

日本不妊学会雑誌

第 32 卷

第 3 号

昭和 62 年 7 月 1 日

原 著

下垂体抽出液投与によるラットの過剰妊娠誘起..... 高橋寿太郎・他..... 1
Electron Microscopic Observations of Atretic Oocytes in Primordial
Follicles of Mice Akira NARITA・他..... 8
精子無力症における精子の微細構造について
第 1 報：精子無力症の臨床的事項に関する一考察..... 佐藤 和宏・他.....12
男性不妊症と精液中セレンについて..... 高橋 登・他.....19
閉塞性無精子症に対する精巣上体精管吻合および精管精管吻合術の経験..... 松田 公志・他.....26
人工精液瘤による妊娠成功例..... 三浦 一陽・他.....33
Chordee without hypospadiasの二例..... 林田 英嗣・他.....38
精子不動化抗体による受精障害作用の検討..... 津久井伸一・他.....43
Capacitationに伴って変化する精子付着抗原の生物学的意義に関する研究..... 石 田 雄 三.....50
乏精子症の補中益気湯による治療と随証療法指針..... 玉舎 輝彦・他.....59
男性不妊症の妊孕能に及ぼす高単位 Kallikrein 製剤の効果について..... 平山 寿雄・他.....65
若年婦人の月経に関するアンケート調査—2,708人の分析結果より—..... 山辺 晋吾・他.....71
Dynamics and Kinetics of Various Steroid and Protein Hormones,
Somatomedin A, Cystine-aminopeptidase and Carcinoembryonic
Antigen in Maternal Blood during Pregnancy and Their Mutual
Relationships Satoshi USUKI.....78
当科で試みた頸管粘液検査法（セッシ法）についての検討..... 吉野 和男・他.....90
経鼻的 native LH-RH の波状投与による排卵誘発効果..... 佐藤 芳昭・他.....96
Correlation between the Reaction-type of LH-RH Test and
Obesity in Infertile Women..... Kentaro TAKAHASHI・他.....102
卵管 adrenergic neurotransmitter の卵移送速度に対する調節効果..... 谷 垣 学.....106
Chlamydia trachomatis による卵管閉塞症成立に関する実験的検討..... 野口 昌良・他.....115
子宮内膜エネルギー代謝動態の妊卵着床への意義..... 提 治・他.....121
受精の過程におけるプロスタグランジン作法の解析..... 林 清士・他.....127
体外受精および人工受精における精子回収法の検討..... 吉松 宣弘・他.....136
Daily Urinary Estrogen Excretion as an Index of Follicle
Growth in IVF and ET..... Satoru CHIDA・他.....142
乏精子症・精子無力症に対する GIFT の有用性および
男性不妊症に対する治療法..... 西 修・他.....148
子宮卵管造影施行例における腹腔鏡所見の検討..... 五味淵秀人・他.....155
芍薬甘草湯のラット卵胞性ステロイド分泌に及ぼす影響..... 太田 博孝・他.....160
Lisuride (Dopamine Agonist) による妊娠の転帰と児の発育..... 柳沼 恣・他.....165
Gestrinone の子宮内膜症に対する効果—Gestrinone 投与の臨床効果と
内分泌学的変化の検討—..... 友成 廉平・他.....174
Effects of Danazol on Peri- and Post-Menopausal Dysfunctional
Uterine Bleeding and Serum Steroid Levels Nobuaki FURUHASHI・他.....182
単クローン性高感度 hCG 診断試薬（MS8501）の使用経験..... 富岡 恵・他.....185
不妊症治療に関する 1 考察：当科不妊症外来昭和 53～59 年受診患者の
成績を基にして..... 杉並 洋・他.....192
地方部会講演抄録..... 197

会 告

第32回日本不妊学会総会および学術講演会（第3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

	昭和62年	
学術講演会	〔第1日目〕 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 メインテーマ「内分泌と生殖」——その基礎と臨床——

招請講演

1. 下垂体・副腎皮質の病理と性機能 東北大学教授（病理学） 笹野 伸昭
2. 卵巣の寿命を周って 北海道大学名誉教授（産科婦人科学） 一戸 喜兵衛

特別講演

1. 哺乳動物卵の組織化学 —— Prostaglandin と Steroid の代謝を中心として ——
新潟大学教授（家畜管理学） 石田 一夫
2. 性腺刺激ホルモンの生物学 —— 魚類からヒトまで ——
早稲田大学教授（生物学） 石居 進
3. 造精機能障害の治療に関する2, 3の問題
富山医科薬科大学教授（泌尿器科学） 片山 喬
4. 女性における副腎機能と生殖 金沢大学助教授（産科婦人科学） 赤祖父 一知
5. 精子学の最近の進歩 帝京大学泌尿器科学教室（生物学） 押尾 茂

シンポジウム

ホルモン抑制物質と生殖

—— 性機能面における“Antihormone”の展開と可能性 ——

座長 金沢大学教授 西田 悦郎

- 森 純一（大阪府立大学農学部家畜臨床繁殖学教授）
佐藤 英明（京都大学農学部畜産学教室）
島崎 淳（千葉大学医学部泌尿器科学教授）
山中 英寿（群馬大学医学部泌尿器科学教授）
廣井 正彦（山形大学医学部産科婦人科学教授）
植村 次雄（横浜市立大学医学部産科婦人科学助教授）
石川 睦男（旭川医科大学産科婦人科学講師）
富田 嘉昌（金沢大学医学部産科婦人科学講師）

一般講演演題申込および発表要項

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。

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って下さい。

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

2. 抄録は800字以内、図、表はつけないで下さい。
3. 同一施設より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

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。

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. 3, 1987)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Original

- Induction of Superpregnancy by Pituitary Extract Injection in Rat
.....*J. Takahashi, A. Itoh & Y. Yasuda*1
- Electron Microscopic Observations of Atretic Oocytes in Primordial
Follicles of Mice.....*A. Narita & K. Ishida*8
- Fine Structure of Asthenozoospermia in Infertile Men.
1. Clinical and Electron Microscopic Studies on Asthenozoospermia.....*K. Satoh,
H. Ishikawa, I. Maehara, S. Satoh, M. Kimura & S. Orikasa*12
- Semen Selenium in Male Infertility.....*N. Takasaki, H. Tonami, A. Shimizu,
N. Ueno, T. Ogita, S. Miyazaki, Y. Deguchi & A. Ogata*19
- Clinical Experience of Epididymovasostomy and Vasovasostomy for
Obstructive Azoospermia.....*M. Matuda, K. Nishimura,
M. Nonomura, K. Okada & O. Yoshida*26
- A Successful Impregnation by Artificial Spermatocoele.....*K. Miura, T. Tanaka,
M. Matsushashi, A. Maki, M. Takanami, K. Fujio,
M. Shirai, K. Ando, S. Hirakawa & K. Momose*33
- Two Cases of Chordee without Hypospadias.....*H. Hayashida, M. Yamamoto,
G. Yamakawa, J. Hayashi, H. Takihara & J. Sakatoku*38
- Further Studies of the Blocking Effect of Sperm-immobilizing Antibodies
on Human *In Vitro* Fertilization.....*S. Tsukui, Y. Noda, A. Fukuda,
H. Matsumoto, K. Tatsumi & T. Mori*43
- Studies on Biological Functions of a Sperm Coating Antigen Related to
Sperm Capacitation.....*Y. Ishida*50
- Treatment of Hochuekki-To for Oligospermic Patients and Implication of
Their Clinical Signs for Therapeutic Efficacy.....*T. Tamaya, Y. Ohono & H. Okada*59
- Effects of High-unit Kallikrein on Fertilizing Capacity for Male Infertility
.....*T. Hirayama, T. Hasegawa, M. Hiroi & T. Oda*65
- Menarche and Postmenarcheal Menstrual Condition of 2,708 Young
—Analysis of Questionnaire Survey—.....*S. Yamabe, Y. Ashitaka,
K. Katayama & M. Mochizuki*71
- Dynamics and Kinetics of Various Steroid and Protein Hormones,
Somatomedin A, Cystine-aminopeptidase and Carcinoembryonic
Antigen in Maternal Blood during Pregnancy and Their Mutual
Relationships.....*S. Usuki*78
- Accuracy of Cervical Mucus Test (Pincet Method) in Our Clinic
.....*K. Yoshino, A. Nishigaki, T. Shirai, A. Uchida, Y. Araki & K. Takahashi*90

Ovulation Induction Effects of Intranasal Administration of Native LH-RH to Amenorrhic Women	<i>Y. Sato & T. Hirohashi</i>	96
Correlation between the Reaction-type of LH-RH Test and Obesity in Infertile Women	<i>K. Takahashi, K. Yoshino, T. Shirai, A. Nishigaki, Y. Araki & M. Kitao</i>	102
Mechanism of Egg Transport: Changes in the Amount of Adrenergic Neurotransmitter in the Oviduct of Normal and Estrogen- or Reserpine- Treated Rabbits during egg Transport	<i>M. Tanigaki</i>	106
Experimental Tubal Occlusion in rabbits Provoked by Chlamydia Trachomatis	<i>M. Noguchi, S. Hieda, T. Yamazaki, T. Akita, N. Ueno, J. Kuroyanagi & M. Ishihara</i>	115
Analysis of Energy Metabolism in Human Endometrium during Menstrual Cycle	<i>O. Tsutsumi, O. Ishihara, M. Sugase, K. Satoh & M. Mizuno</i>	121
Analysis of the Role of Prostaglandins in Fertilization Process	<i>S. Hayashi, Y. Noda, H. Matsumoto & T. Mori</i>	127
The Examination on the Method for Collection of Good Spermatozoa from Semen Sample	<i>N. Yoshimatsu, K. Hoshi, K. Yanagida, T. Aita & A. Sato</i>	136
Daily Urinary Estrogen Excretion as an Index of Follicle Growth in IVF and ET	<i>S. Chida, T. Yohkaichiya, S. Uehara & A. Yajima</i>	142
Usefulness of GIFT for Oligozoospermia Asthenozoospermia and Treatment of Male Infertility	<i>O. Nishi, M. Shiotani, H. Honda, K. Miyazaki, T. Sasaki & M. Yamada</i>	148
Studies on Laparoscopic Findings in the Infertile Patients Who Received Hysterosalpingography	<i>H. Gomibuchi, H. Kitagawa, Y. Taketani, K. Sato & M. Mizuno</i>	155
Influence of Syakuyaku-kanzo-To on Steroidogenesis in Rat Follicles	<i>H. Ota, M. Fukushima & M. Maki</i>	160
The Outcome of Pregnancy and Newborns after Lisuride Therapy of Patients with Argonz-del Castillo Syndrome, Chiari-Frommel Syndrome, Prolactinoma and Corpus Luteum Deficiency	<i>T. Yaginuma, T. Okamura, T. Kobayashi, H. Osada, T. Uemura, K. Mizuguchi, A. Matsuyama, K. Sato, K. Koizumi, T. Aono, K. Kurachi, H. Sumioki, T. Onoue, H. Nakano, M. Kusuda & Y. Nagata</i>	165
Studies of Clinical and Endocrinological Effects of Gestrinone on Endometriosis	<i>R. Tomonari, M. Sakai, Y. Iino, A. Sadanaga, R. Matsuoka, K. Mizutani, H. Mori & T. Kigawa</i>	174
Effects of Danazol on Peri- and Post-menopausal Dysfunctional Uterine Bleeding and Serum Steroid Levels	<i>N. Furuhashi, K. Takahama, A. Yajima, T. Fukaya & O. Shinkawa</i>	182
The assessment of a Test Kit for Diagnosis of Early Pregnancy (MS8501), Using Monoclonal Antibody for hCG	<i>M. Tomioka, T. Yamamoto, Y. Ohno, H. Honjo & H. Okada</i>	185
A Retrospective Analysis of 409 Infertile Patients, Who Consulted through the Year 1978 to 1984	<i>H. Suginami, G. Kuroda, N. Tomioka & K. Yano</i>	192

下垂体抽出液投与によるラットの過剰妊娠誘起

Induction of Superpregnancy by Pituitary Extract Injection in Rat

岩手大学農学部動物育種学教室

高橋 寿太郎 伊藤 敦 安田 泰久

Jutaro TAKAHASHI Atsushi ITOH Yasuhisa YASUDA

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Iwate University

成熟雄ラットの下垂体抽出液を成熟雌ラットに投与して、過排卵を誘起させ、雄と交尾させることによる過剰妊娠誘起を行った。

1. 妊娠7日目と10日目における下垂体抽出液投与群の平均着床数は、それぞれ 19.6 ± 4.2 コ、 15.4 ± 7.7 コで、対照群の着床数 12.3 ± 1.0 コ、 11.6 ± 1.0 コに比べて有意に多かつた ($P < 0.05$)。しかし、胎胞の大きさでは両群間に有意差は認められなかつた。

2. 妊娠21日目における下垂体抽出液投与群の平均生存胎子数は 18.3 ± 4.1 匹であり、対照群の 8.5 ± 3.7 匹に比べて有意に多かつた ($P < 0.01$)。しかし、投与群の平均胎子重量は 4.08 ± 0.48 gr. で、対照群の 4.62 ± 0.34 gr. に比べて有意に軽かつた ($P < 0.01$)。

3. 下垂体抽出液投与群の約50%が、妊娠7日目、10日目および21日目において、19コ以上の着床部位あるいは生存胎子を保有していた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 327-333, 1987)

緒 言

ラットを用いた PMSG と hCG の併用投与による過排卵誘起実験は、これまで数多く行われている¹⁻⁶⁾。しかし、過排卵を誘起しても一般に妊娠率は低く⁷⁻¹⁰⁾、過剰妊娠に導くことは困難であるといわれている。特に高単位の PMSG と hCG を投与されたラットでは、十分に過排卵は誘起されるが、着床前の胚の損失が多く¹¹⁾、着床数は正常妊娠ラットと同程度か逆に少く、全く着床しない例も多い¹²⁾。そこで、本研究では雄ラットの下垂体抽出液を雌ラットに投与して過排卵を誘起し、雄と交尾させて、過剰妊娠誘起の可能性を検討した。

研究 方法

1) 供試動物

実験には Wistar 系ラットを使用した。照明時間は7時から19時とし、室温は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下で飼育した。固型飼料(マウス、ラット生産用ラボ MR プリーダー、日本農産工業 K.K.)と水は自由に摂取させた。

2) 下垂体抽出液

下垂体抽出液は3~10カ月齢の交尾経験のない雄ラットの下垂体を用いた。雄ラットをエーテル麻酔下で放血屠殺して下垂体を摘出し、0.5mlの滅菌生理食塩水とともに小試験管に入れ、 -20°C で保存した。保存期間は3カ月以内のものを使用した。使用時にこれを解凍し、加えていた生理食塩水とともにホモゲナイズし、2,500 r.p.m (1,000g)で15分間遠心した。上清の全量を下垂体抽出液とした。

3) 雌ラットの下垂体抽出液の投与

1個の下垂体から得た抽出液を一匹の雌に投与した。雌ラットは正常な4日の性周期を3回以上くりかえした3~6カ月齢の未経産ラットを用い、膣スメアが発情後期像を示した日の12時~13時に下垂体抽出液を頸部皮下に注射した。下垂体抽出液投与2日後の発情前期像を示す日に成熟雌ラットと一晩同居させ、翌朝、膣スメア中の精子の存在によって交尾を確認し、この日を妊娠1日目とした。

4) 妊娠の確認

下垂体抽出液を投与して交尾させた雌ラットを、妊娠7、10および21日の12時から13時に殺して、卵巣重量、

表 1 Number of implantation sites in control and treated rats on the 7th day of pregnancy.

	Control ¹⁾	Treated ²⁾		
		Total	No. of implantation sites	
			19 or more	less than 19
No. of rats	4	5	3	2
Ave. No. of implantation sites ± S.D. (Range)	12.3±1.0 (11-13)	19.6±4.2 (15-26)	22.0±3.6 (19-26)	16.0±1.4 (15-17)
Ave. No. of C.L. ³⁾ ± S.D. (Range)	13.5±1.7 (12-16)	28.2±7.4 (20-39)	30.0±8.2 (23-39)	25.5±7.8 (20-31)
Implantation rate ± S.D. (%) (Implantation sites/C.L.×100)	91.3±7.7	70.8±10.6	74.8±8.0	64.9±14.3
Ave. weight of ovary ± S.D. (mg)	29.0±4.5	41.6±6.0	41.8±4.0	41.3±9.0
Ave. weight of uterine horn ± S.D. (mg)	236.8±41.0	303.4±76.1	324.2±32.0	272.3±116.2

1) Normal pregnant rat.

2) The supernatant fluid extracted from one pituitary was administered to 3-6 month old female rat at 12:00-13:00h of metestrus of estrous cycle. All of animals were mated with fertile males at the following estrus.

3) Corpora Lutea

妊娠黄体数, 着床数, 生存胎子数, 流産の有無を記録した。また対照群として, 無処置の3~6カ月齢雌ラットを交尾させ, 投与群と同じ日に殺して同様の観察を行った。

5) 妊娠7日目

子宮を摘出し, 数珠状になった膨隆部の数から着床数を算定した。黄体数および卵巣と子宮の重量も測定した。

6) 妊娠10日目

反子宮間膜側 (Anti-mesometrial side) の子宮壁を2本のピンセットで破り, 慎重に胚を取り出した。正常胚および吸収胚の数やその位置を記録するとともに, 胎胞重量として胚および胎盤をまとめて測定した。また, 卵巣重量, 子宮重量および黄体数を記録したが, 子宮重量の測定は胚摘出前に行った。

7) 妊娠21日目

子宮間膜付着部の子宮壁を2本のピンセットで破り, 胎膜を傷つけないように胎胞を取り出した。胎胞と吸収胚の数とその位置および胎子の方向を記録し, 胎胞重量を測定した。また, 胎子, 胎盤および吸収胚の重量も測定した。なお, 胎盤重量は, 胎膜をできる限り取り除き, 臍帯をつけたまま測定した。生存胎子については生殖突起と肛門との距離から雌雄を判別するとともに体長 (Crown-rump length) を測定した。黄体数を数えるとともに卵巣と子宮重量を測定した。子宮重量の測定は胎胞を摘出する前に行った。また, 左右の子宮角を分離することが困難であったため, 両子宮角をまとめて測定した。

8) その他

多数の胚が着床した場合の胎子の成長について明確に

するため, 投与群において着床数および生存胎子数が19個以上のものと19個未満のものに分けて比較検討した。これらの数を19個に設定したのは, 今回の対照群の動物の排卵数および黄体数の最も多いものが18個であり, それ以上の胚や胎子が得られることは無処置ではありえないと判断したためである。

結 果

1) 妊娠7日目

妊娠7日目における着床数や黄体数などについて, 投与群と対照群とで比較検討した (表1)。投与群の着床数は対照群のそれよりも有意に多かつた ($P<0.05$) が, その着床率は投与群で有意に低かつた ($P<0.05$)。投与群を着床数が19個以上のものと19個未満のものに分けて比較すると, 着床率には有意の差はみられないが, 黄体数は19個以上のもので有意に多いことが認められた ($P<0.01$)。卵巣および子宮重量は投与群で有意に重かつた ($P<0.01$, $P<0.05$)。着床部位の大きさは投与群と対照群とで有意差はなかつた。

2) 妊娠10日目

妊娠10日目の着床数や黄体数などについて, 投与群と対照群とで比較検討した (表2)。投与群における正常胚数は対照群に比べて有意差はみられなかつた。胚の生存率と着床率は投与群で有意に低かつた ($P<0.01$)。投与群を, 正常胚数が19個以上のものと19個未満のものに分けて比較すると, 19個以上の群で黄体数は有意に多かつた ($P<0.01$) が, 生存率や着床率には有意差はなかつた。卵巣重量は投与群で有意に重かつた ($P<0.05$)

表 2 Number of implantation sites in control and treated rats on the 10th day of pregnancy

	Control ¹⁾	Treated ²⁾		
		Total	No. of live fetuses	
			19 or more	less than 19
No. of rats	7	12	5	7
Ave. No. of live fetuses ± S.D. (Range)	11.6±1.0 (10-13)	15.4±7.7 (5-28)	23.4±3.5 (19-28)	9.7±3.0 (5-13)
Ave. No. of C.L. ³⁾ ± S.D. (Range)	11.9±0.7 (11-13)	24.8±11.9 (11-46)	36.0±8.1 (26-46)	16.9±6.3 (11-29)
Ave. No. of absorptions ± S.D. (Range)	0	1.6±2.0 (0- 6)	2.4±2.3 (0- 6)	0.7±1.2 (0- 3)
Viability rate ± S.D. (%) (Live fetuses/C.L.×100)	97.5±4.3	63.5±18.2	66.8±13.0	61.1±21.9
Implantation rate ± S.D. (%) (Implantation sites/C.L.×100)	97.5±4.3	69.2±18.5	73.1±11.6	65.9±23.4
Ave. weight of whole conceptus ± S.D. (mg)	37.1±5.7	36.7±9.3	36.7±9.74	36.8±8.6
Ave. weight of ovary ± S.D. (mg)	27.9±1.7	35.7±11.0	46.4±6.7	28.6±6.4
Ave. weight of uterine horn ± S.D.(mg)	601.8±94.5	745.1±373.8	1079.9±279.0	521.8±236.3

¹⁾, ²⁾, ³⁾ See the legends of Table 1.

表 3 Number of live fetuses of control and treated rats on the 21 st day of pregnancy.

	Control ¹⁾	Treated ²⁾		
		Total	No. of live fetuses	
			19 or more	less than 19
No. of rats	4	6	3	3
Ave. No. of live fetuses ± S.D. (Range)	8.5±3.7 (4-12)	18.3±4.1 (12-24)	21.3±2.3 (20-24)	15.3±3.1 (12-18)
Ave. No. of C.L. ³⁾ ± S.D. (Range)	14.8±2.2 (13-18)	34.0±9.1 (18-43)	36.0±6.2 (31.43)	32.0±12.5 (18-42)
Ave. No. of absorptions ± S.D. (Range)	2.8±1.5 (1- 4)	3.8±2.3 (1- 7)	4.3±1.5 (3- 6)	3.3±3.2 (1- 7)
Viability rate ± S.D.(%) (Live fetuses/C.L.×100)	60.1±28.7	56.1±14.0	60.9±15.6	51.3±13.3
Implantation rate ± S.D.(%) (Implantation sites/C.L.×100)	78.7±23.9	67.1±14.3	72.7±13.4	61.5±15.4
Ave. weight of ovary ± S.D. (mg)	44.3±12.4	75.3±20.7	81.8±20.5	68.7±20.5
Ave. weight of uterus ± S.D.(g)	37.3±21.5	77.8±13.8	86.7±12.0	69.0±9.8

¹⁾, ²⁾, ³⁾ See the legends of Table 1.

が、子宮重量では有意差はなかつた。胎胞重量は投与群と対照群とで差はなかつた。着床数が多い場合でも胎胞重量の低下はなかつた。

3) 妊娠21日目

妊娠21日目の生存胎子数や黄体数などについて、投与群と対照群とで比較検討した(表3)。投与群の生存胎子数は、対照群のそれに比べて有意に多かつた(P<0.01)が、生存率や着床率には有意な差はみられなかつ

た。投与群を、生存胎子数が19匹以上のものと19匹未満のものに分けて比較した結果、黄体数、着床率、生存率および吸収胎子数において、両者の間に有意な差はみられなかつた。卵巣および子宮の重量は投与群で有意に重かつた(P<0.01)。

胎胞、胎子および胎盤の重量と体長について、投与群と対照群とで比較した(表4)。投与群の胎胞、胎子および胎盤の重量は、対照群と比べて有意に軽かつた

表 4 Comparison of fetal size and weight of control rats and treated rats on the 21st day of pregnancy

	Control ¹⁾			Treated ²⁾		
	Total	Male	Female	Total	Male	Female
No. of fetuses	34	14	20	110	58	52
Ave. weight of whole conceptus ± S.D. (g)	4.62 ± 0.34	4.78 ± 0.29	4.47 ± 0.32	4.08 ± 0.48	4.24 ± 0.36	3.91 ± 0.54
Ave. weight of fetuses ± S.D. (g)	3.47 ± 0.35	3.63 ± 0.29	3.35 ± 0.35	2.99 ± 0.40	3.09 ± 0.38	2.87 ± 0.40
Ave. weight of placentas ± S.D. (mg)	468.2 ± 94.2	448.9 ± 55.3	983.2 ± 115.3	413.2 ± 61.6	414.8 ± 56.5	411.6 ± 67.0
Ave. of crown-rump length ± S.D. (mm)	30.8 ± 1.9	30.6 ± 2.0	30.9 ± 1.8	29.8 ± 2.0	30.1 ± 2.0	29.5 ± 2.0

¹⁾, ²⁾ See the legends of Table 1.

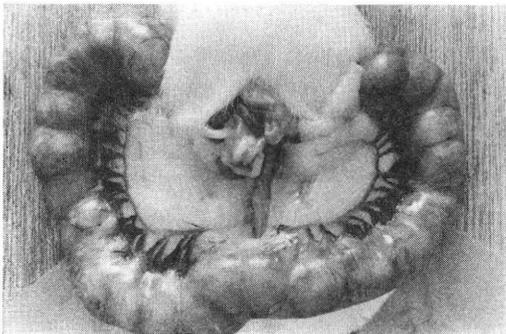


Fig. 1 Uterus of superpregnant rat was filled with many fetuses on the 21st day of pregnancy

($P < 0.01$) が、体長には有意差はみられなかった。また胎子の性別による比較では、雄の胎子および胎盤の重量が雌のそれらより有意に重かった (投与群 $P < 0.01$, 対照群 $P < 0.05$)。過剰妊娠が誘起された妊娠21日目の母体の子宮、胎子および胎盤の所見を図1, 2および3に示した。図3は胎盤が3つ癒着している状態を示している。

4) その他

下垂体抽出液投与群の2例について分娩させたところ、18匹および9匹の産子数が得られた。どちらも分娩は、妊娠23日目であり、無処置の正常妊娠ラットの妊娠期間と同じであった。18匹を分娩した例では、明らかに新生子は小さく、分娩後2日までに3匹が死亡した。他の15匹は2週齢まで生存したが、その後、急激に死亡数が増加し、3週齢を超えて生存したものは1匹のみであった。9匹を分娩した例では、8匹が3週齢を超えて順調に発育し、成熟した。

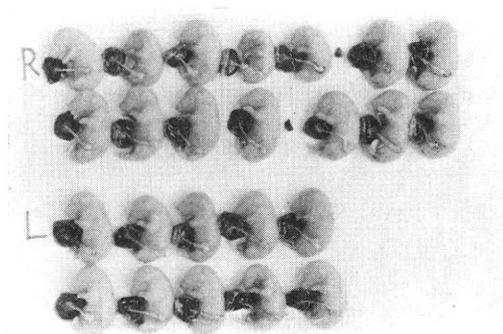


Fig. 2 Twenty four live fetuses and two absorptions were obtained from a superpregnant rat on the 21st day of pregnancy. The fetuses were found to be uniform in size, but mean weight of fetuses in superpregnant rat was lighter than that in normal pregnant one. R: Right uterine horn. L: Left uterine horn

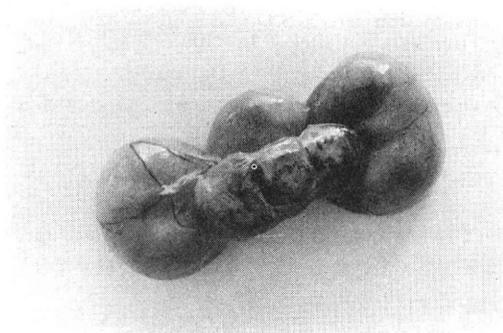


Fig. 3 A superpregnant rat had three conceptuses which placentas conglutinated each other on the 21st day of pregnancy

考 察

本実験では、Wistar 系雌ラットに同系統の雄ラットの下垂体抽出液を投与することによつて、過剰妊娠の誘起を試みた。現在行われている過排卵誘起実験のほとんどは PMSG の単一投与、または PMSG と hCG との併用によつて行われている。下垂体を用いた過排卵誘起および過剰妊娠誘起実験は、下垂体の皮下移植実験¹³⁾や下垂体前葉を未成熟ラットの腎被膜下へ移植して過排卵を誘起した実験¹⁴⁾のほかは、殆どみられない。著者ら¹⁵⁾は、下垂体抽出液投与によるラットの過排卵誘起と初期胚発生の観察を行い、次のような結果を得ている。雄ラットの下垂体抽出液投与によつて成熟雌ラットに高率に過排卵が誘起され、妊娠 3 日目と 5 日目における回収胚数が正常妊娠に比較して有意に増加し、胚の発生の過程およびその形態は正常妊娠のそれらに比較して殆ど差は認められなかつた。本実験における妊娠 7 日目、10 日目および 21 日目の着床率は、前報¹⁵⁾の妊娠 3 日目および 5 日目の着床前の胚の回収率とほとんど差がないことから、妊娠 5 日目に子宮に存在していた胚盤胞の大部分が着床すると考えられる。

妊娠 10 日目において、下垂体抽出液投与群で吸収胎子がいくつか認められ、着床後に変性したと思われる胚も若干みられた。胎胎重量は対照群と投与群とで差はみられず、また、着床数が 19 個以上の場合でも胎胎重量は低下しなかつた。これらのことから過剰妊娠が誘起されても、少なくとも妊娠 10 日目までの胚の成長には過剰妊娠による影響はなく、着床遅延もないものと考えられる。

妊娠 21 日目でも、投与群における着床率は妊娠 10 日目以前とほとんど差がなく、生存胎子数は対照群よりも有意に多かつた ($P < 0.01$)。しかし、着床率や胎子の生存率では対照群との間に有意差は認められなかつた。これは対照群の例数が少ない上に、それらの個体の排卵数が多く、生存胎子数の少ない例が含まれていたため、例数を増して検討する必要があると思われた。

マウスでは、PMSG と hCG 処置により、多くの着床数を得ることができるが、着床後に死亡する胎子が多く、妊娠後半の生存胎子数は正常妊娠の胎子数またはそれ以下といわれている¹⁶⁻²⁰⁾。本実験では、投与群における着床後の死亡胎子数は少なく、マウスの場合よりもむしろ良好な結果が得られた。しかし、妊娠 21 日目における投与群の胎胎、胎子および胎盤の重量は対照群と比較して有意に小さかつた ($P < 0.01$)。投与群の胎子の成長が不良であつたのは、過剰な胎子が着床したために、胎子一匹当りの胎盤血流量の不足や胎子同士の物理的な相互関係が原因ではないかと思われる。投与群では、隣接

した胎盤が癒合している例が多く、圧迫によりうつ血斑のみられる胎子があつた。

投与群の卵巢重量は、妊娠 7 日目、10 日目および 21 日目において、いずれも対照群のそれよりも重かつたが、これは投与群における卵巢の妊娠黄体数が多いためである。投与群では、排卵数、着床数および生存胎子数にかんじの偏差がみられた。そこで、この偏差が排卵数の差によるものか、着床前の胚の消失数の差によるものかを明確にするために、着床数および生存胎子数が 19 個以上のものと 19 個未満のものに分けて比較した。その結果、着床数および生存胎子数が 19 個以上の個体の黄体数は 19 個未満の個体のそれに比べて多かつた。したがつて、排卵数が多いほど、それだけ多くの着床数および生存胎子数を得ることができるものと考えられる。また、下垂体抽出液の投与による過排卵誘起作用（排卵数の増加作用）は偏差が大きいため、それが着床数および生存胎子数に大きな影響を与えていると考えられる。これは下垂体抽出液に含まれるホルモン量に差があるためか、あるいはホルモンに対する雌ラットの感受性の個体差が大きいためと考えられる。

下垂体抽出液投与群の 2 例について分娩例の結果から考えると、過剰妊娠を誘起して過剰分娩させることができても、その子供は未熟な状態であり、成育させることはかなり困難であることが予想される。

これまで PMSG や hCG などのホルモン処置では安定した過排卵を誘起できても、妊娠中における胚の着床数の増加と妊娠後期までの胎子の発育の維持は困難であつたが、本実験では、成熟雌ラットに雄ラットの下垂体抽出液を投与することによつて過排卵を誘起させ、妊娠後期に到るまで高率に過剰妊娠を維持できることが示された。この機構については不明であるが、高単位の PMSG と hCG の併用によつて過排卵誘起された妊娠ラットでは、妊娠前半期における卵巢ホルモン分泌の不均衡がおこることが報告されている^{12,21,22)}。しかし、下垂体抽出液投与による過排卵処置妊娠ラットでは、妊娠前半期における血中卵巢ホルモン濃度変化は正常妊娠ラットに類似している²³⁾ので、過排卵処置によつて引き起こされる妊娠時のホルモン分泌の不均衡を抑制することが過剰妊娠を誘起する重要な要因であると考えられる。

本実験で投与した下垂体抽出液には、FSH, LH のほか、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン、オキシトシンおよびバゾプレッシンなど、種々のホルモンが含まれていると考えられる。したがつて、過剰妊娠誘起に関する下垂体抽出液の作用機序を明らかにするためには、下垂体抽出液中の各種ホルモン成分およびその含有量についての分析を行

う必要性が残されている。

文 献

- 1) 石橋 功, 田中 宏, 高橋紀代志: 過排卵ラット卵子の形態学的研究Ⅲ. 成熟ラットの受精と着床について, 家畜繁殖誌, 16: 14, 1970.
- 2) 石橋 功: 過排卵ラット卵子の形態学的研究, IV. 成熟ラットの着床ならびに胚産期におよぼす性腺刺激ホルモンの影響, 家畜繁殖誌, 18: 87, 1972.
- 3) 石橋 功: 種々の量の PMSG と hCG を投与した成熟ラットにおける排卵数と受精および発育について, 家畜繁殖誌, 29: 1, 1983.
- 4) 利部 聡: 成熟ラットにおける PMSG 投与後の大型卵胞の消長ならびに過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタールの影響, 家畜繁殖誌, 29: 20, 1983.
- 5) Walton, E. A., Evans, G. and Armstrong, D. T.: Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. J. Reprod. Fert., 67: 91, 1983.
- 6) Walton, E. A. and Armstrong, D. T.: Oocyte normality after superovulation in immature rats. J. Reprod. Fert., 67: 309, 1983.
- 7) Edwards, R. G. and Austin, C. R.: Induction of oestrus and ovulation in adult rats. J. Endor., 18: 7, 1959.
- 8) Zarrow, M. X., Clare, J. H., Roellig, C. and Denenberg, V. H.: Prolonged gestation in the PMSG-treated immature rats. Biol. Reprod., 1: 387, 1960.
- 9) 佐藤晶子: シロネズミ (*Rattus norvegicus*) における人為多数排卵とその受精に関する二・三の観察, 遺伝学雑誌, 37: 253, 1962.
- 10) 佐久間勇次, 石島芳郎, 平野公夫: PMS によるラットの過剰妊娠に関する研究, 日大農獣医報, 20: 59, 1965.
- 11) 高橋寿太郎, 本郷裕美, 正木淳二: 過排卵処理された成熟ラットの受精卵の発育に及ぼす卵巣摘出とプロジェステロン投与の影響, 日畜会報, 53: 260, 1982.
- 12) 高橋寿太郎, 本田和正, 正木淳二: 過排卵処理による成熟ラットの妊娠阻害と妊娠前半期の血清プロラクチンおよびプロジェステロン濃度の変化について, 家畜繁殖誌, 28: 59, 1982.
- 13) Engle, E. T.: Pregnancy following superovulation in the mouse. Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 25: 84, 1983.
- 14) Taya, K., Mizokawa, T., Matsuui, T. and Sasamoto, S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. J. Reprod. Fert., 69: 265, 1983.
- 15) 高橋寿太郎, 伊藤 敦, 安田泰久: 下垂体抽出液投与によるラットの過排卵誘起と初期胚発生の観察, 哺乳卵研誌, 2: 115, 1985.
- 16) 佐藤晶子: ハツカネズミ (*Mus musculus*) における人為過剰排卵と過剰妊娠に関する二・三の観察, 遺伝学雑誌, 34: 226, 1959.
- 17) McLaren, A. and Michie, D.: Superpregnancy in the mouse I. Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of various ages. J. Exp. Biol., 36: 281, 1959.
- 18) 佐久間勇次, 遠藤 克, 石島芳郎: マウスの過剰妊娠に関する研究 I, 日大農獣医報, 24: 7, 1967.
- 19) Baumont, H. M. and Smith, A. F.: Embryonic mortality during the pre- and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation. J. Reprod. Fert., 45: 437, 1975.
- 20) 佐藤英明, 石橋武彦: 誘起排卵マウス (JCL-ICR) における胎児体重と胎児数の関係, 家畜繁殖誌, 25: 136, 1979.
- 21) Takahashi, J., Umezu, M., Masaki, J. and Yasuda, Y.: Disturbance of pregnancy in superovulated adult rat. Proceedings of 10th international congress on animal reproduction and artificial insemination.: No. 98, 1984.
- 22) 石橋 功, 佐藤邦忠, 大沢 満: 種々の量の PMSG と hCG を投与後交配した成熟ラットの卵胞数と血清中のステロイドホルモンの動態, 家畜繁殖誌, 30: 199, 1984.
- 23) 高橋寿太郎, 伊藤 敦, 安田泰久, 宮本明夫, 伊藤 紳, 梅津元昭, 正木淳二: 下垂体抽出液投与による過排卵処理妊娠前半期ラットの FSH, LH, プロジェステロンおよびエストロジェンの動態について, 第78回日大畜産学会大会講演要旨: 8, 1986.

Induction of superpregnancy by pituitary extract injection in rat

Jutaro Takahashi, Atsushi Itoh and
Yasuhisa Yasuda

Laboratory of Animal breeding, Faculty of
Agriculture, Iwate University,
Morioka 020, Japan

The artificial induction of superovulation and superpregnancy was attempted by the administration of pituitary extract to adult female rat. Pituitary gland removed from 3-10 months old rat was homogenized and centrifuged. The supernatant fluid extracted from one pituitary was administered to 3-6 months old female rat at metestrus of estrous cycle. Effects of pituitary extract injection on the increase in number of implantation sites and viable fetuses in pregnant rat were studied.

The mean number of implantation sites in

treated animals on the 7th and 10th day of pregnancy (19.6 ± 4.2 and 15.4 ± 7.7 , respectively) was more than that in control ones significantly (12.3 ± 1.0 and 11.6 ± 1.0 , respectively, $p < 0.05$). However, the size of implantation sites in treated animals was not different from that in control ones.

The mean number of viable fetuses in treated rats on the 21st day of pregnancy was more than that in control ones significantly (18.3 ± 4.1

vs 8.5 ± 3.7 , $p < 0.01$). But, the mean weight of fetuses in treated rats was lighter than that in control ones significantly (4.08 ± 0.4 gr. vs 4.62 ± 0.34 gr., $p < 0.01$).

In conclusion, about fifty percent of the animals treated with pituitary extract were induced superpregnancy i.e. more than 19 implantation sites or viable fetuses were observed in their pregnancy.

(受付: 昭和61年9月26日)

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF ATRETIC OOCYTES IN PRIMORDIAL FOLLICLES OF MICE

Akira NARITA and Kazuo ISHIDA

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata-shi, Japan

Abstract: The assumption of degenerating process was done using the results obtained by electron microscopic observations of mouse atretic oocytes in the primordial follicles 2 and 3 days after birth. At the early stage of degeneration, the cisterna of nuclear envelope of the oocyte was enlarged, and a large number of vesicles of different sizes appeared in the cytoplasm. At the middle stage, some of the vesicles were transformed into lamellar bodies, and the majority of the mitochondria into dense bodies. At the late stage, the nuclear envelope became indistinct, chromatin coarse masses as well as the cytoplasmic membrane was partially destroyed, and the dense granules of different sizes appeared around the destroyed lamellar bodies, vesicles and the dense bodies. Finally, the nuclear envelope and cytoplasmic membrane were almost perfectly destroyed, and the coarse chromatin masses remained in the nucleus and a large number of dense granules in the cytoplasm.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 334-337, 1987)

Introduction

It is well known that the number of oocytes contained in the mammalian ovary markedly decrease during the period just before and after birth, and this phenomenon suggests that some of the oocytes degenerate during this period¹⁾. Light microscopic observations of such atretic oocytes were performed using golden hamsters by Weakley²⁾, and electron microscopic ones using rats by Franchi and Mandl³⁾, and using golden hamsters by Weakley²⁾.

The present investigation dealt with the electron microscopic observations of atretic oocytes (dictyate stage of meiosis) in the primordial follicles of mice 2 and 3 days after birth, to assume the degenerating process of the oocytes at this crucial period.

Materials and Methods

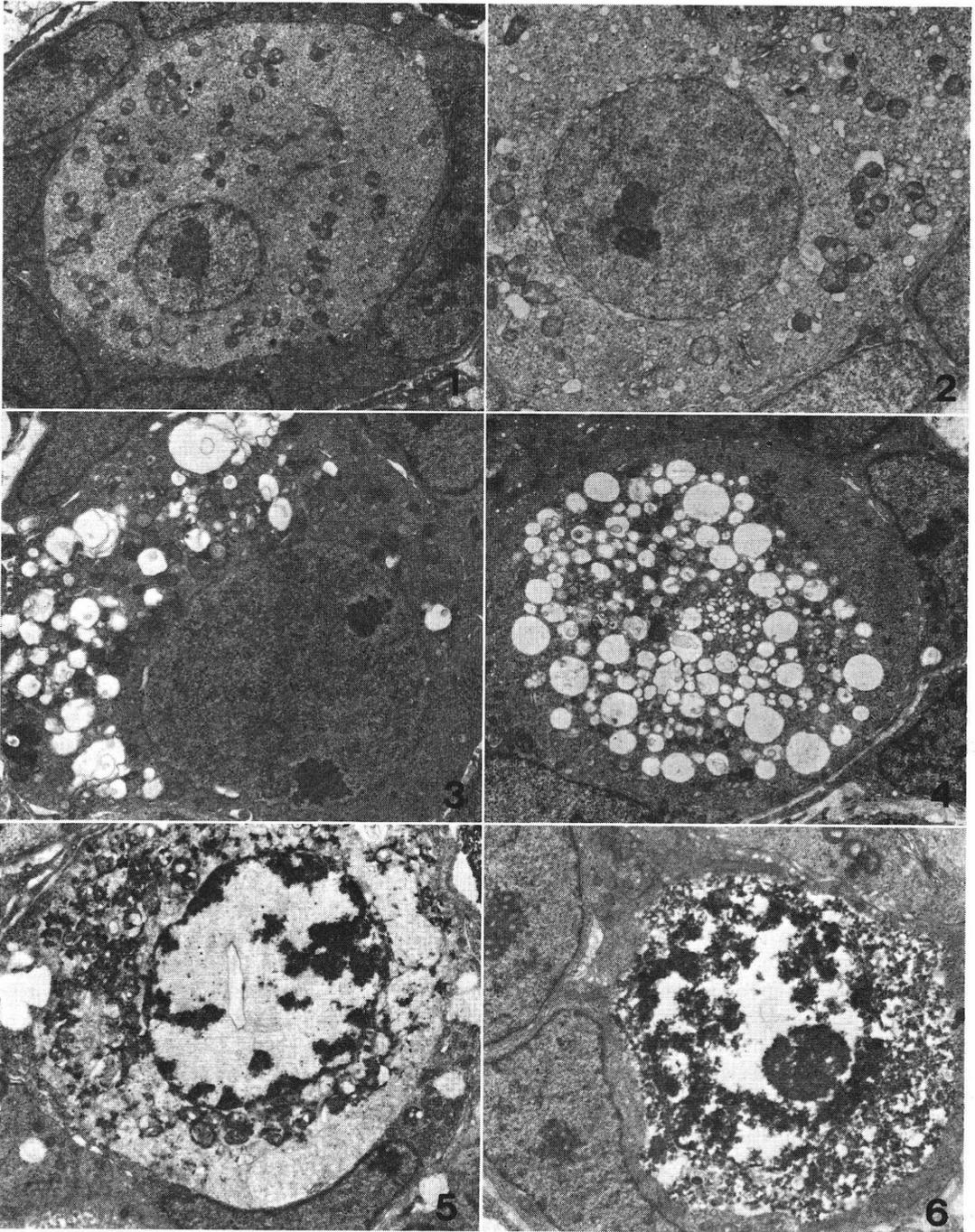
Ovaries were taken from 10 female mice of ICR strain 2 and 3 days after birth, and were immediately fixed for 24 hours in 0.1 M cacodylate buffered solution (pH 7.4) containing 2.5

% glutaraldehyde and 2 % paraformaldehyde. After rinsing thoroughly with 0.1 M cacodylate buffered solution (pH 7.4), they were fixed for 2 hours in 0.1 M cacodylate buffered solution (pH 7.4) containing 1 % osmium tetroxide, dehydrated with acetone, and embedded in Quetol 812. Then, they were cut at the thickness of 0.1 μm using an ultramicrotome, and stained with uranium acetate and lead citrate. Microphotographs were taken under an electron microscope (JEM-100 B). For light microscopic observations, ovaries were stained with 0.05 % toluidine blue solution after they were cut at the thickness of 1 μm .

Results

When toluidine blue-stained specimens of ovaries were observed under a light microscope, some oocytes were degenerating, while the majority of them were seen surrounded by a layer of granulosa cells to form the primordial follicles.

When electron microphotographs were observed, the surface of normal oocyte in the



All the electron microphotographs show mouse oocytes in the primordial follicles 2 days after birth.

Fig. 1 A normal oocyte. $\times 2,200$

Fig. 2 An oocyte at early stage of degeneration. $\times 3,500$

Fig. 3 An oocyte at middle stage of degeneration. $\times 3,500$

Fig. 4 An oocyte at middle stage of degeneration. $\times 3,500$

Fig. 5 An oocyte at late stage of degeneration. $\times 3,500$

Fig. 6 An oocyte at late stage of degeneration. $\times 4,500$

primordial follicle was somewhat wavy, having a small number of short microvilli. Desmosomes were frequently found between the cytoplasmic membrane of the oocyte and those of granulosa cells. The nucleus contained a lot of euchromatin and a well-developed nucleolus. The cytoplasmic matrix was low in electron density. Some Golgi apparatus were located near the nucleus. Round or oval mitochondria having lamellar cristae and a vacuole were found in clusters. A number of free ribosomes were scattered in the cytoplasm, while it was rare to find the cross sections of smooth-surfaced endoplasmic reticulum and lysosome-like granules high in electron density (Fig. 1).

The nucleus in granulosa cell contained a good amount of euchromatin and a nucleolus as much developed as that in the oocyte, while the cytoplasmic matrix was higher in electron density than that in the oocyte was. There also were long mitochondria, rough-surfaced endoplasmic reticula and lysosome-like granules distributed in the cytoplasm (Fig. 1).

In the present study, the atretic oocytes in the primordial follicles showed different degenerating figures.

The early stage of degeneration. The cisterna of the nuclear envelope in the oocyte was enlarged. Although Golgi apparatus in the cytoplasm were developed well, mitochondria somewhat decreased in number. A large number of vesicles of different sizes appeared in the cytoplasm, especially abundantly near mitochondria (Fig. 2).

The middle stage of degeneration. The majority of the microvilli on the cell surface disappeared. The nuclear envelope which had lost the cisterna was mincingly wavy. The cytoplasmic matrix was higher in electron density than that was in the oocyte at the early stage of degeneration. Golgi apparatus degenerated. Mitochondria with destroyed cristae also degenerated, and their matrixes were high in electron density (dense bodies). Most of the vesicles came to have lamellar structures in the lumina (lamellar bodies). Lysosome-like granules somewhat increased (Figs. 3 and 4).

The late stage of degeneration. Desmosomes between the oocyte and the granulosa

cells disappeared, and the cytoplasmic membrane partially destroyed. The nuclear envelope came to be indistinct, chromatin coarse masses high in electron density, and nuclear matrix low in density. In the cytoplasm, dense bodies, lamellar bodies and vesicles were remarkably destroyed, and were surrounded by dense granules of different sizes (Fig. 5). Finally, the nuclear envelope and cytoplasmic membrane were almost destroyed, though coarse chromatin masses remained in the nucleus and a large number of dense granules in the cytoplasm (Fig. 6).

No morphological changes were observed on the surrounding granulosa cells during the process of degeneration in the oocyte.

Discussion

Although it is known that the nuclei of rat and mouse oocytes reach dictyate stage 3 to 4 days after birth⁴⁾, Foote¹⁾ reported that the period in which the nuclei of oocytes reached the stage was not so exactly fixed in mice. In the mice of ICR strain used in this study, the nuclei of oocytes reached dictyate stage 2 days after birth, and most of the oocytes came to form primordial follicles.

Franchi and Mandl³⁾ observed the degenerating process of rat oocytes 4 days after birth, dividing the nuclear stages of meiosis into two groups; oocytes that had nuclei at the stages of leptotene to pachytene and those that had nuclei at the stage of diplotene. On the other hand, Weakley²⁾ observed the degenerating process of golden hamster oocytes 1 day before birth through 8 days post partum. However, they^{2,3)} did not report on the degenerating process of oocytes having nuclei at dictyate stage.

Degenerating figures such as chromatin masses in the nuclei, vesicles and lamellar bodies in the cytoplasm, all found in mouse atretic oocytes that had nuclei at dictyate stage in the present investigation, had already been reported by Franchi and Mandl³⁾ who used rat atretic oocytes having nuclei at the three stages preceding dictyate, and by Weakley²⁾ who used atretic golden hamster oocytes, but did not describe the nuclear stages. Accordingly, it seems that the degenerating figures in atretic oocytes as just mentioned are common to all the stages of meiosis, and

to the kinds of animals also.

Franchi and Mandl³⁾ reported that an interspace was found between granulosa cells and atretic oocytes that had nuclei at the stage of diplotene, while there was no such interspace between those when atretic oocytes had nuclei at the stages of leptotene to pachytene. Weakley²⁾, meanwhile, mentioned that large vacuoles and large granules high in electron density appeared in the cytoplasm of atretic golden hamster oocytes. In the present investigation, such figures were not observed in the atretic oocytes having nuclei at dictyate stage. On the contrary, however, an enlargement in cisternae of nuclear envelopes was found in mouse oocytes during the earliest stage of degeneration.

References

- 1) Foote, R. H.: The gametogenic function of the aging ovary in the mammal. in *Aging Gametes. Their Biology and Pathology*, ed. Blandau, R. J., pp. 179-200, Karger, Basel, 1975.
- 2) Weakley, B. S.: Light and electron microscopy of developing germ cells and follicle cells in the ovary of the golden hamster: twenty four hours before birth to eight days post partum. *J. Anat.*, 101: 435, 1967.
- 3) Franchi, L. L. and Mandl, A. M.: The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. R. Soc. B.*, 157: 99, 1962.
- 4) Bennett, J. P. and Vickery, B. H.: Rats and mice. in *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, ed. Hafez, E. S. E., pp. 299-301, Lea and Febiger, Philadelphia, 1970.

マウスの原始卵胞における退行卵母細胞の電子顕微鏡学的観察

成田 成, 石田一夫

新潟大学農学部畜産学科

生後2日と3日のマウスの原始卵胞における卵母細胞の退行像を電子顕微鏡によつて観察し、卵母細胞の退行過程を推察した。退行初期において、卵母細胞の核膜は槽が拡張し、細胞質にはいろいろな大きさの小胞が多数出現した。ついで、小胞のあるものは層板小体に移行し大部分のミトコンドリアは退行して電子密度の高い小体となった。退行末期には、核膜は不明瞭となり、核質に電子密度の高いクロマチン塊が生じた。細胞膜はところどころで破壊され、細胞質では電子密度の高いさまざまな大きさの顆粒が破壊された小器官の周囲に出現した。さらに退行が進むと、核膜と細胞膜はほとんど消失し、核にはクロマチン塊が、また、細胞質には電子密度の高い顆粒が残存していた。

(受付: 昭和61年11月28日)

精子無力症における精子の微細構造について

第1報：精子無力症の臨床的事項に関する一考察

Fine Structure of Asthenozoospermia in Infertile Men

1. Clinical and Electron Microscopic Studies on Asthenozoospermia

東北大学医学部泌尿器科教室

佐藤 和宏 石川 博夫 前原 郁夫
Kazuhiro SATOH Hiroo ISHIKAWA Ikuo MAEHARA

佐藤 滋彰 木村 正一 折笠 精一

Sigeaki SATOH Masaichi KIMURA Seiichi ORIKASA

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

過去10年間に当科不妊外来を訪れた2,010名の患者の内、われわれの定義（3回以上の精液検査で常に精子運動能指数30以下、但し精子濃度 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 以下は除く）による精子無力症患者は40名（約2.0%）であった。

最近の20例に対し透過型電顕による精子の観察を行ない、内18例に精子無力症の原因と思われる微細構造上の異常を観察した。内訳は短尾精子症3例、巨頭多尾精子症3例、精子尾部中間部の形態異常3例、immotile cilia syndrome 1例、pyospermia 症例で精子尾部微細構造の異常がみられたもの3例、現在の所分類不能で精子尾部微細構造の異常がみられたもの5例であった。

これらの詳細および精巢の電顕所見については順次報告する予定であるが、今回はおもに精子無力症をめぐる臨床的諸問題について述べた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 338-344, 1987)

緒 言

精子無力症は精液検査において、精子の運動性が著しく減少している場合に用いられる用語である。しかし実際の不妊外来において、その原因が必ずしも明らかでない場合が多いために、定義、頻度、原因、治療などが不明確であった事は否めない。一方、1975年の Afzelius¹⁾、Pederson²⁾、1977年の Eliasson³⁾ らの immotile cilia syndrome の報告以来、精子の形態異常と運動性低下との因果関係が注目されている。

われわれは当科不妊外来を訪れた男性不妊患者の内、精子無力症と診断した症例を検討したので、今回は精子無力症の臨床的問題点および精子形態異常との関連についての概略を述べてみたい。

方 法

対象は1977年1月初めより1986年8月末までの約10年間に当科不妊外来を訪れた男性不妊患者2,010名である。精子無力症の診断は、原則として3回以上の精液検査において常に精子運動能指数 (SMEI⁴⁾) が30以下のもの、ただし精子濃度が $3 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のものは除く、とした。この定義に合致するものは40名あり、それらの内20名は透過型電顕による精子形態の観察を、6名は生検標本による精巣組織の微細構造を観察した。また control として3名の healthy fertile men の精子の微細構造を観察した。尚、精子形態の光顕上の観察はおもに0.5%エオジンを用いた超生体染色にて行つた。

精子の電顕像を得る方法として、まず液化精液を1,000×g（約2,500rpm）で15分間遠沈し、上澄を捨て、2.5%グルタルアルデヒド（0.05M カコジル酸緩衝液、pH 7.4）を加え、さらに160×g（約1,000rpm）で5分

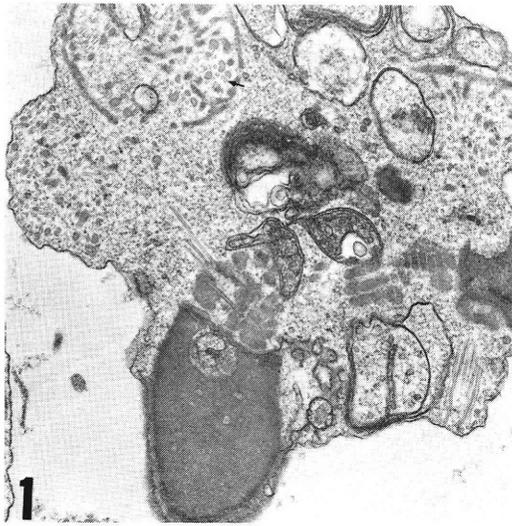


図 1 TEM of short-tailed spermatozoa. The components of the tail are seen, but they distribute at random. Arrow indicates "microtubules".



図 2 Malformed spermatozoa in the semen. Three nuclei and probable acrosome (star mark) are seen.



図 3a Defects of mitochondrial sheath. Arrow indicates rudimentary mitochondrias.



図 3b Elongation of mitochondrial sheath. (arrow, about 15 μ m long)

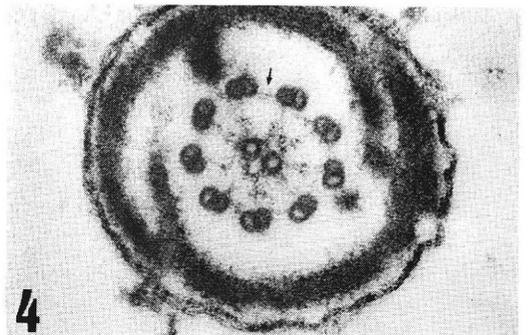


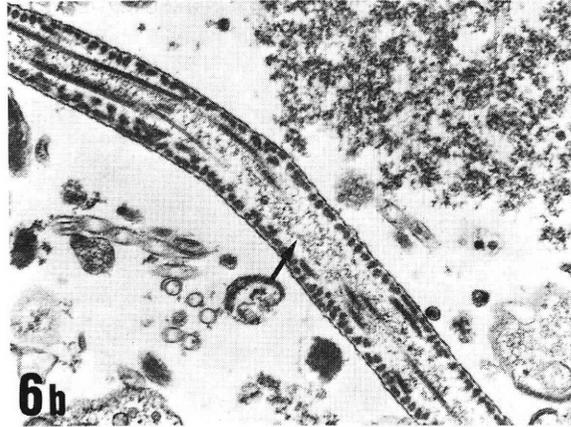
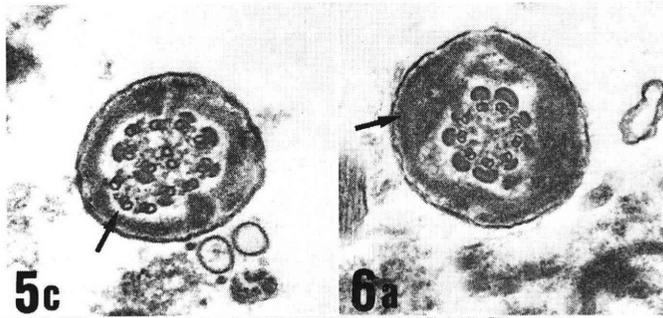
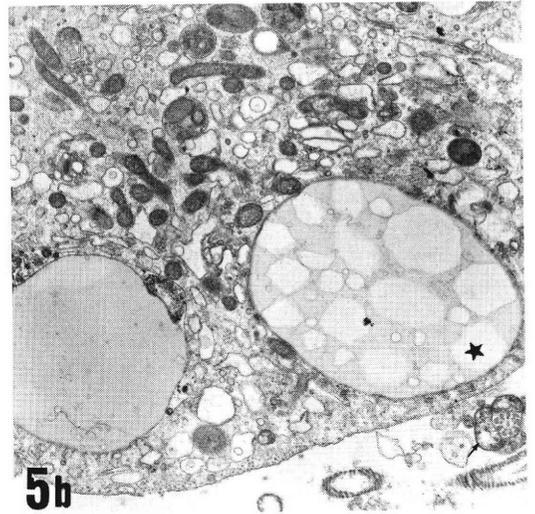
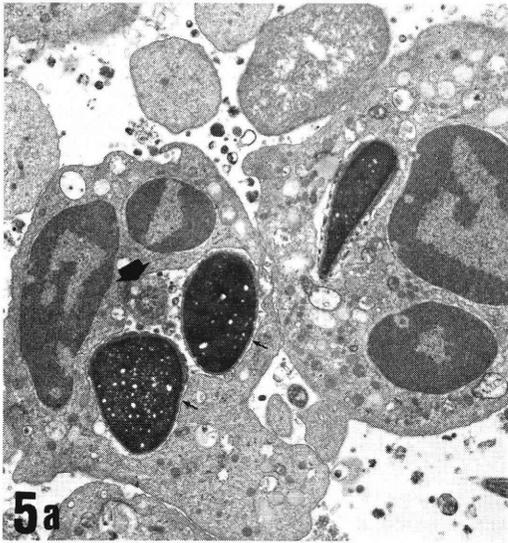
図 4 Immotile cilia syndrome. Arrow indicates lack of both dynein arms.

間遠沈する方法を1~2回繰り返して施行してペレットを得た。これを前述の2.5%グルタルアルデヒドに2時間固定後、1%オスミウムによる二重固定を行ない、エタノール系列で脱水後 Epon 812に包埋した。Reichert OmU4にて超薄切片を作製し、酢酸ウラニウムおよび酢酸鉛にて二重染色を行ない、日立 H-600型電顕にて観察した。精巣組織の微細構造も同様にして観察した。なお電顕観察上1~2の症例で精子の plasma me-

braneの損傷が多くみられたので、これらの症例では遠沈の回転数をより低回転(1,000~1,500rpm)にしてペレットを作製した。

結 果

われわれの定義による精子無力症症例は40名あり、その頻度は約2.0%(40/2,010)であった。精子の光顕、電顕の観察結果を基に、動物で検討されている遺伝性的の問題なども考慮してこれら40症例を Table 1のごとく分



- ☒ 5a TEM of probable leukocytes ingesting sperm heads (arrow) and tail (large arrow).
- ☒ 5b TEM of Sertoli cell in the semen. Star mark indicates lipid in Sertoli cell. Middle piece of spermatozoa (arrow).
- ☒ 5c Arrangement of doublet microtubules is not regular, especially No. 9, No. 1-No. 3 microtubules. Extra three microtubules are seen (arrow).
- ☒ 6a "9+0" axoneme with thickened fibrous sheath (arrow).
- ☒ 6b Axonemal abnormalities seen in longitudinal section. Arrow indicates complete absence of axoneme.

表 1 Classification of 40 cases (hypothesis)

I. the cases thought to be congenital lesion
1. short-tailed spermatozoa (5)
2. spermatozoa with large heads and multiple flagella (3)
3. defect or elongation of spermatozoal middle piece (3)
4. immotile cilia syndrome (1)
II. the cases thought to be acquired lesion
1. spermatozoa in pyospermia (6)
2. spermatozoa in other cases (22)

類してみた。また Table 2 にその精液所見の結果を示す。尚、この分類はあくまで便宜的なものであり、ことに先天性、後天性の問題は今後の詳細な検討を要すると考えられる。

電顕による観察を行った20名の精子は、①short-tailed spermatozoa⁵⁾ (短尾精子症) 3例 (図1), ②large heads and multiple flagella⁶⁾ (巨頭多尾精子症) 3例 (図2), ③精子尾部中間部の形態異常, 3例 (図3a, 3b), ④immotile cilia syndrome (Afzelius の分類⁷⁾ の1型) 1例 (図4), ⑤pyospermia 症例で精子尾部微細構造の異常がみられたもの (図5a, 5b, 5c) 3例, ⑥現在の所分類不能で精子尾部微細構造の異常がみられたもの5例 (図6a, 6b) および微細構造上は正常範囲に入る⁹⁾ と考えられたもの2例の計20例であった。

これらの詳細は、精巢の微細構造の観察結果などとともに、case report の形で報告する予定であるが、こうした症例の精子、精巢の電顕的観察の報告はきわめて少なく、今後さらに症例を重ね検討する余地がある。

考 察

①定義・用語・頻度について：精子の運動性は一般に運動率で表現されるが、より客観的方法として種々の方法が提唱されている^{10,11)}。われわれは従来より精子運動

能^{4,12)} (sperm motile efficiency; SME) を用いて精子の運動性を評価している。本法の特徴は、精子の直進運動性を簡便に測定できる点にあり、推奨されるべき方法の1つであろう¹³⁾。いわゆる、精子無力症の定義が必ずしも明確でない背景には、本症の原因が明らかでなかった点とともに、精子の運動性を表現する客観的測定法の統一がなされていない現状も挙げられる。こうした問題の解決も今後の課題であろう。

精子無力症の定義については、精子濃度が $45 \times 10^6/\text{ml}$ 以上で、精子の大部分が運動性を失っている場合とするもの¹⁴⁾、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上で、運動率40%以下とするもの¹⁵⁾、精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上で、運動率30%以下とするもの¹⁶⁾などがある。

今回われわれは精子無力症の概念を「何らかの原因で精子の運動性が著しく減少し、そのために妊孕性がほとんどないもの」と考え、その定義は「原則として3回以上の精液検査において常に精子運動能が30以下のもの、ただし精子濃度が $3 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のものは除く」とした。その理由としては、実際の不妊外来において、常に運動能が30以下のものは治療がほとんど無効な症例が多い事、逆に精子濃度がたとえば $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下でも運動能が良好なものは妊娠に到る例がある事から、運動能が妊孕性に極めて重要であるとの考えに依った。ただし、精子濃度が $3 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のものでは運動能測定の誤差も大きく、今回の目的の1つである精子の微細構造の観察にもなじまぬため(ペレットの作製が困難である)除外した⁹⁾。精子無力症の原因の検討が進めば、より合理的な本症の定義づけが可能となるであろう。

用語に関しては、精子無力症と同義に necrospermia (精子死滅症) という用語が用いられる事もあるが¹⁴⁾、今回の結果からも明らかなように精子無力症の精子は“live but immotile”の精子が多く割合を占めており、このような症例に対しては necrospermia という言葉は適当でない。また、necrospermia といわれた大部分の症例は、よく検討すれば、immotile cilia syndrome

表 2 Results of semen analysis in each group (mean \pm SD)

	n	sp. density(ml)	viability(%)	abnormality(%)	SMEI
I-1. (short-tailed)	5	25.2 \pm 18.2	62.1 \pm 17.3	78.1 \pm 13.7	1.2 \pm 2.2
2. (large heads)	3	10.1 \pm 7.4	53.3 \pm 16.7	85.6 \pm 15.1	0.0
3. (mid-piece)	3	59.1 \pm 56.8	83.0 \pm 8.3	(*)	2.9 \pm 3.3
4. (immo. cilia)	1	32.0 \pm 8.5	65.0 \pm 9.0	9.0 \pm 9.5	0.0
II-1. (pyospermia)	6	42.1 \pm 38.0	75.1 \pm 14.0	8.9 \pm 10.2	9.1 \pm 8.2
2. (others)	22	45.0 \pm 39.3	70.7 \pm 22.6	7.1 \pm 2.6	7.3 \pm 7.5

(*) mid-piece defects: 3.3 \pm 0.9, mid-piece elongation: 91.3 \pm 4.2

であろうとの考え¹⁷⁾も、今回の結果などをみれば妥当ではない。直進運動性が全くみられない精子症に対する名称として *immotilezoospermia* (精子不動症) との用語も考えられるが、今後の検討課題であろう。

以上のように、精子無力症は運動性を測る方法の不統一や原因不明のために、その定義、用語に若干の混乱はあるが、一応の頻度としては1.6% (44/2,808)¹⁴⁾、2.6% (187/7,073)¹⁸⁾ などの報告があり、今回の集計では2.0% (40/2,010) であった。

②原因について：精子の運動性を減少させる要因としては、副性器感染症¹⁹⁾、抗精子抗体²⁰⁾、精子尾部原形質膜中の酵素欠損²¹⁾、精漿の機能の問題²²⁾および精子の構造異常などが挙げられる。

動物の精子微細構造異常の報告は枚挙にいとまがないが²³⁾、ヒト精子の微細構造異常と不妊症の関係は1963年 Kagan²⁴⁾ 頃より報告され、*immotile cilia syndrome* の報告¹⁻³⁾により注目されるに到った。その詳細は各論に譲るが、こうした報告は本邦においてはきわめて少なく、今後の検討が待たれる。

今回の検討でも明らかのように、精子運動性が常に極端に低下している症例の大部分は精子の微細構造が原因である場合が多く、確定診断には精子の電顕的観察が必要である。一方、精漿の機能低下も精子の運動性を減少させるであろうとの考えから、われわれは分割射精法を用いて各分画の正常人洗浄精子に対する作用を測定する事により不妊症患者の精漿機能を検討している²⁵⁾。臨床的には上記のごとくして精子構造、精漿機能の両面からの検討を行えば、精子運動性低下の原因はより明確となるであろう。

実際には以上の方法でも原因が明らかとならない例もあるが、男性不妊症の臨床において比較的多くみられるにもかかわらず、精子運動性低下との関連で見逃されてきたのは副性器感染症、*pyospermia* (膿精液症) である。

膿精液症があり、精子の運動性が低下している例の原因は、1つには精漿中の多核白血球が精子を貪食し、ある種の *cytotoxic factor* を放出する事により残余の精子の運動性を低下させ¹⁹⁾、1つには逆行性の感染により *blood-testis barrier* を破壊し、そのために抗精子抗体を生じさせ、一方では *early spermatid* に影響を及ぼして精子の微細構造に乱れを生じさせるためと想定されている⁹⁾。今回の結果でも、精液中に精子を貪食していると思われる細胞や Sertoli 細胞、やや変性した *early spermatid* の出現をみたことから、上記の仮説は今後さらに検討されるべきであろう。

③治療の展望について：短尾精子症を初めとする遺伝

性が疑われる症例の治療に関しては有効な方法が全く無いのが現状である。これらの内、巨頭多尾精子症は *spermiogenesis* のみならず *meiosis* の段階での異常も推察されており⁶⁾、頭部の異常も頻繁にみられる事から、むしろ治療は断念した方が良いのかもしれない。一方、他の構造異常は *spermiogenesis* のある stage の異常が原因と考えられており、精子頭部は比較的異常が少ない事が知られている。動物レベルではこうした症例の治療に使えるような試みも行なわれているが²⁵⁾、ヒトへの応用は遺伝性や原因の探求の後の話となろう。

副性器感染症が原因と思われる場合は、まず第1に感染症の治療が先決問題である。副性器感染症の多くを占める前立腺炎は難治性である事が多く、経口抗生剤の投与のみでは膿精液症を改善させる事はしばしば困難である。われわれは日常生活の指導、持続的な前立腺マッサージ、場合によっては精管よりの抗生剤の直接注入などを行なっている。精子無力症症例で膿精液症がある場合には、精子の運動性にとって感染が元凶であるとの認識をまず持つ事が大切であろう。

結 語

①過去10年間に当科不妊外来を訪れた患者2,010名の内、われわれの定義に合致した精子無力症患者は40名(約2.0%)であった。

②透過型電顕による20名の精子の観察では、短尾精子症3例、巨頭多尾精子症3例、精子尾部中間部の形態異常3例、*immotile cilia syndrome* 1例、*pyospermia* 症例で精子尾部微細構造異常がみられたもの3例、現在の所分類不能で精子尾部微細構造異常がみられたもの5例の微細構造が観察され、2例は微細構造上は正常範囲に入るものと思われた。

③精子無力症の定義、用語、頻度、原因、治療に関して若干の考察を加えた。

(本論文の要旨は第31回日本不妊学会総会で発表した。稿を終るにあたり技術的援助を頂いた当院中央電顕室の宗村恵美子氏、庄子幸江氏および当科検査室の高橋勝治氏、木皿そよこ氏に深く感謝致します。)

文 献

- 1) Afzelius, B. A., Eliasson, R., Jonsen, ϕ . and Lindholmer, C.: Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J. Cell Biol.*, 66: 225, 1975.
- 2) Pederson, H. and Rebbe, H.: Absence of arms in the axoneme of immobile human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 12: 541, 1975.
- 3) Eliasson, R. Mossberg, B. Camner, P. and

- Afzelius, B. A.: The immotile cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as a etiologic factor in chronic airway infection and male infertility. *New Engl. J. Med.*, 297 : 1, 1977.
- 4) 光川史郎: 精子運動の新測定法, 精子運動能の臨床的検討, 日泌尿会誌, 70 : 1221, 1979.
- 5) Bacceti, B., Burrini, A., Pallini, V., Renieri, T., Rosti, F. and Menchini Fabris, G. F.: The short-tailed human spermatozoa. Ultrastructural alterations and dynein absence. *J. Submicr. Cytol.*, 7 : 349, 1975.
- 6) Escalier, D.: Human spermatozoa with large heads and multiple flagella. A quantitative ultrastructural study of 6 cases. *Biol. cell.* 48 : 65, 1983.
- 7) Afzelius, B. A. and Eliasson, R.: Flagella mutants in man. On the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J. Ultrastruct. Res.*, 69 : 43, 1979.
- 8) Williamson, R. A., Koehler, J. K., Smith, W. D. and Stenchever, M. A.: Ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. *Fertil. Steril.*, 41 : 103, 1984.
- 9) Escalier, D. and David, G.: Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum. axonemal and peri-axonemal anomalies *Biol. cell*, 50 : 37, 1984.
- 10) Makler, A.: A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil. Steril.*, 30 : 192, 1978.
- 11) 中野眞佐男: 時間露光式測定法による精子運動能研究, 日不妊会誌, 28 : 363, 1983.
- 12) Ishii, N., Mitsukawa, S. and Shirai, M.: Sperm motile efficiency. *andrologia*, 9 : 55, 1977.
- 13) Mattheus, A. und Heise, H.: Zur Bestimmung der Spermatozoenmotilität. *andrologia*, 16 : 439, 1984.
- 14) 石神襄次: 男子不妊症, 泌尿器科内分泌学 (石神襄次ほか編), 1 巻 : p124, 金原出版, 1976.
- 15) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 内村道隆, 村上 優, 松浦俊一, 藤井明和: Zona-free hamster egg sperm penetration test による精子受精能力の判定, 不妊患者1,083例の分析, 日本アネンドロロジー学会, 第5回学術大会, 講演抄録集, p118, 1985.
- 16) Jadot-Van de Casseye, M., Schoysman, R., Smets, G. and Gepts, W.: Ultrastructural aspects of asthno spermia. *Int. J. Andr.*, 3 : 15, 1980.
- 17) Jewett, M. A. S., Greenspan, M. B., Shier, R. M. and Howatson, A. F.: Necrospermia or immotile cilia syndrome as a cause of male infertility. *J. Urol.*, 124 : 292, 1980.
- 18) 守殿貞夫, 岡 伸俊, 浜口毅樹, 岡田 弘, 羽間 稔, 松本 修, 石神襄次: 男性不妊の臨床統計的観察, 特に妊娠成立例の検討, ホルモンと臨床, 34 (春期増刊号) : 171, 1986.
- 19) Berger, R. E., Karp, L. E., Williamson, R. A., Koehler, J., Moore, D. E. and Holmes, K. K.: The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 37 : 557, 1982.
- 20) 伊熊健一郎, 窪田敏雄, 高田喜嗣, 香山浩二, 磯島晋三, 鎌田敏雄: 抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響 (3), 日不妊会誌, 26 : 125, 1981.
- 21) Gagnon, C., Sherins, R. J., Phillips, D. M. and Bardin, C. W.: Deficiency of protein-carboxyl methylase in immotile spermatozoa of infertile men. *New. Engl. J. Med.*, 306 : 821, 1982.
- 22) 石川博夫, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 佐藤和宏, 木村正一, 折笠精一: 正常者洗浄精子の運動能に対する不妊患者精漿の影響について, 日不妊会誌, 31 : 677, 1986.
- 23) 小島義夫: 精子と精子形成の異常, 造精障害の病態と治療 (町田豊平編), 1 巻 : p. 7, 医学教育出版社, 1985.
- 24) Kagan, C. A.: Results of the study of the ultrafine structure of human spermatozoa in oligozoospermia and necrospermia. *Urologiya*, 28 : 34, 1963.
- 25) 亀山賢次, 浜野光市, 菅原七郎, 正木淳二: 体外成熟培養牛卵胞卵子への精子注入に関する研究 I, 凍結精子注入後の動態, 第77回日本畜産学会, 講演要旨, p.73, 1984.

Fine structure of asthenozoospermia in infertile men

1. Clinical and electron microscopic studies on asthenozoospermia

Kazuhiro Satoh, Hiroo Ishikawa, Ikuo Maehara, Sigeaki Satoh, Masaichi Kimura and Seiichi Orikasa

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan.

The definition or etiology of asthenozoospermia is not always clear. The aim of this paper is to clarify these problems using transmission electron microscopy (TEM).

A retrospective study was made on asthenozoospermia in 2,010 infertile men for about ten years since 1977. Forty cases were collected following our criteria of asthenozoospermia (sperm motile efficiency index : SMEI \leq 30, sperm density $>$ 3 \times

10^6 /ml through at least three semen samples) and thus the incidence was about 2.0%.

Recent twenty cases have been studied by TEM and eighteen cases were proved to be abnormal ultrastructurally (short-tailed spermatozoa: 3 cases, spermatozoa with large heads and multiple flagella: 3 cases, abnormalities of spermatozoal middle pieces: 3 cases, immotile cilia syndrome: one case, axonemal and peri-axone-

mal abnormalities in pyospermia: 3 cases, axonemal and peri-axonemal abnormalities in other cases: 5 cases).

The details of these cases will be reported with the fine structure of the testes. We discussed about the definition, terminology, etiology and probable therapy of asthenozoospermia.

(受付: 昭和61年11月27日)

男性不妊症と精液中セレンについて

Semen Selenium in Male Infertility

大阪医科大学泌尿器科学教室

高崎 登 砺波 博一 清水 篤
Noboru TAKASAKI Hirokazu TONAMI Atsushi SHIMIZU
上野 信之 荻田 卓 宮崎 重
Nobuyuki UENO Takashi OGITA Shigeru MIYAZAKI

Department of Urology, Osaka Medical School

福井医科大学環境保健学教室

出口 洋二 緒方 昭
Yoji DEGUCHI Akira OGATA

Department of Environmental Health, Fukui Medical School

妊孕性が証明された健康正常人32名および男性不妊患者73名（乏精子症および／または精子無力症62名，無精子症11名）について，精液中のセレン（Se）濃度（精液 Se 濃度，精漿 Se 濃度，精子 Se 濃度）を測定し，精液 Se と男性不妊との関係について検討した。

精液 Se 濃度は正常者群では 80.1 ± 21.6 ng/ml，不妊患者群では 77.1 ± 25.2 ng/ml（乏精子症および／または精子無力症 76.9 ± 26.2 ng/ml，無精子症 78.1 ± 19.2 ng/ml）であり，正常者群と不妊患者群との間に有意差は見られなかった。

精漿 Se 濃度は正常者群では 70.4 ± 18.6 ng/ml，不妊患者群（無精子症を除く）では 69.5 ± 21.9 ng/ml であり，両者間に有意差は見られなかった。

精子 Se 濃度は，正常者群では 12.0 ± 7.0 ng/ 10^8 sperm であり，不妊患者群（無精子症を除く）では 29.7 ± 23.4 ng/ 10^8 sperm であり，不妊患者群では正常者群に比ベ有意（ $P < 0.005$ ）に高かった。

精液 Se 濃度と精子濃度との間に正の相関（ $r = 0.283$ ， $P < 0.01$ ）が見られ，精漿 Se 濃度と精子 Se 濃度との間にも正の相関（ $r = 0.258$ ， $P < 0.05$ ）が見られた。また精子 Se 濃度と精子濃度との間に負の相関（ $r = -0.407$ ， $P < 0.01$ ），精子 Se 濃度と精子運動率との間に負の相関（ $r = -0.441$ ， $P < 0.01$ ），精子 Se 濃度と運動精子数との間に負の相関（ $r = -0.405$ ， $P < 0.01$ ）が見られた。精子速度がおそいものでは精子 Se 濃度が高い傾向が見られた。

以上の結果より精子 Se 濃度の上昇が男性不妊症の原因になんらかの関係を有することが示唆された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 345-351, 1987)

緒 言

セレン（Se）は原子番号34，原子量78.96の類金属物質であり，近年，動物にとつては微量栄養素として必須なものであることが明らかになってきており，また動物体内における Se の不足や過剰蓄積は生体に種々の障害を起こすことが知られている。Se 欠乏症では骨格筋の変性，血管障害や肝障害などを起こし，強いては発育障

害や繁殖障害などを起こすことが知られている。また，Se の過剰摂取は卵巣や辜丸の萎縮など生殖器の異常を起こすといわれている。最近ではカドミウムや水銀などの微量元素の毒性に拮抗する作用があることもわかってきており，各種微量元素の動物体内でのバランスに Se が深く関与している可能性が大きいと言われるようになった。動物体内における Se の分布は肝，腎および辜丸に比較的高濃度に蓄積され，また精液や精子中にも含

表 1 精液, 精漿および精子中の Se 濃度

Group of Cases	Subjects	Whole Semen ng/ml	Seminal Plasma ng/ml	Sperm ng/10 ⁶ sperm
Fertile	(n=32)	80.1±21.6	70.4±18.6	12.0± 7.0
Infertile	(n=73)	77.1±25.2		
Oligozoospermia &/or Asthenospermia (n=62)		76.9±26.2	69.5±21.9	29.7±23.4
Azoospermia (n=11)		78.1±19.2		
All Cases (Fertile+Infertile)	(n=105)	78.1±24.2	69.6±21.0	19.8±17.5

まれていることがわかり, 生殖に何らかの役割を演じているものと考えられている。

過去における生殖作用に及ぼす Se の役割についての研究は, ほとんどが家畜か実験動物を対象にしたものであつて, ヒト生殖における Se の影響については研究報告が少なく, Bleau^らの報告をみるにすぎない。われわれはこれまでにヒト精液中の Se (精液 Se 濃度, 精漿 Se 濃度, 精子 Se 濃度) の測定を試みてきた^{3,4)}。今回ヒトにおいて Se と男性不妊との関係を明らかにする目的で, 妊孕性が証明された健康な正常男性および男性不妊患者の精液中の Se を測定し, 若干の知見を得たので報告する。

対象ならびに方法

対象は, 妊孕性が証明された心身健康で, 一般精液所見が正常な24~39歳 (平均31歳) までの32名の男性 (以下正常者) および男性不妊外来を受診した患者から無作為に選出した23~44歳 (平均32歳) までの73名の不妊患者 (乏精子症および/または精子無力症62名, 無精子症11名) である。

精液は用手法で採取し, 精液量, 精子濃度, 精子運動率および精子速度を測定した後, 一部は精液 (whole semen) のまま, 一部は精漿と精子とに分離して, それぞれの Se 濃度を測定した。

精漿と精子の分離は遠心分離法によつておこない, 分離された精子は生理食塩水にて3回洗浄した後, 精子中の Se 濃度を測定し, 精子10⁶個当たりの Se 含有量を算出した。Se 濃度は2-3 ジアミノナフタリンによる蛍光法⁵⁾で測定した。また, 精子運動速度は Thoma の赤血球計算盤上で, 予め定めた50×50μm の目盛上を通過する25個の精子について, 50μm を遊走する時間を測定し, その平均値を求めて1秒間の速度を算出した。

結 果

精液 (whole semen) Se 濃度 (表1, 図1) は症例

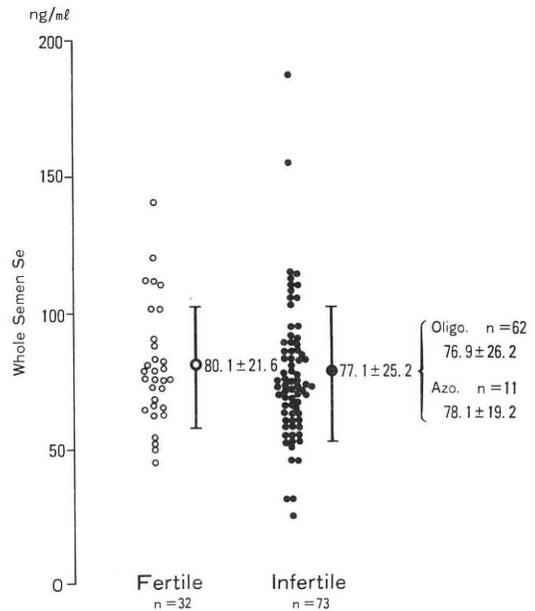


図 1 正常者群および不妊患者群における精液 Se 濃度

全体 (正常者±不妊患者105例) では78.1±24.2ng/ml (27~188ng/ml) であつた。正常者群では80.1±24.2ng/ml, 不妊患者群では77.1±25.2ng/ml であり, 両群間に有意差はみられなかつた。不妊患者群のうち乏精子症および/または精子無力症群 (76.9±26.2ng/ml) と無精子症群 (78.1±19.2ng/ml) との間にも有意差はみられなかつた。

また上記対象例以外に, 精管切断術を受けた症例の精液 Se 濃度を測定したが, その値は68.7±18.9ng/ml (n=5) であつた。

精漿 Se 濃度は (表1, 図2) 症例全体では69.6±21.0ng/ml (24~144ng/ml) であつた。正常者群では70.4±18.6ng/ml, 不妊患者群では69.5±21.9ng/ml であり, 両群間に有意差はみられなかつた。精液 Se 濃度に対する精漿 Se 濃度の比率は, 正常者群では86.3±

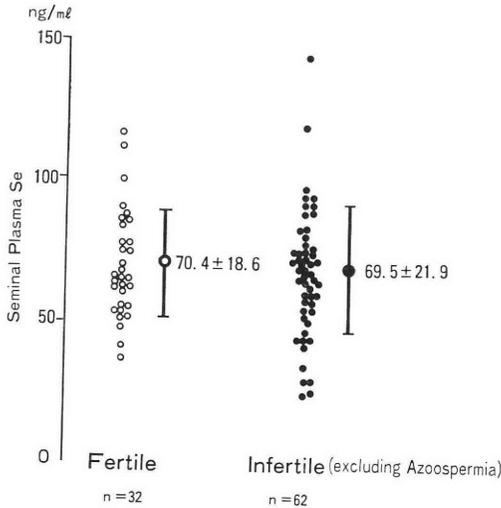


図 2 正常者群および不妊患者群における精漿 Se 濃度

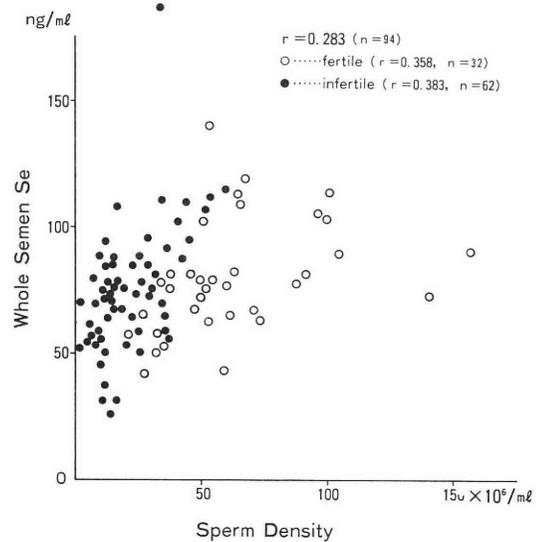


図 4 精液 Se 濃度と精子濃度との関係

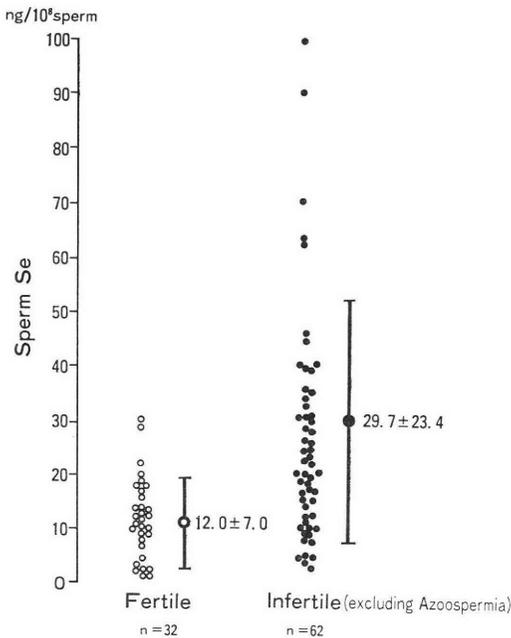


図 3 正常者群および不妊患者群における精子 Se 濃度

10.9% (66~100%) であり、不妊患者群では 88.4 ± 10.3% (62~100%) であり、両群間に有意差は見られなかった。症例全体については 87.0 ± 10.0% であった。

精子 Se 濃度は (表 1, 図 3) 症例全体では 19.8 ± 17.5 ng/10⁸sperm であった。正常者群では 12.7 ± 7.0 ng/10⁸sperm, 不妊患者群 (無精子症を除く) では 29.7 ±

23.4 ng/10⁸sperm であり、不妊患者群では正常群より有意 (P<0.005) に高い値を示した。この両群の差についてみると、精子 Se 濃度が 30 ng/10⁸sperm 以上の症例は正常者群では 0 であるのに対し、不妊患者群では 29% (18/62) であり、また精子 Se 濃度が 20 ng/10⁸以上の症例は、正常者群では 0.9% (3/32) であるのに対し、不妊患者群では 50% (31/62) であった。この結果からみて、精子 Se 濃度の正常上限は 20~30 ng/10⁸sperm と見られる。

精子 Se 濃度と、精液 Se 濃度または精漿 Se 濃度との間には、正常者群においても不妊患者群においても有意の相関関係は見られなかった。

次に、正常者群と不妊患者群 (無精子症を除く) とを合わせた総合例について、精液、精漿および精子中の Se 濃度のそれぞれの相関関係、およびそれぞれの Se 濃度と一般精液所見との相関関係を検討した。

精液 Se 濃度と精漿 Se 濃度との関係についてみると、両者間に有意の正の相関 (r=0.913, P<0.005) がみられた、しかし、精液 Se 濃度と精子 Se 濃度、および精漿 Se 濃度と精子 Se 濃度との間には有意の相関は見られなかった。

精液 Se 濃度と精子濃度との関係についてみると (図 4), 両者間にわずかではあるが正の相関 (r=0.283, P<0.01) がみられた。しかし、精液 Se 濃度と精子運動率、運動精子数および精子運動速度との間には有意の相関は見られなかった。

精漿 Se 濃度についても精子 Se 濃度との間にはわずかながら有意の正の相関 (r=0.258, P<0.05) がみ

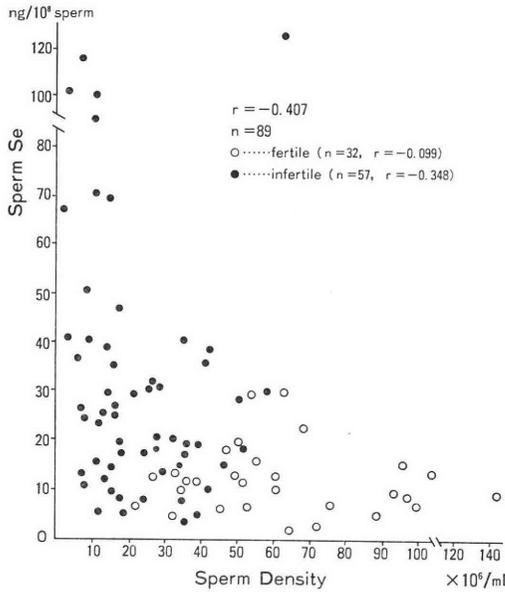


図 5 精子 Se 濃度と精子濃度との関係

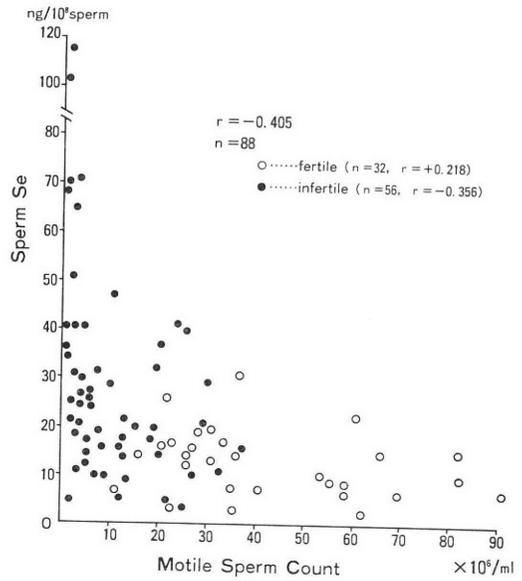


図 7 精子 Se 濃度と運動精子数との関係

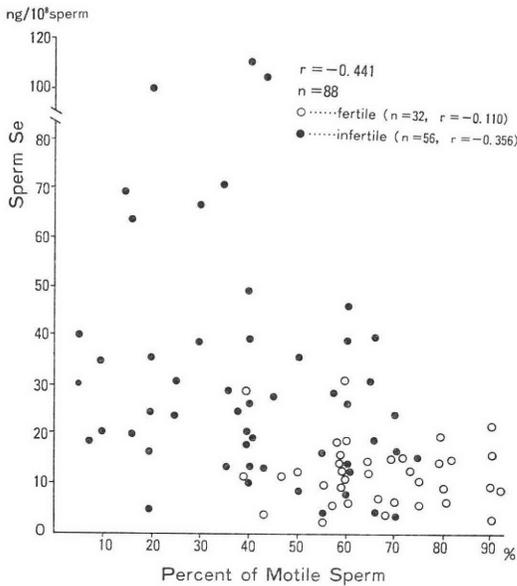


図 6 精子 Se 濃度と精子運動率との関係

($r = -0.405, P < 0.01$) がみられた (図 7)。

次に、精子 Se 濃度と精子運動速度との関係についてみると (図 8)、両者間に有意の相関はみられなかったが ($r = -0.185$), 精子 Se 濃度が $20 \text{ ng}/10^8 \text{ sperm}$ を正常の上限とし、精子速度の正常の下限を $28 \mu\text{m}/\text{sec}$ とすれば、精子 Se 濃度が高い症例の比率は、精子運動速度が正常のものでは 24% ($14/58$), 精子運動速度が遅いものでは 63% ($20/32$) であった。すなわち、精子運動速度が低下しているものでは精子の Se 濃度が高い傾向がみられた。

考 案

Se の栄養素としての欠乏あるいは過剰な状態が雌雄の生殖器に悪影響をおよぼしやすく、Se は生殖作用に何らかの役割を演じていると考えられてきた。雄側の生殖に対する Se の役割についてみると、ラットやマウスなどでは正常な造精機能がおこなわれるためには Se が必須であることが知られており、なかでも精子の構造および運動性を正常に保つために必要であることがわかってきた。

その研究の主なものをあげると、Se 欠乏食によつて飼育されたラットでは精子の運動低下が起こるが、その原因は精子の尾部の破壊が起こるためであると考えられている⁷⁻⁹⁾。また Se 欠乏ラットに Se を投与すると、Se は精子の尾部の中節に集積されることから、Se は精子の中節の形成に必要なものであると考えられている^{10,11)}。また、Se は精子のミトコンドリアを構成する

られたが、精子運動率、運動精子数および精子運動速度との間には有意の相関は見られなかった。

精子 Se 濃度と精子濃度との関係についてみると (図 5)、両者間に負の相関 ($r = -0.407, P < 0.01$) がみられた。

精子 Se 濃度と精子運動率との間にも両者間に負の相関 ($r = -0.441, P < 0.01$) がみられ (図 6)、精子 Se 濃度と運動精子数との関係についても両者間に負の相関

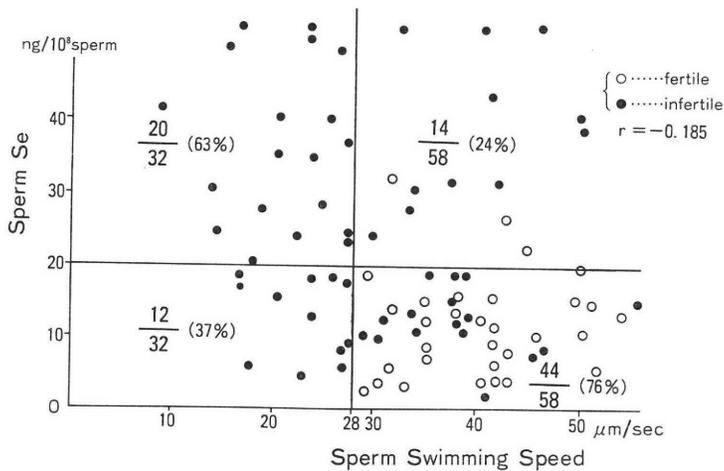


図 8 精子 Se 濃度と精子速度との関係

蛋白質の構成要素であることも判明してきている¹¹⁾。すなわち、ラットやマウスなどのケツ歯動物においては、Se 欠乏は精子の中節のミトコンドリアの形態異常をおこし、これが運動性の低下の原因となり、妊孕性の低下が起こるとされている。したがって、Se は精子形成に際して精子のミトコンドリアを正常に形成し、精子の成熟に必要な物質であると考えられている^{10,12)}。

一方、Se の生物学的機能の1つとして、Se は体内に入った微量な重金属に拮抗して生体を保護する役目をしているのではないかと考えられており、なかでもカドミウム (Cd) と水銀 (Hg) に対して拮抗作用があると報告されている¹³⁾。Cd または Hg の生殖機能におよぼす毒性の1つとして、Cd または Hg は精子の運動性に障害を惹起することが知られており、Se が Cd や Hg の精子毒性に対して拮抗的に作用するとの報告もみられる¹⁶⁾。

羊の精子を使った *in vitro* の実験において、Cd または Hg を精子とまぜて培養すると、精子の酸素消費量の低下と運動性の低下が起こるが、これらに Se を混在させると、酸素消費量の低下と運動性の低下は起こらないことから、Se は Cd や Hg の精子に対する毒性を防止出来ると言う報告がある¹⁵⁾。そして、その作用機序として、Se は精子内酸素系の活性化を強め、特に精子の運動性と酸素の uptake を増加させるのに必要な ATP の活性化に関与しているという報告もある¹⁵⁾。

過剰の Se が生殖に対して悪影響をおよぼすことは間違いないが、これが Se の特異的な毒作用によるものか、あるいは Se 過剰によって付随的に起こる全身衰弱の二次的反應であるかは明らかでない¹⁴⁾。

一方、Se のヒト生殖におよぼす影響についての報告

は非常に少なく、Bleau ら^{14,21)}の報告をみるにすぎない。また、ヒト精液中の Se 濃度についての報告も少なく、Saeed¹⁷⁾、Pleban¹⁸⁾、Bleau²⁾ の報告をみるにすぎない。Saeed¹⁷⁾ は原子吸光法によつて正常男性 (n=13) の精液 Se 濃度を測定し、その値は平均34.7ng/ml であつたと報告している。Pleban¹⁸⁾ らの蛍光法によつて測定した精漿 Se 濃度は67.7±3.4ng/ml (n=10) であり、Bleau ら²⁾ の蛍光法による精液 Se 濃度は71.3±29.7 ng/ml (n=120) である。Saeed らの精液 Se 濃度は Bleau らの値に比べると非常に低いが、これは測定法の違いによるものと思われる。Pleban らの精漿 Se 濃度と Bleau らの精液 Se 濃度の値の差は精子を除去した精漿と精子を含んだ精液 (whole semen) の差であると考えられる。Bleau ら²⁾は精漿 Se 濃度は精液 Se 濃度の85~100%であると述べている。われわれの結果では全症例の精液 Se 濃度と精漿 Se 濃度はそれぞれ78.1±24.2ng/ml, 69.6±21.0ng/ml であり、Pleban らや Bleau らの値と大きな差はなく、ほぼ同じ高い値であつた。精漿 Se 濃度の精液 Se 濃度に対する比率は62~100%、平均87%であり、Bleau らの結果とほぼ一致し、精液 Se の大部分は精漿内に存在すると思われた。また、精管切斷術を受けたヒトの精液 Se 濃度 (68.7±18.9ng/ml, n=5) が精管切斷術を受けていないヒトの精漿 Se 濃度 (69.6±21.0ng/ml) とほぼ同じであることから考えると、精漿 Se は前立腺と精嚢に由来するものと考えられる。ただ精液中に精子が存在しない状態においても、無精子症の精液と精管切斷術を受けたヒトの精液とについて Se 濃度を比較すると、前者が後者より高い傾向が見られたが、これは睾丸由来の Se が混入したためではないかとも考えられる。

Bleau ら²⁾は、彼らの施設(産婦人科)に不妊の相談に訪れた125組の夫婦について約5年間にわたって経過を観察し、夫の精液(whole semen) Se 濃度と不妊との関係について報告している。それによると、精液 Se 濃度が 35ng/ml 以下の症例では高度の乏精子症である比率が高く(90%)、また精子運動性の低下を見るのが高率(90%が精子無力症)で不妊率が高かったこと、また精液 Se 濃度と精子濃度との間に正の相関が見られたこと、および精液 Se 濃度が80ng/ml 以上のものでは流産率が高かったことなどから、精液 Se 濃度を測定することは Se が関与した不妊症であるかどうかの指標として有用であると述べている。われわれの結果では精液 Se 濃度が35ng/ml 以下の症例と35ng/ml 以上との症例とについて比較すると、35ng/ml 以上のものではすべて精子濃度の低下が見られたが、精子運動性については両者の間に差はみられなかった。また、われわれの結果では、正常者群では32例中14例、不妊患者群では無精子症を除く63例中20例において精液 Se 濃度が80ng/ml以上の値を示したが、これらの症例は全例過去に妻に流産の経験はなく、精液 Se 濃度の高いことが流産率を高めるといふ結果は得られなかった。

以上のように、われわれの成績は Bleau らの報告とは若干異なつた結果が得られたが、この違いは対象症例の選択の違い、すなわち、Bleau らの症例のごとく産婦人科を訪れ、夫婦何れに原因があるのか不明の症例を対象とした場合と、われわれのごとく不妊の原因が男性側にあると考えられる症例あるいは妊孕性が正常な症例を対象とした場合とでは異なる可能性があると考えられる。また、観察期間の違いによつても異なる可能性があり、その他、人種、食生活、環境などの違いによつても精液中の Se 濃度や Se に対する生体の反応に違いが生じるのかもしれない。

今回のわれわれの成績では、精液 Se 濃度および精漿 Se 濃度については不妊患者群と正常患者群との間に有意差はみられなかったが、精子 Se 濃度は不妊患者群では正常者群に比べ有意に高い値を示したこと、精子 Se 濃度と精子濃度との間に負の相関がみられたこと、また精子 Se 濃度と精子運動性(精子運動率、運動精子数および精子運動速度)との間に負の相関あるいはその傾向がみられたことなどから、Se はなんらかの形で造精機能に関与し、精子形成中に運動性の悪い精子内に必要以上に取り込まれている可能性も考えられる。精子内 Se と精子運動性との関係をさらに詳細にするためには、今後、運動性の悪い精子内に Se が多く移行するのか、あるいは Se が必要以上に多く移行したために精子の運動性が低下したものか明らかにすることが必要であると考

えている。

結 語

1. 精液 Se 濃度および精漿 Se 濃度については正常者群と不妊患者群との間に有意差が認められなかった。
2. 精子 Se 濃度については不妊患者群の方が正常者群よりも有意に高い値を示した。
3. 精子 Se 濃度の高い症例においては精子運動性の低下および精子濃度の低下傾向が見られ、精子内 Se 濃度の上昇が男性不妊症の原因に何らかの関係を有することが示唆された。

(本論文の要旨は第4回日本アンドロ・ロジ学会、第30回日本不妊学会総会および第12回世界不妊学会において発表した)

文 献

- 1) Bleau, G., Bousquet, D., Clement, M. and Chaphelaine, A.: Selenium in human semen. *Fertility and Sterility*, 32: 246-247, 1979.
- 2) Bleau, G., Lemarbre, J., Faucher, G., Roberts, K. and Chaphelaine, A.: Semen selenium and human fertility. *Fertility and Sterility*, 42: 890-894, 1984.
- 3) 高崎 登, 砺波博一, 清水 篤, 上野信之, 荻田 卓, 出口洋二, 緒方 昭: ヒト精液中セレン, *医学と生物学*, 112: 65-67, 1986.
- 4) 高崎 登, 砺波博一, 清水 篤, 上野信之, 荻田 卓, 出口洋二, 緒方 昭: 男性不妊患者における精液中セレン, *医学と生物学*, 112: 243-246, 1986.
- 5) Michie, N. G., Dixon, E. J. and Bunton, N. G.: Critical review of AOAC fluorometric method for determining selenium in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61: 48-51, 1978.
- 6) Wu, A. S. H., Oldfield, J. E., Shull, L. R. and Cheeke, P. R.: Specific effect of selenium deficiency. *Biology of reproduction*, 20: 793-798, 1979.
- 7) Wu, S. H., Oldfield, J. E. and Whanger, P. D.: Effect of selenium, chromium and vitamin E on spermatogenesis. *J. An. Sci.*, 33: 273 (Abstr.), 1971.
- 8) Wu, S. H., Oldfield, J. E., Whanger, P. D. and Weswing, P. H.: Effect of selenium, vitamin E and antioxidants on testicular function in rat. *Biology of Reproduction*, 8: 625-629, 1973.
- 9) Brown, D. G. and Burk, R. F.: Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a

- Torula yeast diet. *J. Nutr.*, 103: 102-108, 1973.
- 10) Wallace, E., Cooper, G. W. and Cakvin, H. I.: Effects of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gamete Research*, 4: 389-399, 1983.
 - 11) Calvin, H. I., Cooper, G. W. and Wallace, E.: Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine rich structural protein of the mitochondrial capsules. *Gamete Research*, 4: 139-149, 1981.
 - 12) Wallace, E., Calvin, H. I. and Cooper, G. W.: Progressive defects observed in mouse sperm during the course of three generations of selenium deficiency. *Gamete Research*, 4: 377-387, 1983.
 - 13) Committee on medical and biologic effect of environmental pollutants, National research council: SELENIUM, National academy of science, Washington, D. C., USA, p56, 1976.
 - 14) Committee on medical and biologic effect of environmental pollutants, National research council: SELENIUM, National academy of science, Washington, D. C., USA, p102, 1976.
 - 15) Alabi, N. S., Whsnger, P. D. and Wu, A. S. H.: Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility *in vitro* *Biology of Reproduction*, 33: 911-919, 1985.
 - 16) White, I. G.: The toxicity of heavy metals to mammalian spermatozoa. *Aust. J. Exp. Biol.*, 33: 359-366, 1955.
 - 17) Saeed, K. and Thomassen, Y.: Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in blood serum and seminal fluid after protein precipitation with trichloroacetic acid. *Analytica Ahemica Acta*, 143: 228, 1982.
 - 18) Pleban, P. A. and Mei, D. S.: Trace elements in human seminal plasma and spermatozoa. *Clinica Chimica Acta*, 133: 43-50, 1983.

