

日本不妊学会雑誌

第 32 卷

第 2 号

昭和 62 年 4 月 1 日

原 著

犬の尿道下裂の 2 症例	野村 紘一・他	1
無精子症睾丸組織における Glutathione S-transferase による酵素抗体法の 検討	足立 祐二・他	9
男子不妊症患者精漿の INHIBIN 活性	高木 良雄・他	15
ブタ精巣上体尾部および尾部精子におけるペントースサイクル	伊藤 元博・他	22
流行性耳下腺炎性睾丸炎 30 例の臨床的検討	佐藤 安男・他	28
男子における高プロラクチン血症	皆川 秀夫・他	33
特発性男子不妊症に対する Methylcobalamin の検討 —精漿内 Vitamin B ₁₂ 濃度を中心として—	大橋 輝久・他	38
続発性 hypogonadotropic hypogonadism	布施 秀樹・他	44
インドメサシンのマウス卵胞破裂、卵胞卵子成熟に及ぼす影響	林 清士・他	49
Ovulation Induction in Cases Failing to Respond to Clomiphene Citrate through Administration of Pulsatile LH-RH	Yuji YAMADA・他	57
Hatching 過程におけるマウス胚の走査型および透過型電子顕微鏡観察	千田 智・他	66
性成熟期婦人下垂体および種々の HMG 製剤に含有される LH および FSH の質的・量的な比較検討	浜田 雄行・他	74
下垂体過形成を伴った hypergonadotropic normogonadism の 1 例	好川 元庸・他	84
Naloxone Suppresses Serum Prolactin Levels in Hyperprolactinemic Women with Pituitary Macroadenoma	Katsuyoshi SEKI・他	90
ウサギ体外受精卵のステロイドホルモン合成能と初期胚のステロイドホルモン 環境に関する研究	宮崎 和典	94
子宮筋腫由来培養細胞に対する estradiol-17 β の影響	大塚 治夫・他	102
糖代謝と無月経に関する研究 —特に多嚢胞性卵巣症候群における臨床的解析—	幸村 信行・他	106
Effects of Hachimijiogan, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on Estrogen and Progesterone Secretion in Ovarian Follicles	Satoshi USUKI	114
卵胞液中および血中のステロイドホルモン濃度と下垂体ホルモン濃度に ついて	遠藤 俊明・他	122
超音波断層法による卵管疎通性の評価	高田 久士・他	129
生児を得た子宮内外同時妊娠の 2 例	郡山 智・他	136
Antibiotic Prophylaxis: Significance in Bacterial Flora in Female Internal Genital Organ	Masahiro SAITOH・他	140
島根医大附属病院産科婦人科不妊外来における長期不妊の臨床的統計	高橋健太郎・他	149
当院不妊外来における AIH の統計	山内 宏・他	154
地方部会講演抄録		158

会 告

第32回日本不妊学会総会および学術講演会 (第2回予告)

第32回日本不妊学会総会・学術講演会を下記の要領にて開催いたします。会員の皆様方の多数の御参加をお願い申し上げます。

日時・会場

学術講演会	〔第1日目〕	昭和62年 11月23日 (月・祝日)……	金沢市文化ホール
	〔第2日目〕	11月24日 (火)……	石川厚生年金会館
理事会・幹事会		11月22日 (日)……	金沢市文化ホール
総会・評議員会		11月23日 (月・祝日)……	金沢市文化ホール
		(金沢市文化ホール 金沢市高岡町 15-1 Tel. (0762) 23-1221)	
		(石川厚生年金会館 金沢市石引 4-17-1 Tel. (0762) 22-0011)	

学術講演会

本講演会では、招請講演、特別講演、シンポジウム、一般講演などを行う予定です。

詳細については、追ってお知らせいたします。

一般講演には、多数の演題をお申込み下さいますようお願い申し上げます。なお、ご応募の方は、申込要領に従い、締切期日を厳守して下さい。

一般講演演題申込および発表要項

演題申込資格

講演者（共同発表者も含む）は、本会会員に限ります。会員以外の方は、演題申込みと同時に昭和62年度会費（8,000円）を納入のうえ会員となつて下さい。

演題申込要領

1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプでうち、書留郵便にて下記にお送り下さい。

〒920-91 金沢中央郵便局 私書箱 第77号

第32回日本不妊学会総会事務局 宛

右の
あて
名書
を切
り抜
いて
御
利
用
下
さい。

〒920-91

金沢中央郵便局 私書箱 第77号

第32回 日本不妊学会

総会事務局 宛

2. 抄録は800字以内、図、表はつけないで下さい。
3. 1施設より2題以上の御出題のときは、順位をつけて下さい。
4. 別紙申込書、受取書、採用通知書に所定事項を記入し、抄録用紙および抄録用紙コピー3部とともに送って下さい。
5. 申込締切、昭和62年7月31日
6. 〔付〕

一般演題抄録用紙・申込書などの追加御希望の方は、ハガキにて下記にお申し越し下さい。折返しお送りいたします。

〒920-91 金沢中央郵便局 私書箱 第77号
第32回日本不妊学会総会事務局宛

〔電話でのお問い合わせは、総会事務局（金沢）へお願いいたします。〕

演題発表方法

講演時間は7分、討論時間は2分の予定です。

スライド枚数は10枚以内（35mm）、映写機は1台といたします。

参加申込方法

学会当日、会場にて受付けます。

学会参加費 7,000円

総懇親会費 7,000円

総懇親会は学会第1日の講演終了後、金沢市文化ホールにて行う予定です。

昭和62年4月

第32回日本不妊学会

会長 西 田 悦 郎

第32回日本不妊学会総会事務局

〒920 金沢市宝町 13-1

金沢大学医学部産科婦人科学教室内

（担当：富田嘉昌，杉田直道，荒木克己）

Tel.(0762) 62-8151 内線 3915, 3919

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 32, No. 2, 1987)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Original

- Two Cases of Canine Hypospadias.....*K. Nomura,*
S. Niiya, T. Koreeda & C. Iwata 1
- Immunohistological Studies of Glutathione S-Transferase in Testicular
Tissue of Azoospermia.....*Y. Adachi,*
K. Nonomura & T. Koyanagi 9
- Inhibin Activity in Seminal Plasma of Infertile Males.....*Y. Takagi,*
Y. Kumamoto & G. Watanabe15
- Pentose Phosphate Cycle in the Cauda Epididymidis and Epididymal
Spermatozoa of the Boar*M. Ito,*
Y. Nakaoka, H. Watanabe, K. Egawa & H. Amano22
- A Clinical Study of Mumps Orchitis.....*Y. Sato,*
D. Hirano, H. Kaya, T. Yamamoto, K. Okada & T. Kishimoto28
- Hyperprolactinemia in Men*H. Minagawa,*
H. Fuse, Z. Kataumi, H. Ito & J. Shimazaki33
- Clinical Effect of Methylcobalamin in Idiopathic Infertile Men
—Relationship between Seminal Plasma Vitamin B₁₂ Concentration
and Improvement of Sperm Density and Motility—.....*T. Ohashi,*
A. Nagai, S. Irie, Y. Ohashi, M. Furukawa,
Y. Yamashita, S. Tohjoh, K. Takeda & H. Ohmori38
- A Case of Secondary Hypogonadotropic Hypogonadism.....*H. Fuse,*
H. Sumiya, H. Ishii & J. Shimazaki44
- Effects of Indomethacin on Follicle Rupture and Follicular Egg
Maturation in Mice.....*S. Hayashi,*
Y. Noda H. Matsumoto & T. Mori49
- Ovulation Induction in Cases Failing to Respond to Clomiphene Citrate
through Administration of Pulsatile LH-RH.....*Y. Yamada*
& H. Osada,57
- Time Sequential Observation on Hatching of Mouse Blastocysts by
Scanning and Transmission Electron Microscopy.....*S. Chida,*
S. Uehara, H. Hoshiai & A. Yajima66

Qualitative and Quantitative Characterization of LH and FSH in the Pituitary Glands of Women of Fertile Age and Various HMG Preparations	<i>K. Hamada,</i> <i>H. Suginami, K. Yano & S. Matsuura</i>	74
A Case of Hypergonadotropic Normogonadism with Pituitary Hyperplasia	<i>M. Yoshikawa,</i> <i>K. Okuda, K. Miyazaki, Y. Tsuji, M. Saeki & O. Sugimoto</i>	84
Naloxone Suppresses Serum Prolactin Levels in Hyperprolactinemic Women with Pituitary Macroadenoma	<i>K. Seki & K. Kato</i>	90
A Study on the Steroidogenesis of the Rabbit Eggs Fertilized <i>In Vitro</i> and Steroid Hormone Environment of the Early Embryos	<i>K. Miyazaki</i>	95
Effect of Estradiol-17 β on Cultured Cells Derived from Uterine Leiomyoma	<i>H. Otsuka,</i> <i>K. Yoshida, S. Kusano & Y. Okamura</i>	102
Insulin Resistance and Insulin Receptor Profile of the Patients with PCO	<i>N. Yukimura,</i> <i>K. Katayama & M. Mochizuki</i>	106
Effects of Hachimijiogan, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on Estrogen and Progesterone Secretions in Ovarian Follicles	<i>S. Usuki</i>	115
Steroid Hormones, and Pituitary Hormones Levels in Follicular Fluid and in Peripheral Venous Plasma	<i>T. Endoh,</i> <i>H. Watanabe, H. Yamamoto, S. Tanaka & M. Hashimoto</i>	122
Assessment of Fallopian Tubal Patency by Ultrasound	<i>H. Takada,</i> <i>K. Sengoku, T. Asakawa, M. Ishikawa & T. Shimizu</i>	129
Combined Intrauterine and Extrauterine Pregnancy Carried to Term: Report of Two Cases and a Review	<i>S. Koriyama,</i> <i>S. Inde, F. Mochimaru, T. Seki, K. Lee & R. Iizuka</i>	136
Antibiotic Prophylaxis: Significance in Bacterial Flora in Female Internal Genital Organ	<i>M. Saitoh</i> & <i>S. Usuki</i>	140
Statistical Studies of Long-term Infertile Women in Our Infertile Clinic	<i>K. Takahashi,</i> <i>K. Yoshino, Y. Araki, A. Nishigaki, T. Shirai,</i> <i>M. Kusakari, A. Uchida & M. Kitao</i>	149
Statistical Study of AIH on Infertile Women in University of Tsukuba Hospital	<i>H. Yamanouchi,</i> <i>M. Nishida, K. Katase & H. Iwasaki</i>	154

犬の尿道下裂の2症例

Two Cases of Canine Hypospadias

大阪府立大学農学部

野村 紘一

Koichi NOMURA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture

国立循環器病センター

新谷 聡

Satoshi NIIYA

National Cardiovascular Center Research Institute

大阪府開業獣医師

是枝 哲世

Tetuyo KOREEDA

Veterinary Practitioner in Osaka Prefecture

堺市開業獣医師

岩田 千代蔵

Chiyoze IWATA

Veterinary Practitioner in Sakai city

1年6カ月齢の柴犬並びに2カ月齢の雑種犬において会陰部尿道下裂を観察する機会を得た。前者は腹面に裂隙状に開いた大きな包皮口とその尾側端に位置した短小で発育不全の陰茎を有していた。陰茎基部から会陰部にかけて、正中上に浅い溝が形成されており、これによつて陰囊は左右に振り分けられ、独立した2つの囊を形成していた。陰茎は腹面の索状物(chordee)のために下尾側へ牽引され、屈曲反転していた。また、陰茎には外尿道口の形成がなく、外尿道口は会陰部に開口していた。精巣は陰囊内に良く発達して存在し、精液並びに組織所見は正常であつた。また、hCG 負荷試験にもよく反応した。染色体は $2n=78$, XY型を示した。一方、後者の外陰部並びに外生殖器の所見はほぼ前者と同様であつたが、まだ若齢であることもあつて、陰囊形成や精巣下降は認められなかつた。本例は直腸尿道瘻を有する鎖肛を合併していた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 163-170, 1987)

緒言

我が国におけるイヌの尿道下裂の報告は少ない。最近、Aderら(1978)¹⁾は獣医学領域における動物の尿道下裂に関する総説を著し、その中でイヌの自験例3頭を紹介している。彼はMayorら²⁾の分類にのつとつて尿道下裂を亀頭部、陰茎部、陰囊部および会陰部尿道下裂に

区分している。それによると、彼の症例は2頭が亀頭部尿道下裂で、1頭が会陰部尿道下裂であつたと言う。

我々はこれまでに2例を経験したが、これらはいずれも会陰部尿道下裂であつた。これらについて奇型の概要を報告するとともに、その内の1例についてはhCGの負荷試験を実施し、あわせて精巣組織についても検討したのでその成績を報告する。

材料と方法

症例 1

1年6カ月齢の柴犬で体重8.5kgである。生後2カ月齢で外陰部奇型に気付き大阪府立大学附属家畜病院を訪れたが、その後、研究用にもらい受けたものである。本犬について下記の事項を調査した。

1. 家族歴

本犬の同腹犬および両親について血縁関係並びに奇型の発生状況を調査した。

2. 臨床事項

(1) 外陰部肉眼観察：外陰部の異常について幼犬時から成犬にいたるまでの変化を肉眼的に詳細に観察した。

(2) レントゲン検査：外生殖器を中心に単純レントゲン撮影を行い、骨格系の異常の有無や気腹造影による腹腔臓器とくに内生殖器の異常を、更に外尿道口から逆行性造影を行い、尿道、膀胱の異常の有無などについて検討した。

(3) 性染色質検査：口腔内をガーゼで清拭した後、鋭匙を用いて頬粘膜を擦過し、口腔粘膜上皮を採取した。これをスライドガラス上に伸展し、エーテル・アルコール液で固定、クレジルバイオレット染色を施した。鏡検に際し、核構造の明瞭な細胞を無作為に200個選択し、核膜内壁に存在する楕円形の性染色質の有無を検査して、性染色質の陽性率を算定した。これを先に報告した正常犬の標準値と比較し、雌雄の判別を行った³⁾。

(4) 染色体分析：末梢血中白血球の培養法⁴⁾によつて染色体標本を作成し、染色体の分散が適度で中期分裂像を示す85細胞を核型分析に用いた。またX染色体を除き、染色体は大きさの順に配列し、核型を示した。

(5) 精巢生検：1年6カ月齢で、左右精巢について穿刺生検を実施し、それぞれから液体成分と組織片を採取した。液体成分は精子の有無や活動性の観察に、組織片は組織標本作成のために用いた。

(6) hCG 負荷試験：人の精巢機能不全の検査法の1つであるhCGテスト⁵⁾を本犬に応用し、ラディオイムノアッセイによつて血中テストステロン値(以下T値と略)を測定した⁶⁾。すなわち、hCG投与直前値と4000IU3日連続投与における投与後24時間の各日の値を測定し、その値を比較した。なお、採血は給餌前の午前7時に前腕正中皮静脈から行った。

3. 試験開腹

全身麻酔下で型の如く開腹手術を行い、泌尿生殖器をはじめとする腹腔諸臓器の異常の有無を検査した。

症例 2

2カ月齢のテリア系雑種で、体重576gであつた。症例

1と同様に外陰部異常を主訴として来院し、その後、研究材料として寄贈されたものである。本犬の家族歴等についての詳細は不明であつた。本犬も、外陰部の異常について、可及的詳細に肉眼的検査を実施するとともに性染色質検査を行った。本例は重度の鎖肛を伴つており、発育もはなはだ不良で、次第に排便困難に陥り、腹部の膨満と衰弱が著明となつてきた。予後不良と判断して、安楽死の処置を取り、剖検に付した。その後、直腸・泌尿生殖器の肉眼並びに組織学的検査を実施した。

成 績

症例 1

1. 家族歴

本犬の父犬は2歳で、今までに交配歴がなく、母犬は4歳で初産であつた。本犬以外の同腹子、雌2頭、雄1頭には異常は認められなかつた。父母犬の系統には全く血縁関係はなく、血統に特筆すべき異常も認められなかつた。

2. 臨床的事項

(1) 外陰部肉眼所見：本学における飼育開始時(70日齢)は、本犬は雌があつた外貌を持ち、陰囊の形成もなく、精巢は触知できなかつた。外部生殖器も雌雄の別が判然としなかつた(図6, 7)。外生殖器は正中腹面に大きな裂隙を有する包皮の尾側端に位置し、小指頭大の後方に反転した肉柱塊を形成していた。この先端には外尿道口の形成は見られなかつた(図7)。外尿道口は会陰部正中腹端に位置した乳頭様突起部分にあつて、ここから排尿していた(図8)。本犬は成長とともに外貌も雄らしくなり(図9)、1年6カ月齢では陰囊も形成され、精巢も下降し、十分大きく硬固となつた。しかし、外部生殖器は全体的に発育不十分のままでもどまり、とくに包皮口から会陰にかけて正中上に大きな縦溝が形成され、このために陰囊は左右に独立した2つの囊を形成していた(図12)。また、陰茎様の外生殖器は発育不良で、大きく裂開した包皮腹面尾側端から大きさ3.65cm×1.08cmの肉様突起物となつて弓なりに後下方へ反転していた。この陰茎様外生殖器の基部は陰囊前縁に終つていて、この部分でやや膨大した不完全な亀頭球を形成していた。更に、この部から尾側には海綿体の形成は全く認められず、癩痕化した索状物(chordee)が残存していた。すなわち、陰茎様外生殖器は陰囊の前縁において不完全な亀頭球様構造物を形成し、陰茎体や陰茎根の形成を全く見ずにこの位置で終つていた(図10, 11)。

(2) レントゲン所見：外生殖器の位置に鈎針状に屈曲した発育不全の陰茎骨(*Os penis*)の特異な陰影像が認められた以外に、骨格系、その他には著明な異常は見出

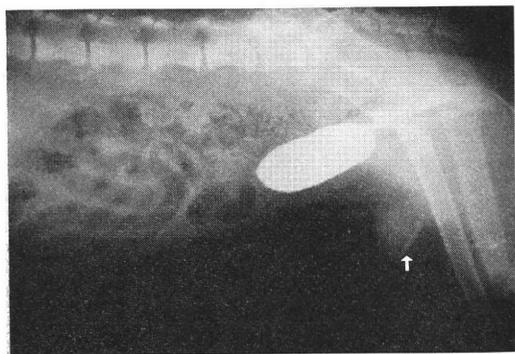


図 1 症例 1. 1 年 6 カ月齢時のレントゲン写真。外生殖器の位置に釣針状の特異な陰莖骨が見られる (↑印)。外尿道口からの逆行性造影の結果、尿道及び膀胱には異常は認められない

せなかつた。また外尿道口から逆行性に造影を行つたところ、尿道並びに膀胱は正常で、直腸尿道瘻などの異常もなかつた (図 1)。

(3) 性染色質検査所見：口腔粘膜上皮細胞による性染色質検査の結果は、性染色質陽性率が10%で、雄性型を示した。

(4) 染色体分析所見：末梢血中白血球の培養法による染色体分析の結果は、図 2, 3 および表 1 に示した通りで、中期分裂像を示す85細胞中、最多の48細胞が染色体数78を示し、いずれも性染色体は XY 型であつた。

(5) 精巢生検所見：陰嚢は左右に2分されているものの、内部の精巢は發育十分で触診上正常健康犬のものと全く変らない大きさや弾力性を有していた。穿刺生検の結果は、多数の活発に運動している精子が観察され、精

子の形態も正常であつた。採取組織片における精巢組織所見も正常であつた (図 4)。

(6) hCG 頁荷試験結果：本犬について hCG テストを実施したところ、図 5 に示す結果が得られた。すなわち、血中 T 量は負荷前値の平均270pg/ml に比べて、負荷後は上昇し、最高1660pg/ml となつて、hCG に十分に反応を示した。

3. 試験的開腹所見

試験的開膜の結果は前立腺の發育が良好で、雌性生殖器などの遺残もなく、半陰陽などの奇型も認められなかつた。

症例 2

1. 臨床的事項

(1) 外陰部肉眼所見：外生殖器は雄型で、包皮口は腹面に大きく裂隙状に開口し、裂隙尾側端にはマツチ頭大の赤色肉様突起物が形成されていた。この突起物から尾側正中腹面に浅い溝が形成され、会陰部に至つていた。この正中に形成された浅い溝の終点には米粒大の開口部があつて、この部分から排尿、排便をしており肛門は閉鎖していた。

また、この溝に沿つて会陰部の排泄口に至る皮下にはやや硬固な組織体があつて、發育不十分な海綿体の存在を

表 1 症例 1 の染色体分析

	染色体数					性染色体	
	75以下	76	77	78	79以上	XX	XY
85細胞中	20	11	6	48	0	0	85

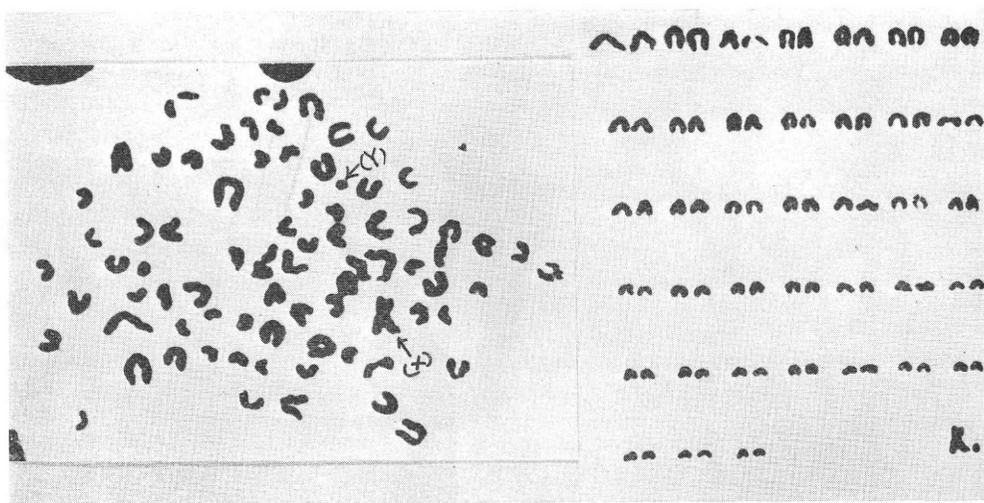


図 2, 3 症例 1. 末梢血中白血球培養法による染色体分析の結果は 2n=78, XY で正常雄型を示している。↑(X)：X染色体，↑(Y)：Y染色体

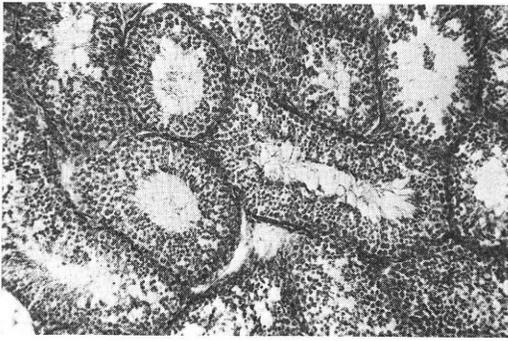


図4 症例1. 性腺の穿刺生検による組織像。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色。×100。ほぼ正常犬の精巣組織像と同様である

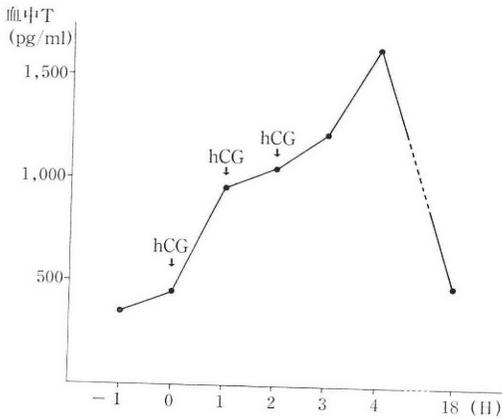


図5 hCG 負荷時のTの変動 (症例1. 採血は負荷直前に行った. T: テストロン. hCG: 妊婦尿性性腺刺激ホルモン)



図6 症例1. 飼育当初 (70日齢) の外貌. やや雌がかった顔付をしている

思わせた. なお, 会陰部には陰囊の形成は見られず, 精巣も存在しなかつた (図13, 14).

(2) レントゲン所見: 排泄口から逆行性に造影剤を注入すると, 大部分は膀胱内に入ったが一部は尿道から直

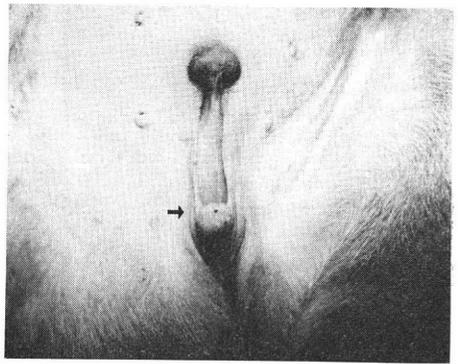


図7 症例1. 飼育当初の外陰部. 腹壁正中には大きな裂隙が形成され, その尾側端には小指頭大の外生殖器 (↑印) が存在している. この部分には外尿道口の形成は見られない



図8 症例1. 飼育当初の会陰部. 腹側端に小乳頭様の突起 (↑印) が見られ, この部分に外尿道口が形成されている. A: 肛門, T: 尾



図9 症例1. 1年6カ月齢時の外貌. 雄らしく精悍な顔貌と体付きになっている

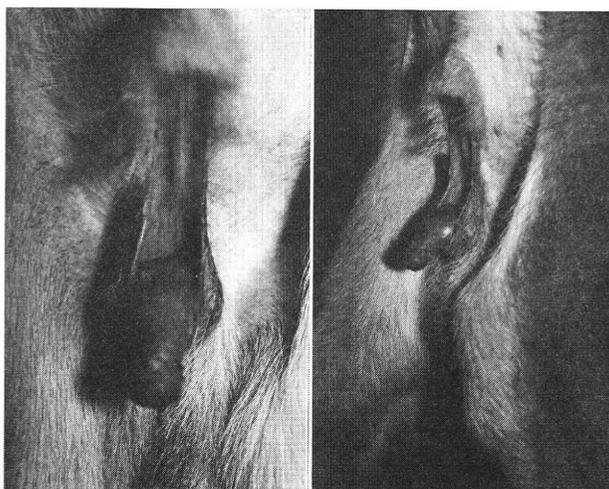


図 10

図 11

図 10, 11 症例 1. 体軀の發育に比して外陰部は發育不全である。裂隙頭側には包皮様の過剰な皮膚皺襞が形成され、裂隙尾側端には母指頭大に大きくなった龟头様肉柱が存在する。これは図11の様に後下方へ反転屈曲している

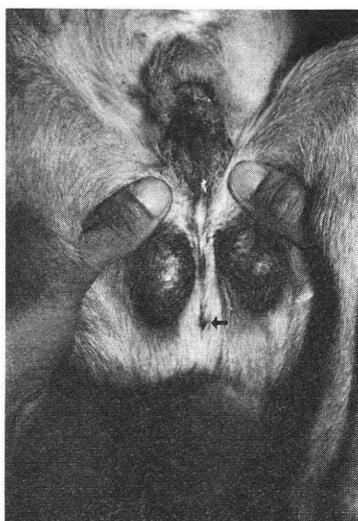


図 12 症例 1. 腹部正中に形成された裂隙は会陰部において浅い溝となり、肛門近くに達している。陰嚢はよく発達しているが、この溝のために左右に2分され、独立した2つの嚢を形成している。嚢内には十分に大きくなった硬固な精巣が存在している。この陰嚢の尾側縁に外尿道口(↑印)が形成されている

腸に流入し、直腸尿道瘻の形成が明らかであった。

(3) 性染色質検査所見：口腔粘膜上皮細胞による性染色質試験の結果は雄性を示した。

2. 内生殖器肉眼所見

左右の發育不全の精巣が精巣上体を伴って鼠径部に存在していた。精管並びに前立腺も形成されていたが、特に異常は認められなかった。著明に膨大した直腸は盲端に終わっていて、尾側腹面に小孔があり、この部と尿道が交通し、直腸尿道瘻を形成していた(図15)。その他の腹腔臓器には特に異常はなかった。

3. 生殖器組織所見

(1) 左右性腺：發育不十分な精巣組織でできており、間質結合繊並びに間細胞は豊富であつたが、細精管内には一層に配列したセルトリ細胞のほかはまだ精細胞の分化は認められなかった(図16)。

(2) 精巣上体管：上体管の形成は良好で、管腔構造は明瞭であつた。内腔は全く空虚で、上体管上皮は一層の円柱上皮でおおわれ、不動毛は認められなかった(図17)。

(3) 精管：背の高い多列の円柱上皮でおおわれた良く発達した管腔内には少量の好中球と粘液が存在していたが、そのほかには特に異常はなかった。

(4) 前立腺：腺腔内に剝離上皮、好中球や粘液様物質が少量存在したほかは、前立腺組織には特に異常は認められなかった。

考 察

ヒトの場合、尿道下裂は泌尿生殖器の奇型の中ではごくありふれたものであるだけではなく、一般の奇型の

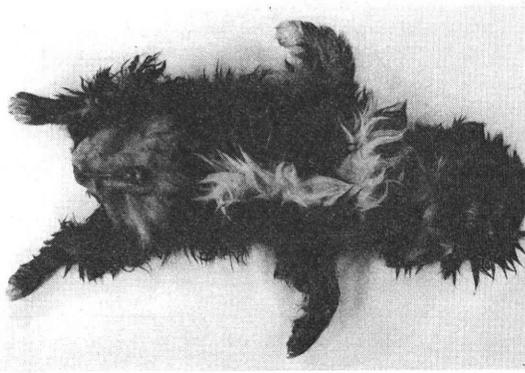


図 13

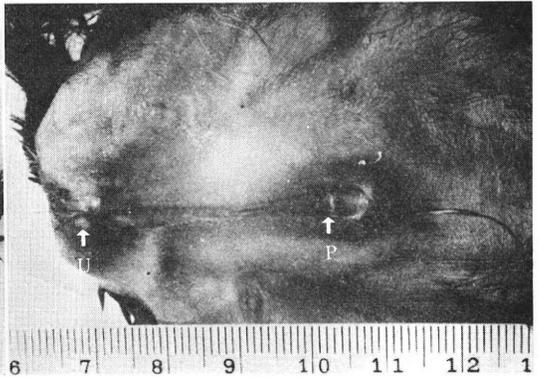


図 14

図 13, 14 症例 2. 外形. 陰茎や陰囊は認められず, 腹部正中には包皮様構造物があつて腹面に大きな裂隙を形成している. この尾側端には外生殖器様突起物 (P) が形成されているが, 外尿道口の形成はない. 外尿道口はこの部から尾側に形成された浅い縦溝の終末部 (U) に存在しているが, 肛門は開口せず, この部分が総排泄口となつている

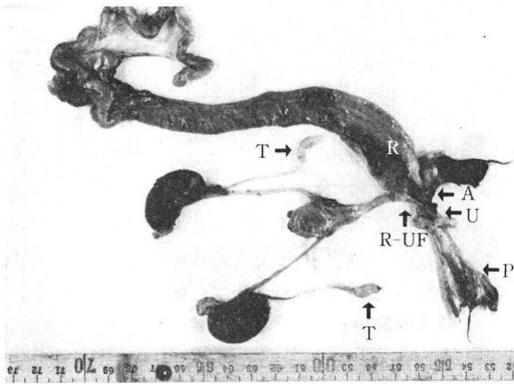


図 15 症例 2. 剖検により摘出された直腸泌尿生殖器. 精巣は精巣上体を伴つて鼠径部に存在している (T). P: 發育不全の陰茎様構造物, U: 総排泄口をなす外尿道口, R-UF: 直腸尿道瘻, R: 拡張した直腸, A: 閉鎖した肛門を示す

中でも発生頻度が高いものの1つと言われている⁷⁾. Malpas⁸⁾ は新生児に対する尿道下裂の発生率を調べ, 870:1であると報告した. Petterson⁹⁾ は500:1, Campbell¹⁰⁾ は0.055~0.625%であるとしている. いずれの場合も女性の発生率は低く, 極めてまれであると言う⁷⁾. 動物, とくにイヌの尿道下裂の発生率については報告例が極めて少ないこともあつて詳細は不明であるが, 多いものではないと思われる.

本症は, ヒトでは生殖ひだの癒合が不完全なまま取り残されることによつて起こる先天異常であると考えられている^{7), 11)}. したがつて, 尿道並びに外生殖器の発生過程のどの段階でこの癒合不全が完成するかによつて数種の型に分類することができる²⁾. 動物の場合もほぼヒトに準じて分類されている¹¹⁾.

Aderら¹⁾ や Bloom¹²⁾ は, イヌの尿道下裂を尿道の開口部が解剖学的にどの位置にあるかによつて, 1) 亀

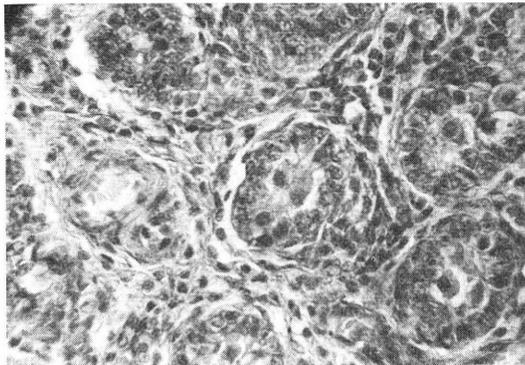


図 16 症例 2. 精巣の組織像. HE 染色. ×400. ほとんど一層の細胞のみからなる管腔組織と, 少量の結合織ならびに間細胞からできた間質組織で構成された未熟な精巣組織

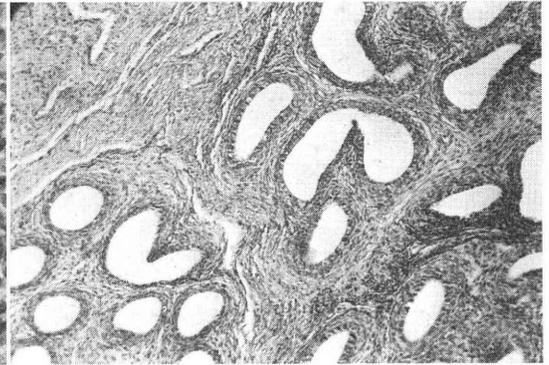


図 17 症例 2 精巣上体の組織像. HE 染色. ×100. よく発達した管腔組織からできているが, 内腔は空虚である

頭部下裂 (glandular hypospadias), 2) 陰茎部下裂 (penil hypospadias), 3) 陰囊部下裂 (scrotal hypospadias), 4) 会陰部下裂 (perineal hypospadias) の 4 型に区別している。これによると、我々の症例 1 および 2 はともに会陰部下裂に属する。症例 1 は Ader¹⁾ の報告例よりは更に重篤なものと考えられた。すなわち、尿道開口部が会陰部に存在し、外尿道口から亀頭腹面にかけて包皮が欠損しており、その部分には長くて一部分に幅の広い縦溝が形成されていた。そのために陰囊は左右 2 個に振り分けられ、それぞれ独立した囊を形成していた。また陰茎の背側には、包皮がむしろ過剰に形成されているために包皮は頭側から腹側へまわり込んだ状態となつて、会陰部からの下裂溝の延長上に幅の広い裂隙状の包皮口を形成していた。陰茎は腹側の索状物 (chordee) のために下尾方へ牽引され、反転屈曲していた。これらの状況はヒトの尿道下裂の内の重度な症例の特徴^{7), 11)} とよく一致していて興味深い。

動物の尿道下裂においてもヒトの場合と同様に他の泌尿生殖器の奇型と合併する場合がある。重篤なものでは半陰陽¹⁰⁾ 並びに片側腎欠損¹⁴⁾ や鎖肛¹⁵⁾ なども報告されている。ヒトでは精巣下降不全が多いと言われている⁷⁾、前述した Ader¹⁾ のイヌの 3 例では合併奇型は認められなかったが、我々の症例 2 では直腸尿道瘻を有する鎖肛を合併していた。また、精巣も下降していなかったが、本例は剖検の時点でまだ 2 カ月齢であったこともあつて、陰嚢のままの状態で成熟したかどうかは不明である。

尿道下裂の発生原因については不明の点が多いとされているが、ヒトの場合は女性よりも男性に頻度が高いところから、胎児精巣の男性ホルモン生成不足が原因であろうとする報告¹⁰⁾ も見られる。しかし、我々の症例 1 は陰嚢が左右に 2 分されているものの、精巣下降も正常に完了し、成育したのちの精巣生検による精子並びに精巣組織所見もほぼ正常であつたこと、また、末梢血中 T 値にも特別異常が認められなかったこと、更に、hCG 負荷試験においてもよく反応したことなどの所見から考え合せて、本例の場合は胎仔期に性腺の発生異常が存在したとは考え難い。本例はむしろ、胎仔精巣からのホルモン分泌は正常であつたが、その標的器管である外生殖器などの関連臓器の感受性に問題があつたのではないかと想像される。あるいは、胎仔精巣からのホルモン分泌とそれらの標的器官の発生過程との時間的同調に問題があつたのかもしれない。Wilson¹⁷⁾ は妊娠ラットにビタミン A の欠乏を起させると、その胎仔に尿道下裂が発生したと言う。また、ヒトの場合は家族集積性の傾向や特定の染色体異常との関係などが注目されている⁷⁾。しかし、

我々の症例 1 では同腹犬並びに両親の血統に特筆すべきものがなく、かつ、末梢血中白血球の培養法による染色体分析の結果も染色体数や性染色体には特別異常がなかった。このように、尿道下裂はその原因が単に胎生期のホルモン分泌異常や染色体異常だけではなく、環境要因なども関与する可能性のある複雑な先天性疾患であると考えられる。これらの原因究明のためには、今後、更に突き進んだ研究が望まれる。

伴侶動物の場合、本奇型が単独で発生している症例では特に生命に直接危険を伴うことが少ない場合が多いところから、ヒトの場合と同様に外陰部の整形によつて治療が行われる^{1), 18)}。これは優生学的見地から決して好ましいことではないので、できるだけ去勢を合せ行うか、もしくは淘汰すべきであろう。

終りにあたり、御校閲を賜つた本学家畜病理学教室堀内貞治教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Ader, P. L. and Hobson, H. P.: Hypospadias: A review of the veterinary literature and a report of three cases in the dog. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 14: 721, 1978.
- 2) Mayor, G and Zingg, E. J.: Urologic surgery. p 394, New York, John Wiley and Son, 1976.
- 3) 野村紘一, 蘭守龍雄, 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.
- 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) 志田圭三, 伊藤善一, 北浦宏一: 内分泌負荷試験 10. 男性ホルモン, ホルモンと臨床, 2381, 1975.
- 6) 稲葉俊夫, 清水亮佑, 蘭守龍雄: 雄イヌ血中 4-Androstenedione, Testosterone および 5 α -Dihydrotestosterone の動態, 家畜繁殖誌, 23: 63, 1977.
- 7) 田中 修: 腹膜後隙および骨盤の奇型, 現代外科大系, 奇型 II 8B: 86, 中山書店, 1974.
- 8) Malpas, P.: The incidence of human malformation and the maternal environment in their causation. J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm. 44: 434, 1957.
- 9) Pettersson, F.: Meclozine and congenital malformation. Lancet 1: 675, 1964.
- 10) Campbell, M. F.: Clinical Pediatric Urology, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1951.
- 11) 間藤方雄: 入門人体発生学, p103, 南江堂, 1977.
- 12) Bloom, F.: Pathology of the dog and cat, p 194, American Veterinary Publications, 1954.

- 13) Dain, A. R. : Intersexuality in a cocker spaniel dog. *J. Reprod. Fert.* 39 : 365, 1974.
- 14) McFarland, L. Z. and Deniz, E. : Unilateral renal agenesis with ipsilateral cryptorchidism and perineal hypospadias in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 139 : 1099, 1961.
- 15) McFarland, L. Z. : Perineal hypospadias in a male lamb. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 133 : 81, 1954.
- 16) Moore, K. L. : 人体発生学 (星野訳), p 269, 医歯薬出版, 1977.
- 17) Wilson, J. G. and Warkany, J. : Malformations in the genitourinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in the rat. *Amer. J. Anat.* 83 : 357, 1948.
- 18) Johnston, D. E. : Male genital system, in *Canine Surgery*. Archibald, J., ed., p 614, Amer. Vet. Publication Inc., 1965.

Two cases of canine hypospadias

Koichi Nomura

College of Agriculture, University
of Osaka Prefecture

Satoshi Niiya

National Cardiovascular center
Research Institute

Tetuyo Koreeda

Veterinary Practitioner in
Osaka Prefecture

Chiyozeu Iwata

Veterinary Practitioner in
Sakai city

Canine hypospadias has been rarely reported especially in Japan. Recently, two cases of it were observed in the Teaching Hospital for Animals of the University of Osaka Prefecture.

The first case was found in an one and half year-old male Shiba dog, which had a blunt and bent penis posteriorly with no urethral opening. A narrow cleft at the midline raphe separated both sides of the scrotum and testicles, and the urethral opening was present in the perineum. This dog was nearly in normal conditions in the morphology of sperms and testicular tissues obtained by the needle biopsies, in the function of testosterone production tested with load by injection of hCG, and moreover, in the number and type of chromosomes analyzed by the cultured peripheral leucocytes. This dog had no other abnormalities besides this perineal hypospadias.

The second case was seen in a two-month old mongrel male dog which had almost the same conditions in hypospadias as the first case. Formation of the scrotums and indescend of the testicles were not observed because of his immaturity. The dog also had another abnormality which was atresia ani with lectum-urethral fistula formation.

Causes of hypospadias are still obscure in detail. In the first case, however, it could be supposed that this hypospadias might be induced by defective or insufficient sensitivity of the external urogenital system in fetus for testosterone which had been produced by embryonic testicles, because the functional testicles were present at the time of the examination.

(受付 : 昭和61年7月18日)

無精子症睾丸組織における Glutathione S-transferase による酵素抗体法の検討

Immunohistological Studies of Glutathione S-Transferase in Testicular Tissue of Azoospermia

北海道大学医学部泌尿器科 (主任: 小柳知彦教授)

足立 祐二 野々村 克也 小柳 知彦
Yuji ADACHI Katsuya NONOMURA Tomohiko KOYANAGI
Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine
(Director: Prof. Tomohiko Koyanagi)

滝川市立病院泌尿器科

小杉 雅郎
Masao KOSUGI

Department of Urology, Takikawa City General Hospital,
Takikawa, Hokkaido, Japan

無精子症10例の睾丸組織に対して Glutathione S-transferase の抗体を用い、酵素抗体法にて染色を行ない、間質細胞の形態を評価するとともに症例の GnH 基礎値と比較検討した。

1. 精路通過障害例では、LH は正常で、睾丸組織は Leydig 細胞が染色され、各分化段階がみられた。
 2. 造精障害例では、LH が正常のものでは Leydig 細胞の分布も正常に近く、高いものでは hyperplasia の所見を示した。
 3. Klinefelter syndrome では LH は高く、adenomatous Leydig cell hyperplasia を示した。
- 以上より、GST の PAP 染色は、Leydig 細胞の分布・機能を評価するうえで有用であり、それは血中 LH 値と関連していた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 171-176, 1987)

緒言

Glutathione S-transferase (以下 GST と略す) は、ヒト各種臓器に分布する酵素であるが、成人男子睾丸組織において Leydig 細胞にその局在が知られている。

今回我々は、無精子症の診断で生検された睾丸組織に対し、GST の抗血清を用い酵素抗体法にて染色を行ない、その内分泌環境について検討を加えた。

対照および方法

1) 対照

昭和51年から昭和58年までの8年間に、当科外来で無精子症と診断され、睾丸生検された10症例の睾丸組織を

利用した。

2) 方法

A. スクリーニング法 (表1)

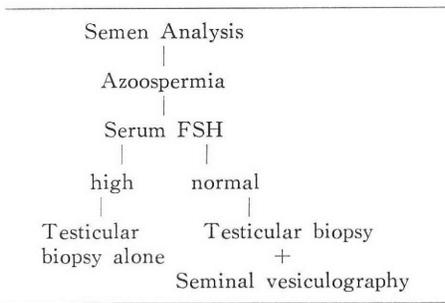
図1に示す如く、不妊などの訴えで当科を受診した症例に対し、詳細な病歴聴取と泌尿器科的診察を行ない、禁欲下(4~5日間)の精液検査で無精子症と診断された際には、まず内分泌検査として血中 LH・FSH・Prolactin の基礎値を測定し、次いで局麻下で開放性睾丸生検を施行した。

その際、精管造影は血中 FSH 値が正常範囲の症例のみ施行した¹⁾。

B. 免疫組織学的方法

採取された睾丸組織は、10%ホルマリンあるいはブア

表 1 Clinical Approach of Azoospermia



ン液で固定し、パラフィン包埋薄切標本を脱パラフィン後、HE 染色法ならびに Sternberger²⁾ の peroxidase anti-peroxidase 法 (以下 PAP 法と略す) に準じた indirect immunoperoxidase sandwich method により行なつた。

PAP 法は、ヒト腎正常皮質部より精製した GST³⁾ をウサギに免疫して得た抗血清を一次抗体として用いた。なお対照実験は DeLellis⁴⁾ の方法にて行ない、ヘマトキシリンによる対比染色後も観察を行なつた。

結 果

無精子症10例の年齢は、21歳から35歳で、平均30歳であり、内訳は精路通過障害2例で1例は先天性、他の1例はヘルニヤ手術に起因すると思われた。造精機能障害8例の中には、immotile cilia syndrome 1例、Klinefelter syndrome 1例を含み、流行性耳下腺炎の既往のあるものが4例みられた。

全10症例の概略を表に示し代表症例を供覧する(表2)。

症例 1

21歳の症例で中学時より肺炎を繰り返し、内科より immotile cilia syndrome あるいは cystic fibrosis 等の関連で精液検査を依頼された。触診上、右睾丸容量は15

cc、左は12ccとほぼ正常大で、精液は1cc以下の無精子症であった。内分泌検査では、血中 FSH 6.7mIU/ml, LH 10.8mIU/ml と正常範囲内であつた。精管造影では、図1の如く矢印のあたりで精管内の造影剤は両側中断しており、精路通過障害による無精子症と診断された(図1)。

睾丸生検組織の HE 染色は、精細管の形態ならびに精子形成能も良好で、基底膜の肥厚および間質の浮腫も見当らなかつた(図2a)。

PAP 染色で、間質部分に細胞質が染まつた Leydig 細胞がみられ、その形態も未分化から成熟細胞まで段階があり、精細管など他の部分は染色されなかつた(図2b)。

組織・内分泌所見とあわせ、ほぼ正常成人睾丸に近い所見とおもわれた。

症例 3

精液中に固形物が混じると訴え受診した23歳の症例で、幼稚園時に流行性耳下腺炎に罹患した既往がある。

両側睾丸は正常大で、血中 FSH 16.5mIU/ml, LH 13.9mIU/ml と正常上限であつたが、精液検査で無精子症の診断を受けた。

睾丸生検組織の HE 染色は、精細管内細胞が Sertoli 細胞で line され、わずかに primary spermatocyte が存在し、基底膜の若干の肥厚が見られた(図3a)。

PAP 染色で、間質部分に Leydig 細胞が染色され、形態分布としては精路通過障害(症例1,2)にみられた睾丸組織の PAP 染色所見とほぼ一致しており、正常の睾丸 Leydig 細胞分布に近いものと判断した(図3b)。

症例 9

不妊を主訴として受診した31歳の症例で、小学時に流行性耳下腺炎に罹患している。両側睾丸容量は2ccで、血中 FSH 70mIU/ml, LH 68mIU/ml と共に上昇を示していた。

睾丸生検組織の HE 染色は、精細管の狭小化と管内

表 2 Testicular Histology and Basal Gonadotrophin Levels in Patients with Azoospermia

Case	Age (Y)	FSH (mIU/ml)	Seminiferous tubules in HE staining	LH (mIU/ml)	Leydig cell in PAP staining
1.	21	6.7	spermatogenesis (+)	10.8	normal distribution
2.	29	13.1	spermatogenesis (+)	17.2	normal distribution
3.	23	16.5	Sertoli~primary spermatocyte	13.9	almost normal distribution
4.	35	4.8	Sertoli cell alone	11.6	almost normal distribution
5.	33	—	Sertoli cell alone	—	almost normal distribution
6.	31	19.0	Sertoli cell alone	24.1	mild hyperplasia
7.	25	—	Sertoli cell alone	—	mild hyperplasia
8.	32	55.2	Sertoli cell alone	44.3	diffuse hyperplasia
9.	31	70	primary spermatocyte	68	diffuse hyperplasia
10.	29	56.9	ghost tubules	34	adenomatous hyperplasia

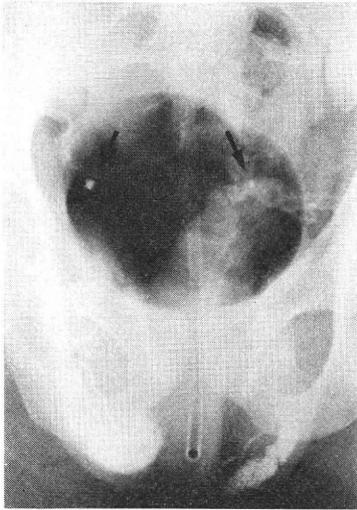


図 1 症例 1—Seminal vesiculography
(矢印で精管は両側中斷している)

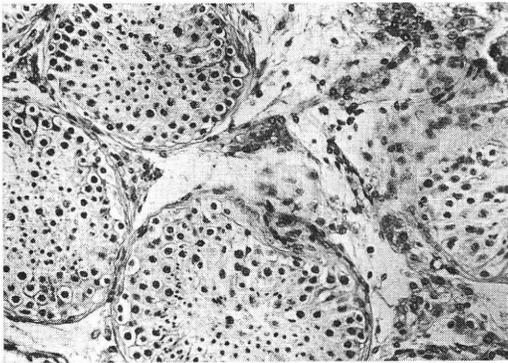


図 2a 症例 1—HE staining (×200)

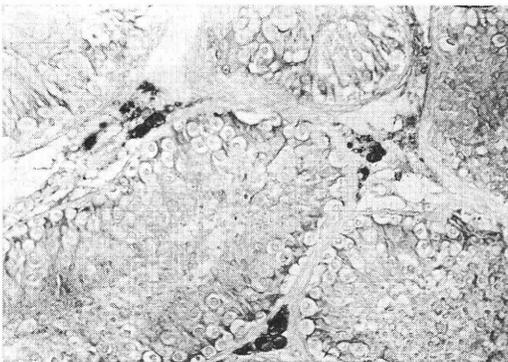


図 2b 症例 1—PAP staining (×100)

細胞はわずかに primary spermatocyte が存在するのみで、間質は浮腫状であつた (図 4 a).

PAP 染色では、Leydig cell hyperplasia を呈していた (図 4 b).

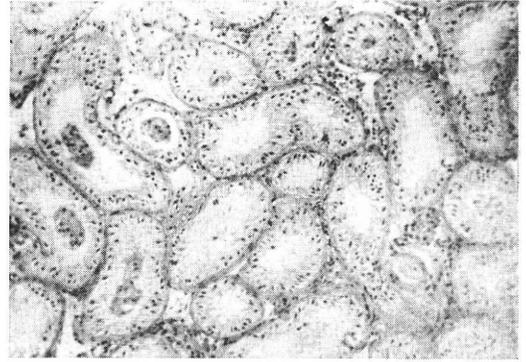


図 3a 症例 3—HE staining (×100)

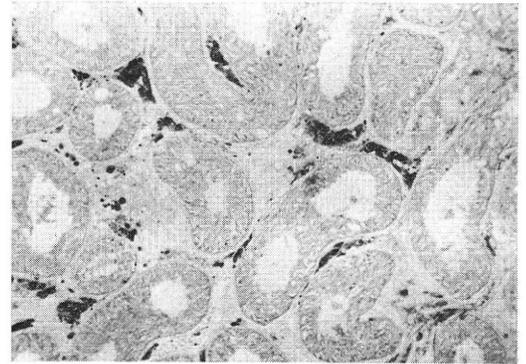


図 3b 症例 3—PAP staining (×100)

症例 10

不妊で訪れた 29 歳の症例で、触診上両側睾丸は小指頭大であり、長身および外性器所見により染色体検査を行ったところ、47XXY/48XXXYmosaic の Klinefelter syndrome と診断された。

血中 FSH 56.9mIU/ml, LH 34mIU/ml と高値を示し、睾丸組織の HE 染色は、標本の範囲では精細管構造が失われており ghost tubules となり、空胞化した Leydig 細胞で占められていた (図 5 a)。

PAP 染色で染色された Leydig 細胞は、高度の過形成を呈し、類腺腫化した集簇像 (adenomatous hyperplasia) が特徴であつた (図 5 b)。

以上の如く、10 例の睾丸組織の HE・PAP 染色と内分泌学検査との結果を比較検討したところ、精路通過障害 2 例 (症例 1, 2) は、双方とも血中 FSH・LH に異常なく、睾丸組織像にても精子形成能は保たれており、PAP 染色では Leydig 細胞の正常の分布を示していた。

一方、造精機能障害例 (症例 3~10) は、内分泌学的には FSH はもとより 8 例中 4 例 (測定未施行含め 5 例) に LH も高値を示した。そして睾丸組織像としては、Sertoli cell only syndrome というべき所見から pri-

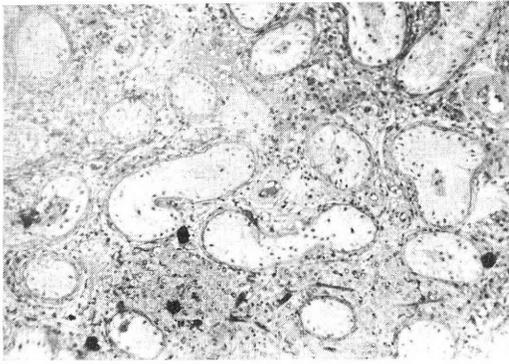


図 4a 症例9—HE staining (×100)

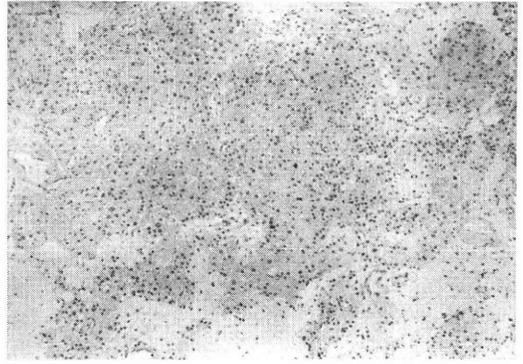


図 5a 症例10—HE staining (×100)

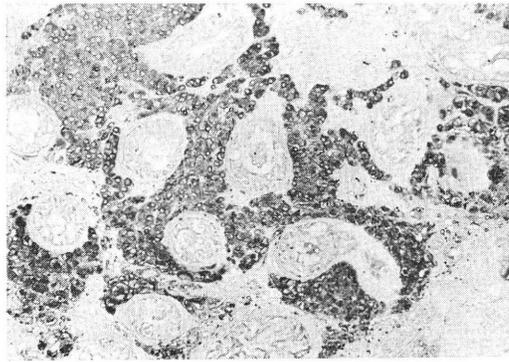


図 4b 症例9—PAP staining (×100)

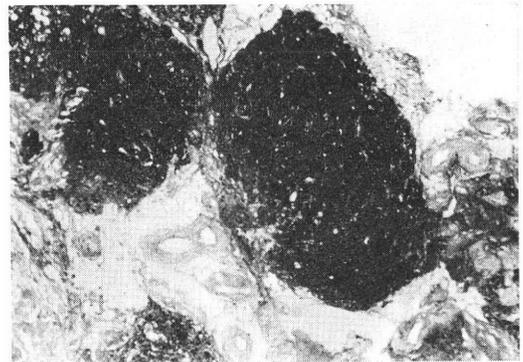


図 5b 症例10—PAP staining (×100)

mary spermatocyte の混在までみられたが、精子形成能はなく、PAP 染色では、LH 値が正常なものは Leydig 細胞が正常な分布を、LH 値が高値なものは辜丸局所の所見としては Leydig cell hyperplasia を呈していた。

考 察

GST は、各種反応物質と還元型グルタチオン (GSH) との抱合を触媒する酵素として知られ、肝に最も強い活性があるほか、腎・脾・肺・脳・筋・胎盤などにも広く分布している。

Campbell ら⁵⁾は、ラット由来 GST から抗体を作成し、各種ヒト組織中の GST 分布を PAP 染色法を用いた免疫組織学的手法で検討しているが、特にステロイド産生に関連した副腎の網状層・辜丸 Leydig 細胞・卵巣顆粒膜細胞にも局在していると述べている。また実際に Benson ら⁶⁾は、GST がステロイド合成の Δ^5 -3-ketosteroid isomerase 作用を有すると報告しており、その役割に関しては今後さらに検討されるべきものと思われる。

小杉は、ヒト腎より独自に GST を精製し、その抗体

による PAP 染色法で、ヒト胎児組織の肝・腎・副腎における GST の出現時期⁹⁾ならびに腎細胞癌の組織学的構築・細胞型との関連性⁹⁾について報告した。今回は、同じ抗体を用いて不妊男子、特に無精子症の辜丸組織に注目し PAP 染色を行なうと同時に、ゴナドトロピン (GnH) 値との関係についても比較検討してみた。

Nistal ら⁸⁾は、辜丸間質における Leydig 細胞の hyperplasia について触れ、その分布・形態を表3の如く、① focal hyperplasia, ② diffuse hyperplasia, ③ adenomatous hyperplasia の3種類に分け (表3), それぞれの病態について述べているが、今回 GST 抗体による PAP 法で無精子症辜丸を染色したところ、やはり Sertoli cell only syndrome というべき、辜丸には明らかな間質 Leydig 細胞の diffuse hyperplasia がみられ、LH 値の上昇と良く相関し、LH 基礎値が正常のものは Leydig 細胞も正常に近い分布を示していた。また症例10に示した様に Klinefelter syndrome の場合、矮小辜丸が思春期以降も高 GnH にさらされ続けたのか精細管構造が消退し ghost tubules となり、一方 Leydig 細胞は“みかけ”上増殖した、adenomatous hyperplasia の像⁹⁾を呈していたが同様の所見は Nistal ら⁸⁾も述べてお

表 3 Leydig cell hyperplasia

1) focal hyperplasia
severe tubular atrophy
diffuse tubular sclerosis
of cryptorchid testis
sclerosis postmumps-orchitis
2) diffuse hyperplasia
Del Castillo's syndrome
(Sertoli cell only syndrome)
Klinefelter syndrome
maturation arrest at the level
of primary spermatocytes
advanced stages of varicocele
some cryptorchid testes
3) adenomatous hyperplasia
Klinefelter syndrome (47XXY)
(Nistal M. 1984)

り大変興味深い。

一般に、不妊睾丸の間質細胞機能については、諸家の報告によると¹⁰⁻¹²⁾ 乏精子症・無精子症・Klinefelter syndrome の順に血清テストステロン (T) 基礎値は低下し、GnH 基礎値は上昇する傾向にあるとされている。同じ無精子症睾丸においても T 値が当然 feed back 機構の形で GnH 放出に関与し、結果として Leydig 細胞の正常から hyperplasia までの分布が見られるとされている。したがってその機能に関しては正常睾丸と比較し、高 LH を示す症例では、T 産生能が不十分であることが予想される。

一方、稀であるが LH 刺激によらない Leydig cell hyperplasia を示す例として、Schedewie ら¹³⁾ は、兄弟に起こった家族性性早熟症を報告している。そのような Leydig 細胞の hyperplasia が GnH 刺激 (内因性) による二次的なものか、あるいはすでに自律性をもった増殖によるものかという際にも、血中ホルモン動態とともに、GST による Leydig 細胞の PAP 染色は有用であろう。今後不妊睾丸のみならず性分化異常症における性腺組織^{14,15)} および睾丸腫瘍についてもさらに検討を加える予定である。

まとめ

無精子症睾丸組織 10 例で Leydig 細胞の形態を知る目的で、GST 抗体による PAP 染色を行なった。

1. 精路通過障害例では、LH は正常で、睾丸組織は Leydig 細胞が染色され各分化段階がみられた。

2. 造精障害例では、LH が正常のものでは Leydig 細胞の分布も正常に近く、高いものでは hyperplasia

の所見を示した。

3. 特に、Klinefelter syndrome では adenomatous Leydig cell hyperplasia を示した。

以上、無精子症患者の睾丸は、GnH の作用を反映し、精細管の変化とともに間質細胞も変化している例があることを示した。

(本論文の要旨は、第28回日本不妊学会北海道地方部会学術講演会において発表した。)

文 献

- 1) 榊原尚行, 中西正一郎, 野々村克也, 小柳知彦: 当科男子不妊症症例の内分泌環境について, 日不妊誌, 29: 407, 1984.
- 2) Sternberger, L. A.: The unlabeled antibody peroxidase antiperoxidase (PAP) method. In: Immunocytochemistry, 1st ed. p. 104~169, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- 3) 小杉雅郎: ヒト腎 Glutathione S-transferase の研究—生化学的ならびにヒト胎児における組織化学的検討—, 日泌尿誌, 76: 1215, 1985.
- 4) DeLellis, R. A., Sternberger, L. A., Mann, R.B., Banke, P.M. and Nakane, P.K.: Immunoperoxidase technique in diagnostic pathology. Am. J. Clin. Pathol. 71: 483, 1979.
- 5) Campbell, J. A. H., Bass, N. M. and Kirsch, R. E.: Immunohistological localization of ligandin in human tissues. Cancer, 45: 503, 1980.
- 6) Benson, A. M., Talalay, P., Keen, J. H. and Jakoby, W. B.: Relationship between the soluble glutathione-dependent 4^β-3-ketosteroid isomerase and glutathione S-transferases of the liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 158, 1977.
- 7) 小杉雅郎: 正常腎および腎細胞癌組織内の Glutathione S-transferase の局在と病理組織学的検討, 日泌尿誌, 77: 31, 1986.
- 8) Nistal, M. and Paniagua, R.: Testicular and epididymal pathology. p. 110, Thieme-Serattion Inc., New York, 1984.
- 9) 鎮目和夫, 出村 博: 臨床検査法, 232, 講談社サイエンティフィック, Japan.
- 10) Ishida, H., Isurugi, K., Aso, Y., Takayasu, H. and Tamaki, B.: Endocrine studies in Sertoli cell only syndrome. J. Urol., 116: 56, 1976.
- 11) 今野 稔, 穂坂正彦, 岩崎 皓, 西村隆一, 高井修道: 男子不妊症における睾丸間質細胞機能について, 日不妊誌, 21: 407, 1976.
- 12) Monica, S. B. and Richard, H.: Leydig cell function in Klinefelter's syndrome. Metabolism, 22: 875, 1973.
- 13) Schedewie, H. K., Reiter, E. O., Beitin, I.

Z., et al. : Testicular Leydig cell hyperplasia as a cause of familial sexual precocity. *J. Clin. Endo. and Meta.*, 52 : 271, 1981.

- 14) 足立祐二, 野々村克也, 小柳知彦, 藤枝憲二, 松浦信夫: 睾丸における glutathione S-transferase の組織学的検討—特に mixed gonadal dysgenesis 5 例の内分泌環境との比較, 日本内分泌学会雑誌予稿集, 62 : 417, 1986.
- 15) 足立祐二, 野々村克也, 小柳知彦, 小杉雅郎, 藤枝憲二, 松浦信夫: 男子仮性半陰陽及び類似疾患の性腺における Ligandin の PAP 染色と HCG テスト, 第53回北海道ホルモン同好会講演.

Immuohistological studies of glutathione S-transferase in testicular tissue of azoospermia

**Yuji Adachi, Katsuya Nonomura
and Tomohiko Koyanagi**

Department of Urology, Hokkaido
University School of Medicine
(Director : Prof. Tomohiko Koyanagi)

Masao Kosugi

Department of Urology, Takikawa
City General Hospital, Takikawa,
Hokkaido, Japan

The testicular tissues of azoospermia were studied in 10 patients by peroxidase antiperoxidase (PAP) using the primary antibody for glutathione S-transferase(GST), and the staining characteristics were correlated with serum LH levels.

The results are summarized as follows :

1. In the obstruction of vas deferens, the level of serum luteinizing hormone(LH) was within normal limit, and Leydig cells showed normal distribution with varying stages of differentiation.

2. In severe seminiferous tubular lesion, distribution of Leydig cells were either nearly normal when LH level was normal, or hyperplastic when LH level was high.

3. In Klinefelter syndrome with high LH level, the lumps of Leydig cells constituted a so-called adenomatous hyperplasia.

These results suggest that the PAP staining of GST in the testicular tissue is an useful method for evaluating the stromal characteristics and distribution pattern of Leydig cells and they reflected well the ongoing serum LH levels.

(受付 : 昭和61年6月18日)

男子不妊症患者精漿の INHIBIN 活性

Inhibin Activity in Seminal Plasma of Infertile Males

札幌医科大学泌尿器科 (主任: 熊本悦明教授)

高木良雄 熊本悦明

Yoshio TAKAGI Yoshiaki KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical College
(Director: Prof. Y. Kumamoto)

札幌医科大学解剖学教室 (主任: 高橋杏三教授)

渡辺 勇一

Yuichi G. WATANABE

Department of Anatomy
(Director: Prof. K. Takahashi)

ヒト精漿中 inhibin の rat 下垂体 gonadotropin 分泌におよぼす抑制作用を検討した。また、男子不妊症患者における inhibin の動態を調べるため rat pituitary incubation の方法を用いて、男子不妊症患者精漿中 inhibin 活性を測定し、次の結果を得た。

1. 34日齢 rat 去勢後に、charcoal 処理ヒト精漿を投与することにより、血中 FSH の上昇が抑制された。また、LH の上昇も軽度抑制された。2. 男子不妊症患者において、無精子症患者では、精漿中 inhibin 活性が低値を示す傾向が認められた。また、睪丸組織所見において、高度の精子発生能障害患者と比較して、精漿中 inhibin 活性が低値を示した。以上より、精子発生能障害が高度の患者では、inhibin の分泌が低下している可能性が示唆された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 177-183, 1987)

緒 言

精子形成には、LH が睪丸の間質細胞に働いて分泌される testosterone と FSH が共同して働いているが、近年、下垂体からの FSH の分泌を調節する因子として、inhibin が睪丸から分泌されていることが明らかとなった。Inhibin とは、McCullagh¹⁾ が1932年、“去勢動物の下垂体に出現する去勢細胞の出現を抑制する精巣からの水溶性抽出物質”として命名したものであるが、現在では、“性腺で産生される水溶性で、下垂体からの FSH 分泌を特異的に抑制する作用をもつ物質”と解釈されている。

Inhibin の産生部位が、雄においては Sertoli cell で

あることは既に明らかとなっている²⁾。Sertoli cell より分泌された inhibin は、大部分が精巣網 (rete testis) や副睪丸頭部で吸収されるが、一部はそのまま精液中に残る。血中に入った inhibin は希釈され、また排泄されるために低濃度となるが、精液中には inhibin が高濃度に存在する³⁾。精子発生能における視床下部-下垂体-性腺系のホルモン調節機構は、inhibin に関する研究で、次第に明らかとなつてきている。男子不妊症患者における inhibin の動態を研究することは、精子発生能に関するホルモン調節機構を知る一助となると思われる。

著者らは、ヒト精漿中 inhibin が rat gonadotropin 分泌を抑制することを確認し、不妊症患者精漿中の inhibin 活性を測定したので報告する。

対象および方法

1. 男子不妊症症例

札幌医大泌尿器科不妊外来を受診した男子不妊患者のうち、無精子例10例、乏精子症 ($0 < < 40 \times 10^6$ count/ml) 20例、正常精子数患者 ($> 40 \times 10^6$ count/ml) 20例について精漿中 inhibin 活性を測定した。

2. 実験 rat

去勢 rat の実験には34日齢雄 S. D. rat を用いた。また pituitary incubation には、22-24日齢雄 S. D. rat を使用した。去勢法は、rat エーテル麻酔後、陰囊切開にて、両側睾丸を摘出し、絹糸にて切開部を縫合した。

3. 精液の採取および charcoal 処理

男子不妊症患者の精液を用手法で射精させ採取した。液化後、精液量、精子数などを測定した。その後、 $2000 \times G$ 30分間遠沈を行ない、上清を採取し精漿とした。

精漿は、steroid hormone を除去するため、生理食塩水に混じた200mg/ml の charcoal を精漿に同量加え、24時間 $4^\circ C$ で保存し、 $2000 \times G$ 30分間遠沈し、charcoal を取り除いた。この処理により、精漿中 testosterone は、charcoal 処理前39ng/dl に対し、処理後は測定感度以下 ($5ng/dl$ 以下) まで低下した。また、基礎的検討の際には、正常精子数患者の精漿を使用した。

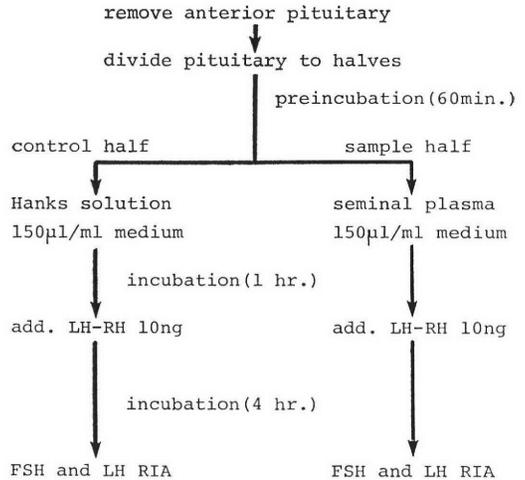
4. FSH と LH の測定

Rat 血清中および pituitary incubation を行なった培養液中の FSH と LH の測定は、NIAMDD-pituitary Agency より提共を受けた kit を使用し、2抗体法で radioimmunoassay を行なった。標準品は、FSH は FSH-RP-1、LHは LH-RP-2を使用した。なお、intraassay coefficient variation は FSH 7.66%、LH 3.58%、interassay coefficient variation は FSH 9.75%、LH 7.86%だった。

5. Rat anterior pituitary incubation 法

22-24日齢雄 S. D. rat (体重47-59g) の下垂体をできるだけ傷つけないように摘出した。これを正中断し、30分から1時間 preincubation を行なった。Preincubation 後、一方を Hanks' solution $150\mu l$ を加えた培養液に入れ control とし、他方は charcoal 処理ヒト精漿を $150\mu l$ 加えた培養液に入れ、1時間 incubation を続けた。1時間の incubation 後、双方に10ng の LH-RH を加え、4時間さらに incubation を行ない、LH-RH による gonadotropin 分泌刺激状態での、培養液中への FSH と LH の放出を測定した (図1)。

培養液は、199に7.5% horse serum, 5% fetal calf serum を加えたものを使用し、添加する試料や Hanks' solution, LH-RH などに加えて最終的に1つの培養皿



Incubation was performed in medium 199 with 5% horse serum and 2.5% fetal calf serum under 95% air and 5% CO_2 .

Seminal plasma was treated with charcoal to remove steroid hormone.

図1 Method of anterior pituitary incubation

には1ml の培養液を入れることとした。培養条件は、air 95%、 CO_2 5%、 $37^\circ C$ とした。

6. 睾丸生検による精細管組織所見の評価

不妊症患者のうち睾丸生検を行なったものの精細管組織所見は、市川、熊本の分類⁴⁾により下記の如く評価した。

- I. 硝子変性型
- II. Sertoli cell only tubules 型
- III. 精子形成不全型 (germ cell arrest)
 - IIIa. 高度精子形成不全型
 - IIIb. 中等度精子形成不全型
 - IIIc. 軽度精子形成不全型
- IV. 正常

結 果

1. 基礎的検討

1-A. ヒト精漿中 inhibin の雄 rat 去勢後の血中 FSH, LH 上昇におよぼす抑制作用に関する検討

35日齢の雄 S. D. Rat を使用し、ヒト精漿投与による去勢後の血中 FSH, LH 上昇に対するヒト精漿中 inhibin の抑制作用を、Nandini⁵⁾ らに準じた方法により検討した。rat を去勢した後、去勢直後と12時間後の2回、charcoal 処理したヒト精漿を2ml あるいは0.5ml 腹腔内投与し、あるいは生理食塩水を2ml 腹腔内投与した。睾丸摘出18時間後に心腔穿刺により採血を行ない、血中 FSH および LH を測定した。結果を図2

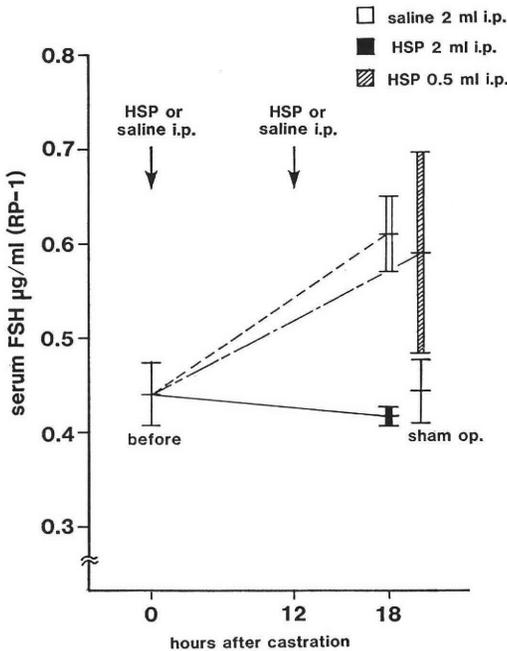


図 2 Effect of human seminal plasma (HSP) on FSH concentration (mean ± S. E.) in castrated rats. HSP was previously treated with charcoal to remove steroid hormone. Each group was assayed in 4-5 rats.

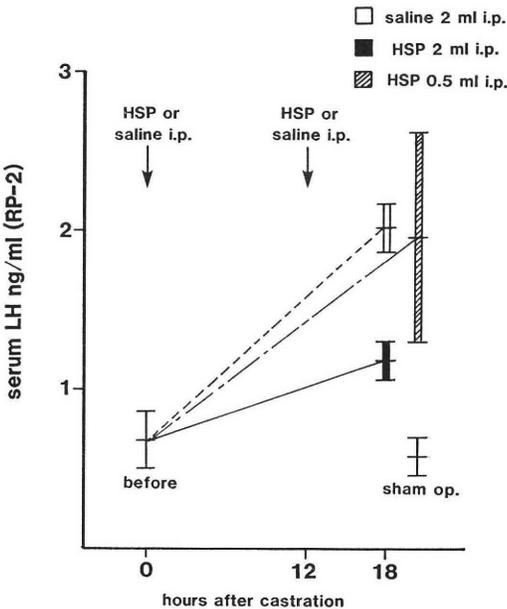


図 3 Effect of human seminal plasma (HSP) on LH concentration (mean ± S. E.) in castrated rats. HSP was previously treated with charcoal to remove steroid hormone. Each group was assayed in 4-5 rats.

および図3に示した. FSH については図2に示した如く, 去勢前 $0.44 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ (mean ± S. E. 以下も同様)であつたのが, 去勢18時間後では $0.61 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ に上昇した. しかし, ヒト精漿を2ml 投与した群では, $0.42 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ を示し, FSHの上昇は全く認められなかつた ($P < 0.01$). また, 精漿0.5ml 投与群では, FSHが $0.59 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ で, 去勢のみの群との差は認められなかつた.

LHについても同様に, 去勢前 $0.68 \pm 0.18 \text{ng/ml}$ であつたのが, 去勢18時間後では $2.02 \pm 0.13 \text{ng/ml}$ に上昇したが, 精漿2ml 投与群では $1.18 \pm 0.30 \text{ng/ml}$ を示した(図3). しかし, FSHでは, 精漿2ml 投与により完全に去勢前の値に抑制されているのに対し, LHでは分泌抑制は認められたが, 去勢前の値に比べ軽度上昇を認めた. なお, sham operationの群では, FSH, LHともに去勢前との間に差を認めなかつた.

1-B. Rat anterior pituitary incubation を用いた定量的測定に関する基礎的検討

Rat anterior pituitary incubation により, inhibin 活性を定量的に測定できるか検討した.

1-B, 1. 下垂体の対における gonadotropin 含有量および LHRH 刺激による gonadotropin 反応性の差に関する検討

下垂体を半分の対として incubation を行なつた際に, 左右の半分どうしの下垂体に含まれる gonadotropin 量に差がないか, また, LHRH 刺激による gonadotropin 分泌に差が認められないかを検討するため, 左右の各対の培養液に Hanks' solution を $150 \mu\text{l}$ 加え, 全く同一の条件で incubation を行ない, 下垂体 gonadotropin 量, 培養液中 gonadotropin 値を求めた(表1).

Rat 個体間の差をみると, 下垂体半分に含まれる gonadotropin 量は, FSH で $18.7 \mu\text{g/pituitary half}$ から, $50.6 \mu\text{g/pituitary half}$ と3倍程度の差を認め, LH でも $0.71 \mu\text{g/pituitary half}$ から $1.37 \mu\text{g/pituitary half}$ と2倍以上の差をみとめた. これに対して, 各々の下垂体の対の gonadotropin 量の差は比較的小さく, 下記の式により, 変動係数として求めた.

$$CV = \sqrt{\sum (d/X \times 100)^2 / 2n}$$

CV = 変動係数

d = right half と left half の差

x = right half と left half の平均

n = 下垂体の対の数

この式により, 変動係数を求めると, FSH では2.18%, LH では2.49%を示し, 下垂体の左右の対の間の gonadotropin 量の差は小さな事が分かつた. また, 培養液中の gonadotropin 濃度についても下垂体の gonado-

表 1 FSH and LH concentrations in medium and pituitary contents of paired pituitary halves in 22-day old pituitary incubation

pituitary No.	FSH concentrations in medium (RP-1, $\mu\text{g/ml}$)		FSH concentrations in pituitary contents (RP-1, $\mu\text{g/pituitary half}$)	
	right half	left half	right half	left half
1	3.05	2.97	29.2	27.3
2	2.85	3.76	35.9	41.4
3	2.85	1.86	18.7	24.1
4	3.33	3.34	37.0	36.6
5	2.95	3.18	42.5	43.3
6	4.13	4.11	46.8	50.6

pituitary No.	LH concentrations in medium (RP-2, ng/mk)		LH concentrations in pituitary contents (RP-2, $\mu\text{g/pituitary half}$)	
	right half	left half	right half	left half
1	40.0	44.1	0.82	0.71
2	46.6	56.0	0.91	1.03
3	56.2	35.0	0.61	0.67
4	43.7	45.7	0.93	0.89
5	51.2	47.6	0.97	1.20
6	85.5	4.11	1.22	1.37

tropin 量と同様に、変動係数で FSH 2.59%, LH 2.71% を示し、LHRH 刺激による gonadotropin 分泌の左右差は小さかった。

1-B, 2. ヒト精漿各濃度投与による容量反応関係に関する検討

ヒト精漿中 inhibin の濃度の差により、rat anterior pituitary incubation における、培養液中への FSH の分泌に容量反応の関係が認められるか検討した。培養液中に、各々ヒト精漿を150 μl 、75 μl 、37.5 μl 、18.8 μl 、9.4 μl 加え、各投与量での FSH の control に対する分泌率を求めた(図4)。ヒト精漿を150 μl 投与した群では、70%の分泌率を示した。以後漸減し、18.8 μl 以下の投与量では、ほぼ100%の分泌率を示した。18.8 μl から150 μl 添加の間で容量反応の関係を示した。

2. 臨床的検討

2-A. 不妊症患者精漿中 inhibin 活性の測定

不妊症患者精漿中 inhibin 活性を rat anterior pituitary incubation を用いて測定した。Inhibin 活性は、control に対する、精漿添加培養液の FSH 分泌率として求めた(図5)。

無精子症では FSH 分泌率は83.3%、乏精子症では69.7%、正常精子数患者では70.9%であった。無精子症

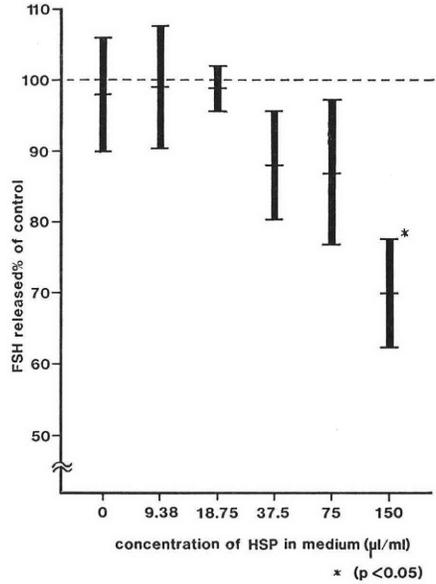


図 4 The effect of different doses of human seminal plasma (HSP) on FSH released % of control (inhibin activity) in rat anterior pituitary incubation.

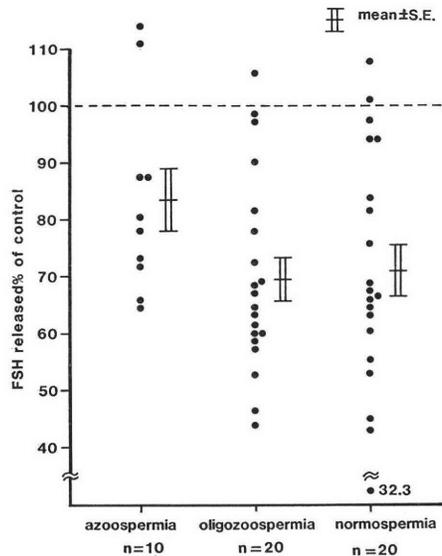


図 5 FSH released % of control (inhibin activity) in human seminal plasma with different sperm count.

患者で、精漿中 inhibin 活性が低値を示す傾向が認められた ($P < 0.10$)。

2-B. 精細管組織所見と精漿中 inhibin 活性の関係 睾丸生検を行なった12例について、精細管組織所見と精漿中 inhibin 活性の関連性について検討した(図6)。

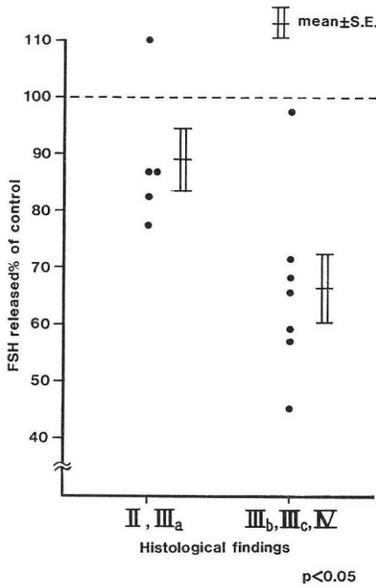


図 6 Relationship between FSH released % of control (inhibin activity) and histological findings of seminiferous tubules (Ichikawa-Kumamoto's classification).

