

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 33 No. 3

July
1988

日本不妊学会雑誌

第33卷 第3号

昭和63年7月1日

Jpn. J. Fertil. Steril. 日不妊会誌 日本不妊学会発行

会 告

第 33 回日本不妊学会総会および学術講演会 (第 3 回予告)

第 33 回日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領にて開催いたします。会員の皆様方の多数の御参加をお願い申し上げます。

日時・会場

学術集会 昭和63年11月15日(火)、16日(水) ……国立京都国際会館
理事会・幹事会 昭和63年11月14日(月) ……宝ヶ池プリンスホテル
総会・評議員会 昭和63年11月15日(火) ……国立京都国際会館
国立京都国際会館 〒606 京都市左京区宝ヶ池 TEL 075-791-3111
宝ヶ池プリンスホテル 〒606 京都市左京区宝ヶ池 TEL 075-712-1111

学術講演会

本講演会では、招請講演、特別講演、シンポジウム、一般講演などを行う予定です。一般講演には、多数の演題をお申込み下さいますようお願い申し上げます。なお今回、ポスターセッションを重要視し、演題数の約半分をポスターセッションにしたいと考えています。ご応募の方は、申込要領に従い、締切期日を厳守して下さい。

I. 会長招請講演

New Technology in the Field of Animal Reproduction

Robert H. Foote 教授 (コーネル大学農学部)

司会 入谷 明 教授 (京都大学農学部)

II. 特別講演

1. 精子の運動生理

毛利 秀雄 教授 (東京大学教養学部生物学科)

司会 正木 淳二 教授 (東北大学農学部畜産学科)

2. 黄体機能の調節とその異常

森 崇英 教授 (京都大学医学部産婦人科)

司会 飯塚 理八 教授 (慶応義塾大学医学部産婦人科)

3. 副睾丸におけるアンドロジェン代謝と精子成熟にかかわる因子

穂坂 正彦 教授 (横浜市立大学医学部泌尿器科)

司会 大島 博幸 教授 (東京医科歯科大学医学部泌尿器科)

III. シンポジウム

1. 『初期発生に関する諸問題』

司会 水野 正彦 教授 (東京大学医学部産婦人科)

豊田 裕 教授 (東京大学医科学研究所)

(1) 顕微受精卵の発生能

細井 美彦 (京都大学農学部畜産学科)

(2) 2-cell ブロックの打破要因

野田 洋一 (京都大学医学部産婦人科助教授)

(3) 胚の EPF

末岡 浩 (慶応義塾大学医学部産婦人科)

(4) 胚細胞核の全能性

角田 幸雄 (農林水産省畜産試験場繁殖部室長)

(5) 卵の成熟分化機構の代謝学的分析

堤 治 (東京大学医学部産婦人科)

2. 『雄性副性器の生理と病理』

司会 酒徳治三郎 教授 (山口大学医学部泌尿器科)

守殿 貞夫 教授 (神戸大学医学部泌尿器科)

(1) 精巣上体における精子成熟過程

押尾 茂 (帝京大学医学部泌尿器科)

(2) ヒト精巣上体機能一部位別にみた内分泌学的, 組織学的特異性—

木下 裕三 (横浜市立大学医学部泌尿器科講師)

(3) 精巣上体管収縮機能 (contractility) とプロスタグランディン

瀧原 博史 (山口大学医学部泌尿器科講師)

(4) 前立腺機能と精子運動能

安川 明広 (香川医科大学泌尿器科講師)

(5) 副性器感染症と不妊

岡田 弘 (神戸大学医学部泌尿器科)

(6) 閉塞性無精子症に対する外科療法

吉田 英機 (昭和大学医学部泌尿器科助教授)

IV. 一般講演

演題申込資格

講演者 (共同発表者を含む) は本会会員に限ります。会員以外の方は演題申込と同時に, 昭和 63 年度会費 (8,000 円) を納入の上, 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又はワープロで打ち書留郵便にて下記にお送り下さい。

〒 606 京都市左京区北白川追分町

京都大学農学部畜産学教室内

第 33 回日本不妊学会事務局

(担当: 内海恭三)

TEL. (075) 751-2111 ext. 6059, 6057, 6058

2. 抄録は800字以内、図、表はつけないで下さい。
3. 一施設より2題以上の出題のときは、順位をつけて下さい。
4. 別紙演題申込書、受取書、採用通知書に所定事項を記入し、切手を貼り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63年7月末日（必着）

演題発表方法

講演時間は6分、討論時間は2分の子定です。スライドプロジェクターは各会場とも1台とします。スライド枚数は10枚以内とします。また、ポスターセッションを御希望の方はポスターのところに○印をつけて下さい。なお、発表形式の最終決定は事務局に御一任願います。ポスターボードの大きさや討議の様式は、採用者に後日御連絡いたします。

参加申込方法

学会当日、会場にて受付けます。

学会参加費 7,000円

総懇親会費 7,000円

総懇親会は学会第1日の終了後に同京都国際会館で行う子定です。

学会の進行子定（多少の変更が予想されます）

11月15日（火）（第1日目）

- 9：00 開会
- 9：10—9：50 会長招請講演
- 9：50—12：00 一般講演：口頭発表（16題×5会場）
- 12：00 休憩 [評議員会]
- 12：50—13：20 総会
- 13：20—14：00 特別講演—1
- 14：05—15：35 一般講演：口頭発表（11題×5会場）
- 15：40—17：40 シンポジウム—1
- 18：00—20：00 総懇親会

11月16日（水）（第2日目）

- 9：00—11：20 一般講演：ポスター（80題：15日午後より展示）
- 11：30—12：10 特別講演—2
- 12：10—13：00 休憩
- 13：00—13：40 特別講演—3
- 13：40—15：00 一般講演：口頭発表（10題×5会場）
- 15：10—17：10 シンポジウム—2
- 17：10 閉会

昭和63年7月

第33回 日本不妊学会

会長 入谷 明

日本不妊学会誌

第33巻 第3号

昭和63年7月1日

—目 次—

原 著

- An Anti-mouse Sperm Monoclonal Antibody (OBF13) and Its Inhibitory Activity on FertilizationM. OKABE et al. 1
- Inhibition of Fertilization in the Hamster by Gold Sodium Thiomalate, A Hyaluronidase InhibitorK. SATO 7
- Concentration of Gonadotropins and Sex Steroids in Bovine Follicular Fluid During Estrous StagesM. UMEZU et al. 11
- 家兔の哺乳行動について.....辻井弘忠 16
- 脳内アミン減少ラットの性機能に関する検討.....堂地 勉・他 22
- ヒト子宮内膜培養上清のリンパ球幼若化反応に及ぼす影響
Fluorometric Blastformation Test と Glucose Consumption Test による解析王 輝生・他 26
- 子宮筋の組織片培養および器官培養との比較
Rose の還流培養装置を使って大塚治夫・他 34
- 正常ヒト初期脱落膜より得られた TTK-2 cell line の分泌現象に関する形態学的研究.....立山一郎・他 40
- Prolactin Response to Gonadotropin-Releasing Hormone in Anovulatory WomenK. SEKI & K. KATO 52
- Prolactin 分泌機構に及ぼす LHRH の影響に関する検討久保田俊郎・他 56
- Role of Ovarian Estrogen on PRL Secretion in Idiopathic Infertile WomenH. TAHARA et al. 63
- 単クローン性抗プロラクチン抗体を用いたプロラクチン半定量法の検討.....吉田耕治・他 70
- 黄体期不全における排卵期, 黄体期の超音波像と内分泌動態.....富岡 恵・他 74
- Catecholaminergic Activity in Patients With Polycystic Ovary Syndrome and in Subjects With A Normal Ovulatory CycleK. YOSHINO et al. 82
- Rubin test, HSG, Laparoscopy の卵管通過性に関する診断的意義東口篤司・他 87
- 卵管通過性に関する通気検査, 子宮卵管造影, 腹腔鏡検査の比較検討.....亀田 隆・他 92
- 非イオン化水溶性造影剤による子宮卵管造影法の試み.....松島弘充・他 97
- 当科における卵管マイクロサージャリーの術式別治療成績の検討.....齊藤佳孝・他102
- ヒト体外受精用培養液中の至適カリウム濃度に関する検討.....和田 省・他107

Menstrual CA 125 AS A Marker for Patients with Endometriosis: A Preliminary Report	K. TAKAHASHI et al.	113
不妊治療による妊娠の管理について 分娩時年齢, 初経産を一致させた自然妊娠群との比較検討から	高橋 晃・他	117
当科不妊外来における臨床的統計の推移.....	西垣 新・他	125
True Hermaphroditism without Demonstration of Existence of Gonads	T. OKAMURA et al.	130
芍薬甘草湯 (S-K) の高 testosterone 血症性婦人における 血中 androgens 濃度の低下作用, 排卵誘発効果と安全性 多施設協同研究.....	柳沼 恣・他	134
卵巣機能不全不妊症に対する漢方療法.....	假野隆司	145
抗プロゲステロン剤 RU 486 の着床阻止作用に関する検討	鷓木康資・他	151
Effects of Hachimijiogan and Keishibukuryogan on Testicular Testosterone Production in Rats	S. USUKI	156
ブタ精巣上体のペントースサイクル活性.....	伊藤元博・他	163
洗滌濃縮精子の凍結保存に関する研究.....	翁 文開・他	167
Migration-Gravity Sedimentation Method を利用した運動精子回収法, 及び同法の AIH への応用	辰巳賢一・他	173
精細管内 Androgen 濃度の研究第 2 報	大橋輝久・他	179
Makler 算定盤の使用経験	林田英嗣・他	185
閉塞性無精子症に対する顕微鏡下一層縫合による精管精管吻合術.....	角谷秀典・他	189
Effect of Porcine Kallikrein Treatment on Male Infertility	M. YOKOYAMA et al.	196
クエン酸タモキシフェンによる特発性男子不妊症の治療.....	布施秀樹・他	199
地方部会講演抄録		205

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 33, No. 3, 1988)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- An Anti-mouse Sperm Monoclonal Antibody (OBF13) and
Its Inhibitory Activity on Fertilization *M. Okabe, T. Adachi, H. Oda,*
M. Yagasaki, Y. Kohama & T. Mimura 1
- Inhibition of Fertilization in the Hamster
by Gold Sodium Thiomalate, A Hyaluronidase Inhibitor.....*K. Sato* 7
- Concentration of Gonadotropins and Sex Steroids in
Bovine Follicular Fluid During Estrous Stages*M. Umezu, A. Miyamoto,*
S. Ito & J. Masaki 11
- Nursing Behaviour in the Rabbit*H. Tsujii* 16
- The Effects of Norepinephrine Depletion on Gonadal Function in
6-Hydroxydopamine (6-OHDA)-Treated Rats.....*T. Douchi, I. Matsumoto,*
S. Yamamoto, Y. Nagata, T. Kosha & T. Fukuda 22
- Effect of Human Endometrial Supernatants on PHA-induced Lymphocyte Reactivity
—Analysis by Fluorometric Blastformation Test and Glucose Consumption Test—
.....*H. S. Wang, H. Kanzaki, M. Tokushige, S. Sato, M. Yoshida & T. Mori* 26
- A Comparative Study of Explant Culture and Organ Culture in Myometrium
Using Rose's Circumfusion System
.....*H. Otsuka, K. Yoshida & Y. Okamura* 34
- Morphological Studies on Secretory Function of The TTK-2 Cell Line
Derived from Normal Human Early Decidual Tissue
.....*I. Tateyama, T. Mori, T. Tominaga & N. Kamitani* 40
- Prolactin Response to Gonadotropin-Releasing Hormone
in Anovulatory Women*K. Seki & K. Kato* 52
- The Effect of LHRH on the Prolactin Releasing Mechanism of
Women in Non-pregnancy and Early Pregnancy
.....*T. Kubota, S. Kamada, H. Tsuzuki,*
A. Kohyama, N. Nishi & M. Saito 56
- Role of Ovarian Estrogen on PRL Secretion in
Idiopathic Infertile Women*H. Tahara, S. Ohishi, H. Chiba,*
R. Tahara, T. Yanaihara & T. Nakayama 63

Evaluation of the Prolactin Semi-quantification using Monoclonal Prolactin Antibody	<i>K. Yoshika, M. Takashima, H. Otsuka, S. Baba, K. Oikawa S. Takayanagi & Y. Okamura</i>	70
The Perioovulatory Hormonal Studies and Pelvic Ultrasonography in Luteal Phase Defect.	<i>M. Tomioka, T. Yamamoto, Y. Ohno, M. Tsuji, H. Honjo & H. Okada</i>	74
Catecholaminergic Activity in Patients with Polycystic Ovary Syndrome and in Subjects with A Normal Ovulatory Cycle	<i>K. Yoshino, K. Takahashi, A. Nishigaki, T. Shirai, Y. Araki & M. Kitao</i>	82
The Diagnostic Value of Rubin Test and Laparoscopy in the Assessment of Tubal Patency	<i>A. Azumaguchi Y. Shimoya, H. Yamamoto, H. Hata, M. Fujii, S. Tanaka & M. Hashimoto</i>	87
A Comparative Study of Tubal Insufflation, Hysterosalpingography and Laparoscopy in the Diagnosis of Tubal Patency	<i>T. Kameda, Y. Samejima, T. Nobunaga, M. Kato, C. Azuma, N. Matsuzaki, T. Negoro, F. Saji & O. Tanizawa</i>	92
Clinical Evaluation of Low-osmotic Non-ionic Contrast Medium for Hysterosalpingography	<i>H. Matsushima, M. Asakawa, M. Tanigaki, T. Furukawa, S. Saito & K. Momose</i>	97
An Analysis of the Results after Microsurgical Tubosurgery in our Clinic.	<i>Y. Saito, H. Tozawa, T. Fukaya, H. Hoshiai & A. Yajima</i>	102
The Effect of Potassium Concentration in the Culture Medium on the Mouse Embryo Development In Vitro	<i>T. Wada, A. Sekijima, T. Iwabe, M. Tanikawa, Y. Oonhara, H. Terado, T. Toda, A. Kikugawa, Y. Mio & K. Maeda</i>	107
Menstrual CA 125 As A Marker for Patients with Endometriosis: A Preliminary Report	<i>K. Takahashi, H. Nagata, A. Uchida, M. Kusakari, Y. Araki, A. Nishigaki, T. Shirai, K. Yoshino & M. Kitao</i>	113
Studies of Pregnancy, Delivery and the Newborn after Treatment of Infertility	<i>A. Takahashi, S. Natsuyama, T. Kihana, N. Emi, K. Takakura & M. Ukita</i>	117

Statistical Data on Women Treated in the Infertility Clinic at Shimane Medical University	<i>A. Nishigaki, K. Takahashi, H. Yamasaki, M. Kusakari, A. Uchida, T. Shirai, Y. Araki, K. Yoshino & M. Kitao</i>	125
True Hermaphroditism without Demonstration of Existence of Gonads	<i>T. Okamura, T. Takeuchi, O. Nishii & T. Yaginuma</i>	130
Effect of SHAKUYAKU-KANZO-TO on Serum Testosterone Levels and Ovulation in Amenorrhic Women with High Serum Testosterone Levels	<i>T. Yaginuma & Co-worker</i>	134
Kampo-Treatment on Ovarian Dysfunctional Infertilities	<i>T. Kano</i>	145
Antinidatory Activity of Anti-Progestational Compound RU486	<i>Y. Unoki, K. Takeuchi & Y. Nagata</i>	151
Effects of Hachimijiogan and Keishibukuryogan on Testicular Testosterone Production in Rats	<i>S. Usuki</i>	156
Pentose Phosphate Cycle in the Caput, Corpus and Cauda Epididymal Tissue from the Boar	<i>M. Ito, I. Atobe, H. Watanabe & H. Amano</i>	163
Cryopreservation of Washed and Concentrated Human Sperm by Percoll Density Gradient	<i>W. K. Won, T. Kobayashi, S. Kaneko, H. K. Lee & R. Iizuka</i>	167
AIH Using the Sperm Collected by the "Migration-Gravity Sedimentation" Method	<i>K. Tatsumi, Y. Noda, H. Matsumoto, Y. Umaoka, J. Yano, A. Fukuda, N. Emi, I. Takai, S. Taii, H. Kanzaki & T. Mori</i>	173
Study on Intratubular Androgen Levels, Report 2	<i>T. Ohashi, S. Irie, Y. Ohashi, M. Furukawa, Y. Yamashita, A. Nagai & H. Ohmori</i>	179
Comparison between Two Methods for the Measuring of Human Spermatozoa	<i>H. Hayashida, K. Ishizu, G. Yamakawa, R. Isoyama, H. Takihara & J. Sakatoku</i>	185
One-Layer Microscopic Vasovasostomy for Obstructive Azoospermia	<i>H. Sumiya, H. Fuse, M. Takahara, H. Ishii, J. Shimazaki & H. Ito</i>	189
Effect of Porcine Kallikrein Treatment on Male Infertility	<i>M. Yokoyama, O. Kamei, H. Seike & M. Takeuchi</i>	196
Treatment with Tamoxifen Citrate in Idiopathic Infertility	<i>H. Fuse, M. Takahara, H. Ishii, H. Sumiya & J. Shimazaki</i>	199

AN ANTI-MOUSE SPERM MONOCLONAL ANTIBODY (OBF13) AND ITS INHIBITORY ACTIVITY ON FERTILIZATION

Masaru OKABE, Toshiyuki ADACHI, Hiroshi ODA,
Mitsuro YAGASAKI, Yasuhiro KOHAMA and Tsutomu MIMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Abstract: When *in vitro* fertilization of mouse ova was performed in a medium containing a monoclonal antibody to mouse sperm (OBF13), zona penetration of sperm was not affected. However, formation of pronuclei after sperm penetrated into the perivitelline space was completely inhibited by the addition of the antibody (at 2,000 times dilution of the ascite: approximately 1.0 μ g IgM/ml). The preincubation of ova with the ascite caused no decrease in the fertilization rate. The fertilization inhibitory activity of the ascite disappeared by adsorbing the antibody with mouse sperm. It was also demonstrated that passive immunization of OBF13 could reduce the percentage of ova developing to the pronuclear stage *in vivo*.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 473-478, 1988)

Introduction

Membrane changes associated with sperm capacitation have been detected using various means including lectin¹⁾, chlortetracyclin²⁾ and monoclonal antibodies³⁻⁸⁾. However it is methodologically difficult to prove that the detected change represents a real physiological change occurring on fertilizing sperm, since during incubation some of the sperm may degenerate, and only a few out of millions of sperm are actually utilized for fertilization. These factors render interpretation of experimental data difficult.

One way of studying the significance of membrane changes detected by one of the above means is to investigate the effect of antibodies or other materials on sperm function.

A monoclonal antibody OBF13 which we obtained attached to the entire surface of sperm head which penetrated the zona pellucida but not to fresh epididymal sperm⁹⁾. In the present paper, we attempted to investigate the role of the

antigen in fertilization by checking the effect of OBF13 antibody on both *in vitro* and *in vivo* (via passive immunization) fertilization of mouse ova.

Materials and Methods

Immunization Sperm were obtained from the cauda epididymis of matured C57BL/6 mice in phosphate buffered saline (PBS) and were washed twice with PBS. Sperm (approximately 1x10⁶) emulsified with Freund's complete adjuvant and Freund's incomplete adjuvant were injected intraperitoneally to female C57BL/6 mice on days 0 and 21, respectively. The third injection was given on day 28 without an adjuvant (sperm were suspended in PBS). The mice were sacrificed on day 32 and their spleen cells were subjected to cell fusion.

Preparation of hybridoma and proliferation in ascite The basic medium used was Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (Flow Lab.) supplemented with 100IU/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin (Flow Lab.), 1 μ g/ml of Fungizone

(Flow Lab.), 80 μ g/ml of Gentacin (Shionogi Pharm. Co., Ltd.), 2×10^{-5} M of 2-mercaptoethanol (Nakarai Chem.) and 15% fetal calf serum (M. A. Bioproducts). Cultivation was carried out under 5% CO₂ in air at 37°C.

The myeloma cell line P3U1 was a courtesy of Fujisawa Pharmaceutical Company, Ltd. Approximately 1×10^8 spleen cells from two immunized mice were fused with 1×10^7 P3U1 cells by dropwise addition of polyethylene glycol 4000. Hybridomas were selectively proliferated in a medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine (HAT medium). The indirect immunofluorescein staining method was employed for the screening of hybridomas.

CBF1 (Balb/c x C57BL/6) mice were injected with 0.5ml pristane (Sigma Chem.) intraperitoneally and 1×10^8 hybridoma (cell line OBF13) were injected at least 14 days subsequently. The OBF13 cell line took approximately 10 to 14 days to grow and ascite fluid was removed when the mouse showed sufficient abdominal swelling. Ascites were then clarified by centrifugation and were aliquoted in small volumes and preserved at -80°C.

In vitro fertilization *In vitro* fertilization was performed using ddY closed colony mice. The standard medium used for the experiments was Toyoda's medium¹⁰. The amount of NaHCO₃ was increased from 2.01 to 5.00g/l to bring the pH level from 7.4 to 8.0, a value shown as more suitable for *in vitro* fertilization of mouse ova in our laboratory. The ova were obtained from 4-5 week old ddY mice injected intraperitoneally with 5 i. u. PMSG (Teikoku Zoki) 48 hr before administration of 5 i. u. HCG (Teikoku Zoki). The mice were killed 14-16 hr after HCG injection and the ova in cumulus cells were recovered by puncturing the ampullar portion of the oviduct with a needle. The collected ova were washed twice with 10ml medium. In order to avoid a difference in fertilizing ability of ova from test tube to test tube, ova from approximately 10 females were incubated in the medium for 10 min with occasional agitation, which caused the ova to separate from one another (while still remaining covered by cumuli). The ova were mixed thoroughly and

dispensed into 6-10 tubes (each containing 20 to 30 ova). The spermatozoa were obtained from the cauda epididymis of mature ddY mice (weighing 35-40g) by dispersing into 2ml of Toyoda's medium. Sperm suspension (40 μ l) was added to the ova deposited in 0.4 ml of medium (the final sperm concentration was approximately $1.0-1.5 \times 10^5$ /ml) and was incubated under 5% CO₂ in air at 37°C. At the end of the 90 min incubation, ova were treated with hyaluronidase for 5 min and were assessed for sperm penetration into the zona pellucida under a phase contrast microscope. When sperm penetration was examined after 5 hr of incubation, the ova with two pronuclei were counted together with the sperm still remaining in the perivitelline space.

Adsorption of OBF13 by mouse sperm Sperm were obtained in PBS from the epididymides of ddY mice (and Wistar rats) by squeezing them between a pair of fogged slide glasses. Epididymal debris was removed by filtration through a Kimwipe. The sperm were then treated with 0.02% sodium deoxycholate in PBS for 1 hr at 4°C to enhance their reactivity to OBF13. After being washed 4 times with saline, to approximately 1.0×10^8 of thus prepared sperm, 50 μ liters of OBF13 ascite (diluted 100 times with saline) was added and incubated for 1 hr at 4°C. After the centrifugation (1,200g \times 10 min), the supernatant (containing absorbed ascite) was further diluted with Toyoda's medium to give a 1/10,000 final ascite concentration and was used for *in vitro* fertilization.

Characterization and quantitation of monoclonal antibody The class of OBF13 was determined from the culture supernatant using a monoclonal antibody kit (Miles Lab.). Quantitation of the immunoglobulin was carried out by employing an IgM radial immunodiffusion kit (Miles Lab.). The ascite was diluted to an appropriate concentration and was applied to the plate.

Passive immunization Ascite preserved at -80°C was thawed and diluted with an equal volume of PBS, pH 7.4. Immunoglobulin was precipitated by adding (NH₄)₂SO₄ to a concentration of 1/3 saturation and was collected by centrifugation (12,000g \times 30 min). The precipitate was dissolved in a

Table 1. Effect of monoclonal antibody OBF 13 on sperm penetration into zona pellucidae *in vitro*

Dilution of ascites	No. of experiments	Total no. of ova examined	Ova with sperm in PVS ^{a)} (%) ^{b)}
—	9	209	65 ± 7.7
1/10000	9	214	66 ± 6.2
1/2000	9	211	51 ± 7.2
1/400	9	201	51 ± 9.5
1/80	9	220	55 ± 6.7

a) PVS : perivitelline space

b) All values represent mean ± S.E.

Table 2. Effect of monoclonal antibody OBF 13 on sperm-egg fusion *in vitro*

Dilution of ascites	No. of experiments	Total no. of ova examined	Ova with male and female pronuclei ^{a)} (%)
—	9	210	59 ± 11.2
1/10000	9	223	17 ± 3.8**
1/2000	9	202	0
1/400	9	214	0
1/80	9	221	0
1/10000 ; absorbed ^{b)} with			
mouse sperm	4	79	42 ± 16.1
rat sperm	4	77	8 ± 3.3**

a) All values represent mean ± S.E.

b) See materials and methods.

Significantly different from control : **p < 0.01

small amount of PBS. After dialysis against PBS at 4°C, the sample was centrifuged again (12,000g × 30 min) to remove undissolved materials, and was then used for passive immunization.

Female ddY mice (4 to 5 weeks old) were maintained in a room kept dark from 20:00 to 8:00. The mice were subjected to the procedure to cause superovulation as described above. Immediately after the HCG injection (19:00), OBF13 was administered intraperitoneally (30mg protein/animal). As a control, an immunoglobulin fraction prepared in the same way from normal mouse serum was administered. A matured male mouse, proven fertile, was paired with two female mice. The next morning, the female mice were assessed for the formation of a vaginal plug, and were sacrificed at 15:00. Ova were recovered from the ampullar portion of the oviduct by puncturing the oviduct wall with a needle. Following the hyalur-

onidase treatment, ova were assessed for fertilization under phase contrast microscopy.

Statistics Student's t-test was employed to assess the significance of differences between the mean values for the control group and the sample administered group.

Results

Effect of OBF13 antibody on the zona penetration in vitro OBF13 was classified as an IgM antibody, and the concentration of IgM in the ascite used was estimated as 2.0 mg/ml.

The effect of OBF13 on fertilization was investigated in an *in vitro* system. Ascite collected from OBF13 proliferated mouse was diluted 80, 400, 2,000 and 10,000 times with Toyoda's medium, and *in vitro* fertilization was performed in the existence of the antibody (each tube contained 25ug, 5.0ug, 1.0ug, 0.2ug IgM/ml, respectively).

The average zona penetration rate of 9 independent tests without the ascite was $65 \pm 7.7\%$, and ascite added groups showed from $51 \pm 9.5\%$ to $66 \pm 6.2\%$. No significant difference between any of the two groups was detected, and no agglutination or inhibition of sperm motility was observed by the addition of the OBF13 antibody (Table 1).

Effect of OBF13 on the pronuclei formation in vitro In the next experiment, we studied the effect of OBF13 on sperm-egg fusion. In the control group (without OBF13), we observed that an average of $59 \pm 11.2\%$ of the ova proceeded to the pronuclear stage after 5 hr of incubation. In the medium containing 1/10,000 ascites, however, the number of ova in the pronuclear stage was significantly low ($17 \pm 3.8\%$; $P < 0.01$). The inhibition was complete in the medium containing 1/2,000 ascite ($1.0 \mu\text{g IgM/ml}$). However, the inhibition activity disappeared when the ascite was previously adsorbed by mouse sperm. Since OBF13 did not cross react to rat sperm, the same adsorption procedure using rat sperm caused no loss of fertilization inhibitory activity (Table 2).

The direct effect of ascite on ova was also investigated. Ova preincubated with 1/1,000 dilution of the ascite were washed and introduced to sperm. No decrease in fertilization rate was observed (Table 3).

Effect of passive immunization on fertilization in vivo We investigated whether or not the fertilization inhibitory activity of OBF13 was also effective *in vivo*.

Female mice received immunoglobulin fraction prepared from normal mouse serum or that of OBF13 ascite. In the control group, almost all the ova recovered 10 hr after mating were found to be at the pronuclear stage. In the immunized group, the percentage of pronuclear stage ova was reduced significantly.

It was noteworthy that, in the control group, few supplemental sperm were found in the perivitelline space of the ova, while in the OBF13 immunized group, the majority of ova had as an average 2.7 supplemental sperm in their perivitelline spaces (Table 4).

Discussion

The importance of the interaction of sperm membrane and zona pellucida has been reported by several authors¹¹⁻¹³. Moreover, certain monoclonal anti-sperm or anti-zona antibodies are known to inhibit zona penetration.^{5-7,14,15} Nevertheless OBF13, which appears to attach to the entire head of capacitated sperm⁹, did not inhibit zona penetration. However, pronuclear formation of zona penetrated sperm was significantly inhibited by the antibody. Although it was not clear whether the OBF13 blocked the binding of sperm to the vitellus or sperm-egg fusion, the inhibition of the fertilization by OBF13 seemed to be restricted to a certain stage of fertilization.

One of the events occurring in the fertilized egg is a release of the cortical granules positioned beneath the plasma membrane, which is known as "zona reaction"¹⁶. This phenomenon prevents further sperm from penetrating the zona pellucida. Although little is known about the sequence of events after sperm penetration, the significantly large number of sperm found in the perivitelline space in the existence of the antibody clearly established that OBF13 blocked the process preceding zona reaction.

Saling *et al.* (1985b) also reported monoclonal antibodies which were thought to block sperm-egg fusion. However, the nature of the antigens recognized by OBF13 and by Saling *et al.*'s antibodies (N29 and N37) are apparently different. OBF13 reacted to the entire surface of sperm head which penetrated the zona pellucida⁹, while N29 attached to the equatorial segment and N37 attached to the equatorial segment and the tail. Moreover, OBF13 did not react to fresh sperm. This suggested that the antigen was specifically expressed on capacitated sperm.

As far as we tested, detection of the antigen on nitrocellulose paper after western blotting was not successful. The antigen was no longer detectable after treatment with 0.01% SDS by enzyme linked immunosorbant assay and by indirect immunofluorescein staining on sperm and in the treated buffer.

In the passive immunization experiment, the

Table 3. Effect of pretreatment with OBF 13 on the fertility of ova *in vitro*

Treatment ^{a)}	No. of experiments	Total no. of ova examined	Ova with male and female pronuclei ^{b)} (%)
	4	77	72.4 ± 10.2
Mouse normal serum	3	47	69.0 ± 9.0
OBF 13 ascite	4	67	60.7 ± 10.7

a) Ova collected from oviducts were preincubated in the medium containing 1/1000 OBF 13 ascite or mouse normal serum for 1hr at 37°C. The ova were then washed 3 times by transferring them into a fresh medium. Following the pretreatment, ova were subjected to *in vitro* fertilization.

b) All values represent mean ± S.E.

Table 4. Effect of monoclonal antibody OBF 13 on mouse fertilization *in vivo*

Female	No. of ova recovered	No. of ova in zona penetrated stage (%)	No. of ova in pronuclei forming stage (%)	Mean ± S.E. of supplemental sperm found in PVS ^{a)} of ova in pronuclei forming stage	OBF 13 antibody in the serum ^{c)}
Control-1	11	0 (0)	11 (100)	N.D.	-
Control-2	8	0 (0)	8 (100)	N.D.	-
Control-3	9	0 (0)	9 (100)	0.1 ± 0.1	-
Control-4	8	3 (37.5)	5 (62.5)	0	-
Control-5	3	0 (0)	3 (100)	0	-
Mean ± S.E.	7.8 ± 1.3	(0.6 ± 0.6)	(92.5 ± 7.5)	0.1 ± 0.1 ^{b)} (n = 17)	
OBF 13-1	12	6 (50.0)	4 (33.3)	N.D.	+++
OBF 13-2	9	2 (22.2)	7 (77.8)	N.D.	++
OBF 13-3	9	2 (22.2)	6 (66.7)	N.D.	+++
OBF 13-4	9	0 (0)	9 (100)	2.7 ± 0.8	+++
OBF 13-5	18	6 (33.3)	12 (66.7)	2.1 ± 0.4	+++
OBF 13-6	8	1 (12.5)	4 (50.0)	0.8 ± 0.8	++
Mean ± S.E.	10.8 ± 1.5	(23.4 ± 7.0)*	(65.8 ± 9.3)*	2.1 ± 0.4 ^{b)} *** (n = 25)	

a) PVS: perivitelline space

b) Value represent mean ± S.E. calculated by combining all the results.

c) Sera were diluted 1000 times with PBS supplemented with 10% newborn calf serum and were subjected to indirect immunofluorescein staining. The intensity of the staining was compared to that of obtained using supernatant of OBF 13 culture medium "-"; no reaction, "+ +"; equal to OBF 13 culture supernatant, "+ + +"; stronger. Significantly different from control: *p<0.05; **p<0.001

N.D.: Not detected

fertilization inhibitory activity was not as potent as shown in the *in vitro* system. However, the zona penetrated sperm of immunized mice could react with FITC-AMiG. This suggested that the transition of OBF13 from serum to oviduct fluid took place.

As far as we tested, OBF13 did not cross react with human, rat, guinea pig or rabbit sperm. We

do not know whether the same kind of antigen detected by OBF13 in mouse exists in other mammalian sperm. The fact that the blockage of a single epitope caused the reduction of fertilization suggested the possibility of the antigen for contraceptive use.

Acknowledgment

The authors are very grateful to Ms. Nagashima and Ms. Fujii for their technical assistance and Ms. Stephanie L. Cook for her assistance in preparing the manuscript.

References

- 1) Nicolson, G. L., Usui, N., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Smith, J. R. (1975) Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa: Changes in surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation. *J. Cell Biol.*, 74, 950-982.
- 2) Ward, C. R. and Storey, B. T. (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlorotetracycline fluorescence assay. *Develop. Biol.*, 104, 287-296.
- 3) Wolf, D. P., Sokoloski, J. E., Dandekar, P. and Bechtol, K. B. (1983) Characterization of human sperm surface antigens with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 29, 713-723.
- 4) Naz, R. K., Rosenblum, B. B. and Menge, A. C. (1984) Characterization of a membrane antigen from rabbit testis and sperm isolated by using monoclonal antibodies and effect of its antiserum on fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81, 857-861.
- 5) O'Rand, M. G., Irons, G. P. and Porter, J. P. (1984) Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens. I. Inhibition of *in vitro* fertilization and localization on the egg. *Biol. Reprod.* 30, 721-729.
- 6) Primakoff, P., Hyatt, H. and Myles, D. G. (1985) A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.*, 101, 2239-2244.
- 7) Saling, P. M. and Lakoski, K. A. (1985a) Mouse sperm antigens that participate in fertilization. II Inhibition of sperm penetration through the zona pellucida using monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.*, 33, 527-536.
- 8) Saling, P. M., Irons, G. and Weibel R. (1985b) Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane. *Biol. Reprod.*, 33, 515-526.
- 9) Okabe, M., Takada, K., Adachi, T., Kohama, Y. and Mimura, T. (1986 b) Inconsistent reactivity of an anti-sperm monoclonal antibody and its relationship to sperm capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, 9, 67-70.
- 10) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, T. (1971)

Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*, II. Effect of *in vitro* preincubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16, 152-157.

- 11) Florman, H. M. and Storey, B. T. (1982) Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Develop. Biol.*, 91, 121-130.
- 12) Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse; sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zone pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.*, 95, 317-324.
- 13) Shur, B. D. and Hall, N. G. (1982) A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.*, 95, 574-579.
- 14) East, I. J., Gulyas B. and Dean, J. (1984) Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity: Effects on fertilization and early development. *Dev. Biol.*, 109, 268-273.
- 15) Moore, H. D. M. and Hartman, T. D. (1984) Localization by monoclonal antibodies of various surface antigens of hamster spermatozoa and the effect to antibody on fertilization *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 70, 175-183.
- 16) Barros, C. and Yanagimachi, R. (1971) Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature*, 233, 268-269.

抗マウス精子モノクローン抗体 OBF13 とその受精阻害作用

大阪大学薬学部微生物薬品化学教室

岡部 勝 安達俊幸 小田 博
矢ヶ崎満郎 小濱靖弘 三村 務

マウス精子に対するモノクローン抗体 OBF13 は、新鮮な精巢上体精子とは反応しないが、受精能を獲得し透明帯を通過した精子の頭部全体と、特異的に反応する。この抗体を含む腹水を、0.05% 加えたメディウム中でマウス体外受精を行なうと、卵透明帯通過は全く阻害されなかったが、その後の前核の形成は完全に阻害された。この作用は腹水をあらかじめマウス精子で吸収しておくことにより消失した。これらの結果からこの抗体の認識する抗原が透明帯通過後の精子と卵黄との相互認識に関係している可能性が示された。また、本抗体を受動免疫したマウスにおいて有意な受精率の低下がみられた。(受付: 昭和 62 年 10 月 2 日)

INHIBITION OF FERTILIZATION IN THE HAMSTER BY GOLD SODIUM THIOMALATE, A HYALURONIDASE INHIBITOR

Kahei SATO

Laboratory of Animal Reproduction, College of
Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University

Abstract: In the present study, the effect of gold sodium thiomalate (GST), an inhibitor of hyaluronidase, on fertilization in the hamster was investigated. Using hamster epididymal spermatozoa treated with GST (25-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *in vitro* fertilization was blocked at the level of the zona pellucida of cumulus-intact or cumulus-free eggs. In cumulus-intact or cumulus-free eggs treated with GST (25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), also, *in vitro* fertilization was inhibited at the level of the zona pellucida. *In vitro* fertilization was also reduced (from 100% to 0%) by 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ added to an epididymal sperm suspension before artificial insemination into the uterus.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 479-482, 1988)

Introduction

In mammals, spermatozoa must undergo capacitation and the acrosome reaction before penetrating the zona pellucida¹⁾. It is considered that after capacitation hyaluronidase is released from sperm head²⁾ and this enzyme disperses the cumulus cell layer³⁾. Hyaluronidase inhibitors have been reported to inhibit fertilization in mammals⁴⁻⁵⁾ and also, the antifertility of its inhibitors is expected, as contraceptive agents. While, hyaluronidase inhibitors are good tool for analysis of a role hyaluronidase in fertilization. At the present time, the information necessary for the role of hyaluronidase in fertilization of mammals was very few. The present study was performed preliminary to examine the effect of gold sodium thiomalate (GST), a hyaluronidase inhibitor, on *in vitro* and *in vivo* fertilization in the hamster.

Materials and Methods

in vitro fertilization

Spermatozoa were collected from the distal

epididymis of male golden hamsters and the motile spermatozoa were isolated using the methods reported previously⁶⁾. The regular medium for sperm incubation and *in vitro* and *in vivo* fertilization was a modified Tyrode's solution (mTALP)⁷⁾. The original medium contains 15 mg/ml bovine serum albumin (BSA), but for this study we used 5 mg/ml BSA because the result of preliminary experiments indicated enough fertilization rate in mTALP with low concentration (3-5 mg/ml) of BSA. All media used were prepared immediately before use. GST (Shionogi Pharmaceutical Co.) was dissolved in the regular medium at various concentrations. In order to induce sperm capacitation, spermatozoa were incubated in the regular medium for 3 hours under 5% CO₂ in air at 37°C. After sperm incubation, the spermatozoa were added into medium containing various concentrations of GST and incubated 15 minutes. A dish containing the regular medium with the sperm suspension was incubated as the control. In order to induce superovulation, adult females were injected intraperitoneally with 30 IU pregnant serum gonadotropin (PMSG, Teikoku

Zoki Co. Ltd.) in the morning of Day 1 of the estrous cycle followed by an intraperitoneal injection of 20 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Teikoku Zoki Co. Ltd.) 52 hours later. About 15 hours after hCG injection, females were killed and their oviducts were removed. The ampullary portion of the oviduct was broken in the medium with fine sharp needles. Eggs obtained had compact cumulus masses and in some experiments the eggs were freed from the cumulus cells with 0.1% hyaluronidase solution for 7-10 minutes. In another experiment, the effect of GST on the fertilizing ability of the eggs was examined. Cumulus-intact and -free eggs were incubated in the medium containing various concentrations of GST for 15 minutes and then the eggs were washed with fresh medium. After washing, the eggs were used for *in vitro* experiments.

in vivo fertilization

Epididymal spermatozoa were used. The spermatozoa were suspended in the regular medium. An aliquot of the sperm suspension was added to

the fresh or GST-added medium and the final sperm concentration was adjusted to 3.5×10^7 /ml. For artificial insemination, adult females were superovulated by intraperitoneal injection of 30 IU PMSG followed by 20 IU hCG intraperitoneal injection 54 hours later. At 6 hours after hCG injection females were anesthetized with sodium pentobarbital (Abott Co. Ltd.) and low midline incision was made so that the junction of the uterine horn could be located and manipulated. Then each horn was ligated to close the cervix to transuterine migration of spermatozoa⁸⁾. After 0.2 ml of the sperm suspension was injected into each horn, one horn receiving the spermatozoa in saline, and the other horn receiving the spermatozoa treated with GST. At 12 hours after insemination, females were killed and their oviducts were broken in the medium. Eggs were assessed for fertilization, as described in *in vitro* fertilization.

Table 1. Effect of gold sodium thiomalate on fertilizing ability of hamster sperm *in vitro*

Inhibitor concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cumulus-free eggs			Cumulus-intact eggs		
	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	Mean % fertilized	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	Mean % fertilized
0	55	55	100	26	26	100
25	64	24	37.5*	53	23	43.4*
50	99	29	29.3*	48	16	33.3*
100	84	19	20.7*	50	16	32.0*

* Significantly different from control, $P < 0.01$

Table 2. Effect of gold sodium thiomalate on *in vitro* fertilization of hamster eggs

Inhibitor concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cumulus-free eggs			Cumulus-intact eggs		
	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	Mean % fertilized	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	Mean % fertilized
0	52	52	100	24	24	100
25	58	15	25.9*	43	11	25.6*
50	32	7	21.9*	53	9	17.0*
100	77	11	14.2*	45	6	13.3*
200	21	0	0 *	23	0	0 *

* Significantly different from control, $P < 0.01$

Results

in vitro fertilization

The fertilizing ability of hamster spermatozoa treated with GST was shown in Table 1. When inseminated with spermatozoa treated with GST and then examined 3 hours later, *in vitro* fertilization of cumulus-intact hamster eggs was significantly inhibited by GST at concentrations of 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.01$), and prevented by 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The effect of GST was apparently not related to blockage of cumulus penetration by the spermatozoa since the cumulus cells were dispersed in all dishes within 20 minutes of insemination. Furthermore, fertilization of cumulus-free eggs was significantly inhibited by 25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. This inhibition showed clearly to be preventing fertilization at the level of the zona pellucida.

The possibility that GST directly affects the zona pellucida was examined by exposing cumulus-free and zona-intact eggs to GST for 15 minutes and then washed them in fresh medium before insemination with the control spermatozoa. Results obtained were presented in Table 2. Fertilization was affected. Concentrations of 25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GST, however, inhibited fertilization ($P < 0.01$).