Semen selenium in male infertility

Noboru Takasaki, Hirokazu Tonami, Atsushi Shimizu, Nobuyuki Ueno, Takashi Ogata and Shigeru Miyazaki

(Department of Urology, Osaka Medical School)

Yoji Deguchi and Akira Ogata

(Department of Environment Health, Fukui Medical School)

The selenium (Se) concentration in whole semen, seminal plasma and sperm was measured in 32 healthy fertile males and 73 infertile males (62 with oligozoospermia and/or asthenospermia, 11 with azoospermia) with the purpose of elucidating the relation of semen Se to male infertility.

The Se concentration of whole semen was 80.1 ± 21.6 ng/ml in the fertile group and 77.1 ± 25.2 ng/ml in the infertile group. No significant difference was seen between the two groups in whole semen Se concentration. The Se concentration of seminal plasma was 70.4 ± 18.6 ng/ml in the fertile group and 69.5 ± 21.9 ng/ml in the infertile group (excluding azoospermic men). No significant difference was seen between the two groups in seminal plasma Se concentration. The sperm Se concentration was 12.7 ± 7.0 ng/ 10^8 sperm in the fertile group, whereas it was 29.7 ± 23.4 ng/ 10^8 sperm in the infertile group. From the statistical point of view, the sperm Se concentration in the infertile group was significantly higher than that in the fertile group ($P < 0.005$).

There was a statistically significant correlation between whole semen Se concentration and sperm density ($r = 0.283$, $P < 0.01$), or between seminal plasma Se concentration and sperm density ($r = 0.258$, $P < 0.05$). A negative correlation was observed between sperm Se concentration and sperm density ($r = -0.407$, $P < 0.01$), percent of motile sperm ($r = -0.441$, $P < 0.01$) or motile sperm count ($r = 0.405$, $P < 0.01$).

There was no significant correlation between sperm Se concentration and sperm swimming speed, however, sperm Se concentration tend to be higher in cases with slow sperm swimming speed than in those with normal speed.

Our results suggested that increased Se concentration in sperm may be associated with male infertility, especially the deterioration of sperm motility and spermatogenesis.

(受付: 昭和61年12月3日)

閉塞性無精子症に対する精巣上体精管吻合および 精管精管吻合術の経験

Clinical Experience of Epididymovasostomy and Vasovasostomy
for Obstructive Azoospermia

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

松田 公志 西村 一男 野々村 光生
Tadashi MASTUDA Kazuo NISHIMURA Mitsuo NONOMURA
岡田 謙一郎 吉田 修
Kenichirou OKADA Osamu YOSHIDA

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. O. Yoshida)

大阪赤十字病院泌尿器科 (部長: 高橋陽一)

真田 俊吾 高橋 陽一
Shungo SANADA Youichi TAKAHASHI
Department of Urology, Osaka Red Cross Hospital
(Chief: Dr. Y. Takahashi)

閉塞性無精子症14例に対し、顕微鏡下に精路再建術を施行した。Vasectomy 後6例、鼠径ヘルニア根治術による両側精管閉塞5例、計11例に Two-layer technique による精管精管吻合を施行、精巣上体炎後の3例に Silber's specific tubule 法による精巣上体精管吻合を施行した。14例中6例で精子濃度 $20 \times 10^6/ml$ 、運動率50%以上と妊孕性を回復、ヘルニア術後の1例で妊娠挙児に成功した。11例に対し精巣生検を施行したが、Johnsen's mean score は 8.20 ± 0.38 (Mean \pm S. D.) と軽度低下を示し、特に閉塞期間が20年以上の症例では、20年以内の症例に比べ有意に低値であった。鼠径ヘルニア術後の症例では、閉塞期間が20年以上の症例が多く、鼠径管内で精管の欠損を伴うことがあり、また精管切断部に Sperm granuloma を認めず、術後成績は不良であった。精巣上体精管吻合では67%で妊孕性を回復し、Specific tubule 法は有効な術式と考えられた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 352-358, 1987)

緒 言

閉塞性無精子症は、男子不妊症の約7%を占めるに過ぎない¹⁾。しかし、男子不妊症の大半を占める精巣の造精機能障害に対する確実な治療法のない現在、手術的に治療可能な精路閉塞症は、男子不妊症の中で重要な一分野といえよう。

閉塞性男子不妊症に対する治療成績は、Microsurgeryの導入により飛躍的に向上した。特に Vasectomy 後の精管吻合術は、近年高い成功率が報告されている²⁾。しかし、小児期の鼠径ヘルニア根治術における精管切断や、精巣上体炎に起因する閉塞性無精子症においては、

長期間の閉塞の精巣および精巣上体に及ぼす影響、精管欠損が長距離にわたる場合の手術方法、精巣上体精管吻合の術式など、いまだ解決されていない問題も多く、その手術成績は必ずしも良好とはいえない。

われわれは、Vasectomy 後、鼠径ヘルニア術後および精巣上体炎後の閉塞性無精子症に対し、Two-layer microscopic technique による精管精管吻合術³⁾、および Specific tubule 法による精巣上体精管吻合術^{4,5)}を施行したので、その手術術式および治療成績について報告するとともに、手術後の精液所見に影響を及ぼす諸因子について検討を加える。

表 1 Three groups of cases of obstructive azoospermia treated by microscopic vasovasostomy or vasoepididymostomy: cause of obstruction, duration of obstruction, and results of hormonal analyses

Cause of obstruction	Number of case	Duration of obstruction (years)	Hormonal analyses		
			LH (IU/L)	FSH (IU/L)	Testosterone (ng/ml)
Vasectomy	6	2-14 mean = 8.3	17.1±6.9	11.2±7.2	6.0±1.1
Bil. inguinal herniorrhaphy	5	3-33 mean = 21.8	16.2±5.9	8.9±1.0	5.8±1.4
Bil. epididymitis	3	1-14 mean = 6.7	15.8±3.0	8.8±1.1	5.3±1.4

対象症例・手術方法

昭和53年9月より昭和61年6月までの7年9カ月の間に、京都大学泌尿器科学教室および大阪赤十字病院泌尿器科にて、計14例の閉塞性無精子症に対し精路再建術を施行した。症例の内訳は、両側精管切断術後6例、両側鼠径ヘルニア術後5例、計11例に精管精管吻合を施行し、両側精巣上体炎後3例に精巣上体精管吻合を施行した(表1)。精路再建術時の年齢は26歳から39歳、平均30.3歳、精路の閉塞期間は1年から33年におよび、平均12.8年、鼠径ヘルニア術後の症例では他の2群に比べ長い傾向を認めた。

各症例とも、術前に精巣生検、血清ホルモン値の測定を施行した。血清 FSH, LH, Testosterone は、それぞれ 16.4 ± 5.4 IU/L, 9.7 ± 4.4 IU/L, 5.7 ± 1.2 ng/ml (Mean \pm S.D.) であり、3群間に有意の差を認めなかった。

精管精囊造影は、Vasectomy 後の症例では施行せず、鼠径ヘルニア術後の症例では術前および術中に施行し、精巣上体炎後の症例では術中に施行するのを原則とした。

手術術式

精管精管吻合：精管の中樞側断端より精子の流出を確認した後、末梢側断端と近接させ、Two-layer microscopic technique³⁾ を行つた。すなわち、手術用顕微鏡下に、内膜を9-0から11-0の Monofilament nylon 糸にて4-7針縫合した後、筋層漿膜を7-0から9-0の Monofilament nylon 糸にて6-10針縫合した。Stent は使用していない。

精巣上体精管吻合：精巣上体を精巣上体炎による硬結より中樞側に切断、断面より精子の出現を確認した後、Silber's specific tubule 法^{4,5)} を行つた。すなわち、手術用顕微鏡下に精巣上体断面を観察、Semen の流出する唯一の Tubule を同定し、精管断端と端々吻合した。精巣上体管と精管内膜は10-0 Nylon 糸にて2-4

針縫合し、精巣上体漿膜と精管筋層は、9-0 Nylon 糸にて8-10針縫合した。

結 果

(1) Vasectomy 後の症例

表2に各症例の閉塞期間、精巣生検、術中所見、術後精液所見を示す。術後精子の出現したのは6例中4例、精子が出現するまでに要した期間は2週間から3.5カ月であつた。精子濃度 20×10^6 /ml 以上、運動率50%以上の妊孕性を有すると思われる精液所見に達した症例は3例で、術後7カ月以内に妊孕性を回復した。その内、症例1および5は未婚であり、2は配偶者に異常があり、共に挙児には至っていない。なお、症例3では Vasectomy 後左精巣の著明な萎縮をきたしており、右精管精管吻合のみ施行した。手術時間は3時間45分-5時間40分、平均4時間34分であつた。

(2) 鼠径ヘルニア術後の症例

表3に各症例の閉塞期間、精巣生検、術中所見、術後精液所見を示す。術後精子の出現したのは5例中4例、精子の出現までに1.5カ月から4カ月を要した。妊孕性を有すると思われる精液所見に達した症例は1例で、回復に術後5カ月を要した。術後2年目に妊娠挙児に成功した。なお、症例2では右側精管の欠損が長く、左側の吻合のみ施行し、症例1および3では、膀胱近接部まで剝離した精管を恥骨直上の腹壁を陰嚢内へ導くことにより、ようやく吻合可能となつた。手術時間は4時間50分-8時間10分、平均7時間であつた。

(3) 精巣上体精管吻合の症例

表4に各症例の閉塞期間、精巣生検、術中所見、術後精液所見を示す。症例3は、術中の精管精囊造影にて、右精囊嚢胞、左精管形成不全の合併していることが判明したが、精巣上体での閉塞も認めため、精巣上体精管再吻合を施行した。術後精囊マッサージ後の精液中に精

表 2 Cases after vasectomy treated by vasovasostomy: pathological findings of testicular biopsies, quality of intraoperative vas fluids, presence or absence of sperm granuloma at vasectomy sites, and semen quality after operation

Case	Age	Duration of obstruction (years)	Johnsen's mean score of biopsy	Sperm in vas fluid		Sperm granuloma at vasectomy site		Semen quality after operation	
				(Rt.)	(Lt.)	(Rt.)	(Lt.)	Sperm density ($\times 10^6/ml$)	Motility (%)
1	34	14	8.4			+	+	37	30
2	31	8	8.7	++	++	+	+	68	80
3*	33	7	8.2	-		+		0	-
4	30	8	-	-	+	-	-	0	-
5	26	2	-	++	++	-	+	60	55
6	39	11	8.2	-	+	-	+	2	0

* Left vasovasostomy was not performed because left testis had vanished after vasectomy.

表 3 Cases after inguinal disruption of vasa deferentia at bilateral herniorrhaphy who were treated by vasovasostomy: pathological findings of testicular biopsies, quality of intraoperative vas fluids, presence or absence of sperm granuloma, and semen quality after operation

Case	Age	Duration of obstruction (years)	Johnsen's mean score of biopsy	Sperm in vas fluid		Sperm granuloma at vasectomy site		Semen quality after operation	
				(Rt.)	(Lt.)	(Rt.)	(Lt.)	Sperm density ($\times 10^6/ml$)	Motility (%)
1	24	21	7.6	++	++	-	-	20	75
2*	33	33	-	-	+	-	-	20	0
3	29	20	7.8	+	-	-	-	10	10
4	32	32	7.8	-	-	-	-	0	-
5#	28	25-3	8.3	-	+	-	-	0.03	0

* Right vasovasostomy was not performed because defect of vas deferens was too long.

This patient underwent right herniorrhaphy 25 years ago, and bilateral herniorrhaphy 3 years ago.

表 4 Cases after bilateral epididymitis treated by epididymovasostomy: pathological findings of testicular biopsies, quality of intraoperative epididymal fluids, sites of anastomoses, and semen quality after operation

Case	Age	Duration of obstruction (years)	Johnsen's mean score of biopsy	Epididymal site of anastomosis		Sperm in epididymal fluid		Semen quality after operation	
				(Rt.)	(Lt.)	(Rt.)	(Lt.)	Sperm density ($\times 10^6/ml$)	Motility (%)
1	30	1	8.5	body-tail	head	+	+	22	65
2	30	5	8.8	body-tail	body-head	++	++	24	60
3*	35	14	8.0	body	head	+	+	0	-

* Right seminal vesicle cyst and atresia of left vas deferens were disclosed by intraoperative vasovesiculography.

子を確認したが、妊孕性のある精液の採取には成功していない。症例1は術後7カ月後に妻の妊娠を見たが流産、その後9カ月目にステロイド等の補充療法にもかかわらず再び無精子症となった。症例2は現在 AIH を施行中である。手術時間は5時間5分-8時間30分、平均7時間15分であった。

(4) 精巣組織所見について

14例中11例で精巣生検を施行し、精子形成を確認したが、さらに詳細に造精機能を評価するため、生検により得られた全ての精細管にたいし Johnsen's score⁶⁾ を与え、Mean score を算出した。Johnsen's mean score は7.6-8.8, 8.20 ± 0.38 (Mean \pm S.D.) であった(表5)。閉塞期間が20年以上の症例では 7.73 ± 0.12 , 20年以内の症例では 8.39 ± 0.27 であり、両群間に有意の差を

表 5 Pathological findings of testicular biopsies

Duration of obstruction	No. of cases	Johnsen's mean score (Mean±S.D.)
20 years>	8	8.39±0.27*
20 years≤	3	7.73±0.12*
Total	11	8.20±0.38

* Statistically significant (P<0.01).

認めた (P<0.01).

(5) 精管断端部での精子の有無と術後成績

精管精管吻合において、精管の中枢側断端での精子の有無と術後成績について検討した。術中断端部より多数の精子を確認した3例では術後妊孕性を回復したのに対し、精子を全く認められなかった症例では術後も無精子症であり、また、左右どちらか一側でごく少数の精子を認めた5例では、4例で術後精液中に精子の出現を見たが、正常精液所見に改善した症例はなかった。

(6) 精管切断部での Sperm granuloma の有無と術後成績

精管精管吻合術に際し、精管切断部の Sperm granuloma の有無を肉眼的、組織学的に検索した。精管切断術後の症例では10精管中6精管に Sperm granuloma を認めたが、鼠径ヘルニア術後の症例では一例も Granuloma を認めなかった。Sperm granuloma の有無と、精管断端での精子の有無および術後成績との関連につき検討したが、特に有意な相関は認めなかった。

考 察

閉塞性無精子症は、精巣上体における閉塞、精管における閉塞、射精管における閉塞、および精管形成不全に大別されよう。このうち、射精管閉塞に対しては TUR²⁾、精管形成不全にたいしては Alloplastic spermatocele による治療⁷⁾が行われている。今回われわれは、精管における閉塞、および精巣上体における閉塞に対する手術療法につき検討した。

閉塞性無精子症にたいする精路再建術において、術後成績を左右する因子は次の2点である。第一に、Reanastomosis が完全であること、特に、Sperm granuloma による再閉塞を起こさないような吻合法であること、第二に、長期間の閉塞による精巣、精巣上体への影響の有無である。

精管精管吻合は、Microsurgery の導入される以前は Stent を用いた一層吻合が行われてきたが、吻合部からの精子の Leakage が Sperm granuloma を形成し再閉塞をきたす率が高く、術後成績は必ずしも良好ではなかった⁹⁾。Microsurgery の導入と共に、1976年、Two-

layer microscopic technique⁹⁾ が紹介されて以降、本邦でも良好な成績が報告されており⁹⁾、精管精管吻合の技術的な問題はほぼ解決されたといえよう。一方、One-layer microscopic technique による精管精管吻合でも良好な成績が報告されている^{10,11)}。いずれにしても吻合のポイントは精子の Leakage を起こさないことであり、われわれは、二層に縫合したほうが粘膜と粘膜を確実に合わせるのが容易と考え、Two-layer technique を行ってきた。

鼠径ヘルニア根治術に際して精管が損傷された症例においては、鼠径管の中で精管の欠損が長距離におよぶときがあり、精管の両断端を緊張なく近接させることが極めて困難なことも少なくない。われわれも、片側の再吻合不能な症例、および、精管を膀胱近接部まで剝離し、恥骨結合に近い腹壁を貫通させることにより、辛うじて再吻合可能となった症例を経験した。Shafik¹²⁾は、精管を閉鎖口を通すことにより、10cm 以上の精管の欠損を補うことが可能であるとしており、また、酒徳ら¹³⁾は、精巣上体尾部の蛇行した精巣上体管を剝離し、延ばすことにより、10cm 以上精管の延長が可能と報告している。精管の欠損部の長い症例においては、このような方法を取り入れた上で、緊張の加わらない、十分余裕のある状態での再吻合が、疎通性の回復、更には妊孕性の回復のために必要と思われる。

精巣上体精管吻合は、精巣上体管と精管との内径差が大きいことより、側々吻合が広く行われてきた。これは、精巣上体管と精管との吻合ではなく、精巣上体断端より漏れ出た精子を精管で受けるといった術式であり、術後に Sperm granuloma が吻合部に生じる可能性は極めて高く、手術成績は満足すべきものではなかった¹⁴⁾。相川ら¹⁵⁾は Microsurgery を用いた精巣上体精管側々吻合で良好な成績を報告しているが、やはり、可能であれば、精巣上体管と精管粘膜との直接の吻合が合理的であろう。われわれは、Silber が1978年に発表した Specific tubule 法を用い、精巣上体管と精管との端々吻合を施行した。精巣上体断面で一本の Tubule を同定するのがむずかしく、手術時間は平均7時間15分と長時間を要したが、精巣上体管が閉塞により拡張していることもあり、精巣上体管と精管粘膜との直接吻合は十分可能であった。ただ、精巣上体の閉塞部が頭部に近い場合、症例1、3のように精巣上体頭部での吻合が必要となる。精巣上体管は頭部では体部や尾部に比べかなり細く¹⁶⁾、吻合はさらに難易度の高いものとなる。さらに、精巣上体は精子運動能獲得において重要な役割を有すること¹⁷⁾を考慮し、精巣上体の可及的に末梢部で吻合を行うことが大切である。しかし Silber¹⁸⁾は、精巣上体頭

部で再吻合した症例でも、1年半以上の経過観察の後、精子の運動性が正常化したと報告しており、頭部での吻合をやむなくされる場合でも、積極的に再吻合すべきであろう。

精路再建術の術後成績を左右する第二の因子としては、再吻合時の精巣の造精機能、精巣上体の通過性、さらには抗精子抗体の関与などがあげられる。精路閉塞が精巣の造精機能に及ぼす影響については、多くの動物実験があるが、Alexander¹⁹⁾ や長田²⁰⁾ は、モルモットやラットを用いた実験で、精巣の造精機能の低下、組織所見の悪化を認めている。また、吉田¹⁴⁾ も、精巣上体精管吻合の術前精巣生検において、Johnsen's mean score の低下を報告している。一方、Vasectomy により造精機能が傷害されることは少ないとの報告もある^{2,21)}。われわれは11例に精巣生検を施行したが、Johnsen's mean score は7.6-8.8であった。Spermatozoa が多数認められ、一見正常と見える精巣組織も、1つ1つ精細管を詳細に検討してみると、Spermatid や Spermatozoa を認めない精細管も多く、軽度ながら機能低下と判断された。さらに、閉塞期間が20年を越える症例では、20年以内の症例に比べ、Jonsen's mean score は有意に低値であり、閉塞が長期に及ぶにつれ、造精機能が徐々に低下するものと考えられる。鼠径ヘルニア術後の症例では、Vasectomy 後の症例に比べ術後成績が不良であったが、閉塞期間が20年以上の症例が多く、長期の閉塞による精巣の造精機能の低下が妊孕性の回復を阻害した要因の1つと考えている。

精路の閉塞が精巣の造精機能を傷害するメカニズムとしては、まず精路内圧の上昇が考えられている。精路に閉塞が生じて精巣は精子を作りつづけ、精管および精巣上体管の内圧が上昇し、精巣輸尿管、精巣網の拡張、そしてついに造精機能の低下をきたすと考えられる²²⁾。また、抗精子抗体が造精機能障害の原因としてなんらかの役割を演じている可能性がある。閉塞性無精子症においては、血清中の精子凝集抗体、精子不動化抗体共に、高頻度に陽性を示すとの報告が多く^{23,24)}、更に、精管切断術後の精細管に IgG や Immune complex と思われる Deposit の沈着を認めたとの報告^{24,25)}もある。しかし、抗精子抗体は存在しても術後の妊孕性の回復を阻害しないとの報告²⁶⁾も多く、今後の更に詳細な検討が必要と考えられる。

長期間の閉塞の精巣上体への影響も指摘されている。Bedford²²⁾ は、各種の動物で精管を結紮したところ、精路内圧の上昇から精巣上体管の破裂と Sperm granuloma が発生したと報告している。また Silber²⁷⁾ は、精管精管再吻合に際し精管断端で精子を認めなかった症

例に対し、精巣上体を切断することにより正常精子を認めたことから、精巣上体に第2の閉塞が生じていることを指摘した。われわれも、精巣生検で Spermatozoa を認めるにも関わらず、精管断端に精子を認めなかった症例を経験しており、両側で精子を認めない場合は術後も無精子症であった。精巣上体に2次的な閉塞が発生していた可能性が高いと考えている。このような場合には、Silber²⁾ の主張するように、積極的に精巣上体精管吻合を施行することが必要であろう。

このように、精巣あるいは精巣上体に対する閉塞の影響は、精路内圧の上昇が大きく作用しているものと考えられるが、精管断端部に Sperm granuloma が発生している場合、持続的な Sperm の Leakage により精路内圧が比較的長く保たれ、精巣や精巣上体への影響も少ないと思われる。Silber²⁾ は、Sperm granuloma が発生している場合は、発生していない場合に比べ中枢側精管の拡張の程度が軽いこと、また、精巣上体での第2の閉塞の頻度も少ないことを報告している。われわれの症例でも、両側で Sperm granuloma を認めなかった6例のうち5例では、術後妊孕性が回復していない。特に小児期鼠径ヘルニア術後の症例では、全例 Sperm granuloma を形成しておらず、精子が作られる10年以上前に精管に閉塞が生じた場合、Sperm granuloma は形成され難いものと思われる。

(本論文の要旨は第31回日本不妊学会総会にて発表した。)

文 献

- 1) 石神襄次：男子不妊の治療，臨泌，31：475，1977。
- 2) Silber, S. J.: Microsurgery of the male ductal system. Reproductive infertility microsurgery in the male and female: p78-161, Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1984.
- 3) Silber, S. J.: Microscopic technique for reversal of vasectomy. Surg. Gynecol. Obstet., 143: 630, 1976.
- 4) Silber, S. J.: Microscopic vasoepididymostomy: specific microanastomosis to the epididymal tubule. Fertil. Steril., 30: 565, 1978.
- 5) 西村一男，松田公志，野々村光生，竹内秀雄，岡田謙一郎，吉田 修：顕微鏡下精管副丸吻合術の経験，Silber's specific tubule technique (end-to-end anastomosis 法) の紹介，泌尿紀要，32: 1013, 1986。
- 6) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hor-

- mones, 1 : 2, 1970.
- 7) Marmar, J. L., DeBenedictis, T. J. and Praiss, D. E.: Clinical experience with an artificial spermatocele. *J. Androl.*, 5 : 304, 1984.
 - 8) Derrick, F. C., Varbrough, W. and D'agostino, J.: Vasovasostomy: results of questionnaire of members of the American urological association. *J. Urol.*, 110 : 556, 1973.
 - 9) 平尾佳彦, 吉田克法, 堀井康弘, 守屋 昭, 岡村 清, 松岡 隆, 岡島英五郎, 玉井 進: Microsurgical two-layer vasovasostomy の経験, 泌尿紀要, 29 : 385, 1983.
 - 10) Sharlip, I. D.: Vasovasostomy: Comparison of two microsurgical techniques. *Urology*, 17 : 347, 1981.
 - 11) 伊藤晴夫, 川村健二, 片海善吾, 角谷秀典, 布施秀樹, 村上光右, 島崎 淳: 顕微鏡使用による精管再吻合術, 日泌尿会誌, 75 : 934, 1984.
 - 12) Shaflik, A.: Obturator foramen approach. 1. A new technique for reconstruction of the vas deferens after extensive resections. *Am. J. Surg.*, 143 : 255, 1982.
 - 13) 酒徳治三郎, 瀧原博史, 山本憲男, 安井平造, 清水芳幸: 精管—精管吻合術における新しい試み, 日不妊誌, 26 : 500, 1981.
 - 14) 吉田謙一郎, 中目康彦, 金親史尚, 根岸壮治, 内島 豊: Organic obstructive azoospermia 11症例に対する副辜丸精管吻合術: その臨床的検討, 日不妊誌, 29 : 311, 1984.
 - 15) 相川 厚, 石川博道, 中島史雄, 篠田正幸, 中藪昌明: 閉塞性男子不妊症に対するマイクロサージャリーによる精巣上体—精管吻合の成績, 日不妊誌, 28 : 340, 1983.
 - 16) Ewing, L. L. and Chang, T. S. K.: Physiology of male reproduction. *Campbell's Urology*, P. C. Walsh, R. E. Gittes, A. D. Perlmutter, and T. A. Stamy, 5th. ed., p 200-232, Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1986.
 - 17) Gaddum, P.: Sperm maturation in the male reproductive tract: development of motility. *Anat. Rec.*, 161 : 471, 1969.
 - 18) Silber, S. J.: Vasoepididymostomy to the head of the epididymis: recovery of normal spermatozoal motility. *Fertil. Steril.*, 34 : 149, 1980.
 - 19) Alexander, N. J.: Autoimmune hypospermatogenesis in vasectomized guinea pigs. *Contraception*, 8 : 147, 1973.
 - 20) 長田尚夫: 精管形成術, 産婦人科の世界, 31 : 581, 1979.
 - 21) Bagshaw, H. A., Masters, J. R. W. and Pryor, J. P.: Factors influencing the outcome of vasectomy reversal. *Brit. J. Urol.*, 52 : 57, 1980.
 - 22) Bedford, J. M.: Adaptations of the male reproductive tract and the fate of spermatozoa following vasectomy in the rabbit, rhesus monkey, hamster and rat. *Biol. Reprod.*, 14 : 118, 1976.
 - 23) Royle, M. G., Parslow, J. M., Kingscott, M. M. B., Wallace, D. M. A. and Hendry, W. F.: Reversal of vasectomy: the effects of sperm antibodies on subsequent fertility. *Brit. J. Urol.*, 53 : 654, 1981.
 - 24) 藤澤章二: 抗精子抗体に関する臨床的研究—男子不妊症240例および精管切断術後症例25例における検討—, 日不妊誌, 31 : 106, 1986.
 - 25) Bigazzi, P. E., Kosuda, L. L., Hsu, K. C. and Andres, G. A.: Immune complex orchitis in vasectomized rabbits. *J. Exp. Med.*, 143 : 382, 1976.
 - 26) Thomas, A. J. Jr., Pontes, J. E., Rose, N. R., Segal, S. and Pierce, J. M. Jr.: Microsurgical vasovasostomy: immunologic consequences and subsequent fertility. *Fertil. Steril.*, 35 : 447, 1981.
 - 27) Silber, S. J.: Epididymal extravasation following vasectomy as a cause for failure of vasectomy reversal. *Fertil. Steril.*, 31 : 309, 1979.

Clinical experience of epididymovasostomy and vasovasostomy for obstructive azoospermia

**Tadashi Matsuda, Kazuo Nishimura,
Mitsuo Nonomura, Kenichirou Okada
and Osamu Yoshida**

Department of Urology, Faculty of
Medicine, Kyoto University

Shungo Sanada and Youichi Takahashi

Department of Urology, Osaka
Red Cross Hospital

Fourteen patients with obstructive azoospermia were treated with microsurgical vasovasostomy or epididymovasostomy. Six cases after bilateral vasectomy, and 5 cases with bilateral vasal disruption by inguinal herniorrhaphy, underwent two-layer vasovasostomy. Three cases after bilateral epididymitis underwent end-to-end epididymovasostomy with Silber's specific tubule technique. After the operation, fertility was restored in 6 out of the 14 cases. They recovered sperm density more than $20 \times 10^6/\text{ml}$ and sperm motility more than 50 per cent. Pregnancy was gained in 1 case after inguinal herniorrhaphy.

Preoperative testicular biopsies carried in 11 cases disclosed slight deterioration of spermat-

genesis. Johnsen's mean score was 8.20 ± 0.38 (mean \pm S. D.). The mean scores of the biopsies obtained from the cases obstructed for more than 20 years were significantly lower than those with less than 20-year-obstruction.

After inguinal herniorrhaphy, reanastomosis of vasa deferens was difficult to restore the fertility, because of the long-term obstruction for more

than 20 years, the defect of vasa deferens in the inguinal canal in some cases, and the absence of sperm granuloma at the vasectomy sites. Epididymovasostomy restored fertility in 67 per cent of the cases. The specific tubule technique was likely the most effective at present in the management of such pathological conditions.

(受付: 昭和61年11月4日)

人工精液瘤による妊娠成功例

A Successful Impregnation by Artificial Spermatocele

東邦大学医学部泌尿器科学教室

三浦一陽 田中貞雅 松橋 求
Kazukiyo MIURA Teiga TANAKA Motomu MATSUHASHI

牧昭夫 高波真佐治 藤尾幸司
Akio MAKI Masaharu TAKANAMI Koji FUJIO

白井将文 安藤 弘
Masafumi SHIRAI Ko ANDO

Department of Urology, Toho University School of Medicine

東邦大学医学部第一産婦人科教室

平川 舜 百瀬和夫
Shun HIRAKAWA Kazuo MOMOSE

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

著者らが開発したシリコン製人工精液瘤を先天性精管欠損症10例、小児期鼠径ヘルニア手術時の両側精管結紮4例、交通事故による両側精管損傷1例の計15例に造設した。

造設した15例中4例に回収精液の人工授精(AIH)を2~4回施行し、うち1例に妊娠(女児出産)の成立をみた。

人工精液瘤より回収した精液を使用して妊娠が成立した報告は、外国でも数例にすぎず、自験例は本邦第1例目である。

人工精液瘤は、副睾丸切開部の繊維様組織変性のために早晚閉塞し、精子の回収が不能になるので可及的早期に回収し、AIHを試みるのが妊娠成功のポイントと考える。また精子回収には、0.3% HSA・TMPA mediumの使用が有用であった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 359-363, 1987)

はじめに

男性不妊症の原因のうち、先天性両側精管欠損、小児期鼠径ヘルニア手術時両側精管結紮、交通事故や労働災害による骨盤骨折に伴う両側精管損傷のような、精路通過障害に対しては、これまで有効な治療法がなかった。しかし最近になって、副睾丸に人工精液瘤を造設し、これより回収した精液を用いて人工授精が試みられるようになった。

著者らもこれら精路通過障害症例に対してシリコン製の人工精液瘤用プロステシスを副睾丸に造設し、それより回収した精液を利用して、夫婦間の人工授精(AIH)を行ってきたが、今回これら症例のうち1例に妊娠の成

立をみ、無事女児の出産をみたので、若干の文献的考察を加えて報告する。

症 例

患者：26歳、男性。

主訴：不妊症。

家族歴：特記すべき事項なし。

既往歴：3歳時、両側鼠径ヘルニアの手術を受けた以外に特記すべき事項なし。

現病歴：1982年11月結婚したが、約2年間不妊のため、妻を精査したが特に異常なく、夫側の精査の目的で1984年10月15日当院リプロダクションセンターを受診した。

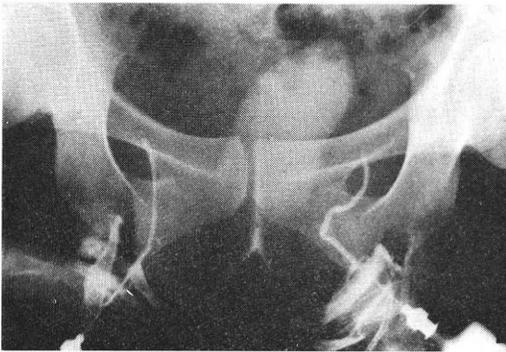


図1 精管・精囊造影



図3 人工精液瘤造設図

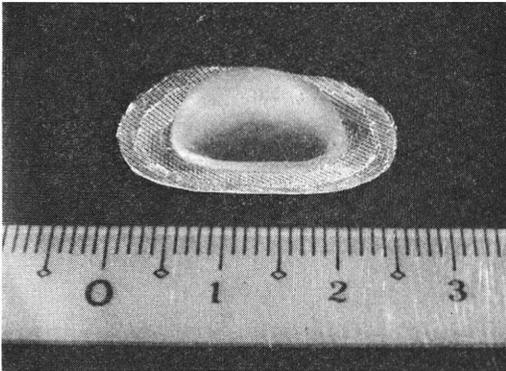


図2 シリコン製人工精液瘤

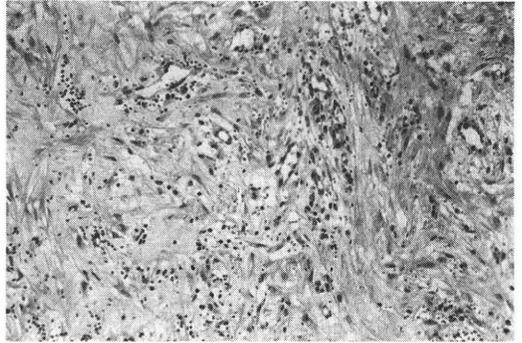


図4 副睾丸閉塞部の繊維組織

現症：初診時の診察では、両側鼠径部にヘルニア手術時の癒痕がある以外には睾丸の発育も良好（両側とも20 ml）で、副睾丸・精管・前立腺ともに触診上、異常所見は認められなかった。

検査所見：血液・生化学・尿検査はすべて正常。ホルモン検査では、testosterone 8.97ng/ml, FSH 6.0mIU/ml, LH 10.3mIU/ml, PRL 6.7ng/ml と、すべて正常範囲であった。精液検査では精液中に精子は認められず、無精子症であったが、睾丸組織生検では造精機能は正常に認められた。また精管・精囊造影（図1）では、鼠径部上部の鼠径ヘルニア手術癒痕部に一致して、精管が完全に閉塞していた。そこで小児期の鼠径ヘルニア手術時の精管結紮による両側精管閉塞と診断し、人工精液瘤造設術を行うことにした。

手術方法

1985年2月20日、腰麻下で陰囊中央に皮膚縦切開を加え、左右の睾丸・副睾丸を創外に脱転し、副睾丸尾部の漿膜に約5～7mmの切開を加えた。その直下に乳白色に怒張した副睾丸管が見えたので、この数カ所にメスの先端で刺入するように注意深く切開を加え、排出された

乳白色の分泌液中に精子が存在することを確認した後、著者が株式会社高研と共同開発したシリコン製人工精液瘤（図2）を移植することにした。この人工精液瘤用プロステースには副睾丸に接着縫合しやすいように、テフロンメッシュのひさしのような帽檐が付いている。このテフロンメッシュに瞬間接着剤（アロンアルファ）を塗布し、切開面を覆うように接着固定した後、精液が漏出しないようさらに8-0ナイロン糸で連続縫合固定した（図3）。次いで人工精液瘤用プロステースが陰囊皮下で容易に触知できる位置に睾丸を固定し、創部を閉鎖した。

妊娠に至る経過

人工精液瘤造設後1カ月目に精液の試験回収を行った。その結果、十分妊娠可能と判断したため、妻の排卵日に穿刺し、AIHを行った。人工精液瘤からの精液の回収法は、精子培養に使用している0.3% HSA・TMP-A medium^{1,2)}を用い、このmedium 0.2mlをあらかじめ注射器に採取し、26～27Gのツベルクリン針を用いて、陰囊皮膚を消毒した後、経皮的に人工精液瘤用プロステースを刺し、その内容液を吸引採取した。直ちに精液検査を行った後、AIHに供した。1985年5月15

表 1 AIH が施行できた人工精液造設症例

No.	症 例(年齢)	精路障害の原因	人工精液造設日	穿刺回収日	回収精液の状態	AIH
1	斉○栄○(26)	小児期鼠形ヘルニア手術時の両側精管結紮	1983.11.11	1983.12.23	右 { V : 0.2ml D : 110×10 ⁶ /ml SMEI : 72.7 M : 65%	(+)
					左 { V : 0.2ml sperm (-)	
				1984. 1.16	右+左 { V : 0.5ml D : 33×10 ⁶ /ml SMEI : 21.2 M : 30%	(+)
				1984. 2.21	右+左 { V : 0.4ml D : 78×10 ⁶ /ml SMEI : 11.5 M : 30%	(+)
				1984. 4.10	右+左 { V : 0.4ml D : 39×10 ⁶ /ml SMEI : 0 M : 10%	(+)
				1984. 5. 8	右 { V : 0.2ml sperm (-)	(-)
				左 { V : 0.15ml sperm(-)		
2	中○ 努(26)	小児鼠径ヘルニア手術時の両側精管結紮	1985. 2. 8	1985. 3.19	右+左 { V : 0.7ml D : 80×10 ⁶ /ml SMEI : 87.5 M : 65%	(+)
				1985. 4.18	右+左 { V : 0.6ml D : 57×10 ⁶ /ml SMEI : 70.1 M : 60%	(+)
				1985. 5.15	右+左 { V : 0.5ml D : 60×10 ⁶ /ml SMEI : 21.7 M : 40%	(+) 妊娠
3	鈴○啓○(27)	交通事故による両側精管損傷	1986. 1.31	1986. 3.12	右+左 { V : 0.5ml D : 21×10 ⁶ /ml SMEI : 67 M : 60%	(+)
				1986. 5. 1	右+左 { V : 0.6ml D : 12×10 ⁶ /ml SMEI : 50.0 M : 50%	(+)
				1986. 6. 4	右+左 { V : 0.5ml D : 10×10 ⁶ /ml SMEI : 40 M : 50%	(+)
				1986. 7. 3	右+左 { V : 0.5ml D : 12×10 ⁶ ml SMEI : 50 M : 60%	(+)
				1986. 9. 3	右+左 { V : 0.4ml D : 10×10 ⁶ /ml SMEI : 0 M : 0%	(-)
				1986.10. 2	右 { V : 0.2ml sperm (-)	(-)
				左 { V : 0.2ml sperm (-)		

4	小○康○(34)	小児期鼠径ヘルニア手術時の両側精管結紮	1986. 9. 5	1986.10. 8	右+左	V : 0.4 D : 10×10^6 /ml SMEI : 50 M : 60%	(-)	
					1986.10.16	右+左	V : 0.4ml D : 3×10^6 /ml SMEI : 33.3 M : 40%	(+)
					1986.11.25	右+左	V : 0.4ml D : 1×10^6 /ml SMEI : 0 M : 50%	(+)
					1986.12.22	右	V : 0.2ml sperm (-)	(-)
					左	V : 0.1ml sperm (-)	(-)	

注 : V=semen volume, D=sperm density, SMEI=sperm motile efficiency index, M=sperm motility

日, 2 回目の AIH で妻は妊娠に成功し, 1986年2月10日に満期正常分娩し, 3,118g の女児を得た. なお妊娠成立時の回収精液所見は, 精液量0.7ml (0.3% HSA・TMPA medium 0.2ml を含む), 精子濃度 60×10^6 /ml, 精子運動率40%, 精子運動能指数²⁾21.7 (70以上正常), 精子形態68%正常型, 精子凝集(-)であった.

考 察

人工精液瘤を副睾丸に装着し, 精子を採取する試みは, 古くは先天性両側精管欠損症に対し, Hanley (1955)³⁾ の羊膜を使用した報告がみられる. その後, 大伏在静脈⁴⁾ や精巣鞘膜⁵⁾ を用いたものから, 人工材料の発達とともに人工血管材料 (monofilament knitted polypropylene graft)⁶⁾ や, シリコンを素材とした人工精液瘤^{7,8)} の報告などがある. このうち妊娠に成功したのは, わずかに Hanley (1955)³⁾, Schoysman (1968)⁴⁾, Jimenez Cruz (1980)⁶⁾, Kelâmi (1981)⁷⁾ のみである.

一方, 本邦でも吉田⁹⁾, 岩崎¹⁰⁾ は人工血管材料の expanded polytetrafluoroethylen (商品名 Goatez vascular graft) を使用し, また吉田¹¹⁾ は, シリコン製の人工精液瘤造設を試みたが, いずれも妊娠には至っていない.

著者らは, 現在までに先天性精管欠損症10例, 小児期鼠径ヘルニア手術時の両側精管結紮4例, 交通事故による両側精管損傷1例の15例にシリコン製人工精液瘤を造設した. これら15例のうち4症例に, 十分妊孕性のある精子が回収でき, AIH を施行した (表1). しかし他の11例は, 穿刺吸引液中に精子がみられるものの, 手術直後より精子運動が無い症例と, 運動精子は存在するものの, 精子数が極端に少ない症例ばかりで, AIH の施行までには至らなかった.

妊娠の成立をみたのは1例 (症例 No 2) のみで, こ

の妊娠例を除く全例とも10カ月以内に精子回収が不能となり, 表1の如く AIH は2~4回しか施行できなかった. そこで著者らは, 無精子となつた人工精液瘤造設部の組織検査を行つたところ, 繊維組織で切開面が閉塞されることが判明した (図4). 従つて精液瘤を造設した場合には, 可及的早期に精液を回収し, AIH を試みるのが妊娠成功のポイントと考えられる. 著者らの妊娠成功例も, 人工精液瘤造設より約3カ月, 2回目の AIH によるものであつた.

(本論文の要旨は第5回日本アンドロロジー学会において報告した.)

文 献

- 1) Barros, C., Gonzalez, J., Herrera, E. and Busto-Obregon, E.: Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Androl.*, 11 : 197-210, 1978.
- 2) 三浦一陽: ヒト精液の評価, *臨牀*, 35 : 452-454, 1981.
- 3) Hanley, H. G.: The surgery of male subfertility. *Ann. Roy. Coll. Surg. Eng.*, 17 : 159-183, 1955.
- 4) Schoysman, R.: La création d'un spermatocele artificiel dans les agénésies du canal déferent. *Bull. Soc. Belg. Gynecol. Obstet.*, 38 : 307-312, 1968.
- 5) Rubin, S.-O.: Congenital absence of vasdeferens. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 9 : 94-99, 1975.
- 6) Jimenez Cruz, J. F.: Artificial spermatocele. *J. Urol.*, 123 : 885-886, 1980.
- 7) Kelâmi, A., Rohloff, D., Affeld, K., Schröter, A. and Blohm, B.: Alloplastic spermatocele. *Urology*, 10 : 317-319, 1977.
- 8) Kelâmi, A.: Kelâmi-Affeld alloplastic sper-

matocele and successful humann delivery.
Urol. Int., 36 : 368-372, 1981.

- 9) 吉田英機, 内藤善文, 井口 宏: 人工精液瘤造設術を行った閉塞性無精子症の 5 例, 臨泌, 38: 137-139, 1984.
- 10) 岩崎 皓, 穂坂正彦, 木下裕三, 岩本晃明, 長田久文, 広川 信: Goatex vascular graft を用いた人工精液瘤造設術の試み, 日不妊誌, 31: 116-121, 1986.
- 11) 吉田英機: 人工精液瘤造設術, 臨泌, 40 : 277-281, 1986.

A successful impregnation by
artificial spermatocoele

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

Department of Urology, Toho University
School of Medicine

Shun Hirakawa and Kazuo Momose

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

An artificial silicone spermatocoele originally

designed by the authors was installed in a total of 15 patients, consisting of 10 with congenital defect of the vas deferens, 4 having undergone bilateral ligation of the vas deferens during operation to repair an inguinal hernia in their childhood, and 1 suffering bilateral contusion of the vas deferens in a traffic accident. 4 out of 15 cases were able to provide enough seminal fluid from the artificial spermatocoele Homologous artificial insemination (AIH) was performed 2-4 times. Then pregnancy occurred in 1 of these 4 couples (a female infant was born).

Only a few successful pregnancies occurring after insemination using seminal fluid collected from an artificial spermatocoele have so far been reported abroad, and our case is the first successful one in Japan.

The collection of seminal fluid often becomes infeasible due to closure of the artificial spermatocoele by fibrotic formation in the epididymis at the incised site. Therefore, the most important point for successful AIH is that seminal fluid be collected as promptly as possible. Moreover, 0.3 % HSA-TMPA medium is the most suitable for the collection of seminal fluid.

(受付: 昭和62年2月24日特別掲載)

Chordee without hypospadias の二例

Tow Cases of Chordee without Hypospadias

山口大学医学部泌尿器科教室 (主任酒徳治三郎)

林 田 英 嗣 山 本 光 孝 山 川 弦 一 郎

Hidetsugu HAYASHIDA Mitsutaka YAMAMOTO Genichiro YAMAKAWA

林 淳 二 瀧 原 博 史 酒 徳 治 三 郎

Junji HAYASHI Hiroshi TAKIHARA Jisaburo SAKATOKU

Department of Urology, school of Medicine, Yamaguchi University
(Director: Prof. J. Sakatoku)

Chordee without hypospadias は、比較的まれとされる男子外性器の奇型である。本症の二例に対し one stage method による手術を施行し、良好な結果を得た。これを報告するとともに、本症の分類および術式に関して文献的考察を加えた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 364-368, 1987)

緒 言

Chordee without hypospadias は、比較的まれとされている男子外性器の奇型である。われわれは本症の二例を経験し、one-stage method による手術を施行し、良好な結果を得たため、分類、術式に関して文献的考察を加えて報告する。

症 例 1

患者：3歳，男児。

主訴：陰茎の下方湾曲（図1）。

家族歴および既応歴：特記すべきことはなかった。

現病歴：33歳父親と28歳母親の第一子として生まれ、分娩は正常、生下時体重2,480gであった。検診にて、尿道下裂との診断を受け、2～3歳時に手術を受けることをすすめられて当科入院となった。

現症：鼠径部に異常を認めず、陰囊の形態は正常であり、両側睪丸は陰囊内で触知可能であった。外尿道口は亀頭やや腹側に位置し、立位排尿可能であった。包皮は余剰部分がフードを形成し、陰茎は下方へ湾曲していた。

DIP 所見：両腎尿管の機能形態に異常は認めなかった。

手術所見：陰茎根部を3号ネラトンにて絞扼し、ヘパ

リン生食にて artificial erection を行ない、陰茎が下方へ湾曲することを確認した。外尿道口より balloon catheter を留置し尿道を観察すると、末梢側1/3で catheter が皮膚上より透視できた。そこで、この末梢側をさける様にして冠状溝の周囲に切開を加えた。切開部より尿道に沿って縦切開を行ない、陰茎根部に向つて皮膚の剝離を行なった。腹側は球部まで、背側は陰茎ワナ靭帯まで剝離し、周囲をすべてこの深さで剝離した（図2）。陰茎腹側を観察したが、明らかな索状物は存在しなかった。また、末梢側1/3の尿道海綿体の発育は不十分であった。再び artificial erection を行ない、陰茎を観察したが、湾曲は修復されていなかった（図3）。従つて、陰茎の中間部1/3程度を剝離遊離した（図4）。これにより下方湾曲が大部分修復された。次にフードの正中に縦切開を加え、切開部を陰茎の周囲にまわす様にして陰茎腹側で余つた包皮を切除し、表皮を結紮縫合し手術を終了した（図5）。

病理所見：術中明らかな索状物はみとめられなかったが、尿道周囲組織は、すべて connective tissue であった（図6）。

術後経過：一過性の排尿困難を訴えたが、術後25日目に balloon catheter を抜去し、その後、湾曲は修復され、現在にいたるまで良好な排尿状態を保っている。

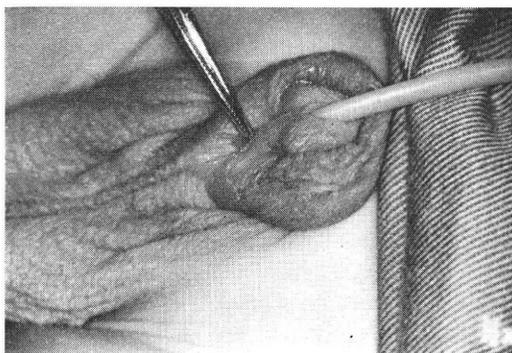


図 1 陰茎の下方湾曲

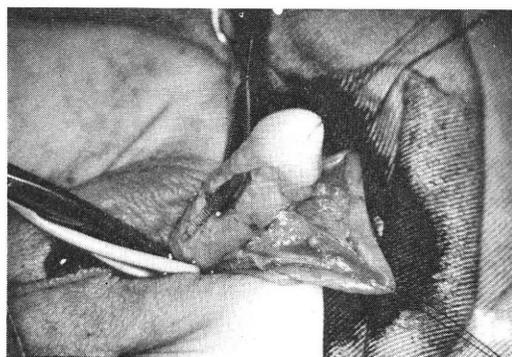


図 4 尿道の剝離

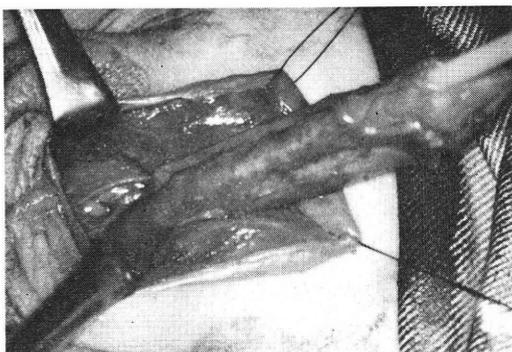


図 2 陰茎周囲の皮膚の剝離



図 5 修復後

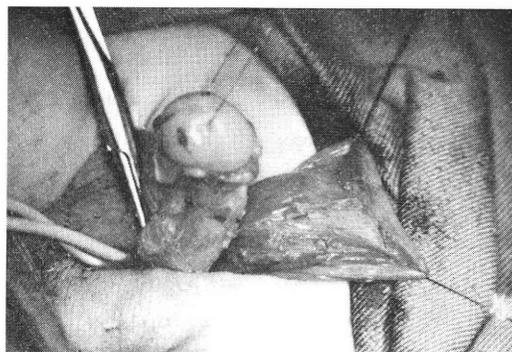


図 3 皮膚剝離後の陰茎の湾曲

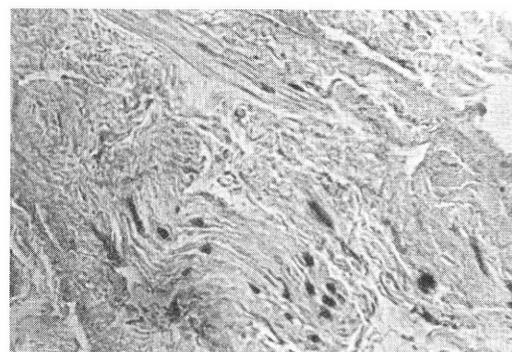


図 6 病理所見

症 例 2

患者：11歳，男児。

主訴：陰茎の下方湾曲。

家族歴および既往歴：特記すべきことはなかった。

現病歴：分娩は正常，生下時体重3,950gであつた。生下時より陰茎の下方湾曲に気付き，手術目的で当科入院となつた。

現症：鼠径部に異常を認めず，陰囊の形態は正常であり，両側睾丸は陰囊内で触知可能であつた。外尿道口は，

亀頭の正常位に位置し，立位にて排尿可能であつた。包皮は陰茎背側で余剰部分がフードを形成していた。また，陰茎腹側に尿道に一致する様に索状物を触知した。

手術所見：陰茎根部をネラトンにて絞扼し，冠状溝周囲に切開を加え皮膚を剝離した。尿道と皮膚の間に索状物を認め，これを切除した。尿道海绵体は，末梢側で発育が悪く，中枢側で十分に発育していた。索状物の切除のみで尿道周囲を充分に剝離せずとも陰茎の湾曲は修復された。次にフードの正中に縦切開を加え，切開部を陰

表 1 本邦における Chordee without hypospadias (過去10年間)

No.	著者	報告年	年齢	分類	手術法	名称	結果
1	新島ら ¹⁵⁾	1977	23	IV~I	Nesbit+索切除	先天性陰茎湾曲症	良好
2	中島ら ¹⁶⁾	1978	24	IV	Nesbit	先天性陰茎湾曲症	良好
3			21	IV	Nesbit	先天性陰茎湾曲症	良好
4	松村ら ¹⁷⁾	1978	24	IV	Nesbit	陰茎湾曲症	良好
5			29	IV	Nesbit	陰茎湾曲症	良好
6			33	IV	Nesbit	陰茎湾曲症	良好
7	波治ら ¹⁸⁾	1984	13	I	Nesbit+索切除	Chordee without hypospadias.	良好
8	荒木ら ¹⁹⁾	1984	25	IV	Nesbit	先天性陰茎湾曲症	良好
9	成田ら ²⁰⁾	1985	26	IV	Nesbit	先天性陰茎湾曲症	良好
10			36	IV	no operation	先天性陰茎湾曲症	—
11			30	IV	Nesbit	先天性陰茎湾曲症	良好
12	平野ら ²¹⁾	1985	17	I	索切除+Crawford 法	chordee without hypospadias.	良好
13	内島ら ²²⁾	1986	21	I	索切除	chordee without hypospadias.	良好
14	自験例		3	I	1 stage		良好
15	自験例		11	I	1 stage		良好

茎の周囲にまわす様にして、陰茎腹側で余った包皮を切除し、表皮を結紮縫合し手術を終了した。

術後経過：湾曲は修復され、良好な排尿状態を保っている。

考 察

Chordee without hypospadias は、1962年 Sievers により初めて記載された疾患であり、比較的まれとされている男子外性器の奇型である。Culps によると、400例の尿道下裂のうち15例¹⁾を、本邦では生駒らが375例中16例を認めたとしている²⁾。過去10年間において、集められた限りでは、本邦にて自験例を含む15例の報告をみている(表1)。Devine & Horton は chordee を hypospadias に伴う陰茎の異常湾曲とし、外尿道口がほぼ正常な位置にあるものを Chordee without hypospadias とした。その他、congenital short methra または hypospadiasm without hypospadias 等の名称で呼ばれてきた。しかし、Devine & Horton は Chordee without hypospadias の名称が最もよくこの病態を表わしているとしている³⁾。

Devine & Horton により本症は3つの型に分類され、さらに Kramers がIV型を付け加えた^{3,4)}。

I型：尿道海绵体が欠損し、そこに chordee が存在する。尿道は陰茎腹側の皮下直下にうすく存在し、外尿道口はほぼ正常な位置にある。Chordee は厚い線維からなる索状物に原因する。

II型：尿道は正常の尿道海绵体でつまれているが、Buck's 筋膜、dartes 筋膜の異常で chordee となる。

III型：尿道、尿道海绵体、そして Buck's 筋膜は正常であるが、dartes 筋膜の異常で chordee となる。

IV型：陰茎海绵体の腹側背側の発育不均衡が原因で chordee となる。

Devine & Horton によると、I型40%、II型40%、III型30%の割合であった。

症例1では陰茎末梢側の尿道海绵体の発育が悪く、balloon catheter が皮膚上から透視出来た。厚い線維からなる明らかな索状物はみられなかったが、I型に属すると考えて良いと思う。また、症例IIでは、尿道海绵体はやはり陰茎末梢側で発育が悪く、尿道と皮膚の間に索状物が存在していたため、これもI型と考えられる。

本邦の15例中の10例は、先天性陰茎湾曲症の名称にて発表してある。また、国外の文献においても congenital curvature of the penis の名称を用いたものもあり、陰茎海绵体白膜の発育不均衡によるものとされ¹¹⁻¹⁴⁾、Kramers のいうIV型と同一のものと考えられる。しかし、chordee without hypospadias が下方湾曲のみに限定されるのに対して、congenital curvature of the penis では、側方および上方への湾曲も含んでいる。

次に手術法であるが、大きく分けて尿道を離断して湾曲を修正し、次に尿道形成を行なう two stage method と、尿道の離断を行なわない one stage method の2つに分けられる。

Devine & Horton によると one stage method が可能であり、各型により手術法が当然異なるとしている^{3,4)}。

I型：正常に尿道海绵体が形成されている部分から亀

頭までの皮膚の縦切開により、尿道カテーテル挿入下に尿道と陰茎海绵体との間をよく剥離して、その間の線維索を完全に切断して陰茎を伸展し皮膚を縫合する。

Ⅱ型：尿道を損傷しないように注意しながら Buck's 筋腹と dartos 筋膜の異常部分を切除する。

Ⅲ型：Dartos 筋膜の異常部分を切除する。

Ⅳ型：陰茎白膜の縫縮、すなわち Nesbit 法を用いる。

本二症例はⅠ型であり、one stage method により手術を施行した。

Ⅰ型に対して索切除および尿道形成の two stage method を主張するものもある。

Chordee without hypospadias に対する two stage method の手術は、Young によつて Thiershe's 法の変法が記載されたのが最初とされ、Nesbit は7歳男児に Denis Brown 法を使用し⁶⁾、Mackinney らは16歳男児に scrotal skin tube を用いる方法を⁷⁾、また Moore は、5歳、2歳、1歳の3人の男児に Ceil 法による尿道形成を行ない、いずれも良好な結果を得たとしている⁸⁾。本邦においては、平野らが Crowfor 法による two stage method を行ない、良好な結果を得ている。

一方 Gross らは、尿道の血液供給路を保存することにより、fistula の形成等、術後合併症が少ないとし、尿道の切断をさける one stage method を主張している⁹⁾。

また、近年、Nesbit 法を用いた良好な結果が多く報告されている。これは索状物の小さなものにも使用されるとされ、Ⅳ型以外にも使用されている⁹⁾。しかし、この手術の特徴上から penis の充分に發育していない思春期以前の患者に施行した場合、再発の報告もある¹⁰⁾。

われわれは、尿道を保存する one-stage method を施行し、ほぼ満足すべき結果を得た。しかし、第一例において尿道伸展のためと思われる排尿困難を起こした。術中、two-stage method も考慮されたが、3歳児に対する手術侵襲および Gross の主張する尿道への血行を加味し、one stage method にて手術を施行した。術後四週間で排尿状態は改善し、現在にいたるまで経過良好である。

われわれは、第Ⅰ例において尿道下裂に導じて3歳児に対して手術を施行したが、明らかな索状物が存在しなかつたことより、成人後に Nesbit 法を施行しても良かつたのではないかと思われる。また、本二症例に対して chordee の再発等、長期にわたる経過観察が必要かと思われる。

結 語

われわれが経験した chordee without hypospadias

の二例に対して one stage method による手術を施行し、満足のいく結果を得た。これを報告するとともに、分類、術式に関して文献的考察を加えた。

文 献

- 1) Culp, O. S.: Struggles and triumphs with hypospadias and associated anomalies: Review of 400 cases. *J. Urology*, 96: 339-351, 1966.
- 2) 生駒文彦, 島 博基, 藪元秀典: 尿道下裂の合併症と予後成績, *小児医学*, 14: 448-467, 1981.
- 3) Devine, C. J. and Horton, C. E.: Chordee without hypospadias. *J. Urology*, 110: 264-271, 1973.
- 4) Kramer, S. A. et al.: Chordee without hypospadias. *J. Urology*, 128: 559-561, 1982.
- 5) Nesbit, R. M.: Congenital curvature of the phallus: Report of three cases with description of corrective operation. *J. Urology*, 93: 230-232, 1965.
- 6) Nesbit, R. M.: The surgical treatment of congenital chordee without hypospadias, *J. Urology*, 72: 1178-1180, 1954.
- 7) Machinney, C. C. and Uhle, C. A. W.: Congenital chordee without hypospadias. *J. Urology*, 84: 343-344, 1960.
- 8) Moore, C. A.: Surgical repair of chordee without hypospadias: Report of three cases, *J. Urology*, 93: 389-390, 1965.
- 9) Gross, M., Fein, R. and Waterhouse, K.: Single stage correction of chordee without hypospadias and coronal hypospadias. *J. Urology*, 102: 70-74, 1969.
- 10) Bennet, A. H and Gittes R.F.: Congenital penile curvature without hypospadias, *Urology*, 16: 364-366, 1980.
- 11) Saalfeld, J. et al.: Congenital curvature of the penis; successful result with variation in corporoplasty. *J. Urology*, 109: 64-65, 1983.
- 12) Gavrell, G. J.: Congenital curvature of the penis. *J. Urology*, 112: 489-490, 1974.
- 13) Pond, H. S. and Brannan, W.: Correction of the congenital curvature of the penis: Experiences with the Nesbit operation at Ochsner clinic. *J. Urology*, 112: 491-492, 1980.
- 14) Udall, D. A.: Correction of 3 types of congenital curvatures of the penis, including the first reported case of dorsal curvature. *J. Urology*, 124: 50-52, 1980.
- 15) 新島端夫, 他: 先天性陰茎腹側湾曲症の手術治療例, *手術*, 31: 1005-1007, 1977.
- 16) 中島幹夫, 辻村玄弘, 横関秀明: 先天性陰茎湾曲症の2例, *西日泌尿*, 40: 913-915, 1978.
- 17) 松村陽右, 他: 陰茎湾曲症の手術—3例の経験—, *西日泌尿*, 40: 408, 1978.

- 18) 波治武美, 他: Chordee without hypospadias の1例, 日泌会誌, 71: 969, 1980.
- 19) 荒木 徹, 沖宗正明, 松元鉄二: 先天性勃起時陰茎湾曲症の1例, 臨泌, 38: 157-159, 1984.
- 20) 成田晴紀, 三宅弘治, 三矢美輔: 先天性陰茎湾曲症の3例, 日不妊誌, 30: 130-135, 1985.
- 21) 平野章治, 高野 学, 大川光央: Chordee without hypospadias と考えられた1例, 西日泌尿, 47: 1181-1184, 1985.
- 22) 内島 豊, 他: 陰茎腹側湾曲症 (Chordee without hypospadias) の1例, 臨泌, 40: 333-335, 1986.

Tow cases of chordee without hypospadias

**Hidetsugu Hayashida, Mitsutaka Yamamoto,
Genichiro Yamakawa, Junji Hayashi,
Hiroshi Takihara and Jisaburo Sakatoku**

Department of Urology, school of Medicine,
Yamaguchi University
(Director: Prof. J. Sakatoku)

Chordee without hypospadias is a rare congenital anomaly of the male external genitalia. Our experience with tow cases of chordee without hypospadias is presented.

One stage method with a intact urethra are successfully performed.

Our revie of the literature about the clasification and the tecunique are discussed herein.

(受付: 昭和61年9月8日)

精子不動化抗体による受精阻害作用の検討

Further Studies of the Blocking Effect of Sperm-immobilizing Antibodies on Human *In Vitro* Fertilization

京都大学医学部婦人科学産科学教室

津久井伸一 野田洋一 福田愛作

Shinichi TSUKUI Yoichi NODA Aisaku FUKUDA

松本央辰 己賢一 森崇英

Hisashi MATSUMOTO Kenichi TATSUMI Takahide MORI

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

精子不動化抗体陰性血清および陽性血清より抽出した IgG 分画を添加した培養液にて精子を処理し、高濃度塩類溶液中に保存したヒト透明帯に対して、*in vitro* にて透明帯貫通試験を施行したところ、精子不動化抗体陰性血清由来 IgG にて処理した精子の場合には、透明帯への貫通が認められた (6/6=100%) が、精子不動化抗体陽性血清由来 IgG にて処理した精子の場合には、ほとんど貫通が認められなかった (1/6=17%)。また電子顕微鏡による検索により、精子不動化抗体陽性血清由来 IgG にて処理した精子は、陰性血清由来 IgG にて処理した精子と比較して、*acrosome reaction* を起こしている割合が有意に減少し、逆に *acrosome intact* である精子の割合が有意に増加していた。従つて、精子不動化抗体には精子の透明帯貫通に対する抑制作用があり、その作用機序の一因として、精子の *acrosome reaction* に対する抑制があるものと思われた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 369-375, 1987)

緒言

従来、原因不明と考えられていた不妊症婦人の中に、抗精子抗体によると思われるものが存在する¹⁾ことが明らかになっているが、抗精子抗体の中でも精子不動化抗体は、不妊症と密接な関係がある²⁾ことが知られている。われわれは、高濃度塩類溶液中に保存した透明帯を用いた、ヒト *in vitro* 受精系において、精子不動化抗体陽性血清 (陽性血清) の存在 (7.5% (v/v)) が受精に対して阻害的に作用することを報告³⁻⁵⁾してきたが、受精阻害作用が精子不動化抗体自体の関与によるものかどうかは未だ不明であった。今回われわれは、陽性血清より得られた IgG 分画を用いて同様の実験を行い、このような受精阻害作用が精子不動化抗体の関与によるものかどうかを検討すると共に、精子の先体反応に及ぼす影響を検討してみたので、その結果を報告する。

研究方法

1. 精子不動化抗体の検出

京都大学不妊外来通院中の患者より得た血清を 56°C, 30分処理にて非動化後、磯島らによる精子不動化試験⁶⁾を行い、補体依存性精子不動化抗体の検出を行った。その結果、精子不動化抗体強陽性 (SIV=∞) と判定された血清に対しては、定量的精子不動化試験⁷⁾を行い、抗体価を算定した。

2. イムノビーズ法による抗体検出

健康男子より得られた精液を PBS (HSP 5mg/ml 添加) と 1:5 (v/v) に混和し、遠心法 (250×g) にて精子を分離した。次に定量的精子不動化試験にて最も高い抗体価を示す症例番号 112 の陽性血清 0.1ml を PBS 0.3ml にて希釈し、その中へ 5×10⁶ 個の精子を浮遊させ、37°C にて 30分間インキュベーションした。インキュベーション終了後、再び遠心法 (250×g) により精子

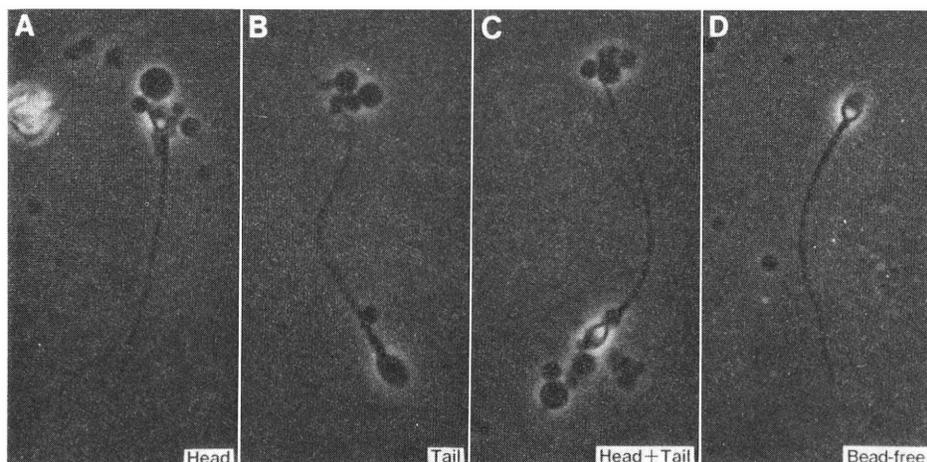


図 1

を洗浄し、PBS (HSA 5mg/ml 添加) 中に浮遊させた。このようにして得られた sperm suspension 5 μ l を抗ヒト IgG または抗ヒト IgM にて coating したイムビーズ (Bio-Rad) 50 μ l と混和し、10分間反応させた後、位相差顕微鏡にてイムビーズ付着精子数および付着部位を検索した⁹⁾。イムビーズの付着部位は、精子頭部、精子尾部、精子頭部および尾部、付着無しに分類し、各精子毎に判定した (図1)。

3. IgG 分画の回収と培養液の作製

Protein A-Sepharose を用いて、精子不動化抗体陰性血清 (陰性血清) および定量的精子不動化試験にて最も高い抗体価を示す症例番号112の陽性血清より IgG 分画を抽出した。すなわち、血清10ml を PBS 10ml と混和し、Protein A-Sepharose (Pharmacia) 1.5g (5ml) が充てんされているカラムに0.5ml/min. の流速にて滴下させた。次に PBS (pH 7.4) にてカラムを洗浄し、洗浄後の吸光度が OD₂₈₀<0.01 であることを確認した後、カラム内の Protein A に結合した IgG を 0.1M glycine-HCl (pH=2.8) にて溶出した。溶出液は限外ろ過にて濃縮し、ゲル内沈降反応 (パルチゲンプレート, Hoechst) にて IgG 濃度を算定した。ついで 7.5% (v/v) 血清添加時相当量の human serum albumin (Sigma) (3.3mg/ml) および上記の IgG (1.2 mg/ml) を modified Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) 培養液⁹⁾に添加し、透明帯貫通試験の培養液として供した。

4. 透明帯の準備

子宮癌等の手術にて摘出した卵巣より、患者の承諾を得た上で未熟卵を採取し、37°C, 5%CO₂ in air にて48時間成熟培養¹⁰⁾を行った。培養終了後、実体顕微鏡に

て十分観察し、破裂、変形の認められない透明帯のみ高濃度塩類溶液¹¹⁾ [0.5M (NH₄)₂SO₄+0.1MMgCl₂+0.1% Dextran] 中に4°C にて保存した。使用時は透明帯を十分脱塩、洗浄の後、実験に用いた。

5. 透明帯貫通試験

健康男子より得られた精液から、layering method¹²⁾により上記の陰性血清または陽性血清由来 IgG を含む modified BWW 培養液中に swim up させた運動性良好精子を回収し、sperm suspension (10 \times 10⁶sperm/ml) を作製した。そこへ高濃度塩類溶液中に保存されていた透明帯を脱塩の後導入し、37°C, 5%CO₂ in air にて24時間培養した。透明帯は培養終了後、マイクロピペットにて数回洗浄し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡 (オリンパス IMT-2-21NR) にて困卵腔に認められる貫通精子数を算定した (図2)。

6. Acrosome reaction の検索

透明帯貫通試験施行時と同様、陰性血清由来 IgG または陽性血清由来 IgG を添加した modified BWW 培養液中にて1時間 swim up させた運動性良好精子を回収し、さらに同培養液中にて3時間 incubation した後、2%グルタルアルデヒドにて前固定、1%オスミウム酸にて後固定し、脱水、エポン包埋¹³⁾後、透過型電子顕微鏡 (HITACHI HU12A) にて精子頭部における acrosome reaction の有無を検索した。

成 績

1. 精子不動化抗体の検出

不妊外来院中の患者より得た血清 212 例に対して精子不動化試験を行ったところ、13例 (6.1%) に於いて精子不動化抗体が陽性であった。さらに精子不動化抗体強陽

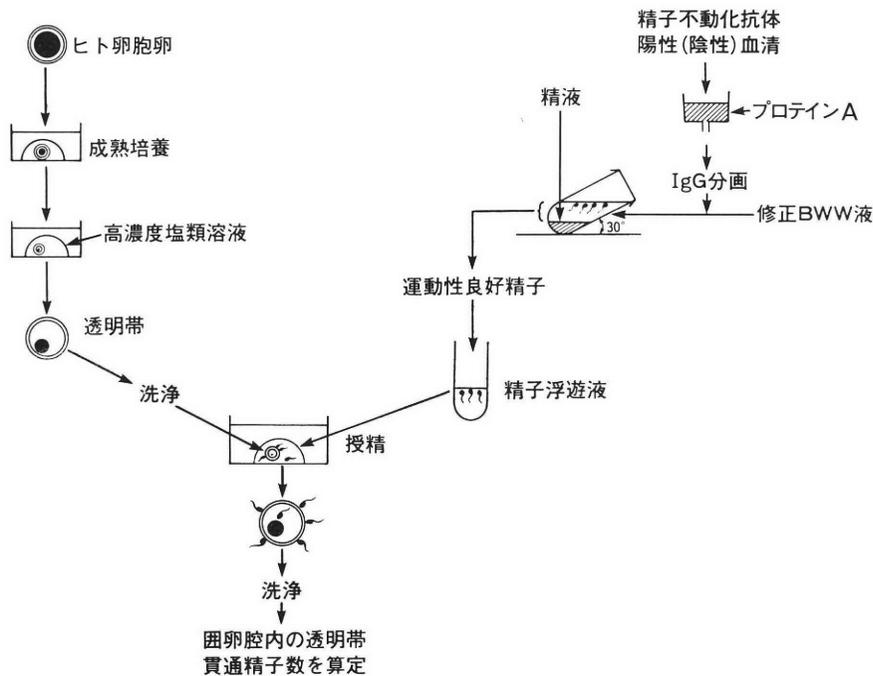


図 2 透明帯貫通試験

表 1 Immunobead binding to human spermatozoa pretreated by sperm immobilizing antibody positive serum

Immunobead	Case no. of supplemented serum (SI ₅₀ ^a)	No. of sperm		% of bound
		Bound (Head, Tail, Head+Tail)	Free	
Anti-human IgG	Control	3 (1, 2, 0)	29	9
	112(32.0)	45 (16, 17, 12)	5	91
Anti-human IgM	Control	2 (1, 1, 0)	27	7
	112(32.0)	12 (9, 3, 0)	24	33

a : 50% Sperm immobilization unit

性 (SIV=∞) を示す血清に対して定量的精子不働化試験を行ったところ、症例番号112の陽性血清が最も高い抗体価 (SI₅₀=32.0) を示した。そこで、症例番号112の陽性血清に対してイムノビーズ法による検索を行ったが、症例番号112の陽性血清にて精子を処理した場合、抗ヒト IgG にて coating したイムノビーズは91%の精子に対して付着が認められたのに対して、抗ヒト IgM にて coating したイムノビーズは33%にしか付着が認められなかった (表 1)。従つて、症例番号112の陽性血清の場合、主として IgG 分画に抗体活性があると判断した。また抗ヒト IgG にて coating したイムノビーズは、精子頭部および尾部に様に付着が認められたが、抗ヒト IgM の場合は主として精子頭部に付着する傾向

が認められた。

3. 透明帯貫通試験

表 2 に示すように、陰性血清由来 IgG 添加培養液にて処理した精子の場合は100%の透明帯に対して貫通精子を認めたのに対して、陽性血清由来 IgG にて処理した精子の場合は17%の透明帯に対して貫通精子を認めたのみで、陰性血清由来 IgG 添加培養液にて処理した精子の場合と比較して、有意の低下を示した (図 3)。

4. Acrosome reaction の検索

図 4 に示すように、acrosome cap 全体に vesiculation が認められる精子は acrosome reacted, vesiculation が部分的に起こっている精子は modified acrosome reacted, また vesiculation が全く起こっていないものは

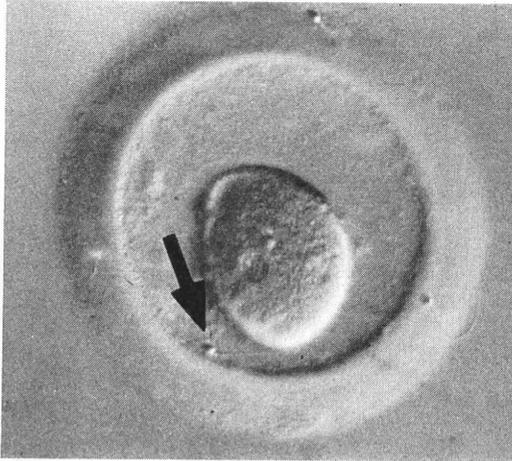
表 2 Effect of sperm immobilizing antibodies (IgG) on the penetration of sperm through zonae pellucidae

Origin of supplemented IgG	No. of experiments	No. of penetrated ova (%)	Maen no. of penetrated sperm
SIA ^a -negative serum	2	6/6(100%)	2.7
SIA-positive serum	2	1/6(17%) ^b	0.5

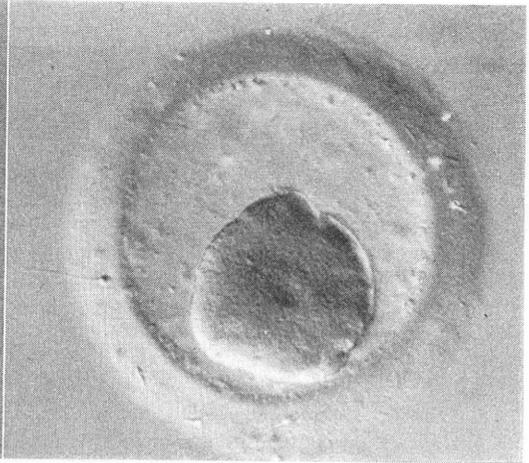
a: Sperm immobilizing antibody

b: Significantly different from SIA-negative serum ($Z^2 = 5.5$; $p < 0.02$)

(1)



(2)



(1) 陰性血清由来IgG添加培養液にて培養した精子 (2) 陽性血清由来IgG添加培養液にて培養した精子。
($\times 400$)。矢印は貫通精子を示す。

図 3

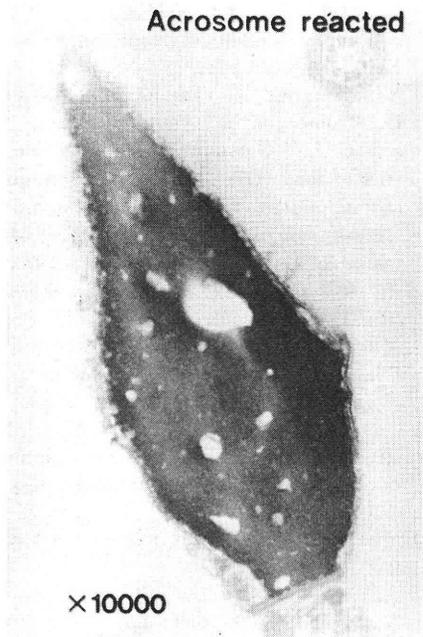
acrosome intact, 判定不能のものは unknown として算定したところ, 陰性血清由来 IgG にて処理した精子の場合は acrosome reacted と判定した精子が35%に認められたが, 陽性血清由来 IgG にて処理した精子の場合は18%にしか認められなかった。さらに陰性血清由来 IgG にて処理した精子の場合は acrosome intact と判定した精子は21%にしか認められなかったが, 陽性血清由来 IgG にて処理した精子の場合は49%に認められた。従つて, 陽性血清由来 IgG にて処理した精子の場合は陰性血清由来 IgG にて処理した精子の場合と比較して, acrosome reacted と判定した精子数が有意に減少し, 逆に acrosome intact と判定した精子数が有意に増加していた (表3)。

考 案

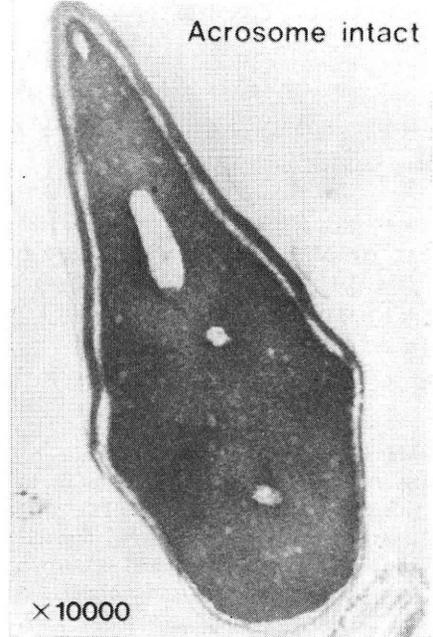
われわれは, 冒頭にも述べたように, 高濃度塩類溶液中に保存する事により, sperm-zona interaction の場としての生物学的性質を保存することができる¹¹⁾ という透

明帯の性質を利用し, ヒト *in vitro* 受精系において, 精子不動化抗体陽性血清の存在下では, 精子の透明帯貫通が阻害されることを報告⁸⁻⁹⁾ してきた。精子不動化抗体の対応抗原は単一ではないと考えられる¹⁴⁾ ため, 精子不動化抗体が常に透明帯貫通抑制作用を有するとは限らないと推定されるが, 今回われわれは, 従来血清を添加した培養液にて施行した透明帯貫通試験の場合と同様の実験条件の元に, 血清成分を human serum albumin および各血清由来の IgG 分画に置き換えて実験を行った結果, ほぼ従来と同様の結果を得る事ができた。従つて, 精子に対する透明帯貫通阻害作用は, 主として陽性血清の IgG 分画に存在すると思われ, 精子不動化抗体自体の関与によるものと思われる。近年, 抗精子抗体保有患者において, donor serum または human cord serum を用いて体外受精を行い, 妊娠に至った症例も報告^{15,16)} されており, このような精子の透明帯貫通を阻害するような精子不動化抗体を保有している症例は, 体外受精の適応によるものと思われる。また精子不動化抗体による

(1)



(2)



(1) 陰性血清由来IgG添加培養液にて培養した精子 (2) 陽性血清由来IgG添加培養液にて培養した精子。

図 4

表 3 Effect of sperm immobilizing Antibodies (IgG) on the acrosome reaction of human spermatozoa

Origin of supplemented IgG	No. (%) of sperm			
	Acrosome reacted	Modified acrosome reacted	Acrosome intact	Unknown
SIA ^a -negative serum	26(35)	19	16(21)	14
SIA-positive serum	13(18) ^b	19	36(49) ^c	5

a : Sperm immobilizing antibody

b : Significantly different from SIA-negative serum ($\chi^2=4.6 : p<0.04$)

c : Significantly different from SIA-negative serum ($\chi^2=11.5 : p<0.02$)

透明帯貫通阻害作用の機序は不明だが、1. 精子の capacitation に対する抑制、2. 精子の acrosome reaction に対する抑制、3. sperm-zona interaction に対する抑制のいずれかが推定される。今回の電子顕微鏡による検索により、陽性血清由来 IgG にて処理した精子は、陰性血清由来 IgG にて処理した精子と比較して、acrosome reacted である精子の割合が有意に少なく、逆に acrosome intact である精子の割合が有意に多かつた。精子の acrosome reaction は抗精子抗体 (IgG) により抑制されるという報告^{17,18)}に加えて、精子不動化抗体は精子の capacitation を抑制しないという報告¹⁹⁾も有る。また、すでに報告したように、透明帯のみを陽性血清で処理しても、精子の透明帯貫通は阻害されない⁵⁾こ

とより、精子に対する受精阻害は acrosome reaction のレベルで起こっている可能性が強く、今回のわれわれの実験結果もこれらの報告を裏付けるものであると思われる。精子不動化抗体による精子の acrosome reaction に対する抑制作用の機序は不明であるが、Friend ら²⁰⁾によると、acrosome reaction に先立って精子の plasma membrane 内の particle の移動が起こり、plasma membrane 内に particle-free area ができ、その部位より先体反応が開始すると報告しているが、Johnson ら²¹⁾が報告しているように、plasma membrane に lectin や antibody 等の macromolecules が結合すると、plasma membrane の lipid bilayers 内の particle の移動が起こりにくくなり、その結果、acrosome reaction が抑制

されることも想定される。

結 論

1. ヒト *in vitro* 受精系において、精子不動化抗体 (IgG) の存在下では、精子の透明帯貫通が阻害された。
2. 精子不動化抗体 (IgG) の存在下では、精子の acrosome reaction が抑制された。

本研究の一部は文部省科学研究助成金 (No. 58570684, 59480333, 60570775) によつた。なお、本論文の要旨は第4回国際 IVF 学会 (1985年11月, メルボルン), 第30回日本不妊学会, 第27回哺乳動物卵子研究会, 第38回日本産科婦人科学会にて発表した。

文 献

- 1) Manarang, P. S. and Behrman, S. J.: Spermatoxicity of immune sera in human infertility. *Fertil. Steril.*, 22 : 145, 1971.
- 2) Cantuária, A. A.: Sperm immobilizing antibodies in the serum and cervicovaginal secretions of intertile and normal women. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 84 : 865, 1977.
- 3) 津久井伸一, 野田洋一, 福田愛作, 森 崇英: 精子の透明帯貫通に及ぼす精子不動化抗体の抑制作用。受精着床, 85 : 249, 1986.
- 4) 津久井伸一, 野田洋一, 福田愛作, 松本 央, 矢野樹理, 森 崇英: 精子不動化抗体の受精阻害作用。産婦進歩, 38 : 383, 1986.
- 5) Tsukui, S., Noda, Y., Yano, J., Fukuda, A., and Mori T: Inhibition of sperm penetration through human zona pellucida by antisperm antibodies. *Fertil. Steril.*, 46 : 92, 1986.
- 6) Isojima, S., Tsuchiya, K., Koyama, K., Tanaka, C., Naka, O. and Adachi, H.: Further studies on sperm-immobilizing antibody found in sera of unexplained cases of sterility in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 112 : 199, 1972.
- 7) 香山浩二, 伊熊健一郎, 窪田耕三, 鎌田敏雄, 磯島晋三: 定量的精子不動化試験とその臨床応用, 日産婦誌, 31 : 1906, 1979.
- 8) Bronson, R. A., Cooper, G. W. and Rosenfeld, D. L.: Complement-mediated effects of sperm head-directed human antibodies on the ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster eggs. *Fertil. Steril.*, 40 : 91, 1983.
- 9) 斎藤 晃, 星 和彦, 鈴木雅洲, 柳町隆造, 林 恵子: ハムスター卵子を使用したヒト精子の受精力検討。産と婦, 49 : 1855, 1982
- 10) Nishimoto, T., Yamada, I., Niwa, T., Nishimura, T. and Iritani, A.: Sperm penetration *in vitro* of human oocytes matured in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 64 : 115, 1982.
- 11) Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C. B., Bronson, R. A., Mahi, C. A. and Nicolson, G. L.: Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 31 : 562, 1979.
- 12) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 斎藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行っている精液静置法 "layering method" による精液中からの良好精子の分離。日不妊誌, 28 : 101, 1983.
- 13) Yanagimachi, R. and Noda, Y. D.: Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 31 : 465, 1970.
- 14) 香山浩二: 免疫学的女性不妊。免疫と疾患, 8 : 203, 1984.
- 15) Ackerman, S. B., Graff, D., van Uem, J. F. H. M., Swanson, R. J., Veeck, L. L., Aosta, A. A. and Garcia, J. E.: Immunologic infertility and *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 42 : 474, .
- 16) Yovich, J. L., Stanger, J. D., Kay, D. and Boettcher, B.: *In-vitro* fertilisation of oocytes from women with serum antisperm antibodies. *Lancet*, 1 : 369, 1984.
- 17) Huang, T. T. F., Tung, K. S. K. and Yanagimachi, R.: Autoantibodies from vasectomized guinea pigs inhibit fertilization *in vitro*. *Science*. 213 : 1267, 1981.
- 18) Tung, K. S. K., Okada, A. and Yanagimachi, R.: Sperm autoantibodies and fertilization. I. Effects of antisperm autoantibody on Rouleaux formation. *Biol. Reprod.*, 23 : 877, 1980.
- 19) 大頭敏文, 鎌田正晴, 森 崇英: 血中精子不動化抗体の受精阻害に関する生殖免疫学的研究。日産婦誌, 38 : 1057, 1986.
- 20) Friend, D. S., Orci, L., Perrelet, A. and Yanagimachi, R.: Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Biol.*, 74 : 561, 1977.
- 21) Johnson, M. H.: The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J. Reprod. Fert.*, 44 : 167, 1975.

Further studies of the blocking effect
of sperm-immobilizing antibodies
on human *in vitro* fertilization

**Shinichi Tsukui, Yoichi Noda, Aisaku Fukuda,
Hisashi Matsumoto, Kenichi Tatsumi
and Takahide Mori**

Department of Gynecology and Obstetrics
Faculty of Medicine, Kyoto University

According to our report, sperm-immobilizing antibodies (SIA) have an inhibitory effect on the sperm penetration through human zona pellucida. To investigate the effect of SIA more precisely, an *in vitro* zona penetration test was designed using IgG-fractions derived from sera with or without SIA activity and stored human zonae pellucidae. IgG-fractions were obtained from both SIA-positive and SIA-negative serum by the Protein-A method. When spermatozoa were incubated in the medium containing IgG-fraction

derived from SIA-negative serum, they could penetrate through stored human zonae pellucidae with high incidence (6/6=100%), whereas in SIA-positive serum the spermatozoa could hardly penetrate (1/6=17%). To clarify the mechanism of this inhibition, motile spermatozoa recovered from the medium after 3 hours' incubation were examined by the transmission electron microscope. Results showed that the rate of acrosome-reacted spermatozoa incubated with IgG-fraction derived from SIA-negative serum was 35%; using SIA-positive serum the rate was 18%. In contrast, the rate of acrosome-intact spermatozoa incubated with IgG-fraction derived from SIA-negative serum was 21%, whereas the rate using SIA-positive serum was 49%. Thus, SIA themselves seem to have an inhibitory effect on the sperm penetration through human zona pellucida. The mechanisms of such inhibition are unknown; however, one possible cause may be the inhibition of acrosome reaction.