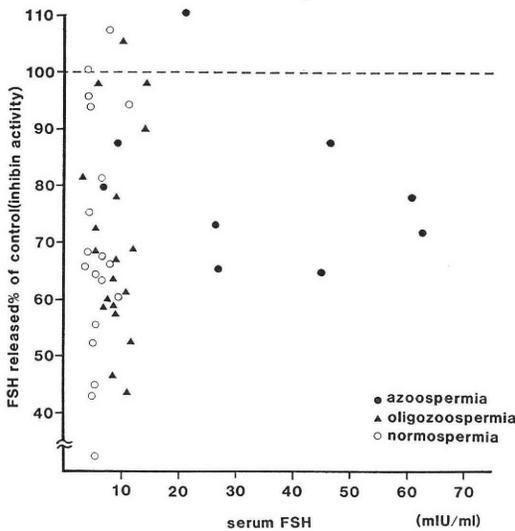


図 7 Relationship between seminal plasma inhibin activity and serum FSH

精細管組織所見が、市川・熊本の分類で、II Sertoli cell only tubules であるか、IIIa の primary spermatocytes までの出現しか認められない高度の精子発生能障害患者においては、精漿中 inhibin 活性が低く、中等度または軽度精子発生能不全または正常組織の spermatids まで出現する軽度の精子発生能障害患者 (IIIb, IIIc, IV) では精

漿中 inhibin 活性が高値を示す傾向をみた ($P < 0.05$).

また、血清 FSH 値と精漿中 inhibin 活性の関係について検討したが (図 7), FSH が正常値を示す症例が多く有意な相関傾向は認められなかった。

考 案

1. Inhibin 活性の測定に関して

Inhibin が精子発生能に関して重要な役割を演じていることは、まぎれもない事実と思われる。しかし、inhibin 活性の測定法は、種々の方法が考案されているが、各々一長一短があり、画一化されていない。

現在、inhibin 活性の主な測定法として、大きくは *in vivo* による bioassay と、*in vitro* による bioassay の 2 つに分けられる。*In vivo* の bioassay としては、1. 雄 rat 去勢による gonadotropin の上昇を inhibin 活性物質がどの程度抑制することができるかにより測定する方法⁵⁾、2. 長期間去勢の状態 で gonadotropin を上昇させたうえで、inhibin を投与することにより、どの程度 FSH が分泌抑制されるか測定する方法⁶⁾、3. 幼若雌 rat あるいは mouse に inhibin を投与した時の卵巣あるいは子宮重量の増加を抑制する程度により測定する方法など⁷⁻⁹⁾、種々の測定法が考案されている。しかし、著者らの実験による結果からみても、ヒト精液中の inhibin の rat FSH 分泌抑制作用はけつして強力なものではなく、去勢直後の雄 rat に投与した場合、精漿 2 ml の大量投与ではじめて FSH の分泌抑制効果が発現することからみても、個々の不妊症患者精漿中 inhibin 活性を測定するのは現実に不可能である。

In vitro の測定法としては、1. 著者らの行なつた pituitary halves による incubation 法¹⁰⁾、2. pituitary monolayer culture¹¹⁾ が考案されている。

Pituitary halves による incubation は、下垂体を摘出する際に、入念に注意深く採取する必要があるため、ある程度の熟練を要するが、その後は 4-5 時間で、1 回の incubation が終了するという長所をもつ。また、個体間の下垂体に存在する gonadotroph の差や LH-RH に対する反応性の差も、1 個の下垂体の半分を control として使用して、他方の培養液に inhibin 活性物質を入れて incubation することにより、予防できることがわかつた。

Monolayer culture は pituitary halves による incubation と同様個体間のバラツキを無くするのに有効である。また、個々の細胞に inhibin 活性物質を長期間作用させることができる長所をもつが、操作が繁雑であり、また下垂体細胞に、trypsin, DNase などの酵素の影響を加えるために、膜などに変化を与える可能性

をもつ。また、長期間の培養を要する点も欠点の1つといえる。

著者らは、pituitary halves による incubation により inhibin 活性を測定したが、培養時間が短いこと、比較的良好的な dose-response curve が得られたことより、この方法による inhibin 活性の測定は有用であると考えられた。

2. 精子発生能不全と、精漿中 inhibin 活性について
現在、inhibin が Sertoli cell で産生されていることは、Sertoli cell culture における培養液中に inhibin 活性が認められることなどより¹²⁾明らかとなっている。Steinberger らは¹³⁾、下垂体を摘出した rat では、10日後には、Sertoli cell からは inhibin が分泌されないが、FSH と LH あるいは、FSH と testosterone を補充投与すると Sertoli cell からの inhibin の分泌が保たれることより、inhibin の分泌は FSH と testosterone、あるいは FSH と LH が間接的に testosterone を分泌させることにより協調的に行なわれていることを報告している。このことは、正常な Sertoli cell は下垂体からの gonadotropin 分泌により、inhibin の分泌が調節されていることを示している。一方、精子発生能障害を有する患者では、なんらかの原因により Sertoli cell からの inhibin の産生分泌が抑制されていることが考えられる。Inhibin の負の feedback 機構が働かないため、FSH の産生、分泌が亢進する。著者らが不妊症患者精漿中 inhibin 活性を測定した結果で、精細管組織所見が Sertoli cell only tubules あるいは primary spermatocytes までしか出現しない高度の精子発生能障害患者における inhibin 活性が低値を示す傾向が認められたことは、FSH と inhibin ならびに精子発生能が密接に関連していることを示していると思われる。また、inhibin が Sertoli cell から分泌されていることが明らかとなっている現在、inhibin の産生、分泌は Sertoli cell の機能を反映していると考えられる。現在、直接 Sertoli cell の機能を把握する方法がない現状において、精漿中の inhibin 活性の測定は、Sertoli cell の機能を反映する検査法として、男子不妊症患者の精子発生能障害の病態を知るうえで、重要な検査法となることが示唆された。しかし、精漿中には、睾丸よりの分泌物以外に精漿や前立腺からの分泌物も含まれ、色々な因子が精漿量に関与する関係上、睾丸よりの inhibin 分泌と精漿中の濃度が必ずしも睾丸機能と平行しない可能性もあり、他の因子による data の変動が生ずることもあり得ることになる。そのため、精漿中濃度より濃度は低いが、血中濃度の方がより正確な睾丸 Sertoli cell 機能を反映する可能性もあり、今後 pure な inhibin 抽出により

抗体を作製して RIA 法などによる検討が必須となつてくるものと考えられる。インド学派により¹⁴⁾、その RIA 法での data も報告されているが、その正確性についてはなお問題なきにしもあらずとされておりさらなる研究が望まれているところである。

まとめ

ヒト精漿中 inhibin について検討し、下記の結果を得た。

1. ヒト精漿中 inhibin は、34日令雄 rat 去勢後の FSH の上昇を抑制する。
2. 男子不妊症患者精漿中 inhibin 活性を22-24日齢 rat anterior pituitary incubation により測定すると、高度の精子発生能障害を有する患者で、軽度の精子発生能障害患者と比較し、有意の低下を示した。

文 献

- 1) Mc Cullagh, D. R. : Dual endocrine activity of the testis. *Science*, 76 : 19, 1932.
- 2) Steinberger, A. and Steinberger, E. : Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured sertoli cells. *Endocrinology*. 99 : 918, 1976.
- 3) Franchimont, P., Henderson, K., Verhoeven, G., Hazee-Hagelstein, M. T., Charlet-Renard, Ch., Demoulin, A., Bourguignon, J. P. and Lecomte-Yerma, M. J. : Inhibin : Mechanisms of action and secretion. In Franchimont, J. P. and Channing C. P., (eds) *Intragonadal Regulation of Reproduction*, p167, Academic Press London, 1981.
- 4) 熊本悦明 : 睾丸機能不全の臨床的研究, 第1編身体医学の問題, *日泌尿会誌* 54 : 1063, 1963.
- 5) Nandini, S. G., Lipner, H. and Moudgal, N. R. : A model system for studying inhibin. *Endocrinology*, 98 : 1468, 1976.
- 6) Lee, V. W. K., Pearce, P. T. and Krester, D. M. : The assesment of rodent models in evaluating the capacity of bovine testis extracts to suppress FSH levels. In Troen, P. and Nankin, H. R. (eds) *the Testis in Normal and Infertile Men*, p293, Raven Press N. Y., 1977.
- 7) Chari, S., Duraiswami, S. and Franchimont, P. : A convenient and rapid bioassay for inhibin. *Hormone Res*, 7 : 129, 1976.
- 8) Setchell, B. P. and Sirinathsinghji, D. J. : Antigonadotropic activity in rete testis fluid, a possible inhibin. *J. Endocrinol.*, 53 : Lx, 1972.
- 9) Ramasharma, K., Shashidara Murthy, H. M.

- and Moudgal, N.R. : A rapid bioassay for inhibin activity. *Biol. Reprod.*, 20 : 831, 1979.
- 10) Setchell, B.P., Davies, R.V. and Main, S.J. : Inhibin. In Johnson, A.D., (eds) *The Testis IV*, 6 : p189, Academic press, N.Y., 1977.
- 11) Baker, H.W.G., Bremner, W. J., Burger, H.G., de Krester, D. M., Dumanis, A., Eddie, L. W., Hudson, B., Keogh, E. J., Lee, V. W. K. and Rennie, G. C. : Testicular control of follicle-stimulating hormone secretion. *Recent Progress of Hormone Research*, 32 : 429, 1976.
- 12) Steinberger, A. : Inhibin production by sertoli cells in culture. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 26 : 31, 1979.
- 13) Steinberger, A. : Regulation of inhibin secretion in the testis. In Franchimont, P., and Channing, C. P., (eds) *Intragonadal Regulation of Reproduction*, Academic Press, London, 1981.
- 14) Vaze, A.Y., Thakur, A. N. and Sheth, A. R. : Development of a radioimmunoassay for human seminal plasma inhibin. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 26 : 135, 1979.

of gonadotropin via rat's pituitary gland. With the view of examining the kinetics of inhibin in male infertility patients, measurements were also made of the seminal inhibin activity in the above patients. The results obtained were as follows :

1) Rise in FSH in blood was inhibited by the administration of charcoal-treated human seminal plasma to 34-day-old rats after sterilization, and the case was the same with LH in blood, though to a lesser extent.

2) For male infertility patients, azoospermic patients showed a tendency to give lower values of seminal plasma inhibin activity. The histology of testis revealed that patients with severe hypospermatogenesis showed lower values of seminal plasma inhibin activity than those with mild hypospermatogenesis.

From the above the possibility is suggested that patients with severe hypospermatogenesis present some hyposecretion of seminal plasma inhibin.

(受付 : 昭和61年6月30日)

Inhibin activity in seminal plasma of infertile males

Yoshio Takagi and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology, Sapporo
Medical College
(Director : Prof. Y. Kumamoto)

Yuichi G. Watanabe

Department of Anatomy
(Director : Prof. K. Takahashi)

Studies were made of the inhibitory effect of human seminal plasma inhibin on the secretion

ブタ精巢上体尾部および尾部精子における ペントースサイクル

Pentose Phosphate Cycle in the Cauda Epididymidis and Epididymal Spermatozoa of the Boar

東邦大学第1産婦人科学教室

伊藤 元博 中岡 義明

Motohiro ITO Yoshiaki NAKAOKA

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

東邦大学生化学教室

渡辺 仁 江川 恵基 天野 久夫

Hitoshi WATANABE Keiki EGAWA Hisao AMANO

Department of Biochemistry, Toho University,
School of Medicine

ブタ精巢上体尾部および尾部精子のペントースサイクル活性について研究した。本経路の鍵酵素である Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G 6 P-DH) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6 PG-DH) を、2', 5' ADP-Sepharose 4B を用いた affinity chromatography により分離、精製した結果、本経路活性は、

1. 尾部精子よりも尾部管において高く、
2. 以前報告した射精精子よりも尾部精子に高かった。

粗抽出液を affinity chromatography により精製し、回収された最も酵素活性の高かつた分画について G 6 P-DH, 6 PG-DH の比活性、至適 pH, Michaelis 定数を検討したところ、

3. 尾部の G 6 P-DH, 6 PG-DH は各々292倍, 128倍に、尾部精子では211倍, 128倍に精製された。
4. 尾部における G 6 P-DH, 6 PG-DH の至適 pH は各々8.4, 7.1, Michaelis 定数は各々 1.41×10^{-3} , 8.69×10^{-3} であった。
5. 尾部精子における G 6 P-DH の至適 pH は8.3, 6 PG-DH は7.1, Michaelis 定数は各々 2.2×10^{-3} , 5.0×10^{-3} であった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32 (2), 184-189, 1987)

緒 言

精子が未成熟の状態で精巢を離れ、精巢上体管を通過後第1次の受精能を獲得することは良く知られている¹⁾。この精子成熟が精子固有の働きではなく、精巢上体が成熟変化に影響を与える環境作りをすることも明らかである。しかし、この成熟過程における精巢上体の変化や役

割についてはいまだ十分な知見は得られていない。

本研究は成熟精子の貯蔵場所である尾部管と、その管腔内に存在する尾部精子の代謝能、ことにペントースサイクル活性を中心に、その鍵酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6P-DH) を2', 5' ADP-Sepharose 4Bを用いた affinity chromatography により分離精製し検討を加えた。

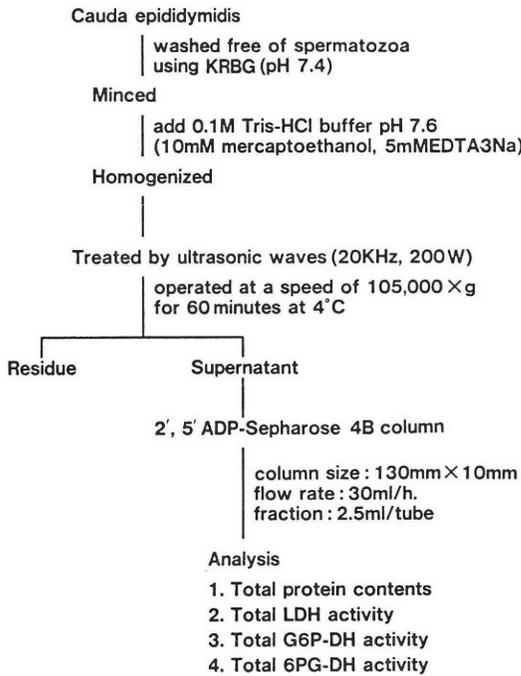


図 1 Experimental procedure

実験方法

- 1) ブタ精巢上体
屠殺後 1 時間前後の生殖可能精巢上体を実験に供した。
- 2) 精巢上体管尾部の分離および尾部粗抽出液の作成 (図 1).
精巢上体管尾部を周囲組織より剝離し、同時に付着している血管、結合織、脂肪組織などを取り除き、KRBG (pH 7.4) で管腔内を洗滌し、精子および管腔内容物を排除する。次に KRBG 中で細片するが、この際、次のホモジナイズに備え十分細片する必要がある。細片後再度 KRBG で洗滌し、洗滌後 10mM メルカプトエタノール、5mM EDTA 3Na を含む 0.1M Tris HCl buffer pH 7.6 を等量加え、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズ (800rpm, ストローク 5 回) し、引き続き発振周波数 20KHz, 200W の出力で 1 分間ずつ 3 回超音波処理をした。超音波処理後、4°C, 105,000×g, 60 分間冷却遠心し、得られた上清を東洋濾紙 No. 7 で濾過し、この濾液を精巢上体管尾部粗抽出液とし、その一部を蛋白量、酵素活性の測定に使用した。実験に供した尾部組織は 3.0g である。
- 3) 2', 5' ADP-Sepharose 4B による精製 (図 1) 方法については本誌既報^{2,3)}に準じた。
- 4) 精巢上体尾部精子の採取および尾部精子粗抽出液

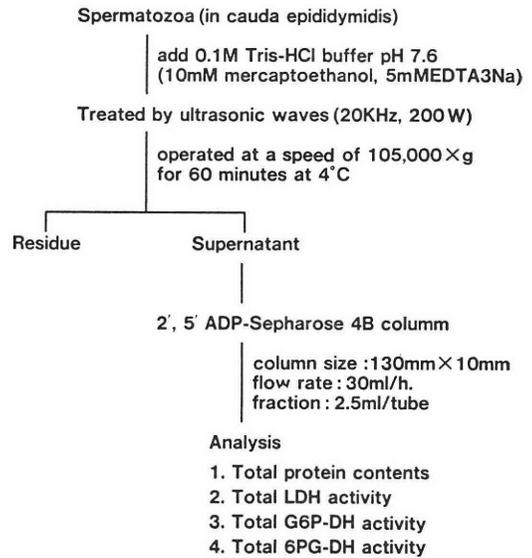


図 2 Experimental procedure

の作成 (図 2)

精巢上体管尾部に近い精管を露出し、切開を加え、切開部位より尾部に向けてチューブを挿入し、注射器により空気を注入する。この空気圧を利用して尾部精液を採取する。実験に使用した精液量は約 3.0ml で光顕にて直進運動を認めた。この精液を 2600×g で 10 分間遠心し、精子と精巢上体液に分離し、分離した精子に 10mM メルカプトエタノール、5mM EDTA 3Na を含む 0.1M Tris-HCl buffer pH 7.6 を等量加え良く攪拌後、超音波を施行した。超音波施行後、4°C, 105,000×g, 60 分間冷却遠心し、得られた上清を尾部精子粗抽出液とし、後の操作は尾部組織の方法に準じた。

5) 2', 5' ADP-Sepharose 4B の特性⁴⁾

ファルマシア社製で、Sepharose 4B に N⁶-(6-amino-hexyl)-adenosine 2', 5'-bisphosphate を cyanogen bromide method によりカップリングさせたものである。NADP 類似 adenosine 2', 5'-bisphosphate の N⁶ の位置でカップリングさせてあるため、NADP 依存酵素を受容できるリガンドになっている。

6) 蛋白量および各酵素活性の測定

- (1) 蛋白量
試料 0.1ml に Bradford 試薬 5ml を加え、595nm における吸光度を測定し蛋白量を求めた⁵⁾。
- (2) LDH 活性
LDH 活性は Hill 変法^{6,7)}にもとづき測定した。
- (3) G6P-DH, 6PG-DH 活性
G6P-DH 活性は Löhr-Waller の方法⁸⁾, 6PG-DH 活性は Wolfson らの方法⁹⁾にもとづき測定した。

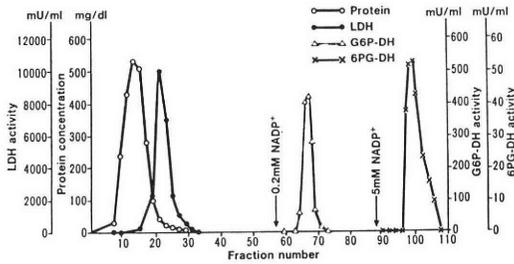


図 3 Affinity chromatography of the ductus epididymidis (cauda) of the boar extract on 2', 5' ADP-Sepharose 4B

活性値の表わし方

1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ NADPH の 340nm における吸光度は6.22 であるから $X \times \Delta\text{OD}/6.22$ (X: キュベット内液量-ml) より生成 NADPH の μM が求められる。

実験結果

1) ブタ精巢上体尾部粗抽出液からの G6P-DH 分離 (図3)

精巢上体尾部管粗抽出液を 2', 5' ADP-Sepharose 4 Bによる affinity chromatography で精製すると, LDH, 蛋白はそのまま溶出され, 両者の溶出確認後, 0.2mM NADP, 5 mMNADP を非連続的に添加すると, カラムに吸着されている NADP 依存酵素である G6P-DH, 6PG-DH がそれぞれ分画採取された。なお, G6P-DH のフラクションには6PG-DH, 6PG-DH のフラクションには G 6 P-DH は認めず, また両者のフラクションには蛋白, LDH は認められず, この結果より両 NADP 依存酵素の分離, 精製が確認された。

2) ブタ尾部精子粗抽出液からの G6P-DH の分離

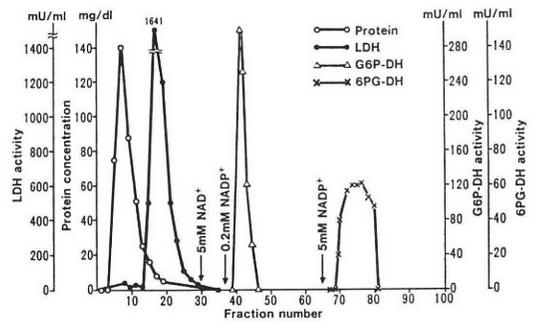


図 4 Affinity chromatography of boar epididymal spermatozoa extract on 2', 5' ADP-Sepharose 4B

(図4)

粗抽出液からの G6P-DH 分離は精巢上体尾部管に準じた。なお比較として既報²⁾のブタ射精精子からの G6 P-DH の分離を図5に示した。

小括すると G6P-DH 活性は尾部管にて尾部精子よりも高く, 尾部精子のそれは射精精子よりも高かった。次に最も酵素活性の高かった分画より得られた G6P-DH, 6PG-DH について比活性, 至適 pH および Michaelis 定数の測定を行なった。

3) 比活性

表1は精巢上体尾部管の G6P-DH, 6PG-DH の比活性である。G6P-DH は粗抽出液に対して, 蛋白1mg 当り292倍, 6PG-DH は128倍に精製された。

表2は尾部精子の G6P-DH, 6PG-DH の比活性である。各々211倍, 128倍に精製された。

4) pH 活性曲線

至適 pH を決定するために尾部管 (図6), 尾部精

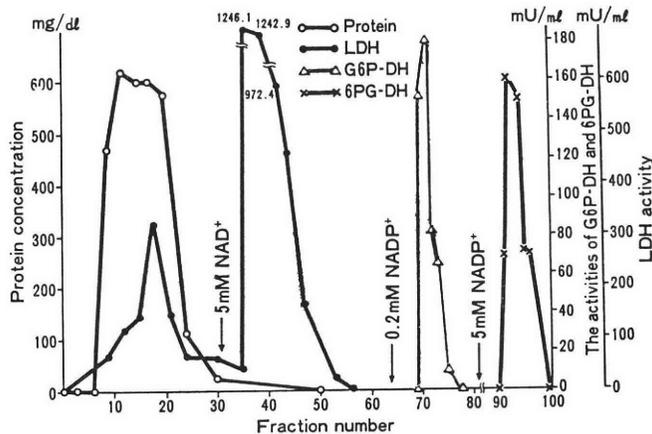


図 5 Affinity chromatography of boar spermatozoa extract on 2', 5' ADP-Sepharose 4B

表 1 Purification of G6P-DH and 6PG-DH from boar epididymis crude extract

Enzyme	Specific activity		Purification
	crude extract	peak fraction	
	mIU/mg. P		fold
G6P-DH	57.9	16,908	292
6PG-DH	8.3	1,064	128

表 2 Purification of G6P-DH and 6PG-DH from boar epididymal spermatozoa crude extract

Enzyme	Specific activity		Purification
	crude extract	peak fraction	
	mIU/mg. p		fold
G6P-DH	138.8	29,330	211
6PG-DH	16.0	2,050	128

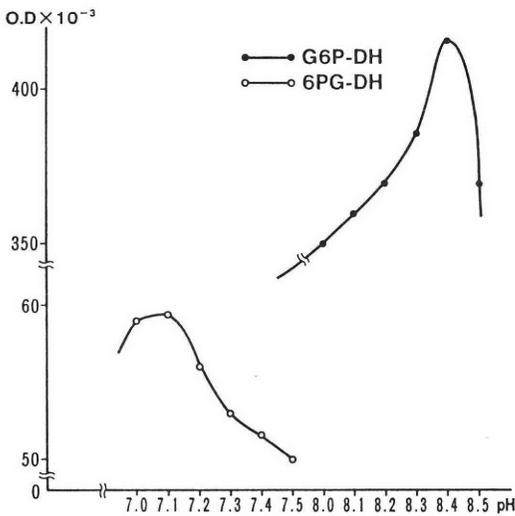


図 6 The dependence of the optical density of G6P-DH and 6PG-DH on pH in epididymis

子 (図 7) の pH 活性曲線を作製した。

5) 至適 pH と Michaelis 定数

pH 活性曲線より精巢上体尾部管の至適 pH は, G6P-DH が 8.4, 6PG-DH が 7.1, また km は各々 1.41×10^{-3} , 8.69×10^{-3} であった (表 3)。

尾部精子の至適 pH は, G6P-DH が 8.3, 6PG-DH が 7.1, km は各々 2.2×10^{-3} , 5.0×10^{-3} であった (表 4)。

表 5 は射精精子と尾部精子の至適 pH および Michaelis 定数の比較である。

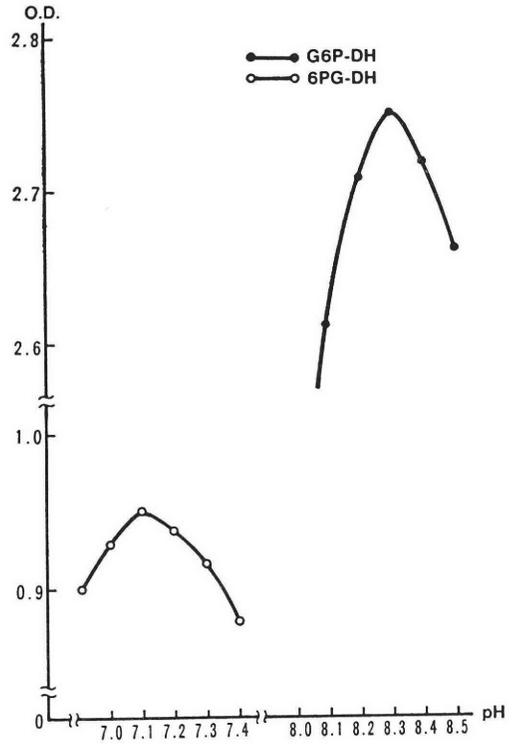


図 7 The dependence of the optical density of G6P-DH and 6PG-DH on pH in epididymal spermatozoa

表 3 Michaelis-constant and optimum pH of G6P-DH and 6PG-DH in boar epididymis

Enzyme	Km M	Optimum pH
G6P-DH	1.41×10^{-3}	8.4
6PG-DH	8.69×10^{-3}	7.1

表 4 Michaelis-constant and optimum pH of G6P-DH and 6PG-DH

Enzyme	Km M	Optimum pH
G6P-DH	2.2×10^{-3}	8.3
6PG-DH	5.0×10^{-3}	7.1

考 察

精巢上体は, 精巢を離れた未成熟な精子を輸送し, 貯蔵し, その間卵との受精が可能になる迄成熟させてゆく環境を準備する機能を有している. 一方, 精子は精巢上体管を通過する間に, その構造, 形態, 比重および代謝能, 受精能の変化を受けることは良く知られている. し

表 5 Michaelis-constant and optimum pH of G6P-DH and 6PG-DH

Enzyme	ejaculated spermatozoa		epididymal spermatozoa	
	G6P-DH	6PG-DH	G6P-DH	6PG-DH
Km	$4.96 \times 10^{-4} \text{M}$	$7.2 \times 10^{-5} \text{M}$	$2.2 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$
Optimum pH	8.2	7.2	8.3	7.1

かし、精巣上体通過中に生じる種々の精子成熟変化と精巣上体の機能的意義、精巣上体管腔内の環境と精子間の相互作用についてはほとんど解明されていない。

われわれは精巣上体の環境因子のうち代謝能、ことにペントースサイクル活性が精巣上体の各部位においてどのように変化するか知る目的で、今回精巣上体尾部管および尾部精子における本経路の鍵酵素である G6P-DH を 2', 5' ADP-Sepharose 4 B を用いた affinity chromatography により分離し検討した。

Setchell ら¹⁰⁾は、精巣上体通過前、通過中、通過後の精子において、そのペントースサイクル活性が減弱してゆくことを明らかにした。Johnson ら¹¹⁾はラット、ラビット、マウスの精巣および精巣上体頭部、尾部における糖代謝を放射性グルコースを用いて検討している。彼らによるとペントースサイクル活性は頭部は尾部と比べより高い活性を示すが、ラットではそれが逆転していることを報告している。この結果は、精子の成熟過程のある時期にその組織あるいは精子によってペントースサイクルが利用されていることを示唆すると同時に、異なる場所の精子だけでなく、特別な部位の精子において種属間に相違があることを証明している。

われわれの実験結果は、ペントースサイクル活性が尾部管において尾部精子よりも高く、また尾部精子は射精精子よりも高いことを示した。この結果は、精子成熟に対する環境作りは、精子固有のものではなく、むしろ精巣上体からの影響がより優勢であることを証明した。Brooks¹²⁾はラット精巣上体精子の G6P-DH、6PG-DH の低い活性を認めており、赤血球混入によるものであると推測しているが、精巣上体を細片して得た精子を用いた彼の方法と空気圧法によるわれわれの方法を比較すると、後者は直接尾部管より流出してくる精子を用いているので血球混入の余地はない。また同じ論文中で精巣上体尾部の G6P-DH、6PG-DH はアンドロジェンのコントロール下にあることを示している。両側精巣切除ラット群に testosterone propionate を処置することにより有意に両酵素活性が亢進している。精巣上体のアンドロジェン依存はその機能本来を維持するために必要であることは定説となっているが、その機能的意義は勿論であるが、精子成熟変化との相互関係あるいは精巣上

体と精子間の相互作用について、これらの結果から推測することは不可能である。しかし、精巣上体尾部の機能は主に射精前の成熟精子を貯蔵する場所であることから、管腔内に存在する精子へエネルギー基質を供給するという役割を演じているのかもしれない。

G6P-DH、6PG-DH の比活性、至適 pH、Michaelis 定数について検討した。尾部管における G6P-DH、6PG-DH の比活性は各々 292 倍、128 倍、尾部精子では 211 倍、128 倍であった。至適 pH および Km は、尾部管で G6P-DH が 8.4、 1.41×10^{-3} 、6PG-DH が 7.1、 8.69×10^{-3} 、尾部精子では G6P-DH が 8.3、 2.2×10^{-3} 、6PG-DH が 7.1、 5.0×10^{-3} であった。また尾部精子と射精精子の両酵素の至適 pH、Km を比較すると、至適 pH にはほとんど差異は認めないが、Km では射精精子でその値は低く、基質への親和性が高いことが示された。

なお、本論文の要旨は第 5 回アンドロロジー学会で報告した。

文 献

- 1) Waites, G. M. H. and Setchell, B. P.: Physiology of the testis, epididymis and scrotum. *Adv. Reprod. Physiol.*, 4: 1, 1969.
- 2) 有沢克夫, 中岡義明, 渡辺 仁: アフィニティークロマトグラフィーによるブタ精子のグルコース-6-リン酸脱水素酵素, 6-ホスフォグルコン酸脱水素酵素の分離, 日不妊誌, 42: 30, 1985.
- 3) 伊藤元博, 中岡義明, 渡辺 仁, 江川恵基, 天野久夫: ブタ精巣におけるペントースサイクルと解糖, 日不妊誌, 31: 22, 1986.
- 4) Brodelius, P., Larsson, P.-O. and Mosbach, K.: The synthesis of three AMP-Analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2', 5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3', 5'-bisphosphate and their applications as general ligands in biospecific affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.*, 47: 81, 1974.
- 5) Marison, M. B.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 284,

- 1976.
- 6) Hill, B.R. and Levi, C. : Elevation of a serum component in neoplastic disease. *Cancer Res.*, 14 : 513, 1954.
 - 7) Hill, B.R. : Some properties of serum lactic dehydrogenase. *Cancer Res.*, 16 : 460, 1956
 - 8) Löhr, G.W. and Waller, H.D. : Glucose -6-phosphate dehydrogenase. In *methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. Bergmeyer, H. U.ed., 636, Academic Press, New York, 1974.
 - 9) Wolfson, Jr. S.K. and Ashman, H.G.W. : Isocitric and 6-phosphogluconic dehydrogenase in human blood serum. *Proc. Soc. Exper. Bio. Med.*, 96 : 231, 1957.
 - 10) Setchell, B.P. and Hinks, N. T. : The importance of glucose in the oxidative metabolism of the testis of the conscious ram and the role of the pentose cycle. *Biochem. J.*, 102 : 623, 1967.
 - 11) Johnson, A.D. and Turner, P.C. : Epididymal carbohydrate metabolism—I. Glucose -1-¹⁴C and glucose-6-¹⁴C metabolism by mouse, rat and rabbit tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A : 599, 1971.
 - 12) David, E.Brooks : Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. *Biochem. J.*, 156 : 527, 1976.

was studied in the cauda epididymidis and epididymal spermatozoa of the boar. The separation of the enzymes, the first enzyme of the pentose phosphate cycle, glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6P-DH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PG-DH) was performed using 2', 5' ADP-Sepharose 4B.

From the present study, the cauda epididymidis had higher activity of G6P-DH compared with the epididymal spermatozoa, on the other hand, epididymal spermatozoa had a higher pentose phosphate cycle activity than the ejaculated spermatozoa which previously described.

It is evident that this spermatozoal maturation is not solely an inherent property of the spermatozoa but that the epididymis provides an essential environment in which the maturation changes are effected. The results presented in this study, it was evident that the cauda epididymidis was more predominant than the epididymal spermatozoa in the influence of pentose phosphate cycle activity on the spermatozoal maturation.

(受付 : 昭和61年7月14日)

Pentose phosphate cycle in the cauda epididymidis and epididymal spermatozoa of the boar

Motohiro Ito and Yoshiaki Nakaoka

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

**Hitoshi Watanabe, Keiki Egawa and
Hisao Amano**

Department of Biochemistry, Toho
University, School of Medicine

The activity of the pentose phosphate cycle

流行性耳下腺炎性睾丸炎30例の臨床的検討

A Clinical Study of Mumps Orchitis

日本大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 岸本 孝教授)

佐藤 安男 平野 大作 賀屋 仁
Yasuo SATO Daisaku HIRANO Hitoshi KAYA

山本 忠男 岡田 清己 岸本 孝
Tadao YAMAMOTO Kiyoki OKADA Takashi KISHIMOTO

Department of Urology, Nihon University, School of Medicine
(Director: Prof. T. Kishimoto)

30例の流行性耳下腺炎性睾丸炎患者について検討を行った。20歳代が15例と最も多く、患側は右側16例、左側5例、両側9例であった。治療は主としてテトラサイクリン系の抗生物質と免疫グロブリン製剤にて行った。合併症は、膵炎・肝炎・髄膜炎を各1例に、副睾丸炎を3例に認めた。精液所見では偏側の症例においても結果は不良で、十分な治療と1年以上にわたる経過観察が必要であると思われた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 190-194, 1987)

緒 言

流行性耳下腺炎(mumps)の合併症としての睾丸炎(流行性耳下腺炎性睾丸炎: mumps orchitis)は、1942年田村¹⁾が18例を、その後、小川²⁾が12例を、片村³⁾が1967年にそれまでの本邦報告36例を集計しているにすぎず、発症頻度に比し症例に対する興味の薄さからか、最近、ほとんど報告はない。しかし一方で、その最終結果として起こりうる萎縮睾丸、強い男性不妊症は、これといった治療法がない現在、予防としての流行性耳下腺炎性睾丸炎に対する治療にもう少し関心が向けられるべきではないかと考える。

対象と方法

日本大学医学部付属板橋病院泌尿器科に1974年1月より1985年12月までの12年間に入院し、mumps orchitisと診断された30例を対象とした。アンケート調査は昭和59年までに入院した21人に対して行った。アンケート調査内容は、罹患後結婚した場合はいつ結婚したか、また、その後子供が何人出来たか、(分娩回数を除外した妊娠回数は何回か)〔罹患前結婚していた場合は、入院カルテで子供の数を調査した〕手術名と手術時期、疾患名と罹患時期について行った。

結 果

年齢分布は、20歳代が15例と最も多く、30歳代が8例、10歳代が6例、40歳代が1例であり、最年少14歳、最高齢41歳であった。なお発症時の結婚の有無は、既婚は14例、未婚は16例であった。発症時期(図1)を月別にみると、7月が7例と最も多く、9月が6例となっていた。睾丸炎の患側は、右側は16例、左側5例であり、両側が9例となっている。両側発症を来した症例の内、不明1例を除いた8例についてみると、右側発症後に左側に発症したものが7例、左側発症後に右側に発症したものは1例のみであった。またその左右発症の時間的關係は、3~9日で平均5.5日であった。耳下腺腫脹より睾丸症状発現までの時間的關係(表1)は、1~21日で、4日後が8例と最も多く、6日後が6例、3日後が5例であり、1例睾丸症状が耳下腺腫脹に先行したものが認められた。耳下腺腫脹側と睾丸炎患側との關係(表2)について、 χ^2 検定を行ったが、両者における患側の関連性は認められなかった。ムンプスウィルスの血中抗体価を11例について測定すると、上昇倍率が64, 32, 16倍を示したものが各々1例、4倍が2例、2倍が3例、変化のないものが3例であった。血中のアマラーゼアイソザイムを16例について測定すると、唾液腺優位を示したものが

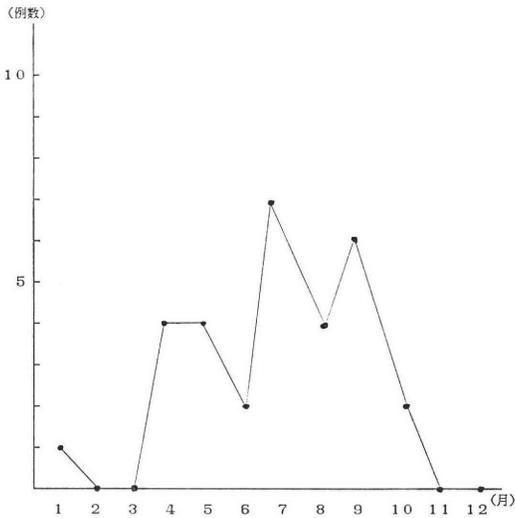


図 1 発症時期

表 1 耳下腺腫脹より辜丸症状発現までの時間的關係

日数	例数
1	2
2	3
3	5
4	8
5	3
6	6
11	1
21	1

表 2 耳下腺腫脹側と辜丸炎患側との關係

辜丸患側	耳下腺患側			計
	右側	左側	両側	
右側	2	1	10	13
左側	0	1	2	3
両側	0	1	7	8
計	2	3	19	24

[例]

14例であり、睪腫優位のものが1例、正常が1例であった。なおこの算出は、唾液(S)、睪腫(P)でS:Pの比率により算出した。

治療内容としては、テトラサイクリン系の抗生物質を28例に、免疫グロブリン製剤を26例に使用し、この両者を併用したものは18例と60%を占めていた。合併症としては睪炎1例、肝炎1例、髄膜炎1例、副辜丸炎3例で

あり、その時期は症状出現より5~7日目であった。精液所見(表3)を12例についてみた。なお期間は、退院後のものであり、精子が全く認められないものを無精子症、精子数が2000万/ml以下を高度乏精子症、2000万より4000万/ml未満を軽度乏精子症、4000万/ml以上を正常とした⁴⁾。症例15と症例23は、正常の精液所見を呈し、症例28は1年未満で高度乏精子症より正常へ復した。しかしこの3症例は、偏側罹患のものであり、両側に発症した5例は、無精子症から高度乏精子症と極めて結果は不良であった。但し症例3は両側に罹患し、2年後の精液所見においても高度乏精子症を呈していたにもかかわらず、約3年後に子供をえている。精液検査が行われていないため、本表には記載しなかったが、同様の症例をもう2例経験している。症例25は、罹患前より高度乏精子症で他院にて加療しており、罹患時は妊娠7カ月であった。

考 察

流行性耳下腺炎は、1934年 Johnson & Good pasture によりウィルス性疾患であることが確認され、その感染経路は主に飛沫感染で、好発年齢は3~5歳である⁵⁾。一方、流行性耳下腺炎性辜丸炎については systemic disease である⁶⁾という考えもあるが、経験した30例全てが耳下腺腫脹を伴っており、合併症と考える方がより妥当であると思われる⁷⁾。この併発は約20%前後である⁷⁾といわれ、発症年齢は思春期以前には少ないとされているが、日本でははっきりしたものでは6歳4ヶ月⁸⁾の小児報告例がある。我々の報告においても14歳が最年少であり、10歳代後半より40歳までが多く、社会的に活動が激しい世代に多い傾向があつた。Mumps は7~8月と10月に多く⁹⁾、また6~7月に多いが季節差はないという報告もある。Mumps orchitis もほぼこの時期に一致するはずであり、30例についてみても7月と9月に多く、晩秋から初春にかけての11月~3月は1例のみであった。患側についてみると左右差はないとされているが、30例では両側発症で左右差不明の1例を除く29例についてみた場合、右側が23例、左側6例となり、右側が多く^{1,2)}、約80%を占めていた。両側発症症例は約30%とされ、30例中においても9例で、やはり30%の併発頻度であつた。一方、右側発症の約30%が両側に発症する危険性を有していることにもなった。Mumps と orchitis との発症の關係は、①耳下腺の腫脹が存在する間に発症、②耳下腺炎の発症に先行、③辜丸炎のみが症状として発現¹⁰⁾、④耳下腺炎消退後に発症の4つが考えられるが、①が最も多く、その期間は8日以内であり、29例についてみても、6日以内が27例とほとんどを占めていた。このため

表 3 精液所見

症例番号	患 側	1 カ月未満	1 カ月～1 年未満	1 年 以上
2	両 側	無精子症		
3	両 側	高度乏精子症		高度乏精子症
9	右 側	高度乏精子症		
10	右 側		無精子症	高度乏精子症
14	両 側			高度乏精子症
15	右 側	正 常		
17	両 側		高度乏精子症	
23	左 側		正 常	
25	右 側	無精子症	無精子症	
27	両 側		無精子症	
28	右 側		高度乏精子症→正常	
30	右 側	高度乏精子症		

出来る限り早期に mumps に対する治療を完全に行うことが orchitis に対する最大の予防策であり、mumps に対する治療を含めて広く内科医・小児科医・耳鼻科医に啓蒙する必要があると考えられる。

耳下腺腫脹側と睾丸炎患側との関連性は認められなかった。一方、食物を主に咀嚼する側から耳下腺の腫脹が始まる¹¹⁾ことも考えられるが、特に今回はその検索は行わなかった。ムンプスウィルスの血清抗体価を急性期・回復期に測定し、CF (complement fixation: 補体結合) の4倍、あるいはそれ以上の上昇が認められたものは5例であった。1例既往に mumps に罹患した症例があったが、その抗体価の変動は32倍で変化はみられなかった。1985年 mumps が大流行したことが1986年1月9日発行の感染症サーベイランス (Medical Tribune)¹²⁾で発表されているが、30例中9例が同年に発症したものであった。血中のアマラーゼアイソザイムについては唾液腺優位がほとんどである。膵臓優位の場合は、膵臓疾患が存在するのみであるとされているが、1例にPが優位のものが認められたが、これは膵炎を合併していなかった。膵炎や膵臓癌にて上昇を来すとされているエラスターゼIの測定を2例に行ったが、1例は正常で、他の1例はやや高値を示したにすぎなかった。血清アマラーゼ値は初期経験3例を除く27例に行い、23例が高値を示し、尿中アマラーゼも21例が高値を示した。尿一般細菌検査は28例に行ったが、全例特に細菌は認められなかった。治療については、30例の入院日数は6~33日、平均11.5日で、総治療日数は8~59日、平均21日であった。治療はウィルス性疾患であるため、対症療法的なものにならざるをえないが、ほとんどの症例はテトラサイクリン系の抗生物質と免疫グロブリン製剤で治療を行った。実質の圧迫・萎縮を防ぐために早期に睾丸白膜の乱

切または穿刺¹³⁾を行なう報告もあるが、我々は行っていない。合併症は、腺組織系は成人に多く、神経系統は小児に多い⁶⁾。しかし本症において、副睾丸炎の合併症としての診断は、その局所の状態から考えてなかなかむずかしいように思われた。後遺症について一番考えなければならないものは、造精障害である。男性不妊の原因となることが少ないという報告が多く、30~40%に睾丸実質の萎縮を来すものの、その受精障害の頻度は13%位である⁵⁾とされている。不妊症例からの検討では、石神¹⁴⁾は原因と考えられる疾患172例中25例、志田¹⁵⁾は135例中既往のある80例の内4例、加藤¹⁶⁾は116例中20例(16.8%)、入沢¹⁷⁾は141例中28例、酒徳¹⁸⁾は107例中5例とその頻度には差がある。男性不妊になる原因として、偏側罹患の際にもリンパ球系の細胞浸潤が起こり、blood testis barrier が破壊され、そのため sperm antibody の流出が起こり、antibody producing system と接触して antisperm antibody が作られる^{19,20)}といわれている。このことより、一側に発症しても対側にも障害が起こることが考えられ、偏側のみの罹患でも注意すべきで、完全なる治療が必要であると考えられる。また精液所見を考慮しつつ、経過観察は1年以上の長期にわたり行わなければならない²¹⁾こともある。その他の後遺症を含めたアンケート調査結果は、回答の得られたものは5例のみであり、しかも本疾患と関連があると思われる睾丸腫瘍^{22,23)}・乳癌²⁴⁾・女性化²⁵⁾については認められなかった。

結 語

当科で経験した流行性耳下腺炎性睾丸炎患者30例に対して臨床的検討を加えた。

①年齢分布では20歳代が15例と最も多かった。

- ②発症時期は7月と9月に多い。
 ③患側は右側に多かった。
 ④耳下腺腫脹より睾丸症状出現までは、4日後が最も多く、1例睾丸症状が先行した症例を認めた。
 ⑤治療は主としてテトラサイクリン系の抗生物質と免疫グロブリン製剤にて行った。
 ⑥合併症としては膀胱炎・肝炎・髄膜炎が各1例、副睾丸炎を3例に認めた。
 ⑦精液所見では両側罹患の症例はもちろん、片側の症例においても結果は不良のことがあるため、十分な治療と1年以上にわたる経過観察が必要であると思われた。

(なお本論文の主旨は第30回日本不妊学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 田村 一, 八木節子: 流行性耳下腺炎に併発せる睾丸炎について, 治療および処方, 23:1326, 1942.
- 2) 小川正見, 池田直昭: 流行性耳下腺炎性睾丸炎, 臨床皮泌, 12:1173, 1958.
- 3) 片村永樹, 新井永植, 福山拓夫, 小松洋輔: 流行性耳下腺炎性睾丸炎の5例, 泌尿紀要, 13:35, 1967.
- 4) 熊本悦明: 男性不妊症の診断治療の進歩と現状, 第4回浜松カンファレンス, 泌尿器科学の最近の進歩, 19, 阿曾住郎編, 浜松医科大学泌尿器科学教室, 浜松, 1983.
- 5) 本間 直: 流行性耳下腺炎, 日本臨床(春季臨時増刊号), 43:689, 1985.
- 6) 甲野礼作: ムンプス・ウイルス感染症について, 臨床, 5:528, 1952.
- 7) 重松 俊: 耳下腺炎性睾丸炎, 泌尿器科学, 第一版, P. 411, 医学書院, 東京, 1973.
- 8) 本村四男: 睾丸炎ならびに出血性腎炎を併発せる小児流行性耳下腺炎の1例, 臨小児誌, 14:595, 1940.
- 9) 吉田和世: 流行性耳下腺炎の臨床的観察(付:尿ザアスターゼ値について), 小診療, 18:1059, 1955.
- 10) 加藤 攻, 村松 直, 平岩親輔, 山田芳彰, 西川英二, 深津英捷, 瀬川昭夫: 耳下腺腫脹を伴うムンプス睾丸炎の1例, 愛知医大誌, 11:104, 1983.
- 11) 近藤兼吉: 青年流行性耳下腺炎の数例とリンゲル氏液の効果について, 耳鼻臨床, 42:222, 1949.
- 12) 川名林治: 感染症サーベイランス情報, Medical Tribune(感染症版), P.54, 1986.
- 13) 上原哲夫, 松岡政紀, 大山朝弘: 急性流行性耳下腺炎後睾丸, 副睾丸炎の臨床的研究, 沖縄医学会誌, 19:173, 1981.
- 14) 石神襄次, 森 昭, 山本 治, 原 信二: 男性不妊の研究, 日不妊会誌, 7:257, 1962.
- 15) 志田圭三, 茅原礼七, 吉沢信雄, 丸山寛, 武田裕寿, 栃木 幸, 熊谷研介, 持田 豊, 大島博幸, 根岸壮治, 北沢豊吉, 小林 修, 中野渡亀夫, 内藤正之, 吉田富佐男: 男子不妊症の臨床, ホと臨床, 8:917, 1960.
- 16) 加藤篤二, 柳原正志, 田辺泰民, 田中広見: 男性不妊症の臨床統計的観察, 日不妊会誌, 10:1, 1965.
- 17) 入沢俊氏, 白井将文, 松下鉦三郎, 加賀山学, 一条貞敏: 男性不妊症の統計的観察, 日不妊会誌, 11:238, 1966.
- 18) 酒徳治三郎: 男子性機能障害症の睾丸生検像について 第II篇男子不妊症の睾丸生検像, 泌尿紀要, 4:610, 1958.
- 19) 古屋聖児, 熊本悦明, 伝法公磨, 須藤宏人, 井川欣市, 高塚慶次: Mumps orchitis の形態学的, 免疫学的研究, 日泌尿会誌, 71:973, 1980.
- 20) 熊本悦明, 古屋聖児: ムンプス睾丸炎と睾丸障害, 臨床とウイルス, 8:271, 1980.
- 21) Barták, V.: Sperm count, morphology and motility after unilateral mumps orchitis. J Reprod Fertil, 32:491, 1973.
- 22) Kaufman, J. J. and Bruce, P.T.: Testicular atrophy following mumps; a cause of testis tumour?. Br. J. Urol., 35:67, 1963.
- 23) Ehrengut, W., Schwartau, M. and Hubmann, R.: Testiculäre vorerkrankungen bei patienten mit hodentumoren unter besonderer berücksichtigung der mumpsorchitis. Urologe. A, 19:283, 1980.
- 24) Nicolis, G. L., Sabetghadam, R., Hsu, C. C. S., Sohval, A. R. and Gabrilove, J. L.: Breast cancer after mumps orchitis. JAMA, 223:1032, 1973.
- 25) Aiman, J., Brenner, P. F. and Macdonard, P. C.: Androgen and estrogen production in elderly men with gynecomastia and testicular atrophy after mumps orchitis. J. Clin. Endocrinol. Metab., 50:380, 1980.

A clinical study of mumps orchitis

Yasuo Sato, Daisaku Hirano, Hitoshi Kaya, Tadao Yamamoto, Kiyoki Okada and Takashi Kishimoto

Department of Urology, Nihon University, School of Medicine (Director: Prof. T. Kishimoto)

A retrospective study of the clinical course was performed on 30 patients with mumps orchitis. The age distribution showed the most frequent in twenties occupied half of all. The right testis was involved in 16 cases, the left in 5, and the

bilateral in 9. Eighteen cases were treated with both tetracycline antibiotics and gamma globulin. The following disorders were combined simultaneously and subsequently with one of pancreatitis, one of hepatitis, one of meningitis, and three of epididymitis. As to the seminal analysis, poor

results could be obtained not only in the bilateral but also unilateral involvement.

Therefore, complete treatment and consecutive seminal examination should be needed for the prevention of the male sterility.

(受付：昭和61年7月17日)

男子における高プロラクチン血症

Hyperprolactinemia in Men

千葉大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 島崎 淳教授)

皆川 秀夫 布施 秀樹 片海 善吾
Hideo MINAGAWA Hideki FUSE Zengo KATAUMI

伊藤 晴夫* 島崎 淳
Haruo ITO Jun SHIMAZAKI

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

血中プロラクチンが高値を示した6症例について内分泌学的検討を行なった。内訳は、不妊を主訴とするもの4例で、このうち2例に下垂体微小腫瘍が疑われた。射精障害を呈したものは1例で、脳腫瘍術後であり、二次性徴欠除を主訴とした1例は下垂体腫瘍であった。LHの低下は3例にみられた。LH-RH 負荷には4例中2例に反応低下がみられ、下垂体不全が示唆された。テストステロンは3例で低下していたが、HCG 負荷では反応は正常であった。CB-154投与によりテストステロン値およびLH 値の改善をみた。今回の検討により、高プロラクチン血症における性機能障害はプロラクチンによる睪丸の直接障害によるものでなく、視床下部の障害を介したものと推定された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 195-199, 1987)

はじめに

プロラクチン (PRL) は系統発生的に最も古い下垂体前葉ホルモンであり、下等脊椎動物における生理作用は多彩である。ヒトにおいては性機能と乳腺組織に関して生理的意義を有する。しかし、その作用は二相性で、PRL 少量では刺激的 (または相対的) に働くが、PRL 過剰では阻害的に働く。女性において高 PRL 血症が不妊を惹起することが解明された。男子における高 PRL 血症と睪丸機能との関係については、なお不明の点が少ない。そこで、睪丸機能障害例における高 PRL 血症の病態について検討を加えた。

対象と方法

症例は血中 PRL が高値を示した24~34歳までの6例である (表1)。主訴は不妊が4例、射精障害1例、二次性徴の欠除1例であった。このうち、症例4, 5は精索静脈瘤を合併し、症例5は勃起力、性欲とも減退してい

た。症例6は小学生の頃より肥満がみられ、二次性徴の発来もなく、初診時、陰毛の欠除、女性化乳房、両側矮小睪丸を呈した。

脳外科的検索により、1例に下垂体腫瘍が発見され、2例では下垂体の microadenoma が疑われた。症例5では10年前に脳腫瘍手術の既往があるが、詳細は不明であった。

血中ホルモンの測定はラジオイムノアッセイにより行なった。すなわち、LH, FSH の測定は LH キット第一、FSH キット第一 (第一RI社)、PRL の測定はプロラクチンリアビーズキット (ダイナボット社)、テストステロンの測定はテストステロン H_a キット (CIS社) により行なった。正常範囲はそれぞれ 6.5~34.5 mIU/ml, 1.9~21.8mIU/ml, 2.0~20.0ng/ml および 300~850ng/dl である。

LH-RH 負荷テストは合成 LH-RH (田辺製薬) 100 μ g を静注し、注射前および注射後30, 60, 90, 120分に採血し、血中のLH, FSH を測定した。

HCG 負荷テストは HCG (帝国臓器) 4000単位を3日間、連続筋注し、投与前および投与4日目の早朝に

* 現: 帝京大学市原病院

表 1 対象患者と血中ホルモン基礎値

症例 No.	年齢	主 訴	下垂体腫瘍	LH	FSH	テストステロン	PRL
1	31	不妊 (Asthenozoospermia)	不明	16.9	14.8	588	34.8
2	27	不妊 (Oligozoospermia)	無し	13.1	18.4	443	25.1
3	34	不妊 (Normozoospermia)	疑い	4.4	2.8	143	64.5
4	29	不妊 (Azoospermia)	疑い	2.0	7.5	540	34.4
5	28	射精障害	脳腫瘍術後	4.3	5.3	32	50.7
6	24	二次性徴の欠除	有り	10.0	2.8	24	1400

採血し、血中のテストステロンを測定した。

TRH 負荷テストは合成 TRH (田辺製薬) 500 μ g を静注し、注射前および注射後30, 60, 90, 120分に採血し、血中の PRL を測定した。

CB-154負荷テストは CB-154 (サンド) 5mg を経口投与し、投与前および投与後30, 60, 90, 120, 180, 240分に採血し、血中 PRL を測定した。また、症例1から5に CB-154 1日2.5mg の経口投与を2~12週行ない、投与前後の血中ホルモン値を測定した。症例6では悪心、嘔吐のため継続投与は不能であった。

結 果

1) 血中ホルモン値

LH が正常範囲内であった3例中2例では、PRL 上昇は軽度で、テストステロンは正常であった。LH が低値を示す3例中2例では、PRL が50ng/ml 以上で、テストステロンも低値であった。症例6は下垂体の macroadenoma の症例であり、血中 PRL は極めて高く、テストステロンは極端に低い(表1)。

PRL とテストステロンとの関係を見ると、PRL が高いほどテストステロンが低い傾向を示す。しかし、PRL が50ng/ml 以下ではテストステロンは正常範囲にとどまっていた。

CB-154投与中のホルモン値を見ると、PRL は5例全例で正常化した。テストステロンも低下していた2例で正常化した。LH の低下をみた3例中2例で正常化した(図1)。症例6でも CB-154 5mg 1回内服により PRL の低下がみられ、本症例でも CB-154の有効性が示された(図2)。なお、CB-154の臨床効果として、症例3で性欲減退が改善し、精液量も増加した。

2) HCG 負荷テスト

HCG 負荷テスト(症例4, 5, 6)の結果、3例中2例では刺激後のテストステロン値は正常域まで達しなかった。しかし、反応率は全例良好で、辜丸間質細胞の予備能は良好なことが示唆された(表2)。

3) LH-RH 負荷テスト

LH-RH 負荷テストを施行し得た4例中2例で、LH,

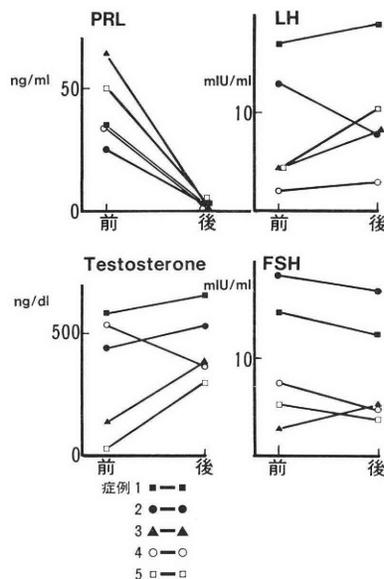


図 1 CB-154投与前後の基礎値の変化

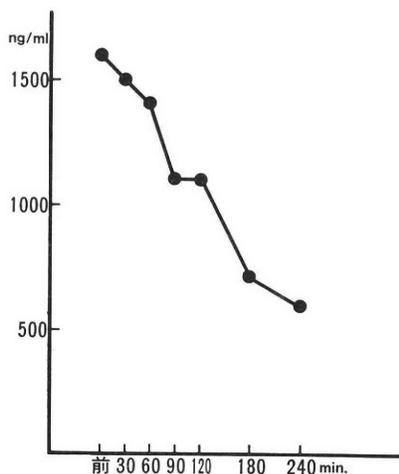


図 2 症例6の CB-154 5mg 内服負荷試験

表 2 HCG 負荷試験

症例 No.	前 値	負荷後値	反応率
4	527	1,420	2.7
5	38	224	5.9
6	18	97	5.4

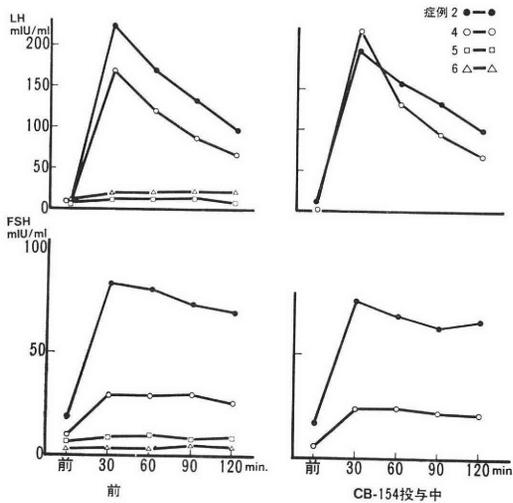


図 3 CB-154投与前および投与中の LH-RH 負荷試験

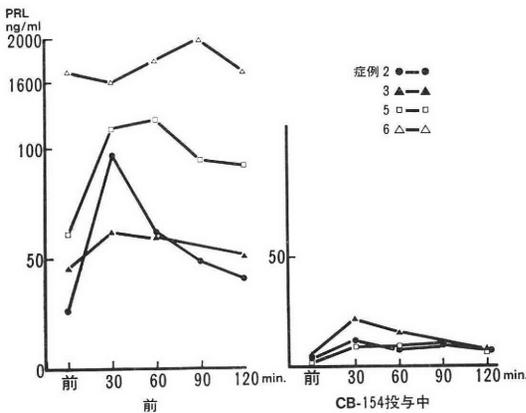


図 4 CB-154 投与前および投与中の TRH 負荷試験

FSH ともに正常の反応を示したが、2例では LH-RH に反応せず、下垂体不全が示唆された。CB-154投与前および投与中の比較が可能なのは2例(症例2, 4)のみであるが、いずれも反応に差はみられなかった(図3)。

4) TRH 負荷テスト

4例中2例(症例2, 5)はほぼ正常な反応を示した。症例6では TRH 負荷による反応はなく、症例3では反応不良であった。CB-154投与中の TRH 負荷テスト

では、いずれも正常な反応がみられ、症例3でも反応性の増加がみられた(図4)。

考 按

高 PRL 血症の原因疾患としては、嫌色素性下垂体腺腫、末端肥大症、異所性松果体腺腫などの視床下部下垂体系の器質的疾患、甲状腺機能低下症、精神神経疾患、腎不全、薬剤服用等があげられている²⁾。血中 PRL が 300ng/ml 以上の高値を呈する場合には PRL 産生下垂体腺腫の存在が強く疑われるが、われわれの6例のうち1例は PRL が 1,600ng/ml であり、脳外科的検索により PRL 産生下垂体腺腫と診断された。2例は下垂体微小腺腫を疑われたが、PRL の上昇は軽度である。

Segal らは高 PRL 血症の臨床像として、(1) hypogonadism, (2) インポテンス等の性機能障害、(3) 不妊等の睾丸機能障害をあげている³⁾。これによれば、症例5は(2)に、症例1~4は(3)に属すると思われる。

高 PRL 血症のさい、LH, FSH の基礎値は正常範囲にあり、テストステロンが低値のわりには LH, FSH は上昇しない。Thorner ら⁴⁾はこれをゴナドトロピンの比較的欠乏状態であるとした。われわれの例では LH は6例中3例で明らかな低値を示した。血中テストステロンは正常ないし低値をとると報告されている^{3,5)}が、われわれの場合も半数の症例で低値であった。

高 PRL 血症のさいに hypogonadism あるいはインポテンスとなるメカニズムについてみると、一般的にはインポテンス患者の高 PRL 血症が正常化すると血中テストステロンが上昇し、インポテンスが改善するので、高 PRL 血症→テストステロン低値→インポテンスの因果関係が成立すると考えられる⁶⁾。

われわれの例では HCG 負荷テストを行なっても正常反応を呈した。文献的にも高 PRL 血症では HCG 負荷テストに正常に反応するといわれる^{7,8)}。したがって、睾丸のゴナドトロピンに対する反応性は低下していないと考えられる。これより、高 PRL 血症では睾丸レベルでゴナドトロピンの作用を阻害するとする説⁹⁻¹¹⁾はとりがたく、少なくともこのメカニズムは主要なものではないであろう。

LH-RH 負荷テストを行なったわれわれの症例のうち2例では、正常反応がみられた。また、治療の前後で LH-RH に対する LH, FSH の反応は変わらなかった。したがって、下垂体そのものの障害はないものとおもわれる。脳腫瘍術後および macroadenoma の存在する各1例では反応がみられなかったが、これは間脳下垂体の器質的障害あるいは下垂体の圧迫によると考えられよう。

高 PRL 血症が存在しても、LH-RH の間歇的投与で

低ゴナドトロピン 性腺不全症の 辜丸機能が正常化する¹²⁾こともこの考えを支持するものであろう。

ラットの除睾後の LH 上昇をテストステロン移植で抑制するさいに高 PRL 血症があると少量のテストステロンで抑制できることは、PRL がステロイドに対する視床下部-下垂体系のネガティブフィードバック機構の感受性を増したと解せよう¹³⁾。高 PRL 血症においては LH の episodic secretion が典型的でなくなることは、視床下部が障害部位であることを示すであろうし、クロミフェンに反応しないこともこれを支持するものと考えられる¹⁴⁾。

以上のことより、高 PRL 血症が作用する部位は視床下部であり、ここでのドーパミンのターンオーバーが増し、ために、視床下部ホルモンである LH-RH の分泌を抑制し、ゴナドトロピン分泌が阻害されるものと推測される¹⁵⁾。

(本論文の要旨は、1984年11月、第29回日本不妊学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 島崎 淳, 伊藤晴夫: 性腺機能検査—男性, 臨床検査, 27: 24, 1983.
- 2) 加藤 譲, 島津 章, 太田 光, 樺山泰弘, 松永和彦, 井村裕夫: 高プロラクチン血症の診断と治療, ホと臨, 32: 27, 1984.
- 3) Segal, S., Yaffe, H., Laufer, N. and Ben-David, M.: Male hyperprolactinemia: Effect on fertility. *Fertil. and Steril.*, 32: 566, 1979.
- 4) Perryman, R. and Thorner, M.: The effects of hyperprolactinemia on sexual and reproductive function in men. *J. Androl.*, 5: 233, 1981.
- 5) Saidi, K., Wenn, R. V. and Sharif, M.: Bromocriptine for male infertility. *Lancet*, 29: 250, 1977.
- 6) Franks, S., Jacobs, H. S., Martin, N. and Nabarro, J. D. N.: Hyperprolactinemia and impotence. *Clin. Endocrinol.*, 8: 277, 1978.
- 7) Carter, J. N. Tyson, J. E., Toli, G., Vliet, S. V., Faiman, C. and Friesen, H.G.: Prolactin-secreting tumors and hypogonadism in 22men. *New Engl. J. Med.*, 299: 847, 1978.
- 8) 福田 勝, 平山博章, 堤坂敏昭, 清田明憲, 奥山輝明, 古谷 博: 高プロラクチン血症の臨床的研究—分類と下垂体機能について—, 日不妊会誌, 29: 354, 1984.
- 9) 大野一典, 熊本悦明, 梅原次男, 丸田 浩: 高プロラクチン血症を呈した辜丸機能不全の4例, 日不妊会誌, 28: 345, 1983.
- 10) Padron, R. S., Mas, J. and de Acosta, O. M.: Testicular response to human chorionic gonadotrophin in men with non-tumoural

hyperprolactinemia. *Int. J. Androl.*, 7: 495, 1984.

- 11) Fonzo, D., Faglia, G., Ambrosi, B., Gaggini, M., Gallone, G., Moriondo, P., Travaglini, P. and Barbero, R.: The role of prolactin in the regulation of the male sexual functions. In: *Oligozoospermia: Recent progress in Andrology*. edited by G. Frajese, Hafez, E.S.E., Conti, C. and Fabbini, A. 147, Raven Press, New York, 1981.
- 12) Skarin, G., Nillius, S. J., Wibell, L. and Wide, L.: Chronic pulsatile low dose GnRH therapy for induction of testosterone production and spermatogenesis in a man with secondary hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 723, 1982.
- 13) McNeilly, A. S.: PRL and the control of gonadotropin secretion in the female. *J. Reprod. Fert.*, 58: 537, 1980.
- 14) Bohnet, H. G., Dahlin, H. G., Wuttke, W. and Schneider, H. P. G.: Hyperprolactinemic anovulatory syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42: 132, 1975.
- 15) Arafah, B. M., Manni, A., Brodkey, J. S., Kaufman, B., Velasco, M. and Pearson, O. Z H.: Cure of hypogonadism after removal of prolactin secreting adenoma in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 91, 1981.

Hyperprolactinemia in men

Hideo Minagawa, Hideki Fuse, Zengo Kataumi, Haruo Ito and Jun Shimazaki

Department of Urology, Chiba University Medical School

(Director: Prof. Jun Shimazaki)

We studied hormonal examination about six cases of hyperprolactinemic men. Four cases complained of infertility, and two cases of those were suspected to suffer from pituitary microadenomas. One case, who had undergone the operation of brain tumor, complained of ejaculatory disorder, and another case who complained of the defect of secondary sexual characteristics suffered from pituitary adenoma. The basal levels of luteinizing hormone (LH) in blood in those three cases were low. The LH responses to luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) administration were low in two of four cases, which suggested the pituitary disorder. The basal levels of testosterone in blood were low in three cases, but the response to human chorionic gonadotropin (HCG) administration were found to be normal. The LH and testosterone levels

in blood reached to the normal range by medication of CB-154 in those cases.

In these examination we came to the conclusion that in hyperprolactinemic men the sexual

dysfunction was due not to direct testicular disorder by prolactin, but to the disturbance of hypothalamus by prolactin.

(受付：昭和61年8月26日)

特発性男子不妊症に対する Methylcobalamin の検討

—精漿内 Vitamin B₁₂ 濃度を中心として—

Clinical Effect of Methylcobalamin in Idiopathic Infertile Men —Relationship between Seminal Plasma Vitamin B₁₂ Concentration and Improvement of Sperm Density and Motility—

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

大橋輝久 永井敦 入江伸
Teruhisa OHASHI Atsushi NAGAI Shin IRIE
大橋洋三 古川雅人 山下良孝
Yozo OHASHI Masato FURUKAWA Yoshitaka YAMASHITA
東條俊司 武田克治 大森弘之
Shunji TOHJOH Katsuji TAKEDA Hiroyuki OHMORI

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori),
Okayama University Medical School,
Okayama, 700, Japan

特発性男子不妊症 75 例に対し, methylcobalamin (methyl-B₁₂) 1,500 μ g/日を 1~19カ月投与し, 精液所見の改善および精漿中 vit. B₁₂ 濃度について検討し, 以下の如き結果を得た.

1. 精子濃度については 29.3% (17/58例), 運動率 45% (18/40例) に改善がみられ, また総合評価で 46% (28/61例) に改善を認め, 内 2 例に妊娠の成立をみた.
2. 精子濃度および運動精子濃度について, 投与前と比較し 6 カ月後に有意の増加を認め, 長期間投与の有用性が示唆された. 一方, 長期間投与によつても, 中等度の acne が 1 例にみられたのみで, 重篤な副作用は認められず, methyl-B₁₂ が特発性男子不妊症に有用な薬剤であることが判明した.
3. 精漿中 vit. B₁₂ 濃度に関しては, methyl-B₁₂ 投与後著明に増加し, とくに B₁₂ 増加量が精子濃度改善群に有意に高く, 精細管内 vit. B₁₂ 濃度の増加が精子形成および成熟を惹起させる可能性が示唆された.

(Jap. J. Fert. Ster., 32 (2), 200-205, 1987)

はじめに

男子不妊症に対する非ホルモン性薬剤としては, ATP 製剤, co-enzyme Q₁₀, vitamin E, kallikrein, 漢方薬などが挙げられているが, 最近, 造精機能を賦活化するといわれている vitamin B₁₂ 製剤である methylcobalamin (Methylcobal® エーザイ) を使用し, 若干の知見を得たので報告する.

対象ならびに方法

A. 対象

対象は不妊を主訴として, 当科内分泌外来を受診した 75 例であり, 年齢は 32.6 \pm 3.1 歳 (平均値 \pm S.D.) で, その 56.0% が 30~34 歳である. また結婚年齢は 27.4 \pm 3.1 歳で, その 60.0% が 25~29 歳であり, 不妊期間は 4.8 \pm 2.9 年で, その内 4~6 年未満が 29.3%, 2~4 年未満が 28.0% と過半数を占めている. 合併症は 3 例に認められ, 各々慢性前立腺炎, 副睾丸炎, 精索静脈瘤および副

表 1 評価方法

- 1) 精子数改善度 (投与前値が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のものに対して判定する)
- (1) 著明改善・精子数が治験前値より $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの。
 - (2) 改善・精子数が治験前値より $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの。
 - (3) 不変・精子数が治験前値と比較して $\pm 10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の変動のもの。
 - (4) 悪化・精子数が治験前値より $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上減少したもの
- 2) 運動率改善度 (投与前値が 50% 以下のものに対して判定する)
- (1) 著明改善・運動率が治験前値に比べ、20% 以上改善したもの。
 - (2) 改善・運動率が治験前値に比べ、10% 以上改善したもの。
 - (3) 不変・運動率が治験前値と比較して 10% 未満の変動のもの。
 - (4) 悪化・運動率が治験前値に比べ、10% 以上悪化したもの。
- 3) 全般改善度
精子数および運動率に対する治療効果を総合的に判定し、5 段階で判定する。
- 1. 著明改善 2. 改善 3. やや改善 4. 不変 5. 悪化

睾丸奇形であった。また既往歴としてムンプスが 5 例に認められた。

なお配偶者の年齢は 29.5 ± 3.2 歳で、その 86.6% が 25 ~ 34 歳であった。また配偶者の妊娠の経験は 13.3% に認められ、産婦人科における診察で 92.0% に異常を認めなかった。

前治療に関しては、33 例に kallikrein, テストステロン製剤, hCG・hMG 療法を行っている。また精巢容量については山口大式 orchidometer¹⁾ を使用して測定したが、左側 $15.2 \pm 3.5\text{ml}$, 右側 $15.4 \pm 3.5\text{ml}$ と左右差を認めなかった。

B. 方法

投与方法については、methyl-B₁₂ 1 日量 $1,500\mu\text{g}$ を 3 分服、1~19 カ月、平均 4.7 カ月投与した。

精液検査は原則として投与前は 2 回以上、投与開始後は 3 カ月に 1 回施行した。なお精液は禁欲 3 日以上で、外来にて用手法で採取させた。また投与前後に血中 LH, FSH, testosterone (T) を RIA 法で、精漿中ビタミン B₁₂ (vit. B₁₂) 濃度をセファデックス固相法を用いた CPBA 法にて測定した。

効果判定については、投与前精子数が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未

表 2 Methyl-B₁₂ の精液所見に対する影響

層 別	投与前	3 カ月後	6 カ月後
精 液 量 (ml)	3.02 ± 1.23 n=49 —	2.99 ± 1.20 n=49 N.S.	3.28 ± 1.25 n=22 N.S.
精 子 濃 度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	17.6 ± 25.3 n=50 —	25.9 ± 33.8 n=50 P < 0.1	30.4 ± 27.1 n=22 P < 0.01
精 子 運 動 率 (%)	42.3 ± 26.0 n=50 —	45.0 ± 25.4 n=50 N.S.	47.7 ± 26.6 n=22 N.S.
奇 形 率 (%)	21.7 ± 10.1 n=48 —	20.7 ± 7.6 n=48 N.S.	21.7 ± 14.3 n=22 N.S.
運 動 精 子 濃 度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	8.2 ± 10.6 n=50 —	13.5 ± 17.3 n=50 P < 0.05	18.7 ± 19.1 n=22 P < 0.01

* 検定は Wilcoxon's sign rank test

表 3 精子数, 運動率改善度

層 別	精子数改善度		運動率改善度	
	症例数	%	症例数	%
著明改善	10	17.2	12	30.0
改 善	7	12.1	6	15.0
不 変	38	65.5	12	30.0
悪 化	3	5.2	10	25.0
計	58	100.0	40	100.0
判定不能	11	—	3	—
*判定せず	6	—	32	—
計	75	—	75	—

* 精子数 $> 40 \times 10^6/\text{ml}$ あるいは運動率 $> 50\%$ のもの

満あるいは運動率 50% 未満の症例を検討の対象とし、表 1 の如き全国規模で行われた methyl-B₁₂ 用量比較試験の際、使用された判定基準を用い、全般改善度については精子数、運動率の両者の改善を参考にして、著明改善、改善、やや改善、不変、悪化の 5 段階に判定した。なお統計処理については、Wilcoxon's sign rank test, t 検定、 χ^2 検定を用いた。

成 績

A. 精液所見 (表 2)

Methyl-B₁₂ を 3 カ月以上投与した 50 例における精液

表 4 血中 LH, FSH, T および精漿中 B₁₂ 濃度

層 別	投 与 前	投 与 後	対応のある t 検定
<ホルモン値>			
L H (mIU/ml)	16.7±7.28 (n=12)	16.1±8.61 (n= 6)	N.S.
F S H (mIU/ml)	13.3±6.84 (n=12)	11.1±7.85 (n= 6)	P<0.05
テストステロン (ng/ml)	4.20±1.78 (n=13)	3.68±1.17 (n= 7)	N.S.
精漿中 B ₁₂ 量 (pg/ml)	1,446± 705 (n=45)	2,311±1,148 (n=43)	P<0.001

所見の変動を表 2 に示したが、精液量、精子運動率、奇形率については、6カ月後に有意の変動は認めなかった。一方、精子数については、投与前 $17.6 \pm 25.3 \times 10^6/\text{ml}$ が3カ月後には $25.9 \pm 33.8 \times 10^6/\text{ml}$ と増加の傾向を認め、さらに6カ月後には $30.4 \pm 27.1 \times 10^6/\text{ml}$ と有意の増加を認めた。また運動精子数に関しても、投与前 $8.2 \pm 10.6 \times 10^6/\text{ml}$ が3カ月後 $13.5 \pm 17.3 \times 10^6/\text{ml}$ 、6カ月後 $18.7 \pm 19.1 \times 10^6/\text{ml}$ といずれも有意の増加を認めた。

B. 精子数、運動率改善度 (表 3)

75例中 methyl-B₁₂ 投与開始後受診せず、投与後の精液検査が行われなかった10例、精子数 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上でかつ運動率が50%以上であった不適格症例3例および副作用で中止した1例の、計14例を除く61例で検討を行った。

まず精子数改善度については、投与前精子数が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上を示した例を除く58例中、著明改善17.2%、改善12.1%と29.3%に改善を認めた。また運動率改善度については、投与前運動率が50%以上の例を除く40例中、著明改善30%、改善15%と45%に改善を認めた。

また75例の内、妊娠の有無が不明の4例を除く71例中2例に妊娠の成立を認め、各々治療開始4, 7週後で、いずれも自然妊娠であった。

C. 副作用

副作用に関しては75例中、わずか1例に中等度の acne を認めたにすぎず、重篤な副作用は1例も認められなかった。

D. 血中 LH, FSH, T および精漿中 vit. B₁₂ 濃度 (表 4)

血中 LH, FSH, T については、投与前後にさほどの変動は認められず、投与後、FSH が低下した症例がみられたが、6例と少なく、臨床的には有意の変動はないと考える。

一方、精漿中 vit. B₁₂ 濃度に関しては、投与前 $1,446 \pm 705\text{pg/ml}$ が投与後 $2,311 \pm 1,148\text{pg/ml}$ と有意の上昇を認めている。

E. 全般改善度、概括安全度および有用度 (表 5)

表 5 全般改善度および有用度

全般改善度

層 別	全般改善度判定	
	症例数	%
著 明 改 善	14	23.0
改 善	14	23.0
や や 改 善	4	6.6
不 変	24	39.3
悪 化	5	8.2
計	61	100.0
判 定 不 能	14	—
計	75	—

有用度

層 別	有用度判定	
	症例数	%
極 め て 有 用	14	23.0
有 用	17	27.9
や や 有 用	4	6.6
有 用 性 な し	24	39.3
好 ま し く な い	2	3.3
計	61	100.0
判 定 不 能	14	—
計	75	—

全般改善度については、精子数および精子運動率より総合評価したが、表 5 の如く、判定不能を除く61例中、著明改善14例、改善14例と改善以上が46%に認められた。

概括安全度については、前述した如く中等度の acne が1例に認められたのみで、98.7%が副作用を認めず、安全性が高いことが確認された。

また有用度については、判定不能例を除く61例中、極めて有用14例、有用17例と有用以上が50.9%であった。

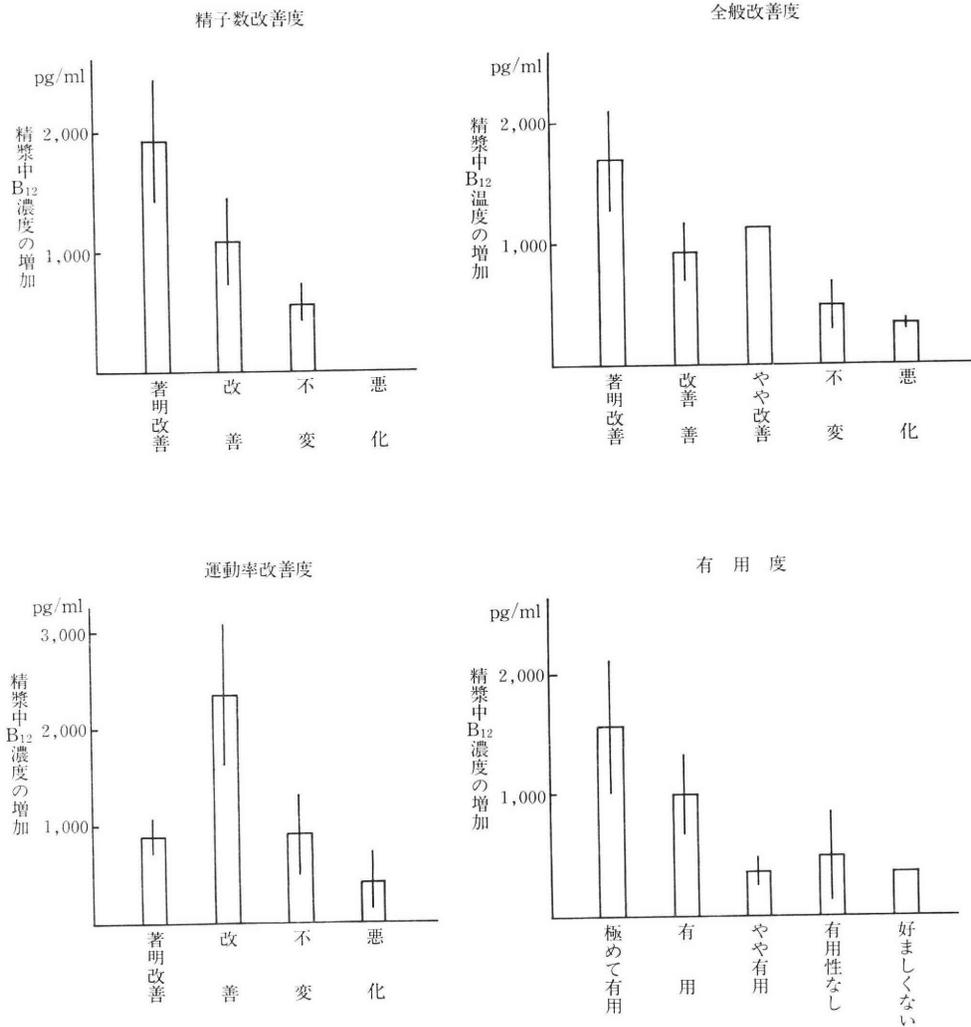


図 1 精漿中 vit. B₁₂ 濃度と臨床効果の関連性

F. 精漿中 vit. B₁₂ 濃度と臨床効果の関連性 (図1)
 精漿中 vit. B₁₂ 濃度と効果判定の関連性について検討した。まず精子数改善度についてであるが、投与前値では有意の差は認められなかったが、投与後は著明改善群 3,483±1,560pg/ml, 改善群 2,378±607pg/ml と、不変群の 1,871±881pg/ml に比し高値を示し、とくに増加量においては、図1に示す如くこの差がより明確になり、改善群以上は B₁₂ 増加量が 1,000pg/ml 以上を示した。一方、運動率改善度に関しては有意の差は認められなかった。また全般改善度および有用度についても、投与後著明改善群 3,245±1,466pg/ml、極めて有用群 3,116±1,454 pg/ml と高値を示し、さらに B₁₂ 増加量についても精子数改善度ほど明確ではないが、両群に有意の上昇を認めている。

G. 精漿中 vit. B₁₂ 増加量と臨床効果の関連性 (表6)
 前述した如く、臨床効果と精漿中 B₁₂ 増加量との間に関連性が認められたが、この点をさらに明確にするため、B₁₂ 増加量のボーダーラインを 1,000pg/ml とし、2群にわけて検討した。

まず精子数改善度については、1,000pg/ml 未満群の改善率が 15.0% に対し、1,000pg/ml 以上群で 72.7% と有意の差を認めたが、運動率改善度に関しては有意の差を認めなかった。また全般改善度、有用度についても両群の間に改善以上でその傾向が、また著明改善で有意の差が認められた。

考 察

Sharp らが乏精子症を合併した悪性貧血患者に met-

表 6 精漿中 Vit-B₁₂ 増加量と臨床効果の関連性

1. 精子数 効果判定

	著明改善	改善	不変	悪化	改善率	著明>	改善>
1,000 未満	1(5.0)	2(10.0)	17(85.0)	0(0.0)	15.0%	P<0.05	P<0.01
1,000 以上	5(45.5)	3(27.3)	3(27.3)	0(0.0)	72.7%		

2. 運動率 効果判定

	著明改善	改善	不変	悪化	改善率	著明>	改善>
1,000 未満	3(30.0)	1(10.0)	3(30.0)	3(30.0)	40.0%	N.S.	N.S.
1,000 以上	2(22.2)	3(33.3)	3(33.3)	1(11.1)	55.6%		

3. 全般改善度

	著改	改善	やや改善	不変	悪化	改善率	著明>	改善>
1,000 未満	2(10.0)	5(25.0)	0(0.0)	11(55.0)	2(10.0)	35.0%	P<0.05	P<0.1
1,000 以上	6(50.0)	3(25.0)	1(8.3)	2(16.7)	0(0.0)	75.0%		

4. 有用度

	極めて有用	有用	やや有用	有用性なし	好ましくない	有用率	極めて有用>	有用>
1,000 未満	3(15.0)	4(20.0)	3(15.0)	9(45.0)	1(5.0)	35.0%	P<0.05	P<0.1
1,000 以上	6(50.0)	4(33.3)	0(0.0)	2(16.7)	0(0.0)	83.3%		

hyl-B₁₂ を用い、精液所見の改善とともに精漿中 vit. B₁₂ 濃度が血中濃度より高いことを報告²⁾して以来、男子不妊症患者に対し methyl-B₁₂ の投与がなされ、その有用性が報告されるようになった³⁻⁷⁾。

動物実験による基礎的検討において、methyl-B₁₂ はメチル基転移反応を介し、生体内における核酸、蛋白合成を促進し⁸⁾、制癌剤あるいは CdCl₂ 投与による精巣障害に対し、防御あるいは回復能を促進する作用を有することが判明している^{9,10)}。とくに木村らのラットにおける検討⁹⁾で、methotrexate による step 15~19 spermatid 消失を認めた精細管の頻度が methyl-B₁₂ 併用により35.0%から12.7%に抑えられ、さらに doxorubicin hydrochloride により精細胞の消失した精細管が methyl-B₁₂ 併用により55.2%から25.0%におさえることができる。以上より、methyl-B₁₂ の作用の一つは精子形成の惹起、とくに spermatogonia あるいは spermatocyte に働くことが示唆される。

臨床的検討において、木村らは1日量1,500 μ g 投与により、総精子数で79.5% (58/73例)、精子運動率で82.2% (60/73例)の増加を認めており³⁾、また磯山らも同じ投与量で、精子濃度38.4% (10/26例)、精子運動率50% (13/26例)の増加を認めている⁵⁾。

一方、奥山らは無作為に抽出した特発性男子不妊症16例に methyl-B₁₂ 3,000 μ g/日、10例に clomiphene citrate 50mg/日を投与して比較検討しているが、前者は精子濃度、運動率とも44% (7/16例)の改善を認め、後者の40% (4/10例)に比し良好な成績を得ている⁴⁾。また飯塚らの多施設共同研究における1,500~3,000 μ g/日投与による検討⁶⁾で、精子濃度58.9% (93/158例)、運動率42.9% (67/156例)の改善を認め、195例中37例 (18.9%)に妊娠の成立を認めている。さらに彼らは methyl-B₁₂ が精子濃度改善にとくに有用であると述べている。以上の報告は、判定基準に多少の違いはあるが、著者らの今回の成績とはほぼ同じ結果であると考えられる。

次に血中 LH, FSH, T に対する methyl-B₁₂ の影響については、今回の成績は奥山ら⁴⁾、磯山ら⁵⁾、岡田ら⁷⁾と同様、顕著な変化は認められず、methyl-B₁₂ は血中ホルモンを介さないことが判明した。

最後に精漿中 vit. B₁₂ 濃度についてであるが、木村らは投与前の B₁₂ 濃度と精子数の間に関連性はなく、また投与後は、B₁₂ 濃度は有意の上昇を示すが、運動率改善群と非改善群との間に有意の差は認められなかつたと報告している³⁾。

しかし著者らの詳細な検討において、精漿中 B₁₂ 濃度

の増加量と精子数改善度との間には密接な関連性があり、とくに B₁₂ 濃度が 1,000pg/ml 以上の増加を示した例では精子濃度の有意の改善を認めている。さらに投与前値では有意差がないことより、methyl-B₁₂ の男子不妊症に対する作用が精細管内における vit. B₁₂ の不足を補うことではなく、精細管内に多量に移行した vit. B₁₂ が精子形成の誘導を惹起することが推察される。また運動率と vit. B₁₂ 増加量との間に密接な関連性は認められなかったが、臨床的に運動率改善が多数認められ、さらに総合改善度と精漿中 B₁₂ 増加量との間にも関連性が認められたことにより、精子成熟にも vit. B₁₂ が作用することが示唆された。

いずれにせよ、今回の検討で methyl-B₁₂ は精子形成および成熟を惹起させることが考えられ、さらに臨床的に特発性男子不妊症患者に対し有用な薬剤で、かつ長期投与によりさらに有用性が高まることが示唆された。

おわりに

特発性男子不妊症 75 例に対し、methyl-B₁₂ 1 日量 1,500 μ g 投与の有用性および精漿内 vit. B₁₂ 濃度との関係について報告した。

なお本論文の要旨は第 24 回日本不妊学会中国・四国支部総会において発表した。

文 献

- 1) 那須誉人, 瀧原博史, 平山 嗣, 越戸克和, 酒徳治三郎: 新しい辜丸測定器 (Orchidometer) について, 日不妊会誌, 24: 12, 1979.
- 2) Sharp, A. A. and Witts, L. J.: Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet*, ii: 779, 1962.
- 3) 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, 1981.
- 4) 奥山明彦, 園田孝夫: 男子不妊症に対するメチコバル® (methylcobalamin) 投与の経験, 基礎と臨床, 17: 1771, 1983.
- 5) 磯山理一郎, 川井修一, 清水芳幸, 原田宏行, 瀧原博史, 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, 1984.
- 6) 飯塚理八, 小林俊文, 末岡 浩, 小嶋 清, 兼子智, 藤井明和, 井上正人, 小林善宗, 広井正彦, 小田隆晴, 平山寿雄, 新井正夫, 中居光生, 巽 英樹, 浜田 宏, 林 方也, 玉田太郎, 小沼誠一: Methylcobalamin (CH₃-B₁₂) の男子不妊症に対する投与成績, 産婦人科の世界, 38: 171, 1986.
- 7) 岡田 弘, 藤沢正人, 岡本恭行, 岡 伸俊, 浜口毅樹, 羽間 稔, 松本 修, 守殿貞夫, 石神襄次: 乏精子症患者に対するメチルコバラミン

(CH₃-B₁₂) の臨床的検討, 日泌尿会誌, 77: 701, 1986.