An aliquot of sperm suspension was removed and examined by the phase-contrast microscope at hourly intervals after the start of sperm incubation. A drop of the sperm suspension was placed onto a slide glass, and the percentage of motile spermatozoa and of the acrosome reacted spermatozoa among 100 motile spermatozoa was determined. The inhibitory effect of GST was not due to toxicity. The percentage of sperm motility decreased with the advancement of the incubation time, and the acrosome reaction increased gradually with incubation times.

in vivo fertilization

Results of fertilization *in vivo* were shown in Table 3. At 6 hours after artificial insemination, all eggs were collected from oviducts of females were fertilized. At concentration of 200-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GST inhibited fertilization in the oviducts of superovulated hamsters. However, the inhibitor in low concentration (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) could not block

Table 3. Effect of gold sodium thiomalate on *in vivo* fertilization in the hamster

Inhibitor concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	Mean % fertilized
0	27	27	100
50	21	20	95.2
100	21	21	100
200	23	19	82.6*
400	25	4	16.0**
800	23	4	17.4**
1000	12	0	0

* Significantly different from control, $P < 0.05$

** Significantly different from control, $P < 0.001$

fertilization.

Discussion

In the present study, GST inhibited fertilization *in vitro* and *in vivo* in the hamster. Under *in vitro* conditions, the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was sufficient to prevent fertilization in cumulus-intact or cumulus-free eggs. A similar result has been reported by Perreault et al⁸), using sodium aurothiomalate, a hyaluronidase inhibitor. According to them, sodium aurothiomalate blocks *in vitro* fertilization of cumulus-intact and cumulus-denude eggs. The results indicate clearly that their inhibitor blocks *in vitro* fertilization at the level of the zona pellucida. In present study, GST inhibited fertilization of cumulus-free eggs. This result also suggests that the blockage of *in vitro* fertilization of hamster eggs by GST is at the level of the zona pellucida. It is accepted generally that hyaluronidase in fertilization *in vivo* is to facilitate passage of spermatozoa through the hyaluronic acid matrix of the cumulus³). However, from this finding and results of Perreaults et al⁸), the possibility that hyaluronidase involves in zona penetration of spermatozoa is clearly evident. GST can block zona penetration of spermatozoa in several ways. An acrosome proteolytic enzyme, acrosin, is known to act for zona penetration of spermatozoa. GST may block fertilization by its non-specific adverse effect on spermatozoa. However, no such effect

was evident because the acrosome reaction proceeded normally and sperm motility was similar in treated and untreated spermatozoa. Also, it is considered that the antifertility effect of GST may be due to its hyaluronidase inhibiting property. Finally, GST may act by inhibiting other acrosomal enzymes which are required for zona penetration, although there is presently no evidence in the literature which supported this idea.

In vivo fertilization also was inhibited by GST in the present study. Fertilization was inhibited at 200-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GST but actual amount of the inhibitor reaching at the site of fertilization was unknown. Perhaps, the inhibitor at the site of fertilization where the amount of the inhibitor required to block fertilization would be quite small because very few spermatozoa actually reach the ampulla.

The antifertility effect of GST indicates that hyaluronidase may play some other role in fertilization of hamsters in addition to its role of cumulus penetration, and that zona penetration may be depend upon the action of other acrosome enzymes in addition to acrosin.

References

- 1) Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. In Fertilization and embryo development in vitro. Mastoroianini, L. and Biggers, J. D., eds. Prenum Press. pp 171, 1981.
- 2) Zaneveld, L. T. D. and Williams, W. C.: A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapacitation factor. Biol. Reprod., 2: 363, 1970.
- 3) Maclean, D. and Rowlands, I. W.: The role of hyaluronidase in fertilization. Nature, 150: 627,

1942.

- 4) Zaneveld, L. T. D.: Sperm enzyme inhibitors as anti-fertility agents. In Human semen and fertility regulation inmen. Hafetz, E. S. E. ed., C. V. Mosby Co., pp 570, 1976.
- 5) Joyce, C., Freund, M. and Peterson, R. N.: Contraceptive of acrosin and hyaluronidase inhibitors in rabbit. Contraception, 19: 95, 1979.
- 6) Sato, K.: In vitro capacitation of ejaculated rabbit sperm cells. Jap. J. Fert. Ster., 29: 179, 1984.
- 7) Sato, K. and Suzuki, Y.: In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution. J. Mamm. Ova Res., 2: 149, 1985.
- 8) Perreault, S., Zaneveld, L. T. D. and Rogers, B. J.: Inhibition of fertilization in the hamster by sodium aurothiomalate, a hyaluronidase inhibitor. J. Reprod. Fert., 60: 461, 1980.

Gold sodium thiomalate の ハムスターにおける受精阻害について

日本大学農獣医学部 家畜繁殖学教室

佐藤嘉兵

Hyaluronidase の inhibitor である gold sodium thiomalate (GST) を用いてハムスターの受精に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、精子あるいは卵子を GST(25-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液に 15 分間感作後、新鮮な medium 中で体外授精を行なったところ、いずれの濃度においても受精は阻害された。また、同様に GST (50-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に感作した精子を用いて排卵誘起処理した雌ハムスターに人工授精を行なった結果、GST200-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に感作した精子では、明らかに受精が阻害された。

(受付：昭和 62 年 10 月 17 日)

CONCENTRATION OF GONADOTROPINS AND SEX STEROIDS IN BOVINE FOLLICULAR FLUID DURING ESTROUS STAGES

Motoaki UMEZU, Akio MIYAMOTO, Shin ITO
and Junji MASAKI

Laboratory of Animal Reproduction,
Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai.

Abstract: Concentrations of gonadotropins (FSH and LH) and sex steroids (estradiol-17 β : E2 and progesterone: P4) were estimated in bovine follicular fluid (BFF) after the ovaries and follicular sizes are classified according to their estrous cycle.

The ovaries were obtained from 44 cows at a slaughter house and the diameter of the ovarian follicles was measured.

The stage of the ovaries was classified by the shape and consistency of the corpus luteum as Stage 1 (early luteal phase), Stage 2 (late luteal phase), Stage 3 (regressing luteal phase) and Stage 4 (follicular phase). The follicular size was classified into 4 categories according to the maximum diameter (cm) as the following F (<0.5), F(0.5–<1.0), F(1.0–<1.5) and F(\geq 1.5). Concentrations of the hormones were determined with radioimmunoassay.

The concentrations of FSH and LH in BFF were 1–5ng/ml and 0–0.5ng/ml, respectively regardless of follicular size and stage of the estrous cycle.

E2 concentrations at the early luteal phase were low in F (0.5–<1.0) and the concentration present in the active luteal phase increased with the size of follicle. P4 concentrations were variable in any follicular size regardless of stage.

When hormone levels were pooled and calculated according to follicular size regardless of stage, FSH levels remained almost constant in each size of follicle, and E2 levels increased with follicular development. P4 levels were highest in F (0.5–<1.0).

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 483–487, 1988)

Introduction

In several studies, the concentrations of sex steroids in bovine follicular fluid (BFF) have been correlated with the stage of follicular development in ovaries obtained from an abattoir^{1,2,3}.

Henderson et al²) originally estimated the concentrations of gonadotropins and sex steroids in the same experimental procedure. They did not, however, classify the stage of the estrous cycle, but only classified the size of follicle.

The aim of this report is to estimate the concentrations of gonadotropins and sex steroids in the same experimental category after the ovaries are classified according to their estrous stage.

Materials and Methods

Collection of BFF

Ovaries were obtained from 44 cows consisting of Japanese Blacks and Holsteins at a slaughter house and carried to the laboratory in a jar with ice inside.

They were weighed and the diameter of the follicles was measured with a calipers within 2 hours after collecting the ovaries.

BFF was aspirated with a syringe, the fluid volume was measured, and the volume obtained was regarded as "follicular volume."

Fluid from the follicles of ovaries less than 0.5cm in diameter was pooled in a container and all other fluids were pooled separately. All of the fluid was stored at -60°C until assayed.

Categorization of estrous cycle stage.

The stage of the ovaries was classified by the shape and consistency of the corpus luteum when collected according to Ireland et al¹¹.

Stage 1 (early luteal phase), Stage 2 (late luteal phase) Stage 3 (regressing luteal phase), Stage 4 (follicular phase)

Classification of follicles

The follicle size was classified into 4 categories according to the maximum diameter (cm) of the follicle protruding from the surface of the ovary, which is represented as the following: F (<0.5), F ($0.5 - <1.0$), F ($1.0 - <1.5$), F (≥ 1.5).

To determine the correlation between a given diameter of a follicle with its volume, the diameter and the cube root ($\sqrt[3]{}$) of the volume were plotted in the X and Y axis, respectively.

Radioimmunoassay of hormones in BFF

Concentrations of FSH, LH, estradiol- 17β (E2) and progesterone (P4) were determined with radioimmunoassay.

Assay of FSH and LH was made with the double antibody method using Iodine-125.

In FSH assay, the pure hormone for iodination (b-FSH) and antiserum (b-FSH-HS-2-17) supplies by Dr. K. W. Chen (Manitoba Univ., Manitoba, Canada) were used.

FSH-LER-1596-1, which was supplied by Dr. L. E. Reichert (Albany Medical College, New York, U. S. A.) was used as a reference standard.

In LH assay, LER-1702 and LH-B-10 from Dr. L. E. Reichert were used as iodination material and reference standard, respectively. GDN-15 was used as anti-LH serum, and was supplied by Dr. G. D. Niswender (Colorado Univ., Colorado, U.S.A.).

The minimum detectable doses in both FSH and LH assays were 0.2ng/ml. The coefficient of

variations of inrea and interassay were within 18% in both assays.

2, 4, 6, 7-3H-estradiol- 17β and 1, 2, 6, 7-3H-progesterone were used as radioactive standards. The antiserum of E2 and that of P4 were supplied by Teikoku-Zoki-Co. and Dr. Y. Hasegawa, Gunma Univ., respectively.

Both hormones were extracted with ether and recovery was over 90%.

Minimum amounts of detectable E2 and P4 were 1 and 10pg per tube, respectively. Coefficients of variation of intra and interassay were within 5%, each.

Statistics

The concentrations of follicular hormones were compared among follicular sizes and among estrous stages.

Differences between the means of samples of more than 2 correlated groups were examined for significance by Duncan's multiple range test.

Also, in order to compare our data on concentrations of follicular hormones with those of Henderson et al²¹, 95% confidence limit was calculated by pooling on follicular size regardless of sexual stage.

Results

Classification and weight of ovaries

The collected ovaries were classified according to the stage of the estrous cycle. Seven cows were found to be in Stage 1, while Stage 2 had 21 cows and Stage 3 contained 5 cows.

The weights (g. \pm s. e.) of the ovaries ipsilateral to the corpora lutea were 8.7 ± 1.4 , 11.8 ± 0.7 and 12.6 ± 1.3 and the contralateral ovaries were 6.1 ± 0.6 , 7.3 ± 0.5 and 7.7 ± 1.1 in Stage 1, 2 and 3, respectively. Weights of ovaries with medium or large follicles were 8.7 ± 0.5 , while the ovaries of the opposite side were 5.8 ± 1.4 .

Follicular diameter and volume

Follicles with diameters of 0.3 to 2.7cm were measured and plotted using diameter as the X axis and $\sqrt[3]{}$ of the follicular volume as the Y axis to obtain a linear regression curve.

The formula showed $Y = 4.39X + 4.28$

Linearity was recognized by F-analysis ($P < 0.01$) in a confidence limit of 95%:

Table 1. Concentration of various hormones in BFF (ng/ml)

Hormone	Diameter of (cm) follicles	Ovarian Condition			
		Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4
FSH	<0.5	3.5±0.9#(5)*	3.7± 0.7 (10)	3.5 (1)	
	0.5-<1.0	2.7±0.6 (3)	3.9± 0.8 (12)	2.5±0.5 (5)	4.5± 3.0 (3)
	1.0-<1.5	1.0 (1)	5.2±0.9 (9)	2.0± 1.0 (2)	3.5± 1.5 (2)
	≥1.5	1.1 (1)	3.3± 0.9 (4)	2.0± 1.0 (3)	3.2± 1.2 (3)
LH	<0.5	0.3±0.1 (9)	0.4± 0.2 (15)	0.0± 0.0 (7)	
	0.5-<1.0	0.5±0.3 (3)	0.9±0.5 (12)	0.2± 0.3 (5)	0.2± 0.2 (3)
	1.0-<1.5	0.0 (1)	0.1±0.1 (8)	0.5± 0.0 (2)	0.0± 0.0 (2)
	≥1.5	0.0 (1)	0.0± 0.0 (4)	0.2± 0.2 (3)	0.3± 0.3 (2)
E2	<0.5	7.5±0.5a (4)	7.1± 1.7b (9)	14.3± 4.2 (5)	30.2 (1)
	0.5-<1.0	1.4±0.7ac(3)	25.6± 9.8 (4)	47.8±19.3 (6)	9.6± 3.2c (3)
	1.0-<1.5	123.6 (1)	25.7± 9.8 (4)	24.7±22.0 (2)	33.2±19.3 (2)
	≥1.5	4.2 (1)	75.4±31.9b (3)	53.0±30.1 (2)	35.0±17.5 (3)
P4	<0.5	13.8±5.8 (7)	18.3± 3.2 (8)	44.1±28.1 (9)	27.5 (1)
	0.5-<1.0	4.4±2.3 (2)	45.2±10.5 (11)	47.8±19.3 (6)	17.3 (1)
	1.0-<1.5	0.2 (1)	34.1±18.9 (9)	19.5± 6.9 (2)	12.3± 6.9 (2)
	≥1.5	197.6 (1)	38.0±24.7 (3)	50.1±31.8 (3)	9.3± 3.0 (3)

Mean ± S.E.

* Number of follicles

Stage 1 : early luteal phase

Stage 2 : late luteal phase

Stage 3 : regressing luteal phase

Stage 4 : follicular phase

The same letters signify a statistical difference.

a, b, c.....P<0.01

$$Y_o \pm 2.00\sqrt{0.06+0.23(X-0.91)^2}$$

When diameter values were adapted to the above formula and cabed, diameters of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5cm corresponded to fluid volumes of 0.27, 0.65, 1.28, 2.23, and 3.55 ml, respectively.

Hormone concentrations of BFF during the estrous cycle stage

Results are shown in Table 1.

FSH values: There was no significant difference among the follicular sizes at each stage or among the different stages of each follicular size.

LH values: Mean values were near or below detectable amounts regardless of any follicular classification.

E2 values: F (0.5-<1.0) showed significantly lower concentration than F(<0.5) at Stage 1 (P<0.01). E2 was higher in F (≥1.5) than in F (<0.5)

at Stage 2 (P<0.01). When E2 values of the same size of follicles were compared among stages, the values of F (0.5-<1.0) at Stage 1 were lower than those at Stage 4 (P<0.01).

P4 values: Since variation was great among P4 values at each stage or at each follicular size, the comparison of various values revealed no significant difference.

Hormone concentrations of BFF with the same criteria of follicular size regardless of sexual stage. Results are shown in Table 2. Both FSH and LH values showed a similar tendency in the classification according to estrous cycle, that is FSH values remained in a small range and LH stayed very low or near minimum detectable amounts.

In E2 levels, F (<0.5) showed lower values than F (0.5-<1.0) (P<0.01) and F(≥1.5) (P<0.05).

Table 2. Concentration of various hormones in BFF (ng/ml) with a 95% confidence limit obtained by combining data of all follicle sizes

Hormone	Diameter of (cm) follicles	95% confidence limit
FSH	<0.5	3.8# (3.0- 4.5)
	0.5- <1.0	3.4 (2.5- 4.0)
	1.0- <1.5	3.9 (3.0- 5.0)
	≥ 1.5	2.8 (1.5- 4.0)
LH	<0.5	0.2 (0.0- 0.5)
	0.5- <1.0	0.2 (0.0- 1.0)
	1.0- <1.5	0.1 (0.0- 0.5)
	≥ 1.5	0.1 (0.0- 0.5)
E2	< 0.5	10.8 (6.7-16.1) d, e
	0.5- <1.0	39.1 (14.4-82.6) d
	1.0- <1.5	30.2 (13.9-52.4)
	≥ 1.5	38.6 (13.6-69.8) e
P4	<0.5	26.3 (18.5-35.8) f
	0.5- <1.0	50.6 (23.4-104.5) f
	1.0- <1.5	26.8 (4.3-81.4)
	≥ 1.5	22.3 (3.5-86.9)

Mean value of hormones

The value in parenthesis means a confidence limit.

The same letters signify a statistical difference.

d, f,.....P<0.01

e,.....P<0.05

P4 levels in F (0.5- <1.0) were higher than F (< 0.5) (P<0.01).

Discussion

The weight taken of the ovaries which contained corpora lutea and those taken from the side containing the larger follicles increased over those of the opposite side.

The weight of ovaries containing the corpus luteum tended to increase steadily from the early luteal phase to late or regressing luteal phase, indicating an enlargement of corpus luteum.

A linear correlation between the diameter and the cube root of the volume of the follicle existed, making it possible to compare this result with others in which either a diameter or a volume was described by applying values to this formula.

When the classification of ovaries was made according to the estimated estrous cycle, FSH levels remained relatively constant regardless of the cyclic stage or follicular size.

The FSH levels were equivalent to basal peripheral levels, which was previously reported by the authors⁴⁾.

This finding shows that FSH exists in BFF in similar concentrations to peripheral blood.

E2 and P4 levels in BFF were very variant in contrast to gonadotropin levels. Since follicular E2 was synthesized by healthy granulosa cells through stimulation of FSH, and since P4 was produced by atretic or degenerated granulosa cells⁵⁾, the variation of these hormone levels may indicate that follicular atresia or degeneration occurs regardless of cyclic stage or follicular size.

E2 levels increased with follicular size in the active luteal phase and decreased in F (0.5- <1.0) in the early luteal phase. The inclination that E2 levels in BFF increase with follicular size in the active luteal phase corresponds with the finding of previous reports^{1,6,7)}. But the reason why E2 levels were lower in F (0.5- <1.0) in the luteal phase is not clear.

P4 levels were variant but did not significantly change with the follicular size in any stage, and this corresponds with the previous reports^{6,7)}.

When hormone levels were pooled and calculated according to follicular size regardless of estrous stage, FSH levels remained almost constant in each size of follicle, and E2 levels increased with follicular development. These results agree with those of Henderson et al²⁾, which suggests that estrogen synthesis was made through relatively constant FSH levels.

P4 levels were highest in F (0.5- <1.0). This suggests that atresia or degeneration increased in this follicular size, but this finding was not consistent with the data of Henderson et al²⁾.

LH levels were almost undetectable in all follicles. Since LH most likely exists in the hormone receptive site of the follicle, it is possible that LH dose not accumulate in follicular fluid due to rapid turnover and/or strong affinity to LH receptors in the theca or granulosa. However, Henderson et al²⁾ reported that LH levels in BFF were

higher in smaller follicles (<0.3cm) and decreased with enlargement of follicular size. In this respect, our results were not in agreement with those of their reports.

Acknowledgement

This work was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan (No. 59560254).

We thank Dr. K. W. Chen (Manitoba Univ., Manitoba, Canada), Dr. L. E. Reichert (Albany Medical College, New York, U. S. A.), Dr. G. D. Niswender (Colorado Univ., Colorado, U. S. A.) and Dr. Y. Hasegawa (Gunma Univ., Maebashi, Japan) for the supply of the materials for bovine gonadotropin or progesterone radioimmunoassay.

References

- 1) Ireland, J. J., Coulson, B. B. and Murphree, R. L.: Follicular development during stages of the estrous cycle of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 49: 1261, 1979.
- 2) Henderson, K. M., McNeilly, A. S. and Swanson, I. A.: Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicular size. *J. Reprod. Fert.* 65: 487, 1982.
- 3) Kruip, Th. A. M. and Dielman, S. T.: Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrous cycle. *Theriogenology.* 24: 395, 1985.
- 4) Umezu, M., Sasada, H., Miyamoto, A., Ohta, M. and J. Masaki.: Changes in serum LH and FSH levels in estrous-synchronized cows around mating with a bull.: *Proceedings of the World Congress on Animal Production* 5: 219, 1983.
- 6) Domeki, I., Nakahara, T., Kaneda, Y. and Yamauchi, M.: Estrogen and gestagen content

in follicular fluid of the cow. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 18: 94, 1972.

- 7) Yazaki, H., Obara, T. and Horikoshi, H.: Progesterone and estradiol-17 β contents in ovarian cyst-fluid and normal follicular fluid in the cow. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 25: 141, 1979.

性周期の種々の時期における 牛卵胞液中の性腺刺激ホルモンと 性ステロイド濃度について

東北大学農学部畜産学科

梅津元昭 宮本明夫 伊藤 紳
正木淳二

性腺刺激ホルモン (FSHとLH) と性ステロイド (エストラジオール: E2とプロゲステロン: P4) が、卵巣と卵胞の大きさを発情周期に従って、分類した後に、牛卵胞液 (BFF) 中で測定された。牛卵巣は、屠場で44頭から採取し、卵胞の直径が測定された。卵巣の性周期における時期 (以下: 時期) は、黄体の硬さ、色、形により、Stage1 (黄体期初期)、Stage2 (黄体期後期)、Stage3 (黄体退行期) と Stage4 (卵胞期) として分類された。卵胞の大きさは、最大直径 (cm) に従って、F (<0.5)、F (0.5-<1.0)、F (1.0-<1.5) と F (≥ 1.5) の4段階に分類された。

ホルモン濃度は、ラジオ・イムノアッセイにより測定された。

BFF中のFSHとLHの濃度は、時期、卵胞の大きさに関係なく、1.5ng/ml, 0-0.5ng/mlであった。

黄体期初期のE2濃度は、F (0.5-<0.1) で低く、黄体期後期の濃度は、卵胞の大きさとともに増加した。P4濃度は、時期に関係なく、どの大きさの卵胞でも変動した。

ホルモン・レベルを、時期に関係なく、まとめて、計算した時、FSHレベルは、どの大きさの卵胞でも、ほぼ一定に留まり、E2レベルは、卵胞の発達とともに増加した。

P4レベルは、F (0.5-<1.0) で最も高かった。
(受付: 昭和62年10月2日)

家兔の哺乳行動について

Nursing Behaviour in the Rabbit

信州大学農学部家畜育種・繁殖学教室

辻井 弘 忠

Hirotsuda TSUJII

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction
Faculty of Agriculture, Shinshu University

妊娠後期から離乳迄の家兔の母性行動を哺乳を中心に調べた。日本白色家兔を5頭用いて、赤外線カメラではほぼ24時間母兔の行動を録画して分析した。得られた結果は次の通りである。

1. 母兔の1日の哺乳回数は平均で1.8回であったが、哺乳前期では1日1回哺乳のものが多く、哺乳の日齢が進むと1日2回又は3回哺乳のものが多くなった。
2. 1回当りの哺乳時間は平均で約3分であった。しかし、哺乳前期では長時間の哺乳が多く、哺乳の日齢が進むと短時間の哺乳が多くなった。また、1日の1回目の哺乳では長時間の哺乳が多く、2回および3回目の哺乳では短時間の哺乳が多かった。
3. 哺乳時刻は大部分が24:00を中心とした暗時であったが、明時においても20%が哺乳した。また、哺乳期および1日当り哺乳回数により明時暗時の哺乳行動パターンは変らなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 488-492, 1988)

緒 言

家兔における哺乳回数の報告は、1924年 Kopeć が1日1回だけ哺乳をする¹⁾と報告し、また、実験的に1日1回の哺乳を行わせても家兔の仔は正常に育つ^{2,3)}ことから家兔における哺乳回数は、一般的に1日1回とみなされているようである。しかし、これらの哺乳回数に関する実験において、実験器具ならびに観察方法については不明な点が多い。

そこで本実験では、暗視野で観察可能である赤外線TVカメラを導入して、家兔の行動を経時的に録画し、哺乳行動の回数および時間ならびに分娩、仔の成長について調べた。

材料および方法

動物は信州大学農学部附属農場で飼育している北山ラベル K.K 由来の日本白色家兔で、未経産2、経産3の雌5匹、体重2.8~3.5 kgのものをを用いた。照明、温度、湿度等の飼育条件は、自然状態である。飼料はアルファルファペレット（オリエンタルRC4）と牧草の併用とし、それぞれ12 gおよび50 g

を1日量として給与し、水は自由に摂取させた。実験期間は、3月から9月までで、自然交配のもとで妊娠させた兔は、分娩数日前から45×30×55 cmの分娩室を備えた45×75×55 cmの観察用ケージに移した。哺乳行動の観察に際しては、分娩室の部分を暗幕で覆い暗視野の状態にし、分娩室の前面に赤外線用テレビカメラ（Hitachi CCTV Camara）と赤外線ランプならびにデジタル時計を設置し、画面に時間を表示させて母兔の行動を録画した。録画にはビデオテープレコーダー（National Time Lapse VTR NV-8030）を用い1/36時間で撮影した。

予備実験で12時から14時の間、哺乳行動が全くみられなかったため、この時間帯に餌と水の補給を行った。同時に親の分娩室への出入を防ぎ、録画を中断し、その間に録画テープを1時間の速送りでモニターテレビ（National Monitor TV TN-95S）に写して行動を観察した。哺乳行動等は、1/18あるいは1/36時間に引き延ばして観察記録した。観察期間は、仔が採食行動を始める出産後約18日迄とした。

体重測定は、分娩日を1日として、この日から離乳時までに行い、飼料給与前の個々の体重を測定した。

Table 1. The episodes of daily suckling in five does.

Doe No.	Day of suckling														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	?	1	2	3	3	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2
2	?	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	3	3
3	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	3
4	1	1	2	1	1	2	2	3	1	3	2	3	2	2	2
5	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	3	3
Mean	1.5					1.8					2.2				

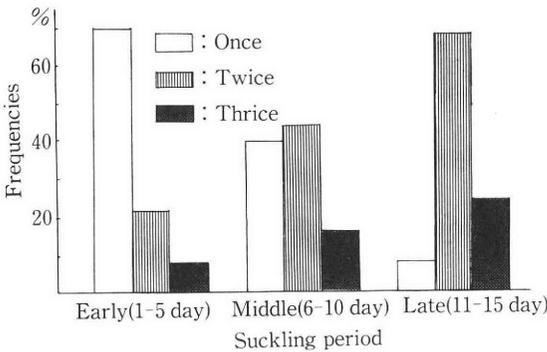


Fig. 1. Frequencies of the episode of daily suckling in early, middle and late periods of suckling in does.

Table 2. Relationship between the episodes of daily suckling and the suckling period in does.

Episode of daily suckling	Suckling period		Total
	Early (2-8 day)	Late (9-15 day)	
Once	17	8	25
Twice+Thrice	18	27	45

$\chi^2 = 5.04, P < 0.01$

体重測定後、親の鼻端に残存性の高い香料として整髪用のポマードをつけ食殺を防いだ。

結 果

a. 哺乳回数

各母兔の哺乳1日から15日迄の1日当りの哺乳回数を表1に示した。哺乳は個体により1日当り1回や3回のもあったが、全体の平均は1日1.8回であ

った。また個体番号1の母兔における哺乳回数は2.1回で比較的安定した哺乳回数を示したが、他の4匹の母兔では安定した回数はみられなかった。

そこで、哺乳期間を前期(1~5日)、中期(6~10日)および後期(11~15日)に分け、1回哺乳と2回および3回哺乳のものが、どの位の割合を占めたかを図1に示した。哺乳前期では、母兔は1日当り1回の哺乳をするものが70%と多いのに対して、哺乳中期および後期は、1日当り1回哺乳の母兔は減少し、1日当り2回または3回哺乳するものが多かった。

なお、表2は哺乳期を前半(2~8日)および後半(9~15日)に分けて、1日当りの哺乳回数の差異を示した。哺乳回数の割合は前半および後半で異なった($\chi^2 = 5.04$)。既述のように前半には1日1回哺乳の母兔が多く後半では1日2回または3回哺乳のものが多かった。

b. 1日当りの哺乳時間

1日当りの哺乳時間は約2分から6分までで、平均3分であったが、これらの分布は正規分布ではなかった。そこで哺乳時間の長短を観察する目安として、1回当りの哺乳時間を180秒以下と181秒以上に分け、それらが占める割合を哺乳期別に表3に示した。哺乳前期には180秒以下の短い哺乳時間を占める割合は少なかったが、哺乳中期および後期になると短い哺乳時間と長い哺乳時間を占める割合は逆転し、哺乳時間は180秒以下のものが多かった。($\chi^2 = 23.49$)。すなわち、哺乳前期の哺乳時間は哺乳中期および後期に比べて長かった。

次に哺乳回数別の哺乳時間について哺乳時間を前述のように2分し、それぞれの割合を示した(表3)。表中の1回目例数69には1日当り1回哺乳の28例と1日当り2回哺乳の第1回目哺乳の33例と3回哺乳の1回目哺乳の12例が含まれている。1回目の哺乳時間は2回目、3回目の哺乳時間に比較して190秒

Table 3. Relationships between the suckling time, suckling period and the number of suckling/24hr.

Suckling time	Suckling period			Number of suckling/24hr.		
	Early	Middle	Late	1st	2nd	3rd
~ 180sec.	9	29	46	37	35	11
190sec. ~	19	15	8	32	10	1
Total	28	44	54	69*	45	12
	$\chi^2 = 23.49^{**}$			$\chi^2 = 10.29^{**a}$		
Mean (sec.)	211	184	158	192	162	162

** : $P < 0.01$ a : Value was calculated from once vs twice plus thrice.

* 69 = 28 (All of once suckling) + 33 (1st time of twice suckling) + 12 (1st time of thrice suckling)

Table 4. Relationships between the daily phase occurred suckling, the suckling period and the episode of suckling in doe.

Daily phase occurred suckling	Suckling period			Episode of suckling		
	Early	Middle	Late	Once	Twice	Thrice
Light (08:00~18:00)	5	8	13	6	11	9
Dark (18:00~08:00)	27	36	41	22	55	27
Total	32	44	54	28	66	36
	$\chi^2 = 1.03$ N.S.			$\chi^2 = 1.06$ N.S.		

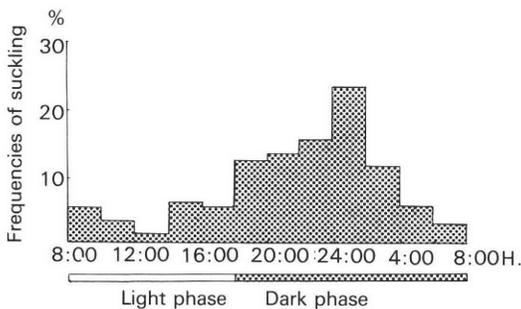


Fig. 2. Daily pattern of suckling behaviour in doe.

以上の長い哺乳時間が占める割合が大きかった($\chi^2 = 10.29$)。すなわち、2回、3回と哺乳回数が多くなるとつれて哺乳時間が短くなった。

c. 哺乳時刻

2時間間隔での相対的頻度分布による家兔の哺乳行動の日内変動を図2に示した。約80%の母兔は18:00から8:00までの暗時に哺乳行動をしたが、残り20%のものは8:00から18:00迄の明時にも哺乳行動を示した。また、暗時においては24:00頃を中心とした哺乳が多かった。

哺乳時刻と哺乳期および哺乳回数との関係を表4に示した。哺乳期別の明期および暗期の哺乳の割合には差異がなかった($\chi^2 = 1.03$)。また、1日当りの哺乳回数による明期および暗期の差異は認められなかった($\chi^2 = 1.06$)。

d. 分娩

巣造り行動の開始時期は、体毛を抜き始めた時とした。体毛を抜き始める時期は、分娩の10時間前から行う個体と30分前から行う個体と各個体においてかなりの幅があった。平均で分娩の5時間30分前であった。この体毛を抜き始める時期から親は落ち着きがなくなり分娩室に出入りする回数も急激に増加するのが観察された。

分娩は交尾後平均31日で、分娩寸前、親はしきりに陰部をなめ、分娩が始まると、産まれてくる仔を順番になめつつ分娩を繰り返すのが観察された。分娩直前に座り込む時間から分娩終了までの時間は、5分から15分までの幅で平均8分56秒であった。また、分娩所要時間は平均6分32秒であった。この分娩所要時間と産仔数との関係を見ると、分娩所要時間が長い程産仔数も増加する傾向がみられた。

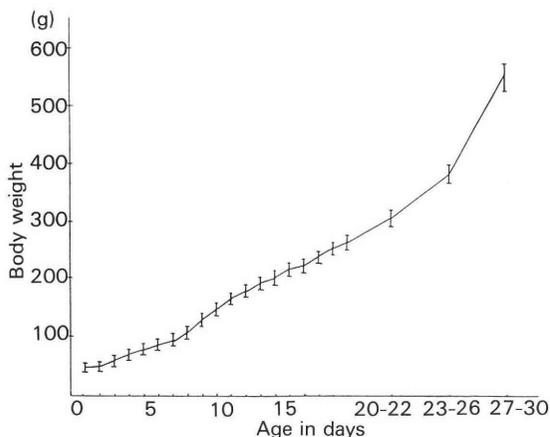


Fig. 3. Growth curve of pups.
Vertical line shows S.D.

e. 哺乳

仔が分娩室を出るようになると(15~18日齢),親はケージと分娩室の内と外を何回も往復し,仔に哺乳を誘う行動が観察された。この行動に促され,仔が親に従って分娩室に入り哺乳が行われた。仔が20日齢を過ぎると親に追従しなくなり,哺乳は分娩室外で行われるのが観察された。

f. 仔の成長

仔の体重曲線を図3に示した。出産時の平均体重は 50 ± 1.1 g,離乳時の30日齢の平均体重は 550 ± 24.8 gで,9日齢と27~30日齢を中心に急激な増加がみられ,S字型曲線を描いて成長しているのが観察された。

両方の目が開眼した日は,早いもので8日齢,遅いもので13日齢,平均は10日齢であった。また,固形飼料を食べ始める時期は,早いもので15日齢位であった。しかし,この初期の段階では,固形飼料よりも牧草の方を好んで食べた。その後,固形飼料を食べるようになったが,最初のうちは,食べるというよりも口の中に含み,なめているような動作であった。18日齢頃から確かな採食とみられる行動が観察された。

考 察

家兔の哺乳回数については,Davis⁴⁾は,1日2回哺乳すると報告し,Venge⁵⁾およびZarrow³⁾は,1日1回であるが一部の母兔においてまれに1日2回の哺乳を行うものがあることを記述している。また,哺乳間隔について,Venge⁵⁾は,24時間と一定していることを,Davis⁴⁾は,分娩後2,3日は一定していないが,それ以降一定することを報告している。

本実験では1匹のみが比較的哺乳回数の規則正しいものがあつたが,他の4匹は,規則正しくなかつた。

これら本報告の哺乳回数,哺乳回数の規則性および後述の哺乳時刻が,上記の報告と異なつたのは,品種による差異以外に観察手段の不備によるものと思われた。それは,家兔は分娩前から非常に神経質で中には人を寄せつけないものもあり,飼育者が巢材の一部に触れたことによる食殺もしばしば存在すること,母兔は暗い分娩室を有するケージでないとき正常哺乳を行わないこと,分娩前から体毛およびワラ等の巢材と一緒にかなり大きな巢を造り,仔が綿毛でおおわれているためいつ分娩したのか,また,仔が生きているのか否か,判別できない場合がしばしばあること,さらに家兔の哺乳時間が非常に短かく,暗視野での肉眼観察では,仔の養育行動と哺乳行動の区別がつきにくいことなどを考慮して観察する必要がある。

家兔の乳汁成分は,他の動物と比べ蛋白質,脂肪含量が極めて高く,逆に乳糖が少ない特長を有する^{2,6,7)}。家兔の哺乳回数および時間が,他の実験動物に比べて少ない^{8,9)}のは,家兔の乳汁成分によるものと思われた。

1回当りの哺乳時間について,Lincoln⁹⁾およびZarrow³⁾は,2~5分と報告しており,本実験の平均3分とほぼ一致した。また本実験において,哺乳期および哺乳回数によって哺乳時間が異なつた。つまり,仔の発育成長と共に哺乳回数が増し,また哺乳回数が増すと哺乳時間が短かくなつた。

哺乳の時間帯について,Zarrow³⁾は,午前8~10時以前に哺乳が行われると報告している。本実験において午前8~10時以前に哺乳を行ったのは,わずか10%にすぎず,本実験と一致しなかつた。

巢造り行動について,Zarrow^{8,12)}は,分娩2~3日前,Sawin¹⁰⁾は,分娩5日前~分娩日と報告している。本実験では,体毛を抜き始める時期を巢造り行動の開始時期としたが,5匹の平均は分娩前5時24分であった。これは,テレビカメラでの観察を容易にする為に巢材を前もって与えなかつたことによるものと考えられた。

初乳開始時間について,Venge⁵⁾は,分娩後16~20時間後であると報告しているのに対して本実験の成績では,平均分娩後27分であった。このことは太田¹¹⁾による分娩終了後30分以内に哺乳を開始するという報告と一致した。また初乳の哺乳期間は,平均4分20秒と1回当りの哺乳時間1分20秒よりはるかに長かつた。

本報告は,家兔の哺乳行動を正しく観察すること

を目的としたが、今後医薬品開発にあたっての生殖試験の観察などの一助になれば幸いである。

文 献

- 1) Kopeć, S.: On the influence of certain developmental factors on the birth weight of rabbits. *Anat. Rec.*, 27: 95-118. 1924
- 2) 村井行夫, 多田 檀, 杉本真次, 佐藤未知子, 勝俣是五郎: 市販人工授乳を利用したウサギ新生仔の人工哺育法, *実験動物*, 26: 23-28. 1977
- 3) Zarrow, M. X., Denenberg, V. H. and Anderson C. O.: Rabbit: Frequency of suckling in the pup. *Science*, 150: 1835-1836. 1965
- 4) Davis, J.: Some observations on lactation and food intakes in a colony of Chinchilla-Gianta rabbits. *J. Anim. Tech. Ass.*, 7: 62-63. 1957
- 5) Venge, O.: The influence of nursing behaviour and milk production on early growth in rabbits. *Animal behaviour*, 11: 500-506. 1964
- 6) Hills, D. M. and Macdonald, I.: Hand-rearing of rabbits. *Nature*, 178: 704-705. 1956
- 7) 吉田 勉: 無菌ウサギの人工哺育について, *実験動物*, 21: 1-12. 1972
- 8) Zarrow, M. X., Farooq, A., Denenberg, V. H., Sawin, P. B. and Ross, S.: Maternal behaviour in the rabbit: Endocrine control of maternal-nest building. *J. Reprod. Fert.* 6: 375-383. 1963
- 9) Lincoln, D. W.: Suckling: A time-constant in the nursing behaviour of the rabbit. *Physiol. Behavior*, 13: 711-714. 1974
- 10) Sawin, P. B., Denenberg, V. H., Sherman, R., Hafter, E. and Zarrow, M. X.: Maternal behavior in the rabbit: hair loosening during gestation. *Amer. J. Physiol.*, 198: 1099-1102. 1960
- 11) 太田克明, 横山 昭: *実験動物, 畜産大事典*, p. 1292-1302. 内藤元男監修, 養賢堂, 東京 1978
- 12) Zarrow, M. X., Denenberg, V. H. and Sachs, B. D.: Hormones and maternal behavior in mammals, In *Hormones and Behavior*, p. 105-134, Levine, S. (edit.), Academic Press Inc., New York. 1972

Nursing behaviour in the rabbit

Hirotsada Tsujii

Faculty of Agriculture,
Shinshu University

Natural suckling behaviour of five does from delivery to 20 days of lactation was observed via infrared TV cameras and recorded. Japanese White rabbits were maintained under natural conditions. On day 21 of pregnancy the rabbits were transferred in observation cages (75×45×55cm) provided with a parturition room. These does were fed from noon to 2:00 p. m., during which time they could not enter the parturition room and the young were weighed. The results indicated that suckling occurs only once a day for the first one or two days after delivery, and more than once a day thereafter. The mean frequency of suckling was 1.8 per day, ranging from 1 to 3 per day. The average time required for suckling was 3 minutes and 24 seconds. Most suckling behaviour occurred in the dark period. Colostrum was secreted an average of 27 minutes after delivery with a range from just after delivery to 90 min. after. The mean pregnancy period was 30 days and 5 hours. The beginning of nest building, which was considered to be marked by hairplucking was an average of 5 hours and 30 minutes before delivery, ranging from 10 hours to 30 minutes before delivery. The mean time required for parturition was 6 minutes and 32 seconds.

(受付: 昭和 62 年 12 月 19 日)

脳内アミン減少ラットの性機能に関する検討

The Effects of Norepinephrine Depletion on Gonadal Function in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated Rats.