(受付：昭和61年12月19日特別掲載)

Capacitation に伴って変化する精子付着抗原の 生物学的意義に関する研究

Studies on Biological Functions of a Sperm Coating Antigen Related to Sperm Capacitation

兵庫医科大学産科婦人科学教室 (主任: 磯島晋三教授)

石 田 雄 三

Yuzo ISHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College
(Director: Prof, Shinzo Isojima)

本研究では、ハムスター精巣上体精子に対するモノクロナール抗体 (Mab) を用いて精子の capacitation に伴って変化する精子付着抗原の生物学的役割について解析した。Mab (GHS-3) の対応抗原は、ハムスターの精巣上体尾部で産生、分泌され、尾部精子の中片部および尾部に付着する精子付着抗原 (GHS-3抗原) であった。GHS-3抗原は、精子の capacitation 過程において精子運動の活性化 (hyperactivation) に伴い、精子表面から急激に消失した。Capacitation 培地への GHS-3抗原の添加により、精子は不動化し、精子運動の活性化も抑制されたが、抗原を含まない培地への移行により、再び精子運動が回復し、活性化が誘起された。一方、すでに活性化した精子に抗原を添加しても、精子の運動性への影響は軽微であった。以上より、GHS-3抗原は精巣上体移行精子に付着する事で精子の capacitation に対して抑制因子として働き、精巣上体内で精子に capacitation が誘起されるのを防御しているものと考えられる。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 376-384, 1987)

緒 言

精巣精子は受精能力を持たないが、精巣上体精子は管腔内を移行する過程で受精能力を獲得する¹⁾。家兎²⁾ では精巣上体体部で、ラット³⁾ およびハムスター⁴⁾ では精巣上体尾部で初めて精子が受精能力を獲得する事が報告されている。

精子の精巣上体管内輸送中に起る精子細胞膜上の変化として、lectin⁵⁾ や抗体⁶⁾ に対する反応性の変化、膜電位の変化⁷⁾、膜中の disulfide グループの局在性の変化⁸⁾ などが報告され、また精巣上体各部位で採取した精子の表面蛋白の分析でも各採取部位により膜成分の構成が異なっていることが報告されている⁹⁾。これらの精子膜上の変化は精子の受精能獲得における機能的な成熟と深い関係があると考えられてきた。また、精巣上体分泌液の成分が各部位で異っている事や精巣上体管腔上皮より分泌された物質 (糖蛋白) が精子に付着して長く存在する事¹⁰⁾ から、精巣上体上皮から分泌されたある成分が精子

表面に結合することによつて精子の代謝機能になんらかの変化が生じ、これが精子の成熟過程に重要な働きを果している可能性が指摘される。しかしながら、精巣上体分泌液中のいかなる成分がこれに関与しているのか、あるいはその産生部位、精子付着様式、精子付着成分そのものの機能については未だ未解決である。一方、射精された精子は雌性器管内で一連の生化学的変化を受けた後、初めて受精が可能になるが、この現象は capacitation¹¹⁾ と呼ばれており、この capacitation 中に起る精子細胞膜上の変化として、精子の lectin、抗体に対する反応性の変化、細胞膜における cholesterol/phospholipid 比の変化、net negative charge の変化などが報告されている¹²⁾。近年、雄性器内での精子成熟過程や雌性器管内での精子の capacitation 過程における精子表面抗原の変化を解析するために、精子に対するモノクロナール抗体 (Mab) が作製され、単一抗原レベルでの精子表面抗原の分析が可能になってきた。香山ら¹³⁾ は、ハムスター精巣上体精子に対する多数の Mab を作製し、精

巢での精子形成段階から精巢上体での精子成熟過程における精子表面抗原の発現と精子膜上での抗原分布を解析した。

その結果、精子表面抗原には精巢での精子形成段階で発現する精子細胞膜抗原と、精巢上体での分泌成分が精巢上体移行精子表面に吸着して表現される精子付着抗原の二種類が存在することを報告した¹⁴⁾。今回はこれらの Mab の内、精子表面付着抗原を認識する Mab の 1 つ GHS-3 を用いて、GHS-3 対応抗原の雄性器管内での産生部位、精子表面での局在性、capacitation 過程での GHS-3 抗原量の変化ならびに capacitation 過程にある精子の運動性および受精能に対する GHS-3 抗体と、その対応抗原の影響について検討した。

実験材料および方法

1. 抗ハムスター精子モノクローナル抗体 (Mab GHS-3)

すでに香山ら¹³⁾が報告したように、成熟ハムスター精巢上体部精子を完全フロイントアジュバントと共に BALB/c (♂) マウスに免疫し、この免疫マウス脾細胞と同系マウス由来の骨髄腫株化細胞 (P3U1) を Polyethylene-glycol (PEG1000) の存在下で細胞融合し、型の如く hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 含有選択培地で融合細胞を選別した後、限界希釈法によるクローニング操作を経て、ハムスター精巢上体尾部精子と反応する 7 種の Mab 産生ハイブリドーマを得た。本研究ではこの内、精子付着抗原を認識する Mab 産生ハイブリドーマの 1 つ (GHS-3) を選んで実験に用いた。抗体として、GHS-3 ハイブリドーマの培養上清または Pristan 腹腔内注射した BALB/c マウスの腹腔内にハイブリドーマ細胞 (1×10^7 /匹) を移植し、得られた腹水から抗体を分離精製し実験に用いた。抗体は実験目的によつて硫酸塩析による γ -グロブリン分画またはイオン交換樹脂 (Mono Q) を用いた液体クロマトグラフィ (Pharmacia 社製 FPLC) により IgM 分画に精製し用いた。

2. 間接蛍光抗体法および酵素抗体法

a. 間接蛍光抗体法

ハムスターの精巢、精巢上体を 10% 等張ホルマリン液で固定 (3 日間) し、パラフィン包埋後マイクロトームにて $4 \sim 6 \mu\text{m}$ に薄切片組織標本を作製した。組織標本を PBS で洗浄後、第 1 抗体として GHS-3 抗体 (腹水 40 倍希釈) (60 分間, 37°C)、第 2 抗体として山羊抗マウス IgM (heavy and light chain) 血清 (Cappel 社) の Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated F (ab')₂ fragment の 40 倍希釈液をスライドガラス上で反

応 (30 分間, 37°C) させ、90% グリセロール (in PBS) にて封入後、Nikon 社製蛍光顕微鏡にて検鏡した。ハムスター精巢上体精子はスライドガラス上で乾燥させた後、メタノールで固定 (30 分間, 室温) し、上記と同様の方法で蛍光染色し検鏡した。

b. 組織酵素抗体法

酵素抗体法は Avidin Biotin Peroxydase Complex (ABC) 法を用い、Vectastain 社の ABCkit を使用した。組織標本は 0.3% 過酸化水素水含有メタノール液にて 30 分間前処理 (室温) し、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化し、ついで 10% 馬血清および 1% 牛血清アルブミン含有燐酸緩衝液で 30 分間処理を行ない、非特異的な染色を減じた。第 1 抗体には GHS-3 培養上清を使用し、室温 30 分間反応させ、第 2 抗体はビオチン化抗マウス IgG 抗体を 30 分間反応させた。ついで、Avidin Biotin Complex を 60 分間反応させた後、Peroxydase を反応させ、3 分後に蒸留水にて洗浄し、反応を停止させた。ヘマトキシリン染色を行ない、組織構造を明確にした上で検鏡した。

3. Capacitation 過程における GHS-3 抗原の変化

Capacitation 過程におけるハムスター精巢上体尾部精子上の GHS-3 抗原の変化を酵素抗体法を用いて解析した。精巢上体尾部より精子を採取し、この一部を 10% 等張ホルマリン液で固定 (24 時間) し、これを培養時間 0 分とした。残りは流動パラフィンオイル下で 15% 牛胎児血清含有修正 Tyrode 液 (15% FCS 含有 m-Tyrode 液) 中で培養し、capacitation を誘起させた。流動パラフィン下の小滴精子浮遊液は $400 \mu\text{l}$ とし、精子濃度は $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調節した。培養は炭酸ガス培養器内で施行し、培養条件は 37°C 、5% CO_2 in air とした (以後精子の培養はすべてこの条件でおこなった)。培養後、10 分、1 時間、2 時間、4 時間、5 時間後に培養液よりそれぞれ精子浮遊液 $200 \mu\text{l}$ を採取し、同様にホルマリン液で固定した。固定後、精子を PBS で 3 回洗浄後精子浮遊液 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) とし、ポリリジン処理した ELISA 用マイクロプレートに各 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し、プレートを 5 分、3,000rpm で遠心した。その後、各ウェルに 0.5% グルタルデヒド液 (in PBS) $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、10 分間室温放置後、プレートを PBS で洗浄し、100mM glycine 含有 1% BSA in PBS ($100 \mu\text{l}/\text{well}$) でブロックした後、第一抗体 (GHS-3 培養上清) を 60 分間、室温で反応させ、PBS で洗浄後、さらに第 2 抗体 (家兎抗マウス IgM 血清の Peroxydase conjugated IgG, 500 倍希釈液) を加え 60 分室温で反応させた。

PBS で洗浄後、Orthophenylene diamine (OPD) 溶液 ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS pH 5.0) $50 \mu\text{l}$ を加え、発色

させた。5分後、10% H₂SO₄ 溶液50 μ l を加えて反応を停止させ、マイクロ用 photometer (Corona electric) で吸光度 (JOD 500-660nm) を測定した。

4. GHS-3 抗体の精子 capacitation に及ぼす影響

GHS-3 抗体はマウス腹水より硫酸塩析により γ -グロブリン分画を分離し、これをイオン交換樹脂 (Mono-Q) を用いた液体クロマトグラフィにて IgM 分画とし、capacitation 用培養液で透析後実験に供した。精子はハムスタ精巣上体尾部より採取し、流動パラフィン下の15% FCS 含有 m-Tyrode 液中にて培養することによつて capacitation を誘起した。Mab GHS-3 を培養時間、0分、10分、2時間、5時間後に各精子浮遊液に加え (最終抗体蛋白濃度 5 mg/ml)、抗体の capacitation 過程に及ぼす影響について倒立顕微鏡下で精子運動の変化を観察した。受精実験に用いたハムスター卵は、発情後期の成熟雌ゴールデンハムスターに PMS50 単位を注射し、さらに54時間後に hCG50 単位を注射して過剰排卵させ、hCG 注射後17時間目に開腹して卵管より採取した。採卵後は、15% FCS 含有 m-Tyrode 液中に浮遊させ、そのままあるいは0.1% ヒアルロニダーゼで10分間処理し、卵丘細胞除去卵として実験に用いた。受精実験は精子 (5 \times 10⁶/ml) を上記培養液にて5時間前培養し、この間に各時間ごとに Mab GHS-3 を添加した。その後、各精子浮遊液に卵を加えてさらに2時間培養した後、卵を5%ホルマリン液で固定後、0.25%ラクモイド溶液で染色した後、位相差顕微鏡下で卵細胞内に侵入した精子の膨化頭部と tail の有無を判定した。

5. GHS-3 抗体対応抗原の採取

a. 抗体アフィニティカラムの作製

カップリングゲルとして CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 社製) を使用し、GHS-3 ハイブリドーマ移植マウスの腹水より硫酸塩析により γ -グロブリン分画を分離してカップリングに用いた。ゲル5g を 1 mM HCl で15分間膨潤させ、coupling buffer (0.1M NaHCO₃ pH 8.3 with 0.5M NaCl) でゲルを洗浄後すぐに抗体 2 ml (蛋白量88mg) を反応させた (室温, 120分)。次いで0.15M Tris 塩酸 buffer pH 8.3でゲルをブロックし (室温, 120分)、その後0.1M 酢酸 buffer (with 0.5M NaCl pH 4.0) と coupling buffer で交互に4, 5回洗浄し、最後に PBS で洗浄した。ゲルには抗体82mg が吸着し、1.2cm, 20cm のカラムを作製した。

b. 抗体アフィニティクロマトグラフィ

成熟雄ゴールデンハムスターより精巣上体尾部を摘出し、数カ所に小切開を加えた後、30分間 PBS 中に静置し、精子と共に管腔内分泌液を PBS 中に流出させた

後、この精子浮遊液を遠心 (3,000rpm, 5分間) し、上清を分離し、精巣上体尾部分泌液として実験に用いた。この精巣上体分泌液 (1mg/ml) 15ml を前述の抗体アフィニティカラムにかけ、4°C, over night で反応させた。カラムを PBS で十分に洗浄後 3M-KSCN in PBS (pH 7.2) で溶出させ、蒸留水で透析後凍結乾燥し、0°C 保存した。各溶出分画における抗原量の測定はマイクロプレートに精巣上体尾部分泌液または各溶出分画をコートして行なう ELISA 法によつた。

6. 抗原分析

a. ゲル濾過

精巣上体尾部分泌液 1ml を蛋白濃度 (15mg/ml) に調整し、Sephacryl S-300 (1.5cm 72cm) を用いてゲル濾過し、溶出 buffer に PBS を用いて 2ml ずつに分画した。各分画につき、マイクロプレートにコート (4°C over night) して行なう ELISA 法を用いて抗原活性を測定した。分子量の比較には標準標品として、Blue Dextran 2000 (2,000,000d), Thyroglobulin (669,000d), Ferritin (440,000d), Catalase (232,000d), Aldorase (158,000d), Albumin (67,000d) を用いた。

b. Western blotting

精巣上体尾部分泌液および精製 GHS-3 抗原を 5% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-Mercaptoethanol (5 \times 10⁻⁵M) の存在下で 100°C, 5分間加熱後、Laemmli の方法¹⁵⁾により 10% アクリルアミドゲルを用い、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行つた。電気泳動終了後、ゲルを取り出し、トランスブロッティング装置 (Bio-Rad 社) を用い、60V, 3時間 でニトロセルロース膜にトランスプロットした。泳動用 buffer は30% methanol 含有 25mM Tris-192mM Glycine buffer pH 8.3 を用いた。ニトロセルロース膜は 3% BSA および10% horse serum 含有 PBS にてブロッキング (4°C over night) を行なつた後、50mM Tris-200mM NaCl, pH 7.4 (TBS) で洗浄し、第一抗体として GHS-3 抗体 (培養上清) を反応 (室温 2時間) させ、第二抗体として Peroxydase conjugated anti Mouse IgM (100希釈) を反応後 (室温 2時間)、クロロナフトール (0.05% in TBS containing 0.01% H₂O₂) にて発色させ検討した。各反応ごとにニトロセルロース膜は TBS で洗浄した。

Negative control として、5D4 (マウス抗 hCG モノクロナール抗体で IgM であり、ハムスター精子に反応しない) および 1% BSA in PBS を使用した。

c. 酵素および過ヨウ素酸処理による抗原性の変化

精製 GHS-3 抗原を過ヨウ素酸 (in 50mM acetate buffer pH 4.0), mixed glycosidase (in 0.1M citrate

表 1 GHS-3 抗体の特徴

細胞融合	ハムスター精子免疫マウス 脾細胞-P3U1		
Ig クラス	IgM		
臓器特異性	精 巢		
	精巢上部	頭部	—
		体部	±
		尾部	+
肝, 脾, 腎, 脳		—	
種 特 異 性	ハムスター	+	
	マウス	—	
	ラット	—	
	ヤギ	—	
	ウシ	—	
	ヒト	—	

ハムスター, マウス, ラット: 精巢上部精子
ヤギ, ウシ, ヒト: 射精精子

buffer pH 4.0), trypsin (in 20mM Tris-HCl buffer pH 7.6), pronase (in 20mM Tris-HCl buffer pH 7.6) 処理し, 抗原活性の変化を酵素抗体法 (ELISA) にて検討した. まず, マイクロプレートの各ウェルに精製 GHS-3 抗原溶液 50 μ l (OD₂₈₀ 0.161相当) をコートし, PBS で洗浄後, 各ウェルごとに反応試薬を加えて実験を行なった. ヨウウ素酸は0.05mM 50mM の濃度に希釈し, その 50 μ l をウェルに加えて室温で15分間反応させた. Mixed glycosidase, trypsin, pronase は 0.01 μ g-10 μ g/ml の濃度に希釈し, その 50 μ l を加え 37°C, 20分間反応させた. 各ウェルを PBS で洗浄後 1% BSA in PBS でプレートをブロックした後, 前述した方法にしたがつて Mab GHS-3 (腹水40倍希釈), Peroxidase conjugated Rabbit anti mouse IgM (500倍希釈) を順次反応させ, OPD 溶液を加えて発色させた後, 吸光度 (JOD 500-660nm) を測定した.

7. GHS-3 抗原の精子 capacitation に及ぼす影響
GHS-3 抗体の影響を見た場合と同様に, 各 capacitation 過程 (培養時間 0分, 10分, 2時間, 5時間後) にある精巢上部尾部精子の浮遊液に最終蛋白濃度が 1 mg/ml となるように精製 GHS-3 抗原を添加し, 精子の capacitation に及ぼす抗原の影響につき検討した.

成 績

1. GHS-3 抗体の特性

表1は確立した GHS-3 抗体の特性をまとめたものである. GHS-3 抗体は臓器特異性では精巢上部体部, 尾部に, 種特異性ではハムスター精子に特異的であつた.

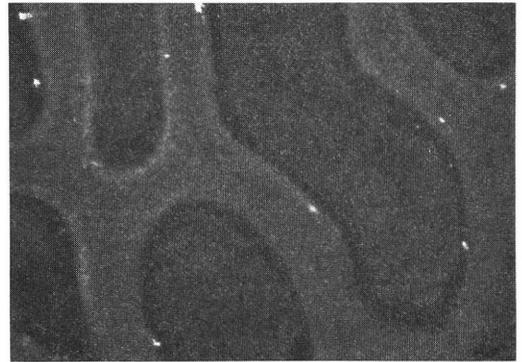


写真 1 精巢上部体部の遠位側 (尾部直前) の上皮に一部 GHS-3抗原の産生を認める. (蛍光抗体法) ×200

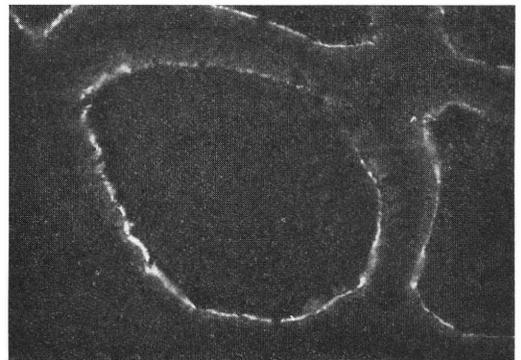


写真 2 精巢上部尾部の上皮全体に GHS-3 抗原の産生を認める. (蛍光抗体法) ×200

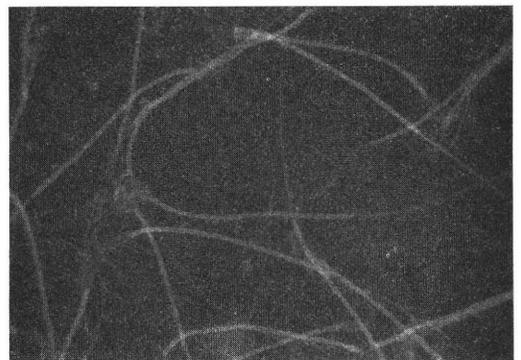


写真 3 精巢上部尾部精子: 中片部および尾部に染色像が認められる. (蛍光抗体法) ×400

2. GHS-3 抗原の産生と局在性

間接蛍光抗体法により, GHS-3 抗原は精巢, 精巢上部頭部には存在せず, 精巢上部体部の遠位側(尾部直前)で一部産生され始め, 尾部に近づく程産生量が増加し, 主に精巢上部尾部で産生されていた (写真 1, 2). 精子

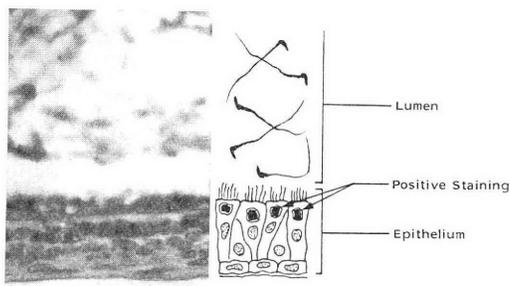


写真 4 精巣上体尾部の精巣上体管上皮に陽性像を認める. 抗原は, 細胞質(管腔側)に限局している. (組織酵素抗体法) ×200

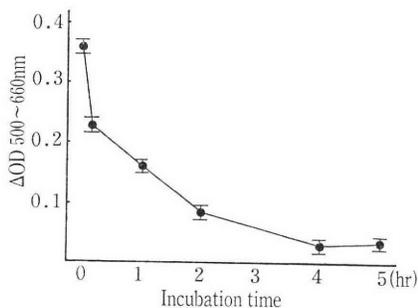


図 1 精子 capacitation 過程における精巣上体尾部精子上の GHS-3 抗原量の変化

については精巣, 精巣上体頭部および体部精子には蛍光を認めず, 精巣上体尾部精子にのみ蛍光を認め, 精子の中片部および尾部に局在していた(写真3). 組織酵素抗体法によると, GHS-3 抗原は精巣上体管上皮の主細胞(principal cell)の細胞質(管腔側)に限局して存在していた(写真4). 以上のことから, GHS-3 抗原は精巣上体尾部の精巣上体管上皮で産生され, これが管腔内に分泌され, 精巣上体管内を移行して来た精子の中片部および尾部に付着する精子付着抗原であることが証明された.

3. Capacitation 過程における GHS-3 抗原の変化
精巣上体尾部精子上の GHS-3 抗原量は精子の *in vitro* での培養時間と共に, すなわち, capacitation の進行過程と共に著しく減少した(図1). 培養時間3時間までの減少率は急激でハムスター精子の capacitation に必要な培養時間(3-4時間)¹⁶⁾とよく一致していた. しかし, 5時間培養後でもなお精子上に培養開始前の GHS-3 抗原量の約7%が残存していた.

4. Mab GHS-3 抗体の capacitation および受精への影響

精子の capacitation 培養液中に GHS-3 抗体を加えると, 培養後0分, 10分に添加した場合, 直ちに強い凝

表 2 GHS-3 抗体の精子 capacitation 過程への影響

抗体添加時間	Rouleau 反応	精子運動* 活性化	精子凝集
0分	inhibited	—	strong
10分	not inhibited	—	moderate
2時間	not inhibited	+	mild
5時間	not inhibited	++	slight
コントロール	not inhibited	+++	no age

コントロール: GHS-3 にかえて normal mouse serum を用いた

* 精子運動率 — 0% ++ 50-70%
± 0-30% +++ 70%以上
+ 30-50%

表 3 GHS-3 抗体の受精過程への影響

抗体添加時間	卵丘細胞 離散	透明体への 精子結合	受精
0分	—(0/10) ¹⁾	—(0/10) ²⁾	—(0/10) ³⁾
10分	—(0/10)	—(0/10)	—(0/9)
2時間	+(10/10)	+(10/10)	—(0/10)
5時間	+(10/10)	+(10/10)	—(0/9)
コントロール	+(10/10)	+(10/10)	+(10/10)

コントロール: GHS-3 抗体にかえて normal mouse serum を用いた

- 1) 卵丘細胞離散した卵数/使用卵数
- 2) 精子結合卵数/使用卵数
- 3) 受精卵数/使用卵数

集および運動抑制が生じ, 30分以内には不動化がみられ, その後培養でも精子運動は回復せず, capacitation の進行はおこらなかつた. 培養後2時間, 5時間後に抗体を添加した場合は, 0分, 10分に添加した場合に比して精子の運動抑制は明らかに少なく, その後引き続き培養することによって不動化された精子の一部に精子運動の活性化をみとめた. 不動化精子の活性化率は抗体を2時間後に添加した場合に比し, 5時間後に添加した場合の方が高かつた(表2). GHS-3 抗体の受精への影響については, 0分, 10分後添加の場合では精子の不動化が起こるため, 卵丘細胞離散, 透明体への精子結合を全く認めなかつたが, 2時間, 5時間後添加の場合は活性化精子による卵丘細胞の離散と透明体への精子の結合を認め, 抗体の添加時期が遅れるほど透明体への結合精子の数が増加した. しかし, いずれの時期に抗体を添加した場合にも受精に至った卵はなく, 受精率は0%であつた(表3).

5. GHS-3 抗体の精製と精製抗原の精子 capacita-

表 4 GHS-3 抗原の精子 capacitation 過程への影響

抗原添加時間	Rouleau 反応	精子運動活性化	運動抑制
0分	inhibited	—	severe
10分	not inhibited	—	severe
2時間	not inhibited	+	slight
5時間	not inhibited	≡	negative
コントロール	not inhibited	≡	negative

コントロール：GHS-3 抗原にかえて bovine serum albumin を用いた

精子運動率 — 0 % ≡ 50-70%
 ± 0-30% ≡ 70%以上
 + 30-50%

tion に及ぼす影響

GHS-3 抗体を用いた抗体アフィニティークロマトグラフィにより、精巢上体尾部分泌液により GHS-3 抗体対応抗原を精製分離した。精製抗原分画はもとの精巢上体尾部分泌液の GHS-3 抗原活性に比して ELISA 法による吸光度測定で蛋白量 (OD_{280nm}) あたり約 7 倍の上昇を示した。精子の capacitation 過程に精製 GHS-3 抗原を投与すると、培養後 0 分、10 分に添加した場合は精子に強い運動抑制が生じ、15 分以内に不動化がみられ、そのまま培養を続けても精子の運動性は回復しなかつた。抗原添加 1 時間後、培養精子を抗原を含まない新たな培養液に移すと、再び精子の運動性が増し、一部に活性化精子を認めた。しかし、抗原添加後 2 時間以上経過した培養精子は同様の操作でも運動性の回復を示さなかつた。培養開始後 2 時間、5 時間で抗原を添加した場合は、添加後すぐに軽度の運動低下がみられたが、不動化は起こさず、そのまま培養を続けることで活性化精子が出現してきた。2 時間に比して 5 時間後に抗原添加をし

た場合の方が、その後の培養による精子の活性化率は高かつた (表 4)。

6. GHS-3 抗原の性状分析

過ヨウ素酸処理、mixed glycosidase 処理では抗原活性の低下はみられなかつたが、pronase 処理で著しく抗原活性は低下した。

Trypsin でも pronase ほどではなかつたが、有意な抗原性の低下が起こつた (図 2)。精巢上体尾部分泌物を Sephacryl S-300 カラムを用いて分画し、各分画の GHS-3 抗原活性を ELISA 法により測定し、分子量を算定したところ約 60Kd であつた (図 3)。さらに 2 ME の存在下で精巢上体尾部分泌液と精製 GHS-3 抗原をそれぞれ SDS-PAGE 法で電気泳動し、これを Western Blotting 法によつてニトロセルロース膜に移し、抗原エピトープを含む分子サイズを検討したところ、GHS-3 抗体結合基は 20Kd から 100Kd まで多数の蛋白分子上に存在していた (図 4)。

考 察

GHS-3 抗原は、蛍光抗体法および酵素抗体法により、主に精巢上体尾部の上皮細胞から産生、分泌されていることが明らかになつた。一方、精巢から輸送されてきた精子は尾部に到達して初めて精子膜上に GHS-3 抗原を発現する。これらの事実は、GHS-3 抗原が精巢上体尾部で産生され、精子に付着する精子付着抗原であることを示している。GHS-3 抗原がなぜ精巢上体尾部精子の中片部と尾部のみに局在して付着するのかわ不明であるが、おそらく精子が精巢上体管内を輸送されてくる精子の成熟過程で、精子細胞膜上に GHS-3 抗原に対する受容体様の分子が発現されてくるものと考えられる。

また、精巢上体部の遠位側の一部上皮に GHS-3 抗原の産生を認め、精巢上体尾部に近くなるほど産生上皮

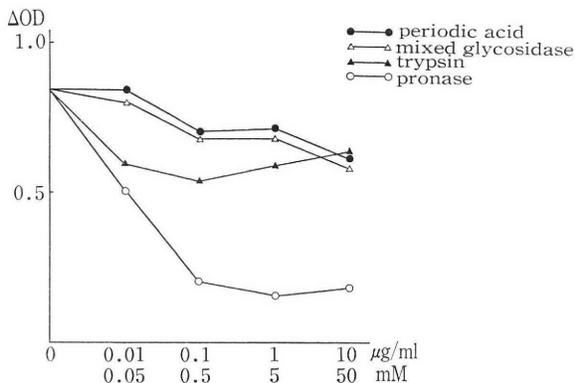


図 2 酵素および過ヨウ素酸処理による抗原性の変化

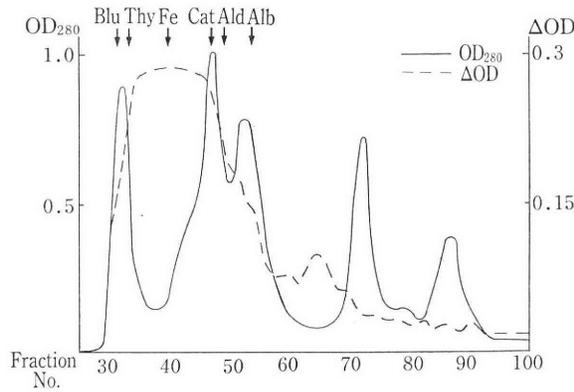


図3 Sephacryl S-300を用いた精巣上体尾部分泌液のゲル濾過
 Blu: Blue Dextran 2000, Thy: Thyroglobulin, Fe: Ferritin
 Cat: Catalase, Ald: Aldorase, Alb: albumin

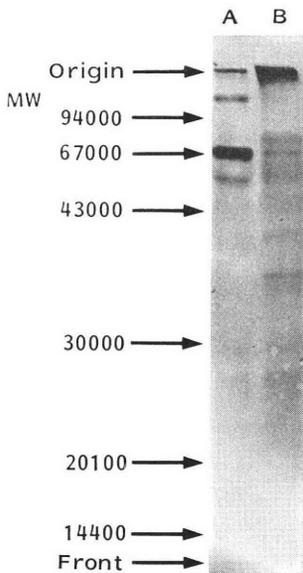


図4 Western blotting
 A: Epididymal Fluid, B: Purified fraction
 by immunoaffinity chromatography

の数が増加することから、機能面では体部と尾部の間に移行帯を形成していることが示唆された。精巣上体で分泌された物質が精子表面に吸着する現象は、すでに精子表面抗原に対する通常抗体を用いた分析⁶⁾や放射性同位元素を標識した精子表面原の分析¹⁰⁾により証明されているが、精子付着抗原が精子の生殖機能にいかなる役割を果たしているかについてはほとんど不明である。精子が精巣上体を通過する間に運動能および受精能を獲得することから精子の機能的成熟と深い関係があると考えられているが、Acott & Hoskins¹⁷⁾は牛精漿中に Sperm

Foward Motility Protein (FMP) を見つけ、これが精子運動の成熟を促進し、しかも FMP は精巣上体で産生され、精子に結合することを認めている¹⁸⁾。また、Rat 精子を精巣上体管と共に培養することで、精巣上体分泌物が精子に付着し、精子運動の促進がみられたという報告¹⁹⁾もある。一方、精漿中には精子の受精能を阻止する物質の存在が多数報告されており、これらの物質はいつたん運動能や受精能を獲得した精子が、卵に遭遇する前に capacitation を起こして受精に必要なエネルギーを消費してしまうのを予防する作用を有しているものと考えられる。Bedford & Chang (1962)²⁰⁾は、精漿起源で精子に吸着する受精阻害物質が capacitation 中に精子細胞膜から遊離することを報告しているが、これらの物質を decapacitation factor と呼んでいる。

今回、capacitation 過程における GHS-3 抗原の変化を ELISA 法を用いて解析したところ、図1で示したごとく capacitation の進行と共に精子表面から GHS-3 抗原が急激に減少していくことがわかった。また、capacitation 過程にある精子に GHS-3 抗体を投与すると、早期に投与したほど強い精子の凝集と運動抑制を認めたが、添加時間を遅らすと抗体の影響は減少した。この結果は GHS-3 抗原が capacitation の進行と共に精子表面より減少していく事実とよく一致するものである。しかし、抗原量が約7%にまで減少する培養開始後5時間目に抗体を添加した場合にも、精子の運動性と精子による卵丘細胞の離散と透明帯への精子結合を認めたものの、受精は全く認められず、なお精子受精能に対するなんらかの抗体の影響があつたものと考えられる。

GHS-3 抗原を capacitaion 過程に加えた場合にも同様に、capacitation の早期に加えたほど強い運動抑制が

みられ、後期に加えたほど運動抑制作用は軽微であった。GHS-3 抗原を加えて運動抑制の起こった精子も、洗浄後、抗原を含まない新たな capacitation 培地で培養を続ける内に再び精子運動が回復し、活性化精子を認めたことは、精子への GHS-3 抗原結合による精子の運動抑制は可逆的の反応で、GHS-3 抗原の離脱または不活性化により精子の capacitation 過程は再び進行するものと考えられる。しかし、十分に capacitation の進行した精子表面では GHS-3 抗原に対する受容体に不可逆的な変化が起こるものと考えられ、この時点で GHS-3 抗原を添加しても、もはや精子運動の抑制は起らなかった。Capacitation に伴う精子表面よりの GHS-3 抗原の消失が抗原分子の遊離によるものなのか、不活性化によるものなのかかわからないが、capacitation 過程における精子培養液中の GHS-3 抗原量を ELISA 法を用いて測定した結果では、上清中に GHS-3 抗原量の増加を認めることは出来なかつた(未発表)。GHS-3 抗原と精子との結合様式については今後解明されなければならないが、おそらく精子表面に GHS-3 抗原に対する特異的な受容体蛋白が存在し、精巣内や精巣上体尾部精子にはこれが発現され、この時点ではすでに獲得されているであろう精子の運動性と受精能の発現を、精巣上体尾部よりタイミングよく産生分泌された GHS-3 抗原が精子表面に結合することによって、時期尚早に capacitation が誘導されるのを予防しているものと考えられる。

謝辞：稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました磯島晋三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、多くの御助言をいただいた香山浩二助教授並びに繁田実先生に心から謝意を表します。

本論文の要旨は、第38回日本産科婦人科学術講演会、3rd International Congress of Reproductive Immunology (Toronto, 1986), The 5th International Symposium on Spermatology (Fujiyoshida, 1986) において発表した。

文 献

- 1) Bedford, J. M.: Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. In Handbook of Physiology, vol. 5, Endocrinology. American Physiological Society, Bethesda, MD: 303, 1975.
- 2) Bedford, J. M.: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. J. Exp. Zool., 163: 319, 1966.
- 3) Blandau, R. J. and Rumery, R. E.: The

relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. Fert. Ster., 15: 517, 1964.

- 4) Horan, A. H. and Bedford, J. M.: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. J. Reprod. Fert., 30: 417, 1972.
- 5) Nicolson, G. L., Usui, N., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Smith, J. R.: Lectin-binding sites on the plasma membrane of rabbit spermatozoa. J. Cell Biol., 74: 950, 1977.
- 6) O'Rand, M. G. and Romsell, L. J.: Appearance of regional surface autoantigens during spermatogenesis. Comparisons of antitestis and antisperm autoantisera. Devel. Biol., 75: 431, 1980.
- 7) Bedford, J. M.: Changes on the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. Nature, 200: 1178, 1963.
- 8) Huang, T. T. F.: Localization of thiol and disulfide groups in guinea pig spermatozoa during maturation and capacitation using bimeane fluorescent labels. Biol. Reprod., 31: 797, 1984.
- 9) Voglmayr, J. K.: Post-testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract., Biol. Reprod., 22: 655, 1980.
- 10) Brooks, D. E.: Selective binding of specific rat epididymal secretory proteins to spermatozoa and erythrocytes. Game. Res., 4: 367, 1983.
- 11) Chang, M. C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature, 168: 697, 1951.
- 12) Langlais, J. and Roberts, K. D.: A molecular membrane model of sperm capacitation and acrozome reaction of mammalian spermatozoa. Game. Res., 12: 183, 1985.
- 13) 香山浩二：卵からみた受精現象解明への単一クローン抗体の応用，日産婦誌，36：1359, 1984.
- 14) Ishida, Y., Kameda, K., Hiraoka, H., Shigeta, M., Koyama, K. and Isojima, S.: Alteration of surface of antigen of hamster spermatozoa during maturation in the epididymis. Acta. Obst. Gynaec. Jpn., 37: 2659, 1985.
- 15) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature., 227: 680, 1970.
- 16) Yanagimachi, R.: *In vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. Biol. Reprod., 3: 147, 1970.

- 17) Acott, T. S. and Hoskins, D. D.: Bovine sperm forward motility protein. *J. Biol. Chem.*, 253 : 6744, 1978.
- 18) Brandt, H., Acott, T. S., Johnson, D. J. and Hoskins, D. D.: Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biol. Reprod.*, 19 : 830, 1978.
- 19) Klinefelter, G. R. and Hamilton, D. W.: Organ culture of rat caput epididymal tubules in a perfusion chamber. *J. Androl.*, 5 : 243, 1984.
- 20) Bedford, J. M. and Chang, M. C.: Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am. J. Physiol.*, 202(1) : 179, 1962.

Studies on biological functions of a sperm coating antigen related to sperm capacitation

Yuzo ISHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hyogo Medical College
(Director : Prof. Shinzo Isojima)

In order to study the relationship between surface antigens and functions of spermatozoa, we analysed the sperm coating antigen by using a monoclonal antibody raised to epididymal spermatozoa in hamster (Mab GHS-3). Immunofluorescent staining and Immunoperoxidase method

showed that the antigen corresponding to Mab GHS-3 (GHS-3 Ag) was secreted from the epithelial cells of cauda epididymis and bound to the midpiece and tail regions of spermatozoa. The amount of GHS-3 Ag on spermatozoa assayed by ELISA were gradually decreased during incubation in capacitation medium. When Mab GHS-3 was added to spermatozoa in early stage of capacitation, sperm motility and their fertilizing ability were markedly reduced. When the GHS-3 Ag purified by immunoaffinity chromatography bound Mab GHS-3 was added in early stage of capacitation, sperm motility was drastically suppressed. However when they were transferred to the capacitation medium without the antigen, the sperm motility was recovered. When the antigen was added in late stage of capacitation, no adverse effect was observed.

GHS-3 Ag was present as a high molecular weight substance (about 600 Kd) in epididymal fluid, but Western blotting of GHS-3 Ag showed that the antigen determinant was distributed to multiple component with different molecular sizes ranged from 20 Kd to 100 Kd.

From these results, it was concluded that the GHS-3 Ag secreted from cauda epididymis bound to spermatozoa during their passage through epididymis and was functioning as a inhibitory factor of sperm capacitation in order to suppress the premature activation of spermatozoa in epididymal tract.

(受付 : 昭和62年1月26日特別掲載)

乏精子症の補中益気湯による治療と随証療法指針

Treatment of Hochuekki-to for Oligospermic Patients and Implication of Their Clinical Signs for Therapeutic Efficacy

京都府立医学科大学婦人科学教室

玉 舎 輝 彦 大 野 洋 介 岡 田 弘 二
Teruhiko TAMAYA Yousuke OHONO Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto
Prefectural University of Medicine

乏精子症の治療に補中益気湯(5.0g/日)を3カ月以上投与し、その有用性を検討した。対象も含み73例が解析対象となつた。改善度(有効・著効)は補中益気湯単独投与群で64.7%で、HMG単独・clomiphene単独投与群と有意の差はなかつた。HMGやclomiphene単独で6カ月以上投与された後に補中益気湯を併用すると、HMG併用群で75.0%、clomiphene併用群で59.1%の改善度が認められた。補中益気湯2カ月で約半数に改善例が認められた。妊娠例は補中益気湯投与群の改善例27例中にもみ3例(11%)が認められた。補中益気湯投与中に副作用は全くなく、安全度は100%であつた。

補中益気湯併用群と問診表(回収可能例)との関係から、乏精子症は普通の体格、汗が普通~多い、便通普通、疲労や倦怠感がないなどの男性に多い傾向を示した。改善度の高いのは汗の多い男性にみられ、また太り・やせ、便秘・下痢のある男性に高い傾向が認められた。個々の男性の体質をみると、改善例は21例中8例(38%)は虚証で、無効例は8例中2例(25%)に虚証が認められた。以上のことから、補中益気湯の証に無関係に投与しても有効性が認められるが、随証療法を行うことにより治療効果の高くなる可能性が考えられた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 385-390, 1987)

緒 言

乏精子症は不妊の原因でも20~30%を占め、その治療は困難なもの1つである。精子数増加や精子運動能の増加のため、ホルモン作用の面からclomiphene投与で、下垂体ゴナドトロピン分泌刺激^{1,2)}やゴナドトロピン投与³⁾により精巣刺激がなされてきた。また精巣での栄養・酵素系の賦活を介して乏精子症、特に精子運動率の改善にkallikrein^{4,5)}が用いられてきた。これら西洋医学的な薬剤は、乏精子症改善に有効であることが認められてきたが、妊娠率に対して十分な治療成果が得られないままである。

一方、近年漢方薬が注目をあびてき、十分な薬理作用が解明されていないが、中国の古い漢方医学の歴史的背景より男性不妊に漢方が用いられ、西洋医学的評価があたえられるようになってきた。その漢方の方剤に八味地黄丸^{6,7)}、人參湯⁸⁾、補中益気湯⁹⁾などがあげられ、これ

ら方剤により妊娠率が向上することが報告されている。

そこで、乏精子症の患者に補中益気湯を投与し、有効性、安全性および有用性を西洋医学的に作用機構の明らかなclomipheneやHMG投与群と比較検討し、さらにこれら薬剤と補中益気湯との併用投与による効果をも検討した。

また初診時の患者の訴えや自他覚所見の状態と補中益気湯投与による最終的な総合改善度との関係をレトロスペクティブに解析し、補中益気湯の証との関連性を検討した。

対象および研究方法

京都府立医科大学付属病院産婦人科不妊外来を訪れた患者が対象となり、試験期間は昭和60年6月1日より昭和61年6月30日までとした。不妊期間は2年以上とした。女性側では排卵障害(無排卵)以外の異常がない者、つまり通常行われている不妊検査で異常がない者が

表 1 精液分析とスコア基準

精子数	スコア
10×10 ⁶ /ml 未満	1
10×10 ⁶ /ml 以上 20×10 ⁶ /ml 未満	2
20×10 ⁶ /ml 以上 40×10 ⁶ /ml 未満	3
40×10 ⁶ /ml 以上	4

精子運動能 [Sperm motile efficiency (ME)] スコア	スコア
30(ME/分) 未満	1
30(ME/分) 以上50(ME/分) 未満	2
50(ME/分) 以上70(ME/分) 未満	3
70(ME/分) 以上	4

対象となった。排卵障害を訴える者は適宜治療を行い、正常排卵周期を回復した者を対象とした。そこで、この不妊女性の夫で既往疾患に陰囊水腫、停留辜丸、その他淋疾、副辜丸炎、ヘルニア、辜丸外傷、熱性疾患のない男性に補中益気湯（津村順天堂社製）を1回2.5g、1日2回計5.0gを3カ月以上投与した。この場合、男性を5群に分けた。すなわち、第1群は精子運動率および運動能の如何にかかわらず精子濃度が40×10⁶/ml以下で補中益気湯のみ投与したものとした（K群）。さらに補中益気湯に併用し、第2群は human menopausal gonadotropin (HMG, 150IU, 週2回) 投与群 (KH群) および第3群は clomiphene (25 mg/日) 連続投与群 (KC群) とし、第2群と第3群は少なくとも補中益気湯投与前6カ月以上投与され、精子濃度の増加、運動率の改善の有無にかかわらず妊娠しなかつた場合とした。これら患者の HMG または clomiphene 治療前の精子濃度は<40×10⁶/mlであった。さらに乏精子症精子濃度 (<40×10⁶/ml) で HMG のみ投与したものを第4群 (H群) とし、clomiphene のみ投与したものを第5群 (C群) とした。以上のように5群に分けて検討した。

また治療前に血中ホルモン値を可能な限り測定し、異常値の有無を知り、他の疾患との鑑別をした。なお血中ホルモン (prolactin, FSH, LH, testosterone) 値はRIAにて測定した。

効果判定は Eliasson Scores⁹⁾ を考慮し、そのうち精子濃度、精子運動能を表1に示したようなスコアを作り、評価し、さらに妊娠率からも検討した。

評価判定基準は以下のように行つた。精液検査は多くは分画射精の精子濃度の濃い方 (第1分画) を計測し、人工受精を行つたので、精液量は不確実である。妊孕性向上の検討の面では精子数と精子運動能が重要である。そこで表1の精子数と運動能の分類基準に基づき、著効は精子数と運動能の両者とも1段以上上昇し、さらにい

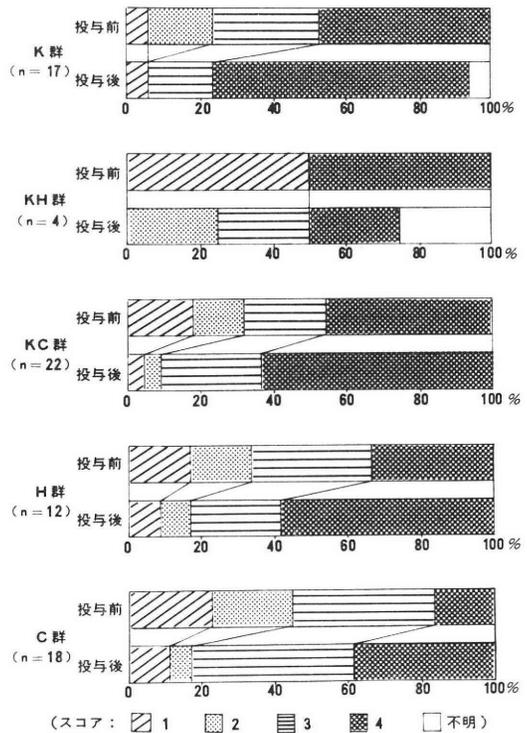


図 2 補中益気湯投与前・後における精子数のスコア変動

ずれか一方が2段階以上上昇したもの、および妊娠が成立したものとした。有効は精子数か運動能のいずれか一方が1段階以上上昇したものとした。無効は精子数と運動能が不変なものとした。

なお推計学的検定は χ^2 検定法により行つた。

結 果

1. 総合評価

補中益気湯単独投与群 (K群)、これに HMG 併用投与群 (KH群)、または clomiphene 併用投与群 (KC群)、HMG 単独投与群 (H群)、clomiphene 単独投与群 (C群) において投与前・後における精子数 (図1)、精子運動能 (図2) の変化をスコアで示し、さらに方法で述べられた基準により、著効・有効・無効に分けて表2に示した。

全症例数82例であるが、そのうち drop-out 9例を除く73例を対象とした。対象年齢 (平均)はK群33.5±4.6歳 (28~42歳)、KH群36.2±4.4歳 (32~41歳)、KC群33.7±3.8歳 (25~39歳)、H群35.3±3.9歳 (31~41歳)、C群35.2±3.7歳 (27~44歳)であり、全体34.5±4.0歳 (25~44歳)であった。群間に有意差はない。

有効以上の改善度をみると、K群64.7%、H群58.3%、

表 2 総合評価

	著 効		有 効		無 効		Drop out	副作用	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	例数	
K 群 (n=17)	2(1)	11.8	9	52.9	6	35.3	5	0	有効以上64.7%
KH群 (n= 4)	2(1)	50.0	1	25.0	1	25.0	1	0	有効以上75.0%
KC群 (n=22)	3(1)	13.6	10	45.5	9	40.9	2	0	有効以上59.1%
H 群 (n=12)	0	0	7	58.3	5	41.7	0	0	有効以上58.3%
C 群 (n=18)	3	16.7	10	55.6	5	27.8	1	0	有効以上72.3%

(K群：補中益気湯単独投与，KH群：補中益気湯と HMG 併用投与，KC群：補中益気湯と clomiphene 併用投与，H群：HMG 単独投与，C群：clomiphene 単独投与，() 内は妊娠成立例である.)

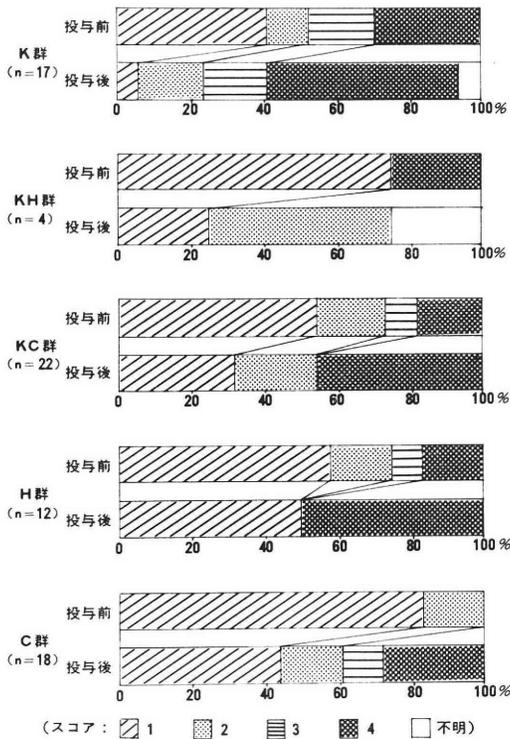


図 2 補中益気湯投与前・後における運動能のスコア変動

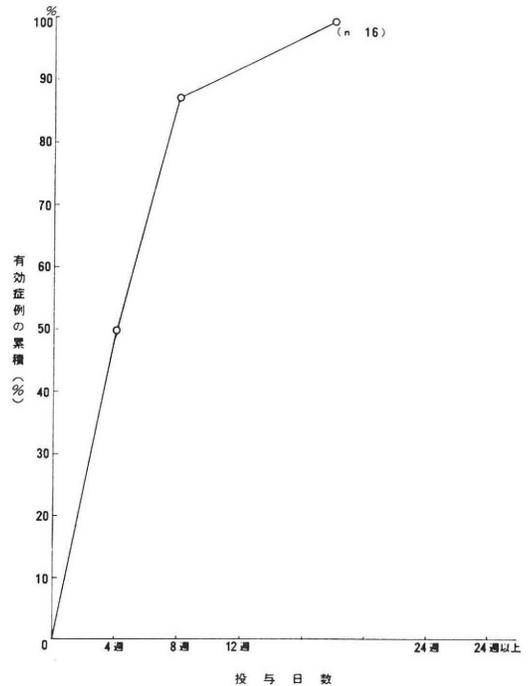


図 3 補中益気湯投与による有効例の精子数の効果発現日数 (補中益気湯単独・併用群の全体の変動)

C群72.3%で3者に有意の差はない。このことから補中益気湯単独でも HMG や clomiphene のようなホルモン分泌刺激剤と同じ改善度がみられるといえる。

一方，HMG や clomiphene で6カ月以上治療した後に補中益気湯を併用することにより，有効以上の改善度が KH 群75.0%，KC 群59.1%に認められた。従つて，ホルモン刺激剤と補中益気湯との併用が有効であることが明らかとなつた。また症例数は少ないが，妊娠例3例は補中益気湯投与群Kのみ認められ，有効以上をみた場合，K群で11例中1例(9%)，KH群で3例中1

例(33%)，KC群で13例中1例(7%)であり，全体で27例中(11%)であつた。

副作用は全くなく，安全度は100%であつた。

2. 補中益気湯投与による効果発現日数

補中益気湯投与(単独群，HMG 併用群，clomiphene 併用群)による改善群での精子数の効果発現日を図3に示した。補中益気湯投与日数とともに増加するが，約半数は1カ月後で有効と認められた。

補中益気湯投与による改善群での運動能の効果発現日数を図4に示した。単独群はほかの補中益気湯併用群の

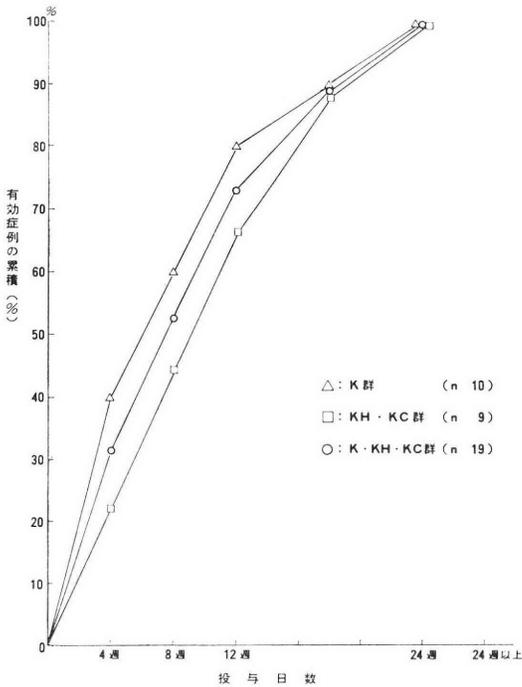


図4 補中益気湯投与による有効例の運動能の効果発現日数

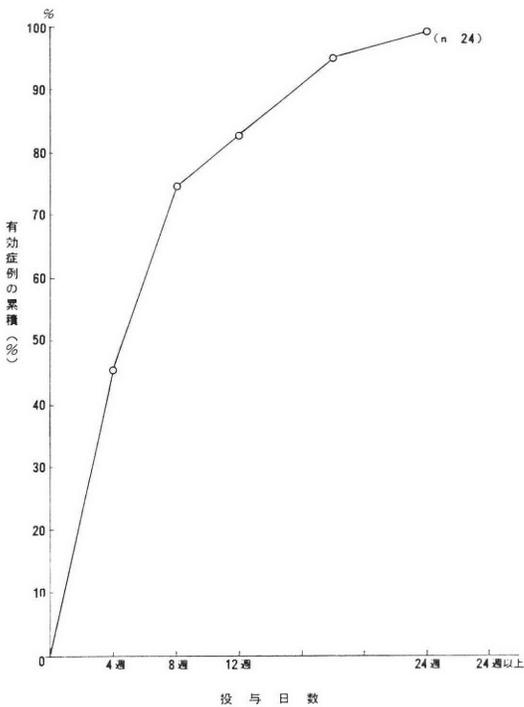


図5 補中益気湯投与による有効例の効果発現日数

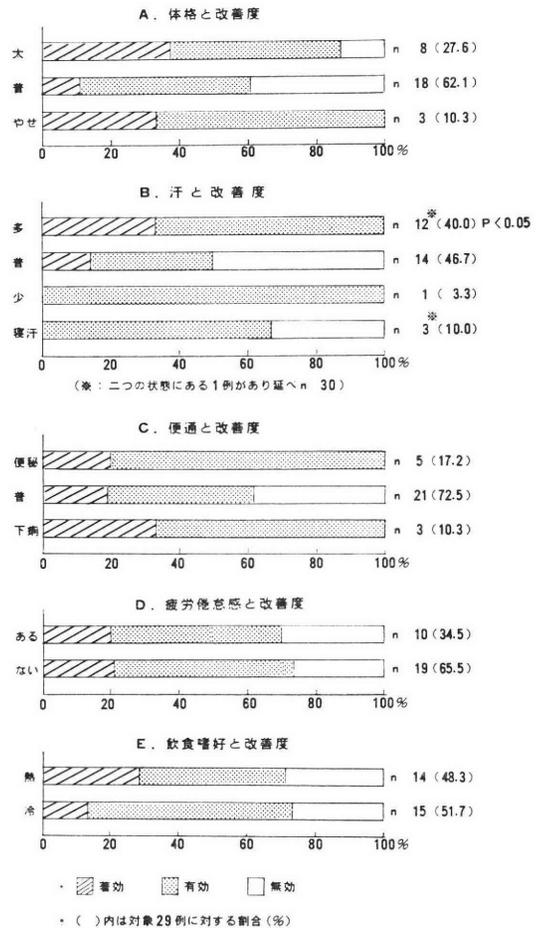


図6 補中益気湯投与群と問診表との関係

合計と比べ早期に改善する印象を受ける. 約半数は2カ月の投与で改善された.

また精子数・運動能のいかんを問わず, 改善例での効果発現日数を図5に示した. およそ約半数は1カ月の投与で改善された.

3. 補中益気湯投与による有効例と無効例の投与前の血中ホルモン値との関係

表3に示したように, 測定しえた症例での投与前の血中 FSH, LH, prolactin, testosterone の値には有効例と無効例に有意の差はなかった.

4. 漢方投与群と問診表との関係

問診表を回収できたものについて検討した.

体格と改善度(図6 A)をみると, 乏精子症は普通の体格の男性に多かった(62%). 太った人は改善度の高い傾向にあった. やせた人も例数が少ないが, 改善度の高い傾向にあった.

汗と改善度(図6 B)をみると, 汗が普通と多い男性

表 3 補中益気湯投与による有効例と無効例のホルモン値

	効果の有無	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosterone (ng/ml)	PRL (ng/ml)
K-1	有効	4.5	9.4	3.8	11.1
2	有効	—	8.2	3.1	6.5
3	有効	10.8	20.3	5.5	3.5
4	有効	7.1	8.5	3.5	9.0
5	着効	5.0	13.8	3.7	11.8
KH-1	着効	17.9	18.7	2.2	8.7
KC-1	着効	12.1	13.7	9.1	8.4
2	着効	7.3	13.0	7.4	11.6
3	有効	5.9	8.5	8.1	5.5
4	無効	10.7	16.4	5.5	10.0
5	無効	6.0	10.0	3.5	11.0
6	無効	4.9	7.2	6.4	8.2
7	無効	14.7	27.8	4.7	34.8
8	無効	8.5	22.2	8.8	11.3
有効群平均 (n=9)		8.8 (n=8)	12.7	5.2	8.5
無効群平均 (n=5)		9.0	16.7	5.8	15.1

に乏精子症が多かった (90%)。汗の多い人に改善度が高かった ($P < 0.05$)。

便通と改善度 (図 6 C) をみると、便通普通の男性に乏精子症が多かった (73%)。症例数が少ないが、便秘・下痢の腸症状のある人に改善度が高い印象を受けた。

疲労・倦怠感と改善度 (図 6 D) をみると、乏精子症は疲労・倦怠感のない人に多い (66%) が、疲労・倦怠感のある・なしと改善度とは無関係であった。

飲食嗜好と改善度 (図 6 E) をみると、熱・冷を好む傾向にあるものと乏精子症の頻度、改善度に差はなかった。

対象症例 29 例の中で、体格、汗の状態、便通状態、疲労・倦怠感、飲食嗜好の項目のほか、身長、体重、顔色の状態、動悸の有無など、総合的に判断して明らかに虚証の傾向にあると認められた症例については次のようであった。有効例は 21 例中 8 例 (38%) が虚証であり、無効例は 8 例中 2 例 (25%) が虚証であった。

考 察

補中益気湯は中国の金、元時代の四大家の一人である季東垣の「弁惑論」に出てくる処方、中を補つて元気を益すという意味からきて、広く体力の増強に用いられる処方である¹⁰⁾。

補中益気湯の処方の内容は 10 種類の生薬よりなり、作用と成分との関係を示すと、疲労回復促進・強壮作用に

人参、消化機能増進作用に人参・生姜、末梢血流改善作用に黄耆・当帰、免疫賦活作用に当帰、抗炎症・抗アレルギー作用に人参・当帰・柴胡・大棗・陳皮・甘草が含まれている¹¹⁾。総合的には胃腸の働きを助けて体力を増強させることとなる。補中益気湯が乏精子症に有効である理論的根拠は乏しいが、おおまかにみて体力を増強させることに基づくと推測しうる。

補中益気湯単独投与による乏精子症改善率は HMG や clomiphene 単独投与によるものとほぼ同じで、補中益気湯は乏精子症に有効であることが明らかとなった。また HMG や clomiphene 単独投与で 6 カ月以上治療された後に補中益気湯を併用することにより改善率が向上することから、補中益気湯はホルモン分泌刺激剤とは異なつた面より作用により効果を発現していると考えられる。また補中益気湯と HMG との併用投与による妊娠率の高い可能性が考えられるが、症例が少なすぎる。

補中益気湯投与 1 カ月で改善例は約半数に達するが、精子の成熟に約 3 カ月かかることから、補中益気湯投与は 3 カ月以上が望ましい。

補中益気湯の使用目標は体力が衰えて元気がなく、衰弱の傾向があり、食欲不振、倦怠、頭痛、悪寒、自汗、身熱、微熱のあるものに用いるとされ、さらに手足倦怠、言語に力がない、眼の光がにぶく力がない、口中に白沫を生ず、食味がない、熱い物を飲食することを好む、臍のところに動悸がある、脈が散大で力がないなどの点があげられている¹⁰⁾。これらは漢方的には虚証である。

回収できた問診表により次のように考察できる。体格と改善度をみると、太りに改善度が高い傾向があるが、太つた患者は本来漢方医学的にはさらに筋肉質太りや水太りなどに分類して検討を加える必要があるが、ここでは内訳だけ記載する。その内訳は太つた患者 8 例のうち筋肉質のもの 4 例 (著効 2, 有効 2), 水太りのもの 4 例 (著効 1, 有効 2, 無効 1) であつた。またやせに改善度が高く、虚証の傾向にあるといえる。補中益気湯の証からは水太り・やせ型のものが適応の傾向にあるといえる。

便秘・下痢の腸症状のある人に補中益気湯が有効である印象を受ける。下痢は虚証の状態としてとらえることができ¹²⁾、便秘は実証型の目標の 1 つとなることが多いが、弛緩性便秘であれば虚証としてとらえることができる¹²⁾。疲労・倦怠感は補中益気湯の使用目標となる最も重要な証の 1 つであるが、それがあつてもなくても有効性に関係はなかつた。飲食の嗜好で熱いものを飲食することを好むことも補中益気湯の証であるが、有効性に関して一定の傾向は認められなかつた。そのほか、皮膚の状態や動悸の有無、食欲についても問診したが、補中益

気湯の証にあてはまる状態は認められなかった。特に食欲については29例中28例に食欲があり、1例のみ食欲不振を訴えたが、この点だけ注目すれば補中益気湯の証にあてはまっていことになる。

補中益気湯は本来、体力が衰え、元気がなく、消化機能が衰えた虚弱（いわゆる虚証）の者に適応となるが、今回の問診の結果、証に無関係に投与しても有効性が認められた。しかし、補中益気湯による改善例の38%に、無効例の25%に虚証がみられることや、汗かき（自汗であれば虚証であるが、その点不明であった）、弛緩性便秘、やせに改善者の多い傾向があることから、虚証の傾向にあるものに有効である印象があり、補中益気湯の証にあつている面もある。したがって、漢方医学的観点よりとらえた随証療法を行うことにより、治療効果は高くなる可能性が考えられる。

文 献

- 1) Paulson, D. F., Wacksman, J., Hammond, C. B., and Wiebe, H. R.: Hypofertility and clomiphene citrate therapy. *Fertil. Steril.*, 26: 982, 1975.
- 2) 玉舎輝彦, 大野洋介, 二岡清昇, 中田好則, 東山秀聲, 岡田弘二: クロミフェンによる乏精子症の治療, 産と婦, 45: 1148, 1978.
- 3) Sina, D., Taubert, H. D. and Karschnia, R.: Human-Menopausal-gonadotropin bei der Behandlung infertiler Männer. *Dtsch. med. Wschr.*, 99: 2639, 1974.
- 4) Schill, W. B., Falco, O. B. and Haberland, G. L.: The possible role of kinins in sperm motility. *Int. J. Fertil.*, 19: 163, 1974.
- 5) 玉舎輝彦, 大野洋介, 和田圭介, 岡田弘二: Kallikrein の不妊症への試み, 日不妊誌, 30: 72, 1985.
- 6) 三浦一陽, 松橋 求, 牧 昭夫, 高波真佐治, 藤尾幸司, 中山幸一, 白井将文, 安藤 弘: 男性不妊症患者に対する八味地黄丸の臨床効果について, 泌尿紀要, 30: 97, 1984.
- 7) 奥山明彦, 並木幹史, 園田孝夫, 林 知厚: 男子不妊症に対する八味地黄丸および人參湯の効果, 泌尿紀要, 30: 409, 1984.
- 8) 光川史郎, 木村正一, 石川博夫, 折笠精一: 男性不妊症患者に対する補中益気湯の使用経験, 日不妊誌, 29: 458, 1984.
- 9) Eliasson, R.: Parameters of male fertility.

In Human, Reproduction, Conception and Contraception: p39, Harper & Row Publishers Inc., Hagerstown, 1973.

- 10) 山田光胤: 補中益気湯, 漢方処方応用の実際, p326, 南山堂, 東京, 1979.
- 11) 山田光胤: ツムラ 補中益気湯, p1, 津村順天堂, 東京, 1983.
- 12) 神戸中医学研究会: 補中益気湯, 中医処方解説, p14, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1982.

Treatment of hochuekki-to for oligospermic patients and implication of their clinical signs for therapeutic efficacy

Teruhiko Tamaya, Yousuke Ohno
and Hiroji Okada

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine

Seventy-three patients with oligospermia were treated with Hochuekkito (5.0 g/d), a traditional Chinese medicine. The improvement rate was 64.7%, similar to those in the controls receiving hMG (58.3%) or clomiphene (72.3%). A higher rate was obtained in those given hMG or clomiphene combined with Hochuekkito. Half of the patients showing improvement were observed within one month of the therapy. Three pregnancies (11%) were achieved among those showing improvement with Hochuekkito therapy. The safety rate was 100%.

The physical characteristics of the oligospermic patients were: Normal in physical structure, normal to abundant in sweating, normal bowel habit, and absence of tiredness and malaise. The patients showing improvement were sweating ($P < 0.05$) and tended to be obese or slim and constipated or diarrheal. Eight (38%) patients with negative physical characteristics were observed among 21 responders but two such patients (25%) were seen in the 8 non-responders. The clinical signs of oligospermic patients may be an indication for the efficacy of treatment with Hochuekkito.

(受付: 昭和62年1月8日特別掲載)

男性不妊症の妊孕能に及ぼす高単位 Kallikrein 製剤の効果について

Effects of High-unit Kallikrein on Fertilizing
Capacity for Male Infertility

山形大学医学部産科婦人科学教室

平山寿雄 長谷川剛志 広井正彦
Toshio HIRAYAMA Takeshi HASEGAWA Masahiko HIROI

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamagata
University School of Medicine

山形県立河北病院産婦人科

小田隆晴

Takahare ODA

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamagata
Prefectural Kahoku Hospital

男性不妊症患者48名に高単位(600 K.U.)の Kallikrein 製剤を約3カ月間経口投与し、投与前後で精液所見の各 parameter の変動, Gelatin substrate slide test にて精子先体酵素 acrosin 活性, Acridine orange fluorescence にて正常 DNA 精子比率の変化を比較検討した。精液所見に対する効果は、精液量、精子濃度、精子運動率では有意の増加は認められなかったが、精子運動能が改善し、直進運動精子数の有意の増加を認めた。また、受精現象で透明帯侵入に重要とされる acrosin 活性の増加、正常 DNA 精子比率の増加を認めた。これらのうち19例に配偶者の妊娠成立を認めた(妊娠成立率39%)。

以上より、Kallikrein 製剤の精子運動能賦活効果、精子受精能改善効果が示唆され、男性不妊症に対する有用性が確認された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 391-396, 1987)

緒言

男性不妊症の薬物療法として、1973年 Stüttgen¹⁾ が Kallikrein の有用性を報告して以来、Kallikrein-Kinin 系が造精機能、精子代謝、精子運動能促進作用に関与し、重要な役割を演じていることが幾多の研究者により確認されている^{2,3)}。臨床的にも男性不妊症の治療に広く応用され、その有用性が評価されている⁴⁻⁶⁾。

Kallikrein の雄性生殖に対する作用機序についてはまだ不明の点も多いが、Kallikrein は生体内に広く分布し、蛋白分解酵素として(図1) Kininogen に作用し、Kinin を遊離する⁹⁾。この Kinin は微量で強力な生理活性を有し、精子代謝を促進し、精子運動能賦活効果を

示すものと考えられている¹⁰⁾。更に、Kallikrein の受精現象に及ぼす影響については、*in vitro* で透明帯除去ハムスター卵の貫通検査を用いて、Kallikrein のヒト精子 Capacitation 時間の短縮¹¹⁾、受精率上昇効果¹²⁾が報告されている。

今回著者らは、Kallikrein の妊孕現象改善への影響を、高単位 Kallikrein 投与により、精液所見の変動のみならず、精子受精能面から approach した。受精過程において透明帯を溶解し卵への侵入に不可欠とされる精子先体酵素のひとつ acrosin 活性および正常 DNA 精子産生に対する Kallikrein の影響を *in vivo* にて検討し、若干の知見を得たので報告する。

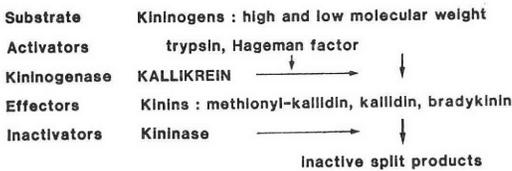
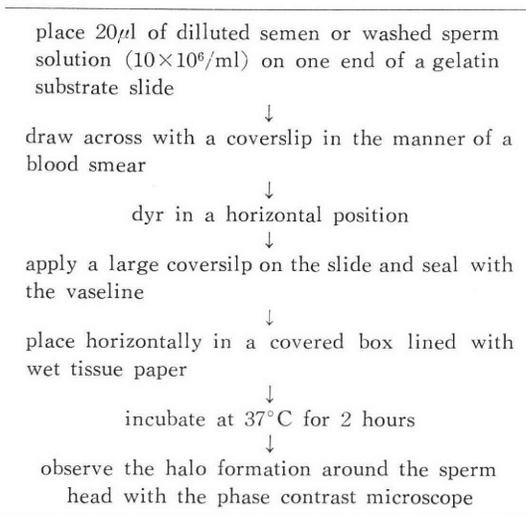


図 1 Components of the Kallikrein-Kinin System

表 1 Quality of Motility

4+	very rapid PROGRESSIVE motility
3+	rapid PROGRESSIVE motility (average)
2b+	sluggish PROGRESSIVE motility
2a+	rapid NON-PROGRESSIVE motility
1+	sluggish NON-PROGRESSIVE motility
<1	occasional spastic motion

表 2 Experimental Procedure of The Geratin Substrate Slide

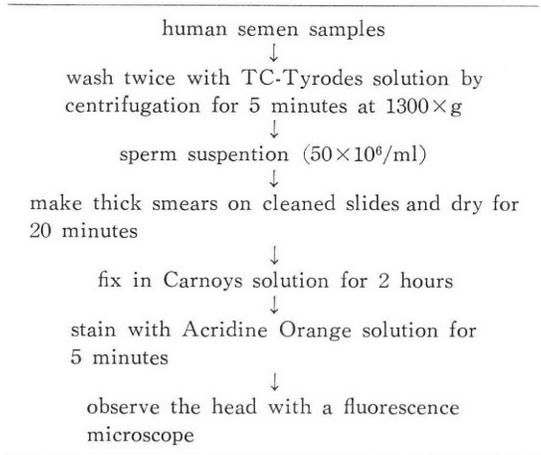


対象および方法

1. 対象

昭和60年4月4日より昭和61年3月までに、山形大学関連病院の山形県立河北病院、山形済生病院不妊外来を受診した乏精子症患者—精子濃度 40 \times 10⁶/ml 未満—48名を対象とした。これらの患者の配偶者は検索出来た限りにおいて、女性因子に異常は認められなかった。

表 3 Experimental Procedure of Acridine Orange Fluorescence



2. 方法

1) 投与方法

使用した Kallikrein 製剤は三和化学研究所より提供されたカルナクリン (Carnaculin) 1錠50 K.U. (Kallikrein Unit) で、1日12錠 (600 K.U./day) を約3カ月間投与し、その後3カ月間 follow up し、妊娠の有無を確認した。

2) 精液検査

精液検査は5日間禁欲後、用手法にて採取した検体を30分間室温静置後よく混和し、精液量、精子濃度、精子運動率、精子運動能を測定した。精子数、精子運動率は Makler counting chamber を用い算出し、精子運動能 (Quality of motility) は表1に示すように Berstein¹³⁾ の grade 0~+4 で表現し、総運動精子に対する +2b 以上の精子 (前進運動精子) の占める割合と、+3以上の精子 (正常運動精子) の占める割合を算出した。更に、精液の総括的妊孕性の評価として、表2に示すような妊孕指数 Fertility Index (F.I.) を算出し、Kallikrein 投与前後でその変動を検討した。

3) Acrosin 活性の測定法

精子先体に存在する蛋白分解酵素 acrosin は受精過程において透明帯を溶解し、精子の卵への侵入を促進させ、受精現象に重要な酵素と云われる¹⁴⁾。その acrosin 活性を gelatin substrate slide test (GSST) を用いて個々の精子の proteolytic activity を直接視覚的に観察し測定した^{15,16)}。概要は表2に示すが、gelatin substrate slide を作成し、精子浮遊液 (10 \times 10⁶/ml) 20 μ l を滴下塗抹し、37°C、2時間 incubate し、位相差顕微鏡にてスライド上個々の精子頭部に形成される円形の光輪 (protein free halo) を観察し、その直径を100精子

表 4 Seminalysis before and after treatment of Kallikrein (n=48)

seminalysis	mean ± S.E.M.	
	before	after
volume (ml)	2.1±0.3	2.3±0.1
sperm count (×10 ⁶ /ml)	23.1±6.9	38.7±7.2
sperm motility (%)	47.2±4.2	55.4±3.8
quality of motility		
≥ +2b (%)	43.6±4.5	54.7±3.7
≥ +3 (%)	25.8±3.3	33.8±2.4
Fertility Index	23.8±7.2	50.3±9.7

につき測定し, mean halo diameter (MHD) を算出して acrosin proteolytic activity (APA) の指標とした. この acrosin 活性を Kallikrein 投与前後で測定し, その変動を検討した.

4) Acridine orange 蛍光染色法

Acridine orange は核酸の染色に有用な塩基性蛍光色素で, 正常二本鎖 DNA と変性した一本鎖 DNA を選択的に染色し, ヒト精子染色に用いて, 正常 DNA 含有精子頭部を緑色に, 変性 DNA 精子頭部を赤色に染色すると報告されている^{17,18)}. そこで表 3 に示すように, ヒト精子を TC-Tyrocte solution にて洗浄後, 精子浮遊液 (50×10⁶/ml) を作製し, スライドガラスに塗抹室温乾燥後, Carnoys Solution (Methanol: glacial acetic acid=3:1) にて 2 時間固定, acridine orange (0.1%) 溶液 10ml, 0.1M citric acid 40ml, 0.3M Na₂HPO₄ 2.5ml の染色液 (pH 2.5) にて 5 分間染色後, 蛍光顕微鏡下に観察した. 励起フィルターは 490nm, カットフィルターは 530nm を使用し, 300 個の精子を観察し, 精子頭部の染色性より緑染精子比率を算出し, 正常 DNA 含有精子比率を検討した.

結 果

1. 精液所見の変動

表 4 に Kallikrein 投与前後の精液所見の変化を示した. 精子濃度は 48 例中 31 例 (64%) に増加傾向がみられたが, 有意な増加ではない. 精子運動率は 48 例中 35 例 (72%) に増加がみられ, 平均精子運動率は 47.2% から 55.4% と改善を示した. 精子運動能の変動は +2b 以上の運動精子数の増加は 48 例中 29 例 (60%) にみられ, +3 以上の運動精子数の増加は 48 例中 34 例 (70%) にみられた.

妊孕指数 F.I. の変動は 48 例中 39 例に F.I. の上昇がみられ, 投与後 F.I. の著明な改善をみている. 以上より, Kallikrein 投与前後の精液の parameter について

表 5 Effect of Kallikrein on acrosin proteolytic activity

sperm concentration (count/ml)	n	mean halo diameter (μm)	
		before	after
		≥ 20×10 ⁶ and < 40×10 ⁶	11
< 20×10 ⁶	9	12.1±1.3	16.3±1.8

(* p<0.01)

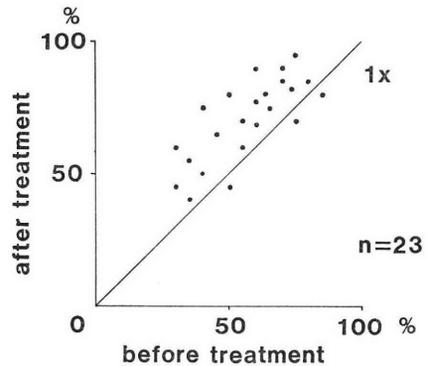


図 2 Percentage of green fluorescing sperm before and after treatment of Kallikrein

統計学的解析を行うと, 精液量, 精子濃度, 精子運動率では有意差は認められなかったが, 精子運動能についてみると, +2b 以上の運動精子数は P<0.05, +3 以上の運動精子数は P<0.01 で, また F.I. は P<0.01 で有意な増加が認められた.

2. Acrosin 活性の変動

表 5 に Kallikrein 投与前後の Acrosin proteolytic activity を mean halo diameter にて示すが, 精子数 20×10⁶~40×10⁶/ml の乏精子症患者では有意の MHD の増加を認め, Kallikrein 投与により精子先体酵素 acrosin の活性が賦活化されることが示された. また, 精子数 20×10⁶/ml 以下の乏精子症においても MHD の増加傾向を認める.

3. 正常二本鎖 DNA 精子比率の変動

図 2 に Kallikrein 投与前後の緑染精子比率の変動を示す. 表 6 示すよう, Kallikrein 投与により, 緑染精子比率は増加を示し, 精子数 20×10⁶~40×10⁶/ml の乏精子症患者では有意の増加を示している.

4. 妊娠率

表 7 に示すが, 対象症例 48 例のうち, Kallikrein 投与開始後 6 カ月までの妊娠症例は 19 例 (39%), 流産した 2 例を除いて全て健児を得た. 児の奇形はなく, 順調

表 6 Effect of Kallikrein on acridine orange fluorescence

sperm concentration (count/ml)	n	percentage of green sperm	
		before	after (%)
$\geq 20 \times 10^6$ and $< 40 \times 10^6$	15	65.8 \pm 2.7	78.2 \pm 3.5*
$< 20 \times 10^6$	8	52.8 \pm 4.8	60.3 \pm 3.9

(* P < 0.01)

表 7 Clinical efficacy of Kallikrein (600KU)

sperm concentration (count/ml)	conception rate
$\geq 20 \times 10^6$ and $< 40 \times 10^6$	12/28 (43%)
$< 20 \times 10^6$	7/20 (35%)
total	19/48 (39%)

に発育している。その内訳は軽度乏精子症 ($20-40 \times 10^6/\text{ml}$) で 28 例中 12 例 (43%)、重症乏精子症 ($20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満) で 20 例中 7 例 (35%) が妊娠した。

考 察

男性不妊症に対する有望な治療薬として Kallikrein は注目されているが、その作用機序および雄性生殖機構に及ぼす影響等はいまだ不明な点が多い。精液所見改善効果については幾多の報告がなされ²⁻⁸⁾、特に精子運動率の著明な改善がもたらされることが明らかにされている^{4,19)}。今回著者らも、精子運動能 (quality of motility) に対する改善を認め、精子無力症例において、+2b 以上の progressive motile sperm、+3 以上の rapid progressive motile sperm の増加を Kallikrein 投与により認めている。このことは Schirren ら²⁰⁾の報告とも一致し、Kallikrein 療法の重要な効果の一つであると思われる。In vitro においても、ヒト精液に Kallikrein を添加すると、精子運動率の増加や精子運動速度の増加みられることが明らかにされている²¹⁾。Kallikrein の精子運動能促進効果については、Kallikrein が前駆物質の Kininogen に作用し、生理活性の強い Kinin を遊離し、精子代謝を促進させると考えられ、Kininogen の添加²¹⁾、Kinin 不活性酵素添加²²⁾、Kallikrein 阻害剤添加²³⁾、および精漿中の Bradykin 分解酵素 DCP 活性と特異的阻害 SQ 14225 添加等²⁴⁾による実験より、精子運動能を賦活化する本態は Kallikrein により活性化させた Kinin であると考えられている。この Kinin は精子細胞膜の透過性変化に作用し、fructose 等の栄養物

吸収を亢進させたり²⁵⁾、prostaglandin を介した精子細胞内 cAMP 濃度の増大などより⁴⁾、細胞内代謝系を促進するものと推測される。

Kallikrein 投与により、精子先体酵素 acrosin 活性の増加を認めた。このことは、Kallikrein の受精過程に及ぼす影響の一つとして精子先体酵素の賦活作用が考えられ、精子の卵透明帯溶解ならびに卵への侵入を容易にし、精子受精能の亢進に働くものと考えられる。また、Acrosin は卵と精子の interaction のみならず、精子の子宮頸管通過²⁶⁾、先体反応²⁷⁾などの種々の生理作用を有することが示唆されている。精子の子宮頸管通過に際して、精子先体 acrosin が子宮頸管粘液中に存在する Kininogen に作用し、Bradykinin を遊離し、精子運動を賦活している可能性が報告されている²⁸⁾。これらの知見より、Kallikrein 投与により精子先体 acrosin 活性が高まると、受精過程の最初の関門である子宮頸管粘液の通過性が良好となり、運動を賦活化された精子は、子宮腔内、卵管内を容易に進み、最終的には卵透明帯溶解貫通性も向上するものと思われ、受精能力改善に作用するものと推測される。

Acridine orange 蛍光染色法は Tejada ら¹⁷⁾がヒト精子頭部染色に応用し、正常 DNA 構成をもつ緑染精子比率と妊孕性との関連について検討している。今回著者らも、Kallikrein 投与前後において、ヒト精子染色性を検討したが、緑染精子比率は投与後 3 カ月程度で増加を認め、Kallikrein の spermatogenesis level での改善効果を示しているものと思われる。

Kallikrein の spermatogenesis へ及ぼす影響は、Blood-Testis barrier 透過性亢進による Seltori 細胞賦活化²⁹⁾、末梢血管拡張作用による血流改善²⁰⁾などの報告をみ、睾丸への血流増加によるところが大きいと考えられている。Kallikrein 投与により、緑染精子比率の増加をみたことは、正常 DNA 構成を有す精子産生能促進、射精に至るまでの精子 DNA 変性減少に Kallikrein が関与するものと思われ、Kallikrein-Kinin 系の細胞分裂、組織修復保護作用が雄性生殖過程においても重要な役割を果していることが示唆される。

高単位 Kallikrein 療法の妊娠効果について、Schill ら³¹⁾は 37.8%、松本ら⁶⁾は 30.8%、小田³³⁾は 35% などの報告をみるが、今回著者らは 39.5% と満足すべきものであり、特に精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 前後の軽度乏精子症患者での効果が著明であった。精子数が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 前後では軽度乏精子症として放置される症例が多いが、数年に渡り不妊を訴える場合が多々みられる。著者らの今回の成績からみると、これらの症例では Kallikrein 療法の反応性が良好で、数カ月の投与にて高い妊娠率を得られる

ことから、軽度乏精子症に対してもより積極的な治療が望ましいものと思われる。

Kallikrein の経口投与量に関して、Schirren²⁰⁾ら、Moriwaki ら³²⁾は腸管からの吸収率が3~6%であると報告し、低単位の Kallikrein へ投与は無効であるとしている。欧米では 600K.U/day という高単位療法が一般的であり、今後本邦でも一般位療法が一般化するものと思われる。

結 語

男性不妊症に対する高単位 Kallikrein 療法は精子運動能の改善のみならず、精子受精能の改善、正常 DNA 構成を有する精子産生能の促進をもたらす。今後、本療法が一般化されるのを期待する。

文 献

- 1) Stuttgen, G.: Clinical substantiation of the effects of kallikrein. In: Kininogenases-Kallikrein 1: p.189, Schattauer, Stuttgart New York, 1973.
- 2) Schill, W. B. and Haberland, G. L.: Kinin-induced enhancement of sperm motility. Hopped-Seyler's Z. Physio. Chem., 355: 229, 1974.
- 3) Schill, W. B.: Influence of Kallikrein on sperm count and sperm motility in patients with infertility problems. In: Kininogenases-Kallikrein 2: p. 129 Schattauer, Stuttgart New York, 1975.
- 4) Schill, W. B.: Kallikrein as a thrapeutical means in the treatment of male infertility. In: Kininogenases-Kallikrein 4: p. 251, Schattauer, Stuttgart New York, 1977.
- 5) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility-a review. Androgia, 11: 77, 1978.
- 6) 松本 修, 羽間 稔, 高田健一, 富岡 収, 守殿貞夫, 石神襄次: 男性不妊症とカリクレイン—高単位カリクレイン錠の有用性について—, 日不妊誌, 25: 531, 1980.
- 7) 飯塚理八, 佐藤博久, 真田利男: 精液における Kallikrein-Kinin 系の意義, 産婦人科の世界, 33: 715, 1981.
- 8) 甲斐祥生, 井口 宏, 山田隆一: 男性不妊症に対する Kallikrein 製剤の精液所見におよぼす効果について, 日不妊誌, 26: 398, 1981.
- 9) Fritz, H.: The Kallikrein-Kinin system in reproduction-biochemical aspects. In: Kininogenases-Kallikrein 2: p. 9, Schattauer, Stuttgart New York, 1975.
- 10) Kaneko, S. and Moriwaki, C.: Effects of kinins and dipeptidylcarboxypeptidase on the motility of highly washed human sperm. J. Pharmacobio Dyn. 4: 443, 1981.
- 11) 齊藤 晃, 星 和彦, 京野広一, 対木 章, 桃野耕太郎, 鈴木雅洲: ヒト精子 Capacitation に対する Kallikrein の影響, 日不妊誌, 29: 173, 1984.
- 12) 星 和彦, 齊藤 晃, 京野広一, 対木 章, 桃野耕太郎, 長池文康, 鈴木雅洲, 柳町隆造: カリクレインのヒト受精に与える効果, 産婦の実際, 32: 767, 1983.
- 13) Bernstein, G. S.: Male factor, In: Reproductive Endocrinology, Infertility and contraception., p. 351. F. A. Davis Company Phyladelphia, 1979.
- 14) Zeneveld, L. J. D., Polakoski, K. L. and Schmucher, G. F. B.: Proteinase and Biological Contro, p. 683, Cold Spring Harbor, 1975.
- 15) Fdcso, G., Ginsberg, L. C., Oldford, G. M., Snoke, R. E. and Becker, R. W.: Gelatin-substrate film technque for detection of acrosin in single mammalian sperm. Fertil. Steril., 39: 548, 1983.
- 16) 長谷川剛志: Gelatin Substrate Slide 使用による Acrosin 簡易測定法の開発とその臨床応用に関する研究, 日産婦誌, 37: 2713, 1985.
- 17) Tejada, R. I., Mitchell, J. C., Narman, A. Marik, J. J. and Friedman, S.: A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange fluorescence. Fertil. Steril., 42: 87, 1984.
- 18) Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M. R.: Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science, 210: 1131, 1980.
- 19) Schill, W. B.: Influence of kallikrein kinin system on human sperm motility *in vitro*. In: Kininogenases-Kallikrein 2: p. 47 Schattauer, Stuttgart New York, 1975.
- 20) Schirren, C., Schill, W. B. and Hofmann, N.: The influence of kallikrein on semen parameters of subfertile patients. In: Kininogenases-Kallikrein 2: p.112, Schattauer, Stuttgart New York, 1975.
- 21) Schill, W. B., Falco, O. B. and Haberland, G. L.: The possible role of kinins in sperm motility. Int. J. Fertil., 19: 163, 1979.
- 22) Schill W. B.: Caffeine-and Kallikrein induced stimulation of human sperm motility: a comparative study. Andrologia, 7: 229, 1975.
- 23) Schill, W. B., Wallner, O., Palm, S. and Fritz, H.: Kinin stimulation of spermatozoa motility and migration in cervical mucus. In: human semen and fertility regulation men: p. 442, Mosby, Saint Louis, 1976.
- 24) Kaneko, S. and Moriwaki, C.: Dipeptidylcarboxypeptidase in the male reproductive

- organs, its biological and pathological status. J. Pharmacobio. Dyn., 4 : 175, 1981.
- 25) Schill, W. B. : Increased fructolysis of kallikrein stimulated human spermatozoa. Andrologia, 7 : 105, 1975.
- 26) Wallner, O., Schill, W. B., Grosser, A. and Fritz, H. : Participation of the kallikrein-kinin system in sperm penetration through cervical mucus *in vitro* studies. In : Kininogenases-Kallikrein 2 : p. 63, Schattauer, Stuttgart New York, 1974.
- 27) Meizil, S. and Lui, C. W. : Evidence for the role of a trypsin like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. J. Exp. Zool., 195 : 137, 1976.
- 28) 兼子 智, 小林俊文, 飯塚理八, 押尾 茂, 毛利秀雄 : ヒト精子の運動に及ぼすキニン母体蛋白質, キニノーゲンの影響, 日不妊誌, 30 : 470, 1985.
- 29) Rohen, J. W. and Buschhuter, H. : Karyometric measurements on the Seltori cell nuclei in kallikrein-treated albino rats. In : Kininogenases-Kallikrein 2 : p. 85, Schattauer, Stuttgart New York, 1975.
- 30) Tauber, A, Petrowicz, O., Erhardt, W., Musselmann, R. and Blumel, G. : Experimental study in rats on the influence of kallikrein on the testicular blood flow. In : Kininogenases-Kallikrein 4 : p. 225, Schattauer, Stuttgart New York, 1977.
- 31) Schill, W. B. : Improvement of sperm motility in patient with asthenozoospermia by kallikrein treatment. Int. J. Fertil., 20 : 61, 1975.
- 32) Moriwaki, C., Moriya, H., Yamaguchi, K. and Fujimori, H. : Intestinal absorption of pancreatic kallikrein and some aspects of its physiological role. In : Kininogenases-Kallikrein 1 : p. 57, Schattauer, Stuttgart New York, 1973.
- 33) 小田隆晴 : 男性不妊に対する高単位 Kallikrein 製剤の妊孕性に及ぼす影響, 山形県病医誌, 20 : 101, 1986.

Effects of high-unit Kallikrein on fertilizing capacity for male infertility

Toshio Hirayama, Takeshi Hasegawa and Masahiko Hiroi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Yamagata University School of Medicine

Takahare Oda

Department of Obstetrics and Gynecology,
Yamagata Prefectural Kahoku Hospital

The effectiveness of Kallikrein on fertilizing capacity in patients with oligozoospermia and/or asthenozoospermia was studied. High-unit kallikrein (Carnaculin, SANWAKAGAKUKENKY-USHO CO., LTD) was orally used in dose of 600 K. U. per day. Seminal analysis was performed. Acrosin proteolytic activity were measured before and after treatment. By gelatin substrate slide test and percentage of green fluorescing sperm by acridine orange fluorescence.

Although no significant difference was observed in sperm concentration and sperm motility, significant improvement was observed in quality of motility and fertility index.

Acrosin proteolytic activity and percentage of green fluorescing sperm was significantly increased in mild oligozoospermia, (20-40 million/ml) before and after treatment of high-unit kallikrein. Nineteen out of 48 cases were succeeded in pregnancy of their wives after treatment.

These results suggest that Kallikrein has an effect of improvement of qualitative sperm motility and fertilizing capacity, and that the agent might be useful to treat patients with male infertile.

(受付 : 昭和62年2月12日特別掲載)

若年婦人の月経に関するアンケート調査

—2,708人の分析結果より—

Menarche and Postmenarcheal Menstrual Condition of 2,708 Young Women

—Analysis of Questionnaire Survey—

神戸大学医学部産科婦人科学教室

山 辺 晋 吾 足 高 善 彦

Shingo YAMABE Yoshihiko ASHITAKA

片 山 和 明 望 月 眞 人

Kazuaki KATAYAMA Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine

初経および初経後の月経状態とその後の月経異常との関連性などを探る目的で、兵庫県下の25歳未満の未婚女性2,714名を対象にアンケート調査を行なった。調査結果は富士通 Facom M170を用いて統計学的に処理した。

アンケートの回収率は99.8%で、調査時には回答者の全員がすでに初経を経験していた。

平均初経年齢は12.8歳であり、月経周期が正順である婦人の平均周期は29.2日、平均持続日数は5.7日であった。

初経年齢に影響を及ぼす因子としては、遺伝素因と環境が考えられたが、初経後の月経異常は、環境、なかでも精神面に動揺を来す因子が最も大きな影響を及ぼしていると思われ、適切な指導の必要性が示唆された。また、副腎機能や生活リズムも初経後の月経異常に対して、少なからず影響することが推察された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 397-403, 1987)

はじめに

無月経をはじめとする月経異常を主訴として産婦人科外来を訪れる婦人の中には、初経あるいはその周辺の時期に何らかの月経異常を経験したことのあるものが数多くみられる。また、一旦、月経周期が確立した後に受験や失恋、環境の変化などが誘因となつて無月経に陥つたと思われる症例に遭遇する機会も少なくない。そこで、初経および初経後の月経状態とその後の月経異常との関連、あるいは月経異常に関与する因子などを探る目的で、アンケートによる調査を実施した。

方法・対象

昭和60年6月より約2カ月間にわたつて、兵庫県下の高校生、看護学生、看護婦を中心とした25歳未満の未婚女性2,714名を対象に、月経に関する無記名式のアンケー

ト調査を行なった。アンケートの内容は、表1に示すごとくで、身長、体重、初経年齢、初経後の月経の状態、月経異常の有無、生活状態、母、姉妹の月経の状態について質問した。アンケートの調査回答の回収率は99.8%で、これらを富士通 Facom M 170 型コンピュータに input し、統計学的に処理した。

結 果

1) 初経年齢

アンケートに回答した2,708人全員が本調査の時点までに初経を経験していた。図1に示したごとく、初経年齢の分布は9歳から18歳の間であつた。平均初経年齢は、 12.8 ± 1.1 歳 (Mean \pm SD) で、12.5歳までにほぼ半数が、また、15.5歳までに99.7%の人が初経を迎えていた。

月経が正順であると答えた人の月経周期は 29.2 ± 4.4

表 1 月経に関するアンケート

職業 _____ 年齢 _____ 身長 _____ cm 体重 _____ kg

- 現在のあなたの月経の状態について答えて下さい。
月経周期（月経が始まった日から次の月経の始まるまでの期間）
イ. 整 _____ 日型 ロ. 不順 _____ 日～ _____ 日位
- あなたの初経は何歳でしたか。
イ. _____ 歳 _____ か月 ロ. 初経がない
- あなたの出生時の体重をご存じであれば記入して下さい。
_____ g
- お母さんの初経は何歳でしたか。 _____ 歳
お母さんに月経異常はありましたか。（あり、なし、わからない）
- あなたのお姉さんや妹さんの初経の時期をご存じであれば記入してください。
_____ 歳 _____ か月
- 初経直後の数か月の月経の状態はいかがでしたか。
イ. すぐにほぼ _____ 日型の規則的な月経周期になった。
ロ. _____ か月間不規則であったが、その後、正常になった。
ハ. 初経後、現在まで不整である。
- 初経後の数か月を過ぎて、以下のような月経異常を経験したことがありますか。あればその印に○をつけて下さい。
a. 無月経（3か月以上月経のない状態）
b. 異常性器出血（イ. 10日以上続く性器出血, ロ. 月経の直前・直後や中間期などの月経以外の出血）
c. 月経周期の長いもの（40日以上3か月まで）
d. 月経周期の短いもの（25日未満）
e. 月経周期の不規則なもの
それは何歳頃の事ですか。 _____ 歳頃
上記のような異常のある前に次の様な事はありませんでしたか。
a. 体重の減少（_____ kg→_____ kg）
b. 体重増加（_____ kg→_____ kg）
c. 精神的動揺（イ. 家庭内のでき事, ロ. 受験に関して, ル. 環境の変化 ニ. 激しいスポーツ, ホ. その他 _____）
- あなた自身は毛深いと思いますか。（はい、いいえ）
“はい”と答えた人のみ答えて下さい。
a. 何歳頃から毛深くなったと思いますか。 _____ 歳頃
b. 体のどの部分が毛深いと思いますか。
イ. 顔面 ロ. 上肢 ハ. 下肢 ニ. 下腹部 ホ. 外陰部
..御協力ありがとうございました..

日 (Mean±SD) で、持続日数は5.7±2.2日 (Mean±SD) であった。

図2に調査時の身長、体重の分布を示す。身長は158.0±4.7cm (Mean±SD)、体重は51.4±5.4kg (Mean±SD) であり、いずれもほぼ正規分布を示した。

表2は初経年齢と身長に関連をみたものである。初経年齢が、Mean±SD の範囲に相当する10.5～15.0歳のものをA群、10.5歳未満のものをB群、15歳以上のものをC群とすると、B群とA群の間には現在の身長に有意の差は認められないが、A群とC群の身長を比較すると、C群の身長が有意 (P<0.05) に高いことが示され

た。

出生時体重や現在の身長、体重と初経年齢との間には相関はみられなかったが、姉妹の初経年齢とアンケート回答者の初経年齢との間には $Y=8.589+0.326X$ ($r=0.354$) の相関が認められた。

2) 初経直後の月経の状態

初経直後の月経の状態を図3に示した。約1/4に相当する26.0%が比較的早期より規則的な月経周期を有していた。初め不規則であったが、その後規則正しくなったものは37.2%にみられ、この群では、初経より規則的な月経を迎えるまでに平均11.3か月を要していた。

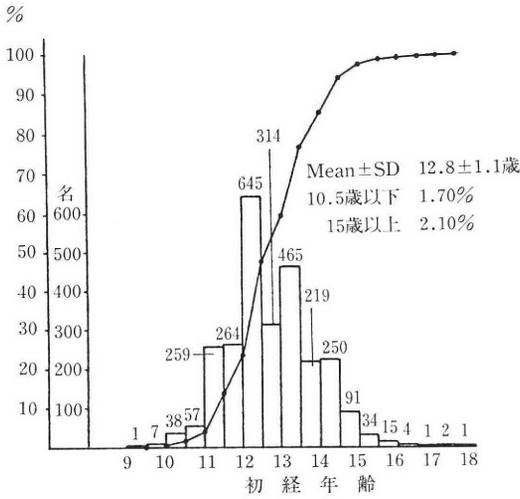


図 1 初経年齢の分布

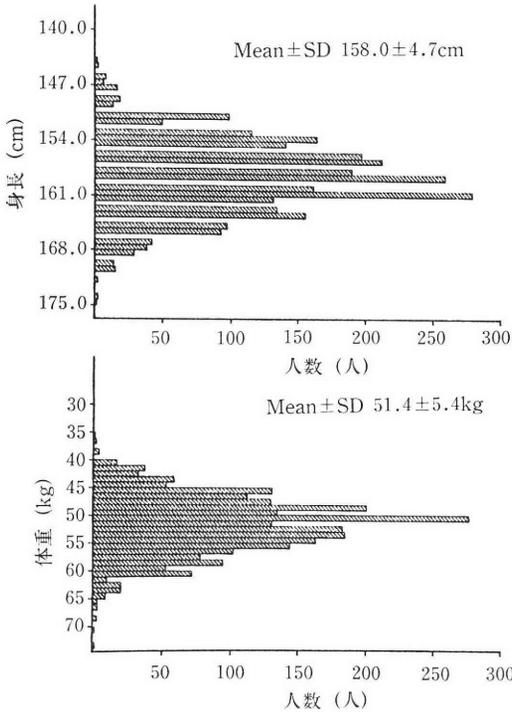


図 2 対象の身長・体重の分布

表 2 初経年齢と身長と比較

	A 群	B 群	C 群
初経年齢	10.5歳未満	10.5~15.0歳	15.0歳以上
人数	25人	2,553人	57人
平均	157.64cm	157.95cm	159.67cm
標準偏差	6.18cm	4.69cm	4.71cm
Minimum	145.0 cm	143.0 cm	152.0 cm
Maximum	168.0 cm	174.0 cm	171.0 cm

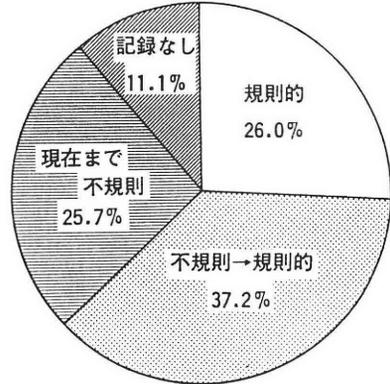


図 3 初経直後の月経の状態

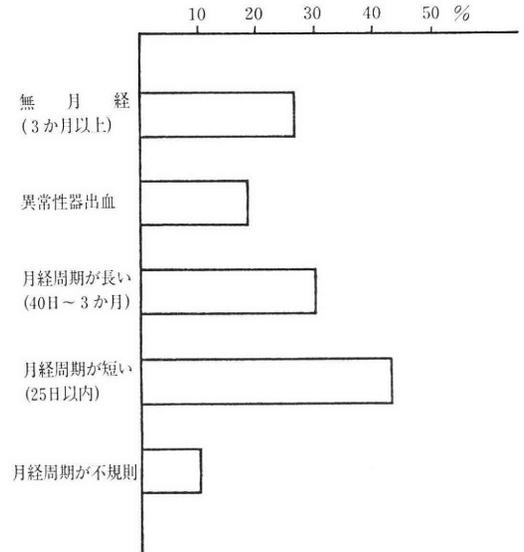


図 4 月経異常の種類

いったん規則性の月経周期を有した後、月経異常を経験したものは全体の51.3%に達した。その時の月経異常の種類を図4に示した。初経直後より月経周期が規則正しかった人と、最初は不規則であったが、やがて規則正しくなった人の、その後の月経異常を経験する確率は、それぞれ39.5%、51.6%で、初経直後より月経周期の規

則正しかった人が、後に月経異常を経験する確率は有意 ($P < 0.001$) に低値であった。

3) 月経異常の原因

初経後しばらくたってからの月経異常のなかで、無月経につき、本人がその原因であるかもしれないと考えて

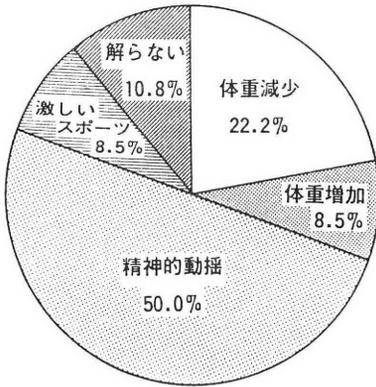


図 5 無月経のきっかけと思われるもの（無月経に陥った症例212例）

いるものの内訳を図5に示した。このなかで、精神的動揺と答えたものが約半数も含まれていた。

多毛に関する調査も行なつたところ。多毛について悩んでいると答えたものが、全体の21.6%にみられ、その部位は上肢、下肢の順に多かつた。また、それに気づいた平均年齢は12.3歳であつた。多毛のなかでも、血中のandrogen濃度を反映すると考えられる下腹部の多毛に悩んでいると答えた人の平均初経年齢は12.4歳で、全体の平均初経年齢の12.8歳と差を認めなかつたが、図6にその分布を示すように、13.5~14歳の間にもう1つのpeakが存在した。

下腹部に多毛がある人と、そうでない人の初経後の月経異常の発症頻度の比較を図7に示した。すべての項目で、多毛の人により高率に月経異常が認められたが、特に異常性器出血は有意の差 (P<0.02) をもつて自分が多毛であると思つている人に多いことがわかつた。

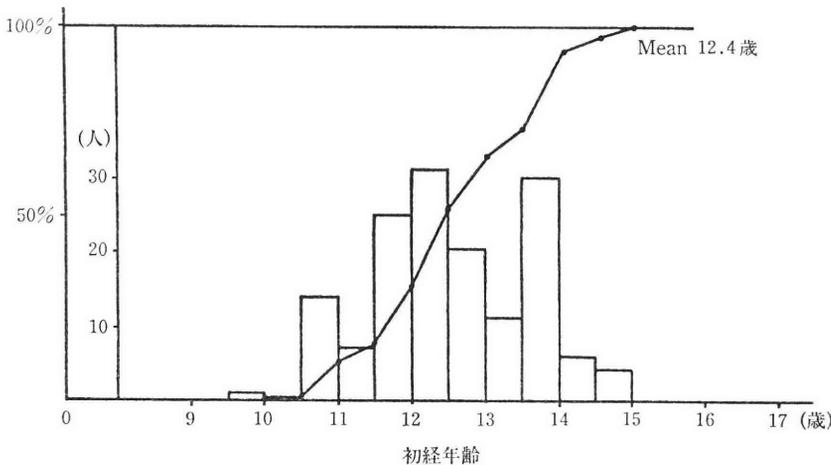


図 6 下腹部の多毛のある者の初経年齢

アンケート調査の対象者のうち、多かつた職業である学生 (1,633人)、看護婦 (833人) につき、月経異常の頻度を比較したのが図8である。すべての項目で、看護婦に月経異常の頻度は高いが、なかでも無月経、異常性器出血、周期が長い、周期が短いの項で、有意にその頻度が高率であつた。

考 案

近年、日常生活の欧米化につれ、初経年齢の低下が注目されてきたが、今回の調査での平均初経年齢は12.8歳であり、15.5歳までに99.7%が初経を経験していた。この成績は玉田の報告¹⁾に類似し、1960年以降、初経年齢の低下はほぼ停止状態にあるものと思われる。

また、ヨーロッパでの初経年齢の報告²⁻⁴⁾では、平均初経年齢は各国である程度の差はあるものの、ほぼ12~13歳であり、今回の調査の結果と同様の年齢であつた。

初経年齢と身長に関する調査では、現在の身長にはB群とA群の間に有意の差は認められず、rhesus macaqueを用いた Terasawaら⁵⁾の結果と同様であつた。したがつて、10.5歳以前の早い時期に初経を迎えても、かならずしも将来に身長の伸びが低下するというわけではなく、初経後にも伸びる可能性があることを示している。このことから、小学校低学年で初経を迎えても、他に基礎疾患のない場合には、特に治療の必要性を認めないのではないかと思われる。

またA群とC群では、C群の身長が高く、初経年齢が遅い場合では身長は高くなるのが明らかとなつた。この結果は中浜ら⁶⁾の報告とも一致するものであり、骨端線の閉鎖作用をもつ estrogen の分泌開始時期が遅れば、最終的には高身長になる可能性が高いことを示し

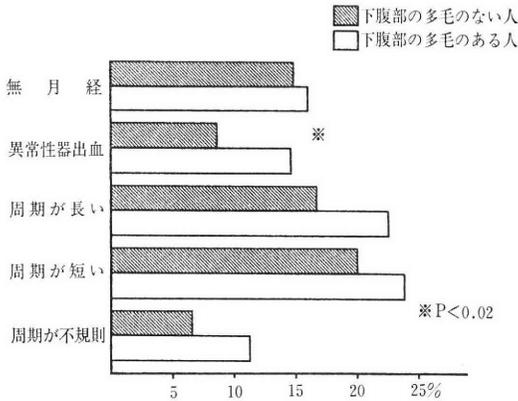


図 7 多毛（下腹部）と月経異常

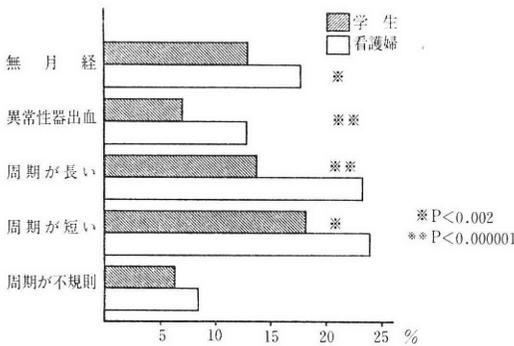


図 8 職業による月経異常の順度の差

ているものといえる。

初経年齢に関与する因子で、関連性が認められたのは姉妹の初経年齢のみであった。このことは、初経年齢には食生活などの環境因子に加え、遺伝因子も何らかの形で関わりをもっていることを推察させる。

アンケート調査の結果では、初経後直ちに規則性の月経周期を有したと答えたものが、全体の約 1/4 に相当する 26.0% にもみられた。規則性の月経周期を有するということは、排卵の存在を推測させるが、諸家の報告⁷⁻¹⁰⁾によると、初経後、排卵までには 1~5 年程度の期間が必要であるとされている。このことからすると、26.0% の大部分の婦人は無排卵性周期症であった可能性が高いのではないかと考えられる。しかし、いずれにしろこれらの婦人では、早い時期からの estrogen 値の上昇があつたこと¹¹⁾が想定され、規則的な月経を有しない婦人に比べ、視床下部一下垂体一性腺系の成熟はより進んでいるものと思われる。したがって、後に月経異常を経験する可能性が初経直後により規則的な月経周期を有している人ほど低い理由の 1 つはここにあるのではないと思われる。

月経異常の原因あるいは誘因ではないかと本人が考えているものなかで、精神的動揺、具体的には下宿生活の開始や引越などによる急激な環境の変化が最も多かった。Metcalf¹⁰⁾の報告によれば、親元を離れた若年女性では、初経後 5~8 年を経過してもなお、排卵は 40% の人にしかみられないとしている。また彼らの報告では、一般対照群が初経後 5 年で 80% の排卵率であつたとしていることも考えあわせると、環境の変化がいかに大きな影響を与えるかがわかる。

一方、月経異常に関する遺伝因子として、母親の月経異常との関連を調べたが、特に一定の傾向は見られず、Ben-Rafael¹²⁾も、母親の無月経と娘の月経状態とは関連がないとしていることより、初経後の月経異常には遺伝的素因はあまり影響しないと考えられた。

以上のように、初経後の月経異常には環境因子が大きな役割りを果たしており、特に精神的な動揺は思春期の月経状態を容易に変化させるものと推察される。したがって、われわれ産婦人科医や両親、教育関係者は、これらのことを念頭において、患者あるいは生徒、学生と接し、対話をもつていくことが必要であると思われる。

多毛に関する調査は、主に副腎性 steroid の月経に対する関与を推察しようとしたものである。多毛に気づいた年齢の平均は 12.3 歳であり、平均初経年齢の 12.8 歳に類似していたのは興味深く、adrenarche と menarche の時期がほぼ同時であることがわかる。

多毛のなかでも、最も血中の androgen 濃度を反映するものと考えられる¹³⁾下腹部の多毛についてみると、これらの婦人でも平均初経年齢が 12.4 歳で、全体のそれと差は認められないものの、2 峰性の分布を示した。

また多毛の人では、そうでない人に比べ、異常性器出血が有意に多いという結果を得た。

Adrenarche の時期には、副腎の網状帯層の発育が著明であること¹⁴⁾や、androgen は下垂体に対して、negative feed back 能を持つていることも考えあわせると、初経や、その後の月経が、時期を同じくして上昇してくる副腎性の steroid により、やはり修飾を受けるのであろうことが示唆された。

看護婦と学生の月経異常を比較すると、ほとんどの項目で看護婦に月経異常が多くなっている。これは夜勤のある看護婦の生活リズムの不規則さに起因すると考えられる。LH や FSH には日内リズムが存在¹⁵⁾し、特に思春期周辺の時期にその傾向が強い¹⁶⁾ことを考慮に入れておかねばならないだろう。

結 論

兵庫県下の 15 歳以上、25 歳未満の未婚女性 2,708 人を

対象にアンケート調査を行なった。平均初経年齢は12.8歳で、月経の正順な人の平均周期は29.2日、平均持続日数は5.7日であった。

初経年齢に影響を及ぼす因子としては遺伝と環境が考えられた。

初経後の月経異常は環境因子、特に精神面が大きな影響を及ぼし、適切な指導や相談が重要であると考えられた。

また、副腎機能や生活リズムも月経異常に少なからず関与することが示唆された。

今回の調査に御協力を賜った神戸大学医療技術短期大学部矢本義子教授、兵庫県立厚生専門学院久垣マサコ先生、兵庫県立柏原看護専門学院徳田千鶴子先生、陸上自衛隊阪神地区病院の皆様方に御礼申し上げます。

本調査の一部は文部省科学研究費補助金60480368, 同60570777ならびに日母おぎやあ献金によった。

参考文献

- 1) 玉田太郎：思春期の医学，産婦世界，27，749，1975。
- 2) Tanner, J. M.: Trend towards earlier menarche in London, Oslo, Copenhagen, the Netherlands and Hungary. *Nature*, 95, 243, 1973.
- 3) Widholm, O., Kantero, R. L.: A statistical analysis of the menstrual pattern of 8,000 Finnish girls and their mothers. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 14, 1, 1971.
- 4) Helm, P., Helm S.: Decrease in menarcheal age from 1966 to 1983 in Denmark. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 63, 633, 1984.
- 5) Terasawa, E., Nass, T. E., Yeoman R. R., D. Loose, M. D, Schults, N. J.: Hypothalamic control of puberty in the female rhesus macaquein, *Neuroendocrine aspects of reproduction*, p 149-182, Academic Press, New York 1983.
- 6) 中浜之雅，金沢元美，矢内原巧，荒木日出之助，中山徹也：初経発来周辺期における内分泌動態と身体発育について，日産婦誌，34，1465，1982。
- 7) Apter, D., Viinikka, L., Vihko, R.: Hormonal pattern of adolescent cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47, 944, 1978.
- 8) Lemarchand-Bérand, T., Luterey, M. M., Reymond, M., Rey, I.: Maturation of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in adolescent girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54, 241, 1982.
- 9) Treloar, A. E., Boynton, R. E., Behn. B. G., Brown, B. W.: Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Inter. J. Fert.* 12, 77, 1967.
- 10) Metcalf, M. G., Skidmore., D. S., Lowry, G. F., Mackenzie, J. A.: Incidence of ovulation in the years after menarche, *J. Endocrinol.* 97, 213, 1983.
- 11) Apter, D., Vihko, R.: Premenarcheal endocrine changes in relation to age at menarche. *Clin. Endocrinol.* 22, 753, 1985.
- 12) Ben-Rafael, Z., Blankstein, J., Sack, J., Lunenfeld, B., Oelsner, G., Serr, D. M. Mashiach, S.: Menarche and puberty in daughters of amenorrheic women. *JAMA*, 250, 3202, 1983.
- 13) Mammerstein, J., Lachnit-Fixson, U., Neumann, F., Plewig, G.: Androgenization in Women, p 75-124 Lectures and discussion of a symposium. *Excepta Medica*, Amsterdam, 1980.
- 14) Cutler, G. B. Jr, Lorianx, D. L.: Adrenarche and its relationship to the onset of puberty. *Feb. Proc*, 39, 2384, 1980.
- 15) Boyar, R. M, Kapen, S, Finkelstein, J. W.: Hypothalamic pituitary function in diverse hyperprolactinemic studies. *J. Clin. Invest.* 53, 1588, 1974.
- 16) Boyar, R. M., Finkelstein, J. W., Roffwarg, H.: Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *New Engl. J. Med.* 287, 582, 1972.