- 8) 中沢恒幸, 小宮英靖, 菅野剛史: ビタミン B₁₂ および葉酸欠乏食飼育シロネズミの脊髄神経細胞内 RNA, DNA の動態, ビタミン, 42: 275, 1970.
- 9) 木村正一, 折笠精一: 制癌剤投与ラットの Spermatogenesis に対する Methylcobalamin の効果, 基礎と臨床, 18: 575, 1984.
- 10) 佐二木順子, 福島悦子, 福田芳生, 平井愛山, 田村 泰, 吉田 尚: CdCl₂ によるラット精巢炎症に対するメチル B₁₂ の効果, 炎症, 5: 45, 1985.

Clinical effect of methylcobalamin in idiopathic infertile men—relationship between seminal plasma vitamin B₁₂ concentration and improvement of sperm density and motility—

Teruhisa Ohashi, Atsushi Nagai, Shin Irie, Yoza Ohashi, Masato Furukawa, Yoshitaka Yamashita, Shunji Tohjoh, Katsuji Takeda and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori), Okayama University Medical School, Okayama, 700, Japan.

Sperm density, sperm motility, motile sperm density and seminal plasma vitamin B₁₂ concentration were investigated in 75 patients with idiopathic oligozoospermia, administered methylcobalamin (methyl-B₁₂) daily (1,500 μ g/day) for one to 19 months.

The results were as follows:

1) Sperm density increased significantly in 17 out of 58 cases (29.3%), and sperm motility increased in 18 out of 40 cases (45.0%) after the methyl-B₁₂ therapy. Spontaneous pregnancy was obtained in 2 cases out of 75 cases. Moreover, both sperm density and motile sperm density increased significantly at 6 months after the methyl-B₁₂ therapy. These data suggested that long-term methyl-B₁₂ therapy might be useful.

2) No severe side effect was noted in 75 cases except for moderate acne only in one case.

3) Seminal plasma vitamin B₁₂ concentration increased significantly after the methyl-B₁₂ therapy. Especially, increment of seminal plasma vitamin B₁₂ had a significant relation with the improvement of sperm density. Therefore, it was suggested that increment of vitamin B₁₂ in seminiferous tubules might play a role on induction of the spermatogenesis and spermatomiosis.

(受付: 昭和61年10月13日)

続発性 hypogonadotropic hypogonadism

Secondary Hypogonadotropic Hypogonadism

千葉大学医学部泌尿器学科教室 (主任: 島崎 淳教授)

布施 秀 樹 角 谷 秀 典
Hideki FUSE Hidenori SUMIYA
石 井 弘 之 島 崎 淳
Hiroyuki ISHII Jun SHIMAZAKI
Department of Urology, School of Medicine,
Chiba University, Chiba, Japan
(Director: Prof. J. Shimazaki)

30歳男性, 22歳で結婚後, 妻の妊娠をみないため当科受診. 2年前より両側睾丸が小さくなり, 恥毛の減少に気付いた. 既往歴, 家族歴に特記すべきことなし. 身長168.0cm, 体重60.0kg, 指極162.5cm, 恥毛薄く女性型, 睾丸左側7ml, 右側10ml, 前立腺触知せず. 血中 LH 値1.4mIU/ml, FSH 1.0mIU/ml, テストステロン58ng/dl, プロラクチン13.5ng/ml と hypogonadotropic hypogonadism の所見を呈した. LH-RH 試験, hCG 試験は, ともに比較的良好な反応を示した. 頭部X線, CT スキャンとも正常. 染色体型46, XY. 嗅覚試験, 異常なし. 睾丸組織は, hypospermatogenesis の所見を示した. 以上より二次性徴発現後に生じた続発性 hypogonadotropic hypogonadism と診断し, hCG および hMG を補充した. 7カ月目の精液所見は, 精液量2.1ml, 精子濃度 40×10^6 /ml, 精子運動率30%であった. 良好な二次性徴の発現もみた.

(Jap. J. Fert. Ster., 32 (2), 206-210, 1987)

緒 言

Hypogonadotropic hypogonadism に対して, hCG, hMG 併用療法が試みられ, 良好な成績が報告されている¹⁾. 今回, 二次性徴発現後に生じたと思われる続発性 hypogonadotropic hypogonadism の例に, 本療法を施行し, 造精機能の改善をみたので報告する.

症 例

患者: 30歳, 男性.

初診: [REDACTED]

主訴: 不妊.

既往歴: 10歳時, 肺炎.

家族歴: 特記すべきことなし.

現病歴: 22歳で結婚, 以後, 妻の妊娠をみないため, 当科受診. 2年前より両側睾丸が小さくなり, 恥毛の減少に気付いた. ヒゲは3日に1度, 剃る. 妻は婦人科的に異常なし.

現症: 身長168.0cm, 体重60.0kg, 指極162.5cm, 恥毛薄く女性型, 腋毛, 左側みとめられず, 右側薄い. 陰莖60mm \times 26mm, 睾丸, 左側7ml, 右側10ml, 前立腺触知せず (図1).

検査成績: 血算, 血液化学, 検尿に異常をみとめず. LH 1.4mIU/ml, FSH 1.0mIU/ml, プロラクチン13.5ng/ml, テストステロン58ng/dl, エストラジオール <10 pg/ml, コルチゾール 12.2 μ g/dl, T₃-RIA 1.3ng/ml, T₄ 8.5 μ g/ml, TSH 1.2 μ unit/ml, HGH 1.8ng/ml, ACTH 48pg/ml であり, hypogonadotropic hypogonadism の所見を呈した.

末梢血リンパ球培養による染色体検査, 46, XY と正常男性型を示した.

精液とれず.

手根骨, 両側とも8個と正常成人男性のそれであった.

頭部X線, トルコ鞍正常. 頭部 CT スキャン, 異常なし (図2).

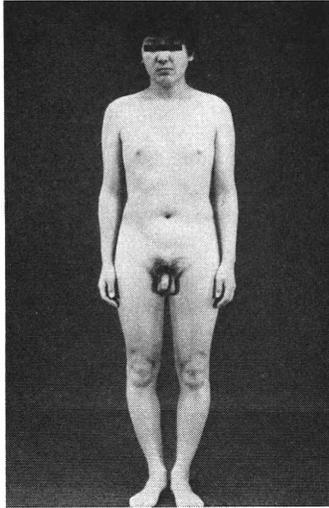


図 1 全身像
恥毛が薄かった。類宦官様体型はなかった。

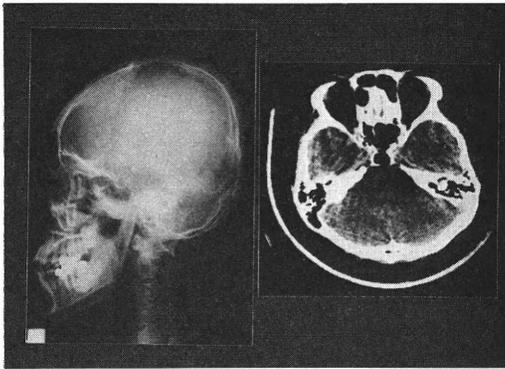


図 2 頭部 X線および CT スキャン両者ともトルコ鞍に異常をみなかった。

嗅覚試験²⁾，正常。

LH-RH 試験³⁾ (LH-RH 注射薬[®] (タナベ) 100 μ g 静注)，血中 LH 値は、投与前5.5mIU/ml が30分で23.4 mIU/ml と最大値を示した。血中 FSH 値は、前値 1.4mIU/ml が120分まで漸増し、3.5mIU/ml となった (図3)。

hCG 試験³⁾ (ゴナトロピン[®] (帝國臓器) 4,000 単位 3日連続筋注)，血中テストステロン値は、前値33ng/dl が4日目に206ng/dl と6.2倍となった (図4)。

辜丸組織像，hypospermatogenesis の所見であった。間質に少数のライデッヒ細胞をみた (図5)。

精管精囊造影，両側とも精管の通過性は良好であった。精囊の発達は，両側ともやや不良であった (図6)。

以上により，二次性徴発現後に生じた続発性 hypogonadotropic hypogonadism と診断し，hCG，hMG

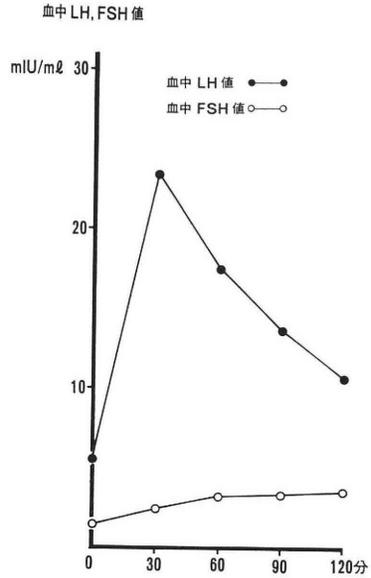


図 3 LH-RH 試験
血中 LH 値は、30分で 23.4mIU/ml と最大値を示した。血中 FSH 値は、120分まで漸増した。

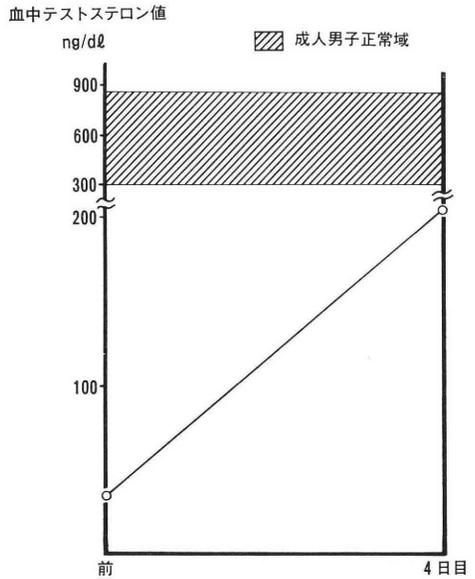


図 4 hCG 試験
血中テストステロン値は、前値33ng/dl が hCG 4,000単位3日間投与後、206ng/dl と6.2倍となった。

投与とした。

治療経過：hCG 1,000単位，hMG (ヒュメゴン[®] (オルガノン)) 75単位を週2回投与した。1カ月後の精液検査で、精液量 1 ml，精子濃度 0×10^4 /ml であった。血中テストステロン値は、388ng/dl と正常成人男性域に

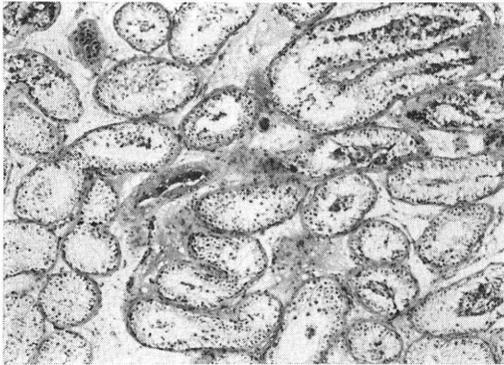


図 5 睪丸組織所見

Hypospermatogenesis をみとめた。間質に少数のライデッヒ細胞をみとめた。

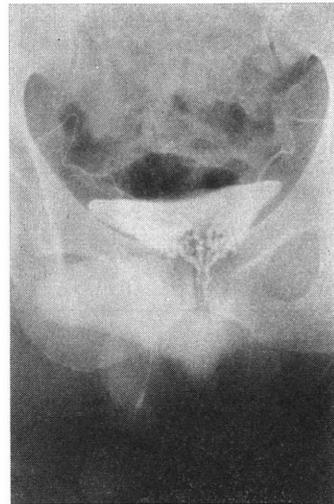


図 6 精管精囊造影

両側とも精管の通過性は良好だった。精囊はやや発育不良であった。

達した。2カ月後に精子濃度 $6 \times 10^6/ml$ と精子の出現をみた。5カ月目に左睪丸11ml, 右睪丸14ml と睪丸容積の増大をみとめ、前立腺もくるみ大に触知した。恥毛も増加し、男性型となった。7カ月目の精液検査では、精液量2.1ml, 精子濃度 $40 \times 10^6/ml$, 精子運動率30%となった(図7)。

治療開始後、9カ月現在、まだ妻の妊娠をみないが、ほぼ良好な二次性徴の発現をみており、外来にて経過観察中である。

考 按

Hypogonadotropic hypogonadism には、思春期前よ

りの低ゴナドトロピン状態が存続し、二次性徴の出現をみないものと、二次性徴の発現後に発症するものがある。前者は、類宦官様体型を呈するため、類宦官症ともいわれる。そのうち、間脳に病変があり、嗅覚障害を伴うものは、Kallmann 症候群といわれる²⁾。後者は、男性ホルモンの低下により二次性徴が失なわれ、造精機能の低下をきたす。自験例は、二次性徴の発現をみた後に、恥毛の減少、睪丸容積の減少をみており、後者の

血中ホルモン値	hCG 1000 単位週 2 回筋注			hMG 75 単位週 2 回筋注				
	1.4	20.4	25.5					
LH (mIU/ml)	1.0	1.1	3.0					
FSH (mIU/ml)	58	388	413					
テストステロン (ng/dl)								
精液所見								
精液量(ml)	とれず	1.0	3.0	1.4	1.6	1.6	2.1	2.5
精子濃度(/ml)		0×10^6	6×10^6	18×10^6	15×10^6	38×10^6	40×10^6	36×10^6
運動率(%)			16	16	20	32	30	32
睪丸容積 (ml)	左 7 右 10							11 14
前立腺	触知せず							くるみ大に触知
恥毛	薄く女性型							男性型

図 7 治療経過

hCG 1,000単位, hMG75 単位, 週 2 回投与により、2カ月で精液量 3.0ml, 精子濃度 $6 \times 10^6/ml$, 運動率16%と精子の出現をみた。5カ月後では、睪丸容積の増大、恥毛の増加をみた。血中テストステロン値は413ng/dl と正常成人男性値となった。

続発性 hypogonadotropic hypogonadism と考えられる。原因として下垂体ないし視床下部の腫瘍、外傷、放射線照射などがあげられるが⁴⁾、自験例は、LH-RH 試験で比較的良好な反応を示したことより、下垂体より上位の障害であり、TSH, ACTH には異常をみないことより、LH-RH の分泌が選択的に障害されたものといえる。頭部 X 線および CT スキャン等には異常を認めず、原因は不明であった。

Hypogonadotropic hypogonadism の治療は、自験例のように下垂体より上位に病変がある例には LH-RH 投与が目的であるが、半減期の短かいことより⁵⁾、高活性で長時間作用型の analog が試みられた⁶⁾。LH-RH analog は、下垂体の LH-RH レセプターの枯渇、すなわち down regulation を介して LH および FSH の分泌低下をきたすため、現在では、本症には用いられず、前立腺癌の治療薬として有望視されている^{7,8,9,10)}。

hCG および hMG 投与が一般に行なわれる。前者は LH 作用、後者は LH および FSH を含有している。ヒトの精子形成には、テストステロンならびに FSH が必要なので¹¹⁾、造精機能の導入には hCG および hMG の併用が望ましい。ちなみに、われわれも、hCG のみでは十分な造精機能をみない例に hMG を併用し、その著明な改善をみた例を経験している¹²⁾。

hCG の投与量は、週 5,000~12,000 単位で開始、漸次投与量を減らす方法もあるが¹³⁾、自験例は週 2,000 単位を投与し、血中テストステロン値は、正常成人男性値となった。一度、ライデッヒ細胞がゴナドトロピンに対して反応し、第 2 次性徴の発現をみているので、比較的少量の hCG でもライデッヒ細胞が反応したものと思われる。

hMG は、血中テストステロン値の如く、適切なパラメーターがないので、その適当量を決定するのはむずかしいが、一般に週 3 回、1 回 75~150 単位投与が多い¹⁴⁾。精液所見をみて、さらに増量を考えるべきだろう。

hCG, hMG 両者の投与量の比率も、今後、検討する必要があるう。

ゴナドトロピン療法の治療成績は、思春期前に発症したものに比し、自験例の如く続発性の例で良好とされている。ちなみに、Schill ら¹⁵⁾は、下垂体術後の hypogonadotropic hypogonadism の 24 例にゴナドトロピンを投与し、全例の造精機能の導入をみたとしている。自験例も、治療開始後、9 カ月で良好な精液所見をえた。一定期間、性腺が正常に機能していたため、その後、外的に投与した hCG, hMG に対して、間質細胞および精細胞が反応しやすい状態にあるものと思われる。

Knobil ら^{15,16)}は、LH-RH を間欠的に、しかも生

理的頻度で投与した時のみ、適当な LH および FSH の分泌をみると報告した。Valk¹⁷⁾は、本症に対して少量、間欠投与を試みて、LH ならびに FSH が思春期と同様の分泌パターンを呈したとしており、前述のゴナドトロピン投与に比べて睾丸に良い効果を与えることだろう。自動注入器による長期間投与も試みられ、良好な成績という^{18,19)}。この LH-RH の少量、間欠投与による hypogonadotropic hypogonadism の治療は、自然分泌動態に合わせた投与量および間隔の解明により、その成績がさらに向上するものと考えられ、本症の治療の主流をなすことになるだろう。

本論文の要旨は、日本アンドロロジー学会第 5 回学術大会において発表した。

文 献

- 1) 岩動孝一郎: Gonadotropin deficiency による男子 hypogonadism 症例に対する hCG/hMG 併用療法についての検討, 日不妊会誌, 28: 189, 1983.
- 2) 布施秀樹, 伊藤晴夫, 皆川秀夫, 川村健二, 島崎 淳: 造精機能導入に成功した Kallmann 症候群の 1 例, 泌尿紀要, 28: 1167, 1982.
- 3) 島崎 淳, 伊藤晴夫: 性腺機能検査一男性, 臨床検査, 27: 24, 1983.
- 4) Spratt, D. I., Hoffman, A. R. and Crowley, W. F. Jr.: Hypogonadotropic hypogonadism and its treatment, In male reproductive dysfunction, ed 1: p227, New York and Basel, Dekker, 1986.
- 5) Mortimer, C. H., McNeilly, A. S., Fisher, R. A., Murray, M. A. F. and Besser, G. M.: Gonadotrophin-releasing hormone therapy in hypogonadal males with hypothalamic or pituitary dysfunction. Brit. Med. J. 14: 617, 1974.
- 6) Potashnik, G., Ben-Adereth, N., Lunenfeld, B. and Rofe, C.: Assessment of pituitary response to nasal application of synthetic gonadotropin-releasing hormone in men. Fertil. & Steril., 28: 650, 1977.
- 7) Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., Laco-rsriere, Y., Raynaud, J. P., Husson, J. M., Gareau, J., Fazekas, A. T. A., Sandow, J., Monfette, G., Girard, J. G., Emond, J. and Houle, J. G.: New approach in the treatment of prostate cancer: Complete instead of partial withdrawal of androgens. The Prostate, 4: 579, 1983.
- 8) Glode, L. M. and Max, D.: Leuprolide (D-leu-desgly-pro-NH Et-LHRH) in the therapy of advanced prostatic carcinoma. Proc. 13th Intl Cong. Chemotherapy, 242: 49, 1983.
- 9) Ahmed, S. R., Brooman, P. J. C., Shalet, S.

M., Howell, A., Blacklock, N.J. and Rickards, D. : Treatment of advanced prostatic cancer with LHRH analogue ICI 118630 : Clinical response and hormonal mechanisms. *Lancet*, ii : 415, 1983.

- 10) 布施秀樹, 座間秀一, 秋元 晋, 島崎 淳, 村上信乃, 五十嵐辰男 : LH-RH analog による前立腺癌の治療, 泌尿紀要, **32** : 1113, 1986.
- 11) Steinberger, E. : Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.*, **51** : 1, 1971.
- 12) 布施秀樹, 角谷秀典, 片海善吾, 高原正信, 伊藤晴夫, 島崎 淳 : 低ゴナドトロピン性類宦官症, 日不妊会誌, **31** : 360, 1986.
- 13) Schill, W. B. : Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility—a review. *Andrologia*, **11** : 77, 1979.
- 14) Smith, K. P., Ficher, M. and Steinberger, E. : Clinical and laboratory findings during gonadotropin therapy of postpubertal hypogonadotropic hypogonadism. *Andrologia*, **6** : 147, 1974.
- 15) Belchetz, P. E., Plant, T. M., Nakai, Y., Keogh, E. J. and Knobil, E. : Hypophyseal responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, **202** : 631, 1978.
- 16) Wildt, L., Marshall, G. and Knobil, E. : Experimental induction of puberty in the infantile female rhesus monkey. *Science*, **207** : 1373, 1980.
- 17) Valk, T. W., Corley, K. P., Kelch, R. P. and Marshall, J. C. : Hypogonadotropic hypogonadism : Hormonal responses to low dose pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51** : 730, 1980.
- 18) Hoffman, A. and Crowley, W. F. Jr. : Induction of puberty in men by long-term pulsatile administration of low-dose gonadotropin-releasing hormone. *N. Engl. J. Med.*, **307** : 1237, 1982.
- 19) Skarin, G., Nillins, S. J., Wilbell, L. and Wide, L. : Chronic pulsatile low dose GnRH therapy for induction of testosterone production and spermatogenesis in a man with secondary hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **55** : 723, 1982.

Secondary hypogonadotropic hypogonadism

**Hideki Fuse, Hidenori Sumiya,
Hiroyuki Ishii and Jun Shimazaki**

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

A 30-year-old male visited the Chiba University Hospital with the chief complaint of infertility for 8 years. He recognized both testes became smaller and his pubic hair decreased.

He is 168.0 cm tall, 60.0 kg in weight and his arm span is 162.5 cm. He has a sparse pubic hair. The volume of testes were 7 ml in left and 10 ml in right. The prostate is not palpable.

The levels of luteinizing hormone(LH), follicle stimulating hormone(FSH), testosterone and prolactin in blood were 1.4 mIU/ml, 1.0 mIU/ml, 58 ng/dl and 13.5 ng/ml, respectively, which showed the findings of hypogonadotropic hypogonadism.

There was good response in the level of testosterone in blood after the administration of human chorionic gonadotropin(hCG).

The levels of LH and FSH in blood reached to 23.4 mIU/ml and 2.4 mIU/ml, respectively, 30 minutes after the administration of luteinizing hormone releasing hormone.

A skull X-ray showed normal findings of the sella turcica.

A computed tomographic scan of the brain revealed no abnormality of the sella turcica and hypothalamic regions.

The chromosome analysis of the peripheral lymphocyte revealed the karyotype of 46, XY.

He was not found to have anosmia in the venous olfactory test.

The finding of the testicular histology showed hypospermatogenesis.

The diagnosis of secondary hypogonadotropic hypogonadism was made and the combination therapy of hCG (1,000 IU twice a week) and hMG (75 IU twice a week) was performed.

The semen analysis performed 7 months after treatment showed 2.1 ml in volume, 40×10^6 /ml in sperm concentration and 30 % in sperm motility and he gets male sexual characteristics.

(受付 : 昭和61年7月15日)

インドメサシンのマウス卵胞破裂、 卵胞卵子成熟に及ぼす影響

Effects of Indomethacin on Follicle Rupture and Follicular Egg Maturation in Mice

京都大学医学部婦人科学産科学教室

林 清 士 野 田 洋 一
Seiji HAYASHI Yoichi NODA

松 本 央 森 崇 英
Hisashi MATSUMOTO Takahide MORI

Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine,
Kyoto University, Kyoto, 606, Japan.

Key words: Indomethacin. Follicle Rupture. Follicular Egg Maturation.

マウスを PMSG, hCG によつて過排卵処理し, hCG 注射90分後にインドメサシン (ID) を投与すると, hCG 注射17時間後の排卵卵子数は, ID 0, 0.5, 1.0, 2.0mg/mouse 投与で, それぞれ 32.2 ± 7.8 , 16.9 ± 5.8 , 5.6 ± 2.9 , 1.0 ± 1.3 と用量依存性に減少した. hCG 注射10時間後, 第二減数分裂中期まで成熟した卵胞卵子は, ID 非投与群で43.5% (40/92), ID 2 mg/mouse 投与群で43.4% (36/83) となり, 有意差は認められなかった. ID 非投与の排卵卵子と ID 2 mg/mouse 投与で卵胞内に停留した卵子の受精率はそれぞれ72.9% (62/85), 73.7% (56/76) となり, 有意差は認められなかった. 以上より, マウスに於ける LH surge 以後の卵子成熟過程は, プロスタグランジンの介在が必須でないことが示唆された.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 211-218, 1987)

緒 言

ヒトを含むほとんどの哺乳類の卵子は, 胎生期あるいは出生直後に第一減数分裂前期の複糸期を完了し, 休止期である卵核胞期で, 排卵直前まで分裂を停止することはよく知られている (Baker, 1972). 排卵直前のゴナドトロピンの刺激により, Graaf 卵胞の卵子は減数分裂を再開し, 受精能を持った第二減数分裂中期 (Met. II) の成熟卵子として排卵される. そして, 排卵の機序についてはいくつかの観点から詳細に研究されており, 例えばプロスタグランジン (PG) 生合成阻害剤であるインドメサシン (ID) 10mg/rat を投与すると, ラットの排卵が阻害されるが, PGE₂ 1.5mg を同時投与すると排卵が回復する事実 (Tsafriri et al., 1972) より, PG が卵胞破裂機序に深くかかわりあっていることが示唆されている. この PG の作用機作のレベルについては, ID 10mg/rat の投与で, ラット卵胞破裂が抑制される条件下でも LH surge が観察されるという報告があることから (Tsafriri et al., 1973), PG は卵巣レベルで関与する

と考えられている. また, ウサギ卵胞内の PGF および PGE 濃度は estrous 時それぞれ, 58.2 ± 30.1 , 256 ± 125 pg/follicle と低値であるが, hCG 100単位を注射すると排卵に向けて上昇し, 9時間後にはそれぞれ60倍, 15倍以上になることが報告されている (LeMaire et al., 1973). さらに, ラットでも卵胞内の PGF および PGE 濃度は proestrous 時それぞれ, 18 ± 2.5 , 11 ± 1.0 pg/mg (卵巣湿重量) であるが, LH surge 後には同様にそれぞれ18倍, 70倍に上昇することが報告されている (LeMaire et al., 1975). この様に, 卵胞卵子は漸次高濃度の PG に晒されながら成熟過程を終え, 排卵されることになる. しかし, LH surge 以後, 排卵に向けて増加する卵胞内 PG が, 卵胞破裂のみに関与するのか, また, 卵胞内に存在する卵子の成熟過程にも関与するのかどうかについては現在までのところ結論づけられてはいない. 例えば, 幼弱マウスを過排卵処理し, PG 生合成阻害剤である ID 10 mg/kg を投与すると, 卵胞卵子の核成熟および卵胞破裂が抑制される (Downs & Longo, 1982) が, PGE₂ 250 μg の投与によつて ID

によるこれらの抑制が回復することが報告されている (Downs & Longo, 1983). しかし、ラットの pro-estrous 時に ID 10mg/rat を投与すると、排卵は抑制されるが、卵子の核成熟には影響を与えないという相反する報告もある (Tsafiriri et al., 1972). 卵子が受精能を獲得するためには、核の成熟のみならず卵細胞質の成熟の必要性が想定されており (Shalgi et al., 1979), 卵子は受精能を有して初めて最終的に成熟したと云える. しかし、PG の卵子成熟過程に及ぼす影響を受精能まで含めて検討した報告は見あたらない. そこで、今回われわれはマウスを過排卵処理後、卵胞破裂を抑制するのに充分量の ID を投与して卵胞内 PG 産生を抑制し、卵胞卵子の核成熟に及ぼす影響を形態学的に検討すると共に、ID 投与によって卵胞内に停留した卵子のうち、形態学上核成熟している卵子を用いて精巢上体精子で体外受精し、PG 生合成阻害が卵子の受精能にどのような影響を及ぼすのかを検討した.

方 法

1. 過排卵処理後の排卵数に与える ID の影響

実験動物は8~10週齡の成熟 ICR 雌マウス (23-30g) を用い、温度23-25°C が保たれた飼育室で、毎日14時間の照明条件下に固形飼料と充分な水を与えて飼育した. PMSG, hCG それぞれ10単位を56時間間隔で腹腔内投与して過排卵を惹起し、hCG 注射90分後または30分前に種々の量の ID を腹腔内投与した. ID の溶媒である NaHCO₃ (0.154M) 2.0ml のみを投与した群を対照群とし、0.5, 1.0, 2.0mg ID/2.0ml/mouse の ID 投与群を設定した. 1回の実験には各群それぞれ3匹ずつのマウスを用い、計3回実験を行なった. 過排卵処理によって充分排卵され終つたと考えられる hCG 投与17時間後に両側卵管を切離し、培養液 (modified Krebs-Ringer-Bicarbonate solution; mKRB) の入った時計皿に移し、実体顕微鏡下に膨大部を乱切し集卵した. 0.01% Hyaluronidase 処理にて裸化卵子としたのち、実体顕微鏡下に排卵卵子数の算定を行い、平均値を算出した. また、hCG 注射30分前に ID 2 mg/mouse を腹腔内投与し、同時に PGF₂α 1 mg/mouse を皮下注射して排卵数に及ぼす影響を検討した. 対照には ID の溶媒である NaHCO₃ 2 ml と PG の溶媒である 25mM CH₃COONa 1 ml を投与し、ID 単独群にも PG の溶媒を投与した.

2. 卵子の核の成熟に与える ID の影響

過排卵処理の方法と ID 投与の時間は前項と同様とした. 実験群には ID を 2 mg/mouse に投与し、対照群には ID の溶媒のみを同量投与した. 各群それぞれ2匹

ずつのマウスを用い、3回の実験をくり返した. 卵胞破裂が始まる直前と考えられる hCG 投与10時間目に両側卵巣を摘除し、mKRB の入った時計皿内で卵胞を乱切し、実体顕微鏡下に卵胞卵子を回収した. 0.01% Hyaluronidase 処理にて裸化卵子としたのち、in toto にスライドガラスとカバーガラスとの間に固定し、中性ホルマリンにて固定、0.1% aceto-lacmoid を用いて核染色をし、卵子の核の成熟段階による分類を行うと共に変性卵の数も算定した. 卵核胞が観察される卵子を卵核胞期 (Germinal Vesicle; GV) と判定した (図 1 a). 卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown; GVBD) が起こり、核膜が消失し、染色体が濃縮した第1減数分裂中期より終期に至るまでを第1減数分裂中期 (Metaphase I; Met. I) に分類した (図 1 b). また、同様に核膜がなく、染色体が濃縮して、しかも極体が観察されるものは第2減数分裂中期 (Metaphase II; Met. II) とした (図 1 c). この Met. I と Met. II とを合せて減数分裂を再開した卵子、すなわち卵核胞崩壊 (GVBD) とした. 変性所見の明らかなものおよび染色体のはっきりしない卵子は変性卵に分類した.

3. 卵子の受精能に与える ID の影響

過排卵処置ののち、ID 2 mg/mouse の投与によって卵胞内に停留した卵子を hCG 投与17時間目に卵胞乱切にて採取し、精巢上体精子を用いて体外受精を行い、卵子の受精能、単為発生、多精子侵入、授精後の変性について比較検討した. 対照として、ID の溶媒のみの投与で排卵した排卵卵子を hCG 投与17時間目に卵管より採取し、実験に供した. 各群とも毎回2~4匹のマウスを用い、5~7回の実験をくり返した. 実験に供した卵子は、実体顕微鏡下に変性所見および卵核胞が認められないもので第1極体を放出しており、成熟卵子 (Met. II) と考えられるもののみとした. また、受精実験に供したと同じ群の卵子の一部を無作為に抽出して固定染色をし、卵子が成熟していることを確認した. 体外受精は豊田らの方法 (Toyoda et al., 1971) に準じ、培養液は chemically defined である mKRB を用いた. 精子は3カ月齡の ICR 雄マウス (1匹30g平均) の精巢上体尾部より採取した. 精子塊を mKRB 内で5分間泳出させ、均等な精子液を作製し、これを CO₂ incubator 内で 37°C 1時間前培養して受精能を獲得させた. 最終濃度 0.5-1.0×10⁶/ml の精子で授精し、5時間後に卵子を in toto にスライドガラスとカバーガラスとの間に固定し、中性ホルマリンで固定、0.1% aceto-lacmoid にて核染色をした. 雌性前核、精子尾部と、それに対応する雄性前核または膨化精子頭部、そして第二極体が認められる卵子のみを受精卵と判定した (図 1 d). 雄性前核または

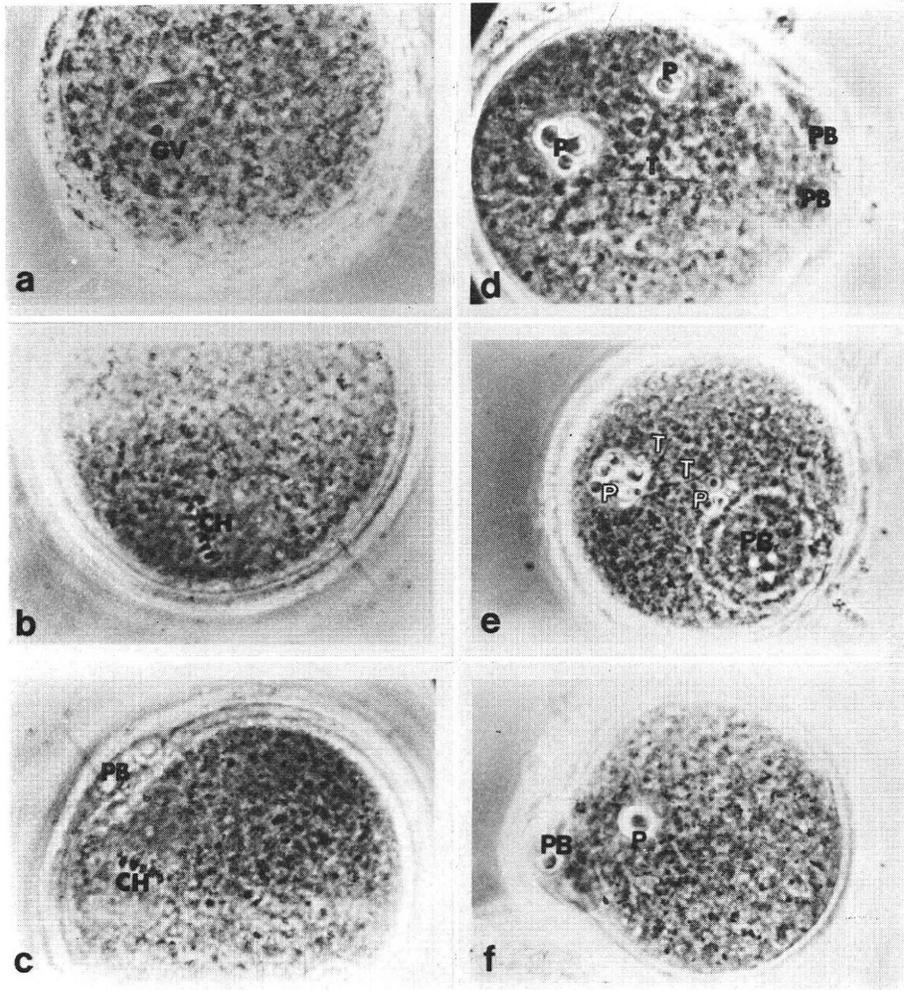


図 1 卵子に於ける核の各成熟段階および受精卵。 卵子を中性ホルマリンにて固定後、0.1%アセトラクモイドにて染色、位相差顕微鏡400倍にて観察す
 a : 第1減数分裂前期網糸期(卵核胞期)を示す。核小体を持った大きな卵核胞(GV)が観察され、極体は観察されない。
 b : 第1減数分裂中期卵子(Met. I)を示す。卵核胞崩壊が起り核膜が消失し染色体(CH)が露出している。極体(PB)は観察されない。
 c : 第2減数分裂中期卵子(Met. II)を示す。Met. Iと異なり極体(PB)が観察される。
 d : 受精卵を示す。雌雄前核(P)、精子尾部(T)、第1・2極体(PB)が認められる。
 e : 多精子侵入卵子(polyspermic egg)を示す。前核(P)が3つ(1つは焦点外)、精子尾部が2つ観察され、dispermicであることが分る。
 f : 単為発生卵子(parthenogenetic egg)を示す。極体(PB)が1つ観察されるが、前核(P)が1つしかなく、精子尾部は観察されない。

膨化精子頭部が複数個認められ、それぞれに対応する尾部が観察される卵子を多精子侵入卵(polyspermic egg)とした(図1e)。前核および極体が1つしかなく、精子尾部が認められない卵子を単為発生卵(parthenogenetic egg)と判定した(図1f)。卵細胞質に明らかな変性所見のある卵子および染色体が不明瞭な卵子を変性卵に

分類した。

成 績

1. 過排卵処理後の排卵数に与える ID の影響
 ID をhCG 注射90分後に投与すると、ID の溶媒単独投与では 32.2 ± 7.8 (mean \pm SD) の排卵卵子が観察され

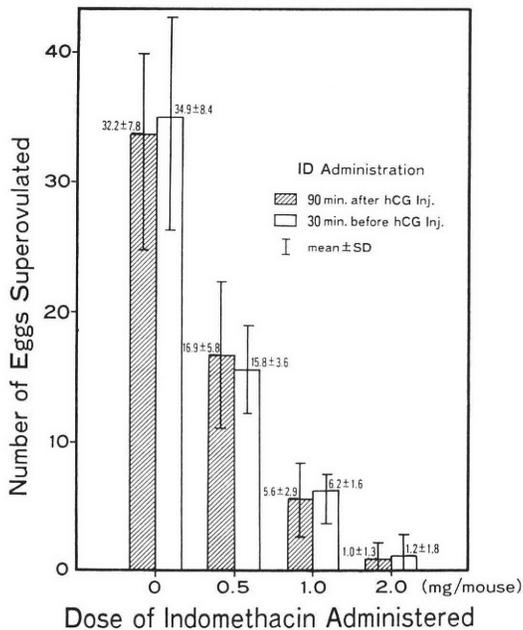


図2 インドメサシンの過排卵卵子数に及ぼす影響・縦軸は、過排卵処理による排卵卵子数、横軸は、マウス当りのインドメサシン投与量を示す。各群共マウスを3匹ずつ用い、3回実験をくり返した

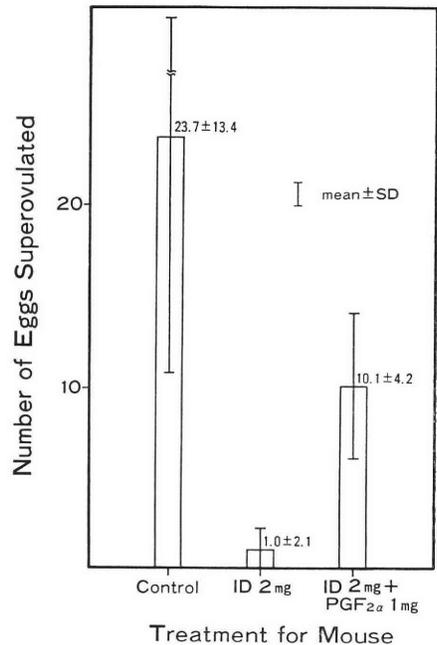


図3 インドメサシンとプロスタグランジンの過排卵卵子数に及ぼす影響・縦軸は排卵卵子数、横軸は処理の種類を示す

たのに対して、ID 0.5mg/mouse 投与では 16.9 ± 5.8 、ID 1.0mg/mouse では 5.6 ± 2.9 と、ID の用量依存性に排卵が抑制され、今回の実験では、ID 2mg/mouse 投与で排卵卵子は 1.0 ± 1.3 となり、ほぼ完全な排卵抑制が観察された。また、ID を hCG 注射30分前に投与しても、ほぼ同様の結果が得られた(図2)。NaHCO₃ 2ml の投与によつても、また2mg/mouse のID 投与によつてもマウスの一般健康状態に異常は認められなかった。そこで、卵胞破裂が抑制された卵子の核成熟・受精能をみるのに、ID 2mg/mouse 投与を実験群とし、NaHCO₃ 2ml/mouse 投与を対照群として以後の実験を行った。また、溶媒のみを投与した対照群では、 23.7 ± 13.4 の排卵卵子が観察されたのに対し、ID 2mg/mouse とPGの溶媒を投与した群では 1.0 ± 2.1 と排卵が抑制され、ID 2mg/mouse とPGF_{2α} 1mg/mouse 同時投与群では 10.1 ± 4.2 と排卵数の回復が観察された(図3)。

2. 卵子の核の成熟に与える ID の影響

ID を hCG 注射90分後に投与して対照群(溶媒のみ投与)、実験群(ID 2mg/mouse 投与)で3回の実験操作の結果、それぞれ92コ、83コの卵子を卵胞より回収し検索した。GV は、対照群では21.7% (20/92)、実験群では36.1% (30/83) となり、実験群で増加傾向が

みられたが、有意差は認められなかった。また、Met. I, Met. II, GVBD は、対照群ではそれぞれ15.2% (14/92)、43.5% (40/92)、58.7% (54/92)、実験群ではそれぞれ10.8% (9/83)、43.4% (36/83)、54.2% (45/83) となり、対照群と実験群との間に Yates の補正 χ^2 検定で有意差は認められなかった。また変性卵子も、対照群では19.6% (18/92)、実験群では9.8% (8/83) と有意差は認められなかった。また、ID を hCG 注射30分前に投与した群についてもほぼ同様の結果が得られ、Met. I については、対照群が53.3% (48/90)、実験群が32.0% (31/97) と、 $P=0.05$ の確率で減少したが、GV・Met. II・GVBD・変性卵については対照群と実験群との間に有意差は認められなかった(表1)。

3. 卵子の受精能に与える ID の影響

ID を hCG 注射90分後に投与して7回の実験で、対照群は85コ、実験群は76コの卵子を用いた。受精率は、対照群(溶媒のみ投与)で72.9% (62/85)、実験群(ID 2mg/mouse 投与)で73.7% (56/76) となり、Yates の補正 χ^2 検定にて有意差は認められなかった。また、多精子侵入率・単為発生率・授精後の変性率・雄性前核形成率は、対照群でそれぞれ8.1% (5/62)、3.5% (3/85)、4.7% (4/85) 95.5% (64/67)、実験群でそれぞれ10.7% (6/56)、3.9% (3/76)、14.5% (11/76)、85.5% (53/62) となり、それぞれ実験群と対照群との

表 1 マウスに於ける卵胞卵子の核成熟に及ぼす ID の影響

Time of ID Administration		No. of Eggs Examined	Stages of Egg Maturation				No. of Eggs Degenerated (%)
			GV (%)	Met. I (%)	Met. II (%)	GVBD (%)	
90min. after hCG Inj	Control	92	20 (21.7)	14 (15.2)	40 (43.5)	54 (58.7)	18 (19.6)
	Experiment	83	30 ^{a)} (36.1)	9 ^{a)} (10.8)	36 ^{a)} (43.4)	45 ^{a)} (54.2)	8 ^{a)} (9.8)
30min. before hCG Inj	Control	90	10 (11.1)	48 (53.3)	22 (24.4)	70 (77.8)	12 (13.3)
	Experiment	97	22 ^{a)} (22.7)	31 ^{b)} (32.0)	36 ^{a)} (37.1)	67 ^{a)} (69.1)	8 ^{a)} (8.2)

a) Not a significant difference between control and experimental group.
 b) Significant smaller than control (p=0.050).

表 2 ID 処理マウスに於ける卵胞内成熟卵子の受精能

Time of ID Administration		Examined	Number of Eggs				No of male pronucleus/no of fertilizing sperm (%)
			Fertilized (%)	Polyspermic (%)	Parthenogenetic (%)	Degenerated (%)	
90min. after hCG Inj	Control	85	62 (72.9)	5 (8.1)	3 (3.5)	4 (4.7)	64/67 (95.5)
	Experiment	76	56 ^{a)} (73.7)	6 ^{a)} (10.7)	3 ^{a)} (3.9)	11 ^{a)} (14.5)	53/62 ^{a)} (85.5)
30min. before hCG Inj	Control	76	54 (71.1)	6 (11.1)	5 (6.6)	2 (2.6)	56/60 (93.3)
	Experiment	69	53 ^{a)} (76.8)	8 ^{a)} (11.5)	2 ^{a)} (2.8)	8 ^{a)} (11.6)	50/61 ^{a)} (82.0)

a) Not a significant difference between control and experimental group.

間に有意差は認められなかった。また、ID を hCG 注射30分前に投与した群についても同様に、受精率・多精子侵入率・単発発生率・授精後の変性率および雄性前核形成率とも、ID 投与による影響は認められなかった(表 2)。

考 察

PMSG/hCG でマウスを過排卵処理し、hCG 投与90分後または30分前に ID を投与すると、卵胞破裂の抑制が観察された。その効果は投与時期に関係なく、用量依存性に顕著になり、本実験では ID を 2mg/mouse の割で投与すると、排卵卵子は1.0~1.2コとなり、ほぼ完全な排卵抑制が観察された(図 2)。しかし、PGF_{2α} 1 mg/mouse を ID と同時投与すると、排卵数が対照群の 43%程度まで回復する事が観察された(図 3)。この結果は、ラット(Tsafiriri et al., 1972)やマウス(Downs & Longo, 1982)で報告されている reverse 実験の結果とも一致し、卵胞破裂抑制作用が単に ID の toxic な作用によるものではないことが本研究でも明らかとなった。ウサギに hCG を注射すると、それまで低値であ

った PGF および PGE 濃度が排卵に向けて急上昇し、それぞれ 60 倍、15 倍になることはよく知られている(LeMaire et al., 1973)。しかし、ウサギに hCG 注射に引き続いて ID 20mg/kg を投与すると、卵胞内の PG 濃度の上昇が観察されない事が報告されており(Yang et al., 1973)、さらに、ウサギの非排卵卵胞内の PGE、PGF は、終始低値で排卵卵胞内でみられる PG の急増は観察されないという報告(Yang et al., 1974)もある。以上の諸家の報告から、卵胞破裂を抑制するに充分な ID 投与によって卵胞内 PG 濃度の上昇が抑制されると考えられるので、卵胞卵子の核成熟・受精能に与える卵胞内 PG の影響を検討するのに、実験群として卵胞破裂をほぼ完全に抑制する ID 濃度である 2 mg/mouse を用いた。ID を hCG 注射90分後に投与して、排卵が始まる直前の卵胞卵子の核の成熟度の分布を比較検討したところ、GV・GVBD・Met. I・Met. II の割合には Yates の補正²⁾検定で有意差は認められず、変性卵子数の増加も認められなかった。hCG 注射90分後という時期は、マウス卵子は GV にとどまっていると考えられる時期であり(Edwards, 1973)、また

LeMaire et al. (1973) は, hCG 投与1時間ではまだウサギ卵胞内の PG 濃度は有意には上昇していないとしているので, 卵子の成熟に及ぼす卵胞内 PG の影響を検討するのに, ID 投与時期として hCG 注射90分後は適当であると考えられる。しかし, 種の異なるマウスでは, hCG に引きつづく卵胞内諸現象が既に動き始めている可能性も考えられたので, hCG 注射30分前に ID を投与して同様の実験を行った。その結果, Met. I は実験群に於て $P=0.05$ の確率で減少したものの, GV・Met. II・GVBD・変性卵の数には有意差は認められなかった(表1)。よつて ID 投与の有無によつては, 核の成熟には影響が認められず, PG は卵子の核の成熟過程に必須であるという結果は得られなかった。

Tsafiriri et al. (1972) は, ラットの proestrous 時に5-10mg/rat の ID を投与すると, 78-89%のラットに卵胞破裂の阻害がみられたが, 成熟分裂再開の第一段階である GVBD は抑制されなかつたことを報告している。また Ainsworth et al. (1979) は, 同じく *in vivo* で未熟ブタを PMSG/hCG で過排卵したのち, hCG 投与20時間後に ID 650mg を投与すると, 卵胞液内 PGE, F濃度の上昇が抑制されると共に, 卵胞破裂も完全に抑制されたが, 卵胞卵子のうち74-91%は Met. IIまで成熟し, また黄体形成は, 顕微形態的にもホルモン測定上にも阻害が観察されなかつたとしている。さらに, Kobayashi et al. (1981) は, 同様の結果を *in vitro* のウサギ卵巣の人工灌流の系を用いて報告している。彼らの報告によれば, 卵胞破裂は hCG 100iu 投与で成熟卵胞の72.7%に起るのに, ID 0.5 μ g/ml の同時投与によつて30.6%まで抑制されるとしている。しかし卵子は, 排卵, 非排卵に関係なく核成熟し, 非卵卵子で60.0%, 非非卵卵子で52.9%が Met. IIまで成熟し, ID 非投与との間に有意差は認められなかつたとしている。今回の実験成績はこれらの報告を支持する結果となった。

一方, 卵胞より卵子を単離し培養すると, LH の作用を受けていなくとも Met. IIまで充分核成熟することはよく知られているが (Pincus & Saunders, 1938), LH の作用を受けていなければ, その成熟卵子の受精能, 胚発生能は極めて低いことが報告されている (Shalgi et al., 1979)。また, *in vitro* で自然成熟した卵子は受精しても精子頭部が膨化するのみで雄性前核を形成することが少ないことより, male pronucleus growth factor (MPGF) の欠除が考えられている (Thibault et al., 1976)。さらには, マウスで核成熟の未熟な卵子ほど多精子侵入拒否の機構が不完全で, 多精子侵入率が高いことも報告されている (Iwamatsu & Chang, 1972)。これらより, 卵子の成熟を検討するのにいままでのような

形態学的な核成熟のみの検討では不十分と考えられ, MPGF, 多精子侵入拒否を含めた広い意味での卵子細胞質の成熟, すなわち卵子の受精能さらには胚発生能の検討が必要と思われる。本研究では ID 投与によつて卵胞内に停留した卵子の中で, 形態学上核成熟している卵子の受精能を検討したところ, 受精率・多精子侵入率・単為発生率・雄性前核形成率に対照群との間に有意差は認められなかつた。また, ID を hCG 注射30分前に投与しても同様の結果を得た(表2)。この結果から, LH surge 後の卵子成熟過程は卵子受精能獲得まで含めて PG の介在が必須の要件でないことが示唆された。しかし, 卵子が成熟過程で獲得するはずの胚発生能が, PG の欠除した状況下で充分得られているかどうかについては今尚不明であり, 今後の研究に待たねばならない。

この様に本研究では, 一見 PG は卵子の成熟過程に関係しないという結果が出たが, PG が積極的に関係するという諸家の報告もある。例えば, マウス卵胞を *in vitro* で器官培養すると, LH 非存在下では卵子の核成熟がおこらないが (Hillensjö et al., 1978), PGE₂ 5 μ g/ml 添加培地では, Met. IIに達する率は少ないものの, GVBD は LH 非存在下でも, LH 存在下と同程度起ることが観察されており (Neal et al., 1975), さらに, ウサギ卵胞内に PGF_{2 α} を注入すると, 90%に卵子の GVBD が起り, 40%に排卵が起ることが報告されている (Armstrong, 1976)。このように卵子成熟過程では, LH 非存在下でも PG が存在すれば, 核成熟の開始が生じることが示されている。しかし, 卵子を卵胞より単離培養すると, LH 非存在下で Met. IIまで成熟することは知られているが (Pincus & Saunders, 1938), 培地に PGE 50 μ g/ml を添加すると, マウスでは GVBD が起るが Anaphase I より先に進まないという一見矛盾した報告もあり (Cho, 1976), PG の核成熟作用には, 卵胞内因子等, 他の要因が介在する可能性が考えられる。

Downs & Longo は, 未熟マウスを LH 投与によつて過排卵処理し, ID 10mg/kg 投与すると, 卵胞頂の菲薄化の抑制と共に卵子の GVBD も抑制されるが (1982), PGE₂ 250 μ g を同時投与すると, これらの抑制が観察されないことを報告し (1983), LH の卵子成熟作用は, 卵胞内 PG の直接制御を受けているとしている。しかし, ID 投与量や実験動物の成熟度, あるいは LH と hCG との相違等, 実験条件の違いもあるので, Downs & Longo の報告とわれわれが今回得た実験結果や, すでに本論文中に引用した他の多数の実験結果と相反する理由は不明である。

LH サージ以後, 卵胞内に PG 濃度が著明に増加する

という諸家の報告と、すでに明らかにされているゴナドトロピンの作用機作から考えてみると、主として卵丘細胞内でアデニル酸シクラーゼが活性化され、結果として細胞内 cAMP 濃度が上昇し、これがきっかけとなって、以後一連の卵成熟過程が進行することが理解されるわけで、その中で PG 合成酵素の活性も亢進することが理解される。しかし逆に、PG の持つ作用機作から卵の成熟過程あるいは卵胞破裂の過程で果たす役割の分子機構を考えてみると、現時点における PG レセプター、あるいは生物作用発現までの分子機構がすべて解明されているわけではなく、文献的レベルで理解するのは困難である。しかし、今迄に知られている知見から考えると、PG は細胞膜を通過しえないものであるので、細胞の外からはレセプターを介してその生物作用を発揮するものと考えられるが、その場合、細胞内に生ずる生物作用はレセプターを介しての cAMP の上昇か、あるいは遊離Ca⁺濃度の上昇である。前者の場合は LH サージ後にみられる場合と同じ第2メッセンジャーを介して生ずる現象であり、後者は平滑筋の収縮作用を発揮するものと思われる(成宮 周, 1986)。このように、PG の作用発現も、結局は第2メッセンジャーの作用にもよることが明らかにされているわけで、よつて LH サージ以後に生ずる cAMP 濃度上昇に引き続く細胞内現象が、PG によって代償されるメカニズムは容易に理解されるところである。しかしながら、排卵現象における PG のかわりを理解するために現在もつとも必要なのは、PG レセプターに関する卵あるいは卵胞内での種類とその局在に関する確かな情報であろう。PG レセプター9種類と局在が明らかにできれば、LH サージ以後、排卵に向けて増加する PG の存在意義が細胞内 Ca⁺濃度を高めて、平滑筋収縮をさせることのみにあるのか、あるいは LH と共通の第二メッセンジャーである cAMP 上昇を介して卵の成熟や発生能以外の、例えば卵胞破裂に関与する酵素系等の調節などに関与しているかどうかについて解析する手掛りがあたえられるものと考えられる。現在までのところ、卵における PG レセプター蛋白は充分には解析されておらず、ウシ黄体に PGF_{2α} レセプターが存在するとの報告(Powell et al, 1974)がみられるのみであり、今後の発展が待たれる。

文 献

- 1) 成宮 周: プロスタグランジン作用の二つの発現機構: 受容体と細胞内輸送, 生化学, 58: 453, 1986.
- 2) Ainsworth, L., Tsang, B. K., Downey, B. R., Baker, R. D., Marcus, G. J. and Armstrong, D. T.: Effects of indomethacin on ovulation

- and luteal function in gilts. Biol. Reprod., 21: 401, 1979.
- 3) Armstrong, D. T.: Role of prostaglandins in ovarian responses to luteinizing hormone. in *Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research* vol. 2 (ed. Samuelsson, B. and Paolett, R.), P934, Raven Press, 1976.
- 4) Baker, T. G.: Oogenesis and ovarian development. in *Reproductive Biology* (eds Balin, H. and Glasser, S. R.), P 398, Excerpta Medica, New York, 1972.
- 5) Cho, W. K.: The effects of prostaglandin E-1 and F-2α on maturation of mouse oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert., 47: 1, 1976.
- 6) Downs, S. M. and Longo, F. J.: Effects of indomethacin on preovulatory follicles in immature, superovulated mice. Am. J. Anat., 164: 265, 1982.
- 7) Downs, S. M. and Longo, F. J.: Prostaglandins and preovulatory follicular maturation in mice. J. Exp. Zool., 228: 99, 1983.
- 8) Edwards, R. G.: Studies on human conception. Am. J. Obstet. Gynec., 117: 587, 1973.
- 9) Hillensjö, T., Ekholm, C. and Ahrén, K.: Role of cyclic AMP in oocyte maturation and glycolysis in the preovulatory rat follicle. Acta Endocrin., 377, 1978.
- 10) Iwamatsu, T. and Chang, M. C.: Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times during maturation. J. Reprod. Fert., 31: 237, 1972.
- 11) Kobayashi, Y., Santulli, R., Wright, K. H. and Wallach, E. E.: The effect of prostaglandin synthesis inhibition by indomethacin on ovulation and ovum maturation in the *in vitro* perfused rabbit ovary. Am. J. Obstet. Gynecol., 141: 53, 1981.
- 12) LeMaire, W. J., Leidner, R. and Marsh, J. M.: Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat Graafian follicles. Prostaglandins, 9: 221, 1975.
- 13) LeMaire, W. J., Yang, N. S. T., Behrman, H. H. and Marsh, J. M.: Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit Graafian follicles. Prostaglandins, 3: 367, 1973.
- 14) Neal, P., Baker, T.G. McNatty, K.P. and Scaramuzzi, R. J.: Influence of prostaglandins and human chorionic gonadotrophin on progesterone concentration and oocyte maturation in mouse ovarian follicles maintained in organ culture. J. Endocr., 65: 19, 1975.

- 15) Pincus, G. and Saunders, B. : The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro* IV. The maturation of human ovarian ova. *Anat. Rec.*, 75 : 537, 1938.
- 16) Powell, W.S., Hammerstrom, S. and Samuelsson, B. : Prostaglandin F_{2α} receptor in ovine corpora lutea. *Eur. J. Biochem.*, 41 : 103, 1974.
- 17) Shalgi, R., Dekel, N. and Kraicer, P.F. : The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 55 : 429, 1979.
- 18) Thibault, C., Gerad, M. and Menezo, Y. : Nuclear and cytoplasmic aspects of mammalian oocyte maturation *in vitro* in relation to follicle size and fertilization. *Prog. Repr. Biol.*, 1 : 233, 1976.
- 19) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T. : Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. II. Effects of *in vitro* pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs *in vitro*. *Jap. J. Animal Reprod.*, 16 : 152, 1971.
- 20) Tsafiriri, A., Koch, Y. and Linder, H. R. : Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E₂. *Prostaglandins*, 3 : 461, 1973.
- 21) Tsafiriri, A., Lindner, H. R., Zor, U. and Lamprecht, S. A. : Physiological role of Prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins*, 2 : 1, 1972.
- 22) Yang, N. S. T., Marsh, J. M. and LeMaire, W. J. : Prostaglandin changes induced by ovulatory stimuli in rabbit Graafian follicles. The effect of indomethacin. *Prostaglandins*, 4 : 395, 1973.
- 23) Yang, N. S. T., Marsh, J. M. and LeMaire, W. J. : Post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit Graafian follicles. *Prostaglandins*, 6 : 37, 1974.

fertilizability of ova retained in the follicles resulting from ovulation inhibition induced by ID administration in mice.

Ten units each of PMSG and hCG were administered intraabdominally to mice at 56-hour intervals to produce superovulation; ID was then administered 90 minutes after hCG injection. The number of ova recovered from the oviduct 17 hours after hCG injection were 32.2 ± 7.8 , 16.9 ± 5.8 , 5.6 ± 2.9 , and 1.0 ± 1.3 for 0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg ID/mouse, respectively. This demonstrated dose-dependent inhibition of ovulation; however, there were no changes in the general condition of the mice. Next, the maturational stages of the nuclei of intrafollicular ova collected 10 hours after hCG administration were compared between ID treated (2 mg/mouse) and control groups. Ova that resumed meiosis were observed in 58.7% (54/92) of the control group and 54.2% (45/83) of the ID treated group; those which matured to metaphase second stage comprised 43% of both groups. Finally, fertilizability was examined using the ova retained in the follicles, as a result of administration of 2 mg ID/mouse, and collected 17 hours after hCG administration. Ovulated ova from animals receiving ID-vehicle were used as controls. Morphologically matured ova were employed in both groups for this experiment. The fertilization rate in the ID-treated group (73.7%) was similar to that in the control group (72.9%). Essentially the same results with respect to efficacy of ovulation inhibition, rate of egg maturation and fertilizability of the intrafollicular ova were obtained when ID was administered 30 min. before hCG injection. These findings indicate that in the mouse, prostaglandin (PG) is not involved in the ovum maturation process, including fertilizability, under the experimental conditions employed, while it is required for follicle rupture.

(受付: 昭和61年11月25日特掲)

Effects of indomethacin on follicle
rupture and follicular egg
maturation in mice

Seiji Hayashi, Yoichi Noda

Hisashi Matsumoto and Takahide Mori

Department of Gynecology and Obstetrics,
Faculty of Medicine, Kyoto University,
Kyoto, 606, Japan

We investigated the effects of indomethacin (ID) on follicle rupture, nuclear maturation and

OVULATION INDUCTION IN CASES FAILING TO RESPOND TO CLOMIPHENE CITRATE THROUGH ADMINISTRATION OF PULSATILE LH-RH

Yuji YAMADA and Hisao OSADA

Nihon University School of Medicine, Department of Obstet. & Gynaec.

Abstract: The aim of this study is to present the results of ovulation induction with administration of pulsatile LH-RH in 31 patients (36 cycles) who did not respond favorably to Clomiphene therapy. LH-RH was infused at a dosage of 5-30 μ g at 90 min. intervals, by either the antecubital veins or abdominal subcutaneous tissue. Ovulation was achieved in 19 cycles (53 %) and conception was achieved in 5 cases (16 %), and in most of these cases, a clear, ferning cervical mucus appeared and a mono follicular maturation was detected by ultrasonography. The cases which failed to respond to LH-RH pulsatile administration treatment can be classified into two groups. One of these groups consists of many cases in which follicle growth was not recognized because of the so-called down regulation i.e. the decrease in responsiveness to LH-RH's pituitary gonadotropin secretion function. The second group consists of the cases in which the LH surge did not occur although the E_2 in the blood increased and follicular growth was detected, it is suggested that this is caused by a serious deficiency in the so-called cyclic center.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(2), 219-227, 1987)

Introduction

In 1972, Yen et al., as a result of detailed examination of the fluctuation of LH in the blood during the natural human ovulatory cycle, indicated that during the follicular phase LH increased in a pulsatile fashion from basal levels, at intervals of one to two hours, characterised by a sharp increase followed by a slow decrease¹⁾. This phenomenon of pulsatile increase is most clearly observed during the ovulatory phase rather than the early follicular phase. It is reported that the interval lengthens to approximately four hours during the luteal phase.

In 1980, Knobil reported that administration of LH-RH in a pulsatile fashion to rhesus monkeys, in which the hypothalamus had been destroyed, caused secretion of gonadotropin to be resumed²⁾. In 1982, Clarke measured the LH-RH contained in sheep's portal veins and showed that the secretion was pulsatile,

and that the peripheral LH was aligned with this phenomenon³⁾. Meanwhile since its synthesis, LH-RH had been widely used for the pituitary gonadotropin secretion priming function test. Since Leyendecker's group reported in 1980 that high ovulation induction effectivity can be achieved through administration of LH-RH in a pulsatile fashion in hypothalamic anovulatory cases, LH-RH had attracted a great deal of attention⁵⁾. There have been many reports subsequently of excellent ovulation induction rates being achieved through the use of pulsatile LH-RH^{4-9,16,17)}.

Although Clomiphene is said to be highly effective in cases of amenorrhea grade 1, and anovulatory cycles etc., it is also said that resistance occurs in 20 to 30 % of cases and that the treatment is accompanied by various difficulties. The ovulation induction rate using Clomiphene is calculated to be 40-60 %. However, the conception rate using clomiphene is less, 10-30 %, which cannot be said to

Table 1 Subjects: Inadequate response to Clomiphene

anovulatory cycle	9 cases	10 cycles
amenorrhea grade 1	12 cases	15 cycles
amenorrhea grade 2	3 cases	3 cycles
PCO	3 cases	3 cycles
weight loss amenorrhea	4 cases	5 cycles
total	31 cases	36 cycles

be a high rate. Regarding the conception rate, it is said that, although ovulation induction is achieved by the use of Clomiphene, 50-60 % of cases fail to conceive. Consequently, in treating infertility, the handling of these cases is a problem which awaits solution. The authors have carried out ovulation induction by administering LH-RH in a pulsatile fashion in various patients with ovulatory problems, and recognizing the clinical value of the treatment, wish to make it more widely known.

Subjects and Methods

We selected 9 cases of anovulatory cycles (10 cycles) and 12 cases of amenorrhea grade 1 (15 cycles) and 3 cases of amenorrhea grade 2 (3 cycles) and three cases of PCO (3 cycles) and 4 cases of weight loss amenorrhea (5 cycles) from our outpatient department (Table 1). And adjusted a NIPURO portable syringe pump so that LH-RH at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ can be automatically infused at a dosage of 5-30 μg at 90 minutes intervals. The administration period was from day 4 or 5 of the menstrual cycle until day 2 after ovulation. The portable liquid transfusion pump was fixed to the patient's abdomen by a belt. As its weight is approximately 200 g, it did not cause any inconvenience. LH-RH was admi-

nistered by either antecubital vein or abdominal subcutaneous tissue. For antecubital vein infusion, 100 μg of LH-RH, to which heparin had been added, was administered by an intravenous catheter. The intravenous catheter was replaced every week in order to reduce infection rate. We did not encounter any side-effects worthy of special mention. For subcutaneous transfusion a 23 G, wing-shaped needle was inserted into the abdominal subcutaneous tissue and fixed. Follicular maturation was monitored daily by sampling the cervical mucus and measuring the diameter of follicle using ultrasonography. Serum hormones, LH, E_2 and P were measured by RIA.

Results

The cases which we evaluated are summarized in table 2. Ovulation was achieved in six cycles of the ten anovulatory cycles (60 %), and conception was achieved in one case (11 %). Ovulation was achieved in three cycles out of five in weight loss amenorrhea (60 %). Ovulation and conception were achieved in one of three PCO cases (33 %). Among the above-mentioned 31 cases (36 cycles), ovulation was achieved in 19 cycles (53 %) and conception was achieved in 5 cases (16 %). Comparing the ovulation rate achieved through usage of Clomiphene and through LH-RH when both were administered to the same case (Table 3), the ovulation rate for anovulatory cycles and PCO on the 91st cycle after Clomiphene was 53 % (48 cycles).

The rate for ovulation induction using LH-RH was, 55 % at the 20th cycle (11 cycles) although a clear tendency was not evident due to the fewer number of cases studied. The latter ovulation rate does not appear superior to Clomiphene administration.

Table 2 The ovulation induction rate and conception rate using pulsatile LH-RH

	No. of patients	No. of conception	conception rate(%)	No. of treated cycles	No. of ovulated cycles	ovulation induction rate(%)
anovulatory cycles	9	1	11	10	6	60
amenorrhea grade 1	12	2	14	15	8	53
amenorrhea grade 2	3	0	0	3	1	33
PCO	3	1	33	3	1	33
weight loss amenorrhea	4	1	20	5	3	60
total	31	5	16	36	19	53

Table 3 Patient who underwent LH-RH therapy following an inadequate response to Clomiphene

	Clomiphene		LH-RH pulsatile	
	cycles/pts.	ovulation rate(%)	cycles/pts.	ovulation rate(%)
anovulatory cycles	11/3	9/3 (82/100)	3/3	2/2 (66/66)
amenorrhea grade 1	65/11	29/8 (45/ 72)	14/11	8/8 (57/73)
PCO	15/3	10/3 (66/100)	3/3	1/1 (33/33)
total	91/17	48/14(53/ 14)	20/17	11/11(55/65)

Table 4 Grading of hypothalamic amenorrhea on the basis of progestagen, clomiphene and Gn-RH tests (G. Leyendecker 1983)

Grade	Result of test
1	Clomiphene positive with bleeding following :
1a	Normal luteal phase
1b	Insufficient luteal phase
1c	Anovulatory cycle
2	Progestagen positive Clomiphene negative
3	Progestagen negative with pituitary response to 100 µg Gn-RHi.v.
3a	Adult response
3b	Prepubertal response
3c	NO response

However, considering that the subjects were those who did not respond to treatment with Clomiphene, the ovulation induction rate using LH-RH is highly significant. The following are a sample of actual cases evaluated during this study.

Patient 1 (Fig. 1)

This woman was a 33 year patient old with anovulatory cycles who had not conceived during six years of marriage. Induction of ovulation was attempted with Clomiphene citrate. Doses of 100 mg/day for 4 cycles and 150 mg/day for 5 cycles was ineffective. The patient was subjected to pulsatile LH-RH administration (5 µg every 90 min i.v.), serum levels of E₂ increased at 3 days after on set of administration, serum LH and urinary LH were increased from 7 days after initiation of treatment. Ovulation was observed 10 days after onset of treatment.

Patient 2 (Fig. 2)

This woman was 32 years old with primary

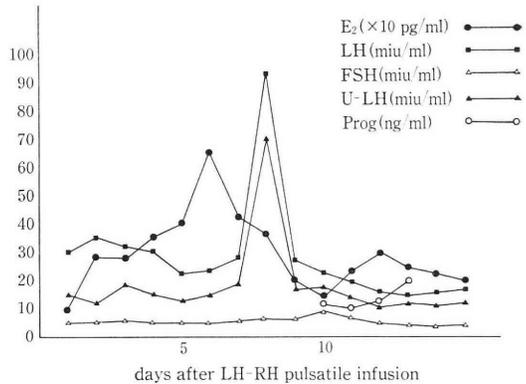


Fig. 1 The serum or urinary concentration of FSH, LH, E₂, and progesterone in patient 1 treated with LH-RH dose of 5 µg/90min.

infertility. The left ovary had a partial resection performed in 1981, and salpingoplasty (micro-surgery) was performed in 1983.

After surgery, induction of ovulation with Clomiphene citrate was attempted, but even though ovulation was recognized, she did not conceive. Pulsatile administration of LH-RH (5 µg every 90 min iv) was performed and a copious clear, ferning cervical mucus with good spinnbarkeit appeared with a rise in E₂ and a mono follicular maturation was detected by ultrasonography, followed by conception.

Patient 3 (Fig. 3)

A 30 year old woman with anovulatory cycles. Induction of ovulation with Clomiphene citrate 100 mg/day for 5 cycles was ineffective, and even with 150 mg/day for 5 cycles, ovulation in only one cycle was recognized, 200 mg/day for 5 cycles was ineffective. HMG therapy was attempted for two cycles, during which the hyperstimulation syndrome occurred. She was then treated with pulsatile administration of LH-RH (5 µg every 90 min iv) and conceived.

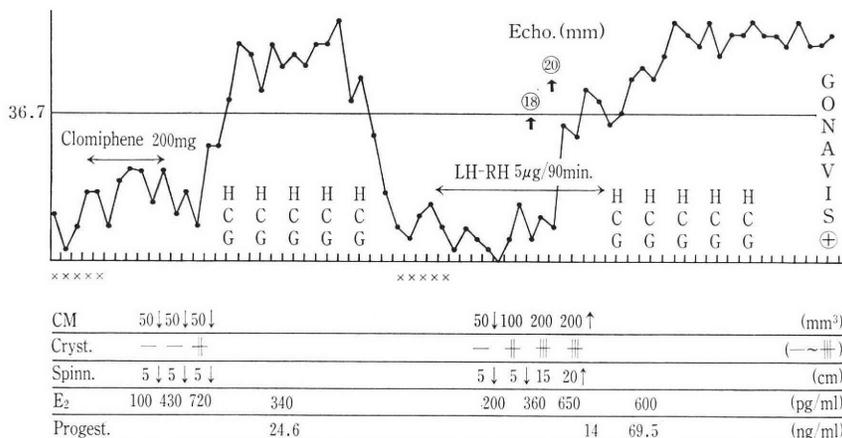


Fig. 2 BBT chart and serum level of E₂ and cervical score in patient 2 treated with LH-RH dose of 5 µg/90min.

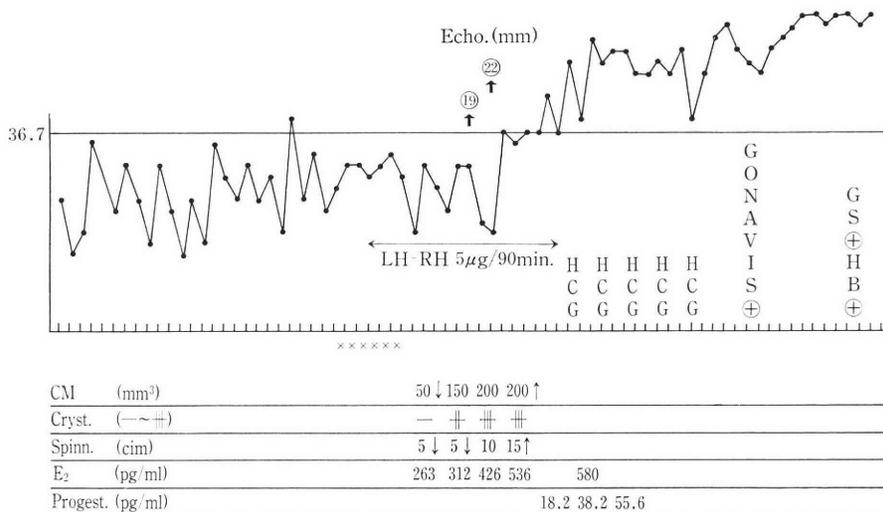


Fig. 3 BBT chart and serum level of E₂ and cervical score in patient 3 treated with LH-RH dose of 5 µg/90min.

Patient 4 (Fig. 4)

This woman was 30 years old with amenorrhea and weight loss. She was 152 cm in height and weighed 35.5 kg. Menarche at 13 yrs was followed by regular menses, Amenorrhea has been present for 5 yrs and a 6 kg weight loss was noticed in the past 6 months. She was diagnosed as having hypothalamic amenorrhea by endocrinologic evaluation. Induction of ovulation with Clomiphene citrate 100 mg/day for 3 cycles and 150 mg/day for 4 cycles was ineffective, this case corresponds to Leyendeckers grade 2. She was then

treated with pulsatile administration of LH-RH (5 µg every 90 min. subcutaneous), but in this case, in spite of the increase of serum and urinary E₂ and maturation of the follicles, no LH surge was recognized. This case was suggestive of severe damage to the so-called cyclic center.

Patient 5 (Fig. 5)

This woman was 32 yrs old with anovulatory cycles, and induction of ovulation with Clomiphene citrate was ineffective. She was treated with pulsatile administration of LH-RH (5-10 µg every 90 min. subcutaneous), but

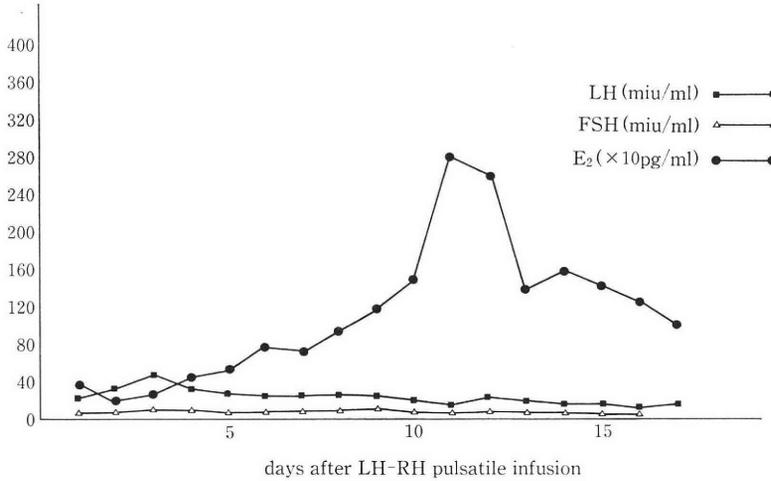


Fig. 4 The serum concentration of FSH, LH, E₂ and progesterone in patient 4 treated with LH-RH dose of 5μg/90min.