鹿児島大学産婦人科学教室 (主任: 永田行博教授)

堂 地 勉 松 元 勇 山 元 慎 一
Tutomu DOUCHI Isamu MATSUMOTO Shin-ichi YAMAMOTO
永 田 行 博
Yukihiko NAGATA

Department of Obstetrics and Gynecology
Faculty of Medicine Kagoshima University

鹿児島大学薬理学教室 (主任: 福田健夫教授)

古 謝 武 志 福 田 健 夫
Takeshi KOSHA Takeo FUKUDA

Department of Pharmacology Faculty of Medicine
Kagoshima University

脳内 catecholamine が性機能にどのように関与しているかを知る目的で, norepinephrine (NE), dopamine (DA)ニューロンの終末を選択的に破壊する 6-hydroxydopamine (6-OHDA)を新生仔ラット側脳室に投与し, 発育, 膣開口, 性周期に及ぼす影響ならびに薬理学的効果を検討した。

その結果, 1) 膣開口は 6-OHDA 群 40.1 ± 0.83 日令, 対照で 37.1 ± 0.99 日令 ($P < 0.05$) であった。2) 規則的な 4 日周期の確立は 6-OHDA 群で膣開口後平均 6.5 日で出現し, 対照の平均 8.4 日と差がなかった。3) phenoxybenzamine 投与によって 6-OHDA 群では 1/8 匹, 対照では 8/9 匹に性周期が乱れた ($P < 0.05$)。4) 6-OHDA 群の視床下部 NE は対照の 54.4% に低下した。

NE は gonadotropin 系に関与しているが, 視床下部の慢性的 NE の低下が極端であっても estrus cycle は維持できる。これはシナプス後膜の catecholamine 受容体の感受性増大による代償性機構が関与しているものと考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 493-497, 1988)

緒 言

脳内アミンがゴナドトロピン系分泌に深く関与し性機能に影響していることは, 以前より示唆されている。しかしながら norepinephrine (NE) 含有ニューロンあるいは dopamine (DA) 含有ニューロンがゴナドトロピン系分泌にどのように関与しているかの詳細は必ずしも明らかでない。

ところで DA のカテコールアミン核の 6 の位置に

OH 基がついた 6-hydroxydopamine (6-OHDA) は, ラットに投与するとカテコールアミンニューロンへ選択的に取り込まれて酸化され, その時生ずる 6-OHDA-paraquinone および活性酸素によりカテコールアミンニューロンが障害を受けることが知られている¹⁾。しかしながら末梢からの投与では血液脳関門を通過しないため中枢神経内のカテコールアミンニューロンを変性させるには脳室内に投与する必要がある。脳室内投与による中枢神経でのカテコールアミ

ニューロンの変性は持続的で、特に幼若期に投与すると不可逆性の変性をおこす¹⁾。

われわれは 6-OHDA のこのような作用を利用し脳内アミン減少ラットを作製し、脳内カテコールアミンが性機能にどのように関与しているかを検討した。

対象と方法

ウィスター今道系幼若ラット (n = 8) の生後 9 日目と 12 日目に十字縫合の 4 - 6 mm 後方、正中線より 0.5 - 1 mm 側方の位置で、頭皮上より 3.5 mm の深さに 6-OHDA 100 μ g ずつを 0.1 % アスכולビン酸を含む生理食塩水に溶かし、マイクロシリンジを用いて左右の側脳室に注入した。対照 (n = 9) には 6-OHDA 投与と全く同じ操作により同量のアスכולビン酸のみを注入した。実験は、①ラットの発育と陰開口、陰開口後の性機能を膣スメアで観察した、② 12 週令で α -receptor blocker である phenoxybenzamine (10/mg/i. p.)、16 週令で β -blocker の DL-propranolol (20mg/i. p.) を投与し性機能に及ぼす影響を膣スメアで観察した。③実験終了後 (20 週令) 無麻酔で断頭屠殺し、すみやかに脳を取り出し、視床下部、大脳皮質、線条体の NE, DA 濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

結 果

1. 発育と陰開口日

陰開口は発育と密接に関係している。体重を指標にその発育をみると、6-OHDA 投与ラット (n = 8) の体重増加は、6-OHDA 投与後 4 日目 (16 日令) の体重が対照に比較し有意に低かったが、その後の体重増加はほぼ同じで両群で差はなかった。

陰開口日は 6-OHDA 投与ラットで平均 40.1 \pm 0.8 日令であり対照の 37.1 \pm 0.99 日令に比較し有意 (P < 0.05) に遅延していた。しかし陰開口時体重は 6-OHDA 投与ラットで平均 139.4 \pm 8.9 g で対照の 126.4 \pm 7.5 g より重かったが有意差はなかった (図 1)。

2. 膣スメアからみた性機能

陰開口後の性機能を膣スメアで連日観察した。陰開口からしばらく性周期は不安定であるが、規則的 4 日周期が確立されるのは 6-OHDA 投与ラットで陰開口後平均 6.5 日であり、対照の平均 8.4 日と差がなかった (図 2)。

12 週令で α -blocker の phenoxybenzamine 10 mg/kg を proestrus の午後 2 時に腹腔内投与し性周期に及ぼす影響を膣スメアで観察すると、6-OHDA 投与ラットでは性周期の乱れは 8 匹中 1 匹であったが、

対照は 9 匹中 8 匹で性周期が乱れた。しかし対照の性周期の乱れは平均 9.5 日で回復した (図 3)。

16 週令で β -blocker の DL-propranolol 20 mg/kg を proestrus の午後 2 時に腹腔内投与し性周期に及ぼす影響を膣スメアで観察すると、6-OHDA 投与ラット、対照とも性周期の乱れはなかった (図 4)。

3. 脳内 NE, DA 量

実験終了後 20 週令で、6-OHDA 投与ラットの diestrus II 期に断頭屠殺し、脳内各部位の DA, NE 濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定し結果を図 5 に示した。NE 濃度は 6-OHDA 投与ラットの大脳皮質で 0.086 μ g/g で対照 0.39 μ g/g の 22 %、視床下部が 0.756 μ g/g で対照 1.39 μ g/g の 54.4 % と有意 (P < 0.05) に低下したが、線条体では差がなかった。DA 濃度は線条体で 6-OHDA 投与ラットが 6.6 μ g/g で対照の 85 % に低下したが (P < 0.05)、大脳皮質、視床下部では有意の差を認めなかった (図 5)。

考 察

脳内カテコールアミンニューロンは運動、情動、体温、食欲、睡眠、ホルモン分泌など脳のあらゆる機能に関与していることが示されている。しかしこれら個々の機能におけるカテコールアミンニューロンの詳細な役割は必ずしも明確ではない。ゴナドトロピン系を介しての性機能に関するカテコールアミンの役割についても不明な点が多い。そこで脳内のカテコールアミンが枯渇した状態でラットの性機能がどのように変化するかは、カテコールアミンの性機能への役割を知る上でも興味あることである。

幼若ラット脳室内に 6-OHDA を投与すると脳内カテコールアミンニューロンの変性は不可逆的であることから、われわれは生後間もない幼若ラットの側脳室に 6-OHDA を投与することにより脳内アミン減少ラットを作製した。その結果、脳内各部位の DA 濃度は線条体で 6-OHDA 投与ラットで低かったが、視床下部では差がなかった。一方、NE 濃度は 6-OHDA 投与ラットで大脳皮質、視床下部で著しく低下した。Fenske et al²⁾ は 6-OHDA を側脳室に投与し、tubero-infundibular neuron の DA 濃度を変化させることなく NE 濃度低下させ得ると報告している。この実験においても視床下部の DA 量に変化がなかったことから、この部位では NE ニューロンだけが変性した状態を作り得たものと思われる。

視床下部 NE 濃度が 54.4 % 低下した 6-OHDA 投与ラットで有意に陰開口がおくれた。その原因として 6-OHDA 投与による体重減少が性機能に影響を及ぼしていないかを検討する必要がある。6-OHDA は

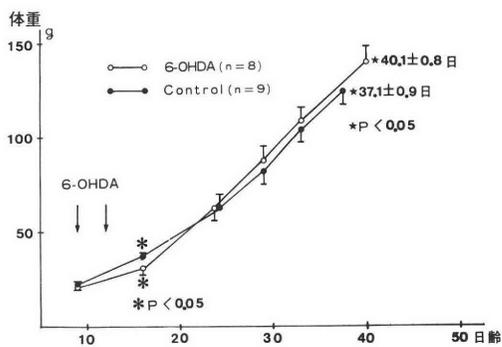


図 1 6-OHDA 投与ラットの膣開口までの体重増加

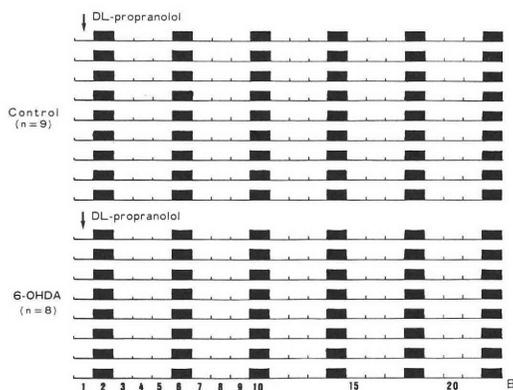


図 4 DL-propranolol 20mg/kg投与後の性周期のみだれ

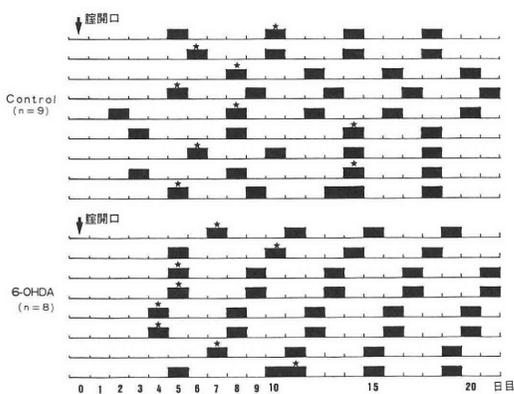


図 2 6-OHDA 投与ラットの膣開口後の性機能

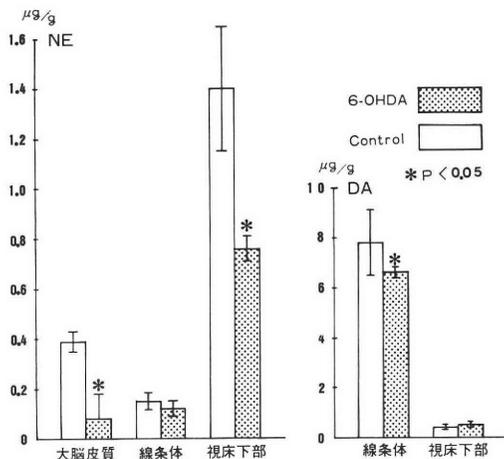


図 5 6-OHDA 投与ラットの各臓器中の NE, DA 量

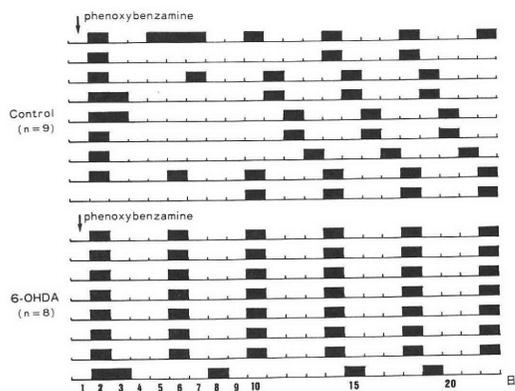


図 3 phenoxybenzamine 10mg/kg投与後の性周期のみだれ

ラットの摂食活動に影響を及ぼすことが知られているからである。しかし 6-OHDA 投与ラットの体重が対照に比較し低かったのは、6-OHDA 投与直後のみであった。しかも 6-OHDA 投与ラットでは膣開口時体重が、遅延した分だけ対照より重かった。したがって膣開口がおくれた理由として摂食行動への影響による可能性は少なく、やはり脳内 NE 濃度の低下が原因としてもっとも考えられる。すなわち NE は GnRH の分泌に促進的に働いていることを示唆するものであろう。

視床下部 NE 濃度が極端に低下したにもかかわらず、膣開口後性機能は cyclic に正常に発来した。これは NE がゴナドトロピン系に密接に関係している

という多くの実験結果とは相反する。しかし Clifton et al³⁾は ascending noradrenergic pathway (ANP) を外科的に切断し視床下部 NE 濃度を 27% に低下させても、性周期の乱れは一過性であったと報告している。同様の報告は他にも見られる^{4,5)}。このように視床下部 NE 濃度が極端に低下しても性機能を維持出来るということは、視床下部 NE の単独の低下では性機能にあまり大きな影響を及ぼさないのかも知れない。あるいは以下のような可能性も考えられる。すなわち① 6-OHDA 投与により破壊されずに残された NE ニューロンが機能を代償しゴナドトロピンの分泌を regulate している。② シナプス後膜のカテコールアミン受容体で感受性が増大した。Bacha et al⁶⁾は、正常ラットでは無効な NE 量でも 6-OHDA 投与ラットにおいては LH 放出が可能であったことから、post synaptic supersensitivity により機能を代償していると説明している。われわれの検討では α -blocker の phenoxybenzamine 投与で 6-OHDA 投与ラットではほとんど性周期の乱れはなかったが、対照では乱れた。慢性的な NE の低下に対して rat brain は、一つにはシナプス後膜の NE 受容体の感受性を増大させることにより機能を代償していると言える。しかし、presynaptic の代謝回転が促進されたか否かは今回の実験からは明らかでなく、今後の研究課題である。

このように極端に NE が低下しても性機能の低下は一過性であったことはわれわれの臨床領域における研究に示唆を与えるものである。当然 DA 低下でも NE 低下同様代償機能が働くことが予想される。ヒトにおける排卵障害症、たとえば polycystic ovarian disease (PCO) は DA の tone の低下が示唆されている⁷⁾。DA でも代償機能が働くと考え、PCO における DA の tone の低下は排卵障害の原因ではなく結果である可能性もある。脳内アミンと性機能の関係の解明はヒトではなかなか困難であり、実験動物を用いた個々の実験の積み重ねが今後も必要である。

稿を終えるにあたり技術的援助を頂いた鹿大薬理学教室の鳥入佳輝氏に感謝します。

本論文の要旨は第 39 回日本産科婦人科学会総会(東京, 1987 年)において発表した。

文 献

1) Fukuda, T., Yamada, K., Suenaga, N. and Takishita, S.: Changes in spontaneous activity and emotional response of rats treated with 6-hydroxydopamine at the suckling age. Arch.

int. Pharmacodyn., 230: 100, 1977.
 2) Fenske, M. and Wuttke, W.: Effect of intraventricular 6-hydroxydopamine injection on serum prolactin and LH levels: Absence of stress-induced pituitary prolactin release. Brain research, 104: 63, 1976.
 3) Clifton, D. K. and Sawyer, C. H.: LH release and ovulation in the rat following depletion of hypothalamic norepinephrine: chronic vs. acute effects. Neuroendocrinology, 28: 442, 1979.
 4) Hancke, J. L. and Wuttke, W.: Effects of chemical lesion of the ventral noradrenergic bundle or of the medial preoptic area on preovulatory LH release in rats. Experimental brain research, 35: 127, 1979.
 5) Nicholsson, G., Greeley, G., Hamm, J., Youngblood, W. and Kizer, J. S.: Lack of effect of noradrenergic denervation of the hypothalamus and medial preoptic area on the feedback regulation of gonadotropin secretion and estrous cycle of the rat. Endocrinology, 103: 559, 1978.
 6) Bacha, J. C. and Donoso, A. O.: Enhanced luteinizing hormone release after norepinephrine treatment in 6-hydroxydopamine-treated rats. J. Endocrinology, 62: 169, 1974.
 7) Quigley, M. E., Rakoff, J. S. and Yen, S. S. C.: Increased luteinizing hormone sensitivity to dopamine inhibition in polycystic ovary syndrome. *ibid.* 52: 231, 1981.
 8) Alger, M., Vazquez-Matute, L., Mason, M., Canales, E. S. and Zárate, A.: Polycystic ovarian disease associated with hyperprolactinemia and defective metoclopramide response. Fertil. Steril, 34: 70, 1980.

The effects of norepinephrine depletion on gonadal function in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats.

Tutomu Douchi, Isamu Matsumoto, Shin-ichi Yamamoto and Yukihiko Nagata.

Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Medicine Kagoshima University

Takeshi Kosha and Takeo Fukuda

Department of Pharmacology Faculty of Medicine Kagoshima University

To elucidate the effects of chronic norepinephrine (NE) depletion on gonadal function, 200 μ g 6-OHDA was administered into the lateral ventricle of newborn Wistar strain rats ($n=8$). Body weights were checked until vaginal opening after administration of the drug. The effects of phenoxybenzamine and DL-propranolol on gonadal function in NE depleted rats were examined by vaginal smears. After experiments, NE and DA contents of cortex, hypothalamus and striatum were determined by high performance liquid chromatography. Vaginal opening in 6-OHDA-treated rats was at 40.1 ± 0.8 days (mean \pm SD) when body weight reached 139.4 ± 8.9 g, whereas 37.1 ± 0.9 days and 126.4 ± 7.6 g in control rats. 6-OHDA-treated rats and control

got regular estrous cycles at 6.5 ± 2.4 days and 8.4 ± 3.3 days after vaginal opening. Phenoxybenzamine (10mg/kg i. p) disturbed estrous cycle in only one of 8 6-OHDA-treated rats, whereas eight in 9 of control rats. DL-propranolol did not have effect on cyclicity in both groups. 6-OHDA reduced cortex and hypothalamic NE to 22%, 54% respectively. DA content of hypothalamus was not significant. We concluded that cyclic reproductive mechanism can resume despite of extremely low NE levels and the brain can compensate for the loss of NE by postsynaptic supersensitivity. The role of NE in gonadal function seemed to be modulatory rather than mandatory.

(受付：昭和 62 年 8 月 31 日)

ヒト子宮内膜培養上清のリンパ球幼若化反応に及ぼす影響

—Fluorometric Blastformation Test と Glucose Consumption Test による解析—

Effect of Human Endometrial Supernatants on PHA-induced Lymphocyte Reactivity —Analysis by Fluorometric Blastformation Test and Glucose Consumption Test—

京都大学医学部産婦人科教室 (主任: 森 崇英教授)

王 輝 生 神 崎 秀 陽 徳 重 誠
Huei-Sheng WANG Hideharu KANZAKI Makoto TOKUSHIGE
佐 藤 重 恭 吉 田 益 美 森 崇 英
Shigeyasu SATO Masumi YOSHIDA Takahide MORI

Department of Gynecology and Obstetrics,
Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto.
(Director: prof. Takahide Mori)

ヒト非妊子宮内膜の免疫学的な役割を解明するために、PHA刺激によるリンパ球の増殖に対するヒト子宮内膜培養上清の影響を核酸合成量及びグルコース消費率の変動を指標として検討した。子宮内膜培養上清は増殖期、分泌期いずれにおいてもPHA刺激リンパ球増殖を有意に抑制し、分泌期では増殖期より強い効果が認められた。一方、組織対照としての大網膜あるいは腹膜の培養上清はいずれも抑制作用を示さなかった。子宮内膜培養上清の抑制作用はdose-dependentで、耐熱性であり、100°C、15分間加熱してもその効果に変化は見られなかった。これらの成績から、リンパ球増殖を抑制する物質、すなわち局所で免疫応答を抑制している可能性のある物質が、着床に先行してヒト子宮内膜から分泌されている事及びその分泌が増殖期に比し分泌期により亢進している事が強く示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 498-505, 1988)

緒 言

移植免疫の面からみて、not-selfである胎児がなぜ拒絶されないのかという理由としては今まで種々の説が挙げられてきた。妊卵着床と妊娠維持に関する免疫現象は決して単純なものではなく、数多くの因子が関与しているものと考えられている。その一つとして、着床直後の子宮局所での母体側要因についての研究により、脱落膜の有する免疫抑制能が明らかとなってきた^{2,3,8,10}。しかしながらヒト着床前の子宮内膜の免疫能についてはそのextractを用いた検討が行われているにすぎない⁷。我々はヒト非妊子宮内膜の免疫調節物質分泌能を高めるため、子宮内膜組織の器官培養上清を非特異的なT細胞mitogenであるPHAで刺激したリンパ球培養系に添加し、Fluorometric Blastformation Test (FBT法)^{11,13,14}とGlucose Consumption Test (GCT法)^{6,15,16}を用い

て検討した。これらはリンパ球芽球化増殖に伴う核酸増加量およびグルコース消費量を測定し増殖能を判定する方法であり、FBT法とGCT法を用いた理由は、これらの検討によって、培養終了前数時間内のリンパ球のH³-thymidine取り込みで判断する従来の方法よりも正確、かつ簡便に全培養過程中のリンパ球増殖能を判定する事ができると考えられるためである。

研究方法

I. 子宮内膜の器官培養法

子宮摘出術により得られた35才から45才までの性成熟期非妊婦人(28例)の子宮内膜をHanks液で二回洗浄した後、非働化した10% FCS (Gibco Laboratories U. S. A.), 100 IU/mlのpenicilline, 100 μ g/mlのstreptomycin sulfateを含む培養液Trowell's T8 (Gibco)内にてさらに一回洗浄の後平均2 mm³に細

切した。これらの 100-200 mg の湿重量の組織は、6well 組織培養プレート (Falcon 3046, U. S. A.) 内の stainless mesh 上に播種した後、各々 Trowell's T8 培養液 2ml を添加し、95% air, 5% CO₂, 37°C の条件下で 1-2 時間の前培養を行い、同量の培養液を更新して、さらに 48 時間培養した。培養終了後の各々の培養液は 2500 回転で 15 分間遠心して、その上清を採取し、-20°C で冷凍保存した。medium control としては培養液 Trowell's T8 のみを上記と同様方法で 48 時間培養した後 -20°C で保存した。また、tissue control としては大網膜及び腹膜組織を用いて、子宮内膜と同様培養した上清を用いた。

II. ヒト末梢リンパ球 (PBL) 浮遊液の調製

成人健康男子より得た末梢血を Ficoll Hypaque 比重遠心法で分離し、採取したリンパ球は 10% の FCS, 100 IU/ml の penicilline, 100 µg/ml の streptomycin を含む RPMI-1640 培養液 (Gibco) の中で 2×10^6 個/ml の濃度で浮遊させた。

III. PHA 刺激リンパ球培養法

リンパ球浮遊液 250 µl を丸底の培養チューブ (12 × 75 mm, No2063, Falcon laboratories, U. S. A.) に入れ、あらかじめ検討した至適濃度 10 µl/ml tube の PHA-M (Difco Laboratories, U. S. A.) 希釈液 50 µl を添加した。この培養系に子宮内膜あるいは tissue control としての大網膜及び腹膜の器官培養上清と medium control としての培養液 Trowell's T8 を室温で溶解し、0.22 µm Millex-GV filter (Millipore Co. Bedford MA, U. S. A.) を通した後、40% (v/v) の容積比 (200 µl) で添加して (リンパ球の最終濃度は 1×10^6 個/ml) 37°C, 5% CO₂, 95% air の湿環境で 96 時間培養した。

IV. リンパ球増殖反応の判定方法

1. FBT 法 (Fluorometric Blastformation Test)

リンパ球培養終了後各 tube は室温で 2000 回転 10 分間遠心し、上清を除去して、細胞可溶化剤 (日本抗体研究所) 1 ml を加え、室温で 30 分放置、その間 3-4 回ミキサーで攪拌して、完全に細胞を溶解し、さらに蛍光試薬 (日本抗体研究所) 1 ml を加え、蛍光光度計 (大塚アッセイ研究所) で Ex525nm, Em600nm の蛍光強度を測定する事で核酸量を算出し、これを指標としてリンパ球の分裂増殖能を判定した。結果は下の式により求めた。

stimulation index (SI) と % suppression で表した。

$$SI = \frac{\text{PHA 添加群の蛍光強度} - \text{バックの蛍光強度}}{\text{PHA 無添加群の蛍光強度} - \text{バックの蛍光強度}} \times 100$$

$$\% \text{suppression} = \left(1 - \frac{\text{組織培養上清添加群の SI}}{\text{control 群の SI}}\right) \times 100$$

2. GCT 法 (Glucose Consumption Test)

リンパ球培養後の上清及びグルコース標準液のそれぞれ 20 µl をグルコメッサー呈色液 (東京臓器化学株式会社) 3 ml と混合し、37°C で 20 分間反応させて、グルコメッサー呈色液を対照にして島津自記分光光度計 UV-260 にて 505nm で吸光度を測定し、グルコース量を算出し、グルコース消費率を下記の式により求めて PHA 反応率とした。

グルコース消費量 (mg/dl) = PHA 無添加リンパ球培養上清のグルコース量 (mg/dl) - PHA 添加リンパ球培養上清のグルコース量 (mg/dl)。

$$\text{グルコース消費率 (\%)} = \frac{\text{グルコース消費量}}{\text{PHA 無添加リンパ球培養上清のグルコース量}} \times 100$$

すなわち、リンパ球増殖抑制のある場合そのグルコース消費率は低下する。なお、FBT 法或は GCT 法とも Duplicate で培養し、結果は Student's t-test により有意差を検討した。

研究成績

I. 子宮内膜培養上清のリンパ球増殖反応に及ぼす影響

FBT 法で子宮内膜 20 例 (分泌期 9 例, 増殖期 11 例), 及び tissue control としての腹膜 9 例, 大網膜 8 例の器官培養上清による検討を行った。図 1 と表 1 に示すごとく、子宮内膜培養上清は増殖期, 分泌期いずれにおいても PHA 刺激リンパ球増殖反応を有意に抑制し ($P < 0.001$), 各々の平均抑制率は $28 \pm 12\%$ と $37 \pm 6\%$ を示し、分泌期の抑制率は増殖期に比し有意に高値であった ($P < 0.05$)。この抑制作用を更に確認する為に生食添加群 (器官培養上清の代わりに生食を添加したもの) との比較も行った。図 1 に示した様に、生食添加群 (8 例) のリンパ球増殖反応は control より有意に抑制され ($P < 0.005$), 平均抑制率 $12 \pm 6\%$ を示したが子宮内膜培養上清添加群の平均抑制率は増殖期, 分泌期いずれにおいても生食添加群より有意に高値であった ($P < 0.001$)。一方、同じ培養方法で得た腹膜或は大網膜器官培養上清は PHA によるリンパ球の増殖反応を抑制せず、生食添加群に比し、逆にリンパ球の増殖能は有意に亢進していた ($P < 0.01$ と $P < 0.001$)。GCT 法 28 例 (増殖期 13 例, 分泌期 15 例) でも同じ結果が得られた (表 2)。子宮内膜培養上清の抑制作用は dose-dependent であり、子宮内膜培養上清の添加量を 10% v/v から 40% 或は 60% までに増量すると抑制率 (FBT 法) は直線状に増強し (図 2 A), グルコース消費率はほぼ直線状に減少していた (図 2 B)。図 3 は一定量 (40% v/v) の子宮内膜培養上清を各

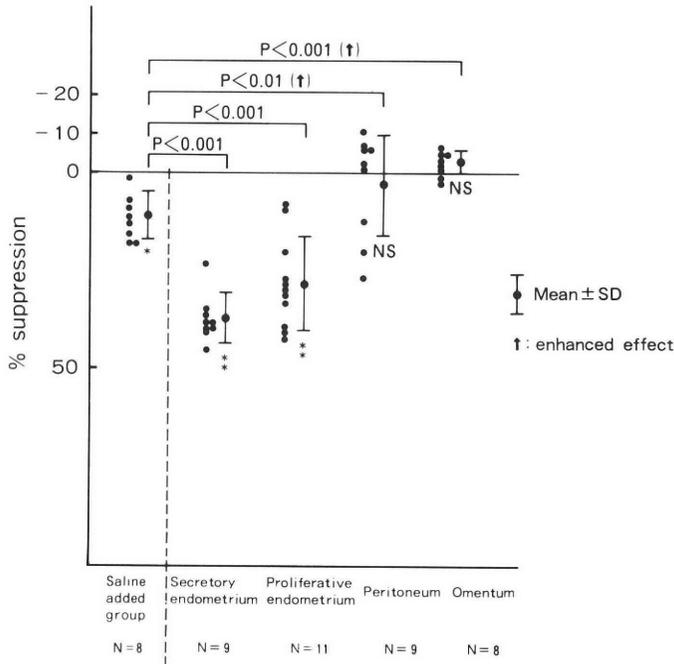


Fig. 1 Effects of tissue culture supernatants on PHA-induced lymphocyte reactivity examined by FBT.

*P < 0.005 ; **P < 0.001 ; NS not significant VS. control

Table 1 Effect of endometrial supernatants on PHA-induced lymphocyte reactivity examined by fluorometric blastformation test(Mean±SD)

	saline added group	Proliferative endometrium					saline added group	Secretory endometrium				
	% suppression	case	age	cycle day	% suppression		% suppression	case	age	cycle day	% suppression	
Exp 1	1 ± 1	1	38	6	8 ± 0	—	—	—	—	—	—	
Exp 2	7 ± 1	2	42	7	9 ± 1	—	—	—	—	—	—	
Exp 3	18 ± 3	3	35	11	31 ± 4	Exp 6	16 ± 4	12	38	17	38 ± 6	
Exp 4	11 ± 3	4	45	12	33 ± 1	Exp 7	13 ± 1	13	39	17	35 ± 1	
Exp 5	9 ± 7	5	45	13	28 ± 1	Exp 5	9 ± 7	14	37	17	38 ± 2	
		6	37	14	27 ± 2			15	43	21	23 ± 4	
		7	44	14	41 ± 3			16	43	24	36 ± 3	
		8	37	15	42 ± 8			17	36	25	40 ± 6	
		9	37	15	39 ± 0			18	40	25	40 ± 1	
		10	45	15	20 ± 0			19	43	26	41 ± 1	
		11	42	16	30 ± 8			20	45	31	45 ± 9	
Mean	9 ± 6	28 ± 12					13 ± 4	37 ± 6				
P < 0.05												
P value vs Control	< 0.05				< 0.001		< 0.05				< 0.001	
P value vs saline added group	< 0.001				< 0.001				< 0.001			

control : peripheral blood lymphocyte (PBL) + Trowell's T8 medium but without supernatant .
 saline added group : PBL + saline but without supernatant .
 % suppression : In comparison with control .

Table 2 Effect of endometrial supernatants on glucose consumption rate of PHA-induced lymphocyte reactivity (Mean±SD)

case	age	cycle day	Proliferative endometrium				Control				case	age	cycle day	Secretory endometrium				Control			
			Glucose concentration (mg/dl)		Glucose consumption rate (%)	Glucose concentration (mg/dl)		Glucose consumption rate (%)	Glucose concentration (mg/dl)					Glucose consumption rate (%)	Glucose concentration (mg/dl)		Glucose consumption rate (%)	Glucose concentration (mg/dl)		Glucose consumption rate (%)	
			PHA (-)	PHA (+)		PHA (-)	PHA (+)		PHA (-)	PHA (+)					PHA (-)	PHA (+)		PHA (-)	PHA (+)		
1	38	6	104±3	53±6	49±6	143±25	87±9	40±6	14	45	16	142±4	46±1	68±1	128±4	23±3	82±3				
2	42	7	134±5	47±10	65±7	125±1	35±8	72±7	15	37	17	124±5	105±2	16±1	159±11	63±1	61±1				
3	45	13	139±4	69±1	51±1	151±7	64±3	58±2	16	36	18	220±11	222±1	0	128±4	23±3	82±3				
4	45	13	138±1	62±1	55±1	159±11	63±1	61±1	17	42	18	130±6	114±1	13±1	155±4	51±4	68±2				
5	38	14	178±0	119±1	34±1	171±1	64±15	62±8	18	42	21	163±23	68±3	59±2	159±11	63±1	61±1				
6	44	14	105±4	45±3	57±3	159±11	63±1	61±1	19	43	21	164±1	115±9	30±6	139±2	43±4	70±2				
7	37	14	170±1	90±28	46±17	156±4	52±17	67±11	20	42	20	157±6	127±1	20±1	181±17	85±12	54±6				
8	37	14	170±1	91±21	47±12	159±11	63±1	61±1	21	44	22	160±5	128±11	20±7	170±1	64±15	62±8				
9	37	15	104±3	54±5	49±5	159±11	63±1	61±1	22	43	23	206±16	156±13	25±6	159±11	63±1	61±1				
10	37	15	122±3	76±4	38±3	155±4	71±2	54±2	23	43	24	101±3	47±7	54±6	159±11	63±1	61±1				
11	45	15	127±3	102±53	21±42	151±7	64±3	58±2	24	40	25	117±4	82±4	30±3	159±11	63±1	61±1				
12	37	15	138±2	75±24	46±4	159±11	63±1	61±1	25	36	25	125±8	122±3	3±2	159±11	63±1	61±1				
13	42	16	140±7	71±4	50±2	159±11	63±1	61±1	26	45	30	134±14	98±1	28±1	155±4	51±4	68±2				
									27	43	31	119±5	104±10	13±8	159±11	63±1	61±1				
									28	45	34	188±16	79±2	58±1	150±3	10±3	94±2				
Mean					47±11			60±7						29±21			67±11				
										P<0.005											
										P<0.02											
										P<0.001											

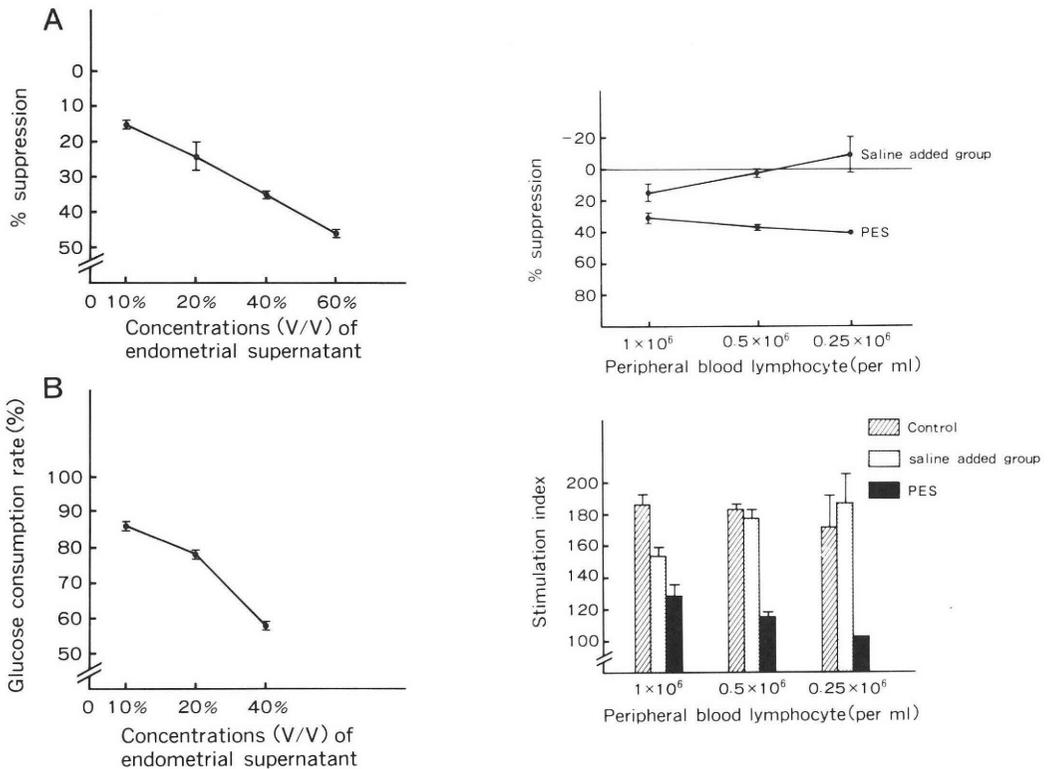


Fig. 2 Dose-dependent suppression of endometrial supernatants in fluorometric blastformation test (A), and glucose consumption test (B).

Fig. 3 Dose-dependent suppression by constant volume (40% V/V) of proliferative endometrial supernatants (PES) with varying concentrations of lymphocytes, examined by FBT.

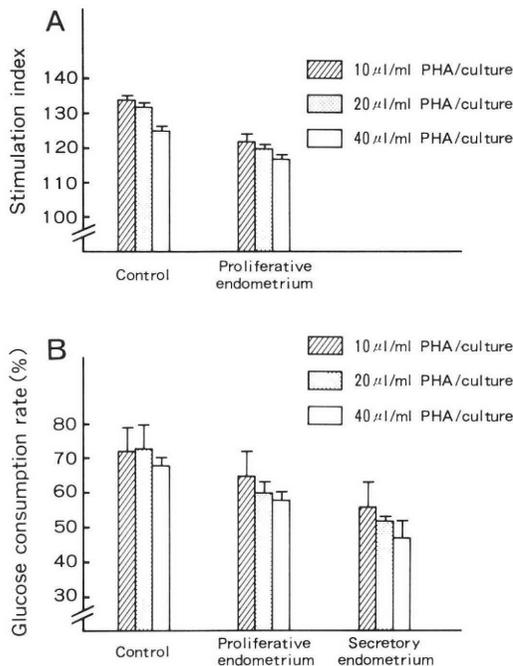


Fig. 4 Effects of PHA concentrations on the suppressive activity of endometrial supernatants, examined by FBT (A) and GCT (B).

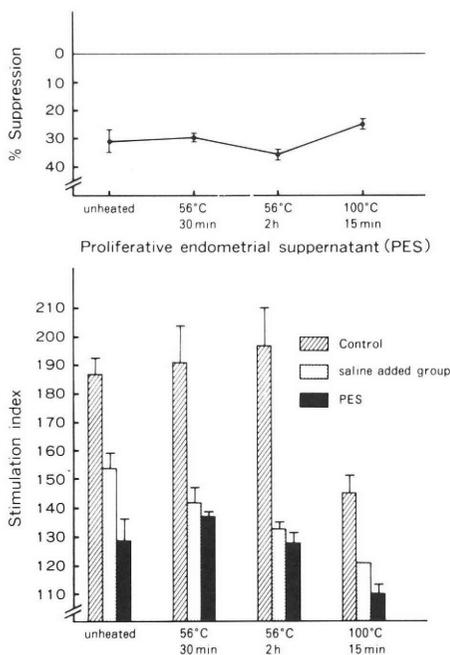


Fig. 6 Effects of heating of endometrial supernatants on PHA-induced lymphocyte reactivity, examined by FBT.

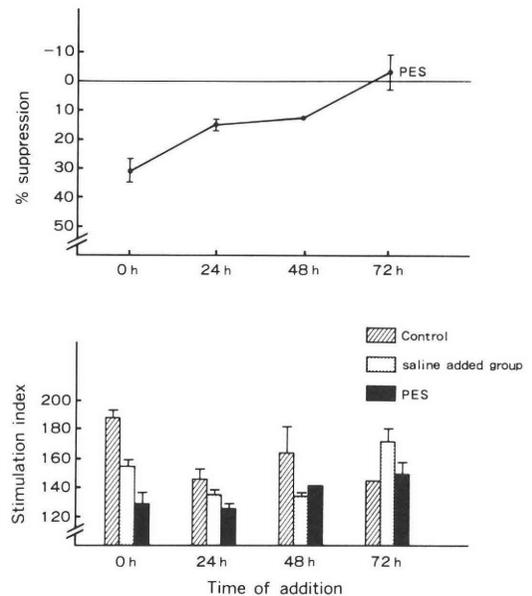


Fig. 5 Effects of addition time of proliferative endometrial supernatants (PES) on PHA-induced lymphocyte reactivity, examined by FBT.

種濃度のリンパ球培養系に添加して検討した結果であり、リンパ球濃度を減少させると子宮内膜培養上清の抑制作用は徐々に増強し、一方、対照としての生食添加群では抑制率が反対に徐々に減少した。この事は子宮内膜培養上清による抑制作用が単なる栄養物質低下によるものでない事を示している。

II. PHA濃度の影響

一定量(40% v/v)の子宮内膜培養上清と10μl/ml, 20μl/ml, 40μl/mlのPHAをリンパ球培養系に添加して検討した。図4に示す様に、子宮内膜培養上清添加群のリンパ球の核酸合成量(SI)或はグルコース消費率はPHA濃度を増量しても増加せず、逆に徐々に低下した。

III. 子宮内膜培養上清添加時間の影響

PHA刺激後の各0, 24, 48, 72時間目で子宮内膜培養上清或は培養液のみ(control)をリンパ球培養系に添加し、その結果をFBT法で検討した。図5に示したごとく、子宮内膜培養上清によるリンパ球増殖反応の抑制作用はPHAとの同時添加培養において最も強く(抑制率31±4%)、PHA添加後子宮内膜培養上清を加えるまでの時間が延長するとともに漸減する傾向を示し、PHA添加48時間後に子宮内膜培養上清を添加してもなお13%の抑制率を示したが72時間後の添加では抑制作用が認められな

った。GCT法による検討でも同様の結果が得られた。

IV. 子宮内膜培養上清の加熱による抑制効果の変化

子宮内膜培養上清及び control medium としての Trowell's T8 培養液と生食を各々56°Cで30分間と2時間、及び100°Cで15分間などの熱処理をしてからPHA刺激リンパ球系に添加し、その子宮内膜培養上清の抑制効果の変化をFBT法で検討した。図6に示したごとく、熱処理していない子宮内膜培養上清添加群のリンパ球の増殖反応はcontrol 或は生食添加群より低値で、抑制率は $31 \pm 4\%$ を示し、56°Cで30分間及び2時間、或は更に100°Cで15分間の熱処理を行ってもその抑制率は有意な変化が認められなかった。GCT法でも同じ結果が得られた。

考 案

子宮内膜から分泌される uterine milk と呼ばれる物質が妊卵の発育、着床に重要な役割を果している可能性は以前から示唆されており、動物においてはその免疫抑制作用の報告もみられる^{1,2,17,18}。今回我々はヒトにおける子宮内膜組織分泌物質の免疫生物学的意義を明らかにする為に、子宮内膜組織の器官培養上清がPHA刺激リンパ球増殖反応に与える影響を96時間のリンパ球培養過程内での細胞増殖に伴う核酸合成量の変動とグルコース消費率を指標として検討した。子宮内膜培養上清は増殖期、分泌期いずれの時期においてもリンパ球増殖を有意に抑制し、また、この抑制効果は増殖期に比し分泌期で有意に強く認められた。一方、大網膜或は腹膜組織の器官培養上清はいずれも抑制作用を示さなかった。子宮内膜培養上清の抑制作用は非特異的 dose-dependent で、この培養上清添加培養後のリンパ球生存率は95%以上であった事からこの抑制作用は細胞毒作用によるものではないと考えられる。また、この抑制作用が子宮内膜培養上清の養分不足から引き起こされたものではない事は、抑制効果が生食添加群より有意に高く、かつリンパ球数を減少させてゆくと、生食添加群の抑制率は徐々に減少し、反対に子宮内膜培養上清添加群の抑制率が徐々に増加していく事からも明らかである。また、この抑制作用が子宮内膜培養上清とPHAの直接結合によるものではない事は、一定量の子宮内膜培養上清添加群でPHA濃度を増加させてもリンパ球の増殖反応の増強は認められなかった事で示される。さらに、子宮内膜培養上清によるリンパ球増殖反応の抑制作用はPHA添加48時間以後に子宮内膜培養上清を添加してもなお13% (FBT法) と $9 \pm 5\%$ (GCT法、

未発表データ)の抑制率が認められた事から子宮内膜培養上清と、PHAとの競合的反応によるものではない事も示唆された。分泌期或は増殖期子宮内膜培養上清中のプロゲステロンの濃度はRIAによっていずれも3ng/ml以下であり(未発表データ)、この抑制効果がプロゲステロンの直接作用により引き起こされたものではない事は明らかである。

子宮内膜培養上清の抑制作用は増殖期初期に低値であり、月経周期の進行に伴って増強する傾向を示し、また、増殖期に比し分泌期では有意に強い抑制効果が認められた。これらの結果は子宮内膜での免疫抑制物質の産生もしくは放出が卵巣ホルモンの影響下で行われている可能性を示唆している。この子宮内膜から分泌された免疫抑制物質は耐熱性であり、100°Cで15分間加熱してもその抑制作用はほぼ変わらなかった事から、蛋白質ではない可能性が強いが生化学的解析は今後の課題である。

妊娠維持機構において、子宮脱落膜が何らかの免疫抑制物質を分泌し、重要な胎児保護の役割を果しているという事はすでに報告されている^{2,8,10}。脱落膜は子宮内膜が、卵巣ホルモン特にプロゲステロンにより分化形成されたものであるが、非妊時の子宮内膜から分泌される物質の免疫調節機能についてはいまだ不明である。しかしながら子宮内膜には典型的リンパ管が存在し⁹、母体にとって semiallograft である妊卵は、第一の直接接触の場所である子宮内膜に何らかの免疫保護作用がなければ、その着床の過程で免疫学的に排除されてしまうであろう。受精卵自身も微量の免疫抑制物質を分泌する事が報告されているが⁴、さらに受容体としての子宮内膜の免疫抑制能がこれに相乗されて、着床が成功すると考えられる。

最近免疫抑制作用を持ち、ホルモンに依存するところの子宮内膜 large lymphoid cell がヒト非妊子宮内膜に存在すると報告されている⁵。また、ヒト分泌期子宮内膜の extract がTリンパ球の増殖反応を抑制する事も最近明らかになった⁷。これらの報告は脱落膜化以前の非妊子宮内膜にも免疫抑制能がある可能性を示唆し、今回の検討はさらに、子宮内膜より免疫抑制物質が分泌されている事、及び分泌期にその抑制作用が増強している事を証明した。培養上清中に検出される免疫抑制物質については、卵巣ホルモンの影響を含め今後さらに検討を行う予定である。

本論文の要旨は、第30回日本不妊学会学術講演会(昭和60年11月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Allen, R. L., Murray, F. A. and Wietsma, H. T.: Immunosuppression in the mouse by porcine uterine secretory protein. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1: 193, 1981.
- 2) Badet, M. T., Bell, S. C. and Billington, W. D.: Immunoregulatory activity of supernatants from short term cultures of mouse decidual tissue. *J. Reprod. Fert.*, 68: 351, 1983.
- 3) Daya, S., Clark, D. A., Devlin, C., Jarrell, J. and Chaput, A.: Suppressor cells in human decidua. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 151: 267, 1985.
- 4) Daya, S. and Clark, D. A.: Production of immunosuppressor factor (s) by preimplantation human embryo. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 11: 3, 1986.
- 5) Daya, S., Clark, D. A., Devlin, C. and Jarrell, J.: Preliminary characterization of two types of suppressor cells in the human uterus. *Fertil. Steril.*, 44: 778, 1985.
- 6) De cock, W., De Cree, J. Van Wauwe, J. and Verhaegen, H.: Measurement of mitogen stimulation of lymphocytes with a glucose consumption test. *J. Immunol. Methods.*, 33: 127, 1980.
- 7) Fujisaki, S. and Maeyama, M.: Immunological studies of human endometrium-suppression of lymphocyte mitogenesis by endometrial extract. *Acta. Obstet. Gynecol. JPN.*, 38: 1105, 1986.
- 8) Golander, A., Zakuth, V., Shechter, Y. and Spirer, Z.: Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by a soluble factor secreted by explants of human decidua. *Eur. J. Immunol.*, 11: 849, 1981.
- 9) Head, J. R. and Seelig, Jr. LL.: Lymphatic vessels in the uterine endometrium of virgin rats. *J. Reprod. Immunol.*, 6: 157, 1984.
- 10) Kirkwood, K. J. and Bell, S. C.: Inhibitory activity of supernatants from murine decidual cell cultures on the mixed lymphocyte reaction. *J. Reprod. Immunol.*, 3: 243, 1981.
- 11) Morgan, A. R., Lee, J. S., Pulleyblank, D. E., Murray, N. L. and Evans, D. H.: Ethidium fluorescence assays. Part 1. Physicochemical studies, *Nucleic Acids Research*, 7: 3, 1979.
- 12) Murray, F. A., Segerson, E. C. and Brown, F. T.: Suppression of lymphocytes in vitro by porcine uterine secretory protein. *Biol. Reprod.*, 19: 15, 1978.
- 13) Olmsted, J. III and Kearns, D. R.: Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acid. *Biochem.*, 6: 3647, 1977.
- 14) Paoletti, C., Lepecq, J. B. and Lehman, I. R.: The use of ethidium bromide-circular DNA complexes for the fluorometric analysis of breakage and joining of DNA. *J. Mol. Biol.*, 55: 75, 1971.
- 15) Parkes, A. B. and Howells, R.: Glycolytic enzyme levels in phytohaemagglutinin stimulated porcine peripheral lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64: 1231, 1975.
- 16) Roos, D. and Loos, J. A.: Change in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 222: 565, 1970.
- 17) Segerson, E. C.: Immunosuppressive effect of ovine uterine secretory protein upon lymphocytes in vitro. *Biol. Reprod.*, 25: 77, 1981.
- 18) Segerson, E. C., Libby, D. W., Getz, W. R. and Randel, R. D.: Immunosuppressive effect of uterine secretory protein from Angus and Brahman cows upon lymphocytes in vitro. *J. Anim. Sci.*, 55, Suppl. 1: 390, 1982.