Menarche and postmenarcheal menstrual condition of 2,708 young women —Analysis of questionnaire survey—

Shingo Yamabe, Yoshihiko Ashitaka, Kazuaki Katayama and Matsuto Mochizuki
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University School of Medicine

A questionnaires survey, concerning menarche or postmenarcheal menstrual condition, was performed on 2,708 unmarried young women living in Hyogo Prefecture.

The ages of menarche were distributed between 9 and 18 years of age, averaging 12.8. There was no relationship between the menarcheal age and the body weight at birth, present body weight or present stature. But the height of women with late menarche (later than 15 y.o.) was significantly taller than that of women with average menarche (between 10.5-15.0 y.o.).

Twenty six percent of women had relatively regular menstruation just after the menarche, but 37.2% necessitated averagely 11.3 months before having regularity and others had continuous irregular mensruations after the menarche. The probability of having menstrual disorders in

later years were much higher in women with irregular menstruations just after the menarche than in women with regular menstruations.

The incidence of menstrual disorders in nurses was significantly higher than that in students. The most related factor they thought to be the

cause of menstrual disorders was enviromental change, especially psychological impact.

These results are thought to be useful for the daily clinical examinations of young women.

(受付: 昭和61年10月11日)

DYNAMICS AND KINETICS OF VARIOUS STEROID AND PROTEIN HORMONES, SOMATOMEDIN A, CYSTINE-AMINOPEPTIDASE AND CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN IN MATERNAL BLOOD DURING PREGNANCY AND THEIR MUTUAL RELATIONSHIPS

Satoshi USUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki 305, Japan
(Director: Prof. H. Iwasaki)

Abstract: Throughout the course of certain pregnancies, simultaneous concentration determinations were made for the following substances: pregnenolone (P_5), pregnenolone-sulfate (P_5-S), progesterone (P_4), 17α -hydroxyprogesterone ($17\alpha-OHP_4$), dehydroepiandrosterone (DHEA), testosterone (T), estradiol- 17β (E_2), estriol (E_3), cortisol, hCG, hCG- β , prolactin (PRL), growth hormone (GH), thyroid stimulating hormone (TSH), somatostatin (SRIF), somatomedin A (SOM A), cystine aminopeptidase (CAP) and carcinoembryonic antigen (CEA). The values obtained were compared with each other and with gestational age, on the basis of the Statistical Package for Social Science (SPSS). The purpose for this was to determine the manner in which these substances are interrelated with each other and obtain information regarding the maternal fetoplacental unit. The levels of various steroid hormones except for $17\alpha-OHP_4$ and DHEA and CAP showed basically the same secretion patterns of increase as pregnancy progressed and to be significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) correlated with each other and gestational age. In contrast, the protein hormones, SOM A and CEA, differed in the manner of their secretion throughout pregnancy, with only the PRL, GH, SOM A and hPL levels related somewhat to those of the steroids, CAP and gestational age. They were not found to be interrelated.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 404-415, 1987)

Introduction

It is well known that endocrine circumstances during pregnancy are transferred to the maternal fetoplacental unit from the hypothalamic-pituitary-ovarian axis during non-pregnancy and also influence the synthesis and secretion of substances such as steroids and gonadotropins in the body of a pregnant woman.

The effects of endocrine changes on the maternal fetoplacental unit are most conspicuous 7 to 9 weeks following the onset of the last menstrual period (LMP). Up until week 7 to 9, the corpus luteum of pregnancy

secretes estrogen and progesterone to protect and maintain implantation. The placenta reflects the fact that both protein and steroid hormones are concomitantly produced and secreted by the same cells, chiefly syncytiotrophoblastic cells, in a manner quite different from other endocrine glands. The production or secretion of protein hormones, receptors, steroid hormones and other substances in the maternal circulation during pregnancy cannot be understood as easily as in the non-pregnant state. Furthermore, these substances are closely and intricately related to the mother and fetus which in twin are related to each other in a

very complex manner. An understanding of the actual maternal fetoplacental function would greatly facilitate the measurement of all hormones, hormone-like substances and enzymes. But in consideration of the amounts of samples available, cost, time-consumption, available means for their assay and other factors, such measurements are not possible. However, in clinical practice, relatively easy hormone component assay routines are available. But such determinations in all cases do not necessarily provide information on the maternal fetoplacental functions. To assess actual physiological information regarding maternal fetoplacental functions and pregnancy well-being, it thus appears advisable to assume the values of undetermined substances by grouping the same secretion patterns together and then determining how they are related each other.

In the present research, simultaneous concentration determinations were made of steroids, protein hormones, SOM A, CAP and CEA throughout pregnancy in pregnant women as well as their dynamics, kinetics and level interrelationships with the course of gestation.

Materials and Methods

Twenty women during the course of normal pregnancy and following the vaginal delivery of normal babies at full term gestation were studied.

Blood samples were serially obtained from 10:00 to 12:00 h at two-week intervals from the 5th to 41st week of gestation and centrifuged at 3,000 r.p.m. for 10 minutes at 4°C. The sera or plasma were separately frozen at -20°C until assayed for steroid, protein hormone, hormone-like substance, enzyme and foreign protein content (described below). At the same time, urinary samples were also drawn for the E₃ assay.

Various steroids such as P₅, P₅-S, P₄, 17 α -OHP₄, DHEA, T, E₂, E₃ and cortisol were assayed by radioimmunoassay¹⁻⁹⁾.

hCG and hCG- β levels were determined by the method of Okumura et al. (1978)^{10,11)}.

PRL, GH and TSH were assayed using the Prolactin-Radioimmunoassay Kit (Daiichi-Radioisotope Laboratories Co., Ltd., Tokyo, Ja-

pan), HGH Radioimmunoassay Kit (Shionogiseiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) and TSH-RIABEAD™ (Daiichi Radioisotope Laboratories Co., Ltd.), respectively.

SRIF (somatotropin-release inhibiting factor, growth hormone inhibiting factor) in the plasma, following EDTA 2 Na-Tragyrol treatment according to the method of Saito and Saito (1982)¹²⁾, was centrifuged at 4°C and assayed.

SOM A was measured by radioreceptor assay (RRA) using human placental membranes and ¹²⁵I-SOM A according to Takano et al. (1975, 1977)^{13,14)} and Svan et al. (1977)¹⁵⁾. CAP and hPL were assayed by the Testopack method (Sankyoseiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan)¹⁶⁾ and ¹²⁵I-hPL RIA-Kit (Daiichi-Radioisotope Laboratories Co., Ltd.), respectively.

CEA was assayed by the CEA-Kit (Daiichi-Radioisotope Laboratories, Co., Ltd.).

The term "weeks of gestation" in this paper is defined as the weeks following the onset of LMP.

In the various analyses, the Student's t test was used. Interrelationships were determined with SPSS, using a FACOM M-380 computer (Fujitsu Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Results

Secretion patterns of each substance during pregnancy

The concentrations of P₅, P₅-S, P₄, 17 α -OHP₄, DHEA, T, E₂, E₃, cortisol, hCG, hCG- β , GH, PRL, TSH, SRIF, SOM A, hPL, CAP and CEA during the first, second and third trimesters of pregnancy are summarized in Table 1. The dynamic and kinetic secretion patterns are shown in Figs. 1-7. The total levels of P₅, P₅-S, P₄, T, E₂, E₃ and cortisol showed variable increase throughout gestation (Figs. 1-7), though the patterns of increase were similar to each other. In Fig. 1, the serum values of 17 α -OHP₄ show a mild gradual decrease up to week 29 but thereafter, increase gradually until full term. The levels of DHEA remained essentially the same throughout pregnancy (Fig. 2). In contrast, the concentrations of protein hormones showed various secretion patterns and only in a few cases were similarity noted in the patterns of increase and

Table 1 Concentrations of pregnenolone, pregnenolone-sulfate, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP₄), dehydroepiandrosterone (DHEA), testosterone, estradiol-17 β (E₂), estriol (E₃), cortisol, hCG, hCG- β , prolactin (PRL), growth hormone (GH), TSH, somatostatin, somatomedin A, hPL, CAP and CEA in maternal blood each at -15, 16-27, and 28-41 weeks of pregnancy. The values are means \pm SD.

		Gestational weeks		
		-15	16-27	28-41
Pregnenolone	ng/ml	1.1095 \pm 0.3668	1.3193 \pm 0.3837	1.6288 \pm 0.6188
Pregnenolone sulfate	ng/ml	170.10 \pm 41.66	279.45 \pm 95.30	379.31 \pm 97.29
Progesterone	ng/ml	61.45 \pm 39.89	81.30 \pm 32.34	180.15 \pm 62.61
17 α -OHP ₄	ng/ml	5.23 \pm 0.91	4.34 \pm 1.09	8.31 \pm 2.15
DHEA	ng/ml	5.72 \pm 2.16	5.72 \pm 0.79	8.24 \pm 2.60
Testosterone	ng/ml	1.08 \pm 0.31	1.47 \pm 0.69	1.65 \pm 0.70
	male	1.08 \pm 0.30	1.43 \pm 0.68	1.69 \pm 0.71
	female	0.91 \pm 0.23	1.22 \pm 0.46	1.56 \pm 0.68
E ₂	ng/ml	2.71 \pm 1.19	14.64 \pm 6.60	36.21 \pm 7.97
E ₃	ng/ml	0.45 \pm 0.36	2.30 \pm 1.34	23.95 \pm 11.88
E ₃ (urine)	mg/day	3.80 \pm 1.85	14.60 \pm 5.02	35.46 \pm 13.59
Cortisol	μ g/dl	14.21 \pm 5.48	24.82 \pm 12.82	36.21 \pm 8.77
hCG	IU/l	143084.93 \pm 107606.39	32210.50 \pm 13618.36	45627.42 \pm 33530.04
hCG- β	ng/ml	172.43 \pm 111.94	19.87 \pm 14.93	23.58 \pm 17.04
PRL	ng/ml	24.93 \pm 8.17	98.42 \pm 41.85	148.98 \pm 58.04
GH	ng/ml	—	11.63 \pm 3.51	13.56 \pm 2.79
TSH	μ g/ml	—	1.80 \pm 0.44	1.37 \pm 0.28
Somatostatin	pg/ml	6.13 \pm 0.88	6.52 \pm 0.64	5.87 \pm 0.90
Somatomedin A	U/ml	0.8523 \pm 0.0746	0.8998 \pm 0.1554	0.9479 \pm 0.0773
hPL	μ g/ml	—	4.2167 \pm 1.1933	7.17 \pm 1.5371
CAP	mU/ml	18.34 \pm 7.26	57.03 \pm 19.20	176.82 \pm 45.33
CEA	ng/ml	1.60 \pm 0.29	1.67 \pm 0.30	1.97 \pm 0.62

decrease.

The secretion levels of hCG and hCG- β peaked at week 10-13, and then receded (Fig. 5).

PRL levels increased with the time of gestation (Fig. 6), while those of GH, SRI F and TSH showed little change throughout pregnancy (Figs. 6 and 7). In Fig. 6 for SOM A, a hormone-like substance, there is a slight biphasic peak at both the first and third trimesters.

The concentrations of hPL and CAP increased gradually throughout gestation (Fig. 6).

The levels of CEA, a serum foreign protein, showed no remarkable change, though in some cases, normal values were exceeded as indicated by the results of the previous radioimmunoassay (0-2.5 ng/ml) shown in Fig. 7.

No significant differences between these

substances in male and female fetuses were detected. In Fig. 2, only testosterone levels are shown.

Levels of various substances in relation to gestational age

The manner in which the levels of the various substances considered in the present research are interrelated was examined (Fig. 8).

The levels of P₅, P₅-S, P₄, T, E₂, E₃, cortisol, PRL, SOM A hPL and CAP increased in essentially the same way as pregnancy progressed and were significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) related to gestational age. However, the levels of hCG, and TSH, had a negative relationship ($P < 0.01$, $P < 0.05$) to gestational weeks. The levels of α OHP₄, DHEA, GH, SRIF and CEA were not significantly related to gestational age.

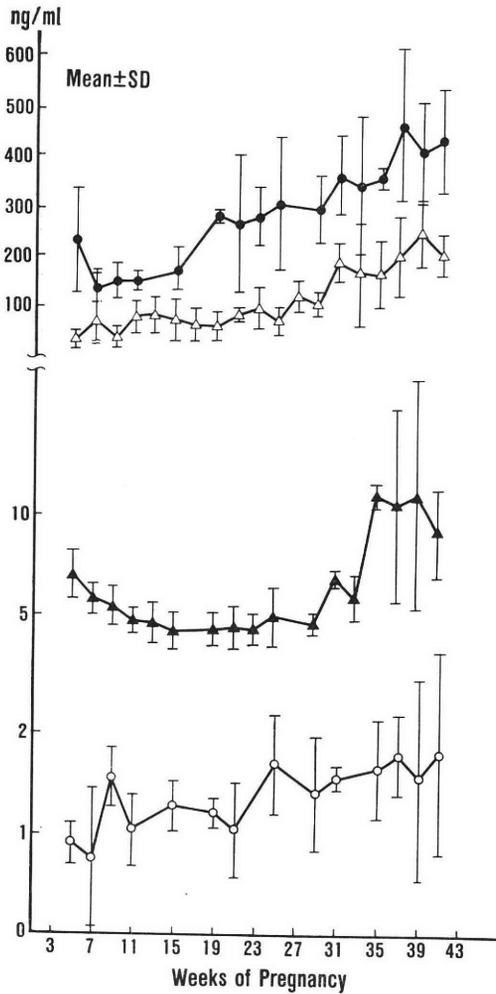


Fig. 1 Pregnenolone, pregnenolone-sulfate, progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone levels during pregnancy. Each value represents the mean \pm SD (vertical bars). \circ — \circ ; pregnenolone, \bullet — \bullet ; pregnenolone-sulfate, Δ — Δ ; progesterone, \blacktriangle — \blacktriangle ; 17 α -hydroxyprogesterone.

Mutual relationships

The levels of P_5 , P_5 -S, P_4 , T, E_2 , E_3 and cortisol showed close mutual relationships ($P < 0.01$, $P < 0.05$) related to each other while those of 17 α -OHP₄ and DHEA with those of P_5 , P_5 -S, P_4 , T, E_2 , E_3 and cortisol were found to be unrelated.

PRL concentrations showed significant ($P < 0.01$, $P < 0.05$) correlation to P_5 , P_5 -S, P_4 , E_2 and CAP, and that of hPL significantly

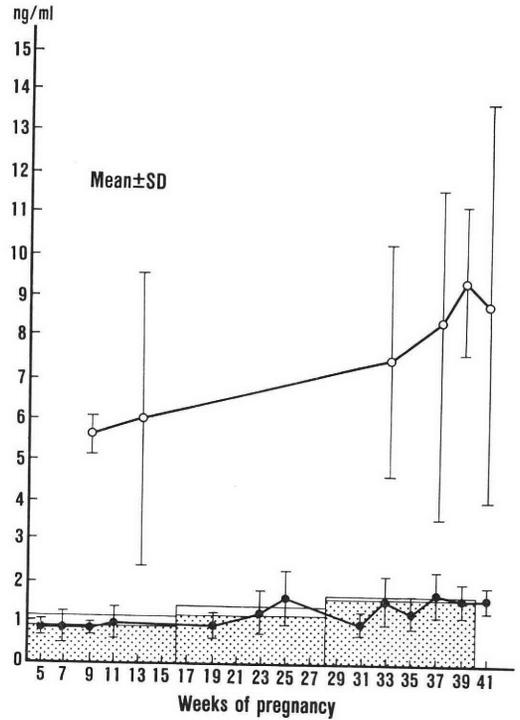


Fig. 2 Dehydroepiandrosterone and testosterone levels during pregnancy. Each value represents the mean \pm SD (vertical bars). \circ — \circ ; dehydroepiandrosterone, \bullet — \bullet ; testosterone. \square ; mean testosterone levels in male fetus. \dots ; mean testosterone levels in female fetus.

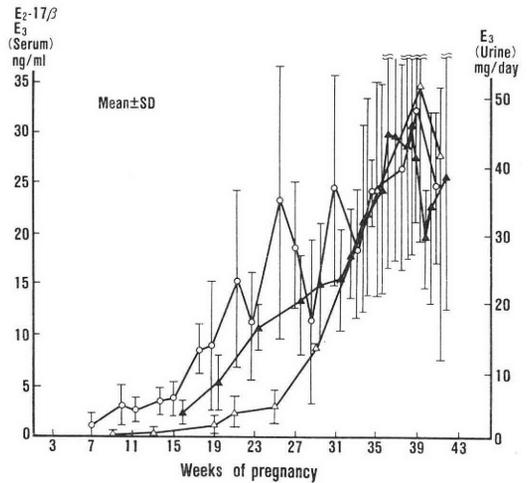


Fig. 3 Estradiol-17 β and estriol levels during pregnancy. \circ — \circ ; serum estradiol-17 β , Δ — Δ ; serum estriol, \blacktriangle — \blacktriangle ; urinary estriol.

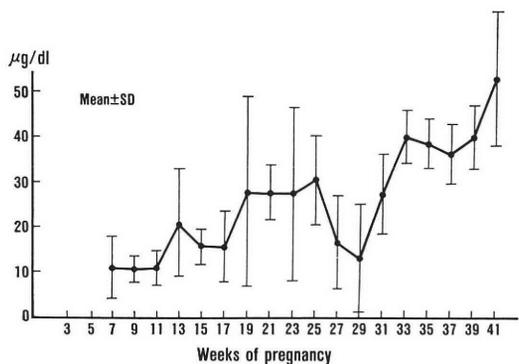


Fig. 4 Cortisol levels during pregnancy. Each value represents the mean \pm SD (vertical bars).

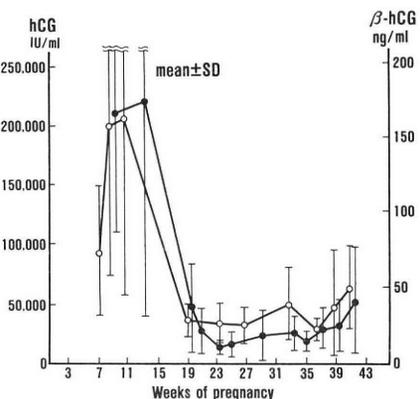


Fig. 5 hCG and hCG- β levels during pregnancy. Each value represents the mean \pm SD (vertical bars). \circ — \circ ; hCG, \bullet — \bullet ; hCG- β .

($P < 0.01$, $P < 0.05$) to the levels of P_5 -S P_4 , E_2 , E_3 , cortisol and CAP.

The levels of GH were related to those of T ($P < 0.01$), whereas those of SOM A significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) to P_4 , E_2 , cortisol and CAP levels.

SRIF concentrations showed a negative relation ($P < 0.05$) to those of cortisol.

CAP values, usually an index of placental function, were closely ($P < 0.01$, $P < 0.05$) related to P_5 , P_5 -S, P_4 , T, E_2 , E_3 , cortisol, PRL, SON A and hPL levels, but negatively related ($P < 0.05$) to the values of hCG and TSH.

17α -OHP, DHEA and CEA concentrations were not significantly correlated with those of other substances

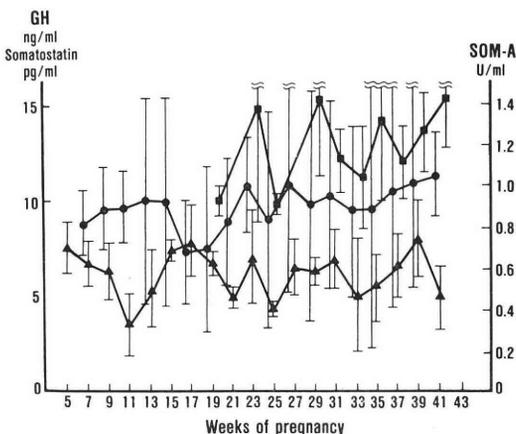
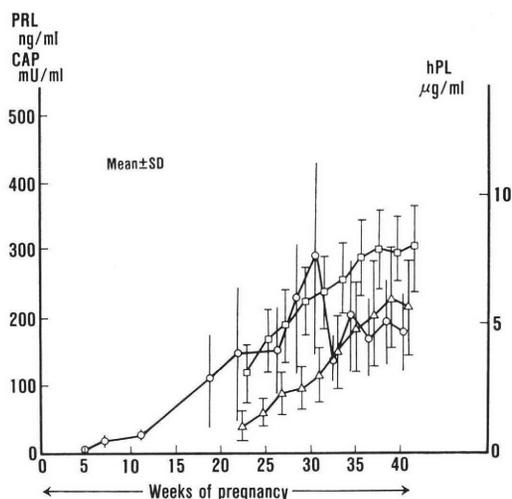


Fig. 6 Prolactin, growth hormone, somatostatin, somatomedin A, hPL and CAP levels during pregnancy.

Each value represents the mean \pm SD (vertical bars). \circ — \circ ; prolactin, Δ — Δ ; CAP, \square — \square ; hPL, \triangle — \triangle ; somatostatin, \blacksquare — \blacksquare ; growth hormone.

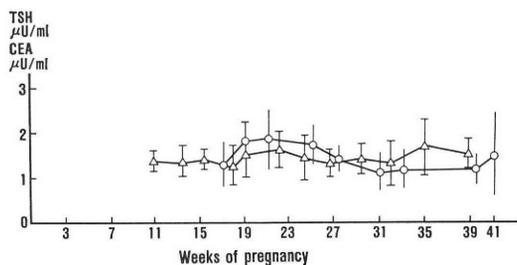


Fig. 7 TSH and CEA levels during pregnancy. Each value represents the mean \pm SD (vertical bars). \circ — \circ ; TSH, Δ — Δ ; CEA.

		Gestational weeks	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱
①	Pregnenolone	○		○	○	×	×	●	○	○	●	×	○	×	×	×	▽	×	○	×
②	Pregnenolone-S	○		○	×	×	●	○	○	○		▽	○	×	×	○	▽	×	○	×
③	Progesterone	○		○	○	×	×	●	○	○	○	×	●	×	○	○	▽	×	○	×
④	17 α -OH-P	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
⑤	DHEA	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
⑥	Testosterone	○	●	●	●	×	×		○	●	●	×	×	○	×	×	▽	×	○	×
⑦	Estradiol-17 β	○	○	○	×	×	○		○	○		×	●	×	○	○	▽	×	○	×
⑧	Estriol	○	○	○	×	×	●	○		○		×	×	×	×	○	×	×	○	×
⑨	Cortisol	○	●	○	○	×	×	●	○	○		×	×	×	○	○	×	▽	○	×
⑩	hCG	▽	×	▽	×	×	×	×	×	×	×		▽	×	×	×	×	▽	×	▽
⑪	Prolactin	○	○	○	●	×	×	×	●	×	×	▽		×	×	×	×	×	×	●
⑫	G.H.	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×
⑬	Somatomedin A	●	×	×	○	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×		×	×	×	●
⑭	hPL	○	×	○	○	×	×	×	○	○	○	×	×	×	×		▽	×	○	×
⑮	TSH	▽	▽	▽	▽	×	×	▽	▽	×	×	▽	×	×	×	▽		×	▽	×
⑯	Somatostatin	×	×	×	×	×	×	×	×	×	▽	×	×	×	×	×	×	×	×	×
⑰	CAP	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○	▽	●	×	●	○	▽	×		×
⑱	CEA	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

Fig. 8 Relationship between gestational age and each value.

○; positive correlation, P<0.01. ●; positive correlation, P<0.05. ▽; negative correlation, P<0.01. ▼; negative correlation, P<0.05. ×; not significant at the level of P<0.05.

Discussion

The dynamics and kinetics of hormones secreted by the ovary are usually cyclically regulated by a hypothalamic-pituitary-ovarian axis in non-pregnant women but in pregnant women, they are controlled by the placenta between 7 and 9 weeks following LMP when women become pregnant. Following pregnancy, they again come under the control of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. During gestation, both steroid and protein hormones are synthesized mainly by the syncytiotrophoblastic cells of the placenta and regulated in a precise manner without mutual interference. However, the placenta by itself is incapable of *de novo* steroidosynthesis owing to lack of DHEA supplied chiefly from the fetus.

This fact indicates that the hormone-synthesizing system comprised of the maternal fetoplacental units developed during pregnancy and substances produced by it are released into maternal or fetal circulation. Thus, physiological and biochemical information

regarding the maternal fetoplacental unit can be obtained on the basis of the maternal serum or plasma concentrations of various hormones, hormone-like substances, enzymes and other substances secreted from this unit.

P₅-S is synthesized in the liver and adrenal cortex of the mother or fetus, metabolized to P₅ by sulfatase contained to a high degree in the placenta and then converted into P₄ within the placenta along with P₅ produced in maternal and fetal adrenal glands. In contrast, P₅ in the fetus, on being transferred to the fetus from the placenta, loses its biological activity by combining with sulfuric acid within the liver and adrenal cortex. Despite differences in their values, the levels of P₅ closely correlate with those of P₅-S. Regulation of the conjugation of serum steroids which biologically inactivates the double control of steroids produced in the mother, placenta, fetal adrenal cortex and gonads, may thus possibly protect the fetal gonads from the double regulation of steroids. The production of steroids is undertaken by placental villi in place of the ovary 7-9 we-

ks following LMP. Hormones synthesized in the placenta conserve the fertilized ovum. P_4 increases from the early period to the end of pregnancy. The implantation and maintenance of a fertilized ovum depends on estrogen and P_4 produced primarily at this stage of pregnancy by the corpus luteum. Placental P_4 is produced mainly from maternal cholesterol and P_5 is synthesized in the maternal and fetal adrenal glands. The levels of P_5 were closely related to those of P_4 .

The levels of 17α -OHP₄ peaked between 5 and 6 weeks of gestation and gradually decreased thereafter (Fig. 1). This peaking is considered due to the corpus luteum of pregnancy, whose life span is extended 2-6 weeks following implantation. Since the placenta is considered relatively deficient in 17α -hydroxylase and C₁₇₋₂₀ lyase, there is little synthesis in the placenta of 17α -OHP₄ through 17α -hydroxylation of P_4 , the Δ^4 -pathway. Accordingly, 17α -OHP₄ is mainly of luteal origin. Its levels reflect the activity of the corpus luteum of pregnancy and not the trophoblast¹⁸⁾, remain low after the start of placental steroidogenesis and increase again only after the 35th week of gestation, primarily as products of fetal adrenal¹⁹⁾. DHEA in the fetal serum is metabolized to 16α -hydroxy-DHEA by 16α -hydroxylation in the fetal liver and adrenal glands, 16α -OH-DHEA-sulfate by sulfation and, further, converted into E_3 by sulfatase in the placenta (phenolic pathway). E_3 synthesized through the phenolic pathway enters the maternal circulation, glucuronidated within the maternal liver and finally excreted into the urine.

The concentrations of DHEA during gestation were found to have lower levels than those in non-pregnant women and remain almost unchanged throughout pregnancy. This may possibly be due to the fact that DHEA is rapidly transformed to estrogens immediately after being transferred to the placenta, causing the rate of maternal kidney clearance to be elevated^{20,21)}.

T during pregnancy is mainly produced from Δ^4 -androstenedione in the placenta, further converted into E_2 or E_3 ; its level is closely correlated with those of E_2 and E_3 . T gradually increased with pregnancy and no differences in T levels during pregnancy in

female and male fetuses were observed. The significance of increased T levels during pregnancy remains to be clarified. However, circulating steroids are usually bound to specific carrier proteins, sex hormone-binding globulins (SHBG) and testosterone-binding proteins which increase during gestation, causing the biological activity of T to diminish²²⁾.

As shown in Fig. 3, estrogen levels increased from early pregnancy near term and slightly decreased at and around the term delivery day. The corpus luteum in early pregnancy synthesizes estrone (E_1) and E_2 , and E_2 produced in the placenta begins to increase from approximately six weeks of gestation. About 40% of DHEA-S originates from the fetus, about 60% of maternal DHEA-S are converted into E_1 and E_2 in the placenta, and E_3 is metabolized from 16α -hydroxy-DHEA-S. Since the production of E_3 is 90% of fetal and 10% of maternal origin, unconjugated E_3 levels are usually good indicators of fetal well-being, while unconjugated E_1 and E_2 reflect the state of fetoplacental unit. Maternal circulating free estrogen is composed mainly of E_2 , and urinary E_3 consists almost completely of glucuronidated E_3 . E_2 levels are closely related to those E_3 ($P < 0.001$).

Serum cortisol is metabolized from P_4 and 17α -OHP₄. The concentrations of cortisol during pregnancy are 2-3 times those of non-pregnant women or fetuses^{19,20)}. This increment may arise from increase in transcortin, a binding protein, or metabolic changes in cortisol or prolongation of the half-life^{23,24)}.

In summarizing the dynamics and kinetics of steroids in maternal sera during pregnancy, the levels of various steroid hormones except 17α -OHP₄ and DHEA fluctuate in essentially the same way as pregnancy proceeds and increase in a manner significantly ($P < 0.01$) correlated to gestational age.

The levels of all the hormones are interrelated, indicating steroid metabolism in the fetoplacental unit to occur in an ordered manner.

During pregnancy, the levels of LH and FSH become low with decrease in gonadotrophs; responsiveness to LH-RH also dropped²⁴⁾. Protein hormones during pregnancy are synthesized mainly in the placenta. Pe-

ptide hormones produced in the placenta are hCG, hPL and the chorionic thyroid-stimulating and chorionic follicle-stimulating hormones.

hCG consists of an α -subunit having 92 amino groups and a β -subunit with 139-145 amino groups. In the α -subunit of hCG can be found structures similar to those of glycoproteins such as LH, FSH and TSH, while in the case of the β -subunit has specific structures differing from glycoproteins having α -chains in common. hCG is produced in the fertilized ovum (trophoblast immediately after nidation) 7-10 days after ovulation and secretion actually begins at 8 weeks of gestation. Maximum hCG levels are attained 10-11 weeks after ovulation, and thereafter recede to and remain at one-tenth the peak amounts. hCG is synthesized independently of the fetus and secreted into the maternal circulation from the placenta and maintains the corpus luteum during the first 4 to 6 weeks of gestation. It is related to the hydroxylation and aromatization of steroids by increasing NADPH following both aerobic and anaerobic glycolyses via a cyclic AMP system. Its values show a significant ($P < 0.01$) negative correlation with gestational age and those of P_5 -S, PRL, TSH and CAP and are unrelated to other hormones.

GH is called a growth hormone-prolactin superfamily and has a structure similar to that of PRL. The biochemical and biological character of GH is similar in part to that of hPL. However, the concentrations of PRL and hPL increase from early pregnancy toward the term of pregnancy, whereas that of GH remains essentially the same during pregnancy and puerperium. Reserve GH in the pituitary becomes less with the advance of pregnancy and is restored gradually after delivery²⁵⁻²⁸.

As mentioned above, hPL (hCS) is a protein hormone, m. w. 20,000, similar in biochemical and biological characteristics of GH. It is synthesized in the placenta, secreted chiefly into the maternal circulation and participates in the supply of glucose, free fatty and amino acids to the fetus. Its levels increase with pregnancy and are closely related to gestational age. They are also highly correlated with those of CAP, which may be

used as an index of placental function. In contrast, the values of hPL differ considerably from those of GH although their structures are similar. hPL is thought to influence directly or indirectly the secretion of GH from the pituitary.

PRL is a protein hormone, m. w. 22,000, having a structure similar to that of GH and called a growth hormone-prolactin superfamily, but no relationship between PRL and GH levels could be found.

PRL levels vary significantly ($P < 0.01$) with the stage of gestation and increase from the first trimester of pregnancy until the term. It is produced mainly in the maternal and fetal pituitary and decidua and, on the basis of differences in molecular weight, clearly divided into that of the maternal side, the fetal side and amniotic fluid.

Recently, a study of the size heterogeneity of PRL indicated it capable of being divided into three different types (little PRL, big PRL and big big PRL) with respect to molecular weight²⁹. There exists big big PRL in the sera of pregnant women (8-10 % of the total PRL) and the ratio of it to little PRL remains constant throughout pregnancy²⁹.

The production of maternal serum PRL during pregnancy chiefly depends on the concentration of estrogen³⁰. PRL participates in the formation of milk in the mammary gland in conjunction with hPL. However, no lactation occurs during pregnancy since estrogen inhibits the effect of PRL on milk production in the mammary gland.

The levels of PRL are significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) related to those of P_5 , P_5 -S, P_4 , E_2 and CAP.

The effects of GH on skeletal tissue are intermediated by a growth-promoting factor, a second growth factor³¹ termed somatomedin (SOM) by Daughaday et al. (1972)³². SOM is synthesized mainly within the liver and influences the nutritive state in a way similar to that of GH. It is defined as a growth factor in the serum and its function depends in part on GH in a broad sense. But in a more restricted sense, it also promotes the incorporation of sulfate or thymidine into cartilaginous tissue, has insulin-like effects on target tissues and may be characterized as SOM A, B, C, insulin-like growth

factor I and II (IGF-I, II), multiplication stimulating activity (MSA)³³⁻³⁷. SOM A, C, IGF-I, II and MSA fill both broad and narrow definitions of SOM, but SOM B alone satisfies the broad definition of SOM³⁸. SOM A³⁹ and C⁴⁰ are identical to IGF-I. SOM A is a peptide, m. w. 7,649, which promotes the incorporation of sulfate into chick cartilage¹⁵ and has a specific receptor apparently different from that of insulin due to GH. Hormones related to the production of SOM are GH, PRL, hPL, TSH, insulin, estrogen, T and adrenocortical hormone³⁸.

Some reports have appeared on the dynamics and kinetics of SOM during pregnancy. In Fig. 6, the levels of SOM A show mild biphasic peaks at the first and second trimesters of pregnancy. According to Bala et al. (1978)⁴¹, SOM C levels before week 24 or after week 36 are lower than those of non-pregnant women and may be characterized but become as much between 25 and 28 weeks of pregnancy or after delivery.

In contrast, some reports maintain that SOM values throughout pregnancy are the same as in non-pregnant women^{42,43} or less^{44,45}. The levels of SOM during gestation according to some reports are at variance. These discrepancies may arise from the particular types of SOM determined or differences in assay methods. In this study, SOM A levels showed a positive relationship ($P < 0.05$) to gestational age, E_2 , cortisol and CAP levels

Estrogen has suppressive effects on growth⁴⁶ and competes with the action of GH⁴⁷. There may exist a negative feed back mechanisms between estrogen and SOM^{48,49} and the production of SOM in the liver is lowered by estrogen⁵⁰. These facts tend to conflict with the possibility of a positive correlation between estrogen and SOM A during pregnancy.

T possibly promotes the synthesis of SOM⁴⁰ but no correlation between T and SOM A was found during pregnancy. SOM in the sera of hypophysectomized rats significantly increases by the administration of ovine hPL and bovine GH⁵¹ and rat serum SOM C has been reported closely related to gestational age⁵².

SRIF is a peptide hormone having a suppressive effects on GH secretion and produced

in the hypothalamus, Langhans cells of the pancreas and endocrine cells of the mucosae of the digestive system. It acts as an information-transmitting substance necessary for the control of the pancreas, endocrine glands and intercellular neural regulation. It also suppresses the secretion of TSH.

The levels of SRIF throughout pregnancy showed a negative relationship ($P < 0.01$) to those of cortisol only,

Next to PRL and hPL, SOM A levels are closely related to those of steroids, the significance of which remains to be elucidated. As described before, SRIF suppresses the secretion of GH and TSH¹¹, but is unrelated to GH and TSH during pregnancy.

CAP is an oxytocin-dissociating enzyme named oxytocinase and specifically synthesized within the placenta and reflects basic placental functions. These functions cannot be understood without it. Although its physiological significance is unknown, CAP is considered to participate in the metabolism of protein and amino acids. Its levels began increasing at approximately week 12 and continued to do so as pregnancy progressed, reaching a peak at 39 to 40 weeks of gestation.

CAP levels were most closely related to gestational age, as well as those of P_5 , P_5 -S, P_4 , T, E_2 , E_3 , cortisol, PRL, SOM A and hPL. A very close relation with various hormones was also noted, reflecting the maternal fetal-placental function of CAP. However, the cause and effects resulting from interactions between CAP and other hormones are yet to be clarified. Should be CAP an index of placental function, its increase should be regarded as resulting from that of hormones closely related to it.

CEA is a tumor marker of cancer. Although it is not unusual that a foreign protein such as ferritin⁵³ increases in tissues like syncytiotrophoblasts and placenta which proliferate rapidly, the levels of CEA remained unchanged throughout pregnancy. They exceeded 2.5 ng/ml on some occasions, possibly due to the precise and rapid Spac-method. The normal range should thus be considered 0-5 ng/ml rather than 0-2.5 ng/ml when using this method.

The levels of CEA showed no relationship

to the gestational week and were unrelated to other substances

In summary, the concentrations of steroid hormones (P_5 , P_5 -S, P_4 , T, E_2 , E_3 and cortisol) except for 17α -OHP₄ and DHEA are closely related to each other with coordinated similar secretion patterns and gestational age. In contrast, the levels of hCG, hCG- β , GH, PRL, TSH, SRIF, SOM A, hPL, CAP and CEA showed secretion patterns differing from each other and only four of these substances (PRL, hPL, SOM A and CAP) were found to be relatively correlated to steroid hormones and CAP.

However, most of the syntheses and secretions of these substances during pregnancy occur through a very complicated system, yet not explainable system: the maternal fetoplacental unit. The substances secreted into the maternal circulation by a variegated and precise control mechanism. Therefore, each mechanism of synthesis or secretion cannot properly be understood by only determining mutual relationships through a comparison of multiple serial hormones. Still, such data may possibly provide a clue for the general clarification of the secretion mechanisms of various substances in the blood and facilitate obtaining considerable physiological information regarding the maternal fetoplacental unit and prognostication of pregnancy well-being, since most individual production mechanisms have been clarified separately.

Acknowledgments

The author is grateful to Dr. H. Iwasaki, Professor, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan, for his kind criticism and revision of this paper and Dr. K. Takano, Associate professor, Department of Medicine, Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan, for making the SOM A determinations. The technical assistance of Mmes S. Kawamura, K. Maeda and M. Kusumi and Miss K. Yoshimine is also gratefully acknowledged.

References

- 1) Den, K., Kamizato, T., Takasaki, T., Haruyama, N., Yoshida, T., Takagi, S., Kokubu, T. and Kambegawa, A.: Simultaneous radioimmunoassay of pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone. *Clinical Endocrinology* (Japanese press), 26 : 309, 1978.
- 2) Kambegawa, A.: Estrogen. *Modern Medicine* (Japanese press), 30 : 790, 1976.
- 3) Kambegawa, A. and Koubu, T.: RIA of pregnenolone and pregnenolone sulfate. *Clinical Pathology* (Japanese press), 25 (II) : 269, 1977.
- 4) Makino, T., Kambegawa, A., Yoshida, T., Den, K., Mukai, H., Yamaji, H., Ozaki, H. and Takagi, S.: A simplified radioimmunoassay for the measurement of plasma progesterone. *Clinical Pathology* (Japanese press), 21 : 930, 1973.
- 5) Makino, T.: Radioimmunoassay of sex steroid hormones. *Folia Endocrinol. Jap.*, 49 : 629, 1973.
- 6) Makino, T., Inatomi, K., Yoshida, T., Den, K., Takagi, S. and Kambegawa, A.: Radioimmunoassay of sex steroid hormone (4)—Radioimmunoassay of testosterone—. *Clinical Endocrinology* (Japanese press), 21 : 867, 1973.
- 7) Yoshida, T., Inatomi, K., Ozaki, H., Takagi, S., Makino, T. and Kambegawa, A.: —Radioimmunoassay of 17α -hydroxypregesterone—. *Clinical Endocrinology* (Japanese press), 22 : 773, 1974.
- 8) Kokubu, T., Hisatomi, Y., Oouchi, R., Mori, H., Kambegawa, A., Furuya, K., Den, K., Yoshida, T. and Takagi, S.: The simple methods for radioimmunoassay of unconjugated and sulfate conjugated dehydroepiandrosterone. *Folia Endocrinol. Jap.*, 54 : 117, 1978.
- 9) Makino, T. and Kambegawa, A.: Radioimmunoassay of plasma cortisol. *Folia Endocrinol. Jap.*, 49 : 1297, 1973.
- 10) Okumura, H., Sudo, T., Fujisawa, M., Sawai, M. and Hayakawa, H.: Radioimmunoassay of hCG. *Clinical Endocrinology* (Japanese press), 26 : 301, 1978.
- 11) Okumura, H., Sudo, T., Sawai, M., Fujisawa, M. and Hayakawa, H.: Biological and immunological activities and separation and purification of hCG subunits. *Clinical Endocrinology* (Japanese press), 26 : 509, 1978.
- 12) Saito, H. and Saito, S.: Somatostatin. *Nihon Rinsho* (a special autumn number), 40 : 735, 1982.
- 13) Takano, K., Hall, K., Fryklund, L., Holmgren, A., Sievertsson, H. and Uthne, K.: The binding of insulin and somatomedin A to human placental membrane. *Acta Endocr.*, 80 : 14, 1975.
- 14) Takano, K., Hizuka, N., Shizume, K. and Hall, K.: Effect of human growth hormone on serum somatomedin A in patients

- with growth hormone deficiency. *Folia Endocrinol. Jap.*, 24 : 359, 1977.
- 15) Svan, H., Hall, K., Ritzén, M., Takano, K. and Skottner, A.: Somatomedin A and B in serum from neonates, their mothers and cord blood. *Acta Endocr.*, 85 : 636, 1977.
 - 16) Iwasaki, H., Ito, S., Usuki, S. and Oikawa, K.: The utility of cystine-aminopeptidase and leucine-aminopeptidase as placental function tests. *Clinical Chemistry (Japanese press)*, 8 : 166, 1979.
 - 17) Palmer, R., Blair, J. A., Erickson, G. and Diczfaulsky, E.: Studies on the metabolism of C-21 steroids in the human foetoplacental unit. *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 53 : 407, 1966.
 - 18) Yoshimi, T., Stroot, C. A., Marshall, J. R. and Lipssett, M. B.: Corpus luteum function in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29 : 255, 1969.
 - 19) Tulchinsky, D. and Simmer, H. H.: Sources of plasma 17 α -hydroxyprogesterone in human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 35 : 799, 1972.
 - 20) Yanaihara, T.: Endocrine profile in pregnant women. *Medical Clinics of Japan*, 9 : 369, 1983.
 - 21) Takagi, S.: Function of maternal endocrinology. *Clinical Obstetrics and Gynecology (Japanese press)*, 32 : 556, 1978.
 - 22) Gandy, H. M.: Androgens, In: *Endocrinology of Pregnancy*, (eds) F. Fuchs and A. Klopper, P. 132, New York, Evanston, and London, Harper and Row Co., 1971.
 - 23) Zumoff, B., Fukushima, D. K., Weitzmann, E. D., Kream, J. and Hellman, L.: The sex difference in plasma cortisol concentration in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39 : 805, 1974.
 - 24) Kumasaka, T.: *Pregnancy and Hormones. Practical Obstetrics and Gynecology (Japanese press)*, 30 : 1941, 1981.
 - 25) Kawaguchi, K., Hirai, I., Morikawa, H., Mochizuki, M. and Tojo, S.: Growth hormone and prolactin during pregnancy. *Folia Endocrinol. Jap.*, 51 : 546, 1975.
 - 26) Tojo, S., Mochizuki, M., Morikawa, H. and Kawaguchi, K.: LTH, HPL and prolactin. *Obstetrics and Gynecology (Japanese press)*, 42 : 1205, 1975.
 - 27) Kawaguchi, K.: Growth hormone, prolactin and chorionic somatomammotropin in normal, molar pregnancy and puerperium. *Folia Endocrinol. Jap.*, 53 : 1397, 1977.
 - 28) Tojo, S. and Morikawa, H.: Placenta directed toward the mother. *Clinical Obstetrics and Gynecology (Japanese press)*, 32 : 569, 1978.
 - 29) Oonami, S., Eto, S., Fukushima, T., Nakada, H. and Suzuki, H.: Studies on the size heterogeneity of PRL in human serum and tissue. *IGAKU NO AYUMI (Japanese press)*, 132 : 662, 1985.
 - 30) Shioji, J., Aono, T. and Kurachi, K.: Pregnancy and prolactin. *Clinical Chemistry (Japanese press)*, 8 : 159, 1979.
 - 31) Salmon, W. D. Jr. and Daughaday, W. H.: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.*, 49 : 825, 1957.
 - 32) Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D. Jr., Van den Brande, J. L. and Van Wyk, J. J.: Somatomedin; Proposed designation for sulphation factor. *Nature (Lond.)*, 239 : 107, 1972.
 - 33) Van Wyk, J. J., Underwood, L. E., Baseman, J. B., Hintz, R. L., Clemmons, R. and Marshall, R. N.: Exploration of the insulinlike and growth-promoting properties of somatomedin by membrane receptor assay. *Adv. Metab. Disord.*, 8 : 127, 1975.
 - 34) Fryklund, L. A., Skottner, A., Sievertsson, H. and Hall, K.: Somatomedin A and B. Isolation, chemistry and *in vivo* effects. *Proceedings of the Third International Symposium on Growth Hormone, International Congress Series no. 381, Amsterdam, Excerpta Medica, 1976, p. 156.*
 - 35) Rinderknecht, E. and Humbel, R. E.: Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activity in human serum: isolation, chemical characterization and some biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73 : 2365, 1976.
 - 36) Nissley, S. P., Passamani, J. and Short, P.: Stimulation of DNA synthesis, cell multiplication, and ornithine decarboxylase in 3T3 cells by multiplication stimulating activity (MSA). *J. Cell Physiol.*, 89 : 393, 1976.
 - 37) Moses, A. C., Nissley, S. P., Cohen, N. L. and Rechler, M. M.: Specific binding of a somatomedin-like polypeptide in rat serum depends on growth hormone. *Nature (Lond.)*, 263 : 137, 1976.
 - 38) Takano, K.: Recent information on somatomedin. *Gendai Sanfujinkagaku Taikai (Suppl.) 1979-A/Endocrinology (Japanese press)*, p. 325-340.
 - 39) Enberg, G., Carlquist, M., Jörnvall, H. and Hall, K.: The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identity to insulin-like growth factor I. *Eur. J. Biochem.*, 143 : 117, 1984.

- 40) Klapper, D.G., Svoboda, M.E. and Van Wky, J.J.: Sequence analysis: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. 112: 2215, 1983.
- 41) Bala, R. M., Wright, C., Bardai, A. and Smith, G. R.: Somatomedin bioactivity in serum and amniotic fluid during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46: 649, 1978.
- 42) Daughaday, W. H., Salmon, W. D. Jr. and Alexander, F.: Sulfation factor activity of sera from patients with pituitary disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 19: 743, 1959.
- 43) Giordano, G., Foppiani, E., Minuto, F. and Perroni, D.: Growth hormone and somatomedin behavior in the newborn. *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 81: 449, 1976.
- 44) Hintz, R. L., Seeds, J. M. and Johnsonbaugh, R. E.: Somatomedin and growth hormone in the newborn. *Am. J. Dis. Child.*, 131: 1249, 1977.
- 45) Tato, L., Du Caju, M., Prévôt, C. and Rappaport, R.: Early variation of plasma somatomedin activity in the newborn. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 534, 1975.
- 46) Zondek, E.: Impairment of anterior pituitary functions by follicular hormones. *Lancet*, 2: 842, 1936.
- 47) Schwartz, E., Echemendia, E., Schiffer, M. and Panariello, V. A.: Mechanism of estrogenic action in acromegaly. *J. Clin. Invest.*, 48: 260, 1969.
- 48) Saenger, P., Schwartz, E., Wiedeman, E., Levine, L. S., Tsai, M. and New, M. I.: The interaction of growth hormone, somatomedin and oestrogen in patients with Turner's syndrome. *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 81: 9, 1976.
- 49) Wiedemann, E., Schwartz, E. and Frantz, A. G.: Acute and chronic estrogen effects upon serum somatomedin activity, growth hormone, and prolactin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42: 942, 1976.
- 50) Wiedemann, E. and Schwartz, E.: Suppression of growth hormone-dependent human serum sulfation factor by estrogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34: 51, 1972.
- 51) Hurley, T. W., D'Ercole, A. J., Handwerger, S., Underwood, L. E. and Furlanetto, R. W.: Ovine placental lactogen induces somatomedin; a possible role in fetal growth. *Endocrinology*, 101: 1635, 1977.
- 52) Furlanetto, R. W., Underwood, L. E., Van Wyk, J. J. and Handwerger, S.: Serum immunoreactive somatomedin-C is elevated late in pregnancy. *J. C. E. & M.*, 47: 695, 1978.
- 53) Iwasaki, M., Iijima, S. and Usuki, S.: Studies on ferritin levels during pregnancy and puerperium and in umbilical cord of fetus. *Clinical Endocrinology (Japanese press)*, 31: 1113, 1983.

妊娠中の各種ステロイドホルモン、蛋白ホルモン、ソマトメジン A、CAP および CEA の動態と相関関係

筑波大学臨床医学系産科婦人科
(主任: 岩崎寛和教授)

臼 杵 愨

妊娠中の血中ホルモン、ホルモン様物質ならびに酵素の動態について個々の報告は多いが、同一連続採血によつて総体的相関関係をみた報告は少ない。20名の正常妊婦から2週間毎に採血し、血中 pregnenolone, pregnenolone sulfate, progesterone, 17 α -OHP, DHEA, testosterone, E₂, E₃, cortisol, hCG (α , β), prolactin, GH, TSH, somatostatin, somatomedin A, hPL, CAP 及び CEA を測定し、各々の妊娠中の分泌動態、妊娠週数および各々の測定値間の相関関係を FACOM M-380 computer の statistical package for the social science (SPSS) を用いて求めた。17 α -OHP および DHEA を除く各ステロイド及び CAP は妊娠週数と共にほぼ同様な分泌パターンをとつて増加し、妊娠週数及び個々の測定値間の相関関係も強かつた。一方、蛋白ホルモン、somatomedin A, CEA は妊娠が進むにつれ種々の分泌パターンを示し、prolactin, GH, somatomedin A および hPL が妊娠週数と各ステロイドおよび CAP と比較的良好に相関したが、各々の間での相関は認められなかつた。
(受付: 昭和61年3月7日)

当科で試みた頸管粘管検査法 (セッシ法)

についての検討

Accuracy of Cervical Mucus Test (Pincet Method) in Our Clinic

島根医科大学医学部産科婦人科学教室

吉野和男 西垣新 白井孝昭
Kazuo YOSHINO Arata NISHIGAKI Takaaki SHIRAI
内田昭弘 荒木芳美 高橋健太郎
Akihiro UCHIDA Yoshimi ARAKI Kentaro TAKAHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Shimane Medical University
(Director: Prof. M. Kitao)

頸管粘液検査において、従来のシリンジ法に加えてセッシ法を用い、結晶形成、牽糸性、頸管粘液量、頸管の状態をスコアー化し、同時に血中 estradiol-17 β (E₂) を測定し、セッシ法とシリンジ法とで比較検討し、以下の結果を得た。

- 1) セッシ法とシリンジ法との一致率は結晶形成では64.4%であり、牽糸性では64.4%、頸管粘液量では42.1%であった。
- 2) 結晶形成、牽糸性、頸管粘液量で頸管粘液スコアーが一致しない例でもスコアーは1ランクだけ違うものがほとんどであった。
- 3) セッシ法、シリンジ法いずれも血中 E₂ との相関関係は低値であった。

以上のことより、頸管粘液検査において、セッシ法はシリンジ法と比較し、頸管粘液スコアーに大きな違いはなく、セッシ法が簡易に出来ることより、不妊外来における頸管粘液検査でのセッシ法の有用性が示唆された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 416-421, 1987)

緒言

排卵の有無を確認し、排卵の時期を推定することは臨床重要である。近年、体外受精・胚移植が行なわれるようになって、排卵直前のより成熟した卵子の採取およびより正確な排卵時期の推定が必要となつてきている。

排卵時期の推定には基礎体温、頸管粘液検査、膣 smear、卵巣および下垂体ホルモンの測定、超音波断層装置などが行なわれているが、その中で従来より広く行なわれて来た頸管粘液検査は排卵のチェックのみならず、不妊症の診断、治療上欠く事のできない検索の1つである。その診断的意義は頸管粘液の量、性状による卵胞の成熟度や、排卵の時期を推定しうる点であり、また、頸管粘液の量的、質的異常による精子通過障害の点よ

り、不妊因子としての治療的意義を有している。実際に临床上、頸管粘液の検査項目として、当科では粘液量、牽糸性、結晶形成現像、頸管の開口度の4項目を測定している。しかし、頸管粘液分泌不全や clomiphene 治療周期などで頸管粘液の量が少なく、従来のシリンジ法(ツベルクリン用注射筒を用いる方法)では頸管粘液量が少なく、正確に測定できず、また、牽糸性、結晶形成が十分に測定できない場合がある。そこで、われわれは従来使用されてきたシリンジ法に併用して、セッシのみで頸管粘液を採取するセッシ法を考案し、その有用性について検討したので報告する。

対象

島根医科大学医学部附属病院産科婦人科内分泌不妊外

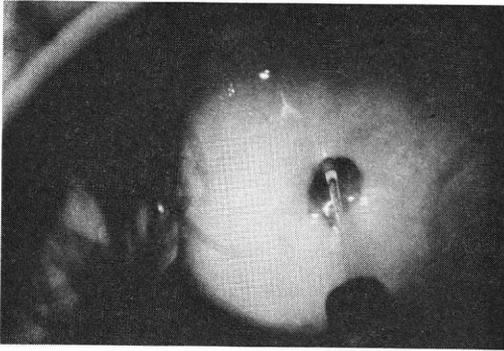


図 1 セッシ法による牽糸性の測定

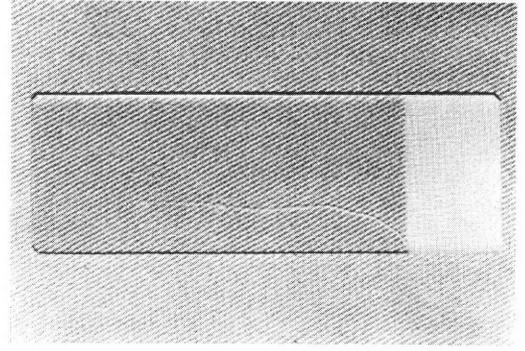


図 2 セッシ法による結晶形成の観察

来を受診した不妊患者延べ59名を対象とした。59名の患者のうち、正常月経周期、無排卵周期症、続発性第1度無月経、続発性第2度無月経、多嚢胞性卵巣症候群に対して、その治療内容により、1) 無治療群（排卵誘発剤使用なし）23例、2) clomiphene 治療群19例、3) HMG-HCG 治療群17例の3つの群に分類した。

方 法

1. 検査方法

1) セッシ法：内診前に行ない、まず子宮腔部を綿球で軽く清拭後、肉眼的に頸管開口度、頸管粘液量を測定する。次に図1に示すようにセッシにて外子宮口より頸管粘液を牽糸し、牽糸性 (Spinnbarkeit) を測定し、そして、図2に示すようにスライドガラス上に塗布し、室温で自然乾燥させ、完全乾燥後、弱拡大の顕微鏡下で結晶形成を観察する。

2) シリンジ法（ツベルクリン注射筒法）：セッシ法に引き続き、シリンジ法を行なう。まず消毒乾燥した針をつけていない1ml ツベルクリン用注射筒の先端を外子宮口から頸管内に挿入し、ゆつくり頸管粘液を吸引する。そして注射筒を頸管より抜き、混入した気泡を除去する。以上の同一操作を数回繰り返す、頸管粘液を残らず吸引し、注射筒の目盛りを読む。次に頸管粘液の一部

をスライドガラスに出し、そのまま注射筒を持ち上げ糸の長さを測定する。そしてスライドガラス上にできるだけ薄く塗布し、以下セッシ法と同じ操作を行なう。

II. 頸管粘液スコアと血中 E₂ 測定

表1に示すような頸管粘液スコア表を用い、セッシ法とシリンジ法のスコアを比較検討した。また、同時に血中 estradiol-17β (E₂) を測定した。

結 果

1) 結晶形成のセッシ法とシリンジ法との比較

図3に示したように、無治療群、clomiphene 治療群、HMG-HCG 治療群に分けて結晶形成をセッシ法とシリンジ法とで比較してみると、両法の一致率は無治療群では82.6%、clomiphene 治療群では63.2%、HMG-HCG 治療群では41.2%であり、全体では64.4%であった。また、シリンジ法の方が全体的にセッシ法よりも結晶形成度が強い傾向であったが、スコアが2ランク以上違うのは clomiphene 治療群に1例あるのみであった。

2) 牽糸性のセッシ法とシリンジ法との比較

図4に牽糸性のセッシ法とシリンジ法との比較を示す。セッシ法とシリンジ法との一致率は全体で64.4%であり、各治療群に分けてみると、無治療群で一致率が一番高く、73.9%であり、clomiphene 治療群が47.7%

表 1 頸管粘液スコア

点 数	0		1		2		3	
	セッシ	シリンジ	セッシ	シリンジ	セッシ	シリンジ	セッシ	シリンジ
粘 液 量	なし	なし	僅 少	0~200 μ l	たれ下る	200~400 μ l	滝 状	400 μ l 以上
牽 糸 性	なし	なし	0~1/4	0~4cm	1/4~1/2	4~8cm	1/2以上	8cm 以上
結 晶 形 成	なし		線 状		部分的		完 全	
頸 管	<2mm				2~4mm		4mm <	

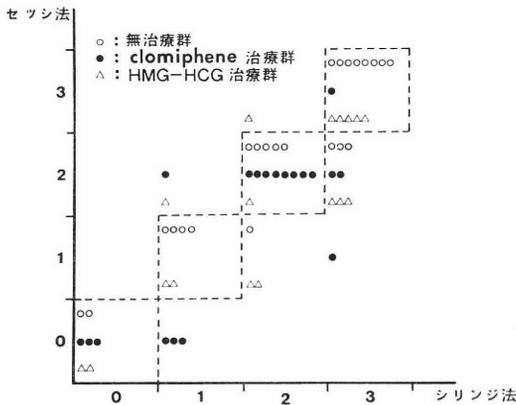


図 3 結晶形成のセッシ法とシリンジ法の比較

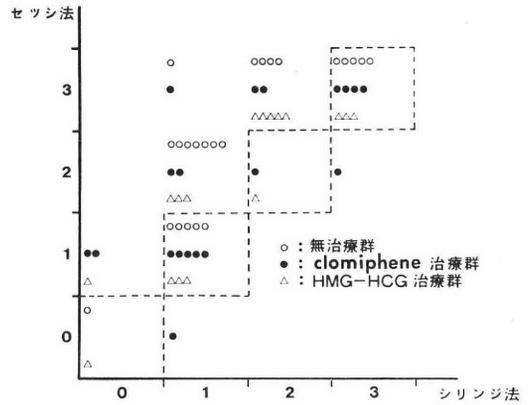


図 5 頸管粘液量のセッシ法とシリンジ法の比較

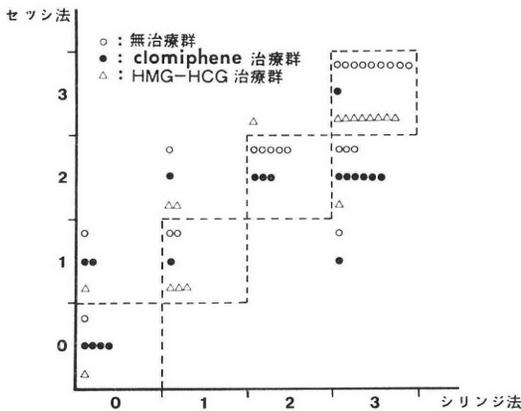


図 4 牽糸性のセッシ法とシリンジ法の比較

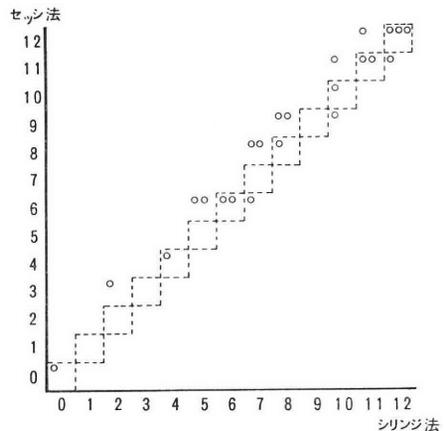


図 6 無治療群の総頸管粘液スコア

で一番低値を示した。そしてセッシ法とシリンジ法で牽糸性が2ランク違うのは2例あり、無治療群1例、clomiphene 治療群1例であった。

3) 頸管粘液量のセッシ法とシリンジ法との比較

図5に示したように頸管粘液量をセッシ法とシリンジ法で比較してみると、全体で一致率は49.2%と低値であった。各治療群でも全体的に低い値を示し、特にHMG-HCG 治療群が42.1%と一番低い値を示した。しかし、頸管粘液量が2ランク違うのは全体で2例しかなく、無治療群、clomiphene 治療群でそれぞれ1例ずつあった。

4) 無治療群の総頸管粘液スコア

図6に無治療群における総頸管粘液スコアでセッシ法とシリンジ法との比較を示した。セッシ法とシリンジ法との一致率は48%と低率で、全体的にセッシ法のスコアがシリンジ法のスコアより高い値を示した。しかし、セッシ法とシリンジ法とでスコアが2点以上違う例はなかった。

5) Clomiphene 治療群の総頸管粘液スコア

図7に示すように、clomiphene 治療群ではセッシ法とシリンジ法との一致率は32%と極めて低値を示した。そしてセッシ法とシリンジ法とでスコアが2点以上違う例が7例(37%)に認められた。

6) HMG-HCG 治療群の総頸管粘液スコア

図8に示すように、HMG-HCG 治療群ではセッシ法とシリンジ法との一致率は53%であり、セッシ法とシリンジ法でスコア2点以上違う例が3例(18.0%)に認められた。

7) セッシ法における血中 E₂ 値と総頸管粘液スコア

図9にセッシ法における血中 E₂ 値と総頸管粘液スコアの相関関係を示した。全体では $y=0.002x+7.22$, $r=0.204$ で、1%以下の危険率で有意な相関が認められた。各治療群に分けてみると、各群において全て1%以下の危険率で有意な相関は認められたが、HMG-HCG

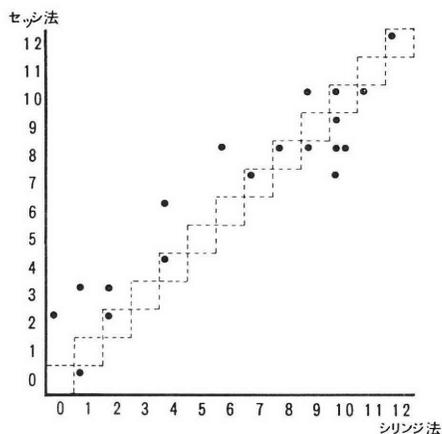


図 7 clomiphene 治療群の総頸管粘液スコア

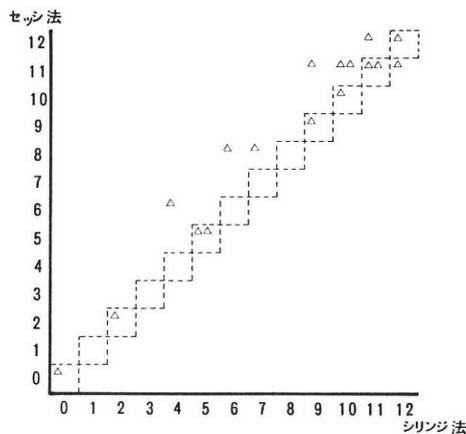


図 8 HMG-HCG 治療群の総頸管粘液スコア

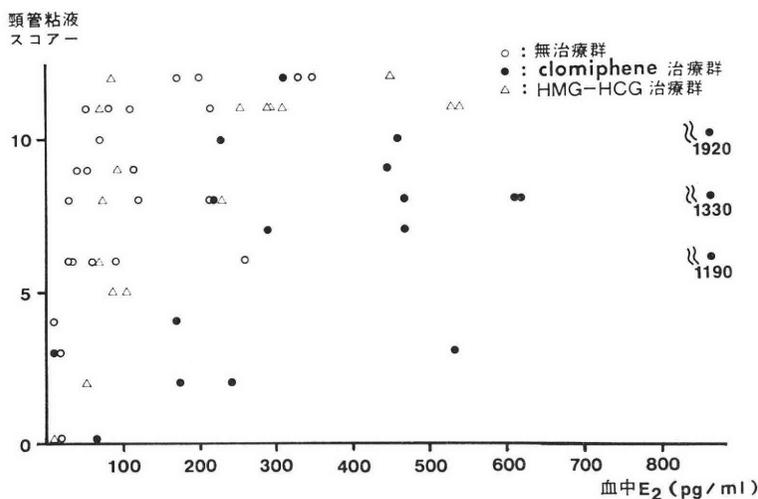


図 9 セッシ法における血中 E₂ 値と総頸管粘液スコア

治療群が $r=0.630$ と相関係数が一番高く、次いで無治療群, clomiphene 治療群の順であつた。

8) シリンジ法における血中 E₂ 値と総頸管粘液スコア

図10に示すように、シリンジ法における血中 E₂ 値と総頸管粘液スコアの相関関係は、セッシ法における関係とほぼ同様に 1%以下の危険率で有意な相関が認められたが、全体では $y=0.003x+6.79$, $r=0.251$ と低値を示した。各治療群では、HMG-HCG 治療群では $r=0.625$ と比較的高い相関を示したが、無治療群 ($r=0.560$) clomiphene 治療群 ($r=0.395$) では相関係数は低値を示した。

考 察

子宮頸管内膜の頸管腺より分泌される頸管粘液は、月

経周期における性ステロイドの血中レベルを反映し、すなわち、卵胞発育に伴うエストロゲン活性の増加を反映して増加し、排卵後黄体から分泌されるプロゲステロンの作用により減少すると言われている。つまり、排卵期になると、量は著しく増加し、牽糸性は増大し、粘稠性は低下し、精子の頸管粘液内通過性は著しく改善する。精子に関しては Sims¹⁾ が1869年、頸管粘液内に精子を初めて観察し、Huhner²⁾ が頸管粘液の PCT (Postcoital test, Huhner test) を不妊症治療の必須検査法として確立したが、PCT の判定結果が必ずしも妊娠成功例と一致しないとの報告³⁾もある。このように、頸管粘液検査は排卵時期の決定のみならず、その性状により精子に与える影響も大きく、その判定には注意を要する。また、頸管粘液分泌不全、clomiphene 治療群では頸管粘液が少ないこともあり、従来のシリンジ法では頸管粘液

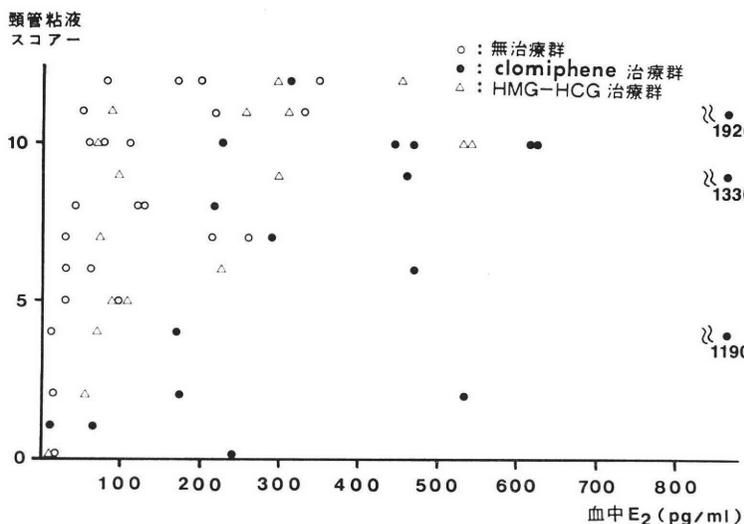


図 10 シリンジ法における血中 E_2 値と総頸管粘液スコア

の採取が困難なことがしばしば経験される。そこで、今回セッシ法にて頸管粘液検査を試みた。セッシ法そのものの方法は図 1 に示すように容易であり、またスライドグラス上での乾燥も図 2 に示すように極めて少量しかスライドグラス上に塗布しないため、自然乾燥が容易であり、判定も従来のシリンジ法よりも早く出来る利点がある。そこで問題となるのは、セッシ法を用いた場合、従来のシリンジ法と比較した場合、大きなずれが生じるかどうかということ、また、シリンジ法と比べて血中 E_2 値の反映率が大きく変わらないかどうかである。そこで頸管粘液スコアのうち、結晶形成、牽糸性、頸管粘液量のそれぞれについて無治療群、clomiphene 治療群、HMG-HCG 治療群に分けて、セッシ法とシリンジ法を同時に施行し、その結果を比較検討した。

結晶形成、牽糸性はセッシ法とシリンジ法との一致率は共に 64.4% であり、約 2/3 は一致していた。しかし、頸管粘液量は一致率が 49.2% と低く、これはセッシ法の場合は主観的要素が強いためと推察される。各治療群に分けてみると、無治療群では一致率は 68.1% であり、HMG-HCG 治療群は 52.9% であつた。しかし、clomiphene 治療群では平均 50.9% と最も一致率が低く、clomiphene の抗エストロゲン作用による頸管粘液に対する副作用により頸管粘液の状態が悪くなり、セッシ法とシリンジ法での一致率が低くなつたと推測される。しかし、セッシ法とシリンジ法とのスコアが 2 ランク以上違った例は、無治療群 1 例、clomiphene 治療群 2 例、HMG-HCG 治療群 2 例であり、一致しなくてもランク的には 1 つしか違わず、セッシ法はシリンジ法と大きな相違はなく、この点ではセッシ法は有用性があると推測

される。

次に、総頸管粘液スコアと血中 E_2 値との相関についてみてみると、総合的にセッシ法、シリンジ法ともに相関関係はあまり良好とは言えず、頸管粘液スコアから血中 E_2 を推測すること、あるいはその逆は困難であることが示唆され、頸管粘液検査の場合に血中 E_2 値の測定結果に頼り過ぎることは無理があると推測される。しかし、HMG-HCG 治療群ではセッシ法、シリンジ法共に頸管粘液スコアと血中 E_2 値の間に比較的高い相関関係が認められ、HMG-HCG 治療群において頸管粘液検査により HMG の投与量の決定、卵巣過剰刺激症候群の予防がある程度可能であると推測される。

以上の結果より、セッシ法とシリンジ法とを比較した場合に大きな差違はなく、セッシ法がシリンジ法に比べて簡易であることより、セッシ法は今後不妊症外来での頸管粘液検査において有用であることが示唆された。現在当科ではセッシ法のみにて頸管粘液検査を施行し、不妊外来の迅速化に努めている。

本論文要旨は第 31 回日本不妊学会 (於 仙台) で発表した。

稿を終るにあたり、御指導および御校閲を賜つた恩師、北尾学教授に深謝する。

文 献

- 1) Sims, J. M.: On the microscope as an aid in the diagnosis and dating of sterility, N. Y. Med. Bull., 8: 393, 1869.
- 2) Huhner, M.: The practical scientific diagnosis and treatment of sterility in the male and

female, *Med. Record*, 85 : 840, 1941.

- 3) Collins, J. A., So, Y., Wilson, E. H., Wrixon, W. and Casper, R. F.: The postcoital test as a predictor of pregnancy among 355 infertile couples. *Fertil. Steril.*, 41 : 703, 1984.

Accuracy of cervical mucus test (pincet method) in our clinic

Kazuo Yoshino, Arata Nishigaki, Takaaki Shirai, Akihiro Uchida, Yoshimi Araki and Kentaro Takahashi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University

We examined a comparative study between pincet method and syringe method at fern leaf phenomenon, spinnbarkeit, volume of cervical mucus and a status of external cervical ostium in cervical mucus test, and simultaneously serum estradiol-17 β (E₂) was measured. Results were as follows: 1) The corresponding rate between the two methods in fern leaf phenomenon, spinnbarkeit and volume of cervical mucus were 64.4, 64.4 and 42.1%, respectively. 2) A gap of score in cervical mucus test was within one point in almost of them. 3) There was low correlation between cervical mucus score and serum E₂ at both methods.

Consequently, we suggest that the pincet method was expedient and useful for cervical mucus test.

(受付: 昭和61年11月20日)

経鼻的 native LH-RH の波状投与による排卵誘発効果

Ovulation Induction Effects of Intranasal Administration of Native LH-RH to Amenorrhoeic Women

新潟大学医学部産科婦人科学教室

佐藤 芳昭 広橋 武

Yoshiaki SATO Takeshi HIROHASHI

Department of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine Niigata University

Eugonadotropic (一部 hypergonadotropic) で LH-RH テストに反応し、正常プロラクチン血症であつて、clomiphene または HMG の単独投与に2周期以上反応しない患者のうち、第1度無月経12例、第2度無月経7例(全69周期)を対象として、LH-RH nasal spray (Kryptocur®) 200 μ g を2時間毎3~4回、連日4~5日経鼻投与し、その排卵誘発効果をみた。①HMG との併用例で100%、clomid+HMG の併用例で80%、clomid との併用例で57.1%、LH-RH の単独投与で17.4%に排卵を認めた。本法は pump 法に比し、その効果はやや低いが、きわめて安全かつ患者の負荷も少なく、かつ一般病院のレベルでも施行可能な LH-RH の波状投与方法として効果があると考えられた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3). 422-427, 1987)

緒言

1971年に Schally と Guillemin らにより LH-RH が同定されて以来、その臨床応用は目ざましく、最近では native LH-RH の波状投与 (pulsatile administration) によつて生理的に自然に近いメカニズムでの排卵誘発が試みられ、その成績は優秀との報告が多くみられる。しかし、その投与方法が経皮的または経静脈的にポンプを使つて行う方法が一般的であるために患者の負荷や合併症を考慮すると、対象がきわめて限られたものとなっている。そこでわたくしたちは、前立腺癌治療のために考案された native LH-RH の経鼻的投与器 (nasal spray) を用いて従来の主たる排卵誘発法 (clomiphene 投与および HMG HCG 療法) にて排卵誘発に失敗した患者に対して、この nasal spray の使用を併用し、誘発効果の著しい改善を認めたので、ここにその成績と文献的な考察を加えて報告する。

対象と方法

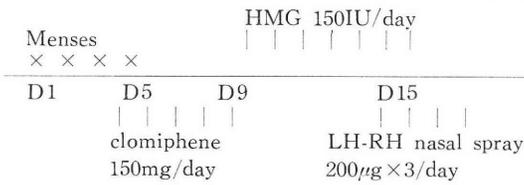
対象としては、4つのグループ群に分けた患者に対して治療を行つた。まずこれらの全ての患者は、治療開始前にホルモン測定を含むルーチンの無排卵症の検査を全

て終わり、治療法として clomiphene (または hCG 併用) および HMG, HCG 療法にて2週期以上排卵誘発に失敗した症例である。従つて、それらの患者は eugonadotropic (一部 hypergonadotropic) で、LH-RH テストに反応があり、高プロラクチン血症 (30mg/ml 以上) のものは除いた。Clomiphene 無効例には clomiphene+LH-RH nasal spray または nasal spray の単独投与(表1のGroup 3, 4)、HMG または clomiphene HMG 無効例には、HMG 投与に引きつづいて、LH-RH の nasal spray を使用した(表1の Group 1, 2)。

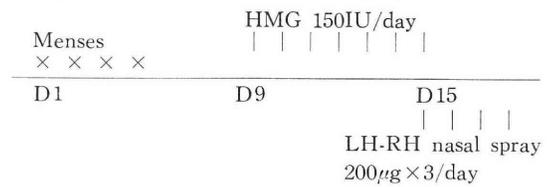
対象例の無月経重症度と治療法別の分布は表2に示したごとくであり、第1度月経12例、第2度月経7例の計19例(69周期)に本 spray 療法を施行した。使用した spray は Kryptocur® (独ヘキスト社) で native LH-RH を10mg 含有し、spray 法は1回200 μ g を1日3~4回、2時間毎に経鼻的に噴霧投与を行つて、基礎体温測定、超音波スキャン、血中ホルモン測定などで排卵および卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation Syndrome: OHSS)、妊娠成立などのモニターを行つた。

表 1 Combined therapy with clomiphene, HMG and LH-RH nasal spray

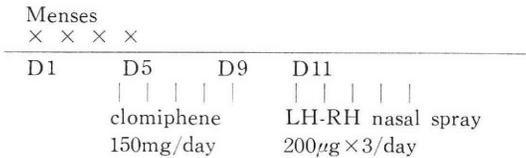
Group 1: clomiphene+HMG+LH-RH nasal spray



Group 2: HMG+LH-RH nasal spray



Group 3: clomiphene+LH-RH nasal spray



Group 4: LH-RH nasal spray

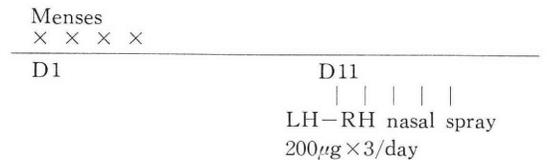


表 2 Response to gestagen test in patients

		amenorrhoea	amenorrhoea
		I°	II°
Group 1	clomiphene HMG LH-RH	4(2)*	3
Group 2	HMG LH-RH	2	0
Group 3	clomiphene LH-RH	3	1
Group 4	LH-RH	3	3
total		12 cases	7 cases

*: pregnancy

表 3 Induction of ovulation by various methods

		CYCLE	CASE
		Group 1	clomiphene HMG LH-RH
Group 2	HMG LH-RH	4/4	2/2
Group 3	clomiphene LH-RH	4/7	3/4
Group 4	LH-RH	4/23	3/6
total		40/69 (58.0%)	14/19 (73.7%)

結 果

(1) 排卵誘発成功率

表 3 に示したごとく、19 例中 14 例 (73.7%) に排卵誘発の効果を確認した。周期としてみた場合、69 治療周期中 40 周期 (58.0%) に効果があり、うち妊娠例は 2 例である。治療法別の誘発成績は表 3 にまとめたごとくであり、症例数が少ないが、HMG+LH-RH が 100% の誘発率で、つづいて clomiphene+HMG+LH-RH 例の 80% であり、LH-RH 単独では 17.4% (全て周期あたり) であった。なお OHSS は WHO 分類 II 以上の例は存在せず、妊娠の 2 例はともに単胎妊娠であった。

(2) 正常卵胞期での LH-RH の LH に及ぼす影響

図 1 に正常性周期を有する婦人へ LH-RH nasal spray による波状投与を行って、30 分毎に採血し、周期 11 日目 (D11) と 15 日目 (D15) での LH の分泌パターンをみたものを示した。

明らかに D15 では排卵へ向けての分泌増強があり、LH-RH への感受性の高まりを示している。

(3) 無排卵症婦人卵胞期での LH-RH の LH に及ぼす影響

図 2 に示したごとく、LH-RH nasal spray の治療の終了した時点での LH の pulsatility を 2 例について行つた。図の左側は結果的に排卵誘発に成功した例であり、右側は失敗した例である。排卵成功例ではほぼ正常か、やや深い amplitude がみられたのに対し、失敗例では pulse が小さかった。一方、FSH の分泌に及ぼす影響は、ほとんど差がみられなかった。

(4) 排卵例における LH-RH 投与前後のホルモン動態

排卵誘発に成功した症例において、LH-RH nasal 療法開始直前と直後の血中ゴナドトロピン、PRL、17β-estradiol (E₂) に与える影響をみたのが図 3 である (従つてこの期間は 4 日間である)。予想されたごとく、LH、E₂ ともに有意の上昇傾向を示し、一方、FSH、PRL には変動がみられない。

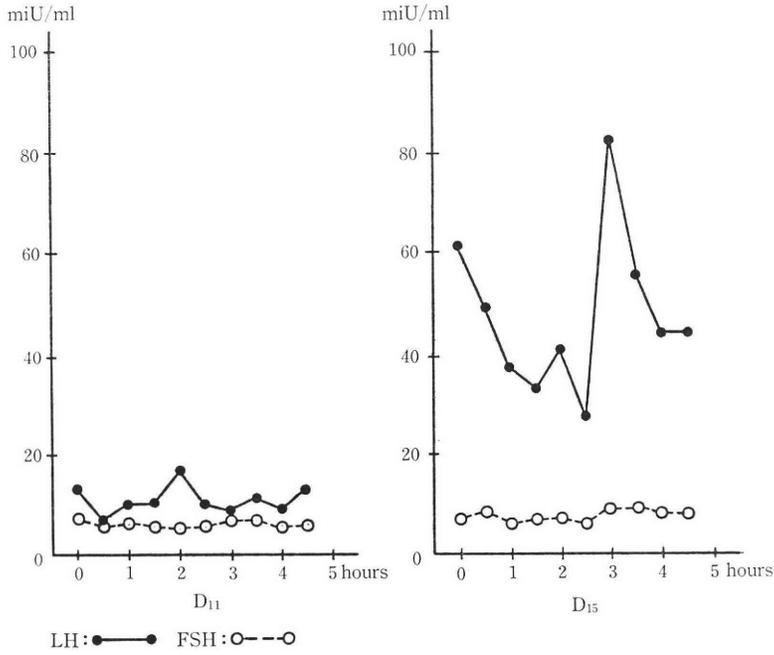


図 1 Serum LH and FSH levels at 30 min intervals during follicular phases in normal woman

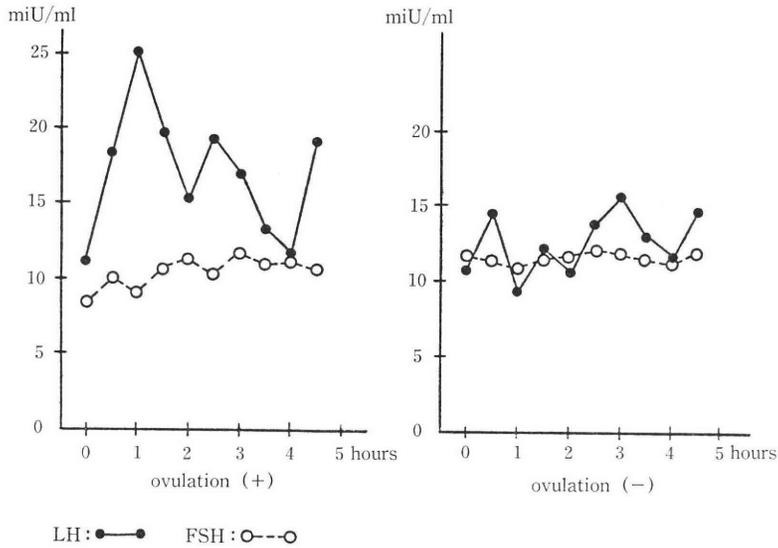


図 2 Serum LH and FSH levels at 30 min intervals during the follicular phases after intranasally sprayed LH-RH.

考 案

1971年に Kastin ら¹⁾が HMG で今まで治療していた患者にヒト下垂体製 LH-RH を静注し、妊娠に成功した例の報告以来、LH-RH を利用しての排卵誘発に関し

ての報告²⁻⁴⁾が多いが、最近にいたるまでにその成功率と妊娠率は低かった。これは LH-RH の波状投与がされず、逆に長期の LH-RH 負荷が LH-RH receptor を down regulation してしまつたためと思われる。Belchetz ら⁵⁾がサルでの LH の波状分泌をみつけ出し、Le-

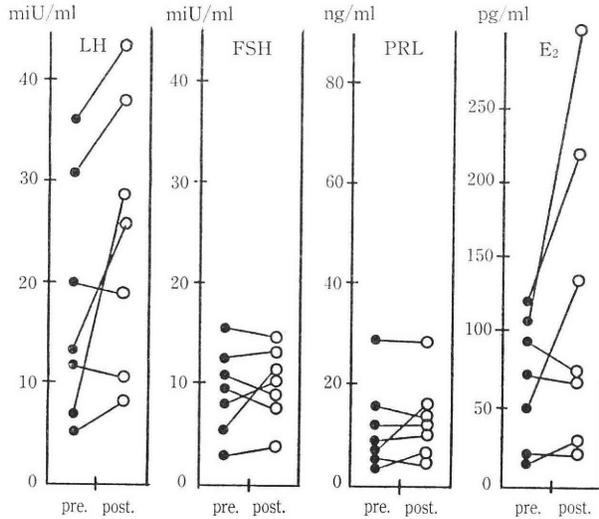


図 3 Pretreatment and posttreatment serum hormones levels after intranasally sprayed LH-RH. (ovulation +)

yendeker²⁾ (1980) のヒトに名する波状投与法の画期的な発表以後、pulsatile な投与方法が生理的に最も近い無排卵の治療法として注目をあびている。しかし現在でも、その投与方法および投与量の最適な方法は確立されていないといつてよい。最初の報告である Knobil¹⁾らは10-15 μ g の LH-RH を90分毎に17~20日間の投与を報告して以来、現在では1-20 μ g を64~180分間隔で静脈へ投与する報告が多いようである。

一方、経皮的に LH-RH を投与する方がより危険と負荷が少ないことから、この方法を推奨する向きもあり、この方法では1-20 μ g を60分~120分間隔で投与する方法が多い。

特に Mason ら⁷⁾の28例に対する皮下注法にて90%以上の排卵成功率と89%の妊娠率の驚異的な報告もあり、現在でも多くの人たちがこの方法を行っている。しかし Reid ら⁸⁾は、経静脈法と経皮下法とをしらべて、使用量に対する反応のばらつきが大きいと、静注法より多量の薬剤が必要で、かつ排卵の予測がむづかしいので、批判的であり、この点は今回の nasal spray 法にもあてはまるが、B-Scope を用いてモニターを行えば、ある程度この点は解決できよう。Nasal spray による方法はほとんど報告がなく、われわれは一応従来の誘発法に引きつづいて2時間毎の1日3~4回投与を行ったが、簡便性からは明らかに上記の2方法より手軽であり、現実的治療と考えられるが、経鼻的吸収という大きな問題点があり、今回の200 μ g 投与では5%の吸収率で、実際は10 μ g の吸収となり、薬剤の無駄という点では改良の余地

がある。また昼間3~4回の吸入で、夜間は実際上吸入が無理であり、この点では重症例には適応しにくいと思われる。

すなわち、一般的に正常婦人では90~120分で pulse がおこつていると言われるが、Backstrom⁹⁾によると、6時間毎に早期卵胞期 (D₁-D₄) では3.4回、中期卵胞期 (D₅-D₉) では4.1回、末期卵胞期 (D₁₀-D₁₄) では4.4回おこり、時期により異なるとしているので、投与方法を現時点で一律に決定するのはむづかしい。

次に、どのような患者に LH-RH 波状投与を行うかについては、原則的には視床下部性無月経で、第1度無月経は、まず clomiphene が用いられるべきである。また LH-RH テストにて無反応のグループは当然 HMG 療法が主体となるので、LH-RH 投与の対象は、われわれの症例のように、eugonadotropic (一部 hypergonadotropic) で、clomiphene 無効例 (一部 HMG 無効例) となる。高プロラクチン血症については別のカテゴリーで考えられるべきであり、また Polycystic ovaris syndrome (PCO) については LH-RH 療法は好ましいとの報告¹⁰⁾もあり、今回の19症例中6例は PCO と考えられるので試みられるべき方法と考える。

実際にわれわれが用いた native LH-RH spray をどのように用いるかについては、多くの検討すべきことが残されているが、一般的に LH-RH 波状投与方法が有利であると思われるのは、(1) LH-RH 分泌パターンが生理的狀態に近い、(2) 正常の feed back 系が働くために

卵胞発育が正常に近く、かつ OHSS や多胎妊娠などが、HMG 療法より少なく、(3) 妊娠成立率がより高く、流産率が少ない、(4) 高単位で多数の卵胞を发育させ得るので、IVF や GIFT (gamete intrafallopian transfer) にも応用できるなどがあげられよう。しかし一方では、経済的に LH-RH 療法は高価であり、その最大の理由は infusion pump の値段が高く、Wong¹¹⁾によれば、アメリカでは1周期の LH-RH pulse 療法は \$545~\$730 で、そのうちの1/3を pump のレンタル料が占めると言い、また LH-RH そのものも analog より高価で、かつ患者そのものがカテーテルつきの pump に対し多かれ少なかれ嫌悪感をもっていることなどが不利な点としてあげられ、LH-RH への抗体産生なども将来の問題としておこるかもしれない。これらの不利な点に関しては、われわれが用いた nasal spray 法によって(しかも従来の誘発法の併用で)かなりの点が克服できる。効果の点ではやや pump 法に劣るのは確かであるが、一般の臨床に広く LH-RH 療法がひろまるためには、このような簡易な nasal 法も十分に考慮されるべきと思う。副作用として症例には含めていないが、spray 使用中鼻炎の悪化をみて中止した一例のみで、他に認めるべき副作用もなく、安全性も高いと考えている。

おわりに

Native LH-RH の波状投与という新しい排卵誘発法は生理的な自然の mechanism に最も近い方法として注目されている。しかし、autoinfusion pump の使用が隘路となつて、一般的方法として採用されたい面もある。そこで、簡易法としての nasal spray の使用を試みて、従来の誘発法に抵抗する症例の中からかなりの誘発成功例を経験し、かつその副作用もほとんど問題のないことを報告した。

(本論文の要旨は第11回国際不妊学会(西ベルリン、1985年)で発表した。)

文 献

- 1) Kastin, A. J., Zarate, A. and Midgley, A. R. Jr.: Ovulation confirmed by pregnancy after infusion of porcine LH-RH, *J. Clin. Endocrinol.*, 33: 980, 1971.
- 2) Leynendecker, G., Struve, T. and Plotz, E. J.: Induction of ovulation with chronic intermittent (pulsatile) administration of LH-RH in women with hypothalamic and hyperprolactinemic amenorrhea. *Arch. Gynecol.*, 229: 177, 1980.

- 3) Skarin, G. Nillvs, S. J. and Wide, L.: Pulsatile low dose luteinizing hormone-releasing hormone treatment for induction with asing hormone treatment for induction aeth intermittent subcutaneous LH-RH. *Lancet*, 1: 147, 1981.
- 4) Hanker, Jp., Neischlag, E. and Schneider, H. P. G.: Frequency-varied versus unvaried pulsatile LH-RH substitution in hypothalamic amenorrhea. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Rep. Biol.*, 17: 103, 1984.
- 5) Belchetz, P. E., Plant, T. M. and Nakai, Y.: Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 202: 631, 1987.
- 6) Knobil, E.: The neuro-endocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.*, 36: 53, 1980.
- 7) Mason, P., Adams, J. and Morris, D. V.: Induction of ovulation with pulsatile lutenizing hormone releasing hormone. *Br. Med. J.*, 288: 181, 1984.
- 8) Reid, R. L. and Sauerberi, F.: Evaluation of techniques for induction of ovulation in out patients employing pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 148: 648, 1984.
- 9) Beckstrom, C. T., McNeilly, A. S. and Leask, R. M.: Pulsatile secretion of LH, FSH, Prolactin, oestradiol and progesterone during the human menstrual cycle. *Clin. Endocrinol.*, 17: 29, 1982.
- 10) Ory, S. J., London, S. N. and Tyrey, L.: Ovulation induction with pulsatile gonadotropin-releasing hormone administration in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil. Steril.*, 43: 20, 1985.
- 11) Wong, P. C. and Ricardo, H. A.: The pulsatile administration of lutenizing hormone-releasing hormone for ovulation. *Int. J. Fertil.*, 30: 4, 1986.

Ovulation induction effects of intranasal administration of native LH-RH to amenorrhic women

Yoshiaki Sato and Takeshi Hirohashi

Department of Obsterics & Gynecology School of Medicine NIIGATA University

Anovulation patients who had failed to the usual ovulation induction methods were treated with pulasatile LH-RH nasal sprays. Patients in each group were treated daily three or four times

with the dose of 200 ug of LH-RH and spraying was done between days 10-15 of the menstrual cycle.

Ovulation was monitored by BBT and B-Scan. The serum endocrine evaluation throughout the cycle was studied with respect to 17β -estradiol and progesterone.

In all, 19 women were studied and we achieved ovulation in 14/19 cases (73.7%) and 40/69 cycles (58.0%). This study indicates that intranasal route for ovulation induction using pulsatile LH-RH is very effective and is easier to accomplish than the pump methods.

(受付：昭和61年11月20日)

CORRELATION BETWEEN THE REACTION-TYPE OF LH-RH TEST AND OBESITY IN INFERTILE WOMEN

Kentaro TAKAHASHI, Kazuo YOSHINO, Takaaki SHIRAI,
Arata NISHIGAKI, Yoshimi ARAKI and Manabu KITAO

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

Abstract: To determine whether or not the delayed reaction-type, that is that the peak of LH observed on and after 90 minutes, in the LH-RH test is connected with obesity, we analysed 113 LH-RH tests in 113 sterile women, using the obesity-index.

The results were as follows:

1) The incidence of the delayed reaction-type was 20.4 % in patients with ovulatory disturbances and was lower than the incidence (37.3 %) in patients with a normal ovulatory cycle.

2) The delayed reaction-type accounted for 100 %, in obese women with ovulatory disturbances.

3) All of obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS) had the delayed reaction-type, in the LH-RH test. On the contrary, in thin women with secondary amenorrhea 2nd grade (SA 2nd grade), the delayed reaction-type was frequently observed.

4) Obese women had a high rate incidence of the delayed reaction-type, despite the reaction pattern in the LH-RH test.

Therefore, we suggest that the delayed reaction-type in the LH-RH test is closely connected with obesity and PCOS.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 428-431, 1987)

Introduction

Generally, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) levels have peaks at 30 and 60 minutes, respectively, after luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) intravenous administration. But the LH level rarely peaks on and after 90 minutes¹⁾. We termed this the delayed reaction-type, and from an analysis of data obtained on the LH-RH test given to 100 infertile women, we reported that the delayed reaction type was not so rare and was observed in 35 % of infertile women²⁾.

Functional disorders of the ovary, especially ovulatory disturbances has frequently been observed in obese women³⁻⁶⁾. Disorders of the hypothalamus is one related mechanism. The feeding center exists in the hypothalamus. Obesity originate in accentuation of

appetite due to the hypothalamic abnormality. On the other hand, the hypothalamus is a secreting region of LH-RH, the secreting disorders leads to disorders of gonadotropin secretion from the pituitary gland, consequently, ovarian function is obstructed.

On the other hand, there is a correlation with an organic lesion in the hypothalamus-pituitary system⁷⁾ and a relation to an abnormal electroencephalography⁸⁾ in patients with the delayed reaction-type in the LH-RH test. Therefore, it was suggested that the delayed reaction-type in the LH-RH test and obesity correlate. We now report a new view of the correlation between the delayed reaction-type in the LH-RH test and obesity.

Materials and methods

One hundred and thirteen sterile women (59 with a normal ovulatory cycle and 54

Table 1 Incidence of obesity-index and the delayed reaction-type in infertile patients

Obesity-index	Total No.	No. of the delayed reaction-type	%
~ +20%	10	7	70.0
+20~+10%	15	2	13.1
+10~-10%	64	18	28.1
-10~-20%	22	6	27.3
-20%~	2	0	0
Total	113	33	29.2

with ovulatory disturbance), aged 22-39 yr (mean 27 yr), who visited the sterility clinic of our hospital and were examined using the LH-RH test, were the subjects of this study.