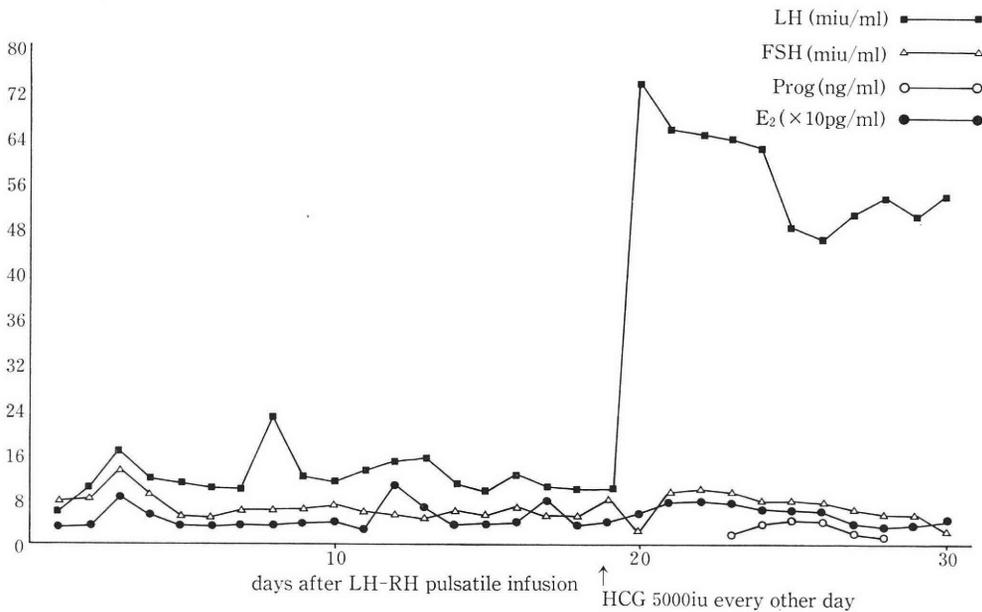


Fig. 5 The serum concentration of FSH, LH, E₂, and progesterone in patient 5 treated with LH-RH dose of 5μg/90min.

serum levels of FSH, LH, E₂ were not increased, and maturation of the follicle did not occur. LH-RH test during this therapy suggested a decrease in the activity of the pituitary gland, and the so-called down regulation phenomenon was suspected.

Comment

While ovulation induction using LH-RH

has been tried by various methods, both single and serial administration have not achieved satisfactory ovulation induction. However, since the discovery, that LH-RH secretion is carried out in a pulsatile fashion, treatment making use of this physiological pattern has been carried out by many investigators.

According to Knobil, serial administration of LH-RH somewhat lowers the responsiven-

ess of the hypophysis and therefore the gonadotropin secretion is not maintained²⁾. However, by administering LH-RH in a pulsatile fashion, in a condition close to its physiological secretion, gonadotropin secretion can be stimulated.

Clomiphene treatment is utilized primarily for anovulatory cycles and amenorrhea grade 1. Compared to its 50-70% ovulation rate, it is reported that the conception rate is 54% (WHO 1973). This discordance between the ovulation rate and the conception rate has been reported due to a luteal function disorder and cervical mucus factors. HMG-hCG treatment is being used in the more severe cases of central nervous anovulation. The problem with this treatment is that this treatment causes ovarian stimulation which ignores the organism's inherent feedback mechanisms. Therefore the growth and ovulation of only dominant follicles, which are normally carried out physiologically, is not maintained, and there is a high occurrence rate of ovarian hyperstimulation syndrome. Treatment using Clomiphene or HMG-hCG has many problems, and thus attention is being paid to the more physiological ovulation induction method or administration of LH-RH in a pulsatile fashion.

Generally speaking, Clomiphene treatment, which is clinically simpler, should be selected as the first choice for anovulatory cycles or amenorrhea grade 1, because sufficiently effective results can be gained without the use of more intricate methods of treatment such as LH-RH treatment. Thus we selected cases to which LH-RH treatment was given, mainly from cases which had failed to respond to Clomiphene, and then evaluated its efficacy. Subjects who underwent ovulation induction by administration of LH-RH in a pulsatile fashion, were mainly hypothalamic anovulation patients.

However, it is said to be difficult to establish the amount of endogenous LH-RH secretion necessary to induce response in the pituitary, or its fluctuation pattern, due not only to the intricate method of measurement involved but also the differences between individuals.

Therefore Leyendecker and others have devised a classification of degrees of hypothalamic anovulation according to reactions to the

Clomiphene test, P-test, and Gn-RH test, as shown in Table 3⁴⁾. That is, Grade 1 is for the group showing a positive reaction to Clomiphene and is divided into three groups according to degrees of hypothalamic deficiency, by assessment of ovulation and luteal function insufficiency. Grade 2 is for the group which was negative to Clomiphene but reacted positively to P-test (progesterone). Grade 3 is for the group which was negative to both the P-test, and the Gn-RH test, it is divided into three groups, namely the adult-type reaction group (when 100 μ g of LH-RH is administered, the increase of LH surpasses that of FSH), the adolescent reaction group (increase of LH and FSH does not differ in quantity and in quality) and the no reaction group. By this classification, Leyendecker and others administered pulsatile LH-RH intravenously, with 15-20 μ g for severe cases, and 5 μ g for light cases⁴⁾. An administration interval of 90 minutes to 120 minutes is widely adopted at present. This is worked out by examining LH's pulse in the peripheral blood. The fact that the interval and dose required vary according to the phase, in the natural ovulatory cycle, has been made, known through the work of Yen and others¹⁾. In actual treatment, the necessity of altering the interval and dose according to the cycle, as well as deciding the length of the LH-RH administration, becomes problematic. Concerning intervals, we did not see any noticeable difference in ovulation induction effectivity between administration at intervals altered according to the cycles, and that at constant intervals. Also no difference was noticed between continuation of LH-RH administration in a pulsatile fashion and administration of hCG for maintenance of the luteal function.

The relationship between LH-RH administration and gonadotropin secretion is dose-dependent. However, gonadotropin secretion fluctuates in quality and quantity according to the feedback from ovarian estrogen which takes place at the pituitary level. Because of this, ovulation is induced anyway even when administering LH-RH under constant condition. The dosage of LH-RH therefore is generally fixed. However, when LH-RH is excessively administered, LH secretion sur-

passes FSH secretion. Particularly in the follicular phase, an increase in LH/FSH suppresses the growth of the follicle. Knobil and others stated that in order to have FSH secretion maintain predominance, the amount of LH-RH administered should be decreased, and the interval extended²¹. Sarkar and others state that for the appearance of an LH surge, in rats, aggravation of LH-RH secretion was recognized¹⁸. But Knobil and others state that an LH-RH surge is not necessary for the appearance of an LH surge²¹. We had one case, as shown in Fig. 4, in which, although a remarkable increase in estrogen, caused by administration of a constant dose of LH-RH in a pulsatile fashion, was noted, the positive feedback mechanism of LH did not appear. Therefore we think that, in the case of humans, depending on the degree of ovulation deficiency, fluctuation in the LH-RH dosage and its administration interval at the ovulatory phase, or administration of hCG, may become necessary, and that these points must be investigated. Regarding the method of administration, there are two alternatives, namely the intravenous and subcutaneous routes of administration. The former method can facilitate release of gonadotropin with less LH-RH dosage. With the latter method, as it is taken into the blood stream after it is once absorbed into the subcutaneous fat, an adequate LH-RH concentration in the blood cannot be obtained and also the pulsatile stimulation is weakened, and in particular the FSH increase is weakened. It has been reported in comparing the efficacy of intravenous and subcutaneous administration for ovulation induction. Subcutaneous administration is superior because of decreased discomfort for the patients. In our experience no significant difference was found between the two methods. With regard to the effectiveness in ovulation induction LH-RH pulsatile administration in PCO cases, a few reports have been made, but no settled opinion has emerged as yet. In our experience, this treatment is not always effective for ovulation. The cause of PCO itself is still a matter of controversy and no unified theory has been established. There are two major theories, namely the central deficiency theory and the steroid biosynthesis deficiency

theory. The former theory argues that a hypothalamic cyclic center deficiency causes acyclic LH secretion from the pituitary. Thus LH secretion is maintained without a break and thus ovulation is suppressed¹⁵. The latter theory argues that a steroid biosynthesis deficiency causes an increase in testosterone and therefore a gonadotropin secretion deficiency is caused centrally. If the abnormality of the PCO's LH secretion pattern is seen as related to the abnormality in the LH-RH secretion pattern, by rectifying this by pulsatile administration of LH-RH effective ovulation can be expected. Meanwhile Knobil and others state that through experimentation on monkeys they noticed that the extension of the intervals of the LH-RH secretion pattern reduced its amplitude thus lowering the LH/FSH ratio and consequently stimulating FSH secretion. By extending the interval of this treatment and reducing the amplitude, the LH/FSH ratio is lowered²¹. However, the subsequent LH surge seems to be inhibited, therefore, when treating PCO it seems necessary to vary the pattern of the LH-RH pulsatile administration, in response to the phase of the ovarian cycle. Lately many cases have been reported in which ovulation was successfully induced among PCO patients by administration of hMG in a pulsatile fashion. This requires further investigation.

As is clear from our previously mentioned results, LH-RH pulsatile administration was effective for weight loss amenorrhea. Its main symptoms are severe anorexia, emaciation, and amenorrhea. It is a distinctive feature of this disorder that the other bodily functions are preserved. Many reports concerning its diagnostic criteria have been made. Among them, psychological symptoms which manifest physiologically in results such as a decrease in weight, amenorrhea, and anorexia are typical¹⁹. This disorder's endocrine and gynaecologic characteristics are said to be caused by an abnormal psychological state which may result in an irreversible change to the diencephalohypophyseal system, thus hindering its functioning. In the case of this disorder, a common, symptom is hypothalamic amenorrhea. Even in cases where the pituitary is involved, many respond to the LH-RH serial load test, they can be cla-

ssified as a secondary transformations of the affected hypothalamus. Thus the effectiveness of LH-RH pulsatile administration for amenorrhea caused by this disorder, is fully comprehensible in view of its endocrinous background.

The cases which failed to respond to LH-RH pulsatile administration treatment can be roughly classified endocrinologically into two groups. One of these groups consists of many cases in which follicle growth itself was not recognized because of the so-called "down regulation" i.e. the decrease in responsiveness to LH-RH's pituitary gonadotropin secretion function¹⁷⁾. The LH-RH secretion pattern of such cases before being given the LH-RH pulsatile administration treatment, show scant pulsatile secretion of LH-RH, with the pituitary being exposed to constant stimulation. Therefore this secretion pattern does not alter with LH-RH pulsatile administration. The same thing can be said concerning cases which failed to respond to Clomiphene treatment. In our experience, ovulation can be induced in cases in which LH's pulsatile secretion was apparent before Clomiphene administration, while cases in which LH's pulsatile secretion was not apparent tend to fail to respond to Clomiphene. However, it has been reported that in cases in which LH's pulsatile secretion was apparent before administration of LH-RH pulsatile treatment, when the LH/FSH ratio was high, ovulation was not induced even with LH-RH pulsatile administration. This is interesting considering the previously mentioned PCO. The second group consists of a few other cases which were given LH-RH pulsatile administration. Although the E₂ in the blood increased and follicular growth was detected by ultrasonography, because of a positive feedback deficiency in the hypothalamus, the LH surge which should have followed did not occur and ovulation did not occur. It is suggested that this is caused by a serious deficiency in the so-called cyclic center. Those cases which failed to respond to LH-RH pulsatile administration treatment are thought to be caused by a serious deficiency in the hypothalamus and its treatment awaits future investigation.

Conclusion

We experienced various types of infertility which did not respond favorably to Clomiphene therapy. Our attempt to induce ovulation in these patients by utilizing a pulsatile administration of LH-RH compared favorably with the results reported for Clomiphene. Our series included women who conceived after prolonged periods of infertility which did not respond to other therapeutic modalities. We hope to increase our cross section of patients and enlarge our series in order to allow us to derive more substantial conclusions.

Acknowledgement

The authors are grateful to Prof. S. Takagi, Director of the Department of Obstetrics and Gynecology, Nihon University School of Medicine and associate Prof. K. Tsubata for their guidance throughout this study.

The contents of this report have been presented at the Annual meeting of the Japan Society of Fertility and Sterility in November, 1985, Tokyo.

References

- 1) Yen, S. S. C., Tsai, C. C. and Naftolin, F.: Pulsatile pattern of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34 : 671, 1972.
- 2) Knobil, E.: The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.*, 36 : 53, 1980.
- 3) Clarke, I. J. and Cummins, J. T.: The temporal relationship between GnRH and LH secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111 : 1737, 1982.
- 4) Leyendecker, G. and Wildt, L.: Induction of ovulation with chronic intermittent (pulsatile) administration of GnRH in women with hypothalamic amenorrhea. *J. Reprod. Fert.*, 69 : 397, 1983.
- 5) Leyendecker, G., Struve, T. and Plotz, E. J.: Induction of ovulation with intermittent (pulsatile) administration of LH-RH in women with hypothalamic and hyperprolactinemic amenorrhea. *Arch. Gynecol.*, 229 : 177, 1980.
- 6) Leyendecker, G. and Wildt, L.: Die pulsatile Therapie mit Gonadotropin-Releasinghormon (Gn-RH). *Gebutsh. u. Frauenheilk.*

- 42 : 689, 1982.
- 7) Belchetz, P. E., Plant, T. M., Nakai, Y., Keogh, E. J. and Knobil, E. : Hypophyseal responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 202 : 631, 1978.
 - 8) Reid, R. L., Leopold, G. R. and Yen, S. C. C. : Induction of ovulation and pregnancy with pulsatile luteinizing hormone releasing factor : Dosage and mode of delivery. *Fertile. Steril.*, 36 : 553, 1981.
 - 9) Leyendecker, G., Wildt, L. and Hansmann, M. : Pregnancies following chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH by means of a portable pump(Zykomat)-A new approach to the treatment of infertility in hypothalamic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51 : 1214, 1980.
 - 10) Nillius, S. J., Fries, H. and Wide, L. : Successful induction of follicular maturation and ovulation by prolonged treatment with LH-RH in women with anorexia nervosa. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 122 : 921, 1975.
 - 11) Seibel, M. M., Kamrava, M., McArdle, C. and Taymor, M. C. : Ovulation induction and conception using subcutaneous pulsatile LH-RH. *Obstet. Gynecol.*, 61 : 292, 1938.
 - 12) Skarin, G., Nillius, S. J. and Wide, L. : Pulsatile low dose LH-RH treatment for induction of follicular maturation and ovulation in women amenorrhea. *Acta Endocrinol.*, 101 : 78, 1982.
 - 13) Strott, C. A., Cargille, C. M., Ross, G. T. and Lipset, M. B. : The short luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 30 : 246, 1970
 - 14) Vande Wiele, R. L., Bogumil, J. and Dyrenfurth, I. : Mechanisms regulating the menstrual cycle in women. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 26 : 63, 1970.
 - 15) Yen, S. S. C. : The polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol.*, 12 : 177, 1980.
 - 16) Masaoka, K. and Kumasaka, T. : Induction of Ovulation with Pulsatile LH-RH in Anovulatory Woman. *Acta Obst Gynaec Jpn.*, 36 : 937, 1984
 - 17) Mizunuma, H., Obata, M., Yamada, K., Ibuki, Y., and Igarashi, M. : Subcutaneous Long-term Pulsatile Administration of LH-RH to Patients with Hypothalamic Amenorrhea. *Acta Obst Gynaec Jpn.*, 38 : 933, 1986
 - 18) Sarker, D.K., Chippa, S.A., and Fink, G. : Gonadotropin-releasing hormone surge in proestrous rats. *Nature*, 264 : 461, 1976
 - 19) Bruch, H. : Anorexia nervosa and its differential diagnosis. *J. Nerve. Ment. Dis.*, 141 : 555, 1966

クロミフェン無効例に対する LH-RH 律動的投与による排卵誘発

日本大学医学部産婦人科学教室

山田祐士, 長田尚夫,

クロミフェン無効の無排卵周期症及び視床下部性無月経の症例31人36周期に対して、LH-RH を律動的投与による排卵誘発を試み、その効果について検討した。LH-RH は、90-120分間隔で、5-10 μ g を皮下投与した。その結果、全体で、19周期53%に排卵を認め、このうち5例16%が妊娠に移行した。排卵誘発無効例について、その内分泌学的背景を検討した結果、1) LH-RH に対する下垂体ゴナドトロピン分泌能の感受性が低下し、いわゆる down regulation のため、卵胞の発育が認められなかった症例ならびに2) 卵胞の発育及び、血中 E₂ の増加を認めるにもかかわらず LH サージが認められず、排卵に至らなかった例が認められた。

(受付：昭和61年12月12日特掲)

Hatching 過程におけるマウス胞胚の走査型 および透過型電子顕微鏡観察

Time Sequential Observation on Hatching of Mouse Blastocysts
by Scanning and Transmission Electron Microscopy

東北大学医学部産科学婦人科学教室

千 田 智 上 原 茂 樹
Satoru CHIDA Shigeki UEHARA

星 合 昊 矢 嶋 聡
Hiroshi HOSHIAI Akira YAJIMA

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

胞胚の着床前現象である透明帯よりの脱出 (hatching) の機序解明の一法として、マウス胞胚の hatching の経時的变化を走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。

1. 走査電顕所見: Hatching は、多孔性のスポンジ状構造を呈する透明帯の一部の融解より始まり、その裂孔は拡大し、透明帯内部より多数の微絨毛を有する胞胚がせり出してくる形態が観察された。また透明帯断端は丸みをおびており、表面には泡沫状変化を認めた。

2. 透過電顕所見: Hatching 開始時、胞胚は十分に拡張し、trophoblast は透明帯側に微絨毛を有する単層の扁平な上皮細胞の形態を示した。Hatching 開始部位は他部位と比較して、透明帯や trophoblast に特別な差を認めなかった。Trophoblast 内にはミトコンドリア、ゴルジ体、小空胞、遊離リポソームを認め、hatching 後は、trophoblast は立方形を呈し、多数の大小空胞の増加が著明であった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32 (2), 228-235, 1987)

緒 言

哺乳動物受精卵の着床前現象である透明帯からの胞胚の脱出現象、いわゆる hatching は 1929 年、Lewis et al.²³⁾ によって家兔胞胚において発見され、さらに 1938 年、Pincus et al.²⁶⁾ も家兔胞胚の hatching を確認し、胞胚の拡張に引き続いておこる現象と考察している。以後数々の研究、追試がなされ、現在では hatching の機序には子宮因子は不要であり、それは胞胚自体の発育・成熟の結果であると同時に着床前に必要不可欠の現象であるとされている^{8,14)}。つまり透明帯は着床には不要であり、着床前に除去される必要がある。

Hatching の機構としては次の様に考えられている。まず trophoblast の Na^+ ポンプを介し、透明帯外より Na^+ 、 Cl^- が胞胚腔内に能動的に取り込まれ、浸透圧が

上昇し、水分流入により胞胚は拡張する⁹⁾。一方では透明帯の一部が trophoblast より産生される蛋白分解酵素にて溶解され、その裂孔より胞胚の一部が脱出し始め、さらに胞胚腔内圧の上昇により圧出されることで hatching が完了するといわれている¹⁰⁾。しかし、trophoblast における Na^+ ポンプの存在や透明帯融解酵素の産生の有無については仮説の域を出ず、また哺乳動物の種の違いによる現象の差違も考えられ^{15,17,24)} 詳細は不明の点が多い。そこで本研究では hatching 機構の解明の一法として、走査型および透過型電子顕微鏡を用い、マウス胞胚の hatching の経過に伴う形態学的変化を観察し検討した (図 1)。

研究 方法

1. 胞胚採取および培養法

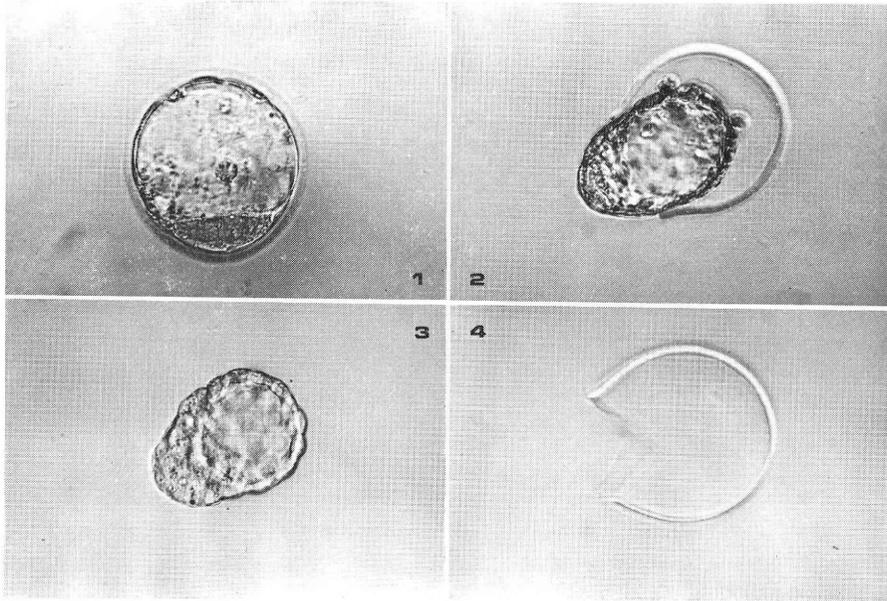


図 1 Hatching phenomenon.

週齢6~8週 ICR 系雌マウスに 5 IU PMSG, 48時間後 5 IU HCG を腹腔内投与し, 同時に雄マウスと交配し, 翌朝膣栓を確認後 74~78時間目に子宮を摘出, 各子宮角より Hanks 液にて flush し, 胞胚を採取した. 十分に拡張した胞胚を 1 mg/ml 牛血清アルブミン添加 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 中, 5% CO₂, 37°C にて数時間培養し, hatching 経過における種々の stage の胞胚を電顕用試料とした.

2. 走査電顕用試料の作製

各種胞胚を 2.5% グルタルアルデヒドに移し, 12~24 時間 4°C にて固定. 固定後 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗滌し, 蒸留水に戻し, 菅原ら²⁹⁾の考案したガラス製の container 中に濾紙を置き, 胞胚を移し, 上昇エタノール系列 (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%) で各々 5 分間の脱水をし, 酢酸イソアミルにて置換した. 以後, 液体炭酸ガス下にて臨界点乾燥 (日立 HCP-1) し, 胞胚を濾紙とともにアルミニウムスタップ上に移し, イオンスパッター (EIKO IB-3型) で金蒸着を施し, 日立 S-450型走査電子顕微鏡にて観察した.

3. 透過電顕用試料の作製

各種胞胚を 2.5% グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) 中にて 4°C, 1 時間の前固定後 0.5% タンニン酸-2.5% グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) 中 4°C, 20 分間, さらに 1.0% タンニン酸-2.5% グルタルアルデヒド-0.1M カコジル酸緩衝液中 4°C, 20 分間にてタンニン酸固定. 以後, 0.1M カコジル酸緩衝液中 4°C over night で洗滌し, 1.0% オ

スミウム-0.1M カコジル酸緩衝液中 4°C, 1 時間の後固定を施した. 脱水は走査電顕用試料と同様にアルコール系列下で行い, 酸化プロピレン・包埋剤等量混合液で置換, エポン包埋とした. Ultramicrotome, Porter MT-1 にて超薄切片作成後, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛にて電子染色を施し, 日立 H-600型透過電子顕微鏡にて観察した.

研究成績

1. 走査電顕観察

Hatching 前の透明帯表面は, 均一な線維性物質よりなり, 多孔性のスポンジ状構造を呈していた. また, 詳細に観察すると透明帯の一部が融解しており, その裂孔より内部に微絨毛を有する trophoblast の一部が観察された (図 2). さらに裂孔は拡大し, hatching が進行すると, 表面に多数の均一の微絨毛を有する胞胚がせり出してくるのが認められた (図 3). この時の透明帯断端は丸みをおびており, また透明帯表面には泡沫状変化がみられた. 尚, 走査電顕写真中右下方の白線は 5 μm を示す (5 U = 5 μm).

2. 透過電顕観察

Hatching 開始時, 胞胚は十分に拡張し, 一層に配列した trophoblast は透明帯側に微絨毛を有する扁平な上皮細胞として観察された. Hatching は胞胚のどの部位からも始まり, embryonic pole, abembryonic pole における差違は認められなかった. 透明帯は一層の均一な物質からなり, hatching 部位の断端付近に特別の変

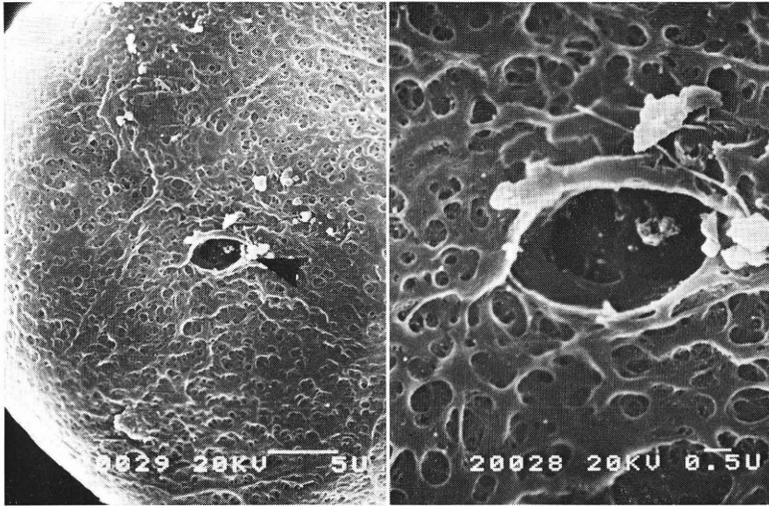


図 2 Hatching starts with lysis of a part of the zona. Note emerging trophoblast cell with microvilli and slit-like opening in the zona surrounding it (arrow head).

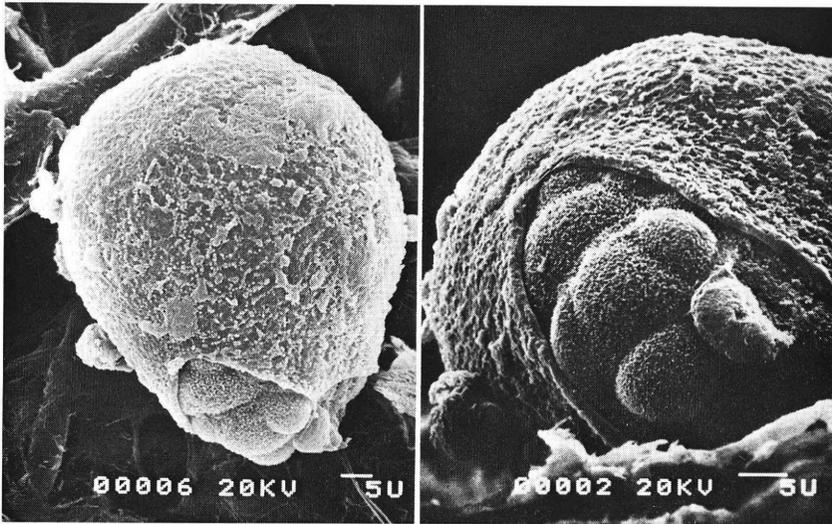


図 3 Shedding of the zona with protruding microvilli from trophoblast cell underneath. Note several bulging trophoblast cells with a dense lining of microvilli and foamy changes on the surface of the zona.

化を認めず、また同部位の trophoblast も他部位と比較して著明な差違を認めなかつた (図 4)。

Trophoblast 内にはミトコンドリアの他、遊離リボソームを認めた (図 5)。また部分的に、発達したゴルジ体 (ゴルジ囊, ゴルジ小胞) が観察された (図 6)。Hatching 後の trophoblast は立方性を呈し、内部には大小空胞, 分泌顆粒様囊胞の増加が著明であつた。この変化は embryonic pole, abembryonic pole ともに同様であつた (図 7)。

考 案

Hatching とは、着床前に胞胚が透明帯より脱出する現象であり、胞胚の發育成熟の指標となる¹⁴⁾。その機序として、次の 2 つが考えられている。胞胚の trophoblast が蛋白分解酵素を産生し、シアル酸を含む酸性から中性のムコ多糖類より成る透明帯²³⁾を溶解する機序。もう 1 つは、trophoblast に Na ポンプが存在し、外部より Na^+ , Cl^- を胞胚腔内へ能動的に取り込み^{6,9)}、浸

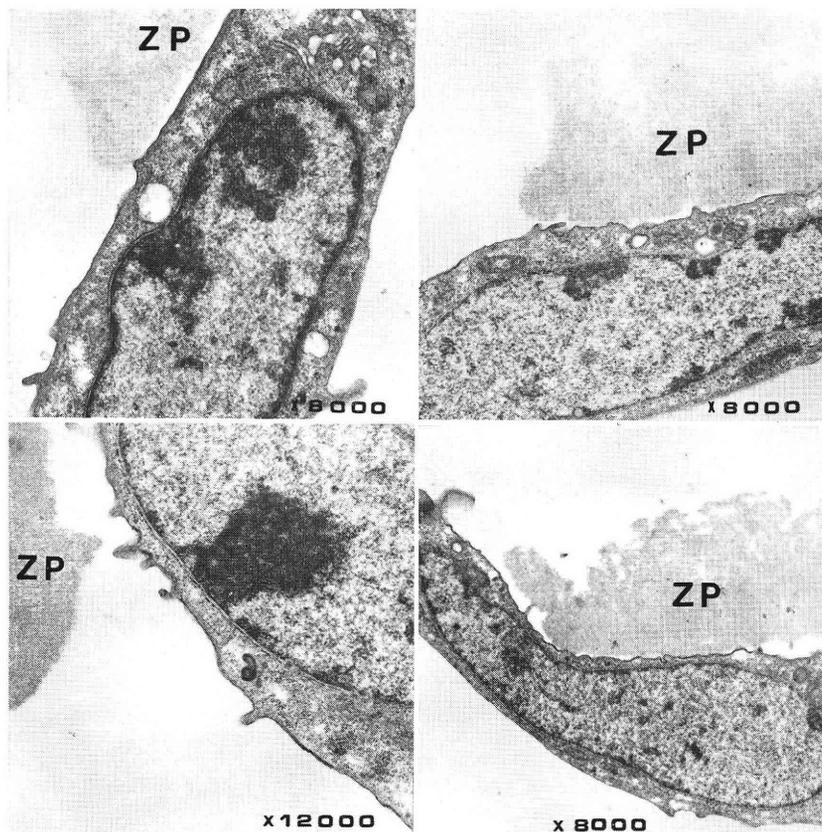


図 4 Transmission electron micrograph of a blastocyst hatching. No specific changes of the edge of the zona pellucida and the cytoplasm of the trophoblast in the part of hatching compared with the other sites. ZP: zona pellucida.

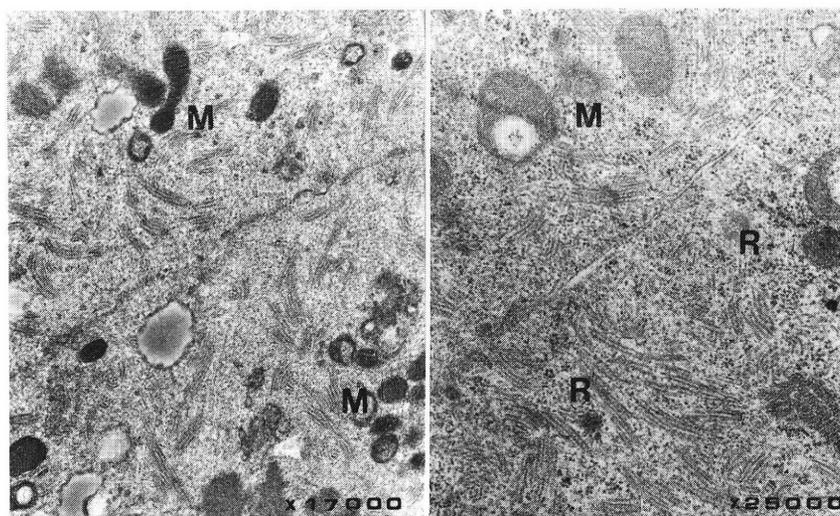


図 5 The cytoplasm of the trophoblast contained a well developed mitochondria (M) and free ribosome (R).

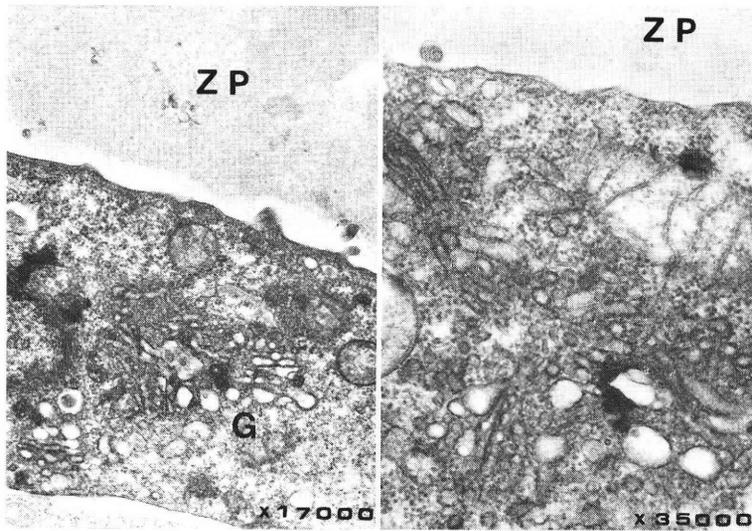
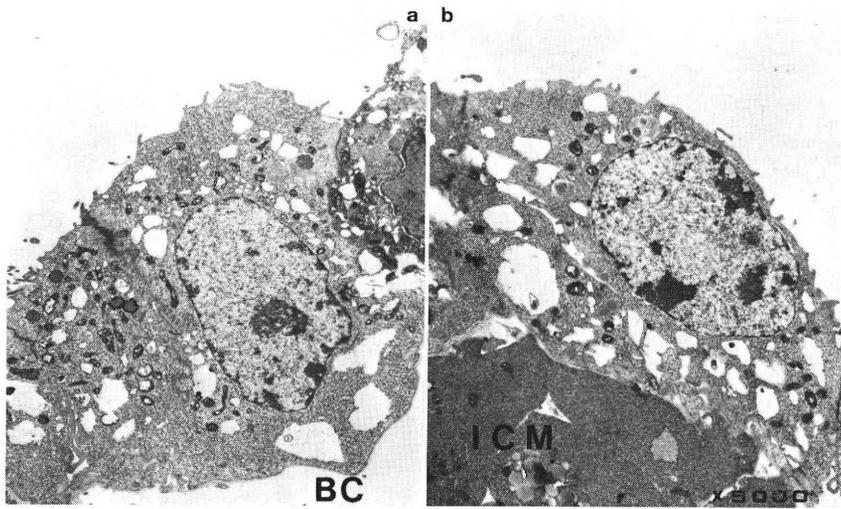


図 6 The Golgi complex in the hatching stage is observed as a packed cluster of tubular cisternae with associated numerous vesicles. ZP : zona pellucida.



a. Abembryonic pole (mural trophoblast) of a hatched blastocyst. Similar changes are observed in mural and polar trophoblast. BC : blastocoele
 b. Embryonic pole of a hatched blastocyst. Many multivesicular bodies and large vacuoles are observed in the polar trophoblast. ICM : inner cell mass

図 7

透圧が上昇する。これにより水分が胞胚腔へ流入し¹¹⁾、腔は拡張し透明帯の脆弱部分を破壊し、機械的に胞胚が圧出されるとする説である¹⁰⁾。

Hatching の開始は、今回の走査電顕観察より、透明帯の局所の融解によって開始されることが推測された。しかし、透過電顕観察においては、透明帯は hatching を通じて均一の物質よりなり、断端に融解を示唆する特

別の所見は得られず、また裂孔直下の trophoblast にも他部位との差違を認めず、hatching 開始部位が何によって決定するのか不明である。Inner cell mass の位置とは関係はないと思われる。Hatching が進行した走査電顕観察において、透明帯断端は丸みをおび、表面には泡沫状変化を認め、これは透過電顕観察 (図 4, 右下) における透明帯表面の変化と一致するようみえる

が、透明帯の変性もしくは退行変化のようであり、さらに検討を要すると思われる。

Plasminogen activator が trophoblast 内で作用し、蛋白分解酵素を産生し着床の際の内膜への trophoblast の侵入に働くという報告がある^{16,28)}。また初期胎胚より後期胎胚の方が、トリプシン様活性、キモトリプシン様活性が高くなるとする報告もあり³⁾、蛋白分解酵素の産生を示唆している。今回の透過電顕観察にて、ミトコンドリア、遊離リボゾーム、ゴルジ体が観察され、エネルギー代謝や蛋白合成能は有していると思われるが、hatching 部位に著明とは言えず、これらの関連についてはさらに研究が必要であろう。しかし hatching 後には、大小空胞や分泌顆粒様囊胞が著明に増加しており、hatching をはじめ、着床開始における trophoblast の attachment, adhesion, invasion 等に作用している可能性がある。同様の現象の報告が他にもみられ²⁴⁾、これらの変化は着床準備状態であろうと考察されている^{7,15)}。Trophoblast の形態が abembryonic pole と embryonic pole では差違を認め、これは細胞内の酵素活性(蛋白分解酵素か不明)の違いによるとする報告⁷⁾もあるが、今回の研究においては特に差違を認めなかつた。しかし、abembryonic pole の方が子宮内膜への侵入作用が強いといわれており⁷⁾、着床が近づくにつれて変化していく可能性はある。走査電顕においても trophoblast 表面の形態や細胞間に、両極において差違がでてくるという^{7,17,27)}。

水分の流入 (fluid accumulation) による胎胚の拡張 (expansion) については以前より形態学的に観察されてはいたが^{18,25)}、 Na^+ や Cl^- の流入についての検討は近年になってからであり^{4,6)}、その本態は依然として不明である。

Trophoblast の透明帯側表面には多数の微絨毛を認め、表面積は大となり、水分の流入等の吸収能力を高めるのには都合が良いと思われる。また、hatching 直前の trophoblast は単層扁平化し、胎胚腔内と外部との交通をたやすくしている感がある。すなわち浸透圧差による水分の流入は trophoblast を介していると推測される。

Trophoblast 細胞間は透明帯側より tight-junction, gap-junction, desmosome が存在し、強固な結合をしている²⁾。Tight-junction がより強固になることで胎胚腔内の水分流出を阻止し、胎胚腔内圧を保持することも考えられる²⁾。Hatching 前後の細胞間結合の変化について、さらに検討する必要がある。

近年において、hatching には prostaglandins (PGs) が関与していることがわかってきた^{1,10,12,19)}。PGs 合成阻害剤である indomethacin などは胎胚の拡張を抑制

し¹⁸⁾、ある種の PG は細胞膜において Ca^{2+} の拡散を調節し、間接的に Na^+ の透過性に作用するといわれ⁶⁾、この PG が hatching における fluid accumulation に作用している可能性がある²¹⁾。また、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ が hatching 促進作用をもっているといわれ^{1,12)}、シクロオキシゲナーゼ (PG 合成酵素) の存在するミクロゾーム、その中の RNA 蛋白やリボゾームと透明帯融解酵素 (hatching enzyme?) との関係等について、今後の研究が期待される。

文 献

- 1) 千田 智 : Indomethacin 及び Prostaglandin E_2 , Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ がマウス胎胚の Hatching に与える影響, 日産婦誌, 37 : 2067, 1985.
- 2) 上原茂樹, 及川直弘, 千田 智, 八日市谷隆, 対木 章, 星合 昊, 矢嶋 聰 : マウス胎胚の超微形態観察—とくに細胞間結合とランタンの細胞間侵入について, 日産婦誌, 38 : 2187, 1986.
- 3) Andary, T.J., Dabich, D. and VanWinkle, L.J. : Changes in proteinase activity in early vs. late mouse blastocysts. J. Cell Biol. 55 : 3a, 1972.
- 4) Barth, L.G. and Barth, L.J. : ²²Sodium and ⁴⁵Calcium uptake during embryonic induction in rana pipiens. Developmental Biology, 28 : 18, 1972.
- 5) Beier, H.M. and Maurer, R.R. : Uteroglobin and other proteins in rabbit blastocyst fluid after development in vitro and in vivo. Cell Tiss. Res., 159 : 1, 1975.
- 6) Benos, D.J. and Biggers, J.D. : Sodium and chloride co-transport by preimplantation rabbit blastocysts. J. Physiol., 342 : 23, 1983.
- 7) Bergström, S. and Nilsson, O. : Blastocyst attachment and early invasion during oestradiol-induced implantation in the mouse. Anat. Embryol., 149 : 149, 1976.
- 8) Bergström, S. : Shedding of the zona pellucida in normal pregnancy and in various hormonal states in the mouse—A scanning electron microscope study. Z. Anat. Entwickl. —Gesch., 136 : 143, 1972.
- 9) Biggers, J.D., Borland, R.M. and Powers, R.D. : Transport mechanisms in the preimplantation mammalian embryo. In : The freezing of mammalian embryos. Ciba foundation symposium, Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam, 129, 1977.
- 10) Biggers, J.D., Leonov, B.V., Basker, J.F. and Fried, J. : Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by prostaglandin antagonists. Biol. Reprod., 19 : 519, 1978.

- 11) Borland, R. M., Biggers, J.D. and Lechene, C.P. : Fluid transport by rabbit preimplantation blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 51 : 131, 1977.
- 12) Chida, S., Uehara, S., Hoshiai, H. and Yajima, A. : Effects of indomethacin, prostaglandin E₂ prostaglandin F_{2α} and 6-keto-prostaglandin F_{1α} on hatching of mouse blastocysts. *Prostaglandins*, 31 : 337, 1986.
- 13) Cole, R.J. : Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J. Embryol. exp. Morph.*, 17 : 481, 1967.
- 14) Dickman, Z. and Noyes, R.W. : The zona pellucida at the time of implantation. *Fertil., Steril.* 12 : 310, 1961.
- 15) Enders, A.C. and Schlafke, S. : Differentiation of the blastocyst of the rhesus monkey. *The American Journal of Anatomy*, 162 : 1, 1981.
- 16) Fazleabas, A.T., Geisert, R.D., Bazer, F.W. and Roberts, R.M. : Relationship between release of plasminogen activator and estrogen by blastocysts and secretion of plasmin inhibitor by uterine endometrium in the pregnant pig. *Biol. Reprod.*, 29 : 225, 1983.
- 17) Fléchon, J.E. and Renard, J.P. : A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 53 : 9, 1978.
- 18) Hoffman, L.H., Dipietro, D. L. and McKenna, T. J. : Effects of indomethacin on uterine capillary permeability and blastocyst development in rabbits. *Prostaglandins*, 15 : 823, 1978.
- 19) Holmes, P. V. and Gordashko, B. J. : Evidence of prostaglandin involvement in blastocyst implantation. *J. Embryol. exp. Morph.*, 55 : 109, 1980.
- 20) Inoue, M. : Nucleic acids and protein synthesis in the rat embryos and uterus in the preimplantation stages. *Acta Obst et Gynec Jap.*, 18 : 251, 1971.
- 21) Jones, M.A. and Harper, M. J. : Rabbit blastocysts accumulate [³H]-prostaglandins in vitro. *Endocrinology*, 115 : 817, 1984.
- 22) Kane, M.T. : Influence of the mucin coat on rabbit blastocysts in culture. *J. Physiol.*, 236 : 30, 1973.
- 23) Lewis, W.H. and Gregory, P.W. : Cinematographs of living developing rabbit eggs. *Science*, 69 : 226, 1929.
- 24) Matthew, A.G. and Yu-chih, H. : Correlative scanning electron, transmission electron, and light microscopic studies of the in vitro development of mouse embryos on a plastic substrate at the implantation stage. *J. Embryol. exp. Morph.* 56 : 23, 1980.
- 25) McLaren, A. : The fate of the zona pellucida in mice. *J. Embryol. exp. Morph.*, 23 : 1, 1970.
- 26) Pincus, G. and Werthessen, N. T. : The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J. Exp. Zool.*, 78 : 1, 1938.
- 27) Shalgi, R. and Sherman, M.I. : Scanning electron microscopy of the surface of normal and implantation-delayed mouse blastocysts during development in vitro. *J. Exp. Zool.*, 210 : 69, 1979.
- 28) Strickland, S., Reich, E. and Sherman, M.I. : Plasminogen activator in early embryogenesis : Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell*, 9 : 231, 1976.
- 29) Sugawara, S., Totsukawa, K. and Masaki, J. : Observation by scanning electron microscopy on the time sequence of sperm penetration into the vitellus of hamster eggs. *Tohoku J. Agricul. Res.*, 31 : 21, 1980.

Time sequential observation on hatching of mouse blastocysts by scanning and transmission electron microscopy

**Satoru Chida, Shigeki Uehara,
Hiroshi Hoshiai and Akira Yajima**

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

As the mechanism of hatching, an increase in internal pressure of the blastocoele due to inflow of water and production of the zona pellucidalytic enzyme by the trophoblast seem to be involved, but the details of the mechanism have not yet been known. Therefore, in the present study, as a means to elucidate the hatching mechanism, mouse blastocyst in the hatching stage were observed on the scanning and transmission electron microscopes.

(1) Scanning Electron Microscopic Findings

Before hatching, the zona pellucida consisted of a porous spongy fibrous structure. Hatching started with lysis of a part of the zona, the pit thus formed was extended, and then a structure was observed in which the trophoblast with numerous homogeneous microvilli on its surface was projecting from the inside of the zona.

(2) Transmission Electron Microscopic Findings

At the starting time of hatching, the monolay-

ered trophoblast was identified as a flat epithelium having the microvilli on the side of the zona. Hatching started from the embryonic or abembryonic pole of the blastocyst, and regarding the starting site, no special changes were seen in the zona pellucida or the trophoblast compared with the other sites. In the trophoblast, numerous free ribosomes and polysomes were observed in addition to mitochondria and Golgi body.

Especially after hatching, a striking increase was seen in the number of large and small vacuoles and secretory granules.

The observations suggested that hatching was confirmed to start with lysis of the zona and trophoblasts were actively performing energy metabolism and protein synthesis before implantation.

(受付: 昭和61年12月1日)

性成熟期婦人下垂体および種々の HMG 製剤に含有 される LH および FSH の質的・量的な比較検討

Qualitative and Quantitative Characterization of LH and FSH in the Pituitary Glands of Women of Fertile Age and Various HMG Preparations

愛媛大学医学部産科婦人科学教室

浜田 雄行 杉 並 洋

Katsuyuki HAMADA Hiroshi SUGINAMI

矢野 浩史 松浦 俊平

Koji YANO Shumpei MATSUURA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Ehime University, Ehime, Japan

性成熟期婦人下垂体および種々の HMG 製剤（パーゴナル，ヒュメゴン，HMG「日研」）に含有される LH および FSH の分子多様性を等電点電気泳動法（IEF）を用いて比較検討した。LH は IEF により 6 個の分画に分離された；A（pH 域=8.20～），B（7.70～8.19），C（7.20～7.69），D（6.70～7.19），E（5.70～6.69），F（～5.69）。各分画の割合（%）を比較すると下垂体での主要な分画は A，B，C であった。下垂体に比べ，HMG 製剤は A が少なく，F が多くなっていた。HMG「日研」のみ A が欠如しており，パーゴナル，ヒュメゴンに比べ，F が多くなっていた。同様に FSH は各々 7 個の分画に分離された；I（pH 域=6.00～），II（5.50～5.99），III（5.00～5.49），IV（4.50～4.99），V（4.00～4.49），VI（3.50～3.99），VII（～3.49）。各分画の割合（%）を比較すると，下垂体での主要な分画は V，VI であった。下垂体に比べ，HMG 製剤では V，VI が少なく，III，IV が多くなっていた。HMG「日研」のみ I が欠如していた。以上により性成熟期婦人下垂体と HMG 製剤は LH，FSH とも質的に異なっており，これはその原材料（下垂体，尿）および内分泌環境（性成熟期，更年期）の差によるものと思われる。また，HMG「日研」の LH，FSH は他製剤とは質的に異なっており，これはその製造方法の差によるものと思われる。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (2), 236-245, 1987)

緒 言

無排卵を原因とする不妊症に対し，HMG 製剤が最も強力な排卵誘発剤として日常臨床で頻繁に使用されている。しかしながら，その使用に当っては，ovarian hyperstimulation syndrome 多胎妊娠，Meigs syndrome 等の副作用が問題となり，細心の注意が必要とされる。最近，治療周期ごとに HMG 投与量を漸増する方法¹⁾，尿中エストロゲンや血中 estradiol のモニタリング²⁻⁴⁾，エコーによる卵胞径の測定⁵⁾等により，これらの副作用はかなり軽減され排卵誘発率も向上してきた

が，未だ幾つかの問題点が残されている。発育過程にある卵胞に対し，卵胞成熟の完成する以前に LH を投与すると卵胞を閉鎖に導くこと⁶⁾があるので，HMG 製剤に LH が多きく混在していると卵胞閉鎖に陥り排卵に至らない場合のあることが想定される。したがって，HMG 製剤の FSH/LH 比，つまり FSH 含量は一定とされているので LH 含量が問題となる可能性がある。一方，ヒト LH は生物物理化学的な分子多様性があり⁷⁻¹⁰⁾，更年期婦人尿から精製される HMG 製剤中の LH は性成熟期婦人卵胞期血中に分泌される LH と質的に異なることが示唆されている。また，ヒト FSH も生

物物理化学的な分子多様性があり^{17,18)}, LH と同様なことが示唆される. 現在, 種々の HMG 製剤が臨床使用されているが, これら HMG 製剤に含有される LH および FSH の質的また量的な検討は詳細には行われていない. 今回の点につき基礎的検討を行なったのでその成績を報告する.

対象および実験方法

現在日本で発売されている FSH 含量が75IU とされているパーゴナル注75 (帝国臓器, Lot No. T001), ヒュメゴン75 (三共, Lot No. 841108-012), HMG「日研」(日研化学, Lot No. 00327) の3種類を実験に用いた. また, 各 HMG 製剤と比較するため, 三個の性成熟期婦人下垂体 ホモジェネート上清を同様に実験に用いた. 使用した下垂体は, それぞれの年齢が35歳, 36歳, 44歳であり, いずれも抗癌剤, 放射線による治療の既往はない. 原疾患は, 前2者が急性クモ膜下出血, 後者が事故死であった. 血中性ステロイドを測定したところ, すべての症例で estradiol <60pg/ml, progesterone <1 ng/ml であり, 卵胞期初期の内分泌環境と類似していた. 下垂体は摘出後-70°C にて凍結した. HMG 製剤は各バイアル中の原末を蒸留水 1 ml に溶解し, 充分に攪拌した後, 実験に用いた. 下垂体は実験前に解氷し, 蒸留水にてホモジェナイズ (Type: 1020, Inter. Laborat. App. GmbH 7801 Dottingen) 後, 高速遠心機 (Model RS-18GII, Tomy Seiko Co., LTD) にて遠沈 (15,000rpm, 60分, 4°C) し, その上清を実験に用いた. 各製剤溶解液および下垂体ホモジェネートをカラム等電点電気泳動法 (IEF) により分画した.

IEF: カラムは LKB electrofocusing column # 8100-1 (110ml capacity, LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) を使用し, carrier ampholites は Ampholine pH 3.5~10 (LKB) を用いた. 下部電極液として陰極液である水酸化ナトリウム溶液 (NaOH 0.1g, H₂O 14ml, ショ糖11g) を充填後, dense solution (40% Ampholine 1.9ml, H₂O 49.5ml, ショ糖24g) および light solution (40% Ampholine 0.6ml, H₂O 49.5ml) を gradient mixer (LKB 8121), stirrer motor (LKB 8123) を用いて攪拌しながら Ampholine-ショ糖密度勾配を作成した. 充填速度は60ml/hr とした. カラム中央部に試料溶解液 2 ml と dense solution 2ml の混合液並びに marker protein としてウマ心臓ミオグロビン (Type III, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 10mg を重層後, 更に Ampholine-ショ糖密度勾配を作成した. 最後に上部電極液として陽極液であるリン酸溶解液 (H₃PO₄ 0.025 ml,

H₂O 5 ml) を重層した. その後, 4°C, 700V, 3W の条件下に48時間の通電 (LKB, D. C. Power supply 3371E使用) をおこなった. 通電終了後, 分取用フラクションコレクター (LKB 7000) を用い, 定量ポンプにて 60ml/hr の定速で, 各々 2 ml を分取した. 直ちに氷冷中で各分画の pH を測定した (Horiba F-800 pH analyzer 使用). pH 測定後, 4°C, 0.05Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) 灌流にて24時間の透析を行ない, Ampholine およびショ糖を除去した. 各分画は測定時まで-70°Cにて凍結保存した. なお, この IEF は再現性に優れ, marker protein として用いたミオグロビンの pI 値は 7.94±0.05 (Mean±S.D., n=12) であつた. IEF 後の HMG 製剤の回収率は, LH が 88.3±10.3% (Mean±S.D., n=9), FSH が 70.0±12.6% (n=9) であり, 製剤間に有意差は認められなかつた.

各分画の LH FSH の測定は RIA キット (CIS 社製, LH standard=MRC 68/40) FSH standard=MRC 78/549, を用いて行なつた. このキットの standard には血清が含まれているため, 測定に先立ち IEF の透析に用いた 0.05M PBS の RIA buffer としての信頼性を検定したところ, LH, FSH とも値が低くなる傾向が認められた. したがって, 標準曲線との平行性を検定するため, 高濃度 HMG 製剤 (パーゴナル注150 Lot. No. T005) を添付の溶解液で溶解した後, 3種類の dilution buffer (0% BSA-PBS, 1% BSA-PBS, 2% BSA-PBS) で希釈して平行性を比較検討した. なお, 統計処理には一元配置分散分析, 二元配置分散分析, student's t-test を用いた.

実験結果

LH, FSH ともに 1% BSA-PBS で最も良好な平行性がみられた. 0% BSA-PBS では LH, FSH ともに平行性はなく, 2% BSA-PBS では低濃度領域での平行性が認められなかつた (図1). 測定値の信頼性を検討するため, 高濃度 HMG 製剤 (パーゴナル注150 Lot. No. T005) を 1% BSA-PBS と添付の gonadotropin-free serum で希釈した際の測定値を比較した. 統計学的検討には multiple 3+3 parallel line assay design¹⁹⁾ を用いた. 両希釈液を用いた際の LH, FSH 測定値は良く近似していた. また, F(linearity), F(parallelism), λ それぞれ良好な成績が得られた (表1). 以上により, 1.0% BSA-PBS の希釈液を用いて各分画中 LH, FSH の測定を行なつた.

1) 下垂体および各 HMG 製剤における LH の等電点電気泳動

下垂体における IEF profile は図2(a)のごとく

パーゴナル注150 (Lot. No. T005)

パーゴナル注150 (Lot. No. T005)

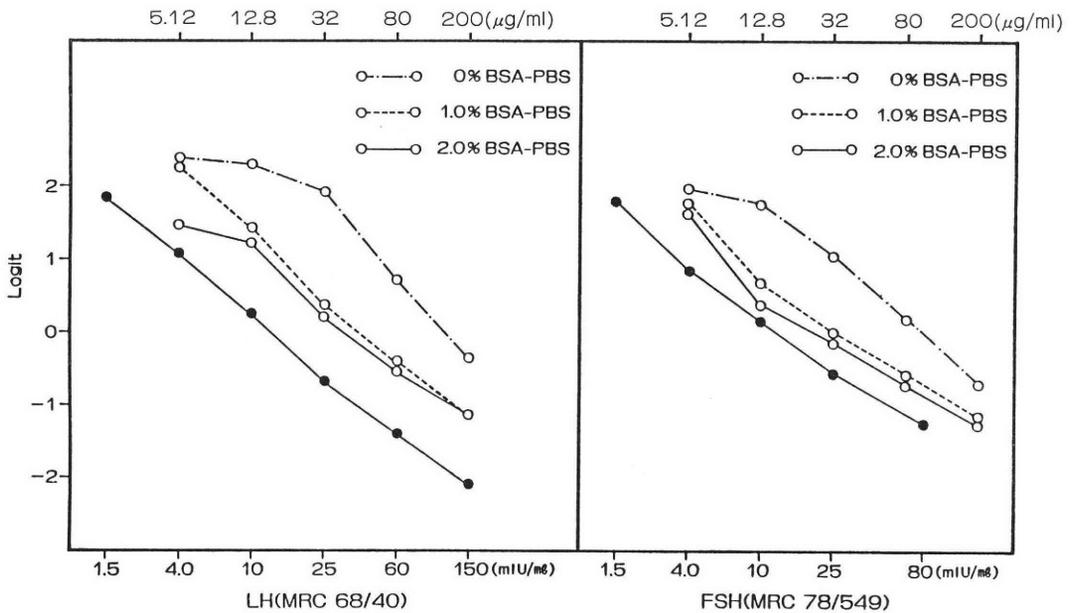


図1 種々の希釈液 (0%, 1.0%, 2.0% BSA-PBS) による HMG 製剤 (パーゴナル注 150, Lot. No. T005) 中 LH, FSH 希釈曲線および標準曲線

表1 2種類の希釈液 (LH, FSH free serum, 1% BSA-PBS) における HMG 製剤 (パーゴナル注 150, Lot. No. T005) 中 LH・FSH の測定値の比較

Dilution Buffer	LH	FSH
LH, FSH-free serum	25.6 (18.4-35.5)	46.5 (25.8-83.5)
1% BSA-PBS	26.2 (21.0-32.5)	42.4 (26.1-68.8)
F (linearity)	1.41	0.64
F (parallelism)	0.38	0.34
λ	0.039	0.069

分子種A~Fが存在し、Aよりさらにアルカリ側にA', A'', またFよりさらに酸性側にF'の分子種を認めた。最も大きなピークは分子種BおよびCであり、殆どの LH が pH 6.5~8.5の間にあつた。パーゴナルでは図2 (b) に示すように最も大きなピークは分子種BおよびCであるが、下垂体とは異なり、分子種A, A', A''が欠如しておりまた分子種Fが大きなピークを形成していた。ヒュメゴンは図2 (c) に示す様にパーゴナルの IEF profile と非常に良く類似しており、最も大きなピークは分子種BおよびCで分子種A, A', A''が存在せず、ヒト下垂体に比べ分子種Fが多くなつていた。HMG「日研」でも

図2 (d) に示すごとく、同様に分子種Fが多くなつていゝるが、他の HMG 製剤とは異なり、分子種Bが欠如しており最も大きなピークは分子種Cであつた。

下垂体および各 HMG 製剤の分子種の等電点 (pI) をそれぞれ表2 (a) に示した。各 pH の S.D. は0.01から0.10の間にあり、試料間でpI値の差はみられなかつた。各分子種のpI値は、A' 9.08±0.10 (n=3), A' 8.76±0.04 (n=3), A 8.34±0.07 (n=3), B 7.98±0.08 (n=9), C 7.40±0.06 (n=12), D 6.91±0.05 (n=12), E 6.23±0.07 (n=12), F 5.25±0.05 (n=12), F' 3.59±0.04 (n=12) であつた。

各 IEF profile の統計学的検討を可能ならしめるため、pH 域 A : 8.20以上, B : 7.70~8.19, C : 7.20~7.69, D : 6.70~7.19, E : 5.70~6.69, F : 5.69以下の6個の分画に分けて、各分画の割合 (%) を比較検討した (図3)。下垂体ではアルカリ性~中性の分画A, B, Cが主要な分画であるのに対し (p<0.001), パーゴナル, ヒュメゴンでは相互に差異はみられず、それぞれ分画Fが最も多く (p<0.05), 分画Aが最も少なかつた (p<0.02)。HMG「日研」でも同様に分画Fが最も多く (p<0.001) なつていたが、分画Cさらに分画Bの順に少なくなつており (p<0.05, p<0.001), 分画Aは欠如していた。次に各分画毎にそれぞれ比較検討した。強アルカリ性 LH である分画Aと弱アルカリ性 LH である

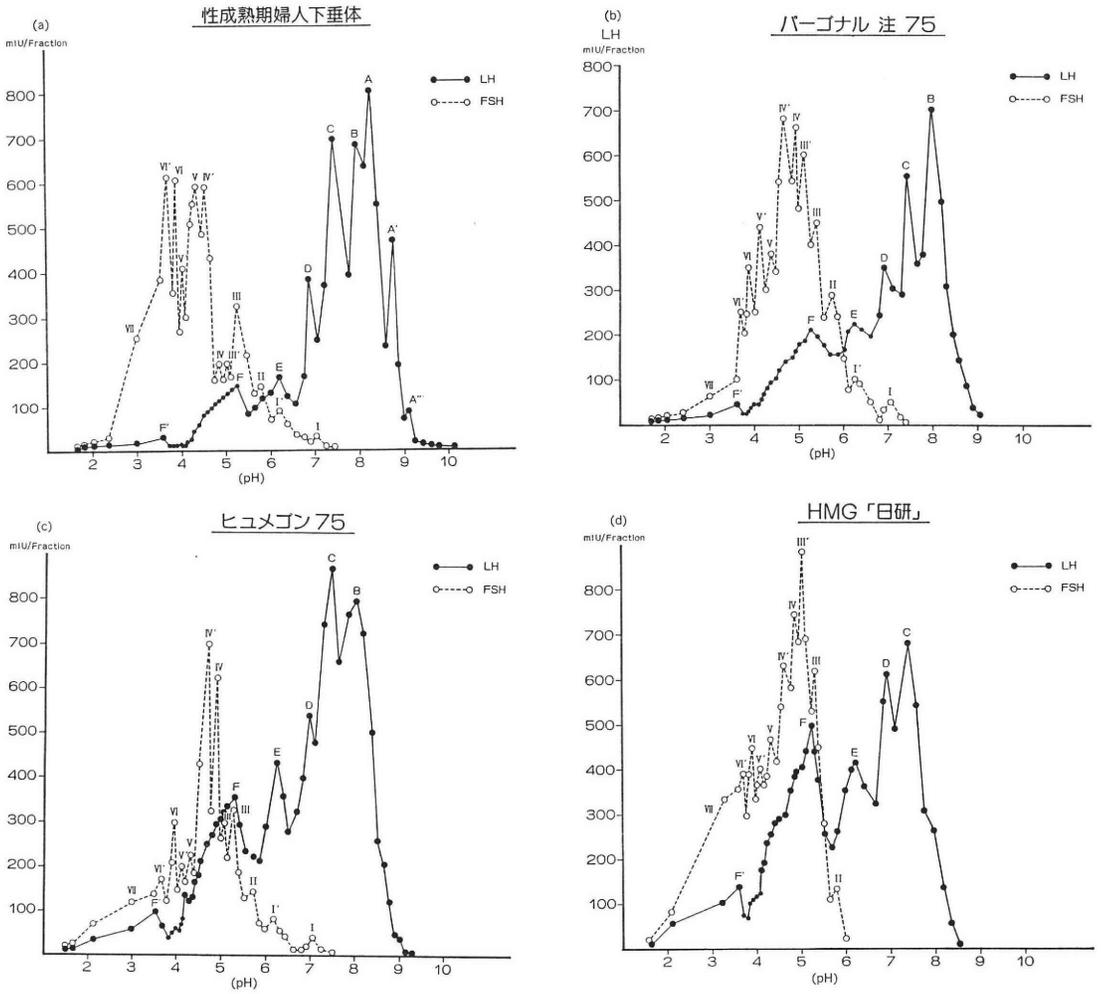


図 2 性成熟期婦人下垂体, パーゴナル注75, ヒュメゴン75, HMG「日研」における LH および FSH の IEF profile

分画Bは、下垂体に多く存在し ($p < 0.02$, $p < 0.05$), HMG「日研」では分画Aが欠如していた. HMG「日研」は分画Cに少なく ($p < 0.05$), 中～酸性 LH である分画DおよびEで多くなっていた ($p < 0.02$). 強酸性 LH である分画Fでは下垂体が最も少なく ($p < 0.005$), HMG「日研」が最も多くなっていた ($p < 0.02$).

2) 下垂体および各 HMG 製剤における FSH の等電点電気泳動

下垂体における IEF profile は図2(a)のごとく I ~ VI' の計11個の分子種が存在し、分子種VI'よりさらに強酸性域にも免疫学的活性が認められた(分子種VII). 主要な分子種は pH 3.5~5.0の間にあつた. パーゴナルでも同様に図2(b)に示すように分子種I ~ VI' の計11個の分子種および強酸性分子種VIIが認められ、主要な分子

種は pH4.0~5.5の間にあつた. ヒュメゴンでは図2(c)に示すごとく、パーゴナルの FSH IEF profile と非常に良く類似しており、同様に分子種I ~ VI' の11個の分子種と強酸性分子種VIIが認められ、主要な分子種は pH 4.0~5.5の間にあつた. HMG「日研」の IEF profile は図2(d)のごとく、分子種IおよびI'を欠いていたが、そのパターンはパーゴナルおよびヒュメゴンと良く類似しており、主要なピークは pI 4.0~5.5の間にあつた.

下垂体および各 HMG 製剤の分子種の等電点 (pI) をそれぞれ表2(b)に示した. 分子種VI'のpI値は、使用した Ampholine の分離下限 pI 3.5近くの強酸性域にあたるため、SD が 0.06~0.13とやや大きくなっているが、他の分子種のpI値は0.00~0.09の間にあり、試料間に差は認められなかつた. すなわち、各 FSH 分子種の pI 値は、I 7.00 ± 0.05 ($n=9$), I' 6.23 ± 0.03 ($n=9$),

表 2(a) ヒト下垂体および各 HMG 製剤における LH 分子種の等電点 (pI)

試料	分子種	F'	F	E	D	C	B	A	A'	A''
ヒト下垂体		3.60 ±0.06	5.22 ±0.03	6.24 ±0.03	6.93 ±0.06	7.45 ±0.04	7.93 ±0.08	8.34 ±0.07	8.76 ±0.04	9.08 ±0.10
パーゴナル 注 75		3.57 ±0.05	5.26 ±0.08	6.27 ±0.10	6.91 ±0.09	7.38 ±0.04	8.00 ±0.09			
ヒュメゴン 75		3.59 ±0.05	5.25 ±0.03	6.20 ±0.07	6.90 ±0.04	7.42 ±0.03	8.02 ±0.10			
HMG 「日研」		3.59 ±0.04	5.30 ±0.03	6.22 ±0.10	6.92 ±0.05	7.37 ±0.09				
Mean ± SD		3.59 ±0.04	5.25 ±0.05	6.23 ±0.07	6.91 ±0.05	7.40 ±0.06	7.98 ±0.08	8.34 ±0.07	8.76 ±0.04	9.08 ±0.10

表 2(b) ヒト下垂体および各 HMG 製剤における各 FSH 分子種の等電点 (pI)

試料	分子種	VI'	VI	V'	V	IV'	IV	III'	III	II	I'	I
ヒト下垂体		3.73 ±0.06	3.96 ±0.02	4.11 ±0.08	4.31 ±0.03	4.59 ±0.06	4.86 ±0.04	5.03 ±0.01	5.30 ±0.06	5.76 ±0.03	6.24 ±0.03	6.96 ±0.06
パーゴナル 注 75		3.72 ±0.06	3.91 ±0.01	4.15 ±0.02	4.38 ±0.05	4.66 ±0.06	4.92 ±0.06	5.05 ±0.00	5.34 ±0.02	5.74 ±0.02	6.25 ±0.04	7.03 ±0.01
ヒュメゴン		3.65 ±0.13	3.88 ±0.08	4.10 ±0.06	4.34 ±0.06	4.62 ±0.02	4.91 ±0.02	5.03 ±0.05	5.31 ±0.09	5.73 ±0.05	6.22 ±0.02	7.00 ±0.07
HMG 「日研」		3.70 ±0.13	3.90 ±0.03	4.11 ±0.08	4.39 ±0.07	4.71 ±0.07	4.87 ±0.06	5.01 ±0.08	5.35 ±0.07	5.74 ±0.04		
Mean ± S.D.		3.70 ±0.09	3.91 ±0.05	4.12 ±0.05	4.35 ±0.05	4.64 ±0.06	4.89 ±0.05	5.03 ±0.04	5.32 ±0.06	5.74 ±0.03	6.23 ±0.03	7.00 ±0.05

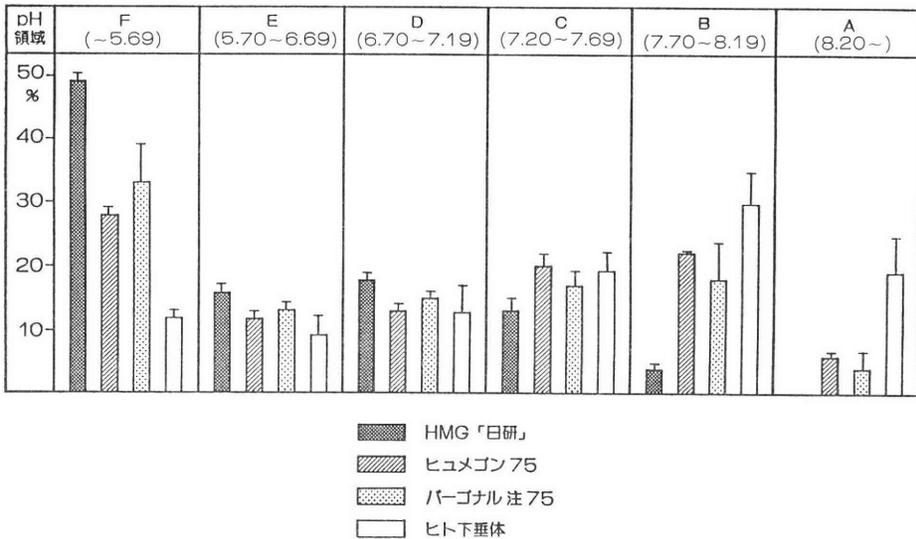


図 3 性成熟期婦人下垂体, パーゴナル注75, ヒュメゴン75, HMG 「日研」における各 LH 分子種を pH 領域 A : 8.20以上, B : 7.70~8.19, C : 7.20~7.69, D : 6.70~7.19, E : 5.70~6.69, F : 5.69以下の 6 つの分画に分けた際の各分画の割合 (%)

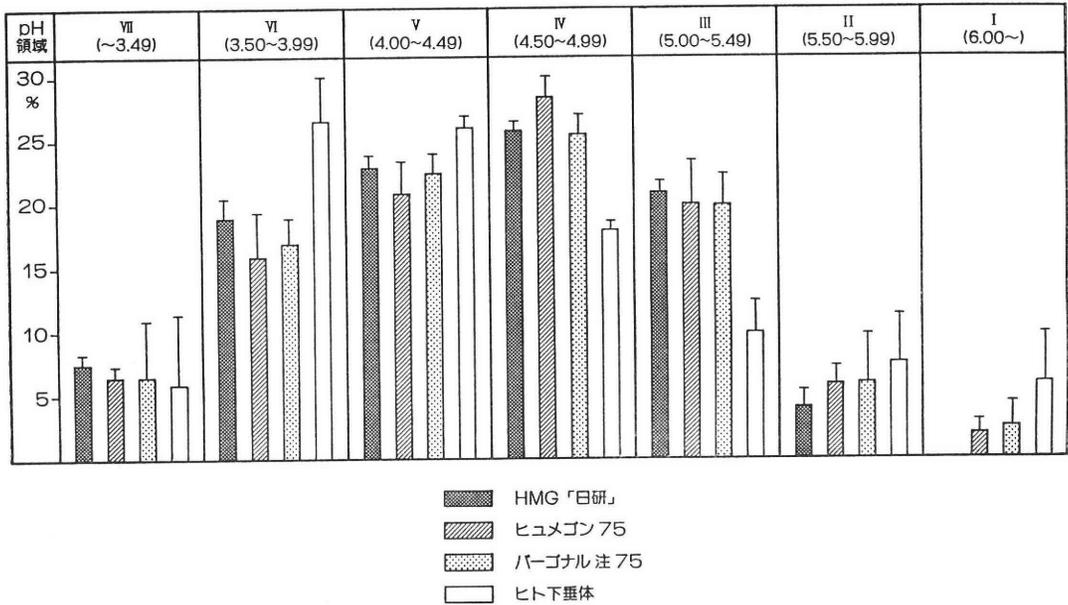


図 4 性成熟期婦人下垂体, パーゴナル注75, ヒュメゴン75, HMG「日研」における各 FSH 分子種を pH 領域 I : 6.00以上, II : 5.50~5.99, III : 5.00~5.49, IV : 4.50~4.99, V : 4.00~4.49, VI : 3.50~3.99, VII : 3.49以下の7つの分画に分けた際の各分画の割合 (%)

II 5.74±0.03 (n=12), III 5.32±0.06 (n=12), III' 5.03±0.04 (n=12), IV 4.89±0.05 (n=12), IV' 4.64±0.06 (n=12), V 4.35±0.05 (n=12), V' 4.12±0.05 (n=12), VI 3.91±0.05 (n=12), VI' 3.70±0.09 (n=12) であった。

各 IEF profile の統計学的検討を可能ならしめるため, pH 域 I : 6.00以上, II : 5.50~5.99, III : 5.00~5.49, IV : 4.50~4.99, V : 4.00~4.49, VI : 3.50~3.99, VII : 3.49以下の7つの分画に分けて, 各分画の割合 (%) を比較検討した(図4). 下垂体では分画V, VIが主要な部分を占めているのに対し, HMG 製剤では3製剤とも分画IVが最も多くなっており (p<0.0001), 製剤間には差は認められなかった. 各分画毎に下垂体と各 HMG 製剤を比べると, 分画I では HMG「日研」が欠如しており, 分画II, VIIでは有意差は認められなかった. 分画III, IVでは HMG 製剤が多くなっており (p<0.02, p<0.005), 分画V, VIでは下垂体が多くなっていった (p<0.05, p<0.05).

考 察

ヒト LH が等電点の異なつた複数の分子種により構成されているということは, 下垂体^{7,12)}, 血漿^{11,13,14)}, 閉経期婦人尿¹⁵⁾, HMG 製剤 (パーゴナル)¹⁶⁾等の種々の sample について多く報告されている. 今回の我々の成績では, A'' 9.08, A' 8.76, A 8.34, B 7.98, C 7.40,

D 6.91, E 6.23, F 5.25, F' 3.59の9個の LH 分子種が認められ, 各 pI 値は試料間差異を示さなかつた. しかし, 今回得られた pI 値はこれらの報告との間に, またこれら報告の間においてもその pI 値に多少の差が認められる. これは, 各 IEF の設定条件 (電圧, 電流, 電力, 通電時間, Ampholine の pH range) の違いによるものと思われるが, Ampholine の分離能力の限界から, 各 LH 分子種が単一のものではなく, 複数の分子種から構成されていることも否定できない. これはラット下垂体の Ampholine を用いた IEF カラムによる分離^{20,21)}に比べ, polybuffer exchange resin カラムによる分離の方が同じ pH 領域において LH 分子種が多くみられること²²⁾, また IEF により分離されたヒト下垂体の各 LH 分子種を HPLC によるゲル濾過を行うと, 分子種によつては複数個の LH に分離されること²³⁾などから類推されるものである. 強アルカリ域にある A'', A', A は下垂体のみ存在し, HMG 製剤には分子種として認められなかったが, これはヒト下垂体と HMG 製剤 (パーゴナル) を等電点分離した Robertson らの報告¹⁶⁾と一致している. 卵胞期後期のヒト血漿中では A'' よりさらに強アルカリ域にある pH=9.30~9.55 の LH 分子種が存在し^{11,13,14)}, 一方, サル LH の IEF profile はヒト LH の IEF profile と良く類似しているが²⁴⁾, 卵胞期後期のサル下垂体中にはこれよりさらにアルカリ域にある pI=10.2 の LH 分子種が大量に存在

することが証明されている²⁵⁾。

各分画毎に検討すると、HMG 製剤中の LH は性成熟期婦人下垂体中の LH に比べ、強アルカリ域の分画 A ($pI > 8.20$) が少なく、強酸性域の分画 F ($pI < 5.69$) が多くなっていた。Zaidi²⁶⁾ らは性成熟期婦人下垂体に比べ更年期婦人下垂体には酸性 LH が多いこと、Van Damme¹⁵⁾ らは更年期婦人尿中ではさらに多くなり、II nd IRP HMG にもつとも多いことを報告している。したがって、両者の質的な差異は内分泌環境の違いのみならず、原材料およびその精製方法にも起因するものと考えられる。また、性成熟期婦人下垂体は卵胞期初期の内分泌学的背景と一致していたが、その IEF profile はヒト血中卵胞期初期の IEF profile¹⁴⁾ とよく類似している。さらに、卵胞期後期になると強アルカリ域にある分画 A がさらに増加することが明らかにされている¹⁴⁾。したがって、HMG 製剤に含まれる LH は卵胞期にある性成熟期婦人血中に分泌される LH と質的に異なることが示唆された。また、HMG「日研」はパーゴナル、ヒュメゴンに比べ、アルカリ域の分画 A, B, C で少なく (A は欠如)、中～酸性域の分画 D, E, F で多くなっていた。HMG 製剤の精製は基本的にはゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーにより行われており、この様な製剤間の違いは主にイオン交換クロマトグラフィーに用いられる溶出液のイオン強度と pH の差によるものと思われる。

最近、LH の等電点における多様性は糖鎖構造および含量の差によるのではないかと言われている^{26,27)}。Hattori ら²⁷⁾は Neuraminidase によりシアル酸を除去すると、IEF により分離される 7 個のラット LH 分子種は最も強アルカリ域 ($pI=10.0$) にある 1 個の LH 分子種になるとしている。しかしながら、ヒト LH の糖鎖には amid sugar である N-acetyl-D-glucosamine と N-acetyl-D-galactosmine も含有されており、これら amid sugar の関与も否定できない。シアル酸の果たす役割については、HCG のシアル酸を除去すると、生体内での半減期は急激に短くなり²⁸⁾、*in vivo* での生物活性が失われる²⁹⁻³²⁾ことから、*in vivo* での作用発現に関与していると考えられる。また、シアル酸を除去した LH はレセプター結合能もステロイド産生能も亢進することから²⁷⁾、これらに対してシアル酸は本質的な役割をなしておらず、むしろ阻害作用を持つていると考えられる。Manjunathら³³⁾によるとフッ化水素によりヒツジ LH の糖部分を除去すると、レセプター結合能は維持されるが、*in vitro* での生物活性は全く失われる。このことからレセプター結合能にはアミノ酸構造が、*in vitro* での生物活性にはシアル酸以外の糖鎖構造が本質的な役

割をなしていると思われる。以上のことから強酸性 LH (分画 F) は強アルカリ性 LH (分画 A) に比べ、シアル酸含量が多く、このため血中消失速度が遅く *in vitro* での生物活性がより小さいのではないかと推察される。したがって、性成熟期婦人下垂体と IEF profile の異なる HMG 製剤は卵胞期中に血中に分泌される LH とは異なった生物学的作用を示すことが示唆される。

ヒト FSH がヒト LH と同様に等電点の異なる複数の分子種から構成されることは、FSH 国際標準品、ヒト下垂体について Zaidi ら^{17,18)}が報告している。今回の成績で FSH は pH 2.5~7.0 の範囲にあり、特に主な分子種は pH 3.0~6.5 の間にあつた。この成績は、biologically active FSH が 3.0~6.5 の範囲に存在するという Zaidi ら¹⁸⁾の報告と一致している。各 FSH 分子種の pI 値は、I 7.00, I' 6.23, II 5.74, III 5.32, III' 5.03, IV 4.89, IV' 4.64, V 4.35, V' 4.12, VI 3.91, VI' 3.70 であり、試料間で有意差は認められなかつた。これらの pI 値は pI 7.00 の分子種の記載がないこと以外、Zaidi ら¹⁸⁾の報告とよく類似している。下垂体について Zaidi ら¹⁷⁾は pI 4.00 以下の分子種は認められないとしているが、これは試料として用いた下垂体の内分泌学的背景の差異によるものと考えられる。HMG 製剤中 FSH の回収率は 70% であり、製剤間に有意差を認めなかつた。Zaidi ら¹⁸⁾によると、IEF 後の回収率は *in vitro* 生物学的活性値より免疫学的活性値が有意に低下すること、また FSH の α -subunit および β -subunit の活性値は IEF 後に 85% 以上消失することから、FSH の IEF 後の免疫学的活性値の低下は主に free subunit によるものとしている。もしこれが事実とするならば、この成績は HMG 製剤中の free subunit 含量が製剤間で差のないことを示唆するものである。

各分画毎に検討すると、HMG 製剤中の FSH は性成熟期婦人下垂体中の FSH に比べ、強酸性域の分画 V, VI ($pH=3.50\sim 4.49$) が少なく、弱酸性域の分画 III, IV ($pH=4.50\sim 5.49$) が多くなっていた。Zaidi ら^{17,18)}は 10 種類の FSH 国際標準品の IEF profile を検討し、それぞれ原材料および精製方法により異なったパターンを示すことを報告している。したがって、この IEF profile の差異は LH と同様、原材料、内分泌環境の違い、そして HMG 製剤の精製方法によるものと推察される。また、HMG「日研」ではパーゴナル、ヒュメゴンとは異なり、最も高い pH 領域にある中性域の分画 I ($pH=6.00\sim$) が欠如していたが、これは LH と同様その精製方法の違いによるものと思われる。

LH と同様に FSH の等電点における分子多様性はシアル酸を含めた糖鎖構造が関与している可能性が強

い。これは、FSH は LH に比べ、酸性域に pI 値を有するが、これはシアル酸含量が FSH では 5% である⁸⁴⁻⁸⁸⁾のに対し、LH では 1.5% であること⁸⁸⁾、さらにラット FSH を Neuraminidase 処理すると、LH と同様に FSH の各分子種は 7.78~9.54 のアルカリ域の pH 領域に移動すること⁸⁹⁾ などから示唆されるものである。さらに、LH と同様に糖鎖構造が生物活性に重要な役割を持つていることが推察され、IEF profile の異なる HMG 製剤中の FSH と性成熟期婦人下垂体中の FSH はその生物学的作用も質的に差がでてくるものと思われる。

文 献

- 1) Tsapoulis, A.D., Zourlas, P.A. and Cominos, A. C. : Observations on 320 infertile patients treated with human gonadotropins (human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin). *Fertil. Steril.*, 29 : 492, 1978.
- 2) Raj, S.G., Thompson, I.E., Berger, M.J. and Taymor, M.L. : Clinical aspects of the polycystic ovary syndrome. *Obstet. Gynecol.*, 49 : 552, 1977.
- 3) Gemzell, C.A. : Induction of ovulation with human gonadotropins. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 21 : 179, 1965.
- 4) Wang, C.F. and Gemzell, C. : The use of human gonadotropins for the induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. *Fertil. Steril.*, 33 : 479, 1980.
- 5) 杉並 洋, 伊藤孝徳, 浜田雄行, 矢野浩史, 松浦俊平 : 多嚢胞卵胞 (Polycystic ovarian disease ; PCOD) 例における hMG-hCG 排卵誘発と超音波断層検査による卵胞成熟モニタリング. *日不妊会誌*, 31 : 244, 1986.
- 6) Bernardus, R.E., Jones, G.S., Acosta, A.A., Garcia, J.E., Liu, H.C., Jones, D.L. and Rosenwaks, Z. : The significance of the ratio in follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in induction of multiple follicular growth. *Fertil. Steril.*, 43 : 373, 1985.
- 7) Rathnam, P. and Saxena, B.B. : Isolation and physicochemical characterization of luteinizing hormone from human pituitary glands. *J. Biol. Chem.*, 246 : 7087, 1971.
- 8) Graesslin, D., Spies, A., Weise, H.C. and Bettendorf, G. : Properties of human pituitary and urinary LH. *Acta Endocr. (Kbh.)*, Suppl. 173 : 56, 1973.
- 9) Reichert, L.E. : Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing. *Endocrinology*, 88 : 1029, 1971.
- 10) Loeber, J.G. : Human luteinizing hormone. *Acta endocr. (Kbh.)*, Suppl. 210 : 1, 1977.
- 11) Robertson, D.M., Van Damme, M.P. and Diczfalusy, E. : Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone : I. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 9 : 45, 1977.
- 12) Robertson, D.M. and Diczfalusy, E. : Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone : II. A comparison to the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 9 : 57, 1977.
- 13) Strollo, F., Harlin, J., Hernandez-Montes, H., Robertson, D. M., Zaidi, A.A. and Diczfalusy, E. : Qualitative and quantitative differences in the isoelectrofocusing profile of biologically active lutropin in the blood of normally menstruating and post-menopausal women. *Acta endocr.*, 97 : 166, 1981.
- 14) Suginami, H., Yano, M., Hamada, K., Ito, T., Yano, K. and Matsuura, S. : Qualitative and quantitative differences in hLH species in the first and the second LH release induced by continuous stimulation with synthetic LHRH in normal menstrual cycle as assessed by isoelectrofocusing. *Endocrinol. Japon*, 32 : 583, 1985.
- 15) Van Damme, M. P., Robertson, D.M. and Diczfalusy, E. : Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone : III. Biological and immunological profiles of urine preparations after electrofocusing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 9 : 69, 1977.
- 16) Robertson, D.M., Suginami, H., Hernandez Montes, H., Puri, C.P., Choi, S.K. and Diczfalusy, E. : Studies on a human chorionic gonadotropin-like material present in non-pregnant subjects. *Acta Endocr.*, 89 : 492, 1978.
- 17) Zaidi, A.A., Robertson, D.M. and Diczfalusy, E. : Studies on the biological and immunological properties of human follitropin : profiles of two international reference preparations and of an aqueous extract of pituitary glands after electrofocusing. *Acta Endocr.*, 97 : 157, 1981.
- 18) Zaidi, A.A., Fröysa, B. and Diczfalusy, E. : Biological and immunological properties of different molecular species of human follicle-stimulating hormone : electrofocusing profiles of eight highly purified preparations. *J. Endocr.*, 92 : 195, 1982.