**Effect of human
endometrial supernatants on
PHA-induced lymphocyte reactivity
—Analysis by fluorometric
blastformation test and
glucose consumption test—**

Huei-Sheng Wang, Hideharu Kanzaki,
Makoto Tokushige, Shigeyasu Sato,
Masumi Yoshida and Takahide Mori

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

In order to clarify the immunological properties of the non-decidualized endometrium, we prepared the supernatants from explant cultures of human endometria, and examined their effects on phytohemagglutinin (PHA)-induced lymphocyte reactivity by using fluorometric blastformation test (FBT) and glucose consumption test (GCT). Both proliferative (PES) and secretory endometrial supernatants (SES) showed significant dose-dependent inhibition. Supernatants obtained from the early proliferative phase endometria had only slight suppressive activity and the activity increased gradually as the cycle progressed. The suppressive activity of SES was higher than that of PES. In contrast, no suppressive effect was

identified in supernatants from similar cultures of peritoneums and omentums. The inhibitory effect of endometrial supernatants was highest when it was added at the beginning of culture, and decreased gradually with the delay in the time of its addition. Increase concentrations of PHA failed to overcome the suppressive activity, and the activity was still preserved even after the heating of the supernatants at 100°C for 15 min.

These results provide an evidence that before

implantation, the human endometrium could release and/or produce a soluble and heat-stable immunosuppressive substance (s), which may operate for the protection of allogeneic spermatozoa and fertilized ovum from maternal immunologic destruction. Key words: Endometrial supernatants. Immunosuppression.

PHA. Fluorometric blastformation test.

Glucose consumption test.

(受付：昭和62年10月3日)

子宮筋の組織片培養および器官培養との比較 Rose の還流培養装置を使って

A Comparative Study of Explant Culture and Organ Culture in Myometrium Using Rose's Circumfusion System

産業医科大学産婦人科学教室 (主任: 岡村 靖教授)

大塚 治夫 吉田 耕治 岡村 靖
Haruo OTSUKA Kohji YOSHIDA Yasushi OKAMURA

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

担子宮筋腫患者5名の摘出子宮を用いて、子宮筋の組織片培養法による単層培養、Roseの還流培養装置を用いての器官培養を施行し両者の比較検討をした。

組織片培養法による単層培養では、組織片の辺縁より増殖し、組織片は1週間程で、壊死に陥ったため、取り除いた後、増殖した細胞を継代した。培養した細胞が子宮筋由来細胞であることの一証明手段として、酸素抗体法を用いて desmin 染色を行なった。

Roseの還流培養装置を用いての子宮筋は、3週間目にも尚、増殖しつづけ、辺縁部は密に細胞が並び、その延長線上には、増殖した細胞が交差して重層を形成した。

以上のことにより、子宮筋の単層培養及び器官培養は、両者共今後、in-vitro 上での実験に応用可能であり、とくに、Roseの還流培養装置は優れた装置であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 506-511, 1988)

緒 言

子宮は、reproduction period において dynamic な変化をする、極めて特徴のある臓器である。実地臨床上、妊娠の週数増加に伴い末期には避妊時の20倍にもなり、胎児娩出後、短時間で収縮してゆく様は、驚異とも思える。又、婦人科腫瘍で最も一般的な子宮筋腫は、子宮に多発する。これらの事は、子宮が女性 hormone の target organ であり、子宮筋細胞の特殊な機能のためと思われる。

このため、子宮筋における hormone 作用機構、ならびに細胞の特徴を解明せんとして、子宮筋の培養を試み、組織片培養法による単層培養と、Roseの還流培養装置を用いて器官培養を施行し、比較検討したのでここに報告する。

研究材料および方法

1. 材料

実験に用いた子宮筋は、子宮筋腫と診断され、単純子宮全摘出を施行された、年齢40~48歳に至る5例の患者の摘出子宮より得られた。筋組織は、一部を病理検査に提出し残りを培養に供した。

2. 研究方法

(1)組織片培養法による単層培養

無菌的に切り出した子宮筋をシャーレに移し、その組織を交差した2本のメスではさんで両方のメスの刃と刃とをよく合わせメスを左右に引くことを繰り返して、全体の組織が1-2mm²の多数の組織片になるまで切った。細切した組織を底面積25cm²の tissue culture flask (Corning Glass Works, Corning, N. Y., U. S. A.)に移し、その表面全体に広げ、20% FBS

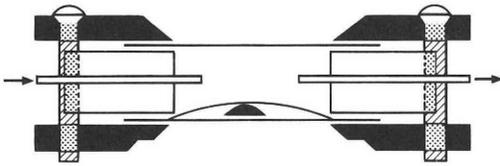


図1 セロファンシート法

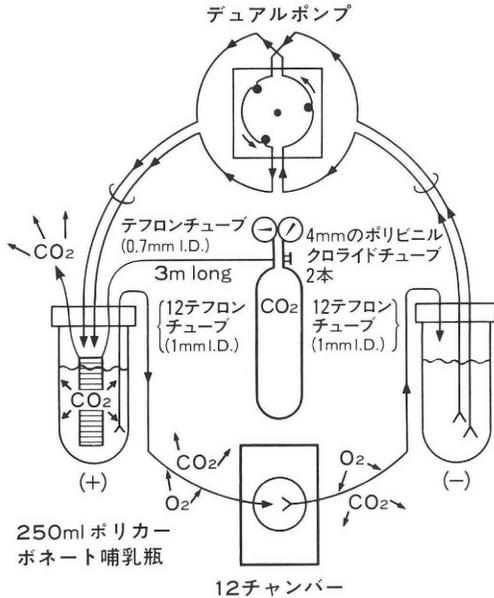


図2 Roseの還流培養法

(Fetal bovine serum, Flow Laboratories, Va., U. S. A.)加 McCoy5A 培地 (Flow) を 5 ml 加えた。翌日、この培養を観察して、培養器表面に付着しなかった組織片、細胞破片、赤血球などを取り除くために、培地を交換した。その後、週に2回培地交換をし、組織片辺縁より細胞が増殖しはじめた時、組織片を取り除き、単層培養を行った。

(2) Roseの還流培養装置を用いての器官培養

セロファンシート法¹⁾がこの培養法の中心になっている。図1は、その断面図であるが有窓金属板2枚と有窓ガスケット、2枚のカバーガラスと透析用のセロファン膜によりカバーガラスに圧縮された状態で培養され、培養液とは直接ふれない。すなわち組織はセロファン膜により透析された成分で培養される。しかも膜は組織産物を培養液に希釈されることもなく組織の周囲にとどめる役目を果たしてお

り、組織によい培養環境を与えている。

図2にその原理を示してある。デュアルポンプでチューブをしごきチャンパーに培養液を還流させている。すなわち培養液は、哺乳瓶(+)→テフロンチューブ→チャンパー→テフロンチューブ→哺乳瓶(-)→塩化ビニールチューブと、1分間に48ml、各々のチャンパーに4mlの割合で流れ、栄養分を培養組織に補給している。コイル状にして(+)側の哺乳瓶に入れたチューブに炭酸ガスを流し、培養液のphを調整する。酸素は空気中よりテフロンチューブを通して培養液中に取り入れられ、余分の炭酸ガスは空気中に放出される。

この原理をもとに、血清を含まない培養液中で、子宮筋組織直径、1-2mmの大きさに小鋏で細切り、細切った組織3-4個をカバーガラス上ののせチャンパーを完成させた。12個のチャンパーを同様にして組立て、20% FBS加 McCoy5A液を200ml入れた2本の哺乳瓶に(+), (-)側のキャップをとりつけ、培養液を還流させた。1週間後に半分の200mlを、2週間目に全培養液を交換した。

3. 観察方法

単層培養は位相差顕微鏡による観察とともに、10%中性ホルマリン固定後、ギムザ染色又は、0.1%クリスタルバイオレット染色による肉眼的並びに光顕的観察を行った。

Roseの還流培養は、適宜チャンパーを直接位相差顕微鏡で観察するとともに、培養後はチャンパー内に、95%アルコール液を注入、固定し、固定後チャンパーをこわし、カバーガラスに組織をつけたまま、肉眼的並びに光顕的観察を行った。

4. 酸素抗体染色

培養した細胞が子宮筋由来細胞であることの証明の一手段として、酵素抗体法により、子宮筋組織切片、子宮筋由来培養細胞の desmin 染色を行った^{2,3,4)}。

研究成績

(1)単層培養

写真1は、子宮筋組織切片を底面積25cm²の tissue culture flask (Corning) に20% FBS加 McCoy5A液5ml加えた、7日目のものである。組織片は、底面に密着し片縁より、増殖遊離した細胞がみられる。

写真2は、その2週間目のものである。遊離した細胞は、互いに培養増殖し、単層を形成する。この時には、細胞片は壊死をおこし底面から浮いてくる。

写真3は、子宮筋組織片の desmin 染色像である。amino-ethylcabasole で赤く染色されている部分が、筋細胞の細胞質である。



写真1 子宮筋の組織片培養7日目(×20) 右側の子宮筋組織より増殖遊離した細胞を認める。

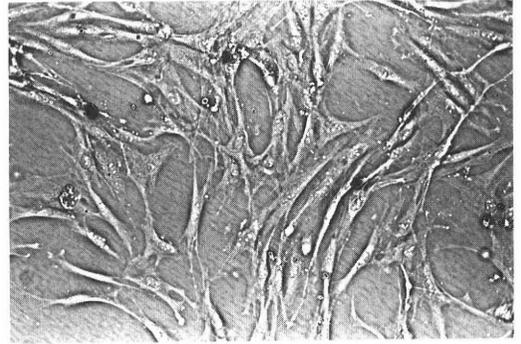


写真2 子宮筋由来培養細胞における初代培養2週間目(×50)

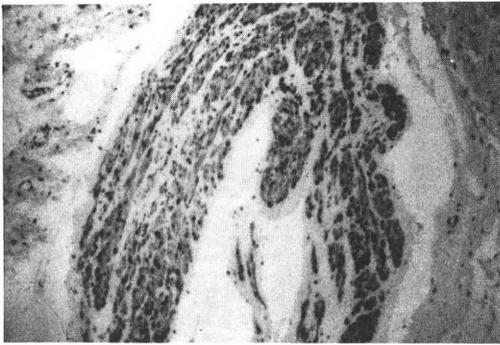


写真3 子宮筋組織の desmin 染色(×50) 子宮筋細胞の細胞質が染色されている。

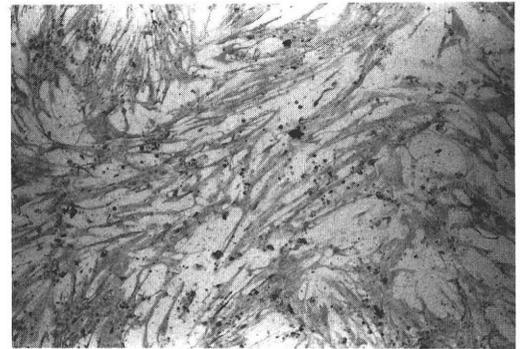


写真4 子宮筋由来培養細胞における desmin 染色(×20)。細胞が相互に接着し、個々の細胞質が染色されている。

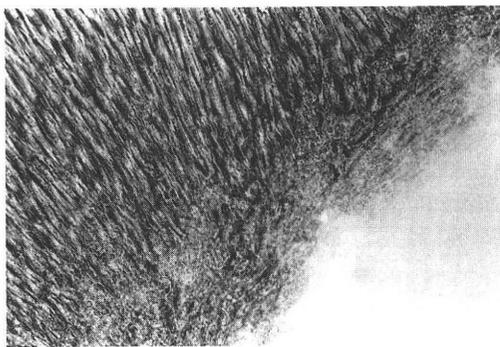


写真5 Rose の還流培養装置を用いた子宮筋培養3週間目(×20) 右側の子宮筋組織辺縁は増殖が盛んで境界が不明瞭である。

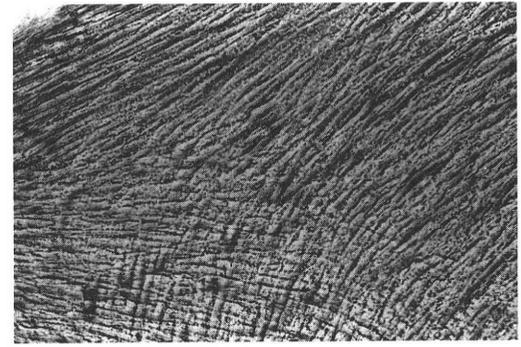


写真6 Rose の還流培養装置を用いた子宮筋培養3週間目(×20)。写真5の延長線上のものであり、増殖した細胞が交差している。

写真4は、組織片培養法による単層培養のdesmin染色である。細胞同士が密着し、紡錘形の細胞質が赤く染色され、positiveな所見であり、核はヘマトキリンにて青く染色されている。

(2) Roseの還流培養装置を用いた培養

写真5は、培養3週間目の子宮筋組織である。組織片培養法によるものと比較して、筋組織片縁の細胞増殖は盛んで、増殖した細胞が密に並んでおり、そこから、周辺に増殖してゆく様子がうかがえる。

写真6は、増殖した細胞の延長線上のものであり、密に並んで紡錘形の細胞が、交差し重層になっている。

考 案

単層培養には、組織片培養法と分散培養法がある⁵⁾。子宮筋の分散培養法を用いての単層培養は、すでに報告した⁶⁾。今回、Roseの還流培養装置を用いての器官培養と比較するため組織片培養を施行した。単層培養を用いた実験は多数あり、方法としては、分散培養法によるものの方が多い^{5,7)}。この理由として、消化酵素剤の発達⁸⁾、trypsin⁹⁾、pronase¹⁰⁾、collagenase¹¹⁾、hyaluronidase¹²⁾、dispase¹³⁾により、容易に浮遊細胞が多量に得られることが一因であろう。組織片培養法は、培養容器表面に付着した、鋭利な辺縁より、細胞が増殖しはじめ、継代するには、少なくとも1週間位必要とし、又、浮遊細胞も、多量には得にくいのが実情であると思われる。

in-vitroで薬剤やHormoneなどの影響を観察する際、単層培養を用いる方法は、すでに確立されたものであり、幾多の医学分野に貢献してきた¹⁴⁾。しかし、単層培養を用いる際、つまり、in-vitroのできごとをin-vivoにおきかえる際、注意すべき点として、1. cell-to-coll contactが失われた状態であり正常組織構造ではない。2. 培養細胞は、insulinやcortisolのようなgrowth factorおよび他のHormone作用がin-vivoとは違った影響をするかもしれない。3. 数種の構成細胞からなる培養細胞は、そのうちの一部が、目的とする薬剤やHormoneに影響をうけるにすぎない¹⁵⁾。その為、よりin-vivoに近い状態は器官培養の方がすぐれているとおもわれる。しかし、器官はいうまでもなく細胞より高準位にあり、構成細胞のエネルギー消費は膨大であり、その可塑性・安定性は低くなっている。したがって一般的に、器官培養は細胞培養に比して困難であり、細胞培養学派が細胞の栄養要求¹⁶⁾・クローン分離¹⁷⁾をはじめ詳細な研究を行ない得たのに比し、器官培養派ではそうした面での研究は立ち遅れている。

器官培養は、1914年Thomson¹⁸⁾がニワトリ胚の肢、羽毛、水晶体などを成長させることに成功している。以後、StrangwaysとFell¹⁹⁾(1926年)が器官培養の基礎を確立、1929年にFellとRobinson²⁰⁾が今日の器官培養の原点ともいえる時計皿法を確立している。1952年にはWolffはHaffenの協力を得て、新しい培養法Wolff-Haffen法を²¹⁾を考案し、性分化の問題、器官間の相互作用、免疫化学的研究などの問題解決に用い、一応の成果を得た。器官培養に大きな転換をもたらしたのは、これまでの半固体培養液上における培養から、1954年Chen²²⁾が開発した液体培養液上での培養である。以降1954年Trowell²³⁾による金網台法が確立され、呼吸不足から生ずる中心部の壊死なしに多量の培養体を長期間培養できるようになった。しかしながら、細胞培養に比べ器官培養は、前述した種々の厳しい制約の為、培養器官の上でも、また質的にも必ずしも満足できるものではなかった。Roseの還流培養装置は²⁴⁾は、胎生組織の機能を発現維持させ長期間培養できるという点で非常にすぐれている。しかも従来の方と違い培養した状態で位相差顕微鏡により観察でき、細胞の動態を眼下にとらえることができる。培養組織の形体的観察だけではなく、生化学的データの裏づけとして、あるいは生化学的裏づけをもった形態学的データを得ながら実験をすすめられる。

Rose et al²⁵⁾は、2週間培養した、肝細胞の電子顕微鏡像では、毛細胆管、粗面小胞体、ゴルジ装置、グリコーゲン、ミクロボディなどが観察され、成体肝細胞像とまったく同様であり、培養期間は108日が最高で、位相差顕微鏡による観察では完璧な肝細胞像を示したと報告している。

今回Roseの還流装置を用いて、3週間子宮筋の培養をした。組織片培養法による組織片は、1週間程で中心部の壊死をおこしてしまうのに比較して、Roseの還流装置を用いた子宮筋は、3週間目にも尚増殖しつづけた。今後さらに培養期間を延長させ、また培養組織の光顕的、電顕的観察も検討課題としている。

このRoseの還流装置による培養子宮筋をつかって、子宮筋に対する薬剤やHormoneの作用機構を解明していきたいと考えている。

文 献

- 1) Rose, G. G.; Pomerat, C. M., Shindler, T. O. and Trunnel, J. B.: A cellphane-strip technique for culturing tissue in multipurpose culture chamber. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4: 761,

- 1958.
- 2) 石川春律：血管内皮細胞と細胞骨格, 生体の化学, 36: 173, 1985.
 - 3) 大塚治夫, 吉川耕治, 草野秀一, 柏村正道, 岡村靖：子宮筋腫・子宮由来培養細胞の酸素抗体染色。—desmin, vimentin, fibronectin をつかって—日産婦誌, 39: 746, 1987.
 - 4) 大塚治夫, 吉田耕治, 草野秀一, 岡村靖：子宮筋腫由来細胞の初代培養の確立, 日産婦誌, 39: 271, 1987.
 - 5) 難波正義, 木本哲夫：2 倍体細胞株の培養。組織培養—基礎と応用—(中井準之助ら編), 朝倉書店, 東京, 1964.
 - 6) Otsuka, H., Yoshida, K., Kusano, S. and Okamura, Y.: Primary culture of cells derived from human myometrium: Both myometrium and cultured cells stained with desmin by the enzyme-labeled antibody method. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 13: 121, 1987.
 - 7) 中井準之助, 山根績, 山田正篤, 井上幸重, 堀川正克：組織培養, 朝倉書店, 東京, 1964.
 - 8) Rinaldini, L. M.: An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. *Exp. Cell Res.*, 16: 477, 1959.
 - 9) Rinaldini, L. M.: The isolation of living cells from animal tissues. *Intern. Rev. Cytol.* 7: 587, 1958.
 - 10) Gwantkin, R. B. L. and Thomson, J. L.: A new method for dispersing the cells of mammalian tissues. *Nature*, 201: 1242, 1964.
 - 11) Lasfargues, E. Y. and Ozzelo, L.: Cultivation of human breast carcinomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, 21: 1131, 1958.
 - 12) Litwin, J.: Standatization of human diploid cell cultivation. *Appl. Microbiol.*, 20: 1899, 1970.
 - 13) Matsumura T., Yamanaka, T., Hashizume, S., Irie, Y. and Nitta, K.: Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease. *Jpn. J. Exp. Med.*, 45: 377, 1975.
 - 14) 松谷豊：初代培養。組織培養—基礎と応用—(中井準之助ら編), 47, 朝倉書店, 東京, 1964.
 - 15) Chen, L., Linder, H. R. and Lancet, M.: Mitogenic action of oestradiol-17 β on human myometrial and endometrial cells in long-term tissue cultures. *J. Endocr.*, 59: 87, 1973.
 - 16) 草野敬久：培養液。組織培養—基礎と応用—(中井準之助ら編), 7, 朝倉書店, 東京, 1964.
 - 17) 山田正篤：コロニー形成とクローニング法。組織培養—基礎と応用—(中井準之助ら編), 90, 朝倉書店, 東京, 1964.
 - 18) Thomson, D.: Some further researches on the cultivation of tissues in vitro. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 7: 21, 1914.
 - 19) Strangeways, T. S. P. and Fell, H. B.: Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. I. The development of the undifferentiated limb bud. *Proc. Roy. Soc. London.* 99: 340, 1926.
 - 20) Fell, H. B. and Robinson, R.: The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated in vitro. *Biol. J.*, 23: 767, 1929.
 - 21) Wolff, E. and Haffen, K.: Sur une methode cultivee organes embryonnaires in vitro. *Texas Rep. Biol. Med.*, 10: 463, 1952.
 - 22) Chen, J. M.: The cultivation in the fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of fetal rat. *Exp. Cell Res.*, 7: 518, 1954.
 - 23) Trowell, O. A.: A modified technique for organ culture in vitro. *Exp. Cell Res.*, 6: 246, 1954.
 - 24) Rose, G. G.: The circumfusion system for multipurpose culture chambers, I. Introduction to the mechanics, technique, and basic results of a 12 chamber (in vitro) closed circulatory system. *J. Cell. Biol.*, 32: 89, 1967.
 - 25) Rose, G. G., Kumegawa, M. and Cattoni, M.: The circumfusion system for multipurpose culture chambers, II. The protracted maintenance of differentiation of fetal and newborn mouse liver in vitro. *J. Cell. Biol.*, 39: 430, 1968.

A Comparative study of monolayer culture and organ culture in myometrium Using Rose's circumfusion system

Haruo Otuka, Kohji Yoshida
and Yasushi Okamura

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

Monolayer culture by the explant culture method and organ culture in Rose's circumfusion system were performed using myometrium obtained from resected uteri of 5 patients with uterine leiomyoma.

On explant culture, cells proliferated from the margin of the tissue section. Since necrosis was observed after about 1 week, the tissue section was removed, and the proliferated cells were subcultured. To confirm that the cultured cells were derived from myometrium, the cells were stained with desmin by the enzyme-labelled antibody method.

The myometrial cells on organ culture in Rose's circumfusion system were proliferating even after 3 weeks. The cells were closely arranged in the margin, and on the extension line, proliferated cells crossed, forming multiple layers.

These findings show that both monolayer culture and organ culture of myometrium are useful for in vitro experiments, especially, Rose's circumfusion system.

(受付：昭和 62 年 11 月 21 日)

正常ヒト初期脱落膜より得られた TTK-2 cell line の 分泌現象に関する形態学的研究

Morphological Studies on Secretory Function of The TTK-2 Cell Line Derived from Normal Human Early Decidual Tissue.

京都大学医学部婦人科学産科学教室

立山 一郎 森 崇 英
Ichiro TATEYAMA Takahide MORI

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

福井医科大学産科婦人科学教室

富永 敏朗 紙谷 尚之
Tosiro TOMINAGA Naoyuki KAMITANI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukui Medical School

正常ヒト初期脱落膜から分離培養された TTK-2 cell line の継代5代約4ヶ月間培養された時点の細胞に形態学的考察を加えた。この cell line は現在まで4年間約40代継代培養されており、常に旺盛な増殖能を呈し培養後7ヶ月継代9代で transformation をきたし上皮様に悪性化をおこしたと考えられる。今回の観察では fibroblast-like cells が大部分を占め、一部にその変化したやや胞体の広がった epithelial-like cells が混在したが、共に細胞質中に豊富な lysosome 顆粒を有し粗面小胞体、Golgi 装置、mitochondria、脂肪様顆粒を持っていた。さらに種々な形態の lysosome 顆粒を exocytosis で胞体外に放出している像や独特な形態の物質を microapocrine 分泌で微絨毛から放出している像が捉えられた。形態学的な見地から TTK-2 cell line は脱落膜細胞由来の cell line と考えられ、脱落膜細胞の分泌機能を明確に示すことができた。さらに脱落膜細胞は子宮内膜間質細胞から分化してきたものであり、上皮細胞への分化能も有する事が推測され分泌もその一過程と考えられる。この事は脱落膜細胞が間質から上皮へ分化する中間段階にある細胞と言えるのかもしれない。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 512-523, 1988)

緒 言

現在さまざまな妊娠週数におけるヒト脱落膜組織の超微形態学的構造が明らかにされつつあり、それに伴って脱落膜組織のもつ役割がしだいに判明しつつある。ヒト子宮内膜は性 steroid の target organ であり、estrogen 及び progesterone の両 hormone の作用によって decidualization (脱落膜化) という機

能形態学的にきわめて特徴ある変化を引き起こして行く。この脱落膜化をきたした子宮内膜組織、すなわち脱落膜組織は epithelial component (腺上皮組織) と stromal component (間質組織) とに分かれており、それぞれがもとの子宮内膜組織とは異なった変化を惹起している。これらの変化を一言でいえば、前者においては Arias-Stella 反応であり、後者においては脱落膜細胞化である。筆者らは現在正常

ヒト初期脱落膜由来の細胞系, TTK-1 cell lines^{1,2)} (上皮成分と間質成分に分かれている)と TTK-2 cell line を有している。これらはそれぞれ現在まで8.5年間・4年間の長期継代培養期間を有しているが、その培養過程の中で *in vitro* spontaneous neoplastic transformation をきたしたものと考えられる。脱落膜化という現象は妊娠を前提とした短期間の変化現象であるが、この脱落膜組織を母組織とする細胞系と、子宮内膜組織 (menstrual cycle による採取時期の相違はあると思われるが) を母組織とする細胞系とでは形態学上かなりの相違が見られる。すなわち Trent ら³⁾, Kirk ら⁴⁾, Centola ら⁵⁾ の報告する正常ヒト子宮内膜由来の細胞系と今回筆者らの報告する TTK-2 cell line の形態学的相違は明らかであり、この事は *in vitro* 培養に入って hormone の影響を受けなくても、脱落膜由来の細胞系は子宮内膜由来のそれと異なり強く脱落膜組織の性格を残存させ得ると考えられる。この事は少なくとも細胞系が transformation を惹起するまでは当てはまると思われる。以上の事を考慮して、正常脱落膜組織の性格を強く反映すると思われる transformation をきたす前の TTK-2 cell line について、その分泌現象を中心に形態学的考察を加えてみた。

研究材料および方法

TTK-2 cell line の初代培養は1984年2月18日、正常妊娠9週の子宮から合法的妊娠中絶術により約10gの組織が採取され培養が開始された。まず得られた組織のうち trophoblast に付着していた基底脱落膜 (basal decidua) の部分のみを実体顕微鏡下にはあるが選別し、他の組織が混入しないように37.0°Cの生理的食塩水の入ったシャーレの中で10数回洗いぬいで洗浄した。もちろん付着していた血液などもこの時にすべて取り除かれた。この脱落膜組織を同様に37.0°CのHanks液の入ったシャーレの中に入れ、耳鼻科用剪刀を使って約1mm³のfragmentsに細切後遠沈器(800回転/分)を用いてPBS(-)溶液で数回洗浄した。こうして完全にCa²⁺を取り除いた後に0.25% Ca・Mg free trypsin (Difco 1:250)にて処理し、脱落膜組織をほとんど1個ずつの細胞に分離した。この分離された細胞を約6mlの培養液を入れた25cm² culture flask (Corning)の中に入れて培養を開始した。以上はすべて無菌操作のもとで行なわれた。1つのflaskには細胞数が約50万個になるように調整され、培養液はWaymouth MB 752/1 (GIBCO) 60%, Hanks' BSS (日水) 30%, Fetal Calf Serum (GIBCO) 10%から成り、penicillin 100u/ml,

streptomycin 100μg/ml, Anti-PPLO×100 (GIBCO) 2~4%を添加した。初代培養のみは37.0°C, 5% CO₂+95% airの開放系静置培養とし、以後は37.0°C閉鎖系の静置培養とした。培養液は2~3日毎に交換し、3週間から1ヶ月に1度のpassageを目安とし、現在(1988年2月)まで約40代継代培養されている。このTTK-2 cell lineは継代9代において *in vitro* spontaneous neoplastic transformation をきたした⁶⁾と考えられるが、今回試料作成に使用したものは継代5代、約4ヶ月間培養された時点のもので transformation をきたす前のものである。

1) 位相差顕微鏡

TTK-2 cell line を culture flask (Corning) 中で confluent の状態になるまで培養し、培養液交換したのち位相差顕微鏡にて観察した。

2) 走査電顕試料作成

TTK-2 cell line を cover glass の上で confluent の状態になるまで培養し (passage 後3日); これを0.1M sucrose 入り cacodylate buffer にて数回洗いぬいで洗浄した。次に2% glutaldehyde と2% osmium tetroxide で二重固定した後、脱水・臨界点乾燥を行なった。最後に200Åのgold coatingを行ない、走査型電子顕微鏡 (日立S-450) で観察した。

3) 透過電顕試料作成

TTK-2 cell line を Corning culture dish (35mm×10mm style) の中で confluent の状態になるまで培養し (Passage 後5日), これを0.1M sucrose 入り cacodylate buffer で2回洗浄後4% paraformaldehyde, 5% glutaldehyde 等量混合液で前固定、次に2% osmium tetroxide で後固定を行なった。ethanol series で脱水し、epon 812 で包埋した後、dish を破壊し epon block を取り出した。この block で TTK-2 cell line が存在している面 (すなわち dish の底面) に parallel な方向に切片を作成したが、細胞は1~2層しか存在していないために面の trimming はほとんどできず直接 ultra microtome Porter-Blum (MT-2B) にて超薄切片を切り出した。超薄切片は uranyl acetate と lead citrate の二重染色を行なった後、透過型電子顕微鏡 (日立H-600) で観察した。

4) acid phosphatase 活性

TTK-2 cell line を cover glass の上で confluent の状態になるまで培養し (Passage 後3日), これにACP染色キット (武藤化学) を使用してその使用方法に従って反応液を作用させ光顕的な acid phosphatase 活性を検索した。染色は Carrazi's hematoxylin で行なった。

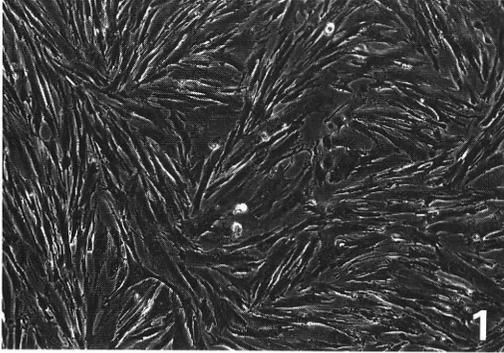


写真1 passage 後3日目の TTK-2 cell line。大部分が fibroblast-like cells であるが、一部にやや胞体の広くなった細胞が見られる。
位相差顕微鏡×100

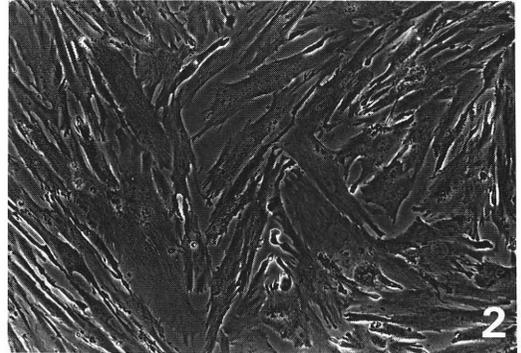


写真2 位相差顕微鏡の強拡大写真。
位相差顕微鏡×200

結 果

1) 位相差顕微鏡像 (写真1・写真2)

写真1・写真2は共に passage 後3日目における TTK-2 cell line の位相差顕微鏡写真である。これによると TTK-2 cell line は細胞質突起を有する胞体の細長い fibroblast-like cells を多く含み、ところどころにやや胞体の広くなった細胞や、三角形の胞体を有する細胞が混在している。これらの細胞は fibroblast-like cells が変化してきたものと考えられるが、やや epithelial cells の形態に近くなっている。これらをここでは epithelial-like cells と呼ぶ事にする。また核がやや大きくなった細胞、2核の細胞なども散見される。

2) 走査電顕所見 (写真3～写真8)

写真3は fibroblast-like cells と考えられる細胞である(↑)。これらの細胞はその細胞表面に数は少ないがやや短い微絨毛と球形に近い分泌顆粒を有している。またかなり長い細胞質突起も有している。写真4は fibroblast-like cell と考えられる細胞の表面をやや高倍で捉えたものであるが、比較的小数の短い微絨毛と細胞長袖には平行な皺壁構造が認められた。微絨毛の中にはその一部が分泌顆粒によって polyp 状に膨出しているものがある(↑)。写真5は epithelial-like cells と考えられる細胞である(↑)。まず細胞表面の分泌顆粒がきわめて多いのが特徴として掲げられる。微絨毛に関しては細く長いものが存在するが、その数があまり多くなく、この点が明らかな epithelial cells と考えられない所見である。しかし胞体は広くっており細胞表面の起伏は少ない。写真6は epithelial-like cell と考えられる細胞の表面を高倍にしたものであるが、細く長い微絨毛

と数多くの分泌顆粒が存在している。細胞表面に皺壁構造はなく、なだらかな起伏を有している。この点は明らかに fibroblast-like cells との相違をみせている。写真7は分泌顆粒の2種の形態を示したものである。上方の↑で示す顆粒は表面が平滑に膨らんでおり、下方の↑↑で示す顆粒は表面が粗く部分的に穴があいた状態になっている。その他微絨毛の一部が polyp 状に膨出したものや、表面の凹凸の多い顆粒なども認められる。写真8は分泌顆粒のうち表面の平滑なもので、その一部がおしつぶされたものを示している。これもやはり分泌形態の一つと考えられる。

3) 透過電顕所見 (写真9～写真22)

写真9は fibroblast-like cells の透過電顕写真である。細胞は細長い紡錘形を呈しており微絨毛の数がきわめて少ない。核細胞質比は比較的小で、核膜の切れ込みを有している。chromatin の分布はほぼ均等であり、核小体も小型である。細胞質の中にはきわめて豊富な顆粒が存在しており、それらはさまざまな形態を呈している。すなわち高電子密度のもの、その一部に亀裂が入ったり低電子密度となってぬけているものなどである。また脂肪様顆粒の存在も見られるが、これら大部分の顆粒は形態学的には lysosome 顆粒と考えられるものであり、一次 lysosome、二次 lysosome、残余小体の混合したものである。また細胞質の中には豊富な粗面小胞体、mitochondria、遊離の ribosome が見られる。写真10は左上方にやや胞体の広くなった epithelial-like cell (↑↑) と思われる細胞が存在しているが、この細胞も微絨毛の少ないことが特徴である。核細胞質比はやや大となっているが、やはりこのような形態上の点からも、fibroblast-like cell の胞体がやや広くなっ

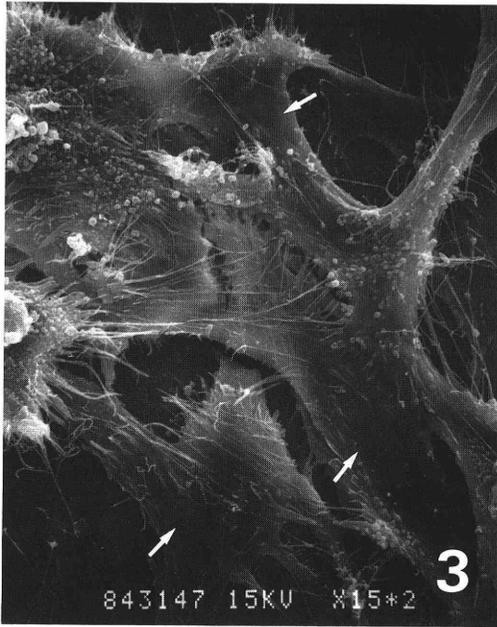


写真3 fibroblast-like cellsと考えられる細胞(↑)。細胞表面に数少ない短かい微絨毛と球形に近い分泌顆粒が見られる。 SEM×1,500

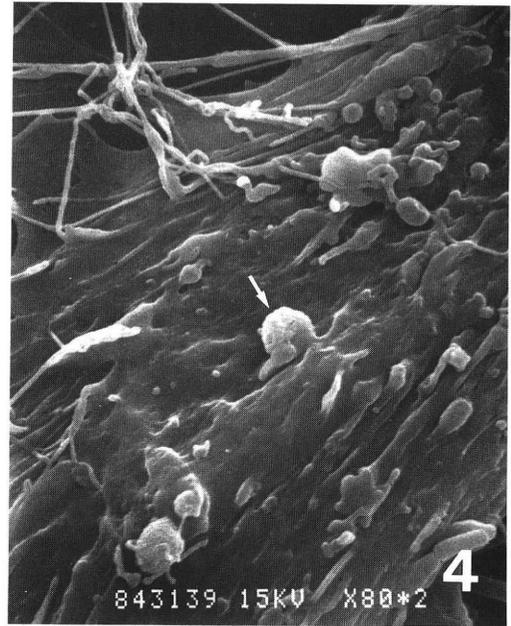


写真4 fibroblast-like cellと考えられる細胞の表面。少数の微絨毛と細胞長軸に平行な皺壁構造が認められ、微絨毛の一部が polyp 状に膨出している(↑)。 SEM×8,000



写真5 fibroblast-like cellsの胞体の広くなった epithelial-like cellsと考えられる細胞(↑)。細胞表面の分泌顆粒はきわめて多い。しかし微絨毛に関しては、細く長いものが存在するがその数はあまり多くない。 SEM×3,100

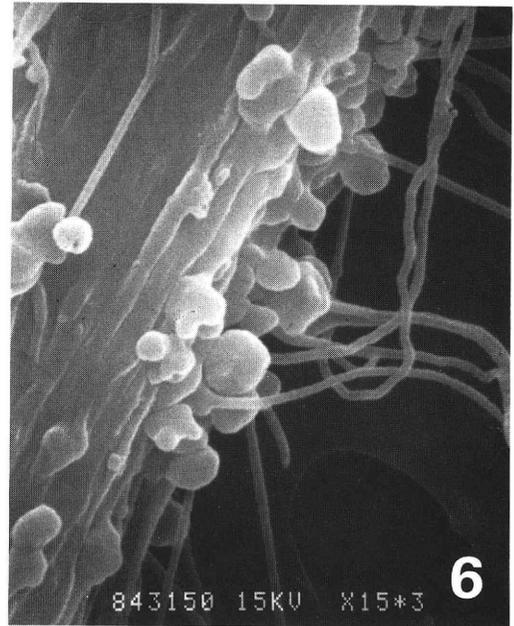


写真6 epithelial-like cellと考えられる細胞の表面。細く長い微絨毛と数多くの分泌顆粒が存在し、細胞表面はなだらかな起伏を呈している。 SEM×15,000