These women were given 200 µg LH-RH i. v. on day 10 after initiation of menstruation or withdrawal-bleeding (follicular phase). Blood samples were collected before and at 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after the LH-RH administration and were assayed for serum LH and serum FSH by the radioimmunoassay method. The classification of the reaction pattern in the LH-RH test in our clinic includes 7 types²⁾. We analysed the reaction pattern of LH and FSH in the LH-RH test and examined, as the delayed reaction type, the peak of LH observed on and after 90 minutes.

The obesity-index was according to the Japanese variation of Broca's index⁹⁾, namely, patients who were 20 per cent or over the ideal body weight, 10 per cent or more over the ideal body weight, -10 per cent or more over the ideal body weight, -20 per cent or more over the ideal body weight and -20 per cent under the ideal body weight were classified as obese, obese-tendency, standard weight, thin persons and emaciation, respectively. The infertile women were grouped into five types according to the Obesity-index and of ovulatory disturbances³⁾. We made a correlation study between the delayed reaction-type in the LH-RH test and obesity.

Results

The delayed reaction-type accounted for 29.2% of 113 given the LH-RH test. Classi-

Table 2 Incidence of obesity-index and the delayed reaction-type in patients with a normal ovulatory cycle

Obesity-index	Total No.	No. of the delayed reaction-type	%
~ +20%	6	3	50.0
+20~+10%	7	2	28.6
+10~-10%	37	13	35.1
-10~-20%	9	4	44.4
-20%~	0	0	—
Total	59	22	37.3

Table 3 Incidence of obesity-index and the delayed reaction-type in patients with ovulatory disturbances

Obesity-index	Total No.	No. of the delayed reaction-type	%
~ +20%	4	4	100
+20~+10%	8	0	0
+10~-10%	27	5	18.5
-10~-20%	13	2	15.4
-20%~	2	0	0
Total	54	11	20.4

fyng the delayed reaction-group by the obesity-index, the incidence of the delayed reaction type was 70 per cent in obese, 28.1 per cent in standard weight, 27.3 per cent in thin persons and 0 per cent in cases of emaciation (Table 1). The correlation between obesity and the LH-RH test in patients with a normal ovulatory cycle is shown in Table 2. Of the 59 patients with a normal ovulatory cycle, 22 (37.3%), the weight was abnormal weight. Of these 59 given the LH-RH test, the incidence of the delayed reaction-type was 37.3 per cent. Classifying by obesity-index, the highest incidence of the delayed reaction-type was obese at 50.0 per cent. The incidence in thin person, in standard weight and in obese-tendency were 44.4%, 35.1% and 28.6%, respectively. On the contrary, of the 54 patients with an ovulatory disturbance, 27 (50.0%) were patients with an abnormal weight and the incidence of the delayed reaction-type was 20.4%. This incidence was lower than the incidence in patients with a normal ovulatory cycle. Classify-

Table 4 Classification according to the obesity-index and disorders related to infertility

Diagnosis Obesity-index	Anovulatory cycle	Secondary amenorrhea 1st grade	Secondary amenorrhea 2nd grade	Hyperprolac- tinemia	Polycystic ovary syndrome
~ +20%	0	1 (1)	0	0	3 (3)
+20~+10%	2 (0)	1 (0)	0	2 (0)	3 (0)
+10~-10%	10 (2)	3 (0)	3 (0)	4 (1)	7 (2)
-10~-20%	4 (1)	4 (0)	3 (0)	1 (1)	1 (0)
-20%~	0	1 (0)	1 (0)	0	0
Total	16 (3)	10 (1)	7 (0)	7 (2)	14 (5)

() No. of the delayed reaction-type

ing according to the obesity-index, the incidence of the delayed reaction-type in obese patients was 100%. There was no incidence of the delayed reaction-type in patients with obese-tendency and with emaciation. The incidence of the delayed reaction-type in patients with standard weight and in those with thin body were 18.5% and 15.4%, respectively. Thus, in patients with ovulatory disturbance, the incidence of the delayed reaction-type in the LH-RH test varied, in accord with the obesity-index. The incidence of the delayed reaction-type in ovulatory disturbance patients with obese-tendency and in thin persons was lower than that in those with a normal ovulatory cycle and in ovulatory disturbance in obese patients higher than in obese women with a normal ovulatory cycle (Table 3). The 54 patients with ovulatory disturbances were classified by diagnosis and the number of obesity and the delayed reaction-types in each group was determined (Table 4). There were no obese women in other groups, except secondary amenorrhea 1st grade (SA 1st grade) group and cases of polycystic ovary syndrome (PCOS) group. Patients with ovulatory disturbances were numerous in the groups of 10 per cent or under the ideal weight, especially in patients with secondary amenorrhea 2nd grade (SA 2nd grade). Those with ovulatory disturbance showed a trend toward increase but the delayed reaction type in the LH-RH test was not observed. In patients with PCOS, obese and obese-tendency were frequently observed and the incidence of the delayed reaction-type was 100 per cent.

Discussion

As obese women have a disorder of the hypothalamus-pituitary system, abnormal responses in the LH-RH test can be expected. Response of the LH-RH test in obese women has been more decelerative⁶⁾ or more accelerative⁹⁾ than that in non-obese women. In the present study, we discussed the relation to obesity, ovulatory disturbance and the delayed reaction-type in the LH-RH test. Consequently, because the delayed reaction-type was frequently observed in patients with normal menstrual cycle rather than in patients with ovulatory disturbance, we can not think that the delayed reaction type is an abnormal reaction. And further, the lack of any relationship between ovulatory disturbance and the delayed reaction-type was apparent²⁾. But, the delayed reaction-type accounted for 70% in obese patients, especially, in obese patients with ovulatory disturbance the very high rate incidence of the delayed reaction-type was observed. Therefore, it is suggested that the delayed reaction-type in the LH-RH test is closely connected with obesity and a correlation between the delayed reaction-type and PCOS exists.

References

- 1) Kurachi, K.: Differential diagnosis of the region of ovulatory disturbance. In: Induction of ovulation (Nakano, R. ed), pp. 63-77, Kanehara Shuppan, Tokyo, 1980 (in Japanese).
- 2) Takahashi, K., Nishigaki, A., Nagata, H., Shirai, T., Yoshino, K., Shibukawa, T. and Kitao, M.: Clinical studies on the LH-RH test for patients with ovulatory disturbance—A consideration for the delayed reaction-type—.

Jap. J. Ster. (in press).

- 3) Yoshino, K., Shibukawa, T., Araki, Y., Shirai, T., Takahashi, K. and Kitao, M.: Obesity and ovulatory disorders in infertile Japanese Shimane J. Med. Sci. (in press).
- 4) Hartz, A. J., Barboriak, P. N., Wong, A., Katayama, K. P. and Rimm, A. A.: The association of obesity with infertility and related menstrual abnormalities in women. Int. J. Obesity., 3 : 57, 1979.
- 5) Bates, G. W., Whitworth, N. S. and Bates, S. R.: Effects of body weight control on reproductive function. Fertil. Steril., 35 : 248, 1981.
- 6) Kopelman, P. G., Pilkington, T. R. E., White, N. and Jeffcoate, S. L.: Abnormal sex steroid secretion and binding in massively obese women. Clin. Endocrinol., 12 : 363, 1980.
- 7) Kurokawa, H.: Clinical assessment of ovulatory disorder with LH-RH test. Acta. Obst. Gynaec. Jpn., 26 : 621, 1974. (in Japanese).
- 8) Kaneda, K., Yoshiga, T., Sawahara, M., Tagashira, T., Mio, Y., Iba, N., Iwasa, Y. and Maeda, K.: The studies on LH-RH test with respect to abnormal electroencephalographic findings in anovulatory women. Yonago Acta. medica., 23 : 1, 1979.
- 9) Newmark, S. R., Rossini, A. A., Naftolin, F. I., Todd, R., Rose, L. I. and Cahill, G. F.: Gonadotropin profiles in fed and fasted obese women. Am. J. Obstet. Gynecol., 133 : 75, 1979.

不妊症患者における LH-RH test の反応型 と肥満との関連性に関する研究

島根医科大学医学部産科婦人科学教室

(主任: 北尾 学教授)

高橋健太郎, 吉野 和男, 白井 孝昭

西垣 新, 荒木 芳美, 北尾 学

LH-RH test の反応型パターンの一つである遅延型反応が、肥満とどのように関連しているかを知るために、当科不妊外来を受診し、LH-RH test を施行した 113 名の婦人を対象とし、LH-RH test の反応性パターンのうち、LH のピーク値が 90 分以降に認められるものを遅延型反応とし、これと肥満度との関連性について比較検討し、以下の結果を得た。

排卵障害婦人において遅延型反応を示すものは 20.4% であり、正常月経婦人における 37.3% よりも低値であったが、肥満症患者では 100% が遅延型反応を示した。PCOS の肥満症患者は全例遅延型反応を示し、逆に第 2 度無月経においては、やせ傾向婦人で遅延型反応が多く認められた。肥満症患者は LH-RH test の反応型にかかわらず遅延型反応は高率であった。

以上より、LH-RH test での遅延型反応は肥満と密接な関係があり、また、PCOS 患者との関連性も示唆された。

(受付: 昭和 61 年 7 月 14 日)

卵管 adrenergic neurotransmitter の 卵移送速度に対する調節効果

Mechanism of Egg Transport: Changes in the Amount of Adrenergic
Neurotransmitter in the Oviduct of Normal and Estrogen or
Reserpine-Treated Rabbits during Egg Transport

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室 (主任: 百瀬和夫教授)

谷 垣 学

Manabu TANIGAKI

Ist Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University, School of
Medicine, Tokyo (Director: Prof. Kazuo Momose)

卵管 adrenergic neurotransmitter の卵移送速度に対する調節効果を解明する目的で、卵が卵管内を通過する時期の卵管における noradrenaline (NA) の変動、および estradiol (E) 投与または reserpine 投与による変化を検討した。

家兔を、I: 非妊群、II: 妊娠群 (交尾後10, 12, 24, 72および96時間目に開腹)、III: estradiol 投与群 (25または250 μ g を皮下投与後12, 24および72時間目に開腹)、IV: reserpine 投与群 (hCG を投与する24時間前より0.3または0.6mg/日、皮下投与し、hCG 投与後24または72時間目に開腹) に分けた。蛍光組織化学的に卵管 adrenergic fiber の分布を観察した。卵管を近位峡部、遠位峡部および膨大部に分割した。卵管各部位と子宮を生理的食塩水で flush し、卵を得た。卵管各部位の NA を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

交尾後、遠位峡部における NA は低レベルを保持し、交尾後12時間目に最も低下し、その後、徐々に増加して96時間目に非妊時のレベルに復帰した。交尾後12時間目においては卵の大部分 (82.6%) は膨大部に認められた。E 25 μ g 投与後72時間目の遠位峡部 NA は増加したが、近位峡部の NA には変化は認められず、E 250 μ g 投与後72時間目の遠位と近位峡部の NA は増加したが、膨大部の NA には変化は認められない。E 投与後72時間目における卵の分布状態は、卵の移動が遅れ、卵は遠位峡部と膨大部に停滞した。Reserpine 処置群では、卵管各部位の NA は著明に低下し、この時期の卵は子宮に到達するのが大幅に遅れ、卵管各部位に著しく滞った。遠位峡部では豊富な蛍光線維が輪状筋層に観察され、膨大部の蛍光線維は主として血管周囲に認められた。

正常な状態において卵が卵管内を移動する際には、遠位峡部の NA が低レベルを維持して卵の移送を制御しており、neuroeffector system、とりわけ遠位峡部での noradrenergic activity の変化は卵管内における卵の移送速度を調節する重要な因子である。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 432-440, 1987)

緒 言

大部分の哺乳動物において、卵は排卵後約3日で子宮に到達するという。とくに卵が膨大部を通過するのは予想以上に速く、排卵後約2時間で ampullary isthmic junction (AIJ) に達する。この卵の50%以上は AIJ に

14~38時間停滞し¹⁾、その後、峡部に移動して排卵後約72時間で子宮腔に入る。卵が急速に、あるいはあまりにも遅く子宮に到達すれば、生殖器各部の連係機能にひずみが生じる。

卵管平滑筋を主として支配するのは交感神経、とくに short adrenergic neuron であり²⁾、sympathetic post-

ganglionic neurotransmitter である NA が卵管峡部の輪状筋層に豊富に分布している^{3,4)}。従来より、卵管内の卵の移送に影響を及ぼすものとして、卵管線毛、筋収縮あるいは粘膜からの分泌液が報告されてきた。近年、 α および β -adrenergic receptor が卵管に存在⁵⁻⁹⁾することが証明されるとともに、Brundin³⁾、Owman⁹⁾、Coutinho ら¹⁰⁾によつて、卵管運動と卵の移送を調節するのは卵管局所に存在する adrenergic な神経終末より release される NA の作用による可能性が強いことが指摘され、卵移送に対する交感神経の役割が注視されるようになった。

ここでは、卵が卵管内を通過する時期における、卵管各部位の NA の動態および卵管 NA に及ぼす E と reserpine の影響を検討し、卵管 NA の卵移送速度に対する調節効果を追求した。

実験材料および実験方法

I. 実験材料

体重 3~4 kg の日本白色家兔を使用し、以下の 4 群に分けて実験を行なった。

- 1) 非妊群
- 2) 妊娠群：交尾後 10, 12, 24, 72 および 96 時間目に開腹した。
- 3) Estradiol 処置群：E 25 μ g または 250 μ g を交尾後直ちに皮下投与し、投与後 12, 24 および 72 時間目に開腹した。対照群には E 溶解液 sesame oil のみを同量用いた。
- 4) Reserpine 処置群：reserpine 0.3mg または 0.6 mg/kg/日を、hCG (human chorionic gonadotropin) 100IU 静注の 24 時間前より、開腹日まで皮下投与し、hCG 投与後 24 または 72 時間目に開腹した。対照群には蒸留水を用いた。

家兔を空気栓塞にて屠殺後、卵管と子宮を摘出し、それらの組織表面に附着した脂肪や結合組織を除去した。卵管を近位峡部（子宮側の峡部 1/2）、遠位峡部（膨大部側の峡部 1/2）および膨大部に分割し、湿重量を測定した。左右両側の卵管各部位を合わせて 1 検体とし、NA 測定の試料に供した。

II. 実験方法

1. 家兔卵管中の NA の測定

NA の定量はアルミナを用いたカラムクロマトグラフィーで、Euler ら¹¹⁾の方法に一部改良を加えて行なった。卵管組織を細切し、10 倍量の冷 0.4 N 過塩素酸液中で、テフロン homogenizer により 5 分間 homogenize した。Homogenate を 2°C、12,000 \times g で 20 分間遠心して除蛋白した。上清に 0.2M EDTA-2Na 3ml を加え、

攪拌しながら 4N と 1N NaOH で pH を 5.5~6.0 に調整し、活性アルミナ 2g を加えて 7 分間攪拌した。その後、攪拌しながら 4N と 1N の NaOH で pH を 8.2~8.5 に調整した。このアルミナを含む全液を内径 9 mm のカラムに移し、25ml の蒸留水で 2 回アルミナを洗浄後、0.5N 酢酸 5 ml でカテコールアミンの溶出を行なった。この酢酸溶出液 100 μ l を高速液体クロマトグラムに自動注入し、自動カテコールアミン分析装置で NA を定量した。外部標準として NA 4ng を使用した。

高速液体クロマトグラフィーの条件の概略はプレカラム：Yanapak ODS-T 4.6mm \times 1 cm, カラム：Yanapak ODS-T 4.0mm \times 25cm, 溶離液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム, 0.1M NaH₂PO₄, 水溶液-メタノール, 流速：1.0ml/分, 温度：40°C, 試料量：卵管からのアルミナ溶出液 100 μ l, 検出：THI 法, 日立 204-R スペクトロモニター（励起波長 420 nm, 蛍光波長 520 nm）である。NA (4 ng) のピークの高さの再現性の変動係数は 1.0% (n=10), 除蛋白後の上清からの NA の回収率は 82.3 \pm 2.1% (Mean \pm SE, n=5) であった。NA レベルは平均値 \pm 標準誤差 ng/g wet weight で表示し、統計学的解析は Student's t 検定で行なった。

2. 卵の採取

卵管各部位と子宮を生理的食塩水で flush し、卵を得た。各群の総採取卵数を 100 として採取部位別に % で表示し、卵の分布状態の統計学的解析は χ^2 検定で行なった。

3. 卵管における adrenergic fiber の分布

Falk-Hilliarp ら¹²⁾の蛍光組織化学的法に基づき、摘出した卵管をアセトン・ドライアイスで急速凍結し、凍結乾燥機で -40°C, 4 日間凍結乾燥した。乾燥後、組織切片を 80°C, 1 時間パラホルムアルデヒドと反応させ、パラフィン包埋し、マイクロームで 3 μ に薄切した。脱パラフィン後、蛍光顕微鏡で adrenergic fiber の局在を観察し、写真撮影した。蛍光顕微鏡はオリンパス落射蛍光顕微鏡 BHS-RFK-A1 を使用した。

成 績

I. 家兔卵管中のカテコールアミンのクロマトグラム

図 1 は noradrenaline 4ng および adrenaline 2ng を含む標準試料を高速液体クロマトグラフに注入し、蛍光光度計で noradrenaline と adrenaline を測定した時のクロマトグラムである。Noradrenaline は 13.2 分、adrenaline は 17.1 分でそれぞれ溶出された。家兔卵管中のカテコールアミンのクロマトグラムは図 1 に示したようにピークの溶出時間は 13.2 分であり、標準試料の noradrenaline の retention time と一致したので、ピークは noradrenaline と同定された。

表 1 卵移動中の家兎卵管における NA の変化

交尾後時間	n	近位峽部	遠位峽部	膨大部
		NA ng/g wet wt.	NA ng/g wet wt.	NA ng/g wet wt.
非妊時	10	1065.8±44.1	1661.9±42.7*	698.7±55.8
10	7	911.9±52.9	1496.8±102.4	567.2±57.6
12	7	899.2±50.7	949.2±64.9*	429.2±25.0
24	6	959.6±75.2	1518.5±118.9	619.8±56.0
72	6	932.5±80.3	1462.8±119.2	551.8±52.1
96	6	945.8±56.4	1621.6±116.8	670.5±69.1
		Mean±SE		*P<0.01

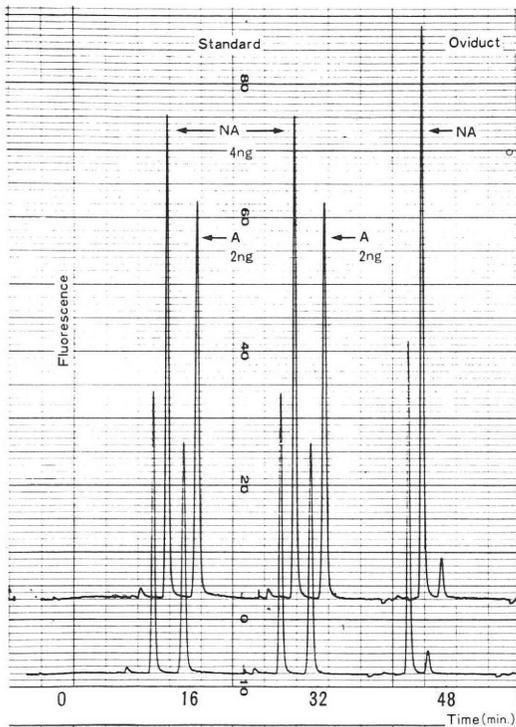


図 1 家兎卵管中のカテコールアミンのクロマトグラム

II. 卵管組織中における NA の変化

1. 卵移動中の卵管における NA の変化 (表 1)

近位峽部, 遠位峽部および膨大部の部位的な比較では, いずれの時期においても NA 量は遠位峽部, 近位峽部, 膨大部の順に多く, 遠位峽部と近位峽部および膨大部との間の NA 量には有意差 ($P<0.01$) が認められた. 近位峽部, 遠位峽部, 膨大部の各部位における交尾後の経時的な NA 量は非妊時に比べて低レベルを維持し, 交尾後漸減し, 12時間目で最も低下した. 以後, NA 量はゆるやかに増加し, 交尾後96時間目で非妊時のレベ

ルに復帰した. 交尾後12時間目の遠位峽部における NA 量は非妊時に比べて43.9%有意 ($P<0.01$) に減少したが, 近位峽部 NA 量は低下傾向を示すのみで, 有意の変動はなかった.

2. 卵移動中の卵管の NA に及ぼす E の影響 (表 2)

E 25 μ g または250 μ g 投与後, 12と24時間目の近位峽部, 遠位峽部ならびに膨大部における NA 量は対照群に比べて, いずれも有意の変化を示さなかった. E 25 μ g 投与後72時間目においては, 遠位峽部 NA 量のみが対照群に比べて有意 ($P<0.01$) の変化を示し, その増加は35.5%であり, 近位峽部の NA 量には増加傾向が認められた. E 250 μ g 投与後72時間目における遠位と近位峽部 NA 量の変化は対照群に比べてそれぞれ79.0%, 41.4%と有意に ($P<0.01$) 増加したが, 膨大部 NA 量には有意の変化は認められなかった.

3. 卵移動中の卵管の NA に及ぼす reserpine の影響 (表 3)

Reserpine 処置群における卵管各部位の NA レベルは, 22ng 以下と, 枯渇に近い状態まで著しく低下した. Reserpine 0.3mg または0.6mg 処置群で, hCG 投与後24と72時間目の近位峽部, 遠位峽部および膨大部における NA 量は対照群の約1/100で, 著明に減少 ($P<0.001$) した.

III. 採取卵の分布状態

1. 卵移動中の卵管と子宮における卵の分布状態 (表 4)

交尾後12時間目においては卵の大部分 (82.6%) は膨大部に存在し, 遠位峽部には17.4%の卵が認められた. 交尾後24時間目の卵は卵管各部位に移送され, 12時間目に比べて有意 ($P<0.001$) に遠位と近位峽部に移動していた. 遠位峽部に51.4%と最も多くの卵が存在し, 近位峽部に8.1%, 膨大部にも40.5%の卵が認められた. 交尾後72時間目においては, 卵の91.2%は子宮に移送され, 卵管では近位峽部のみに8.8%の卵が認められた. 交尾後

表 2 卵移動中の家兎卵管の NA に及ぼす estrogen の影響

交尾後時間	E μg	n	近位 峽 部		遠位 峽 部		膨 大 部	
			NA		NA		NA	
			ng/g	wet wt.	ng/g	wet wt.	ng/g	wet wt.
12	(-) 対照群	5	879.2±	51.4	974.7±	65.3	468.7±	24.8
12	25	5	866.8±	99.2	1098.7±	142.5	403.0±	51.7
12	250	5	841.9±	98.9	1033.3±	130.6	391.2±	69.3
24	(-) 対照群	5	921.8±	90.8	1477.2±	124.1	588.9±	64.5
24	25	5	980.4±	162.7	1574.6±	195.4	634.9±	68.6
24	250	5	938.7±	52.6	1515.7±	161.0	607.8±	69.3
72	(-) 対照群	5	919.9±	97.2*	1456.5±	97.9*	586.1±	50.2
72	25	6	1265.3±	110.6	1973.4±	85.0*	616.1±	69.9
72	250	6	1646.7±	168.1*	2060.2±	154.6*	715.8±	100.9

E: estradiol Mean±SE *P<0.01

表 3 卵移動中の家兎卵管の NA に及ぼす reserpine の影響

hCG 静注後 時 間	Reserpine mg/kg/日	n	近位 峽 部		遠位 峽 部		膨 大 部	
			NA		NA		NA	
			ng/g	wet wt.	ng/g	wet wt.	ng/g	wet wt.
24	(-) 対照群	5	994.5±	92.3*	1564.9±	332.9*	637.2±	77.1*
24	0.6	5	13.5±	2.0*	21.7±	3.4*	5.7±	1.1*
72	(-) 対照群	5	1127.7±	93.9*	1508.8±	146.1*	541.2±	50.3*
72	0.3	5	14.5±	2.4*	21.8±	3.1*	6.6±	1.0*

Mean±SE *P<0.001

表 4 卵移動中の家兎卵管および子宮における卵の分布状態

交尾後時間	n	回 取 卵									
		計 数	子 宮		近 位 峽 部		遠 位 峽 部		膨 大 部		
			数	%	数	%	数	%	数	%	
10	7	7	0	0	0	0	0	0	7	100	
12	7	46	0	0	0	0*	8	17.4*	38	82.6*	
24	6	37	0	0**	3	8.1*,**	19	51.4*	15	40.5*	
72	6	34	31	91.2**	3	8.8	0	0	0	0	
96	6	17	17	100**	0	0**	0	0	0	0	

*, ** P<0.001

24と72時間目の両者間における分布状態には有意 (P<0.001) の移動変化が認められた。交尾後96時間目の卵は全て子宮に到達し、卵管内には認められなかった。

2. E処置後の卵管と子宮における卵の分布状態 (表 5)

E投与後12時間目の卵の分布は対照群と同様であった。E 25μg または250μg 投与後24時間目における卵の移動状況は、対照群に比べて、近位峽部に存在する割合

は減少し、遠位峽部と膨大部に存在する割合が増加する傾向が認められた。E投与後72時間目における卵の分布状態には変化が認められ、対照群の卵は遠位峽部と膨大部に全く認められないのに、E処置後の卵は遠位峽部に25.0~40.8%、膨大部に44.4~62.5%分布しており、卵の移動が遅れ、有意 (P<0.001) に遠位峽部と膨大部に停滞していた。

3. Reserpine 処置後の卵管と子宮における卵の分布

表 5 Estrogen 皮下注後の家兎卵管および子宮における卵の分布状態

交尾後時間	E μg	n	回 取 卵								
			計 数	子 宮		近 位 峡 部		遠 位 峡 部		膨 大 部	
				数	%	数	%	数	%	数	%
12	(-) 対照群	5	34	0	0	0	0	5	14.7	29	85.3
12	25	5	32	0	0	0	0	4	12.5	28	87.5
12	250	5	31	0	0	0	0	4	12.9	27	87.1
24	(-) 対照群	5	31	0	0	3	9.8	16	51.5	12	38.7
24	25	5	33	0	0	2	6.1	15	45.4	16	48.5
24	250	5	31	0	0	1	3.2	14	45.2	16	51.6
72	(-) 対照群	5	26	24	92.7*	2	7.3	0	0*	0	0*
72	25	6	27	2	7.4*	2	7.4	11	40.8*	12	44.4*
72	250	6	24	1	4.2*	2	8.3	6	25.0*	15	62.5*

E: estradiol

* P<0.001

表 6 Reserpine 皮下注後の家兎卵管および子宮における卵の分布状態

hCG 静注後 時 間	Reserpine mg/kg/日	n	回 取 卵								
			計 数	子 宮		近 位 峡 部		遠 位 峡 部		膨 大 部	
				数	%	数	%	数	%	数	%
24	(-) 対照群	5	28	0	0	3	10.7*	16	57.2*	9	32.1*
24	0.6	5	18	0	0	0	0*	3	16.7*	15	83.3*
72	(-) 対照群	5	21	19	90.5*	2	9.5*	0	0*	0	0*
72	0.3	5	16	3	18.8*	6	37.5*	5	31.2*	2	12.5*

* P<0.001



写真 1 家兎卵管近位峡部, 非妊時.
比較的多数の神経終末が輪状筋層に観察される
(×200)

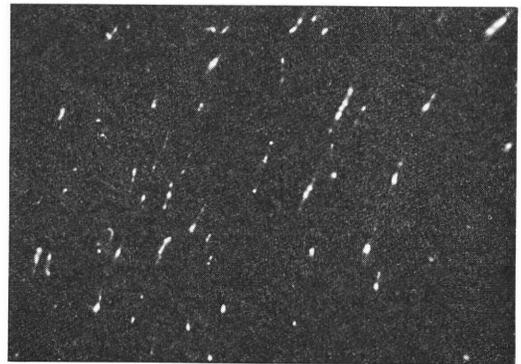


写真 2 家兎卵管遠位峡部, 非妊時.
豊富な神経終末が輪状筋層に観察される
(×100)

状態 (表 6)

Reserpine 0.6mg 処置群で, hCG 投与後24時間目においては, 卵の移動は著しく遅れ, 対照群に比べて有意 (P<0.001) に遠位峡部および膨大部に滞り, 膨大部には

83.3%の卵が存在していた. hCG 投与後72時間目の対照群における卵は子宮に90.5%到達するのに, 同時期の reserpine 0.3mg 処置群においては子宮に存在する卵の割合は18.8%と著しく低下し, 卵管には81.2%の卵が認

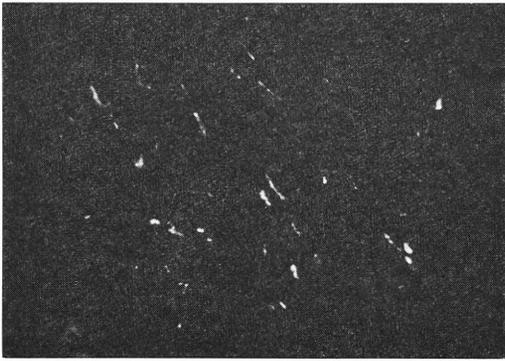


写真 3 家兎卵管膨大部, 非妊時.
神経終末は乏しく, 血管周囲にも観察され
る (×100)

められ, 卵は有意 ($P < 0.001$) に卵管各部位に停滞した.

IV. 卵管における adrenergic fiber の分布

非妊時の近位峡部においては比較的多数の蛍光線維が筋層に認められた (写真 1). 遠位峡部では豊富な蛍光線維が輪状筋層に明瞭に観察された (写真 2). 膨大部の蛍光線維は血管周囲にも認められ, 極くわずかの神経線維が筋層に観察された (写真 3).

考 察

非妊時の家兎卵管における NA 量は部位によつて差があり, 遠位峡部で最も高く, 近位峡部で中間値, 膨大部で最も低かつた. 交尾後および hCG 投与排卵誘発群における経時的な部位別の卵管 NA 量も, 非妊時と同じく, 遠位峡部 > 近位峡部 > 膨大部の順で高かつた. したがつて, 非妊時, 交尾後および hCG 投与排卵誘発群における部位別の経時的な NA 量は, いずれの時期でも遠位峡部において最も高いことが確認された. 蛍光組織化学的な観察によつても, adrenergic fiber の分布は遠位峡部の輪状筋層に最も密に認められた. Brundin³⁾, Owman⁴⁾も家兎およびヒトの卵管の adrenergic fiber は峡部において最も豊富であることを観察している.

さらに注目すべき事実は, 交尾後 12 時間目における遠位峡部 NA 量が急激に低下したことである. その後, 経時的に遠位峡部 NA は徐々に増加し, 交尾後 96 時間目, すなわち卵が子宮内にほぼ全て到達している時期に非妊時のレベルに復帰してくる. この交尾後 12 時間目は排卵後約 2 時間目であり, 排卵された卵が AIJ 周辺に移動する時期に相当する. Bodkhe ら¹³⁾は排卵後約 5 時間目に家兎卵管 NA は減少することを認め, 今回の成績とほぼ一致する結果を報告している. 家兎においては卵の膨大部内の通過は速やかで, 排卵後 2 時間以内で AIJ に到達し, ここに卵の 50% 以上は 14~38 時間停滞

する¹⁾. そして, この AIJ の輪状筋層に adrenergic fiber^{3,4)} が最も密に分布している.

興味深いことには, 同じ峡部である子宮側の近位峡部 NA 量は遠位峡部 NA 量とパラレルに変動すると思われたが, 交尾後 10~96 時間目までほとんど変化しなかつた. さらに膨大部においても, 交尾後 10~96 時間目まで, 近位峡部と同じように NA の変化は認められなかつた. 膨大部における adrenergic fiber の分布は峡部とは異なり, 筋層内よりも, 主として血管周囲に局在しているのが特徴的である. これらの事実から, 卵が膨大部から峡部に移送される時期に, 遠位峡部 NA が低レベルを維持して卵の移送を調節している可能性が極めて強い. しかしヒト卵管では, 峡部 NA は膨大部より高値であるが, 峡部を 3 等分して検討した結果では, 各々の峡部 NA の間に有意差がなく⁹⁾, ヒツジの卵管においても峡部 NA は膨大部より増加しているが, 性周期の変化は認められないという報告¹⁴⁾もある.

卵が卵管内を通過する際には, 遠位峡部における NA が低レベルを保持するという示唆に富む現象に着目し, 卵管 NA 量が正常な状態から逸脱した時に, 卵の卵管内通過速度に異常が生じるかどうかを確認するため, 卵管内卵の移送速度に影響を及ぼす E を使用して卵管 NA の変化を検討した. E は大量では卵管内に卵を停滞させ, 少量では卵移送を促進すると報告されている^{1,15)}. E 25 μg を投与した群では交尾後 12 および 24 時間目までは卵の卵管内分布は対照群と同様であるが, 72 時間目になると卵は近位峡部ではなく膨大部 (44.4%) と遠位峡部 (40.8%) に著しく停滞した. 対照群の交尾後 72 時間目における卵の存在部位は, 子宮に 91.2%, 卵管に 8.8% で, この卵管の中でも近位峡部のみに卵は認められ, 膨大部と遠位峡部には存在せず, 卵はほとんど子宮内に移送されている. E 250 μg 投与群では, 対照群に比べて交尾後 24 時間目より卵が膨大部に停滞する割合が増え始め, 72 時間目では 62.5% と膨大部に著明に停滞した. E 投与後, 経時的に卵管内に増加を続ける卵の停滞に対応して, E 25 μg 投与後 72 時間目の遠位峡部 NA は増加し, E 250 μg 投与後 72 時間目においては遠位と近位峡部の NA は増量した. E 投与による卵の停滞は 25 μg より 250 μg 投与群で著しく, 卵の停滞部位はいずれも遠位峡部と膨大部に集中している.

家兎卵管を細分割して, E による卵移送の変化を調べた Greenwald¹⁾ の実験によれば, 卵の停滞は AIJ に著しく認められている. 今回の実験では AIJ の部分を細分割せず, 膨大部と峡部の境界で分割したため, 卵の停滞は遠位峡部と膨大部の两部分に分散されたと思われる. Greenwald¹⁾ は家兎への E 25 μg 投与によつて卵

管内の卵移動は促進されたと報告しているが、本実験では卵移送の促進ではなく、むしろ抑制が認められた。Bodkhe ら¹³⁾も E 25 μ g 使用による卵移送の抑制を家兎で確認している。E 投与群、その対照群のいずれにおいても、卵管 NA が変動するのは主として遠位峡部の部分であり、膨大部に変化は認められなかった。膨大部における adrenergic fiber の局在が輪状筋層ではなく、主に血管周囲であることと関係がありそうである。

これら E 投与の結果から、近位峡部に卵が停滞する割合はさほど増加せず、遠位峡部における NA レベルが増量すると、遠位峡部に卵の停滞する率が増してくる。したがって、遠位峡部 NA レベルと卵管内における卵移送速度とは深い相関関係の存在が考えられる。E 投与後72時間目においては、遠位峡部と膨大部に卵が停滞するので、この時期の卵は膨大部、遠位峡部および近位峡部に存在することになる。これらの卵の存在部位は交尾後24時間目における卵の存在部位と部位的には一致する。この事実は、卵移送を遅らせて、遠位峡部と膨大部に卵を停滞させる作用機構に NA が介在している可能性が大きいことを物語っている。

E 投与の結果、卵管 NA レベルは増加し、卵は卵管内に停滞することが確認されたので、次に卵管 NA が減少した状態では、卵管内の卵の移送状態はどのように変化するかを検討した。末梢神経終末のカテコールアミン減少作用を有する reserpine をマウスに10mg/kg 投与¹⁴⁾すると、卵は卵管内に停滞するといわれるが、この群の卵管 NA は膨大部、遠位峡部および近位峡部、すなわち卵管すべての部位において低下し、ほとんど枯渇の状態になった。この成績のように卵管 NA レベルが低下しても、卵移送は遅れ、卵は卵管内に著しく停滞する。

これらの実験結果から、卵管 NA が増加すると、卵は卵管内に停滞し、反対に卵管 NA が低下しても卵は卵管内に滞ることが明らかになった。

*In vitro*⁸⁾ と *in vivo*¹⁰⁾ の実験から、NA は卵管運動に対して刺激的に作用するといわれている。ヒト、家兎の卵管には α と β -adrenergic receptor の存在⁵⁻⁸⁾が証明されており、adrenergic な作用は α と β の両 receptor によって行なわれている。性ホルモンの卵移送に及ぼす影響については数多くの報告があり、 α -adrenergic blocking agent である phenoxybenzamine は E 効果による卵の停滞を解除する¹⁷⁾、あるいは解除しない¹⁵⁾など相反する結果が報告されている。卵管機能に対する性ホルモンの影響も部分的には adrenergic な神経支配によって mediate されるのであろう。

α -receptor、すなわち峡部における NA が低レベルの

状況下では、筋の活動力が減弱して卵の移動が遅れるとともに、峡部には卵の通過に対して抵抗する力が一段と増強される。卵が子宮に到達する時期になると、峡部の NA がゆるやかに増加し、 β -receptor も dominant になり¹⁹⁾、峡部の筋は弛緩して卵の通過が容易になり、卵は子宮に移送されると理解したい。

卵管内の卵移送は、adrenergic fiber が豊富に存在する遠位峡部の、主として輪状筋層内における NA が低レベルに保持された状態で円滑に行なわれており、その調節は卵管自体の局所的な adrenergic neural mechanism によることが明らかになった。しかし、峡部 NA の低レベルという現象がいかなる作用機序で卵の移送を調節しているかについては、今後の問題として残されている。

(稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った東邦大学第1産科婦人科学教室百瀬和夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始直接御指導をいただいた斎藤真一講師に感謝するとともに、高速液体クロマトグラフィーについて御指導をいただいた労働省産業医学総合研究所守 和子博士に感謝致します。)

なお、本論文の要旨は第29回日本不妊学会総会(1984)、XII World Congress on Fertility & Sterility (1986) において発表した。))

文 献

- 1) Greenwald, G. O.: A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. *Fertil. Steril.*, 12: 80, 1961.
- 2) Owman, C. and Sjöstrand, N.-O.: Short adrenergic neurons and catecholamine-containing cells in vas deferens and accessory male genital glands of different mammals. *Z. Zellforsch.*, 66: 300, 1965.
- 3) Brundin, J. and Wirsén, C.: The distribution of adrenergic nerve fibers in the rabbit oviduct. *Acta Physiol. Scand.*, 61: 203, 1964.
- 4) Owman, C. and Sjöberg, N.-O.: Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z. Zellforsch.*, 74: 182, 1966.
- 5) Rosenblum, I. and Arthur, A. S.: Autonomic responses of the circular muscles of the isolated human fallopian tube. *Am. J. Physiol.*, 210: 1127, 1966.
- 6) Nakanishi, H., Wansbrough, H. and Wood, C.: Postganglionic sympathetic nerve innervating human fallopian tube. *Am. J. Physiol.*, 213: 613, 1967.
- 7) Coutinho, E. M., Mattos, C. E. R. and Silva, A. R.: The effect of ovarian hormo-

- nes on the adrenergic stimulation of the rabbit fallopian tube. *Fertil. Steril.*, 22 : 311, 1971.
- 8) Ueda, M., Mattos, C. E. R. and Coutinho, E. M.: The influence of adrenergic activation and blockade on the motility of the circular and longitudinal muscle layers of the rabbit oviduct *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 24 : 440, 1973.
 - 9) Owman, C., Rosegren, E. and Sjöberg, N.-O.: Adrenergic innervation of the human female reproductive organs: A histochemical and chemical investigation. *Obstet. Gynec.*, 30 : 763, 1967.
 - 10) Coutinho, E. M., Maia, H. and Adeodato, F. J.: Response of the human fallopian tube to adrenergic stimulation. *Fertil. Steril.*, 21 : 590, 1970.
 - 11) Euler, U. S. V. and Lishajko, F.: The estimation of catecholamine in urine. *Acta Physiol. Scand.*, 45 : 122, 1959.
 - 12) Falck, B., Hillarp, N.-Å., Thieme, G. and Torp, A.: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, 10 : 348, 1962.
 - 13) Bodkhe, R. R. and Harper, M. J. K.: Mechanism of egg transport: Changes in amount of adrenergic transmitter in the genital tract of normal and hormone-treated rabbit. In *The Regulation of Mammalian Reproduction*. p 364, Springfield, C. C. Thomas., 1973.
 - 14) Holst, P. J., Cox, R. I. and Braden, A. W. H.: The distribution of noradrenaline in the sheep oviduct. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 48 : 563, 1970.
 - 15) Greenwald, G. S.: Interruption of early pregnancy in the rabbit by a single injection of oestradiol cyclopentylpropionate. *J. Endocrin.*, 26 : 133, 1963.
 - 16) Bennett, J. P. and Kendle, K. E.: The effect of reserpine upon the rate of egg transport in the fallopian tube of the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 13 : 345, 1967.
 - 17) Pauerstein, C. J., Freming, B. D. and Martin, J. E.: Estrogen-induced tubal arrest of ovum. *Obstet. Gynec.*, 35 : 671, 1969.
 - 18) Longley, W. J., Black, D. L. and Currie, G. N.: Ovarian hormone control of ovum transport in the rabbit as influenced by autonomic drugs. *J. Reprod. Fert.*, 17 : 579, 1968.
 - 19) Hodgson, B. J. and Pauerstein, C. J.: Effects of hormonal treatments which alter ovum transport on β -adrenoceptors of the rabbit oviduct. *Fertil. Steril.*, 26 : 573, 1975.

Mechanism of egg transport: Changes in the amount of adrenergic neurotransmitter in the oviduct of normal and estrogen or reserpine-treated rabbits during egg transport

Manabu Tanigaki

Ist Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University, School of Medicine, Tokyo
(Director: Prof. Kazuo Momose)

In order to examine the effect of adrenergic neurotransmitters in the oviduct on the control of egg transport, changes in noradrenaline (NA) levels in the oviduct during the passage of eggs through it were studied.

Rabbits used as experimental models were divided as follows: I estrous group; II pregnant group; III estradiol (E)-administered group; IV reserpine-administered group. The rabbits in the pregnant group underwent laparotomy for evaluation at 10, 12, 24, 72 and 96 hours after mating. Rabbits in the E-administered group underwent laparotomy at 12, 24 and 72 hours following 25 or 250 $\mu\text{g}/\text{day}$ sc of E. Rabbits in the reserpine-administered group received 0.3 or 0.6 mg/kg/day sc of reserpine from 24 hours before hCG administration and underwent laparotomy at 24 or 72 hours following hCG administration.

The oviducts were divided into three portions: The ampulla and distal and proximal halves of the isthmus.

Adrenergic fibers were demonstrated in the oviducts by the histochemical fluorescence method of Falk and Hillarp. Eggs were recovered by flushing each portion of the oviduct and uterus with physiological saline. NA at each portion of the oviduct was measured using high performance liquid chromatography.

NA in the distal isthmus remained at low levels following mating, reaching a minimum 12 hours after mating, and then exhibiting a gradual increase until returning to the estrous level by 96 hours after mating. By 12 hours after mating, most of the eggs were found in the ampulla. NA levels in the distal isthmus were increased 72 hours after administration of 25 μg of E, but NA levels in the proximal isthmus showed no change. By 72 hours after administration of 250 μg of E, NA levels at both proximal and distal isthmus was increased, but NA in the ampulla showed no change. The distribution of the eggs 72 hours after E administration implied a delay

in the egg transport and retention of the eggs at the distal isthmus and ampulla. In the group of rabbits receiving reserpine, NA levels at each portion of the oviduct were markedly decreased. The arrival of eggs at the uterus was delayed and a remarkable retention of eggs at each portion of the oviduct was noted. Histochemical fluorescence studies of the oviducts revealed a significant difference between the isthmus and ampulla. The distal isthmus had abundant fluorescent fibers

in the circular muscle layer, whereas the fluorescent fibers in the ampulla were noted mainly around blood vessels. Egg transport through the oviduct in normal animals is associated with lowered levels of NA in the distal isthmus. The changes in the neurotransmitter system and specifically noradrenergic activity at the oviduct level represents an important factor in the control of egg transport through the oviduct.

(受付: 昭和62年3月3日, 特別掲載)

Chlamydia trachomatis による卵管閉塞症 成立に関する実験的検討

Experimental Tubal Occlusion in Rabbits Provoked
by Chlamydia trachomatis

愛知医科大学産婦人科学教室

野口昌良 稗田茂雅 山崎健
Masayoshi NOGUCHI Shigeo HIEDA Takeshi YAMAZAKI
秋田敏行 上野直樹 畔柳純一
Toshiyuki AKITA Naoki UENO Jun'ichi KUROYANAGI
石原実
Minoru ISHIHARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University

10羽の家兎の20卵管について、Chlamydia trachomatis (CT) $10^4/ml$ をパルーンカテーテルを通して直接子宮内に接種し、その後の変化について腹腔内所見と合わせて観察した。接種後2週間で多量の腹水が発生し、卵管および子宮、膀胱表面は強く発赤腫脹を示した。この状況は4~6週後まで認められるが、18週後には消失する。18週後に開腹した時点で20卵管中2卵管に閉塞がみられ、うち1卵管は卵管留水腫を示していた。36週後まで開腹時に毎回採取した腹腔内の擦過検体および腹水から極めて強力なCT抗原が検出され、それによるCTの分離培養も可能であった。近年、卵管閉塞症の原因として注目されている微生物CTによる実験的卵管閉塞症の成立について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

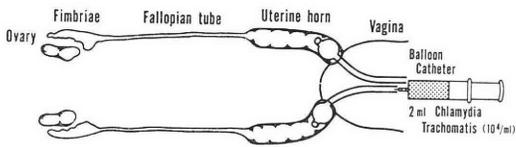
(Jap. J. Fert., 32(3), 441-446, 1987)

はじめに

女性に原因のある不妊症の中でも卵管に障害のあるものもつとも頻度が高く、40%を超えるとさえいわれている。この卵管の通過障害は子宮内膜症に起因するものもあるが、多くは卵管における炎症の結果生じたものである。その炎症の原因は結核菌であり、淋菌であるとされ、さらに大腸菌もその役割を演じているといわれ続けてきた。しかしながら、1980年代に入ると、全く様相は一変し、特殊なライフサイクルを持つ微生物であるChlamydia trachomatis (CT) が卵管閉塞の成立に対して大きなウエイトを占めていることが次第に明らかになってきた¹⁻³⁾。このCTの出現は、検出法の確立により発見されるようになったということの他に、CTに対して感受性のあるテトラサイクリン系もしくはマクロライド系の抗生物質の使用頻度が減少し、セフェム系および

合成ペニシリン製剤の普及という社会的現実のもたらした結果としての認識もされている。一方において、1970年代初めより卵管不妊症の治療方法として顕微鏡手術が取り入れられ、それまでは治す手だてのなかった卵管閉塞症にも30~40%の成功率で生児を得ることが可能になった。さらに、その残りの卵管不妊対策として、体外受精も成功することで、この種の不妊患者の救済には新たな1ページが開かれた。

しかしながら、これらの解決手段が進歩したとはいえ、マイクロサージェリーによる疎通性の回復がなされても、前に述べたように妊孕性の回復は50%を超えることさえ困難な状況である⁴⁾。まして体外受精となると、その妊娠成功率はさらに低くその上、技術的に可能な施設は少なく、今後実施できる機関が急に増えるとは思えない。従つて、卵管疎通障害を来し、治療を考慮される状態になる以前に、卵管閉塞症の成因を突き止めること



バルーンカテーテルを子宮内に留置しこれを通じてクラミジア含有液を家兎子宮内に注入接種する。

図 1 実験方法

により、この病態生理を的確に把握し、少しでも多くの通過障害の発生を未然に防ぐことが出来れば、卵管性不妊症に悩む患者を減少させ得るものと期待される。そこで著者⁶⁾らは、最近 S. T. D. の原因として、さらに卵管閉塞の原因としても注目されてきた CT の感染モデルを家兎により作成し、これを用い検討を続け、卵管采側から卵管内に CT を接種して成立する卵管炎およびそれに伴う腹腔内の病態について既に報告したが、今回は、従来より哺乳類において困難といわれていた CT 感染をより自然な性行為感染症の発症に近い状況から作成することを試み、成功したので、ここに報告する。

実験方法

成熟日本白色雌家兎で、未経妊、体重 3 kg 前後のものを用い、セレクトラルおよびケタラル麻酔下で開腹し、図 1 のように両側の子宮内にバルーンカテーテルを置き、それぞれその先端部は膈を経て膈外に出し、腹壁を 3-0 ナイロン糸で 2 層に縫合して閉じた。使用した CT は岐阜大学泌尿器科学教室より分与された臨床分離株 G/UR/488 を用いた。この生理食塩水溶解液 2 ml (10⁴/ml) を各々のカテーテルを通じて子宮内に注入した。

実験成績

Chlamydia trachomatis 含有液を、図 1 のように、双角子宮内にそれぞれ留置したバルーンカテーテルへ直接注入したが、対象とした 10 羽の家兎の全身状態に関しては注入後 2 週間を経過しても著変はみられなかった。10 羽の開腹所見は表 1 のように第 2 週後に最初の開腹をした時点で極めて多量の腹水を認めた。これは 4 週間後においてもほぼ半数には認められ、著者らが報告した卵管采側から注入したケースと変わりのない結果が得られた。しかし 6 週以後になると、いずれも腹水はほとんど存在しなくなっていた。

2 週後に 4 例に認められた臓器間癒着は 4 週後には 7 例に及んだが、それ以後は増加することなく経過した。これらの癒着はいずれも子宮と膀胱との癒着で、6 週以

表 1 Chlamydia Trachomatis 子宮内接種家兎開腹所見

	2 週後	4 週後	6 週後	18 週後	36 週後
腹 水	10	6	0	0	0
臓器間癒着	4	7	7	7	7
卵管浮腫	10	6	0	0	0
卵管閉塞	0	0	0	2	2
卵管留水腫	0	0	0	1	1
卵管周囲膿瘍	0	0	0	0	0
腹腔内抗原検出	10	10	10	10	10

表 2 Chlamysiazyme level on weeks after inoculation with C. Trachomatis

WEEK	PART	Chlamysiazyme (Net A ₄₉₂ *)
2	VAGINA	2.000
	UTERUS	2.000
	URETHRA	2.000
3	ASCITES	2.000
	UTERUS	2.000
4	VAGINA	1.360
	TUBE	2.000
	ASCITES	2.000
4	VAGINA	0.932
	TUBE	2.000
	ASCITES	2.000
6	VAGINA	2.000
	UTERUS	2.000
	ASCITES	2.000
6	TUBE	2.000
	URINE	1.643
	ASCITES	2.000
10	ASCITES	2.000
	VAGINA	1.320
18	ASCITES	2.000
	VAGINA	0.942
24	ASCITES	2.000
	VAGINA	0.842
36	ASCITES	2.000
	BLADDER	2.000
	TUBE	2.000

F : Fimbriae * Net A₄₉₂ = 検体吸光度 - 陰性コントロールの平均吸光度
 U : Uterus (0.100 < Net A₄₉₂ < 2.000)
 V : Vagina

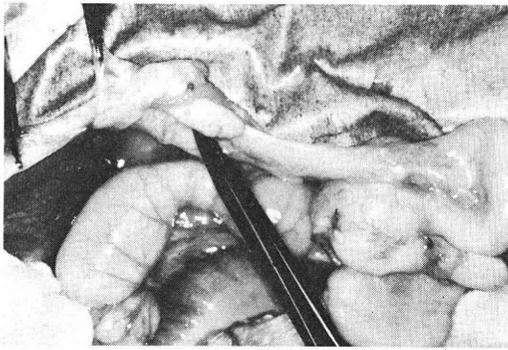


写真 1 接種 2 週後の浮腫の著明な卵管が卵巢の上部に見られる。また子宮は膀胱に癒着し、多量の腹水が存在している。

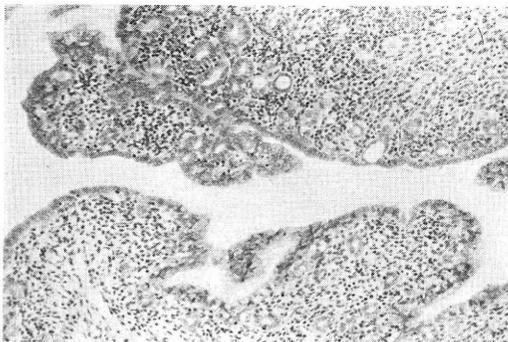


写真 2 接種 4 週後の子宮内膜の組織所見，リンパ球の浸潤が著明で強い炎症像がみられる。

後には次第に強固なものとなつたが、この癒着臓器およびその進行は卵管采側の注入時と同様であつたが、子宮内投与の場合は卵管采側からの注入に比べてその発症頻度は低い傾向があつた。卵管浮腫は 4 週後では存在するものもあつたが、6 週以後は全く消失していた。卵管閉塞症 10 羽の 20 卵管のうち 2 羽、いずれも片側の合計 2 卵管であつた。この内の 1 例のみに極めて小さい 1.0 × 0.5 cm の卵管留水腫を 18 週後に認めたが、36 週経過もその大きさは変わらず、また新たな卵管留水腫の発症もみられなかつた。

また著者⁵⁾らが以前に報告した、大腸菌を接種した場合にみられた卵管周囲膿瘍は全例 36 週経過しても出現しなかつた。次に、今回の実験において毎回開腹時に腹腔内の数か所より擦過スワブにより採取した検体について、CT の抗原を Chlamydiazyme 法により検索し、表 2 のような結果を得た。これらはどれも抗原検出値としては最も高い値を示すもので、満足すべき感染成立が 6 か月後においても確認され、このことから子宮内に接種された CT は卵管を経て、腹腔内に速やかに到達し、腹

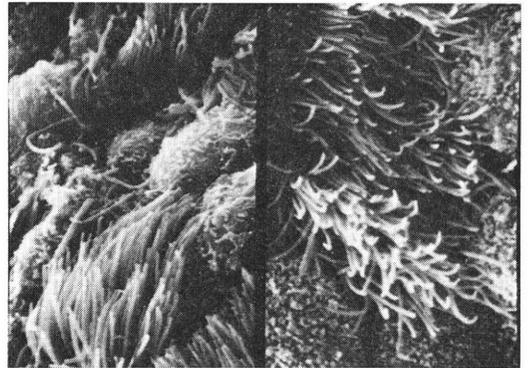


写真 3 *Chlamydia trachomatis* 接種後の卵管内膜の走査電顕所見 (×500)，2 週後 (右) はほぼ正常であるが 4 週後 (左) は、線毛細胞の走行に異常が現われている。

水発生の原因となるほか、臓器間癒着の原因ともなり、長い経過のうちには卵管の通過障害を生ぜしめることがあることも判明した。さらに抗原の検出からいつたん腹腔内に入った CT は長く存在し続け、6 か月を経過しても存在することが明らかになつた。また、このときの腹腔内より採取された検体の McCoy cell による分離培養によつても封入体を確認できたことから、CT の腹腔内における長期存在が立証できた。なお、コントロールとして、4 羽の家兎に関して同様の方法で生理食塩水を注入したケースでは、同じ間隔で開腹し検索したが、全く腹腔内に変化はみられなかつた。

写真 1 は CT 接種後 2 週後のもので、卵管の浮腫と共に子宮膀胱に強い発赤がみられ同時に多量の腹水が存在したケースである。写真 2 は 4 週間後の子宮内膜の組織所見であり、リンパ球の浸潤が著明で、強い炎症像がみられる。

写真 3 はこのときの卵管の走査電顕所見であり、内腔の分泌細胞の変化は著明ではないが、線毛細胞には変化がみられている。

考 案

1. CT 感染の立証

今回われわれが報告した実験系の中で、CT 感染は十分に立証された。EIA 法である Chlamydiazyme 法による抗原検出の結果は表 2 のように、CT 接種後 36 週を経過しても腹腔内から高い値が検出されたことと、この接種 36 週後の腹腔内擦過検体の McCoy cell による分離培養を行ない、CT の封入体の検出が可能であつた。以上より、このような方法で投与された CT は、家兎の腹腔内に様々な変化を生ぜしめつつ、6 か月間以上も生存

することが判明した。今回われわれは、2ml (10⁴/ml) と比較的菌量の少ない含有液を投与したにもかかわらず、感染の成立をみたが、10⁶/ml 程度の菌量を投与する場合にはより強い感染の成立が起こり得ると思われる。われわれが10⁴/ml の菌量で行なった理由は、分離培養法により CT を集めるのに、技術的にこの量が集めやすいために過ぎない。今後は10⁶/ml 以上の菌量についても検討したいと考えている。

2. 感染成立とその予後

CT を接種された家兎は、外見上は臨床的に著変を認めず、一時的な体重減少も2週間以内に回復する。また、CT 接種後6か月以内の死亡は1例もなく、大腸菌接種による実験で、しばしば起こる致命的な変化はみられない。6か月後に抗原は全例検出できるが、これらのうちの2羽を交配させたところ妊娠は速やかに成立した。しかしながら、在胎週数30日の家兎の妊娠期間より2例とも5日早く分娩に至り、生まれた8羽のうちの全例未熟児(体重30g前後)であり、かろうじて1羽が成熟したが、この早産とCT感染との因果関係については現在さらに詳しい検討を行なっているところである。

3. 卵管浮腫および腹水の出現

卵管采側より接種した場合と全く同様の卵管の変化がみられた。強い発赤が外側にも著明となり、全体に約2倍の直径を有するまで腫大するが、4週後には次第に減少し、6週後には正常に復し、腹水も殆ど消失する。いずれも卵管采側からの投与と変わりはなかったが、CTが接種されればどのような方法にせよ、このような変化は必発することが確論されたわけである。

4. 周囲臓器との癒着

膀胱と子宮との癒着は半数以上に発生する。しかしながら、これらが妊孕性の障害となるようなことはなく、6か月後においても妊娠の成立を見たものもあつた。

5. 子宮内膜の変化

組織診写真2に示すように強い炎症性変化がみられ、CT接種によりCTが子宮内膜に組織学的変化をもたらすことは確認できた。この程度の変化は着床不全を引き起こすまでには至らないのか、6か月後には妊娠は成立した。

6. 卵管の疎通性

10羽の家兎の20卵管のうち、わずかに2羽2卵管のみに閉塞が認められたが、この内の1羽は残る一方の卵管で妊娠が成立した。このように腹腔内にならぬ変化があり、CTそのものが長く生棲することが判明しているにもかかわらず、接種後6か月程度の期間では容易に卵管閉塞は成立しないように思われた。今後も検討を続けたい。

7. 卵管内膜の変化

卵管内膜のCT接種による変化は、写真3に示すように、走査電顕所見では少なからず変化は生ずるが、この程度の接種方法では直ちに卵管閉塞を起こして、直接的な不妊の原因となる明確な根拠にはなり得ない。しかしながら、前にも述べたように36週以上もCTの存在が確認できたことから考えれば、卵管内膜の変性が極めて緩徐であつたとしても、少しずつではあるが変化が生まれ、たとえ卵管の疎通性は維持されていても、線毛細胞の異常による子宮外妊娠の発症や、原因不明不妊症の成因となり得る可能性はあると考えてもよいと思われる。

8. 大腸菌接種による卵管炎との差異

著者ら⁶⁾が報告した大腸菌接種による卵管炎の発症との差は極めて明確である。まず、大腸菌接種による場合、卵管内膜に直ちに強い炎症を生じ、卵管は短期間に疎通性を失う。また腹腔内で強い炎症が起こり、臓器間癒着も速やかに発症し併せて膿瘍も必発する。時として、家兎は敗血症死する。一方、CT接種では炎症所見は極めて緩徐に現われ、まず最初の所見は大腸菌接種による場合よりもはるかに多量の腹水が出現したが、余り減少しないまま4週間以上も存在し続ける。また大腸菌接種により感染が成立した家兎は、抗生物質投与を受けない限り、全身状態は悪化し、接種菌により差はあつても1~2か月後には感染死するものが多いのに反し、CT接種ではまずこれが原因で死に至ることはない。しかしながら、CTは依然として長期腹腔内で生存し続けている。このため、もし接種が原因で卵管炎が発症するとしても、卵管を通つて腹腔内に至つたCTが腹水を多量に作り、その腹水中のCTが再び卵管采側より卵管内に逆流し、その結果、卵管内に変化をもたらす、不妊症の原因となるのではないかとと思われるに至つた。また既に臨床例において、著者⁶⁾らが報告した、ヒトにおいてCTにより発生する急性腹症を来す骨盤腹膜炎の成立も、長期間腹腔内に生存したCTがなんらかのきっかけで急激に増殖し、その結果、強烈な骨盤内炎症を引き起こす可能性も、これらの実験系を通して説明できることが示唆された。

9. 接種法の検討

CTは鳥には感染するが、これまではヒトの結膜炎以外哺乳類には感染しないとされていた。また、実験的に哺乳類に感染実験を試みても、感染の成立はみられないとされてきた。しかしながら1980年Wang⁷⁾の報告によれば、家兎の卵管采からCTを接種し、卵管炎を実験的に成立させ得たとするものであり、著者らの検討もこれに習つたものであつた。その後、CTによる実験的卵管炎は報告されていないが、今回著者らは、より性行

為感染症の成立に近い形で、卵管炎の成立を目的として、子宮内投与による卵管炎の成立を検討した。その結果、これまでに述べたように卵管炎は成立し、それに伴う腹腔内変化、CT の長期生存を確認できたが、経膈的に、即ち性行為感染症そのままの状況を作るため、家兔の膈内に投与された CT 含有液により卵管炎もしくはそれに伴う変化の検討を行なっているところである。この方法の問題点としては、家兔の膈は極めて長く、広いため、これを満たすためには10ml 以上の含有液が必要とされることなどがあり、現在なお検討中である。

おわりに

臨床上 CT の検出分離はなお検討途上にあるが、実地医家においても次第にその検出が可能状況になっている。卵管閉塞症の50%以上が淋菌や結核菌ではなく、この CT によるといわれるようになった現況では、これによる卵管炎発症の解明は急務といわなければならない。今回われわれの研究もこのような背景から生まれたものである。先に報告した卵管采よりの接種法と合わせてもわれわれの検討はなお少数例ではあるが、いずれの腹腔内においても腹水の多量発症を初めとする炎症所見が出現することは、子宮内に接種された CT が上行性に卵管へ移行し、さらには速やかに腹腔内にも及ぶことは明確になった。一方、臨床的に婦人科領域においては、泌尿器科領域における尿道炎の成立から、この CT の感染で頸管炎が生じると考えられてきたが、かりに初期感染で頸管炎が成立しても、臨床症状は極めて乏しく、かなり重篤な感染から腹腔内に波及し、骨盤腹膜炎となつてから初めて強く明確な症状を示してくるケースが少なくないことが著者ら⁸⁾の臨床例からの検討で明らかになつてきている。このような観点から、今後なお一層、CT の感染モデルによる卵管性不妊症の原因の追求が大きな意味を持つようになると思われる。

結 語

- 1) 卵管性不妊症の成因を探るべく CT 含有液を子宮内に接種し、実験的に感染モデルの形成を検討した。
- 2) CT 接種2週後にはすでに多量の腹水の発生とともに、卵管、子宮、膀胱表面に強い浮腫と発赤がみられた。
- 3) 以上の変化は接種6週後には消失したが、10例中7例には臓器間、特に子宮と膀胱と強固な癒着が認められた。
- 4) 接種後18週目に20卵管中2卵管に閉塞が認められた。併せてその1例に極めて小さい卵管留水腫が認められた。

5) 接種後36週経過した家兔の腹腔内擦過検体から全例に CT 抗原が強陽性に認められた。

6) これらの検体からの分離培養により CT の封入体を確認できたこのことから接種された CT は、増殖しつつ、長く腹腔内に生棲することが確認された。

文 献

- 1) Mårdh, P.-A., Moller, B. R., Ingerselv, H. J., Mussler, E., Westrom, L. and Wolner-Hanssen, P.: Endometritis caused by chlamydia trachomatis. Br. J. Vener. Dis., 57: 191, 1981.
- 2) Richard, L. S.: Chlamydial salpingitis and infertility. Fertil. Steril., 38: 530, 1982.
- 3) Jones, R. B., Ardery, B. R., Hui, S. L. and Cleary, R. E.: Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. Fertil. Steril., 38: 553, 1982.
- 4) 野口昌良: 卵管マイクロサージェリー応用の限界と将来, 産婦科, 40: 215, 1986.
- 5) 野口昌良, 稗田茂雄, 秋田敏行, 山田昌男, 中西正美, 石原 実: 家兔卵管内感染モデルによる卵管留水腫の作製, 日不妊誌, 30: 83, 1985.
- 6) 野口昌良, 稗田茂雄, 秋田敏行, 山崎 健, 石原 実: Chlamydia trachomatis による実験的卵管炎の検討, 日不妊誌, 31: 123, 1986.
- 7) Patton, D. L., Halbert, S. A. and Wang, S. P.: Experimental salpingitis in rabbits provoked by chlamydia trachomatis. Fertil. Steril., 37: 691, 1982.
- 8) 野口昌良, 秋田敏行, 山崎 健, 稗田茂雄, 鈴木正利, 石原 実: Chlamydiazyme 法による産婦人科領域における骨盤腹膜炎を中心とした Chlamydia trachomatis 感染症の検討, 産婦の世界, 38: 459, 1986.

Experimental tubal occlusion in rabbits provoked by chlamydia trachomatis

Masayoshi Noguchi, Shigeo Hieda, Takeshi Yamazaki, Toshiyuki Akita, Naoki Ueno, Jun'ichi Kuroyanagi and Minoru Ishihara

Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University

To search the cause of fallopian tubal sterility, the CT contained solution was inoculated into the uterus through balloon catheter. Then formation of experimentally infected models was studied in 20 fallopian tubes of 10 rabbits, and observed inoculation the intra-abdominal findings after 10^4 /ml. 2 weeks after the inoculation, a

large quantity of ascites were already produced and severe redness and swelling were observed in fallopian tubes and the surface of uterus and urinary bladder. The same condition was also seen 4-6 week later, but ascites disappears 18 weeks later.

Although there were the above changes, yet 18 out of 20 fallopian tubes had facilitation till

36 weeks later. Antigenicity of Chlamydiae was confirmed by ascites 2 weeks later, liquor in fallopian tubes, the surface of bladder and the material taken from abdominal cavity.

The same condition was also seen 36 weeks later, so that the infection by CT inoculation was proved to be occurred.

(受付: 昭和62年2月10日特別掲載)

子宮内膜エネルギー代謝動態の妊卵着床への意義

Analysis of Energy Metabolism in Human Endometrium during Menstrual Cycle

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任水野正彦教授)

堤 治 石 原 理 菅 生 元 康
Osamu TSUTSUMI Osamu ISHIHARA Motoyasu SUGASE

佐 藤 和 雄 水 野 正 彦
Kazuo Satoh Masahiko MIZUNO

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo
(Director: Prof. M. Mizuno)

子宮内膜は着床の場として妊卵にエネルギーを供給し発育させる。われわれは月経周期各期の内膜において、エネルギー代謝酵素活性および中間代謝物量等を測定し、以下の成績を得た。

- 1) 内膜湿重量当りの乾燥重量、蛋白含量は、それぞれ 19.6 ± 0.39 , $9.43 \pm 0.21\%$ ($M \pm SE$) であった。
 - 2) Glucose および glucose 6-phosphate の含量は、分泌期で増殖期のそれぞれ3.10倍に増加した。
 - 3) Hexokinase, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase の酵素活性は、増殖期に比し、分泌期内膜で有意に上昇した。
 - 4) 五炭糖シャントの glucose 6-phosphate dehydrogenase 活性は、増殖期分泌期で変化はなく、排卵期のみ有意の上昇を示した。
 - 5) エストゲン・プロゲステロン同時投与により内膜エネルギー代謝は分泌期と同様の変化を示した。
- 以上より、着床期子宮内膜は内分泌環境に対応してエネルギー代謝が活発化し、妊卵着床の環境が整えられることが示された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 447-452, 1987)

緒 言

子宮内膜の基本的機能は妊卵着床の場となることである。分泌期内膜にグリコーゲン顆粒が多数出現することは古くから知られ、妊卵に対するエネルギー源供給のための変化と考えられた^{1,2)}。これら子宮内膜の示す周期的変化は月経周期に対応しており、臨床的には内膜日付診として、日常内分泌・不妊診療に欠くことのできない情報を提供している^{1,3)}。内分泌学的には、卵巣ステロイドの標的器官として、ホルモン作用発現を究明する恰好のモデルでもある^{4,5)}。特に最近、体外受精による胚移植時の子宮環境⁶⁾、黄体機能不全症における不妊と内膜の関係⁷⁾等の観点から、子宮内膜の機能に関する興味が高まってきている。われわれは、内膜日付診をステロイド作用の指標として、内膜のエネルギー代謝活性の測

定をおこない、ステロイド作用により着床期内膜で形態変化に対応してエネルギー代謝の活性化がおこることを明らかにした。

方 法

1. 子宮内膜試料

東大病院産婦人科および長野赤十字病院産婦人科を受診した正常月経周期を有する20歳から45歳までの女性48名ならびに norethisterone 1mg と mestranol 0.05 mg の合剤(ノアルテンD₁; 塩野義)を1日1錠10日間投与したものの5名を対象とした。

子宮内膜試料は、内膜組織診用のポケットキュレットを用い、子宮底部より採取した。試料組織片の一部は直ちにホルマリン固定し、HE染色を行ない、組織標本とした。内膜日付診は Noyes⁸⁾および蜂屋⁹⁾の分類に

準じておこなった。すなわち、増殖期内膜は腺の大きさ、管状腺の長さ、迂曲の有無、stromal edema の程度、stromal cell の大きさを主体に判定し、腺は小さいし中型で短かく、stromal cell は小型でコンパクトなものを増殖期初期とした。腺は中型、管状腺は長さを増すが、迂曲は見られず、stromal edema を見るものを増殖期中期とした。腺に迂曲を認め、stromal edema は減少するが、stromal cell が軽度腫大を示すものを増殖期後期とした。排卵期内膜は、全体的には増殖期後期に近いが、一部の腺上皮に subnuclear vacuole を見るものと定義した。分泌期初期は subnuclear vacuole を認めるものとし、分泌期中期は subnuclear vacuole を認めず、分泌像著明、上皮の鋸歯状像ないものとした。上皮の鋸歯状像を認め、stromal cell の decidua-like change を見るものを分泌期後期とした。

生化学実験試料は -80°C にて保存した。実験に先だつて試料の湿重量を秤量し、凍結乾燥後、その乾燥重量の測定を行なつた。その上で湿重量の約2倍量の生理的食塩水を加え、テフロン棒ホモゲナイザーを用い、ホモゲネート試料を作製した。試料の蛋白含量はLowry法⁹⁾によつて測定した。

2. 酵素活性測定法

エネルギー代謝の上で重要な4種の酵素、すなわち hexokinase (EC 2. 7. 1. 1), glucose-6-P dehydrogenase (G6PD; EC 1. 1. 1. 49), lactate dehydrogenase (LDH; EC 1. 1. 1. 27), malate dehydrogenase (MDH; EC 1. 1. 1. 37) の活性を蛍光測定法により定量した⁹⁾。

反応液の組成は、hexokinase の場合、100mM Tris-HCl buffer pH 8.0に5mM MgCl₂, 0.5% (v/v) Triton X-100, 5mM glucose, 6mM ATP, 0.6mM NADP⁺, G6PD 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた。G6PD の場合、100mM Tris-HCl buffer pH 7.5に10mM MgCl₂ 1mM glucose-6-P, 0.1mM NADP⁺を加えた。LDH では、100mM Tris-HCl buffer pH 7.5に2mM pyruvate 0.3mM NADHを加えた。MDH では、100mM Tris-HCl buffer pH 8.5に0.5mM oxaloacetic acid, 0.3mM NADHを加えた。各 buffer には、0.05% (w/v) の bovine serum albumin を加えた。

実験に用いた反応血量は1mlで、使用するホモゲネート試料は10 μl 以下(50 μg 蛋白以下)とした。いずれの反応も、補酵素としてNADP⁺またはNADHを加えて行ない、酸化還元反応に伴うNADHまたはNADPHの増減を蛍光計を用いて測定した。スタンダードには、あらかじめ比色法で定量(1mol=0.622)したNADH, NADPHを使用した。

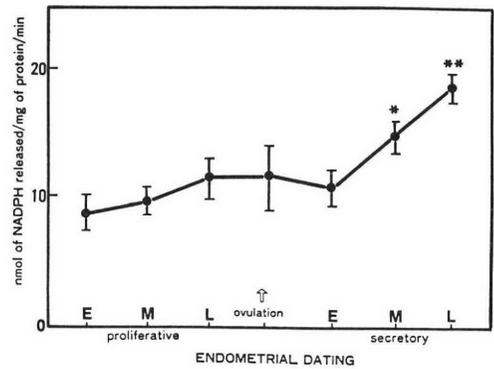


図1 子宮内膜の hexokinase 活性

3. 中間代謝物測定法

Glucose, glucose 6-P の内膜組織内含量の測定は蛍光法によつた。すなわち、100mM Tris-HCl buffer pH 8.0に1mM MgCl₂, 0.3mM ATP, 0.03mM NADP⁺を加える。その反応液1mlにホモゲネート試料5 μl を加え、さらにG6PDを0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加える。これにより glucose 6-P+NADP⁺→6-P gluconate+NADPH と反応が進み、蛍光が生じる。この反応が終了後、さらに hexokinase を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、蛍光増加を測定した。最初の蛍光は glucose 6-P によるもので、後者は glucose による。両者を個別にNADPHスタンダードより定量した。

実験に用いた補酵素NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, および hexokinase, G6PD はベリンガー社 (Mannheim, West Germany) のものである。その他の試薬類はすべて特級を用いた。また、統計的検定には student's t-test を用いた。測定値は平均±標準誤差で表現した。図中*と**は、それぞれ、増殖期前期の値に対する有無水準 $P<0.05$, $P<0.01$ を示した。

成 績

1. ヒト子宮内膜試料

正常周期を有する48名から採取した内膜は、19名が組織診断で増殖期とされた。そのうち、前期は4名、中期8名、後期7名であつた。排卵期とされたものは6名であつた。分泌期は23名、うち前期8名、中期8名、後期7名であつた。これら内膜試料の湿重量に占める乾燥重量の割合は $19.6 \pm 0.39\%$ であり、蛋白含量は $9.43 \pm 0.20\%$ であつた。乾燥重量の48.1%が蛋白であつた。各周期における湿重量当りの蛋白含量をみると、増殖期中期に $8.79 \pm 0.63\%$ と最低であり、排卵期に $10.4 \pm 1.0\%$ と最高であつたが、各周期間に有意の差は認めなかつた。ステロイド負荷群では 9.17 ± 0.62 であつた。

2. 酵素活性

1) Hexokinase 活性 (図 1)

増殖期前期の hexokinase 活性は 8.65 ± 1.33 nmol/mg of protein/min であった。中期, 後期は, それぞれ 9.68 ± 1.03 , 11.5 ± 1.54 であり, 増殖期の間では活性に著変を認めなかった。排卵期, 分泌期前期でも変化がなかった。しかし分泌期中期では, 14.8 ± 1.26 と増殖期前期の値に対して有意 ($P < 0.05$) の活性上昇を示した。さらに分泌期後期では, 18.4 ± 1.06 と増殖期前期の 2.1 倍の高活性を示した ($P < 0.01$)。ステロイド負荷群でも 18.0 ± 3.37 と高値であった。

2) Glucose 6-P dehydrogenase 活性

増殖期前期の G6PD 活性は 4.80 ± 1.06 nmol/mg of protein/min で, 中期, 後期と有意の差を認めなかった。しかし, 排卵期では 9.17 ± 0.61 と上昇を示した。この値は, 前 3 者に比較して有意 ($P < 0.01$) の高値である。分泌期では, 前期, 中期, 後期が, それぞれ 6.00 ± 0.93 , 6.31 ± 0.93 , 6.70 ± 0.83 であり, いずれも排卵期の値に比較して有意 ($P < 0.01$) に低値であった。増殖期と分泌期の間には有意差は認められなかった。ステロイド負荷群では 5.90 ± 1.73 と, 増殖期, 分泌期と同レベルであった。

3) Lactate dehydrogenase 活性

増殖期前期の LDH 活性は 311 ± 50 nmol/mg of protein/min で, 中期 332 ± 41 , 後期 359 ± 37 と有意の差を認めなかった。しかし排卵期では, 524 ± 22 と増殖期に比較して有意 ($P < 0.01$) の上昇を示した。分泌期では, 前期, 中期, 後期が, それぞれ 538 ± 63 , 600 ± 83 , 654 ± 68 で, 排卵期と同レベルで, 増殖期より有意に高値を示した。ステロイド負荷群では 558 ± 236 であった。

4) Malate dehydrogenase 活性

増殖期前期の活性は 245 ± 33 nmol/mg of protein/min で, 中期 (263 ± 22), 後期 (318 ± 61) の値と有意の差を認めなかった。排卵期では 443 ± 48 と, 増殖期前期, 中期に比較して有意 ($P < 0.05$) の上昇を示した。分泌期では, 前, 中, 後期が, それぞれ 407 ± 30 , 367 ± 22 , 437 ± 77 で, 排卵期と同レベルで増殖期前期に比較して有意に高値を示した。ステロイド負荷群では 629 ± 338 と高値であった。

3. 中間代謝物量

1) Glucose 量

Glucose の単位蛋白当りの内膜組織含量は, 増殖期前期で 6.05 ± 1.25 nmol/mg of protein, 中期, 後期は, それぞれ 8.36 ± 1.06 , 9.50 ± 1.81 と大きな変化はない。排卵期では 16.5 ± 3.36 であり, 増殖期前期, 中期に比較して有意の増加が認められた。分泌期前期では 9.35 ± 2.54

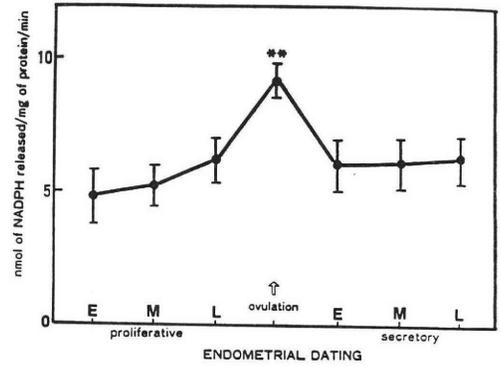


図 2 子宮内膜の glucose 6-P dehydrogenase 活性

であった。分泌期中期, 後期には著増が認められ, それぞれ 16.3 ± 3.3 , 27.9 ± 2.8 であった。ステロイド負荷群でも 24.5 ± 3.5 と高い含量を示した。

2) Glucose 6-P 量

Glucose 6-P の組織含量は, 増殖期前期に 1.30 ± 0.61 nmol/mg of protein であり, 増殖期中期 (0.68 ± 0.19), 後期 (1.50 ± 0.81), 排卵期 (1.13 ± 0.24) まで有意の変化を認めなかった。しかし, 分泌期では前期 (4.64 ± 0.81), 中期 (7.19 ± 2.50), 後期 (14.8 ± 2.7) と期相の進行に応じて著増を示した。ステロイド負荷群でも 9.95 ± 0.35 と高値であった。

考 案

本研究により, 子宮内膜では卵巢ステロイドによる内分泌環境の変化に対応してエネルギー代謝が変化し, 特に黄体期の中・後期には活発化することが明らかとなり, これにより妊卵着床の環境が整えられるようになると推定されるにいたつた。組織学的変化に対応した変化で, 特徴的なものの 1 つは hexokinase 活性で, 増殖期から分泌期前期まで変化を示さないが, 血中プロゲステロン値が高まる分泌期中期には有意に上昇した (図 1)。逆に G6PD 活性は増殖期分泌期の両者間で有意の差を認めないが, エストロゲン分泌が亢進する排卵期には両者に比して有意の活性上昇を認めた (図 2)。この 2 種の形態変化に伴った酵素活性の変動は, それぞれプロゲステロン, エストロゲンがある一定のレベルを超えることに対応している可能性がある。すなわち, プロゲステロンにより hexokinase が特異的に合成され, 着床時内膜のエネルギー代謝が活発化し, エストロゲンにより G6PD 活性が上昇し, 五単糖シャントを介する細胞機能の制御が行われると解釈できる。LDH, MDH は図 3 に示すように排卵期以降高活性を保ち, 二相性を呈す

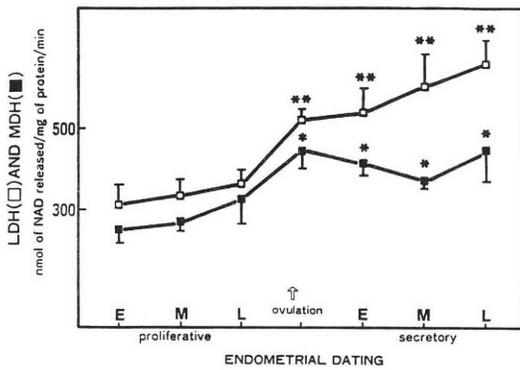


図3 子宮内膜の lactate dehydrogenase および malate dehydrogenase 活性

る。これは2種のホルモンの複合作用の結果であることが推測される。Glucoseの組織含量は排卵期で上昇するが、分泌期前期で減少し、中期以降再び著増という特殊な変動を示す。これはホルモン作用の1つの表現と考えられる。Glucose 6-Pは分泌期に増加し、プロゲステロンの制御下にあると示唆される。通常組織ではglucoseに対するglucose 6-P量は10~20%であり、内膜でも増殖期ではその範囲内である。しかし、分泌期のglucose 6-Pの急増はその比を50%にまで増加させる。これは基質量および酵素活性増加によるエネルギー代謝の活発化を反映したものと考えられる。

子宮内膜はステロイドホルモンの標的器官として、ホルモン作用の発現を検討するモデルとして、DNA、RNAレベルでの解析が進んでいる^{4,5)}。蛋白合成あるいは酵素量の変動もよい指標となる。エネルギー代謝に関連しては、Baquerらが去勢雌ラットにエストラジオール17 β を投与し、子宮の酵素活性を測定し、hexokinase, G6PD活性が特異的に増加することを報告した¹⁰⁾。これは特異的蛋白合成により酵素が誘動されるためと考えられるが、一部酵素に対してはエストロゲンがアロステリック効果を持つこともある¹¹⁾。プロゲステロンについても特異的な酵素蛋白を誘導することが報告されている¹²⁾。ヒト内膜においても、今回の成績から、月経周期のホルモン分泌に対応して特異的なエネルギー代謝のパターンが認められること、外因性ステロイドによっても分泌期中期以降と同様の代謝型が認められることより、ステロイドが内膜のエネルギー代謝を直接制御していることが示唆される。しかし、hexokinase活性やglucose含量等が分泌期後期に極大に達することは、プロゲステロン値の動態とは必ずしも一致しない。これは内膜がプロゲステロンにより一定の方向性を持つて分化の規定をうけるためと解釈できる¹³⁾。

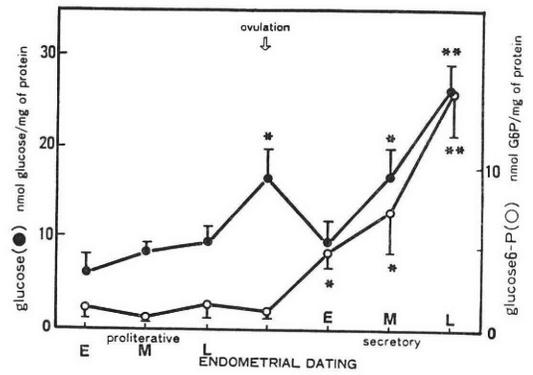


図4 子宮内膜のglucose および glucose 6-P 含量

分泌期中期以降の内膜でエネルギー代謝が活発化することは、着床をめぐる環境という点で興味深い。着床期内膜では腺や血管が発達し、細胞にはグリコーゲン顆粒が認められる¹⁾。グリコーゲン合成系の賦活も報告されている¹⁴⁾。これら変化は妊卵着床に適した環境の形成にあると考えられた。卵の側をみると、卵には内在性のエネルギー基質が乏しく、常に外部からエネルギー源を供給されないと生存不能であるということが知られている¹⁵⁾。着床期に内膜のエネルギー代謝が活性化され、直接卵に利用されるエネルギー基質glucose, glucose 6-Pが蓄積されることは生物学的にも意味があると考えられる。今日的话题である体外受精胚移植に関連しては、初期胚を子宮に戻した時の内膜の状態が問題になる⁶⁾。現在、体外受精卵の培養技術の限界より、胚は2~8細胞期に子宮腔へ移植されることが多い¹⁶⁾。この場合、卵のエネルギー代謝は未完成であると考えられるが、内膜の側も分泌期初期でエネルギー代謝は卵の発育や着床に適した状態でないと推測される。体外受精胚移植の臨床成績が自然のものに比較して低い¹⁷⁾ことの一因はここにあることが示唆される。動物実験においては、胚の日令と移植される子宮の相のズレが着床率を低下させることが報告されている¹⁸⁾。体外受精の臨床成績向上には、内膜の生化学的性状、卵の培養法、胚移植のタイミング等の検討も必要であると考えられる。

内膜のエネルギー代謝と関連して興味ある臨床的問題は、いわゆる黄体機能不全である⁷⁾。黄体機能不全の疾病概念や診断基準は未だ統一されていないが、不妊の一因となると考えられる。黄体機能低下によるプロゲステロン分泌低下あるいは内膜レベルでの作用障害により、着床期内膜のエネルギー代謝活発化が阻害され、それにより着床障害や初期流産が招来される可能性がある。不妊患者の内膜で解糖系酵素活性の低下を認めた報告は^{19,20)}、この可能性を示持すると考えられる。今回のわ

れわれの成績でステロイド負荷により代謝活性が上昇することから、黄体機能不全患者に対してはステロイド補充療法を含めた治療法を検討する必要がある²¹⁾。また最近、血中ステロイド値と内膜の日付診との間に解離の認められる症例があることが報告され²²⁾、内膜が必ずしも黄体機能を忠実に反映するとは限らないことが示唆された。このような場合の生化学的变化にも興味をもたれる。

本論文においては、子宮内膜のエネルギー代謝が着床期に活発化し、妊卵着床の環境が整えられることを示した。今後、腺や間質、さらに細胞レベルでの解析に方法論を進展させれば、内膜のエネルギー代謝は原因不明の不妊症の病態解明、ステロイド作用機構の解析等に有用であると考えられる。

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導、御助言を賜りました恩師坂元正一東京大学産科婦人科学教室名誉教授に深甚なる謝意を表します。また、組織学的診断にあたり御指導戴きました羽田悟長野赤十字病院中央検査部部長に深謝いたします。

本論文の要旨は第35回日本産婦人科学会学術講演会および第1回受精着床学会学術集会において発表した。

文 献

- 1) Noyes, R. W., Hertig, A. T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.*, 1: 3, 1950.
- 2) Hughes, E. C., Van Ness, A. W. and Llyoid, C. W.: The nutritional value of the endometrium for implantation and habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 59: 1292, 1950.
- 3) 蜂屋祥一, 他: 内膜性周期の診断法, 産婦の実際, 22: 449, 1973.
- 4) Segal, S. J., Scher, W. and Koide, S. S.: Estrogens, nucleic acids, and protein synthesis in uterine metabolism. *Biology of the uterus*, p. 139, Plenum press, Newyork and London, 1977.
- 5) 須川 俊, 志村研太郎: 性ステロイドの作用発現機構, p. 25, 生殖酵素学, 診断と治療社, 1985.
- 6) Garcia, J. E., Acosta, A. A., Hsiu, J. G. and Jones, H. W. Jr.: Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin for in fertilization. *Fert. Steril.*, 41: 31, 1984.
- 7) 楠原浩二, 小田原靖, 渡辺直生, 蜂屋祥一: 黄体機能不全の診断と治療, 産婦人の実際, 34: 941, 1985.
- 8) Lowry, O. H., Rosegrouth, N. G., Farr,

- A. C. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Polin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- 9) Lowry, O. H. and Passoneau, J. V.: A flexible system of enzymatic analysis. p. 147, Academic Press, New York, 1972.
- 10) Baquer, N. Z. and McLean, P.: The affect of oestradiol on the profile of constant and specific proption groups of enzymes in rat uterus. *Biochem. Res. Commun.*, 48: 729, 1972.
- 11) Yielding, K. L. and Tomlins, G. M.: Structural alterlations in cristaline glutamic dehydrogenase induced by steroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 46: 1483, 1960.
- 12) Yochim, J. M. and Pepe, G. J.: Effect of ovarian steroids on nucleic acids, protein, and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in endometrium of the rat. *Biol. Reprod.*, 5: 172, 1971.
- 13) 館 澄江, 館 郷: 卵着床の細胞生物学的機構, ホルモンと生殖II, p. 173, 日本比較内分泌会編, 1979.
- 14) Souda, Y., Fukuma, K., Kawano, T., Tanaka, T., Matuoo, I. and Maeyama, M.: Activities of glycogen synthetase and glycogen phosahorylase in the human endometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1985: 153, 100.
- 15) 堤 治, 他: 受精着床過程における卵の物質代謝およびその microenvironment 形成の生化学的解析, 日産婦誌, 36: 1377, 1984.
- 16) Dandekar, P. V. and Quigley, M. M.: Laboratory setup for human *in vitro* fertilization. *Fert. Steril.*, 42: 1, 1984.
- 17) 鈴木雅洲, 星合 晃, 対木 章: 体外受精の適応と成績, 産婦の実際, 34: 967, 1985.
- 18) Doyle, L. L., Gales, A. H. and Noyes, R. W.: A synchronous transfer of mouse ova. *Fert. Steril.*, 14: 215, 1963.
- 19) Hughes, E. C., Jacobs, R. D., Rubulis, A. and Husney, R. M.: Carbohydrate pathways of the endometrium. Effects on ovular growth. *Am. J. Obstet. Gyneol.*, 85: 594, 1963.
- 20) 菊地義公, 田巻勇次, 加藤孝子, 高見沢裕吉: 正常婦人と原発性不妊婦人の子宮膜に於ける解糖系酵素性の変動について, 日産婦誌, 28: 1655, 1976.
- 21) Wentz, A. C., Herbert, C. M., Maxson, W. S. and Garner, C. H.: Outcome of progesterone treatment of luteal phase inadequacy. *Fert. Steril.*, 41: 856, 1984.
- 22) Gravinis, A., Zorn, J. R., Tauguy, G., Nesman, C., Cedard, L. and Robel, P.: The "dysharmonic luteal phase" syndrome, endometrial progesterone receptor and estradiol dehydrogenase. *Fert. Steril.*, 42: 730, 1984.

Analysis of energy metabolism in
human endometrium during
menstrual cycle

**Osamu Tsutsumi, Osamu Ishihara, Motoyasu
Sugase, Kazuo Satoh
and Masahiko Mizuno**

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

Human endometrium has been analyzed biochemically in terms of energy metabolism. Endometrial samples were obtained by a biopsy from 20 to 45-year-old women with normal cycles or under hormone (estrogen and progesterone; EP) treatment. Activities of hexokinase, glucose 6-P

dehydrogenase (G6PD), malate dehydrogenase (MDH) and lactate dehydrogenase (LDH) and contents of glucose and glucose 6-P in the endometrium were determined by fluorometry. The activities of hexokinase, MDH and LDH were significantly higher in the secretory phase than in the proliferative phase ($P < 0.01$) while that of G6PD had its peak level at the ovulatory phase ($P < 0.01$). Glucose and glucose 6-P contents were also higher in the secretory phase than in the proliferative phase ($P < 0.01$). Similar changes were observed in the endometrium of the women treated with EP. These results suggest that the energy metabolism in the secretory phase is activated to prepare the favorable situation for the nidation and development of fertilized oocyte.

(受付: 昭和61年9月29日)

受精の過程におけるプロスタグランジン作用の解析

Analyses of the Role of Prostaglandins in Fertilization Process

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.

プロスタグランジン (PG) が受精の過程にどの様に関与しているかを知るために、インドメサシン (ID) を直接マウス体外受精の培地に加えて PG 合成を阻害した場合と、ID と同時に PG を補った場合の両配偶子の viability および受精についての影響を検討した。精子の viability (運動性) は ID 100, 150 μ g/ml 添加で影響がみられなかったが、ID 200 μ g/ml 添加では1時間の培養で著明に抑制された。卵子の viability は ID 200 μ g/ml 添加培地で5時間培養後も変化はなかった。受精率は ID 0, 100, 150, 200 μ g/ml 添加で、それぞれ58.8, 54.8, 24.3, 18.9%となり、150 μ g/ml 以上で有意な受精阻害が観察された。PG F $_{2\alpha}$ 50 μ g/ml を ID と同時に添加すると、ID 単独添加でみられた精子の viability の低下はみられなかった。また受精率は、ID 150 μ g/ml 単独群と PG 添加群で23.1, 55.8%, ID 200 μ g/ml 単独群と PG 添加群で20.7, 64.0%となり、それぞれ ID 単独群で見られた受精阻害は、PG 添加群で観察されなかった。精子の運動性を抑制しない ID 150 μ g/ml 添加でみられた受精阻害が PGF $_{2\alpha}$ の同時添加によつて観察されないことにより、PG は精子の運動性を介してのみならず、他の機序によつても受精現象に関与することが示唆された。

(Jap. J. Fert. Star., 32(3), 453-461, 1987)

緒 言

プロスタグランジン (PG) は生体のあらゆる組織で産生され、局所ホルモンとして種々の働きを荷つている。生殖の分野に於ても PG との関りはよく研究されている。たとえば、ラットの卵胞内 PGE $_2$, F 濃度は pro oestrous 時それぞれ11 \pm 1.0, 18 \pm 2.5pg/mg であるが排卵に向けて上昇し、排卵直前にはそれぞれ70倍, 18倍以上になるということ (LeMaire et al, 1975), 排卵されたラットの cumulus cell-oocyte complexes が PGE $_2$, F をそれぞれ4.76 \pm 1.05, 0.62 \pm 0.18ng/animal/flask 産生するという (Schuetz & Dubin, 1981), 又、ヒツジの卵管液中に最大230ng/ml の PGF $_{2\alpha}$ が存在し (Warnes et al, 1978), さらに、ヒツジの子宮液中にも15-400ng/ml の PGF $_{2\alpha}$ が存在すること等が報告されている (Harison et al, 1972)。また、ヒトの精漿中には他

の組織とは比較にならないほど多種多量の PG (400 μ g/ml) が存在するという (Gerozissis & Dray, 1981), ラット, ウサギの輸精管の homogenate が *in vitro* で、PGE $_2$, PGF $_{2\alpha}$, 6-keto-PGF を産生し (Swan & Poyser, 1983), さらにはウサギの7日令の胚が PGE $_2$, F をそれぞれ 3.051 \pm 0.746, 3.100 \pm 0.662ng/zygote/90 min. 産生するという (Harper et al, 1983) が報告されている。このように、雌雄生殖道には常に PG が存在し、両配偶子の成熟, 受精, 胚発達, 着床までの生殖の全過程が PG の存在下に進行することになる。しかし、受精現象そのものと PG との関りが全て明らかにされている訳ではない。たとえば、ウサギ射出精液を抗 PG (E $_2$ または F $_{2\alpha}$) 抗血清や PG 不活化酵素 (PG-dehydrogenase) で処理して人工授精すると、妊娠率が低下するという報告がある (Schlegel et al, 1983)。一方で、ウサギの精巢上体頭部, 尾部そして射出精子を

それぞれ PGF_{2α} 33mg% で処理してメスの卵管内へ媒精しても、受精率は PG 非処理群と何ら変化はなかったという報告がある (Sorgen & Glass, 1972). また、メスマウスに交尾4日目に PGF_{2α} 300μg を投与すると流産が増すという報告 (Bartke et al, 1972) や、反対に PG 合成阻害剤であるインドメサシン (ID) 150μg をメスマウスに交尾後4日間皮下注射すると100%流産するという報告 (Lau et al, 1973) がある。以上のごとく、一見相反する報告があり、しかもこれらの結果が直接 PG と受精現象との関りのみを反映したものとは考えにくい。そこで、PG の受精現象における役割を知るための1つの方法として、*in vitro* 受精系で PG 合成を阻害して、受精に与える影響を検討するのが直接的な方法と考えられる。以前に Nuzzo et al. (1983) が、ID で処理した精子を用いてマウス体外受精をすると、受精阻害がみられたことを報告しているが、具体的な実験条件等詳細な報告はなされていない。

そこで、今回われわれは、マウス受精系を用い、*in vitro* で ID を直接培養液に加え、PG 生合成を阻害した場合と、さらに ID と PGF_{2α} を同時に培地に添加した場合の両配偶子の viability と受精に与える影響を検討し、受精現象における PG の役割りの一端を明らかにせんと試みたので、その方法ならびに結果について述べる。

方 法

1. 配偶子の準備

実験動物として、雄は12~15週齢、雌は10週齢の成熟 ICR マウスを用い、温度23-25°C 下に昼14時間、夜10時間の昼夜周期にて飼育したものを実験に供した。精子の採取は雄マウスを屠殺の後、精巢上体尾部を切断して行った。精子塊を培養液内に入れ、約5分、精子が泳出してくるのを待ち、ほぼ均一な精子懸濁液を作製した。この原精子液を培養液で希釈して目的の最終濃度を作った。卵子の採取に際しては、雌マウスに10 i.u. の PMSG および hCG を56時間間隔で腹腔内注射することによって過排卵を惹起し、hCG 注射17時間後に屠殺、卵管膨大部より排卵卵子を採取した。この排卵卵子を0.1% Hyaluronidase 処理によって裸化卵子とした後、実体顕微鏡下に第一極体が観察され、変性所見が認められず、正常な排卵成熟卵子と判定された卵子のみを実験に供した。配偶子の準備および体外受精には chemically defined である modified Krebs-Ringer-Bi carbonate solution (mKRB) (Toyoda et al, 1971) を培養液として用いた。mKRB は使用直前にウシ血清アルブミンを加え (4mg/ml)、濾過滅菌器 (pore size 0.22μm) にて滅菌し、5% CO₂ incubator 内に5時間静置し、温度

(37°C) および気相を平衡させた後、実験に使用した。

2. 体外受精法

豊田らの方法 (Toyoda et al, 1971) に準じて体外受精を行った。通常、培養皿に0.4mlの培養液を置き、パラフィンオイルで覆って培地としているが、今回は ID または PG がパラフィンオイルへ溶出して添加量が不明瞭になるのを防ぐため、培養試験管に2mlの培養液を入れ培地とし、パラフィンオイルは使用しなかつた。精巢上体精子懸濁液を0.5-1.0×10⁶/ml の濃度で1時間前培養して受精能を獲得 (capacitation) させ、成熟排卵卵子をこの精子液に移して媒精した。媒精5時間後にスライドグラス上に卵子を *in toto* に置き、カバーグラスとの間に固定した後、中性ホルマリン固定した。0.25% acetolaemoid にて核染色をした後、受精、多精子侵入、単為発生、媒精後の変性、雄性前核形成についてそれぞれ検討した。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-a)。雄性前核または膨化精子頭部が複数認められ、それぞれに対応する尾部がある卵子を多精子侵入卵 (polyspermic eggs) とした (図1-b)。前核が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 eggs) とし (図1-c)、核が不明瞭な卵子または卵黄質に変性のある卵子を変性卵 (degenerated eggs) と判定した (図1-d)。

3. 精子の viability に与える ID の影響

精子の viability は、精子運動を指標として判定したが運動率のみならず運動の形態 (精子の推進力) を加味した Zausner-Guelman et al. (1981) の Sperm Survival Index (SSI) (表1) を用い、種々の濃度 (0, 100, 150, 200μg/ml) の ID 添加 mKRB 内で0.5-1.0×10⁶/ml の濃度で精子を培養 (5% CO₂ in air, 37°C) し、viability の経時変化をみた。マウスの個体差を除外するため、精巢上体精子を3~5匹分混和したものを原精子液とし、実験、対照群は同一の原精子液を用いて実験をした。運動率は精子濃度と不動精子濃度を算定して算出した。それぞれ5回実験をくり返し、SSI の平均値を算出した。

4. 卵子の viability に与える ID の影響

卵子の viability は実体顕微鏡下の変性所見および trypan blue 排泄能 (Hutz et al, 1985) を指標とした。マウスの個体差を除外するために5匹のマウスより実体顕微鏡下に正常と判定された過排卵裸化卵子を採取し集めた後各種濃度 (0, 100, 150, 200, 400μg/ml) の ID 添加 mKRB 培地に振り分け、5時間培養 (5% CO₂ in air, 37°C) したのち、viability を判定し、それぞれ実験を3回くり返した。

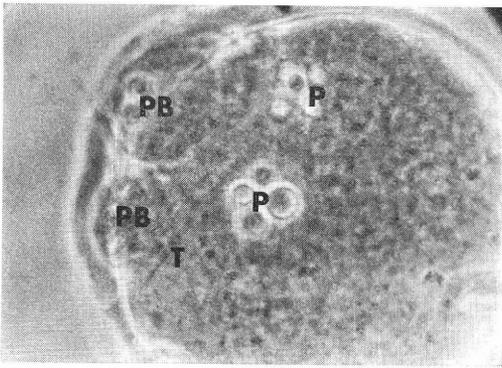


図 1-a 受精卵 (fertilized egg) を示す. 雌雄両前核 (P), 精子尾部 (T), 第 1・2 極体 (PB) が認められる

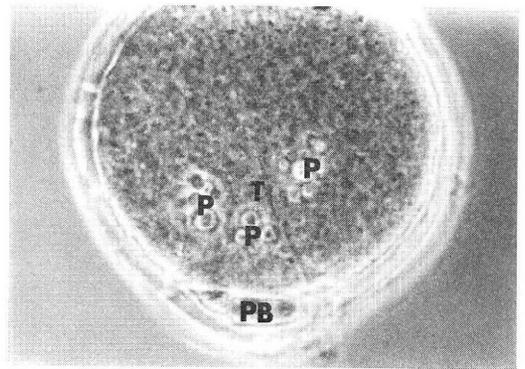


図 1-b 多精子侵入卵 (polyspermic egg) を示す. 前核 (P) が 3 つ, 精子尾部が 2 つ (1 つは焦点外) 観察され, dispermic であることが分る

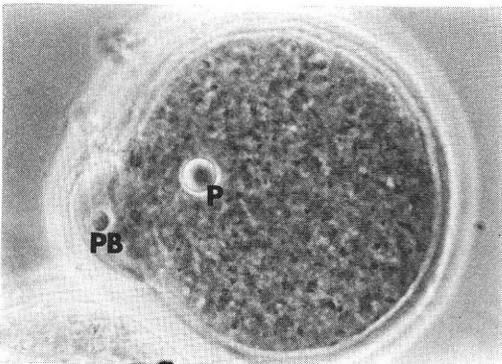


図 1-c 単為発生卵 (parthenogenetic egg) を示す. 極体 (PB) が 1 つ観察されるが, 前核 (P) が 1 つしかなく, また精子尾部は観察されない

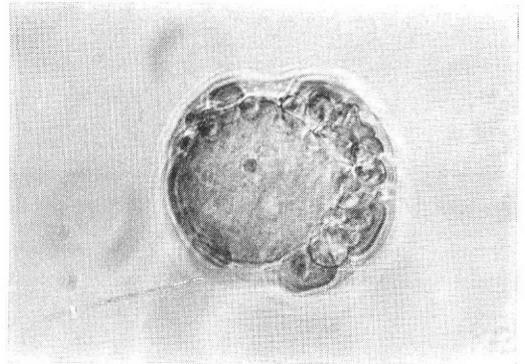


図 1-d 変性卵 (degenerated egg) を示す. 細胞質が不均一で fragmentation をおこなっていることが分る

図 1 受精卵, 多精子侵入卵, 単為発生卵, 変性卵を以下に示す.