- 19) Finney, D.J. : Statistical method in biological assay (3rd edition), Charles Griffin Co., London, England, 1978.
- 20) Wakabayashi, K. : Multiplicity of luteinizing hormone and its comparative aspects. Hormones, Adaptation and Evolution (ed. S. Ishii), 271, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- 21) Uchida, H. and Suginami, H. : Subpopulations of luteinizing hormone (LH) possessing various ratios of bioactivity to immunoreactivity in the female rat pituitary glands and their changes during the estrous cycle. Endocrinol. Japon., 31 : 605, 1984.
- 22) Keel, B.A. and Grotjan, H.E.JR. : Characterization of rat pituitary luteinizing hormone charge microheterogeneity in male and female rats using chromatofocusing : effects of castration. Endocrinology, 117 : 354, 1985.
- 23) 浜田雄行, 矢野まり子, 内田博久, 伊藤孝徳, 杉並 洋 : ヒト下垂体における LH 分子種の特性, 第57回日本内分泌学会総会抄録集, 1984.
- 24) Hamada, K. and Suginami, H. : Qualitative and quantitative changes in plasma luteinizing hormone (LH) under stimulation by intravenous infusion of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) as assessed by electrofocusing. Endocrinol. Japon, 30 : 101, 1983.
- 25) 浜田雄行, 杉並 洋, 星野達二, 矢野まり子, 内田博久, 中嶋 晃 : Steroid back ground の変動に伴ったニホンザル下垂体 LH の量的質的変動, 第56回日本内分泌学会総会抄録集, 1983.
- 26) Zaidi, A.A., Qazi, M.H. and Diczfalusy, E. : Molecular composition of human luteinizing hormone : biological and immunological profiles of highly purified preparations after electrofocusing. J. Endocr., 94 : 29, 1982.
- 27) Hattori, M., Ozawa, K. and Wakabayashi, K. : Sialic acid moiety is responsible for the charge heterogeneity and the biological potency of rat lutropin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 127 : 501, 1985.
- 28) Ashwell, G. and Morell, A.G. : Advances in Enzymology, Vol. 41, pp. 99, Interscience Publication, 1974.
- 29) Govered, B.C., Veenkamp, G. J. and Homan, J. D. H. : Studies on human chorionic gonadotrophin. Acta Endocr., 59 : 105, 1968.
- 30) Ryle, M. : Gonadotropins and ovarian development, p. 98, Livingstone, 1970.
- 31) Dufau, M.L., Catt, K.J. and Tsuruhara, T. : Retention of in vitro biological activities by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 44 : 1022, 1971.
- 32) Sairam, M.R. and Papkoff, H. : Handbook of Physiology, pp. 111. American physiological Society, 1974.
- 33) Manjunath, P., Sairam, M.R. and Schiller, P.W. : Chemical deglycosylation of ovine pituitary lutropin. Biochem. J., 207 : 11, 1982.
- 34) Reichert, L.E., Kathan, R.H. and Ryan, R.J. : Studies on the composition and properties of immunochemical grade human follicle stimulating hormone (FSH) : comparison with luteinizing hormone (LH). Endocrinology, 88 : 109, 1968.
- 35) Roos, P. : Human follicle stimulating hormone : Its isolation from the pituitary gland and from postmenopausal urine and a study of some chemical, physical, immunological and biological properties of the hormone from the two sources. Acta Endocr. Suppl., 131 : 1, 1968.
- 36) Barker, S.A., Gray, C.J., Kennedy, J.F. and Butt, W.R. : Evaluation of human follicle-stimulating hormone preparations. J. Endocr., 45 : 275, 1969.
- 37) Saxena, B.B. and Rathnam, P. : Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. J. Biol. Chem., 246 : 3549, 1971.
- 38) Hara, K., Rathnam, P. and Saxena, B.B. : Structure of the carbohydrate moieties of α -subunits of human follitropin, lutropin, and thyrotropin. J. Biol. Chem., 253 : 1582, 1978.
- 39) Blum, W.F.P., Riegelbauer, G. and Gupta, D. : Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing : studies on in-vitro bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. J. Endocr., 105 : 17, 1985.

Qualitative and quantitative characteri-
zation of LH and FSH in the pituitary
glands of women of fertile age and
various HMG preparations

**Katsuyuki Hamada, Hiroshi Suginami,
Koji Yano and Shumpei Matsuura**

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Ehime
University, Ehime
(Director: Prof. Shumpei Matsuura)

The pituitary glands of women of fertile age and various HMG preparations (Pergonaru, Hyumegon, HMG NIKKEN) were subjected to isoelectrofocusing (IEF) fractionation. IEF fractionation separated LH into 6 distinct species i.e, Fraction A (pH range=8.20~), B (7.70~8.19), C (7.20~7.69), D (6.70~7.19), E (5.70~6.69), F (~5.69). When percentage of each fraction in the pituitary LH was compared, main Fraction was A, B and C. Pergonaru and Hyumegon LH decreased in Fraction A

but increased in Fraction F in comparison to pituitary LH. Same differences were further exaggerated in HMG NIKKEN LH in comparison to pituitary LH. Likewise, IEF fractionation separated FSH into 7 distinct species; i.e, Fraction I (pH range = 6.00~), II (5.50~5.99), III (5.00~5.49), IV (4.50~4.99), V (4.00~4.49), VI (3.50~3.99), VII (~3.49). When percentage of each fraction in pituitary FSH was compared, main Fraction was V and VI. Pergonaru, Hyumegon and HMG NIKKEN FSH decreased in Fraction V and VI but increased in Fraction III and IV in comparison to pituitary FSH. Fraction I was absent in HMG NIKKEN FSH.

Qualitative differences of LH and FSH were present between the pituitary glands and HMG preparations, which might result from the difference of source (pituitary gland vs. urine) or endocrine environment (fertile age vs. postmenopause). Furthermore, it also indicated qualitative differences of LH and FSH between HMG preparations. This might be due to the difference of purification process.

(受付: 昭和61年6月23日)

下垂体過形成を伴った hypergonadotropic normogonadism の1例

A Case of Hypergonadotropic Normogonadism with
Pituitary Hyperplasia

大阪医科大学産科婦人科学教室

好川元庸 奥田喜代司 宮崎和典
Motonobu YOSHIKAWA Kiyoji OKUDA Kazunori MIYAZAKI
辻吉範 佐伯理男 杉本修
Yoshinori TSUJI Michio SAEKI Osamu SUGIMOTO
Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Medical College,
Osaka, Japan

高ゴナドトロピン (Gn) 血症を伴う排卵障害例の多くは卵巣性無月経であり、エストロゲン (E) の分泌はほとんどみられない。今回、著明な高 Gn 血症状態にもかかわらず、E分泌がみられた25歳の排卵障害例において、種々の検索を行ったので報告する。本例は12歳に初経がみられ、15歳頃より月経不順となり、BBT上では無排卵周期症であった。初診時、血中 LH および FSH 値はともに110mIU/ml 以上であったが、血中 estradiol 値は65pg/ml で、頸管粘液の分泌もみられた。各種副腎機能検査は正常で、甲状腺機能も正常であった。頭部の enhance CT 像でトルコ鞍部に直径約9 mm の high density area を認めたため、Hardy 手術を施行した。摘出組織は腺腫も否定できない過形成を示した。術後血中 Gn 値は30mIU/ml 以下に低下し排卵した。以上本例は下垂体過形成によるゴナドトロピン分泌亢進症と考えられ、高 Gn 血症例において、卵巣性 Gn 分泌亢進症との鑑別が必要であると思われる。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(2), 246-251, 1987)

緒言

排卵障害婦人において、血中 LH および FSH が高値を示す高ゴナドトロピン血症の大部分の例ではエストロゲン値が著しく低く、卵巣自体に障害のあるものが多いとされている。しかし、中にはゴナドトロピン (Gn) 産生分泌亢進が下垂体腺腫に依る例があることが報告されている¹⁻⁵⁾。その頻度は低く、成熟婦人においてはほとんどみられないといわれるが、反対にこのような下垂体腺腫はまれではなく、下垂体腺腫の細胞培養で96例中6例 (6.3%) に証明できたという報告もある¹⁰⁾。

今回、25歳の排卵障害婦人で、著明な高 Gn 血症を呈するにもかかわらず、エストロゲン分泌がみられ、種々の検索で Gn 産生下垂体病変があることが強く疑われた症例を経験したので報告する。

症例

患者：■■■■ 25歳、主婦
主訴：月経不順、挙児希望
家族歴、既往歴：特記事項なし
初経：12歳
妊娠歴：0回経妊、0回経産
現病歴：初経後、月経は順調であったが、15歳頃から不順になる。23歳で結婚、25歳のとき挙児希望および月経不順を主訴として某医受診。Clomid 50mg×5日間投与による排卵誘発を4クール受けたが排卵しなかった。昭和60年1月当科初診。

初診時所見：身長158 cm、体重52 kg、血圧123/71 mmHg、脈拍数84/min、眼球突出、眼瞼下垂、甲状腺腫を認めず、乳房および陰毛などの二次性徴の発現状態は

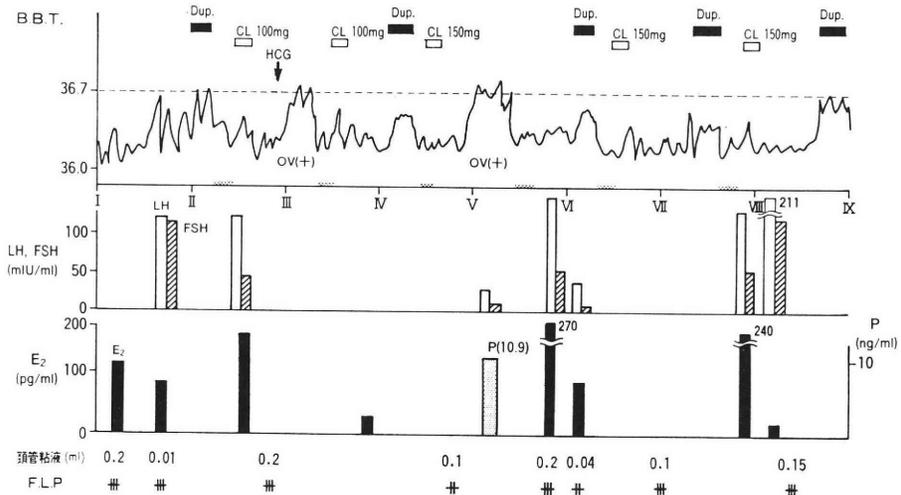


図 1 本症例の臨床経過 (昭和60年1~9月)

正常. なお指圧で少量の透明な乳汁漏出を認めた. 外性器は正常で, 内診で正常大の子宮が触知され, 付属器も異常所見はなかった.

経過

昭和60年1月から同年9月までの臨床経過を示した(図1).

初診時, 透明な頸管粘液が0.2ml 採取され, 結晶形成は(卅)であった. 薬剤投与前の血中 estradiol (E₂) 値は65~120pg/ml であつたが, 血中 LH および FSH はそれぞれ117mIU/ml, 113mIU/ml の著明な高値を示した. duphaston 投与による消退性出血開始5日目より clomid 100mg/day の5日間投与と HCG 10,000単位 の筋注で BBT は上昇し, 月経を認めた. 次周期に clomid 100mg/dayを5日間投与したが, 排卵を見なかつた. clomid 150mg/day に増量すると, 周期14日より BBT は上昇し, 高温相が10日間持続した. また, 高温相6日目の血中 progesterone (P) 値は10.9ng/ml の高値を示し, 排卵したものと考えられた. その時の, 血中 LH および FSH はそれぞれ23.5mIU/ml, 9.6 mIU/ml で一時低下した. 今度は clomid 150mgの5日間投与でも排卵は誘発されず, 血中 LH および FSH 値は10~200mIU/ml, 血中 E₂ 値は25~270pg/ml といずれも大きく変動した. また, HMG (pargonal 150IU/day×10日間) や LHRH の皮下投与 (20~40μg/90min×14日) によつても, 卵胞成熟はみられず, 排卵は誘発されなかつた. 昭和61年1月には血中 LH, FSH 値はともに上昇し, 同年3月初め頃には200mIU/ml 前後になり, 第2度無月経となった.

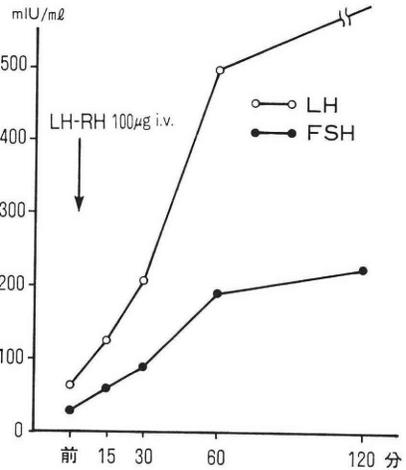


図 2 LHRH テスト

LHRH 100 μg 静注後血中 LH および FSH は過剰反応を示した

内分泌学的検索

1. LHRH テスト (図2)

LHRH 100μg 静注前の LH 値は60mIU/ml, FSH 値は26mIU/ml であつたが, 静注後60~120分で LH 値が500mIU/ml 以上, FSH 値は180mIU/ml に上昇し, それぞれ過剰反応を示した.

2. TRH テスト時の prolactin (PRL) の反応性(図3)

TRH 500μg 静注前の血中 PRL 値は13ng/ml と正常範囲で, 静注後15分には27ng/ml となり, 正常反応と判定した.

3. エストロゲン負荷前後における血中 LHRH, LH および FSH の律動性分泌(図4)

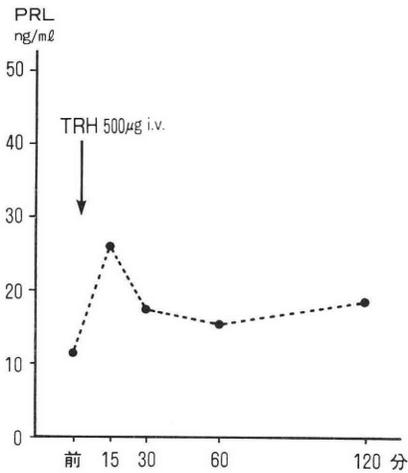


図3 TRH テスト時の PRL の反応性
TRH 500µg 静注15分後の血中 PRL 値は前値の2倍以上を示した

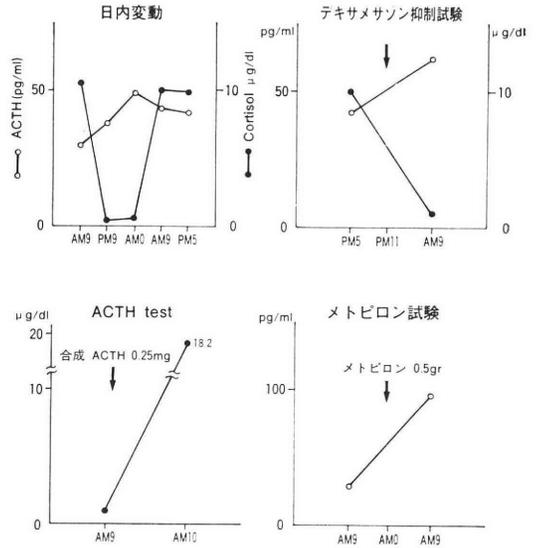


図5 下垂体-副腎系機能検査

デキサメサゾン抑制試験における ACTH の反応性
以外はすべて正常反応を示した

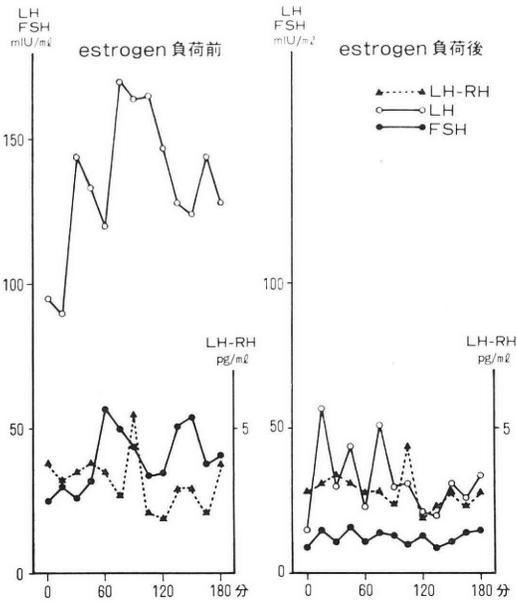


図4 エストロゲン負荷前後における血中 LH-RH, LH および FSH の律動性分泌

エストロゲン投与による negative feedback をみるために、消退性出血開始10日目とエストロゲン投与後に末消血中 LHRH, LH および FSH の律動性分泌を15分毎、3時間にわたり検討した。エストロゲン製剤として mestrano 0.08mg/day を14日間経口投与した。血中 LHRH Takahashi らの方法を用いて、LH, FSH は第1ラジオアイソトープ社製キットで RIA で測定した。エストロゲン投与前の血中 LHRH の基礎値は、わ

れわれが以前報告した正常排卵例の卵胞期初期におけるそれら⁷⁾とほとんど差がなく、LHRH パルスは1回とらえられ、LHRH 分泌には異常がないと思われた。血中 LH の基礎値は約130mIU/ml と高値ながらも、振幅 20~50mIU/ml のパルス (平均値×2×測定間誤差) が3回認められた。血中 FSH の基礎値は35mIU/ml 前後でやや高く、FSH パルスは2回認められ、その振幅は20~30mIU/ml であった。

エストロゲン投与後の、血中 LH および FSH の基礎値はそれぞれ29mIU/ml, 12mIU/ml で、投与前に比べて著しく低下した。また、LH パルスと FSH パルスの振幅も小さくなった。一方、血中 LHRH の基礎値は変化せず、LHRH パルスも1回認められた。すなわち、本例ではエストロゲン投与により negative feedback が働き、血中 LH, FSH の基礎値とパルスの振幅が低下したもので、視床下部よりの LHRH 分泌には異常がないと考えられた。

4. 下垂体-副腎系機能検査 (図5)

血中 ACTH, cortisol の日内変動、デキサメサゾン抑制試験、ACTH テスト、メトピロン試験などの各種下垂体-副腎系機能検査を行った。ACTH は夜間高値、cortisol は夜間低値とそれぞれ正常の日内変動を示した。デキサメサゾン抑制試験では、ACTH の低下がみられなかったが、cortisol は低下した。合成 ACTH0.25 mg 負荷による cortisol の上昇と、メトピロン0.5g を負荷による ACTH の上昇はそれぞれ正常反応を示した。

項目	測定値	正常範囲	単位
LH	117	5~25	mIU/ml
FSH	113	5~25	mIU/ml
Prolactin	12~18	<30	ng/ml
ACTH	30~49	<100	pg/ml
TSH	3.6	<10	μU/ml
GH	3.0	<5	ng/ml
estradiol	65	>45	pg/ml
testosterone	0.4	0.25 ~0.75	ng/ml
androstenedione	0.423	0.155~2.06	ng/ml
T ₃	125	90~190	ng/ml
T ₄	9.9	5.0~13.5	μg/dl
TBG	25.4	12~30	μg/ml
FT ₄	1.49	0.78~2.11	ng/dl
Cortisol	3.5~10.6	4.9~14.7	μg/dl
尿中17-OHCS	5.4	3.5~6.0	mg/day
尿中17-KS	7.58	3.91~14.05	mg/day

図 6 血中・尿中各種ホルモン測定値
血中 LH および FSH が高値にもかかわらず est-
radiol は正常範囲内であった

デキサメサゾン抑制試験における血中 ACTH の反応以外は正常反応を示しており、下垂体-副腎系機能は一応正常と判定した。

5. 血中・尿中各種ホルモン値 (図 6)

各種ホルモン値をまとめてみると、LH および FSH 値はともに著しく高かったが、PRL, ACTH, TSH および GH の下垂体性ホルモンはすべて正常範囲であった。血中 estradiol, testosterone, androstenedione 値, T₃, T₄, TBG, FT₄ 値, 血中cortisol, 尿中 17-OHCS, 尿中17-KS 値もすべて正常範囲内にあつた。

以上の内分泌学的検索から、われわれは下垂体における LH, FSH 産生腫瘍の存在を疑い、トルコ鞍のエックス線単純撮影と CT-scan を施行した。図 7 は enhance した CT 像で、トルコ鞍中央部分に直径 9mm の high density な mass の存在を認めた。そこで昭和61年3月11日、当院脳神経外科において、Hardy 手術⁸⁾を施行した。手術時、下垂体前葉は赤味を帯びた黄色調で比較的硬く、一部赤色の部分を認めたが、腺腫様の柔らかい部分はなかった。Aspiration と腫瘍摂子で、CT-scan 上 mass と思われた部分を摘出した。

図 8 は、摘出組織の HE 染色の光顕像である。写真左は被膜に囲まれたほぼ正常と思われる下垂体前葉の組織で、明らかな腺腫性病変を認めない。写真右は、その強拡大像で、好酸性、好塩基性、嫌色素性の下垂体細胞の軽度増殖がみられ、腺腫も否定しえないが hyperplasia と診断した。手術後28日目における血中 LH 値

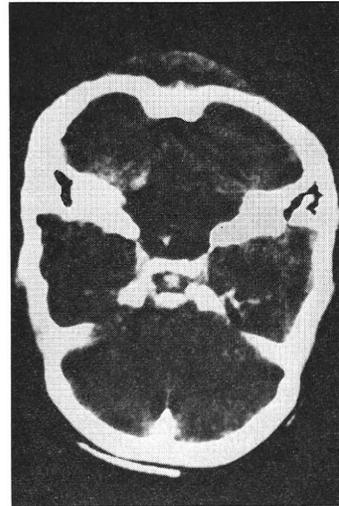


図 7 頭部 CT 横断像

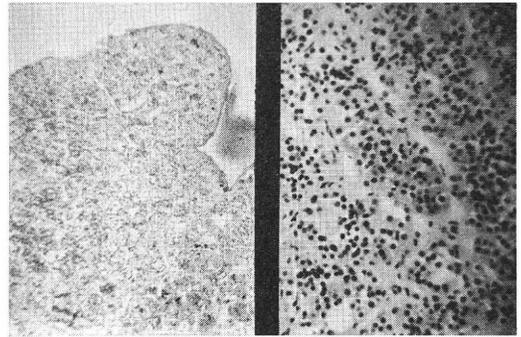


図 8 摘出組織の光顕像
(HE 染色, 左×100, 右×200)

は 30mIU/ml, FSH 値は 20mIU/ml とそれぞれ手術直前の1/5~1/6に低下し、血中 E₂ は 230pg/ml になり、HCG 10,000単位筋注で BBT は上昇し、排卵が起こったと考えられた。

考 察

下垂体腺腫のなかで Gn を産生するものは稀と考えられていたが、ホルモンの微量測定法, 組織培養法, 免疫組織学的検討などにより、下垂体腺腫の1~16%を占め、比較的多いとする報告がみられるようになった⁹⁻¹²⁾。しかし、その多くは男性例で、土田らは、女性腺腫51例中1例(2%), 男性腺腫24例中4例(16%)と報告している。また、女性例でもほとんどが高齢者で、性成熟婦人における報告はほとんどない。

本症例は LH および FSH だけが高値でありながら、エストロゲン分泌がみられ、排卵も誘発された。また、CT 像で下垂体腫瘍が疑われ、組織学的にも下垂体腺腫

を否定できない hyperplasia を示し、手術により血中 LH および FSH 値が低下した。すなわち、この高 Gn 血症は下垂体病変によるものであると考えられた。Gn 産生下垂体過形成の報告はないので本例を Gn 産生下垂体腺腫の範疇に入れると、年齢も25歳で若く、内分泌学的にも hypergonadotropic normogonadism であり、非常に稀な1例といえる。本例における内分泌学的特徴として次のような点があげられる。①多くの卵巣障害例と異なり、常に LH 値のほうが FSH 値より高値、すなわち FSH/LH 比は1以下であった。②E₂ 値およびP 値の変動により LH および FSH 値は大きく変動し、エストロゲン投与による negative feedback がみられた。③ LHRH テストで LH および FSH は過剰反応を示した。

以上のような本例における内分泌学的特徴は、従来のゴナドトロピン産生下垂体腺腫とは相違点が多く、むしろ組織学的に示されたようにゴナドトロピン産生下垂体過形成とするほうが理にかなっているように思われた。

本例は hypergonadotropic でありながら、エストロゲン分泌がみられ、排卵に対する LH および FSH の役割も興味深い。すなわち、血中 E₂ が正常値を示すことや、Clomid で排卵が誘発されたことより卵巣の機能障害はないと考えたいが、なぜ血中 LH および FSH が高値であるのに排卵が障害されたのかの疑問がこのころ、まず、RIA では LH および FSH 値は高かったが、はたしてこれらは生物学的活性を忠実に表わしているのかどうかという疑問である。しかし、本例に外因性の HMG (pergonal) 150IU を10日間投与しても超音波断層法で卵胞成熟を確認できず、血中エストロゲンの増加もみられなかつた。高橋¹⁷⁾は、3例のゴナドトロピン産生下垂体腺腫患者の血中 LH を RIA と bioassay (BA) で測定し、その値はそれぞれ正常卵胞期後期の4倍もあつたが、その比は 1.24 ± 0.10 で正常例と有意差がなく、エストロゲンは正常範囲内にあり、これら症例の血中 LH には生物学的活性があると判断した。本例でも immunoreactive LH および FSH も生物学的活性をもっていたと考えたい。また、LH-RH agonist である busserelin (ヘキスト) は作用時間が長く、反復投与すると血中 LH および FSH が長時間上昇し、排卵を抑制するが、その機序は、卵巣に down regulation が働くためであると説明されている¹⁸⁾。このような機序が本例においても native に働き、無排卵周期症からついに無月経になったのであろうか。正常排卵例にみられる LH の律動性分泌はヒトの排卵現象に重要な役割を担っている¹⁹⁾が、排卵が障害されると、その律動性分泌に異常を示すことがある^{7,14-16)}。本例では血中 LH および

FSH の律動性分泌が存在し、パルスの振幅も正常排卵例に比べて大きかった。本例では Clomid により2回の排卵を認めたが、その機序として、Clomid が LH パルスの頻度と振幅をさらに増加させたためと考えられる。また手術後は、血中 LH および FSH はともに著明に低下し、生理的なパルスが回復したため排卵にいたつたと思う。高 Gn 血症に伴う排卵障害例の多くは、いわゆる卵巣性無月経であり、排卵誘発は困難を極めてきた。しかし中には、本例のように下垂体の増殖性病変が高 Gn 血症をもたらす、卵巣機能がある程度保持されているにもかかわらず、無月経になる例があることを認識しておかねばならない。このような排卵障害例に対しては、詳細なホルモン測定に加えてトルコ鞍の検査もかならず行う必要があると思う。

文 献

- 1) Miura, M., Matukado, Y., Kodama, T. and Mihara, Y.: Clinical and histopathological characteristics of gonadotropin-producing pituitary adenomas. *J. Neurosurg.*, 62: 376, 1985.
- 2) Whitaker, M.D., Prior, J.C., Scheithauer, B., Dolman, L., Durity, F. and M.R. Pudek: Gonadotropin-Secreting Pituitary Tumor: Report and Review. *Clinical Endocrinology*, 22: 43, 1985.
- 3) Demura, R., Kubo, O., Demura, H. and Shizume, K.: FSH and LH Secreting Pituitary Adenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 653, 1977.
- 4) Friend, J.N., Jugde, D.M., Sherman, B.M. and Santen, R.J.: FSH Secreting Pituitary Adenoma: Stimulation and Suppression Studies in Two Patient. *J. Clinol. Endocrinol. Metab.*, 43: 650, 1976.
- 5) Synder, P.J. Sterling, F.H.: Hypersecretion of LH and FSH by a Pituitary Adenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42: 544, 1976
- 6) Takahashi, M., Hashimura, E., Skin, S., Imagawa, K. and Suzuki, Y.: Preovulatory change in luteinizing hormone releasing hormone concentrations in peripheral plasma in constant estrous rat at induced ovulation. *Endocrinol. Japan*, 29: 113, 1982.
- 7) 奥田喜代司, 矢田守男, 好川元庸, 石田雅俊, 宮崎和典, 杉本 修: 正常排卵例と排卵障害例における LHRH および LH の律動性分泌の検討, *日産婦誌*, 37: 2799, 1985.
- 8) Hardy, J.: Transsphenoidal surge of hypersecretory pituitary tumors, in Kohler, P.O., Ross GT (eds): *Diagnosis and Treatment of Pituitary Tumors. International Congress Series, No. 303, New York, Elsevier, 179,*

- 1973.
- 9) Kovacs, K., Horvath, E., Von Loon, G. R., Rewcastle, N.B., Ezrin, C. and Rosenbloom, A.A. : Pituitary Adenomas associated with elevated blood follicle-stimulating hormone levels : A histologic immunocytologic and electron microscopic study of two cases. *Fertil. Steril.*, 29 : 622, 1978.
 - 10) Takeuchi, J., Handa, H., Suda, K. and Aso, T. : *In vitro* secretion of follicle stimulating hormone by pituitary chromophobe adenoma. *Surg. Neural.*, 14 : 303, 1980.
 - 11) Snyder, P.J., Bashey, H.M., Kim, S.U. and Chappel, S.C. : Secretion of Uncombined Subunits of Luteinizing Hormone by Gonadotroph Cell Adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 59 : 1169, 1984.
 - 12) Yamagami, T. : Immunohistochemical and Endocrinological Study of Pituitary Adenomas. *Arch. Jpn. Chir.*, 53 : 756, 1984.
 - 13) 土田博美, 佐藤 修, 伝法公磨, 室谷光三 : Gonadotropin 産生腺腫の 5 例—免疫組織学的・電顕的検査—, 第 3 回下垂体腫瘍 Workshop 講演集, 83, 1982.
 - 14) Yen, S.S.C., Tsai, C.C., Naftolin, F., Vandenberg, G. and Ajabor, L. : Pulsatile patterns of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34 : 671, 1972.
 - 15) Bohnet, H. G., Dahlen, H.G., Wuttke, W. and Schneider, H. P. G. : Hyperprolactinemic anovulatory syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42 : 132, 1975.
 - 16) Buckman, M. T., Peake, G. T. and Srivastava, L. : Patterns of spontaneous LH release in normo and hyperprolactinemic women. *Acta Endocrinol.*, 97 : 305, 1981
 - 17) 高橋 晃 : Luteinizing hormone の生物活性と免疫活性の解離に關与する性ステロイドの意義, 日内分泌誌, 61 : 605, 1985.
 - 18) 矢田守男, 奥田喜代司, 好川元庸, 宮崎和典, 植木 実, 杉本 修 : Buserelin 投与の血中ホルモン動態, エンドメトリオージス研究会会誌, 7 : 192, 1986.

A case of hypergonadotropic
normogonadism with pituitary
hyperplasia

**Motonobu Yoshikawa, Kiyoji Okuda,
Kazunori Miyazaki, Yoshinori Tsuji,
Michio Saeki and Osamu Sugimoto**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka Medical College, Osaka

This is a case report of a 25-yr-old woman who showed a pituitary hyperplasia with hypersecreting LH and FSH. Her menstrual cycle has been irregular since 15 years of age, 3 years after menarche, and her BBT revealed low monophasic pattern. Though plasma E_2 levels, 61 pg/ml, and secreting of cervical mucus were within normal range, the levels of LH and FSH were markedly elevated (>110 mIU/ml). She had no other detectable endocrine abnormalities. Administration of GnRH elicited brisk LH and FSH responses.

A cranial computed tomographic scan revealed a contrast-enhancing area about 9 mm in diameter in the sella turcica. A transsphenoidal partial resection was performed on March 11, 1986. Excised specimen of the tumors histologically showed hyperplasia.

The LH and FSH concentrations decreased below 30 mIU/ml after the operation. Three months later, spontaneous ovulation was noticed.

(受付: 昭和61年8月23日)

NALOXONE SUPPRESSES SERUM PROLACTIN LEVELS IN HYPERPROLACTINEMIC WOMEN WITH PITUITARY MACROADENOMA

Katsuyoshi SEKI and Koichi KATO

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

Abstract: Administration of opiate peptides stimulates the release of prolactin (PRL) in animals and humans. An opiate antagonist, naloxone, has been reported to decrease basal PRL levels in rodents and nonhuman primates. Experimental data indicate that opioidergic control of PRL secretion is mediated through its inhibition of endogenous dopamine turnover and release. However, it was reported that naloxone failed to decrease basal PRL levels in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma in whom endogenous opioid activity was considered to be increased. In the present study, naloxone administration significantly decreased serum PRL levels in hyperprolactinemic women with pituitary macroadenoma, but not in those with pituitary microadenoma. It significantly increased serum LH levels in hyperprolactinemic women with microadenoma, but not in those with macroadenoma. Recently, naloxone was reported to induce PRL release in normal women during the late follicular and luteal phases. Naloxone-induced gonadotropin-releasing hormone (GnRH) was postulated as the mechanism by which naloxone stimulates PRL secretion in such women. Therefore, it cannot be ruled out that naloxone may exert both inhibitory and stimulatory effects on PRL secretion in humans. Administration of naloxone may not release sufficient GnRH to stimulate PRL secretion in hyperprolactinemic women with pituitary macroadenoma. Consequently, only inhibitory effect of naloxone on PRL secretion may ultimately manifest in these women.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(2), 252-255, 1987)

Introduction

Administration of opiate peptides stimulates the release of prolactin (PRL) in animals and humans¹⁻³. An opiate antagonist, naloxone, has been reported to decrease basal serum PRL in rodents and nonhuman primates⁴⁻⁶. Therefore, endorphins appear to be involved in the stimulation of PRL secretion. With the exception of one study in which naloxone significantly decreased basal plasma PRL levels in normal young men⁷, administration of naloxone did not alter basal PRL levels in normal men and women, however⁸⁻¹¹. Furthermore, it failed to decrease basal PRL levels in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma in whom

endogenous opioid activity was considered to be increased¹². This failure of naloxone to influence PRL release does not appear to lend support to the contention that the action of endogenous opioids is involved in the regulation of PRL secretion in humans. The effect of naloxone on PRL secretion has not heretofore been evaluated in hyperprolactinemic women with pituitary macroadenoma. In the present study, responses of PRL and luteinizing hormone (LH) to naloxone were examined in normal women and hyperprolactinemic women with pituitary micro- and macroadenomas.

Materials and Methods

The subjects of this study were 5 normal

Table 1 Basal hormone data (mean \pm SE) in normal women during the early follicular phase and hyperprolactinemic women with pituitary micro- and macroadenomas. Serum LH concentration was expressed in terms of ng LER 907/ml.

Subjects (N)	Normal Women (N=5)	Microadenoma (N=8)	Macroadenoma (N=6)
PRL (ng/ml)	9.8 \pm 1.2	97.8 \pm 12.4 ²	513 \pm 129 ^{2,3}
LH (ng/ml)	82.3 \pm 5.0	76.5 \pm 9.8	45.7 \pm 10.0 ¹

¹ P<0.05 vs normal women.

² P<0.01 vs normal women.

³ P<0.01 vs hyperprolactinemic women with microadenoma.

women during the early follicular phase and 14 hyperprolactinemic-amenorrhic women with pituitary micro-(n=8) and macroadenomas (n=6). The diagnosis of pituitary tumor was made by computed axial tomographic scan. It was confirmed subsequently at surgery in 3 of 8 patients with microadenoma and in all patients with macroadenoma. All patients were free from any medication for at least 6 weeks prior to examination. Starting at 0900 to 1000 h, each subject received 0.4 mg of naloxone or normal saline (1 ml) as an iv bolus dose after two baseline samples had been obtained (-15 and 0 min); additional blood samples were obtained at 15, 30, 45, 60 and 90 min after administration of test substance. Serum PRL and LH concentrations were measured by radioimmunoassay as previously described¹³⁾. Mean basal concentrations were obtained by averaging the two baseline samples collected before naloxone or normal saline administration. Statistical analyses were performed using Student's t test.

Results

The mean basal PRL concentration was significantly higher in patients with macroadenoma than in patients with microadenoma (Table 1). Serum PRL concentrations were significantly lower 30, 45, 60 and 90 min after naloxone administration in patients with macroadenoma compared to the basal values, but were not decreased at any time in patients with microadenoma and normal women (Fig. 1). The mean basal LH concentration was significantly lower in patients with macroadenoma, but not in patients with microadenoma compared to that in normal women (Table 1). Serum LH concentrations were

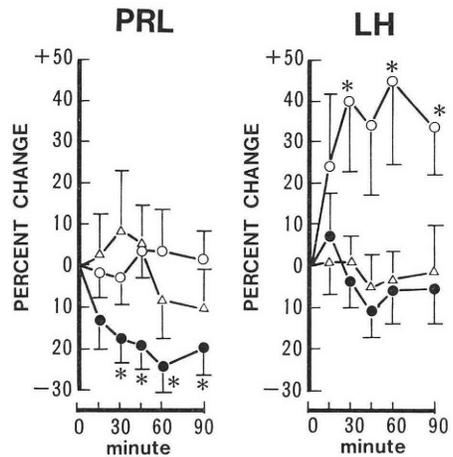


Fig. 1 The mean (\pm SE) percent changes in serum PRL and LH levels in response to the administration of naloxone in normal women during the early follicular phase (Δ) and hyperprolactinemic women with pituitary micro- (\circ) and macroadenomas (\bullet).

* P<0.05 vs basal hormone concentrations.

significantly higher 30, 60 and 90 min after naloxone administration in patients microadenoma compared to the basal values, but were not increased at any time in patients with macroadenoma and normal women (Fig. 1). The administration of normal saline induced no significant changes in serum PRL and LH levels in normal women and hyperprolactinemic women (date were not shown).

Discussion

Naloxone had no significant effects on serum PRL in normal women during the early follicular phase and hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma. This is in agreement with the results of other repor-

ted studies. However, naloxone administration suppressed PRL secretion in hyperprolactinemic women with pituitary macroadenoma. This inhibitory effect of naloxone on PRL secretion is not in agreement with the results of most previous studies⁸⁻¹¹. Furthermore, Cetel et al.¹⁴ found that naloxone infusion induced PRL release in normal women during the late follicular and luteal phases. They postulated naloxone-induced gonadotropin-releasing hormone (GnRH) as the mechanism by which naloxone stimulates PRL secretion. Experimental data in animals indicate that opioidergic control of PRL secretion is mediated through its inhibition of dopamine turnover and release by the tuberoinfundibular neurons¹⁵⁻¹⁸. If one may assume that opioidergic control of PRL secretion via dopaminergic mechanism demonstrated in non-human primates is also operative in humans, naloxone may exert both inhibitory and stimulatory effects on PRL secretion in humans. The failure to detect any change in PRL levels following naloxone administration may be explained by a balance between inhibitory and stimulatory effects of naloxone. In the present study, naloxone increased serum LH levels in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma. Naloxone infusion was reported to induce a pulsatile release of LH in some hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma, suggesting increased GnRH secretion¹². Consequently, inhibitory effect of naloxone via dopaminergic mechanism may have been negated by its stimulatory effect via GnRH in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma. However, naloxone induced no significant change in serum LH levels in hyperprolactinemic women with macroadenoma. Endogenous GnRH activity may be more compromised in these women compared to patients with microadenoma. Therefore, administration of naloxone may not release sufficient GnRH to stimulate PRL secretion. Consequently, only inhibitory effect of naloxone on PRL secretion may ultimately manifest in hyperprolactinemic women with pituitary macroadenoma.

References

1) Von Graffenried, B., Del Pozo, E., Roubicek, J., Krebs, E., Poldinger, W., Bumeister,

P. and Kerp, L.: Effects of the synthetic enkephalin analogue FK 33-824 in man. *Nature*, 272 : 729, 1983.

- 2) Stubbs, W. A., Jones, A., Edwards, C. R. W., Delitala, G., Jeffcoate, W. J., Rutter, S. W., Besser, G. M., Bloom, S. R. and Alberti, K. G. M.: Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man. *Lancet*, 2 : 1225, 1980.
- 3) Reid, R. L., Hoff, J. D., Yen, S. S. C. and Li, C. H.: Effects of exogenous β -endorphin on pituitary hormone secretion and its disappearance rate in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52 : 1179, 1981.
- 4) Gold, M. S., Redmond, D. E. and Donabedian, R. K.: Prolactin secretion, a measurable central effect of opiate-receptor antagonists. *Lancet*, 1 : 323, 1978.
- 5) Gold, M. S., Redmond, D. E. and Donabedian, R. K.: The effects of opiate agonist and antagonist on serum prolactin in primates: possible role for endorphins in prolactin regulation. *Endocrinology*, 105 : 284, 1979.
- 6) Ragavan, V. V. and Frantz, A. G.: Opioid regulation of prolactin secretion: evidence for a specific role of β -endorphin. *Endocrinology*, 109 : 1769, 1981.
- 7) Rubin, P., Swezey, S. and Blanshke, T.: Naloxone lowers plasma prolactin in man. *Lancet*, 1 : 1923, 1979.
- 8) Janowsky, D., Judd, L., Huey, L., Roitman, N., Parker, D. and Segal, D.: Negative naloxone effects on serum prolactin. *Lancet*, 2 : 637, 1978.
- 9) Morley, J. E., Baranetsky, N. G., Wingert, T. D., Carlson, H. E., Hershman, J. M., Melmed, S., Levin, S. R., Jamison, K. R., Weitzman, R., Chang, R. J. and Varner, A. A.: Endocrine effects of naloxone-induced opiate receptor blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 : 251, 1980.
- 10) Delitala, G., Devilla, L. and Arata, L.: Opiate receptors and anterior pituitary hormone secretion in man. Effect of naloxone infusion. *Acta Endocrinol.*, 97 : 150, 1981.
- 11) Delitala, G., Guisti, M., Montano, V., Rosadini, G. T. and Giordano, G.: Growth hormone, prolactin and cortisol nocturnal variations during naloxone-induced opiate receptor blockade in man. *Acta Endocrinol.*, 100 : 321, 1982.
- 12) Quigley, M. E., Sheehan, K. L., Casper, R. F. and Yen, S. S. C.: Evidence for an increased opioid inhibition of luteinizing hormone secretion in hyperprolactinemic patients with pituitary microadenoma. *J. Clin.*

Endocrinol. Metab., 50 : 427, 1980.

- 13) Seki, K., Uesato, T. and Kato, K. : Effects of a dopamine antagonist (metoclopramide) on the release of the adenohypophyseal hormones in amenorrhoeic patients with and without hyperprolactinaemia. Acta Endocrinol., 101 : 166, 1982.
- 14) Cetel, N. C., Quigley, M. E. and Yen, S. S. C. : Naloxone-induced prolactin secretion in women : evidence against a direct stimulatory effect of endogenous opioids. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60 : 191, 1985.
- 15) Gudelsky, G. A. and Porter, J. A. : Morphine and opioid peptide-induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. Life Sci., 25 : 1697, 1979.
- 16) Van Vugt, D. A., Bruni, J. F., Sylvester, P. W., Chen, H. T., Ieiri, T. and Meites, J. : Interaction between opiates and hypothalamic dopamine on prolactin release. Life Sci., 24 : 2361, 1979.
- 17) Van Loon, G. R., Ho, D. and Kim, C. : β -Endorphin-induced decrease in hypothalamic dopamine turnover. Endocrinology, 106 : 76, 1980.
- 18) Wilkes, M. M. and Yen, S. S. C. : Reduction by β -endorphin of efflux of dopamine and DOPAC from superfused medial basal hypothalamus. Life Sci., 27 : 1387, 1980.

Prolactinoma (macroadenoma) 患者における naloxone 投与後の血中 prolactin の低下

関 克義, 加藤宏一

防衛医科大学校産科婦人科

動物およびヒトにおいて, opiate peptide は prolactin (PRL) の放出を刺激する. 動物において, opiate の antagonist である naloxone の投与によって血中 PRL が減少することが報告されている. Opioid の PRL 分泌調節は内因性 dopamine の転換および放出の抑制を介するものと推定されている. しかし, 内因性 opioid 活性が亢進していると考えられる下垂体 microadenoma を有する高 PRL 血症患者に naloxone を投与した場合, 血中 PRL は低下しなかつたと報告されている. 今回, naloxone の投与によって血中 PRL は, 高 PRL 血症中下垂体 macroadenoma 例で減少したが, microadenoma 例では増加しなかつた. 一方, naloxone の投与によって血中 LH は, microadenoma 例で増加したが, macroadenoma 例では増加しなかつた. 最近, 卵胞期後期および黄体期の正常婦人に naloxone を投与すると, 血中 PRL が増加することが報告されている. Naloxone によつて放出された gonadotropin-releasing hormone (GnRH) が PRL の分泌を刺激すると推定されている. したがつて, ヒトにおいて, naloxone は PRL 分泌に対して dopamine を介する抑制効果および GnRH を介する促進効果をおよぼす可能性がある. Macroadenoma 例では naloxone の投与によつて PRL 分泌の刺激に十分な GnRH が放出されなかつた可能性がある. それ故, macroadenoma 例では naloxone の PRL 分泌に対する抑制効果のみ発現したものと推測される.

ウサギ体外受精卵のステロイドホルモン合成能と 初期胚のステロイドホルモン環境に関する研究

A Study on the Steroidogenesis of the Rabbit
Eggs Fertilized *in Vitro* and Steroid Hormone
Environment of the Early Embryos

大阪医科大学産科婦人科学教室

宮崎和典

Kazunori MIYAZAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Medical College

家兎体外受精卵において hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) 活性を組織化学的に検討し、また家兎卵管液中の各種ステロイドホルモン濃度を測定し、以下の結果を得た。

1) DHA を基質とした 4^{β} -3 β -HSD および T による 17β -HSD 活性は、day 1 より検出され、day 6 で強陽性となり、対照卵子と差はなかった。

2) 4^{β} -P による 4^{β} -3 β -HSD, E_2 による 17β -HSD 活性は、day 4 より弱陽性となり、対照卵子では day 6 で強陽性となつたのに対し、弱陽性のままであつた。

3) 体内受精、体外培養卵でも day 6 で、 4^{β} -P による 4^{β} -3 β -HSD, E_2 による 17β -HSD 活性は弱陽性であつた。

4) 血中 P, 4^{β} -P は、day 0 で 0.6ng/ml より漸増し、偽妊娠が続くにつれて有意に増加したのに対し、卵管液中濃度は、day 0 でそれぞれ 0.47, 0.52ng/ml で経日的変化に乏しく、血中値より低値であつた。

5) 血中 E_2 , E_3 は、day 0 で 76.8pg/ml, 45.1pg/ml で、偽妊娠の持続によつても変化を受けなかつた。卵管液中濃度は、それぞれ 77.6pg/ml, 63.2pg/ml で、終始、血中値より高値であつたが、有意な差はなかつた。

6) DHA, T は全経過を通じ、血中値、卵管液中濃度ともにそれぞれ、0.37~0.72ng/ml, 35.8~81.7pg/ml の間で推移し、一定の変動や差異を認めなかつた。

以上より家兎初期胚のステロイド合成は day 4 までは母体環境の影響を受けず、自律的であること、体外受精卵では P や estrogen などのステロイドホルモン産生能の一部に低下が認められ、これは体外培養に起因し、体外受精卵における着床不全の一因となることが推察された。また、卵管液中のステロイドホルモンの推移は、これら酵素活性とは目的に対応はしないが、血中とは異なつた動態を示し、胚の初期発生に必要なステロイド環境を維持する能動的な機構の存在が示唆された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 256-263, 1987)

緒言

近年、卵管性不妊の治療法として、体外受精・胚移植 (IVF・ET) の臨床応用が定着しつつある一方、その研究段階において、排卵から着床にいたる初期胚発生過程についての多くの新見も得られてきた。しかし、

IVF・ET の成功率はなお低く、自然環境と異なつた培養下の初期胚の発生を規制する因子に関し、より一層の基礎的解明が必要になってきている。

本研究では初期胚の発生に関与する因子の 1 つとして、家兎初期胚におけるステロイドホルモン合成能に対する体外受精、体外培養の影響を組織化学的に検討する

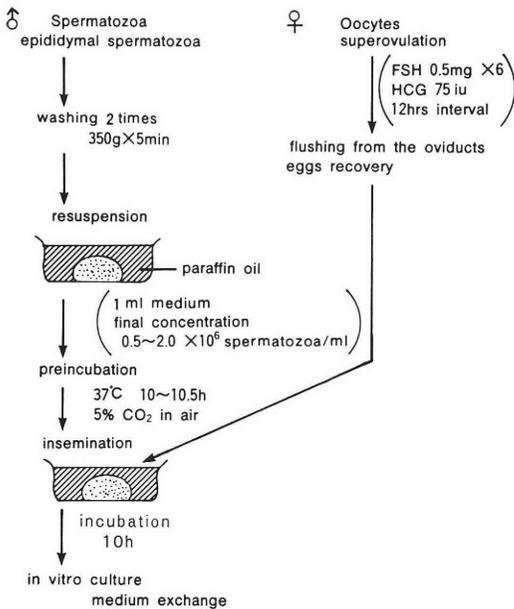


図 1 Procedure of *in vitro* fertilization and *in vitro* culture.

とともに、胚をとりまく微小環境、とくに卵管液中の各種ステロイド動態を明らかにし、相互の関連を検討することによって、初期胚発生過程におけるステロイドホルモンの生物学的意義を明らかにせんとした。

研究方法

体重 2.5~3.0kg の成熟日本白色種の家兎 12羽を用い、少なくとも 4 週間、単飼したのち、実験に供した。

1) ウサギ体外受精法 (図 1)

卵採取にあたり、過排卵誘起のため、FSH 0.5mg (FSH, Chromalloy Pharmaceutical, Inc.) を 12 時間間隔で 6 回皮下注射し、FSH 最終投与 12 時間後に、HCG 75 iu を静脈内投与した。排卵直後の卵管内卵子 を HCG 投与 14~15 時間後、卵管灌流によって採取し、2 回洗浄後、細井らの方法¹⁴⁾ による体外受精系を用いて受精させた。すなわち、精子は精巢上体精子を用い、培養液で 2 回洗浄を繰り返し、10~10.5 時間前培養して capacitate させた。精子浮遊液の調整は、培養液の spot を前もって作成し、8 時間 CO₂ incubator 内で平衡させた後、精子濃度 0.5~2.0×10⁶/ml となるように精子を加えた。さらに、前培養の終了時に採取した卵子を加え、受精させた。約 10 時間後に受精の有無を雌雄両前核および 2 個の極体の存在によって確認した。この時点より、チャコール処理 20% 不活化家兎血清を加えた育生用メEDIUM に移し、以後初期胚の培養を続行し、培養液は 48 時間毎に交換した。

HCG 投与よりそれぞれ 24 (day 1), 48 (day 2), 96 (day 4), 144 (day 6) 時間後の卵子を組織化学的検討に用いた。対照として用いた体内受精卵は、FSH 最終投与 12 時間後に雄家兎と交尾させ、同時に HCG 投与し、それぞれ 24 (day 1), 48 (day 2) 時間後では卵管灌流にて、96 (day 4), 144 (day 6) 時間後では子宮灌流にて卵を採取した。さらに、体内受精、体外培養卵として交尾後 24 時間に採取した卵を、以後同じシステムで培養した。

2) 卵子のステロイド脱水素酵素の組織化学的検討

上記の方法によって得られた卵子について、ステロイド産生にあずかる 4^β-3^β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) 活性や 17^β-HSD 活性の推移を組織化学的に検討した。基質は 4^β-3^β-HSD として pregnenolone, dehydroepiandrosterone を、17^β-HSD では testosterone, estradiol-17^β を用いた。反応液は Dickman & Dey の方法¹⁵⁾ に従い、基質 1.8ng, NAD 4.0ng, nitroblue tetrazolium 2.0ng を 0.1M phosphate buffer (pH 7.5) 9.6ml に加えたものを用いた。浸漬は 37°C で行い、反応時間は非特異的沈着を考慮し、90分とした。酵素活性の判定はジホルマゼン顆粒の沈着量により、陰性 (-), 弱陽性 (+), 中等度陽性 (H), 強陽性 (HH) の 4 段階で行った。各実験区とも 8~18 個の卵子を用い、変性卵や分割の遅れた異常卵は実験より除外した。

3) 卵管液の採取法

卵管液の採取には入谷ら⁴⁾ の腹腔内装着フラスコを用いた。すなわち卵管采よりシリコンチューブを約 1cm 挿入し、同部で結紮固定し、卵管角部を結紮し、卵管液の子宮内への流入を遮断した。シリコンチューブの反対側は、フラスコの流入口に接続し、フラスコは側腹より採取管を腹腔外に誘導して固定した。フラスコ内に貯留した卵管液が、装着後、清澄となるのを確認し、HCG 100iu を投与、排卵を誘起した。貯留した卵管液は 24 時間毎に採取し、同時に耳静脈より採血した。

4) ステロイドホルモン測定法 (図 2)

卵管液、および血漿中の pregnenolone (4^β-P), progesterone (P) と、androgen として dehydroepiandrosterone (DHA), testosterone (T) を、estrogen として estradiol (E₂), estrone (E₁) を測定した。試料が微量のために、複数のステロイドホルモンの同時測定を目的として celite column を独自に作成し、elution pattern を確認のうえ chromatography を行なった。測定にあたり、用いた標識ステロイドはすべてトリチウムにラベルされたもので、New England Nuclear 社により入手し、Sephadex LH-20 column chromatography で純化した後、使用した。非標識ステロイドは Sigma 社より購入

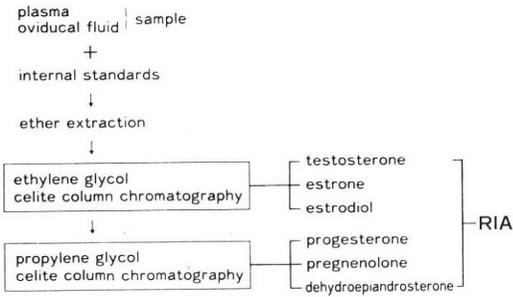


図 2 Assay procedure for progesterone, pregnenolone, dehydroepiandrosterone, testosterone, estrone, and estradiol in plasma and oviducal fluid

し, ethanol-water 系で2度再結晶してから使用し, 各ステロイドの RIA に用いた抗血清は帝国臓器社より提供をうけた. celite は Johes-Manville Products Corporation 社製の analytical filter aid を用い, 500°C, 一昼夜, 活性化してから使用した. リン酸緩衝液は0.1%ゼラチン加0.1N phosphate buffer saline を, scintillator は toluene 1ml に PPO 4.0g, POPOP 0.1g を溶解したものを用いた. 卵管液, 血漿ともに0.5 ml に対し, 回収率補正用の ³H 標識ステロイドを1,000 dpm/10 μ l 加え, 抽出した. 各ステロイドの分離には, celite と ethylene glycol を2:1, celite と propylene

glycol を1:1の割合 (W/V) で混和攪拌したのち, 内径7 mm 長さ約30cm のガラス管に充填し, column を作成し, 表1に示した溶媒にて分離した.

ステロイドホルモンの RIA は Brenner ら (1973) の方法⁹⁾に従って行った. 分離した各ステロイドの分画は, 蒸発乾固後, PBS を0.3~0.5ml 加え, 混和溶解後, 0.1ml を回収率算定用として, 残りの0.1~0.2ml を測定用とした. 測定は duplicate で, 統計処理は student t test によった.

研究成績

1) 家兎卵子におけるステロイド脱水素酵素活性とその推移

基質を含まない反応液に浸漬した対照卵子では, いずれの発育時期においても, 非特異的ジホルマゼン顆粒の沈着はみられなかつた (写真 a). HSD 活性を示すジホルマゼン顆粒は透明帯には認められなかつたが, 細胞質には均等に分布し, 発育時期によつては極体にも認められた. 各分割球間では沈着量にほとんど差がなく, 変性卵や分割の停止した異常卵には HSD 活性を認めなかつた. 対照として行った体内受精卵では, DHA を基質とする ⁴ β -³ β -HSD 活性は, day 1 より強陽性で, day 2 で低下したが (写真b), day 4 より再び強くなり, day 6 では強陽性となつた. ⁴ β -P を基質とする ³ β -HSD 活性,

表 1 Elution pattern of steroids from celite column chromatography.

Solvent	Volume (ml)	Eluate
I. celite : Ethylene glycol column (2 : 1)		
Isooctane	10	discarded
Sample (Isooctane : Toluene = 90 : 10)	0.5 x 2	
Isooctane : Toluene = 90 : 10	5.0	Progesterone Pregnenolone Dehydroepiandrosterone
Isooctane : Toluene = 80 : 20	1.0	
Isooctane : Toluene = 80 : 20	3.0	Testosterone
Isooctane : Ethyl Acetate = 85 : 15	0.5	discarded
Isooctane : Ethyl Acetate = 85 : 15	2.0	Estrone
Isooctane : Ethyl Acetate = 75 : 25	0.5	discarded
Isooctane : Ethyl Acetate = 75 : 25	3.0	Estradiol
II. celite : propylene glycol column (1 : 1)		
Isooctane	10	discarded
Sample (Isooctane : Toluene = 90 : 10)	0.5 x 2	
Isooctane : Toluene = 90 : 10	3.5	Progesterone
Isooctane : Toluene = 80 : 20	2.0	discarded
Isooctane : Toluene = 80 : 20	4.0	Pregnenolone
Isooctane : Toluene = 50 : 50	3.5	Dehydroepiandrosterone

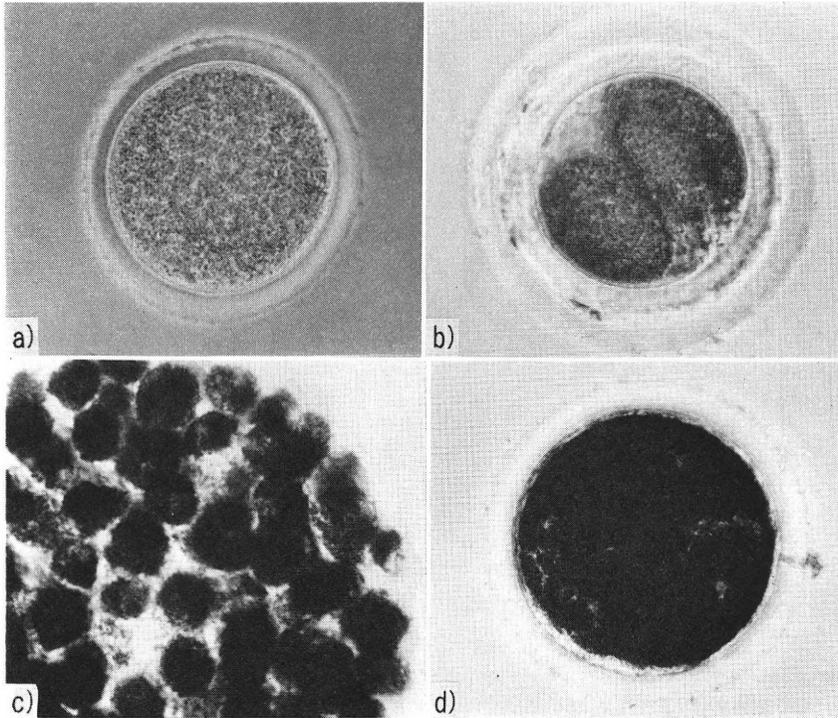


写真 a) Without substrate (control), negative (-), A 1 cell egg, $\times 200$.
 写真 b) $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ (DHA), weak positive (+) A 2 cell egg, $\times 200$.
 写真 c) $17\beta\text{-HSD}$ (Testosterone), moderate positive (++) A morula, $\times 400$.
 写真 d) $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ ($\Delta^5\text{-P}$), strong positive (###) A hatched blastocyst, $\times 200$.

表 2 Hydroxysteroid dehydrogenase activities in rabbit eggs fertilized *in vivo*

	substrate	day 1 pc 24 hrs	day 2 pc 48 hrs	day 4 pc 96 hrs	day 6 pc 144 hrs
$\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$	dehydro-epiandrosterone	###	+	##	##
	pregnenolone	-	-	+	##
$17\beta\text{-HSD}$	estradiol	-	-	+	##
	testosterone	+	+	##	##

表 3 Hydroxysteroid dehydrogenase activities in rabbit eggs fertilized *in vitro*

	substrate	day 1 af 12 hrs	day 2 af 36 hrs	day 4 af 84 hrs	day 6 af 132 hrs
$\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$	dehydro-epiandrosterone	##	+	##	##
	pregnenolone	-	-	+	+
$17\beta\text{-HSD}$	estradiol	-	-	+	+
	testosterone	+	+	##	##

E_2 を基質とする $17\beta\text{-HSD}$ 活性は、day 2 までは検出されなかつたが、day 4 で弱陽性、day 6 で強陽性になつた (写真 d)。T を基質とする $17\beta\text{-HSD}$ 活性は day 1 より弱く検出され、day 4 より中等度陽性になり (写真 c)、day 5 で強陽性になつた (表 2)。

一方、体外受精卵における HSD 活性は、day 1 から day 4 までは、体内受精卵と差を認めなかつた。Day 6 では体外受精卵がすべての活性に強陽性を示したのに対し、体内受精卵では $\Delta^5\text{-P}$ を基質とした $3\beta\text{-HSD}$ 、 E_2 を基質とした $17\beta\text{-HSD}$ 活性が弱陽性のままであつた (表 3)。

さらに体内受精体系培養システムより得られた卵子の day 6 の酵素活性は、体外受精卵と全く同一で、やはり $\Delta^5\text{-P}$ を基質とした $3\beta\text{-HSD}$ 、 E_2 を基質とした $17\beta\text{-HSD}$ 活性が弱陽性を示した (表 4)。

2) 各ステロイドホルモン測定法の精度および回収率
 図 2 に示した chromatography による ^3H 標識物の全操作を通じての回収率は 63.7~89.2% の間にあつた。また、同一検体を繰り返し測定し、within assay variation と between assay variation を検討したところ、変動係数はそれぞれ、4.95~12.7, 5.78~13.2 と十分満足するものであつた。

表 4 Hydroxysteroid dehydrogenase activities in rabbit eggs at day 6

	substrate	in vivo fertilized	in vitro fertilized	in vivo fertilized
		-in vivo cultured	-in vitro cultured	
4 ^α -3 β-HSD	dehydro-epiandrosterone	##	##	##
	pregnenolone	##	+	+
17 β-HSD	estradiol	##	+	+
	testosterone	##	##	##

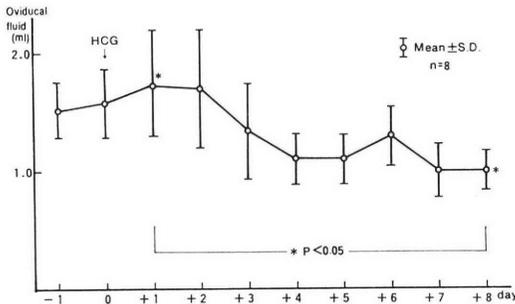


図 3 Oviducal fluid volumes during oestrus and pseudopregnancy

3) 卵管液の分泌量および各ステロイド濃度の推移
卵管液の分泌量は図3のように day 0 では1.54±0.23 ml であつたが, HCG 投与後, day 1 で1.73±0.42ml に増加した。しかし day 3 以後は漸減し, day 8 では0.97±0.17ml になり, day 1 に対し有意な減少を示した (P < 0.05)。

測定したステロイドホルモンのうち, 血中 4^β-P 値は, day 0 で0.60±0.11ng/ml から漸増し, day 4 で1.44±0.41ng/ml とピークに達した後, やや低下した。これに対し卵管液中 4^β-P 濃度は, day 0 では0.52±0.11 ng/ml で血中濃度とさほど相異なかつたが, その後の変動も少なく, day 6 で一過性の上昇を認めたが, 有意ではなかつた (図4)。

一方P値は, 血中値で day 0 の0.60±0.17ng/ml から day 7 の11.7±4.21ng/ml まで増加したのに対し, 卵管液中P値は, day 0 の0.47±0.08ng/ml から変動せず, 低値にとどまつた。両群の間には day 1 よりすべて有意差が認められた (P < 0.01) (図4)。すなわち, P, 4^β-P において, 血中値は偽妊娠が続くにつれて有意に増加するのに対し, 卵管液中では oestrus の状態で低値にとどまることが判つた。

また E₂ 値は, 血中濃度が day 0 で45.1±13.5pg/ml であり, その後, 3日間微増したが, 以後40pg 前後の低値にとどまり, 有意な変化を示さなかつた。卵管液中 E₂ 値は, day 0 で63.2±19.1pg/ml から day 7 で85.9±24.9

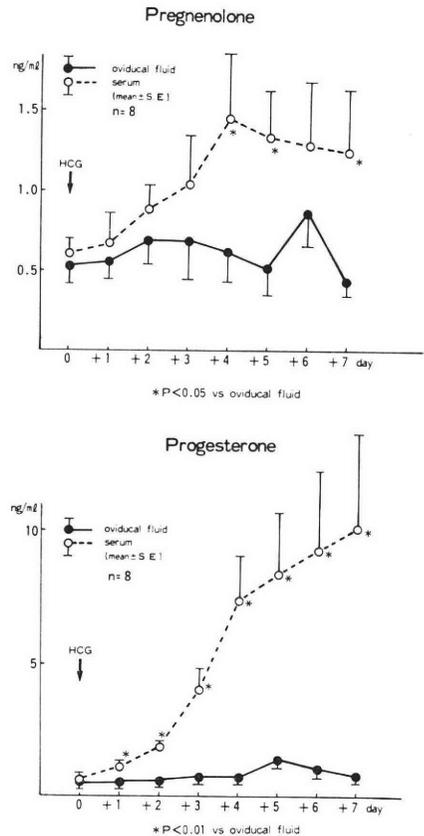


図 4 Pregnenolone and Progesterone concentrations in rabbit oviducal fluid and serum.

pg/ml と微増し, day 7 では血清より有意に高値になつた。同様に E₁ の血中濃度は, day 0 の76.8±18.6pg/ml から day 7 の77.6±21.0pg/ml までほとんど変化なく, 卵管液中濃度も77.6~95.8pg/ml の範囲内で変動し, 偽妊娠の影響を受けなかつた。すなわち, E₁, E₂ ともに偽妊娠による変化を示さなかつたが, すべての日において, 卵管液中濃度は血清よりわずかに高くなり, day 7 では E₂ 値に有意差を示すようになった (図5)。

DHA, T においては血中濃度は, それぞれ 0.38~0.72ng/ml, 37.5~72.0pg/ml の間で推移し, 特徴的な傾向を認めなかつた。また卵管液中 DHA, T 値も, それぞれ0.37±0.08~0.58±0.18ng/ml, 35.8±11.7~81.7±36.6pg/ml の間で変動し, 血中, 卵管液中の両濃度間にも特別な差異は認められなかつた (図6)。

これら各ステロイドの卵管液中と血中濃度との関連を知る目的で両濃度比を検討した。測定した6種のステロイドホルモンは大きく分けて3つのパターンに分類可能であつた。すなわち, 4^β-P, Pは, 血中濃度が増加し続けるのに対し, 卵管液中濃度は変化せず, 濃度比は終始

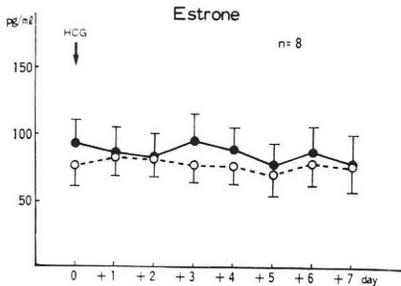
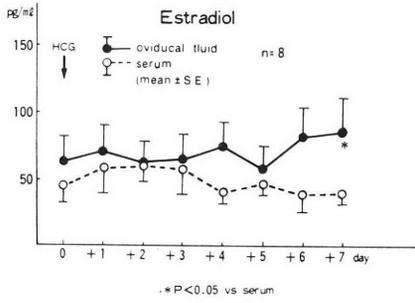


図 5 Estradiol and Estrone concentrations in rabbit oviducal fluid and serum.

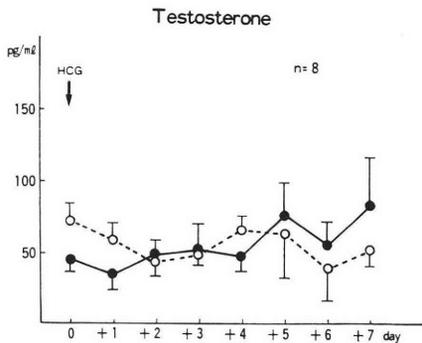
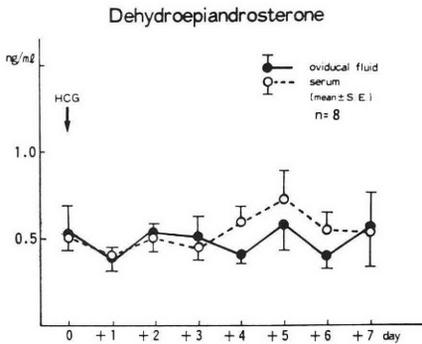


図 6 Dehydroepiandrosterone and Testosterone concentrations in rabbit oviducal fluid and serum.

1 以下で、偽妊娠日数とともに漸減した。E₁, E₂ は偽妊娠日数ともなう変化は少ないとはいえ、 Δ^5 -P, Pとは逆に、濃度比は常に1以上であつた。残る DHA, T は血中、卵管液中とも一定に傾向がなく、濃度比は1前後で変動した。

考 案

多くの哺乳動物では、排卵の機構や卵の受精から着床に至る一連の初期胚の発生過程において、ステロイドホルモンが重要な役割を演じていることが知られている。特に卵子自身に対する成熟、受精、分割、胞胚形成および着床に至る様々な段階への関与が重視されている。しかし、実際に卵子および初期胚を取りまく微小環境におけるステロイドホルモンの動態は、実験方法が難しいため、十分に解明されていない。また最近、卵子自身もステロイドホルモンを産生することが明らかとなり、これら卵子のステロイドホルモン産生機構との相互の関連性に関しては不明点が多い。

卵子のステロイド合成能に関しては、Huff¹²⁾がウサギ胞胚で acetate から cholesterol や Δ^5 -P が、perry¹¹⁾はブタを用いて androstendione や DHA より E₁, E₂ が合成されることを生化学的に証明した。組織化学的には Dickmann³⁾、ラット、マウス、ウサギなどで桑実胚より胞胚の時期にかけて、 Δ^5 -3 β -HSD, 17 β -HSD などの酵素活性が亢進することを示し、自ら産生されたステロイドホルモンは桑実胚から胞胚への移行や着床などに関与し、特に estrogen は子宮内膜に局所的に作用し、着床に深く関与すると述べている。また、ステロイド合成酵素阻害剤である isoxazole¹⁾ で処理すると、卵の分割が阻止されるなど、卵自身のステロイド合成が正常発生を自己規制する重要な意義をもつことが明らかにされつつある。

これら、卵子におけるステロイド合成酵素活性の調節機構に関しては殆ど解明されていないが、新村²⁾によると、ハムスター卵子の HSD 活性は *in vitro* ではあるが、HCG, プロラクチン, プロスタグランディンなどによって変化するという。今回の実験では、DHA を基質とした Δ^5 -3 β -HSD 活性や、T を基質とした 17 β -HSD 活性は、体外受精、体外培養卵でも体内受精卵と差がなく、androgen 合成能が維持されるとともに、これら酵素活性が生理的条件下では母体環境に影響を受けず、自律的であることを示している。他方、 Δ^5 -P を基質とした Δ^5 -3 β -HSD 活性と E₂ を基質とした 17 β -HSD 活性の変化からみると、体外受精卵で day 6 のこれら酵素活性は亢進せず、P や estrogen などのステロイドホルモン産生の相対的低下を示していた。これは Dickmann

らの言う“blastocyst estrogen”産生低下につながり、いわゆる着床不全を引き起こし、体外受精卵の着床率低下の原因の1つとなる可能性を示すものかもしれない。また、この低下が体外受精そのものが、あるいは体外培養によるものかを知るため、体内受精卵を体外培養し、そのHSD活性を検討したところ、体外受精卵と差はなく、体外受精による直接的影響ではなく、主に体外培養条件に関連することが分つた。すなわち、この結果より、現在広く用いられている体外培養系において、卵子のステロイドホルモン合成、特にPやestrogenなどの産生を障害する因子の存在が示唆された。また、卵巣性ステロイドホルモンは卵管上皮に分泌変化をもたらし、卵管液の組成や分泌量を制御することによって、精子のcapacitationや初期胚の発育にも間接的に作用するといわれている。一方、卵胞液、卵管液、子宮液などの分泌液を介する直接作用も当然存在する。ところが、従来より体外受精に用いる培養液は、主に卵管液の組成に基づいて作成されてきたにもかかわらず、卵管液に含まれるステロイドホルモンの濃度を検討した報告は、Wuら⁸⁾のアカゲザル、Richardson⁹⁾のウサギによる報告のみで、その詳細は不明な点が多い。そこで家兎をモデルとして、卵管液中の各種ステロイド濃度を経日的に測定し、血中濃度との相関を検討した。血中濃度は、 4β -PやPでは偽妊娠日数につれて急増するのに対し、T、DHAなどandrogenおよび、 E_1 、 E_2 などestrogenでは変化は少なく、偽妊娠の影響も少なかった。

一般に卵管液の一部は、血液からの漏出液が含まれているとされているが、卵管液中ステロイドホルモンのうち、 4β -PやPは血中濃度の増加にもかかわらず、低値にとどまった。また E_1 、 E_2 は、逆に卵管液中で高値となり、T、DHAなどは血清濃度とは無関係で、一定の傾向を認めず、ステロイドホルモンの種類によつて異なった分泌動態を示すことが判明した。これらステロイドホルモン濃度に影響する因子についての詳細は不明であるが、今回の成績より卵管液中ステロイドホルモン濃度は経日的変化に乏しいながら、これは初期胚の発生に必要なあるいは至適なホルモン環境を提供する何らかの調節作用の存在を想起させるものである。卵管液分泌量は性周期により変化するといわれ、本実験でもウサギ卵管液は交尾後4日目より漸減した。Waldham¹³⁾らによると、卵管血流量はPの上昇とともに減少するので、血流量の変化によりステロイドホルモン濃度が影響を受けることは十分考えられる。またEL-Bannaら³⁾は、卵管の E_2 結合能はPの上昇により減少すること、卵管上皮には17 β -HSD活性が存在することなどを報告しているの、これがステロイド濃度の制御のあずかっている可能性も高

い。卵管液中ステロイドホルモンが直接、初期胚に及ぼす影響については、マウス、ラット、ウサギを用いて検討されており、桑実胚期まではPやTは分割を抑制し、 E_2 はfragmentationを引き起こすと言われている⁸⁾。

本研究により、これらホルモンの卵管液中濃度は薬理学的実験濃度と比べ、かなり低濃度であることが判明した。しかしWuは、卵管液にはステロイド結合蛋白が少ないために多くの部分が活性の遊離型で存在し、血漿に比べても極端に高濃度の条件下にあると述べている。今回、卵のステロイド合成の推移に応じて、卵管液中ステロイドが基質として利用されるような直接的相関は確認できなかったが、この遊離型ホルモンの動態と作用について、今後、なお詳しく検討すべきであろうと思われる。

卵管液中に存在するステロイドホルモンが、卵のステロイドホルモン合成の基質として利用されるか、初期胚に直接ホルモン作用を発揮するかは明白ではないが、ヒト子宮内膜のHSD活性をPが促進するという事実¹⁰⁾や、着床期のPや、Pのcarrier蛋白としてのuteroglobinがembryotropicに働く⁷⁾などの報告は、卵をとりまく微小環境における外因性ステロイドと、自ら産生する内因性ステロイドが相互に作用しつつ、胚の発育や着床に重要な役割を演じていることを示すものと思われる。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜った恩師杉本修教授に深甚なる謝意を捧げます。また、始終研究に御協力を頂いた京都大学農学部、入谷明教授、三宅正史助手、細井美彦先生、の各位および教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 新村末雄、石田一夫：ステロイド合成を阻止したマウス卵子における卵割・胞胚形成能力の衰退、日不妊会誌、26：142、1981。
- 2) 新村末雄、石田一夫：HCG及びprolactinがハムスター卵子のヒドロキシステロイド脱水素酵素活性に及ぼす影響に関する組織化学的観察、家畜繁殖誌、25：176、1979。
- 3) EL-Banna, A. A. and Sacher, B.: A study on steroid hormone receptors in the rabbit oviduct and uterus during the first few days after coitus and during egg transport. Biol. Reprod., 17: 1, 1977.
- 4) Iritani, A., Nishikawa, Y., Gomes, W. R. and VanDemark, N. L.: Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. J. Anim. Sci., 33: 829, 1971.
- 5) Brenner, P. F., Guerrero, R. Cekan, W. and Diczfalusy, E.: Radioimmunoassay me-

- thod for six steroids in human plasma. Steroids, 22 : 775, 1973.
- 6) Wu, C. H., Mastroianni, L. Jr. and Mikhail, G. : Steroid hormones in monkey oviductal fluid. Fertl. Steril., 28 : 1250, 1977.
 - 7) Beier, H.M. and Maurer, R. R. : Uteroglobulin and other proteins in rabbit blastocyst fluid other development *in vivo* and *in vitro*. Cell Tiss. Res., 159 : 1, 1975.
 - 8) Daniel, J.C. JT. : Some effects of suteroids on cleavage of rabbit eggs *in vitro*. Endocrinology, 75 : 706, 1965.
 - 9) Richardson, L. L. and Oliphant, G. : Steroid concentrations in rabbit oviductal fluid during oestrus and pseudopregnancy. J. Reprod. Fert., 62 : 427, 1981.
 - 10) Tseng, L. and Gurpide, E. : Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. Endocrinology, 97 : 825, 1975.
 - 11) Perry, J. S., Heap, R. B. and Amoroso, E. C. : Steroid hormone production by pig blastocysts. Nature, 245 : 45, 1973.
 - 12) Huff, R. L. and Eik-nes, K. B. : Metabolism *in vitro* of acetate and certain steroids by six-day-old rabbit Blastocysts. J. Reprod. Fert., 11 : 57, 1966 .
 - 13) Waldham, S. J. and Dickson, W. M. : Blood flow to the uterine tube (oviduct) of the early pseudo pregnant and pregnant rabbit. Am. J. Vet. Res., 37 : 817, 1976.
 - 14) Hosoi, Y., Niwa K., Hatanaka, S. and Iritani, A. : Fertilization *in vitro* of rabbit eggs by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. Biol. Reprod. 24 : 637, 1981.
 - 15) Dickmann, Z. and Dey, S. K. : Two theories : the preimplantation embryo is a source of steroid hormones controlling (1) morula-blastocyst transformation, and (2) implantation. J. Reprod. Fert., 35 : 615, 1973.
 - 16) Dickmann, Z. Dey, S. K. and Gupta, J. S. : A new concept : Control of early pregnancy by steroid hormones originating in the preimplantation embryo. Vitam. Horm., 34 : 215, 1976.

A study on the steroidogenesis of the rabbit eggs fertilized *in vitro* and steroid hormone environment of the early embryos

Kazunori Miyazaki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka Medical College, Osaka

In eggs of rabbits which have been fertilized

in vitro, the activity of hydroxysteroid dehydrogenase was investigate histochemichally, and in addition, the concentrations of various steroid hormones were measured in the oviductal fluid of the rabbit. The following results were obtained :

1) Δ^5 -3 β -HSD with the substrate of DHA and 17 β -HSD with T became weakly positive on day 1 and strongly positive on day 6, showing no difference from the control eggs.

2) Δ^5 -3 β -HSD with Δ^5 -P and 17 β -HSD with E_2 became weakly positive, on day 4, and remained weakly positive, whereas they became strongly positive on day 6 in control eggs.

3) Also in eggs, which has been fertilized *in vivo* and cultured *in vitro*, Δ^5 -3 β -HSD with Δ^5 -P and 17 β -HSD with E_2 were weakly positive on day 6.

4) Serum P and Δ^5 -P both increased gradually from 0.6 mg/ml on day 0, and increased significantly as the pseudopregnancy continued, whereas the concentration in the oviductal fluid was 0.47 and 0.52 ng/ml respectively on day 0, showing little daily change and lower values that the values in blood.

5) Serum E_2 and E_3 were 26.8 and 45.1 pg/ml respectively on day 1, being unchanged even when pseudopregnancy persisted. The concentration in the oviductal fluid were 77.6 and 63.2 pg/ml respectively, being higher than those in the blood all the time, but showed no significant difference.

6) DHA and T changed within the values of 0.37-0.72 and 35.8-81.7 pg/ml respectively throughout the whole course for the concentrations in the blood and the oviductal fluid, and showed no definite variation or difference. From the above it has been assumed that the sterorid synthesis in the early embryo of the rabbit is not influenced by *in vitro* fertilization.

Decreases were noted in part of the production capacities of steroid hormones, such as P, estrogen, etc.

This is cause by *in vitro* culture, becoming a contributing cause of insufficient implantaion in the eggs fertilized *in vitro*.

Further, the changes of steroid hormones in the oviductal fluid do not correspond reasonably to these enzyme activities, but show dynamic states in the blood, suggesting from the presense of an active mechanism, which maintains the environment of steroids necessary for the appearance of an embryo in the early period.