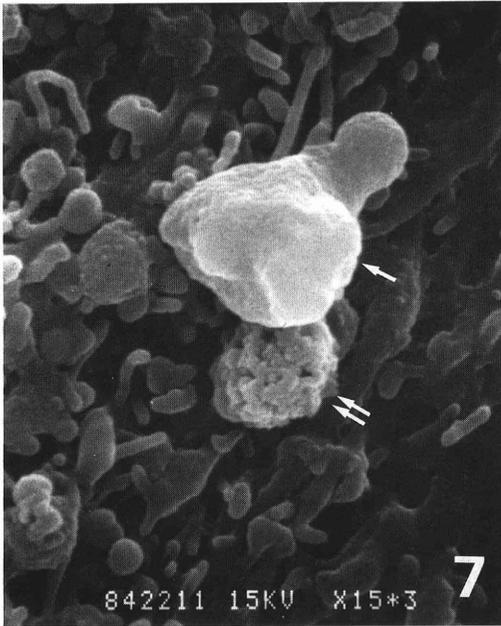


写真7 分泌顆粒の2種の形態を示す。上方の↑は表面が平滑なもの、下方の↑↑は表面が粗く部分的に穴があいている。 SEM×15,000

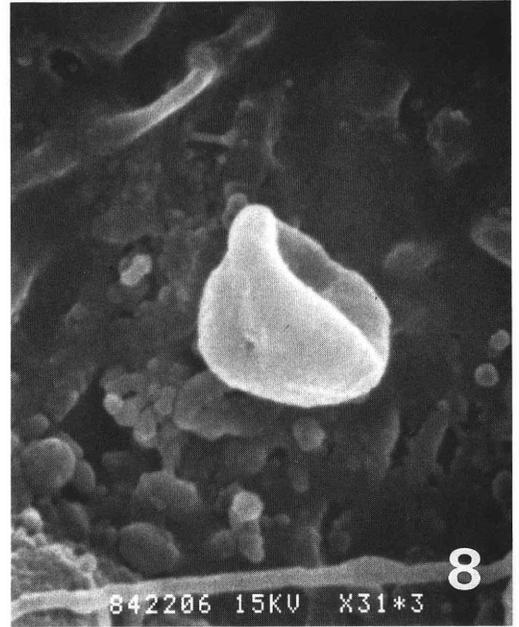


写真8 表面の平滑な分泌顆粒で、その一部がおしつぶされている。 SEM×31,000

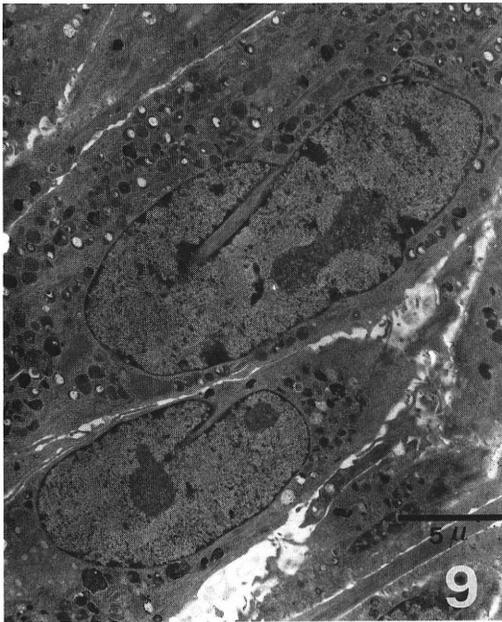


写真9 fibroblast-like cellsと考えられる細胞であるが、微絨毛の数がきわめて少なく、細胞質の中に豊富な顆粒を有している。その多くは形態学的には lysosome 顆粒と思われる。その他豊富な粗面小胞体、mitochondria、遊離 ribosome が見られる。 TEM×3,000

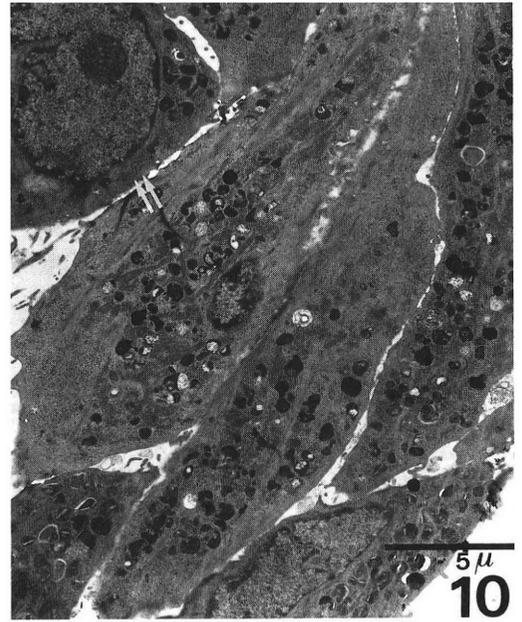


写真10 左上方にやや胞体の広がった epithelial-like cell (↑↑)と思われる細胞が存在しているが、微絨毛は少ない。fibroblast-like cellsの接着給合装置としては desmosome の存在があり、細胞間隙にはところどころに分泌されたと思われる顆粒がある。 TEM×3,500

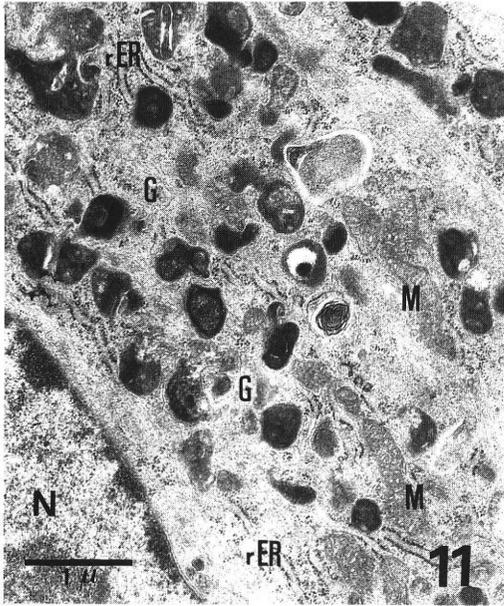


写真11 細胞質内を拡大したものであるが、さまざまな形態の lysosome 顆粒が存在している。長桿状の mitochondria (M), cisterna 間隔の広い粗面小胞体 (rER), Golgi 装置 (G), 豊富な遊離 ribosome が認められる。 N: 核
TEM × 15,000

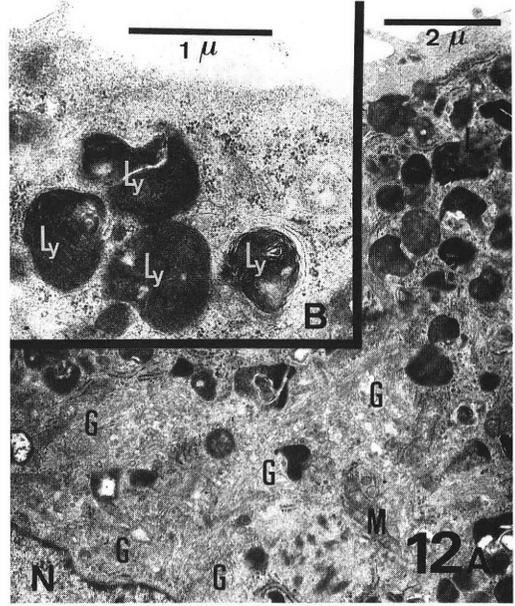


写真12 lysosome 顆粒 (Ly), 脂肪様顆粒 (L) と Golgi 装置 (G) を示した。 N: 核, M: mitochondria
TEM A: × 8,000
B: × 20,000

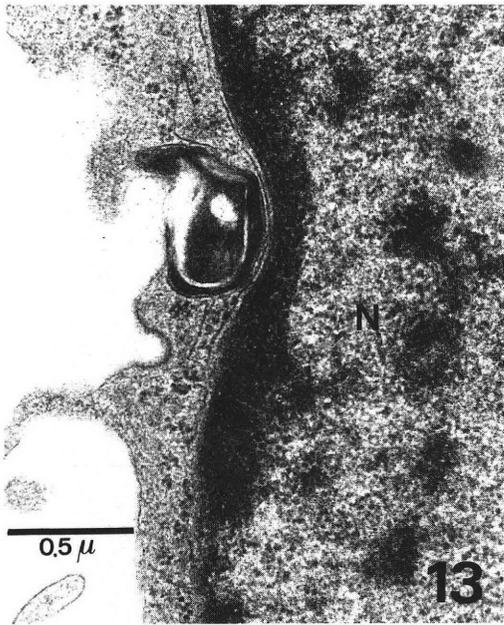


写真13 写真13~写真18は exocytosis に関するものである。細胞質内の lysosome と思われる顆粒を限界膜と細胞膜とが融合した形で、顆粒内容のみ細胞外に放出している。 N: 核 TEM × 35,000

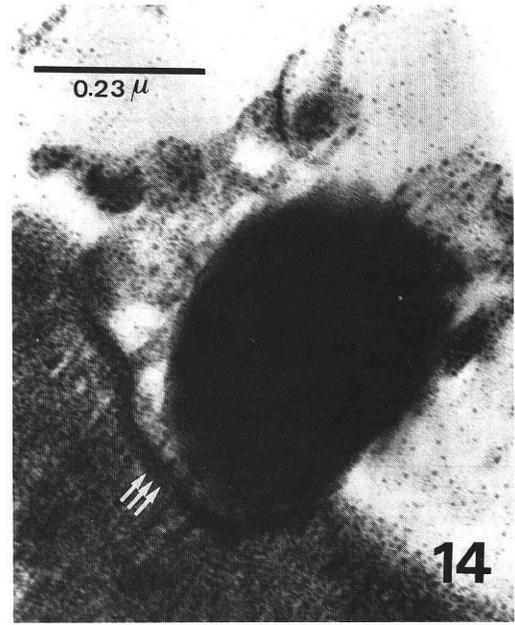


写真14 exocytosis での顆粒の放出を捉えたもので、放出直後のものである。細胞側には細胞膜と限界膜とが融合した厚い膜が残っている (↑↑↑)。 TEM × 100,000



写真15 lysosome と考えられる顆粒が細胞外に分泌されて細胞間隙に存在している。D: desmosome, G: Golgi 装置, L: 脂肪様顆粒
TEM ×20,000



写真16 小胞を有する膜に包まれた顆粒が exocytosis で胞体外に放出されている。Golgi vesicle (↑) も存在している。
TEM ×50,000

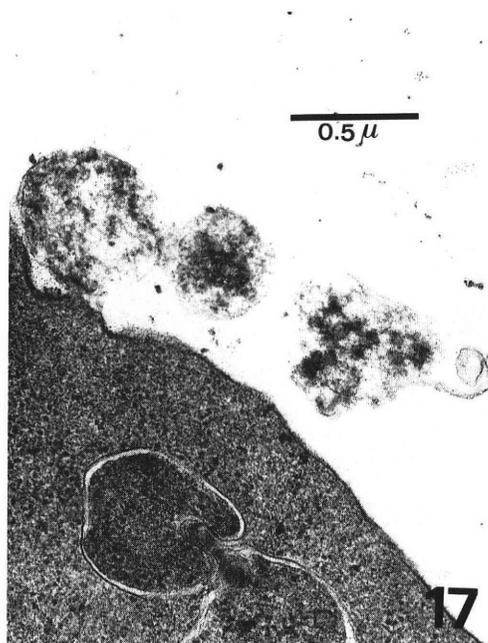


写真17 lysosome 顆粒の残余小体が胞体外に exocytosis の形で放出されている。
TEM ×35,000

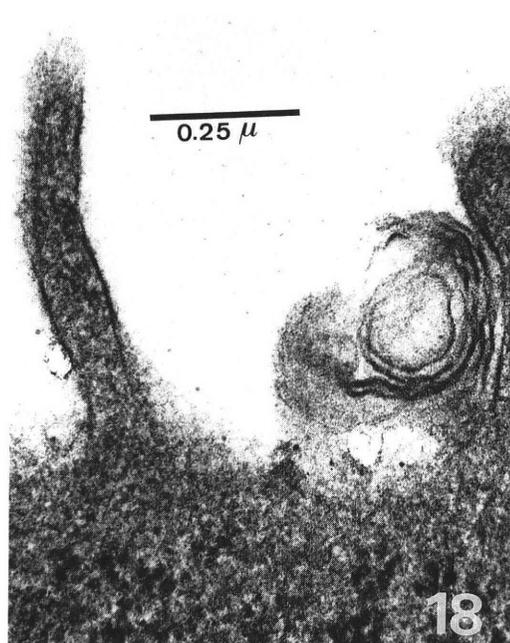


写真18 myelin 像を呈していた lysosome 顆粒が exocytosis の形で放出されている。
TEM ×80,000

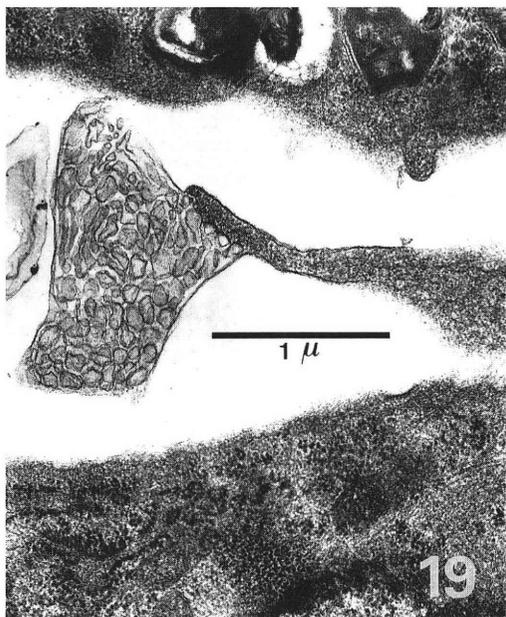


写真19 写真19~写真22はmicroapocrine分泌に関するものである。微絨毛の先端部分が膨出して polyp 状になっている。ここで分泌される顆粒はきわめて特徴的な形態をもっている。TEM ×25,000

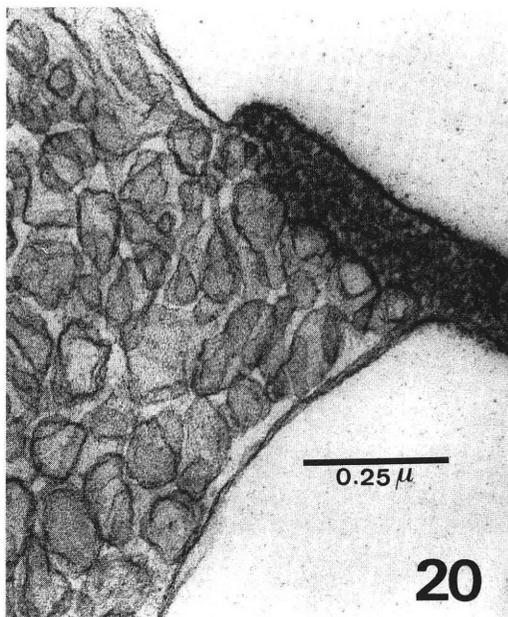


写真20 写真19の微絨毛先端部分のみをさらに拡大したものである。TEM ×80,000



写真21 外膜に包まれた中に小胞を有する顆粒が微絨毛を通して microapocrine 分泌されている(↑)。TEM ×15,000

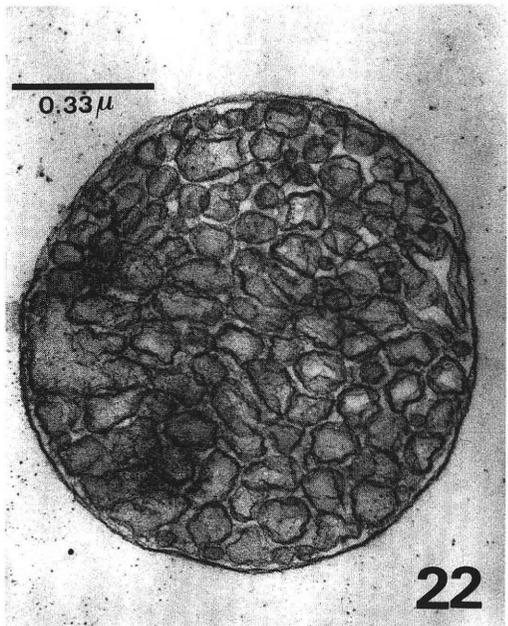


写真22 同様の分泌顆粒が microapocrine 分泌によって完全に細胞間隙に放出されたものである。TEM ×60,000

て上皮様に変化しつつあると考える方が妥当だと思われる。fibroblast-like cells はその細胞質中の長く大きな桿状 mitochondria が数多く認められ、また粗面小胞体、遊離の ribosome がきわめて豊富である。lysosome 顆粒も特徴的に認められ、細胞間隙にはほところどころに分泌されたと思われる顆粒が見られる。また細胞間の接着結合装置としては desmosome が存在している。写真 11 は細胞質内をさらに拡大したものであるが、さまざまな形態の lysosome 顆粒が存在しており、myelin 像を呈する残余小体も見られる。粗面小胞体が数多く見られ活発な蛋白質合成をうかがわせると共に、ところどころに Golgi 装置が存在している。また長桿状の mitochondria が明確な crista を形成している。写真 12 は lysosome 顆粒、脂肪様顆粒と Golgi 装置とを示したものである。このように胞体内に脂肪様顆粒も数多く見られた。また遊離 ribosome も数多く認められる。写真 13 は、形態学的には lysosome と見られる顆粒が限界膜と細胞膜とが融合した形でその顆粒の内容のみが細胞外に放出されている像である。いわゆる開口分泌(exocytosis)と考えられるが、分泌されている顆粒は明らかに先程示した細胞質内の lysosome 顆粒と思われる。写真 14 はやはり exocytosis の分泌形式で出されている顆粒であるが、細胞内から細胞間隙に放出された直後のものである。細胞の方には細胞膜と限界膜とが融合した厚い膜が残存している(↑↑)。写真 15 は、形態学的には lysosome と考えられる顆粒が細胞外に分泌されて細胞間隙に存在している状態である。またここでは細胞間接合の desmosome や、細胞質内の Golgi 装置が見られる。写真 16 はやや形態の異なる顆粒が exocytosis の形式で細胞外に放出されている像である。分泌顆粒は膜につつまれており、その中にさらに膜に包まれた小胞を有している。また細胞質内には Golgi vesicle と考えられるものが数個存在している(↑)。このような形の分泌顆粒は、今までの細胞質内に存在していた顆粒とやや異なるものである。写真 17 は細胞内に存在していた lysosome 顆粒の残余小体が胞体外に exocytosis の形で放出されている。やはり細胞側には細胞膜と限界膜が融合したと思われる厚い膜が見られる。写真 18 は細胞内に存在していた lysosome 顆粒の残余小体の中で、myelin 像を呈していたものがやはり exocytosis の形で放出されている。写真 19 は細胞の微絨毛の先端部分を捉えたものであるが、この部分が膨出して polyp 状になったものと考えられる。これは走査電顕の微絨毛で polyp 状に膨出したものと一致するものと思われる。おそらくこれがちぎれて分泌されるものと

考えられるが、この分泌形態は apocrine 分泌の中の microapocrine 分泌である。ここで分泌される顆粒はきわめて特徴的な形態をもっており、外膜に囲まれた中にさらに膜に囲まれた小胞を多数有する。写真 20 は写真 19 の微絨毛先端部分のみをさらに拡大したものである。これによると微絨毛の先端の部分は分泌のため少しその構造がくずれかけており、微絨毛膜外葉から分泌顆粒の外膜は一つの連続した膜となっている。また外膜に包まれた小胞は大小さまざまで、電子密度のやや高い部分を有するものがある。しかし全体的にみれば均一無構造の小胞が大部分である。写真 21 は同様に外膜に包まれた中に小胞を有する顆粒が微絨毛を通して分泌されているものである。微絨毛は屈曲しにくれかかっているが、やはり microapocrine 分泌形態と考えられる。写真 22 は同様の分泌顆粒が完全に細胞間隙に放出された部分を捉えたものである。分泌顆粒はほぼ球形をしており、内部に大小さまざまな小胞を有している。いづれにしろきわめて特徴的な分泌顆粒であり、分泌形態である。

4) acid phosphatase 活性所見 (写真 23・写真 24)

写真 23・写真 24 に ACP 染色キットによる TTK-2 cell line の acid phosphatase 活性部位の局在を示した。これによると TTK-2 cell line のうち fibroblast-like cells およびやや胞体の広がった epithelial-like cells も共にその細胞質内に顆粒状に acid phosphatase 活性強陽性所見を認めた。すなわち電顕で見られた細胞の胞体内の顆粒はその大部分が acid phosphatase 活性陽性であり、機能的には lysosome と判断すべき正確を有している。

考 察

以上 TTK-2 cell line の分泌現象を中心に形態学的観察を行ってきたが、まずその由来について考察を加えてみる。すなわち前述したように筆者らは正常脱落膜組織(basal decidua)より初代培養を行ない継代培養を続けている TTK-1 cell lines,^{1,2)} TTK-2 cell line⁶⁾の細胞系を有している。前者は長期継代培養の過程で epithelial-like cells が dominant となった TTK-1 (E) cell line と fibroblast-like cells が dominant となった TTK-1 (F) cell line とに分かれ、それぞれ培養後 1～3 年で transformation をきたし悪性化した²⁾。後者は培養後 7 ヶ月、継代 9 代において transformation をきたし悪性化した⁶⁾。その transformation の形式は in vitro spontaneous neoplastic transformation と考えられ、現在まで旺盛な増殖能を呈している。TTK-1 cell lines に関し



写真 23 TTK-2 cell line の細胞で fibroblast-like cells も epithelial-like cells も共に細胞質内で顆粒状に acid phosphatase 活性強陽性所見を認めた。Carrazi's hematoxylin stain $\times 400$



写真 24 同様の強拡大写真, Carrazi's hematoxylin stain $\times 1,000$

ては脱落膜組織の上皮成分と間質成分がそれぞれ TTK-1 (E), TTK-1 (F) cell line となったのか,あるいは一度脱落膜細胞のみとなったものが TTK-1 (E), TTK-1 (F) cell line に分化していったのか不明であり現在検討中である。TTK-2 cell line については transformation 後の形態は上皮様であり, 今回の研究で示した fibroblast-like cells あるいはその胞体が広がった epithelial-like cells はいわゆる脱落膜細胞由来の cell line であり, これが transformation によって上皮様に分化したと考えられる。元来脱落膜細胞は子宮内膜間質細胞の変化したものと考えられており, 子宮における間質細胞と上皮細胞が同一の中胚葉組織に由来している事から脱落膜細胞自体上皮の性格を有し分化した細胞であり, これがさらに上皮細胞へ分化していく事に不思議はないと思われる。従って今回筆者らが観察した transformation をきたす前の継代 5 代目の TTK-2 cell line は上皮細胞への分化能を有する脱落膜細胞由来の cell line であり, その細胞は強く脱落膜組織, 特に脱落膜細胞化した stromal component の性格を有するものと考えられ

る。子宮内膜組織, 脱落膜組織の超微形態学的研究の中で特徴的な分泌機能に触れている論文がある^{7,8,9)}。これらの大部分は初期の脱落膜組織, 特に妊娠 10 週前後の脱落膜細胞の機能形態に触れ, その細胞質中での Golgi vesicle の産生と vesicle の細胞周縁部への移動, さらに vesicle 集団の reticular lamina を破っての細胞質突起から細胞外への分泌放出を提唱している⁹⁾。しかもこれらの顆粒は細胞内外において acid phosphatase 活性陽性としている。つまりこれらの分泌顆粒は lysosome 顆粒であるとの可能性を示唆しているものであるが, 今回の筆者らの TTK-2 cell line においても同様の事が言える。形態学的に明らかのように TTK-2 cell line はその胞体内にきわめて多量の lysosome 顆粒を有しており, その大部分を exocytosis の形で細胞外に分泌放出していた。顆粒の形態は高電子密度のもの, その密度や内部構造がさまざまに変化したもの, vesicle 様のものなどであったが, 基本的にこれらは in vivo 脱落膜細胞の有する顆粒と同様のものであり分泌形態も同様と考えられる。ただ筆者らの採取した組織は基底脱落膜であ

る事、さらに長期培養中は hormone の影響は皆無である事を考慮に入れておかねばならない。一般に lysosome 顆粒、脂肪様顆粒は細胞の退行変化を示す organelle の一つと考えられているが、脱落膜細胞に関してはやや特殊なものと考えざるを得ない。TTK-2 cell line はこの頃きわめて旺盛な増殖能を有していた時期であり、この3ヶ月後には transformation をきたして現在まで活発に増殖しつつけており、これらの分泌顆粒および分泌形態も意義のある事と推測される。甲状腺の上皮細胞では lysosome が甲状腺 hormone 産生機構に密接に関与していたり、下垂体前葉の乳腺刺激 hormone 産生細胞では lysosome が hormone 分泌量の調節機構に関係しているという考えがある¹⁰⁾。これらは lysosome と hormone 産生分泌の関係がきわめて密接な事を示す例であり、脱落膜細胞においても lysosome と顆粒分泌に関しての有意性を予測させる。すなわち lysosome と脱落膜組織、特に脱落膜細胞は今までの lysosome の概念とは違った深い関わりがあると思われる。またこれとは別に microapocrine 分泌形態による顆粒は lysosome 顆粒とは異なった形態を有しており、脱落膜細胞の分泌能に関して今後の検討が望まれる。しかしづれにせよこれらの分泌物質の同定はきわめて大切な事で、脱落膜細胞の機能解明に役立つものと思われる。現在脱落膜から産生分泌されると考えられる物質には、prolactin (PRL と略す) や強力な免疫抑制物質その他 fibrillar material などがあげられる。PRL に関しては短時間の incubation などでのその産生分泌を証明した論文¹¹⁾もあるが酵素抗体法による電顕的観察では分泌顆粒ではなく粗面小胞体の表面¹²⁾や核膜周囲¹³⁾にその局在を証明しているものがある。つまり脱落膜細胞では下垂体細胞と異なり PRL 分泌顆粒を有さない事の証明であるが、長期継代培養された脱落膜由来 cell line の細胞質中に存在する lysosome 顆粒の中に PRL の局在を示すものが有るか否かの調査は必要な事と思われる。筆者らの TTK-2 cell line の今回の研究に使用した時期の培養液中には微量ではあるが RIA-2 抗体法によって PRL の存在は証明されており、今後の検討が望まれる。また免疫抑制物質に関しては現在その同定が盛んになされており¹⁴⁾、近い将来に脱落膜細胞の分泌する lysosome 顆粒との関係も明らかになるものと思われる。fibrillar material¹⁵⁾については、母体血からの反応産物との報告¹⁶⁾もあり確定的な事は分かっていない。以上 TTK-2 cell line を通して脱落膜細胞の分泌に関する考察を加えてきたが、これらの分泌能も要約すると細胞分化の一過程と考えられる。すなわち子宮内

間質細胞は脱落膜細胞への分化を行ない、さらに脱落膜細胞は上皮細胞への分化能を有している。これらの分化は hormone その他によって容易に惹起されるものであり、その分化の過程で collagen その他の放出や分泌顆粒の放出が行なわれるが、脱落膜腺上皮成分にみられるように分化し得た状態では分泌能のみを有し、退行変化していくものと思われる。筆者らの行なっている子宮内膜細胞培養¹⁷⁾や家兎胚の in vitro 着床実験^{18,19)}においてもこのような細胞分化がきわめて重要な役割を担っている。たとえば家兎においては、交配後6.5日を経た子宮内膜細胞(妊娠性の変化をきたした間質成分)には collagen 産生能力はないが、非妊家兎子宮内間質細胞は collagen を盛んに放出して胞胚に向かって盛り上がり¹⁸⁾、盛り上がった表面を被っている細胞は上皮細胞への分化形態を示し、時間の経過と共に autolysis をおこしてくる¹⁹⁾。すなわち collagen を放出して細胞分化をきたしている状態が推測される。このような細胞分化の問題は単に脱落膜細胞のみの問題ではなく、広く間質成分から上皮成分への変化移行性(分化)の問題(ある条件下ではこの逆の変化もあるのかもしれない)に深く関わってくるものであり、脱落膜細胞はその中間段階にある細胞と言えるのかもしれない。

(本論文の一部は第37回日本産科婦人科学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 立山一郎, 紙谷尚之, 富永敏朗, 木下幹久, 村松 拓巳, 川口周利, 森 崇英: normal human early decidua より得られた cell lines の形態学的考察, 第36回日産婦学会講演要旨, 299, 1984.
- 2) 立山一郎, 富永敏朗, 紙谷尚之, 森 崇英: 正常人脱落膜より得られた細胞系 (TTK-1 cell lines) のヌードマウスへの移植実験, 日産婦誌, 36(11): 2115, 1984.
- 3) Trent, J. M., Davis, J. R. and Payne, C. M.: The establishment and morphologic characterization of finite cell lines from normal human endometrium, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 136 (3): 352, 1980.
- 4) Kirk, D. and Irwin, J. C.: Normal Human Endometrium in Cell Culture, *Methods in Cell Biology*, Vol. 21B: P51, Academic Press, 1980.
- 5) Centola, G. M., Cisar, M. and Knab, D. R.: Establishment and morphologic characterization of normal human endometrium in vitro, *In Vitro*, 20 (6): 451, 1984.
- 6) 紙谷尚之, 立山一郎, 堂庭信男, 金嶋光夫, 富永敏朗: 正常人脱落膜より得られた cell line の形態

- 学的考察〔II〕, 第37回日産婦学会講演要旨, 352, 1985
- 7) Wynn, R. M.: Ultrastructural development of the human decidua. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 118 (5): 652, 1974.
 - 8) 奥平吉雄, 本郷二郎, 小林弥仁, 三宅 侃, 広田義和, 早川謙一, 西浦治彦, 大鶴栄史, 松井義明, 沢田益臣, 井口正男: 妊娠子宮内膜, 特に脱落膜細胞の機能形態に関する電子顕微鏡的研究, *日産婦誌*, 31 (1): 73, 1979.
 - 9) 吉田吉信: ヒト子宮内膜間質細胞の妊娠性変化, *細胞*, 14 (11): 427, 1982.
 - 10) 小川和朗: *細胞*: 64, 朝倉書店, 1981.
 - 11) Ziegler, D. and Gurdip, E.: Production of prolactin by cultures of cells from human decidua, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55 (3): 511, 1982.
 - 12) 水口弘司: 胎児におけるプロラクチン分泌の動態とその生理的意義, *日産婦誌*, 32 (9): 1257, 1980.
 - 13) Fujimori, K., Matsuda, M., Imai, Y. and Hiroi, M.: The ultrastructural study of human endometrial stromal cells and decidual cells, *J. Clin. Electron Microscopy*, 17: 133, 1984.
 - 14) 森 庸厚: 胎盤形成における免疫制御機構, *細胞*, 19 (2): 62, 1987.
 - 15) Azab, I., Okamura, H. and Beer, A.: Decidual cell production of human placental fibrinoid, *Obstet. Gynecol.*, 40: 186, 1972.
 - 16) Hata, T., Ookawa, K., Aihara, K. and Yajima, G.: An electron histochemical investigation on the mucopolysaccharide in the syncytium-decidual junctional zone, *J. Clin. Electron Microscopy*, 9: 597, 1976.
 - 17) 立山一郎, 富永敏朗, 紙谷尚之: 正常ヒト子宮内膜細胞培養の問題点, *組織培養*, 10 (10): 385, 1984.
 - 18) 立山一郎, 富永敏朗, 紙谷尚之, 金嶋光夫, 麻生武志, 田中輝男: 家兎胎胚の *in vitro* 着床実験 (Part 1), *受精・着床* 84: 124, 学会出版センター, 1985.
 - 19) 立山一郎, 富永敏朗, 紙谷尚之, 堂庭信男, 金嶋光夫, 後藤健次, 小辻文和, 麻生武志, 田中輝男: 家兎胎胚の *in vitro* 着床実験 (続報), *受精・着床* 85: 43, 学会出版センター, 1986.

**Morphological studies on
secretory function of the
TTK-2 cell line derived
from normal human
early decidual tissue.**

Ichiro Tateyama and Takahide Mori

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

Tosiro Tominaga and Naoyuki Kamitani

Department of Obstetrics
and Gynecology,
Fukui Medical School

Morphological investigations of the TTK-2 cell line derived from normal human early decidual tissue were carried out. This cell line has been maintained in culture through about forty subcultures over 4 years up to February 1988 and always has proliferated actively. *In vitro* spontaneous neoplastic transformation occurred in this cell line after it was maintained in culture through nine subcultures over 7 months and changed into a malignant epithelial cell line. This cell line was maintained in culture through five subcultures over 4 months and studied by phase-contrast microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and acid phosphatase assays. The cells of the TTK-2 cell line were shown to be composed of many fibroblast-like cells coexisting with some epithelial-like cells with abundant cytoplasm. Both had numerous lysosomal granules, abundant rough endoplasmic reticula, Golgi complexes, mitochondria and lipid-like granules. Moreover variously shaped lysosomal granules were secreted by exocytosis from the cytoplasm and unique granules were secreted by microapocrine secretion from microvilli into the intercellular spaces.

From the morphological point of view, the TTK-2 cell line was thought to be derived from decidual cells, and we demonstrated the secretory function of the TTK-2 cell line clearly. It seems that uterine endometrial stromal cells differentiate into decidual cells, and decidual cells have the ability to differentiate into epithelial cells. The secretory phenomena are thought to be one process involved in the differentiation of the cells. According to these findings, decidual cells may be the intermediate cells between stromal cells and epithelial cells.

(受付: 昭和63年2月27日特掲)

PROLACTIN RESPONSE TO GONADOTROPIN- RELEASING HORMONE IN ANOVULATORY WOMEN

Katsuyoshi SEKI and Koichi KATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
National Defense Medical College

Abstract: We evaluated the relationship among prolactin (PRL), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) release in response to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in normoprolactinemic, anovulatory women (anovulatory cycle, oligomenorrhea, normoestrogenic amenorrhea, hypogonadotropic hypoestrogenic amenorrhea and hypergonadotropic hypoestrogenic amenorrhea) and in normal women. A significant rise of serum PRL after GnRH was observed only in women with hypergonadotropic hypoestrogenic amenorrhea. However, in all groups some subjects were PRL responders while some subjects were PRL nonresponders. The percentage of PRL responders varied significantly among the 6 groups of subjects. It was significantly correlated to the FSH response to GnRH, but not to the LH response. The positive correlation between the PRL and FSH responses to GnRH is consistent with a paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 524-527, 1988)

Introduction

Exogenous gonadotropin-releasing hormone (GnRH) can stimulate prolactin (PRL) release in humans¹⁻³. The mechanism (s) by which GnRH induces PRL release has not been established. However, a significant correlation between PRL release and gonadotrophs responsiveness to GnRH was found in normal women during the various phases of the menstrual cycle, and in hypogonadal women^{3,4}. These findings suggest that a paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs demonstrated in the rat⁵ is operative in humans. A significant PRL response to GnRH was also observed in some normoprolactinemic, anovulatory women⁶. However, the mean follicle stimulating hormone (FSH) or luteinizing hormone (LH) after GnRH was reported to be similar in anovulatory women who showed a PRL response to GnRH and those who failed to do so⁶. Thus, it is not certain whether

there exists any relationship between PRL release and gonadotrophs responsiveness to GnRH in anovulatory women as a whole. In the present study, we evaluated the relationship among PRL, LH and FSH release in response to GnRH in women with anovulatory cycle, oligomenorrhea and amenorrhea.

Materials and Methods

The subjects of this study were 62 normoprolactinemic, anovulatory women. Out of the 62 patients, 9 had anovulatory cycle, 13 oligomenorrhea, and 40 secondary amenorrhea. Eleven normal women, studied during the early follicular phase of their ovulatory cycles, served as control subjects. None of the subjects was taking any medication at the time of studies. Starting at 1000-1100 h, each subject received 100 μ g GnRH as an iv bolus dose after two baseline samples had been obtained; additional blood samples were obtained 30, 60 and, 120 min after GnRH administration.

All amenorrhic patients then received an intramuscular injection of 25 mg progesterone. Uterine bleeding occurred in 12 amenorrhic patients (normoestrogenic amenorrhea), but not in other 28 amenorrhic patients (hypoestrogenic amenorrhea). Out of the 28 patients with hypoestrogenic amenorrhea, 13 patients had low or normal serum FSH levels (hypogonadotropic hypoestrogenic amenorrhea), and 15 patients had elevated serum FSH levels (hypergonadotropic hypoestrogenic amenorrhea).

Serum LH, FSH, PRL and estradiol (E₂) were determined by radioimmunoassay as previously described⁷. Serum LH and FSH concentrations

were expressed in terms of nanograms of LER 907 per ml. The intra- and interassay coefficients (CV) of variation were less than 10% in each assay. All samples from an individual subject were analyzed at the same time. Mean basal concentrations were obtained by averaging the two baseline samples collected before the administration of GnRH. Statistical analyses were performed using analysis of variance, Student's t test, X² test and linear regression. For each individual subject, the definition of a significant PRL response to GnRH took intraassay CV into consideration. An increase over the basal value of at least 33% (five times the intraassay CV, 6.5%, for PRL) at 30 min following

Table 1 Basal hormone levels (mean ± SE) in normal women and normoprolactinemic, anovulatory women.

	Normal women (n = 11)	Anovulatory cycle (n = 9)	Oligomenorrhea (n = 13)	Normoestrogenic amenorrhea (n = 12)	Hypogonadotropic hypoestrogenic amenorrhea (n = 13)	Hypergonadotropic hypoestrogenic amenorrhea (n = 15)
PRL (ng/ml)	11.9±1.6	12.6±1.4	10.7±1.1	9.3±0.9	8.6±1.2	8.8±1.1
LH (ng/ml)	87.3±10.2	141.1±28.2	153.0±26.0*	142.4±22.5*	82.2±11.3	586.4±115.7**
FSH (ng/ml)	362.0±27.8	251.7±38.0*	260.0±33.9*	296.1±29.2	224.8±33.9**	3392.9±491.4***
E2 (pg/ml)	43.6±4.9	57.2±5.3	45.1±5.2	51.7±6.4	26.9±3.1**	20.0±1.7***

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs normal women.

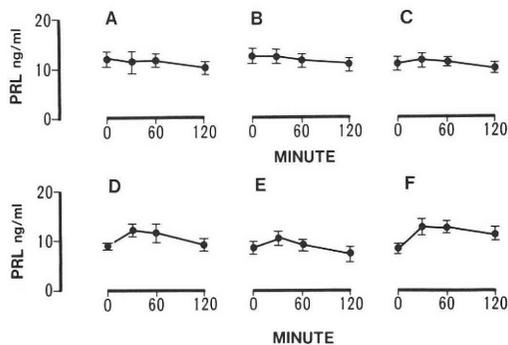


Fig. 1. Mean ± SE basal serum PRL and its response to an iv bolus dose of 100 µg GnRH in normal women (A, n = 11) and in women with anovulatory cycle (B, n = 9), oligomenorrhea (C, n = 13), normoestrogenic amenorrhea (D, n = 12), hypogonadotropic hypoestrogenic amenorrhea (E, n = 13) and hypergonadotropic hypoestrogenic amenorrhea (F, n = 15).

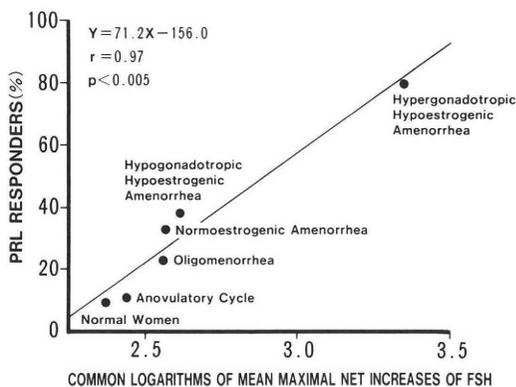


Fig. 2. Linear regression between the percentage of PRL responders and common logarithms of the mean maximal net increases of FSH.

GnRH, was used to distinguish secretory responses from random fluctuations.

Results

Basal PRL levels in anovulatory women were similar to those in normal women (Table 1). Basal LH levels were significantly higher in women with oligomenorrhea, normoestrogenic amenorrhea and hypergonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea compared to normal women (Table 1). Basal FSH levels were significantly lower in women with anovulatory cycle, oligomenorrhea, and hypogonadotropic amenorrhea, and were significantly higher in women with hypergonadotropic amenorrhea compared to normal women (Table 1). Basal E_2 levels were significantly lower in women with hypogonadotropic and hypergonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea than in normal women (Table 1). A significant rise of serum PRL after GnRH was observed only in women with hypergonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea (Fig. 1). However, in all groups some subjects were PRL responders while some subjects were PRL nonresponders. The percentage of PRL responders varied significantly ($p < 0.01$) among the 6 groups of subjects. There was 1 (9.1%) PRL responders out of 11 normal women, and 1 (11.1%) out of 9 women with anovulatory cycle. There were 3 (23.1%) PRL responders out of 13 women with oligomenorrhea, 4 (33.3%) out of 12 women with normoestrogenic amenorrhea, 5 (38.5%) out of 13 women hypogonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea, and 12 (80.0%) out of 15 hypergonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea. The PRL net increase observed in each PRL responder was not significantly different among the 4 groups of anovulatory women (oligomenorrhea, normoestrogenic amenorrhea, hypogonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea and hypergonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea), in which there were more than 2 PRL responders. The mean basal levels of E_2 , PRL, LH and FSH, and the mean net increases of FSH and LH after GnRH were similar in PRL responders and PRL nonresponders in these 4 groups. However, the percentage of PRL responders in the 6 groups of subjects was significantly correlated to the mean

maximal net increases of FSH ($r = 0.93$, $n = 6$, $p < 0.01$) or their common logarithms ($r = 0.97$, $n = 6$, $p < 0.005$) (Fig. 2), though it was not correlated to the mean maximal net increases of LH ($r = 0.78$, $n = 6$, NS) or their common logarithms ($r = 0.62$, $n = 6$, NS). It was not correlated to the mean basal E_2 levels ($r = 0.81$, $n = 6$, NS).

Discussion

In agreement with the results of other reported studies^{4,8}, a significant PRL response to GnRH was observed in women with hypergonadotropic hypoenestrogenic amenorrhea. Although the mean PRL response, as computed in the whole group of women, was not significant in other groups of women, in all groups some subjects showed a PRL response while others failed to do so. When only PRL responders were considered, no significant modifications of the amplitude of PRL response to GnRH could be detected among the different groups of anovulatory women. Furthermore, net increases of FSH and LH after GnRH were not significantly different between PRL responders and PRL nonresponders. This is in agreement with the results of Gianpietro et al⁹, who found no significant difference in FSH and LH after GnRH in PRL responders and PRL nonresponders in normoprolactinemic, anovulatory women. However, the percentage of PRL responders varied among the 6 groups of subjects. It was significantly related to the FSH response to GnRH. The positive correlation between the PRL and FSH responses to GnRH is consistent with a paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs demonstrated *in vitro* in the rat⁵. Furthermore, in response to GnRH, the gonadotrophs that mediate GnRH-stimulated PRL release secreted remarkably high amounts of FSH compared to LH⁹. In conclusion, a paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs seems to be operative in anovulatory women as a whole.