スライドガラスに卵子を *in toto* に置きカバーガラスとの間に固定した後, 中性ホルマリン固定, 0.25% アセトラクモイド染色をし, 位相差顕微鏡 400 倍にて観察す.

5. 体外受精に与える ID の影響

各種濃度 (0, 100, 150, 200 μ g/ml) の ID 添加 mKRB を培養液として用い体外受精を行い, 受精, 多精子侵入, 単為発生, 媒精後の変性, 雄性前核形成に与える影響を検討した. 体外受精の全過程 (精子の前培養から媒精, 卵子固定まで) にわたって実験群では ID が作用するように条件を設定した. 各群について 3~5 回実験をくり返した.

6. 精子の viability に与える ID と PG の影響

培地に ID も PG も含まない群を対照群とし, ID 150 または 200 μ g/ml 単独群, ID 150 または 200 μ g/ml と各種濃度の PGF_{2 α} (12.5, 25, 50, 100 μ g/ml) 同時添加群を設定し, それぞれの培地で精巢上体精子を 0.5-1.0 $\times 10^6$ /ml の濃度で培養し, SSI の経時変化をみた.

PGF_{2 α} は 98% ethanol で溶解したのち, 細胞毒性を抑えるため培養中の最終濃度を 0.05% とし, さらに ethanol による影響を除外するため, 対照群, ID 単独群の培地にも同濃度の ethanol を添加した. 各群について 5 回の実験をくり返し, SSI の平均値を算出した.

7. 体外受精に与える ID と PG の影響

培地に ID と PGF_{2 α} を両方共添加しない群を対照群とし, ID 150 または 200 μ g/ml 単独添加群, ID 150 または 200 μ g/ml と PGF_{2 α} 50 μ g/ml 同時添加群を設定し, それぞれの培養液を用いてマウス体外受精を行った場合の影響を, 受精, 多精子侵入, 単為発生, 媒精後の変性, 雄性前核形成について検討した. ethanol による影響を除外するため, 対照群, 実験群共, 最終濃度で 0.05% の ethanol 添加とした. また, 実験群では ID

表 1 Sperm Survival Index (SSI) の配点。
SSI は運動率による配点に運動形態の配点を
加えて算定する

	Values	
Motility	≥80%	8
	60-79%	6
	40-59%	4
	20-39%	2
	≤19%	0
Progression	Rapid forward movement	4
	Forward movement	3
	Erratic movement	2
	Shaking in place	1
	Immotile	0

The sperm survival index (SSI) was obtained by adding motility and progression values.

または ID および PGF_{2α} が体外受精の全過程にわたつて作用するように条件を設定した。各群について 3~5 回の実験をくり返した。

成績

1. 精子の viability に与える ID の影響

ID を添加しない対照群の Sperm Survival Index (SSI) の経時変化は、培養前、培養後 1, 3, 5, 7, 9 時間で、それぞれ 12.0±0.0, 12.0±0.0, 9.8±0.8, 10.4±1.1, 9.4±1.7, 8.4±1.1 と緩徐な低下傾向がみられた。ID 100, 150µg/ml 添加群では、対照群に比して、やや抑制傾向がみられたが、大きな変化は認められなかった。ID 200µg/ml 群では培養 1 時間目の SSI は 3.8±0.8 となり、培養 1 時間ですでに著明な運動性の低下が観察された (図 2)。

2. 卵子の viability に与える ID の影響

3 回の実験でそれぞれの群について 45~73 コの卵子について検討した。5 時間培養ののち、ID 100µg/ml 添加群で 4.1% (3/73), 150µg/ml 添加群で 4.6% (3/65), 200µg/ml 添加群で 10.5% (6/57) の変性卵が観察され、ID 無添加群との間に有意差は認められなかった。しかし、ID 400µg/ml 添加群では 45 コ全卵共変性したので、受精実験にはこの濃度を用いなかった (表 2)。

3. 体外受精に与える ID の影響

対照群の受精率は 58.8% (57/97) であり、添加 ID 濃度 100µg/ml 群では 54.8% (40/73) となり、受精抑制の傾向はみられたが、有意差は認められなかった。添加 ID 濃度 150, 200µg/ml 群の受精率は、それぞれ 24.3% (18/74), 18.9% (18/95) と用量依存性に低下し、有意

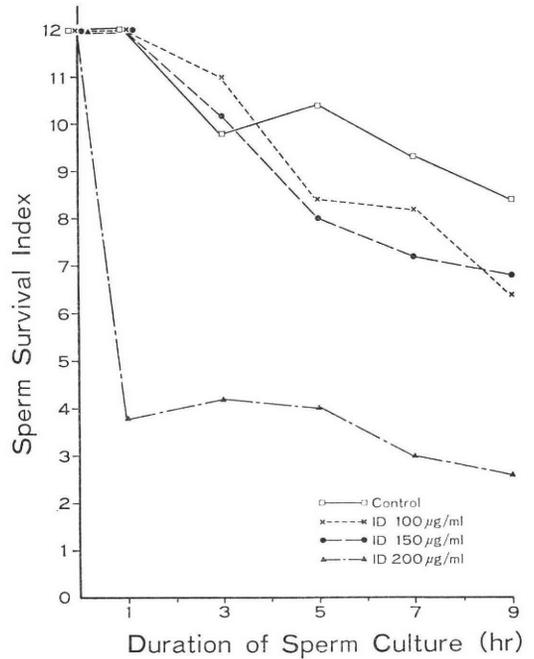


図 2 精子の viability に与えるインドメサシンの影響。縦軸は Sperm Survival Index (SSI) を示し、横軸は培養時間を示す。5 回実験をくり返し SSI の平均値をプロットした

表 2 卵子の viability に与えるインドメサシンの影響。各種濃度のインドメサシン添加培地で卵子を 5 時間培養したのち、卵子の viability を変性所見および trypan blue 排泄能を指標として検討した

Concentration of indomethacin (µg/ml)	No. of eggs degenerated / no. of eggs examined (%)
0	2/56 (3.6%)
100	3/73 (4.1%) ^{a)}
150	3/65 (4.6%) ^{a)}
200	6/57 (10.5%) ^{a)}
400	45/45 (100.0%) ^{b)}

- a) no a significant difference between control and experimental group.
- b) significant greater than control

な受精阻害が観察された (P≤0.001)。多精子侵入、単為発生については一定の傾向は認められなかった。媒精後の卵子変性については、添加 ID 濃度 200µg/ml 群で媒精後 5 時間で変性卵子は 30.5% (29/95) となり、対照群の 12.4% (12/97) との間に有意な増加が観察された (P≤0.003)。また ID 200µg/ml 群では、fertilizing sperm に対する雄性前核の比率が 90.9% (20/22) とな

表 3 体外受精に与えるインドメサシンの影響

各種濃度のインドメサシン添加 mKRB を培養液として用い体外受精を行い、受精、多精子侵入、単為発生、授精後の変性、雄性前核形成に与える影響を検討した結果を示す。各群について 3~5 回の実験をくり返しその総計を示す

Concentration of ID ($\mu\text{g/ml}$)	Number of Eggs							No. of male pronucleus/no. of fertilizing sperm (%)
	Examined	Fertilized (%)	Unfertilized	Polyspermic (%) ^{d)}	Parthenogenetic (%)	Degenerated (%)		
0	97	57 (58.8)	40	8(14.0)	3(3.1)	12 (12.4)	62/65(95.3)	
100	73	40 (54.8)	33	10(25.0)	6(8.2)	15 (20.5)	47/50(94.0)	
150	74	18 ^{a)} (24.3)	56	1(5.5)	5(6.8)	9 (12.2)	18/19(94.7)	
200	95	18 ^{a)} (18.9)	77	4(22.2)	5(5.3)	29 ^{b)} (30.5)	20/22(90.9) ^{c)}	

- a) Values significant different from control (non-ID group) at $P \leq 0.001$.
- b) Significant greater than control (no-ID group) at $P \leq 0.003$.
- c) A tendency to inhibit male pronucleus formation, but no significant difference.
- d) Percent of polyspermic ova in fertilized ova.

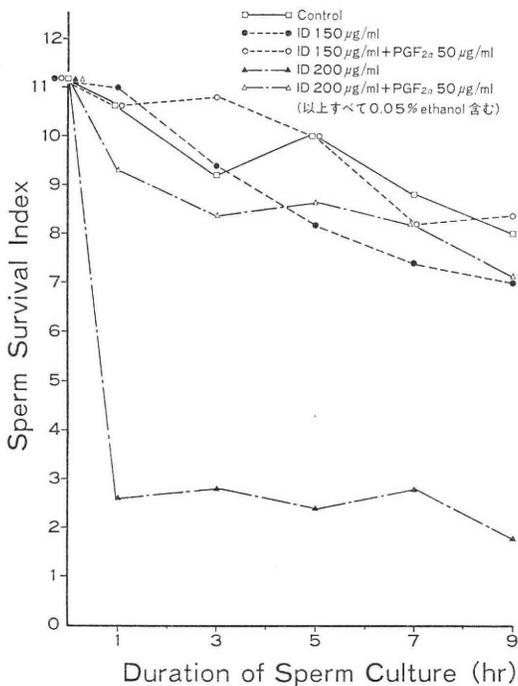


図 3 精子の viability に与えるインドメサシンとプロスタグランジンの影響

り、対照群の95.3% (62/65) に比して雄性前核形成阻害傾向がみられたが、有意差は認められなかった (表 3)。

4. 精子の viability に与える ID と PG の影響

本実験では PG の溶媒である ethanol の影響を除外するため、対照群および ID 単独添加群にもそれぞれ最終濃度で0.05%の ethanol 添加としたので、ethanol 無添加の各群に比して SSI はやや低下傾向を示したが、ほぼ同様の経時変化が観察された。つまり、ID 150 $\mu\text{g/l}$

ml 添加群では対照群とほぼ同様の緩徐な低下を示し、ID 200 $\mu\text{g/ml}$ 添加群では一時間培養後の SSI は2.6 \pm 1.1と著明な抑制がみられた。しかし、ID 200 $\mu\text{g/ml}$ の PGF_{2 α} 50 $\mu\text{g/ml}$ 同時添加群では、SSI は培養前、培養後1, 3, 5, 7, 9時間で、それぞれ11.2 \pm 1.1, 9.4 \pm 0.9 8.4 \pm 0.6, 8.6 \pm 1.1, 8.2 \pm 0.8, 7.2 \pm 0.8となり、ID 単独群でみられた著明な viability の低下は観察されなかった (図 3)。また、添加 PGF_{2 α} の濃度が12.5, 25, 100 $\mu\text{g/ml}$ についても同様の結果が得られたが、50 $\mu\text{g/ml}$ に於て SSI の回復が一番顕著であったので、以後の実験の添加 PGF_{2 α} 濃度は50 $\mu\text{g/ml}$ とした。

5. 体外受精に与える ID と PG の影響

本実験では ethanol の影響を除外するため、添加 ethanol 濃度を最終濃度で0.05%とし、全実験群に添加したが、受精率は ethanol 無添加の対照群で58.8%、ethanol 添加の対照群で55.6%となり、ethanol の影響は無視できると考えられた。ID 150 $\mu\text{g/ml}$ 単独群と PG 添加群で受精率は、それぞれ 23.1% (12/52), 55.8% (29/52), ID 200 $\mu\text{g/ml}$ 単独群と PG 添加群でそれぞれ 20.7% (12/58), 64.0% (32/50) となり、各々 ID 単独群でみられた有意な受精阻害は PG 添加群では観察されなかった ($P \leq 0.001$)。多精子侵入、単為発生に関しては一定の傾向を認めなかった。また媒精後の卵子変性については、対照群で14.8% (8/54), ID 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ 単独添加群でそれぞれ11.5% (6/52), 22.4% (13/58) となり、ID 200 $\mu\text{g/ml}$ 群で増加傾向が認められた (表 3)。そして ID 200 $\mu\text{g/ml}$ の PG 添加群では、媒精後の卵子変性は8.0% (4/50) となり、ID 単独添加群に比して有意差は認められなかったが、減少傾向が観察された (表 4)。雄性前核形成については一定の傾向を認めなかった。

表 4 体外受精に与えるインドメサシンとプロスタグランジンの影響。体外受精の全過程にインドメサシン, またはインドメサシンおよびプロスタグランジンを作用させ受精, 多精子侵入, 単為発生, 授精後の変性, 雄性前核形成に与える影響を検討した結果を示す。各群について 3~5 回の実験をくり返しその総計を示す

Concentration of ($\mu\text{g/ml}$)			Number of Eggs					No. of male pronucleus/no. of fertilizing sperm (%)
ID	PGF _{2α}	Examined	Fertilized (%)	Unfertilized	Polyspermic (%) ^{a)}	Parthenogenetic (%)	Degenerated (%)	
0	0	54	30 (55.6)	24	3(10.0)	0(0.0)	8 (14.8)	32/33(97.0)
150	0	52	12 ^{b)} (23.1)	40	1(8.3)	2(3.8)	6 (11.5)	12/13(92.3)
150	50	52	29 ^{b)} (55.8)	23	2(6.9)	0(0.0)	6 (11.5)	31/31(100.0)
200	0	58	12 ^{b)} (20.7)	46	3(25.0)	2(3.4)	13 ^{c)} (22.4)	15/15(100.0)
200	50	50	32 ^{b)} (64.0)	18	4(12.5)	2(4.0)	4 ^{d)} (8.0)	34/36(94.4)

- a) Values significantly different from control (non-ID, non-PG group) at $P \leq 0.001$.
 b) Significant greater than ID alone group at $P \leq 0.001$.
 c) A tendency to increase compared to control (non-ID, non-PG group), but no asignificant difference.
 d) A tendency to decrease compared to ID alone group, but no significant difference.
 e) Percent of polyspermic ova in fertilized ova.

考 察

今回の実験では, PG 合成阻害剤である ID を直接受精の培地に加えると, 用量依存性に受精阻害が観察された(表 3). ところが, PGF_{2 α} を同時に加えると ID 単独添加でみられた受精阻害が観察されなかつた(表 4). このことにより, ID 添加により起つた受精阻害は, ID の toxic な薬理作用によるものではなく, PG の合成が阻害された結果と考えることができ, PG が受精の過程へ何らかの形で直接関与する事が示唆された. 今回の研究では, ID 200 $\mu\text{g/ml}$ 添加で著明な精子運動の抑制が観察され, さらには受精阻害が観察された. しかし, PGF_{2 α} 同時添加では精子運動・受精共に阻害がみられなかつた. これらを考え合わせると, PG, とくに PGF_{2 α} はまず第 1 に精子運動を介してマウスの受精に大きく関与していると考えられた. 諸家の報告をみても, PG は精子運動に深く関与する点で一致しているようである. 例えば, Schlegel et al. (1981) は PG 不活化酵素である PG-15-hydroxydehydrogenase (PG-15-HDH) 4.3 $\mu\text{IU}/\mu\text{l}$ でヒト射出精液を処理すると, 精子運動が著明に抑制されるが, PGE を同時に加えて処理しても精子運動に対する抑制は回復しないので, PGF_{2 α} は精子運動に不可欠としている. さらに Schlegel et al. (1983) は, ウサギの射出精液を抗 PGF_{2 α} 抗血清で処理しても精子運動に影響はみられないが, PG-15-HDH で PG を不活化すると, 精子運動の抑制がみられたことにより, ウサギの精子運動には PGF_{2 α} 以外の PG が必須であるとしている. また, ヒト射出精液に PGF_{2 α} 2500ng/ml を加えると精子運動の亢進が観察されたという報告 (Grun-

berger et al, 1981) や, ヒト射出精液に PGE₁・E₂・F_{1 α} ・F_{2 α} をそれぞれ 100 μg ずつ加えると, 精子運動は PGE₂ で亢進し, PGF_{1 α} , 2 α で抑制されるという報告 (Didolkar & Roychowdhury, 1980) がある. しかしこれらの報告は, 抑制試験では PG の補充試験が行われていないし, また刺激試験では, 元から精漿中に含まれている PG を除去していないので, 結果の正しい解釈は困難と思われる. Aitken & Kelly (1985) はヒト射出精子を精漿中に生理的に含まれる濃度の PGE₁・E₂ で処理すると, 用量依存性に精子運動が促進されると共に, zona-free のハムスター卵子を用いた異種間授精で精子の侵入率が有意に上昇することを観察している. PG が精子の運動性に関係し, 精子の運動性が卵子侵入率と関係するという事を明らかにした点で, われわれの結果は Aitken & Kelly の報告と一致した.

マウスでは 2 時間前培養した精子で媒精すると 1 時間後には, 精子侵入卵の割合が 100% に達するという報告 (Toyoda et al, 1971) があり, 培養 3 時間までの精子の運動性が受精に大きく関係するものと考えられる. 今回の実験では, ID 150 $\mu\text{g/ml}$ 添加で精子を 3 時間培養しても運動性の低下は観察されなかつたにも拘らず有意な受精阻害がみられた. そして, やはり PGF_{2 α} 同時添加群では, 受精阻害は観察されなかつた. このことより, ID 150 $\mu\text{g/ml}$ 添加で起つた受精は精子の運動性とは関係ない別の機序, 例えば受精能獲得 (capacitation) や精子尖体反応 (acrosome reaction, AR) の阻害等を通じて受精阻害が生じたことが可能性として考えられた. 詳細なデータの報告はなされていないが, Nuzzo et al. (1983) は, 受精能を獲得させたマウス精子に ID 100 $\mu\text{g/ml}$ を

加えても精子運動には変化がみられないが、体外受精をするとう受精の阻害が観察され、また、モルモット精子の AR が ID 100 μ g/ml で抑制されるが、PGE₁₀ μ g/ml を同時に添加するとその抑制がみられないことを報告している。さらに Meizel & Turner (1984) は、ハムスター精子を *in vitro* で cyclooxygenase inhibitor である docosahexaenoic acid 1 μ g/ml で処理すると、AR が阻害され、PGE₁・E₂ それぞれ 6.27nM 添加によつて AR が促進されることを報告している。これらの報告とわれわれの結果を考え合わせると、精子運動の抑制がないのにみられた受精阻害は、ID によつて PG の生合成が抑制され、そのため AR が阻害されて起こつたという可能性が考えられる。

さて、PG の作用の大部分は PG receptor を介して発現するとされており、ヒト精子には PGE₁、PGF_{2 α} に対する PG receptor の存在が報告されている (Mercado et al, 1978)。そして PG の細胞内作用機作は、現在までのところ、大きく分けて以下の 4 つが想定されている。(Hall & Behrman, 1982)。1. ionophore 様の働きで Ca²⁺ influx および Ca²⁺ 代謝を変化させることによつて、2. membrane-associated enzymes を介して、3. intracellular enzyme に作用して、4. 細胞内の microtubules や microfilaments の収縮を介して PG はその作用を発現するとされている。2. で代表的なものは adenylate cyclase-cyclic Adenosine monophosphate (cAMP) 系であり、3. では炭水化物代謝に関係し、とくに steroidogenic enzymes 活性に影響を与えるとされている。

また、精子の運動とこれに関与する因子をまとめてみると、精子鞭毛には筋肉のミオシンとアクチンに相当する Adenosine triphosphatase (ATPase) 活性をもつ蛋白質 dynein (Gibbons & Rowe, 1965) と tubulin (Mori, 1968) が存在し、これらの相互作用により Adenosine triphosphate (ATP) をエネルギー源として鞭毛運動が起こることが知られている、tubulin は cAMP-dependent protein kinase であり (Tash & Means, 1982)、精子内の cAMP を人工的に上昇させると精子運動が刺激されること (Garber et al, 1971) も知られている。さらに、Ca²⁺ も精子運動を制御する (Babcock et al, 1978) とされている。さらに capacitation の過程で精子細胞内の cAMP 濃度が上昇すること (Morton & Albagli, 1973)、また methylxanthine phosphodiesterase inhibitor (0.25mM) によつて誘起された細胞内 cAMP と Ca²⁺ の濃度の増加とが *in vitro* で受精能を獲得したモルモット精子の AR と相関関係にあること (Hyne & Garbers, 1979)、Ca²⁺ influx が AR に必須

であること (Yanagimachi, 1981) などが知られている。これら諸家の報告を総合して考えれば、PG は精子の PG receptor に結合することによつて第 2 メッセンジャー (cAMP あるいは Ca²⁺) を介して精子運動、capacitation、さらに AR の過程で重要な生物作用を発揮することは当然予期されることであり、今回の研究で得た結果がそれを裏づけているといえる。

現在までのところ、卵子に於る PG receptor 蛋白質の存在は証明されていないが、排卵された cumulus cell-oocyte complexes が PGE、F を産生するという報告 (Schuetz & Dubin, 1981) があるので、PG は精子のみならず、卵子を介しても受精の過程に関与する可能性が考えられる。今回の実験では ID 200 μ g/ml 添加でも卵子の viability の低下は用いた実験条件下では観察されなかつた。しかし、媒精 5 時間後の変性卵子数は有意に増加し、PGF_{2 α} 同時添加により変性卵子の減少傾向が観察された。この事は PG 合成が阻害されたための代謝障害が受精ならびに胚発達阻害の一因を荷っている可能性があることを示すと考えられる。また、前核形成阻害が有意にみられなかつたことは、Thibault et al. (1976) のいう male pronucleus growth factor (MPGF) の合成がすでに卵の成熟過程で完了している事と考えあわせると、精子侵入後の前核形成過程において、PG の直接作用が必須であるとの根拠を与えなかつたことになる。

PG の受精現象に与えるその他の影響としては、動物種によつては PG が多精子侵入拒否の機構に関与する可能性があると考えられている。例えば、ウニでは PG 生合成を阻害する cyclooxygenase inhibitor (ID 10-100 μ M, flufenamate 10-60 μ M, または meclofenamate 10-60 μ M) を卵子が cortical reaction を完了する前に作用させると多精子侵入が増加することが報告されている (Schuel et al, 1984)。しかし、今回の実験では多精子侵入に関して一定の傾向は認められなかつた。

今後、PG が卵子を介してどのように受精に関与しているかを解析するためには、まず、卵子における PG receptor 蛋白質の局在とその種類等に関する基礎検討が必要であろう。

以上、今回の実験により、PG は精子の運動性を介してのみならず、他の機構によつても受精の過程に直接の関わりを持つことが示唆されたが、その詳細な機序に関しては今後の課題として検討が必要である。

文 献

- 1) Aitken, R. J. and Kelly, R. W.: Analysis of the direct effects of prostaglandins on human sperm function. J. Reprod. Fert.,

- 73 : 139-146, 1985.
- 2) Babcock, D. F., Stamerjohn, D. M. and Hutchinson, T. : Calcium redistribution in individual cells correlated with ionophore action on motility. *J. Exp. Zool.*, 204 : 391-400, 1978.
 - 3) Bartke, A., Merrill, A. P. and Baker, C. F. : Effects of prostaglandin $F_2\alpha$ on pseudo-pregnancy and pregnancy in mice. *Fert. Steril.*, 23 : 543, 1972.
 - 4) Didolkar, A. K. and Roychowdhury, D. : Effects of prostaglandins E-1, E-2, F-1a and F-2a on human sperm motility. *Andrologia.*, 12 : 135-140, 1980.
 - 5) Garbers, D. L., Lust, W. D., First, N. L. and Lardy, H. A. : Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry*, 10 : 1825-1831, 1971.
 - 6) Gerozissis, K., and Dray, F. : Radioimmunoassay of prostaglandins in the semen of fertile men. *J. Reprod. Fert.*, 61 : 487-490, 1981.
 - 7) Gibbons, I. R. and Rowe, A. J. : Dynein : a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science*, 149 : 424-425, 1965.
 - 8) Grunberger, W., Maier, U. and Lunglmayr, R. : Effect on prostaglandin F 2 alpha on sperm motility *in vitro*. *Reproduction*, 5 : 141-144, 1981.
 - 9) Hall, A. K. and Behrman, H. R. : Prostaglandins : biosynthesis, metabolism and mechanism of cellular action. In : *Prostaglandins*. Ed : Lee, J. B. Elsevier-N. Holland, New York, pp 1-38, 1982.
 - 10) Harper, M. J. K., Norris, C. J. and Rajkumar, K. : Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits. *Biol. Reprod.*, 28 : 350-362, 1983.
 - 11) Harison, F. A., Heap, R. B., Horton, E. W. and Poyser, N. L. : Identification of prostaglandin $F_2\alpha$ in uterine fluid from the non-pregnant sheep with an autotransplanted ovary. *J. Endocr.*, 53 : 215-222, 1972.
 - 12) Hutz, R. J., DeMayo, F. J. and Dukelow, W. R. : The use of vital dyes to assess embryonic viability in the hamster, *mesocricetus auratus*. *Stain Tech.*, 60 : 163-167, 1985.
 - 13) Hyne, R. V. and Garbers, D. L. : Calcium-dependent elevation of cyclic AMP and inducible of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 20 (Suppl. 1, Abstracts) : Soc. for Study Reprod., 79A, 1979.
 - 14) Lau, I. F., Saksena, S. K. and Chang, M. C. : Pregnancy blockade by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis : its reversal by prostaglandins and progesterone in mice. *Prostaglandins*, 4 : 759-803, 1973.
 - 15) 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 : 221-229, 1975.
 - 16) Meizel, S. and Turner, K. O. : The effect of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.*, 231 : 283-288, 1984.
 - 17) Mohri, H. : Amino acid composition of "tubulin" constituting microtubules of sperm flagella. *Nature*, 217 : 1053-1054, 1968.
 - 18) Morton, B. and Albagli, L. : Modification of hamster sperm adenylyl cyclase by capacitation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50 : 697-703, 1973.
 - 19) Nuzzo, N. A., Joyce, C. and Zaneveld, L. J. : Role of prostaglandins in the acrosome reaction and fertilization. *Biol. Reprod.*, 28, Suppl. : 38, 1983.
 - 20) Schlegel, W., Fischer, B., Beier, H. M. and Schneider, H. P. G. : Effects on fertilization of rabbits of insemination with ejaculates treated with PG-dehydrogenase and antisera to PGE₂ and PGF₂ α . *J. Reprod. Fert.*, 68 : 45-50, 1983.
 - 21) Schlegel, W., Rotermund, S., Faber, G. and Nieschlag, E. : The influence of prostaglandins on sperm motility. *Prostaglandins*, 21 : 87-99, 1981.
 - 22) Schuel, H., Traeger, E., Schuel, R. and Boldt, J. : Anti-inflammatory drugs promote polyspermic fertilization in sea urchins. *Gamete Res.*, 10 : 9-19, 1984.
 - 23) Schuetz, A. W. and Dubin, N. H. : Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell oocyte complexes. *Endocrinology*, 108 : 457-463, 1981.
 - 24) Sorgen, C. D. and Glass, R. H. : Lack of effect of prostaglandin $F_2\alpha$ on the fertilizing ability of rabbit sperm. *Prostaglandins*, 1 : 229-232, 1972.
 - 25) Swan, C. G. and Poyser, N. L. : Prostaglandin synthesis by, and the effects of prostaglandin analogues on, the vas deferens of the rabbit and rat *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 69 : 91-99, 1983.
 - 26) Tash, J. S. and Means, A. R. : Regulation of protein phosphorylation and motility by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.*, 26 : 745-763, 1982.
 - 27) Thibault, C., Gerard, M. and Menezo, Y. : Nuclear and cytoplasmic aspects of mammalian oocyte maturation *in vitro* in relation

- to follicle size and fertilization. *Prog. Reprod. Biol.*, 1 : 233-240, 1976.
- 28) 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 : 152-158, 1971.
- 29) Warnes, G. M., Amato, F. and Seamark, R. F. : Prostaglandin F in the fallopian secretion of the ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 31 : 275-283, 1978.
- 30) Yanagimachi, R. : Mechanisms of fertilization in mammals. In : *Fertilization and embryonic development in vitro*. Eds : Mastroianni, L., Jr. and Biggers, J. D. Plenum Press, New York, pp 82-182, 1981.
- 31) Zausner-Guelman, B., Blasco, L. and Wolf, D. P. : Zona free hamster eggs and human sperm penetration capacity : a comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fert. Steril.*, 36 : 771, 1981.

Analyses of the role of prostaglandins in fertilization process

Seiji Hayashi, Yoichi Noda, Hisashi

Matsumoto and Takahide Mori

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

This study was designed to investigate the role of prostaglandins (PG) in fertilization process by using both indomethacin (ID), an inhibitor of PG biosynthesis, as a tool and mouse *in vitro* fertilization, as a model for analysis. Spermatozoal viability was slightly suppressed by ID

at doses of 100 or 150 $\mu\text{g/ml}$, but was markedly suppressed by a dose of 200 $\mu\text{g/ml}$ one hour after the beginning of cultivation as judged by motility of the gamete; on the other hand, viability of ova was not affected even by 200 $\mu\text{g/ml}$ of ID for 5hr-incubation as examined by dye-excretion test and morphology. Fertilization rates for 0, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ of ID were 58.8% (57/97), 54.8% (40/73), 24.3% (18/74) and 18.9% (18/95), respectively. At doses of 150 $\mu\text{g/ml}$ and more, significant inhibition of fertilization was noted. At 200 $\mu\text{g/ml}$, a tendency to inhibit formation of male pronucleus and a significant increase in the number of degenerated ova after insemination were observed. In a subsequent experiment to examine the effects on spermatozoal viability and fertilization of ID added to the medium concurrently with 50 $\mu\text{g/ml}$ of $\text{PGF}_{2\alpha}$. The reduction in spermatozoal viability observed at 200 $\mu\text{g/ml}$ of ID was not detected after the concurrent addition of PG. Fertilization rates was 55.6% (30/54) in the control group, 23.1% (12/52) or 20.7% (12/58) in the groups cultivating with ID at dose of 150 or 200 $\mu\text{g/ml}$, and after concurrent addition of PG, up to 55.8% (29/52) or 64.0% (32/50) respectively. Thus, the significant inhibition of fertilization observed in the groups cultivating with ID only was not observed in the groups cultivating with ID concurrently with PG. No particular tendency was found with regard to the formation of the male pronucleus or to polyspermy, but degeneration after insemination tended to be reduced in the PG-added groups. Based on the fact that fertilization was inhibited by ID at doses not affecting gamete viability, but not by ID at doses sufficient to suppress spermatozoal viability to which were added $\text{PGF}_{2\alpha}$, it is concluded that PG may be involved in fertilization via not only sperm motility but also other processes of fertilization.

(受付：昭和62年2月6日特別掲載)

体外受精および人工授精における精子回収法の検討

The Examination on the Method for Collection of Good Spermatozoa from Semen Sample

福島県立医科大学産科婦人科学講座

吉松 宣弘 星 和彦 柳田 薫
Nobuhiro YOSHIMATSU Kazuhiko HOSHI Kaoru YANAGIDA

会田 都美子 佐藤 章
Tomiko AITA Akira SATO

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

精液から運動良好精子を回収するためにわれわれは精液静置法 (swim up 法) を採用しているが, viscosity の高い精液では回収率が芳しくない。そこで攪拌遠心法を考案し, 従来の swim up 法と回収率の比較検討を行った。本法は, 精液と同量の medium を加え, 攪拌の後, 1500回転5分間遠心し, 約0.1ml の pellet を充分に混和し, swim up させる方法であるが, viscosity の高低を問わず, 13例中12例 (92.3%) で swim up 法が良好な回収率を示した。しかし viscosity の高い精液では, swim up 法でも回収率は悪く, 更に有効な swim up 法を確立するために液化時間と回収率の関係を検討した。その結果, 30分の液化に比べ, 90分液化させ精液の回収率が増加が認められた。Viscosity の高い精液の場合には, 60~90分という比較的長い液化時間を設ければ, 良好精子を充分に集める事ができ, swim up 法は優秀な精子回収法と考えられる。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 462-467, 1987)

緒 言

体外受精あるいは人工授精の際の精子回収法として, われわれは精液静置法 (Layering method)¹⁾, いわゆる swim up 法を常用してきた。本法は, 正常またはそれに近い所見を示す精液に対しては良好精子の回収率が高く, 精子回収法としては極めて有効な方法である。しかし, viscosity の高い精液や oligospermia の患者精液等に対しては, 仲々 swim up しない, 良好精子が回収できないという事実が経験あるいは指摘されている。

1984年に Leung ら²⁾ が, oligospermia, asthenospermia の患者精液から良奴精子を回収する方法を報告している。すなわち, 液化の完了した精液を同量の Ham's F10液で攪拌遠心し, 上清を除去, 残った pellet に再度 medium を加え, 攪拌遠心を繰り返し, 沈殿した pellet を AIH, IVF に利用するものである。Leung らは, 単に medium を上乘せる over laying method に比べ良好な成績が得られたと報告している。また, 本法のごとき攪拌遠心を利用する方法は精漿を完全に分離

し得るとの報告も認められる。

今回われわれは, viscosity の高い精液に対して, 外来でも簡易に行える様に, Leung らの方法を簡略化した方法を考案し, 良好精子回収の効果を調べ, また合わせて, 効果的な swim up の方法について再検討したのでここに報告する。

方 法

図1に従来の swim up 法を示した (A法)。

用手法により採取した精液を室温で30分放置し, 液化させた後, mBWW 液2.0ml を入れた試験管底に medium と精液が2層性になる様に静かに0.5ml の精液を注入する。試験管口をパラフィルムで覆い, 精液と medium の境界が広がる様に30°に傾けて, 37°C, CO₂ インキュベーター内に1時間静置し, 上清部分をそのままの状態, ピペットで1.0ml を採取した。

図2に今回考案した方法を示した (B法)。

攪拌遠心法と称する。用手法で採取した精液を室温で30分放置し, 液化させた後, 0.5ml を試験管にとり,

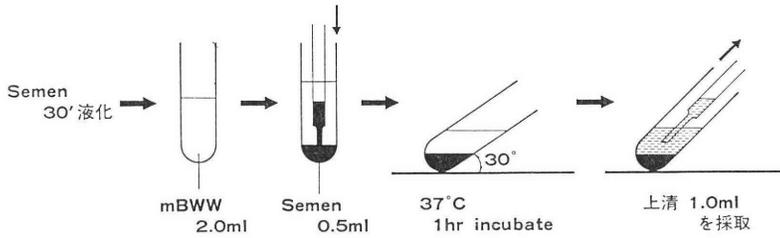


図 1 Layering method (Swin up 法) : A 法

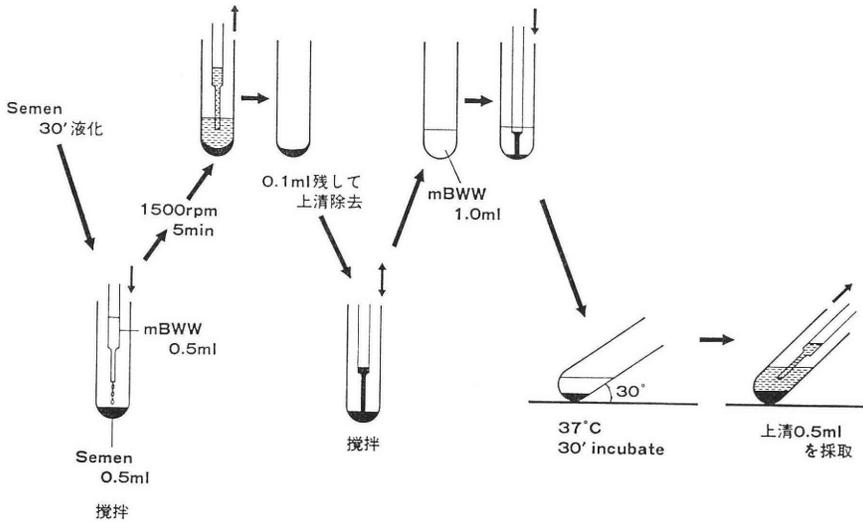


図 2 攪拌, 遠心法 : B 法

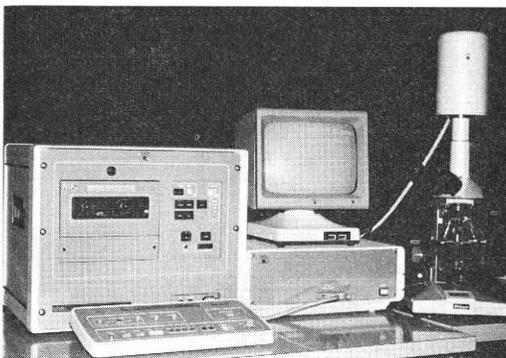


図 3

0.5ml の mBWW を加え、ピペットで十分に攪拌混和する。1500回転で5分間遠心の後、約0.1mlを残し上清を除去する。Pellet を十分に攪拌し、mBWW 1.0ml の入った試験管にA法と同様に注入し、30°に傾けて、30分、37°C、CO₂ インキュベーターに静置し、上清を同様に0.5ml 採取した。

これらの上清と、A, B法施行前の精液について、sperm density, motility, morphology を調べ、良好精子の回収率を比較検討した。Sperm density はMakler の counting chamber を使用し、motility は microscopic high speed video (Nac) を用いて検討した(図3)。

良好精子数、精子総数、回収率は、medium を全て回収したものとして考え、次の式によつた。

◎良好精子数 = 精子総数 × 運動率 × 形態学的正常精子率

◎精子総数 = 精子濃度 × 0.5ml 精液

〃 × 2.0ml A法

〃 × 1.0ml B法

◎回収率 = 良好精子数 (A, B) / 良好精子数(精液)

結 果

A法とB法を比較検討すると、表1に示すごとく、13例中12例(92.3%)までがA法の方が良好な回収率を示した。

表 1

No.	Viscosity		Sperm density ($\times 10^5$ /ml)	Motility (% motile spermatozoa)	Morphology (% normal spermatozoa)	Collection rate (%)
1	high	semen	34.0	57.0	93.0	
		A	8.0	71.0	92.0	115.9
		B	19.0	64.0	98.9	133.4
2	high	semen	9.0	64.5	90.7	
		A	2.0	78.0	92.0	109.0
		B	4.0	46.0	91.0	63.0
3	very high	semen	76.0	72.5	86.6	
		A	1.0	88.8	93.3	6.9
		B	3.0	50.6	86.9	5.5
4	high	semen	44.0	46.6	81.1	
		A	3.5	90.0	81.0	61.4
		B	4.0	86.2	84.7	35.1
5	very high	semen	65.5	70.4	95.2	
		A	4.0	91.2	99.0	32.0
		B	7.0	88.6	92.1	27.7
6	high	semen	66.6	84.0	94.5	
		A	14.0	98.0	92.8	97.0
		B	3.5	83.6	97.0	10.0
7	very high	semen	41.0	47.2	87.1	
		A	1.3	61.5	75.8	14.4
		B	6.3	21.5	76.2	12.2
8	low	semen	82.0	68.3	81.6	
		A	9.0	98.3	91.5	70.9
		B	18.0	84.0	80.8	53.5
9	low	semen	9.0	46.8	77.2	
		A	1.0	81.5	97.2	97.0
		B	1.0	52.2	92.7	29.8
10	high	semen	95.0	78.9	84.4	
		A	22.5	98.0	94.7	132.0
		B	28.0	81.1	96.0	103.3
11	very high	semen	34.0	56.8	91.8	
		A	2.0	86.0	91.7	35.5
		B	2.0	78.0	93.2	24.6
12	low	semen	37.0	23.2	84.0	
		A	2.0	77.4	81.2	69.7
		B	2.0	78.3	88.0	38.2
13	low	semen	28.6	65.8	79.2	
		A	4.0	99.0	93.5	99.6
		B	5.0	16.3	77.0	8.4

表 2

		Sperm density ($\times 10^5/\text{ml}$)	Motility (%)	Morphology (%)	Collection rate (%)
Case 3	semen	82.0	83.4	90.2	
	30' 液化後 swim up	8.0	96.8	96.8	48.6
	90' 液化後 swim up	11.0	89.6	97.6	62.2
	150' 液化後 swim up	9.0	92.0	97.9	52.8
Case 7	semen	240.0	65.9	89.1	
	30' 液化後 swim up	18.3	96.9	96.5	48.6
	90' 液化後 swim up	25.3	93.8	98.1	66.1

表 3

Liquefaction	Sperm density ($\times 10^5/\text{ml}$)	Motility (%)	Morphology (%)	Collection rate (%)
0'	11.0	81.3	91.7	
swim up	0.1	95.0	90.0	10.4
speed	24.6, 25.9, 27.7, 29.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$		$\bar{m}=26.9 \mu\text{m}/\text{sec}$	
30'	27.0	81.3	88.5	
swim up	3.0	83.6	91.3	47.1
speed	48.1, 36.8, 38.2, 62.5, 39.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$		$\bar{m}=45.0 \mu\text{m}/\text{sec}$	
90'	17.0	80.5	93.2	
swim up	4.0	85.3	92.9	99.4(65.2)
speed	33.2, 37.1, 33.1, 37.7 $\mu\text{m}/\text{sec}$		$\bar{m}=35.2 \mu\text{m}/\text{sec}$	

理論的には100%を超える回収率はあり得ないが、今回の実験では上清の1/2を採取しており、全ての上清を厳密に回収した場合に比べて若干の差はあると思われる、計算上の産物と考えられる。

viscosityの高低に関しては、30分の液化の後、ピペットで吸引し、完全に液状となっているものを low、粘稠性が今だ残存しているものを high、更に一部にゲル状塊が存在しているものを very high とした。

B法で回収された精子は motility も悪く、良好精子の回収法としてはA法に劣っている。

A法に於ても、回収率の極端に悪いものは high viscosity の例であり、更に有効な swim up の条件を確立するため、液化時間と回収率の関係を調べてみた(表2)。

2例とも viscosity は very high の性質を有するものであるが、30分の液化に比べ、90分の液化時間をとった方が良好な回収率を示している。

また、液化時間とその時点での精液中の精子の状態の観察と回収率とを表3に示した。

射出直後の精液をA法で swim up させると、回収率は10.4%と極めて低く、high speed video で観察する

と、直線的な運動を示す精子は極めて少なく、尾部のみゆつくりと運動させているものが大部分で、その平均運動速度は26.9 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であつた。30分の液化では、同じ精液でも、運動精子が27.0 $\times 10^6/\text{ml}$ と増加して認められ、回収率も41.1%と急増、また直線運動を行う精子数も増加し、運動速度も45.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ と増加している。更に90分の液化では、精子活動に若干の低下を認めるものの、回収率は99.4%、30分液化させた精液を基準にしても、65.2%と良好な成績を示した。

考 案

精液中から、運動性が良く、奇形率の少ない良好精子を回収する事は、体外受精、人工授精に必要なのはもち論の事、受精現象解明の研究を行う上でも重要な事である。われわれは、従来より、磯島らの精液静置法を修正した方法を常用し、良好精子を回収してきた(A法)。ところが、この方法は正常もしくはそれに近い所見を示す精液に対しては70%前後の回収率を示すものの、oligospermia や、viscosity の高い精液に対しては swim up しないという事が指摘されたり、回収率が悪いという点が経験されていた。1984年に Leung らが、oligo-

spermia, asthenospermia の患者精液から良好精子を分離する方法を発表した。これは、冒頭にも述べたごとく、攪拌遠心を繰り返すもので、良好な成績を得たと報告されている。攪拌と遠心を利用する方法は、理論的には、精漿をほぼ完全に除去できる利点があるが、いずれにしても、swim up 法に比べて、臨床に応用する際には、手間と時間がかかりすぎる傾向がある。

今回、viscosity の高い精液に対して攪拌遠心法 (B 法) を試み、どの程度の効果があるのか検討を行ったが、swim up (A 法) に優る成績は得られなかった。B 法が A 法に劣る理由としては、① sperm suspension の粘度が非常に希薄であり、mBWW に注入する際に混和が起りやすい事、すなわち上清中に不良精子が入り込んでしまう、② 遠心後除去した上清中にも、良好精子が多数含まれている (Case 6 は A 法では良好な回収率を示した例であるが、B 法の上清中には $26 \times 10^6/\text{ml}$ もの精子が存在していた) 以上の 2 点が考えられる。①に対しては久保ら³⁾のシリンジ法で解決する事が可能と思われるが、今回行った B 法では、②の点で解決策がない。すなわち、今回のごとき一回のみの攪拌遠心では十分に精漿の分離ができないと考えられる。精漿の完全分離のためには、従来より発表されているごとく、数回の攪拌、遠心、洗浄を繰り返す事が必要の様であるが、それに費す時間と労力、また、遠心、洗浄等の人為的操作の繰り返しによる精子の loss と、細胞としての精子に対する影響についても考慮せねばならず、今後、より一層の検討が必要であろう。

さて viscosity の高い精液は、A 法でも回収率は十分でなく、現行の 20~30 分の液化がはたして十分なのかという問題がある。精液の液化、凝固は人間に特有の現象であり、射精後精液は 5 分以内に凝固し、ゲル状となつて精子を包み込み動けなくする。その後、液化が起こり、約 20 分後には精液は液状となり、精子は運動を開始すると言われている⁴⁾⁵⁾。不十分な液化は精子の運動障害につながると考えられる。そこで、現行の一律 30 分の液化時間に対して、90 分、150 分液化の場合の回収率を比較し、合わせて精液中の精子の状態をも比較観察してみた。結果にも示したごとく、30 分に比べて 90 分の液化では、回収率が上昇し、液化に伴って直線的な運動を示す精子数も増加し、スピードも速くなってくる。十分な液化が起こっていない状態では、先にも述べたごとく、精子の trap が起り、たとえ良好精子であつても、swim up できないと考えられる。

今回の実験では、viscosity の程度や液化の完了に関しては判断が主観的であり、今後、客観的なパラメーターを利用して、更に理想的な精子回収法を追求していき

い。

結 論

1. 精子回収法として、layering method, swim up 法と攪拌遠心法とを比較検討した。

13 例中 12 例 (92.3%) で、swim up 法が良好な回収率を示した。

攪拌遠心法は、運動率回収率共に低く、精子回収法としては swim up 法の方が有効である。

2. swim up 法でも回収率が不良の例は viscosity の高い症例であり、このような症例につき液化時間と回収率との関係を検討してみた。

30 分の液化時間に比べて 90 分液化させた方の回収率が良好であつた。

3. viscosity の高い症例について、液化時間と精子の性状を検討した。

液化の進行と共に、運動精子数の増加と運動速度の増加が認められ、swim up の回収率も 90 分の液化で良好な成績を示した。

4. viscosity の高い精液の場合、60 分~90 分前後の十分な液化が必要であり、その上で swim up 法を施行すれば、良好精子は十分に回収可能であると考えられる。

本論文の要旨は第 4 回日本受精着床学会・学術講演会で発表した。

文 献

- 1) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 斎藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行な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. 日不妊誌, 28: 101, 1983.
- 2) Leung, P. C. S., Hyne, R. V., Clarke, G. N. and Johnston, I.: A Technique for Enrichment of Motile Spermatozoa from Oligozoospermic and Asthenozoospermic Patients. Aust. N Z. J. Obstet. Gynaec., 24: 210, 1984.
- 3) 久保春海, 安部祐司, 林 鴻程, 片山 進, 島田美津江: 改良精液静置法による人工授精 (AIH) の成績について, 日不妊誌, 31: 425, 1986.
- 4) 島崎 淳, 片山 喬, 相川英男, 柳 重行: 精液の生化学, 代謝, 16: 471, 臨時増刊号「性」, 1979.
- 5) Tauber, P. F. and Zaneveld, L. J. D.: Coagulation and liquefaction of human semen: Human semen and fertility regulation in men. p153, Edited by Hafez, E. S. E. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1976.

The examination on the method for
collection of good spermatozoa
from semen sample

**Nobuhiro Yoshimatsu, Kazuhiko Hoshi,
Kaoru Yanagida, Tomiko Aita
and Akira Sato**

Department of Obstetrics and Gynecology
Fukushima Medical College,

We divided the method to collect a population of good spermatozoa from high viscosity semen sample, and investigated the usefulness of this method compared with "Layering method" (Swim up method).

Fresh ejaculates allowed to liquefy for 30 min, then mixed with same amount of medium, and centrifuged at 1500 rpm for 5min., 0.1 ml pellet was mixed and supplied to "Layering method".

But the collection rate of "New method" was not higher than that of "Swim up method".

In semen which had very high viscosity, we had low collection rate with both method, thus investigated the relationship of the time of liquefaction and collection rate.

We obtained higher collection rate in 90 min. liquefaction time than 30 min with "Swim up method".

From these data, we suggested that "Swim up method" was very useful to collect good spermatozoa, and with enough liquefaction (60-90 min.), we could obtain high collection rate even from high viscosity semen sample.

(受付：昭和61年10月11日)

DAILY URINARY ESTROGEN EXCRETION AS AN INDEX OF FOLLICLE GROWTH IN IVF AND ET

Satoru CHIDA, Shigeki UEHARA, Hiroshi HOSHIAI,
Takashi YOHKAICHIYA and Akira YAJIMA
Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University
School of Medicine, Sendai 980

Abstract: Daily urinary estrogen excretion was determined by means of a semiquantitative urinary estrogen determination reagent kit to investigate its relation to follicle growth in patients undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfer as well as those undergoing ovulation induction. The daily urinary estrogen excretion as determined by this method proved to be closely related to the serum estradiol level, and the pattern of its daily variation was similar to that of the serum estradiol level. Furthermore, the daily urinary estrogen excretion was in close correlation with follicle diameter, which was measured by ultrasonography. The findings suggest that daily urinary estrogen excretion as determined by use of this reagent kit is valuable as an index of follicle growth.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 468-473, 1987)

Introduction

It is well known that there is a relationship between estrogen and follicle growth. However, examination of the amount and properties of cervical mucus which are secondary phenomena caused by estrogen has been the primary method for monitoring follicle growth. After radioimmunoassay (RIA) to monitor the blood level of estrogen came into use in recent years, it has been to obtain more direct information about the follicle. For the determination of blood estradiol by RIA, however the use of the radioisotope is mandatory, and this is often a problem because it is stipulated, especially in Japan, that special areas must be assigned for RIA management. Another disadvantage of RIA is that it is very expensive when used for assaying a small number of samples. For these reasons, a new estrogen measuring method has been eagerly looked for to replace RIA. A semiquantitative urinary estrogen micrometry reagent kit based on hemagglutination inhibition reaction using anti-estriol antibody sensitized erythrocytes (Hi-Estrotec, Mochida Pharmaceutical Company, Ltd., Tokyo) has been recently

developed. Its clinical use in monitoring follicle growth as substitute method for RIA is evaluated in the present study, and the early ovulatory phases was studied using 24-hr urine samples.

Materials and Methods

1) Subjects

A total 43 patients undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF and ET) or ovulation induction in our department volunteered. All of them were medicated with clomiphene citrate (Clomid, Shionogi Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka) every day for 5 days, starting on the 5th day of their menstrual cycle, and 12 patients of them were further administered 150 IU of human menopausal gonadotropin (hMG, Pargonal, Teikoku Zoki Co. Ltd., Tokyo) every day, starting on the 10th day of their menstrual cycle.

2) Determination of daily urinary estrogen excretion

In the outpatient clinic the patients were instructed to collect urine samples from the second voiding in the morning to the first voiding the following day in every day, starting on the 7th day of their menstrual cycle.

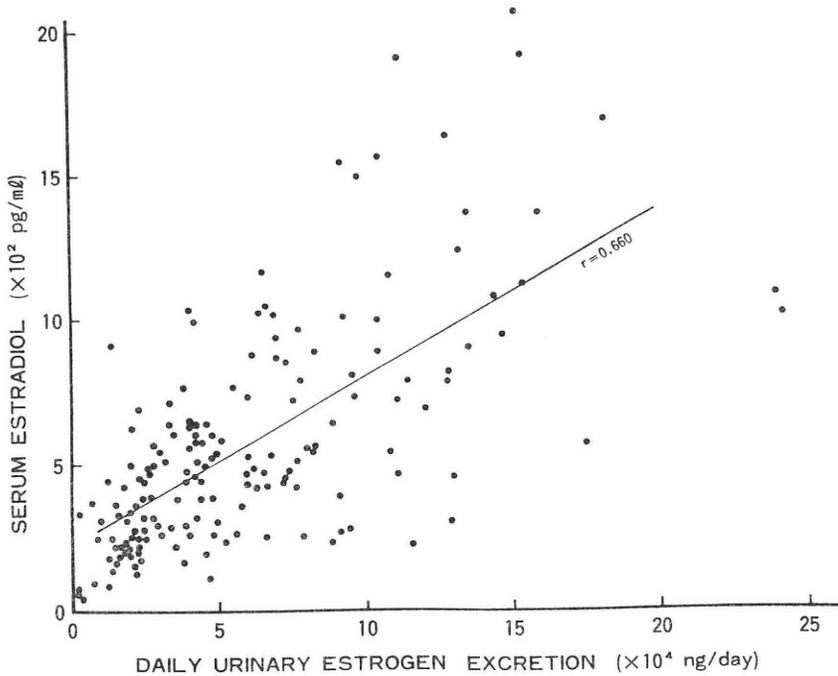


Fig. 1 Correlation between the daily urinary estrogen and the serum estradiol level. Correlation coefficient (r) is 0.660, representing a positive correlation ($P < 0.01$)

On the day when the maximum follicular diameter of the leading follicle measured with ultrasonography exceeded 18 mm, the patients undergoing IVF and ET were hospitalized. After then, the 24-hr urine collection was begun at 7 a. m. and the total urine was measured for estrogen concentration, which was multiplied by the urine volume to calculate the daily urinary estrogen excretion.

The principle and method for the determination of urinary estrogen concentration are described in a previous report⁶⁾.

3) Determination of urinary LH (luteinizing hormone) excretion rate

To detect the onset of LH surge, patients undergoing IVF and ET were instructed to collect urine every 4 hrs after their hospitalization. A part of each urine samples was examined for determination of LH, and the remaining portions were combined for use as the 24-hr urine. Hi-Gonavis was used for the determination of LH. And when the hourly excretion was 3 IU/hr or higher, and continued to increase, 2 hrs before the time when the hourly LH excretion reached 3 IU/hr or higher was taken as the time of onset

of LH surge.

4) Determination of serum estradiol

Blood samples were obtained from all 43 patients every morning. The serum estradiol was determined by use of a kit using the direct determination method (Estradiol I-125 kit, Midori Juji Co. Ltd., Tokyo). The results were then compared with the daily urinary estrogen excretion in the urine collected in the period from the morning when the serum estradiol level was determined to the following morning. The cross reactivity of this RIA kit was 1 % or less for all steroids except estradiol.

5) Measurement of follicular diameter by ultrasonography

The ultrasonograph model RT 3000 (Yokokawa Medical Co. Ltd, Tokyo) was employed to count the follicles and measure the maximum diameter of each follicle every day on all patients. Two parameters were examined for correlation with the daily urinary estrogen excretion and the serum estradiol level which are the maximum follicular diameter (MxFD) of the leading follicle and the total of the maximum diameters of all follicles

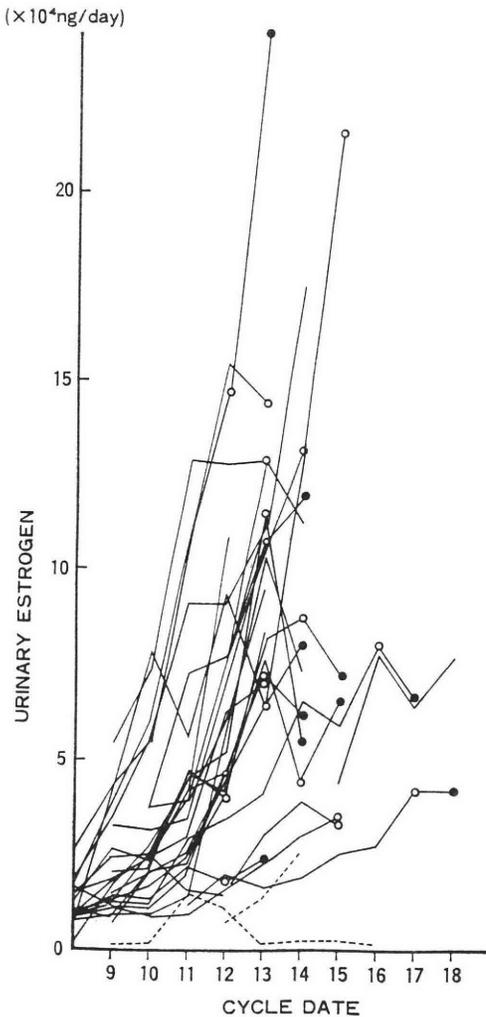


Fig. 2 Patterns of the daily urinary estrogen excretion in each patient medicated with clomiphene. Closed circles (●) present values of the day of LH surge onset. Open circles (○) present values of the day before LH surge onset day. Dotted lines (···) show patterns of the patients diagnosed as insufficient follicle growth

measuring 1.0 cm or more in the maximum diameter (total of follicular diameters; TFD).

Results

1) Correlation of daily urinary estrogen excretion to the serum estradiol level

By the statistical analysis about 153 sets of samples obtained from 43 patients, it was revealed that there was a significant positive correlation ($P < 0.01$) between the daily urin-

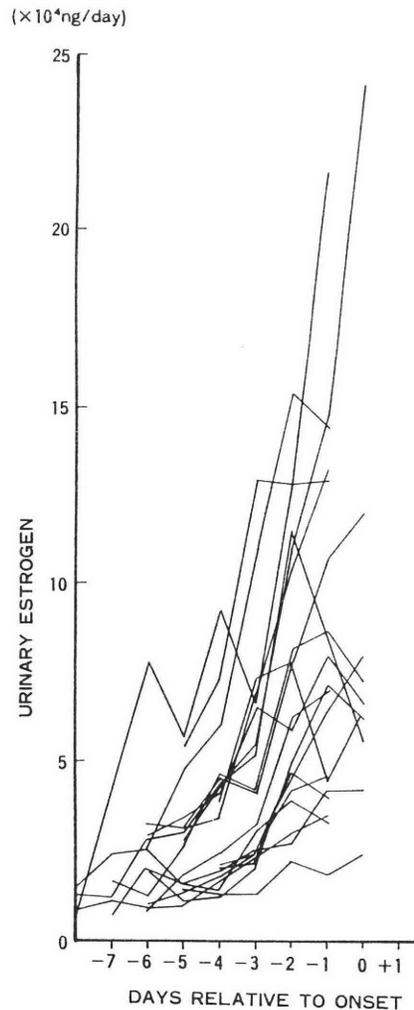


Fig. 3 Patterns of the daily urinary estrogen excretion from the day of onset of LH surge. The day of the LH surge is designated Day 0

ary estrogen excretion and the serum estradiol level, with a correlation coefficient of 0.660 (Fig. 1).

2) Daily changes in daily urinary estrogen excretion

In 29 out of 31 patients medicated with clomiphene alone, daily urinary estrogen excretions showed a value higher than that of the preceding day on each day from the first detection of estrogen in the urine. Patterns of 13 patients showed rapid increase ($> 5 \times 10^4$ ng/day) on the daily urinary estrogen excretion between 9th and 14th day of the menstrual cycle, and that of 16 patients showed

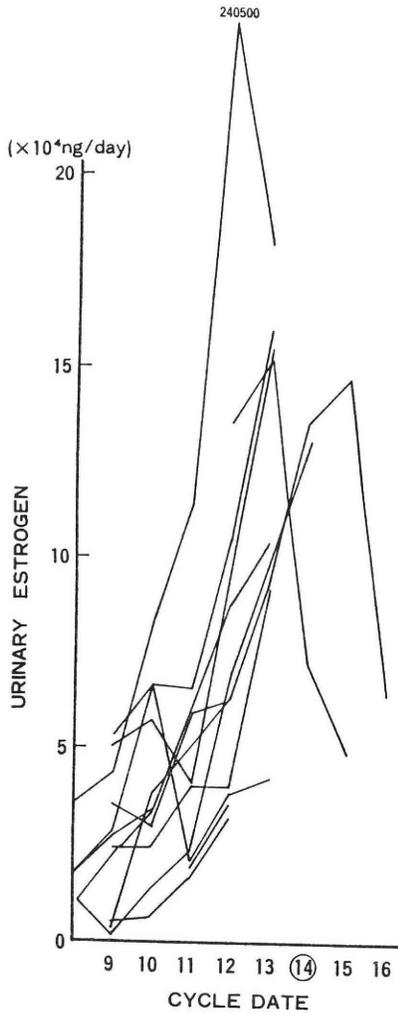


Fig. 4 Patterns of the daily estrogen excretion in each patient medicated with clomiphene and hMG. In the early morning of Day 14, all patients were administered 5000 IU of hCG (human chorionic gonadotropin)

gradually increases ($<5 \times 10^4$ ng/day) between 9th and 17th. In 5 patients of those groups, increasing rate of the urinary estrogen secretion showed fall down on the day of the onset or one to three days before. Both patterns were diagnosed as having sufficient follicle growth. In the other two patients the daily urinary estrogen levels remained low, then diagnosed as having insufficient follicle growth (Fig. 2).

Patterns of daily urinary estrogen excretions in a group diagnosed as having sufficient follicle growth were rearranged as a basis of

Table 1 Correlation coefficient between ultrasonographic parameters and estrogen values

	Daily urinary estrogen excretion	Serum estradiol level
Clomiphene group		
MxFD	0.416*(94)	0.437*(91)
TFD	0.443*(94)	0.393*(91)
Clomiphene+hMG group		
MxFD	0.494*(34)	0.467*(40)
TFD	0.653*(33)	0.544*(39)

MxFD, maximum follicular diameter of the leading follicle; TFD, total of follicular diameters.

(), number of pairs; * positive correlation ($P < 0.01$).

the day of onset of LH surge determined with urinary LH measurement (Fig. 3). The daily urinary estrogen excretion in most cases changed from a tendency to increase to a tendency to decrease as the onset of LH surge drew close. But those in several cases continued to increase till the onset of LH surge.

The pattern of daily changes in daily urinary estrogen excretion of 12 patients treated with clomiphene and hMG were showed in Fig. 4. In most cases (8 out of 12 patients) rapid increases in the excretion of estrogen from the 10th day of the menstrual cycle when the hMG administration was initiated. Furthermore, three cases showed rapid decreases in daily estrogen excretion after peak values between 12th and 15th of the menstrual cycle (Fig. 4).

3) Correlation of daily urinary estrogen excretion to follicular diameter

There was a significant positive correlation ($<P < 0.01$) between the daily urinary estrogen excretion and the MxFD measured by ultrasonography in the group medicated with clomiphene alone, with a correlation coefficient of 0.416 ($n=94$), and also in the group medicated with clomiphene and hMG, with a correlation coefficient of 0.494 ($n=34$). Furthermore, between the daily urinary estrogen excretion and TFD in each group, significant positive correlations ($P < 0.01$) were analyzed with correlation coefficient of 0.443 ($n=94$) and 0.653 ($n=33$), respectively. Likewise

significant positive correlations ($P < 0.01$) were between the serum estradiol level and Mx_{FD} or TFD in the group medicated with clomiphene alone as well as clomiphene and hMG, with a correlation coefficients 0.437 ($n=91$) or 0.393 ($n=91$), and 0.467 ($n=40$) or 0.544 ($n=39$), respectively (Table 1).

Discussion

Since Mishell et al.⁷⁾ and Shaaban and Klopper¹⁰⁾ reported the fact that the elevation of serum estrogen level with the growth of follicles and the decrease in the level of the ensuing preovulatory phase, many authors have reported similar findings. However, there can be seen only a few reports using the level of urinary estrogens or estrogen metabolite as an index of follicle growth of maturation measured by ultrasonography in relation to IVF and ET. Among the few reports, the use of the ratio of urinary estrogen-3-glucuronide and pregnanediol-3- α -glucuronide determined by RIA as an index of follicle maturation was investigated by Collins et al.⁴⁾ and Adlercreutz et al.²⁾, and also Adlercreutz, Lehtinen and Kairento¹⁾ investigated on the possibility of using urinary estradiol, estrone-3-glucuronide and estrone as indices of the prediction of the ovulatory phase. In comparative studies of urinary estrogen and serum estradiol levels, Black et al.³⁾ reported that the serum estradiol levels reflected the ovarian function more accurately, and that the preovulatory estrogen peak in the urine lagged by 1 day, compared with the serum estradiol level. Also, from the study by the determination of serum estrogen and urinary estradiol-17 β -glucuronide, Miyakawa et al.⁸⁾ described that the two parameters were intimately correlated, and that urinary estradiol-17 β -glucuronide did not remain stable and varied widely at the phase when serum estrogen indicated preovulatory follicle maturation. Considering these results, it might be felt that urinary parameters alone were incapable of predicting follicle maturation.

There are two probable reasons for the urinary estrogen level reflecting follicle maturation less accurately than the serum estrogen level. One of them is that the urinary parameters are liable to vary with water intake.

The effect of water intake is prominent when a random urine is used for a sample. The other is that the urinary estrogen is a result of excretion of serum metabolite estrogen. However, determining the estrogen excretion of the urinary estrogen concentration in the 24-hr total urine ought to minimize its effect.

The reagent kit used in the present study does not use isotope, and though it is intended to be a kit for semiquantitative determination that it has a sensitivity of 1 ng/ml making microassay for estrogen possible. It is also advantageous in that the results of assay by this method are available in about 2 hrs. Moreover the daily urinary estrogen excretion as determined by use of this reagent kit was closely correlated with the serum estradiol level, and showed a pattern close to the daily preovulatory changes in serum estradiol so far reported. Also, because two of the patients were found to have follicle growth insufficiency, it was possible to detect the growing ability of follicles and to predict the probable day of onset of LH surge by this method. In some of the patients medicated with clomiphene and hMG, the daily urinary estrogen excretion increased rapidly after the start of hMG administration, which suggested that the determination of daily urinary estrogen excretion by this method would contribute to the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome.

Many authors^{5,9,12)} have already reported that the blood level of estradiol is correlated with the follicular diameter determined by ultrasonography. From their findings that the number of follicles and follicular diameter are influential on the serum estrogen level, Smith et al.¹¹⁾ described that the ultrasonography would supplement endocrinological findings and be of value in determining the status of follicle maturation.

The findings in the present study that there was a correlation between the daily urinary estrogen excretion and Mx_{FD}, and also between the former and TFD, which was similar to the correlation between the serum estrogen level and both Mx_{FD} and TFD, has proved that the accuracy of this reagent kit is reliable enough and also suggests that the determination of daily urinary estrogen excretion can be used as an index of follicle

growth. However, if we use the daily urinary estrogen excretion alone as the index, it is obvious that we can obtain only a small amount of information about the ovulation time. At the present time, there is only one method to measure the LH level in urine or blood samples for the accurate prediction of natural ovulation. Therefore, it may be concluded that daily urinary estrogen excretion is useful for the recognition of follicle growth and the prediction of the onset of LH surge.

The use of early morning urine samples instead of 24-hr samples may also be considered⁶⁾, but the former result is obviously less accurate determination than the latter.

References

- 1) Adlercreutz, H., Lehtinen, T. and Kairento, A. L.: Prediction of ovulation by urinary estrogen assays. *J. Steroid Biochem.*, 12: 395, 1980.
- 2) Adlercreutz, H., Brown, J., Collins, W., Goebelsman, U., Kellie, A., Campbell, H., Spieder, J. and Braissand, G.: The measurement of urinary steroid glucuronide as indices of the fertile period in women. *J. Steroid Biochem.*, 17: 695, 1982.
- 3) Black, W. P., Coutta, J. R. T., Dodson, K. S. and Rao, L. G. S.: An assessment of urinary and plasma steroid estimation for monitoring treatment of anovulation with gonadotropins. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Comm.*, 81: 667, 1974.
- 4) Collins, W. P., Collins, P. O., Kilpatrick, M. J., Manning, P. A., Pike, J. M. and Tyler, J. P. P.: The concentrations of urinary oestrogen-3-glucuronide, LH and pregnanediol-3 α -glucuronide as indices of ovarian function. *Acta Endocrinol.*, 90: 336, 1979.
- 5) Häckeloer, B. J., Fleming, R., Robinson, H. P., Adam, A. H. and Coutts, J. R. T.: Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135: 122, 1979.
- 6) Hoshiai, H., Uehara, S., Tsuiki, A., Hirose, Y., Momma, T. and Suzuki, M.: Measurement of urinary estrogen level with the urinary estrogen micrometry method in *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 24: 204, 1984.
- 7) Mishell, D. R., Nakamura, R. M., Crosig-

- nani, P. G., Stone, S., Kharma, K., Nagata, Y. and Thorneycroft, I. H.: Serum gonadotropin and steroid pattern during the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 111: 60, 1971.
- 8) Miyakawa, I., Stanczyk, F. Z., March, C. M., March, A. D. and Goebelsman, U.: Urinary estradiol-17 β -glucuronide assay for gonadotropin therapy. *Obstet. Gynecol.*, 58: 142, 1981.
- 9) Robertson, R. D., Picker, R. H., Wilson, P. C. and Saunders, D. M.: Assessment of ovulation by ultrasound and plasma estradiol determination. *Obstet. Gynecol.*, 54: 686, 1979.
- 10) Shaaban, M. M. and Klopper, A.: Plasma oestradiol and progesterone concentration in the normal menstrual cycle. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Comm.*, 80: 776, 1973.
- 11) Smith, D. H., Picker, R. H., Sinosich, M. and Saunders, D. M.: Assessment of ovulation by ultrasound and estradiol levels during spontaneous and induced cycles. *Fertil. Steril.*, 33: 387, 1980.
- 12) Ylöstalo, P., Röneberg, L. and Juppila, P.: Measurement of the ovarian follicle by ultrasound in ovulation induction. *Fertil. Steril.*, 31: 651, 1979.

IVF-ET における 1 日尿中エストロジェン 排泄量と血中エストロジェンおよび 卵胞発育について

東北大学医学部産科学婦人科学教室

千田 智, 八日市谷隆, 上原 茂樹,

星合 昊, 矢嶋 聡

体外受精・胚移植における排卵誘発群 (クロミッド単独群, クロミッド+hMG 群) 43 例において 1 日尿中エストロジェン排泄量と血中エストロジオール濃度, および卵胞発育について検討した. 尿中エストロジェン測定にはハイエストロテック (持田) を使用, 血中エストロジオール測定には RIA キット 卵胞発育は超音波断層装置にて主席卵胞最大径および各々直径 1 cm 以上の卵胞径最大径の総計を用いた. 1 日尿中エストロジェン排泄量は両群の血中エストロジオール値と有意に相関し ($r=0.660$, $p<0.01$), さらに両者はクロミッド群, クロミッド+hMG 群, の両群において, とともに主席卵胞最大径と卵胞直径総計と有意な相関を示した ($p<0.01$). また尿中エストロジェン排泄量より, LH サージの onset の予測が可能であり, さらに卵胞発育成熟のスクリーニングにも使用できることが示唆された.

(受付: 昭和62年1月8日特別掲載)

乏精子症・精子無力症に対する GIFT の有用性 および男性不妊症に対する治療法

Usefulness of GIFT for oligozoospermia, asthenozoospermia
and treatment of male infertility

福井赤十字病院産婦人科

西 修 塩谷 雅英 本多 秀明
Osamu NISHI Masahide SHIOTANI Hideaki HONDA
宮崎 好一 佐々木 太郎 山田 良
Koichi MIYAZAKI Taro SASAKI Makoto YAMADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukui Red Cross Hospital, Fukui

乏精子症患者、精子無力症患者22名に対して GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer) を施行し、うち5名(22.7%)に妊娠の成立をみた。患者は高度の乏精子症、精子無力症であり、Ficoll または Percoll 法による AIH で妊娠しなかつた症例を対象とした。最近の報告でも、高度の乏精子症、精子無力症では妊娠率はせいぜい数%と低値である。IVF・ET (*In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer) に比して、より有益性があるかは議論の余地はあるが、現時点では今回報告する結果に十分満足している。また男性不妊症の治療法についても述べる。

(Jap. Fert. Ster., 32(3), 474-480, 1987)

はじめに

配偶子卵管内移植 (Gamete Intrafallopian Transfer; GIFT) は、1984年テキサス大の Asch ら¹⁾により原因不明の不妊症 (unexplained infertility) の治療法として開発された方法であり、広い意味での受精障害に対する治療法である。

1978年世界初の体外受精児²⁾が誕生して以来、体外受精・胚移植 (*In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer; IVF・ET) は、不妊症の治療法として欠くべからざる方法として普及・確立された。

そこで、GIFT と IVF・ET の適応をはつきり決めようとする動きがみられる。

今回われわれは、男性不妊症に対する GIFT の有効性を述べるとともに、男性不妊症に対する治療法について検討してみた。

1. 男性不妊症について³⁾

WHO の精液検査の統一基準⁴⁾において、妊孕男子の下限値は精子数 $2,000 \times 10^4/\text{ml}$ 、運動率60%を提唱しているが、もちろんこれ以下でも妊娠せる症例も認められている。本邦では男性不妊症としては精子数 $4,000 \times 10^4/\text{ml}$ 以下との基準が多く採用されている。実際、これら

の不妊症患者に AIH を施行し、妊娠率を調べると2%に満たないと言う⁵⁾。

1) 薬物療法

Ross⁶⁾によれば、乏精子症に対する唯一の有効な治療法はゴナドトロピンによる刺激であり、カルナクリン等は *in vitro* で精子運動率を上昇させるといわれるが、有効性を疑問視する者もいる。

最近われわれは、副性器感染が不妊の原因とみられる患者にピリドンカルボン酸系化学療法剤を投与し、感染治療後すぐ妊娠した症例を経験したのでその概略を報告する。患者は年齢28歳の主婦であり、昭和57年に結婚、その後不妊を主訴として他医受診、機能性不妊の診断のもとに AIH 等を施行されていた。昭和61年2月当科受診、不妊の系統的検査に異常はなかつた。夫の精液検査は Volume 2.0ml Count $9,000 \times 10^4/\text{ml}$, Motility 80%, 奇形率10%であつたが、精液培養にて感染を認めた。表1のごとく、各種化学療法剤を投与するも細菌数は減少しなかつた。そこで、男性副性器感染性に高い治療効果^{7,8)}を示すといわれるピリドンカルボン酸系化学療法剤を投与したところ、直ちに精液中の細菌は陰性化し、それと同時に患者は妊娠した、その臨床経過を BBT とともに図1に示す。

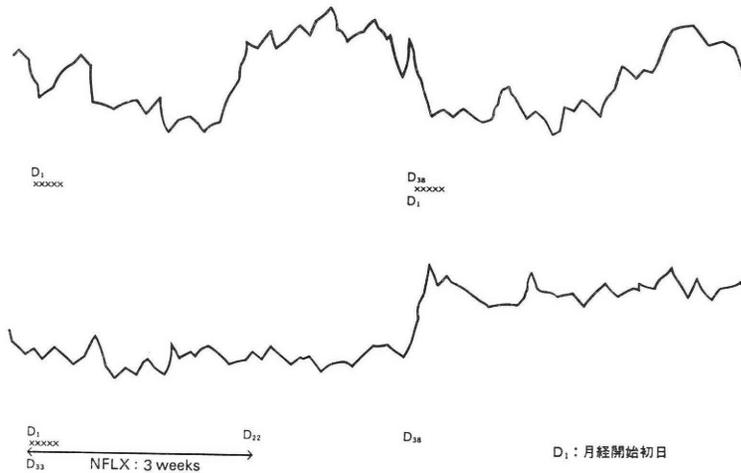


図 1 患者の基礎体温表と妊娠直前の化学療法剤内服時期

表 1 夫精液より検出された細菌の種類および使用した化学療法剤

	61.3.24	61.4.28	61.6.16	61.7.16	61.9.2
Sta. epidermidis	10 ⁵ ~10 ⁶ ^{a)}	10 ⁵ ~10 ⁶	10 ⁵ ~10 ⁶	10 ⁵ ~10 ⁶	(-)
Str. viridans	10 ⁴	10 ⁵ ~10 ⁶	10 ⁵ ~10 ⁶	10 ⁵ ~10 ⁶	(-)
Str. anhemolyticus	(-)	10 ⁴	10 ⁴	(-)	(-)
Sta. aureus	(-)	(-)	(-)	10 ⁴	(-)
		↑ MINO	↑ ST	↑ AB-PC	↑ NFLX

a) 個/ml

前立腺炎，尿道炎，精のう炎などの副性器感染が不妊の原因となることは以前から知られており，不妊症患者の中にこれらが高頻度にみられたという報告もある。われわれは不妊を主訴として来院した患者の夫全員にルーチン検査として精液培養を行なっている。特に乏精子症患者，精子無力症患者ではその頻度は高く，80%にも達している。感染を除去しただけで，正常性行為にて妊娠せる症例もかなりある。感染がどの様に作用しているかは不明の点が多いが，精漿の PH の変化や菌体外毒素が精子運動率を低下させる事が知られており，これらの原因で精子の受精能が低下したと考えられる。このことは今後の検索を要すると思われる。

2) 手術療法

精索静脈溜は治療しうる不妊の原因として最も頻度が高い。

2. GIFT について

1) 適応および症例

乏精子症，精子無力症を対象として，排卵期のモンタリング下に Percoll または Ficoll にて精子濃縮洗浄後

表 2 夫精液所見

	Volume (ml)	Motility (%)	Count (×10 ⁴ /ml)	奇形率 (%)
1 A I	5.5	10	3400	10
2 T U	3.5	60~70	100	10~20
3 K K	5.0	60~70	500	10
4 H K	1.0	50	1000	20
5 R S	3.0	10↓	9000	30~40
6 K N	5.0	10	900	10↓
7 S Y	3.0	60~70	1600	10↓
8 T S	2.2	30~40	150	10
9 K U	4.6	40~50	1400	30
10 K N	4.0	80~90	3100	10↓
11 C I	1.0	20~30	2900	10~20
12 E T	4.0	10	2200	10~20
13 S N	5.0	30~40	110	20
14 T I	3.0	80	2000	20
15 K M	4.5	20~30	700	10~20
16 K H	1.0	20	500	30~40
17 A S	2.0	30~40	1240	10↓
18 J M	2.8	60~70	30	20~30
19 S Y	6.0	10~20	300	10
20 H M	3.0	40~50	1800	30~40
21 C U	2.5	10	2600	10
22 E H	2.5	60	500	10~20

swim up させた良好精子を用いて AIH を 3~5 回施行後も妊娠にいたらなかった症例のうち，運動精子数 1,000×10⁴/ml 以下の症例およびそれ以上でも夫婦が希望するものを対象とした。GIFT 施行にあたっては，不妊症としての系統的検索を行い，さらに，HSG にて少なくとも 1 側の卵管の通過性が確認されたものだけに実施した (表 2，表 3)。

2) 卵巣刺激の方法および卵の分類

基本的に IVF・ET の場合と同様⁹⁾ である。Clomiph-

表 3 対象患者の卵子の状況, E₂ 値および妊娠成功, LH Surge の有無

	Reovered egg		Transferred egg		E ₂ ^{a)} level	Comment
	r-	l-	r-	l-		
1 AI	4,2	4	4,2	4	1280	LH surge (+)
2 TU	4,4,4,3,2	4,2	4,4,3	4,4	2180	
3 KK	4,3,3	4,4,3	4,3	4,4	1450	
4 HK	3,2,2	4,4	3,2	4,4	1850	
5 RS	4,2,2,1	3,2	4,2	3,2	1120	
6 KN	4,3,3	4,4,3	4,3	4,4	1690	Case 1 Pregnancy
7 SY	4	4,3	4	4,3	1290	
8 TS	4,2	4,4,4	4,4	4,4	1440	Pregnancy → early abortion
9 KU	4,3	(-) ^{b)}	4,3	(-) ^{c)}	1830	
10 KN	4	4	4	4	1510	LH surge (+)
11 CI	4,3	(-) ^{b)}	4	3	1070	
12 ET	4,4,2	3	4,2	4,3	1200	
13 SN	3	(-) ^{b)}	3	(-)	1150	
14 TI	(-) ^{b)}	4,4,3,2	4,3	4,2	1860	
15 KM	4,4,4,3	3,3	(-) ^{c)}	4,4,4	1950	Pregnancy(TWIN)
16 KH	4,3	3,3	4,3	3,3	1600	
17 AS	4,3,3	4,3	4,3	4,3	1910	
18 JM	4,4,4,3	4,3	4,4,4	4,3	2370	Pregnancy
19 SY	4	4,4,3	4,4	4,3	1830	
20 HM	4,4	4,3,2	4,4,4	(-) ^{c)}	1960	
21 CU	2	4	(-) ^{c)}	4,2	1260	
22 EH	4,4,4,2	4,4	4,4,4	4,4	3560	Pregnancy(TWIN)

a) hCG 投与時の E₂ 値 b) 採卵できず c) 卵管閉鎖又は卵管切除后

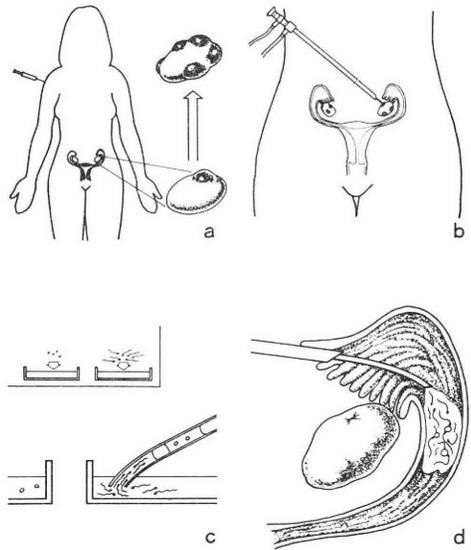


図 2 GIFT 模式図 (Asch 文献より引用)

表 4 卵子の分類

1. germinal vesicle
2. thick cumulus and corona
3. partially dispersed cumulus and corona
4. ｲ) well-dispersed cumulus and corona
 ㍀) moderate-dispersed cumula and radiating corona
 ㍁) presence of polar body

ene citrate (CC), human menopausal gonadotropin (hMG), human chorionic gonadotropin (hCG) を用いて排卵を control し, LH surge を待たずに行なうのを原則とした (時に LH surge を認めた). CC は月経周期 3 ~ 6 日目より 50 ~ 150 mg を 5 日間服用させ, hMG は CC 投与最終日より 75 ~ 300iu にて開始, 超音波断層法にて主席卵胞の直径が 18mm になり, 血中 E₂ 値が 1 卵胞あたり 300pg/ml を超える時点まで行つた. 最終 hMG 投与後, 30 ~ 60 時間後に hCG を投与, hCG 投与後 30 ~ 50 時間後に採卵を行なつた (LH surge 陽性例には, その onset より 24 ~ 30 時間後に採卵を行なつた).

採卵した卵子は, 表 4 のごとく, Grade 1 ~ 4¹⁰⁾ に分類した.

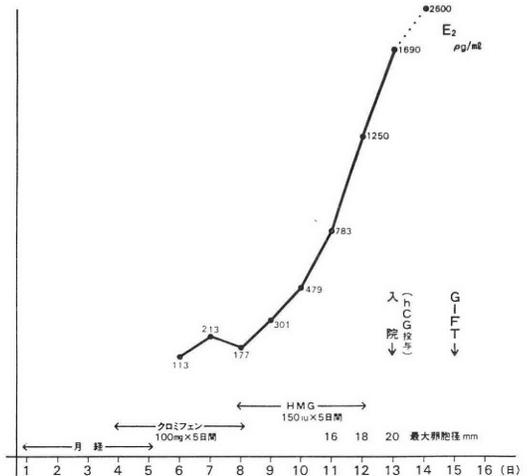


図 3 症例 1 の外来でのモニタリング状況

3) 精子の調整および swim up

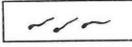
精液は採卵約 2.5 時間前に採取し, 37°C にて 30 分間静置, 液化をはかった. 精液と modified Ham's F 10⁰⁾ を 1 : 3 に混合し, 200g にて 10 分間遠心分離を行ない, 上清液を除き 1 ml の培養液 (modified Ham's F 10 + 10% inactivated HCS) を混じ約 45 分間静置, Swim up 計った. 最終運動精子濃度を 10 × 10⁴ / 25 μl としたが, これに至らない症例もしばしば認めた.

4) 卵管内移植

アトム社製 5 Fr, 長さ 40cm の栄養カテーテルに 1 ml の注射器を接続し, 1 ~ 3 個の卵子を含む Transfer me-

表 5 症例 1 の GIFT 時所見

午前 10 時 18 分開始			
	Egg Number		Comment
右 1	2 ml	1	a bit immature
右 2	5.5 ml	2	mature
		3	a bit immature
左 1	6 ml	4	mature
左 2	6.5 ml	5	mature
		6	a bit immature

DESERET INTRACATH	
25 μ l	25 μ l
	
50,000 sperm	2 egg
HAM F-10	HAMF-10
with 10% HCS	with 50% HCS

Number 2, 3	右卵管へ	GIFT
Number 4, 5	左卵管へ	GIFT

表 6 症例 1 の卵胞液の成分表

	r-1	r-2,3	l-1	l-2,3
α_1 -antitrypsin MG/DL	253	252	222	275
T.P. G/DL	6.3	5.9	5.5	5.9
A/G 比	2.1	2.2	2.3	2.2
albumin %	67.8	69.0	70.1	68.4
α_1 -globulin %	1.7	1.6	1.1	2.6
α_2 -globulin %	6.0	5.6	4.9	5.1
β -globulin %	8.2	7.7	8.1	7.7
γ -globulin %	16.3	16.1	15.7	16.2
transferrin MG/DL	(-)	260	246	269

dia (modified Ham's F 10+50%inactivated HCS) を 25 μ l, つづいて 25 μ l の精子浮遊液をカテーテル内に吸入する。腹腔鏡下で卵管采より約 1.5~2.0cm までカテーテルを挿入し、ゆつくりと配偶子を卵管内に浮入する (図 2¹¹⁾)。

症 例 1

患者は 36 歳の主婦で、不妊に対する系統的検査には特徴を認めなかった。昭和 57 年結婚、その後まもなく夫は急性耳下腺炎に罹患。その後の精液検査で乏精子症、精子無力症と診断された。夫の精液所見は、Volume 3.0 ml, Count 800~900 $\times 10^4$ /ml, Motility 10%前後、奇形率 10%で、3 回の濃縮精子洗浄浮遊液を用いての AIH を行なうも妊娠を認めなかった。外来でのモニタリングを図 3 に、GIFT 時の所見を表 5 に、その際の卵胞液の成分表を表 6 に、GIFT 後の臨床経過を図 4 に示す。

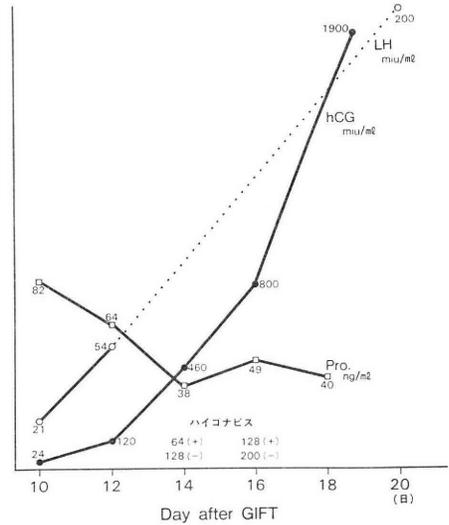


図 4 症例 1 の GIFT 後の hCG 値, LH 値, 黄体ホルモン (Pro.) 値

考 察

不妊症は、1) 排卵障害、2) 卵管障害、3) 男性因子、4) その他と大別できる。1) に関しては CC, hMG, LH-RH, Bromocriptine 等の各種薬物療法で、2) に関しては高度のものは IVF・ET で、3) に関しては夫に対する各種の薬物療法が試みられているが、その効果は期待どおりではない。また Ficoll および Percoll を使用する精子濃縮洗浄法による AIH にも限界があり、AIH 自体も精子を子宮腔内に浮入するだけで、精子が卵子に到達するまでには多くの障害があり、したがって受精の場である卵管膨大部まで到達するか否かは疑しい。

R. Edwards と P. Steptoe によれば、AIH の成功率は 10~25% であるが、長年の不妊歴を有する乏精子症患者での AIH の成功は 2% に満たないという。

男性不妊に関しては、Trousnon¹²⁾ によれば、精子運動率 30% 以上、運動精子が形態的に正常かつ前進運動を示せば 500 $\times 10^4$ /ml でも IVF・ET は可能であると報告している。また P. Steptoe¹³⁾ は精子運動率 50% 以下では IVF・ET による成功率は極めて低いと述べている。

世界初の体外受精児が誕生して以来、IVF・ET は不妊症において欠くべからざる治療法として普及し確立された。しかしながら、IVF・ET は世界の特定の施設におけるその妊娠率は 20~30%¹⁴⁻¹⁶⁾ であるが、日本では 5~10% とかなり差がある。だが GIFT は IVF・ET の約 2 倍の妊娠率があると言う。GIFT では受精の場である卵管膨大部に直接精子・卵子を注入し、*in vitro* より

も条件の整った *in vivo* にて発育をとげるため、卵自身に妊孕性があれば、当然妊娠率も IVF・ET に比して上昇するし、また精子数も少なくとも妊娠可能である。このような現状から乏精子症・精子無力症に対する治療法の討論が早急になされねばならない。

井上ら¹⁷⁾によると、GIFT は基本的には受精障害に対する治療法であり、排卵直前の卵子を採取し、Capacitation した精子を加えて卵管膨大部注入する事により、1)卵の排出障害、Luteinized unruptured follicle syndrome (LUFS) と Ovum reten¹⁸⁾、2)卵の Pick-up 障害、3)精子の卵管内輸送障害を解決し、受精に必要な要件を整えてやろうとする試みであるが、精子を培養液中で capacitation させる通常の方法では、正常精子についても受精率に大きな差が有り、false negative も少なくない。このため男性不妊に対してはあまり有効でないと言われている。また卵管采による卵子の pick-up 障害は、卵管・卵巣周囲癒着、卵管采周囲癒着によるものが多い。卵管形成術により疎通性は回復したが、妊娠に至らない症例もかなり多い。河上ら¹⁹⁾によるマイクロサージェリーの結果でも、卵管溜水腫の II 型および卵管周囲癒着では術後の妊娠率はともに 0% で、手術以外の方法を推奨している。これらの症例より、卵子の pick-up 障害が妊娠成立阻害に大きく関り、卵管溜水腫では卵管采を元に再建する事が難しく、卵管上皮そのものが萎縮変形し、卵管機能は有していないので疎通性は回復するものの妊娠成立には至らないと思われる。

IVF・ET においては、Trounson ら²⁰⁾によつて示唆された授精操作に先立つ卵の前培養の必要性は、受精率の向上、以後の卵割率および妊娠率にも好結果をもたらす事が明らかになった。この前培養の必要性は単に回収された成熟卵についてのみ必要なだけでなく、発表されている成績の中での卵子の成熟度をみれば明らかで、Norfolk グループ²¹⁾によつても、immature な卵が mature な卵と共に controled cycle より回収されており、これら immature な卵の取り扱いが問題になる。われわれは No. 22 の症例において得られた Grade 2 の卵子を 24 時間に亘り前培養する事により、受精後 28 時間にて 2 細胞期の正常胚に、受精後 184 時間にて blastocyst に発育した症例を経験したのでその写真 1、2 を示す。

田中ら²²⁾によれば、前培養を行なう事により GIFT による妊娠率が向上したとの報告が有るが、この方法では腹腔鏡を 2 度も行なわねばならず、麻酔時間の延長を余義なくされるので極めて困難と思える。刺激方法や採卵時間を再検討し、完全に成熟した卵子を採取できれば、かならずしも前培養は必要ないように思える。多数の卵が回収できる場合には、回収できた卵が同程度の

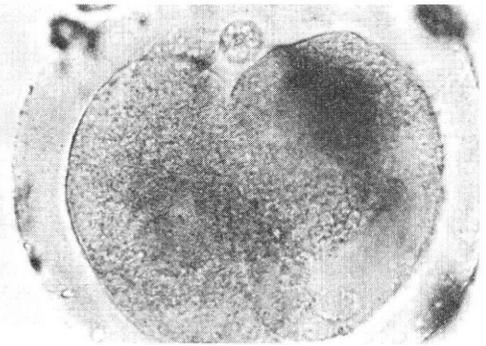


写真 1 受精後 28 時間の時点で得られた normal 2-cell embryo

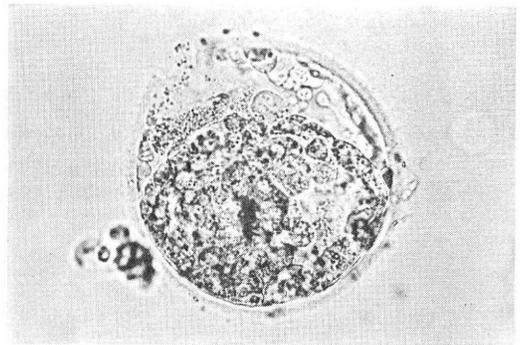


写真 2 受精後 184 時間の時点で得られた normal blastocyst

Grade である事が望ましく、Norfolk グループでは特別な刺激方法^{23,24)}を行なっている。事実諸外国では、前培養なくして高い妊娠率を示している施設も多い。

今回われわれは、22 例の男性不妊症に対して GIFT を試み、うち 5 例 (22.7%) に妊娠の成立をみた。Unexplained factor に対する GIFT の妊娠率は、イタリアの Palermo²⁵⁾のごとく、7/25 (25.9%) と高い妊娠率を示す施設もかなりある。しかしながら、男性不妊に關しての当科の 22.7% の妊娠率は、国内および諸外国のそれに比して決して劣るものではないと考える。

おわりに

今回われわれは、男性不妊に対して GIFT を施行し、妊娠に成功した症例を中心にその有益性を示唆した。GIFT が IVF・ET に比して男性不妊に対する妊娠率が高いか否かは、1987 年 4 月にアメリカで開催される世界体外受精学会まで待たねばならないが、現時点では十分に満足できると思われる。しかしながら、簡易である簡便であるとして IVF・ET の確立をみないままに GIFT を試みる事は慎まねばならないという慎重論を唱える学者も少なくない。

今後は、複数の卵を同時に成熟させるような刺激方法の開発と同時に、男性不妊としての副性器感染に関する研究を推めていく事を課題としたい。

文 献

- 1) Asch, R. H., Ellsworth, L. R., Balmaceda, J. P. and Wong, P. C.: Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet*, 2: 1034, 1984.
- 2) Steptoe, P. C. and Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of human embryo. *Lancet*, 8: 336, 1978.
- 3) 伊藤晴夫, 島崎 淳: 男性不妊症とその治療, 産婦人治療, 50: 60, 1985.
- 4) 岩崎 皓, 穂坂正彦, 木下裕三, 西村隆一: 特発性男子不妊症の精液検査の基本的評価と Adenosine Triphosphate 2Na 療法の有効性について, 日不妊誌, 30: 163, 1985.
- 5) 野田洋一: Personal communication.
- 6) Ross, L. S.: Diagnosis and treatment of infertile men, a clinical perspective. *J. Urol.*, 130: 847, 1983.
- 7) 熊沢浄一: 男性副性器感染症における CPFx の治療効果, *Convention Insights on Chemotherapy*, 10: 1, 1986.
- 8) 桜木 勉: 化学療法剤の前立腺組織ならびに精液内移行に関する研究, 日泌尿会誌, 70: 403, 1979.
- 9) 西 修, 栃木一男, 斉藤友治, 宮崎好一, 佐々木太郎, 山田 良, 富永敏朗: 体外受精・胚移植により妊娠・分娩に成功した1例, 産婦治療, 53: 719, 1986.
- 10) Asch, R. H., Ellsworth, L. R., Balmaceda, J. P. and Wong, P. C.: Preliminary experience with gamete intrafallopian transfer, *Fertil and Steril.*, : 45 : 366, 1986.
- 11) Asch, R. H., Ellsworth, L. R., Balmaceda, J. P. and Wong, P. C.: Gamete intrafallopian transfer, *Int. J. Fertil.* 30: 41, 1985.
- 12) Trounson, A. O. and Wood, C.: Extracorporeal Fertilization and Embryo Transfer. : *Clin. Obstet. Gynaecol.*, 8: 681, 1981.
- 13) Steptoe, P. C.: Personal communication.
- 14) Edwards, R. G., Fishel, S. B., Cohen, J., Fehilly, C. D., Purdy, J. M., Slater, J. M. Speptoe, P. C. and Webster, J. M.: Factors influencing the success of *in vitro* fertilization for alleviating human infertility. *J. IVF and ET*, 1: 3, 1984.
- 15) Garcia, J., Acosta, A., Andrews, M. C., Jones, G. S., Jones, H. W. Jr., Mantzavinos, T., Mayer, J., McDowell, J., Sandow, B., Vaeck L., Whibley, T., Wilkers, C. and Wright, G. Jr.: *In vitro* fertilization in Norfolk, Virginia, 1980~1983. *J. IVF and ET*, 1: 24, 1984.
- 16) Lopata, A.: Concepts in human *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil. and Steril.*, 40: 289, 1983.
- 17) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 松山毅彦, 宮川和子, 藤井明和: 配偶子卵管内移植の実際, 産婦の世界, 38: 721, 1986.
- 18) Craft, I. C., Shelton, K., Yovich, J. and Smith, D.: Ovum retention in the human. *Fertil. and Steril.*, 34: 537, 1980.
- 19) 河上征治, 森定 優, 永田哲郎, 末光博雄, 橋本 透, 飯塚理八: 不妊症領域におけるマイクロサージェリー, 産婦の世界, 35: 247, 1983.
- 20) Trounson, A. O., Mohr, L. R., Wood, C. and Leeton, J. F.: Effect of delayed insemination on *in vitro* fertilization, culture and transfer of human embryos. *J. Reprol. Fertil.*, 64: 285, 1982.
- 21) Jones, H. W., Jones, G. S., Andrews, M. C., Acosta, A. A., Burden, C., Garcia, J. E., Sandow, B. A., Veeck, L. L., Wilkes, C., Witmyer, J., Worthaun, J. W. and Wright, J. L.: The program for *in vitro* fertilization at Norfolk. *Fertil. and Steril.*, 38: 14, 1982.
- 22) 田中 温, 戸枝通保, 長沢 敢, 山本 勉, 中潟直己: 配偶子卵管内移植の開発とその検討, 産婦の世界, 38: 727, 1986.
- 23) 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. and Steril.*, 43: 373, 1985.
- 24) Jones G. S., Acosta, A. A., Garcia, J. E., Bernardus, R. E. and Rosenwaks, Z.: The effect of follicle-stimulating hormone with out additional luteinizing hormone on follicular stimulation and oocyte development in normal ovulatory women. *Fertil. and steril.*, 43: 696, 1985.
- 25) Guastella, G., Comparetto, G., Palermo, R., Cefalu, E., Ciriminna, R. and Cittadini, E.: Gamete intrafallopian transfer in the treatment of infertility. *Fertil. and steril.*, 46: 417, 1986.