(受付 : 昭和61年12月12日特掲)

子宮筋腫由来培養細胞に対する Estradiol-17 β の影響

Effect of Estradiol-17 β on Cultured Cells Derived from Uterine Leiomyoma

産業医科大学産婦人科学教室

大塚 治夫 吉田 耕治

Haruo OTSUKA Kohji YOSHIDA

草野 秀一 岡村 靖

Shuichi KUSANO Yasushi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health

子宮筋腫患者10例の摘出子宮を使つて、子宮筋腫由来細胞を施行した。培養に成功したのは10例中5例であり、実際継代培養できたのは3例であつた。子宮筋腫由来培養細胞が子宮筋腫細胞であることの証明の一手段として、酵素抗体法を用いて desmin 染色を行つた。このようにして確立した子宮筋腫由来培養細胞を用いて estradiol-17 β の影響を細胞増殖率の比較でみたところ、 10^{-5} ~ 10^{-8} mol では細胞増殖の促進がみられた。とくに 10^{-7} , 10^{-8} mol では約120%になつた。

以上より、*in vitro* 上、子宮筋腫の細胞増殖促進効果は至適濃度が存在する可能性が示唆された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 264-267, 1987)

緒 言

子宮筋腫は婦人科腫瘍中、最も popular な腫瘍であり、estrogen dependent tumor¹⁾と言われている。その為、estradiol-17 β と子宮筋腫の関係を解明する基礎 data は多数報告されてきたが、いまだ一定の見解は得られていない。

今回われわれは、子宮筋腫の estrogen の影響を知るため、子宮筋腫由来培養細胞の初代培養を確立し、この培養系をつかつて、estradiol-17 β の影響を観察し、若干の知見を得たので報告する。

対象と方法

1. 材料

実験に用いた筋腫組織は、子宮筋腫と診断され、単純子宮摘術を施行された、年齢37歳~52歳に至る、10例の患者の摘出子宮より得られた。筋腫組織は一部を病理検査と酵素抗体染色用とし、残りを培養に供した。

2. 研究方法

1. 子宮筋腫由来細胞の培養

筋腫組織を小鉄で1mm³角程度に細切し、細切した筋腫組織を滅菌した三角フラスコに入れ、0.25% trypsin 液 (Flow Laboratories, Va., U.S.A.) 15ml+0.1% collagenase 溶液 (和光純薬, 大阪) 15ml 溶液を加えた後、マグネチックスターラーでゆるやかに攪拌して浮遊細胞にした。最初の消化処理は30分行い、濾過して上清は廃棄した。2回目以降は1時間毎に同様な操作を行い、2回目よりの上清中の浮遊細胞を培養に供した。その後3回目、4回目と同様な処理をした。得られた細胞浮遊液を金属メッシュにて濾過し、濾過液を容量15ml の disposable 遠沈管 (Corning Glass Works, Corning, N.Y., U.S.A.) 中で、4°C, 300g, 5分間遠沈した。遠沈後は decantation にて出来るだけ trypsin および collagenase を取り除き、phosphate buffer solution 中で再度遠沈した。遠沈後は、20%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, Flow Laboratories, Va., U.S.A.), penicillin 100I.U./ml・streptomycin 100 μ g/ml (GIBCO Laboratories, Gland island, N.Y., U.S.A.) を含む McCoy 5 A培地 (Flow) 中に再浮遊させ、底面積25cm² の tissue culture flask (Corning)

にて培養した。培養器の気相は、5% CO₂・95% air, 37°C 下とし、培養液は週 2 回交換した。

2. 観察方法

培養細胞は位相差顕微鏡による観察とともに、colony は 10% 中性ホルマリン固定後、Giemsa 染色または 0.1% crystal violet 染色後、肉眼的並びに光顕の観察を行い、適宜写真撮影した。

3. 酵素抗体染色

培養細胞が子宮筋腫由来細胞である事の証明の一手段として、筋腫組織および培養細胞の desmin 染色をした。

筋腫組織は、95% 冷アルコール 24 時間固定後、パラフィンに包埋し、薄切切片を作成し、培養細胞は、95% 冷アルコール 20 分間固定後、desmin 染色を行った。用いた desmin (アマーシャムジャパン株式会社、東京) は monoclonal anti-desmin (IgG1) で、53KD の単一ポリペプチドを認識するもので、desmin のアミノ酸残基 325-372 間が、この抗体のエピトープである事が Western blotting で確かめられている²⁻⁴⁾。2 次抗体以降は Universal immunoperoxidase kit (DAKO Corporation, Santa Barbara, California, U.S.A.) を用いた。これらを基本として、反応をよくするために trypsin 処理および第 1 次抗体との反応を overnight するなど、modification した。

4. 子宮筋腫由来細胞に対する estradiol-17β の影響

このようにして、培養に成功したのは 10 例中 5 例であり、残り 5 例は contamination および細胞増殖しなかつた。また、成功した 5 例中、2 例は、confluent になるまで数週間要し、継代するには至らなかつた。残り 3 例は、増殖が盛んで、初代培養後、1 週間で confluent になり、この confluent になった初代培養細胞を用い、0.25% trypsin 液を作用させ、浮遊にした後、1~2×10⁵コ/ml になる様に培養液で希釈調整した。Colony 観察のために Falcon の 6-multiwell tissue culture plate (Becton Dickinson and Company, Oxnard, CA., U.S.A.) を用い、各々の Well に希釈細胞浮遊液 0.2ml ずつを入れた。細胞数測定用には、Falcon の 24-multiwell tissue culture plate (Becton Dickinson) を用い、各々の well に希釈細胞浮遊液 0.1 ml ずつを植え込んだ。培地は、20% FBS 加 McCoy 5A 培地であり、6-well の各々の well には、培地 2 ml、24-well の各々の well には、培地 1 ml ずつ加えた。継代 24 時間後に estradiol-17β (Sigma chemical Co., St Louis, Mo., U.S.A.) を 10⁻⁹~10⁻⁸mol になるように、6-well および 24-well に各々入れた。培地液および estradiol-17β は週 2 回、同時に交換した。尚、estradiol-

17β を溶解する時、phosphate buffer solution に ethanol を加え、細胞増殖に影響ない様に ethanol 濃度を 0.3% 以下にした。この様にして、estradiol-17β の影響を 3 例の筋腫組織を用いて観察し、6-well の colony 観察の方は single で、24-well の細胞数測定には triplicate にて施行した。6-well および 24-well 共に confluent 近くになったとき実験を中止し、6-well の方は、10% 中性ホルマリン固定後、crystal violet 染色をして colony の観察をし、24-well の方は、0.25% trypsin 液を作用させて、浮遊細胞にし、細胞数を測定した。細胞数の測定は自動血球計算機 (TCC-108, Tokyo, Japan) を用いた⁵⁾。

研究成績

1. 子宮筋腫 および子宮筋腫組織由来培養細胞の desmin 染色

図 1 は子宮筋腫組織の desmin 染色像である。Aminoethylcarbazole で染色されている部分が筋腫細胞の細胞質である。図 2 は子宮筋腫由来培養細胞における desmin 染色である。細胞形態は 3 種類認められ、細長くのびた紡錘形の細胞は、細胞質が均一に染色され、細胞形態が明瞭である。紡錘形ではあるが、長くのびてない細胞は、染色性が均一でなく、濃淡が認められる。やや扁平な低辺の広い多角形の細胞は、横紋様に、濃淡のついた染色を呈する。これら 3 種類共、desmin 染色 positive である。

2. 子宮筋腫由来培養細胞に対する estradiol-17β の効果

図 3 は、子宮筋腫由来培養細胞に対する estradiol-17β の効果を細胞数の比較で示したものであり、control を 100 とした場合の百分率をあらわしている。10⁻⁹~10⁻⁶ mol 迄は全て細胞増殖が促進され、とくに、10⁻⁸、10⁻⁷ mol では 1.2 倍程度になる。また、10⁻⁵mol の高濃度

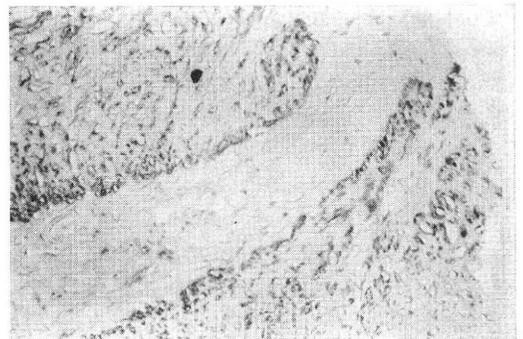


図 1 子宮筋腫組織の desmin 染色 (×50) 筋腫細胞の細胞質が染色されており、間質部分と明瞭な境界を形成する



図 2 子宮筋腫由来培養細胞の desmin 染色 ($\times 50$)
3 種類の細胞形態がみられる

では、わずかではあるが、細胞増殖が抑制された。

考 察

子宮筋腫由来細胞に成功したのは10例中5例であり、成功した5例中3例のみしか実験につかえなかつた。著者は、子宮内膜、子宮筋層、子宮腺筋症をも培養しているが、最も子宮筋腫の培養成功率が低い。文献的にも子宮筋腫由来培養細胞を使った実験が散見されるに過ぎないのは、この培養成功率の低さによるのも一因と思われる⁶⁾。

次に培養細胞が子宮筋腫細胞である事を証明する一手段として、子宮筋腫組織、子宮筋腫由来培養細胞の desmin 染色をした。desmin は細胞骨格蛋白の一つであり、細胞骨格を主として構成する要素としては、① microtubule, ② microfilament, ③ intermediate filament の3種の線維性構造がある⁷⁾。desmin は、この3種の内 intermediate filament に属するものであり、筋細胞に特異的なものである⁸⁾。この性質を利用して、子宮筋腫由来培養細胞が子宮筋腫細胞であることを証明しようとした。しかし、desmin が染色された事だけから子宮筋腫細胞であると必ずしも断定できない面もあり⁹⁾、電顕等其他の手段も用いる必要がある。

一般に子宮筋腫は、生殖年代に多く、閉経後は発育の停止または縮小をきたし、妊娠中には増大する。止血を目的とした外因性ステロイドの投与による筋腫の発生や増大する現象がある¹⁰⁾。これらの事はよく知られた事実であり、それゆえ子宮筋腫は estrogen dependent tumor¹⁾と言われている。しかし、必ずしも明確な証明はなされていない。担筋腫患者とそうでない患者の血中 estradiol-17 β の程度に差はなく¹¹⁾、筋腫部分の局所に着目し、筋腫組織中の estradiol の高値¹¹⁾、estrogen receptor による説明¹²⁾、E₂-17 β -hydroxy dehydrogenase (E₂DH) の低下による E₂ の pooling による説明が¹³⁾なされている。今回の子宮筋腫由来培養細胞をつかった実験

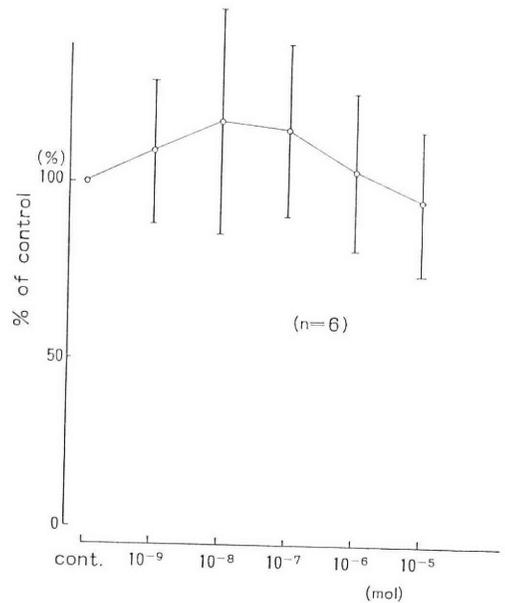


図 3 Effect of estradiol-17 β on cultured cells derived from uterine leiomyoma

をも確かに estrogen dependent tumor と言える結果であろう。ただ、その細胞増殖効果も、10⁻⁸、10⁻⁷mol と至適濃度が存在する旨が考えられた。今回発表していないが、同様な実験系での danazol の影響が estradiol と逆の結果を示しており、興味深い事実である。また、培養細胞を使つての薬剤効果も、³H-thymidine⁶⁾、colony assay⁶⁾ 法があり、この判定の仕方により、結果に差異ができるのは当然の事であり、現在検討中である。

今後この培養系を用いて、子宮筋腫に対する pathogenesis の解明をしていきたい。

稿を終わるに臨み、御協力下さつた、新日鉄八幡病院産婦人科、川上昌男博士並びにスタッフの方々、当病院中検病理のスタッフの方々に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 藤井信吾：子宮筋腫の発生要因，組織発生源とその内分泌相関，第35回日本産婦人科学会シンポジウム講演要旨，日産婦誌，35：1166，1983。
- 2) Debus, E., Weber, K. and Osborn, M. : Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein. The EMBO. J., 12 : 2305, 1983.
- 3) Lazarides, E. : Intermediate filament : A chemically heterogenous, developmentally regulated class of protein. Ann. Rev. Biochem., 51 : 219, 1982.

- 4) Osborn, M. and Weber, K. : Biology of disease—Tumor diagnosis by intermediate filament typing : A novel tool for surgical pathology—Lab. Invest., 48 : 372, 1983.
- 5) 野沢志郎, 多田和代 : 自動白血球数装置 (cc-108) による培養細胞の測定に関する基礎的検討 (第 1 報), *Sysmex J.*, 2 : 46, 1980.
- 6) Chen, L., Linder, H. R. and Lancet, M. : Mitogenic action of oestradiol-17 β on human myometrial and endometrial cells in long-term tissue cultures. *J. Endocr.*, 59 : 87, 1973.
- 7) 石川春律 : 細胞骨格の微細構造, 蛋白質核酸酵素, 28 : 624, 1983.
- 8) 石川春律 : 血管内皮細胞と細胞骨格, 生体の化学, 36 : 173, 1985.
- 9) 森 啓 : 細胞の骨 (V), 生物化学, 37 : 86, 1985.
- 10) John, A. H. and Martin, Q. : Growth of leiomyoma with estrogen-progesterone therapy. *J. Reprod. Med.*, 6 : 49, 1971.
- 11) Otsubu, J. A. : Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor bearing myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 143 : 130, 1982.
- 12) Farber, M. : Estradiol binding by fibroid tumors and normal myometrium. *Obstet. Gynecol.*, 40 : 479, 1972.
- 13) Pollow, K., Sinnecker, G., Boquoi, E. and Pollow, B. : *In vitro* conversion of estradiol-17 β into estrone in normal human myometrium and leiomyoma. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16 : 493, 1978.

Effect of estradiol-17 β on cultured cells derived from uterine leiomyoma

Haruo Otsuka, Kohji Yoshida, Shuichi Kusano and Yasushi Okamura

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, University of
Occupational and Environmental Health

In ten cultures from resected uteruses performed in women undergoing operation for reasons of uterine leiomyoma were studied. In five of ten cultures were able to success, in only three of five cultures were able to subculture. To confirm that the cultured cells were derived from the myoma, the cells were stained with desmin by the enzyme-labelled antibody method. The cultured cells from the myoma responded to addition of estradiol-17 β (10^{-5} mol- 10^{-9} mol/l) to the medium by an increased rate of cell number. The myoma-derived cells grown in the estradiol-17 β medium (10^{-7} mol- 10^{-8} mol/l) showed increase of about 120 % than the cells grown in control.

It is suggested that estradiol-17 β increases the cell growth with suitable concentration on the human uterine leiomyoma *in vitro*.

(受付 : 昭和61年9月10日)

糖代謝と無月経に関する研究

——特に多嚢胞性卵巣症候群における臨床的解析——

Insulin Resistance and Insulin Receptor Profile of the Patients with PCO

神戸大学医学部産科婦人科学教室

幸村 信行 片山 和明 望月 眞人

Nobuyuki YUKIMURA Kazuaki KATAYAMA Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University School of Medicine

無月経患者を第1度無月経、第2度無月経の2群に分け、糖負荷試験を行い、血糖および血清 IRI の反応性を検討した。その結果、第1度無月経、特に PCO 患者においてインスリンの基礎値および反応性が対照群に比し、有意に高値であるという結果を得た。この臨床的成績は、非肥満、肥満患者を問わず、PCO 患者に特有であり、インスリン抵抗性が PCO 患者に存在することを推察させる。

そこで、このようなインスリン抵抗性の原因を究明すべく、赤血球および卵巣への ^{125}I -insulin の特異的結合を検討した。その結果、PCO 患者では赤血球、卵巣とも、 ^{125}I -insulin への特異的結合が対照群に比し、有意に低値であることが判明した。

以上の成績は、PCO におけるインスリン抵抗性がレセプターの異常にある可能性を示唆する。しかし、インスリン抵抗性が、PCO 発症の原因であるのか、あるいは発症の結果であるのか、その解明は今後の研究にまたねばならない。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 268-275, 1987)

結 言

糖代謝異常、特に糖尿病患者において月経異常が多発することは古くから知られた事実である。インスリンが発見され、これが糖尿病の治療薬として使用される以前では、糖尿病婦人の約50%が無月経を呈したという報告¹⁾があり、本邦では1980年、本田ら²⁾は閉経前糖尿病患者の15.3%が無月経を認めたと報告している。また最近になって、インスリン抵抗性糖尿病患者において多嚢胞性卵巣症候群(PCO)が高率に合併することが報告³⁻⁶⁾されており、著者等も同様の患者を経験し、すでに報告した⁷⁾。

月経異常、特に PCO 患者における糖代謝異常に関しては、Burghen ら⁸⁾の報告以来いくつかの報告があり、いずれも PCO 患者においては、程度の差はあるもののインスリン抵抗性の存在することを示唆している。しか

し、本邦婦人における月経異常と糖代謝との関連性に関する報告は現在のところみあたらない。

そこで著者らは、わが国の月経異常婦人における糖代謝異常の有無を調べる目的で、まず正常比体重の無月経患者を第1度無月経、第2度無月経の2群に分け、糖負荷試験を行ない、血糖および血清 IRI の反応性を検討した。さらに、その結果明らかになった第1度無月経、特に PCO 患者のインスリン抵抗性の原因を探る目的で PCO 患者の赤血球および卵巣のインスリンレセプターについても検討を加えた。

研究対象ならびに方法

1. 研究対象

神戸大学医学部産科婦人科内分泌外来を受診した19歳から38歳(28.3±3.5歳, mean±SD)までの無月経患者35例を対象とした。その内訳は、第1度無月経(Am I°)

22例 (28.5±4.9歳), 第2度無月経 (Am II°) 13例 (28.3±4.1歳) である。

Am I° と Am II° の区別は progesterone 50mg の筋注による消腿性出血の有無によつた。また Am I° 群のうち, clomiphene 150mg にて排卵が起こらず, LH の基礎値が30mIU/ml 以上, 血中の testosterone が0.8ng/ml 以上を示したものを PCO 群とし, それ以外の Am I° 群を non-PCO 群とした。Am II° 群は, さらに FSH, LH が両者とも 30mIU/ml 以上のものを hypergonadotropic hypogonadism, 10mIU/ml 以下のものを hypogonadotropic hypogonadism, プロラクチンが30ng/ml 以上のものを hyperprolactinemia として区別した。

対照としては 21 歳から 40 歳までの正常月経周期婦人 14名 (32.4±5.4歳) を用いた。

2. 糖負荷試験

負荷試験は当日絶食絶水の条件下でブドウ糖75g を経口にて投与し, 負荷前, 負荷後30分, 60分, 120分, 180分に肘静脈より採血を行い, 採血した血液は2分し, 一方は血糖測定に, 他方はすみやかに血清を分離し, -20°Cにて凍結保存後, 血清 immunoreactive insulin (血清 IRI) の測定に供した。血糖は全血を用い glucose oxidase 法により, また血清 IRI は二抗体法による radio-immunoassay 法 (ダイナボット社製) により測定した。

なお, 糖負荷試験のデータ整理時比体重 (体重/標準体重×100: %) を考慮に入れたが, この際標準体重は松木の標準体重表⁹⁾より算出した。

3. 赤血球インスリンレセプターの検討

PCO の患者 6 例 (28.3±5.8歳, mean±SD), および対照としての正常月経周期婦人 5 例 (28.4±1.8歳) を対照とした。

早朝空腹時にヘパリン採血を行い, 直ちに小林らの方法¹⁰⁾にて radio-receptor-assay (RRA) を行つた。すなわち, 採血した血液 (約 5 ml) をまず 1,000g で 15 分間遠沈し, 上層の血漿と buffy coat を分離除去した。その pellet に生理食塩水 5 ml と lymphoprep 1 ml を加え攪拌し, 1,000g で再び 15 分間遠沈した後, Pasteur pipette にてその上清を吸引除去し赤血球の pellet のみを残した。その pellet を Hepes-Tris buffer にて充分洗浄し, 赤血球数を $3 \times 10^6/\text{mm}^3$ に調整したものをレセプター標品とした。その 400 μl に ^{125}I -insulin (NEN 製) 50 μl を加え攪拌し, 15°C pH 8.0 にて 210 分間 incubate した。Incubation 終了後, その assay system よりそれぞれ 100 μl を採取し bound insulin・free insulin の分離に供した。すなわち, microcentrifuge tube (容量 400 μl) にまず Hepes-Tris buffer を 200 μl 加え, その上層に dibutyl-phthalate を 100 μl 加え, さらにその上層にそれ

ぞれ assay system の 100 μl を重層した。そして, Beckman-model B microfuge にて約 90 秒の遠沈を行い, tube 先端の pellet 部分を切断し, 赤血球と結合した ^{125}I -insulin の放射活性を Beckman- γ -counter で測定した。

4. PCO 患者卵巣のインスリンレセプターの検討

PCO の診断にて開腹楔状切除術を受けた患者 3 例 (31.3±3.8歳, mean±SD) を対象とし, また子宮筋腫, 子宮頸癌の診断にて, 当科で卵巣摘出を行つた患者 4 例 (36.2±5.0歳) を対照とした。摘出した卵巣はそれぞれ生食で浸したガーゼにて包み, -60°C にて冷凍保存した後実験に供した。まず卵巣をそれぞれ手用的に細断し, 氷冷した Tris-HCl buffer を加え polyton homogenizer にて数回 homogenize したのち 2,000g にて 10 分間遠沈した。その pellet を crude ovary のレセプター標品とした。それを Tris-HCl buffer に suspend し, ローリー法¹¹⁾にて蛋白定量を行つた。その 100 μl に ^{125}I -insulin を 100 μl (約 0.4ng/ml) ならびに各量の非標識インスリンを添加し, よく攪拌した後, 4°C にて 24 時間の incubation を行つた。Tris-buffer (CaCl₂ 含) 1 ml を加え攪拌後 2,000g にて 30 分間遠沈し, 液層を吸引除去した後その pellet を Beckman- γ -counter にて count し, 結合インスリンの測定を行つた。

5. 統計処理

各グループの平均値間の有意差の検定は, Student の t 検定によつた。

研究成績

1. 糖負荷に対する反応性

a) 無月経患者における血糖および血清 IRI の反応性

無月経患者を Am I° 群と Am II° 群に分け, 糖負荷前後の血糖および血清 IRI の反応性を検討した。

なお, 対照群, Am I° 群, Am II° 群の比体重は, それぞれ 95.6±10.5 (mean±SD), 96.3±10.1, 95.0±9.5 で, 3 群間に有意の差は認められなかつた。

血糖の推移は図 1 上段に示すごとくである。糖負荷前の血糖値には 3 群間で全く差が認められず, 負荷後 30 分以降の値も Am I° 群でやや高値を示すものの, 対照群との間に有意の差が認められなかつた。

血清 IRI の推移は図 1 下段のごとくである。血清 IRI の基礎値および頂値には 3 群間に有意の差は認められなかつた。しかし, 120 分値では対照群の 42.9±17.7 $\mu\text{U}/\text{ml}$ (mean±SD) に対し, Am I° 群 78.1±48.8 $\mu\text{U}/\text{ml}$, Am II° 群 54.9±41.0 $\mu\text{U}/\text{ml}$, また 180 分値では, 対照群 21.2±13.1 $\mu\text{U}/\text{ml}$ に対し, Am I° 群 42.5±25.5 $\mu\text{U}/\text{ml}$, Am II° 群 36.4±33.3 $\mu\text{U}/\text{ml}$ と 120 分値, 180 分

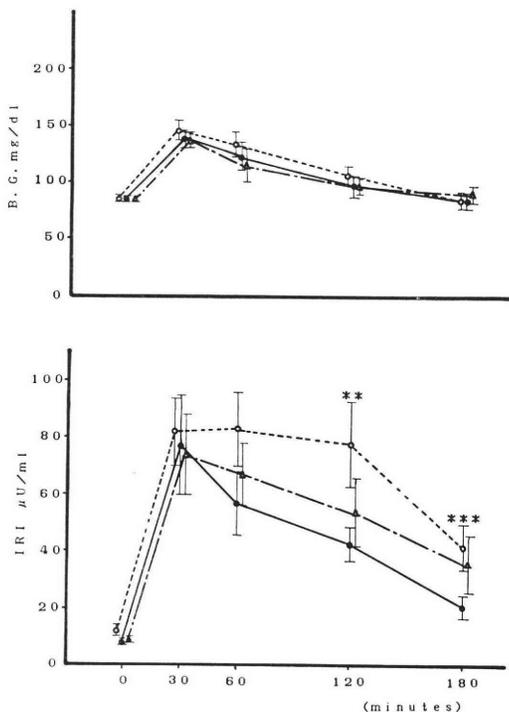


図 1 Blood Glucose and Serum IRI Response to 75g OGTT in Patients with Amenorrhea
 □ denotes mean±SE ** P<0.025
 ●—● denotes Control *** P<0.01
 ○··○ denotes Am I°
 △··△ denotes Am II°

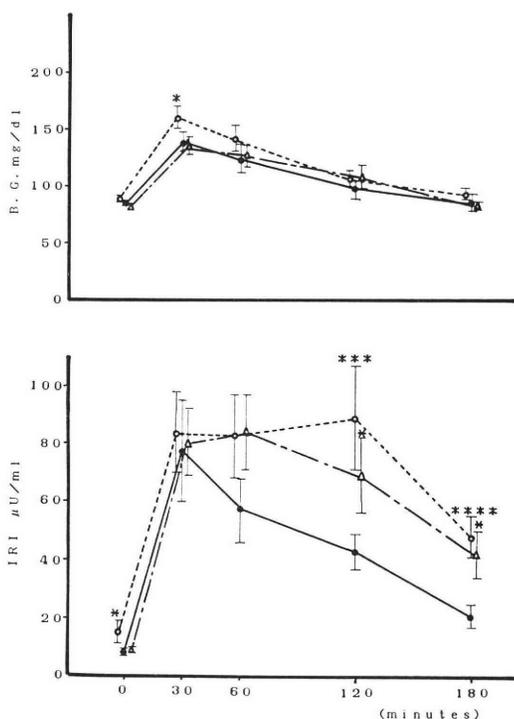


図 2 Blood Glucose and Serum IRI Response to 75g OGTT in Patients with Estrogenic Amenorrhea
 □ denotes mean±SE * P<0.05
 ●—● denotes Control *** P<0.01
 ○··○ denotes PCO **** P<0.005
 △··△ denotes non-PCO

値ともに対照群に比し、Am I°群で有意 ($p<0.025$, $p<0.01$) に高値であった。また対照群、Am II°群では血清 IRI の頂値が負荷後30分にみられたが、Am I°群では60分にあり、遅延傾向が認められた。

b) Am I°患者における血糖および血清 IRI の反応性
 Am I°群を PCO 群、non-PCO 群 (PCO 群以外の Am I° 患者) に分け、糖負荷前後の血糖および血清 IRI の推移を比較検討した。PCO 群、non-PCO 群の比体重は、それぞれ 93.9 ± 10.1 (mean±SD), 98.4 ± 10.1 で、両者間および対照群との間に有意の差を認めなかった。

図 2 は糖負荷前後の血糖および血清 IRI の動態を示したものである。non-PCO 群の血糖には、基礎値、負荷後の値とも、対照群との間に有意の差は認められなかった。PCO 群では、基礎値、60分値、120分値、180分値で対照群との間に有意差を認めなかったものの、30分値は対照群の 138.5 ± 22.1 mg/dl (mean±SD) に対し、PCO 群では 160.0 ± 26.7 mg/dl と、PCO 群で有意に ($P<0.05$) に高値を示した。

血清 IRI (図 2 下段) の30分値、60分値には対照群

と non-PCO、PCO 群との間に有意の差は認められなかった。しかし基礎値は、対照群の 8.3 ± 3.6 μU/ml に対し、PCO 群では 14.8 ± 9.8 μU/ml と、PCO 群で有意 ($P<0.05$) に高値であった。また120分値、180分値は対照群の 47.7 ± 19.7 μU/ml, 22.0 ± 15.3 μU/ml に対し、non-PCO 群では 69.3 ± 41.5 μU/ml ($P<0.05$), 40.2 ± 27.6 μU/ml ($P<0.05$), さらに PCO 群では 88.7 ± 56.8 μU/ml ($P<0.01$), 45.3 ± 24.0 μU/ml ($P<0.005$) と、それぞれ有意に高値を示した。なお、血清 IRI の peak は対照群では負荷後30分にみられたが、PCO 群では120分値にみられ、PCO 群で明らかに遅延していた。

図 3 は、対照群 (正常性周期婦人)、PCO 群とも比体重が110以上の者を選び、同様の検討を行ったものである。対照群 8 例、PCO 群 6 例の比体重は、それぞれ 120.6 ± 9.2 (mean±SD), 133.1 ± 14.6 で、両者の間に有意の差は認められなかった。血糖の反応性には 2 群間に全く有意の差は認められなかった。しかし血清 IRI 値は、PCO 群の基礎値および負荷後値とも対照群に比し、有意に高値であった。

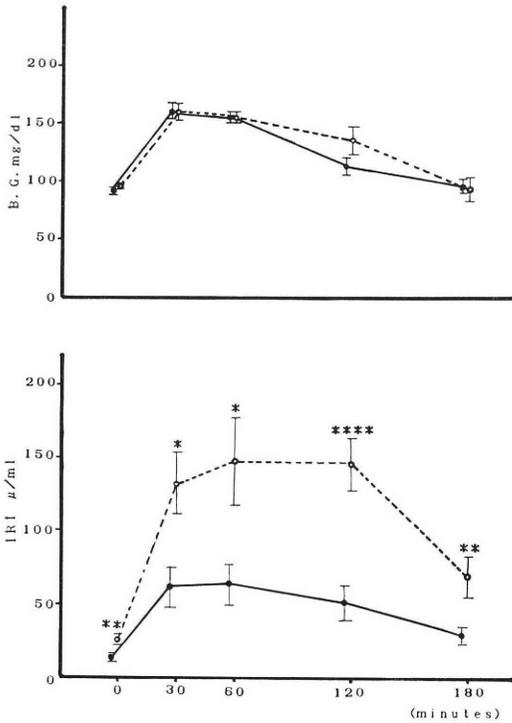


図 3 Blood Glucose and Serum IRI Response to 75g OGTT in Obese-Patients with PCO
 ⊠ denotes mean±SE * P<0.05
 ●—● denotes Control ** P<0.01
 ○---○ denotes PCO **** P<0.005

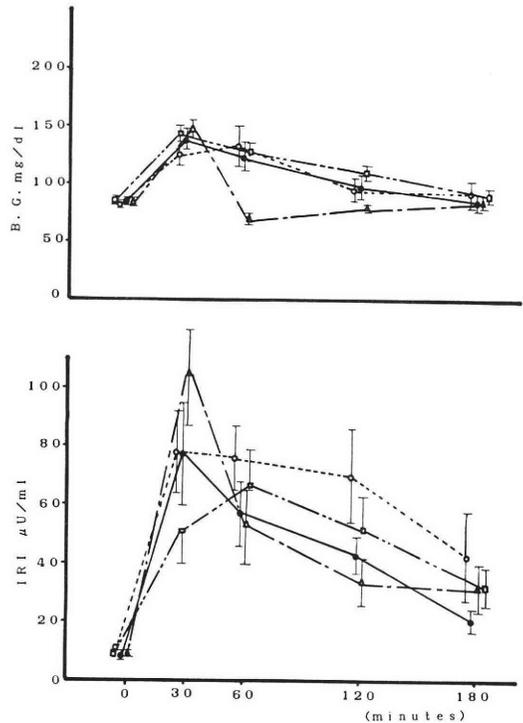


図 4 Blood Glucose and Serum IRI Response to 75g OGTT in Patients with Non-Estrogenic Amenorrhea
 ⊠ denotes mean±SE
 ●—● denotes Control
 ○---○ denotes hypogonadotropic hypogonadism
 △---△ denotes hypergonadotropic hypogonadism
 □---□ denotes hyperprolactinemia

c) Am II°群における検討

Am II°群において, hypergonadotropic hypogonadism, hypogonadotropic hypogonadism, hyperprolactinemia に分類して同様の検討を行った。

図 4 はその成績を示したものであるが, いずれの群の血糖値, 血清 IRI 値にも対照群との間に有意の差は認められなかった。

2. 赤血球インスリンレセプターの検討

表 1 に示すように赤血球インスリンレセプターの特異的結合は, PCO 群では 5.22 ± 0.79 (mean±SD), 対照群では 7.22 ± 1.58 であり, PCO 群において有意 ($P < 0.025$) に低値であった。

図 5 に示すように Scatchard plot を行つたところ, PCO 群に capacity の低下が見られ, 次に average affinity profile¹²⁾ (図 5 右図) を作成すると, K_e は PCO 群で $7.45 \times 10^7 M^{-1}$, 対照群で $7.05 \times 10^7 M^{-1}$ と両者の間の親和性に差が認められなかった。

3. ヒト卵巣インスリンレセプターの検討

ヒト卵巣組織のインスリンレセプターの特異的結合を表 1 に示す。特異的結合は, PCO 群で 13.4 ± 3.2 , 対

表 1 Specific Binding of ¹²⁵I-Insulin to Erythrocytes and Ovary of Patients with PCO

Receptor	n	normal	PCO
Erythrocyte (3×10^6 cell)	5	7.22 ± 1.58	5.22 ± 0.79 **
crude ovary (100 μg)	4	24.9 ± 5.5	13.4 ± 3.2 *

* $P < 0.05$ ** $P < 0.025$ mean ± SD

照群で 24.9 ± 5.5 であり, PCO 群で有意 ($P < 0.05$) に低値を示した。

図 6 に示す Scatchard plot より capacity は, PCO 群で 4.6×10^{-12} mol/mg·protein, 対照群 9.5×10^{-12} mol/mg·protein であり, PCO 群においてやや低値を示した。average affinity profile (図 6 右図) においては,

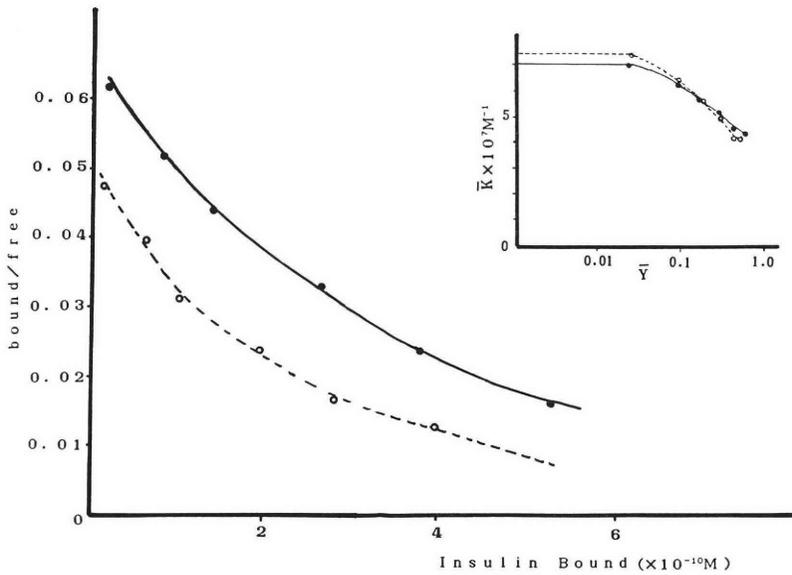


図 5 Scatchard Plot and Average Affinity Profile in Erythrocytes of the Patients with PCO
 ●—● denotes Control
 ○---○ denotes PCO

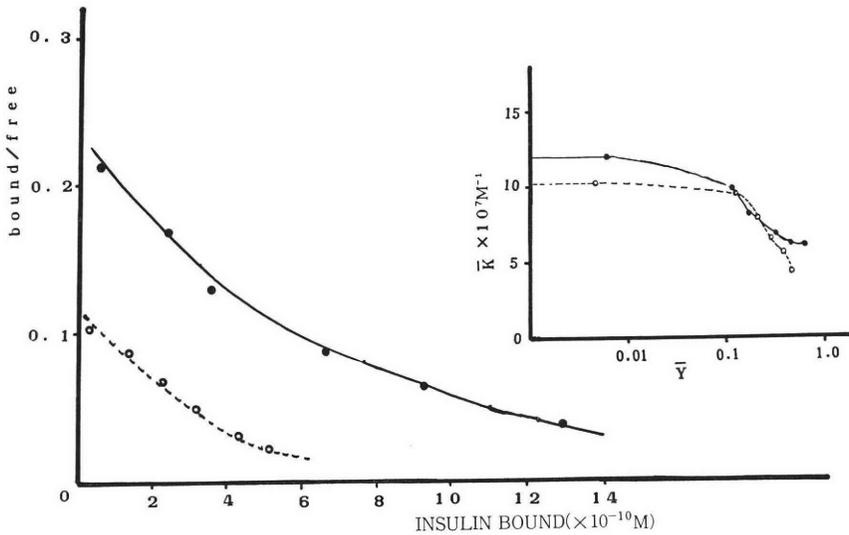


図 6 Scatchard Plot and Average Affinity Profile in the Ovary of Patients with PCO
 ●—● denotes Control
 ○---○ denotes PCO

Ke は PCO 群 $10.3 \times 10^7 M^{-1}$, 対照群 $12.0 \times 10^7 M^{-1}$ と親和性にほとんど差はなかつた。

考 案

無月経患者における糖負荷後の血糖の反応をみると、

第1度無月経群 (Am I°), 第2度無月経群 (Am II°) とも対照群との間にはほとんど差はみとめられなかつた。しかし、血清 IRI については、Am II°群では有意の値はみられなかつたものの、Am I°群では糖負荷後の差植が対照群に比して有意に高く、高値が比較的長時間

持続するという結果を得た。

そこで、Am I^o群を clomiphene 150mg, 5日間の投与で排卵が起こらず、LH の基礎値が30mIU/ml 以上、血中 testosterone が0.8ng/ml 以上を示すものを PCO 群、それ以外のものを non-PCO 群として2群に分け、同様の検討を行った。その結果、PCO 群では負荷後30分の血糖値が対照群に比して有意に高く、また血清 IRI の基礎値、負荷後値も対照群に比して有意に高値で、その peak が遅延するという成績を得た。non-PCO 群の血清 IRI 値が、負荷後120分、180分で対照群に比して有意に高値であるものの、PCO 群ほど著明ではないことからすると、Am I^o群における血清 IRI の過剰反応は、この群に多数の PCO 患者が含まれているためだとも推察される。しかし、ここで non-PCO 群としたものの中にも、形態学的にみて PCO と診断すべきものがかなりの数含まれていることを考慮しておく必要がある。

一方、Am II^o群では、血糖、血清 IRI の基礎値、反応値とも対照群との間に有意の差は認めず、この群をさらに hypergonadotropic hypogonadism, hypogonadotropic hypogonadism, hyperprolactinemia の3群に分けて検討を行っても、その結果は同様であつた。

PCO 群において、糖負荷に対する血清 IRI の基礎値および反応値が高値であるという臨床的な成績は、絶対値に相異があるものの non-obese PCO 患者を対象として糖負荷試験を行った Chang らの成績¹³⁾とほぼ一致するものであり、PCO 患者にはインスリン抵抗性が存在することを示唆するものである。

また、対象とした患者は平均比体重が96.3の非肥満者で、PCO 群のインスリン抵抗性が肥満に基づくものとは考えられないが、PCO 患者に肥満者が多いという事実を考慮し、平均比体重が133.1の肥満 PCO 患者および相応の比体重を持った肥満正常性周期婦人を対象に同様の検討を試みた。その結果、血糖値には対照群との間にほとんど差はないものの、血清 IRI は非肥満 PCO 群の成績にもまして、基礎値、反応値とも対照群に比し、著明に高いという成績を得た。この成績は、肥満 PCO 患者を対象として糖負荷試験を行った Burghen ら⁸⁾や Pasquali ら¹⁴⁾の成績と一致するものである。

つまり、以上の成績は、本邦における PCO 患者も欧米の患者と同様に非肥満者、肥満者を問わず、インスリン抵抗性を有することを示唆するものである。

インスリン抵抗性に関しては、先に述べた肥満の他に、PCO 患者では高アンドロゲン血症、インスリンレセプターの異常などが可能性としてあげられる。

肥満に関しては、すでに述べたごとく非肥満 PCO 患者でもインスリン抵抗性があること¹³⁾。また、肥満

PCO 患者の体重を diet により減じてインスリン抵抗性に変化のみられないこと¹⁵⁾などからして、肥満のみが PCO 患者のインスリン抵抗性の原因とは考えられない。

アンドロゲンとインスリンの関連性についてはいくつかの報告^{8,16-18)}がある。PCO 患者では、血清 IRI の基礎値あるいは反応値が血中 testosterone や androstenedione と正の相関を示すことから、Chang¹⁹⁾らは PCO におけるインスリン抵抗性を高アンドロゲン血症の結果であると推測している。事実、合成アンドロゲンである oxymetholone を aplastic anemia の小児に投与すると、耐糖能が低下し、高インスリン血症が生じることが報告²⁰⁾されている。

しかし、われわれの成績では、血清 testosterone と血清 IRI の基礎値、peak 値との間には相関関係は認められなかつた。また、testosterone を正常人に投与しても耐糖能には変化はみられない²¹⁾し、高アンドロゲン血症患者の両側卵巣を摘除し、アンドロゲン レベルを正常域にもどしてもインスリン抵抗性には変化は認められないとする報告¹⁸⁾もある。

一方、逆に高インスリン血症が高アンドロゲン血症を引き起すとする説もある。Adashi ら²²⁾はインスリンは hCG 刺激下のラット睾丸細胞の testosterone 産生能を用量反応性に高めるとしているし、Barbieri ら²³⁾はインスリンは卵巣夾膜細胞のアンドロゲン産生を促進するとしている。

以上のごとく、PCO 患者における高アンドロゲン血症と高インスリン血症との因果関係は現在のところ明らかではない。

インスリン抵抗性の原因の一つにインスリンレセプターの異常があげられる。その代表的な疾患がインスリン抵抗性糖尿病で、Kahn ら⁹⁾により type A と type B に分けられているが、非常に興味深いことに、特に type A の患者では高頻度に PCO を合併することが報告されている^{3,4,7)}。

そこで、PCO 患者におけるインスリンレセプターの異常の有無をさぐる目的で PCO 患者の赤血球あるいは卵巣を用いて、¹²⁵I-insulin の特異的結合について検討を行つてみた。その結果、PCO 患者においては赤血球、卵巣の両者において、¹²⁵I-insulin に対する特異的結合が正常性周期婦人に比し、有意に低値を示すことが明らかとなつた。これを Scatchard plot よりみると、インスリンレセプターの capacity は PCO 患者で低い傾向にあり、affinity についてはほとんど差は認められず、特異的結合の低値はレセプターの数の減少に起因する可能性が示唆された。

赤血球におけるインスリンレセプターは全身のインス

リンレセプターの状態を反映しているとされており¹⁰⁾, このことからすると, 今回実験対象となった PCO 患者では卵巣を含め全身の臓器のインスリンへの特異的結合が低下しているものと考えられる。

つまり, これらの成績は PCO 患者におけるインスリン抵抗性が主としてインスリンレセプターの異常に起因する可能性を示唆するものである。

卵巣におけるインスリンレセプターの存在はすでに Posner²⁴⁾ら, Poretsky²⁵⁾らによって明らかにされている。May²⁶⁾らは豚顆粒膜細胞を用いた *in vivo* の実験で, インスリンには FSH の存在下で LH/hCG レセプターの誘導を行うとともに, progesterone の産生も促進すると報告しており, 共同研究者の大谷ら^{27,28)}も同様の実験成績を示している。つまり, インスリンは顆粒膜細胞の機能発現に必須のホルモンであり, 何らかの原因でインスリンの作用が発現されない場合には顆粒膜細胞がその機能を停止してしまうものと推察される。

今回, われわれの行った PCO 患者における卵巣のレセプター検討は whole ovary を homogenize して用いたため, 卵巣のどの細胞成分のインスリンレセプターの動態を反映しているのか明確ではない。しかし, 赤血球の成績からみるごとく, 全身のインスリンレセプターの特異的結合が低下していることから総合勘案すると, 顆粒膜細胞もその例外ではないものと思われる。

卵巣のインスリンレセプターの特異的結合の低下が PCO 発症の原因であるのか否かは不明であるが, かりに顆粒膜細胞におけるインスリン作用に異常が生じたとすれば, そのために顆粒膜細胞の機能が停止し, その結果, 発育途上にある卵胞が閉鎖し, その数が蓄積されて PCO が生じるという一つの仮説も成立つものと考えられる。

文 献

- 1) Gold, J. J.: Gynecologic Endocrinology. Harper & Row, New York, p. 196, 1975.
- 2) 本田正志, 大森安恵, 平田幸正: 精尿病患者の無月経, 糖尿病, 23: 697, 1980.
- 3) Kahn, C. R., Flier, J. S., Bar, R. S., Archer, J. A., Gorden, P., Martin, M. M. and Roth, J.: The syndrome of insulin resistance and acanthosis nigricans. N. Engl. J. Med., 294: 739, 1976.
- 4) 植田太郎, 崎元哲郎, 麻生宜則, 加藤堅一, 井村 博, 大森安恵: 多嚢胞性卵巣を伴い, 抗インスリン受容体抗体によると思われるインスリン抵抗性若年糖尿病の一例, 代謝, 15: 1169, 1978.
- 5) Bar, R. S., Muggeo, M., Roth, J., Kahn, C. R., Havrankova, J., Imperato-Mcginley, J.: Insulin resistance, acanthosis nigricans, and normal insulin receptor in a young woman: Evidence for a postreceptor defect. J. Clin. Endocrinol. Metab., 47: 620, 1978.
- 6) Gibson, M., Schiff, I., Tulchinsky, D. and Ryan, K. J.: Characterization of hyperandrogenism with insulin-resistant diabetes Type A. Fertil. Steril., 33: 501, 1980.
- 7) 幸村信行, 藤原卓夫, 片山和明, 望月真人: インスリン抵抗性糖尿病を合併した多嚢胞性卵巣症候群の一例, Diabetes Journal, 11: 163, 1983.
- 8) Burghen, G. A., Givens, J. R. and Kitabchi, A. E.: Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. J. Clin. Endocrinol. Metab., 50: 113, 1980.
- 9) 松木 駿: 標準体重の考え方, 最新医学, 38: 284, 1983.
- 10) 小林 正: 血球インスリン, レセプターの測定法, 臨床化学, 9: 378, 1980.
- 11) Lowly, H. L., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- 12) Meyts, P. and Roth, J.: Cooperativity in binding: A new graphic analysis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 66: 1118, 1975.
- 13) Chang, R. J., Nakamura, R. M., Judd, H. L. and Kaplan, S. A.: Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57: 356, 1983.
- 14) Pasquali, R., Venturli, S., Paradis, R., Capelli, M., Parenti, M. and Melchionda, N.: Insulin and C-peptide levels in obese patients with polycystic ovaries. Horm. Metabol. Res., 14: 284, 1982.
- 15) Pasquali, R., Fabbri, R., Venturoli, S., Paradisi, R., Antenucci, D. and Melchionda, N.: Effect of weight loss and antiandrogenic therapy on sex hormone blood levels and insulin resistance in obese patients with polycystic ovaries. Am. J. Obstet. Gynecol., 154: 139, 1986.
- 16) Shoupe, D., Kumar, D. D. and Lobo, R. A.: Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Am. J. Obstet. Gynecol., 147: 588, 1983.
- 17) Shoupe, D. and Lobo, R. A.: The influence of androgens on insulin resistance. Fertil. Steril., 41: 385, 1984.
- 18) Nagamami, M., Dinh, T. V. and Kolver, M. E.: Hyperinsulinemia in hyperthecosis of the ovaries. Am. J. Obstet. Gynecol., 154: 384, 1986.
- 19) Chang, R. J. and Geffner, M.: Associated

- non-ovarian problems of polycystic ovarian disease: Insulin resistance. *Obstetrics and Gynecology*, 12: 675, 1985.
- 20) Woodward, T. L., Burghen, G. A., Kitabchi, A. E., Williams, J. A.: Glucose intolerance and insulin resistance in aplastic anemia treated with oxymetholone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 905, 1981.
- 21) Landon, J., Wynn, V. and Samols, E.: The effect of anabolic steroids on blood sugar and plasma insulin level in man. *Metabolism*, 12: 924, 1963.
- 22) Adashi, E. Y., Fabrics, C. and Hsueh, A. J. W.: Insulin augmentation of testosterone production in primary culture of rat testicular cells. *Biol. Reprod.* 26: 270, 1982.
- 23) Barbieri, R. L., Makris, A. and Ryan, K. J.: Effect of insuline on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. *Fertil. Steril.* 40: 237, 1983.
- 24) Posner, B. I., Kelly, P. A., Shiu, R. P. C. and Friesen, H. G.: Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: Tissue distribftion species variation and characterization. *Endocrinology*, 95: 521, 1974.
- 25) Poretsky, L., Smith, D., Seibel, M., Pazianos, A., Moses, A. C. and Filer, J. S.: Specific insulin bindings sites in human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 59: 809, 1984.
- 26) May, J. V. and Schomberg, D. W.: Granulosa cell differentiation *in vitro*: Effect of insulin on growth and functional integrity. *Biol. Reprod.*, 25: 421, 1981.
- 27) 大谷徹郎, 丸尾 猛, 幸村信行, 望月眞人: 顆粒膜細胞の機能分化における insulin の影響に関する細胞生物学的研究, *産婦進歩*, 36: 201, 1984.
- 28) Otani, T., Maruo, T., Yukimula, N. and Mochizuki, M.: Effect of insulin on porcine granulosa cells: implication of a possible

receptor mediated action. *Acta Endocrinologica*, 108: 104, 1985.

Insulin resistance and insulin receptor profile of the patients with PCO

**Nobuyuki Yukimura, Kazuaki Katayama
and Matsuto Mochizuki**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University School of Medicine

Response of blood glucose and serum immunoreactive insulin (IRI) after a 75 g oral glucose load was studied in 35 patients with amenorrhea. The results were compared with those of 14 normally ovulating subjects.

The levels of IRI before and after loading of glucose in the group of patients with estrogenic amenorrhea, especially the group of patients with PCO, were significantly higher than those in the control group. The same results were obtained in obese patients with PCO. These results seems to indicate that hyperinsulinism or insulin resistance may be a common feature of PCO, independent of the presence of obesity.

To investigate the mechanism of insulin resistance in PCO, insulin binding sites and receptor affinities of erythrocytes and ovary of the patients with PCO were mesured. Specific binding sites in erythrocytes and ovary of the patients with PCO were significantly lower compared with those of normal subjects. But the receptor affinities of both erythrocytes and ovary of patients with PCO were similar to those of normal subjects.

These results indicate that insulin resistance exists even in the Japanese patients with PCO and suggest that insulin resistance may be one of the causes of PCO.

(受付: 昭和61年9月19日)

EFFECTS OF HACHIMIJIogan, TOKISHAKUYAKUSAN AND KEISHIBUKURYOGAN ON ESTROGEN AND PROGESTERONE SECRETION IN OVARIAN FOLLICLES

Satoshi USUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba, Niihari-gun, Ibaraki 305, Japan

Abstract: Rat ovarian follicles excised 48 hours after the injection of 10 IU PMS at 27 days of age were incubated or perfused with NIH-LH, Hachimijiogan (TJ-7), Tokishakuyakusan (TJ-23) and Keishibukuryogan (TJ-25).

The incubation or perfusion medium was assayed for estradiol-17 β (E₂) and progesterone by radioimmunoassay.

TJ-7, TJ-23 or TJ-25 showed a decrease of E₂ levels in the incubation medium but no effect in the perfusion study, whereas the effect of LH on E₂ secretions was augmented when they were utilized together with LH. In contrast, TJ-7 or TJ-23 increased progesterone concentrations in both incubation and perfusion media, while the effect of LH on progesterone secretions was decreased when TJ-7, TJ-23 and TJ-25 were used together with LH.

These results suggest that TJ-7 or TJ-23 stimulates rat preovulatory follicles to secrete progesterone and that the combination treatment of TJ-23 with LH multiplies the sole effect of LH on E₂ secretions but that the addition of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 to LH suppresses the effect of LH alone on progesterone secretions. The effect of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 alone on the E₂ secretion is questionable.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(2), 276-283, 1987)

Introduction

Chinese herbal medicines have been used in safe for more than 2,000 years. However, it is the known fact that there are many Chinese medicines which have been utilized only empirically without clarification of the mechanism of their efficacies. Of late, there have been extensive efforts to supply a gap between the Chinese medicine and Western medicine from the Western medical point of view. However, there are very few basic studies on the relationship between Chinese herbal medicines and gonadal steroidogenesis. TJ-7, TJ-23 and TJ-25 are known to have been widely used in the field of fertility and sterility, and recently, Usuki^{2,4,5,8,12,13)} reported that TJ-7 improves spermatogenesis

and increases serum E₂ levels in men and that TJ-23 or TJ-25 stimulates rat corpora lutea to secrete progesterone.

This study was carried out to basically clarify *in vitro* the effects of TJ-7, TJ-23 and TJ-25 on estrogen and progesterone secretions by rat preovulatory follicles.

Materials and Methods

Immature female Wistar-Imamichi rats purchased from the Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama, Japan) were maintained in air-conditioned quarters illuminated between 08.00 and 20.00 h. The animals were injected subcutaneously with 10 IU of PMS (Pregnant mare's serum gonadotropin; Teikokuzoki Co., Ltd., Tokyo, Japan) on day 27 of age and killed by cervical dislocati-

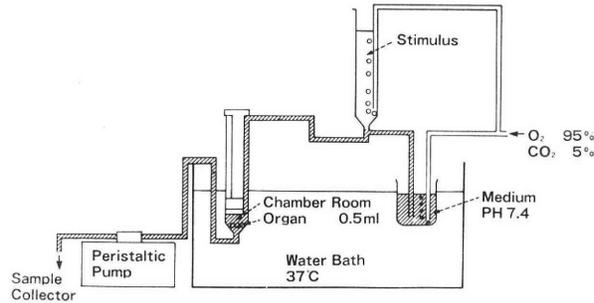


Fig. 1 Perifusion system

on under ether anesthesia 48 hours later. The ovaries were resected, cleaned off surrounding tissue, blotted, and then large follicles (about 0.75–1 mm in diameter) were excised under a dissecting microscope.

Incubation or Perifusion study

Twenty follicles were preincubated for 60 minutes in the synthetic TC-199 media containing 1% glucose and 0.2% NaHCO_3 , at 37°C in an atmosphere of 95% O_2 -5% CO_2 , and subsequently, the incubation was carried out for 120 minutes under the same condition, with 2.0 ml of synthetic media containing various doses (dry weights of each extract) of TJ-7, TJ-23, TJ-25 and LH as described in legends for Figures.

In a parallel experiment, follicles were perfused in the apparatus illustrated in Fig. 1. Twenty follicles were placed in a chamber room (0.5 ml in volume) and exposed to a continuous flow (flow rate 2.5 ml per 20 minutes) of synthetic TC-medium 199 (1.0% glucose and 0.2% NaHCO_3 , pH 7.4) saturated with a mixture of 95% O_2 -5% CO_2 . The medium was maintained at 37°C in a water bath and forced through the apparatus by a multichannel infusion pump (Yoshie Science Co., Ltd., Tokyo, Japan). The effluent medium was collected every 20 minutes over a period of 300 minutes in an automatic fraction collector. Following a 20 minute-preincubation, the medium was delivered for 60 minutes to stabilize flow rate without any addition of stimuli, and then 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TJ-7, TJ-23, TJ-25 and LH, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LH+20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TJ-7, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LH+20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TJ-23 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LH+20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TJ-25 were each infused together with the perifusion medium.

The incubation and perifusion media were kept at -20°C until assayed for E_2 and progesterone by radioimmunoassay.

Chinese herbal medicines

The main component herbs (plants) contained in TJ-7, TJ-23 and TJ-25 are shown in Table 1. These extracts were given from Tsumura-Juntendo Co., Ltd. (Tokyo, Japan) and dissolved directly in the medium.

LH preparation

LH (ovine luteinizing hormone; NIAM-DD-oLH-25, having an LH potency $2.3\times$ that of NIH-LH-S1, an FSH potency less than $0.005\times$ that of NIH-FSH-S1 and a prolactin potency less than $0.001\times$ that of NIH-prolactin) was kindly given from Dr. A.F. Parlow.

Radioimmunoassay

Concentrations of E_2 and progesterone in incubation or perifusion medium were measured by radioimmunoassay. The rabbit antiserum to 6-oxoestradiol-17 β -6-oxime-BSA (bovine serum albumin) was used for the assay of E_2 , and progesterone-3-oxime-BSA for progesterone.

The cross-reactivities of the E_2 -antiserum with progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, testosterone and androst-4-ene-3,17-dione were <0.08 , <0.08 , 0.29 and 0.44% respectively.

[2, 4, 6, 7- ^3H]- E_2 (sp. act. 130 Ci/mmol: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.) or [1, 2, 6, 7- ^3H (N)]-progesterone (sp. act. 115 Ci/mmol: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.) was used for assay and recovery reagent. The medium was extracted with 8 ml of ethyl ether and

Table 1 Main components of Hachimijiogan (TJ-7), Tokishakuyakusan (TJ-23) and Keishibukuryogan (TJ-25)

Herbs (Plants)	Family (Familia)	Parts used	TJ-7	TJ-23	TJ-25
Hoelen* ¹ (Hoelen)	Fungi	nuclei	3* ²	4* ²	3* ²
Peony root (Paeoniae Radix)	Paeoniaceae	roots		4	3
Alisma rhizome (Alismatis Rhizoma)	Alismataceae	rootstocks	3	4	
Mountain bark (Mountain Cortex)	Paeoniaceae	rootbarks	2.5		3
Cassia (Cinnamomi Cortex)	Lauraceae	barks	1		3
Rehmannia root (Rehmanniae Radix)	Bignoniaceae	roots	6		
Atractylodes lancea rhizome (Atractylodis Lanceae Rhizoma)	Compositae	rootstocks		4	
Japanese angelica root (Angelicae Radix)	Umbelliferae	roots		3	
Cnidium rhizome (Cnidii Rhizoma)	Umbelliferae	roots		3	
Cornus fruit (Corni Fructus)	Cornaceae	fruits	3		
Dioscorea rhizome (Dioscoreae Rhizoma)	Dioscoreaceae	rootstocks	3		
Peach kernel (Persicae Semen)	Rosaceae	seeds			3
Aconite root (Aconiti Tuber)	Ranunculaceae	roots	0.5		

*¹ English (Latin in parentheses).

*² Values are the amount (g) of each herb contained.

Chemical constituents should be referred to the previous report¹²⁾.

evaporated under N₂ and air in a heating block at 40°C.

After evaporation of the ethyl ether, the residue was chromatographed on a Sephadex LH-20 (0.5 gm) column in benzene and methanol (85 : 15, v/v). The E₂ or progesterone antiserum was added to the separated fractions. The E₂ and progesterone antisera were diluted 1 : 50,000 and 1 : 10,000 respectively in borate buffer (0.05 M; pH 8.0) containing BSA (0.06 %), human gamma-globulin (0.05 %) and 1.8 × 10⁻⁷ Ci [2, 4, 6, 7-³H(N)]-E₂ or [1, 2, 6, 7-³H(N)]-progesterone.

The samples were incubated for 30 minutes at 20°C. Blanks and standard samples of E₂ or progesterone (0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 and 1000 pg) were assayed in duplicate together with the experimental samples. Bound and free hormones were separated by incubation for 10 minutes with 0.5 ml saturated ammonium sulphate and centrifugation for 10 minutes at 3,000 revolutions per minute (r.p.m.) at 4°C.

The supernatant fractions were collected, and then liquid scintillation counting was carried out by using scintillation fluid (a mixture of 0.3 % PPO and 0.03 % dimethyl POPOP in toluene and Insta-Gel; Packard Instruments, Downers Grove, Illinois, U.S.A.; 1 : 1, v/v, 10 ml). Water blanks were close to zero for E₂ or progesterone. Accuracy

was assessed by adding known quantities of E₂ or progesterone (0, 20, 50, 100, 200 and 500 pg/ml) to the medium and assaying the extracts. Interassay coefficients of E₂ and progesterone were 7.6 and 8.5 % respectively. Intrassay coefficients of E₂ and progesterone were 12.6 and 16.7 % respectively. The linear regression analysis of the results gave the equation $y=1.03x+0.5$ ($r=0.99$, $P<0.01$) for E₂ and $y=0.90x+11.9$ ($r=0.93$, $P<0.01$) for progesterone, where y =amount recovered and x =amount added.

The mean extraction efficiencies of E₂ and progesterone were 84.3 ± 8.3 and 88.7 ± 7.8 % respectively.

The assay sensitivities of E₂ and progesterone were 10 and 20 pg/ml respectively.

All extracts of the preparations didn't influence the binding of E₂ and progesterone to their respective antisera (data not shown).

Data were expressed as pg/mg wet weight follicular tissue and statistically assessed by Student's *t*-test.

Results

As shown in Fig. 2, E₂ levels were significantly ($P<0.001$, $P<0.01$) decreased by 0.2–200 μg/ml of TJ-7, 0.2 and 200 μg/ml of TJ-23 or 200 μg/ml of TJ-25 in the follicles incubated and its effect was most remarkable

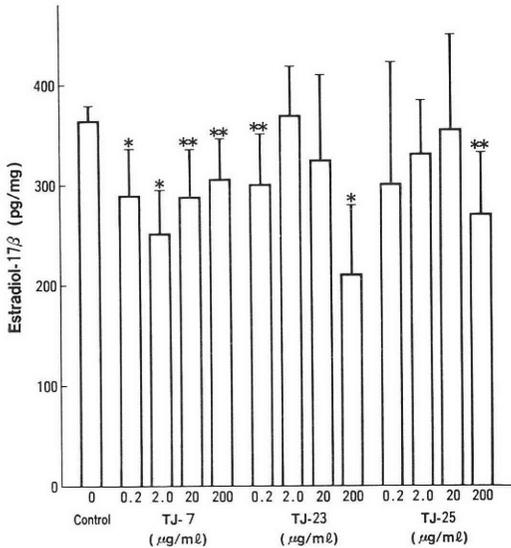


Fig. 2 Effects of TJ-7, TJ-23 and TJ-25 on estrogen secretions in immature rat ovaries incubated *in vitro*.

10 IU of PMS was injected on day 27 of age and incubation was done 48 hours after the PMS injection. The values are means±SD (vertical bars) of ten experiments.

*P<0.001, **P<0.01 compared with control groups (Student's *t*-test).

by TJ-7. 0.002-0.02 μg/ml of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 showed no significant effect (data not shown).

Fig. 3 revealed the results of effects of LH alone, LH+TJ-7, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 on E₂ secretions by preovulatory follicles. LH alone significantly (P<0.01, P<0.05) augmented E₂ levels compared to the control group. The combination treatment of LH+TJ-7, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 also significantly (P<0.01, P<0.001, P<0.001.) increased E₂ concentrations and their effects on E₂ secretions were almost similar to those of LH alone. Furthermore, the combination treatment of 20 μg/ml of LH+2.0 μg/ml of TJ-23 showed a significant (P<0.05) increase in E₂ secretions as compared with 20 μg/ml of LH alone.

On the contrary, progesterone secretions were significantly (P<0.01) increased by 20 μg/ml of TJ-7 or 0.2-20 μg/ml of TJ-23, while TJ-25 showed a tendency to decrease without significance (Fig. 4). Progesterone concentrations were also significantly (P<

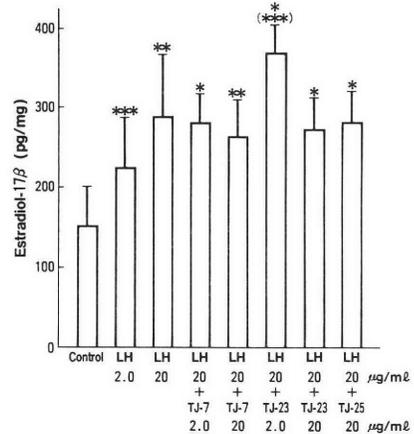


Fig. 3 Effects of LH, LH+TJ-7, LH+TJ-23 and LH+TJ-25 on estrogen secretions in immature rat ovaries incubated *in vitro*. 10 IU of PMS was injected subcutaneously on day 27 of age and incubation was done 48 hours after the PMS injection. The values are means±SD (vertical bars) of ten experiments.

*P<0.001, **P<0.01, ***P<0.05 compared with control groups. (***)P<0.05 compared with 20μg/ml of LH (Student's *t*-test).

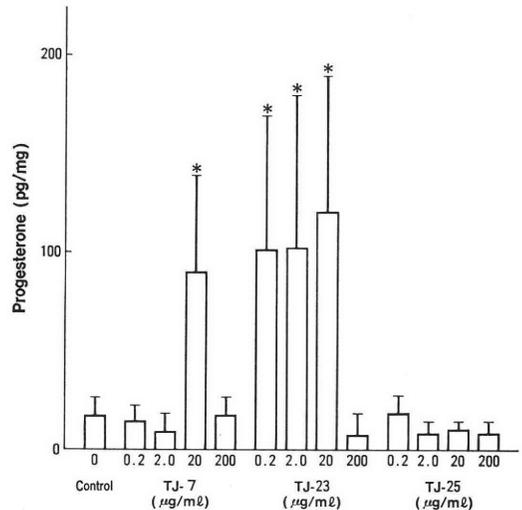


Fig. 4 Effects of TJ-7, TJ-23 and TJ-25 on progesterone secretions in immature rat ovaries incubated *in vitro*.

10 IU of PMS was injected on day 27 of age and incubation was done 48 hours after PMS injection. The values are means±SD (vertical bars) of ten experiments.

*P<0.01 compared with control groups (Student's *t*-test).

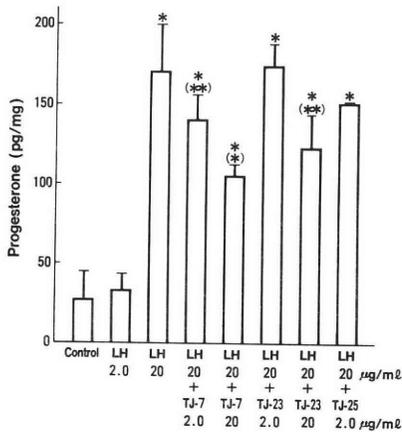


Fig. 5 Effects of LH, LH+TJ-7, LH+TJ-23 and LH+TJ-25 on progesterone secretions in immature rat ovaries incubated *in vitro*.

10 IU of PMS was injected subcutaneously on day 27 of age and incubation was done 48 hours after the PMS injection. The values are the means±SD (vertical bars) of ten experiments.

*P<0.001 compared with control groups. (*P<0.01, (**P<0.05 compared with 20µg/ml of LH (Student's *t*-test).

0.001) increased by 20 µg/ml of LH, LH+TJ-7, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 as compared with those of control groups, while the combination treatment of 20 µg/ml of LH+2-20 µg/ml of TJ-7 or 20 µg/ml of TJ-23 revealed a significant (P<0.01, P<0.05) decrease in progesterone levels as compared with LH alone (Fig. 5).

In a perfusion study, LH alone, LH+TJ-7, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 increased E₂ levels in the effluents 20 to 40 minutes after the initiation of each stimulation and reached their peaks 120 to 140 minutes later, thereafter showing a plateau or slight decrease, while the single treatment of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 showed no effect on the levels of E₂ (Fig. 6). The response to LH+TJ-23 somewhat exceeded that of LH alone although the response to LH exceeded that of LH+TJ-7 or TJ-25.

As shown in Fig. 7, progesterone secretions were augmented by TJ-7 or TJ-23 alone or the combination treatment of 20 µg/ml of LH+TJ-7, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 in the same manner as by 20 µg/ml of LH alone as compared with those of the control group,

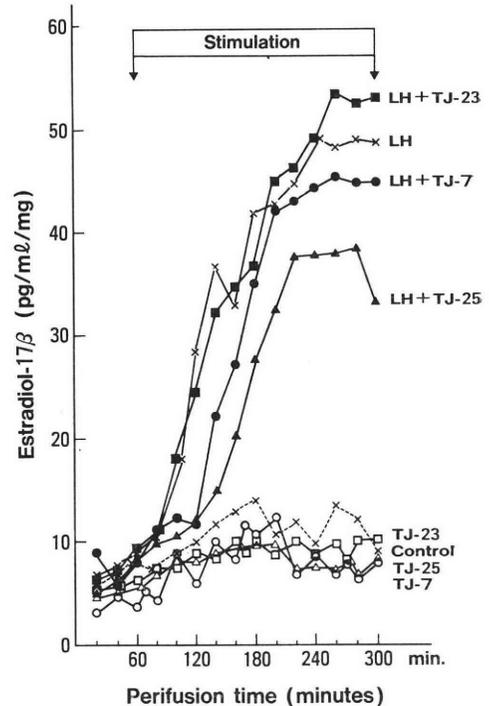


Fig. 6 Effects of LH, TJ-7, TJ-23, TJ-25, LH+TJ-7, LH+TJ-23 and LH+TJ-25 on estrogen secretions in immature rat ovaries perfused *in vitro*.

10 IU of PMS was injected on day 27 of age and incubation was done 48 hours after the PMS injection.

Data represent the means of three determinations.

×··× ; control, ×-× ; 20µg/ml of LH, ○-○ ; 20µg/ml of TJ-7, □-□ ; 20µg/ml of TJ-23, △-△ ; 20µg/ml of TJ-25, ●-● ; 20µg/ml of LH+20µg/ml of TJ-7, ■-■ ; 20µg/ml of LH+20µg/ml of TJ-23, ▲-▲ ; 20µg/ml of LH+20µg/ml of TJ-25.

but the effects of TJ-7, TJ-23 and TJ-25 on LH stimulation of progesterone secretion were relatively weaker than those of LH alone. TJ-25 showed no effect on progesterone secretions and the addition of TJ-25 to LH showed a slightly increased levels of progesterone.

Discussion

In the incubation study some doses of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 decreased E₂ secretions, while 20 µg/ml of TJ-7 or 0.2-20 µg/ml of TJ-23 increased progesterone levels. These results

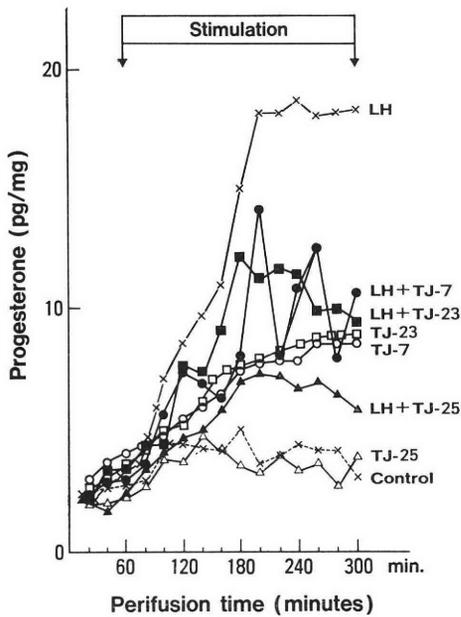


Fig. 7 Effects of LH, TJ-7, TJ-23, TJ-25, LH +TJ-7, LH+TJ-23 and LH+TJ-25 on progesterone secretions in immature rat ovaries perfused *in vitro*.

10 IU of PMS was injected on day 27 of age and incubation was done 48 hours after the PMS injection.

Data represent the means of three determinations.

x...x ; control, O—O ; 20 μ g/ml of TJ-7, □—□ ; 20 μ g/ml of TJ-23, Δ — Δ ; 20 μ g/ml of TJ-25, ●—● ; 20 μ g/ml of LH+20 μ g/ml of TJ-7, ■—■ ; 20 μ g/ml of LH+20 μ g/ml of TJ-23, ▲—▲ ; 20 μ g/ml of LH+20 μ g/ml of TJ-25.

suggest that TJ-7, TJ-23 or TJ-25 may have a tendency to suppress E₂ secretions by rat preovulatory follicles and that TJ-7 or TJ-23 may stimulate preovulatory follicles to produce progesterone. TJ-7 or TJ-23 at the high dose 200 μ g/ml had no stimulatory effect on progesterone secretion. This mechanism remains to be investigated.

By preovulatory follicles of the PMS-primed immature rat ovaries LH stimulates predominantly E₂ secretion in media^{1-4,7}). Therefore, the effect of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 on LH stimulation of E₂ or progesterone secretions was examined. As for E₂ levels, the combination treatment of LH+TJ-23, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 significantly stimulated E₂ secretions to almost the same extent as

LH alone and E₂ levels by the addition of 2 μ g/ml of TJ-23 to LH exceeded those by LH alone. This suggests that TJ-7, TJ-23 or TJ-25 does not interfere with the action of LH on E₂ secretions and that TJ-23 may multiply the effect of LH on E₂ secretion by preovulatory follicles.

The concentrations of progesterone were also significantly increased by the combination treatment of LH+TJ-7, LH+TJ-23 or LH+TJ-25 but the response to LH far exceeded that of the addition of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 to LH. By the follicles at this stage, LH stimulates the secretions of E₂, progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP)⁴), and so, the combination of LH+TJ-7 or LH+TJ-23 may promote the production of 17 α -OHP. These mechanisms are also to be elucidated.

The perfusion technique is ideally suited to study *in vitro* the dynamics and mode of the steroid secretion like the *in vivo* study. In this study, 20 μ g/ml of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 revealed no effect on E₂ secretion. The result of the former one is different from that in the incubation study and those of the latter two are in consistency with those in the incubation experiment.

These results indicate that TJ-7, TJ-23 or TJ-25 may have no stimulation of E₂ secretion. The inhibitory effect of E₂ by TJ-7 must await further studies.

The addition of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 to LH increased E₂ levels in accordance with the result in the incubation experiment and the efficacy by the addition of TJ-23 to LH somewhat exceeded that by LH alone. This suggests that TJ-7, TJ-23 and TJ-25 may not disturb the stimulation of E₂ secretion by LH alone and preferably TJ-23 may augment the stimulatory effect of LH.

As for progesterone secretions, the stimulation of progesterone secretion by TJ-7 and TJ-23 was present in both incubation and perfusion studies. TJ-25 had no effect on progesterone levels. This indicates that TJ-7 and TJ-23 may stimulate preovulatory follicles to secrete progesterone. TJ-25 is known to stimulate rat corpora lutea to secrete progesterone¹²) but no stimulatory effect was observed in the preovulatory follicles. This may depend on the different sensitivities of preovu-

latory follicles or corpora lutea to TJ-25. The addition of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 to LH in the perfusion experiment increased progesterone concentrations and the effect seemed to be half of that of LH alone. This accords with that in the incubation study. This result suggests that TJ-7, TJ-23 or TJ-25 may suppress the stimulatory effect of LH alone on progesterone secretions by preovulatory follicles. However, it remains still undetermined whether these effects described above may be due to the whole combination effects of various components or the sole effect of the constituent of each Chinese herbal medicine. Furthermore, Usuki^{6,7,9-11,14} reported that pituitary gonadotropins are closely related to the induction of DNA polymerase- α activity for cell proliferation, oocyte maturation and steroidogenesis, and therefore the effect of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 on DNA polymerase activity should be also examined from a molecular point of view.

The detailed clarification of these mechanisms awaits future investigations.

The present experiments indicate that TJ-7 or TJ-23 may stimulate rat preovulatory follicles to secrete progesterone and that TJ-23 may tend to multiply the stimulatory action of LH alone on E_2 secretions but to suppress the action of LH on progesterone secretions when TJ-7, TJ-23 and TJ-25 are utilized together with LH.

The effect of TJ-7, TJ-23 or TJ-25 alone on the E_2 secretion is questionable.

Acknowledgments

The author wishes to thank Drs. S. Raiti, Univ. of Maryland, Baltimore, Md., and A. F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center, and the Hormone Distribution Office, NIADDK, Torrance, Calif., for kind donations of highly purified ovine NIH-LH-24.

This work was supported in part by Tsukuba University Project Research and N.I.H..

References

- 1) Armstrong, D. T., Goff, A. K. and Dornington, J. H.: Regulation of follicular estrogen biosynthesis. In *Ovarian Follicular Development and Function*, pp. 169, Eds A. R. Midgley and W. A. Sadler, Raven Press, New York, 1979.
- 2) Usuki, S.: Gonadotropic regulation of estrogen secretion by rat ovarian follicles. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 34: 863, 1982.
- 3) Usuki, S., Iwasaki, H. and Usuki, Y.: Immunohistochemical localization of estradiol- 17β and progesterone in rat ovaries and its microscopic study. In *Follicular Maturation and Ovulation*, pp. 103, Eds R. Rolland, E. V. Van Hall, S. G. Hillier, K. P. McNatty and J. Schoemaker, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1982.
- 4) Usuki, S. and Iwasaki, H.: Effects of LH and FSH on steroidogenesis before and after LH and/or FSH surge by rat preovulatory follicles. In *Advances in the Biosciences*, pp. 209, Eds T. Fujii and C. P. Channing, Pergamon Press, New York-Oxford, 1982.
- 5) Usuki, S.: Hachimijiogan increases serum estradiol- 17β and stimulates spermatogenesis in oligospermic men. *JAFES*, 3: 139, 1983.
- 6) Usuki, S., Iwasaki, H., Usuki, Y. and Shioda, M.: Effects of LH, FSH and prolactin on induction of DNA polymerase α and β by rat preovulatory follicles. In *Gamete Quality and Fertility Regulation*, pp. 63, Eds R. Rolland, M. J. Heineman, S. G. Hillier, and H. Vermer, Elsevier North-Holland, Amsterdam, 1985.
- 7) Usuki, S. and Iwasaki, H.: Effects of LH and FSH on estrogen, progesterone and testosterone secretion by rat preovulatory follicles incubated or perfused in vitro. In *Growth and Differentiation of Cells in Defined Environment*, pp. 285, Eds by H. Murakami, I. Yamane, D. W. Barnes, J. P. Mather, I. Hayashi and G. H. Sato, Kodansha Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1985.
- 8) Usuki, S.: Hachimijiogan changes serum hormonal circumstance and improves spermatogenesis in oligozoospermic men. *Am. J. Chin. Med.*, XIV: 37, 1986.
- 9) Shioda, M. and Usuki, S.: Two types of DNA polymerase α in sea urchin eggs and embryos. *Zool. Science*, 3: 555, 1986.
- 10) Usuki, S. and Iwasaki, H.: LH and FSH induce DNA polymerase α activity required for DNA replication by preovulatory follicles. *Jap. J. Fert. Steril.*, 31: 234, 1986.
- 11) Usuki, S.: Gonadotropic regulation of DNA polymerase- α activity in rat preovulatory follicles. *Jap. J. Fert. Steril.*, 31: 371, 1986.
- 12) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicines on progesterone secretions by corpus luteum. *Jap. J. Fert. Steril.*, 31: 482, 1986.

- 13) Usuki, S.: Effects of Tokishakuyakusan and its components on progesterone secretions by corpora lutea. *Jap. J. Fert. Steril.*, 32: 1, 1986.
- 14) Usuki, S. and Shioda, M.: Increase of DNA polymerase α activity associated with DNA synthesis due to FSH or estrogen in ovaries of immature rat. *J. Endocrinol.*, 110: 353, 1986.

八味地黄丸、当帰芍薬散及び桂枝茯苓丸の 排卵前卵胞 estrogen および progesterone 分泌並びに LH 作用に及ぼす影響について

筑波大学臨床医学系産科婦人科

臼杵 愨

排卵前卵胞に於ける漢方製剤の estrogen および progesterone 産生分泌能並びに LH 作用に及ぼす影響について *in vitro* での検討を行なった。27日齢 Wistar-Imamichi 系雄ラットに PMS 10 IU を皮下投与し、卵胞を成熟させ、PMS 投与後48時間にエーテル麻酔下で断頭・屠殺し、卵巣を摘出した。摘出卵巣の周囲脂肪組織を充分に除去した後、実体顕微鏡下で卵胞 (ϕ 約 0.75 ~ 1 mm) を摘出し、各々の卵胞 20 コを 1 群として incubation ないし perfusion を行なった。

Incubation 実験は、medium TC-199を用い95% O₂-5% CO₂ 下で、60分間の preincubation の後、新しい medium に種々濃度の八味地黄丸エキス (津村順天堂

TJ-7)、当帰芍薬散 (TJ-23)、桂枝茯苓丸 (TJ-25) および ovine NIH-LH を加え120分間 incubation した。

Perfusion 実験は、incubation と同一条件下で20分間の preincubation の後60分間 medium のみで perfusion し、次いで種々濃度の TJ-7, TJ-23, TJ-25 および LH で240分間刺激灌流し (2.5ml/20分)、20分毎に medium を採取した。

Incubation ないし perfusion した medium 中の estradiol-17 β (E₂) および progesterone (P) を RIA で測定した。

Incubation 実験に於いて、TJ-7, TJ-23ないし TJ-25 は E₂ を減少させ、一方 TJ-7, TJ-23はPを増加させた。

LH に TJ-7, TJ-23 ないし TJ-25 を併用させると P は LH 単独刺激より減少したが、TJ-23 で E₂ は増加した。

Perfusion 実験に於いては、TJ-7, TJ-23ないし TJ-25 の単独刺激は E₂ 濃度に影響を及ぼさなかったが、TJ-7ないし TJ-23はP濃度を増加させた。

LH との併用刺激では、LH の単独作用に較べ、E₂ 濃度は TJ-23で増加したが、TJ-7および TJ-25では有意な差が認められず、一方、P濃度は TJ-7, TJ-23, TJ-25で減少した。

以上の事実は、排卵前卵胞に於いて、1) TJ-7ないし TJ-23はP産生分泌を促進させる、2) TJ-23は LH の E₂ 産生分泌能を促進させる、3) TJ-7, TJ-23 および TJ-25は LH のP産生分泌能を減少させることを示唆している。

(受付・昭和61年2月3日)

卵胞液中および血中のステロイドホルモン濃度と 下垂体ホルモン濃度について

Steroid Hormones, and Pituitary Hormones Levels in Follicular Fluid and in Peripheral Venous Plasma

札幌医科大学産婦人科学講座

遠藤 俊明 渡辺 広史 山本 弘
Toshiaki ENDOH Hiroshi WATANABE Hiroshi YAMAMOTO
田中 昭一 橋本 正淑
Shoichi TANAKA Masayoshi HASHIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College

大卵胞, 小卵胞また月経周期別に卵胞を分類し, その卵胞液中性ステロイドや下垂体ホルモン濃度を測定した. また血中のそれらのホルモン濃度も測定し以下の結果を得た. ①estradiol-17 β (E₂) は, 卵胞期後期の大卵胞においてもつとも高濃度を示し, 末梢血中 E₂ 濃度との間に正の相関 (r=0.65; P<0.05) が認められた. ②progesterone (P) も卵胞期後期の大卵胞でもつとも高濃度を示し, P濃度と E₂ 濃度の間には正の相関 (r=0.71; P<0.01) が認められた. ③testosterone (T) は卵胞期後期の大卵胞は小卵胞と比較して低濃度の傾向があり (P<0.05), 卵胞期後期の大卵胞液中 E₂ と T濃度の間には負の相関 (r=-0.64; P<0.05) が認められた. ④卵胞液中ゴナドトロピン (LH, FSH) 濃度は卵胞期前期小卵胞よりも卵胞期後期大卵胞の方が有意に高値だった (P<0.05). ⑤卵胞液中プロラクチン濃度は, 卵胞の大きさ, 月経周期により一定の傾向は認められなかった.