References

- 1) Yen, S. S. C., Hoff, J. D., Lasley, B. L., Casper, R. F. and Sheehan, K.: Induction of prolactin release by LRF and LRF-agonist. *Life Sci.*, 26:

- 1963, 1980.
- 2) Zhang, Y.-W. and Yen, S. S. C.: Prolactin-releasing action of LRF: a central catecholamine mediated event? *Life Sci.*, 34: 653, 1984.
 - 3) Mais, V., Melis, G. B., Paelotti, A. M., Strigini, F., Atinori, D. and Fioretti, P.: Prolactin-releasing action of a low dose of exogenous gonadotropin-releasing hormone throughout the human menstrual cycle. *Neuroendocrinology*, 44: 326, 1986.
 - 4) Mais, V. and Yen, S. S. C.: Prolactin-releasing action of gonadotropin-releasing hormone in hypogonadal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 1089, 1986.
 - 5) Deneff, C. and Andries, M.: Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology*, 112: 813, 1983.
 - 6) Giampietro, O., Moggi, G., Chisci, R., Coluccia, A., Dalle Luche, A., Simonini, N. and Brunori, I.: Unusual prolactin response to luteinizing hormone-releasing hormone in some anovulatory women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49: 141, 1979.
 - 7) Seki, K., Uesato, T. and Kato, K.: Effects of a dopamine antagonist (metoclopramide) on the release of the adenohypophyseal hormones in amenorrhoeic patients with and without hyperprolactinaemia. *Acta Endocrinol.*, 101: 166, 1982.
 - 8) Georgitis, W. J., Treece, G. L. and Hofeldt, F. D.: Gonadotrophin releasing hormone provokes prolactin release in hypergonadotrophic hypogonadal women: a response not altered by dexamethasone. *Clin. Endocrinol.*, 19: 319, 1983.

- 9) Deneff, C., Hautekette, E. and Rubin, L.: A specific population of gonadotrophs purified from immature female rat pituitary. *Science*, 194: 848, 1976.

**無排卵患者における
prolactin の gonadotropin-
releasing hormone
に対する反応**

防衛医科大学校産科婦人科

関 克義 加藤宏一

正 prolactin (PRL) 血症無排卵患者 (無排卵周期症, 希発月経, 正エストロゲン性無月経, 低 gonadotropin 低エストロゲン性無月経, 高 gonadotropin 低エストロゲン性無月経) および正常婦人において, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) に対する PRL, luteinizing hormone (LH) および follicle stimulating hormone (FSH) の反応間の関連性について検討した。GnRH 投与後有意の血中 PRL の増加は高 gonadotropin 低エストロゲン性無月経群においてのみ認められた。しかしすべての群において, GnRH 投与後 PRL が増加する症例 (PRL responder) と増加しない症例が認められた。各群間で, PRL responder の割合は有意に変化した。PRL responder の割合 (%) は GnRH に対する FSH の反応と相関したが, LH の反応とは相関しなかった。GnRH に対する PRL と FSH の反応の相関は gonadotropin 細胞と PRL 細胞の paracrine interaction と矛盾しない。

(受付: 昭和62年8月11日)

Prolactin 分泌機構に及ぼす LHRH の影響に関する検討

The Effect of LHRH on the Prolactin Releasing Mechanism of Women in Non-pregnancy and Early Pregnancy

東京医科歯科大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 斎藤 幹 教授)

久保田俊郎	鎌田周作	都築浩雄
Toshiro KUBOTA	Shusaku KAMADA	Hiroo TSUZUKI
光山 聡	西 望	斎藤 幹
Akira KOHYAMA	Nozomu NISHI	Motoi SAITO

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

視床下部・下垂体系の prolactin (PRL) と gonadotropin (Gn) 分泌機構の間の機能的相関を、LHRH を用いて探究した。LHRH 100 μ g 静注後、血清 Gn だけでなく血清 PRL も上昇する症例が各時期で存在した前値の 50% 以上の PRL 増加率を示す症例 (PRL 良好反応例) は正常周期黄体期婦人 23 例中 8 例 (34%)、卵胞期婦人 17 例中 3 例 (18%)、視床下部性無排卵症 15 例中 3 例 (20%)、去勢後婦人 10 例中 3 例 (30%)、妊娠初期婦人 7 例中 0 例、対照群 (生食 2 ml 静注) 7 例中 0 例であった。黄体期 PRL 良好反応群では、LHRH 投与後 30 分の血清 PRL 値 (30.5 \pm 5.1ng/ml) は前値 (17.3 \pm 2.7ng/ml) に比し有意 ($P < 0.05$) な高値を示したが、黄体期 PRL 不良反応群では PRL の有意な上昇はみられなかった。また、黄体期 PRL 良好反応群の血清 P 基礎値は黄体期 PRL 不良反応群の同値に比し有意 ($P < 0.05$) に低かった。LHRH 静注後の PRL 分泌と Gn 分泌の間の機能的な相関は各時期でその出現頻度が異なり、卵巣性ステロイドホルモン環境がこの相関の発現因子の 1 つである可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 528-534, 1988)

緒 言

視床下部領域の dopamine neuron と LHRH neuron の走向が解剖学的に近接している¹⁾ことや、PRL 分泌に影響を与えるカテコールアミンや neuropeptide は gonadotropin (Gn) 分泌にも関与する²⁾ことなどより、prolactin (PRL) 分泌と Gn 分泌における機能的な相関が注目されている。PRL 分泌を制御する視床下部の dopamine system が Gn や LHRH 分泌にも影響を及ぼすことは既に知られ²⁾、dopamine 作動性薬剤が、視床下部の LHRH neuron

に直接作用したり LHRH に対する Gn の反応性を弱めることが推測されている³⁾。一方、LHRH の静脈内投与が正常男子⁴⁾や続発性無月経婦人⁵⁾、正常周期黄体期婦人⁶⁾などにおいて血清 PRL を上昇させるとの報告がみられ、最近では下垂体の培養実験においても、LHRH 添加による PRL 分泌の促進が証明されている⁷⁾。しかしこの PRL の上昇は、LHRH 投与後の Gn の如く正常下垂体機能を有する全ての症例にみられるとは限らず、各時期の個々の症例により様々で、この発現機序はいまだ解明されていない。本研究では、いかなる時期のいかなる環境下で LHRH

Table. 1 Serum prolactin and gonadotropin levels after the intravenous injection of LHRH in the women of luteal phase, follicular phase, hypothalamic amenorrhea, castration and early pregnancy.

Luteal Phase (N = 23)				Hypothalamic Amenorrhea (N = 15)			
Time (min)	PRL (ng/ml)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	Time (min)	PRL (ng/ml)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)
0	18.2±1.3	15.8±2.2	5.6±0.6	0	16.7±2.3	28.0±4.4	10.1±1.1
30	23.5±2.3	113.3±13.6	12.5±1.3	30	18.3±1.9	227.4±40.8	26.5±2.2
60	18.9±1.9	100.7±12.2	14.0±1.4	60	16.7±1.9	193.3±37.6	29.9±2.7
90	14.6±1.1	85.2±10.6	12.5±1.2	90	16.2±1.8	174.1±40.4	28.0±2.7
Follicular Phase (N = 17)				Castration (N = 10)			
Time	PRL	LH	FSH	Time	PRL	LH	FSH
0	15.0±1.3	19.9±2.6	8.5±0.8	0	22.4±3.6	103.0±10.8	86.4±10.0
30	16.7±1.5	109.8±17.5	19.5±1.9	30	28.7±5.7	283.1±44.7	125.8±14.5
60	13.8±0.9	99.2±18.3	20.8±2.4	60	26.2±4.1	308.1±49.4	146.2±19.7
90	12.1±0.6	92.8±23.5	18.5±2.1	90	22.2±3.2	257.4±37.8	136.4±17.4
Control (N = 7)				Early Pregnancy (N = 7)			
Time	PRL	LH	FSH	Time	PRL	LH-β (ng/ml)	
0	15.3±2.0	25.6±5.8	14.3±2.3	0	36.4±3.1	1.07±0.06	
30	16.9±2.4	26.9±5.5	17.3±2.9	30	38.9±2.8	1.23±0.08	
60	17.0±2.4	30.3±6.8	16.8±3.1	60	39.7±3.2	1.21±0.05	
90	16.3±2.2	27.6±5.9	15.5±3.1	90	36.9±3.4	1.16±0.05	

Mean ± S.E.

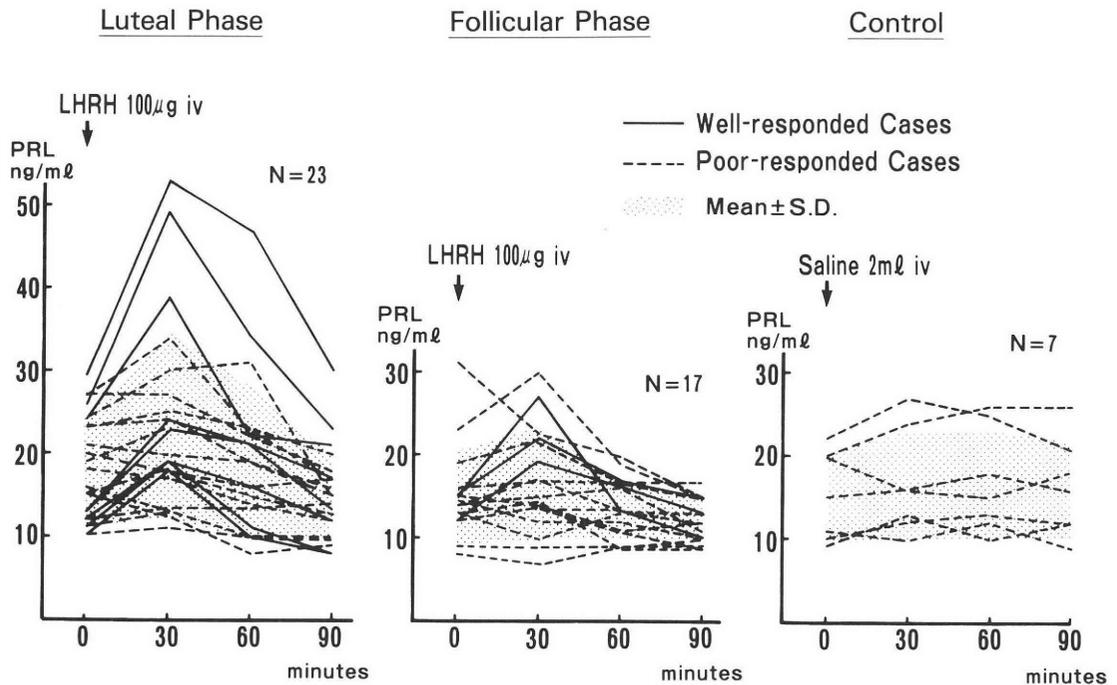


Fig. 1 Serum prolactin levels after the intravenous injection of LHRH in the women of luteal phase and follicular phase.

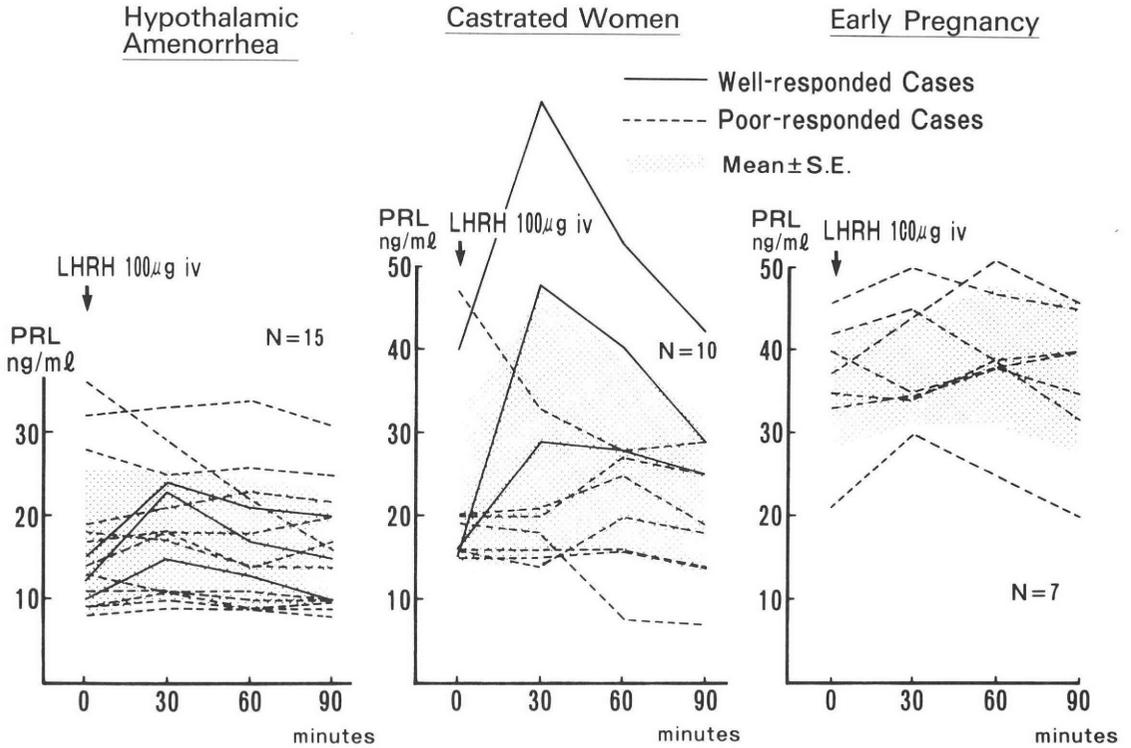


Fig. 2 Serum prolactin levels after the intravenous injection of LHRH in the women of hypothalamic amenorrhea, castration and early pregnancy.

静注後の血清PRLの反応がみられるかを詳細に検討し、この発現機序に関与する因子についても探究した。

対象および研究方法

1) 対象

正常周期卵胞期婦人17例、正常周期黄体期婦人23例、視床下部性無排卵症15例(多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)を8例含む)、48~61歳までの両側卵巣摘除後の去勢後婦人10例、妊娠5~12週までの正常妊娠初期婦人7例を対象とした。本症例は全てvolunteerであり、時に妊娠例は人工妊娠中絶を適応とする同意の得られた婦人を選んだ。以上の症例とは別に、非妊娠婦人7例を選び対照群とした。

2) 研究方法

空腹時午前9時より上記の婦人に対し、LHRH(田辺薬品)100µgを1回静注投与し、投与前および投与後30分、60分、120分に静脈血を採取した。血液は直ちに血清に分離し、各検体中のLH、FSH、PRLを測定した。また黄体期の症例については、estradiol-17β(E₂)とprogesterone(P)基礎値を測定した。妊娠

初期群ではHCGと交叉反応を示さないLH-β subunit(LH-β)を測定し、Gnの示標とした。対照群には生理的食塩水2mlを1回静注し、同様の実験を行った。PRL、LH、FSH、E₂は第一ラジオアイソトープ社製のradioimmunoassay(RIA)キットを用い、Pはミドリ十字社製のRIAキットを用いた。LH-βは米国NIHのNIAMDDより提供された標準品および抗血清を用い、既述の方法^{8,9)}に従い測定した。各測定値はmean±standard error(S.E.)にて表示し、その統計的処理はStudent-t-testにより検定した。

研究成績
1) LHRH 静注後の各期婦人における血清Gn動態(表1)

非妊娠時におけるLHRH静注後のGnの反応性は全例に良好で、卵胞期婦人と黄体期婦人ではほぼ同様の反応を示し、両群間で有意差はなかった。視床下部性無月経群(PCOS 8例を含む)では、LH基礎値(28.0±4.4mIU/ml)やLHRH静注後のLH項値(227.4±40.8mIU/ml)とも黄体期に比し有意(P<0.01)に高く、FSH項値(29.9±2.7mIU/ml)も黄体期群に比し有意(P<0.001)に高値を示した。

去勢後婦人では血清 LH, FSH 基礎値はともに対照群や黄体期群に比し有意 ($P < 0.001$) に高く, LHRH 静注後の LH 頂値 (308.1 ± 49.4 mIU/ml), FSH 頂値 (146.2 ± 19.7 mIU/ml) も有意 ($P < 0.001$) な高値を示した。これに対し妊娠初期群の LH- β は, LHRH 静注後上昇の傾向はみられるが, 前値に比し有意差はみられなかった。

2) LHRH 静注後の各期婦人における血清 PRL 動態 (表1, 図1, 2)

LHRH 静注後の血清 PRL を各期婦人で検討した。黄体期婦人では前値が 18.2 ± 1.3 ng/ml, 30 分値が 23.5 ± 2.3 ng/ml を示し, 去勢婦人では前値が 22.4 ± 3.6 ng/ml, 30 分値が 28.7 ± 5.7 ng/ml を示し, LHRH 投与後血清 PRL は上昇傾向はみられるが有意差はなかった。他の群においても血清 PRL 動態に有意な変化はみられなかった(表1)。次に, LHRH 静注後 PRL 増加値が前値の 50% を越える症例を PRL 良好反応例, PRL 増加値が前値の 50% 以下の症例を PRL 不良反応例と区分し, 個々の症例における血清 PRL 動態を検討した。黄体期婦人では 23 例中 8 例 (34%) が PRL 良好反応例で, PRL 増加値が 10 ng/ml 以上を示す例は 3 例みられた。卵胞期婦人では PRL 良好反応例は 17 例中 3 例 (18%)

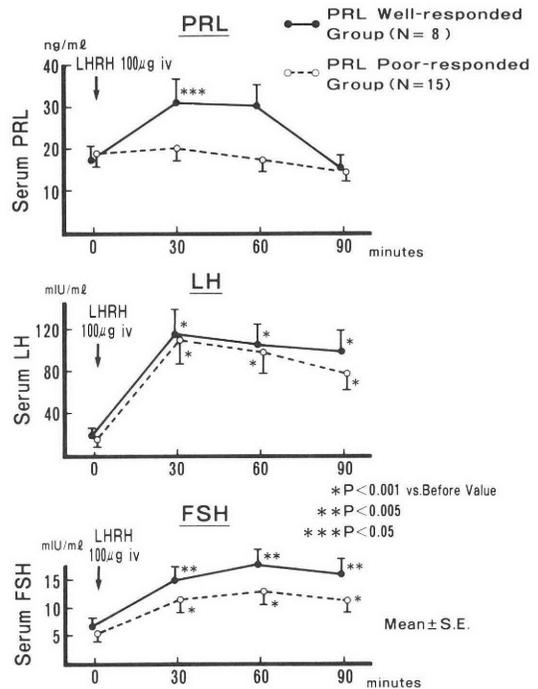


Fig. 3 Serum prolactin and gonadotropin levels after the injection of LHRH in the women of luteal phase.

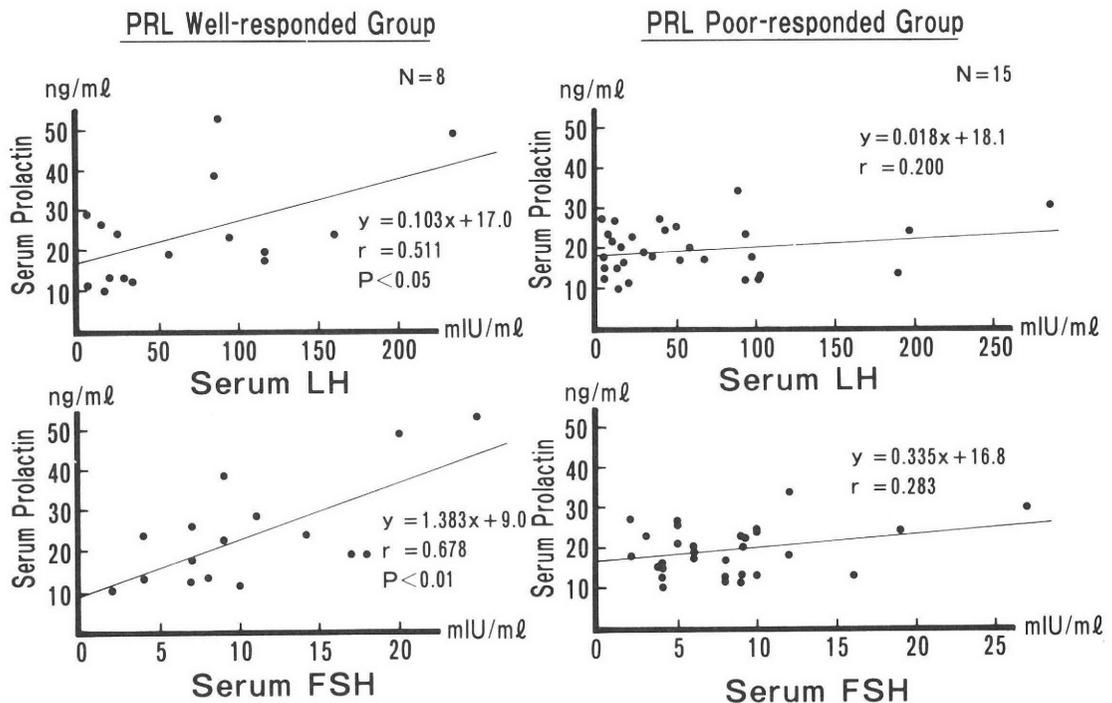


Fig. 4 The correlation between serum prolactin and gonadotropin levels before and 30 minutes after the injection of LHRH in the women of luteal phase.

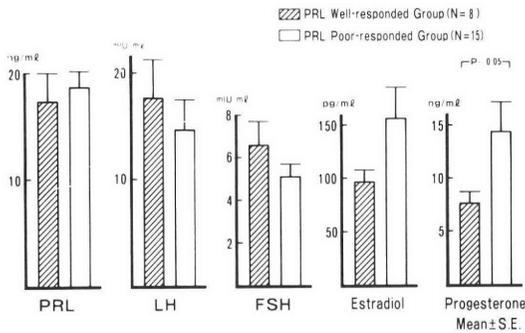


Fig. 5 Basal levels of prolactin, LH, FSH, estradiol and progesterone in the women of luteal phase.

で、黄体期に比しその出現頻度は、低かった(図1)、視床下部性無月経婦人では15例中3例(20%)で、このうちPCOS 8例中では1例(12.5%)がPRL良好反応例であった。去勢後婦人10例中PRL良好反応例は3例(30%)みられ、黄体期婦人と同様出現頻度は高い傾向を示した。この3例ともPRL増加値が10 ng/ml以上であった。妊娠初期婦人では、血清PRL基礎値(36.4±3.1ng/ml)は対照群に比し有意($P < 0.001$)に高値を示すが、PRL良好反応例の出現頻度は対照群と同様0%であった(図2)。

3) LHRH 静注後の黄体期婦人における血清ホルモン動態(図3, 4)

黄体期婦人23例を対象を絞り、PRL良好反応例8例とPRL不良反応例15例に分けて比較検討した。PRL良好反応群では、LHRH 静注後30分値(30.5±5.1ng/ml)はPRL基礎値(17.3±2.7ng/ml)に比し有意($P < 0.05$)な高値を示し、60分値(22.8±4.3ng/ml)も有意差はないものの高い傾向がみられた。これに対しPRL不良反応群では、30分値(19.8±1.8ng/ml)はPRL基礎値(18.7±1.4ng/ml)に比し有意差はみられず、PRL良好反応群に比し明らかな discrepancy がみられた。LHRH 静注後の血清Gnの反応は良好で、両群間で有意差はみられなかった(図3)。

LHRH 静注後30分以内での血清中のPRLとLH、PRLとFSHの相関について検討すると、PRL良好反応群ではPRLとLHの間では相関係数(r)は0.511で有意($P < 0.05$)な相関がみられ、PRLとFSHの間でも $r = 0.678$ で有意($P < 0.01$)な相関がみられた。これに対しPRL不良反応群では、PRLとLHの間では $r = 0.200$ 、PRLとFSHの間では $r = 0.283$ で有意な相関はみられなかった(図4)。

次に、黄体期婦人における血清 E_2 、P基礎値を検討した(図5)。血清PはPRL良好反応群で7.7±1.1ng/ml PRL不良反応群で14.4±2.8ng/mlを示し、前者が有意($P < 0.05$)な低値を示した。血清 E_2 はPRL良好反応群が97.2±12.1 pg/ml PRL不良反応群は157.1±30.8pg/mlを示し、有意差はみられないものの前者が低い傾向がみられた。

考 察

近年、GnパルスとPRLパルスがかなりの頻度で同調すること^{10,11})や、正常男子⁴⁾、無月経婦人⁵⁾や黄体期婦人⁶⁾でLHRH 静注後血清PRLが有意に上昇することなどが報告され、下垂体からのGn分泌とPRL分泌の間に深い関連性が存在することが明らかとなった。本研究において各時期の婦人にLHRHテストを施行した結果、LHRH 静注後のPRLの反応はGnの上昇ほど顕著ではなく、各群のPRL平均値では統計学的な有意差はみられなかった。しかし個々の症例を検討し、血清PRLがLHRHにより前値の50%以上上昇した症例をpick upしてみると、このPRL良好反応例は非妊娠時の各時期に出現し、その中でも黄体期婦人と去勢後婦人では30%以上の出現率を示すことが明らかとなった。

それでは、このような血清PRLの上昇作用はいかなる機序により発現するのであろうか。文献的に考察してみると、第一にはLHRHが視床下部のdopamine活性を低下させる結果、PRL分泌への抑制が減弱しPRLが放出されると推測される⁴⁾。Soupe et al.¹²⁾は、LHRH投与後PCOSで高頻度にみられる血清PRLの上昇がL-dopaの前投与により消失することを示し、この反応が視床下部・下垂体のdopamineの相対的欠乏によるものと推論している。第二には、LHRH刺激により下垂体のgonadotropesがLHを放出する際、paracrine因子を介してlactotropesからもPRLが放出されることが証明されている¹³⁾。第三には、LHRH自身が下垂体lactotropesに直接的に作用しPRLが分泌されるという可能性も考えられている⁷⁾。

このようなPRLの上昇が特定の環境でのみみられ、その出現頻度が各時期で異なるのはなぜであろうか。この疑問を解く鍵として、血中のLHパルスとPRLパルスの同調性について考えてみたい。PRLはLH同様パルス状に分泌され、PRLパルスとLHパルスは密接に関連することが知られており、PRLパルスはLHパルスと質的量的に近似した性格を有し、LHRHがPRLパルスの発生に関与する可能性が示されている^{10,11)}。これら二種類のパルスは

黄体期、卵胞期とも約70%が同時に発生し、黄体期では卵胞期に比しPRLやLHのパルスの振幅は増大しその頻度は低下すると報告されている^{10,14}。従って黄体期では1回に分泌される内因性LHRH濃度は卵胞期より高く、タイミングよく外因性のLHRHが投与されればLHパルスと同調したPRLパルスも増幅され、血清PRLの顕著な上昇が発現する可能性が高いと思われる。同じ黄体期でもPRLパルスのパターンと外因性LHRHの投与時期のタイミングがずれればPRLの顕著な上昇はみられず、また卵胞期ではPRLパルスの振幅が小さいため¹⁴ PRLの上昇の可能性は黄体期より低いと考えられる。

去勢後婦人においてもPRL良好反応例の出現頻度が高かった。去勢後はnegative feedbackにより血清Gn基礎値やLHRH濃度は高く、LHパルスと同調するPRLパルスが外因性のLHRH投与により黄体期と同様に増幅される可能性も大きいと推測される。これに対しPCOSを含む視床下部性無月経婦人では、PRL良好反応例の出現頻度は低かった。FSH-enriched gonadotropes と lactotropes の間のparacrine効果の重要性がMais et al.¹⁵により指摘されていることから、LHに比しFSHに富むgonadotropesがこれらの症例中で乏しいこともPRL上昇のみられない原因の1つと考えられた。

本研究ではさらに黄体期婦人に対象を絞り、PRL良好反応群と不良反応群におけるホルモン環境の違いについて検討した。この二群間ではLHRHに対するGnの反応に差はないがPRLの反応には有意差がみられ、LHRH静注後30分間のPRLとGnの相関についても明らかな相違がみられている。ここで注目されるのは両群間の卵巣性ステロイドホルモン環境が異なることであり、PRL良好反応群では、P基礎値はPRL不良反応群に比し有意に低くE₂基礎値も有意差はないもののPRL不良反応群よりも低い傾向がみられている。血清E₂、Pが低い去勢後婦人でもPRL良好反応例の頻度が高く、ステロイドホルモンレベルの高い妊娠初期群ではPRL良好反応例がみられない本研究成績も考慮すると、卵巣性ステロイドホルモンがnegative feedback機構を介して内因性のLHRH分泌に影響を与え、外因性LHRHに対するPRL分泌の作用発現に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。さらにヒト下垂体細胞を用いたin vitro実験で、estrogen非存在下でのみLHRHはPRL分泌を促進しestrogen存在下ではこの反応がみられない⁷ことから、paracrine効果の発現やLHRHに対するlactotropesの感受性に対し、estrogenなどのステロイドホルモン

が影響を及ぼす可能性も考えられる。

本研究では、LHRH静注後ある特定の婦人に血清PRLの上昇がみられることを明らかにし、GnとPRLのパルスパターンと同調性、内因性のLHRH濃度や卵巣性ステロイドホルモン環境の相違などが、この作用発現に影響を及ぼす1因子と推測された。この他にもopioid peptideの関与なども考えられ⁶、Gn分泌とPRL分泌の機能的相関については、視床下部・下垂体を中心とした神経内分泌領域における今後の研究成果が期待される。

本論文の内容の一部は、第73回日本産科婦人科学会関東連合地方部総会(1987, 東京)および第32回日本不妊学会総会(1987, 金沢)において発表した。

文 献

- 1) McNeill, T. H. and Sladek, J. R.: Fluorescence-immunocytochemistry: Simultaneous localization of catecholamines and gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 200: 72, 1978.
- 2) Judd, S. J., Rakoff, J. S. and Yen, S. S. C.: Inhibition of gonadotropin and prolactin release by dopamine: Effect of endogenous estradiol levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 494, 1978.
- 3) Lachelin, G. C. L., Leblanc, H. and Yen, S. S. C.: The inhibitory effect of dopamine agonist on LH release in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 728, 1977.
- 4) Van Loon, G. R.: Bromocriptine-induced inhibition of plasma dopamine, noradrenalin and adrenaline response to LH-RF. *Nature*, 275: 331, 1978.
- 5) Giampietri, O., Noggi, G., Chisci, R., Coluccia, A., Dalle Luche, A., Simonini, N. and Brunori, I.: Unusual prolactin response to luteinizing hormone-releasing hormone in some anovulatory women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49: 141, 1979.
- 6) Braund, W., Roeger, D. C. and Judd, S. J.: Synchronous secretion of luteinizing hormone and prolactin in the human luteal phase: Neuroendocrine mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56: 1313, 1983.
- 7) Blackwell, R. E., Rogers-Neame, N. T., Bradley, Jr, E. L. and Asch, R. H.: Regulation of human prolactin secretion by gonadotropin-releasing hormone in vitro. *Fertil. Steril.*, 46: 26, 1986.
- 8) 久保田俊郎, 西 望, 斎藤 幹, 鈴木 明, 矢追良正, 熊坂高広: 黄体期・妊娠初期におけるgonadotropin及びprolactin分泌機構の関連性に関する研究. *日産婦誌*, 38: 545, 1986.
- 9) 鈴木 明, 久保田俊郎, 矢追良正, 熊坂高広, 斎

藤 幹：妊娠初期血漿中の LH- β の動態. ホと臨床, 27: 639, 1979.

- 10) Bäckström, C. T., McNeilly, A. S., Leask, R. M. and Baird, D. T.: Pulsatile secretion of LH, FSH, prolactin, oestradiol and progesterone during the human menstrual cycle. Clin. Endocrinol., 17: 29, 1982.
- 11) Cetel, N. S. and Yen, S. S. C.: Concomitant pulsatile release of prolactin and luteinizing hormone in hypogonadal women. J. Clin. Endocrinol. Metab., 56: 1313, 1983.
- 12) Soupe, D. and Lobo, R. A.: Prolactin response after gonadotropin-releasing hormone in the polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril., 43: 549, 1985.
- 13) Denef, C. and Andries, M.: Evidence for paracrine interaction between gonadotrope and lactotrophs in pituitary cell aggregates. Endocrinology, 112: 813, 1983.
- 14) 正岡 薫, 北沢正文, 新部哲雄, 熊坂高広: 月経周期におけるプロラクチンのパルス状分泌とその調節因子, ホと臨床, 34: 185, 1986.
- 15) Mais, V. and Yen, S. S. C.: Prolactin-releasing action of gonadotropin-releasing hormone in hypogonadal women. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 1089, 1986.

**The effect of LHRH
on the prolactin releasing
mechanism of women
in non-pregnancy
and early pregnancy**

Toshiro Kubota, Shusaku Kamada,
Hiroo Tsuzuki, Akira Kohyama,
Nozomu Nishi and Motoi Saoto

Department of Obstetrics
and Gynecology, Faculty

of Medicine, Tokyo Medical
and Dental University

The purpose of this study was to investigate the functional correlation between prolactin (PRL) and gonadotropin (Gn) secretion from the pituitary gland after an intravenous injection of LHRH in six different groups of women.

The following results were obtained:

1) LHRH did not induce a significant increase in serum PRL levels in all groups. However, the high reaction PRL cases after LHRH (serum PRL increase $\geq 50\%$ of PRL basal levels) were found in each groups. The appearance rates of these cases were 30% (8/23) in the luteal phase, 18% (3/17) in the follicular phase, 20% (3/15) in the hypothalamic amenorrhea, 30% (3/10) in the castrated women, 0% (0/7) in the early pregnancy and 0% (0/7) in the control (the injection of saline).

2) In the high reaction PRL cases of luteal phase, the peak values of serum PRL ($30.5 \pm 5.1 \text{ ng/ml}$) after LHRH were significantly ($P < 0.05$) higher than the PRL basal levels, and the positive PRL response after LHRH was significantly ($P < 0.05$) correlated with the positive Gn response. However, there was no significant increase of PRL after LHRH in the little reaction PRL cases of luteal phase.

3) Basal levels of serum progesterone (P) ($7.7 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$) and estradiol (E_2) ($97.2 \pm 12.2 \text{ pg/ml}$) in the high reaction PRL cases of luteal phase were lower than those of P ($14.4 \pm 2.8 \text{ ng/ml}$) and E_2 ($151.1 \pm 30.8 \text{ pg/ml}$) in the little reaction PRL cases.

From these results, the functional correlation between Gn and PRL after LHRH was found most frequently in the women of luteal phase and castration. Additionally, the serum steroid hormone levels seemed to have affected the PRL response to LHRH in the luteal phase.

(受付: 昭和 62 年 10 月 30 日)

ROLE OF OVARIAN ESTROGEN ON PRL SECRETION IN IDIOPATHIC INFERTILE WOMEN

Hiroko TAHARA, Shingo OHISHI, Hiroshi CHIBA,
Ryuzo TAHARA, Takumi YANAIHARA and Tetsuya NAKAYAMA

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

Abstract: Frequent measurements of pituitary and ovarian hormones were undertaken to study the physiological role of ovarian estrogen in relation to prolactin (PRL) secretion. Twelve infertile women with regular menstrual cycle ($PRL < 25\text{ng/ml}$) were selected for this study and were divided into two groups according to the responsiveness of PRL to thyrotropin-releasing hormone (TRH). Seven of 12 women showed high response of PRL to TRH and were considered occulted hyperprolactinemia (Group A). Five of 12 women showed normal response and were considered normoprolactinemia (Group B). Group A showed a small but significant transitory elevation of serum PRL levels which coincided with LH surge, while this was not noticed in group B. No apparent difference of FSH, LH, estradiol (E_2) and progesterone (P_4) levels were noticed between two groups.

In 4 cases of group B, human menopausal gonadotropin (HMG) was given and E_2 and PRL levels were examined. Following HMG administration to the patients in group B, serum E_2 levels increased significantly at preovulatory phase and PRL levels also increased. Good correlation between E_2 and PRL levels were noticed.

From the results obtained above, it is suggested that in the patients with occulted hyperprolactinemia, prompt response of PRL secretion was induced by the elevation of intrinsic E_2 , which subsequently resulted in the transitory elevation of PRL at midcycle.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 535-541, 1988)

Introduction

It has been evaluated that amenorrhoea and anovulation are frequently complicated by hyperprolactinemia. Suppression of PRL by bromocriptine plays an important role in induction of ovulation in hyperprolactinemic patients with galactorrhoea/amenorrhoea¹⁾. Although serum PRL level is regarded as one of the important factors in infertile women, information on the daily changes in serum PRL levels during the menstrual cycle has not been clarified yet. Transitory PRL elevation at ovulatory phase or both at ovulatory and mid luteal phase was reported by

many authors^{4,5,6,7)}, while no cyclic changes of PRL was recognized by others^{2,3)}. The present study is to investigate the changes of serum PRL during menstrual cycle in idiopathic infertile women. The pituitary-ovarian function in these patients and the patho-physiological role of ovarian estrogen on prolactin secretion is discussed.

Subjects and Methods

1) Subjects

Twelve infertile women who had consulted Department of Obstetrics and Gynecology at Showa University Hospital were selected for this study. The purpose of this study was explained to

Table 1. Subjects

Cases No.	Age (yrs.)	Gravidity	Duration of infertility (yrs.)	Resting level of PRL (ng/ml)	Max. response to TRH (max. PRL level) / (basal PRL level)
1. Y.H.	32	0	3	12.0	11.7
2. O.T.	33	0	2	15.2	9.8
3. K.F.	28	0	3	14.0	9.3
4. U.N.	32	0	2	15.0	10.0
5. D.I.	35	0	2	18.5	10.1
6. E.F.	27	0	3	13.5	10.2
7. K.A.	27	0	2	24.0	10.4
8. I.M.	31	0	5	17.0	4.7
9. T.K.	27	0	2	15.4	5.9
10. A.G.	27	0	5	12.8	7.8
11. N.Y.	26	0	2	23.0	4.8
12. A.A.	31	0	2	21.0	5.7

the patients and they consented to the experimental schedule. These women have been normally ovulated and showed normal luteal phase with less than 25ng/ml of serum PRL levels. They have shown biphasic basal body temperature for at least 3 months with luteal phase lasting 12 to 14 days with over 10ng/ml of P_4 level at mid luteal phase. The patients were between 26 to 35 years of age and the duration of infertility was 2 to 5 years. Clinical data are summarized on table 1.

2) Classification of the patients by the responsiveness of PRL to TRH

All patients were intravenously administered LH-RH 100 μ g and TRH 500 μ g between 5 to 7 days from the onset of last menses and blood samples were collected at 0, 15, 30, 60 minutes relative to the injection.

From the results of TRH test, the patients were divided into two groups. Group A consisted of 7 women who showed high response of PRL to TRH. In this group, the ratio of maximum levels of PRL to the basal levels of PRL after TRH administration showed over 9, and was considered occulted hyperprolactinemia (case No. 1 to 7 in table 1). Group B consisted of 5 women who showed normal response. The ratio was less than 9. These patients were considered normo-

prolactinemia (case No. 8 to 12 in table 1).

In 4 cases of group B, HMG was given, and then both E_2 and PRL levels were examined.

3) HMG administration

HMG was generously supplied by Teikoku Hormone Mfg. Co. Japan. 150 units of HMG were injected daily from the 7th day of menstrual cycle to four women of group B, and blood samples from each of the women were obtained.

4) Radioimmunoassay

Daily blood samples were collected from all patients between 10 a. m. to 11 a. m. after 30 minutes' bed rest during midcycle for about 7 days. Blood samples were separated for serum by centrifugation for 5 minutes at 3000 rpm and kept -20°C until the measurement.

FSH, LH, PRL, E_2 and P_4 concentrations in serum were determined by Daiichi Radioimmunoassay Kit. Intraassay and inter assay coefficients of variation were within 10% in all hormones.

All data obtained were analyzed by student's t-test.

Results

1) Response of serum PRL to TRH

Response of serum PRL to TRH was evaluated

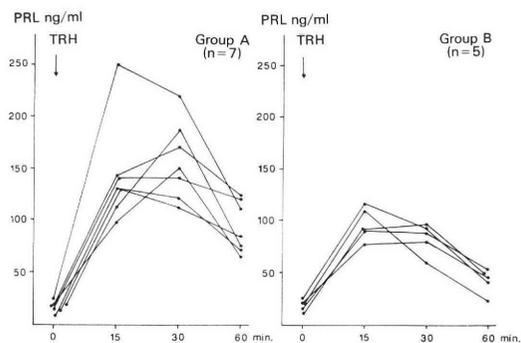


Fig. 1. Response of serum PRL to TRH Left graph indicates the response of serum PRL to TRH in seven women who showed high response (Group A). Right graph indicates the response of serum PRL to TRH in five women who showed normal response (Group B).

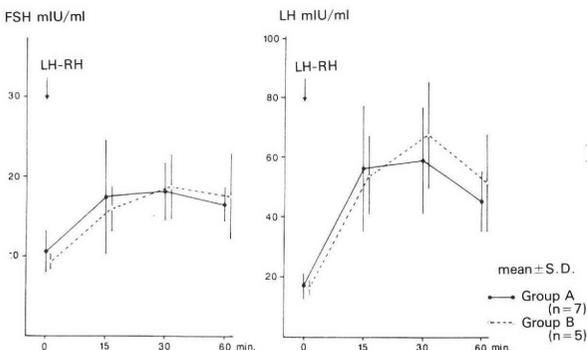


Fig. 2. Response of serum FSH, LH to LH-RH Closed circles indicate the response of serum FSH, LH to LH-RH in seven women of occulted hyperprolactinemia (Group A). Open circles indicate the response of serum FSH, LH to LH-RH in five women of normoprolactinemia (Group B).

by the ratio of maximum levels of PRL after TRH administration to the basal levels of PRL. The ratio of each patient was represented in table 1.

As shown in Fig. 1, serum PRL responded to TRH promptly and showed a maximum value at 15 to 30 minutes in both groups. The mean value of the basal PRL level were $16.0 \pm 3.8 \text{ ng/ml}$ (Mean \pm Standard deviation, $M \pm S. D.$) in group A and $17.8 \pm 3.7 \text{ ng/ml}$ in group B and there was no significant difference between two groups. In the level at 15 and/or 30 minutes, all patients showed

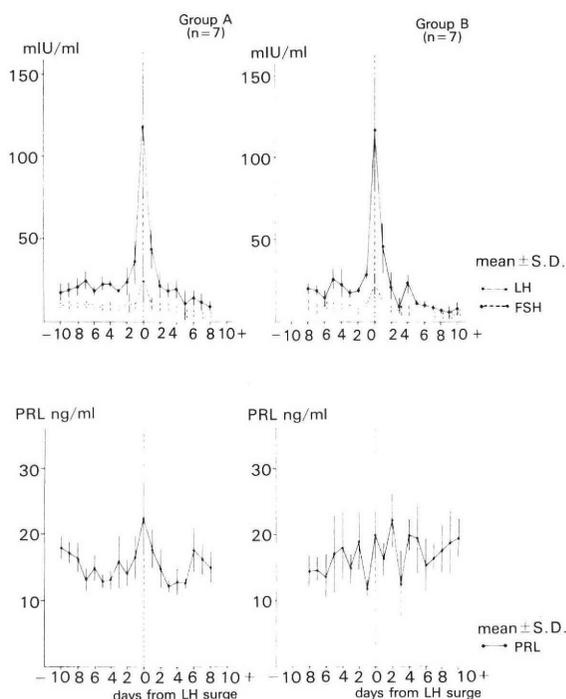


Fig. 3. Serum FSH, LH and PRL levels [upper graph]

Open circles indicate serum FSH levels and closed circles indicate serum LH levels. Left graph indicates the mean FSH and LH levels in the seven patients of occulted hyperprolactinemia (Group A). Right graph indicates the mean FSH and LH levels in five patients of normoprolactinemia (Group B).