Usefulness of GIFT for Oligozoospermia
Asthenozoospermia and Treatment
of Male Infertility

**Osamu Nishi, Masahide Shiotani, Hideaki
Honda, Koichi Miyazaki, Taro Sasaki
and Makoto Yamada.**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukui Red Cross Hospital, Fukui.

We tried the GIFT (Gamete Intrafallopian
Transfer) for 22 sterile women due to the male

infertility and got 5 pregnancies. It's percentage
of the pregnancy is 22.7%.

AIH was performed to all couples using by
Ficoll or Percoll method, but any women didn't
get pregnancy.

In the recently reports, the pregnancy rate of
the severe oligozoospermia or asthenozoospermia
is very low.

But, It is doubtful whether the GIFT is supe-
rior to the IVF·ET (*In Vitro* Fertilization and
Embryo transfer) or not. At present, we are
satisfied our result. We will mention about the
treatment of male infertility.

(受付：昭和62年1月12日，特別掲載)

子宮卵管造影施行例における腹腔鏡所見の検討

Studies on Laparoscopic Findings in the Infertile Patients
Who Received Hysterosalpingography

東京大学医学部産科婦人科学教室

五味淵 秀人 北川 浩明 武谷 雄二
Hideto GOMIBUCHI Hiroaki KITAGAWA Yuji TAKETANI

佐藤 孝道 水野 正彦
Kodo SATO Masahiko MIZUNO

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

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、近年腹腔鏡が行われるにつれ、その診断可能な領域の検討が必要と考えられる。そこで、当科にて HSG、腹腔鏡を施行した55例を対象として検討を行った。HSG では9例に子宮内腔の変形を、37例に卵管およ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84%であった。子宮内腔の変形、峡部閉塞、卵管水腫と診断した26例は全例一致したが、間質部閉塞の3例は腹腔鏡では疎通性が認められた。卵管の屈曲や延長など走行異常所見のみで卵管周囲癒着と診断した症例では50%に癒着が認められただけであった。また、HSG で正常と診断した症例の22%に卵管周囲癒着があった。以上より、HSG は子宮卵管内腔の異常に関する正診率は高いが、これらに変形をきたさない程度の腹腔内癒着の診断は難しく、適切な時期での腹腔鏡検査が必要と考えられた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 481-485, 1987)

はじめに

子宮卵管造影は不妊症領域において重要な診断的意義をもつが、近年腹腔鏡が安全かつ比較的簡単に行われるようになるにつれ、腹腔鏡検査所見および腹腔鏡下での通色素検査の所見がともすれば重視される傾向がある。しかし、これらの検査方法はそれぞれ特徴をもつものであり、子宮卵管造影を一概に正診率の低い検査とは言えない。子宮卵管造影の診断可能な領域を再検討することが必要と考えられる。そこで、われわれは子宮卵管造影後に腹腔鏡検査を施行した症例を対象として、両検査における卵管の所見を中心に比較検討したので報告する。

対象および方法

当科不妊症外来を受診している患者のうちで、子宮卵管造影と腹腔鏡検査をともにうけた55例を対象とした。われわれは、子宮卵管造影を screening 検査としては施行しておらず、卵管通気検査にて異常を認めた症例、

卵管障害を疑わせる既往症がある症例、内分泌的治療を6箇月以上行っても妊娠に至らなかった症例などにその適応を限定して施行している。子宮卵管造影には描記式自動注入器を用いて透視下に水溶性造影剤を注入した。注入中の所見は透視モニターで観察するとともに VTR に録画した。X線撮影は原則として、子宮内腔充滿時、腹腔内流出時および注入15分後の前後像3枚であるが、随時、斜位や側方からの撮影を加えた。感染予防の目的で検査前の十分な腔消毒とともに前々日より6日間抗生剤(ケフラール、塩野義、1.0g/day)を内服させ、更に子宮卵管造影所見より卵管水腫や腹腔内癒着などが疑われた場合は抗生剤の点滴静注(シオマリン、塩野義、2.0g/100ml)を加えた。また疼痛緩和のため、あらかじめ鎮痛剤を服用させた。検査および読影は全例とも卵管不妊外来担当医が行い、とくに判定の難しい症例では担当医全員で読影を行った。腹腔鏡検査は子宮卵管造影にて異常所見のあった症例や原因不明の長期不妊症例などに限定して行っている。原則的には腹腔鏡検査施行前日

表 1 両側卵管間質部閉塞症例

	G-P	既往歴	腹腔鏡所見	疎通性
1	1-0	—	卵管周囲癒着・筋腫	—
2	1-0	虫垂切除	—	—
3	6-4	虫垂切除	—	—
4	3-0	—	卵管周囲癒着	—
5	5-0	虫垂切除・卵管切除	卵管周囲癒着・卵管水腫	—
6	3-0	付属器切除・外妊	卵管周囲癒着・卵管水腫	—
7	2-2	卵管結紮	—	—
8	0-0	結核	—	—
9	1-0	外妊	卵管周囲癒着	+

に入院し、全身麻酔をかけるため開腹術にほぼ準じた術前処置を施行している。Hasson 型 open laparoscope を臍部より挿入し、VTR で録画を行いながら、TV モニター下で観察を行った。同時に indigocarmine 液を用いて通色素検査を行い、卵管の疎通性を検索した。とくに子宮卵管造影では卵管疎通性が認められながら腹腔鏡下通色素検査で認められない症例では、注入用カテーテルを交換するなど、疎通性の確認につとめた。また、腹腔鏡検査も子宮卵管造影と同様に卵管不妊外来担当医が施行した。以上の方法で両方の検査を施行された症例について閉塞や周囲癒着など、卵管の異常を中心に子宮卵管造影と腹腔鏡とにおける所見を比較検討した。

結 果

子宮卵管造影検査では55例中37例に卵管および卵管周囲の病変を疑った。また、他の9例に子宮筋腫や奇形による子宮内腔の変形をみとめ、残り9例は異常所見を認めなかった。全体として腹腔鏡との一致率は84%であった。卵管の障害別にみると、両側卵管間質部閉塞と診断した9例では1例を除き続発性不妊症であり、7例には何等かの既往歴があった。腹腔鏡検査において9例中8例は子宮卵管造影同様に腹腔鏡下通色素検査において卵管内への色素の流入を認めなかったが、1例は卵管周囲癒着を認めたものの強圧にて疎通性が認められた。また、5例には疎通性以外にも卵管周囲癒着などの異常を認めた(表1)。子宮卵管造影検査で両側卵管峽部閉塞と診断した3例はいずれも卵管障害の原因となりうる既往歴を持っていた。腹腔鏡では3例とも卵管周囲癒着があり、また、疎通性も認められなかった(表2)。両側卵管水腫の7例では全例に卵管峽部の屈曲あるいは延長所見があり、4例では卵管峽部にまでかかる高度の水腫を認めた。腹腔鏡では全例に卵管水腫と周囲癒着があり、また、色素の腹腔内流出も認められなかった。しか

表 2 両側卵管峽部閉塞症例

	G-P	既往歴	腹腔鏡所見	疎通性
1	0-0	子宮内膜症	卵管周囲癒着	—
2	2-0	淋疾	卵管周囲癒着	—
3	1-0	外妊	卵管周囲癒着	—

し、卵管水腫の程度と卵管周囲癒着の程度は必ずしも一致していなかった(表3)。子宮卵管造影ではまだ疎通性があると診断した卵管采癒着7例において、卵管の屈曲や延長などの異常所見とともに造影剤の腹腔内異常貯留像を認めた。腹腔鏡では卵管の拡大と周囲癒着を認め、また、全例とも疎通性は残っていた(表4)。卵管の拡張像や異常貯留像はかいが、延長や屈曲・走行異常などから卵管周囲癒着を疑った8例では、2例に子宮内膜症(Beecham I期)や傍卵巣嚢腫が存在し、4例に卵管周囲癒着を認めた(表5)。片側のみに異常所見のあつた症例は3例あり、このうち2例は間質部閉塞と診断した。しかし、この2例とも腹腔鏡では何等異常所見はなく、疎通性も認められた(表6)。子宮卵管造影検査では異常なしと診断した9例のうち4例に軽度ではあるが異常所見を認めた(表7)。また、子宮内腔の変形を認めた9例は、腹腔鏡あるいは子宮鏡の併用により、子宮卵管造影と一致した所見を得た。

考 察

子宮卵管造影は卵管機能検査として広く施行されている検査法である。しかし、近年腹腔鏡がしたいに多く行われるにつれ、子宮卵管造影検査では明らかにできなかった異常が指摘され、子宮卵管造影との所見の差が問題となっている。両者の一致率について、坂倉¹⁾は57%、Philipsen²⁾は58%、Brolin³⁾は67%と報告している。今回の検討では、腹腔鏡と子宮卵管造影所見の一致

表 3 両側卵管水腫症例

	G-P	既往歴	HSG 所見	腹腔鏡所見	疎通性
1	0-0	内膜症・卵管炎	屈曲・高度水腫	卵管水腫・高度癒着	—
2	1-0	結核・内膜症	延長・高度水腫	卵管水腫・高度癒着	—
3	1-1	—	屈曲・中等度水腫	卵管水腫・高度癒着	—
4	0-0	—	屈曲・延長・高度水腫	卵管水腫・中等度癒着	—
5	1-0	外 妊	屈曲・高度水腫	卵管水腫・軽度癒着	—
6	0-0	—	屈曲・中等度水腫	卵管水腫・中等度癒着	—
7	1-0	虫垂切除	屈曲・中等度水腫	卵管水腫・高度癒着	—

表 4 両側卵管采癒着症例

	G-P	既往歴	HSG 所見	腹腔鏡所見	疎通性
1	0-0	卵管形成術	屈 曲	卵管拡大・周囲癒着	+
2	0-0	虫垂炎・付属器切除	屈曲・貯留	卵管拡大・周囲癒着	+
3	3-1	—	屈曲・延長・貯留	卵管拡大・周囲癒着	+
4	2-0	処女膜閉塞・外妊	貯 留	卵管拡大・周囲癒着	+
5	1-0	卵管切除・外妊	屈曲・貯留	卵管拡大・周囲癒着	+
6	0-0	筋腫核出術	屈曲・延長	卵管拡大・周囲癒着	+
7	1-0	—	屈曲・貯留	卵管拡大・周囲癒着	+

表 5 卵管の走行異常等で癒着と診断した症例

	G-P	既往歴	HSG 所見	腹腔鏡所見	疎通性
1	0-0	—	走行異常	内膜症	+
2	0-0	—	走行異常	—	+
3	0-0	虫垂切除	延 長	—	+
4	0-0	腹膜炎	屈 曲	卵管周囲癒着	+
5	0-0	虫垂切除	屈 曲	卵管周囲癒着	+
6	0-0	虫垂切除	屈曲・延長	卵管周囲癒着	+
7	0-0	—	屈曲・延長	傍卵巢のう腫	+
8	0-0	—	屈曲・延長	卵管周囲癒着	+

表 6 片側卵管のみに異常所見のあった症例

	G-P	既往歴	HSG 所見	腹腔鏡所見	疎通性
1	1-0	—	間質部閉塞	—	+
2	0-0	—	間質部閉塞	—	+
3	0-0	卵管炎	卵管走行異常	卵管周囲癒着	+

率は全体として84%であり、特に疎通性に関してのみでは95%と高率であった。子宮内腔の変形、卵管峡部閉塞、卵管水腫および造影剤の腹腔内異常貯留像がある卵管采癒着では全例一致をみたが、卵管間質部閉塞や付属周囲癒着では一致しない症例があった。特に一側の卵管

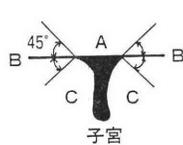
間質部閉塞と診断した症例の一致率は極めて悪かった。われわれは自動注入器などを用いているため疼痛による spasm は極めて少ないと思われるが、左右の卵管の抵抗には差があることが当然考えられ、さらに、air が一側に多く残ったことにより造影されなかつた可能性も考え

表 7 明らかな異常所見がなかった症例

	G-P	既往歴	腹腔鏡所見	疎通性
1	0-0	—	—	+
2	0-0	卵管炎?	—	+
3	0-0	—	左卵管周囲癒着	+
4	0-0	—	漿膜下筋腫	+
5	0-0	—	—	+
6	0-0	虫垂切除	—	+
7	0-0	—	—	+
8	1-0	—	子宮内膜症	+
9	0-0	—	左卵管周囲癒着・筋腫	+

表 8 子宮の偏位と卵管周囲癒着

	癒着あり	癒着なし
子宮偏位あり	8	3
なし	13	13



	癒着あり	癒着なし
1 区域	17	18
2 区域	15	9

図 1 卵管走行区分と卵管周囲癒着

られる。また、卵管の拡大や造影剤の腹腔内異常貯留所見がなく、屈曲や延長・走行異常所見のみから周囲癒着と診断した症例ではわずか50%に一致をみただけであった。Horwitz ら⁴⁾はこのような卵管の異常所見と子宮の偏位より97%の正診率をえたと報告しているが、Corson ら⁵⁾をはじめ、多くの報告においても卵管周囲癒着の正診率が低いことが指摘されており、当科においても同様の結果であった。われわれも子宮が左右に偏位している場合には癒着を疑うことがあるが、表8に示すように偏位のある症例では癒着がみられる傾向があるものの、偏位のない症例でも癒着は多くみられており、これらからだけでは癒着の診断的根拠とはなりがたいという結果であった。卵管の走行を図1のように区分し、2区域以上にわたるものには卵管周囲癒着が多いとの報告⁶⁾があり、われわれもこれを参考に判定を行ったが、子宮の偏位と同様に癒着が存在する傾向を認めただけであった。油性造影剤を用いることで少しでも多くの卵管周囲の情報を得ようとする考え⁷⁾もあるが、今回の検討からは腹腔内異常貯留像を示すような卵管周囲癒着は水溶性造影剤でも十分判定できると思われた。問題はこのような所見を示さない癒着であろう。しかし、子宮卵管造影は性管の内腔を造影するもので、あくまで「影絵」にすぎない。いかに透視下に行っても、前後像だけでなく、斜位や側方からの撮影を行っても、造影されていない管腔外の病変を間接的な所見から確実に判定することは困難なことが多いと思われる。

卵管の疎通性は子宮卵管造影でも腹腔鏡下通色素検査でも正しく診断できると考えられるにもかかわらず、坂倉⁸⁾は18%、Donnez ら⁹⁾は10%、われわれは5%に、両者の所見が異なっていた。子宮卵管造影では疎通性があったが、腹腔鏡ではこれが認められない場合は、両検査の施行に時間的なずれがあるために病変が進行していた可能性はあるが、逆に腹腔鏡でのみ疎通性が確認される

場合が問題である。この原因として、次の3点があげられると思われる。まず第一に麻酔の有無があげられる。われわれは腹腔鏡を全身麻酔下で行っており、これにより、いわゆる spasm はほぼ完全に除かれると考える。ただし、通常の筋弛緩剤では spasm はとれず、これを除くには Halothane が有効であるとの報告¹⁰⁾もあるため、麻酔法は十分検討すべき問題である。第二に、注入する液体の粘稠性の差が考えられる。油性に比べれば水溶性造影剤は粘稠性が低いといえども、indigocarmine 液に比べればはるかに粘稠性は高い。これにより狭窄のある卵管では造影剤が通過できず、子宮卵管造影所見としては閉塞と診断されることが考えられる。第三に注入量の問題が考えられる。注入量が少ないことにより、卵管の疎通性を正確に診断できない可能性がある。子宮卵管造影では腹腔内に流入する造影剤を多量にすれば腹膜への刺激も強く、当然患者の疼痛も増す事になる。さらに、造影が重なることで逆に所見がとりにくくなる可能性が高い。一方、腹腔鏡下では腹腔内に流出した通色素液を吸引することが可能なため、疎通性を十分に確かめることができる。これら3点より両検査に所見に差がでることがあると考えられる。しかし、子宮卵管造影では疎通性が認められなくても腹腔鏡下通色素では疎通性が認められたからといって、その卵管が全く正常だとは言いがたいのではないかと考える。強圧でのみ疎通性が認められる症例にも何等かの異常があると考えべきであろうし、正しく施行されたにもかかわらず、両検査に差がでたとなれば、やはり、これらの所見のもつ病的意義を考えるべきではないと思われる。この点については今後の検討が必要であろう。

腹腔鏡や子宮鏡、さらに卵管鏡などの内視鏡が発達しても、子宮卵管造影は産婦人科領域において今後とも意義のある検査方法であろうと思われる。病変のために各検査所見に差がでること以外、手技的には可能な限り正確な所見を得られるように行う必要があると考える。疼

痛による spasm と思われる閉塞を防ぐために自動注入器を用いるなど注入を緩和にすることは有効な操作であり、鎮痙剤や安定剤の使用も有効であろうと考える。また、造影剤そのものの刺激性を少なくすることも有効なことと考える。はらに、腹腔内拡散像を損なわない範囲で造影剤の粘度を下げるため適度に生理食塩水で希釈することもひとつの方法と思われる。できる限り立体的にみるためには当然多方向からの検討が必要であろうし、TV モニター下に行い、VTR にて検討を加えることで更に正確な判定が可能であると思われる。しかしながら、卵管の屈曲や延長・走行異常、さらに子宮の偏位などの二次的な所見だけでは腹腔内癒着は診断しえないものもあり、また、子宮卵管造影では正常であつても初期の子宮内膜症など不妊症の原因となりうる病変が存在する可能性もあるため、検査後、適切な時期での腹腔鏡が必要であると考えられる。

まとめ

教室において子宮卵管造影・腹腔鏡をとも施行した55例について、卵管を中心にその所見を検討した。子宮卵管造影は、卵管疎通性に関し、高い正診率が得られるものの、卵管の拡大像や造影剤の腹腔内異常貯留のない例では周囲癒着の診断は難しい場合があると考えられた。また、子宮卵管造影で異常所見のなかつた症例でも不妊症の原因となりうる何等かの異常を認めることがあり、適切な時期での腹腔鏡検査が必要であると考えられる。

(本論文の要旨は第49回日不妊学会関東地方部会で発表した。)

文 献

- 1) 坂倉啓一：不妊症例における子宮卵管造影像と腹腔鏡所見併用による診断的意義，慶応医学，59(5)：737-748，1982。
- 2) Philipsen, T. and Hansen, B. B. : Comparative study of hysterosalpingography and laparoscopy in infertile patients. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 60 : 149-151, 1981.
- 3) Brolin, I. and Lannering, B. : Vergleich zwischen Hysterosalpingographie, Laparoskopie und Laparotomie. Fortschr. Röntgenstr., 133(5) : 510-513, 1980.
- 4) Horwitz, R. C. et al. : A radiological approach to infertility—hysterosalpingography. Br. J. Radiol., 52 : 255-262, 1979.
- 5) Corson, S. L. : Use of the laparoscope in the infertile patient. Fertil. Steril., 32 : 359-369,

1979.

- 6) 高野 昇・他：卵管形成術の Hysterosalpingography (HSG) 像の分析とその病理組織的所見との相関について，日産婦誌，32(5)：559-566，1980。
- 7) 米倉国男・他：卵管の画像診断としての子宮卵管造影の再評価，臨婦産，38(2)：97-101，1984。
- 8) Donnez, J. et al. : Incidence of pathological factors not revealed by hysterosalpingography but disclosed by laparoscopy in 500 infertile women. Europ. J. Obstet. Gynec. reprod. Biol., 13 : 369-375, 1982.
- 9) Ron, M. et al. : The effect of halothane on uterine cornual spasm during general anaesthesia. Int. J. Fertil., 27(3) : 187-188, 1982.

Studies on laparoscopic findings in the infertile patients who received hysterosalpingography

Hideto Gomibuchi, Hiroaki Kitagawa, Yuji Taketani, Kodo Sato and Masahiko Mizuno

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

Hysterosalpingography (HSG) has been widely used to assess the organic abnormality of fallopian tube and uterus in infertile women. The availability of laparoscopy, however, have provided new modalities to directly evaluate fallopian tube. Therefor, the role of HSG in evaluation of infertility needs reassessment. The findings obtained by HSG and laparoscopy were compared in 55 infertile women. The same diagnosis was obtained in 84 % of all cases between the two examinations. The diagnosis of tubal patency was given to 95 % of the patients by HSG. Discrepancies were often found in the cases with cornual occlusion or extratubal lesions. The diagnosis of peritubal adhesion by HSG based on elongation and/or kinkiness of the fallopian tube was correct only in 50 % of the patients in comparison with laparoscopic diagnosis. In cotrast, peritubal adhesion was found by laparoscopy in 22 % of cases with normal findings by HSG. It was concluded, therefore, that HSG is still an important way of examinations for infertility, but laparoscopy is indispensable particularly in the patients who do not conceive longer than 6 months after receiving HSG.

(受付：昭和61年10月6日)

芍薬甘草湯のラット卵胞性ステロイド分泌に及ぼす影響

Influence of Syakuyaku-Kanzō-Tō on Steroidogenesis in Rat Follicles

秋田大学医学部産婦人科学教室

太田博孝 福島峰子 真木正博

Hiroataka OTA Mineko FUKUSHIMA Masahiro MAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine

芍薬甘草湯の卵巣直接作用を検討する目的で、以下の実験を行った。27日齢の未熟雌ラットに PMSG 8 IU を腹腔内に投与、48時間後無菌的に卵巣を摘出し、成熟卵胞を分離した。各卵胞は培養液中で羊プロラクチン (oPRL: 0.1-50 μ g)、芍薬甘草湯、あるいは芍薬、甘草を加え、24時間器管培養した。培養終了後、培養液中の estradiol (E₂)、progesterone (P)、testosterone (T) 濃度を RIA で測定した。

oPRL の添加は培養液中の E₂ 分泌を用量依存性に低下させ、逆に P 分泌を増加させ、T 分泌に変化を与えなかった。E₂ 分泌は芍薬甘草湯100, 500 μ g 添加群で、oPRL 単独群に比し有意に増加した。P も500 μ g 群で、同様に増加した。これら oPRL 投与により低下した E₂ 分泌の改善および P 分泌の更なる上昇は、芍薬甘草湯構成成分の中で、芍薬の作用によると考えられた。今回の実験結果より、芍薬甘草湯は卵巣に直接作用し、PRL のアロマトラーゼ抑制作用に拮抗、E₂ 分泌を促進、同時に P 分泌を刺激することが明らかとなった。

(Jap. J. Fert., Ster., 32(3), 486-490, 1987)

緒言

芍薬甘草湯は近年、種々の排卵障害の不妊婦人に有効であることが知られつつある。すなわち、芍薬甘草湯は高 androgen 血性不妊婦人で血中 androgen 値を低下させ、estrogen 値を上昇、排卵を惹起させる¹⁻³⁾。さらに高 PRL 血性不妊婦人で芍薬甘草湯は PRL 正常化作用^{4,5)}のあることが明らかとなってきた。そして、PRL の低下により、estradiol/estrone 比が上昇⁵⁾し、排卵に最適な内分泌環境を惹起する様である。著者らは sulpiride を投与して作った実験的高 PRL 血症ラットに芍薬甘草湯を投与し、下垂体前葉の dopamine 受容体を刺激することにより血中 PRL 値を低下させる結果を得た^{4,6)}。その際、同時に認められる性ステロイド分泌の変動のすべてを PRL 低下による2次的なものとして説明が困難で、特に estradiol の変化は芍薬甘草湯の直接作用も否定できなかつた。そこで今回、芍薬甘草湯の卵巣レベルでの性ステロイド代謝への影響を知る目的で本研究を行った。

一般に、漢方は随証療法が基本とされる。従つて、証モデル・ラットの意味で *in vitro* 実験では sulpiride

を投与して血中 PRL 値の上昇を計つた^{4,6)}が、今回は培養液中に PRL を投与して比較検討した。

実験方法

1) 卵胞採取法

27日齢のウイスター今道系未熟雌ラット(動物繁殖研究所、埼玉)に8IU(0.2ml)のPMSG(妊馬血清ゴナドトロピン:帝国臓器)を腹腔内に注射した。ラットは14時間照明・10時間暗黒の照明サイクルで、常時22±1°Cに調節された空調室で飼育した。対照群には0.2mlの生理食塩水を投与した。ラットは48時間後頸部を過伸展させて屠殺し、無菌的に卵巣を摘出した。次に実体顕微鏡下で成熟卵胞を無菌的に分離した。

2) 卵胞培養法

各卵胞は multiwell tissue culture plate (Falcon: 3047) 内の培養液中に静置した。用いた培養液は McCoy's 5a (modified) で penicillin 10U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, l-glutamine 2mM/ml を添加した。培養液中には種々の濃度の羊プロラクチン (oPRL: NIADDK-oPRL-16: 0.1-50 μ g)、芍薬甘草湯 (ツムラ: 1-500 μ g)、あるいはその構成成分である芍薬 (100 μ g)、甘草

(100 μ g) を加えた。各卵胞は24時間、37°C、95%air、5%CO₂、100%湿度の条件下で器管培養した。培養終了後、培養液はホルモン測定日まで-20°Cで冷凍庫に保存した。また各卵胞は10%ホルマリンで固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的に閉鎖傾向を示した卵胞の培養液は除外した。

3) 性ステロイドホルモン測定法

培養液の estradiol (E₂), progesterone (P) 濃度は dextran coated charcoal (DCC) 法による RIA キットを用いて測定^{7,8)}した。Testosterone (T) 濃度は 2 抗体法による RIA キット⁹⁾を使用した。得られた値は平均値とその標準誤差で示し、各群間の有意差検定は Duncan の new multiple range test を用いて行った。

成 績

1) プロラクチン添加による性ステロイド濃度の変動
 培養液中 E₂ 濃度は oPRL 非添加の対照群で810±62pg/ml で、oPRL 添加により用量依存性に低下、50 μ g の oPRL で対照群の40%まで低下した (図1)。P 濃度は対照群で534±50pg/ml で、E₂ の変動とは逆に oPRL 添加で用量依存性に増加し、10、50 μ g の添加では対照群の196、296%まで有意に (P<0.05, 0.01) 増加した。しかし、T 濃度は oPRL 添加で変動しなかつた (図2)。

2) 芍薬甘草湯添加による性ステロイド濃度の変動
 oPRL 非添加時、種々の濃度の芍薬甘草湯の添加は培養液中の E₂ 濃度に影響を与えなかつた (図3)。一方、oPRL (10 μ g) の添加は E₂ 濃度を対照群より有意に低下させ、芍薬甘草湯の同時添加は逆に用量依存性に増加させ、とくに100、500 μ g の添加では oPRL 単独群より213、230%と有意に (P<0.02) 増加させた。

P 濃度は oPRL 非添加時、高濃度の芍薬甘草湯 (500 μ g) で対照群より有意に (P<0.02) 増加した (図4)。oPRL (10 μ g) 単独投与で P 濃度は軽度増加し、500 μ g の芍薬甘草湯同時投与で対照群より有意に (P<0.02) 増加した。

T 濃度は oPRL 非添加時 1-100 μ g の芍薬甘草湯添加で対照群より有意に低下した (図5)。oPRL の同時投与は低下した T 値を対照域に改善させ、500 μ g の高濃度では逆に高値を示した。

3) 各生薬成分添加による性ステロイド濃度の変動

以上のような芍薬甘草湯の卵胞内性ステロイド分泌動態に及ぼす効果が生薬構成成分のいずれの作用によるかを知るため、芍薬、甘草各100 μ g を培養液に加え、卵胞内性ステロイド代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、培養液中の E₂ 濃度は oPRL、甘草単独投与群では

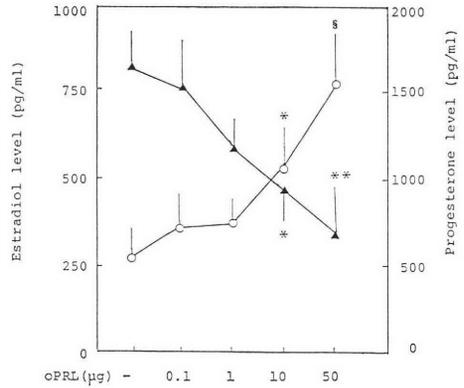


図 1 羊プロラクチン (oPRL; 0.1-50 μ g) 添加による estradiol (\blacktriangle — \blacktriangle), progesterone (O—O) 濃度の変動。
 *P<0.05, **P<0.02, §P<0.01

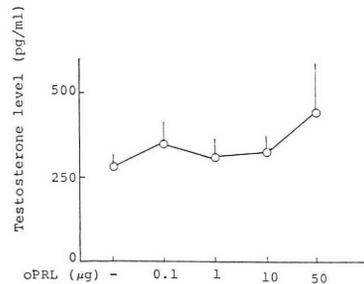


図 2 羊プロラクチン (oPRL; 0.1-50 μ g) 添加による testosterone 濃度の変動。

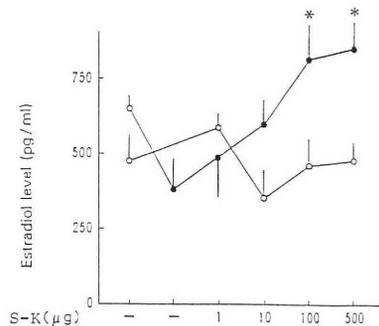


図 3 芍薬甘草湯 (S-K; 1-500 μ g) 添加による estradiol 濃度の変動。O—O, oPRL 非添加群; ●—●, oPRL 添加群。
 *P<0.02

対照値以下にとどまつた (図6)。一方、芍薬の添加は E₂ 分泌を改善させ、その値を対照域に戻した。P 濃度も同様で芍薬添加群で有意に (P<0.05) 増加し、甘草単独では P 濃度に変動はなかつた。T 濃度も各生薬の添加で変動が見られなかつた (図7)。

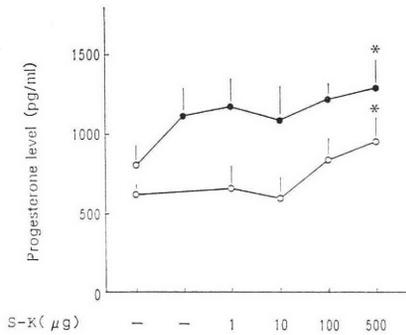


図 4 芍薬甘草湯 (S-K; 1-500μg) 添加による progesterone 濃度の変動。○—○, oPRL 非添加群; ●—●, oPRL 添加群, *P<0.02

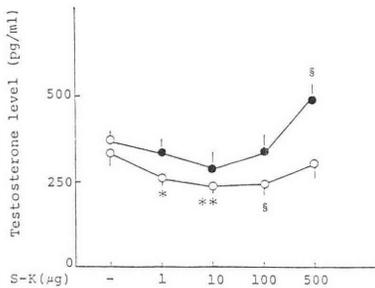


図 5 芍薬甘草湯 (S-K; 1-500μg) 添加による testosterone 濃度の変動。○—○, oPRL 非添加群; ●—●, oPRL 添加群. *P<0.05, **P<0.02, §P<0.01

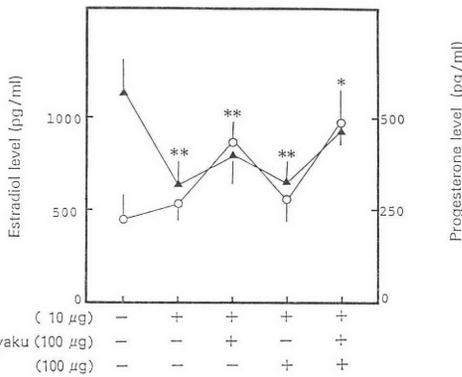


図 6 生薬成分添加による estradiol (▲—▲), progesterone (○—○) 濃度の変動. *P<0.05, **P<0.02

考 察

PRL はマウス¹⁰⁾, ラット¹¹⁾, 豚¹²⁾, 牛¹³⁾, ヒト^{13,14)} 等では卵巣にある受容体を介し, 直接性ステロイドや各種酵素に作用していると考えられる。臨床的に PRL 値

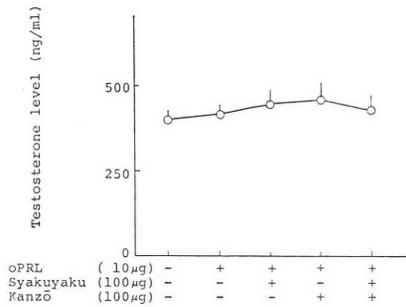


図 7 生薬成分添加による testosterone (○—○) 濃度の変動.

が正常範囲を越える高 PRL 血症では, PRL による種々の卵巣機能抑制作用が見られる。すなわち, 血中 PRL 値が 30ng/ml を越える時, 基礎体温表での高温期は短縮し, P 分泌も低下し, 黄体機能不全症^{15,16)} となる。PRL 値が 100ng/ml を越えると, 一般に排卵, 月経は抑制され, P や estrogen 分泌も低下する。高 PRL 血性排卵障害例, 例えば多嚢胞卵巣症候群では clomiphene 等による排卵誘発率は正 PRL 血性の例より低くなり, 楔状切除術による治療効果も低下する¹⁷⁾。

PRL の卵巣機能抑制作用はラットや豚でよく研究されている。PRL はラット顆粒膜細胞で FSH 刺激による E₂ 産生を用量依存性に抑制する^{18,19)}。これは細胞質のマイクロゾーム分画にあり, androgen から estrogen への転換酵素であるアロマトラーゼ (芳香化酵素) 活性を直接抑制する結果である²⁰⁾ ことが知られている。また, PRL は顆粒膜表面にある FSH²¹⁾, LH 受容体²¹⁾ に作用し, その受容体数を減少させ (down-regulation), second messenger である cyclic AMP 量も減少させる。

不妊症領域に使われつつある芍薬甘草湯は 2 種類の生薬から成り, 高 androgen 血性不妊症に有効との報告¹⁻³⁾ がある。この芍薬甘草湯による androgen 低下作用は, 甘草の作用によるという見解²⁾ もある。甘草の主成分である glycyrrhizin には, 抗消化性潰瘍作用, 抗アレルギー作用, 鎮咳作用と共に副腎皮質ホルモン様作用^{22,23)} を有している。dexamethazone や prednisolone に androgen 低下作用のあることを考えると, 芍薬甘草湯にこれらステロイドホルモン様作用を有することも理解できる。

さらに最近, 芍薬甘草湯は androgen 低下作用と共に高 PRL 血症にも有効^{4,5)} で, PRL 低下作用を有することがわかってきた。芍薬甘草湯に関する全国 13 大学共同研究のまとめ⁵⁾ では, 10 例の高 PRL 血症患者に芍薬甘草湯を投与し, PRL, estrone (E₁), cortisol の低下と E₂/E₁ 比の上昇をみた。一方, 著者ら⁴⁾ による薬物誘導

性高 PRL 血症の投与で 6 例中 3 例に PRL 値の正常化と無月経の改善, 乳漏の消失などの効果を認めた。従つて芍薬甘草湯は, androgen 低下作用のみならず, 中枢や卵巣レベルで PRL の作用に拮抗し, 性ステロイド代謝の正常化をもたらしていくもの^{6,20}と考えられる。

本研究で PRL は用量依存性に E₂ 量を減少させた。これは PRL の顆粒膜細胞内アロマターゼへの直接的抑制作用によると考えられる。芍薬甘草湯の同時添加は E₂ 分泌を改善させ, 100, 500 μ g の添加では oPRL 単独群より有意に増加した。そして構成成分別の比較で, この E₂ 増加作用は芍薬のみ認められ, 卵胞内顆粒膜細胞のアロマターゼ活性促進を含む性ステロイド生成増強作用の効果と考えられた。

PRL は中枢レベルで, PRL 分泌促進因子 (PRF), PRL 分泌抑制因子 (PIF) の両者により, その分泌が調節されている。PIF としては dopamine が有力視されている。Sulpiride は薬理生化学的に高い選択性をもつ dopamine 受容体の遮断剤²⁵⁾である。従つて, sulpiride 投与により高 PRL 血症となる。それに対し, 著者らは *in vivo* で sulpiride に芍薬甘草湯を併用すると, sulpiride の dopamine 受容体遮断効果が出現しないばかりか, むしろ dopamine 受容体の結合能が増加し, 刺激効果を見ることができた⁶⁾。一方, 本研究で芍薬甘草湯の卵胞への直接作用を検討すると, 芍薬甘草湯は E₂ 分泌増加と共に大量では P 分泌増加作用があり, この効果は構成成分の中で芍薬による可能性が大きい。

一方, 培養液中の T は 1-100 μ g の芍薬甘草湯添加で対照群より有意に低下した。この事実は臨床的に芍薬甘草湯の有する androgen 低下作用と考え合わせると興味深い。しかしながら, PRL それ自体には卵胞の androgen 代謝への関与は見られなかった。

芍薬甘草湯は高 androgen 血症に使われている dexamethazone や prednisolone 等のコルチコイドに比較すると副作用は極めて少ない。従つて, 本剤はステロイド代謝に及ぼす効果からみても極めて有用な薬物としてその臨床応用が可能であろう。

文 献

- 1) 柳沼 恣: 高 testosterone 血症と高 LH 血症および稀発月経との関連性, 日不妊誌, 28 : 386, 1983.
- 2) 柳沼 恣, 小林拓郎, 藤原亮寿: 「ツムラ芍薬甘草湯」の血中 testosterone 濃度低下作用とその臨床応用, 産婦人科漢方研究のあゆみ I, 36, 診断と治療社, 1984.
- 3) 岡村 泰, 大野 剛: 不妊症に於ける芍薬甘草湯の使用経験, 産婦人科漢方研究のあゆみ I,

- 44, 診断と治療社, 1984.
- 4) 福島峰子, 成田章子, 一関和子, 太田博孝, 五十嵐信一, 脇坂 晟: 芍薬甘草湯の薬物誘導性高プロラクチン血症への基礎的, 臨床的検討, 産婦人科漢方研究のあゆみ III, 47, 診断と治療社, 1986.
- 5) 福島峰子, 柳沼 恣・他: S-K (芍薬甘草湯) 研究会報告書, 東京, 4月, 1986.
- 6) 福島峰子, 成田章子, 一関和子, 太田博孝, 真木正博: 芍薬甘草湯の下垂体 dopamine receptor への作用, 産婦人科漢方研究のあゆみ IV, 93 診断と治療社, 1987.
- 7) 神戸川明: エストロゲン, 最新医学, 30 : 790, 1975.
- 8) 松本 茂, 中村幸雄, 川村尚道, 田辺清男, 飯塚理八: RIA によるステロイドホルモン (E₂, E₃, P) の測定法について, ホと臨床, 411 : 24, 1976.
- 9) 宇都宮隆史, 山口省之, 門田 徹: ¹²⁵I-Testosterone Radioimmunoassay kit “榮研” の基礎的検討, ホと臨床, 1413 : 29, 1981.
- 10) Bohnet, H. G. and Friesen, H. G.: Effect of prolactin and growth hormone on prolactin and LH receptors in the dwarf mouse. J. Reprod. Fertil., 48 : 307, 1976.
- 11) Ota, H., Wakizaka, A., Fukushima, M. and Maki, M.: Downward and upward regulation of hormonal receptors in rat ovary by exogenous gonadotropin stimulation. IRCS Med. Sci., 10 : 727, 1982.
- 12) Hammond, J. M. and Krall, E.: Steroid hormones modulate prolactin binding by cultured porcine granulosa cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 91 : 284, 1979.
- 13) Saito, T. and Saxena, B. B.: Specific receptors for prolactin in the ovary. Acta Endocrinol., 80 : 126, 1975.
- 14) Ota, H., Fukushima, M., Murata, J., Wakizaka, A. and Maki, M.: Ovarian membrane receptors for LH, FSH and prolactin during the menstrual cycle and in polycystic ovary syndrome. Tohoku J. exp. Med., 149 : 31, 1986.
- 15) Corenblum, B., Pairaudeau, N. and Shewchuk, A. B.: Prolactin hypersecretion and short luteal phase defects. Obstet. Gynecol., 47 : 486, 1976.
- 16) Del Pozo, E., Wyss, H., Tolis, G., Alcañiz, J., Campana, A. and Naftolin, F.: Prolactin and deficient luteal function. Obstet. Gynecol., 53 : 282, 1979.
- 17) Ota, H., Fukushima, M., Ichinoseki, K. and Suzuki, M.: Prolactin secretion in polycystic ovary syndrome. Acta Obstet. Gynecol. Jap., 31 : 2072, 1979. (abstract)
- 18) Dorrington, J. H. and Gore-Langton, R. E.: Antigonadal action of prolactin: Fur-

ther studies on the mechanism of inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat granulosa cell cultures. *Endocrinology*, 110 : 1701, 1982.

- 19) Brodie, A. M. H. and Ota, H. : Divergent effects of prolactin on FSH receptor, cyclic AMP, aromatase activity and steroidogenesis in rat granulosa cell cultures. Society for the Study of Reproduction, 18th Annual Meeting, Montreal, 201, 1985. (abstract)
- 20) Tsai-Morris, C.-H., Ghosh, M., Hirschfield, A. N., Wise, P. M. and Brodie, A. M. H. : Inhibition of ovarian aromatase by prolactin in vivo. *Biol. Reprod.*, 29 : 342, 1983.
- 21) Darbon, J. M. and Ranta, T. : Prolactin inhibits FSH and cyclic AMP-induced gonadotropin receptor expression in cultured rat granulosa cells. 66th Endocrine Society, San Antonio, 872, 1984. (abstract)
- 22) 熊谷 朗 : グリチルリチンの作用とその機序, *Minophagen Med. Rev.*, 23 : 181, 1978.
- 23) 熊谷 朗 : 甘草, 特にグリチルリチンの薬理作用と臨床応用への問題点, *Minophagen Med. Rev.*, 25 : 185, 1980.
- 24) 福島峰子, 太田博孝, 立崎達夫, 関 晴夫, 小松良子 : 無排卵モデル・ラットに及ぼす漢方薬の効果, 産婦人科漢方研究のあゆみ I, 85, 診断と治療社, 1984.
- 25) Debeljuk, L., Dascal, H., Rozados, R. and Guitelman, A. B. : Effect of sulphiride on prolactin release by rat pituitaries *in vitro*. *Experimentia*, 30 : 1355, 1974.

Influence of Syakuyaku-Kanzō-Tō on steroidogenesis in rat follicles

**Hirota Ota, Mineko Fukushima
and Masahiro Maki**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita University School of Medicine

Effects of herbal medicine, Syakuyaku-Kanzō-Tō (S-K), on the ovarian steroidogenesis were investigated using rat follicles in the presence of prolactin. Immature female rats were injected 8 IU PMSG intraperitoneally, killed 48 hrs later, and the ovaries were removed aseptically. Then, the follicles were separated and incubated in the medium for 24 h with ovine prolactin (oPRL; 0.1-50 μg), S-K (1-500 μg), Syakuyaku (100 μg) or Kanzō (100 μg). After incubation, steroid levels such as estradiol (E_2), progesterone (P) and testosterone (T) in the medium were measured. Addition of oPRL reduced the E_2 secretion and increased P levels in a dose-response manner, but had no effect on the T level. Addition of S-K (100, 500 μg) with oPRL restored the E_2 level, and P secretion in 500 μg S-K group. S-K (1-100 μg) alone reduced the T secretion in the medium. These stimulatory effects on the E_2 and P secretion were due to the action of Syakuyaku, but not of Kanzō. In conclusion, S-K appears to directly act on ovary, and restore the disturbed steroidogenesis by prolactin.

(受付 : 昭和62年2月27日特別掲載)

Lisuride (Dopamine Agonist) による

妊娠の転帰と児の発育

The Outcome of Pregnancy and Newborns after Lisuride Therapy of
Patients with Argonz-del Castillo Syndrome, Chiari-Frommel
Syndrome, Prolactinoma and Corpus Luteum Insufficiency

(Lisuride 研究会代表：小林拓郎)

東京大学医学部分院産婦人科

柳 沼 恣 岡 村 隆 小林 拓郎

Tsutomu YAGINUMA Takashi OKAMURA Takuro KOBAYASHI

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

横浜市立大学医学部産婦人科

長 田 久 文 植 村 次 雄 水 口 弘 司
Hisatumi OSADA Tsugio UEMURA Kohji MINAGUCHI

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

小田原市立病院産婦人科

松 山 明 美 佐 藤 啓 治

Akemi MATSUYAMA Keiji SATO

Department of Obstetrics and Gynecology, Odawara Citizen's Hospital

大阪大学医学部産婦人科

小 泉 清 青 野 敏 博 倉 智 敬 一
Kiyoshi KOIZUMI Toshihiro AONO Keiichi KURACHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School Osaka University

九州大学医学部産婦人科

角 沖 久 夫 尾 上 敏 一 中 野 仁 雄
Hisao SUMIOKI Toshikazu ONOUE Hitoo NAKANO

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

佐世保共済病院産婦人科

楠 田 雅 彦

Masahiko KUSUDA

Department of Gynecology and Obstetrics, Sasebo Kyosai Hospital

鹿児島大学医学部産婦人科

永 田 行 博

Yukihiro NAGATA

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

Argonz-del Castillo 症候群, Chiari-Frommel 症候群, prolactinoma および黄体機能不全症の治療上の Lisuride の 1 日至適投与量決定の治験 (1 日 75 から 600ug を投与) において, 33 例が妊娠し, このうち 32 例について追跡調査が可能であった。

妊娠の転帰は, 正産 24 例 (75.0%), 自然流産 6 例 (18.8%), 卵管妊娠 1 例と人工妊娠中絶 1 例であった。

正産はすべて単胎で男女比は 1 : 1, 出生時の身長と体重は正常範囲内にあり, 奇形は認められなかった。1 例を除いて, これらの児の 1 年間の心身の発育は正常であった。1 例は遺伝性疾患で生後 7 カ月に死亡した。

比較的高い自然流産率は母の高年齢の因子によることが分析された。

無脳児の発生が 1 例に認められたが, 一般に無脳症発生率は極めて低い (0.087%) ので, さらに多数例での検討が必要と思われるが, Lisuride の他の治験では 478 例の出生例中に無脳児は報告されていない。

卵管妊娠と Lisuride との関連性も, 子宮外妊娠の発生率がまた低いことを考慮すると, さらに多数例での検討が必要と思われる。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 491-499, 1987)

緒 言

Lisuride (Lisuride hydrogen maleate) は下垂体からの prolactin 分泌を抑制する¹⁾。われわれは, 高 prolactin 血症や黄体機能不全症の患者の治療のための Lisuride の 1 日至適投与量を決定する試験において, Lisuride が乳汁漏出, 無排卵や黄体機能不全および不妊症の治療に有効であり, 安全であることを報告してきた^{2,3)}。

これらの症例の中で 33 例に妊娠が成立した。今回, これらの中の 32 例について, 妊娠の転帰および生後 1 年までの児の追跡調査を行なうことができたので, その結果を報告する。

対象と方法

以前にわれわれが報告した²⁾ Lisuride 投与による妊娠 33 例中 32 例の追跡調査である。1 例は調査しえなかった。

1) 原因疾患は, Argonz-del Castillo 症候群 (14 例) が最も多く, 次いで prolactinoma (非手術例 8 例, 術後例 4 例), 黄体機能不全 (4 例) および Chiari-Frommel 症候群 (2 例) の順であった (表 1)。それぞれの疾患別の妊娠率は表 1 に示した。

2) 各疾患群の血清 prolactin 濃度は, 非手術 prolactinoma が最も高く, 次いで術後 prolactinoma, Argonz-del Castillo 症候群, Chiari-Frommel 症候群 および黄体機能不全の順であった (図 1)。非手術あるいは術後 prolactinoma と黄体機能不全, そして Argonz-del Castillo 症候群と黄体機能不全との間に有意差が認められた。

3) 月経状態は続発性の第二度無月経が最も多かった

表 1 原因疾患の頻度と妊娠例数

疾 患	妊娠症例数	他に原因 のない挙 児希望不 妊症例数	妊娠率 (%)
Argonz-del Castillo 症候群	14(43.8%)	32	43.7
Chiari-Frommel 症候群	2(6.2%)	13	15.3
Prolac- 非手術 tinoma 術後	8 12(37.5%) 4	42	29.2
黄体機能不全	4(12.5%)	21	19.0
計	32 (100%)	107	29.9

(表 2)。月経状態別の妊娠率も表 2 に示した。

4) 乳汁漏出は約 72% に認められた。

5) Lisuride の投与は, 1 錠中 Lisuride を 25ug または 100ug を含有する錠剤を用い, 75, 150, 300あるいは 600ug を 1 日量とし, 1 日 3 回に分けて毎食後内服させた。

6) 妊娠が成立するまでの Lisuride の投与期間 (妊娠成立周期の推定卵日までの期間) は 10-211 日, その間の Lisuride 総投与量は 0.75-109.8mg であった。妊娠成立後に Lisuride は 3-75 日, 0.825-16.8mg が投与された。

7) 妊娠成立周期における排卵誘発薬は clomiphene citrate (3 例) と HMG-HCG (1 例) であった。

8) 妊娠成立時の母体年齢は 23-38 歳 [30.2 ± 3.5 (SE) 歳] であった。

9) 妊娠した 32 例について, 妊娠の経過および新生児

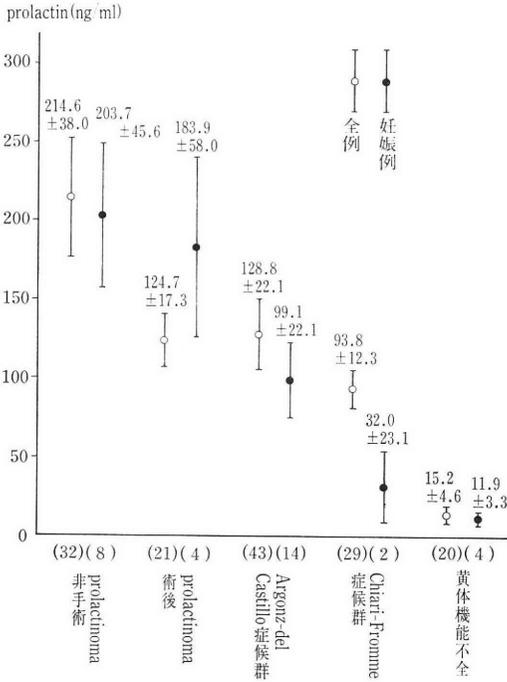


図 1 疾患別 Lisuride 投与前 PRL 値 (平均 ± SE) () 内症例数

表 2 月経状態別頻度と妊娠率

月経状態	妊娠症例数 (%)	他に原因のない挙児希望症例数	妊娠率 (%)
原発性無月経 II 度	1 (3.1)	2	50.0
続発性無月経 I 度	8 (25.0)	37	21.6
II 度	13 (40.6)	37	35.1
無排卵性月経	5 (15.6)	9	55.5
黄体機能不全	4 (12.5)	21	19.0
正常月経	1 (3.1)	1	100.0
計	32	107	29.9

の状態と、その後 1 年間の身体および知能の発達状態を追跡調査した。

10) 妊娠の転帰のうち自然産に關連する背景因子の分析を logistic 回帰分析⁴⁾と Spearman の順位相関分析⁹⁾により検討した。

結 果

1) Lisuride 投与により妊娠した 32 例の転帰は、正期

表 3 自然産産，卵管妊娠と人工妊娠中絶の詳細

	年齢 (歳)	妊娠/分娩歴	診断名	月経状態	投与前 PRL (ng/ml)	併用排卵誘発薬	妊娠までの 1 日量/投与総量	妊娠後の 1 日量/総量	週数
自然産	29	0/0	黄体機能不全	黄体機能不全	20	なし	150 μ g \times 16日 2.4mg	150 \times 49日 7.35mg	10週 5日
	32	0/0	Prolactinoma (非手術)	続発性無月経 II 度	384	なし	300 \times 122,600 \times 21日, 49.2mg	600 \times 28日 16.8mg	10週 2日
	36	1/1	Prolactinoma (非手術)	原発性無月経 II 度	98	なし	600 \times 39日 49.2mg	600 \times 19日 11.4mg	8週 4日
	33	1/0	Prolactinoma (非手術)	続発性無月経 II 度	384	なし	600 \times 41日 24.6mg	600 \times 18日 10.8mg	11週 1日
	30	1/1	Prolactinoma (術後)	続発性無月経 II 度	357	なし	600 \times 123日 73.8mg	600 \times 16日 9.6mg	9週 4日
	38	0/0	Argonz-del Castillo	続発性無月経 II 度	267	なし	600 \times 45日 27.0mg	600 \times 19日 11.4mg	10週 1日
	平均	—	—	—	251 \pm 143.5	—	67.8 \pm 47.4日 33.4 \pm 22.6mg	24.8 \pm 11.5日 11.2 \pm 2.9mg	10.0 \pm 0.8週
卵管妊娠	34	1/0	黄体機能不全	黄体機能不全	13	なし	75 \times 80日 3.3mg	75 \times 17日 1.275mg	9週 6日
人工産	33	2/1	Argonz-del Castillo	続発性無月経	85	なし	300 \times 106,600 \times 27日, 48mg	600 \times 13日 7.8mg	22週 5日

表 4 自然流産群と正期産群の因子の比較分析

	自然流産群 (n=6)	正期産群 (n=24)
年平均±SE	32.8±3.2	29.3±3.2
年齢		
32歳≤例	4(66.6%)	6(25.0%)
<32歳例	2(33.3%)	18(75.0%)
疾患		
腫瘍 例数	4(66.6%)	8(33.3%)
32歳≤例	3(75.0%)	0(0.0%)
患非		
腫瘍 例数	2(33.3%)	16(66.6%)
32歳≤例	1(50.0%)	1(6.3%)
平均±SE	251.6±143.6	96.8±78.0
投与前		
PRL 例数	4(66.0%)	1(4.1%)
32歳≤例	3(75.0%)	0(0.0%)
PRL 値		
<267ng 例数	2(33.3%)	23(95.8%)
32歳≤例	1(50.0%)	2(8.7%)
Lisuride 例数	5(83.3%)	5(20.8%)
600μg 群 32歳≤例	4(80.8%)	1(20.0%)
妊娠前の投与日数	67.8±47.4	78.5±61.2
Lisuride 投与量(mg)	33.4±22.6	27.2±31.9
妊娠後の Lisuride		
投与日数	24.8±11.5	24.6±24.9
投与量(mg)	11.2±2.9	6.5±8.9
≥7mg 例数	6(100%)	7(29.1%)
32歳≤例	4(66.6%)	2(28.6%)
≥10mg 例数	4(66.6%)	3(12.5%)
32歳≤例	4(100%)	1(33.3%)
排卵誘発薬併用	0	4

産24例(75.0%), 自然流産6例(18.8%), 卵管妊娠1例と人工妊娠中絶1例であった。人工妊娠中絶の症例は、妊娠22週目の無脳児であり、33歳の Argonz-del Castillo 症候群の治療例であった。

2) 正期産の24例はすべて単胎であり、男女比は1:1, 妊娠週数は39.9±1.60週(38.0-41.0週)であり、児の出生時体重は3167±53.2g(2750-3800g), 身長は49.5±0.4cm(48-53cm)であった。

3) すべての出生児に外表面奇形などの身体異常は認められなかった。無脳児の1例を入れると、奇形発生率は4%(1/25)であった。

4) 自然流産の6例の背景因子を表3に示す。1例のみが1回の自然流産の既往を有した。これらの患者の年齢は29, 30, 32, 33, 36と38歳であった(従って30歳以上が83%, 32歳以上は66%となる)。Prolactinoma の症例が4例(1例は術後)(66%)も含まれ、これらの

うち3例の血清 prolactin 濃度は357ng/ml以上と非常に高値であった。Argonz-del Castillo 症候群の1例の血中 prolactin 濃度も267ng/mlと高値であった。すべての症例において、妊娠成立後も Lisuride が投与された。

5) 自然流産群と正期産群の背景因子の比較(表4)

5-1) 妊娠成立時の年齢

両群の間において、妊娠時の平均年齢には有意差がなかった。これらの症例中に32歳以上の患者は10例いたが、このうち4例(40%)もが自然流産している。自然流産例の66.6%もが32歳以上であったことになる。正期産例中の25%(6/24)が32歳以上であった。一方、32歳未満の症例は20例いたが、このうち2例(10%)のみが自然流産したにすぎない。

5-2) prolactinoma の症例

非手術および術後 prolactinoma の12例中4例(33.3%)が自然流産している。これは自然流産群の66.6%をも占める。一方、非 prolactinoma の26例中2例(7.6%)のみが自然流産であった。しかし、自然流産した prolactinoma の4例中3例(75%)は32歳以上であり、正期産の prolactinoma の8例のすべては32歳未満であった。

5-3) 血清 prolactin 値

自然流産群は正期産群より有意に高値であった($P < 0.05$)。血清 prolactin ≥ 267 ng/ml の5例中4例(80%)が自然流産している。かかる症例は自然流産群の中の66.6%(4/6)を占めたのに対し正期産群中では4.1%を占めたにすぎない。その4例の自然流産患者中3例(75%)(2例が prolactinoma, 1例が Argonz-del Castillo 症候群)もが32歳以上であった。一方、正期産であった1例(Argonz-del Castillo 症候群)は27歳であった。

5-4) Lisuride 投与量

Lisuride を1日600ug 投与された例の占める割合が自然流産群で高かった。すなわち、かかる10例中5例が自然流産であり、残りの5例は正期産(正期産の中の20.8%)であった。これらは自然流産の中の83.3%をも占めた。しかし、自然流産の5例中4例(80%)が32歳以上であり、一方、正期産の5例中1例(20%)が32歳以上であったにすぎない。

妊娠成立前の Lisuride 投与日数と投与総量は自然流産群と正期産群の間で有意差は認められなかった。妊娠成立後の Lisuride 投与日数は両群の間で有意差がなかった。

妊娠成立後の Lisuride 投与総量は、自然流産群が正期産群よりも有意に高値であった($P < 0.01$)。Lisuride の投与総量が7mg以上の13例中6例(46.1%)が自然流産で、残りの7例は正期産であった。従って、かかる

表 5 標準化した年齢, Lisuride 投与前 prolactin 値および妊娠成立後の Lisuride 投与総量を自然流産のリスクに関連づける logistic parameter* の最大推定値

変数	β_1	$\hat{\beta}_1$	SE($\hat{\beta}_1$)	T	df
X_0 切片	β_0	-2.4308	0.8427		
X_1 年齢	β_1	1.3569	0.8087	1.6799 ⁺	28
X_2 前血中 PRL 値	β_2	1.6613	0.6898	2.4085**	28
X_3 妊娠後投与量	β_3	-0.3257	0.5622	-0.5793 ^{ns}	28

*) Logistic model : $P_x = \frac{1}{1 + e^{-1(\beta_0 + \beta_1 X_1' + \beta_2 X_2' + \beta_3 X_3')}} ; P_x = \text{自然流産確率}$

ただし, X_1', X_2', X_3' は標準化したデータを用いた.

$$\left\{ \begin{array}{l} X_1' = \frac{X_1 - \bar{X}_1}{\hat{\sigma}_1} \quad X_2' = \frac{X_2 - \bar{X}_2}{\sigma^2} \quad X_3' = \frac{X_3 - \bar{X}_3}{\hat{\sigma}_3} \\ \bar{X}_1 = 30.3(\text{歳}) \quad \bar{X}_2 = 120.7(\text{ng/ml}) \quad \bar{X}_3 = 7.3\text{mg} \\ \hat{\sigma}_1 = 3.5 \quad \hat{\sigma}_2 = 111.9 \quad \hat{\sigma}_3 = 8.1 \end{array} \right.$$

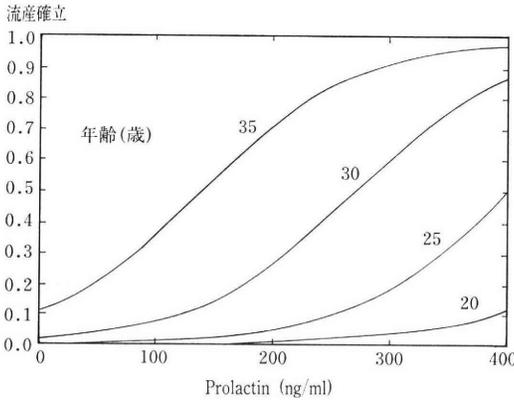


図 2 妊娠成立時年齢および Lisuride 投与前 prolactin 値と流産確率

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(-15.6208 + 0.3869X_1 + 0.048X_2)}}$$

$X_1 = \text{妊娠成立時年齢}$
 $X_2 = \text{Lisuride 投与前 prolactin 値 (ng/ml)}$

症例は自然流産例の100%を占め, 正常産例の 29.1%を占めた.

一方, 自然流産の 6 例中 4 例 (66.6%) が32歳以上であつたが, 正常産の 7 例中 2 例 (28.5%) のみが32歳以上であつた. さらに, Lisuride 投与総量が10mg 以上の 7 例中 4 例 (57.1%) が自然流産であり, この 4 例のすべてが32歳以上であつた.

5-5) Spearman の順位相関分析によると, Lisuride 投与前の血中 prolactin 値と妊娠成立後の Lisuride 投与総量との間に有意な相関が認められた ($R=0.65, P<0.0001$).

6) 自然流産であつた症例の妊娠成立周期に排卵誘発薬は併用されていない.

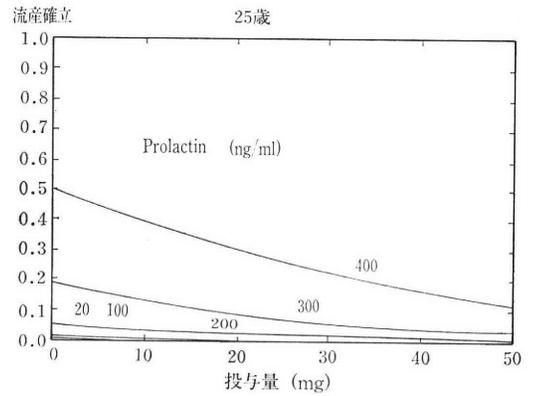


図 3 妊娠成立後の Lisuride の投与総量および Lisuride 投与前 prolactin 値と自然流産確率

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(-15.6208 + 0.3869X_1 + 0.0148X_2 - 0.04026X_3)}}$$

$X_1 = \text{妊娠成立時年齢}$
 $X_2 = \text{Lisuride 投与前 prolactin 値 (ng/ml)}$
 $X_3 = \text{妊娠成立後 Lisuride 投与総量}$

7) 自然流産に関連する因子の logistic model 分析 (表 5).

この分析は, 自然流産のリスクに関連すると考えられる因子が及ぼす影響を表わすパラメータ値を推定し, これ (推定パラメータ値) が有意にそのリスクに関連する因子であるかどうかを決定するために行なわれた. 因子として, 上述の結果から, 妊娠時の患者の年齢, Lisuride 投与前の血中 prolactin 値と妊娠成立後の Lisuride 投与総量が選ばれた.

分析の結果, 血中 prolactin 値のパラメータが有意に ($P<0.01$) 関連していることが分かつた. 一方, 患者の

表 6 出生時および1歳時の体重および身長 (平均±SE)

項目	全体	男	女	
出生時	体重 g	3166.9±53.2(24)	3119.2±67.4(12)	3214.7±83.1(12)
	身長 cm	49.5± 0.4(22)	49.6± 0.7(12)	49.5± 0.4(10)
1歳時	体重 g	9.86± 0.2(17)	10.16± 0.3(10)	9.42± 0.1(7)
	身長 cm	75.1± 0.4(16)	75.0± 0.3(9)	75.3± 0.8(7)

() は症例数

表 7 生後1年までの発育状況 (平均±SEカ月)

観察項目	全体	男	女
首すわり	2.97±0.16(18)	2.95±0.28(10)	3.00±0.10(8)
寝がえり	5.08±0.33(18)	5.35±0.48(10)	4.75±0.44(8)
這い始め	7.50±0.25(18)	7.60±0.34(10)	7.38±0.37(8)
ひとり座り	7.00±0.28(18)	6.90±0.35(10)	7.13±0.48(8)
ひとり歩き	11.39±0.37(18)	11.10±0.59(10)	11.75±0.56(8)
あやすと笑う	2.68±0.17(17)	2.70±0.27(10)	2.64±0.18(7)
命令の理解	10.44±0.91(17)	11.10±1.34(10)	9.50±1.13(7)
片言をいう	10.72±0.54(18)	11.50±0.81(10)	9.75±0.45(8)

() は症例数

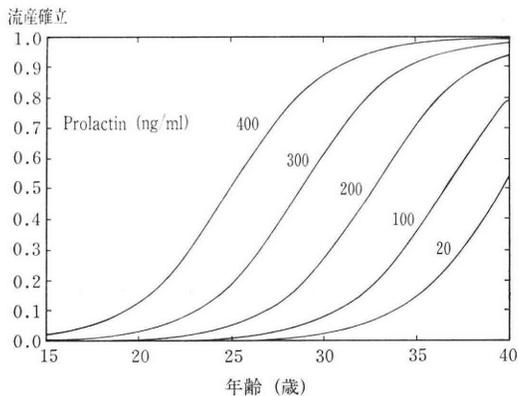


図 4 妊娠成立時年齢と血清 prolactin 値と自然流産確率

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(-15.6208 + 0.3869x_1 + 0.0148x_2)}}$$

X1=妊娠成立時年齢
X2=Lisuride 投与前 prolactin 値 (ng/ml)

年齢のパラメータは P<0.1において有意であった。そこで、この2つのパラメータを用いた logistic modelにより自然流産率を図2に示した。

すなわち、血中 prolactin 値および年齢の増加と共に自然流産率が上昇することが分かる。Lisuride 投与総量と血中 prolactin 値をパラメータとした logistic modelによる自然流産確率を図3に示した。Lisuride の総投与

量が自然流産率に無関係であることが示されている。年齢を横軸にした自然流産率を図4に示した。ある年齢から急激に自然流産率が上昇することが分かる。

一方、Spearman の相関分析によると、年齢と血中 prolactin 値あるいは妊娠後 Lisuride 総投与量との間には有意な相関はなかった(それぞれ R=0.25あるいは0.38)。

8) 満1歳までの心身の発育 (表6, 7)

32例の出生時および満1歳時の体重および身長は、男女ともに、昭和61年国民の福祉の動向：厚生指標に示された昭和55年のものとほぼ同じである。1例を除いた32例の満1歳までの心身の発育過程は、また標準的なものであった⁶⁾。1例は遺伝疾患である Werdnig-Hoffman's paralysis で生後7ヶ月に死亡した。

考 察

われわれは、Lisuride が高 prolactin 血症性無月経 (prolactinoma, Argonz-del Castillo 症候群および Chiari-Frommel 症候群) や黄体機能不全症の治療に有効であり、安全であることを示してきた^{2,3)}。今回、それらの治療において妊娠した33例中、追跡調査が可能であった32例の妊娠の転帰および26例の出生児の一歳までの心身の発育状況を報告した。なお、この試験における妊娠率は29.9%であり、日本における Parlodel の妊娠率45.3%⁷⁾より低い。これは、われわれの試験は Lisuride

の至適投与量を決定するためのものであつたこと（1日600ugの投与量の場合では、妊娠率は46%であつた）と、Parlodelの報告の妊娠の24.3%にも排卵誘発薬が併用されていた（われわれの場合は12.5%）ことと、黄体機能不全の患者が比較的多数含まれていたことによると考えられる。さらに、表1と2に疾患別あるいは月経状態別に妊娠率を示したが、上述のように Lisurideの投与量が一定していないので、これらはそれぞれの疾患や月経状態における正確な妊娠率を示していないであろう。しかし、prolactinoma群の妊娠率が非prolactinoma性無月経群よりも低く、黄体機能不全症候群の妊娠率が無月経群より低いことは、Parlodelの場合と同じ傾向であつた。これらは、prolactinomaの場合にはより血中prolactin値が高く（図1）、従つて薬剤によりより卵巣機能が回復しにくいこと⁸⁾、そして黄体機能不全症の場合にはprolactin以外の他の因子がその原因として存在することによると思われる。

Argonz-del Castillo 症候群、Chiari-Frommel 症候群や非手術prolactinomaのような高prolactin血症の場合に、いずれの場合も妊娠した症例の血中prolactin値はより低い傾向が認められた（図1）。

今回、Lisurideにより妊娠して追跡調査しえた32例中正期産をしたのは75.0%（24例）であつた。すべての新生児に、観察されえた限りにおいて、全く異常は認められなかつた。しかし、妊娠22週に無脳児のために人工妊娠中絶をした1例があつた。日本における最近の調査⁹⁾（1972-1983）では、その無脳児の発生は出生10,000に8.7であり、諸外国でも好発地域の北アイルランド（19.8%）以外では2.5から7.3である¹⁰⁾。従つて、Lisurideの治験において症例数がさらに増加しないと無脳児の発生率を正確にいうことはできない。Parlodelの場合に、無脳児の発生率は出生数の0.44%（同じ施設における自然排卵妊娠の場合に0.17%）であると報告されている⁷⁾。

Lisurideの他の治験において、出生478例中に無脳児は認められていない¹¹⁾。麦角剤治療の際の無脳児の発生率の高低に関してはさらに多数例での検討が必要と考えられる。

男女比は1:1であり、すべて単胎であつた。Lisurideの多数例の出生例の報告では男女比は不明であるが、多胎（すべて双胎）発生率は0.19%で、自然排卵妊娠の場合と変わらない¹¹⁾。Parlodelの場合、男女比は106:100⁷⁾、多胎発生率は1.1%⁷⁾あるいは1.8%¹²⁾であると報告されている。

われわれの正期産例には奇形は認められなかつたが、多数例の報告において、Lisurideの場合2.4%¹¹⁾、そしてParlodelの場合1.8%⁷⁾あるいは3.5%¹²⁾とされてい

る。いずれの場合の著者も、これらの薬剤に催奇形性は認められないとしている。ちなみに、日本における前述の調査⁹⁾では、奇形発生率は0.8%である。Lisurideは、マウス、ラット、ウサギおよびサルにおいて催奇形性はないことが示されている^{11,13,14)}。Parlodelもまた動物実験において催奇形性を示していない。

われわれの治験において、自然流産率は18.8%であつた。多数例の治験成績ではLisurideの場合9.2%であり¹¹⁾、Parlodelの場合10.1%⁷⁾あるいは11.1%¹²⁾と報告されている。自然排卵妊娠の場合、自然流産率は報告者によつて大きい開きがあるが、Willamsの産科学教科書に記載されているように、常識的には約10%である。これらを比較すると、われわれの自然流産率は高かつた。これらの自然流産症例の詳細を表3に、自然流産群と正期産群の背景因子の比較を表4に示した。自然流産群と正期産群との間で、平均年齢に有意差はなかつたが、前者に高年齢者が多く含まれていることが注目される。すなわち、自然流産の6例中4例に32歳以上（32, 33, 36および38歳）が含まれていた。

Hassold and Chiu (1985)¹⁵⁾あるいは椎名ら (1984)¹⁶⁾によると、32歳以後あるいは35歳以後、自然流産率は急速に上昇し、前者の報告では32歳から39歳の間にそれは17.6%から27.0%に上昇し、後者の報告では35歳から39歳でのそれは23.2%である。従つて、われわれの自然流産率には年齢の因子が大きく関与していると考えられる。事実、われわれの治験の中に32歳未満の患者は20例いたが、これらのうち2例（10%）が自然流産したにすぎなかつた。

表4に示したように、自然流産群により高頻度に含まれる背景因子は、年齢以外ではprolactinoma、薬剤投与前の血中prolactin値 ≥ 267 ng/ml、Lisuride一日投与量600ugおよび妊娠成立後のLisuride投与総量であつた。しかし、表4から分かるように、これらの因子すべてに高年齢（32歳以上）の因子が関与している。すなわち、表4の分析からは、今回のわれわれの治験における高い自然流産率は、主に高年齢妊娠によると考えるのが妥当である。

Lisuride投与前の血中prolactin値は、自然流産群が正期産群よりも有意に高値であつた（表4）。これは、prolactinomaの症例が前者により多数含まれたことによると考えられる。さらに、妊娠成立後のLisuride投与総量は前者が有意に高かつた。血中prolactin値も妊娠成立後のLisuride投与量も、直接自然流産率に関連しないであろうことは前述したが、特に妊娠成立後のLisuride投与総量の自然流産率との関連性の有無をさらにlogistic modelの分析により検討した（表5）。その

結果、妊娠成立後の Lisuride 投与総量は自然流産率の有無に関与しないことが示された (図3). 図4に示したように、年齢が高くなると、血中 prolactin 値の高さと共に自然流産率を上昇させる結果となっている。これは、おそらく自然流産症例6例中4例が32歳以上であり、この4例中3例の血中 prolactin 値が267ng/ml 以上の高値であったことによると考えられる。一方、この血中 prolactin 値と年齢のあいだに有意な相関が認められなかった。しかし、血中 prolactin 値が267ng/ml 以上の群では32歳以上の症例の頻度が60%となり、267ng/ml 未満における12%より明らかに高くなる (表4). この様な傾向は図4によく反映されている。すなわち、ある年齢から急激に自然流産率が上昇する。このような現象は血中 prolactin 濃度に無関係に一般的に認められているものである^{15,16)}。

出生児の満1歳までの心身の発育は、1例が遺伝性疾患で死亡したことを除いては、標準と差がなかった (表6, 7). Parlodel についても同様な結果が報告されている¹⁷⁾。卵管妊娠が1例 (3.1%) 認められたが、一般に子宮外妊娠は200から300の妊娠に1例の発生率であるので、Lisuride 投与に関連するかどうかを確認するためには、さらに多数例での検討が必要である。540件の妊娠例の報告では、それは1.14%であった¹¹⁾。Parlodel の治験では100例中1例であった。

以上、われわれおよび諸家の成績は、Lisuride 投与により妊娠が成立した時、たとえ妊娠初期に Lisuride が投与され続けても、胎児および出産後1年以上の心身の発育に Lisuride が影響しないことを示す。しかし、これらはまだ少数例における検討であるので、妊娠成立が判明した時にはただちに Lisuride の投与は中止されるべきであると考えられる。

文 献

- 1) Calne, D. B., Horowski, R., McDonald, R. J. and Wuttke, W.: Lisuride and Other Dopamin Agonists. New York, Raven Press, 1983.
- 2) Lisuride 研究会: Dopaminergic ergot compound, Lisuride hydrogen maleate の高 Prolactin 血症, 乳汁漏出症および黄体機能不全症に対する至適投与量の決定. 日不妊誌, 31: 18, 1986.
- 3) Lisuride 研究会: Lisuride の下垂体前葉, 甲状腺および副腎皮質機能に対する影響. 日不妊誌, 31: 57, 1986.
- 4) 重松逸造, 柴田直義, 玉城英彦: 疫学, 臨床医学のための患者対照研究法. 東京, ソフトサイエンス社, 1985.
- 5) Siegel, S.: Nonparametric statistics for be-

havioral sciences. New York, McGraw-Hill, 1956.

- 6) 高津忠雄: 小児科学, 東京, 医学書院, 1974.
- 7) Parlodel 高プロラクチン血症研究会: Bromocriptine (Parlodel) による卵巣機能不全の治療. 産と婦, 48: 117, 1981.
- 8) Lisuride 研究会: マレイン酸リスライドパイロット試験結果 (未発表).
- 9) 住吉好雄, 野嶽幸正, 桑原慶紀, 皆川 進, 野末源一, 斎藤 幹, 五味洸政人, 森山 豊: 日本母性保護医協会の外表奇形等調査の統計. 産婦の世界, 37: 35, 1985.
- 10) 9) 参照
- 11) Scholz, A and Horowski, R: Clinical course and outcome of pregnancies achieved on treatment with the strong dopamine agonist Lisuride. Fertil. Steril., in press.
- 12) Turkaij, N., Braun, P. and Krupp, P.: Surveillance of Bromocriptine in pregnancy. JAMA, 247: 1589, 1982.
- 13) 児玉直巳, 坪田邦広, 江角吉造: Lisuride hydrogen maleate の生殖試験 (第2報) — マウスにおける胎仔の器官形成期投与試験 —, 基礎と臨床, 15: 2311, 1981.
- 14) 児玉直巳, 坪田邦広, 江角吉造: Lisuride hydrogen maleate の生殖試験 (第3報) — ウサギにおける胎仔の器官形成期投与試験 —, 基礎と臨床, 15: 2338, 1981.
- 15) Hassold, T. and Chiu, D.: Maternal age-specific rates of numerical chromosomes abnormalities with special reference to trisomy. Hum. Genet., 70: 11, 1985.
- 16) 椎名美博, 奥山和彦, 竹田和希, 松浦敏章, 阿部 博, 岩崎寛治, 田畑雅章, 土門洋哉, 荒川涉, 新開奈保子, 木脇祐晋, 一戸喜兵衛: 母性の加齢と自然流産の頻度について. 北海道医誌, 59: 17, 1984.
- 17) Parlodel 高プロラクチン血症研究会 (代表倉智敬一): 妊娠中にプロモクリプチンの投与を受けたプロラクチノーマを主とする下垂体腫瘍症例における妊娠の転機と新生児所見. 産と婦, 52: 1689, 1985.

The outcome of pregnancy and newborns after Lisuride therapy of patients with Argonz-del Castillo syndrome, Chiari-Frommel syndrome, Prolactinoma and Corpus luteum insufficiency

Takuro Kobayahi et al.

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

Thirty-three patients with Argonz-del Castillo

syndrome (14 cases), Chiari-Frommel syndrome (2 cases), Prolactinoma (12 cases) and Corpus luteum insufficiency (4 cases) were conceived by the treatment of Lisuride. Thirty-two patients were investigated for the outcome of pregnancy and the newborns at one year of age. Lisuride was administered in the total dose of 0.75-109.8 mg for 10-211 days before conception and 0.825-16.8 mg for 3-75 days after conception.

Twenty-four patients (75.0%) had normal-term delivery of single baby, 6 (18.8%) spontaneous abortion, 1 artificial abortion at 22 weeks of gestation for the anencephalus and 1 tubal pregnancy. The spontaneous abortion was analysed to be related to the high age of the patients

(mean \pm SE 33.0 \pm 1.41 years old). The newborns of term delivery were found to have no abnormalities and developed normally at one year of age except one infant who died of the genetic disease at 7 months of age.

It is difficult to discuss the incidence of anencephalus in the present study of a small number of patients, but no anencephalus was reported in the other study of 478 newborns. These results indicate that Lisuride is a safe drug for the treatment of the above mentioned disease, for pregnancy.

(受付：昭和62年2月17日特別掲載)

Gestrinone の子宮内膜症に対する効果

—Gestrinone 投与の臨床効果と内分泌学的変化の検討—

Studies of Clinical and Endocrinological Effects of Gestrinone on Endometriosis

大分医科大学産婦人科

友成 廉平 酒井 美鈴 飯野 好明

Rempei TOMONARI Misuzu SAKAI Yoshiaki IINO

貞永 明美 松岡 良 水谷 勝美

Akemi SADANAGA Ryo MASTUOKA Katsumi MIZUTANI

森 宏之 木川 源則

Hiroyuki MORI Tomonori KIGAWA

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

Gestrinone を Beecham 分類Ⅱ～Ⅲ期の子宮内膜症患者25名（A群；5 mg/week の低用量群11名，B-D群；7.5-10mg/week の高用量群14名）に投与し，その臨床効果と内分泌動態について検討した．低用量群のうちの2例を除き，排卵は抑制され，自覚的に改善をみた．副作用としては瘡瘻・体重増加・哽声の一部にみられた．投与終了後1カ月以内に全例に排卵が回復した．また血中 CA-125は投与後2週目より有意に低下した．内分泌学的には，Gestrinone の投与により，LH，FSH，prolactin の基礎値は影響されなかったが，LH，FSH の分泌予備能は低用量で亢進，高用量で低下，prolactin の分泌予備能は低用量で低下した．また，estradiol，progesterone は低下したが，estradiol の低下は閉経期レベルまでの低下でなかった．testosterone は両群とも有意に低下した．以上のことより，Gestrinone の子宮内膜症への効果は中枢への作用・卵巣への作用というより，むしろ内膜組織への直接作用であることが推定された．

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 500-507, 1987)

緒言

近年我国でも増加しているといわれる子宮内膜症は，性成熟期の女性に発症し，不妊の原因となるため，生殖能温存をはかりながら治療を行うことが重要である．本症の保存治療としては gestagen 剤の投与，pill，androgen 投与などが行われてきた．しかし，これらには自覚的な副作用が高率に発生するのみならず，投与終了後の再発率などの点からみても必ずしも満足すべき効果が得られなかった．

近年，Danazol が偽閉経療法の名の下に投与されるようになり，その効果は従前の保存療法に比して優れていることは周知のとおりである．しかし，その副作用であるアンドロゲン作用および多量のステロイドを投与することに起因する肝機能障害は，Danazol 療法も必ず

しも理想的な薬剤でないことを示している．近年，より強力な gonadotropin 抑制剤として開発され，週1回内服の経口避妊薬¹⁻³⁾としても臨床応用が試みられている Gestrinone⁴⁻⁷⁾ (13 β -ethyl-17 α -ethyl-17-hydroxy-gona 4, 9, 11-trine-3-one: 図1) が子宮内膜症の治療にも有効であることが報じられている⁸⁾．そこで今回われわれは，Gestrinone により子宮内膜症の治療を試み，その有効性と同時に投与中の内分泌動態を検討したので報告する．

対象および研究方法

対象は，昭和59年3月10日より昭和60年8月9日まで大分医科大学産婦人科を受診し，腹腔鏡・開腹所見・臨床所見等により子宮内膜症と診断された21歳から46歳までの正常経周期を有する25名であり，口頭により投与の

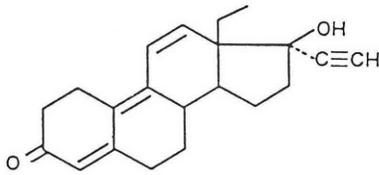


図 1 Gestrinone の構造式

表 1 各群における Gestrinone の投与方法別の患者の年齢

Group	Dose of Gestrinone (/week)	Numbers of cases	Mean age (years±S.D.) (range in years)
A	2.5mg/day×2	11	32.5±8.0 (21-46)
B-D		14	30.1±6.4 (22-41)
(B)	5.0mg/day×2	4	29.5±7.6 (22-37)
(C)	2.5mg/day×3	5	30.2±6.7 (25-37)
(D)	5.0mg/day×2 for 4 weeks-2.5mg/day×2	5	30.6±6.6 (23-41)

承諾を得た。日本ルセル株式会社より提供された Gestrinone (R2323) 2.5mg カプセルを 4 群に分けて投与した。A 群 11 名は Gestrinone 2.5mg の週 2 回投与、B 群 4 名は 5mg の週 2 回投与、C 群 5 名は 2.5mg の週 3 回投与、D 群 5 名はまず 5mg の週 2 回投与を 4 週間行い、ひき続いて 2.5mg の週 2 回投与を行つた。A 群は 26 週で中止した 1 例を除き、10 例は 32 週間の投与を行つたのち、6 ヶ月以上の follow up を行つた。B, C, D 群は 24 週間の投与を行つた。B, C, D 群はそれぞれの例数が少ないため、高用量投与群として一括し、それらに比して低用量投与群である A 群との比較を行つた (表 1)。

対象の背景因子は以下の通りであつた。

1. 年齢および進行期分類

年齢は 21 歳から 46 歳まで、その平均年齢は A 群 32.5 ± 8.0 歳 (Mean ± SD), B-D 群 30.1 ± 6.4 歳 (B 群 29.5 ± 7.6 歳, C 群 30.2 ± 6.7 歳, D 群 30.6 ± 6.6 歳) で、各群の年齢分布に差はみられなかつた (表 1)。

進行期分類は Beecham の分類にしたがって行い、A-D 群に属する全例が II ~ III 期であつた。また A 群と

表 2 対象の進行期分類 (Beecham の分類による)

stage	Group A	Group B-D
1	0 (0)	0 (0)
2	6 (54.5)	8 (57.1)
3	5 (45.5)	6 (42.9)
4	0 (0)	0 (0)
total	11 (100)	14 (100)

() : %

表 3 子宮内膜症の発生部位

	Group A	Group B-D
Ovary	3 (27.2)	1 (7.1)
Douglas	11 (100)	14 (100)
Adnexa	1 (9.1)	1 (7.1)
Sacro. Ut.	2 (18.2)	1 (7.1)
Adenomyosis	2 (18.2)	2 (14.2)
Vagina	0 (0)	1 (7.1)

() : %

表 4 Gestrinone 投与前の自覚症状
月経時の自覚症状

過多月経	9 (38)*
月経困難症	22 (88)
下腹痛	19 (76)
腰痛	18 (72)
排便痛	5 (20)
悪心	2 (8)
頭痛	1 (4)

月経時以外の自覚症状

内診時痛	21 (88)
下腹痛	15 (60)
腰痛	14 (56)
性交痛	8 (32)
排便痛	6 (24)

* : 子宮摘出術後を一名除く () : %

B-D 群との間に進行期分類の分布に差はみられなかつた (表 2)。

2. 発生部位

子宮内膜症の発生部位は全例にダグラス窩の病変が認められた。以下、卵巢 27.2%, 仙骨子宮靭帯の順であつた (表 3)。

3. 投与前の自覚症状

月経時の自覚症状は、月経困難症が 22 例 (88%) にみ

表 5 Gestrinone 投与中の性器出血

	Group A	Group B-D
Menstruation-like bleeding	6 (60)	3 (21)
Spotting	9 (90)	11 (79)
No bleeding	0 (0)	2 (14)

() : %

表 6 Gestrinone 投与中の自覚症状の変化

	Group A	Group B-D
Clearly improved	3 (30)	2 (14.3)
Partially improved	6 (60)	11 (78.6)
Unchanged	1 (10)	1 (7.1)
Aggravated	0 (0)	0 (0.0)
total	10 (100)	14 (100)

() : %

られ、下腹部痛19例 (76%)、腰痛18例 (72%) の順であった。過多月経が9例 (36%) にみられた。月経時以外の自覚症状は、内診時の疼痛21例 (84%)、下腹部痛15例 (60%)、腰痛、性交痛、排便痛の順であった (表4)。

投与は基礎体温を記録させながら行い、月経周期3~5日に開始した。開始後2~4週毎に自覚症状・他覚所見の変化および副作用の有無を確認し、同時に FSH, LH, prolactin, estradiol progesterone, testosterone を RIA により測定した。LH, FSH, prolactin, estradiol, progesterone は第一ラジオアイソトープ社製, testosterone は栄研化学社製のキットを使用した。

成 績

1. 基礎体温の変化

Gestrinone 投与により殆どどの症例は基礎体温が低温一相性を示したが、低用量群のA群では基礎体温上の排卵が投与開始後4週で11例中2例 (18%)、投与開始後20週で11例中1例 (9%) にみられた。B-D群では全て投与開始後より低温一相性を示した。

2. 投与中の性器出血

A群では Gestrinone 投与中の性器出血は全例にみられ、その内10例中6例 (60%) は月経様出血であった。また、10例中9例 (90%) にはspotting がみられた。B-D 群では、月経様出血がみられた症例は14例中3例 (21%) であり、spotting がみられた症例は14例中11例 (79%) であった。B-D 群で性器出血のみられなかつた症例は2例であった (表5)。

3. 投与中の自覚症状の変化

表 7 Gestrinone 投与終了後の初回月経時の月経困難症の変化

	Group A	Group B-D
Clearly improved	2 (20)	3 (42.9)
Partially improved	6 (60)	2 (28.6)
Unchanged	2 (20)	2 (28.6)
Aggravated	0 (0)	0 (0.0)
total	10 (100)	7 (100)

() : %

表 8 Gestrinone 投与終了後の他覚所見の変化

	Group A	Group B-D
Clearly improved	3 (30)	5 (35.7)
Partially improved	6 (60)	6 (42.9)
Unchanged	1 (10)	3 (21.4)
Aggravated	0 (0)	0 (0.0)
total	10 (100)	14 (100)

() : %

表 9 Gestrinone 投与終了後の月経再来直後の他覚所見の変化

	Group A	Group B-D
Clearly improved	2 (20)	2 (40)
Partially improved	7 (70)	2 (40)
Unchanged	1 (10)	1 (20)
Aggravated	0 (0)	0 (0)
total	10 (100)	5 (100)

() : %

性器出血時の疼痛はA群の一例を除き全例に改善がみられた。性器出血時以外の自覚症状は、投与初期より全般的に改善し、最終投与時の自覚症状はA群、B-D 群ともに90%以上の症例に改善がみられた (表6)。

4. 投与後の初回月経発来時の自覚症状の変化

投与後の初回月経時の月経困難症状は、投与前に比してA群、B-D 群とも70~80%の改善がみられた。B-D 群には著明改善が多い傾向にあつたが、不変なものも多く、両群間に差はないと考えられた (表7)。

5. 他覚所見の変化

他覚所見の改善は、自覚症状が投与初期より改善したのに比して遅れ、投与開始後8週以降に改善がみられた。投与終了時には、A群、B-D 群で80~90%の改善がみられ、自覚症状の改善率とほぼ一致した。両者にお

表 10 Gestrinone 投与中の副作用

Weight gain more than 3k g	11 cases (44)
Acne	18 cases (72)
Voice change	7 cases*(28)
Edema	1 cases (4)
Skin rash	2 cases (8)
Hot flash	2 cases (8)
Shoulder pain	1 cases (4)
Arthralgia	5 cases (20)
Night sweat	4 cases (16)
General malaise	5 cases (20)
Palpitation	1 cases (4)
Nausea	3 cases (12)
Back pain	1 cases (4)
No side effect	2 cases (8)

* all cases was included in Group B-D () : %

ける著明改善率は約1/3で差はみられなかった(表8)。投与終了後の月経再来直後の他覚所見の改善も表9のとおりであり、投与終了時の改善率とほぼ一致していた。

6. 投与終了後の follow up study

B-D 群では follow up 期間が不十分であったため、A群で6カ月まで follow を行い得た10例について検討した。6カ月間の follow up 中、月経困難症状は初回月経再来時と変わらず、非月経時の自覚症状と他覚所見は投与前へと戻った例は2例(20%)で、Gestrinone の効果は大略投与終了後6カ月間は持続した。

7. 副作用

副作用は表10に示したものがみられた。瘡瘡が A-D 群25例中18例(72%)と高率に出現し、体重増加(3kg以上)が11例(44%)、嘔声が7例(28%)と高率にみられ、また関節痛、全身倦怠感、盗汗などが目立った。ほとんどの副作用は投与終了後速やかに消失したが、瘡瘡と嘔声の消失はやや遅れる傾向があった。

臨床検査所見では、LDH, GOT, GPT の上昇がそれぞれ7例(28%)、4例(16%)、10例(40%)にみられた。一般検血では、RBC Ht, Hb, platelet の上昇が10~30%にみられた。しかし、いずれも高度ではなく、全例投与終了後2カ月以内に正常化した。

8. CA-125の変動

高用量群の5例について Gestrinone を投与前より2週毎に測定した。投与前は102.6±29.31U/ml (Mean±S. E., n=5)で、2週では24.4±5.96U/ml (Mean±S. E., n=5)と有意な低下を認め、以後低値を示した。

9. 投与終了後の性機能回復

投与終了後の排卵については、その follow up がで

きたA群10例は投与終了後平均21.5日(0~82日)、B-D 群5例は投与終了後平均22.8日(9~45日)で、全例にみられた。すなわち、投与終了後の性機能の回復は速やかであると考えられた。

10. 内分泌学的検討

A群は投与開始時(月経期)と投与終了時に血中 LH, FSH, prolactin, estradiol, progesterone, testosterone の基礎値を測定すると同時に、投与開始時(日経期)と投与開始後14~20週の間に LH-RH test, TRH test (LH-RH 100 μ g, TRH 500 μ g を同時に静脈内投与)を行って、LH, FSH, prolactin を測定した。B-D 群は投与開始時(月経期)と開始後2, 4, 8, 12, 16週に血中 LH, FSH, prolactin, estradiol (E₂), progesterone, testosterone を測定し、投与開始時(月経期)と12週に LH-RH test, TRH test (LH-RH 100 μ g, TRH 500 μ g 同時に静脈内投与)を行い、LH, FSH, prolactin を測定した。

a) LH, FSH, prolactin の基礎値の変化

B-D 群の投与中の血中 LH, FSH, prolactin の基礎値は、投与開始時(月経期)の LH 16.60±2.69mIU/ml (Mean±S. E., n=10), FSH 7.35±1.43mIU/ml (Mean±S. E., n=10), prolactin 15.19±1.20ng/ml (Mean±S. E., n=13)と比較し、16週では LH 15.20±3.20mIU/ml (Mean±S. E., n=10), FSH 7.35±1.43mIU/ml (Mean±S. E., n=10), prolactin 13.07±1.24ng/ml (Mean±S. E., n=13)と有意な変化はみられなかった(図2)。A群でも投与開始時(月経期)の LH 20.25±2.53mIU/ml (Mean±S. E., n=9), FSH 9.65±1.25mIU/ml (Mean±S. E., n=9), prolactin 12.69±1.43ng/ml (Mean±S. E., n=9)が投与終了時には LH 18.07±3.70mIU/ml (Mean±S. E., n=9), FSH 11.81±1.39mIU/ml (Mean±S. E., n=9), prolactin 10.61±0.95ng/ml (Mean±S. E., n=9)であり、B-D 群と同様に有意差はなかった。

b) E₂, progesterone, testosterone の基礎値の変化

B-D 群の血中 E₂ 値は、投与期間中投与開始時(月経期)の87.59±9.20pg/ml (Mean±S. E., n=13)に比して低値を示し、4週48.22±3.49pg/ml (Mean±S. E., n=13), 12週57.72±6.37pg/ml (Mean±S. E., n=13)と有意な抑制がみられた(P<0.001, P<0.05)。B-D 群の血中 progesterone は、全症例とも投与期間中一貫して、投与開始時(月経期)0.42±0.09ng/ml (Mean±S. E., n=10)と差は認められなかった。B-D 群の testosterone は投与開始時(月経期)より全体的に抑制傾向がみとめられ、投与開始時(月経期)0.81±0.05ng/ml (Mean±S. E., n=10)と比較し、16週では

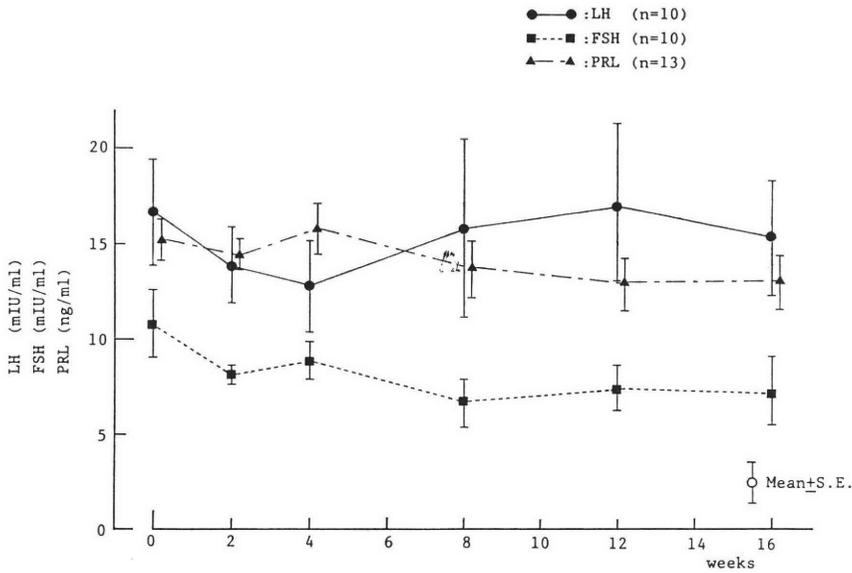


図 2 Gestrinone 投与中の血清 LH, FSH, prolactin の変化 (B-D群)

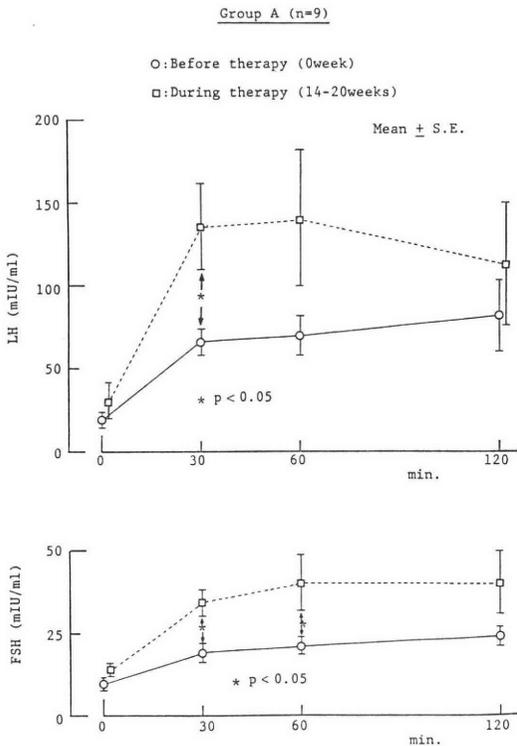


図 3 Gestrinone 投与中の LH-RH test (LH-RH 100 μ g iv) (A 群)

0.56 \pm 0.06ng/ml (Mean \pm S. E., n=10) と有意な抑制がみられた (P<0.05) (図 4). 一方 A 群では, E₂ は投与開始時 (月経期) 31.16 \pm 14.45pg/ml (Mean \pm S. E., n=3) が投与終了時 76.09 \pm 21.21pg/ml (Mean \pm S. E., n=11) と, むしろ高値を示す傾向にあった. progesterone は, 投与開始時 (月経期) 0.53 \pm 0.07ng/ml (Mean \pm S. E., n=4) が 0.74 \pm 0.23ng/ml (Mean \pm S. E., n=10) と, やはり高値を示す傾向にあった. しかし testosterone は, 投与開始時 (月経期) 0.34 \pm 0.03ng/ml (Mean \pm S. E., n=5) が投与終了時 0.20 \pm 0.03ng/ml (Mean \pm S. E., n=5) と有意な抑制を示した (P<0.05).

c) LH-RH test の結果

A 群では LH-RH に対する LH, FSH の分泌反応は, Gestrinone 投与により LH, FSH ともに全体的に response が高くなり, LH は 30 分値と比較すると, 投与開始時 (月経期) が 68.45 \pm 9.04mIU/ml (Mean \pm S. E., n=9) であつたものが投与中 136.12 \pm 26.09mIU/ml (Mean \pm S. E., n=9) となつた (P<0.05). FSH は, 30 分値を比較すると, Gestrinone 投与により 19.81 \pm 2.41mIU/ml (Mean \pm S. E., n=9) が 34.28 \pm 4.11mIU/ml (Mean \pm S. E., n=9) となり, 60 分値では 21.57 \pm 2.25mIU/ml (Mean \pm S. E., n=9), 40.61 \pm 8.15mIU/ml (Mean \pm S. E., n=9) と有意な (P<0.05) 反応性の亢進がみられた (図 3). B-D 群では LH-RH に対する LH, FSH の分泌反応は, FSH は投与による変化をうけなかつたが, LH は上述の A 群と

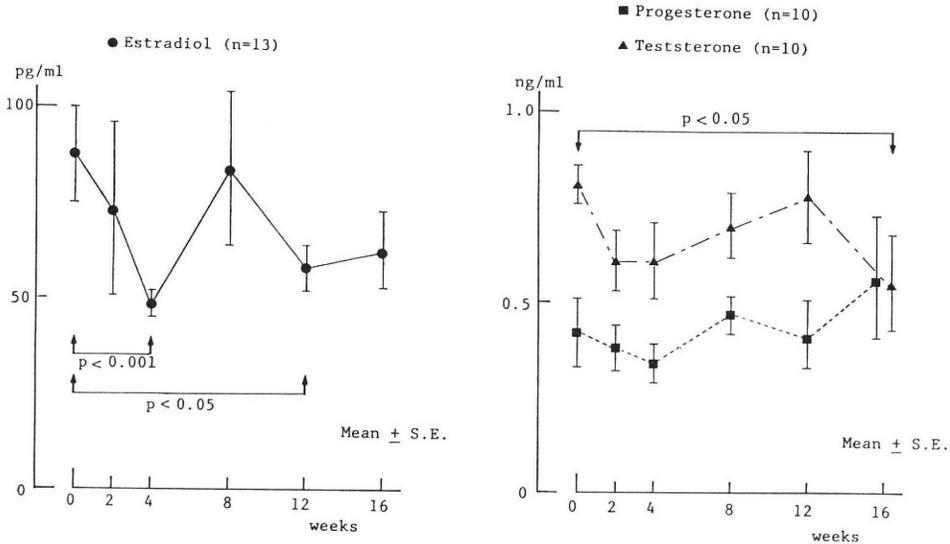


図 4 Gestrinone 投与中の E₂, progesterone, testosterone の変化 (B-D 群)

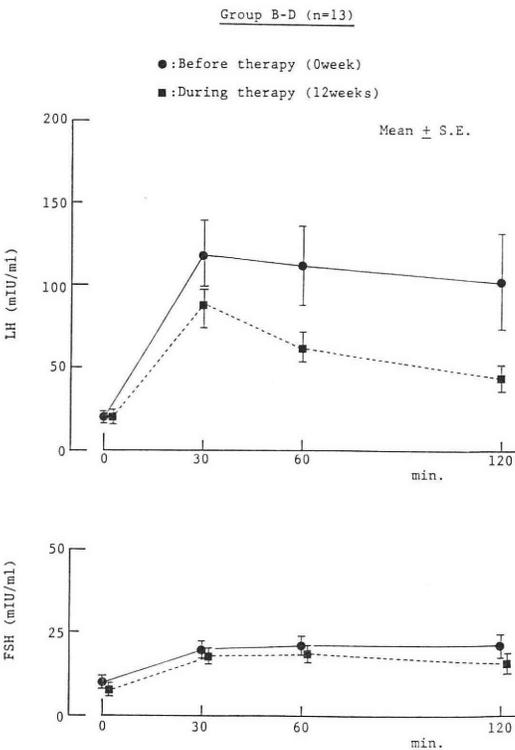


図 5 Gestrinone 投与中の LH-RH test (LH-RH 100 μ g iv) (B-D 群)

は逆に抑制傾向がみられたが有意ではなかった (図 5)。

d) TRH test の結果

A群では、投与により prolactin の反応性は全体的に

低下し、60分値を比較すると、投与開始時 (月経期) 103.19 \pm 8.78ng/ml (Mean \pm S. E., n=10) が投与により 67.16 \pm 5.73ng/mm (Mean \pm S. E., n=10) と有意に (P<0.01) 抑制された。B-D 群では投与による変化はみられなかった (図 6)。

考 案

以上の成績より、Gestrinone は子宮内膜症の治療法としてその有効性が臨床的に認められた。投与量の比較では、高用量 (7.5~10mg/week) の投与では投与中の排卵抑制の確実性は認められたが、spotting などの性器出血の割合の減少はさほどでもなく、また自覚症状および他覚所見の改善は、再来月経時での比較でも差がみられず、むしろ副作用としての嘔吐が長期に残存するという症例が多いという不利が目立つた。これらの点から総合的に判断すると、高用量の使用は投与期間が短くてすむという点を除けばその意義は少ないと考えられ、2.5 mg の週 2 回投与の方が望ましいと考えられた。

内分泌学的検索を行った結果からは、Gestrinone 投与は、① LH, FSH, prolactin の基礎値に対しては変化を与えない。②低用量の投与によって LH, FSH の分泌予備能は亢進した。③しかし、高用量の投与によっては、むしろ LH の分泌予備能はやや低下する傾向がみられた。④ prolactin の分泌予備能の変化は低用量投与によって低下した。⑤ estradiol は投与によって低下するが、その低下は閉経期レベルまでの著明なものではなかった。⑥ progesterone はやや低下する傾向がみられ

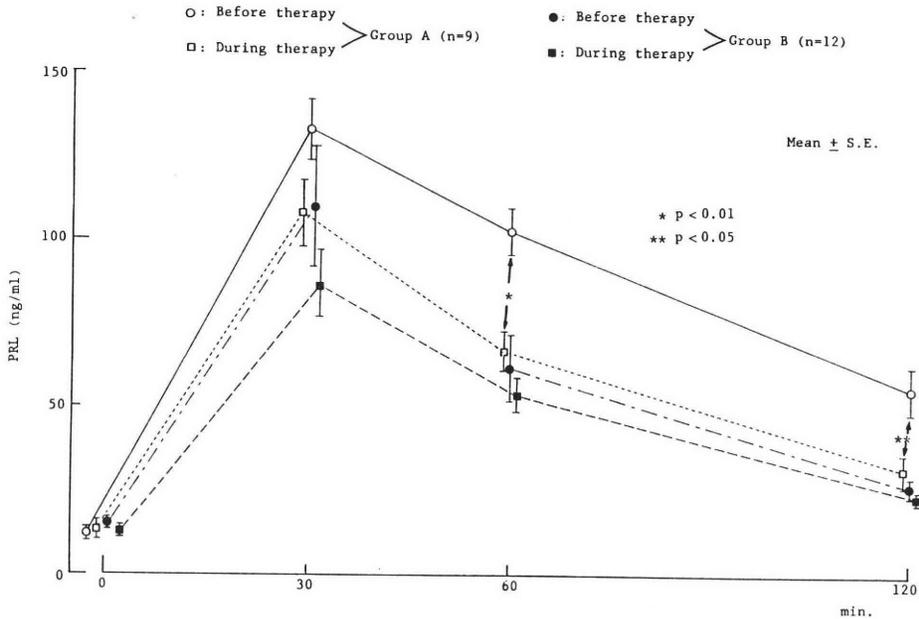


図 6 Gestrinone 投与中の TRH test (TRH 500 μ g iv) (A-D 群)

るも著明でなかった。⑦ testosterone は投与によつて低下した。以上の所見が得られた。これらからみると, gonadotropin に対する Gestrinone の効果は, 基礎値・分泌予備能のいずれの面からも抑制的な作用は少なく, 用量によってはむしろ分泌予備能の亢進がみられたことになる。このことは, Gestrinone の作用としては中枢における gonadotropin の tonic な放出を抑制するのではないことは明らかである。しかし, 1~2 の例外を除いては排卵が抑制されたことから, cyclic な gonadotropin 分泌が抑制されたことは明らかであり, Gestrinone の中枢への作用は中枢の周期性への侵襲であると推論される。

prolactin 分泌は Gestrinone 投与によつて prolactin 分泌予備能の低下はみられたが, これは投与中に低下を示した estradiol による二次的な変化として十分説明可能と考えられた。

estradiol は Gestrinone によつて低下するが, その値は閉経期レベルまでの低下ではなく, Gestrinone の臨床効果をこれによつて説明することは困難であろう。testosterone は低下したが, その変化は著しいものではなかった。

以上を総括すると, Gestrinone の子宮内膜症への効果をその投与によつてもたらされる生体の内分泌変化に求めることは困難である。唯一著しい変化は排卵の抑制であり, もしこれに Gestrinone の作用機序を求めるとすれば, 排卵抑制がここに示したような著明な直接効果

と投与終了後の遠隔効果をもたらすこととなり納得しがたい。

Gestrinone は *in vivo* において著明な抗プロゲステロン作用 (anti-decidual, anti-progestomimetic, anti-progestational, anti-implantation) と中等度の抗エストロゲン作用, 弱い抗アンドロゲン作用^{9,10}を示すほか, 下垂体のゴナドトロピン分泌阻害^{1,2}がみられるとされている。

本研究の結果からみたとき, 抗下垂体ゴナドトロピン作用は比較的弱く, また卵巣性ステロイド生成に対する作用も著しいものでなく, むしろその作用は Coutinho¹¹の述べたように, 子宮内膜組織に対する直接作用により萎縮・壊死をおこさせるものと理解できる。

文 献

- 1) Sakiz, E., Azadian-Boulanger, G., Laraque, F. and Raynaud, J. P.: A new approach to estrogen-free contraception based on progesterone receptor blockage by mid-cycle administration of ethyl norgestronone (R2323). *Contraception*, 10, 467-474, 1974.
- 2) Azadian-Boulanger, G., Secchi, J., Laraque, F., Raynaud, J. P. and Sakiz, E.: Action of a mid-cycle contraceptive (R2323) on the human endometrium. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 125, 1049-1056, 1976.
- 3) Mora, G., Faundes, A. and Johansson, E. D. B.: Lack of clinical contraceptive efficacy

of large doses of R2323 given before implantation or after a missed period. *Contraception*, 12, 211-220, 1975.