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 284-290, 1987)

緒 言

ヒト卵巣の卵胞液は, 原始卵胞から一次卵胞, 更に二次卵胞へと卵胞が発育するにつれて出現し, 二次卵胞とは, 卵胞腔あるいは卵胞液の存在する卵胞と定義されている. 卵胞液は, 一部は卵胞自身から, また一部は血漿からの浸出によるものであり, その組成は顆粒膜細胞, 内茨膜細胞の分泌動態や, 生理的あるいは病的変動を反映して変化する. 月経周期による卵胞の大きさの変化は, 卵胞液の貯留のために生ずると言われている. 従って卵胞液中のホルモン濃度は, 月経周期や卵胞の大きさによつて変化すると考えられている^{1,2)}.

そこで今回われわれは, 卵胞液中 estradiol-17 β (E₂), progesterone (P), testosterone (T), LH, FSH, Prolactin (PRL) を大卵胞, 小卵胞別に測定し, また同時に末梢血中ホルモン濃度も測定した. そして月経周期に

よる濃度変化, 各ホルモン濃度の相互関係について検討し, 文献的考察を加えたので報告する.

対象と方法

子宮筋腫および上皮内癌等で開腹手術を施行した25歳から45歳の正常月経周期婦人35名を対象とした. 卵胞液は27Gの注射針で血液が混入しないように採取した. その際卵胞の最大径が8mm以上を大卵胞, 5mm以下を小卵胞として分類した. また, 同時に末梢血も採取し, 血漿分離後, 卵胞液とともにRIAによるホルモン測定まで-20°Cにて凍結保存した.

月経周期は, 過去の月経歴, 血中 E₂, P, ゴナドトロピン濃度, 基礎体温, 子宮内膜日付け診により卵胞期前期, 卵胞期後期, 黄体期に分類した. 尚, 卵胞期後期大卵胞の卵胞液は肉眼的に主席卵胞と思われる卵胞から採

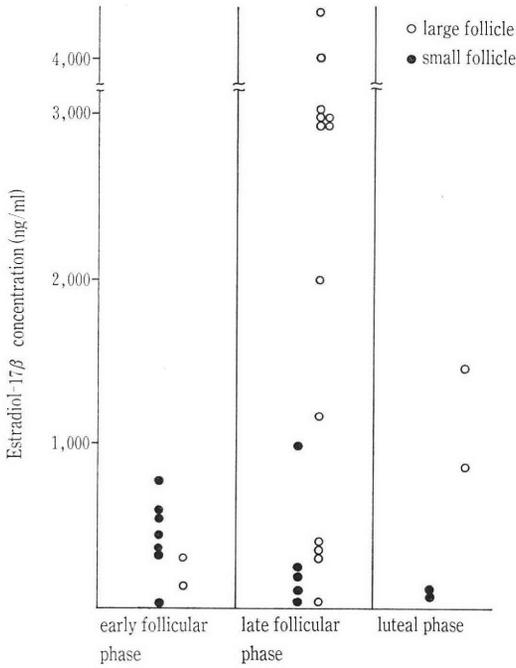


図 1 Concentration of Estradiol-17β in follicular fluid

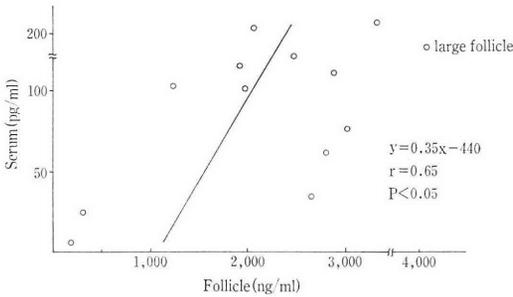


図 2 The correlation between concentration of Estradiol-17β in follicular fluid and peripheral venous plasma at late follicular phase

取した。

成 績

1. 卵胞液中ステロイドホルモン

①卵胞液中 E₂ 濃度

大卵胞液中 E₂ 濃度は 1.0ng/ml から 4,800ng/ml を示した (n=17). 一方, 小卵胞は 1.0ng/ml から 1,000 ng/ml までの E₂ 濃度を示した (n=14). 特に卵胞期後期の卵胞は, 2/3 が 1000ng/ml 以上を示し (mean ± SE = 20,78.96 ± 437.27ng/ml), 卵胞期後期の小卵胞 (292.00 ± 187.21ng/ml) や卵胞期前期小卵胞 (412.86 ± 90.77ng/ml) よりも有意に E₂ 濃度が高かった (P <

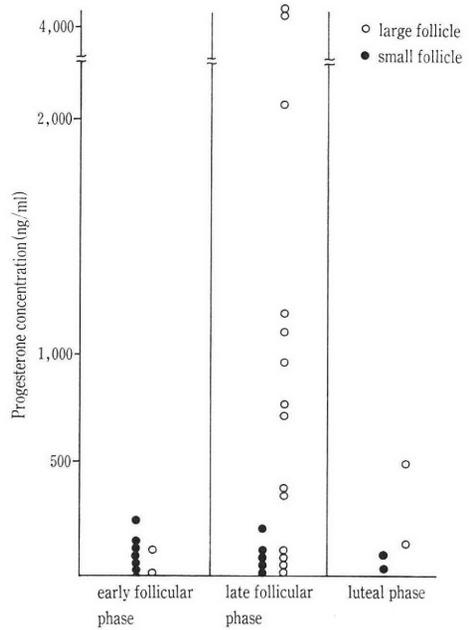


図 3 Concentration of Progesterone in follicular fluid

0.01) (図 1).

また, 卵胞期後期の卵胞液中 E₂ 濃度と血中 E₂ 濃度との間に正の相関が認められた (r=0.65; P<0.05) (図 2). しかし, 小卵胞液中 E₂ 濃度と血中 E₂ 濃度に相関はなかった。

②卵胞液中 P 濃度

大卵胞液中 P 濃度は 40ng/ml から 5,000ng/ml を示し (n=18), 卵胞期後期では半数が 500ng/ml 以上の高値を示した (mean ± SE = 1,149.23 ± 427.42ng/ml). それに対して小卵胞は, 全周期を通じて 200ng/ml 以下であり (66.82 ± 30.64ng/ml) (n=14), 有意に前者の方が高濃度だった (P<0.01) (図 3).

同一卵胞内における E₂ と P の濃度の関係について検討すると, 卵胞期後期の卵胞においてのみ正の相関が認められた (r=0.71; P<0.01) (図 4). しかし, 卵胞液中 P 濃度と血中 P 濃度の間に相関は認められなかった。

③卵胞液中 T 濃度

小卵胞では, 測定感度以下の 1 例を除いては全て 50ng/ml 以上であったのに対し (n=9), 大卵胞では 350 ng/ml の 1 例を除いて全て 50ng/ml 以下であった (n=16). 卵胞期後期の卵胞液中 T 濃度 (mean ± SE = 45.81 ± 25.43ng/ml) は全周期の小卵胞 (148.00 ± 10.05ng/ml) よりも有意に低値だった (P<0.05) (図 5).

同一卵胞内における E₂ と T 濃度について検討すると, 卵胞期後期の卵胞においてのみ負の相関が認めら

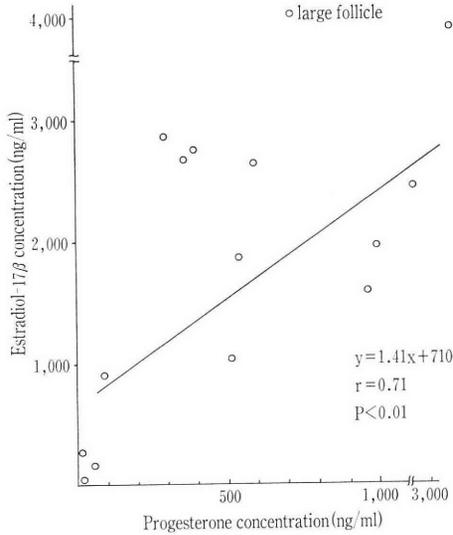


図 4 The correlation between Progesterone and Estradiol-17 β concentrations in follicular fluid at late follicular phase

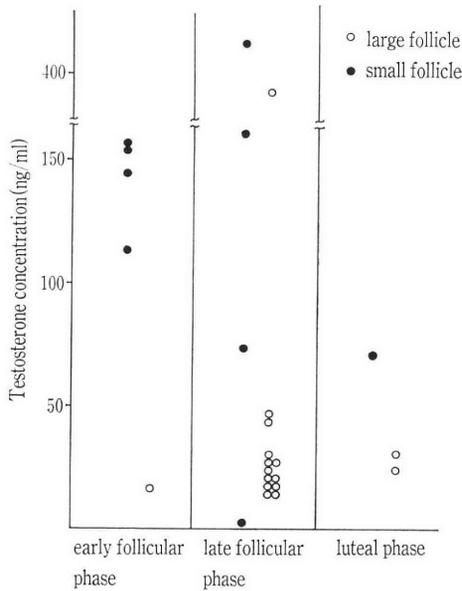


図 5 Concentration of Testosterone in follicular fluid

れた ($r = -0.65$; $P < 0.05$) (図 6). 小卵胞ではそのような相関はなかった. また, P 濃度と T 濃度の間にも相関はなかった.

また, 卵胞液中 T 濃度と血中 T 濃度に相関はなかった.

2. 卵胞液中下垂体ホルモン

①卵胞液中ゴナドトロピン

大卵胞液中 LH 濃度は測定感度以下から 75mlU/ml までを示し ($n = 11$), 一方小卵胞液中 LH 濃度は測定

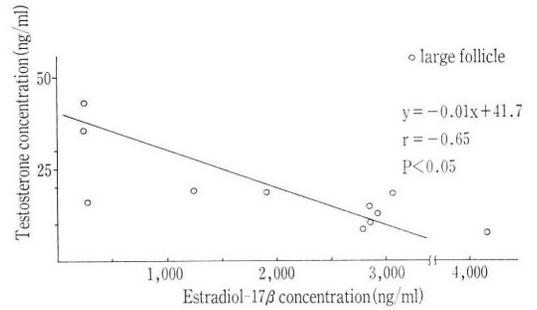


図 6 The correlation between Estradiol-17 β and Testosterone concentration in follicular fluid at late follicular phase

感度以下から 66mlU/ml までを示した ($n = 7$).

大卵胞液中 FSH 濃度は測定感度以下から 30mlU/ml までを示し ($n = 8$), 小卵胞では測定感度以下から 21mlU/ml までを示した ($n = 6$).

同一卵胞におけるゴナドトロピンと性ステロイド濃度の関係について検討したが, 相関など一定の傾向は認められなかった.

しかし, 卵胞期前期の小卵胞と卵胞期後期の大卵胞の LH 濃度を比較すると, $\text{mean} \pm \text{SE} = 7.27 \pm 3.18 \text{mlU/ml}$, $24.43 \pm 5.61 \text{mlU/ml}$ と有意に後者の方が高値だった ($P < 0.05$). また卵胞期前期の小卵胞中 FSH 濃度は 3 例中 2 例が測定感度以下であったのに対し, 卵胞期後期の大卵胞は $6.96 \pm 2.11 \text{ng/ml}$ と, 後者の方が有意に高値だった ($P < 0.05$) (図 7).

LH, FSH は卵胞液中濃度と血液中濃度に相関はなかった.

②卵胞液中プロラクチン

大卵胞液中 PRL 濃度は測定感度以下から 80ng/ml を示した ($n = 16$). 小卵胞では測定感度以下から 51ng/ml までを示した ($n = 10$). 月経周期, 大卵胞, 小卵胞による一定の傾向はなかった (図 8).

同一卵胞における PRL 濃度とゴナドトロピン濃度との関係について検討したが, 一定の傾向はなかった.

つぎに, 卵胞液の高 PRL 状態における性ステロイド濃度について検討した. 卵胞期後期の卵胞内 PRL 値が血中 PRL 濃度の正常値と比べて比較的高値と思われる 60ng/ml, 54ng/ml を示した大卵胞 2 例の E_2 濃度は, それぞれ 2,900ng/ml, 2,700ng/ml と高値であった. しかし P 濃度は, それぞれ 90ng/ml, 290ng/ml と低値を示した. また卵胞期前期の大卵胞で, PRL が 80ng/ml と高値を示すものが 1 例あったが, その E_2 , P 濃度はともに 81.0, 40.8ng/ml と低値を示したのに対し, T 濃度は 170ng/ml と高値であった. 卵胞液中 PRL 濃度

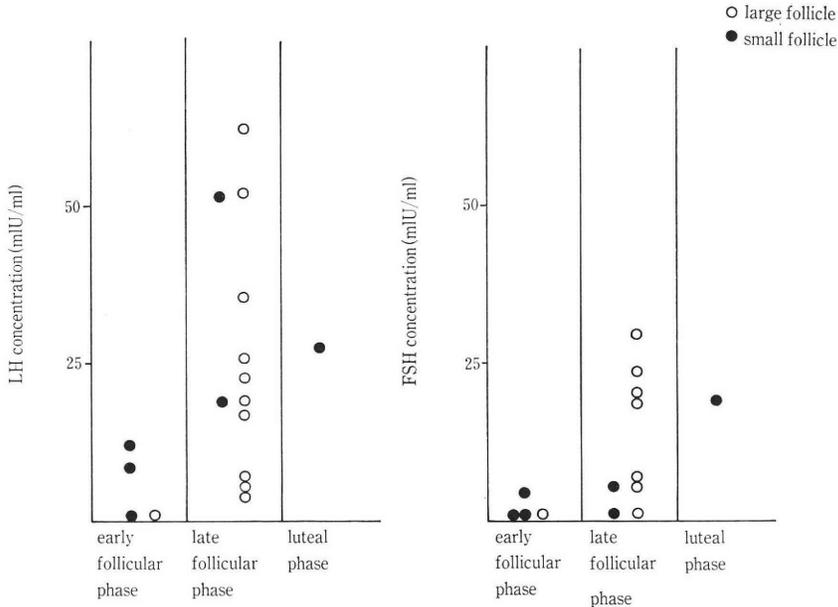


図 7 Concentrations of LH and FSH in follicular fluid

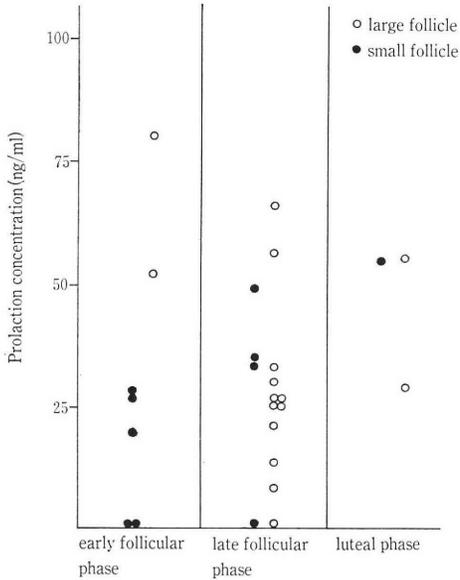


図 8 Concentration of Prolactin in follicular fluid

考 察

卵胞液中ホルモン濃度は顆粒膜細胞、内茨膜細胞の機能を反映し、また血漿成分にも由来すると言われている^{1,2)}。したがって、卵胞液中ホルモン濃度を測定する事は卵胞の機能を知るうえで極めて有用である。しかも IVF-ET が広く実施されている現在、卵胞液中中性ステロイド濃度が oocyte の status の marker となると考えられている³⁾ため、その測定はますます重要性を増している。また卵胞の成長を直接 regulate するゴナドトロピンなどの内分泌学的微少環境を検索する意義は深い。

そこで今回われわれは、卵胞液中ホルモン濃度を大卵胞、小卵胞別に測定し、月経周期による濃度変化も検討した。さらに同一卵胞内におけるホルモン濃度の相互関係をもあわせて検討した。また、卵胞液中ホルモン濃度と血中濃度との関係も検討した。

卵胞液中 E₂ 濃度は、われわれの成績では卵胞期後期の大卵胞は、約2/3が1,000ng/ml 以上の高値を示し、同時期の小卵胞液中 E₂ 濃度と比較して明らかに高値を示した。同様の結果を McNatty らも報告している^{4,5)}。

また、卵胞期後期の大卵胞液中 E₂ 濃度と血中 E₂ 濃度の間には正の相関が認められた。この事から卵胞期後期の血中 E₂ は主席卵胞に由来する事が示唆された。Baird ら⁶⁾は E₂ 濃度1,000ng/ml 以上の卵胞を機能的に活動している卵胞としており、したがってわれわれの成績では、卵胞期後期の小卵胞 E₂ 値は図 1 に示すごとく、全例

と血液中 PRL 濃度に相関はなかつた。

3. 黄体期のホルモン濃度について

黄体期にホルモン測定をできた卵胞は、E₂ 4 例、P 4 例、T 3 例、LH と FSH は 1 例ずつ、PRL は 3 例と少数例のため一定の傾向の有無について考察することができなかつた。しかし大卵胞の 2 例が、E₂ 濃度がそれぞれ 850, 1,450ng/ml、また P 濃度が 100, 484ng/ml と特記すべき高値を示した。

1,000ng/ml 以下であり, Baird⁶⁾の報告からするとほとんどが機能的に不活発な状態の卵胞であつたと考えられた。それに対して卵胞期後期の2/3以上の大卵胞は, E₂ 値が1,000ng/ml 以上であり, 機能的に活動している卵胞と考えられた。

したがって卵胞の機能を知る上で, その大きさが重要な指標となる事が示された。E₂ 高値の大卵胞は図3のごとくP濃度も500ng/ml 以上と血中P濃度の数十倍から数百倍の高濃度を示すものが半数にあつた。Uehara の報告⁷⁾では卵胞液中 E₂ 濃度とP濃度には相関はなかつたとしているが, われわれの成績では, この時期の大卵胞は卵胞液中 E₂ 濃度とP濃度の間には正の相関が認められた。つまりこれは, 卵胞液中 E₂ が高値を示す卵胞期後期では黄体形成以前に卵胞内ですでに活発にP合成がなされている事をあらわしており, 卵胞期後期にはすでに卵胞液中Pが高値をしめすとする従来の報告⁸⁻¹¹⁾と一致した。この点に関して *in vitro* では, Channing¹²⁾が赤毛ザルで, McNatty ら¹³⁾はヒトで顆粒膜細胞がP合成能を持つ事をあきらかにしている。そしてこれは, 卵胞期後期の小卵胞や卵胞前期の大卵胞, 小卵胞と明らかな差を示す点である。

また卵胞期後期の大卵胞のP合成の急増に関して McNatty¹⁴⁾は, 排卵に近づくにつれて mitotic activity が低下し, 卵胞液中 LH が上昇し, granulosa cell の hypertrophy をおこす事と 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性の高まるためだと説明している。また, 同様に Edwards²⁾も顆粒膜細胞の3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性が高まる事を報告している。一方, Brailly ら¹⁵⁾は, 卵胞液中Pの上昇はPからの Androgen 合成の減少によるもので, aromatization の低下によるものではないとしている。また Carr ら¹⁶⁾は, そもそも granulosa cell は luteal cell と同様P産生能を有しており, 卵胞期前期には末梢血中の low density lipoprotein (LDL) を運ぶ血管支配が欠如していたものが排卵前期には血管が新生された, LDL が供給されるため, P合成が増加するのだと説明している。

成熟卵胞内ステロイド濃度の特徴は, 高 E₂, 高P濃度であるが, 低T濃度も重要な指標とされている。Uehara ら⁷⁾は, oocyte の cleavage の成功は卵胞内 E₂ 濃度やP濃度よりもT濃度のほうがよりよい指標となる事を示唆している。

われわれの成績では, 大卵胞液中T濃度は, 閉鎖卵胞と思われる1例を除くと15-45 ng/ml に分布し, McNatty ら^{4,5)}, Uehara ら⁷⁾, 庄司¹¹⁾, Bailly ら¹⁵⁾の報告とほぼ一致した。卵胞期後期の大卵胞において E₂ 濃度とT濃度の間に負の相関が認められ(図3), E₂ 濃度

の高い卵胞ほど T が低く, 盛んに aromatization がおこなわれている卵胞であることを示している。この点に関しては, Uehara ら⁷⁾も同様に負の相関のある事を報告をしている。

また, 大卵胞の1例は, E₂ 濃度が1.43ng/ml, P濃度が3.68ng/ml と低値で, T濃度が350ng/ml と高値であつたが, これは形態学的検索はしていないが閉鎖卵胞であつたと考えられた。

閉鎖卵胞の卵胞内ステロイド合成に関して Brailly ら¹⁵⁾は, Pから Androgen への変換は障害されていないが, aromatization が極端に低下しているため E₂ 濃度が低値となり, T濃度が高値となると説明している。しかし, 閉鎖過程が進むとT濃度も低下するとしている。また, Uehara ら⁷⁾はP濃度とT濃度の間にも負の相関が認められるとしているが, われわれの成績ではそのような関係は認められなかつた。この違いは, われわれが採取した卵胞期後期の卵胞が必ずしも排卵直前の卵胞ばかりではないためかもしれない。

黄体期でも E₂ 濃度が850, 1,450ng/ml と高値を示す大卵胞を2例認めたが, P濃度はそれぞれ100, 484ng/ml, T濃度は33, 24ng/ml であり, 閉鎖卵胞とは考えがたく, McNatty¹²⁾のいう排卵期に高値のFSHにさらされた卵胞が排卵せず, そのまま成長を続けた卵胞と考えられた。

卵胞液中ゴナドトロピンに関して McNatty ら^{4,5)}は, 大卵胞の方が小卵胞より LH, FSH とともに detectable な例が多く, 卵胞期後期で最も高濃度になると報告しているが, われわれの成績では, はつきりしたその様な傾向はなかつた。卵胞期後期の大卵胞のゴナドトロピンについて彼らの成績によれば, LH, FSH 濃度は mean で6, 3mlU/ml であり, われわれの成績の1/4-1/2の低値となつている。しかし, Laufer ら¹⁸⁾は, HMG-HCG 施行後ではあるが, 卵胞液中 LH, FSH 濃度が mean で130, 11mlU/ml と報告している。McNatty らの報告のゴナドトロピン値の低い原因としては, Laufer ら¹⁸⁾の指摘しているように, 血管の発達の不十分な未成熟卵胞からの卵胞液採取による事が考えられ, その様な卵胞には血中のゴナドトロピンが十分に移行しないため低ゴナドトロピン濃度になつたと思われる。

卵胞液中ゴナドトロピンと性ステロイドとの関係について, 従来より FSH の存在が granulosa cell の E₂ 分泌を助長し, 同様に LH の存在がP分泌に関係しているとされている。われわれの成績でも, LH, FSH とともに卵胞期前期小卵胞より卵胞期後期大卵胞の方が卵胞液中濃度が高く, 卵胞期後期大卵胞の高 E₂, 高P濃度とゴナドトロピン濃度上昇と関係していると思われた。し

かし、卵胞液中ゴナドトロピン濃度と血中ゴナドトロピン濃度との間には相関関係はなかつた。この理由も個々の卵胞の成熟度によって卵胞内の血管の発達に差があり、血中ゴナドトロピンの卵胞液への移行にも差が出るためと思われる。

卵胞液中 PRL に関して、卵胞期前期の小卵で最高値を示し、また卵胞期後期の大卵胞では最低値を示す。一般に卵胞期では卵胞が大きくなるにつれて卵胞液中 PRL 値は低下する傾向があると McNatty ら^{4,5,17)}は述べている。また、彼らは、PRL 値が 35ng/ml 以上では明らかに卵胞液中 E_2 濃度が低下すると述べている、しかし Laufer ら¹⁸⁾は、卵胞前期には逆に卵胞液中 PRL 濃度は 100ng/ml 以上まで上昇すると報告している。また、これは血中 E_2 濃度が急増することによって PRL 値が上昇するためと推論している。われわれの成績では $25\text{--}30\text{ng/ml}$ とほぼ血中の正常値と同レベルで、月経周期や大、小卵胞によるはつきりした濃度の差は無かつた。卵胞期後期の大卵胞の中に PRL 濃度が 50ng/ml 以上のものが2例あつたが、 E_2 濃度は両者とも $2,500\text{ng/ml}$ 以上で、この症例に限って言えば高 PRL 濃度の E_2 合成への影響は認められなかつた。血中 PRL 濃度と卵胞液中 PRL 濃度の間に相関は認められなかつたが、これもゴナドトロピンと同様、卵胞内の血管の発達に関係していると思われた。

以上をまとめると、卵胞は卵胞期後期に大きくなると E_2 、P 濃度が上昇し、一方 T 濃度は低値を示し、さかんな aromatase 活性の存在が示された。また、この時期の血中 E_2 は主席卵胞に由来する事が示唆された。そして、このような性ステロイド合成の変化は、卵胞液中ゴナドトロピンの卵胞期後期の上昇が関与していると思われた。PRL 濃度については一定の傾向はなかつた。以上、卵胞液中ホルモン濃度について興味ある知見を得たので報告した。

尚、本論文の一部は第27回不妊学会総会(1982年、東京ならびに第11回世界不妊学会(1983年、ダブリン)にて発表した。

文 献

- 1) 鈴木秋悦：卵子の成熟(1) —哺乳類, ホルモンと生殖II, p21, 学会出版センター, 1979.
- 2) Edwards, R. G.: Follicular fluid. J. Reprod. Fert., 37: 189, 1974.
- 3) McNatty, K. P., Smith, D. M., Makris, A., Osathanondh, R. and Ryan, K. J.: The microenvironment of the human antral follicle: interrelationship among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells and the status of the oocyte

- in vitro and in vivo. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49: 851, 1979.
- 4) McNatty, K. P., Hunter, W. M., McNeilly, A. S. and Sawers, R. S.: Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human Graafian follicles throughout the menstrual cycle. J. Endocr., 64: 555, 1975.
- 5) McNatty, K. P., Baird, D. T., Bolton, A., Chambers, P., Corker, C. S. and McLean, H.: Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle. J. Endocr., 71: 77, 1976.
- 6) Baird, D. T. and Fraser, I. S.: Concentration of oestradiol in follicular fluid and ovarian venous blood of women. Clin. Endocrinol., 4: 259, 1975.
- 7) Uehara, S., Naganuma, T., Tsuiki, A., Kyono, K., Hoshiai, H. and Suzuki, M.: Relationship between follicular fluid steroid concentrations and in vitro fertilization. Obstet. Gynecol., 66: 19, 1985.
- 8) Friedrich, F., Breitenecker, G., Salzer, H. and Holzner, J. H.: The progesterone content of the fluid and activity of the steroid- 3β -01-dehydrogenase within the wall of the ovarian follicles. Acta Endocrinologica, 76: 343, 1974.
- 9) Kemeter, P., Salzer, H., Breitenecker, G. and Friedrich, F.: Progesterone, oestradiol- 17β and testosterone levels in the follicular fluid of tertiary follicles and graafian follicles of human ovaries. Acta Endocrinologica, 80: 686, 1975.
- 10) Sanyal, M. K., Berger, M. J., Thompson, I. E., Taymor, M. L. and Horne, JR, H. W.: Development of graafian follicles in adult human ovary. I. Correlation of estrogen and progesterone concentration in antral fluid with growth of follicles. J. Clin. Endocrinol. Metab., 38: 828, 1974.
- 11) 庄司 誠, 木村英三, 中田裕信, 大川 清, 蜂屋祥一, 小幡 功, 今川信行: ヒト卵胞成熟機構とステロイド産生機構との関係について, 日産婦誌, 34: 43, 1982.
- 12) Channing, C. P.: Temporal effects of LH, HCG, FSH and dibutyl cyclic $3'$, $5'$ -AMP upon luteinization of rhesus monkey granulosa cells in culture. Endocrinology, 94: 1215, 1974.
- 13) McNatty, K. P. and Sawers, R. S.: Relationship between the endocrine environment within the graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cell in vitro. J. Endocr., 66: 391, 1975.

- 14) McNatty, K. P. : Cyclic changes in antral fluid hormone concentration in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 7 : 577, 1978.
- 15) Brailly, S., Gougeon, A., Milgrom, E., Bomsel, H. O. and Papiernik, E. : Androgens and progestins in the human ovarian follicle. Differences in the evolution of pre-ovulatory, healthy nonovulatory, and atretic follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53 : 128, 1981.
- 16) Carr, B. R., MacDonald, P. C. and Simpson, E. R. : The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertil. Steril.*, 38 : 303, 1982.
- 17) McNatty, K. P. : Relationship between plasma prolactin and the endocrine microenvironment of the developing human antral follicle. *Fertil. Steril.*, 32 : 433, 1979.
- 18) Laufer, N., Botero-Ruiz, W., Decherney, A. H., Hasltine, F., Polan, M. L. and Behrman, H. R. : Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58 : 430, 1984.

Steroid hormones, and pituitary hormones levels follicular fluid and in peripheral venous plasma

**Toshiaki Endoh, Hiroshi Watanabe,
Hiroshi Yamamoto, Shoichi Tanaka
and Masayoshi Hashimoto**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Sapporo Medical College

We measured concentrations of estradiol-17 β (E₂), progesterone(P), testosterone(T), prolactin (PRL), LH and FSH in large follicles and in small follicles at various stages of the menstrual cycle. And we measured them in peripheral venous plasma. The following results were obtained.

①The level of E₂ in large follicles was apt to be highest at late follicular phase LFP (mean \pm SE=2,078.96 \pm 437.27 ng/ml). A correlation was observed between E₂ level in large follicles and that in plasma at LFP (r=0.65 ; P<0.05).

②At LFP most of large follicles had very high concentration of P (1,149.23 \pm 427.42 ng/ml). In large follicles, a correlation was observed between P and E₂ concentration at LFP (r=0.71 ; P<0.01).

③The level of T in large follicles were significantly lower than that in small follicles at LFP (P<0.05). And a correlation was observed between T and E₂ concentrations in large follicles at LFP (r=-0.64 ; P<0.05).

④The levels of gonadotropins (LH, FSH) in large follicles at LFP were significantly higher than those in small follicles at early follicular phase (P<0.05).

⑤The level of PRL in follicular fluid had no specific tendency.

(受付 : 昭和61年7月31日)

超音波断層法による卵管疎通性の評価

Assessment of Fallopian Tubal Patency by Ultrasound

旭川医科大学産婦人科学教室

高田 久 士 千石 一 雄 浅川 竹 仁
Hisashi TAKADA Kazuo SENGOKU Takehito ASAKAWA
石川 睦 男 清水 哲 也
Mutsuo ISHIKAWA Tetsuya SHIMIZU

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College,
Asahikawa 078, Japan

超音波断層法による卵管通過性の評価が可能か否かを、開腹時または腹腔鏡施行時の通色素試験の結果を基準として子宮卵管造影法 (HSG) と比較検討した。

超音波法と HSG の通色素試験との一致率は、各々88.2% (30/34), 85.3% (29/34) と、ほぼ変わらない成績であった。False positive rate は、超音波法26.7% (4/15), HSG 25.0% (3/12) と、これもほぼ同率であったが、False negative rate は、超音波法0% (0/19), HSG 9.1% (2/22) であり、超音波法では1例もなかった。Specificity は、超音波法82.6% (19/23), HSG では87.0% (20/23) であったが、Sensitivity は超音波法は100% (11/11), HSG 81.8% (9/11) であった。

超音波断層法によるダグラス窩の液体貯留像の観察により、少なくとも一側の卵管通過性の評価が可能であり、しかも極めて高い正診率を示した。さらに、生体に対する侵襲性やその簡易性の点からも超音波法による卵管疎通性検査法は、実地臨床上有用性が大きいことを確認しえた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 291-297, 1987)

緒 言

卵管通過性の評価法として、従来より、通気法、通水法、子宮卵管造影法 (以下 HSG と略す)、あるいは、腹腔鏡や開腹手術時において直接、確認できる通色素試験などによって行なわれてきた。しかし、通気法や通水法は卵管疎通性の精度¹⁾に問題があり、HSG はX線被曝²⁻⁴⁾やヨード過敏の問題が存在している。一方、超音波断層法は骨盤内腫瘍⁵⁾や卵胞発育の観察⁶⁾などに関し、有用性が高く評価されてきており、不妊症領域における必須の重要な診断法のひとつとして確立されつつある。

今回、著者らは、超音波断層法による、通水時のダグラス窩への液体貯留像を観察することにより、卵管通過性の評価が可能であるか否かを検討し、さらに HSG の精度と比較するため、開腹時または、腹腔鏡施行時の通色素試験の結果を基準 (Gold standard) として、卵管

通過性の評価法としての精度につき、各々を比較検討した。

研究 方法

対象は、旭川医科大学産婦人科外来に通院中の不妊症患者で、昭和59年7月から昭和61年7月までに超音波法を施行した62名中、超音波法、HSG、開腹時または腹腔鏡下の通色素試験のいずれかで、卵管疎通性の評価が直接可能であった34名である (表1)。その内訳は、子宮内膜症10名、骨盤内感染症11名、卵巣囊腫5名、子宮筋腫1名、子宮中隔症1名、ターナー症候群1名、原因不明不妊症5名であった。この34名中、開腹手術施行者22名のうち6名は、腹腔鏡後、開腹手術となった症例である。腹腔鏡検査のみの施行者は12名であった。34名の年齢は26歳から38歳までで、平均年齢は31.9歳で、不妊期間は半年から18年で平均6.5年である。

方法は、図1のごとく、膀胱充満下にあらかじめ子宮、

表 1 Materials

Laparotomy	(patients)
endometriosis	7
PID	9
ovarian cyst	4
myoma uteri	1
septate uterus	1
Laparoscopy	
endometriosis	3
PID	2
ovarian cyst	1
unexplained infertility	5
Turner's syndrome	1
Total	34

PID: Pelvic inflammatory disease

卵巣などを確認し HSG と同様に膣部鉗子で子宮膣部を把持し、頸管カニューレより滅菌生理食塩水20から40 ml を注入し、注入中および注入後の子宮腔内、卵管、ダグラス窩への液体貯留像の有無により卵管通過性を判定し、その成績を HSG と比較し、いわゆる“Gold standard”を開腹手術または、腹腔鏡下の通色素試験の結果とした。

超音波断層装置は、横河 U-sonic RT-3,000および RT-3,600, realtime sector scanner, Transducer 3.5 MHz を使用した。

成 績

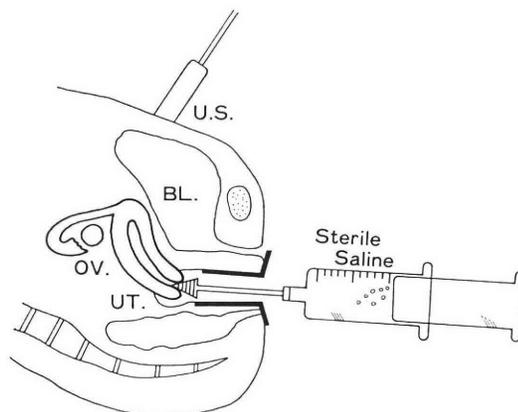
図 2-a は原因不明不妊症患者における通水前の超音波像で、子宮体部の横断面を示す。図 2-b は通水後の超音波断層像で、ダグラス窩に生理食塩水が貯留している

のが確認された。また、子宮体部前面にも生理食塩水が見られる。図 2-c は同一患者の HSG で両側卵管の通過性が推定される。図 2-d は腹腔鏡にて両側卵管からの indigo carmine (10倍希釈) の流出が確認された像で、両側卵管の通過性を認めた。以上より、3つの検査法がすべて一致した両側卵管に疎通性を認めた症例であった。

図 3-a は子宮内膜症患者における通水中の超音波像であるが、子宮腔内の拡張像は見られるが、ダグラス窩に液体貯留像はない。図 3-b は同一患者の HSG 像で両側卵管からの造影剤の流出はみられず、開腹時の通色素試験でも indigo carmine の流出はなく、3つの検査法がすべて一致した両側卵管閉塞例である。

図 4-a は超音波法偽陽性であった、骨盤内感染症疑いの患者の通水前の子宮体部横断面像である。図 4-b は通水後の超音波像で、左卵管水腫は見られるが、ダグラス窩への液体貯留像は認められなかった。図 4-c は、その子宮卵管造影像で、左卵管水腫を認めたが、通過性はなく、右卵管からの造影剤の流出がかるうじて認められた。開腹所見では、左卵管水腫と両側卵管の強度の癒着が認められ、通色素試験でも indigo carmine の流出は、右卵管からのみわずかに認めていたことより、超音波法偽陽性症例である。

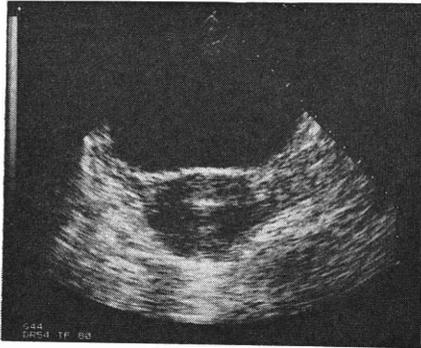
上記症例を総括したものが表 2 である。超音波法と HSG の通色素試験との一致率は、各々 88.2% (30/34), 85.3% (29/34) で、また、超音波法または HSG で閉塞ありと判断し、通色素試験で卵管閉塞なしと確認したものを偽陽性率とすると、超音波法 26.7% (4/15), HSG 25% (3/12) であつた。逆に、超音波法または HSG で卵管閉塞なしと判断し、通色素試験で卵管閉塞ありと確認した偽陰性率は、超音波法は 0% (0/19),



U.S.:Ultrasound, BL:Urinary bladder, OV:Ovary, UT:Uterus

図 1 Method

a. Before injection



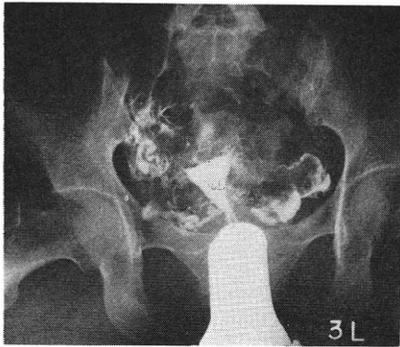
b. After injection



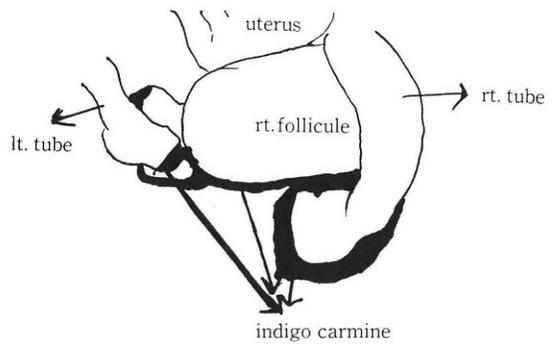
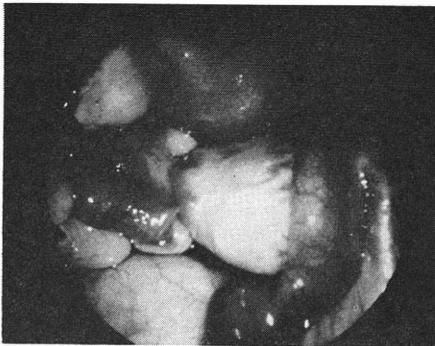
図 2 Case 1

BL: Bladder
 FL: Free fluid
 FO: Follicle
 (right)
 D: The pouch of Douglas
 UT: uterus

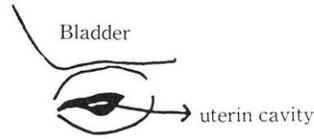
c. HSG: Hysterosalpingography



d. Laparoscopy



a. After injection



b. HSG

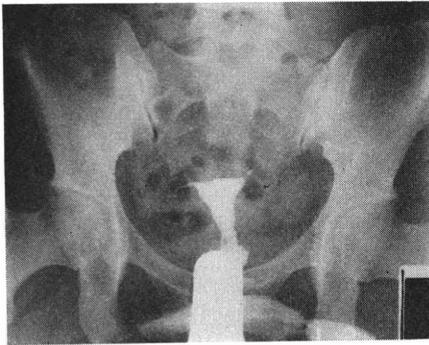


図 3 Case 2

HSG は9.1% (2/22) であった。また、真陰性率である Specificity (特異度: 罹患していないものを陰性と判定する率) は、超音波法82.6% (19/23), HSG 87.0% (20/23), 真陽性率である Sensitivity (敏感度: 罹患しているものを陽性と判定する率) は、超音波法 100% (11/11), HSG 81.8% (9/11) であった。

考 案

不妊症患者の中で、卵管因子が占める頻度は25~50%⁹⁻¹³⁾といわれるほど高く、その正確な診断は重要な問題といえる。しかし、HSG や腹腔鏡、あるいは開腹手術を頻回に施行することは、卵子、卵巣に対するX線被曝、ヨード過敏、手術侵襲、傷の痕、癒着など多くの問題を有しており、現実には不可能であろう。

しかしながら、著者らが試みてきた超音波断層法を用いての卵管通過性の評価は、その正診率において、HSG と並び、きわめて高く、超音波法で卵管閉塞なしと判断した症例で、通色素試験で閉塞ありという偽陰性者は一例もなかった。

HSG と腹腔鏡との一致率は他の報告例によると55~76%¹⁴⁻¹⁶⁾とされているが、今回の著者らの成績は、超音波通水法、HSG とともに、通色素試験との一致率は、88.2%, 85.3%といずれも高かった。また、HSG の偽陽

性率は5~20%, 偽陰性率も8~20%¹⁶⁻¹⁸⁾と報告されているが、今回の超音波通水法、HSG の偽陽性率はともにほぼ報告例と一致しているが、偽陰性率は報告例より低率を示した。

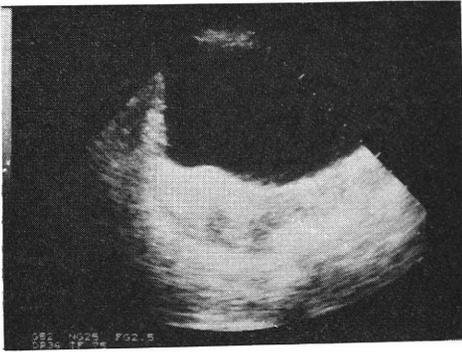
今回の超音波法で、偽陽性例が4例あり、2例は通過性は認められたが、indigo carmine がわずかしこ流出せず、また1例は驚卵大の chocolate cyst がダグラス窩に入りこんでおり、またもう1例は、数個の大卵胞があり、ダグラス窩への液体貯留像が超音波法で確認しづらい症例であった。

超音波断層でみられる膀胱後面、三角形の echo free space である、いわゆる subtle pelvic fluid¹⁹⁾ は今回明らかではなかったが、出現時には液体貯留像との鑑別を要する。

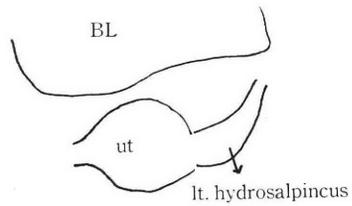
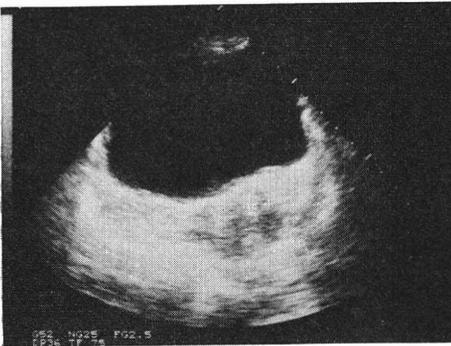
通水後の生理食塩水約20ml は、今回の著者らの検査では、ほぼ24時間後に完全に消失しているのが確認された。

超音波断層法による卵管通過性の評価は、現在まで3つの報告があり、いずれも“Gold standard”を HSG としているが、開腹時または腹腔鏡下での通色素試験を“Gold standard”とした報告は、今回の報告が最初である。すなわち、Richman²⁰⁾ らは35名に施行し、Sensitivity 100%, Specificity 96%, Accuracy 97%, False

a. Before injection



b. After injection



c. HSG

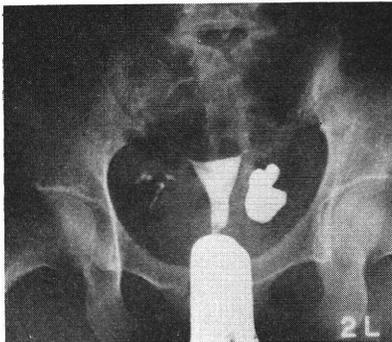


図 4 Case 3

positive rate 10% (1/10), False negative rate 0% (0/24)と報告したが、これは HSG との比較であり、通色素試験との比較はしていないため、その精度をそのまま著者らの成績と比較することはできない。

Randolph ら²¹⁾は、100例に拍動性に生理食塩水を子宮腔内に注入し、子宮腔拡張の状態により、卵管通過性および卵管閉塞部位、左右差などを確認できたと報告している。しかし、著者らの今回の成績では、約1/3にのみ、左右卵管を同定できただけであり、左右の同定には今後の検討が必要であらう。

Rasmussen ら²²⁾の報告では、25例に超音波通水を行

ない、HSG との一致率は87.5%、False negative rate 10%、False positive rate 25%で、卵管周囲の癒着が強い例は偽陽性と判定しやすく、両側の卵管水腫や腸壁が浮腫状になっている症例では、偽陰性と判定しやすいと述べている。今回の著者らの症例でも、卵管周囲の癒着が強いために偽陽性となった症例が2例あつたが、両側の卵管水腫で偽陰性となった例はなかつた。また、浮腫状の腸壁のある症例もみられなかつた。今後、子宮内膜症などによる卵管周囲の強度の癒着例についての超音波下通水も症例をかさねる必要性が認められている。超音波法のもつ操作の簡易さ、無侵襲性、くり返し検査

表 2 Comparison of the evaluation obtained by Ultrasound and HSG

Methods	Ultrasound	HSG
Agreement rate	88.2% (30/34)	85.3% (29/34)
False positive rate	26.7% (4/15)	25.0% (3/12)
False negative rate	0 % (0/19)	9.1% (2/22)
Specificity	82.6% (19/23)	87.0% (20/23)
Sensitivity	100% (11/11)	81.8% (9/11)

が可能であるという利点を考え合わせると、有用な方法の一つと考えられる。さらに同時に、治療としての意義もあるが、ダグラス窩同定の困難症例や、さらに左右卵管通過性の同定など、今後、検討を要する点も多い。

今回の著者らの成績は、通水法が HSG のように解剖学的な細かい情報を得るために全面的に HSG にとって変るというのではなく、不妊症患者、特に若年婦人において、まず、超音波法による通水法を行ない、通過性があると判断した症例は 6 カ月間待つて、妊娠成立の有無を観察し、もし妊娠しない時には、今度は HSG を行ない、両側卵管閉塞と超音波法で判定した症例は直ちに HSG を行なうというように、不妊症患者における卵管通過性検査のスクリーニング法として、ルーチン検査の一つとなりうることを示唆した。

文 献

- 1) 百瀬和夫, 向井治文: 卵管疎通性検査法, 産婦治療, 51 : 20, 1985.
- 2) Bokstedt, H.: Protection of the patient in X-ray diagnosis. Publication No. 16. IRCP, Oxford 1969.
- 3) 鈴木雅州, 佐藤 章, 星 和彦, 齊藤 晃: 子宮卵管造影法, 産と婦, 7 : 1181, 1981.
- 4) 百瀬和夫: 婦人科 X 線診断 とくに子宮卵管造影法, 日産婦誌, 35 : 727, 1983.
- 5) Walsh, J. W., Taylor, K. J. W., Wasson, J. F. M., Schwartz, P. E. and Rosenfield, A. T.: Gray-scale ultrasound in 204 proved gynecologic masses: Accuracy and specific diagnostic criteria. Radiology, 130 : 391, 1979.
- 6) Callen, P. W.: Ultrasonography in obstetrics and gynecology. 193, Philadelphia, W. B. Saunders, 1983.
- 7) 千石一雄, 石川睦男, 浅川竹仁, 高田久士, 木村広幸, 山下幸紀, 清水哲也: 基礎体温法による排卵および排卵期診断における正確性に関する検討, 日不妊誌, 30 : 75, 1985.
- 8) Sengoku, K., Ishikawa, M., Kasamo, M., Yamashita, K. and Shimizu, T.: Ultrasonic and endocrinologic investigation of ovarian follicle and free fluid in cul-de-sac for

monitoring follicular development and ovulation. Int. J. Gynaecol. Obstet., 24 : 21, 1986.

- 9) Brown, W. E.: Fallopian tubes in sterility. Fertil. Steril., 7 : 178, 1956.
- 10) Israel, S. L.: Diagnosis and treatment of menstrual disorders and sterility, fifth edition. New York, Harper and row, 1967.
- 11) Wall, R. L. Jr.: Evaluation and management of infertility. Clin. Obstet. Gynaecol., 12 : 889, 1969.
- 12) Boyd, I.: Tubal sterility: patency tests and results. J. Obstet. Gynaecol. Br. Com monw., 80 : 142, 1973.
- 13) Philipsen, T. and Hansen, B.B.: Comparative study of hysterosalpingography and laparoscopy in infertile patients. Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 60 : 149, 1981.
- 14) Keirse, M. Jn. and Vandervellen, R.: A comparison of hysterosalpingography and laparoscopy in the investigation of infertility. Obstet. Gynecol., 41 : 685, 1973.
- 15) Swolin, K. and Rosencrantz, M.: Laparoscopy vs. hysterosalpingography in sterility investigation. A comparative study. Fertil. Steril., 23 : 270, 1972.
- 16) Gabos, P.: A comparison of hysterosalpingography and endoscopy in evaluation of tubal function in infertile women. Fertil. Steril., 27 : 238, 1976.
- 17) Duignan, N.M., Jordan, J.A., Coughlan, B.M. and Logan Edwards R.: One thousand consecutive cases of diagnostic laparoscopy. J. Obstet. Gynaec. Br. Cwlth., 79 : 1016, 1972.
- 18) Moghissi, K.S. and Sim, G. S.: Correlation between hysterosalpingography and pelvic endoscopy for the evaluation of tubal factor. Fertil. Steril., 26 : 1178, 1975.
- 19) Nyberg, D.A., Laing, F.C. and Jeffrey, R. B.: Sonographic detection of subtle pelvic fluid collections. Am. J. Roentgenol., 143 : 261, 1984.
- 20) Richman, T.S., Viscomi, G.N., deCherney, A. and Alcebo, L. O.: Fallopian tubal patency assessed by ultrasound following fluid injection. Radiology, 152 : 507, 1984.
- 21) Randolph, J.F., Ying, Y. K., Schmid, C. L. and Riddick, D. H.: Dynamic sector ultrasonography as an alternative to hysterosalpingography in the evaluation of uterotubal architecture. Am. Fert. & Steril., The 41th annual meeting (abst.): 122, 1985.
- 22) Rasmussen, F., Larsen, C. and Justesen, P.: Fallopian tube patency demonstrated at ultrasonography. Acta. Radiol. Diag., 27 : 61, 1986.

Assessment of fallopian tubal patency
by ultrasound

**Hisashi Takada, Kazuo Sengoku,
Takehito Asakawa, Mutsuo Ishikawa
and Tetsuya Shimizu**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Asahikawa Medical college, Asahikawa
078, Japan

Several methods have been used as diagnostic parameters to assess tubal patency, in infertile patients, e.g. the Rubin test, hysterosalpingography (HSG) or laparoscopy. However, these methods are invasive or expose the patients to ionizing radiation and in some cases, controversy results exist when combined diagnostic methods are

used to assess tubal function. The ability of ultrasound to detect patency of at least one fallopian tube was evaluated in 34 infertile women. The technique was investigated utilizing a sector scanner to assess the tubal patency by demonstrating free fluid in cul-de-sac. The accumulation of fluid in the cul-de-sac was seen in the presence of tubal patency. All ultrasonic findings and HSG were compared with the chromotubations during laparoscopy or laparotomy. Overall accuracy of ultrasound was 88.2% and HSG was 85.3%. Ultrasound demonstrated bilateral occlusion with a sensitivity of 100%, and showed tubal patency with a specificity of 82.6%. These technique should be developed routine screening procedure in evaluation of tubal patency in infertile patients.

(受付: 昭和61年8月29日)

生児を得た子宮内外同時妊娠の2例

Combined Intrauterine and Extrauterine Pregnancy Carried to
Term: Report of Two Cases and a Review

平塚市民病院産婦人科

郡山 智 印出 秀二 持丸 文雄
Satoshi KORIYAMA Syuji INDE Fumio MOCHIMARU

関 隆 李 顕 鋭
Takashi SEKI Kenkoh LEE

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hiratsuka City Hospital

慶応義塾大学医学部産婦人科教室

飯塚 理 八
Rihachi IIZUKA

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

子宮内外同時妊娠は2卵性双胎の特殊な着床異常型と考えられ、今回われわれは、子宮内妊娠が満期まで継続し、生児を得た症例を2例経験した。うち1例は外妊娠児の胎齢を推定することができ、superfetationの可能性も示唆された。また、この2例を含む本邦の77例について検討を行なった。このうち子宮内妊娠が満期まで継続したのは19例(24.7%)であったが、最近の症例では内妊の予後が良く、昭和53年以降では14例中10例(71.4%)で生児を得ている。術前に正診し得たのは77例中わずか4例で、その診断は必ずしも容易とは言えないが、子宮内妊娠の存在にさえ気がつけば予後は比較的良好と言えよう。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(2), 298-301, 1987)

緒言

子宮内外同時妊娠はまれな疾患で、国外では1708年にDuvernyが発表して以来1979年までに589例¹⁾、本邦では昭和5年に桜林が初めて報告をしてから昭和58年までに82例の報告²⁾があるのみである。更にその診断は困難で外妊手術前に正確に診断された例は極めて少ない。しかし最近、超音波検査の普及等により術前診断が可能となり、子宮内妊娠の予後が改善した。

今回われわれは、外妊手術後も子宮内妊娠が継続し、満期産までいたったという貴重な症例を2例経験したので若干の文献考察を加えてここに報告する。

症例1

患者: ■■■ 28歳 主婦

主訴: 妊娠13週 下腹痛

家族歴: 特記すべきことなし

既往歴: 月経は13歳を初潮とし、周期は28日型で整、結婚は24歳、妊娠初期の自然流産が2回、未産婦である。

現症経過: 最終生理は昭和60年2月28日より5日間で、以後無月経となり、5月15日(妊娠11週)、下腹痛、嘔吐、下痢を訴え、近医入院。血液検査にて、WBC 11900、CRP3+の炎症所見、左下腹部に圧痛、同部に超音波検査にて嚢腫を認めた。卵巣嚢腫合併妊娠の診断で安静・経過観察の後当院を紹介される。

5月30日(妊娠13週0日)当院初診となる。内診にて子宮体は双手拳大で柔らかく、左付属器の部位に子宮体部に接して、手拳大の腫瘤を触知した。腔内容は正常で出血を認めなかった。左下腹部に圧痛があつたが、腹膜

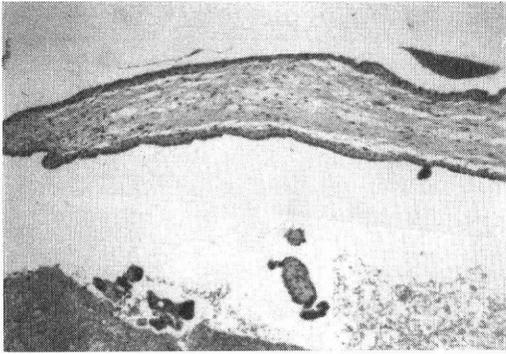


写真 1 切除した左卵管内にみられた絨毛組織

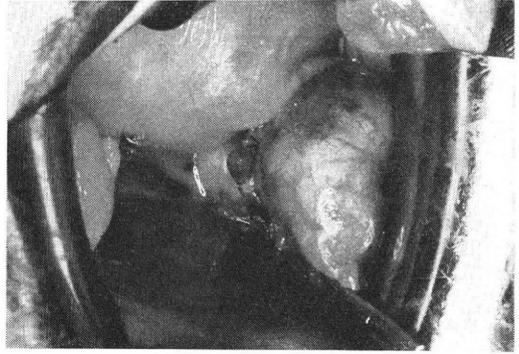


写真 2 症例 2 の開腹所見

刺激症状は認められなかった。超音波検査にて子宮内に胎児像、胎児心拍像を認め、週数相当の BPD (25mm) を確認した。子宮体の左側に描出された不均一な腫瘤像は、子宮との境界がはつきりせず、悪性腫瘍の可能性も疑われた。

翌 5 月 31 日精査のため入院。

6 月 7 日 (妊娠 14 週 1 日) 卵巣囊腫合併妊娠の診断のもとに開腹手術を施行した。子宮体は小小児頭大、軟。子宮底部より子宮を取り囲むように陳旧性の血腫があり、一部大網と癒着していた。血腫を除去してゆくと、鶏卵大に腫大した左卵管を認めた。壁の一部に破裂と思われる部位があつた。卵管内は凝血で充満していた。左卵巣および右付属器は正常大で、血腫中に存在したが、癒着が強かったため黄体は確認できなかつた。左卵管切除術と血腫除去術を行ない閉腹した。

病理学的検索により切除した卵管内に変性を伴つた絨毛組織を認めた (写真 1)。以上より左卵管妊娠を合併した子宮内妊娠と診断した。

術後経過は順調で、6 月 19 日超音波検査にて週数相当の BPD (32mm) を確認し、同日退院した。その後、妊娠経過も順調で、11 月 23 日 (38 週 2 日) で女兒 2,940g を正常分娩した。児に異常はみられなかつた。

症 例 2

患者：[redacted] 31 歳 主婦

主訴：無月経 11 週 下腹痛

家族歴：特記すべきことなし。

既往歴：月経周期は 33 日型で整、結婚は 24 歳で、正常分娩 2 回の経産婦である。

現症経過：最終生理は昭和 60 年 4 月 5 日より 7 日間、平常通りであつた。5 月末ごろ (無月経 7 週ごろ)、心窩部痛、下腹部痛出現。近医受診し、妊娠の診断を受け、症状は投薬にて軽快した。以後、少量の性器出血が断続的に続いた。

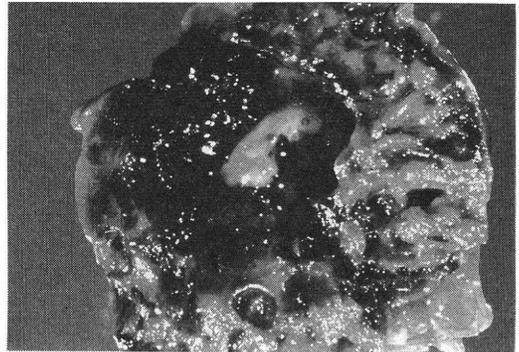


写真 3 左卵管内の胎児

6 月 22 日 (無月経 11 週 2 日)、下腹痛が急激に出現し、当院を紹介される。受診時、体格中等、栄養良好、全身状態良好。下腹部に著明な圧痛を認めるが腹部全体は柔らかく、腹膜刺激症状もなかつた。内診では子宮体部は前傾前屈、超鶯卵大。左付属器に小鶏卵大の囊腫を触れ、圧痛著明。ダグラス窩、傍結合織は軟。腔内容は黄白色少量で、性器出血は認められなかつた。

超音波検査にて子宮内に胎囊、胎児、胎児心拍像を、ダグラス窩に囊腫様の像を認めた。

卵巣囊腫合併妊娠の診断にて入院、安静の上、経過観察となる。

6 月 28 日 (無月経 12 週 1 日)、上記診断にて開腹術施行。写真 2 に開腹所見を示す。子宮体は超手拳大、軟。右付属器は正常。左卵管膨大部は小鶏卵大に腫大し、漿膜面の一部より出血があり、腹腔内には暗赤色の凝血塊約 100ml を認めた。左卵管妊娠流産の診断にて左卵管切除術施行し、閉腹した。切除した卵管内には、完全な形の胎児を認めた (写真 3)。

摘出した標本に発生学的検索を加え、胎齢を推定した。

頭殿長は 5 mm であつた。臓器診断は眼球と心についてのみ可能であつた。普通、明らかな眼球の発生は受精

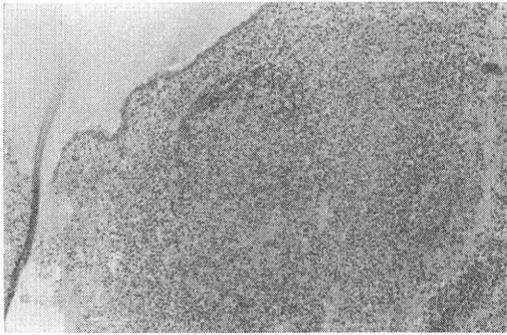


写真 4 網膜の色素沈着が三日月状にみえる

後22日頃から認められると言われているが、摘出標本では網膜の色素沈着と極めて不完全な水晶体が認められ、明らかな眼杯形成はまだみられない(写真4)。心については心腔と思われる構造が見られた。以上より、受精後26日から28日程度と考えられた。

術後経過は良好で、7月5日(無月経13週0日)に行なった超音波検査では BPD 21mm (12週0日相当)、CRL 49mm (11週5日相当)であつたため、この日を妊娠12週0日と修正した。

7月8日退院。その後、妊娠経過良好。昭和61年1月10日(40週0日)、男児3,020gを正常分娩した。児に異常は見られなかった。

考 察

子宮内外同時妊娠の成立機転は2卵性双胎の着床異常であろうと考えられているが、症例2については図1に示すように内妊と外妊の成立機転を便宜的に分類することができよう。まず、内妊と外妊が同一時期の排卵による多胎妊娠であつたとするならば、①②の様な場合が考えられる。このうち①は、最初に切迫症状が出現した妊娠6週に外妊胎児が死亡しているが、この場合は、胎児死亡後、外妊手術が行なわれるまでの約5週間にわたつて死後変性がほとんど起きなかったことになる。

一方②の場合は、外妊胎児の実生存期間と推定胎齡との間に大きな差があつたことになる。つまり外妊胎児のみに發育遅延が存在したことになるが、Fujiらは unilateral tubal quadruplet pregnancy の報告の中で、4つの外妊胎児の間に成長の差が見られたことから、なんらかの要因によつて外妊胎児に成長率の差異が存在する可能性について述べている⁴⁾。

外妊胎児の自己融解が肉眼的にも組織学的にも軽微であつたことから、外妊手術時あるいはその直前に外妊胎児が死亡したと考え、しかも外妊胎児に發育遅延がなかつたならば、③に示すように内妊の存在下で排卵・受

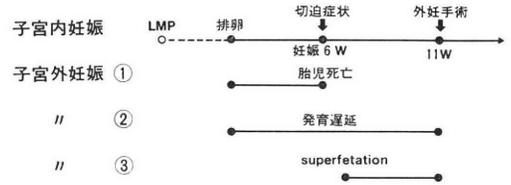


図 1 症例2の成立機転

表 1 最近の77例について

1. 平均年齢	31.3歳
2. 妊娠歴	未産婦 32% 経産婦 68%
3. 外妊の部位	卵管 87.4% 卵巢 2.6% 腹腔内 10.0%
4. 症 状	ショック 17例 下腹痛・性器出血 27例 下腹痛のみ 18例
5. 術前診断	外妊 27例 切迫流産 13例 正診 4例
6. 先行治療	開腹術 62% 内妊中絶 38%
7. 内妊の予後	満期まで継続 19例

精・着床が起こる superfetation の可能性が考えられる。

いずれにしても、現段階では、外妊胎児の成長率あるいは妊娠初期における胎児の母体内での死後変性についての詳しいデータがないために、この症例が上記いずれのケースであるかを断定することは困難であると思われる。

本邦における子宮内外同時妊娠の報告は、昭和5年の桜林以来、現在まで約82例を数えると言われている²⁾。このうち渡辺らは、昭和53年に63例について統計的検索を行なっているが³⁾、今回われわれはそれ以降に発表された12例と今回のわれわれの2例を加えて検討を行なつた(表1)。

この中で発症の時点での診断について見ると、正診が4例と極めて少なく、術前の診断が非常に困難であることがわかる。しかし、超音波検査の普及に伴つて術前に子宮内妊娠が確認される例が増えている。そのような例では、妊娠に合併した虫垂炎、卵巢嚢腫などと診断され、ほとんどが先行治療として開腹術が行なわれている。実際、最近の14例については術前に子宮内妊娠に気がついていたのは10例(71.4%)で、内妊中絶が先に行なわれていたのはわずか1例で、この例も患者が妊娠中絶を希望したためとのことであつた。

内妊の予後については外妊手術後の自然流産は13例中2例とかなり少ない。特に53年以降は満期産まで至ることが多く、14例中10例(71.4%)で生児を得ている。

つまり、術前に正診は得られなくとも、術前に子宮内妊娠の存在に気がつくことは比較的容易であり、そのことが内妊の予後の向上に結びついていると思われた。むしろ、子宮内妊娠が確認できたからといって外妊を否定してしまい、手術の時期を逸してしまうことのないように注意すべきであろう。

本症の誘因のひとつとして、排卵誘発剤の投与があげられているが^{2,5,6)}、排卵誘発剤による妊娠は14例中3例(21.4%)で、Albert Reece の統計による15.1%¹⁾という数値を若干上まわつた。

おわりに

以上の如く、今回発表した症例は生児を得た子宮内外同時妊娠として稀有であるばかりでなく、superfetationの可能性も示唆され、生殖生理学上も興味ある症例と考え、臨床統計と併せて報告した。

稿を終えるにあたり、御指導後校閲を賜りました慶応義塾大学医学部法医学教室黒田直人先生に深謝致します。

文 献

- 1) Reece, E. A., Petrie, R. H., Sirmans, M. F., Finster, M. and Todd, W. D.: Combined intrauterine and extrauterine gestations: A review: Amer. J. Obstet. Gynec., 146: 323, 1983.
- 2) 斉藤 幹, 高橋一久, 渡辺千冬, 三高千恵子, 安村鉄雄, 東 恭彦, 矢沢珪二郎, 成田例弘, 熊坂高弘: 宮内外同時妊娠と排卵誘発, 産婦治療, 48: 617, 1984.
- 3) 渡辺千冬, 三高千恵子, 斉藤 幹: 本邦における子宮内外同時妊娠の統計的観察, 日産婦関東連会報27号: 45, 1983.
- 4) Fuji, S., Ban, C., Okamura, H. and Nisimura, T.: Unilateral tubal quadruplet pregnancy: Amer. J. Obstet. Gynec., 141: 840, 1981.
- 5) Berger, M. J. and Taymor, M. L.: Simultaneous intrauterine and extrauterine pregnancies following ovulation induction. Amer. J. Obstet. Gynec., 113: 821, 1972.
- 6) 石原楷輔, 山藤泰功, 平野和雄, 菊池三郎: HMG-HCG 療法と AIH にて子宮内外同時妊娠をきたした1例, 産科と婦人科, 51: 245, 1984.

Combined intrauterine and extrauterine pregnancy carried to term: Report of two cases and a review

Satoshi Koriyama, Syuji Inde, Fumio Mochimaru, Takashi Seki and Kenkoh Lee

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hiratsuka City Hospital

Rihachi Iizuka

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

The coexistence of intrauterine and extrauterine pregnancy is a somewhat rare obstetric phenomenon, although it is believed that the etiologic factors of combined pregnancy are the same as those of ordinary tubal pregnancy. Two cases of combined pregnancy carried to term including a possible case of superfetation are described.

Analysis of 75 cases reported in our country and two cases from our hospital revealed that the intrauterine pregnancy reached term and was delivered in only 19 cases of those (24.7%) in total but 10 among the 14 cases (71.4%) in recent 8 years.

Preoperative diagnosis of combined pregnancy is extremely difficult as shown in the result that only four cases have been precisely diagnosed but the prognosis of the intrauterine pregnancy seems fair so long as clinical suspicion of an additional pregnancy is aroused.

(受付: 昭和61年8月20日)

ANTIBIOTIC PROPHYLAXIS : SIGNIFICANCE IN BACTERIAL FLORA IN FEMALE INTERNAL GENITAL ORGAN

Masahiro SAITOH, and Satoshi USUKI

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

(Director : Prof. Hirokazu IWASAKI)

Abstract : To investigate the bacterial flora in the female internal genital organ, samples for bacterial cultures were obtained at abdominal hysterectomies from 28 patients who were not administered any preoperative antibiotics. The minimal inhibitory concentrations of antibiotics for these isolated bacteria were determined. Furthermore, to evaluate the efficacy of an antibiotic treatment *in vivo*, bacterial cultures were obtained from 13 patients who had been administered an antibiotic, cefmetazole (CMZ), prior to the operation. In the untreated genital organ except for the vagina, the detection of bacteria from the patients with benign and malignant uterine disease were 61 % and 80 %, respectively. In contrast, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and many strains of anaerobes were conspicuously diminished in the treated patients. These results indicate the presence of bacteria as indigenous in the female internal genital organ and that the antibiotic prophylaxis is useful to reduce such indigenous bacteria.

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 302-310, 1987)

Introduction

It is suspected that most of the gynecologic infections are caused by the endogenous bacteria (Fig. 1). The bacterial flora of the vagina and cervix has been studied in more detail during the 1970s¹⁻³⁾, and the presence of anaerobic organisms as normal bacterial flora has been clarified as well as that of aerobic ones. Although these bacterial flora are frequently implicated as pathogens in pelvic inflammatory disease or postoperative local infection, the mechanism of the onset of these infectious diseases is not well elucidated. There are few reports concerning the bacterial research of the female internal genital organ except for the vagina and cervix which may have an important key to understanding the mechanism of onset of pelvic infection.

It is said to be apparent that maximum benefit is gained from antibiotic prophylaxis if therapeutic concentrations are already present in the tissues before the incision^{4,5)}. A

number of reports on the efficacy of antibiotic prophylaxis have been available and it was reviewed that most of the authors had stated that antibiotic prophylaxis is useful on clinical evaluation⁶⁾. However, there are few reports available in the bacteriological basis of prophylactic antibiotics.

There are many surgeries and procedures such as artificial insemination of husband's semen (AIH) and endometrial biopsy in connection with fertility and sterility, threatening infection. However, it is difficult to get enough surgical specimens for bacterial analyses from sterile patients. This study was performed to know the indigenous presence of bacterial flora and to evaluate the efficacy of prophylactic chemotherapy selecting the patients with gynecologic diseases as subjects.

Material and Methods

Forty-one patients admitted to University Hospital of Tsukuba for abdominal hysterectomies were selected as subjects and all of them had no sign of infection after careful

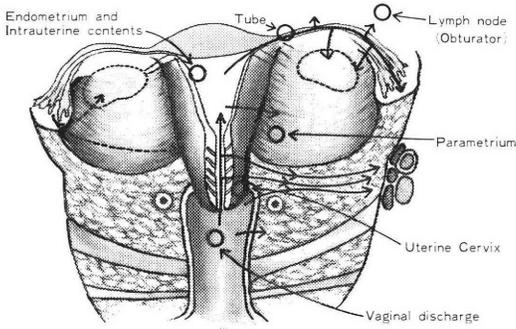


Fig. 1 Supposed pathways of pathogens
O ; Samples collected

examinations. Thirteen of the patients (group 1) had benign uterine diseases (11 uterine myomas, 1 ovarian tumor and 1 hydatidiform mole) and were administered no antibiotic before abdominal total hysterectomies. Twenty-eight patients had malignant uterine diseases (20 uterine cervical cancers and 8 endometrial cancers), and these patients were divided into two groups; group 2: 15 patients receiving no preoperative antibiotics, and group 3: the remaining 13 patients receiving CMZ (2g by drip infusion, every 12 hours for 2 days before the operation). To prevent the influence of CMZ in the tissues on bacterial culture, each patient was administered no antibiotic during 8 hours before the resection of the uterus. The mean age and mean body weight of each group were 44 years old, 52.0 kg in group 1, 50 years old, 52.7 kg in group 2 and 51 years old, 55.8 kg in group 3, respectively. All of group 1 patients had menstrual cycles, while about a half of group 2 and 3 patients were in the postmenopausal stage. Six patients in group 2 and 5 in group 3 underwent abdominal radical hysterectomies with lymphadenectomies, 4 in group 2 and 5 in group 3 were performed extended total hysterectomies with lymphadenectomies, and all of the group 1, 5 in group 2 and 3 in group 3 had only abdominal total hysterectomies. The mean durations of performed operations were 104, 200 and 188 minutes in group 1, 2 and 3, respectively.

Just prior to the hysterectomy, vaginal swab was collected. The surgical specimens were collected from endometrium, oviducts, cervical myometrium, parametria and/or obturator and internal iliac lymph nodes.

Table 1 Procedure of bacterial culture

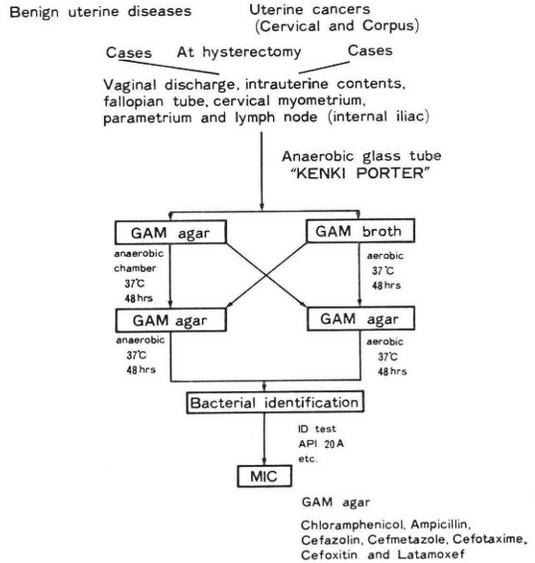
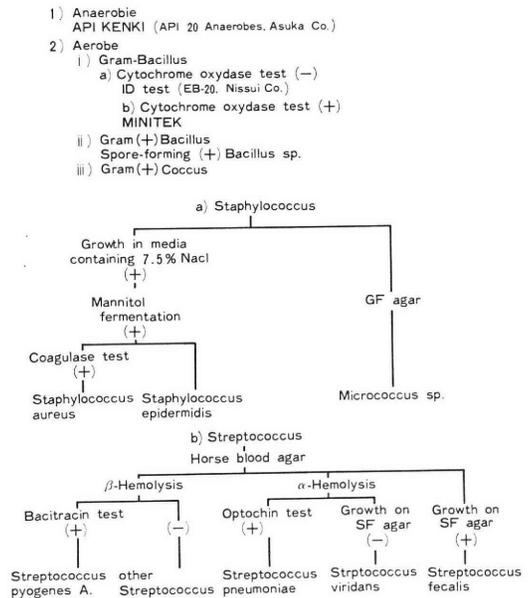


Table 2 Bacterial identification



The tissues except for the endometrium were collected before the vaginal vault was opened to prevent the contamination by the vaginal contents. The endometrium was taken by an incision in the uterine body immediately after the hysterectomy. The amount of each tissue was more than 500 mg.

Each specimen was placed in an anaerobic porter (Clinical Supply Co., Ltd., Tokyo) at the time it was collected. The following

procedures were carried out as soon as possible. The tissues were inoculated onto GAM agar plates (Nissui Co., Ltd., Tokyo) and cultured aerobically, and anaerobically in an anaerobic chamber ($N_2-80\%$, $H_2-10\%$, $CO_2-10\%$). At the same time, enrichment cultures were carried out in GAM broths (Nissui Co., Ltd., Tokyo). Each culture was examined after 48 hours' incubation at $37^\circ C$. After isolation cultures on GAM agar plates, isolated bacteria were gram stained and examined morphologically (Table 1). For identification of aerobes, horse blood agar, mannite salt agar, EB-20 and SP-18 systems (Nissui Co., Ltd., Tokyo) were used. API-20 A system (Asuka Junyaku Co., Ltd., Tokyo) was used to identify the anaerobes (Table 2). Since the enrichment culture was done at first, no quantitative evaluation of the bacteria was available.

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by agar dilution method⁷⁾. Suspensions containing 10^6 organisms per milliliter were inoculated onto GAM agars. Antibiotics used for determination of MIC were chloramphenicol (CP), ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ), CMZ, cefotaxime (CTX) and latomoxef (LMOX). Standard reference powders of each antibiotic were provided by the manufacturers. The MIC_{90} denotes the MIC for 90% of the isolates express-

ed in micrograms per milliliter.

Chi-square test was utilized in the statistical analysis.

Results

Table 3 demonstrates the clinical diagnosis and the number of the bacterial species detected from group 1 patients. From the genital organ except for the vagina, aerobes alone were detected in 4 patients, only anaerobes in 1 and both aerobes and anaerobes in 3 and none in 5.

Table 4 documents microorganisms recovered from group 2 patients and the clinical stage (FIGO)⁸⁾. From the genital organ except for the vagina, aerobes alone were recovered in 4 patients, only anaerobes in 2, both aerobes and anaerobes in 6 and none in 3. Eventually, anaerobes were detected in 53% of all patients. Although the rate of bacterial recovery was not correlated to the clinical stage, the patient after conization revealed the presence of many strains of aerobes and anaerobes.

The summary of tables 3 and 4 is shown in Fig. 2. Though the vaginal bacterial flora seemed to be the same in both groups, the number of the anaerobic strains from other tissues was less in group 1 than in group 2. Especially, the simultaneous detection of both aerobes and anaerobes from the same tissues

Table 3 Bacterial identification in benign uterine diseases without antibiotic administration

Case	Disease	Vagina		Em.		Cervix		Oviduct		Pm.	
		A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.
1	Uterine myoma		1		1						
2	ditto	1	1	1	1						
3	ditto	1		1							
4	ditto	1		1						1	
5	ditto	1						1		1	1
6	ditto	1	2	1				1			1
7	ditto		3	1				1			
8	ditto		2								
9	ditto	1	1								
10	ditto	1									
11	ditto	1	1								
12	Hydatidiform mole	1						1			
13	Left ovarian tumor	1		1							

Em.; Endometrium Pm.; Parametrium A.; Aerobes Ana.; Anaerobes
Numbers are numbers of strains.

Table 4 Bacterial identification in uterine cancer without antibiotic administration

Case	Clinical stage*	Vagina		Em.		Cervix		Oviduct		Pm.		L.N.	
		A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.
1	Cervical cancer	0**	2	2	3	1	3	1	2	1			N.C.
2		0	1			1				1			N.C.
3	I a												
4	I a		2					1	1	1		1	
5	I b	1		1				1					N.C.
6	I b	2											
7	II a		N.C.		3			1	1	1			
8	II b										1		N.C.
9	II b		1		1		1	1		1		1	
10	II b	1				1							
11	Corpus cancer	I	2	1	2	1							N.C.
12		I	1		1								
13		I	2	2									
14		II		2	1					1	1		
15		IV		N.C.		1		2		2		1	N.C.

Em. ; Endometrium Pm. ; Parametrium L.N. ; Illiac lymph node A. ; Aerobes
 Ana. ; Anaerobes * ; FIGO 1979⁸⁾ ** ; After cervical conization N.C. ; Not collected
 Numbers are numbers of strains.

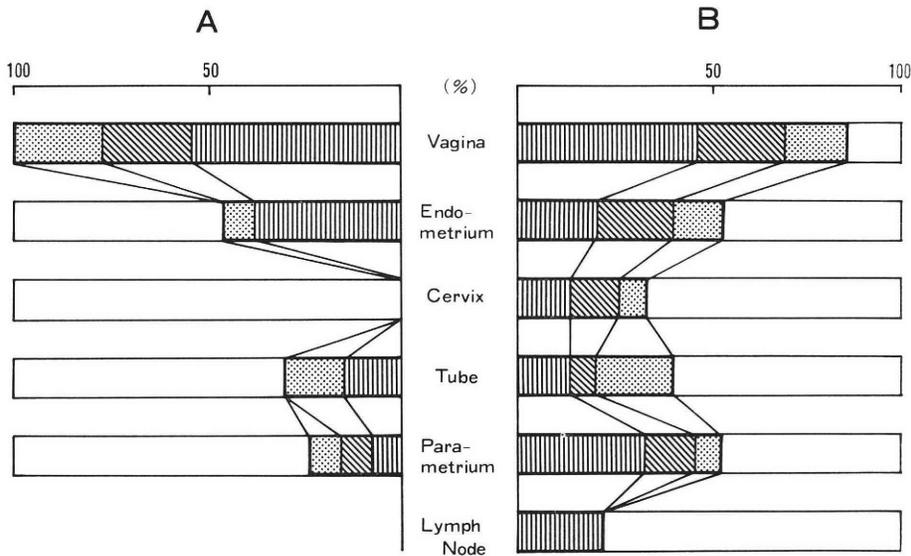


Fig. 2 Frequency of bacterial detection in benign (A) and malignant (B) uterine diseases without antibiotic administration.

□ ; No bacterial detection, ▨ ; Aerobes alone,
 ▩ ; Anaerobes alone, ▤ ; Both aerobes and anaerobes.
 Each part is expressed as percentage.

was very rare in group 1.

In the vagina of the patient with benign disease (Table 5), *Micrococcus* species, *Escherichia coli* (*E. Coli*) and *Bifidobacterium* spe-

cies were dominant. From the other organs, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Micrococcus* species., *E. coli* and *Peptococcus* species

Table 5 Correlation in bacteria among vagina, endometrium and other tissues in the groups without antibiotic administration

	Group 1			Group 2		
	Vagina	Em.	Others	Vagina	Em.	Others
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	3 (1)	1	2 (1)	6 (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1 (1)	1	0	0	1
<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	0	0	3	2 (2)	0
<i>Micrococcus</i> species	3	1 (1)	1	2	1 (1)	1 (1)
<i>Escherichia coli</i>	5	2 (1)	0	3	2 (1)	1 (1)
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Bacillus</i> species	0	0	0	0	0	2
<i>Peptococcus</i> species	2	0	2	2	4 (1)	5 (2)
<i>Eubacterium</i> species	2	0	0	2	1	1
<i>Bifidobacterium</i> species	4	1 (1)	0	2	0	1 (1)
<i>Clostridium terfium</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i> species	2	1 (1)	0	1	1	2
<i>Bacteroides</i> species	1	0	0	2	0	2 (1)
<i>Fusobacterium</i> species	0	0	0	0	1	1

Em.; Endometrium Numbers are numbers of strains and numbers in parentheses are numbers of strains which were the same as in the vagina in the same patient.

were recovered with some frequency. Other organisms were rarely recovered. On the contrary, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* species., *E. coli*, *Peptococcus* species, *Eubacterium* species, *Bifidobacterium* species and *Bacteroides* species were detected at almost the same rate from the vagina of group 2 patients, whereas *S. epidermidis* and *Peptococcus* species were dominant in other tissues.