[lower graph]

Left graph indicates the mean PRL levels in serum of seven patients of Group A. Right graph indicates the mean PRL levels in serum of five patients of Group B.

over 100ng/ml of PRL level in group A, while two of five patients in group B showed over 100ng/ml. The mean value at 30 min. in group A was $156.9 \pm 35.3 \text{ ng/ml}$ and that in group B was $84.4 \pm 13.1 \text{ ng/ml}$. The difference was statistically significant.

2) Response of serum FSH, LH to LH-RH

Response of serum FSH, LH to LH-RH were examined in the women of group A and group B on the 5th day of the cycle.

Mean value of the basal levels of FSH was $10.7 \pm 2.7 \text{ mIU/ml}$ in group A and $9.4 \pm 1.0 \text{ mIU/ml}$ in group B. There was no significant difference

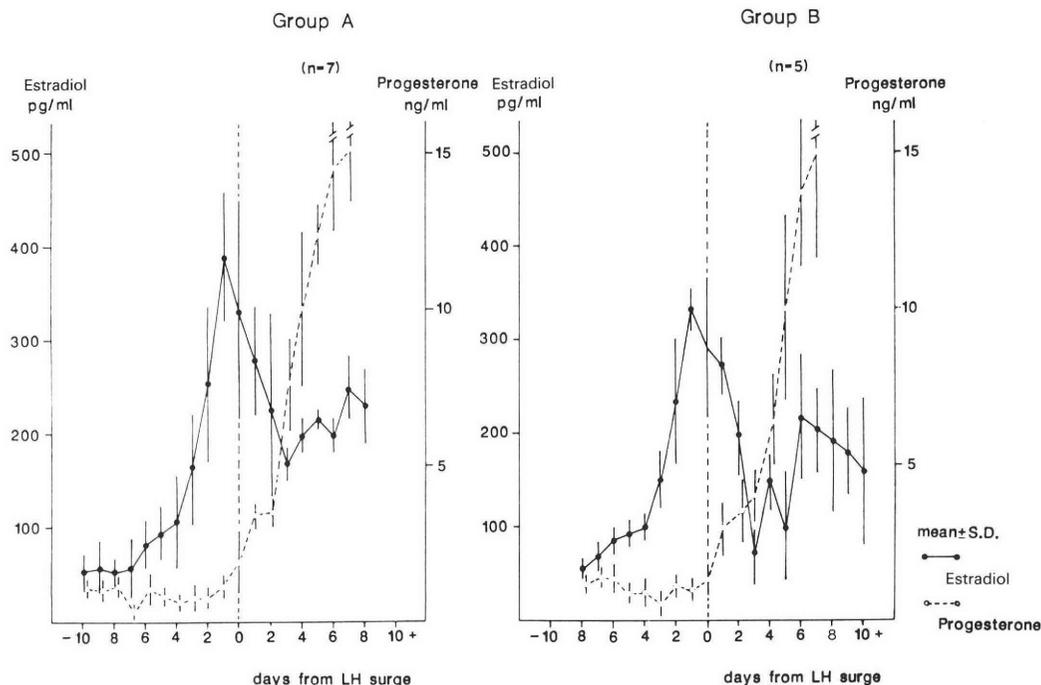


Fig. 4. Serum Estradiol and Progesterone levels.

Closed circles indicate serum E_2 levels and open circles indicate serum P_4 levels.

Left graph indicates the mean E_2 and P_4 levels in serum in seven patients of occulted hyperprolactinemia (Group A)

Right graph indicates the mean E_2 and P_4 levels in serum in five patients of normoprolactinemia (Group B).

between two groups. And the levels at 15, 30, 60 minutes after injection also showed no significant difference between two groups.

Mean value of the basal levels of LH was 16.8 ± 4.8 mIU/ml in group A and 16.4 ± 2.9 mIU/ml in group B and there was no significance between two groups. After LH-RH injection, no significant difference was observed at each point between two groups.

3) Serum FSH, LH and PRL levels

Daily levels of FSH and LH in serum were obtained from the women in group A and group B. As shown in Fig. 3, mean values of FSH at LH surge were 25.9 ± 11.8 mIU/ml in group A and 21.3 ± 7.9 mIU/ml in group B. And mean values of LH at midcycle surge were 119.0 ± 66.1 , 113.9 ± 69 mIU/ml in each group. No significant difference of both FSH and LH levels was observed between two groups.

On the other hand, a small but significant transitory elevation of serum PRL levels which coincided with LH surge was observed only in group A. In this group, the mean value of serum PRL levels at LH surge was 22.7 ± 6.1 ng/ml, while the mean value in all days except LH surge was 14.8 ± 4.2 ng/ml. There is a significant difference between them ($P < 0.001$). On the contrary, no apparent peak of PRL was noticed in group B. The mean value of serum PRL levels in all days was 17.7 ± 6.5 ng/ml in group B.

4) Serum Estradiol and Progesterone levels

Daily changes of E_2 and P_4 levels in serum obtained from the women in group A and group B were compared in Fig. 4.

Preovulatory E_2 peak level was 386.1 ± 72.3 pg/ml in group A and 334.0 ± 15.8 pg/ml in group B. There was no significant difference between two groups. P_4 levels showed no apparent difference

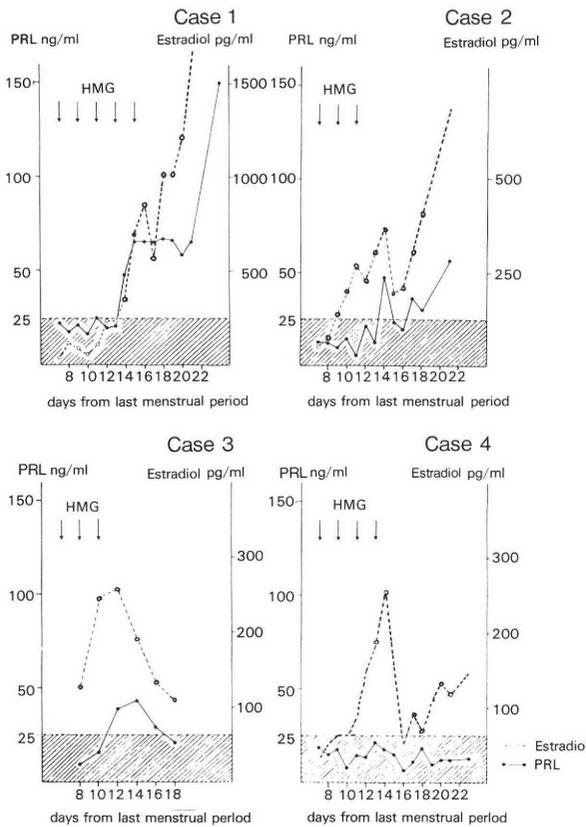


Fig. 5. Response of Estradiol and PRL to HMG administration. Open circles indicate serum E₂ levels and closed circles indicate serum PRL levels. Daily changes of E₂ and PRL were examined in the four patients of normoprolactinemia when 150 units of HMG was daily administered. Striped shadow indicates normal range of serum PRL level (<25 ng/ml).

as well in both groups.

5) Response of E₂ and PRL to HMG administration

150 units of HMG were injected daily to four women of group B from the 7th day of menstrual cycle and blood samples from each woman were obtained.

Changes of E₂ and PRL levels in each patient were shown in Fig. 5. E₂ levels increased markedly and PRL levels also rose almost in parallel in case 1, 2 and 3. But in case 4, elevation of PRL was eliminated.

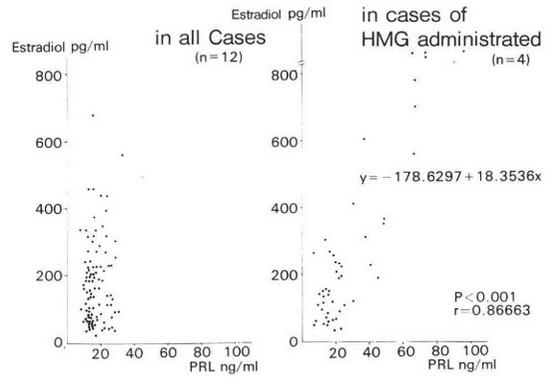


Fig. 6. Relation between serum Estradiol and PRL levels.

Left graph indicates the relation between E₂ and PRL levels in serum obtained from the women of group A and group B without HMG administration.

Right graph indicates the relation between E₂ and PRL levels in serum obtained from 4 women of group B when HMG was administered.

6) Relation between serum Estradiol and PRL levels

E₂ and PRL levels in serum obtained from the women of group A and group B without HMG administration were depicted in the left graph of Fig. 6. No correlation between E₂ and PRL levels were noticed. In contrast, as shown in the right graph, significant correlation was observed between E₂ and PRL levels in the cases when HMG was administered ($P < 0.001$, $r = 0.8663$).

Discussion

Although several papers reported in regard to the changes of PRL levels during menstrual cycle, final conclusion has not been obtained.

No cyclic pattern and no significant daily variation of PRL was observed in some papers^(2,3), while significant increase in serum PRL was observed during the ovulatory and luteal phase in other papers^(4,5,6,7). However, the mechanism of presence or absence of daily changes of PRL has not been clarified.

Recently patients with less than 25ng/ml in serum PRL level at daytime associated with elevated PRL level during the night were payed an

attention as occulted hyperprolactinemia^{8,9)}. These diurnal variation of PRL level is considered to be an important cause of idiopathic infertility.

On the other hand, the patients who show transitory elevation of PRL levels during the menstrual cycle are called transient hyperprolactinemia⁹⁾. In their report, it was inferred that minimal hyperprolactinemia of short duration could affect fertilization, implantation, embryogenesis or function of the corpus lutein of pregnancy.

To investigate the PRL secreting capacity, TRH administration study has been carried out^{9,10,11,12)}.

Mori et al reported that the patients who showed 150ng/ml or more of PRL levels at 30 min. after 500 μ g of TRH administration are considered to be occulted hyperprolactinemia. They also reported that bromocriptine therapy to those patients were effective⁹⁾.

In our study, patients were divided into two groups according to the ratio of maximum levels of PRL to the basal levels of PRL after TRH administration¹²⁾; high response group (the ratio over 9, occulted hyperprolactinemia) and normal response group (the ratio less than 9, normoprolactinemia). Serum PRL levels during the menstrual cycle were compared in two groups. Preovulatory transitory elevation of PRL level was observed in occulted hyperprolactinemia but it was not noticed in normoprolactinemia. These results were compatible with the findings reported by Aisaka et al¹³⁾.

In occulted hyperprolactinemia, PRL secreting capacity is stimulated by many factors including estrogen. It is therefore suggested that the presence of preovulatory PRL elevation may be related to the sensitivity to intrinsic estrogen in the pituitary gland. In our series of patients, estrogen levels were not different between group A and B at midcycle. However, when the patients in group B who did not show transient PRL elevation, were treated by HMG, PRL levels increased in parallel with estrogen elevation. These results clearly demonstrated that the intrinsic estrogen stimulated PRL secretion.

Then a question rises as to the different PRL secretion pattern between group A and B at midcycle, since the estrogen levels at midcycle in both groups are compatible. From the results of HMG administration study, a hypothesis that the sensitivity of PRL secretion to estrogen is different between the patients in group A and B.

In our present study, occulted hyperprolactinemia in which PRL secreting capacity is increased, showed a transitory elevation of serum PRL level at midcycle. It is also demonstrated that occulted hyperprolactinemia may be the same pathophysiological state as so called transient hyperprolactinemia.

These results suggested that the women who show high response of PRL to TRH may possess high sensitivity to estrogen, which resulted in transitory elevation of PRL at midcycle. Further study has to be done to elucidate the pathophysiological role on the pituitary ovarian function.

References

- 1) Aono, T., Miyake, A., Shioji, T., Yasuda, M. and Kurachi, K.: Restoration of oestrogen positive feedback effect on the release by bromocriptine in hyperprolactinemic patient with galactorrhoea-amenorrhoea. *Acta Endocrinol.*, 91: 591, 1979.
- 2) Robert, B. J., Basil, H. Y., William, R. K. Jr. and Midgley, A. R., Jr.: Physiologic and pathologic profiles of circulating human prolactin. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 15: 757-773, 1973.
- 3) McNeilly, A. S. and Chard, T.: Circulating levels of prolactin during the menstrual cycle. *Clin. Endocrinol.*, 3: 105-112, 1974.
- 4) Franchiment, F., Dourey, C., Legros, J. J., Reuter, A., Vrindts-Gevaert, Y., Van Camwenberge, J. R. and Gaspard, U.: Prolactin levels during the menstrual cycle. *Clin. Endocrinol.*, 5: 643-650, 1976.
- 5) Vekemans, M., Delvoeye, P., L'Hermite, M. and Robin, C.: Serum prolactin levels during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 989-993, 1977.
- 6) Ben-David, M. and Shenker, J. G.: Transient hyperprolactinemia: A correctable cause of idiopathic female infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 442-444, 1983.
- 7) Azuma, K. and Yamano, S.: Correlation between serum prolactin secretion patterns and

ability of fertilization and cleavage of human oocyte (Effect of transient hyperprolactinemia on fertilization and cleavage of human hyperprolactinemia on fertilization and cleavage of human oocyte). *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.*, 37: 2097-2106, 1985.

- 8) Board, J. A., Evelin, S. and Volker, S.: Nocturnal prolactin levels in infertility. *Fertil. Steril.*, 36: 720-724, 1981.
- 9) Mori, H., Aisaka, K., Matsuoka, R. and Kigawa, T.: Corelation of prolactin-secreting-capacity to circadian profile of prolactin in euprolactinemic women with ovulatory disturbances. *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.*, 37: 287-292, 1985.
- 10) Pellion, F., Vincens, M., Cesselin, F., Doumith, R. and Mowszowisz, I.: Exaggerated prolactin response of thyrotropin-releasing hormone in women with anovulatory cycles: possible role of endogenous estrogens and effect of bromocriptine. *Fertil. Steril.*, 37: 530-535, 1982.
- 11) Archer, D. F.: Prolactin response to thyrotropin-releasing hormone in woman with infertility and/or randomly elevated serum prolactin levels. *Fertil. Steril.*, 47: 559-564, 1987.
- 12) Lin, K-C., Koshida, M., Noda, Y., Kanzaki, H., Taii, S. and Mori, T.: Prediction of efficacy of bromocriptine therapy in euprolactinemic infertile woman: the usefulness of TRH and LH-RH tests. *Jap. J. Fert. Ster.*, 32: 551-558, 1987.
- 13) Aisaka, K., Ando, S., Kokubo, K., Yoshida, K. and Mori, H.: Studies of prolactin secreting

capacity in the ovulatory infertile patients with transient hyperprolactinemia. *Folia Endocrinol.*, 62: 662-671, 1986.

下垂体 PRL 分泌と 卵巣性 Estrogen 分泌との関係について

昭和大学産科婦人科学教室

田原裕子 大石親護 千葉 博
田原隆三 矢内原巧 中山徹也

下垂体 PRL 分泌と卵巣性 estrogen 値との関係を潜在性高 PRL 血症例 (A 群) 及び正 PRL 血症例 (B 群) について検討した。正常性周期婦人 (PRL 25 ng/ml 以下) 12 例を TRHtest により、最大反応率 (最大反応値/前値) が 9 以上を A 群、9 未満を B 群の 2 群に分け、排卵前後の血中ホルモン (H) 値を比較した。又、B 群に対し HMG を連日投与し、血中 H 値を非投与時と比較した。A 群では排卵期 LH サージに一致して PRL の一過性の有為な上昇がみられたが、B 群ではみられなかった。尚、estradiol (E₂) サージの値及び FSH, LH, progesterone 値は両群に差はなかった。B 群への HMG 投与により、排卵前 E₂ 値は非投与時に比べ高値となり PRL 値も有意な上昇を示した。更に E₂ 値と PRL 値との間に正の相関がみられた。以上により潜在性高 PRL 血症では正 PRL 血症に比べ中枢での E₂ の感受性が高く、同レベルの E₂ 値が PRL の一過性の上昇を起こす事が示唆された。

(受付: 昭和63年2月13日掲掲)

単クローン性抗プロラクチン抗体を用いた プロラクチン半定量法の検討

Evaluation of the Prolactin Semi-quantification using Monoclonal Prolactin Antibody

産業医科大学産婦人科学教室 (主任: 岡村靖教授)

吉田 耕 治 高 島 正 樹* 大 塚 治 夫
Kohji YOSHIDA Masaki TAKASHIMA Haruo OTSUKA
馬 場 伸 二 及 川 和 郎 高 柳 茂 生
Shinji BABA Kazuo OIKAWA Shigeo TAKAYANAGI
岡 村 靖
Yasushi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,
University of Occupational and Environmental Health,
School of Medicine
(Director: Prof. Y. Okamura)

血液中のプロラクチン (PRL) 測定は radiomunoassay (RIA) で行われることが多いがこれには放射性物質を使用するため特殊な設備を要し、またかなりの時間も必要である。最近、単クローン性抗体の作製技術が確立しこれを応用した逆受身赤血球凝集反応による PRL 半定量試薬 (MS-8701) が開発された。本半定量試薬を用いれば特別な器具を用いることなく簡便な操作でかつ短時間 (2 時間) で微量 (15 ng/ml) の血清中の PRL を測定することができる。このキットの同時再現性は良好で、標準曲線も PRL 12.5-200ng/ml の範囲ではほぼ直線的な相関が得られた。MS-8701 と PRL RIA Bead kit II (ダイナボット KK 社製) による測定値の間の相関は、相関係数 $r = 0.915$ と良好であった。TRH 負荷試験を行った 7 症例でもほぼ相関したが、半定量のせいか MS-8701 による PRL 値が全般にやや低値を示していた。血液以外の体液として妊娠 20 週の羊水中の PRL は 2560 ng/ml と高く、本キットで羊水中の PRL も測定可能であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 542-545, 1988)

緒 言

近年、潜在性あるいは一過性高プロラクチン (PRL) 血症とよばれる病態の存在が指摘されている⁶⁾。この様な場合に血清中の PRL 値を簡便に迅速に知り得れば、TRH (thyroid stimulating hormone) 負荷テストを行うべき症例を選別する上でも有利である。

現在、血中 PRL の測定は RIA (radiomunoassay) で主に行われているがこれには放射性物質を使用

するため特殊な設備を必要とする欠点がある。ところが最近になって単クローン性抗体の作製技術が確立され、これを用いた逆受身赤血球凝集反応による PRL 半定量試薬が開発された²⁾。本半定量試薬 (MS-8701) を用いて、不妊や卵巣機能不全の患者の血清中 PRL を測定し RIA 値と比較検討したので報告する。

原理と測定方法

1) 原理

* 現所属 神戸大学医学部産婦人科

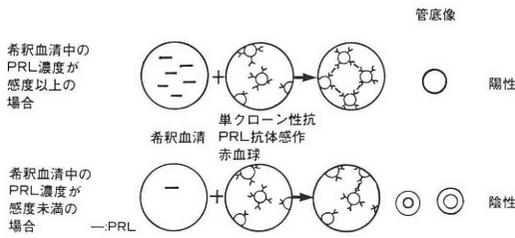


図 1 測定原理と判定

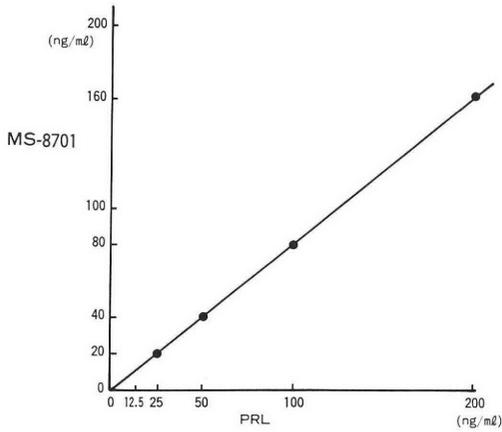


図 2 標準曲線

MS-8701(持田製薬KK製造部)は、2種類の単クローン性抗PRL抗体を感作した羊赤血球が、血清中のPRLにより凝集を起こす、いわゆる逆受身赤血球凝集反応(Reversed-passive hemagglutination reaction: R-RHA)の原理に基づく⁴⁾。被検尿中に本試薬の感度以上のPRLが存在すれば抗PRL抗体感作ヒツジ赤血球とPRLが結合し反作用アンプルの管底にいわゆるスムーズマット(Smooth mat)が形成される(陽性)。一方、希釈血清検体のPRLが本試薬の感度未満の場合、赤血球凝集反応は起こらず、反作用アンプルの管底に沈降輪が形成される(陰性)。(図1)この半定量試薬キットの検出感度は1ng/ml(血清中15ng/ml血清15倍希釈以上で測定可能)である。

2) 測定方法 ((1)(2)(3)の操作はキットに付属の簡易ピペットで容易にできる。)

(1) 希釈剤溶液の調整

希釈剤アンプルを被検血清と同数開口し、希釈剤溶解液の2.5mlを加え、十分に混和し溶解する。

(2) 検体の調整

被検血清を(1)で調整した希釈剤溶液を用いて、目的に応じ適宜希釈し希釈列を調整する。

(3) 反応操作

- 1 被検血清1検体につき3本の抗体感作血球アンプルを開口し、(1)で調整した希釈剤溶液の0.4mlを各々に加え十分に混和し溶解する。
- 2 (2)で調整した被検血清希釈列の任意の3濃度の各0.1mlを(3)1で調整した抗体感作血球アンプル(反作用アンプル)に加え十分に混和後、室温(20~30℃)で2時間静置する。

(4) 判定

2時間静置後、管底に沈降輪が形成されない場合は陽性、形成された場合は陰性と判定。

(5) 血清中PRL濃度の計算

陽性を示す最高希釈倍数(N)を求め次式により計算する。

$$\begin{aligned} \text{被検血清中のPRL濃度 (ng/ml)} \\ = N \times 1.0 \\ \text{(感度 1.0ng/ml)} \end{aligned}$$

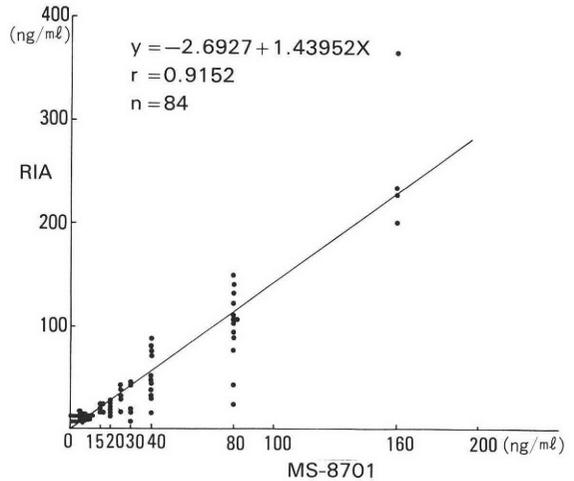


図 3 MS-8701による半定量値とRIA法による測定値の相関

表 1 同時再現性

Sample No	7	12	15	19	30	17
RIA (ng/ml)	12.0	16.1	27.1	50.0	130.8	200.0
MS-8701 (ng/ml)	< 15	15	20	40	80	160
	< 15	15	20	40	80	160
	< 15	15	15	40	80	160

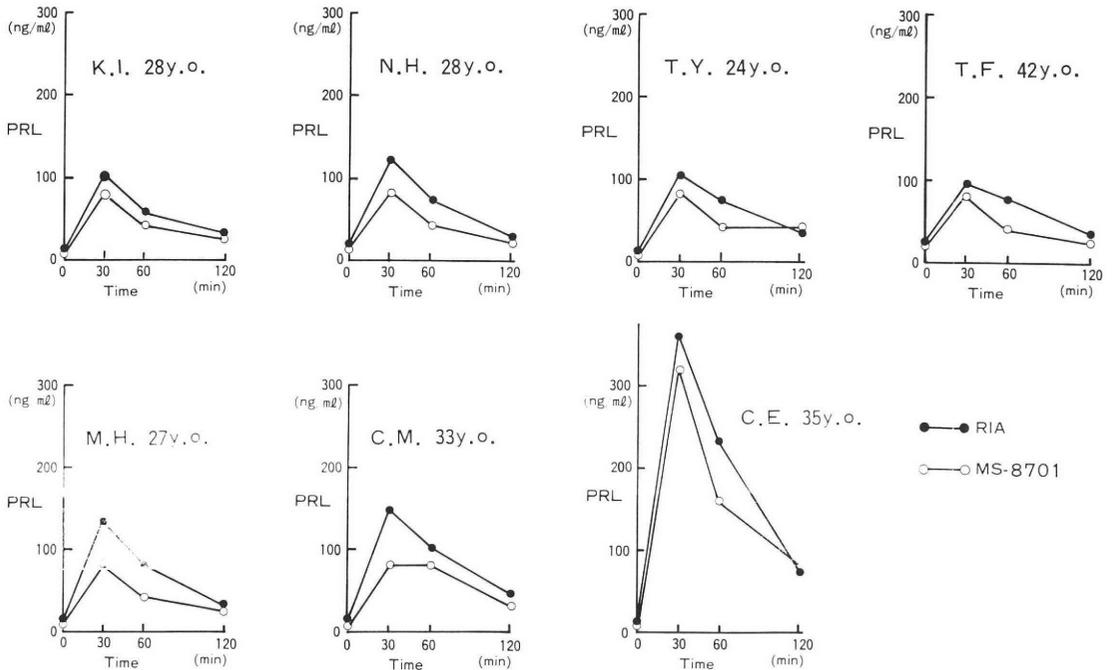


図4 TRH 負荷試験による PRL の反応

研究対象

産業医科大学付属病院産婦人科外来を受診した患者及び当科入院患者のべ 85 例 (LH-RH・TRH 負荷試験を施行した 7 例を含む) を対象とした。また前期破水の患者から羊水を採取し、羊水中 PRL を測定した 1 症例も合わせて対象とした。

成績

1) 同時再現性

本キットの再現性を検定するために RIA 値で 12~200ng/ml の 6 検体を異なる測定日に 3 回測定した。その結果、RIA 値が 27.1 ng/ml である検体について、MS-8701 による測定値が 20 ng/ml, 20 ng/ml, 15 ng/ml とやや変動があったものの、全体としては同時再現性は良好であった。(表 1)

2) 標準曲線

PRL 標準液 (Cat. No. 869058, Lot. 696004) (ヘキスト社製) を用いて得られた標準曲線を図 2 に示す。測定感度 5ng/ml で PRL 12.5 ng/ml から 200ng/ml まで、ほぼ直線的な dose-response が得られた。

3) MS-8701 と RIA との相関

主に不妊や卵巣機能不全の患者のべ 85 例の血清中

PRL を、本試薬 (MS-8701) と、ダイナボット KK の RIA ビーズ, サンドイッチ固相法⁵⁾で同時に測定した。85 検体中 1 例で、RIA の測定値と R-PHA による測定値の間に大差があったものの、この 1 例を除く 84 例で、RIA 値と R-PHA 値の相関を調べたところ、相関係数 $r=0.915$ 、回帰直線は $y = -2.6927 + 1.43952 X$ と高い相関が認められた(図 3)。

4) TRH 試験の症例

LH-RH, TRH 負荷試験を行った 8 名の患者について、RIA と MS-8701 で同時に測定した結果を図 4 に示す。LH-RH と TRH は田辺製薬 KK の製剤を用い、それぞれ 100 μ g と 500 μ g を生食水 10 ml に混注し静注後 30 分, 60 分 120 分後に採血して得られた値である。MS-8701 による測定は半定量の倍数希釈であるためか RIA による値よりも全般にやや低値を示していた。

まとめ

潜在性あるいは一過性高プロラクチン血症と呼ばれる病態が注目されて以来⁶⁾、近年 PRL 測定の重要性は増してきている。PRL の測定法には生物学的測定法、RIA 法^{3,5)}、RRA (Radioreceptor assay) 法、EIA (Enzyme immunoassay) 法などが報告されてきたが実際の臨床においては RIA 法による測定が

大半を占めている。しかしながら R I A 法は放射性同位元素を使用するため特別の設備を必要とし測定後の処理も煩雑である。近年 Köhler と Milstein⁷⁾が開発した単クローン性抗体を用いた種々のホルモン測定が、その高感度、高特異性の故に広く普及しつつある。今回の測定キットも P R L に高い特異性を有する単クローン性抗 P R L 抗体を用いた半定量キットで、特別な器具を用いることなく簡便な操作でしかも短時間 (2 時間) に微量 (15 ng/ml) の血清中の P R L を測定することができる。

その結果は同時再現性も良好で、標準曲線も P R L 12.5-200ng/ml の範囲でほぼ直線的な相関が得られた。MS-8701 と P R L R I A Bead キット II (ダイナボット K K) による測定値の間の相関は、相関係数 $r = 0.915$ と良好であった。T R H 負荷試験を行った 7 症例でも R I A 値とほぼ相関したが MS-8701 による値が全般にやや低値を示した。

血液以外の体液として妊娠 20 週の羊水中の P R L を測定したところ 2560 ng/ml という高値を示した。羊水中の P R L は妊娠初期から急増し妊娠中期には 500-3,000ng/ml という著しい高値を示し、24 週頃から徐々に減少する¹⁾。羊水中の P R L は脱落膜由来であるが、その生理学的意義として、羊水-母体間および羊水-胎児間の水・電解質の移行を調節したり、あるいは胎児の肺成熟にも関与しているといわれている。この MS-8701 の様な簡便なキットを用いれば外来で繰り返して羊水中の P R L が測定可能であるので今後、妊娠・周産期管理の上で産科学的方面でも応用の可能性がある。

文 献

- 1) 青野敏博：羊水中プロラクチン，図説プロラクチン：P. 23, 医歯薬，東京，1985.
- 2) 松浦 崇，荒井隆之助，片峯奉章，馬場正博：MS-8701 説明書，持田製薬 K K 製造部：1987.
- 3) 山口省之，宇津宮隆史，片桐英彦：高プロラクチン血症を伴う排卵障害婦人に関する研究，日妊会誌 23：148, 1978.
- 4) 山口康夫：凝集反応，医免疫学：p188：金原，東京，1978.
- 5) 山中優和子，出村黎子，地曳和子，石渡尚子，小田桐恵美，出村 博：プロラクチン・RIABEAD II キットの基礎的，臨床的検討，ホと臨床 34：1097, 1986.

- 6) 吉田耕治，林炯旻，大塚治夫，高島正樹，岡村 靖：マウス初期胚の *in vitro* の成育に及ぼすプロラクチンの影響，産業医科大学雑誌 9：181, 1987.
- 7) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495, 1975.

Evaluation of the prolactin semi-quantification using monoclonal prolactin antibody

Kohji Yoshida, Masaki Takashima,
Haruo Otsuka, Shinji Baba,
Kazuo Oikawa, Shigeo Takayanagi
and Yasushi Okamura

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

The radioimmunoassay of prolactin (PRL) in blood is prevalent, however it needs specific equipments because of using radioactive isotope, and it takes considerable time. Nowadays, the making technique of PRL monoclonal antibody is established, hence the PRL semi-quantification kit (MS-8701) using reversed passive hemagglutination is prepared to use. We are able to assay only a little PRL (15 ng/ml) in serum using this kit in two hours without any specific radioassay equipment.

The accuracy of reproducibility of the kit is good and the standard curve is almost linear between 12.5 and 200 ng/ml of PRL concentrations. The coefficient of correlation between hormone levels using MS-8701 and those by PRL RIA Bead kit II (Dinabott K K.) is excellent ($r=0.915$). Those PRL data of the patients with TRH loading tests are also correlative, however the average value by MS-8701 is relatively a little lower than those by RIA probably due to semi-quantification. The PRL value of the amniotic fluid of 20 weeks of gestation is very high (2560 ng/ml). It could be able to measure PRL in amnios using this kit.

(受付：昭和 63 年 3 月 16 日特掲)

黄体期不全における排卵期、 黄体期の超音波像と内分泌動態

The Perioovulatory Hormonal Studies and Pelvic Ultrasonography in Luteal Phase Defect.

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任: 岡田弘二教授)

富岡 恵 山元 貴雄 辻 雅路
Megumi TOMIOKA Takao YAMAMOTO Masamichi TSUJI
大野 洋介 本庄 英雄 岡田 弘二
Yohsuke OHNO Hideo HONJO Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine.

不妊症原因としての黄体期不全の診断には依然として不明瞭な点が多く、その治療も漫然となされている場合が多い。今回は、黄体期不全患者 16 例を、排卵後 6～7 日目の 24 時間尿中 pregnanediol-3-glucuronide (Pd-3G) を免疫化学的手段にて測定し、5 mg/日を基準値に Pd-3G 低値群 (5 mg/日未満) 7 例と Pd-3G 正常群 9 例に分けた。さらに両群にて排卵前 3～4 日より排卵日までの連日と排卵後 6～7 日目に血中 LH, FSH, estradiol (E_2), progesterone (P) を RIA にて測定し、同時に行った経腹的超音卵胞計測値と共に検討を加えた。その結果、Pd-3G 低値群の排卵前の卵胞発育、最大卵胞径、血中諸ホルモン値の変動には特徴的な異常を認めなかったが、Pd-3G 正常群では、最大卵胞径の異常が多数を占め (8/9 例)、血中 E_2 ピーク低値も特徴的であり、 E_2 , LH 各ピークから排卵確認までの遅延症例も存在した。さらに同群には高温相 11 日以内の黄体期短縮を認め、卵胞成熟不全と黄体期短縮の関連性が強く示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 546-553, 1988)

緒 言

不妊及び不育症の原因の重要な病態として黄体期不全¹⁾ (黄体機能不全) がある。今までこの黄体期不全について、多くの研究がなされているが、その診断方法や治療に関しては必ずしも統一した見解が確立されているとは言えない²⁾。特にその診断においては、黄体から産生されるステロイドホルモン及びその代謝産物の測定、又ステロイドホルモンの体温上昇作用を利用した基礎体温測定法より判定する方法、あるいはそのホルモン標的臓器である子宮内膜の反応性を組織検査により診断する方法などがよく利用されている。しかしそれぞれの検査にも一長一短があり、また基礎体温以外の検査では、黄体期間中の

どの時期に検査を施行するのが最適でしかも、臨床応用可能であるかなどの点についても、まだ意見の一致を見ていない。

黄体期不全の診断において、24 時間尿中プレグナンジオールは血中プロゲステロンの 1 日産生量を反映しているため、黄体機能の良き指標である¹⁾。しかしその測定に際しては、ガスクロマトグラフィー法を用いると、検査が繁雑でしかも時間を要すること、あるいは RIA 法でも設備面、迅速性に問題を有することより、従来汎用される検査とはなり得なかった。最近免疫化学的に尿中 pregnanediol-3-glucuronide (Pd-3G) を数分で測定する方法が広井³⁾により開発された。そこで今回、我々は黄体期不全の診断にその測定法を用い、さらに卵胞期後期から

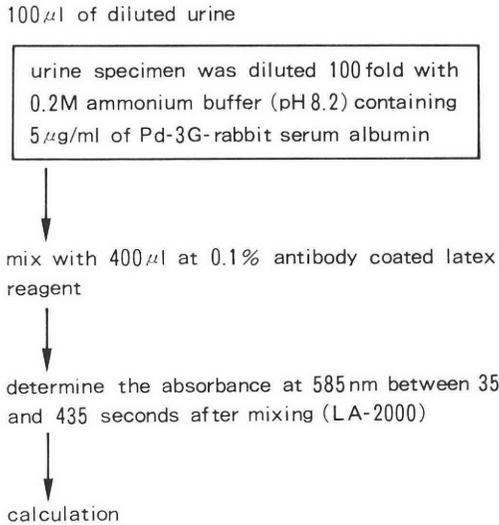


図1 尿中 Pregnenediol-3 glucuronide (Pd-3G) の免疫化学的測定法

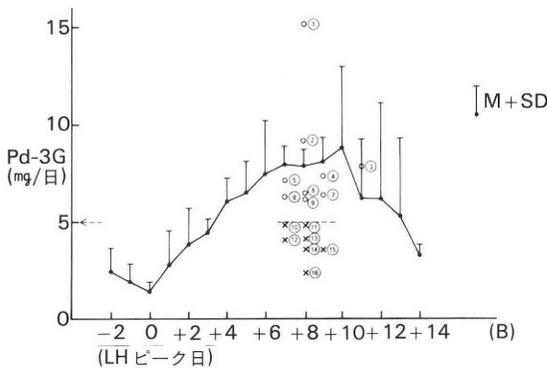


図2 黄体期不全例の黄体期24時間尿中 Pd-3G 値—正常月経周期変動 (M \pm SD) との比較—
 (○ : ①~⑨ 24時間尿中 Pd-3G 正常値症例)
 (× : ⑩~⑯ 24時間尿中 Pd-3G 低値症例)

排卵期の超音波観察下の卵胞径の変化と内分泌動態を、黄体中期の諸ホルモン値と比較することにより、黄体期不全の成因について検討した。

対象と方法

対象は京都府立医科大学附属病院産婦人科不妊外来通院患者のうち、過去2周期以上にわたり、子宮内膜日付診異常(Noyesの分類にて2日以上ずれ)、血中プロゲステロン低値(黄体中期5 mg/ml未滿)、黄体期間短縮(基礎体温上高温相11日以内)のいずれかを認め、他に明らかな不妊原因を認めない16症例とした。

方法としては、排卵周辺期連日と、排卵後6~7

日、10~11日目に超音波診断装置(ALOKASSD190電子セクタスキャナ3.5MHz)を用い、経腹的に卵胞観察を行い、卵胞径計測及び排卵の確認を行った。さらに同日に血中LH, FSH, estradiol-17 β (E₂), progesterone (P)をRIAにて、24時間、早朝尿中Pd-3Gを全自動免疫化学分析装置(LA-2000, AIC & Alphatec社製)を用いて測定した。この装置による測定法は図1のごとくであり、検査所要時間は約10分である。尚本法によるPd-3G測定において他のステロイドとの交叉性は、20 α -hydroxyprogesteroneで76.4%以外はすべて3%以下と特異性に優れている³⁾。16症例中10例は観察周期の排卵確認後6~8日目に子宮内膜日付診も行い、Noyesの分類⁴⁾により2日以上ずれを示すものを異常と判定した。

結 果

1. 黄体期24時間尿中 Pd-3G 値

今回の検討例16例の黄体中期(超音波検査下排卵確認後6~7日目)の24時間尿中Pd-3G値を、以前に同測定法にて検討した正常月経周期婦人の平均値と比較して示すと、図2のごとくである。各症例の24時間尿中Pd-3G値は、正常婦人の対応する日数での平均値より、ほぼ正常と認められるもの(-1.5SD以内)9例(図2の○印①~⑨)と平均値より著しく低いもの(-1.5SD以上)7例(図2の×印⑩~⑯)とに分類可能であった。この2群の分類は、LHピーク後7~9日目(或いは超音波検査下排卵確認後6~7日目)においては24時間尿中Pd-3G値5 mg/日を基準値とした分類と一致するため、今回排卵後6~7日目の24時間尿中Pd-3G値が本法を用いた測定で5 mg/日未滿のものをPd-3G低値群とした。

2. 黄体期間における検討

24時間尿中Pd-3G値以外に黄体中期の早朝尿中Pd-3G/クレアチニン、血中P、血中E₂の各測定値、排卵日から次回月経開始日までの日数、基礎体温上高温持続日数、子宮内膜日付診のずれを各症例で検討し、24時間尿中Pd-3G値が高値のものから順に並べ表1に示した。24時間尿中Pd-3G値は、早朝尿中Pd-3G/クレアチニン値あるいは血中P値との間に明らかな相関関係を認めなかった。内膜日付診施行症例は症例⑩を除き全例異常を示した。黄体期間に関しては、従来の基礎体温上上の高温持続日数11日以内の症例は8例認めた。症例③、⑧、⑪のように超音波検査で確認された排卵日から月経開始前日までの日数と3日以上異なる症例も存在した。黄体期短縮(高温相11日以内)を示した8例中6例は、尿中Pd-3Gの正常域のものであった。

表 1 各症例の黄体期所見

症例	ホルモン値 (排卵後 6 ~ 7 日目)				排 卵 日 ↓ 月経開始前日 (日)	高温持続 日 数 (日)	子宮内膜日付 け診のずれ (日)
	尿中 Pd 値 (24時間尿) (mg/日)	尿中 Pd/ クレアチニン (早朝尿) (μ g/mg)	血中 P 値 (ng/ml)	血中 E ₂ 値 (pg/ml)			
①	15.2	10.2	8.2	77	11	10	腺間質分離
②	9.6	14.0	15.5	138	11	10	混合型
☆③	7.8	4.0	9.5	123	10	14	+ 3
④	7.4	6.5	13.2	109	13	11	混合型
⑤	7.1	6.8	5.2	71	10	10	
⑥	6.3	7.7	13.4	107	11	10	
⑦	6.3	9.0	8.8	101	14	14	- 2
☆⑧	6.3	5.9	4.8	67	14	10	- 3
⑨	6.2	6.0	3.1	72	12	13	
⑩	4.9	5.6	8.9	165	13	13	正 常
⑪	4.9	6.4	6.0	120	12	9	混合型
☆⑫	4.1	4.9	5.4	183	12	13	混合型
☆⑬	4.1	2.4	0.6	18	7	6	
⑭	3.8	10.7	7.6	102	15	14	
⑮	3.6	9.2	10.5	107	12	12	+ 2
⑯	2.3	7.5	17.3	98	14	14	

症例①~⑨は24時間尿中 Pd-3G 5 mg /日以上、症例⑩~⑯は、同 5 mg /日未満、☆は後述症例(図 4 ~ 7)

Pd: pregnanediol-3 glucuronide, P=progesterone

3. 卵胞期, 排卵期における検討

次に各症例の卵胞期, 排卵期に関しては, 卵胞期日数, 超音波観察下の排卵前 2 日間, 及び 3 日間の卵胞径増大速度, 排卵前日の最大卵胞径について検討を加えた。さらに, 内分泌環境としては血中 FSH, E₂, LH のそれぞれのピーク値と, E₂ピーク日から LHピーク日まで, LHピーク日から排卵日までの日数, 排卵確認日の血中 P 値, 24 時間尿中 Pd-3G 値 (排卵日前日~排卵日まで) を検討項目とした。(表 2) 表 2 に示した症例の順序は表 1 と同じく, 上段の 9 例が黄体期 Pd-3G 値正常域の症例, 下段の 7 例が Pd-3G 値が 5 mg/日未満と低値を示した症例である。この上, 下段の 2 群を比較すると, 卵胞期日数, 卵胞径増大速度においては有意な相違点は認められなかった。しかし最大卵胞径においては, 以前我々が報告した⁶⁾正常婦人の排卵前最大卵胞径 2.19 ± 0.20 cm (M ± SD) より ± 1 SD 以上逸脱するものが多く認められた。さらに詳細に検討すると, 上段で 8/9 例, 下段で 2/7 例と, 黄体期尿中 Pd-3G 正常の症例の方に逆に卵胞径異常を示すものが多く認

められた。

図 3 は表 2 の排卵前卵胞径推移を, 黄体期尿中 Pd-3G 正常群と低値群に分類し, 正常婦人の卵胞発育経過と比較したものである。前述の結果に加え, 特に黄体期尿中 Pd-3G 低値群では, 正常婦人の経過とはほぼ類似の卵胞発育及び排卵経過を示している。