- 4) Sakiz, E., Azadian-Boulanger, G., Ojasoo, T. and Laraque, F.: Contraceptive efficacy of once-weekly oral administration of 2.5mg R2323. *Contraception*, 3, 275-284, 1976.
- 5) Teruhiko, T., Jiro, F. and Hiroji, O.: Treatment of pelvic endometriosis with Gestrinone-Report on 9 cases-. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 3, 403-409, 1985.
- 6) Coutinho, E. M., Husson, J. M. and Azadian-Boulanger, G.: Treatment of endometriosis with Gestrinone-Five-years Experience. *Medical Management of Endometriosis*, 249-261, 1984.
- 7) Robyn, C., Delogne-Desnoeck, J., Bourdoux, P. and Copinschi, G.: Endocrine effect of Gestrinone. *Medical Management of Endometriosis*, 207-221, 1984.
- 8) Mettler, L. and Azadian-Boulanger, G. (1981): Treatment of genital endometriosis particularly in female sterility comparing tolerance and efficiency of lynestrenol, danazol and R2323 in the 3-step therapy. In: *Progesterone et progestatifs*. International Symposium, Paris, 7-9 May.
- 9) Azadian-Boulanger, G., Secchi, J. and Sakiz, E. (1973): Biological study of the anti-progesterone effect of R2323. In: *Proceedings of the VII World Congress of Fertility*, Tokyo 1971, pp. 129-133, *Excerpta Medica*, Amsterdam.
- 10) Sakiz, E. and Azadian-Boulanger, G. (1971): R2323-An original contraceptive compound. In: *Hormonal Steroids*, pp. 865-871, *Excerpta Medica*, Amsterdam.
- 11) Coutinho, E. M. (1981): Conservative treatment of uterine leiomyoma with the anti-estrogen anti-progesterone R2323. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 19: 357-360.

Studies of clinical and endocrinological effects of Gestrinone on endometriosis

Rempei Tomonari, Misuzu Sakai, Yoshiaki Iino, Akemi Sadanaga, Ryo Matsuoka, Katsumi Mizutani, Hiroyuki Mori and Tomonori Kigawa

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

The clinical and endocrinological effects were examined in 25 patients with pelvic endometriosis (Beecham's stage II or III), who were treated by two regiments of Gestrinone. A low dose regiment (5 mg/week for 32 weeks) was given for II cases, and a high dose regiments (7.5-10 mg/week for 24 weeks) for 15 cases. Approximate 90% of patients responded to the both regiment and improved both subjectively and objectively. Anovulation were observed in all cases except for 2 low dose patients. The side effects, like as acne, weight gain and hoarseness were moderately stronger in a high dose group than in a low dose group, which subsided after the end of therapy. Ovulatory cycles were restored in every regiment within one month after the end of treatment. The based levels of LH, FSH and prolactin did not show any change during treatment. The increased secreting capacities of LH, FSH were found in low dose group and decreased in high dose group. Also, decreased prolactin secreting capacity was noted in low dose group. Estradiol, progesterone were decreased but not low level like as menopause. Testosterone was significantly decreased in all cases. These showed that Gestrinone makes influence on the cyclic gonadotropin secretion not on the tonic gonadotropin secretion, and that Gestrinone dose not completely abolish the ovarian function. It is suggested that Gestrinone effects directly on the endometrial tissue.

(受付: 昭和62年2月12日特別掲載)

EFFECTS OF DANAZOL ON PERI- AND POST-MENOPAUSAL DYSFUNCTIONAL UTERINE BLEEDING AND ON SERUM STEROID LEVELS

Nobuaki FURUHASHI, Kazuhiro TAKAHAMA, Akira YAJIMA,
Takao FUKAYA and Osamu SHINKAWA

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

Abstract: The clinical and hormonal effects of danazol were studied in women with peri- or post-menopausal uterine bleeding. After 2 weeks danazol treatment, the dysfunctional uterine bleeding has stopped in 21 cases except one endometrial polyp and one endometrial cancer cases. Serum estradiol levels after danazol treatment reduced significantly ($P < 0.05$) in both peri- and post-menopausal patients. Serum progesterone levels after danazol treatment reduced slightly. Serum testosterone levels after treatment increased significantly ($P < 0.01$) in peri-menopausal women.

These data suggest that the clinical effect of danazol for the dysfunctional uterine bleeding in peri- and post-menopausal women might be due to the androgenic and/or anti-estrogenic effect of danazol.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 508-510, 1987)

Introduction

Dysfunctional uterine bleeding occurs with increasing frequency as women approach the menopause. Each patient with peri- and post-menopausal dysfunctional uterine bleeding must be thoroughly investigated due to the increased incidence of malignant neoplasia that may occur at the time of menopause. Some sex steroids, such as androgen, progesterin, estrogen are given for treatment of these peri- and post-menopausal dysfunctional uterine bleeding. Danazol therapy has been widely used to treat endometriosis. Danazol has been reported some androgenic effect¹⁾ and anti-gonadotropic effect^{3,7)}.

In this study, danazol was given for treatment of peri- and post-menopausal dysfunctional uterine bleeding, and investigated serum steroid levels before and after danazol treatment.

Materials and Methods

Subjects

The subjects were 23 women with peri- or post-menopausal dysfunctional uterine bleeding. After 2 weeks danazol treatment, one endometrial polyp and one endometrial cancer cases were excluded. Serum steroid levels analysis were done for 21 patients. In these subjects, pre-menopausal women were 17 cases (mean age, 46.5 ± 1.3 years, mean \pm S.E.) and postmenopausal women were 4 cases (mean age, 56.0 ± 1.6 years). All patients were given danazol at a dose of 400 mg/day for 2 weeks. The blood samples were obtained before and after 2 weeks of treatment.

The blood samples were collected in tubes and were allowed to clot, and serum was separated by centrifugation and stored at -20°C until assay.

Hormone analysis

Serum estradiol (E_2), progesterone (P) and testosterone (T) were measured by the RIA technique with dextran-coated charcoal to separate the free and bound hormone as previously reported^{4,5)}.

The endometrial Papanicolaou analysis and

Table 1 Endometrial histology in dysfunctional uterine bleeding

Endometrial histology	Case number
Proliferative	7
Afunctional	5
Hyperplasia	4
Atrophic	3
Secretory	2
Polyp	1
Adenocarcinoma	1
totals	23

endometrial biopsy were done in all 23 patients before danazol treatment.

Statistical analysis

Group data were subjected to the Student's t test for significance of difference.

Results

Endometrial histology in 23 dysfunctional uterine bleeding patients were shown in Table 1. One endometrial polyp and one endometrial cancer patients were excluded from serum hormone analysis.

Mean basal serum levels of E₂, P and T in peri-menopausal women were 47.4±10.6 pg/ml, 43.4±4.2 ng/100 ml, and 46.2±3.5 ng/100 ml, respectively. In post-menopausal women, mean basal serum levels of E₂, P and T were 19.8±1.5 pg/ml, 42.5±12.5 ng/100 ml and 39.8±7.3 ng/100 ml, respectively. There was no statistical significant difference of mean basal serum steroid levels between peri-menopausal women and post-menopausal women in this study. Serum steroid levels after 2 weeks danazol treatment and given in Figure 1. Serum estradiol decreased significantly (P<0.05) in peri-menopausal women (22.0±3.2 pg/ml) and post-menopausal women (13.3±1.4 pg/ml) after 2 weeks danazol treatment. Serum progesterone decreased slightly after danazol treatment both in peri- and post-menopausal women.

Serum testosterone increased significantly (P<0.01) in peri-menopausal women (60.6±5.6 ng/100 ml). On the other hand, serum testosterone in post-menopausal women increased slightly (59.5±5.7 ng/100 ml) after treatment.

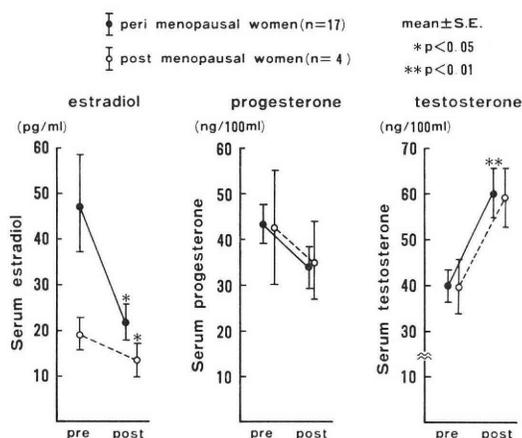


Fig. 1 Serum steroid levels pre and post danazol treatment

All changes in mean values of the different compounds (WBC, RBC, Ht, Pt, Hb, SGOT, SGPT) measured after danazol treatment were within the normal reference limits.

Discussion

Abnormal uterine bleeding occurs with increasing frequency as women approach the menopause. Each patients with abnormal bleeding must be thoroughly investigated, due to the increased incidence of premalignant and malignant neoplasia. In this study, we found one endometrial cancer patients (1/23, 4.3%), and in this case the abnormal uterine bleeding was not stop after danazol treatment. There are several hormone therapies, such as estrogens, progestational agents and androgen agents for dysfunctional uterine bleeding in peri- and post-menopausal women. In this study, we applied the anti-gonadotropic effect and/or androgenic effect of danazol for the dysfunctional uterine bleeding in such women. Twenty-one cases in 23 cases of patients, the dysfunctional uterine bleeding stopped after 2 weeks danazol treatment. However, in one endometrial cancer and one endometrial polyp patients, the abnormal uterine bleeding could not be stopped. So, danazol treatment is possible to make a differential diagnose between dysfunctional uterine bleeding and endometrial neoplasia before we will get a endometrial histological result.

It was suggested that post-menopausal bleeding might be due to either endogenous or

exogenous estrogens. We have measured serum estradiol, progesterone and testosterone levels before and after 2 weeks danazol treatment to investigate some relationship between these steroid levels and dysfunctional uterine bleeding. There were several previous reports about changing patterns of serum steroid levels after danazol treatment and results have been conflicting. It might be due to the antibodies for radioimmunoassay. In this study, basal serum estradiol levels of peri- and post-menopausal women were very similar as previous our report⁴⁾. Serum estradiol levels after danazol treatment were significantly decreased as other reports^{2,8,9)}. Serum testosterone level of peri-menopausal women after danazol treatment increased significantly as other reports^{2,6)}.

All of subjective women except two cases who had endometrial neoplasia were success to stop their dysfunctional uterine bleeding after danazol treatment.

These data suggest the clinical effect of danazol for dysfunctional uterine bleeding might be due to the antiestrogenic effect and androgenic effect of danazol.

References

- 1) Dmowski, W. P.: Endocrine properties and clinical application of danazol. *Fertil. Steril.*, 31: 237, 1979.
- 2) Floyd, W. S.: Danazol: endocrine and endometrial effects. *Int. J. Fertil.*, 25: 75, 1980.
- 3) Fraser, I. S., Markham, R., Robinson, M. and Thorburn, G. D.: Influence of danazol treatment during the luteal phase on pituitary and ovarian function during the subsequent menstrual cycle. *Fertil. Steril.*, 37: 489, 1982.
- 4) Furuhashi, N., Suzuki, M., Abe, T., Yamaya, Y. and Takahashi, K.: Changes of hypophysio-ovarian endocrinological function by aging in women. *Tohoku J. exp. Med.*, 121: 231, 1977.
- 5) Furuhashi, N., Suzuki, M., Fukaya, T., Kono, H., Shinkawa, O., Tachibana, Y. and

Takahashi, T.: Concentration of LH-hCG, -hCG, FSH, estradiol, cortisol and testosterone in cord sera and their correlations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 143: 918, 1981.

- 6) Hirschowitz, J. S. Solar, N. G. and Wortsman, J.: Sex steroid levels during treatment of endometriosis. *Obstet. Gynecol.*, 54: 448, 1979.
- 7) Luciano, A. A., Hauser, K. S., Chapler, F. K. and Sherman, B. M.: Danazol: Endocrine consequences in healthy women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 723, 1981.
- 8) Meldrum, D. R., Pardridge, W. M., Karow, W. G., Rivier, J., Vale, W. and Judd, H. L.: Hormonal effects of danazol and medical oophorectomy in endometriosis. *Obstet. Gynecol.*, 62: 480, 1983.
- 9) Wood, G. P., Wu, C. and Flickeringer, G. L.: Hormonal changes associated with danazol therapy. *Obstet. Gynecol.*, 45: 302, 1975.

更年期機能性出血に対するダナゾールの臨床効果と血中ステロイド動態

東北大学医学部産科婦人科学教室

古橋 信晃, 高浜 一宏, 矢嶋 聡,
深谷 孝夫, 新川 尹

更年期機能性出血を主訴とした婦人にダナゾールを投与し、有効な止血効果を認め、また、投与前後の血中ステロイド動態についても検討したので報告する。

対象は35歳以上の機能性出血と診断された婦人21例で、子宮筋腫あるいは子宮腺筋症の合併を13例に認めた。これら婦人にダナゾール400mg/日を2週間経口投与し、その前後の症状をチェックし、また血中ステロイド値をRIAにて測定した。

血中エストラダイオール値(閉経前: n=17, 47.4±10.6 pg/ml, mean±S.E., 閉経後: n=4, 19.8±1.5 pg/ml)はダナゾール投与後(閉経前: n=17, 22.0±3.2 pg/ml, 閉経後: n=4, 13.3±1.4 pg/ml)は有意に(P<0.05)低下していた。血中テストステロン値は、投与後、閉経前婦人において有意に(P<0.01)上昇していた。21例全例で有効な止血効果が認められたが、これは、エストロゲン低下による可能性が示唆した。

(受付: 昭和62年1月27日特別掲載)

単クローン性高感度 hCG 診断試薬 (MS8501) の使用経験

The Assessment of a Test Kit for Diagnosis of Early Pregnancy
(MS8501), Using Monoclonal Antibody for hCG

京都府立医科大学産婦人科学教室

富岡 恵 山元 貴雄 大野 洋介
Megumi TOMIOKA Takao YAMAMOTO Yohsuke OHNO
本庄 英雄 岡田 弘二
Hideo HONJO Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

現在日常臨床で汎用されている多クローン性抗 hCG 抗体による妊娠診断試薬（ゴナビスライド）に対し、最近単クローン性抗 hCG 抗体による試薬（MS8501）が開発されたため、その基礎および臨床検討を行った。感度試験では、ゴナビスライドは900IU/L、MS8501は200IU/L以上のhCG濃度にて明瞭な凝集を認め、hLHとの交叉については、ゴナビスライドがhLH 3000IU/Lまで、MS 8501が5000IU/Lまでは凝集を認めなかった。Prozone現象はゴナビスライドの500万IU/L以上に対し、MS 8501は3000万IU/Lまで生じなかった。臨床検討は不妊症治療患者を中心に40名（計84回）について行ったが、排卵日が正確で正常妊娠経過をとった15名ではMS 8501陽性は平均4週4日、ゴナビスライド陽性は5週1日、B-Scope上GS出現は、5週2日となり、施行回数別陽性率は4週ではMS 8501、73.9%、ゴナビスライド17.4%、5週ではMS 8501 100%、ゴナビスライド78.6%となった。尚、臨床上妊娠の疑わしかった非妊娠症例13名において、MS8501は偽陽性が1例もなかった。また異常妊娠例12名中3名は、MS 8501陽性、ゴナビスライド陰性で経過し、流産の転帰をたどった。MS 8501はゴナビスライドに比し、初期妊娠（妊娠4週）だけでなく、hCG低値を示す異常妊娠の検出にも優れていた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(3), 511-517, 1987)

はじめに

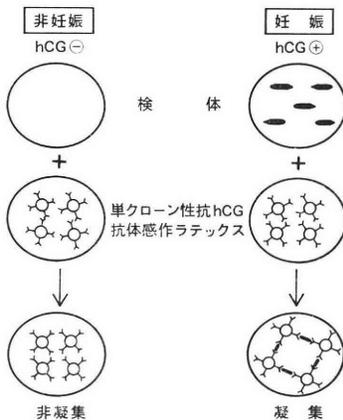
日常臨床の場において使用される免疫学的妊娠診断試薬のなかでは、尿中hCGに対するラテックス凝集反応(hCG-LAR)を用いたスライド法が迅速かつ簡便であるため、現在最もよく使用されている。しかしこの場合、hCGの検出には多クローン性抗hCG抗体を用いており、hLHの干渉が無視できないため、偽陽性防止のためにその感度は1000~3000IU/Lが限界であった。そのため、それ以下の尿中hCG値を示す妊娠期や流産、子宮外妊娠などの異常妊娠を検出することが困難な場合もしばしば相違した。これに対し、hCGのサブユニットである β -hCGを検出するRadioimmunoassay(RIA)や赤血球凝集反応(HAR)が開発され、各々

hCG感度が0.1~40IU/Lと両者共それぞれの検査の特徴を生かして利用されている。また β -hCG-LARも同様に、hCG感度500IU/Lで2分間判定のスライド法として開発され、早期妊娠の検出に優れていることをわれわれも報告した¹⁾。今回、1975年にMilsteinら²⁾の確立した細胞融合法により得られた単クローン性抗hCG抗体を用いて、検出感度を上げるべくラテックス凝集反応による高感度妊娠診断試薬(MS 8501)が開発された。われわれはこれを臨床的に使用し、以下の成績を得たので報告する。

原理および操作法

本法は、単クローン性抗hCG抗体を感作させたラテックス粒子を被検尿と混合すると、尿中hCGが一定量

原理 : ラテックス凝集反応 (LAR)



操作法

- 1) ろ過管付きピペットにゴム球を取り付け、被検尿を静かに吸いあげる。
- 2) ろ過した被検尿を2滴反応板に滴下する。
- 3) 緩衝用試液を一滴反応板の2)の液に滴下する。
- 4) 反応板をゆっくりと揺り動かし、液を枠内一杯に広げる (搅拌棒を用いて広げてもよい)。
- 5) ラテックス試液を4~5回振盪して均一にした後、その一滴を反応板上の4)の液に滴下する。
- 6) 液が混和するように反応板を緩やかに揺動する。
- 7) 揺動開始後2分で反応像を肉眼的に観察し、凝集像の有無によって判定を行う。
- 8) 判定
 - (1) 凝集が認められた場合 : 陽性 (+)
 - (2) 凝集が認められない場合 : 陰性 (-)
 - (3) 凝集が不明瞭な場合 : 疑陽性 (±)

図 1 MS8501の原理および操作法

(約200IU/L) 以上存在すれば、凝集を生じるラテックス凝集反応である (図1上投). 操作法は図1下段のごとくである.

基礎的検討

基礎的検討としては、感度試験、hLH との交叉性および prozone 現象について、それぞれ従来使用されている多クローン性の hCG-LAR であるゴナビスライド (3分にて判定) と比較した.

(1) 感度試験

hCG 標準品 (hCG 40,000IU/L, 持田製薬, 東京) を生理食塩水にて希釈後, 0, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 800, 900, 1,000IU/L の濃度をそれぞれ作製し, 本試薬の感度を調べた. その結果, MS 8501は100, 150 IU/L の濃度にて (±), 200IU/L 以上は明瞭に (+) となり, 一方, ゴナビスライドは900IU/L 以上で (+) となった. 即ち, MS 8501の感度は200IU/L であることが確認された (図2上段).

(2) hLH との交叉性試験

hLH との交叉性の有無を検討するために hLH 標準品 (hLH 5,000IU/L, 持田製薬, 東京) を用いて1,000~5,000IU/L の濃度をそれぞれ作製した. その結果, MS 8501は5,000IU/L 未満までは hLH による凝集は認めなかった. 一方ゴナビスライドは, 1,000IU/L 以上では疑陽性, 3,000IU/L 以上では明らかに hLH による交叉反応が生じた (図2中段). MS 8501に関しては5,000IU/L 以上の尿中高 LH レベルは生理的量をはるかに上回るため, まず LH の干渉は無視できるものと判断された.

感 度 試 験

		hCG 濃度 (IU/L)									
		0	100	150	200	250	300	500	800	900	1000
判定	MS 8501	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+
	ゴナビスライド	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

hLH との交叉性

		hLH 濃度 (IU/L)						
		1000	2000	3000	3500	4000	4500	5000
判定	MS 8501	-	-	-	-	-	-	±
	ゴナビスライド	±	±	+	+	+	+	+

prozone 現象

		hCG 濃度 (×10 ⁴ IU/L)					
		500	1000	1500	2000	2500	3000
判定	MS 8501	+	+	+	+	±	-
	ゴナビスライド	-	-	-	-	-	-

図 2 MS8501の基礎的検討

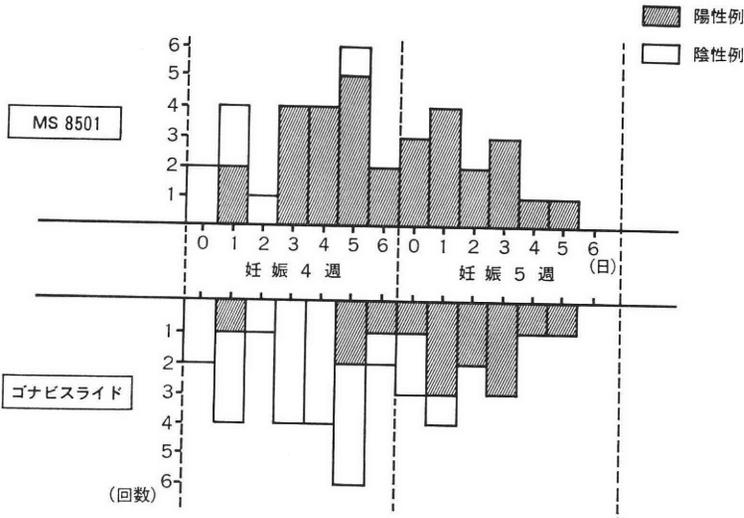


図 3 MS8501, ゴナビスライドの正常妊娠初期施行回数別陽性症例分布

表 1 MS8501, ゴナビスライド陽性, GS 出現日一覧表

	MS 8501 陽性	ゴナビスライド陽性	GS 出現日
1. S. H.	4w+1d	4w+1d	4w+6d
2. E. H.	4w+1d	4w+5d	5w+1d
3. H. O.*	4w+3d	4w+5d	5w+1d
4. Y. O.	4w+3d	5w+2d	5w+2d
5. H. H.	4w+3d	5w+2d	5w+2d
6. M. S.	4w+3d	5w+3d	4w+6d
7. K. S.	4w+4d	4w+6d	5w+4d
8. Y. S.	4w+4d	5w+1d	5w+1d
9. A. Y.	4w+4d	5w+1d	5w+1d
10. M. I.	4w+4d	5w+3d	5w+3d
11. A. N.*	4w+5d	5w+0d	5w+0d
12. K. Y.	4w+5d	5w+1d	5w+1d
13. A. M.*	4w+5d	5w+3d	5w+3d
14. F. K.	5w+0d	5w+3d	5w+3d
15. Y. O.*	5w+0d	5w+5d	5w+5d
平均	4w+4d	5w+1d	5w+2d

* 基礎体温上昇日より算出
 その他は超音波排卵日より算出

臨床的検討

(1) 対象および方法

臨床的検討は京都府立医科大学付属病院産婦人科外来通院中の不妊症患者に初期妊娠が疑われた 40 名 (計 84 回) について行った。正常妊娠 15 名, 異常妊娠 12 名, 非妊娠 13 名である。尚, 全症例中 22 名は超音波診断装置を用いて卵胞発育の連日観察による排卵日の確認を行い, 10 名は基礎体温上昇日を排卵日とし, 両者共黄体期の観察により排卵後 15 日以上黄体期が存続した症例を検討対象とした。被検尿は随時尿を用いすべての尿は MS 8501 とゴナビスライドの両者にて比較検討した。尚, 超音波観察症例の使用超音波機種は ALOKA SSD 190 (3.5 MHz) である。

(2) 正常妊娠例

上記の超音波観察にて排卵日を確認した 11 名と基礎体温により排卵日決定した 4 名の排卵後 15 日以上の黄体期存続症例 15 名中 MS 8501 が初めて陽性化した日, 超音波画像上 GS が初めて出現した日をそれぞれ検討した (表 1)。MS 8501, ゴナビスライドとも最も早期の出現は 4 週 1 日であつたが, 全体を平均すると MS 8501 は 4 週 4 日, ゴナビスライドは 5 週 1 日, 超音波 GS 出現日は 5 週 2 日となつた。

同様の症例において, 検査施行回数別に陽性例数の分布を検討したところ図 3 のごとくであつた。MS 8501 は 4 週 0 ~ 2 日までは陰性のものも認めたが, 4 週 3 日以降は 1 例を除きすべて陽性化し, ゴナビスライドに比し, 特に 4 週における検出率が優れていた。それぞれの陽性率は妊娠 4 週では MS 8501 73.9%, ゴナビスライド

(3) Prozone 現象の検討

高濃度 hCG 溶液における検討では, MS 8501 は 3000 万 IU/L 以上になると反応が陰性化し, 一方, ゴナビスライドは 500 万 IU/L 以上で同現象が起り, MS 8501 の方が prozone 現象は起り難かつた (図 2 下段)。

表 2 妊娠初期 MS8501, ゴナビスライドの陽性率の比較

	妊娠 4 週	妊娠 5 週
MS 8501	17/23 (73.9%)	14/14 (100%)
hCG-LAR (ゴナビスライド)	4/23 (17.4%)	11/14 (78.6%)

17.4%, 妊娠5週では MS 8501 100%, ゴナビスライド78.7%を示した(表2)。

(3) 非妊娠例

臨床経過上極めて妊娠の疑われた症例で、その後の自然月経発来や投薬による消退出血により非妊娠の確認されたものを検討した(表3)。まず基礎体温上高温相が18日以上継続した4名は MS 8501, ゴナビスライド両者共陰性であった。超音波観察にて排卵日が明らかであり、なおかつ14日~21日高温相が継続した症例3名(計4回)においても両者とも陰性を示した。また最終月経と月経周期のみより妊娠の疑われた症例3名(計5回)でも両者とも陰性を示した。無月経、下腹痛などの症状により子宮外妊娠の疑われた3名も両者共陰性であった。即ち、MS 8501はゴナビスライドと共に偽陽性を1例も認めなかった。

(4) 異常妊娠例

妊娠経過の異常を認めた12名(計31回)について、MS 8501, ゴナビスライドおよび超音波検査によるGS

出現の有無によつて継続観察した結果を表4に示す。流産症例のうち超音波排卵日の確認し得た8例においてはMS 8501の陽性化が4週初期, ゴナビスライド陽性化が4週後期, 超音波検査によるGSの出現も4週後~5週初期になり, 正常妊娠例と同様の経過をたどるものと, MS 8501が陽性化するのが5週2-3日と遅れ, 以後ゴナビスライド陽性化も遅延するか, またはゴナビスライド陰性のまま流産の転帰をとる症例の2種類に大別可能であった。さらに後者の場合は超音波検査によるGS出現日とゴナビスライド陽性日との比較において, GS出現日にゴナビスライドが陽性に至らない症例が正常妊娠例に比し多く認められた。前者のうち2例は胎児心拍が確認されたにもかかわらず流産の転帰をたどっていることから, これら両者の差異はそれぞれの妊娠の停止時期の違いによるものと考えられた。子宮外妊娠は検査症例中に2例あり, 尿中hCG値は2例ともMS 8501だけでなく, ゴナビスライドも陽性を示した。

図4は初期流産の転帰をたどつた異常妊娠症例の基礎体温と尿中hCG半定量を含めた臨床経過である。1月30日を最終月経とし, 2月12日, 13日の超音波検査にて右側卵巣の最大径1.9cmの卵胞の消失により排卵を確認した。排卵後26日目にはMS 8501は陽性なるもゴナビスライド陰性, 子宮内にはGS様エコーが認められた。その4日後にもMS 8501, ゴナビスライドの反応は不変で, さらに3日後にはMS 8501の凝集も(-)~(±)

表 3 非妊娠症例 (13名/16回)

	MS 8501	ゴナビスライド
1) BBT 上高温相継続		
① T. S. 22日間	(-)	(-)
② T. F. 18日間	(-)	(-)
③ Y. K. 33日間	(-)	(-)
④ K. N. 19日間	(-)	(-)
2) 排卵後日数14日以上 (超音波排卵日確認後)		
⑤ K. M. POD 16	(-)	(-)
21	(-)	(-)
⑥ E. O. 16	(-)	(-)
⑦ M. S. 14	(-)	(-)
3) 最終月経より長期間無月経		
⑧ Y. I. (35~40日型) 41日間, 48日間	(-), (-)	(-), (-)
⑨ M. U. (40~60日型) 47日間, 54日間	(-), (-)	(-), (-)
⑩ A. O. (30日型) 45日間	(-)	(-)
4) 子宮外妊娠の疑い		
⑪ M. K. 卵巣出血 (D&C 後無月経)	(-)	(-)
⑫ M. K. 卵巣機能不全	(-)	(-)
⑬ K. K. 不全流産にて curettage 後	(-)	(-)

表 4 異常妊娠例 (12名/31回)

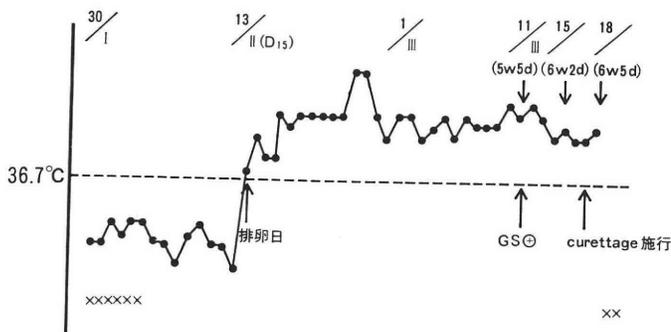
1) 初期流産

	MS 8501	ゴナビスライド	GS 出現日	
1. Y. K.	4w+1d	5w+1d	5w+1d	
2. A. H.	4w+2d	4w+5d	4w+5d	→F.H.B. ⊕
3. H. K.	4w+2d	4w+4d	5w+1d	→F.H.B. ⊕
4. T. T.	4w+2d	4w+5d	5w+1d	
5. E. A.	5w+2d	6w+0d	6w+0d	
6. K. N.	5w+3d	6w+1d	5w+3d	
7. K. K.	5w+2d	5w+3d	5w+2d	
8. M. T.	5w+5d	/	5w+5d	
9. M. E. (28日型, 整)	6w+4d	/	/	ハイゴナビス× 128⊕
10. C. K. (30日型, 整)	5w+3d	/	/	×64⊕

2) 子宮外妊娠

	MS 8501	ゴナビス ライド	ハイゴナビス	
1. K. K. (22~40日型, 不整)	約10wG (-)	(-)	ハイゴナビス×8⊕	→abortion of tubal pregnancy
2. F. T. (25日型, 整)	6w+5d (+)	(+)	UCG タイトレーション×64⊕	→rupture of tubal pregnancy

症例 M. T. (30日型, 整)



	11/III	15/III	18/III
MS 8501	±~+	±~+	~±
ゴナビスライド	-	-	-
ハイゴナビス	×128⊕	×128⊕	×64⊕

図 4 初期流産の一症例の経過

となり、その日の夕刻より下腹痛と共に出血が始まり、翌日の子宮内容清掃の組織検査にて流産が確認された。確認のため併用した赤血球凝集反応（ハイゴナビス、持田製薬製、感度 5 IU/L）でも最高128倍陽性までにしか致らず、ゴナビスライドが最後まで陽性化しない程度の

尿中 hCG 低タイターで変動した症例であつた。このような MS 8501を用いることにより始めて検出可能であつた流産が他にも 2 例存在した。

表 5 MS8501, ゴナビスライド (hCG-LAR) とハイゴナビス (hCG-HAR) の比較検討

	MS 8501	ゴナビスライド	ハイゴナビス (感度 5IU/L)
E. O.	-	-	×4 (+), ×8 (-)
Y. I.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
K. M.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
M. V.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
M. S.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
K. K.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
K. K.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
M. E.	-	-	×32 (+), ×64 (-)
C. K.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
"	-	-	×32 (+), ×64 (-)
M. I.	-	-	×16 (+), ×32 (-)
"	+	-	×64 (+), ×128(-)
A. Y.	-	-	×16 (+), ×32 (-)
"	+	-	×128(+), ×256(-)
T. H.	-	-	×16 (+), ×32 (-)
"	+	-	×128(+), ×256(-)
K. Y.	-	-	×16 (+), ×32 (-)
"	+	-*	×256(+), ×512(-)
K. S.	-	-	×8 (+), ×16 (-)
"	+	-	×128(+), ×256(-)
"	+	+	×256(+) ^{以上}
T. T.	-	-	×32 (+), ×64 (-)
"	-*	-	×64 (+), ×128(-)
"	+	-	×128(+), ×256(-)
"	+	-	×128(+), ×256(-)
"	+	+	×256(+), ×512(-)
H. H.	+	-	×32 (+), ×64 (-)
E. H.	+	-	×64 (+), ×128(-)
F. K.	+	-	×128(+), ×256(-)
K. N.	+	-	×128(+), ×256(-)
Y. S.	+	-*	×256(+), ×512(-)
S. M.	±	-	×16 (+), ×32 (-)
M. T.	-~±*	-	×64 (+), ×128(-)
"	±~+	-	×128(+), ×256(-)
K. K.	+	±*	×512(+) ^{以上}

* 不一致症例

考 案

現在利用されている妊娠診断試薬の hCG 検出感度は 1,000IU/L~3,000IU/L であり, 臨床的には正常妊娠過程の 5~6 週以降しか診断は困難であり, hCG 産生量の低いことが予測される異常妊娠の検出頻度はさらに低いと考えられる. 今回の単クローン性抗 hCG 抗体による hCG に特異的な免疫反応を利用した新試薬 (MS 8501)

は, われわれの基礎的検討でも検出感度が 200IU/L と従来の 5 倍であることが確認され, このことにより本試薬は臨床的にはより早期の妊娠の診断およびより多くの異常妊娠の検出が可能であることが十分推察し得る. 実際, 諸家の報告³⁻⁹⁾においても, これは反映されている.

今回の検討では, 妊娠日数の誤差による不正確性を除外するために超音波検査にて排卵日を確認したもの, あるいは基礎体温上昇日を排卵日としたものを可能な限り選択したが, その結果によると, 本試薬は妊娠 4 週 1 日からすでに陽性であるものも認め, 平均すると妊娠 4 週 4 日で陽性であり, ゴナビスライドの平均 5 週 1 日に比較し約 4 日早期の検出が可能であった. しかし 4 週での陽性率は, MS 8501 が 73.9% と, ゴナビスライドの 17.4% に比し明らかに高率であった. この陽性率は, 見城³⁾, 久保⁴⁾, 堀切ら⁵⁾ の 4 週にて 100%, 多賀ら⁹⁾ の 90% には劣る結果ではあるが, これは 4 週初期の検討例数が比較的多数を占めたことも一因ではあるが, 最終月経帰算の妊娠週数に比し, より正確な成績を反映しているとも考えられる. さらに 5 週以降は 100% 陽性を示すことは他の諸報告とも一致する好成绩である.

異常妊娠の検討では, 流産の場合, 尿中 hCG の変動が正常妊娠と同じ経過を示しても流産に致る症例と, 妊娠初期 (4~6 週) から明らかに hCG 低値の症例が存在し, 特に後者の場合の検出に MS 8501 は優れており, 従来のゴナビスライドでは検出不能で, 月経異常と見間違われる可能性のある, いわゆる subclinical abortion が診断し得たことは本試薬の有用性を示すものである. 子宮外妊娠の診断においても同様に有効であると考えられるが, 今回経験した症例ではその意義を立証するに致らなかつた.

基礎的検討で確認された MS 8501 の感度は hCG 200 IU/L であつたが, 実際の被検尿の一部を従来用いられていた半定量法である hCG-HAR (ハイゴナビス, 感度 5 IU/L, 2 時間判定) と比較し, ゴナビスライドも含め 3 者の試薬間の感度の再検討を行った (表 5). その結果, 23 名 (35 回) の検査において, MS 8501 陽性, ゴナビスライド陰性の症例は, ハイゴナビス 32 倍陽性から 128 倍陽性を示すものがほとんどを占めた. この結果, 妊娠かどうかの定性的診断において, ゴナビスライドが陰性であつた場合に 2 分間で判定可能な MS 8501 が判定に 2 時間を要するハイゴナビスにほぼ匹敵する検査であることを裏づけている.

一方, 羽里ら⁷⁾ の報告のごとく, その凝集出現時間と hCG 濃度の関連より, さらに検査に半定量的要素をもたせることも十分可能と考えられるが, 半定量にまで応用可能な場合 2 分で判定できる長所は多大であり, 絨毛

性疾患や流産後の follow up など、今後の臨床使用が期待されるところである。

また妊娠経過により妊娠の疑われた症例において偽陽性を一例も認めなかつたことも諸家の報告³⁻⁹⁾と一致し、本試薬の有用性を物語るものと判断された。

おわりに

今回、MS 8501の臨床使用にあたっては不妊症治療との関係から、比較的排卵日の正確な症例について検討することが可能であつた。その結果より、平均妊娠4週4日と、従来の検査法より4日早期に、簡便に、正確に妊娠の有無が診断し得る事実、初期妊娠、異常妊娠の管理上極めて利点が多いものと考えられた。

文 献

- 1) 富岡 恵, 山元貴雄, 辻 雅路, 大野洋介, 本庄英雄, 岡田弘二: 妊娠の早期診断—hCG- β LAR (SST) と超音波断層法の有用性およびhCG-LAR との比較検討—, 日不妊誌, 30(4): 457, 1985.
- 2) Köhler, G and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. Nature, 256: 495, 1975.
- 3) 見常多喜子, 藤井明和: 単クローン性抗 hCG 抗体を用いた妊娠診断薬の検討, 産科と婦人科, 53: 410, 1986.
- 4) 正岡 薫, 田所 望, 新部哲雄, 大塚 進, 森隆生, 渡辺 博, 熊坂高弘: 単クローン性抗体を利用した新しい妊娠診断薬 (MS-8501) の基礎的検討 (第1報), 産科と婦人科, 53: 414, 1986.
- 5) 堀切 浩, 吉田隆美, 大塚 茂, 近藤俊吾, 池田秀造, 田中敏幸, 馬淵是純, 疋田美直, 佐藤正仁, 宮内裕光, 畑 俊夫: 高感度妊娠診断薬 MS8501 の検討について, 産科と婦人科, 53: 419, 1986.
- 6) 田口 誠, 矢口輝仁, 大原基弘, 久保田俊郎, 小山嵩夫, 西 望, 齊藤 幹: 抗 hCG モノクローナル抗体を用いた妊娠診断薬 MS8501 の臨床的有用性とその利用範囲について, 日産婦東京地方部会誌, 35: 127, 1986.
- 7) 羽里幸彦, 篠原礼子, 大高 究, 小林信一, 永田登喜雄: 新しい妊娠診断薬 (MS 8510) の基礎的検討, 日産婦東京地方部会誌, 35: 131,

1981.

- 8) 久保春海, 菊地晴美, 安部裕司, 林 鴻程, 片山 進: 単クローン性抗 hCG 抗体を用いたラテックス凝集法 (LAR) による妊娠診断について, 産婦人科の世界, 38: 191, 1961.
- 9) 多賀理吉, 白須和裕, 植村次雄, 水口弘司: 単クローン性抗 hCG 抗体を用いた新しい妊娠診断薬の検討, 産婦人科の世界, 38: 305, 1961.

The assessment of a test kit for diagnosis of early pregnancy (MS8501), using monoclonal antibody for hCG

Megumi Tomioka, Takao Yamamoto, Yohsuke Ohno, Hideo Honjo, and Hiroji Okada.

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

A new test kit for diagnosis of early pregnancy (MS8501), which is hCG latex agglutination reaction (hCG-LAR) using monoclonal antibody for hCG, was compared to polyclonal hCG-LAR (Gonavislide) in clinical cases.

The sensitivity of MS8501 and Gonavislide were 200iu/l hCG and 900iu/l respectively.

The average of the earliest positive day for both tests were recognized at 4weeks gestation and 4days with MS8501, at 5weeks gestation and 1day with Gonavislide, and 2day after 5week gestation by appearance of gestational sac under ultrasound in 15 normal pregnancies, confirmed the day of ovulation with ultrasound.

The positive rates were 73.9% with MS8501 and 17.4% with Gonavislide on 4weeks gestation, 100% and 78.6% on 5weeks gestation respectively.

There were no false positive cases in 13 doubtful cases for pregnancy. In 12 abnormal pregnancies, 3 subclinical abortions were detected only with MS8501. In conclusion the MS8501 test kit was very useful clinically not only for detection of early pregnancy, especially on 4weeks gestation, but also for diagnosis of various abnormal pregnancies.

(受付: 昭和62年2月5日特別掲載)

不妊症治療に関する1考察：当科不妊症外来 昭和53～59年受診患者の成績を基にして

A Retrospective Analysis of 409 Infertile Patients, Who Consulted
through the Year 1978 to 1984

愛媛大学医学部産科婦人科（主任：松浦俊平教授）

杉 並 洋 黒 田 譲 治
Hiroshi SUGINAMI George KURODA
富 岡 尚 徳 矢 野 浩 史
Naonori TOMIOKA Kohji YANO

Department of Obstetrics and Gynecology, Ehime University
School of Medicine, Shigenobu, Ehime 791-02.

昭和53～59年に愛媛大学医学部附属病院産科婦人科不妊症外来を受診した409例の成績を集計した。うち86例（21.0%）は脱落例であり、修正受診者数は323例であった。150例が妊娠し、粗妊娠率、修正妊娠率はそれぞれ36.7%、46.4%であった。卵巣因子133例中80例（60.2%）、卵管因子23例中6例（26.1%）、子宮因子19例中7例（36.8%）、頸管因子3例中3例（100.0%）、子宮内膜症187例中56例（37.3%）、男性因子37例中11例（29.7%）、その他25例中11例（44.0%）が妊娠した。治療開始後1年以内に106例（70.7%）が妊娠した。122例（81.3%）が生児を得た。この好成績はわれわれの行っている不妊症診断および治療の妥当性を立証している。すなわち、不妊症治療の成績向上には、1) 正確な不妊因子の同定、2) 最適な治療法の選択、3) 的確かつ謙虚な治療効果の判定、4) 不妊因子および治療法の再検討、が必須である。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(3), 518-522, 1987)

緒 言

最近の著明な平均寿命の上昇は人口の急激な増加をもたらした。人口問題は今世紀最大の命題だと言われている。しかし、一方では子孫に恵まれない不妊夫婦も多く、その頻度はわが国では婚姻夫婦の約10%とされている。彼等にとって最大の関心事の1つであり、子孫の有無は彼等の将来設計に大きな影響を与える。

不妊症をもたらす因子（不妊因子）は多岐に亘り、その正確な把握は不妊症治療の根幹をなす。近年、種々の検査法および治療法の開発により、不妊症の治療成績は格段の向上を示している。

われわれは昭和53年に愛媛大学医学部附属病院産科婦人科に不妊症外来を開設した。以来、多くの不妊症患者の治療を行い、良好な治療成績を挙げている。今回は、昭和53～59年に当科不妊症外来を受診した409例の不妊症

患者の治療成績等を報告し、これを基に不妊症治療に関して考察を加える。

対象および診断、治療、成績

昭和53～59年に愛媛大学医学部附属病院産科婦人科不妊症外来を受診した409例を検討の対象とした。

受診患者数は昭和53年度は18例であったが、以後順調に増加し、昭和59年度には99例に達した。409例中86例（21.0%）は初診以後来院しなかつたり、治療を拒否した所謂脱落例であり、修正受診患者数は323例であった。うち150例（36.7%）が妊娠し、修正妊娠率は46.4%であった。年度別妊娠率は昭和53、54年の66.7%を最高に以後低下し、昭和55年、56年は40%台、以後は20～30%台であった。昭和57年の妊娠率が26.6%と低かつたが、これは脱落例が多かつたことに依るもので、修正妊娠率は40.4%であった。昭和59年の修正妊娠率は28.0%と低値

表 1 年度別新患者数と妊娠例数および率の推移

年度	総新患者数	修正* 新患者数	妊娠 例数	妊娠率	修正 妊娠率
昭和53年	18	14	12	66.7%	85.7%
54	18	17	12	66.7	70.6
55	49	33	23	48.9	69.7
56	53	52	23	43.4	44.2
57	79	52	21	26.6	40.4
58	95	73	37	37.9	49.3
59	99	82	23	23.2	28.0
総 計	409	323	150	36.7%	46.4%

* 修正新患者数=(総新患者数-脱落例数)

を示したが、これは治療継続中の症例をより多く含んでいるためである(表1)。

不妊因子別分類を行った(表2)。無排卵に代表される卵巣因子および子宮内膜症がそれぞれ153例(37.4%)および187例(45.7%)と多くの症例に認められた。続いて、男性因子、卵管因子、子宮因子、頸管因子の順であった。2つ以上の因子を有する複合因子例は66例であった。本表では複合因子例はそれぞれの該当する因子群の中に重ねて計上されている。また、因子別妊娠例数および率もあわせて表記した。

次いで、各不妊因子の同定およびその治療成績について検討した。

受診患者には正確な基礎体温の測定と記載を要求した。基礎体温上12日以上連続する高温相が認められた場合は自然排卵ありと判定した。153例(37.4%)は上記の診断規準を満足せず排卵障害と診断された。それらに対して、月経周期2-7日目あるいは低温相時に種々の内分泌学的検討を加え、無排卵症の成因を追求した。これらには、単回あるいは連続採血による血中 LH,FSH, PRL, estradiol, progesterone, androgens の測定、

GnRH 試験, metoclopramide (MCP) 試験¹⁾などが含まれた。さらに、必要に応じて腹腔鏡検査を施行し、卵巣の形状を観察し、組織診も行った。このようにして無排卵症の鑑別を行った後、それ相応の治療法を選択した。86例の正 Gn-正 PRL 性無排卵症例に対して clo-miphene を投与し、35例(40.7%)が妊娠した。明かな高 PRL 症例あるいは潜在性高 PRL 症例、さらに一部の多嚢胞卵巣例(計33例)に対して bromocriptine を投与し、17例(51.5%)が妊娠した。上記治療の無効例、低 Gn-正 PRL 性無排卵症例および一部の多嚢胞卵巣例(計30例)に対して hMG-hCG 療法を施行し、16例(53.3%)が妊娠した。これらの排卵誘発時、特に hMG-hCG 療法時には血中 LH, FSH, estradiol, progesterone 値および超音波検査による卵胞径の計測値による卵胞成熟モニタリングは必須であり、中でも超音波検査は real time であり、非常に有用であった。すなわち、卵胞径が17~20mm に達した際に卵胞成熟が完成したと考え、hCG 投与に切替えた。昭和53~55年度において7例の多嚢胞卵巣例に対して卵巣楔状切除を行い、5例(71.4%)が妊娠したが、術後の癒着性不妊症の問題などが提起されたため現在は行っていない。他に排卵誘発後の自然排卵周期の回復などにより7例が妊娠した(表3)。

子宮卵管造影検査(HSG)により25例(6.1%)において両側あるいは片側の卵管閉塞が認められた。うち、2例は HSG 後に、3例は卵管通水により、また1例は卵管開口術後に妊娠した。

8例(2.0%)に子宮奇形、4例(1.0%)に子宮腔癒着、7例(1.7%)に子宮筋腫、2例(0.5%)に子宮發育不全が認められた。子宮奇形のうち1例は Jones-Jones 手術後に、3例は自然に妊娠した。子宮腔癒着症の1例は子宮鏡下癒着剝離術後に妊娠した。子宮筋腫の1例は筋腫摘出術後に妊娠した。子宮發育不全の1例は偽

表 2 不妊因子別分類

不 妊 因 子	例数(頻度)	修正例数(頻度)	妊娠例数	妊娠率	修正妊娠率
卵 巢 因 子	153(37.4%)	133(41.2%)	80	52.3%	60.2%
卵 管 因 子	25(6.1)	23(7.1)	6	24.0	26.1
子 宮 因 子	21(5.1)	19(5.9)	7	33.3	36.8
頸 管 因 子	4(1.0)	3(0.9)	3	75.0	100.0
子 宮 内 膜 症	187(45.7)	150(46.4)	56	29.9	37.3
男 性 因 子	49(12.0)	37(11.5)	11	22.4	29.7
そ の 他	41(10.0)	25(7.7)	11	26.8	44.0
総 計	409	323	150	36.7%	46.4%

注) 複合因子を有する症例はそれぞれの該当する因子群に計上されている。

表 3 無排卵症の治療成績

治療法	例数	妊娠例数	妊娠率
Clomiphene	86	35	40.7%
Bromocriptine	33	17	51.5
hMG	30	16	53.3
Wedge resection	7	5	71.4
その他		7	

表 4 子宮内膜症の治療成績

治療法	例数	妊娠例数	妊娠率
偽妊娠	34	10	29.4%
Danazol	106	23	21.7
腹腔鏡	30	8	26.7
その他		15	

表 5 妊娠成立までの治療期間

不妊因子	~0.5年	~1.0年	~1.5年	~2.0年	~3.0年	3.0年~
卵巣因子	33	18	6	3	3	—
卵管因子	3	1	—	—	—	—
子宮因子	—	—	3	3	—	—
頸管因子	3	—	—	—	—	—
子宮内膜症	14	16	4	1	3	—
男性因子	2	3	—	1	—	—
複合因子	2	3	7	2	3	2
その他	6	2	1	—	2	—
	63	43	21	10	11	2

妊娠療法後に妊娠した。

4例(1.0%)に頸管粘液-精子不適合が認められ、うち3例は配偶者間人工受精(AIH)により妊娠した。

注意深い問診、内診、直腸診および腹腔鏡検査により187例(45.7%)に子宮内膜症が診断された²⁾。偽妊娠療法を34例に施行し、10例(29.4%)が妊娠した。Danazol療法を106例に施行し、23例(21.7%)が妊娠した。30例に対して腹腔鏡下に子宮内膜症病巣電気凝固および腹腔洗浄を実施し、うち8例(26.7%)が妊娠した。その他、待期療法などにより14例に妊娠の成立を見た(表4)。

精子減少症、無精子症などの男性因子が49例(12.0%)に認められた。AIHなどにより11例(22.4%)が妊娠した。なお、われわれは無精子症に対する非配偶者間人工受精(AID)は行っていない。

40例(10.0%)は染色体異常、原因不明などであつたが、うち11例(27.5%)は自然に妊娠した。

妊娠が成立するまでの治療期間について検討した。表5に示すごとく、63例(42.0%)は治療開始後6カ月以内に、43例(28.7%)は6カ月以降1年以内に、21例(14.0%)は1年以降1年6カ月以内に、10例(6.7%)は1年6カ月以降2年以内に妊娠した。また、治療開始後2年以降に妊娠したものは13例(8.7%)であつた。卵巣因子例での治療期間は短く、子宮内膜症例でのそれはより長期であつた。複合因子例の中には非常に長期間

表 6 妊娠例の転帰

転 帰	例数(多胎)	頻度
満期経膈分娩	105(2)	70.0%
満期帝切分娩	12	8.0
早産	6(1)	4.0
流産	19	12.7
胞状奇胎	3	2.0
胎内死亡	1	0.7
その他	4	2.7
全 体	150(3)	100.0%

の治療を要したのも存在した。

妊娠例の転帰を表6に示した。妊娠例150例のうち122例(81.3%)は生児を得た。3例の多胎妊娠例があり、これらはいずれもhMG-hCG非卵誘発例であつた。うち4胎妊娠の1例は妊娠27週で早産し、児はいずれも周産期に死亡した。19例(12.7%)では妊娠初期流産に終つた。3例の胞状奇胎例、1例の妊娠中期胎児死亡例が存在した。妊娠初期での風疹罹患により2例で人工妊娠中絶が施行された。2例は転帰不明であつた。

考 察

われわれは昭和53年に不妊外来を開設したのであるが、初年度には18例の新患が来院した。新患数は年毎に

増加し、昭和59年度には99例に達した。これは地域の諸先生からの紹介によるところが大きいのであるが、さらにわれわれの良好な治療成績（妊娠率および修正妊娠率：それぞれ36.7%および46.4%）が巷間で評価されたためだと考える。さらに、この好成绩はわれわれの行っている不妊症診断および治療の妥当性を立証するものと思われる。そこで、当不妊症外来における不妊症診断および治療について概説する。

不妊症治療にあたって、その治療成績を向上させるには不妊因子の同定は必須である。そのためには治療開始前に十分な検査を施行するべきである。まず治療を開始し、その結果によって次を考えるといつた試行錯誤的なアプローチは時には成功をもたらすかも知れない。しかし、このような試行錯誤はその症例の不妊因子を隠蔽し、かえって治療期間の延長、成功率の低下を招くものである。ただ、十分な治療前検査の施行は不必要な実施を意味するものではない。まず非侵襲性の検査から始めて必要に応じて順次侵襲度の高い検査へと移行すべきであらう。

まず、十分な問診は不妊症診断の第一歩である。既往歴、月経歴、妊娠歴を詳細に記載する。中でも月経歴は特に重要である。初経以来の月経周期の分析は勿論であるが、月経前および月経時の随伴症状についても注意を払う必要がある。月経周期の分析は排卵障害の有無の推定をある程度可能にする。この際、体重の有意の変遷があれば、これを記載しておく。主たる月経随伴症状は月経痛であるが、それ以外にも頭痛、嘔吐、尿・便通異常などがある。これらの月経随伴症状あるいは性交痛などが存在すれば、子宮内膜症を念頭に置かねばならない。既往歴で注意すべき点は前医における不妊症検査、診断および治療の有無である。その中で利用できる検査成績などは活用すべきである。しかし、診断および治療に関して、それを参考とするのはかまわないが、それを信じることは危険である。何故ならば、既往の診断および治療が妥当なものであるならば当然良好な成績が得られていてしかるべきであるにもかかわらず、現にわれわれの不妊外来を受診したという事実は患者が過去の治療に満足していないことを意味しているからである。また、配偶者の職業にも注意せねばならない。高温環境下での労働は造精能に少なからず悪影響を及ぼす、さらに、問診の間その患者の置かれている社会的環境をそれとなく把握し、同時に患者との間に何らかの信頼関係を樹立するよう努力しなければならない。この信頼関係は以後の治療にとって不可欠である。

次いで内診である。内診によって患者の内性器の状態を把握する。したがって、内診による診断能力を向上せ

しめるため常に努力を怠つてはならない。それに加えて、不妊症治療に携わるものにとつて直腸診を忘れてはならない²⁾。今回の集計でも明らかなように、われわれの外来受診患者の約半数は子宮内膜症を有している。ダグラス窩は子宮内膜症の好発部位の1つである。直腸診で触知されるダグラス窩の疼痛性小結節あるいは仙骨子宮靭帯の肥厚は子宮内膜症に特徴的な所見である。通常の内診ではこのような所見はなかなかとらまえない。内診および直腸診によって何らかの所見が得られた場合には膀胱充満下に超音波検査を施行する。

受診患者には基礎体温の測定および記載を義務づける。もし前医からの治療を継続している場合には一旦治療を完全に中断し、無治療の状態で1~2カ月の基礎体温の測定が必要である。正確に記載された基礎体温表上12日以上連続する高温相が認められれば排卵(+)と判定する。無排卵あるいは排卵が疑わしい症例にはホルモン測定を実施する。基礎体温低温相期に採血し、LH, FSH, PRL, estradiol, androgens を測定する。必要に応じて昼間あるいは夜間の連続採血によるホルモン動態の分析および種々の負荷試験を行う。これらにより大部分の排卵障害例の内分泌学的鑑別が可能であり、自ら最適の治療法が選択できる。高PRL症例に対してはトルコ鞍撮影、頭部CT検査などが必要となる。

配偶者の精液検査は非侵襲的であり、是非実施すべきである。できれば排卵直前に行い、頸管粘液との適合性を判定する。採精は2~3日の禁欲後に用手的に行う。異常な精液検査所見が得られた場合には数回の再検が必要である。いずれの精液検査もが異常の際には泌尿器科不妊外来に紹介する。

以上はあまり侵襲を伴わない検査であるが、必要に応じてさらに種々のより侵襲性の検査が必要となる。その1つが子宮卵管造影(HSG)である。HSGによって子宮腔の異常、卵管の疎通性などが検討できるが、検査時の疼痛や羞恥心は無視できず、さらに検査後に下腹痛や発熱などを合併することがある。われわれはこのようなadverse effectsと比較して得られる情報量は少ないと考える。よつて、われわれはHSGをroutine検査とはせず、子宮内操作や骨盤腔内炎症の既往を有する症例など、これが必要と思われる症例に限って実施している。

また、より侵襲性は高いものの、われわれは腹腔鏡検査を重用している²⁾。腹腔鏡検査によって得られる情報は不妊因子を確定する上で非常に重要である。すなわち、腹腔鏡検査により骨盤内諸臓器の形態、外観、位置、癒着などの解剖学的分析が可能となるばかりでなく、biopsyによる組織学的分析、子宮腔内色素注入によ

る卵管機能の分析, さらに電気焼灼などを用いた内視鏡手術なども可能である。われわれは患者を4日間入院せしめ, 全身麻酔下に腹腔鏡検査を実施している。既往手術歴を有する症例には Hasson's trocar を使用することにより殆どの症例に対して安全に腹腔鏡検査を行うことができる³⁾。

このような種々の方法を駆使すれば多岐に亘る不妊因子の同定はある程度可能となるであろう。不妊因子が同定できれば, それに対する治療法は自ら決定でき, また好結果が期待できる。事実, このようなアプローチによりわれわれは409例中150例(30.7%)の妊娠例を得た。さらに治療中断例や治療拒否例など86例を除去すれば, 修正妊娠率は46.4%となった。これは諸家の成績と比較しても非常に優秀である。この良好な成績は前述のごとく詳細な不妊因子の同定に拠るところが大なのであるが, 治療効果の正確な判定を基にした治療法の再検討を無視してはならない。予想されるような治療効果が得られない場合には再度原点に帰つて不妊因子を再確認する必要がある。

以上, われわれの得た不妊症治療成績を基に不妊症診断および治療に関してわれわれなりの考察を加えた。不妊症治療の成績向上には, 1) 的確な不妊因子の同定, 2) それ相応の治療法の選択, 3) 正確な治療効果判定, 4) それに基いた不妊因子の再確認と治療法の再検討, が必須のものと思われる。

稿を終えるにあたり御指導, 御校閲下さった当教室主任: 松浦俊平教授に深甚なる謝意を表します。また, 種々の検査の施行に際し御協力下さった当医局諸先生および当病院看護婦一同に感謝いたします。

文 献

- 1) Suginami, H., Hamada, K., Yano, K., Kuroda, G. and Matsuura, S.: Ovulation induction with bromocriptine in normoprolactinemic anovulatory women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 899, 1986.
- 2) 杉並 洋, 矢野浩史, 松浦俊平: 腹腔鏡診断に

よる外性子宮内膜症: 90例の retrospective な検討, *日産婦誌*, 39: 502, 1987.

- 3) Borten, M.: *Laparoscopic Complications: Prevention and Management*. B. C. Decker Inc., Toronto, 1986.

A retrospective analysis of 409 infertile patients, who consulted through the year 1978 to 1984

Hiroshi Suginami, George Kuroda,
Naonori Tomioka and Kohji Yano

Department of Obstetrics and Gynecology,
Ehime University School of Medicine,
Shigenobu, Ehime 791-02.

A series of 409 infertile women who consulted the Infertility Clinics, Ehime University Hospital, through the year of 1978 to 1984 was retrospectively analyzed.

Eighty-six (21.0%) of the 409 cases dropped out the treatments and 323 (79.0%) underwent treatments. One hundred fifty cases conceived, which gave an over-all pregnancy rate and a corrected pregnancy rate of 36.7% and 46.4%, respectively. Incidence of pregnancy in respect to infertility factors was as follows; 80/133 (60.2%) with ovulatory disorders, 6/23 (26.1%) with tubal factors, 7/19 (36.8%) with uterine factors, 3/3 (100.0%) with cervical factors, 56/187 (37.3%) with endometriosis, 11/37 (29.7%) with male factors, and 11/25 (44.0%) with others. The majority (106 cases; 70.7%) of the pregnant cases conceived within 1 year. One hundred twenty-two cases (81.3%) obtained live babies.

The excellent results would rationalize our management in infertility, consisting of 1) accurate identification of infertility factors, 2) selection of the most suitable treatment, 3) infallible judgement of the outcome, and 4) reassessment of the above matters.

(受付: 昭和61年9月6日)

地方部会講演抄録

第31回日本不妊学会九州支部会

日時：昭和61年11月16日（日）

会場：城山観光ホテル

1. ラットによる実験的子宮内膜症の発生に関する検討

○藤下 晃・増崎英明・岡 智
犬塚邦彦・浜崎哲史・宮崎正浩
町田雅子・石丸忠之・山辺 徹
(長崎大産婦)

ラットを用いて子宮内膜症の実験的発生を試みた。対象は10週齢で240~260gのSprague-Dawley rat 12匹を用い、一侧の子宮の一部を切断し、その子宮内膜片を他側の子宮支帯および腸間膜に4-0ナイロン糸を用いて移植した。このうち4匹については、子宮内膜の移植と同時に両側卵巣を摘出した。そして移植後1週、3週および6週後に開腹した。

多くの場合、移植された子宮内膜の部位に一致して嚢胞化が認められた。嚢胞の組織学的検討では、子宮内膜の腺組織および間質がみられた。一方、卵巣摘出群では移植組織は萎縮または消失していた。

以上の成績から、ラットを用いた子宮内膜症の実験的発生が可能であり、その増大には卵巣からのホルモンが関与することが明らかであった。現在、この実験モデルを用いてダナゾールの有効性に関する検討を行なっている。今後、さらに不妊原因およびその治療に関する検討を行ないたい。

2. AIH 施行時の USG による卵胞発育モニタリングについて

○佐久本哲郎・佐久川政男・宮里達也
新崎 盛雄・東 政 弘・中山道男
(琉球大産婦)

不妊症治療の実際にあつては、排卵時期を予知することは重要なポイントである。近年血中・尿中 LH, E₂ の測定や、USG による卵胞の経時的観察から排卵時期をより正確に推定することが可能となつてきた。今回われわれは AIH 施行例において USG による卵胞発育の観察を行ない、AIH 実施のタイミングについて検討を加えたので報告する。

対象は当科不妊外来にて AIH を行なつた17例39週期で、その不妊因子の内訳は頸管因子13例(25周期)、乏精子症3例(8週期)、原因不明1例(6週期)である。USG による排卵日は卵胞の消失または縮小が認められた前日とした。17例中6例(39周期中6例)に妊娠が成立した。妊娠例の AIH 施行日と USG による排卵推定日と比較すると、排卵0日が4例、排卵-1日が2例であつた。排卵+1日においては18例中1例も成功が認められなかつた。以上の事より AIH 施行、特に Single AIH を行なう場合には排卵時期をより正確に予知する事が重要であると思われる。

3. 第2度無月経に対する LH-RH 律動的投与

○本田賀裕・松浦講平・西村 宏
東 憲次・藤崎俊一・岡村 均
(熊本大産婦)

今回、34歳の続発第2度無月経婦人に LH-RH 5~7.5 μ g を90分間隔で投与し、2週期日目に妊娠が成立したので報告する。第1周期目は10日目に BBT は高温相へ移行し、高温相の10日間 LH-RH の投与を継続したが、24日目に月経が発来した。投与前のホルモン値は、LH;14.7mIU/ml, FSH;9.1mIU/ml, E₂;11pg/ml であつた。投与第1日目より E₂ は漸増し8日目に371pg/mlに達した。FSH は第1日目の pulse 前値が35.1mIU/ml と増加し、それ以降は E₂ と逆相関的に低下した。LH も同様の傾向を示した。LH-RH の pulse に対する反応は1日目で LH が34.7から45分後49.1mIU/ml, FSH は35.1から45分後37.1mIU/ml のピークを示した。7日目では LH が16.7から15分後40.4へ、FSH が7.6から15分後9.9と FSH の反応が抑制された。2週期目は9日間5 μ g/pulse で10日目より7.5 μ g/pulse に増加し16日目に排卵した。20日目で中止し hCG 5,000iu を22, 24, 26日目の3日間投与し妊娠に至つた。

4. PRL 分泌異常を伴つた習慣性流産の1例

○黄 宏駿・石丸忠之・増崎英明
今村定臣・重松 潤・瀧 利雄
山辺 徹 (長崎大産婦)

TRH テストで潜在性高プロラクチン(PRL)血症が疑われた習慣性流産(過去4回、いずれも妊娠6~7週で流産)の既往を有する不育症例に bromocriptine を

投与し、妊娠した例を経験したので報告する（昭和61年8月25日の時点で17週4日）。

症例は28歳の主婦。基礎体温は2相性で、卵胞期に施行した TRH テストにおける PRL 値は前：16.0, 15分：154.6ng/ml であったが、乳漏は認められなかった。黄体中期の PRL は30.7~38.1ng/ml であり、いわゆる一過性高 PRL 血症状態が考えられた。黄体中期に行なった PRL 値の日内変動は、昼間42.9±9.6 (n=29), 夜間61.4±18.0ng/ml (n=20) であり、夜間の最高値は113.1ng/ml であった。染色体は夫婦ともに正常で、HLA-DR 検査の結果でも HLA 系の関与は否定された。本症は bromocriptine の投与で妊娠が継続していることから、PRL 分泌異常（一過性高 PRL, 夜間異常高値）が習慣性流産の原因と推測された。

5. 正常プロラクチン血症性無月経に対するプロモクリプチンの使用経験

○松口博之・中村元一・尾上敏一
中野仁雄 (九州大産産)

近年正常プロラクチン (PRL) 血症性排卵障害に対するプロモクリプチン (以下 Br) 療法の効果が報告されるようになってきた。今回われわれ7施設の共同研究として、正常 PRL 血症性無月経に対する Br 療法の効果を検討した。

血中 PRL 値25ng/ml 以下の無月経患者のうち、クロミフェン (以下 Cl) 無効で排卵の起こらない16例と、Cl 有効で排卵は誘発出来るものの、妊娠の成立をみない17例の計33例を対象とした。全例続発性無月経で、乳漏症を示した者は認められなかった。これらの症例に対し Br 5mg/単独、または Cl との併用療法を行なった。

Br 単独療法で、Cl 無効例では50.0%に、Cl 有効例では57.1%に排卵が認められた。また挙児希望のあつた29例中5例に Br 療法により妊娠の成立をみた。Cl 無効例中では、血中 LH 値および LH/FSH 比の高いものに、Br 療法による排卵率の高い傾向がみられた。

これらから正常 PRL 血症性無月経患者に対する Br 療法の有用性が確認された。

6. 高プロラクチン血症の臨床—特に医原性高プロラクチン血症と月経異常—

○坂田師隣・宮川勇生・山尾裕道
谷山圭一・小池弘幸・森憲 正
(宮崎医大産婦)

Prolactin の radiomunoassay の開発およびその臨床用は内分泌学を大きく進歩させた。特に、産科婦人科領域では無月経、乳汁分泌の原因診断、下垂体腫瘍の早

期発見の検査法として必須なものとなつた。

宮崎医科大学産科婦人科において昭和52年10月から昭和61年8月までに、月経異常、乳汁分泌を主訴として受診した患者で prolactin 値が30ng/ml 以上を呈した60例について検討したので報告する。

高 prolactin 血症の成因分類では、間脳障害5例(8.3%)、下垂体疾患17例(23.4%)、原発性甲状腺機能低下症6例(10.0%)、薬物服用によるもの27例(45.0%)、その他5例(8.3%)であり、薬物服用による副作用にて月経異常、乳汁分泌を来すものが45.0%と高率であつた。また、60例中13例に bromocriptine 療法を行ない、このうち6例に妊娠、分娩に成功し、1例は妊娠、流産となつた。

殊に薬物服用による高 prolactin 血症の原因となつてゐる薬剤について検討する。

7. 八味地黄丸 (TJ-7) 内服により精液所見が改善され妊娠した男性不妊症の1例

○安部哲哉・吉田耕治・大塚治夫
岡村 靖 (産業医大産婦)

不妊症診療において男性不妊の占める割合は高く、当科の昭和60年の統計では原発不妊の37%が男性因子による不妊であつた。一般に男性不妊の原因には、造精機能の障害、精子輸送路の障害、副精器障害などがあるが、そのほとんど(男性不妊の90%)は、いわゆる特発性造精機能障害であるといわれている。明確な病因は不明であり、したがつて有効な治療法もなく困惑することが多かつた。今回、ツムラ八味地黄丸 (TJ-7) 5g を4か月にわたつて内服させたところ、精液所見が改善し5周期目の AIH により妊娠した症例を経験したので報告する。

患者は26歳の男性で治療前の精液所見は精子濃度 $115 \times 10^6/ml$ 、運動率22%の asthenozoospermia であつたが、TJ-7、4か月内服後 $155 \times 10^6/ml$ 、75%となり妊娠した。漢方薬の有効性と作用機序に対して疑問を持たれることも多いが、従来の西洋薬が無効で原因不明の慢性的な病態に対しては placebo 的な効果も含めて更に検討されても良い。

8. 糖尿病と月経異常

堂地 勉・山元慎一・永田行博
(鹿児島大産婦)
河野泰子 (同1内科)

尿糖病患者が月経異常を呈することはよく知られた事実であるが、その理由は必ずしも明確ではない。今回糖

尿病が性機能に及ぼす影響を及ぼしているかを検討したので報告する。対象は13~37歳の clinical diabetes の15例で、I型12例、II型3例である。これを初発発来前に DM 発症した4例、治療経過中無月経になったことのあるもの5例、順調に経過した6例で BW, %IBW, FBS, HbA₁ のパラメータで比較検討した。初期発来前に発症した DM の初経は13歳1か月、14歳8か月、17歳3か月、13歳で初経発来なしが1例あった。この4例は発症後の体重増加不良が著明であった。DM 治療経過中順調に月経があつた6例は BW, %IBW とも一定していたが無月経になったことのある5例では、無月経前後で3週間から6か月の間に6~18kg (平均14.8kg) の体重減少があつた。以上より糖尿病の性機能失調は体重減少性無月経とよく似た病態であることが示唆された。

9. 新しい妊娠診断薬・新ゴナビスライドの使用経験

○結城裕之・松口博之・井村睦規
石明 寛・中村元一・中野仁雄
(九州大婦産)

現在、妊娠診断薬として繁用されている反応薬は、多クローン性抗 hCG 抗体を用いているために、hCG と構造の類似した LH との交叉反応性を無視できない。そのため hCG の測定感度を比較的低位設定してあり、非常に早期の妊娠診断には不都合であつた。今回われわれは、LH との交叉反応性の低い単クローン性抗 hCG 抗体を用いた新ゴナビスライド(持田製薬)を妊娠の早期診断に利用する機会を得たので報告する。なお、この試薬における hCG の測定感度は200IU/l である。

当科不妊外来を通院中に妊娠し、BBT 上、妊娠4~5週の早期に従来のゴナビスライド陰性を示した22例に新ゴナビスライドを実施した。

最も早い例では妊娠4週+0日に、また4週+5日以降は、流産例を含めて全例に新ゴナビスライド陽性を示した。

妊娠の早期診断はもちろん、異常妊娠の診断等に新ゴナビスライドの有用性が示唆された。

10. 当院不妊外来における妊娠例の検討

中村雅弘・四宮大乗・儀保善英
(愛育病院)

昭和59年1月より60年12月までの2年間に、当院不妊外来での妊娠成立が248名あつた。

不妊期間、妊娠成立周期の治療、妊娠の経過、妊娠持続日数、分娩時出血量、分娩所要時間、分娩形式、アプガール・スコア等を検討したので報告する。

11. 性器奇形と妊娠・分娩

○小池弘幸・宮川勇生・安田 博
河野恭悟・森 憲正
(宮崎医大産婦)

性器奇形を合併した妊娠・分娩の頻度は多くはないが、妊娠の維持や分娩経過に直接影響を及ぼすことが考えられる。今回、われわれは昭和52年10月から昭和61年8月までに当科において経験した性器奇形を合併した妊娠・分娩16症例、延べ妊娠回数24回、分娩回数17回について検討した。

奇形の内訳は、単角子宮4例、双角単頸子宮(単腔)2例、双角双頸子宮(腔中隔合併)1例、双角双頸子宮(腔中隔合併)1例、腔中隔のみのもの5例、処女膜閉鎖症1例であつた。

このうち正期産で経産分娩は10例(自然分娩7例、吸引分娩3例)帝王切開6例、早産(妊娠29週)1例、自然流産3例、子宮外妊娠2例、現在妊娠中のもの2例であつた。反復妊娠したものは、2回妊娠が4例、3回妊娠が2例であつた。

以上の16症例について、考察を加えて報告する。

12. 外性子宮内膜症に対するダナゾールと R-2323 の腹腔鏡による治療効果の比較

宇津宮隆史・角沖久夫・岩里桂太郎
是 永 進・松岡幸一郎・是永迪夫
門 田 徹
(九州大生体防御医学研究所産婦)

子宮内膜症は不妊症の原因として注目されており、その治療法も種々報告されている。われわれは不妊症例に腹腔鏡を行なつて子宮内膜症を認めた42例のうち22例にダナゾール、20例に R-2323を6か月投与し、その治療効果を独自に考案した腹腔鏡によるスコアリングを用いて比較、検討した。その結果、両群の重症度分類、発生部位には差はなかつた。自覚症状の改善度も両群とも50%以上で差はなかつた。腹腔鏡所見は、ブルーベリー・スポット、癒着、チョコレートのお腫について、それぞれ検討したが、両群とも60%以上の改善率を得て、差はなかつた。副作用ではダナゾールは肝機能異常を来した例が54.5%あり、それに比べ、R-2323では10%と低率であつた。また嘔声はダナゾールは4.5%であつたのに比べ、R-2323では軽症例も含め35%に認められた。

第29回日本不妊学会北海道地方会部会総会・ 学術講演会

日 時：昭和62年1月13日(土)

場 所：北海道大学学術交流会館

1. 乳汁中コルチゾール値を指標とする ACTH 負荷 による乳牛の副腎皮質機能検査法についての検討

○和 氣 拓・中尾敏彦・森好政晴
河田啓一郎(酪農学園大獣医学科)

乳牛において血液よりも採取が容易な乳汁中のコルチゾールの EIA を応用した ACTH 負荷試験の基礎的検討を行なった。ACTH (0.25~1.0mg) の筋注後、血清中で30分後、脱脂乳中では1~2時間後にコルチゾール値の急激な上昇が認められ、4時間高値を維持した。このことから、ACTH 0.25mg 負荷前と負荷2時間後の脱脂乳中コルチゾール値を測定することにより副腎皮質機能を検査できるものと考えられた。

次にこの方法による ACTH 負荷試験の正常値を検討する目的で泌乳前期の牛6頭(I群)と泌乳中期6頭(II群)において ACTH 負荷試験を行なった。ACTH 負荷前と負荷2時間後の値(平均±SD)はI群で $1.3 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$ と $22.5 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ 、II群で $1.1 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ と $20.1 \pm 5.0 \text{ ng/ml}$ であつた。またI群とII群全頭における ACTH 負荷試験の負荷前と負荷2時間後の平均値の95%信頼限界は $1.1 \sim 1.4 \text{ ng/ml}$ と $18.5 \sim 24.0 \text{ ng/ml}$ であり、これが本法における正常値であると考えられた。

2. 牛黄体の形態と血清中 Progesterone (P) 濃度 および黄体中 P 含有量との関連性について

○須藤 正英・森好政晴・中尾敏彦
河田啓一郎(酪農学園大獣医学科)

牛の発情黄体・妊娠黄体の形状の変化、特に生前の直腸検査による卵巣触診および剖検時の肉眼所見と組織学的・免疫組織化学(AB法)的所見ならびに血清中P濃度および黄体中P含有量との関連性を明らかにする目的で、畜場に搬入されたホルスタイン種乳牛(うち妊娠牛23例)について検索を行なった。

その結果、発情黄体では触診による硬度と性周期の時期との間に有意な相関があり、妊娠黄体は性周期での形成後期に相当し、組織学的には黄体中の結合組織の占める割合の変化に由来することが確認された。また大型黄体細胞に強い免疫活性が認められ、発情黄体例では大型黄体細胞の割合・血清中P濃度および黄体中P含有量の

それらの間に高い正の相関がみられ、性周期の開花期に頂点を示す増減を示したが、妊娠例ではこのような関係は明確には認められなかつた。

3. 液体窒素ガスによるマウス胚の急速凍結、とくに 透明帯の有無および耐凍剤の影響

○アバス・マズニ・オスマン
高橋芳幸・金川弘司
(北大獣医)

マウス桑実胚の透明帯は0.5%プロムナーゼで除去し、耐凍剤は glycerol, ethylene glycol および DMSO を使用し、0.25M の sucrose または lactose を含む媒液で、急速凍結を行ない、融解後、体外培養によつて胚の生存性を検査した。

その結果、透明帯を有する対照胚では3M ethylene glycol と lactose および 3M glycerol と sucrose を用いた場合に生存率が高く、それぞれ76.5%および73.5%であつた。一方、透明帯除去胚では2M glycerol と lactose および 3M ethylene glycol と lactose を用いた場合に生存率が高く、それぞれ62.7%および60.8%であつた。このことから、耐凍剤の種類や濃度によつて、sucrose や lactose の効果が異なることが示唆された。

予備的に切断2分離胚についても、急速凍結法を試みたが、対照胚では66.3%の生存率が得られたのに、正常な発育を示す胚はみられなかつた。

4. 高齢マウスにおける無核卵の多発性について

山口辰美・牧野田知・戸喜兵衛
(北大産婦)

胞状奇胎の発生原因は Androgenesis によることが証明され、その成立の一つの可能性として無核卵の受精が想定される。一方、胞状奇胎妊娠は40歳以上の更年期婦人で激増するため、これらの関係を解明すべく更年期動物における卵胞卵での無核卵の頻度を追求した。

実験動物は C57BL/6J 系マウスの成熟齢(108~274日齢)、更年期齢(403~503日齢)のものをを用いた。培養液は TC-199+1mg BSA で pH は7.2~7.3、浸透圧は約310mOsm であつた。卵胞を穿刺し卵を採取培養した。卵は経時的に観察し、培養終了後固定し染色観察した。

1) 成熟齢での採卵数は1個当たり約17個なのに対し、更年期齢では約6個と1/3であつた($P < 0.01$)。しかし卵質成熟度、卵核成熟率には差はなかつた。2) 極体数2個の卵は成熟齢で3.6%に出現したが、更年期齢では9.2%と著しく高かつた($P < 0.025$)。3) 無核卵の出現

率は成熟齢で3.6%であった。しかし更年期齢では12.5%と3倍以上の著高を認めた ($P < 0.05$)。

400日齢以上の C57BL/6J 系更年期マウスで無核卵の出現頻度の上昇を認めた。高齢化により卵の成熟過程に何らかの変化が推定され、更年期齢での胞状奇胎妊娠増現象の裏付けが示唆された。

5. 北大産婦人科不妊外来における妊娠成功例の内わけ

田中俊誠, 及川 衛, 桜木 範明
山本 律, 藤本征一郎, 一戸喜兵衛
(北大産婦)

昭和52年1月より61年11月までの10年間に登録された1,435名の不妊婦人のうち526名(36.7%)が妊娠した。当科での一般的不妊検査を終了した(1,221名)に対する修正妊娠成功率は43.1%であった。

妊娠に直接結びついたりと考えられる治療・検査について検討した。各種の不妊検査終了後に自然に妊娠が成立した婦人は155名(28.5%)であった。Clomid 単独、もしくは clomid と他剤との併用による妊娠は162名(29.8%)で最も多かった。その他、hMG 療法による妊娠(52名, 9.6%), HSG 施行後妊娠(41名, 7.6%), Bromocriptine による妊娠(23名, 4.2%), 通水後妊娠(22名, 4.1%), PCOD 婦人に対する楔状切除術後妊娠(19名, 3.5%)などが多かった。

本研究のデータより、当教室における今後の不妊症治療の方向性を探りたい。

6. 当院における PCO の薬物療法における治療成績

○遠藤俊明, 三好正幸
(北見赤十字病院産婦)
伊東英樹, 福島道夫, 田中昭一
橋本正淑 (札幌医大産婦)

PCO は進行性病変であり、未婚であつても、早期排卵誘発が望ましいとされている。われわれは、昭和61年に経験した未婚・既婚合わせて約20名の PCO 患者に対して sexovid, clomid 治療、更に hCG, Bromocriptine, 芍薬甘草湯, Prednisolone を併用投与した。そして治療前後の LH, FSH, testosterone, DHEAS, androstenedione の変化を検討した。また排卵成績、妊娠例について得た知見について報告する。

7. 体重減少による無月経について

○渡辺広史, 水沼正弘, 幡 洋
田中昭一, 橋本正淑
(札幌医大産婦)

最近5年間に急激な体重減少と関係した無月経症例は12例(減食性無月経8例, Anorexia nervosa 4例)で、これについて検討した。初経年齢は正常であつた。無月経期間と無月経の程度とは相関はなかつた。血中 gonadotropin 値は低く、LH-RH に低反応であるが、症状改善とともに gonadotropin 基礎値の上昇、LH-RH に対する反応が出てくる傾向を示した。この両者の治療の第一は体重の回復であるが、標準体重に回復し難く、また標準体重に回復しても性機能の改善が認められないものが大部分であつた。治療法はまず第一に体重回復をはかる、さらに第1度無月経には Holmstrom 療法、第2度無月経には Estrogen progesterone cyclic 療法を行なっているが、排卵誘発を行なつた症例はない。しかしこれら治療に半数以上は反応せず無月経のままであつた。また臨床的に減食性無月経より Anorexia nervosa の方が重症であつた。以上、若い女性の急激な体重減少が性機能に与える影響について検討したので報告する。

8. 超音波断層法による卵管疎通性の評価 —第2法—

○菊川美一, 高田久士, 相馬 彰
笠茂光範, 浅川竹仁, 石川睦男
清水哲也 (旭川医大産婦)

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) とほぼ変らない成績であつた。偽陽性率は超音波法26.7% (4/15), HSG 25.0% (3/12) とこれもほぼ同率であつたが、偽陰性率は超音波法0% (0/19), HSG 9.1% (2/22) であり、超音波法では1例もなかつた。

超音波断層法によると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の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、30名の通色素試験の行なわない外来患者に超音波通水法を行ない、HSG と比較検討し、超音波法による卵管疎通性検査法は実施臨床上有用性が大きいことを確認した。

9. Laparoscopy で確認された不妊婦人における endometriosis

及川 衛, 田中 俊誠, 山本 律
桜木範明, 藤本征一郎, 一戸喜兵衛
(北大産婦)

子宮内膜症を有する婦人が増えてきているといわれている。したがって、endometriosis が不妊の原因となっている婦人の数も増加しているものと予想される。

北大産婦人科において、昭和59年4月より61年11月までに Hysterosalpingography (HSG) により卵管・腹膜因子が不妊の原因と考えられる197名に Laparoscopy を施行した。37名 (18.8%) に endometriosis を確認した。そのうち22名は Laparoscopy 施行後に始めて endometriosis と診断された。

原因がはっきりしない不妊婦人、HSG より卵管・腹膜因子が不妊の原因と考えられる婦人には endometriosis を考慮した不妊の検査・治療が必要と考えられる。

10. ウシ凍結精子の体外における受精能獲得誘起法に関する 2, 3 の検討

橋田達慶, 高橋芳幸, 金川弘司
(北大獣医)

ウシ凍結精子の受精能獲得および先体反応を誘起する方法を確立するために、前培養のみ、イオノホア (A 23187) および高張処理の3つの処理方法について比較検討した。

まず、条件を変えて処理した精子について、トリプルステイン法を用いて先体反応誘起率を判定し、最適な処理条件を調べた。

また、2頭の雄ウシの精子を使用することによつて、供試牛による個体差についても検討した。トリプルステイン法で最適と判断された条件で条種処理を施した精子を、体外成熟卵子と体外で媒精した結果、イオノホア処理 (0.1 μ M, 3分間) を施した場合に最も高い受精率 (43.3%) が得られた。受精率とトリプルステイン法で判定した先体反応誘起率との間には有意な相関が認められた。

11. ラット精巣における Glutathione S-transferase の組織化学的検討

足立祐二, 野々村克也, 小柳知彦
(北大泌尿器)
高野衛子, 阿部和厚 (同第3解剖)
小杉雅郎 (市立滝川病院泌尿器)

ラット精巣における GST の局在、分布と Leydig の細胞の重量の算出を経時的に行ない、内分泌学的検討を加えた。

出生直後-14週までのラット精巣のブアン環流固定標本を用いた。GST による PAP 染色は、Sternberger の方法に準じて行ない、Leydig 細胞の重量は立体計量形態学的に算出した体積比に精巣重量を乗じて求めた。

Leydig 細胞は年齢の別なく全例で GST の染色性を有しており、その重量は4週より急激に上昇した。精細管では2~4週にかけて GST に染色性の有する細胞がみられ、出生直後および6週以降のラットでは染色されなかった。以上、Leydig 細胞では、その分化度に関係なく GST 活性を有し、一方精細管では、思春期前期とも云えるホルモン環境の時期のみに、GST 活性を有する細胞が出現するものと想定される。これらの結果は、われわれが従来報告してきた人精巣における GST の PAP 染色の検討結果と一致する。

12. 男子不妊症での治療効果推定の検討

○伊藤直樹, 三熊直人, 斎藤誠一
高木良雄, 丸田 浩, 熊本悦明
(札幌医大泌尿器)

われわれは Oligozoospermia 症例において治療効果を期待できる group の特徴を検討する目的で、辜丸間質予備能としての Estrogen 分泌予備能に着目し、さらに gonadotropin level, 精子数, 最終的な治療効果の有無から、治療へ反応する症例群の内分泌学的特徴について詳細に検討した。

対象は3か月以上の治療を施行した男子不妊症 (精子数 $40 \times 10^6/\text{ml} >$) 58例。血中 LH, FSH, hCG 10,000 単位投与前および24時間後の Testosterone (T), Estradiol (E_2), 治療前精子数を測定、 E_2 予備能と E_2 -T balance を知る上で $[E_2/T] 24h/[E_2/T] 0$ という index を用いた。

治療効果が期待できる group は以下の特徴を有した。
① $[E_2/T] 24h/[E_2/T] 0 < 3.5$ ② $LH \leq 13$ (正常男子の mean + 1 S, D) ③ 治療前精子数 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、つまり E_2 分泌予備能は E_2 -T balance を崩すほど高くは

なく, gonadotropin 正常, severe Oligozoospermia ではないと特徴づけられ, 今後, 治療効果推定の参考になり得ると思われた.

13. マウス抗雄脾臓細胞血清の細胞障害性試験

西山栄治, 高橋芳幸, 金川弘司
(北大獣医)

Y連鎖組織適合性抗原いわゆる H-Y 抗原は, マウス・ウサギなどにおいて胚の雌雄判別に有効であることが確認されている. 抗血清の力価の判定法としては, 一般に Goldberg ら (1971) の精子細胞障害性試験が用いられているが, 精子の生死判別が難しい. そこで今回は, 染色法に改善を加えた Doohar と Bennett (1977) の変法を用いて障害性試験を行ない, その有効性を検討

し, 併せて胚細胞への影響も調べた. 抗血清の作製は, C57BL/6 系雌マウスに同系雄マウスの脾臓細胞を数回にわたって腹腔内に投与して行なった. 細胞障害性試験の結果, 免疫した15匹のマウスのうち6匹から, 障害活性の上昇した血清が得られた. ddY 系雌マウスに過排卵処理を行ない, 正常に発育した桑実胚を回収して, 障害活性が上昇した血清と上昇しなかった血清を用いて培養した結果, 障害活性が上昇した血清で培養した場合には約50%の胚が変性した.

以上のことから, Doohar と Bennett の変法は, 抗血清の判定に十分利用できると考えられた.

特別講演 男性不妊に関連する 2, 3 の問題

片山 喬 (富山医薬大泌尿器)

第5回 日本受精着床学会学術集会ならびに
ヒト体外受精国際シンポジウム案内
(第2回予告)

第5回日本受精着床学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) を下記の要領にて、開催いたします。多数の御出題ならびに御参加をお願い申し上げます。

記

1. 第5回日本受精着床学会

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 京都市左京区松ヶ崎宝ヶ池 (TEL. 075-791-3111)

招 請 講 演 1. 東京大学医学部産婦人科 水野正彦 教授
演題未定

2. 京都大学農学部 入谷明 教授
「哺乳動物における体外受精・初期胚の顕微操作」

シンポジウム 1. 生殖生物学における最近の進歩

2. 日本における GIFT 法の現況とその周辺

演題申込要領 1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプでうち、簡易書留郵便にて下記へお送り下さい。

〒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事務局 (TEL. 075-751-3284)

2. 演題募集締切 昭和62年7月31日(金)必着

(第1回予告では6月30日となっておりましたが上記期日に変更させていただきます。)

学術集会および懇親会参加費：

学術集会参加費 9,000円 (7月31日迄に登録の場合)

(ヒト体外受精国際シンポジウム 10,000円 (8月1日以降に登録の場合)
参加費を含む)

懇親会参加費 7,000円

2. ヒト体外受精国際シンポジウム

会 期：昭和62年11月1日（日）
会 場：国立京都国際会館（Kyoto International Conference Hall）
〒606 京都市左京区松ヶ崎宝ヶ池（TEL. 075-791-3111）
会 費：第5回日本受精着床学会参加費に含まれる。

講演内容	タイトル	演者
(1)	(Follicular stimulation in IVF)	G. Hodgen
(2)	Techniques for oocyte recovery in IVF	L. Hamberger
(3)	Basic and clinical studies towards a blood test for human endometrial function	M. Seppala
(4)	Improved oocyte quality to improve results in IVF-ET	A. H. DeCherney
(5)	Prospects and problems in eggs and embryo cryopreservation	A. O. Trounson
(6)	Gamete intrafallopian transfer—Past, present, and future	R. H. Asch
(7)	Legal and religious aspects of new technology in reproduction	J. H. Schenker
(8)	(Gametes and embryo manipulation in IVF-ET. today and tomorrow)	D. Hanahan
(9)	Pregnancy outcome in IVF-ET, reality and reaches (including immunological factors)	L. Mettler
(10)	(Male infertility and IVF)	J. Cohen

() 付きのものは、現在交渉中の依頼演題ですので、
演者の要望によつて変更されることもあります。

第5回日本受精着床学会 会長

ヒト体外受精国際シンポジウム 組織委員長 森 崇 英

第5回日本受精着床学会ならびに

ヒト体外受精国際シンポジウム事務局

〒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

(担当 野田洋一, 矢野樹理)

(TEL. 075-751-3284)

第13回 世界不妊学会 (IFFS) のご案内

1986年10月シンガポールで開催されました第12回 IFFS 総会で次期の開催が下記の通り決定しましたのでご案内申し上げます。

開催地：カサブランカ（モロッコ）

開催期間：1989年10月1日～6日

プログラム等に関しましては目下 Scientific Committee で検討中でありますので、追ってご案内申し上げます。

第6回 Society for the Advancement of Contraception (SAC 東京大会)

開催のお知らせ

会期：昭和63年5月23日（月）～26日（木）

場所：笹川記念会館（東京都港区三田）

会長：高木 繁夫（日本大学）

詳細については下記事務局までお問合せ下さい。

事務局：日本大学医学部産科婦人科学教室内

SAC 東京大会係

〒173 東京都板橋区大谷口上町 30-1

TEL. 03 (972) 8111

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)
参 加 費：正会員 60,000円
 同伴者 30,000円
 student 20,000円

主なる foreign guests (100名)：

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), 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 21
 シンポジウム 17
 ワーク・ショップ 12
 一般演題 約 320

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

参加申込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。
なお、一般演題の申込みはすでに締切りました。

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

III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GYNECOLOGIC ONCOLOGY, SURGERY AND UROLOGY

下記の要領で開催されます。奮つて御参加下さい。
(講演には、日本語=英語の同時通訳が入ります)

会期ならびに会場：

昭和62年10月18日(日)~19日(月) 仙台, ワシントンホテル
昭和62年10月22日(木)~23日(金) 東京, 日大会館(市ヶ谷)

会 長：高 木 繁 夫(日本大学教授)

主 題： I Breast cancer II Ovarian cancer
 III Endometrial cancer IV Cancer of the vulva
 V Trophoblastic disease VI Carcinoma of the cervix
 VII Basic research

演 者：(一般演題はありません)

外人講師 17名

V. Friedberg (F.R.G.) J. Kindermann (F.R.G.) P. Knapstein (F.R.G.)
R. Park (U.S.A.) J.T. Thigpen (U.S.A.) P.J. DiSaia (U.S.A.) B.U. Sevin (USA)
N. Hacker (U.S.A.) U. Haller (Switzerland) Lawler and K.D. Bagshawe (U.K.)
M. Webb (Australia) A. Ng (Australia) N. Hacker (Australia) J. Burkhardt (Austria)
J. Robert (France) F. DiRe (Italy) L.G. Lampe (Hungary)

国内講師 29名

協 賛：日本産科婦人科学会, 日本母性保護医協会

申込方法：登録用紙にご記入のうえ8月31日までにお申込み下さい。

参加費 15,000円

申込先 〒173 東京都板橋区大谷口上町 30-1

日本大学医学部産科婦人科学教室 高木 繁夫
(お問い合わせ TEL 03 (972) 8111 内2197 長田, 津端)

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
 - 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 3 号

昭和 61 年 6 月 25 日 印 刷

昭和 62 年 7 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