MICs were determined for these 43 aerobic strains and 40 anaerobic ones. Although MICs in aerobic gram-positive cocci were not so much different, ABPC, CEZ and CTX showed relatively lower MICs than other antibiotics with an MIC₉₀ of 3.125 µg/ml, 12.5 µg/ml and 12.5 µg/ml, respectively (Fig. 3). One third of *E. coli* were resistant to ABPC, while CMZ showed the lowest MIC on them (MIC₉₀ 6.25 µg/ml). All of anaerobic gram-positive cocci were sensitive for all antibiotics examined and ABPC revealed the lowest MIC. The MIC₉₀ of ABPC, CMZ, CEZ and CP for anaerobic gram-positive cocci were 1.56 µg/ml, 1.56 µg/ml, 3.125 µg/ml and 6.25 µg/ml, respectively. ABPC was effective for anaerobic gram-positive bacilli, either. MICs of cepheids in them were shown to

be almost similar.

Table 6 lists microorganisms isolated from group 3 patients. Only one patient resulted in no bacterial recovery from the genital organ except for the vagina. From the genital organ except for the vagina, aerobes alone were detected in 10 patients and both aerobes and anaerobes in 2. Anaerobes were detected in 15% of all preoperative antibiotic-treated patients. The bacterial detection rate was not correlated to the clinical stage.

From the vagina of the group 3 patients, *S. epidermidis*, *S. aureus* and *Bacillus* species were obtained in 2 patients and *Bacteroides* species were in 4. Other bacteria were rarely detected. In the other organs, *S. epidermidis*, *Micrococcus* species and *Bacillus* species were dominant. Though anaerobes were rarely detected, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium* species and *Propionibacterium acnes* were recovered. The detection of *E. coli* and anaerobes was conspicuously lower in group 3 than in groups 1 and 2 (Table 7).

On clinical evaluation, none of the group 1 patients had any sign of postoperative infection including urinary tract infection. On the other hand, 2 of the group 2 patients (13.3%) and 1 of the group 3 patients (7.7

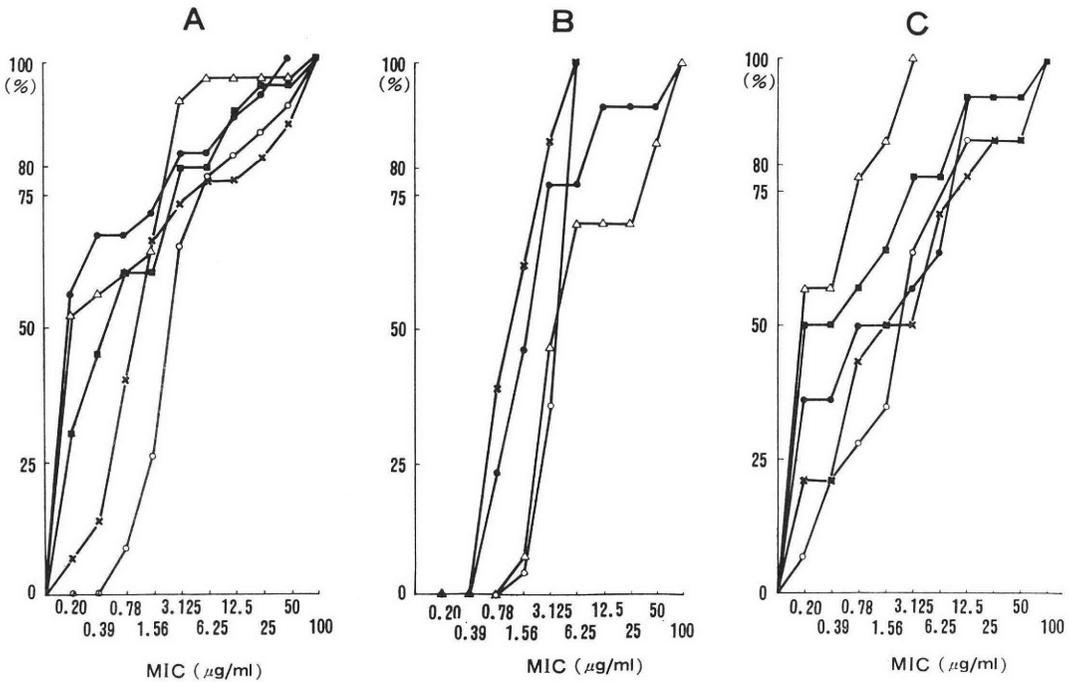


Fig. 3 Susceptibility profiles of clinical isolates ; (A) ; 27 strains of aerobic gram-positive cocci (13 strains of *S. epidermidis*, 3 of *S. aureus*, 2 of *Streptococcus faecalis*, 2 of *Streptococcus pyogenes* and 7 of *Micrococcus* species), (B) ; 13 strains of *E. coli*, (C) ; 14 strains of anaerobic gram-positive bacilli (6 strains of *Eubacterium* species, 7 of *Bifidobacterium* species and 1 of *Clostridium terfium*. Δ — Δ ; ABPC, \blacksquare — \blacksquare ; CTX, \times — \times ; CMZ, \circ — \circ ; CP, \bullet — \bullet CEZ.

Table 6 Bacterial identification in uterine cancer with administration of cefmetazole

Case	Clinical stage*	Vagina		Em.		Cervix		Oviduct		Pm.		L.N.	
		A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.	A.	Ana.
1	Cervical cancer	0**	1							1			
2		0**	1	1	1					1			
3		0	1										N.C.
4		I a	1		1								N.C.
5		I a	1		1			1		1			N.C.
6		I a	1									1	
7		I b	1	1				1	1	1	1	1	1
8		I b						1		1			
9		II b	1	1	N.C.	1		1		1		1	
10		II b		1		1							
11	Corpus cancer	I	1	2						1		1	
12		I	1		1								
13		I		1	1		N.C.						

Em. ; Endometrium Pm. ; Parametrium L.N. ; Illiac lymph node A. ; Aerobes
 Ana. ; Anaerobes * ; FIGO 1976³⁾ ** ; After cervical conization
 N.C. ; Not collected Numbers are numbers of strains.

Table 7 Correlation in bacteria among vagina, endometrium and other tissues in uterine cancer with administration of cefmetazole

	Vagina	Em.	Others
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	2	5 (2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0	0
<i>Micrococcus</i> species	1	1 (1)	2 (1)
<i>Escherichia coli</i>	1	1 (1)	0
<i>Proteus Mirabilis</i>	1	0	0
<i>Bacillus</i> species	2	1	3
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	0	1
<i>Eubacterium</i> species	1	1 (1)	0
<i>Bacteroides</i> species	4	1 (1)	0

Em. ; Endometrium

Numbers are the number of strains and numbers in parentheses are the number of strains which were the same as in the vagina in the same patient.

%) were diagnosed as having postoperative local infections, but the difference between these rates was not significant at the level of $p < 0.05$.

Comment

As gynecologic operations or intrauterine procedures such as AIH and endometrial biopsy may sometimes cause a risk of contaminations of the procedure site by the vaginal microflora, the routine use of prophylactic antibiotics for the patients undergoing these procedures seems to be done in many hospitals. Although there is still much controversy about whether this antibiotic prophylaxis is essentially needed, most of the reports concerning this question have shown significant decrease in febrile morbidity and urinary tract infection⁹⁻¹²⁾ and reduction in wound infection⁹⁾, pelvic cellulitis¹²⁾ and total hospital stay^{9,10)}. It seems to have been believed that gynecologic postoperative local infections are almost caused by the contamination of the vaginal microflora¹³⁾. But our data suggest the indigenous presence of microorganisms in and around the female internal genital organ except for the vagina without any sign of infection. These bacteria may act as the pathogens in postoperative local infection or in pelvic inflammatory disease due to the change of local resistance. Also it is natural that these indigenous bacteria are attributed to ascending infection or lymphogenous infection from the vagina (Fig. 1).

In this study, we considered external contamination to be the difficulty that led to errors in the results, that is, airborne bacteria, insufficient sterilization of the skin, and contamination accompanying surgical procedures. But bacterial cultures of the blood in the operating area, the surface of the scalpel used and subcutaneous tissue during these procedures had shown no bacterial detection even with enrichment cultures. This fact may be an evidence that the problem of external contamination can be denied.

As compared with total hysterectomy, only a few authors have reported on the efficacy of the prophylactic antibiotics for patients who underwent such extended procedures as extended total or radical hysterectomy with pelvic lymphadenectomy^{12,15)}, though the use seems to be more necessary. Such extended procedures provide higher risk factors for postoperative infection because of strangulated tissues, difficult hemostasis, retention of lymph and foreign bodies. In addition, the fact that the incidence of indigenous bacteria was shown to be more frequent with malignancy and that the antibiotic treatment decreased the number of bacterial strains in this *in vivo* study may be a support of prophylactic antibiotics for extended surgery on patients with malignancy.

Despite few cases, the presence of many strains of bacteria after conization was noteworthy. In the literature, most of the authors found that there was an increase in infectious

morbidity after hysterectomy following cervical conization¹⁶⁻¹⁸⁾. Our bacteriological data support the higher possibility of operative site infection in such condition. Cervical conization, not only has an indication for antibiotic prophylaxis in itself, but also can be a higher risk factor for postoperative infection after the following hysterectomy.

AIH is also usually done in connection with fertility and sterility. Our previous report¹⁴⁾ implied that seminal fluids contain relatively many aerobes and anaerobes such as *S. epidermidis*, *E. coli*, *Bacteroids fragilis*, etc.. Since the seminal fluid is added to the vaginal and intrauterine contents at the time of AIH, the procedure of AIH has also a risk of infection. In our clinic, 3 of 209 patients (1.44 % ; 3 of 1129 AIHs : 0.27 %) undergoing AIH developed pelvic inflammatory diseases, although antibiotic prophylaxis was performed.

The method of collecting the vaginal secretion unexpectedly posed some problems. The vaginal swab was taken before the vagina was scrubbed at hysterectomy. However, the patients had been underwent vaginal examinations and douche to confirm the clinical diagnosis before the operation. Therefore, it is considered that these procedures might cause the change of the vaginal microflora. Moreover, the secretion was small in volume and the swab was less regarded to anaerobic conditions. The lower frequency of bacterial detection from the vagina may be caused by such problems.

CMZ was selected as the prophylactic antibiotic, because of its wide sensitivity distribution for each aerobe and anaerobe, especially against gram-negative bacilli and its high concentrations detected in the female internal genital organs after the infusion¹⁹⁾.

With administration of CMZ, the detection rates of *E. coli* and most of anaerobes were apparently diminished and that of *S. aureus* was relatively decreased. It is well known that these microorganisms play an important role in postoperative gynecologic infections. Therefore, the diminution of such virulent pathogens by antibiotic administration prior to the operation provides a key to understanding the efficacy and usefulness of prophylactic antibiotics in order to prevent the postope-

rative infection or the pelvic inflammatory disease due to intrauterine procedures such as AIH.

References

- 1) Gorbach, S. L., Menda, K. B., Thadepalli, H. and Keith, L. : Anaerobic microflora of the cervix in healthy women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 117 : 1053, 1973.
- 2) Ohm, M. J. and Galask, R. P. : Bacterial flora of the cervix from 100 pre-hysterectomy patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 122 : 683, 1975.
- 3) Grossman III, J. H. and Adams, R. L. : Vaginal flora in women undergoing hysterectomy with antibiotic prophylaxis. *Obstet. Gynecol.*, 53 : 23, 1979.
- 4) Burke, J. F. : The effective period of antibiotic prophylaxis in experimental incisions and dermal lesions. *Surgery*, 50 : 161, 1961
- 5) Burke, J. F. : Preventive antibiotic management in surgery. *Annu. Rev. Med.*, 24 : 289, 1973.
- 6) Cartwright, P. S., Pittaway, D. E., Jones, H. W. and Entman, S. S. : The use of prophylactic antibiotics in obstetrics and gynecology. A review. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 39 : 537, 1984.
- 7) The Investigation Committee of MIC Determination for Anaerobes, Japan Society of Chemotherapy : A method for determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) for anaerobes. *Chemotherapy*, 27 : 559, 1979 (in Japanese).
- 8) Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. 17 : 20, Radiumhemmet, S-104 01 Stockholm, Sweden, 1979.
- 9) Allen, J. L., Rampone, J. F. and Wheelless, C. R. : Use of a prophylactic antibiotic in elective major gynecologic operations. *Obstet. Gynecol.*, 39 : 218, 1972.
- 10) Rosenheim, G. E. : Prophylactic antibiotics in elective abdominal hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 119 : 335, 1974.
- 11) Ohm, M. J. and Galask, R. P. : The effect of antibiotic prophylaxis on patients undergoing total abdominal hysterectomy. I. Effect on morbidity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 125 : 442, 1976.
- 12) Rosenshein, N. B., Ruth, J. C., Villar, J., Grumbine, F. B., Dillon, M. B. and Spence, M. R. : A prospective randomized study of doxycycline as a prophylactic antibiotic in patients undergoing radical hysterectomy. *Gynecol. Oncol.*, 15 : 201, 1983.
- 13) Ledger, W. J., Gee, C. and Lewis, W. P. :

Guidelines for antibiotic prophylaxis in gynecology. Am. J. Obstet. Gynecol., 121 : 1038, 1975.

- 14) Saito, M., Usuki, S. and Iwasaki, H. : Bacterial analysis in sperm, vagina and uterine cavity at artificial insemination of husband. Proc. 13th Int. Congr. Chemo., Part 124 : 93, Vienna, 1983.
- 15) Creasman, W. T., Hill, G. B., Weed, J. C. and Gall, S. A. : A trial of prophylactic cefamandole in extended gynecologic surgery. Obstet. Gynecol., 59 : 309, 1982.
- 16) DeCenzo, J. A., Malo, T. and Cavanagh, D. : Factors affecting cone-hysterectomy morbidity: A study of 200 patients. Am. J. Obstet. Gynecol., 110 : 380, 1971.
- 17) Wisborg, T. : The cone biopsy-hysterectomy time interval related to wound infection. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 51 : 1, 1972.
- 18) Forney, J. P., Morrow, C. P., Townsend, D. E. and DiSaia, P. J. : Impact of cephalosporin prophylaxis on conization-vaginal hysterectomy morbidity. Am. J. Obstet. Gynecol., 125 : 100, 1976.
- 19) Doko, F. : Fundamental and clinical investigation of cefmetazole in the obstetric and gynecological field. Jap. J. Antibiotics, 35 :

1951, 1982.

女性内性器に於ける常在細菌叢と予防的 抗生剤投与の意義

筑波大学臨床医学系産科婦人科

(主任：岩崎寛和 教授)

齊藤正博, 臼杵 愨

女性内性器組織中の細菌叢を検索する目的で、術前に抗生剤投与を行なわない13名の良性子宮疾患患者および15名の悪性子宮疾患患者の内性器から、手術時に検体を採取して細菌培養と同定および最小発育阻止濃度の測定を行なった。続いて術前に抗生剤の投与を行なって、*in vivo*での細菌の消失の有無を検索する目的で、悪性子宮疾患患者13名にセフメタゾールの投与を行ない、上記と同様の細菌培養と同定を行なった。

抗生剤非投与群における膣以外の内性器からの細菌検出率は、良性子宮疾患患者で61%、また悪性子宮疾患患者で80%であった。膣内細菌叢については両者の間で差は認められなかった。抗生剤投与による効果は膣内細菌叢に対しては不十分であったが、膣以外の内性器では、大腸菌、黄色ブドウ球菌及び嫌気性菌の検出率が低下、あるいは全く検出されなくなった。以上の結果は、女性内性器に於ける組織中常在細菌叢の存在と、子宮内操作ないし手術的操作に於ける予防的抗生剤投与の有用性を示唆している。

島根医大附属病院産科婦人科不妊外来における 長期不妊の臨床的統計

Statistical Studies of Long-term Infertile Women in Our Infertile Clinic

島根医科大学医学部産科婦人科学教室

高橋 健太郎 吉野 和男 荒木 芳美
Kentaro TAKAHASHI Kazuo YOSHINO Yoshimi ARAKI
西垣 新 白井 孝昭 草刈 万寿夫
Arata NISHIGAKI Takaaki SHIRAI Masuo KUSAKARI
内田 昭弘 北尾 学
Akihiro UCHIDA Manabu KITAO

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

不妊期間が治療効果にどのような影響を及ぼしているかを知るために昭和54年10月より昭和60年9月までに当科不妊外来を受診した挙児希望患者351名のうち、初診時不妊期間5年以上の126名を長期不妊群とし、初診時不妊期間5年未満の225名を対照群として臨床統計的に比較検討し、以下の結果を得た。

1. 原発性不妊と続発性不妊の割合は、長期不妊群、対照群ともに約3:2で、両者に差は認められなかった。
2. 不妊原因では、長期不妊群は対照群と比較して、卵管因子、男性因子が高率であり、多数の不妊因子が重複していた。
3. 妊娠率は、対照群が42.2%であるのに較らべ、長期不妊群は22.2%と低値であった。
4. 不妊原因別の妊娠率は、対照群では卵管因子の76.7%、長期不妊群では男性因子の30.4%が最高であった。
5. 流・早産率は、対照群で25.4%、長期不妊群では16.7%であった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 311-315, 1987)

緒 言

不妊症に対する概念は時代とともに変化を示しており、近年は結婚年齢の高齢化、希望児数の減少という社会的背景のもとに、その診断法、治療法も急速に進歩しており、IVF-ETの成功により、従来は妊娠不可能と考えられていた症例も妊娠が出来るようになった。しかし、上述の医学的要因の進歩の割には治療効果は期待するほど満足のものではなく、やはり受診までの不妊期間等の社会的要因の占める割合も無視出来ない。今回、不妊期間が治療効果にどのような影響を及ぼしてい

るかを検討し、若干の知見を得たので報告する。

研究対象及び方法

昭和54年10月15日の島根医大附属病院開院以降昭和60年9月30日までに産科婦人科不妊外来を受診した351名の不妊症患者を対象とした。なお、挙児希望患者であれば、不妊期間が1年以内でも診療対象とした。以上351名の不妊患者のうち、初診時不妊期間5年以上の患者を長期不妊群とし、初診時不妊期間5年未満の患者を対照群として臨床統計的に比較検討した。

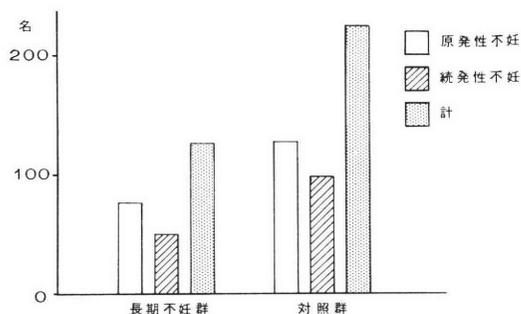


図1 各群の患者数

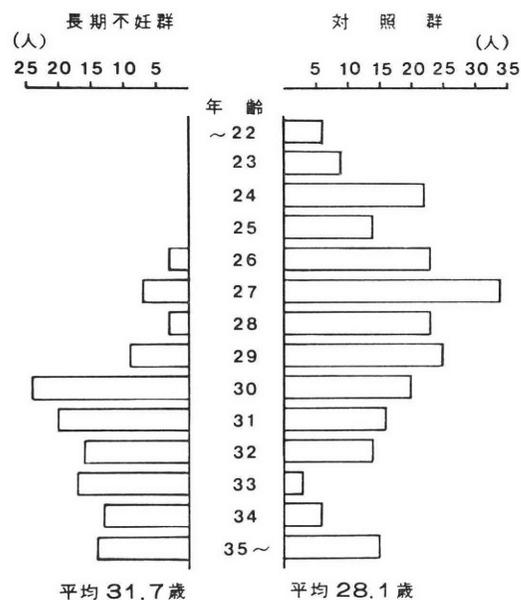


図2 初診時年齢

研究成績

〔頻度〕

長期不妊群は126名、対照群は225名で、不妊症患者全体に対する割合は、長期不妊群35.9%、対照群64.1%であった。また、原発性不妊と続発性不妊の割合は、長期不妊群、対照群ともに約3:2の割合で原発性不妊が多

く、長期不妊群と対照群とでは差は認められなかつた(図1)。

〔初診時年齢分布〕

初診時年齢は図2に示すように、対照群では19~39歳と広く分布し、27歳にピークをもつ分布を示したが、長期不妊群では26~38歳の分布で、30歳で急に高頻度となり、30歳以降も高頻度が持続する分布を示した。平均年齢も、対照群の28.1歳と比較して、長期不妊群では31.7歳と対照群よりも約3歳高齢であった。

〔不妊原因〕

妊娠力により大きな影響を及ぼすと推測される因子を考えると、表1に示すように長期不妊群、対照群ともに卵巣・内分泌因子が最も高率であったが、対照群の34.7%と比較して長期不妊群は27.0%と少なく、その反面、卵管因子、男性因子が対照群よりも高率であった。また、長期不妊群は多数の不妊因子が重複して存在している事も判明した。

〔妊娠率〕

妊娠成功率は表2に示すように、対照群は225名中95名の妊娠を認め、42.2%の妊娠成功率であるのに対して、長期不妊群では126名中28名の妊娠成立しか認めず、妊娠成功率は22.2%と低い値であった。また、長期不妊群、対照群ともに原発性不妊患者の方が続発性不妊患者に比して、約10%、妊娠成功率が低率であった。

〔初診時年齢と妊娠率〕

初診時年齢と妊娠率との関係を図3に示す。各年齢層において、対照群の方が長期不妊群よりも妊娠率は高く、また、年齢が増すにつれ、妊娠率は低下している事も分かつた。

〔初診後妊娠に至るまでの期間〕

妊娠成立症例における初診時より妊娠成立までの期間を図4に示す。1年以内の妊娠は、対照群で83名中65名、78.3%、長期不妊群で20名中16名、80.0%であり、治療開始より1年以内に大半が妊娠している。そして、治療開始後1年以上経たものでは、治療期間が長くなるほど妊娠し難くなる事が推測され、その難度は長期不妊

表1 不妊原因

不妊因子	長期不妊群			対照群			計(%)
	原発性	続発性	計(%)	原発性	続発性	計(%)	
卵巣・内分泌因子	16	18	34(27.0)	44	34	78(34.7)	112(31.9)
卵管因子	12	14	26(20.6)	9	21	30(13.3)	56(16.0)
子宮因子	14	8	22(17.5)	30	13	43(19.1)	65(18.5)
男性因子	21	2	23(18.3)	23	7	30(13.3)	53(15.1)
不明	13	8	21(16.7)	21	23	44(19.6)	65(18.5)

表 2 各群の妊娠率

	長期不妊群	対照群	計
原 発 性	15(19.7%)	49(38.6%)	64(31.7%)
続 発 性	13(26.0%)	46(46.9%)	59(39.9%)
計	28(22.2%)	95(42.2%)	123(35.0%)

() 妊娠率

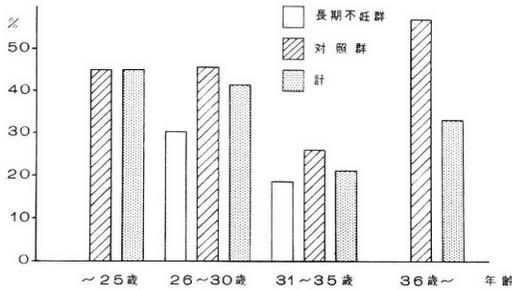


図 3 初診時年齢と妊娠率

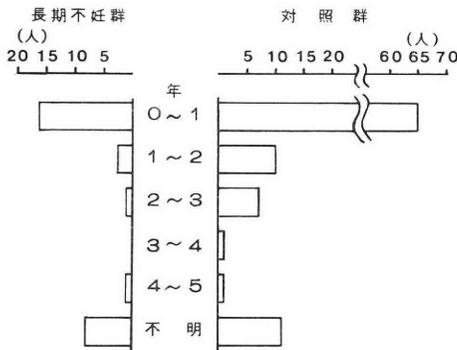


図 4 初診時より妊娠成立までの期間

群の方が強い傾向にある。

〔不妊原因別にみた妊娠率〕

不妊原因別の妊娠率を表 3 に示す。対照群では卵管因子が最も多く、76.7%の妊娠率であり、次に卵巣・内分泌因子、原因不明、子宮因子、男性因子の順であった。しかし、長期不妊群では男性因子の30.4%が最も多く、続いて、卵巣・内分泌因子、原因不明、卵管因子、子宮因子の順であった。このように長期不妊群と対照群とでは、不妊原因により妊娠率がかなり違っている事が分かった。

〔妊娠成立周期の治療法〕

妊娠に直接つながったと思われる治療法では表 4 に示すように、対照群は排卵誘発剤と無治療がともに27.7%と多く、つぎに HSG の21.7%であった。長期不妊群では排卵誘発剤が35.0%と最も多い事は対照群と同じであるが、AIH, AID が20.0%と、続いて多い事が認めら

表 3 不妊原因別の妊娠率

不 妊 因 子	長期不妊群	対照群	計
卵巣・内分泌因子	10 (29.4%)	34 (43.6%)	44 (39.3%)
卵 管 因 子	3 (11.5%)	23 (76.7%)	26 (46.4%)
子 宮 因 子	2 (9.1%)	15 (34.9%)	17 (26.2%)
男 性 因 子	7 (30.4%)	7 (23.3%)	14 (26.4%)
原 因 不 明	6 (28.6%)	16 (36.4%)	22 (33.8%)

() 妊娠率

表 4 妊娠成立周期の治療法

治 療 法	長期不妊群	対照群	計 (%)
排 卵 誘 発 剤	7 (35.0)	23 (27.7)	30 (29.1)
H S G	3 (15.0)	18 (21.7)	21 (20.4)
通 水	2 (10.0)	6 (7.2)	8 (7.8)
A I H, A I D	4 (20.0)	4 (4.8)	8 (7.8)
無 治 療	3 (15.0)	23 (27.7)	26 (25.2)
そ の 他	1 (5.0)	9 (10.8)	10 (9.7)

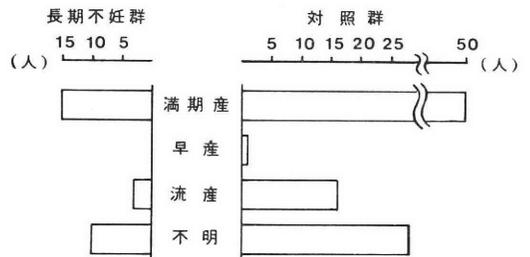


図 5 妊娠の予後

れた。なお、その他の治療法には、高プロラクチン血症に対するプロモプロブチン療法及び Hardy operation や膣洗浄、Hühner test なども含まれている。

〔妊娠成功例の予後〕

妊娠の予後は図 5 に示すように、対照群で74.6%が満期産であり、早産1.5%、流産23.9%であった。長期不妊群では83.3%が満期産であり、16.7%が流産に終わった。

考 察

不妊症の治療において、妊娠の成功を左右する因子と

しては医学的因子と社会的因子の2つがあげられる。医学的因子としては、近年、不妊症専門外来の開設や内視鏡の積極的な利用による診断技術の向上や治療方法の進歩、特に IVF-ET による新しい不妊症治療などがあり、妊娠率は向上しつつある。しかし、社会環境の変化とともに生じた女性の社会への進出結果としての結婚年齢の高齢化および職業婦人の結婚後によくみられる一定期間の避妊等による妊娠率の低下をまねく可能性のある社会的因子が増加しつつあるのも事実である。確かに、家族計画に関する知識の普及と不妊に対する一般の関心は高まりつつあり、初診までの不妊期間は最近短縮する傾向がある^{1,2)}と報告されているが、大学病院の不妊外来を訪れる患者は、他の医療機関において、ある期間治療後に来院する患者が多く、来院時には不妊期間もかなり長く、必然的に受診時年齢も高く、女性の妊孕力のピークを過ぎてきている者が多いのが現状である。

われわれは以前に、受診までの不妊期間が5年以上の患者と5年未満の患者とでは、妊娠率に有意の相違が認められ、不妊症患者の早期の受診の必要性を報告した³⁾。今回は、前述したような社会的背景をふまえ、大学病院の不妊外来受診者において、受診までの不妊期間の長短が妊娠率にどのように影響を及ぼしているのかを知る為に、不妊期間5年以上の患者を長期不妊群として、不妊期間5年未満の患者とで比較検討してみたのであるが、長期不妊群は不妊症患者全体の35.9%を占め、米谷ら⁴⁾の報告の原発性不妊の24.0%、続発性不妊の16.6%、野村ら¹⁾の報告の25.0%よりも高率であった。このように、長期不妊群の割合が高率であったのは、大学病院の特殊性および地域性が関係していると推測される。同様に、田中ら⁵⁾も大学病院では不妊期間5年以上の症例が多いと報告している。また、一般的に不妊期間が長いほど妊娠率が低下すると言われているが、われわれの成績では長期不妊群が22.2%の妊娠率であるのに対し、不妊期間5年未満の群では42.2%の妊娠率であった。同様な成績は松家ら⁶⁾、白水ら⁷⁾、寺田ら⁸⁾、田中ら⁵⁾も報告している。

不妊原因では長期不妊群において卵管因子および男性因子が対照群に比して高率であった。それ故に、長期不妊患者には再度 HSG 検査および精液検査が必要であると推察された。この事は、続発性不妊患者での再度の精液検査の必要性を述べている白水ら⁷⁾の意見と一致する。

治療開始後妊娠に至るまでの期間は、長期不妊群では80%が1年以内に妊娠しており、2年以内まで含めると90%が妊娠に至っている。また、治療期間が長くなればなるほど妊娠し難くなる傾向にあり、一応の治療の目安は治療開始後2年以内に目標を定め、早期の原因追求、

適切な治療が必要と推察される。

不妊原因別の妊娠率で対照群の卵管因子が76.7%と非常に高率であったのは HSG あるいは卵管通水後の妊娠を含めているためと推測される。また、長期不妊群で最も多いのが男性因子の30.4%であった。これは、男性側の治療、AIH, AID 等が含まれていると推察され、特に、当科では最近、乏精子症患者に積極的に精液静置法⁹⁾および精子遠心洗浄濃縮法¹⁰⁾を応用し、妊娠に成功している例が多い事も一因と推察される。

一般に不妊症治療成功例の流産率は、自然流産率10~11%¹¹⁾に比べ、高いといわれている。特に寺田ら⁸⁾は排卵誘発妊娠例の流産率は24.3%と高い事を報告している。われわれの成績でも、対照群では23.9%の流産率であった。しかし、長期不妊群の流産率は16.7%であり、対照群と比べて低率である。これは、妊娠成功後、早期に high risk pregnancy として入院安静などの妊娠管理を積極的に行つた為と推測される。

結 語

当科不妊外来における長期不妊患者の臨床統計を試みた結果、長期不妊群では年齢的にも高齢となり、妊娠率の低下も著明であるので、早期の受診を啓蒙するとともに、適切な診断、治療を早期に開始する事が必要である。

なお、本論文の概要は、第30回日本不妊学会学術講演会（於：東京）において発表した。

文 献

- 1) 野村一志, 寺本秀樹, 林谷誠治, 勝部泰裕, 宮川和康, 中山俊彦: 当院における最近6年間の外来不妊統計, 共済医報, 34: 496, 1982.
- 2) 品田孝夫, 竹中恒久, 横田佳昌, 大和田信夫, 阿美邦榮: 不妊外来における臨床統計的観察, 日不妊会誌, 24: 80, 1979.
- 3) 吉野和男, 高橋健太郎, 松永 功, 沢田康治, 渋川敏彦, 北尾 学: 島根医大附属病院産科婦人科不妊外来における臨床的統計, 日不妊会誌, 30: 385, 1985.
- 4) 米谷国男, 伊藤 誠, 高橋正明, 千原 啓, 越知正憲: 当大学病院開設後10年間における不妊症患者の統計的観察, 日不妊会誌, 30: 28, 1985.
- 5) 田中昭一, 山本 弘, 遠藤俊明, 幡 洋, 藤井美穂, 下谷保治, 東口篤司, 橋本正淑: 当科不妊症外来の最近10年間の臨床統計——(1972~1976)と(1977~1981)の比較——, 日不妊会誌, 29: 431, 1984.
- 6) 松家五朗, 増田歳久, 吉崎健一, 乾 泰延, 三村経夫, 竹内 悟, 山野修司, 高橋久寿: 当不妊外来における最近5年間の妊娠例の検

討, 日不妊会誌, 25: 86, 1980.

- 7) 白水充典, 平井ひろみ, 河田文子, 藤本 俊, 有馬昭夫, 下村 宏, 加藤 俊: 最近5年間の当教室不妊症外来の臨床統計(昭和41~45年の統計と比較して), 日不妊会誌, 27: 59, 1982.
- 8) 寺田夏樹, 前川岩夫, 内藤正文, 小堀恒雄, 高見沢裕吉: 最近の当教室における不妊外来統計, 日不妊会誌, 28: 69, 1983.
- 9) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 齊藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: 我々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.
- 10) 鈴木雅洲, 星 和彦, 星合 昊, 齊藤 晃, 桃野耕太郎, 森良一郎, 京野広一, 対木 章, 今泉英明, 長池文康, 上原茂樹, 永沼孝子, 広瀬洋子: 体外受精・胚移植により受精・着床に成功した卵管性不妊症の1例, 日不妊会誌, 28: 439, 1983.
- 11) 倉智敬一: 流早産, 現代産婦人科学大系, 17A, 21, 中山書店, 東京, 1974.

Statistical studies of long-term infertile women in our infertile clinic

Kentaro Takahashi, Kazuo Yoshino, Yoshimi Araki, Arata Nishigaki, Takaaki Shirai, Masuo Kusakari, Akihiro Uchida and Manabu Kitao

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

To know the relation between the infertile pe-

riod and the effect of therapy, we tried statistical study on 351 infertile women who visited on our infertile clinic from October 1979 to September 1985. They were divided into two groups according to the infertile period; the long-term infertile groups (LIG: the patients who had a sterile period of more than five years, 126 patients) and the control groups (CG; the patients who had a sterile period of less than five years, 225 patients) and compared some factors between two groups.

The results were as follows;

1. The incidence of primary sterility to LIG was about 60% and that to CG was same percentage.
2. On the causes of sterility, the tubal sterility and the male sterility were higher incidence of the sterility factors in LIG than in CG. LIG had various overlapping sterility factors.
3. The pregnancy rate was 42.2% in CG and 22.2% in LIG.
4. Of the pregnancy rate due to the difference of infertile factors, the tubal sterility shows the highest in CG (76.7%) and the male sterility shows the highest in LIG (30.4%).
5. The ratio of abortion and premature delivery was 25.4% in CG and 16.7% in LIG.

(受付: 昭和61年6月11日)

当院不妊外来における AIH の統計

Statistical Study of AIH on Infertile Women in
University of Tsukuba Hospital

筑波大学臨床医学系産婦人科

山内 宏 西田 正人

Hiroshi YAMANOUCHI Masato NISHIDA

片瀬 功芳 岩崎 寛和

Katsuyoshi KATASE Hirokazu IWASAKI

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

昭和51年10月筑波大学附属病院開院以来、同59年12月までの不妊外来登録患者1,250名のうち、1度でも AIH 治療を行なった209名、1,129回を調査した。

- 1) AIH による妊娠は36例、妊娠率は17.2%であった。
- 2) 各適応に対する妊娠率は、適合不全27%、頸管粘液不全19.2%、乏精子症11.3%であった。
- 3) AIH 以外の周期に妊娠した症例は30例14.4%であった。
- 4) 乏精子症群97例中、夫に対する治療が行なわれたのが17例あり、このうち10例(58.8%)が妊娠に至った。
- 5) AIH 妊娠36例中33例(91.7%)は6回までに妊娠した。
- 6) AIH 妊娠の流産率は36例中9例(25%)であった。
- 7) PID 発症は209例中3例(1.43%)であった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(2), 316-319, 1987)

はじめに

配偶者間人工授精 (Artificial Insemination with Husband's semen; AIH) は不妊症の治療法として、現在広く一般的に行なわれている。筑波大学附属病院産婦人科においても、昭和51年10月の開院以来、不妊外来において適応のあるものには積極的に AIH 治療を行なってきた。しかし、AIH による妊娠率は必ずしも満足すべきものではないので、治療成績をまとめ、検討し、AIH の妊娠率の向上をはかった。

対 象

昭和51年10月筑波大学附属病院開院以来、同59年12月末までの不妊外来登録患者は1,250名で、このうち1度でも AIH 治療を行なった209名、1,129回を調査対象とした。

AIH の適応および方法

AIH の適応としては、

- 1) 乏精子症：精子濃度4,000万/ml 未満、あるいは運動率が50%未満
- 2) 適合不全：性交後試験 (Huhner test) で400倍視野中に頸管内運動精子が5匹未満
- 3) 頸管粘液不全：頸管粘液量が0.05ml 以下
- 4) その他

その他の適応の中には、ルチン検査の後、1) から3) の異常は認められないが、本人の希望によるものなどが含まれる。また乏精子症であっても、性交後試験が良好なものは、精液検査、あるいは性交後試験を再検し、少なくとも性交後試験で頸管内運動精子が400倍視野内20匹を越えている場合には適応としていない。

AIH の方法は、用手法により採取した精液を用い、

表 1 AIH の適応と妊娠率

適 応	症 例	AIH による妊娠率	AIH によらない妊娠数	総妊娠数
乏精子症	97 (46.4%)	11 (11.3%)	14 (14.4%)	25 (25.8%)
適合不全	63 (30.1%)	17 (27.0%)	8 (12.7%)	25 (39.7%)
頸管粘液不全	26 (12.4%)	5 (19.2%)	8 (30.8%)	13 (50%)
その他	23 (11.0%)	3 (13.0%)	0 (0%)	3 (13.0%)
計	209 (100%)	36 (17.2%)	30 (14.4%)	66 (31.6%)

推定排卵日に AIH 針にて0.5ml を子宮腔内へ注入した、排卵日の推定は、AIH 施行前、数周期にわたって頸管粘液検査、超音波断層法による卵胞径の測定、BBT、インクステイン法などを行ない、最もその患者に適した方法を選択した。また AIH 後には、全例に2日間、抗生剤を経口投与した。

結 果

1) AIH の適応と妊娠率

表1は AIH の適応と、その後の妊娠率を示したものである。妊娠率が最も高いのは、適合不全63例に対して、17例 (27%) が妊娠に至っている。次いで頸管粘液不全26例では5例 (19.2%) であつたが、乏精子症は97例中11例 (11.3%) と低い妊娠率であつた。AIH 治療による妊娠は全部で36例あり、妊娠率は17.2%であつた。また AIH 治療をしたにもかかわらず、AIH 以外の周期に妊娠した症例も30例あり、両者を合計すると、AIH を一度でも行なつた症例中66例 (31.6%) が妊娠したことになる。

2) 乏精子症の治療と予後

乏精子症群97例中、夫に対して八味地黄丸投与、精索静脈瘤手術等の治療を行なつたものが17例あり、このうち10例 (58.8%) が妊娠した。一方、無治療の80例では15例 (18.8%) しか妊娠しておらず、この差は χ^2 検定でも有意であつた。また、乏精子症群で AIH によらない妊娠が14例あつたが、このうち7例 (50%) に夫に対する治療がなされていた (表2)。

乏精子症のなかで、AIH により妊娠に至つた群、AIH によらないで妊娠した群、および妊娠しなかつた群の3群の精子数を比較すると、表3のごとく3者間に

表 2 乏精子症の治療と予後

	治療群*	無治療群
妊娠例	10(58.8%)	15(18.8%)
AIH による	3	8
AIH によらない	7	7
非妊娠例	7(41.2%)	65(81.2%)
計	17	80

* p<0.001

表 3 精子数 (乏精子症群)

AIH による妊娠	23.22±12.54 (×10 ⁶ /ml)
自然妊娠	19.31±11.80
非妊娠群	20.56±12.44

差は認められなかつた。

3) 既往妊娠と妊娠率

AIH 治療を行なつたうち、原発不妊が209例中149例と、続発不妊の約2.5倍であつた。妊娠率に関しては、原発不妊16.8%、続発不妊18.3%と有意な差は認められなかつた (表4)。

4) AIH 施行回数と妊娠数

AIH による妊娠36例中33例 (91.7%) が6回までに妊娠した。10回以上で妊娠したものは3例で、最高は22回目に妊娠し、満期産に至つた。AIH 施行総数1,129回に対する妊娠率は3.2%であつた (図1)。

5) AIH 妊娠例の予後

AIH による妊娠36例中満期産に至つたものが20例 (55.5%)、流産したものが9例 (25%) で、当院不妊外来における妊娠例の流産率14.5%よりも約10%も高率と

表 4 既往妊娠と妊娠率

	症 例	AIH による妊娠数	AIH によらない妊娠数	総妊娠数
原 発 不 妊	149	25 (16.8%)	20 (13.4%)	45 (30.2%)
続 発 不 妊	60	11 (18.3%)	10 (16.7%)	21 (35.0%)
	209	36	30	66

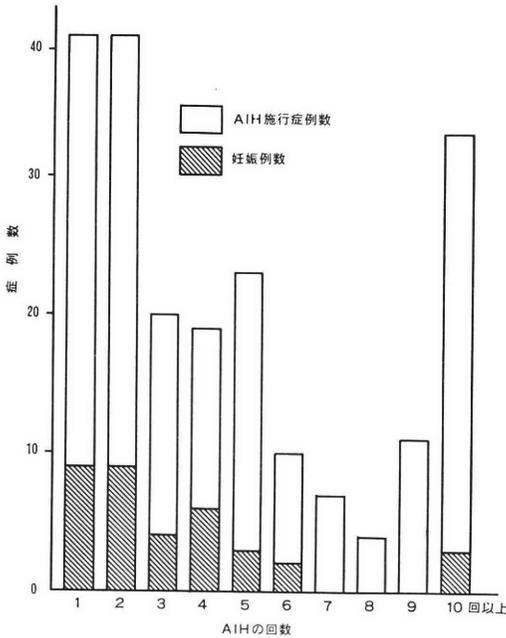


図 1 AIH の回数と症例数

表 5 AIH 妊娠例の予後症例数

満期産	20 (55.5%)
流産	9 (25.0%)
早産 (双胎)	2
転院	4
外妊	1
計	36

表 6 PID 発症症例

症例	PID 発症 AIH 施行回数	AIH 適応	治療
1	3×	乏精子症	開腹術
2	1×	乏精子症	抗生剤 DIV
3	18×	頸管粘液不全	開腹術

なっている。早産したものは2例であるが、2例とも双胎であった。その他、妊娠成立後、他医に転院したものが4例、子宮外妊娠が1例であった。当院で分娩に至った満期産および早産の22例についていえば外表奇形は全く認められなかった(表5)。

6) PID 発症率

AIH 治療における最大の副作用は骨盤内感染(PID)と考えられるが、対象209例中3例(1.43%)にPIDの発症をみ、このうち2例が開腹術をうけた。対AIH施行回数では0.27%であった。またPIDを発症したAIH施行回数は、それぞれ3回目、1回目、18回

目で、前2者は乏精子症を適応にAIHを行なったものである。18回目でPIDを発症した症例は頸管粘液不全を適応としたもので、開腹時に子宮筋腫と外性子宮内膜症が認められた(表6)。

考 察

AIHによる妊娠率は10~30%^{1-5,7)}と報告されており、当科における妊娠率(17.2%)もこの中に含まれる。AIHによる妊娠率が最も高かったのは適合不全、すなわちHuhner test 不良に対する27.0%であった。諸家の報告でも、適合不全に対するAIHの成績が良いものが多いとみられる。若尾ら⁸⁾はHuhner testの成績を正常群、中間群、不良群の3群に分類し、不良群に対して積極的にAIHを施行したところ、正常ならびに中間群とかわらない妊娠率(21.2%)になったという、われわれの成績からも適合不全がAIHの適応として最も良いことが示唆された。

最も症例数の多い乏精子症群の妊娠率が11.3%と、一番低く、これは当然の結果と考えられるが、この群に対しては、AIHのみでなく精子選別や濃縮などの手段を積極的に工夫すべきであろうと考える。

不妊治療を行なっていると、治療をしていない周期に自然妊娠する症例をしばしば経験するが、今回もAIH以外の周期に妊娠する例を多く経験した。佐治ら⁷⁾は、AIH治療を行なった283例中18例(6.4%)が自然妊娠したことを報告している。成績では、AIH妊娠36例(17.2%)に対し、自然妊娠が30例(14.4%)とほぼ同率の妊娠率を示し、乏精子症や頸管粘液不全においては、AIH妊娠よりも妊娠率が高いという結果であった。この中の多くの症例でAIHと併行して夫の治療も行なわれていたため、状態の改善によつて自然妊娠したのもあると考えたい。実際に乏精子症と診断され、当院泌尿器科において精索静脈瘤の手術をうけたり、八味地黄丸等の投薬をうけた17例中10例が妊娠しており、また自然妊娠した14例中7例で夫に対する治療が行なわれていた。このように乏精子症の夫に対する泌尿器科の治療を行なうことは、AIHの妊娠率向上にきわめて有効であると考えられる。

頸管粘液不全に対して蜂屋ら⁹⁾は、1)頸管粘液腺の発達は認められるがE₂活性に対して反応性の低下しているもの、2)頸管粘液腺の発達が形態的にも機能的にも明らかに低下しているものと、2つの因子があることを指摘した上で、前者に対してはAIHが有効だが、後者にはホルモンの補充療法が効果的であると述べている。今回のわれわれの成績では、AIHによらない妊娠の方が多かつたが、その理由はエストロゲンの補充療法

により頸管粘液の性状が改善したことが考えられ、頸管粘液不全の診断には注意を要すると思われる。

AIH の施行回数に関しては、大部分が AIH 6 回以内に妊娠し、他施設の報告⁴⁾と全く同じ傾向を示した。このことは、いたずらに AIH をくりかえすことなく、5~6回の AIH で妊娠しない場合には、症例をもう 1 度検討しなおす必要のあることを示しているといえよう。

一般的に AIH 妊娠は流産が多いといわれており、われわれの調査でも 25% と実に AIH 妊娠の 4 人に 1 人が流産していた。AIH による妊娠率の向上とともに、AIH 妊娠後の流産原因を究明し、流産率を下げることにも重要な課題であると思われる。飯塚ら¹⁾の AID の single insemination より得た知見によると、BBT 低温最終日よりはなれるほど流産率が高くなるという、従つて良好な精子を得ることも重要であるが、AIH の timing に関しても慎重でなければならないであろう。

AIH 後の PID の発症に関し、飯塚ら¹⁾は 342 例中 2 例 (0.6%) の感染発熱を報告する一方で、AID 432 例には発症は皆無であった点を指摘している。Attila ら⁹⁾によると、無症状の男性 430 名の精液を調べたところ、このうち不妊群より有意に多い菌が培養できたという。また当科における斉藤らの報告¹⁰⁾でも、不妊外来における AIH に用いられた精液の全例から菌が検出でき、精液が無菌とはほど遠いことを再認識している。AIH 後の PID 発症にかかわる因子は精液のみではないことはいままでもないが、精液因子の改善、すなわち乏精子症に対する精子洗浄法や、男性側の泌尿器系の異常の検索が PID 発症を低下させ、しかも妊娠率を向上させると考えられる。

(本論文の要旨は第 30 回日本不妊学会学術講演会において発表した)

文 献

- 1) 飯塚理八, 林 方也: 人工授精, 現代産科婦人科学大系, 9: 227, 中山書店, 東京, 1970.
- 2) 明石勝英, 道免聚二, 佐々木誠, 小関章夫, 千秋哲彦, 川瀬哲彦, 安井幸夫, 中村俊男, 菊池和男, 山口 斌, 小前由雄: 札幌医大産婦人科における人工授精の成功例について, 産婦治療, 11: 639, 1965.

- 3) 石橋亨規, 河石 徹, 中川 繁: 人工授精の経験例; 日不妊誌, 11: 226, 1966.
- 4) 杉本 修, 矢野弘之, 林 俊郎, 鈴木 瞭, 広崎彰良, 池谷東彦, 横山重善, 道本和子: 人工授精施行成績に対する検討; 日不妊誌, 11: 286, 1966.
- 5) 河上征治, 小林俊文, 眞井徳幸: AIH の適応と効果, 産婦世界, 28: 723, 1976.
- 6) 若尾豊一, 佐治文隆, 根来孝夫, 中室嘉郎: 不妊検査における Huhner test の診断的意義, 日不妊誌, 22: 104, 1977.
- 7) 佐治文隆, 中室嘉郎, 谷澤 修: AIH 治療の評価, 産婦の実際, 34: 955, 1985.
- 8) 蜂屋祥一, 杉田 元: 不妊における頸管腺組織, 産と婦, 42: 877, 1979.
- 9) Attila, T. and Martin, L. L.: Asymptomatic Bacteriospermia in fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 36: 88, 1981.
- 10) Saito, M., Usuki, S. and Iwasaki, H.: Bacterial analysis in sperm, vagina and uterine cavity at artificial insemination of husband. Proc, 13th International congress of chemotherapy, 124: 93, 1983.

Statistical study of AIH on infertile women in University of Tsukuba Hospital

Hiroshi Yamanouchi, Masato Nishida,
Katsuyoshi Katase and Hirokazu Iwasaki
Department of Obstetrics and Gynecology,
Institute of Clinical Medicine, University
of Tsukuba, Niihari-gun, Ibaraki, Japan

Between 1976 and 1984, 1,129 times of AIH were performed on 209 infertile patients at University of Tsukuba Hospital.

There were 66 pregnancies among those patients, 36 cases (17.2%) with AIH and 30 cases (14.4%) without AIH. Pregnancy rates were 27%, 19.2% and 11.3% in the group of poor post-coital test, in insufficient cervical mucus and in oligospermia, respectively. There were 9 cases (25%) of spontaneous abortion as clinical outcome of 36 pregnancies with AIH. The incidence of PID was 1.43% among those 209 women who received AIH
(受付: 昭和61年7月24日)

地方部会講演抄録

昭和61年度日本不妊学会中部支部学術集会

日 時 昭和61年6月14日(土)

場 所 藤田学園保健衛生大学病院

1. 不妊を訴える稀発排卵例に対する工夫

(1) 排卵誘発経過カードの作成

(2) Swim up 法による精子の撰択と AIH

○作井久孝・吉村俊和・白木 誠
丸山邦之・市川文隆・蛭原照男
多田 伸・澤田富夫・河上征治
(保健衛生大産婦)
廣田 穰 (新城市民病院産婦)
篠原好雄・柿原和子・岡本葉子
戸刈 薫 (新城市民病院臨床検査室)

年に数回しか BBT が2相性を示さない症例、あるいは、全く無排卵で、しかも夫の精液所見に Oligospermia または運動率低下を示す不妊夫婦に対し、私達は排卵誘発経過カードを作成し、Swim up 法にて運動精子を選択し、AIH を行なっている。一方、これらの方法論と自然授精、従来の AIH との妊娠成立率を比較検討中である。

(1) 排卵誘発経過カード

従来の患者本人が測定している BBT カードと、医師側がカルテにチェックしている排卵誘発法、排卵時期確認のための諸検査、AIH 等の諸治療を、1枚のカードに同時に記載し、その経日的な動態を1枚の図表で把握できるようにした。50日周期を1枚のカードにした BBT の下欄に、①尿中エストロゲン値、②尿中 LH 値、③頸管粘液、④排卵誘発の治療内容、⑤AIH 等の諸治療、⑥その他 U.S. 等の特記事項を記載する。一つの治療単位を50日周期としたのは、排卵誘発の治療効果の判定、排卵誘発治療の限度を約4週間としたからである。

(2) Swim up 法による運動精子の撰択と AIH への応用

Oligospermia (私達は $3,000 \times 10^4/\text{ml}$ 以下)、または精子運動率低下(50%以下)の症例に対し、次のような方法で運動精子を選択し、AIH に応用している。

用手法により採取された精子を十分液化後、遠心する

ことなく培養液 HamF10 (2 ml) の入った試験管の管底へ静かに分注 (0.5ml)。混和することのないよう、静かに 30° 傾斜させ、精子と培養液の接触面を広くし、 37°C 、95%air、5% CO_2 の incubator 内にて30~60分静置する。上方培養液内へ浮遊 Swim up してくる精子のみを収集し、1本の試験管内にて精子濃度 $2.0 \sim 3.0 \times 10^6/\text{ml}$ になるよう遠心濃縮し、調整する (IVF, GIFT, に用いる濃度の約10倍程度の濃縮度)。濃縮された精子は運動率が90%以上と良好精子が大部分を占めている。このうち0.6~0.8ml を通常人工授精 (AIH) と同様の手技にて子宮腔内へ注入する。

2. 長期不妊患者における streak gonad の症例

小池皓式・今泉克英
(東海通信病院産婦)

不妊症の原因ならびに治療については種々な面で進歩している。その中で、HSG 等の検査で大きな異常が認められない症例については患者側が病院を転々として同じ検査ならび治療をくり返している間に長期間が過ぎてしまう。今回、他の数施設で治療を受けていた患者で、当科での腹腔鏡にていわゆる streak gonad を確認した3症例を報告する。いずれも原発性不妊症と無月経Ⅱ°の症例で、うち2例は45Xとのモザイクであり、46XX q^+ 、と46X+mar であり、いずれも Turner 症候群様所見を認めなかつた。他の1例は46XXの正常核型であった。子宮は正常、ないし、少し小型であつたが、卵管はほぼ正常に近く、両側卵巣は gonadal agenesis に近い所見であり、その組織にて Oocyte は認められなかつた。LH-RH test、甲状腺ホルモン検査等も施行している。

不妊症全例に腹腔鏡を施行すべきとは思わないが、症例を選択して施行すべきであろう。

3. FCM (flow cytometry) による精子分離法

○中川恵彰・浅井光興・鈴木正利
山田昌夫・中西正美・石原 実
(愛知医大産婦)

性染色体異常による伴性遺伝病の予防を目的として、X, Y精子分離研究が行なわれている。その方法としては電気泳動、遠心分離、アルブミン勾配、抗体などが応用されているが、われわれは研究面での応用を目的として、X, Y精子の DNA 量の差に基づいて、ヒトX, Y精子の分離を行なった。

(方法) 精子を70% ethanol で固定し、pepsin 処理、RNase 処理をした後、ethidium bromide にて染色した。そして、フローサイトメトリー (FACS-440) にて DNA 量を測定した。そのヒストグラムにおいて DNA 量の差よりX, Y精子を区分し、FACS-440の Sorting 機能を利用して、X, Y精子を分離した。

(結果) 分離したX, Y精子はキナクリンマスタート法にて確認し、フローサイトメトリーを使用して比較的簡便にX, Y精子が分離できることがわかった。

4. 潜在性子宮腺筋症と機能性不妊

○戸谷良造・三輪 是・黒木尚之
柴田金光・鈴置洋三 宮川 透*
(国立名古屋病院産婦)
(*三菱油化メディカルサイエンス)

子宮腺筋症は子宮の腫大と硬化を来した時点で、双合診、B-Scope 診等で診断されてきたが、血中 CA 125 値を測定しうるようになり、生化学的検査法が加わった。その結果、子宮の腫大、硬化を来さない早期の子宮腺筋症も、月経期末梢血 CA 125 を測定することにより診断しうるようになった。従来、不妊原因不明のいわゆる機能性不妊と診断されていたものの一部に、潜在性子宮腺筋症が存在すると思われる。

子宮内膜組織由来物質の自己体内逆流現象と妊孕能の関連を検討しつつあるので報告する。

正常月経血中 CA 125 値の平均は40,312U/ml であつた。同時採血した末梢血中 CA 125 値は32U/ml であり、これは Tumor marker の上限としている35U/ml に近い。正常女性の平均値17.5U/ml より高い。すなわち、月経血中子宮内膜成分の自己体内逆流現象の存在を示すものである。子宮筋腫例 (主に B-Scope 所見、内診所見にて診断、一部子宮摘出により確認症例を含む) においては、平均22,973U/ml と正常月経血より低い。しかし、これらの症例から remarkable な hypermenorrhea 例を

除いた症例では 35,677U/ml と正常月経血とほぼ同値であつた。Myoma 症例は normomenorrhea といつてもやや hypermenorrhea の傾向があるためと推察され、正常子宮内膜と同量の CA 125 産生がなされているとみるべきであろう。Adenomyosis においては正常月経血の約2倍、80,342U/ml の CA 125 値がみられた。本疾患は月経血量が増加するため、子宮内膜由来 CA 125 の産生は更に高まっているものといえる。顕著な hypermenorrhea を認めた症例では3,236U/ml と正常月経血の約12分の1、内膜症月経血の約20分の1と低値であり、これらの症例を除外した症例での値は 97,104U/ml と高値であり、更に子宮内膜症では子宮内膜組織での CA 125 産生の抗進を裏付けるものであつた。不妊例のうち、特に不妊原因を認めないにもかかわらず、妊娠の成立をみない症例につき、末梢血、月経血の CA 125 値を測定したところ、その約4割の症例に CA 125 値が異常値を示した。すなわち、月経期末梢血値の平均は73.9±67.1 U/ml であり、月経血値は53,644±36,737U/ml であつた。すなわち、これらの症例は潜在性子宮腺筋症と考えられる。

5. 当大学第1, 第2病院の不妊症例における腹腔鏡施行例の検討

○千原 啓・多田 伸・作井久孝
高橋正明・米谷国男・福島 稔
(保健衛生大産婦)
廣田 稔 (新城市民病院産婦)

当大学第1, 第2病院の不妊症例における腹腔鏡施行例を検討し、その特徴について考察した。昭和56年8月より61年5月まで、146例の腹腔鏡施行例のうち76例(52%)が不妊症であつた。腹腔鏡的診断では癒着が30例(39%)と最も多く、ついで子宮内膜症が21例(28%)に見られた。長期不妊例は特に癒着が多かつた(57%)が、一方では骨盤腔に異常の見られない症例も3例(13%)あつた。正診率は癒着82%、内膜症77%であつた。76例中、腹腔鏡のみで終わったものは21例(28%)、腹腔鏡下に処置を行なつたものは43例(57%)、開腹手術を行なつたものは12例(15%)であつた。これら76例中15例(20%)が妊娠に成功した。癒着が最も多く見られた異常であつたが、大部分は腹腔鏡下に処置が可能であり、また腹腔鏡上、正常骨盤であつても、その後の治療方針を立てる上で貴重な情報を提供しているわけで、不妊症においては積極的に腹腔鏡を行なつていきたいと思います。

6. 高アンドロゲン血症を伴う不妊婦人における治療法の検討

○大脇正哉・花井一夫・大沢政己
正橋鉄夫・成田 収
(名大分院産婦)
菅沼信彦・紀平正道・木村敏男
反田 豊 (名大産婦)

高アンドロゲン血症を示す排障害、不妊患者に従来は副腎皮質ステロイド、ピル等が用いられていたが、最近スピロラクトン (以下、SP) や芍薬甘草湯 (以下、SK) が注目されている。今回、SP、SK、デキサメサゾン (以下 Dex) にて治療する機会を得たので報告する。なお高アンドロゲン血症は Mean+2SD (T: 0.45+0.24 ng/ml, DHEA: 5.05+2.4ng/ml, DHEA-S: 780+192ng/ml, Androstendion: 1.15+0.58ng/ml) をいづれかが越えた症例とした。1. SP 投与例は、T、DHT. に有意の低下を無月経の2/9に排卵発現をみた。2. SK 投与、有意差はないが LH、T. に低下を認め、無排卵性稀発月経の4/5に排卵を、うち2例に妊娠を、また正常月経の2/3にも妊娠の成立をみた。3. Dex 投与例は無月経2/6に排卵を認め、うち1例が妊娠、排卵性稀発月経1/2に排卵周期の改善と妊娠の成立を認めた。

7. 卵管妊娠のマイクロサージェリーによる卵管保存手術の経験

○竹内一郎・山口 賢二・安藤正昭
梅林康久、笠原 真弓・生田克夫
花田征治・水野金一郎・八神喜昭
(名市大産婦)

卵管妊娠の発生頻度は最近増加傾向にあるうえに、一度卵管妊娠に罹患した女性では、他側卵管での再発生の危険が高いなどの理由で古典的な卵管切除術後の妊孕性が著しく低いため、卵管妊娠に対する卵管保存手術療法が試みられている。われわれは卵管妊娠の補助診断法として腹腔鏡検査を積極的に応用し、破裂前に診断し得た卵管妊娠9例に対し、マイクロサージェリーを応用した卵管保存手術を行なっている手術治療後1年以上を経過した7例のうち、経過観察可能であった5例中4例で手術施行側卵管の疎通性が確認され (残る1例は手術直後に妊娠)、3例で妊娠がみられ、全例満期正常産であった。卵管妊娠の再発生例は認めていない。未破裂卵管妊娠に対する卵管保存手術は妊孕性の維持に有効な治療法と考えられ報告した。

第94回日本不妊学会関東地方部会

日 時 昭和61年7月12日 (土)
場 所 古名屋ホテル

1. 子宮外妊娠における機能保存手術例

○吉田孝二、三橋直樹、安水洗彦
小池憲章、井川名記、塚原嘉治
加藤順三 (山梨医大産婦)

卵管妊娠に対する機能保存手術は診断技術の発達による早期発見の増加とマイクロサージェリーの導入による卵管形成術の進歩により、近年発展してきている。今回われわれは当教室において行なつた卵管妊娠に対する機能保存手術3症例、計4回について報告する。

症例は27~28歳の未産婦で、術式としては卵管縦切開内容圧出、采部切開内容圧出、卵管部分切除、卵管破裂部からの圧出であった。卵管形成術は全て拡大鏡下に行なつた。術後の経過は1例が正常妊娠、1例が反腹外妊であった。術後の卵管疎通は全例に認められた。

機能保存手術の発展は挙児希望の外妊症例には重要であるが外妊反復の可能性もあり、その適応については慎重な検討が必要と思われる。当教室においては原則として挙児希望の強い症例、対側卵管が既摘除あるいは明らかに病的である症例、全身状態が良好な症例に対し機能保存手術を行なっている。今後、術式とともに適応について検討を加えたい。

2. 超音波断層法にて診断しえた unruptured interstitial pregnancy の一例

○松田 稔・菊池義公・木沢 功
大森景文
(社会保険山梨病院産婦)
梶山謙二 (梶山産婦人科)

母子衛生統計によると子宮外妊娠は妊産婦死亡の第3位を占めている。その原因は出血性の不可逆性ショックによるものである。それ故いち早く診断し改善を図る必要がある。子宮外妊娠の中でも特に interstitial pregnancy は子宮破裂の時と同様強い臨床症状を呈し、短時間でショック状態となるため早期の診断がその予後を左右するが、今回われわれは超音波断層法にて破裂前に診断しえた interstitial pregnancy の症例を経験したので紹介する。症例は35歳、5回妊娠、昭和59年7月10日近医にて人工妊娠中絶を受けた。3日後になつても不正性器出血、つわり症状持続し、尿妊娠反応も陽性で再掻

爬で子宮内膜は全く採取されず。直ちに当科に紹介された。超音波断層法にて子宮左側で卵管移行部に G. S. 像が認められた。unruptured interstitial pregnancy と診断し左卵管を含めた病変部を切除し、輸血の必要もなく軽快した。以上超音波断層法が本症診断に威力を発揮したのでここに紹介した。

3. 莢膜由来の ovarian growth factor 研究の現況

○安水洗彦・三橋直樹・吉田孝二
小池憲章・井川名記・塚原嘉治
加藤順三 (山梨医大産婦)

卵胞の発育そしてこれに伴う顆粒膜細胞脱増殖を調節する因子の解明を目的として、ブタ卵胞莢膜から内因性成長因子を抽出。その性状分析、内分泌環境との関係、卵胞発育との関係を分析した。活性はブタ顆粒膜細胞、マウス Ba/b/c 3T3細胞数増加、3H-チシジン取りこみ増加を示標として測定した。結果は以下のごとくである。

1. ブタ卵巣莢膜には顆粒膜細胞および3T3細胞の増殖とDNA合成を促進する成長因子が存在する。
2. この物質は易熱性、cationic な分子量12,400~25,000の蛋白あるいは蛋白様物質である。
3. 本成長因子生成は estradiol にて亢進するが、FSH, LH では影響をうけない。
4. 本成長因子の組織あたりの生成量、含有量とも中型卵胞で高い。

以上より本成長因子が、顆粒膜細胞に対する直接 mitogen として、卵胞の生理的発育に関与していると推察される。

4. 当院産婦人科不妊外来における臨床的統計

○深井 博・桐沢重彦・西島重信
寺本勝寛
(山梨県立中央病院産婦)

今回、われわれは昭和57年4月1日より昭和61年5月31日までの間に、当院産婦人科外来を挙児希望で受診した142名について臨床統計をとり、次の結果を得た。

- 1) 当院の不妊患者の頻度は1.4%で、総外来患者9,920名中142名であった。
- 2) 原発性不妊61.3%、続発性不妊38.7%であった。
- 3) 初診時年齢は、原発性不妊で平均28.9歳、続発性不妊で平均30.5歳であった。
- 4) 初診時不妊期間は原発性不妊1.9年、続発性不妊3.2年であった。
- 5) 女性不妊82.4%、男性不妊17.6%であり、女性不

妊では卵管因子(26.8%)が最も多く原因不明も29.6%存在した。

6) 妊娠率は全体で21.1%であった。

7) 妊娠率は、初診時年齢が30歳未満、初診時不妊期間3年未満、及び卵巣・内分泌原因において高く、それぞれ27.1%、25.3%、34.5%であった。

5. 流産におけるオキシトシン動態

○元山鎮雄・牧野恒久・菅原正人
飯塚理八 (慶応大産婦)

本研究では、妊娠6週より14週の間、下腹痛、出血を主訴に来院し、切迫流産の診断の得られた妊婦7名の血中オキシトシン値を測定し、妊娠初期流産とオキシトシンとの関係を考察した。

正常妊娠血中オキシトシン値は、妊娠初期 30.6 ± 12.6 pg/ml、妊娠中期 38.7 ± 10.5 pg/ml、末期 55.0 ± 12.8 pg/ml と増加し、産褥1か月では 45.0 ± 7.0 pg/ml と減少する。非妊婦の血中オキシトシン値は 6.0 ± 2.0 pg/ml であつた。切迫流産妊婦血中オキシトシン値は 63.0 ± 7.4 pg/ml で妊娠初期正常妊婦血中オキシトシン値と比較し高値を示した。

私達は下垂体以外に異所性オキシトシンがヒト胎盤で合成されることを報告してきた。妊娠初期流産において、母体下垂体以外に胎盤オキシトシンが病態に関与している可能性も考えられる。流産が起こるため血中オキシトシン値が増加するのか、あるいは血中オキシトシン値が増加する為、流産が進行するのかどうかは今後の検討を要する点と思われる。

6. RU 486 誘発流産における各種薬剤の影響

○辻井 孝・小林美和子・吉村幸子
大川亮一・神戸川 明・荒井 清
(帝京大産婦)

(目的) 抗P剤 RU 486を妊娠ラットに経口投与し、その流産誘発効果を検討すると共に、各種薬剤を併用投与し、RU 486の流産誘発効果に影響を及ぼすか否かを検討した。(方法) 妊娠9,12,16日齢ラットにRU 486を2.5, 5, 10mg/kg 投与した。また各種合成黄体ホルモン剤、副腎皮質ホルモン剤、抗エストロゲン剤を単独、あるいはRU 486と併用投与した。投与2日後に開腹、生存胎児数、子宮重量、母体血中ホルモンを測定した。

(結果) ①妊娠9,12,16日齢にRU 486 2.5mg/kg 投与時の流産率は50, 30, 0%であった。②妊娠9日齢にRU 486 5mg/kg 投与すると全例流産した。③合成黄体ホルモン剤10mg/kg、副腎皮質ホルモン剤5mg/kg、

抗エストロゲン剤 5 mg/kg 単独投与しても流産は誘発されなかつた。④抗エストロゲン剤の併用投与時のみ RU 486 の流産誘発率が增大する傾向が認められた。⑤RU 486にて流産が起きたラットの血中 P 値は低下した。⑥RU 486を投与しても母体血中コルチコステロン値に変化を認めなかつた。

7. 習慣流産の総合的検索と免疫治療の試み

小林淳一・牧野恒久・福岡一樹
飯塚理八 (慶応大産婦)

慶応義塾大学産婦人科では習慣流産の専門外来を設けその原因を総合的に検索し、様々な治療を試み成果を上げてきた。昭和61年6月現在、登録症例数は420、平均流産回数は 3.15 ± 0.064 回。流産の原因として最も頻度の高いものは、子宮筋腫など後天的異常を含む子宮の器質的異常である。糖尿病、リウマチは予想より少なかつた。内分泌異常では甲状腺疾患が多い。染色体異常は、転座型など流産に連がるものは4.5%であつた。HLA 検査では、当科では対照群に比して HLADR/ocus に有意 ($P < 0.05$) な適合性を認めた。

免疫治療は他に大きな異常がなく HLA 検査にて class II 抗原系にとくに適合性の高い夫婦に行われた。夫リンパ球を1回に $4.0 \pm 0.5 \times 10^7$ 個/ml 皮内接種する方法で、非妊時4回妊娠初期に1回免疫をした。125例に試み、すでに33名が分娩を終えた。流産率は約25%と、免疫治療の対照群の約64%と比して有意 ($P < 0.01$) に効果を認めた。

8. 男子不妊症の臨床統計

○吉井慎一・友政 宏・武島 仁
石川博通・小磯謙吉
(筑波大泌尿器)

〔目的〕最近1年間の男子不妊症患者の臨床統計を行なったので報告する。

〔対象〕1985年4月から1986年3月までの1年間に筑波大学病院泌尿器科を受診した男子不妊症患者70例。

〔方法〕問診、性器および副性器の触診、精索静脈瘤の有無の検討、睾丸容量(オーキドメーター)の測定を行なった。血清 FSH, LH, テストステロン, プロラクチンの測定。

〔結果〕年齢分布、不妊期間、配偶者の年齢は前回2回の報告と大きな変化はなかつた。前回と同様に患者を5群に分けて行なった統計学的検討では、原発性無精子症の睾丸容量は他の群に比して有意に小さく、また FSH は他の群に比して有意に高値を示した。LH に関

しては FSH ほど著明な傾向はみられなかつた。テストステロンは、各群間に有意差は認められなかつた。プロラクチンについても同様で、今後さらに検討が必要と考えられた。

9. 家兎の卵管内人工授精に関する研究—VIII

—排卵後に培養精子の注入による受精と妊娠成績—

○楢井 大・市川克己・須田 強
富来基壽・山海 直・金山喜一
遠藤 克・佐久間勇次
(日大農獣医学部獣医生理)

演者らは、家兎を用いて卵管内に直接精液を注入する人工授精により正常な受精が認められ、その胚を移植して正常な産子が得られることを明らかにしてきた。近年、ヒトの不妊治療として IVF & ET およびこれを簡易化した GIFT 法が試みられるようになってきたが、演者らは、先に家兎を用いて GIFT 法よりさらに簡便な方法による卵管内人工授精を試み、正常な受精卵と着床胎児および産子が得られることを報告した。

今回、さらに *in vitro* で培養した精子を用いて、排卵後の卵管内に排卵卵子が存在する時期に培養精子を注入する試験を行なった。供試家兎は、hCG 75 iu を静注し13時間後に開腹して卵巣の排卵点を確認した後、*in vitro* で8時間培養した精子を卵管采から卵管内に注入した。注入する精液は、人工腔法で採取した精液で、B. O. 液により2回洗浄後37°C、5%CO₂下で培養したものをを用いた。

hCG 投与後48時間目の卵管から、6例のうち5例から計37個の分割卵子を回収した。排卵数に対する回収率は67.3%、回収卵子に対する受精率は43.2%であつた。また、妊娠第11日目に開腹した6例のうち2例に1個と3個の着床胎児が認められた。

以上のように、排卵後に培養精子を卵管采から人工授精する方法によつて従来の排卵前に人工授精する方法より、卵子の回収率を向上させることができた。これは、排卵前に卵管采を操作、刺激しないことによるものであろう。今後、精子の培養方法、注入精子数および注入量を検討することによつて、さらに受精率、着床妊娠率の向上改善が期待できる。

10. 妊娠後期母体ストレスのラット胎仔下垂体 β エンドルフィン分泌に対する影響

大川とみ・Wolfgaup Rohde*
 Franziska Götz*・Guntev Dorner*
 沖永荘一・荒井 清 (帝京大産婦)
 (*フンボルト大学実験内分泌)

β エンドルフィン (β EP) はストレスにより ACTH とともに下垂体から放出されることが知られている。妊娠後期の母体ストレス負荷時、ラット胎仔で β EP の反応を知る目的で、妊娠20-22日のラットに immobilization ストレスを加え、胎仔の血中並びに視床下部カテコールアミン (CA) と下垂体 β EP および母体血コルチコステロン (B) を経時的に測定した。母体ストレスにより胎仔血中 CA は有意に上昇し、視床下部 CA 含量は減少傾向を認めた。下垂体 β EP はストレス負荷30分で増加後60分で減少した。母体血 B はストレス開始後30-120分で高値を示した。これらの成績は、ストレス負荷初期には母体の高濃度 B によって胎仔下垂体からの β -EP 放出が抑制されるものの、60分間の母体ストレスで認めた β EP 減少は下垂体からの β EP 放出を示唆するものである。また胎仔血中並びに視床下部 CA が胎仔下垂体からの β EP 放出に関与する可能性が考えられる。

11. 中枢における β -Endorphin の局在について 一免疫組織化学的研究一

○深沢みゆき・味香勝也・荒井 清
 沖永荘一 (帝京大産婦)

〔目的〕 内因性オピオイドである β -Endorphin と脳腸管ペプチドである Neurotensin の下垂体、視床下部における尿在を免疫組織化学を用いて検討した。

〔方法〕 コレヒチンを注入したラットを4%パラホルム液で灌流固定し、脳組織を薄切して、ABC 酵素抗体法により染色した。

〔成績〕 β -Endorphin 産生細胞は室旁核、視束上核、弓状核に局在し、それらの神経線維は正中隆起内層にも少数観察される。Neurotensin 産生細胞は室旁核、背内側核、弓状核に多数局在し、それらの神経終末は正中隆起外層に多数観察される。

〔結論〕 β -Endorphin と Neurotensin 産生細胞は視床下部では異なる細胞で産生されると考えられる。一方その神経終末が正中隆起に存在し、前葉では同一細胞に存在することから、両者は前葉の機能調節に関与しているものと思われる。

12. 原因不明不妊 (unexplained infertility) の腹腔鏡所見について

○川勝 雅秀・楠原浩二・武田 修
 小田原 靖・渡辺直生・松本和紀
 落合 和徳・寺島芳輝
 (慈恵医大産婦)

Routine の不妊検査にて明らかな不妊原因が見い出せない、いわゆる原因不明不妊 (unexplained infertility (U. I)) の診断にはより詳細な検査が必要であり、近年その一つに腹腔鏡による内性器の検索が注目されている。そこで当教室で実施した本症に対する腹腔鏡診について検討した。(対象) BBT, HSG, 精液検査, 性交後試験等の一般不妊検査が全て正常な36例である。(結果)

1) 子宮、付属器に全く異常が認められない normal pelvic organ は僅か5例・13.9%であった。2) 残り31例は何らかの異常を認めた。その内訳は①卵管周囲癒着が12例・33.3%と最も多く以下②Endometriosis 9例・27.8%, ③子宮筋腫5例・13.9%, ④unruptured luteinizing follicle syndrome suspected 3例・8.3%その他⑤旁卵巣嚢腫、卵管采 phimose 等がみられた。以上の結果より、原因不明不妊には内診, HSG 等にて一見正常と思われる例でも、腹腔鏡にて初めて明らかにし得る卵管・子宮の異常が少なからず潜在している事が明らかとなった。

13. PCO 患者における排卵誘発法の検討

○白須和裕・植村次雄・水口弘司
 (横浜市大産婦)

内分泌学的に高 Testosterone (0.6ng/ml 以上), 高 LH (20mIU/ml 以上), 正常 FSH および LHRH に対する LH の過剰反応の各条件を満足する排卵障害グループを PCO-like として排卵誘発法の成績と内分泌学的所見を検討した。対象 PCO 患者の全排卵障害婦人に占める割合は14.2%であった。Clomiphene による排卵誘発率は64.8%, HMG-HCG によるそれは60%であった。Clomiphene の投与周期における排卵成功率および妊娠率は各々27.8%, 20%と低率であった。Bromocriptine による排卵成功率は80%と高率であり、排卵成功群では、治療前 LH, LHRH に対する LH 反応性はむしろ高い傾向を示した。PRL 値, TRH test の PRL 多応性には差がみられなかった。Mazindol, Modifast 療法では体重減少と共に全例に排卵周期の回復が認められ、内分泌学的にも基礎 LH, Testosterone 値の低下が有意に起こっており改善が裏付けられた。

14. 尿中 Estrogen 値と不妊症の關係

○小林美和子・吉村幸子・辻井 孝
池川 明・神戸川 明・荒井 清
(帝京大産婦)

不妊症治療時における排卵誘発剤投与後の効果の判定や排卵の予知など卵胞成熟状態を知る上での指標として頸管粘液検査や血中 Estradiol 値の測定が行なわれている。今回、正常月経周期婦人、黄体機能不全患者で血中 Estradiol 値を反映する尿中 Estrogen 値を赤血球凝集阻止反応（ハイエストロテック）で測定し、Radio-immunoassay 法での値と比較した。また、尿中 Pregnadiol 値で管理している症例でも比較検討を行なった。まず、正常性周期の尿中 Estrogen 値の動態をみると排卵期に両方法で一致して peak がみられ、相関係数 $r=0.8669$ ($n=15$) と良好で、黄体機能不全患者では、排卵期の1日前に低値の peak が両方法でみられた。相関係数 $r=0.8077$ ($n=15$) と一応良好であつた。尿中 Pregnadiol 値で管理している例で治療中の値は、治療前の値に比し、わずかずつの上昇がみられた。以上より、赤血球凝集阻止反応（ハイエストロテック）は、不妊症患者の治療時の指標の1つにできると思われる。

15. HPLC を用いた卵胞発育のモニタリング

○原 利男・牧野恒久・近藤善二郎
飯塚理八 (慶応大産婦)

卵胞発育、排卵日を予知する手段として血中 E_2 (estradiol) の測定は不可欠といえる。しかしその測定には通常 radio immunoassay (RIA) を用いねばならず複雑な手技と長い測定時間を要する。私達は高速液体クロマトグラフィーを用いて妊娠血中 E_3 , E_2 を報告してきた。今回逆相分酸クロマトグラフィーを用い、血清中の E_2 の濃縮を行ない、それを測定することにより排卵時

の血中 E_2 に臨床応用可能かどうか検討したのでここに報告する。

症例は体外受精-胚移植のため clomiphene-hMG 療法をした患者血中の E_2 の用いた。 E_2 値は $0.57\sim 3.05$ ng/ml 同検体の RIA 系での測定値は $0.66\sim 2.5$ ng/ml、変動係数は within-day CVE_2 $3.6\sim 11\%$, between-day CVE_2 49% , 回収率は 93% 以上であつた。相関は $E_2Y=1.1987X-321.58$, 相関係数 $r=0.911408$ ($Y=RIAX=xpsc$) 以上より高速液体クロマトグラフィーによる血清 E_2 値の測定は有用であることが示唆された。

16. 教室における HSG・腹腔鏡施行症例の検討

五味淵秀人・北川浩明・武谷雄二
佐藤孝道・水野正彦
(東京大産婦)

子宮卵管造影 (HSG) は不妊症領域において重要な診断的意義をもつが近年腹腔鏡が安全に行なわれるようになり、HSG の診断可能な領域の検討が必要と考えられる。そこで、当科において HSG, 腹腔鏡検査を施行した55例を対象として HSG の正診性について検討した。HSG では55例中9例に筋腫など子宮内腔の変形を認め、37例に卵管及び卵管周囲の病変を疑った。また、9例は正常と診断した。全体として腹腔鏡との一致率は 83.6% であつた。子宮内腔の変形、両側峡部閉塞、卵管水腫と診断した26例は全例一致したが、両側間質部閉塞の1例、片側間質部閉塞の2例は腹腔鏡下の通色素検討では疎通性が認められた。卵管の屈曲や延長などの走行異常所見のみで卵管周囲癒着と診断した8例では4例に癒着が認められただけであつた。また、HSG で正常と診断した9例では2例に一侧の卵管周囲癒着があつた。以上より、子宮卵管内腔および疎通性に関する正診率は高いが、これらに変形を来さない程度の腹腔内癒着の診断は難しく腹腔鏡検査が必要と考えられた。

会 告

第5回日本受精着床学会学術講演会ならびに ヒト体外受精国際シンポジウム案内 (第1回予告)

第5回日本受精着床学会学術講演会ならびにヒト体外受精国際シンポジウム (International symposium on human *in vitro* fertilization) について、第1回予告を下記のごとく後案内申し上げます。多数の御出題ならびに御参加をお願い申し上げます。

記

会 期：昭和62年11月1日（日）、2日（月）

会 場：国立京都国際会館 (Kyoto International Conference Hall)

〒606 京都市左京区宝ヶ池 (Tel 075-791-3111)

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回に掲載いたします。
一般演題の締切りは6月下旬の予定です。

連絡先：〒606 京都市左京区聖護院川原町54番地

京都大学医学部婦人科学産科学教室内

第5回日本受精着床学会

ヒト体外受精国際シンポジウム事務局宛

(Tel. 075-751-3284)

日本受精着床学会 会長

ヒト体外受精国際シンポジウム組織委員長

森 崇 英

インヒビンに関する国際 Serono シンポジウムの予告

会 期：昭和62年5月21～22日

会 場：ホテルニューオータニ（東京）

Main Topics：

Gonadal Peptides

Overview-Regulation of FSH Secretion.

Isolation and Purification of Inhibin-like Peptides

Structure and Cloning of Inhibin.

Radioimmunoassays for Inhibin.

Mechanism of Action of Inhibin.

Inhibin in Contraception.

Proposal for International Standard.

主 催：Ares Serono Symposia (Rome, Italy)

世話人：H. Burger (Melbourne, Australia)

五十嵐正雄（群馬大・医・産婦人科）

参加費：3万円

参加者・一般演題：会場の都合で少数のみ受け付けます。

詳細は群馬大学・医・産科婦人科研究室 宮本，長谷川。Tel. 0272-32-7221

Ext. 3327 にお問合せ下さい。

お 知 ら せ

Vith World Congress on Human Reproduction

下記の要領で開催されます。奮つて御参加下さい。

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), K. Calt (U.S.A.)
M. Seppälä (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 VI th 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	穂 坂 正 彦
石 島 芳 郎	小 林 俊 文	百 瀬 和 夫
佐 久 間 勇 次	和 久 正 良	

EDITORIAL BOARD

Rihachi IIZUKA (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Ikuo DOMEKI	Masahiko HOSAKA
Yoshiro ISHIJIMA	Toshihumi KOBAYASHI	Kazuo MOMOSE
Yuzi SAKUMA	Masayoshi WAKU	

日本不妊学会雑誌 32 卷 2 号

昭和 61 年 3 月 25 日 印 刷
昭和 62 年 4 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