表 2 において, 血中 E₂ピーク値は上段の症例の方が低値をとる傾向を示した。E₂ピーク日-LHピーク日-排卵日の関係では, 症例③で LHピーク日の 4 日後に初めて排卵が確認される異常経過をたどった以外は, 特に上, 下段における差異は見いだすことは出来なかった。排卵日血中 P 値, 全尿中 Pd-3G 値は, 下段の症例の方が若干低値を示した。

これらの結果より, それぞれの黄体期不全の卵胞期, 黄体期を主たる特徴として, 卵胞径異常と卵胞期血中 E₂ピーク低値を示す群と, 卵胞期には異常を予知し難く, 排卵期及び排卵後黄体ホルモンが低値を示す群が存在した。

以下にその代表例を呈示する。

4. 黄体期不全例

表 2 各症例の卵胞期及び排卵日所見

症例	月経開始日 ↓ 排卵日 (日)	超音波検査所見			排卵前血中ホルモン値			E ₂ ピーク日 ↓ LHピーク日 (日)	LHピーク日 ↓ 排卵日 (日)	排卵日ホルモン値	
		排卵前3日間の 卵胞径推移 (cm)	排卵前2日間の 卵胞径推移 (cm)	排卵前最大 卵胞径 (cm)	E ₂ ピーク値 (pg/ml)	FSH ピーク値 (mIU/ml)	LH ピーク値 (mIU/ml)			血中P値 (ng/ml)	尿中Pd値 (24時間尿) (mg/日)
①	13	0.07	0.04	1.88*	139	20.2	76.7	0	1	1.8	3.0
②	16	0.31	0.03	1.94*	183	24.2	116.7	1	0	2.6	5.6
③	19	0.28	0.16	2.41* (LHピーク時 1.88)	146	25.3	171.2	1	4	6.5	2.6
④	15	0.43	0.12	1.81*	145	22.6	150.0	0	2	2.1	1.6
⑤	21	0.50	0.35	2.41*	287	15.6	77.7	0	1	0.1以下	4.4
⑥	15	0.85	0.66	2.69*	239	18.6	95.4	1	1	1.2	2.9
⑦	34		0.10	2.09	156	21.1	149.8	0	1	1.4	2.1
⑧	20	0.28	0.09	1.78*	131	8.3	73.0	1	0	0.5以下	1.5
⑨	14	0.36	0.13	1.97*	156	22.1	330.4	0	1	0.7	3.2
⑩	13	0.56	0.30	2.09	265	45.1	157.5	1	0	1.2	1.5
⑪	25	0.38	0.12	2.03	172	22.7	171.7	0	1	0.5	2.0
⑫	16	0.18	0.10	2.28	316	26.0	115.9	2	1	1.0	1.6
⑬	25	0.62	0.56	2.75*	280	18.1	82.2	1	1	2.2	3.8
⑭	18	0.19	0.10	1.91*	165	35.3	151.8	1	1	1.6	1.1
⑮	16	0.18	0.10	2.13	270	14.1	60.8	0	2	1.5	2.9
⑯	32	0.28	0.19	2.19	236	18.5	163.7	1	1	1.5	2.4

(* 正常最大卵胞径平均±1 S'D を逸脱する症例)

症例⑧ (図 4)

排卵前 3 日間の卵胞径と血中 E₂ 値はほぼ平行に上昇していたが、排卵前日に卵胞径が 1.78 cm、血中 E₂ 値が 131pg/ml を示した後排卵に致っている。FSH は排卵日前日に若干上昇しているが明確なピークを形成しておらず、しかも LH ピーク値も排卵日に 78mIU/ml と低値を示した。基礎体温の上昇は、排卵後約 4 日遅れて認められている。排卵後 6 日目の血中 P 値は 4.8ng/ml と明らかに低値を示したが、24 時間尿中 Pd-3G 値は 6.3mg/日 とほぼ正常域であった。排卵後の血中 E₂ は卵胞期と同様低値を示した。排卵後 10 日目も血中 P、尿中 Pd-3G 値共 7 日目の値とほとんど変化せず、10 日間の高温相の後月経発来をみており、排卵後 6 日目の子宮内膜日付診にて腺、間質共 3 日の遅延を認めた。

症例③ (図 5)

この症例は排卵前 E₂ ピーク値は 146pg/ml と低値であり、LH ピーク時の最大卵胞径も 1.88 cm とやや正常を下回る値であったが、その後卵胞径は増大し、LH ピーク日 3 日後にて 2.41 cm と今度は正常域を上回る値を示し、その翌日に排卵現象を確認し得たも

のである。排卵前の LH ピーク、FSH ピーク値は共に正常域であった。基礎体温は LH ピーク時、排卵確認時と 2 段階の上昇を示し高温相に致っている。血中 P も排卵日 2 日前より上昇し始め、尿中 Pd-3G 値と共に正常域で推移した。子宮内膜日付診は、腺、間質共に排卵確認日からの計算によると 3 日の促進を認めしたが、LH ピーク時の基礎体温の上昇を、仮に排卵日としていると正常と判定されたかもしれない。血中 E₂ ピーク値が低く、症例⑧と同様卵胞未成熟にて排卵に致っている上に、血中、尿中諸ホルモン値及び子宮内膜日付診のすべてが実際の排卵現象と 2~3 日のずれを示した症例である。

症例⑫(図 6)

卵胞期の諸検査において、卵胞径及び血中 E₂、LH、FSH ピーク値、排卵現象、基礎体温の上昇などすべてにおいて特に異常は認められなかったにもかかわらず、排卵後 6 日目の血中 P 値は 5.4ng/ml と低値を示し、24 時間尿中 Pd-3G 値も 4.1mg/日 と低値であった。排卵から月経発来までは 12 日間であり、子宮内膜日付診はアンバランスな腺分泌像を有する混合型の異常を示した。

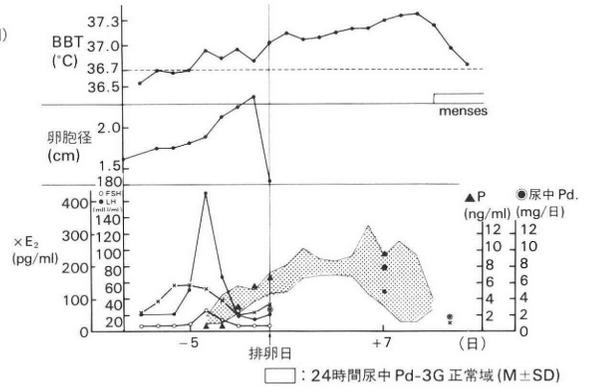
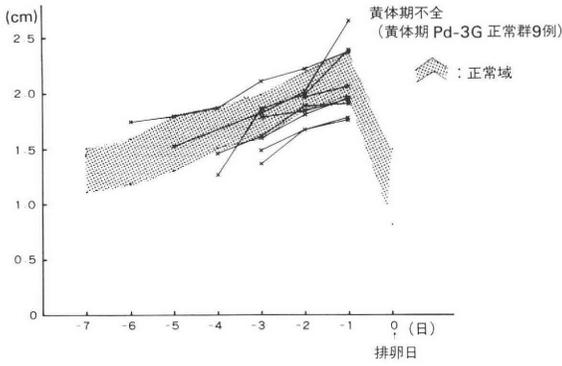


図5 症例③ 卵胞成熟不全型 (排卵遅延)

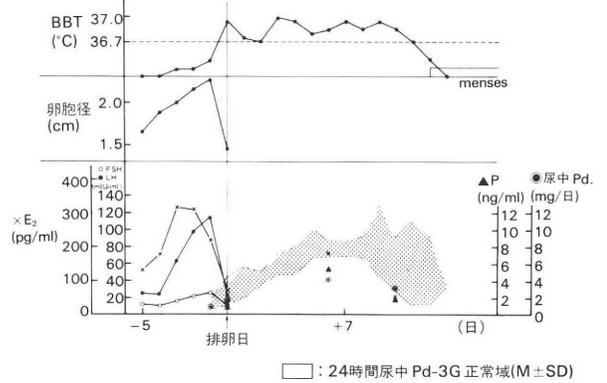
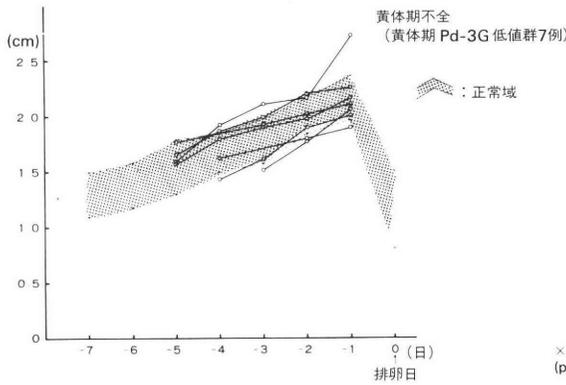


図6 症例⑫ 黄体化不全型

図3 排卵前卵胞径推移の比較
(上段：黄体期 Pd-3G 正常群)
(下段：黄体期 Pd-3G 低値群)

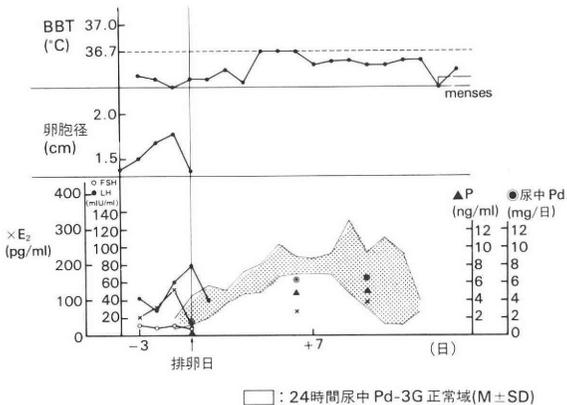


図4 症例⑧ 卵胞成熟不全型

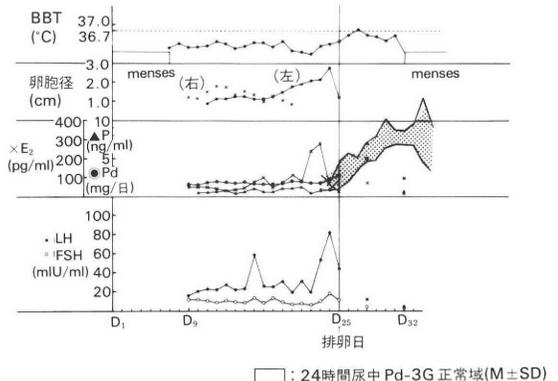


図7 症例⑬ 黄体化不全型 (混合型)

症例⑬ (図7)

本症例は、右側卵巣に卵胞様構造の発育が認められるも排卵に至らず、その後左側卵胞が発育し、月経開始後24日目に2.19 cmから2.75 cmと著名にその径を増大させ、翌日排卵確認されたものである。左側卵胞径急増と共に血中 E_2 値も増加し、排卵2日前に280 pg/mlとピーク値をとり、その後LHピーク(82.2 mIU/ml)が出現している。血中P値、尿中Pd-3G値は排卵後3日目までは正常域であったがその後は極めて低値となり、排卵後7日目において月経の発来をみた。基礎体温の上昇も顕著でなく、連続観察がなされていなければ無排卵と診断される危険性を有する黄体期不全であった。

考 案

黄体期不全の病因としては、排卵前卵胞及びその排卵経過にすでに内在していると考えられており⁷⁾、卵胞期のFSH、FSH/LH、LHピーク値などのgonadotropin値あるいは血中PRL、黄体着床期の P/E_2 、子宮内膜のLHレセプター、さらに最近ではluteinizing unruptured follicle (LUF) やendometriosisなどが問題とされている。このように多種多様な原因が存在しているため、その治療をそれぞれに適切に行ううえで原因の究明が極めて重要である。今回黄体期不全として取り扱った16例はいずれも、排卵は超音波観察下に確認し、また高プロラクチン血症は除外しており、子宮内膜症を疑う自覚症状も認められなかった。その黄体期不全が卵胞発育過程、黄体機能、子宮内膜の異常のいずれかによることが最も疑われた症例のみである。

さらに、黄体期不全をより複雑化させている原因は、同一人であっても周期により黄体期不全の程度に差が見られることである。言いかえればある周期の黄体期の状態は、その周期の卵胞期にすでに規定されていると言える⁸⁾。そのため黄体期不全の厳密な診断及び加療には同周期の卵胞期観察が必須と言えるが、卵胞期と黄体期を連続的に詳細に観察しながら黄体期不全の診断を行った報告は少ない^{9,10)}。

黄体機能検査法の中では黄体ホルモンの測定が一般的ではあるが、血中1回測定、2回測定、尿中測定など測定方法が一定していないため、その評価も様々である。特に診断に应用する場合は、その検査自体の意義だけでなく、手技の簡便さや迅速な結果も要求される。その点今回利用した尿中Pd-3Gの免疫化学的定量法は、全工程10分以内に結果を得ることが可能で、従来のクロマトグラフィー法やRIA法に比し、より臨床応用に適している。今回は本法

による正常婦人の成績を参考⁵⁾に、排卵後6~7日目の最も黄体機能の活発である時期の24時間尿中Pd-3G値が5 mg/日を黄体期不全診断における境界値と設定した。この尿中Pd-3G値に対して血中プロゲステロン値も同時に測定したが、尿中Pd-3G低値のものが必ずしも血中プロゲステロン低値のものとは一致せず、黄体期不全の診断においては黄体ホルモン産生量の1日の総和である24時間尿中Pd-3G測定の方がより正確に黄体期不全を反映しているものと考えられた。また同時に早朝尿中Pd-3G/クレアチン補正值も測定したが、全尿中値との間に他の報告^{5,11)}ほど明確な相関は認めず、早朝尿で代用することも困難と考えられた。これは今回の症例が正常婦人ではなく黄体期不全患者であったため、正常人とは異なった黄体ホルモンの日内変動¹²⁾を示した可能性が考えられる。

この24時間尿中Pd-3G値と他の黄体機能検査との関係においては、Pd-3G正常値のものの中に黄体期短縮を多く認め、症例①や⑬のごとくPd-3G値が低値で、黄体期短縮も認める混合型も存在するものの、本質的には両者の黄体期不全は異なる病態であると言える。この結果は、木川¹³⁾が黄体機能不全を短縮型と低活性型に分類したことを裏づけたことになる。

さらにこの短縮型の卵胞期の特徴として、最大卵胞径異常を示すもの、及び血中 E_2 ピーク低値のものを多く認めた。ちなみに黄体期不全を認めない正常月経周期婦人の排卵前血中 E_2 ピーク値の平均値は301.2 pg/mlであり、今回の表2上段の①~⑨の症例の平均値は185.0 pg/mlと、正常例と比較しても有意に($P < 0.02$) E_2 ピーク低値を示した。この血中 E_2 ピーク低値や最大卵胞径異常に反映される未熟卵胞や異常卵胞の排卵がPd-3G正常なるも黄体期短縮を示すパターンで黄体期不全に帰結したことは、両者の関連性を大きく示唆したと言える。黄体期短縮の病因として顆粒膜細胞の質的異常が関与していることも推察された。木下ら¹⁰⁾は黄体期不全3症例の呈示の中で、短縮型よりむしろ低活性型の黄体期不全を示した症例と卵胞期gonadotropin分泌不全との関連を指摘しており、我々とは異なる報告である。我々の症例の中でも短縮型、低活性型と明確に分類し難く、混合された病態も存在し、さらに症例の検討を重ねることがこの矛盾点を解決に導く手段となろう。

一方、最大卵胞径異常と E_2 ピーク低値症例がほとんど一致したことについては、正常婦人の卵胞モニタリングでは、最大卵胞径と血中 E_2 値との間に正の相関の認められることはよく知られているが¹⁴⁾、異常

なもの同志の関係も認められた事実として、卵胞の形態と機能の関係において興味深い結果であった。

子宮内膜日付診異常は、Pd-3G 値及び他の諸ホルモン値及び黄体期間の長短に関係なく認められ、黄体期不全の中では独立した病態を示した。卵胞期においてもこの内膜日付診異常を予測し得る特徴的な異常は認め難かった。また逆に卵胞期における検討項目のうち、卵胞期間については、21 日間以上認めるものが 5 例存在したが、遅発排卵の為に生じたと考えられる特徴的な黄体期異常のパターンは見いだせなかった。同様に、排卵前 2～3 日から排卵時の最大卵胞径の異常、及び黄体期の異常をも予知することは困難であった。

超音波検査と内分泌検査、基礎体温の 3 者を併用して観察することにより、黄体期不全症例において、いくつかも排卵期からの時間的異常が見出された。まず高温期の持続日数が実際の排卵日から月経開始日までの日数と大きく異なる例が存在した。例えば高温期になっても排卵の確認できないもの、あるいは排卵後高温相へスムーズに移行しないものである。前者は黄体化無排卵卵胞とも連続する性質の異常とも考えられ、両者共黄体からのプロゲステロン産生と排卵現象のずれが黄体期不全を起こすことを示唆する所見と言える。又黄体期を排卵後からとみなすと、黄体期期間は 14 日間なるも、高温相は 10 日間という症例も存在して、黄体期短縮の定義にも一考を要すると思われた。また卵胞期においても症例③のごとく E_2 ピーク日 - LH ピーク日 - 排卵日の時間的關係における異常が黄体期不全と関わっていると考えられた例が存在した。この症例では、排卵確認日はすでに高温相に移行しており、排卵当日の血中 P 値も 6.5ng/ml と高値を示していた。しかし全尿中 Pd-3G 値は他症例と比較しても高値とは言えず、ただ単に排卵現象が遅延したのみならず、その遅延が継時的な黄体ホルモン分泌経過にまで影響を及ぼしたものと推察された。以前に報告した¹⁵⁾正常婦人においては、 E_2 ピーク日 - LH ピーク日、LH ピーク日 - 排卵確認日までそれぞれ 1 日のものが最も多く認められたので、今回の黄体期不全例では、たとえ ± 1 日の誤差を考慮にいれても、各々の間隔が 3 日以上であれば positive feed back mechanism の異常を含む gonadotropin 分泌異常が黄体期不全の病因に十分なり得るであろうと考えられた。これは LH ピークからプロゲステロン産生までの時間の遅れが不妊原因の 1 つであるという Koninckx *et al.*¹⁶⁾の説とも一致している。

以上の卵胞期、黄体期にわたる諸検討成績から、

各症例毎に黄体期不全の主因を考えると、症例⑧は卵胞成熟不全、症例③は卵胞成熟不全と排卵遅延を伴ったもの、症例⑫は黄体化不全、症例⑬は黄体化不全と卵胞成熟不全の混合型と分類することが可能であった。

おわりに

今回黄体期不全症例を、免疫化学的測定法による黄体中期全尿中 Pd-3G 値 (5 mg/日) を基準として分類することにより、Pd-3G は正常値なるも黄体期短縮を特徴とするパターンで黄体期不全と卵胞期の卵胞成熟不全との関係が明白となった。しかもこの卵胞成熟不全は排卵前血中 E_2 ピーク値という指標だけでなく、超音波観察下の最大卵胞径の異常という、より侵襲の少ない簡便な検査で代用できることも判明した。また今回は検討しなかったが恐らく尿中エストロゲン半定量も検査として利用し得ると考えられる。

卵胞期から排卵期にわたり、超音波検査を含めた詳細な観察により、その後の黄体期不全の病因が卵胞成熟不全か？ 排卵遅延か？ またはそれらの経過には異常を認め難い黄体化以降の不全なのかを明確にすることが可能である。さらにそれぞれの病因に応じた治療を選択することは合目的的であり、妊娠率の向上にも貢献するものと考えられた。

文 献

- 1) 岡田弘二：ステロイド療法のあり方—産婦人科領域：98。全芳堂、1982。
- 2) Annos, T., Thompson, I. E. and Taymor, M. L.: Luteal phase deficiency and infertility: difficulties encountered in diagnosis and treatment. *Obstet. Gynecol.* 55: 705, 1980.
- 3) 広井正彦, 川越慎之助, 斉藤英和, 坪田宣之, 斉藤伸行, 窪田信幸：尿中 pregnanediol-3 glucuronide の免疫化学的定量法の開発と月経周期および排卵週期における変動, *日内分泌会誌*, 61: 1182, 1985.
- 4) Noyes, R. W., Hertig, A. T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.* 1: 3, 1950.
- 5) Honjo, H., Shiroshita, K., Kitawaki, J., Urabe, M., Yamamoto, T., Okada, H., Saito, N., Kubota, N. and Tubota, N.: Pregnanediol-3-glucosiduronate in early morning urine and 24 hour urine during the menstrual cycle by an immunochemical assay, contributed.
- 6) 富岡 恵, 山元貴雄, 辻 雅路, 大野洋介, 岡田弘二：電子セクタ式超音波断層法を用いた卵胞発育過程の観察, *産婦進歩*, 37: 14, 1985.
- 7) Jones, G. S. and Madrigal-Castro, V.: Hormonal

findings in association with abnormal corpus luteum function in the human luteal phase defect. *Fertil. Steril.* 20: 1, 1970.

- 8) 河野前宣：基礎体温曲線よりみた黄体機能判定に関する研究，日不妊誌，29：1，1984.
- 9) 木川源則，目崎 登，森 宏之，桑原慶紀，水口弘二，坂本正一：機能性不妊婦人の血中LH，FSH，Estradiol，Progesteroneおよび17-OH-progesterone—黄体機能不全周期と正常周期の比較—，日産婦誌，28：1165，1976.
- 10) 木下勝之，佐藤和雄，岡井 学，河合康夫，堤浩，北川浩明，高木耕一郎，坂元正一：黄体機能異常，臨婦産，37（1）：39，1983.
- 11) 森本紀彦，野田洋一：尿中Estrogen，Pregnanediol/Creatinine比測定 of 卵巣機能検査法としての有用性，日産婦誌，36：347，1984.
- 12) Chatterton, R. T. J., Haan, J. N., Jenco, J. M. and Cheesman, K. L.: Radioimmunoassay of pregnanediol concentrations in early morning urine specimens. for assessment of luteal function in woman. *Fertil. Steril.* 37: 361, 1982.
- 13) 木川源則：黄体機能の調節と不全につて，臨婦産，30：387，1976.
- 14) Hackelöer, 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.
- 15) 富岡 恵，山元貴雄，辻 雅路，大野洋介，岡田弘二：排卵誘発剤使用時における卵胞発育の超音波診断，日不妊誌，30：322，1985.
- 16) Koninckx, P. R., Heynx, W. J., corvelyn, P. A. and Brosens, I. A.: Delayed onset of luteinization as a cause of infertility. *Fertil. Steril.*, 29: 266, 1978.

The periovulatory hormonal studies and pelvic ultrasonography in luteal phase defect.

Megumi Tomioka, Takao Yamamoto, Masamichi Tsuji, Yohsuke Ohno, Hideo Honjo and Hiroji Okada

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

Sixteen infertile patients with luteal phase defect were studied from the preovulatory periods. The follicle size and the ovulation were confirmed by daily ultrasonographic examination. Serum LH, FSH, estradiol-17 β (E₂) and progesterone (P) were measured by radioimmunoassay, on each day before ovulation. Urinary pregnanediol-3-glucuronide (Pd-3G) was measured by a simplified and rapid immunochemical assay in the luteal periods.

They were classified into two groups by the value of mid-luteal Pd-3G in 24 hour urine samples. The normal mid-luteal Pd-3G group ($\geq 5\text{mg/day}$, n=9) was characteristic significantly at more frequent appearance of the abnormal (too large or too small) maximal follicle diameters and lower serum E₂ peak levels in the preovulatory periods than the other group.

In one case of this group, the long interval (4 days) was recognized between LH peak and the ovulatory day. A short luteal phase (11 days or less) was very often seen in this group (8/9).

The low mid-luteal Pd-3G group ($< 5\text{mg/day}$, n=7) showed no abnormal findings in the preovulatory hormonal and ultrasonographical data.

It was suggested that the immunochemical assay of Pd-3G was very convenient and effective for diagnosis of the type of luteal phase defect and that the luteal phase defect with a short luteal phase often results from the ovulation with abnormal size of follicles and premature ovulation.

(受付：昭和62年10月21日)

CATECHOLAMINERGIC ACTIVITY IN PATIENTS WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AND IN SUBJECTS WITH A NORMAL OVULATORY CYCLE

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

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University

Abstract: To investigate possible correlations between catecholaminergic activity and hormonal disturbances in case of polycystic ovary syndrome, serum LH, FSH and catecholamine metabolites (MHPG as a marker of adrenergic activity, DOPAC as dopaminergic activity) in patients with normal ovulatory cycles and polycystic ovary syndrome and serum estradiol-17 β , prolactin, testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone in those with a polycystic ovary syndrome were measured. 1) The MHPG levels in those with polycystic ovary syndrome were significantly higher than in those with a normal ovulatory cycle. 2) There was a significant correlation between the MHPG levels and the androstenedione levels in case of polycystic ovary syndrome.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 554-558, 1988)

Introduction

Polycystic ovary syndrome is a frequent luteinizing hormone (LH) dependent hyperandrogenic disorder and presents a spectrum of overlapping ovarian and adrenal abnormalities with variable clinical manifestations. Elevated circulating androgen levels have been detected in women with polycystic ovary syndrome¹⁾. Polycystic ovary syndrome has features of high levels of LH, low to normal levels of FSH and abnormal LH/FSH ratio²⁾. Catecholamines may play an important role in gonadotropin secretion, an event controlled by a feedback mechanism. Ovulation can be induced by an intraventricular injection of epinephrine or norepinephrine³⁾.

The aim of our study was to investigate the possible correlation between catecholaminergic activity and hormonal events in patients with

polycystic ovary syndrome. We measured the catecholamine metabolites, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), as a marker of adrenergic activity⁴⁾ and 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) as a maker of dopaminergic activity⁵⁾.

Materials and Methods

Eleven Japanese women aged 24 to 34 years were diagnosed ultrasonographically as cases of polycystic ovary. We determined the levels of LH, FSH, estradiol-17 β (E₂), prolactin (PRL), testosterone (T), androstenedione (ASD), dehydroepiandrosterone (DHEA) and catecholaminergic activity. Catecholaminergic activity was determined in eight other women with regular cycles of ovulation. The time of ovulation was determined by basal body temperature and ultrasonography, during the follicular phase. From eight patients

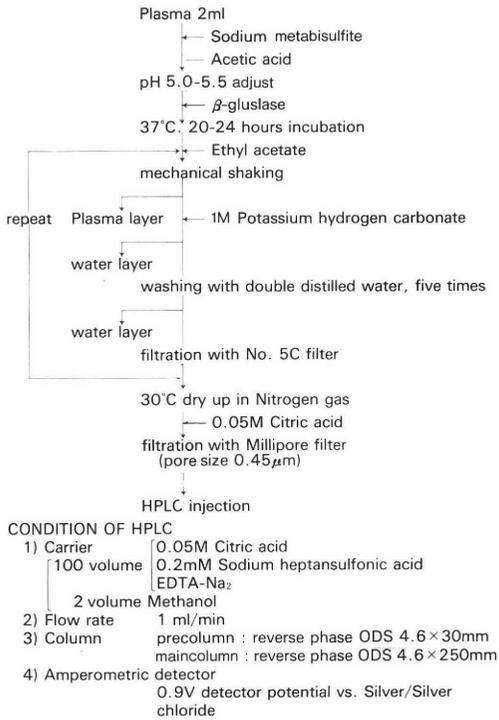


Fig. 1. Determination of MHPG and DOPAC

with a normal ovulatory cycle and three with polycystic ovary syndrome, samples were collected after the subjects had been in the supine position for forty minutes. Blood was collected through an indwelling catheter inserted at 15 min intervals over a period of 3 hours. Serum LH, FSH, E₂, PRL, T, ASD and DHEA concentrations were determined by radioimmunoassay. Two catecholamine metabolites (MHPG, DOPAC) were determined simultaneously, using high performance liquid chromatography⁶⁾(Fig. 1).

Results

1) Comparison of normal ovulatory cycles and polycystic ovary syndrome

The average of gonadotropins and catecholamines in all the subjects is shown in Table 1. The average of LH (42.4 ± 15.3mIU/ml) and

MHPG (7.00 ± 0.85ng/ml) in those with polycystic ovary syndrome was significantly higher than in those with a normal ovulatory cycle. There was no statistically significant difference in FSH or DOPAC.

2) Catecholaminergic activity and polycystic ovary syndrome

Table 2 summarizes the basal hormone levels in those with polycystic ovary syndrome. It is apparent from this table that the patients were normoprolactinemic and that all had elevated LH levels and LH/FSH ratios. T levels were higher than normal ranges, in all subjects. ASD levels were higher in 9/10 patients and DHEA levels were higher in 3 (patient 3, 8 and 11). With regard to catecholamine activity and basal hormone levels in those with polycystic ovary syndrome, there was no significant correlation between the catecholaminergic activity (MHPG, DOPAC) and LH/FSH ratios (Fig. 2) or T (Fig. 3). The correlation between the catecholaminergic activity (MHPG, DOPAC) and ASD levels is shown in Fig. 4. The regression line (y = 0.231x + 2.13) was determined between adrenergic activity (MHPG) and ASD levels. The higher the MHPG levels were, the higher the ASD levels were, but there was no significant correlation between dopaminergic activity and ASD levels and no significant correlation between catecholamine activity (MHPG, DOPAC) and DHEA levels (Fig. 5).

Discussion

Our data suggest that adrenergic activity in patients with polycystic ovary syndrome is higher than in those with a normal ovulatory cycle. The adrenergic activity correlated significantly to androgen (ASD) in patients with polycystic ovary syndrome. Quigley et al.⁷⁾ reported that a primary central disturbance in gonadotropin-releasing hormone pulsatility is probably mediated by dopamine. It was also reported that primary excessive ovarian androgen production directly affects hypophyseal production or the release of gonadotropin⁸⁾. In subjects with polycystic ovary syndrome, the peripheral aromatization of excessively secreted androgens plays an important role in producing abnormal gonadotropin release^{1,9)}.

Table 1. Average of gonadotropins and catecholamine metabolites

	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	MHPG (ng/ml)	DOPAC (ng/ml)
normal ovulatory cycle	15.4±6.1	7.3±1.4	3.65±0.69	0.93±0.19
polycystic ovary syndrome	42.4±15.3*	8.9±2.1	7.00±0.85*	0.97±0.13

* P<0.001

Table 2. Basal hormonal levels in patients with polycystic ovary syndrome

patient	LH mIU/ml	FSH mIU/ml	LH/FSH	E ₂ pg/ml	PRL ng/ml	T ng/ml	ASD ng/ml	DHEA ng/ml	MHPG ng/ml	DOPAC ng/ml
1	39	11	3.5	71	9	1.6	2.1	5.3	3.8	0.7
2	34	9	3.8	20	17	1.3	2.9	5.8	4.5	0.8
3	47	12	3.9	47	6	1.8	2.8	10.0	4.5	1.0
4	40	13	3.1	47	12	1.6	4.7	6.1	3.9	0.9
5	42	10	4.2	22	16	1.6	3.1	3.0	4.5	1.2
6	39	10	3.9	31	13	1.1	4.0	4.6	8.6	1.1
7	48	10	4.8	32	13	1.4	4.5	5.3	9.3	1.1
8	51	9	5.7	31	16	1.5	3.0	11.0	3.5	0.8
9	60	13	4.6	33	16	1.0	3.3	2.1	5.6	1.1
10	37	12	3.1	68	10	1.1	2.9	4.1	2.7	1.1
11	36	11	3.3	21	21	1.2	2.7	9.2	3.5	0.7

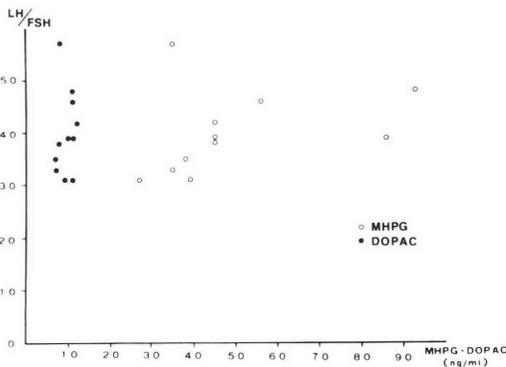


Fig. 2. Correlation between catecholamine metabolites and LH/FSH ratio.

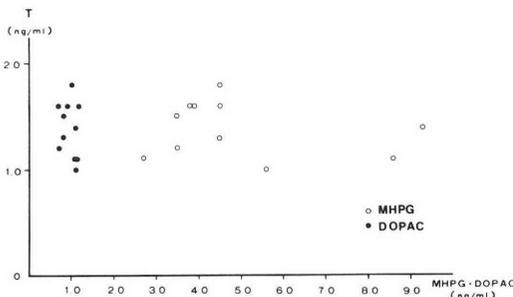


Fig. 3. Correlation between catecholamine metabolites and testosterone.

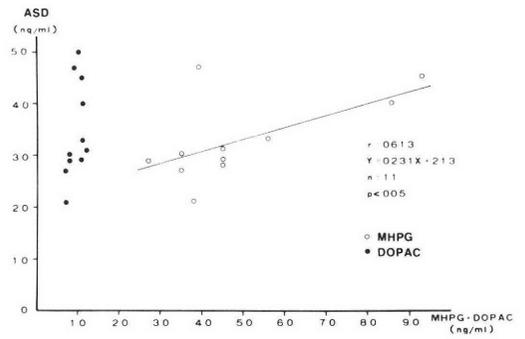


Fig. 4. Correlation between catecholamine metabolites and androstenedione.

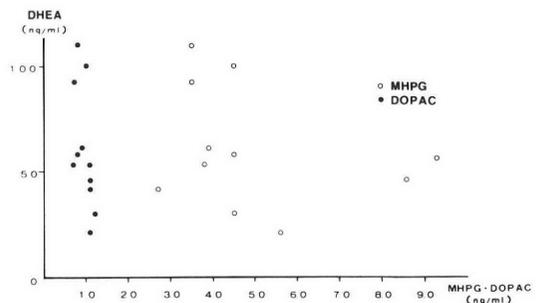


Fig. 5. Correlation between catecholamine metabolites and dehydroepiandrosterone.

Plasma LH levels were found to be elevated and FSH levels were low or low-normal and the LH/FSH ratio was constantly high with the characteristic endocrine profile of polycystic ovary syndrome¹⁰. We found that the LH/FSH ratio of all patients was high, the average being 4.0 ± 0.76 (mean \pm SD). Other workers found that extraadrenal sites (ovarian) were the predominant sources of androgen overproduction in patients with polycystic ovary syndrome¹¹. The testosterone levels were high in all patients and the androstenedione levels were high in 90.9% of our patients. Several of our patients (27.3%) had high levels of DHEA, primarily of adrenal origin.

In 1952, Sawyer reported that intraventricular injection of $50 \mu\text{g}$ of either epinephrine or norepinephrine induced ovulation in 4/10 estrogen-primed rabbits³. In vitro, norepinephrine stimulates luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) at median eminence terminals and dopamine enhances this mechanism¹². We reported a relationship between gonadotropin secretion and catecholamines, an event which may influence the secretion of gonadotropins⁶. Shoupe et al.¹³ reported that there was altered catecholamine metabolism in polycystic ovary syndrome. In the present study the MHPG levels (as adrenergic activity of polycystic ovary syndrome) were significantly higher than those with a normal ovulatory cycle (Table 1). And there was a significant correlation between the MHPG levels and the androstenedione levels ($r=0.613$, $P<0.05$) (Fig. 4). Thus, it is suspected that the catecholaminergic activity, particularly adrenergic activity may influence the hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome.

References

- 1) Yen, S. S. C.: The polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol.*, 12: 177, 1980
- 2) Hurwitz, A., Rosen, B., Palti, Z., Ebstein, B., Har-Nir, R. and Ron, M.: The hormonal response of patients with polycystic ovarian disease to subcutaneous low frequency pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *Fertil. Steril.*, 46: 378, 1986.
- 3) Sawyer, C. H.: Stimulation of ovulation in the rabbit by the intraventricular injection of epinephrine or norepinephrine. *Anat. Rec.*, 11: 385, 1952.
- 4) DeMet, E. M. and Halaris, A. E.: Origin and distribution of 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol in body fluids. *Biochem. Pharmacol.*, 28: 3043, 1979.
- 5) Cheng, C.H. and Wooten, G.F.: Simultaneous radioenzymatic assay of dopamine and dihydroxyphenylacetic acid: An index of in vivo dopamine release. *J. Pharmacol. Methods*, 5:165, 1981.
- 6) Yoshino, K., Shibukawa, T., Takahashi, K. and Kitao, M.: Catecholamines and gonadotropin secretion in sterile women. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 38: 423, 1986.
- 7) Quigley, M. E., Rakoff, J.S. and Yen, S. S. C.: Increased luteinizing hormone sensitivity to dopamine inhibition in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 231, 1981.
- 8) Yen, S. S. C., Chaney, C. and Judd, H. L.: Functional aberrations of the hypothalamic-pituitary system in polycystic ovary syndrome: a consideration of the pathogenesis. James VHT, Serio MG, Giusti G. In *The Endocrine Function of the Human Ovary*. New York: Academic Press, 373, 1976.
- 9) Rebar, R., Judd, H. L., Yen, S. S. C., Rakoff, J., Vandenberg, J. and Naftolin, F.: Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Invest.*, 57: 1320, 1976.
- 10) DeVane, G. W., Czekala, N. M., Judd, H. L. and Yen, S. S. C.: Circulating gonadotropins, estrogens and androgens in polycystic ovarian disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 121: 496, 1975.
- 11) Wajchenberg, B. L., Achando, S. S., Okada, H., Czeresnia, C. E., Peixoto, S., Lima, S. S. and Goldman, J.: Determination of the source (s) of androgen overproduction in hirsutism associated with polycystic ovary syndrome by simultaneous adrenal and ovarian venous catheterization. Comparison with the dexamethasone suppression test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 1204, 1986.
- 12) Negro-Vilar, A., Ojeda, S. R. and McCann, S. M.: Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone releasing hormone by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology*, 104: 1749, 1979.
- 13) Shoupe, D. and Lobo, R.A.: Evidence for altered catecholamine metabolism in polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 150: 566, 1984.

**多嚢胞性卵巣症候群における
catecholamine 代謝産物の
関連性について**

島根医科大学医学部産科婦人科学教室
(主任:北尾 学 教授)

吉野和男 高橋健太郎 西垣 新
白井孝昭 荒木芳美 北尾 学

多嚢胞性卵巣症候群における catecholamine 代謝産

物の関連性を調べるために以下の実験をした。まず、多嚢胞性卵巣症候群と正常月経周期において、血中 LH, FSH, catecholamine 代謝産物 (adrenergic activity の指標として MHPG, dopaminergic activity の指標として DOPAC) とを比較し、次に、多嚢胞性卵巣症候群において catecholamine 代謝産物と LH/FSH 比、血中 testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone との関連性について調べた。結果として 1) 正常月経周期に比べて多嚢胞性卵巣症候群では LH と MHPG が有意に高かった。2) 多嚢胞性卵巣症候群において、MHPG と androstenedione との間には有意な正の相関関係が認められた。

(受付:昭和 62 年 10 月 28 日)

Rubin test, HSG, Laparoscopy の 卵管通過性に関する診断的意義

The Diagnostic Value of Rubin Test and Laparoscopy in the Assessment of Tubal Patency

札幌医科大学産婦人科学講座

東口 篤 司 下 谷 保 治 山 本 弘
Atsushi AZUMAGUCHI Yasuharu SHIMOYA Hiroshi YAMAMOTO
幡 洋 藤 井 美 穂 田 中 昭 一
Hiroshi HATA Miho FUJII Shoichi TANAKA
橋 本 正 淑
Masayoshi HASHIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Sapporo Medical College

昭和 51 年から 61 年の 11 年間に於いて Laparoscopy を施行した不妊症例 128 例, 243 側卵管を対象とし, Laparoscopy 所見と Rubin test, HSG の所見を比較検討した。

その結果, Laparoscopy の所見を正しいと仮定すると, HSG で通過していると診断した場合の正診率は 81.9%, 閉塞していると診断した場合の正診率は 77.3% と満足すべき数値であったが, 通過しているが癒着していると診断した場合の正診率は 42.2% と低かった。

一方 Rubin test で通過していると診断した場合の正診率は 69.4%, 閉塞していると診断した場合の正診率は 60.7% であり, 癒着型と診断した場合の正診率は 13.6% に過ぎなかった。

以上より卵管の癒着を診断する場合, Rubin test はほとんど無力で, HSG でもかなり難しく, Laparoscopy が有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 559-563, 1988)

緒 言

女性不妊症の約 40% は卵管通過障害によるといわれる¹⁾。卵管の通過性検査は X 線を用いる子宮卵管造影法 (HSG) と通気 (Rubin test) 通水などで子宮卵管内圧をモニタリングする方法、さらに Laparoscopy, Culdoscopy などの内視鏡的方法の 3 つに大別できる。これらのうち Rubin test, HSG の歴史は古く、1920 年代から広く使用されはじめ、両者とも最近まで卵管因子に対する基本的検査の双璧を成してきた。両検査の一致率についての報告もみられる²⁾。1970 年代になって Laparoscopy が婦人科領域にも導入され、現在では最も診断的価値の高い卵管検査法

として欠くことのできないものとなってきており、Laparoscopy と HSG の所見を比較する文献も多いが^{3,4,5)}、Laparoscopy と HSG, Rubin test の 3 者の一致率については報告が少ない⁶⁾。

札幌医大産婦人科不妊症外来では Rubin test, HSG に異常があったり、両者の所見が合致しない症例に Laparoscopy を施行しているが、通過性の有無のみならず卵管周囲癒着の存在などに関する Rubin test, HSG, Laparoscopy の信頼度を検討したので報告する。

対象と方法

昭和 51 年から昭和 61 年の 11 年間に於いて、

表 1 laparoscopy 施行不妊症例の年齢分布

年 齢	原 発 性	続 発 性
20-24	4	0
25-29	37	9
30-34	47	16
35-39	7	6
40-44	2	0

表 2 laparoscopy 施行例の不妊期間

不妊年数	原 発 性	続 発 性
0-1	5	0
1-2	11	4
2-3	24	7
3-4	15	4
4-5	15	4
5-	27	11

表 3 開腹手術の既往歴と laparoscopy 所見

既 往 歴	laparoscopy における異常所見	
既往歴(+)	72	
虫垂切除	34	
付属器摘除	9	
子宮外妊娠	9	
卵管形成術	9	
腹膜炎	4	
帝王切開術	2	
子宮内膜症	2	
筋腫核出術	1	
楔状切除	1	
胃切除	1	
既往歴(-)	56	
	異常所見(+)	38
	異常所見(-)	18

表 4 HSG の正診率

HSG 所見		laparoscopy 所見					計
通 過 性	癒着の有無	通 過 性	癒着なし	軽度癒着	高度癒着	水 腫	
通過 127	癒着(+)	通過	20	15	12	—	47
		閉塞	1	0	5	11	17
	癒着(-)	通過	49	7	1	—	57
		閉塞	1	2	1	2	6
閉塞 110		通過	11	7	7	—	25
		閉塞	13	5	23	44	85

表 5 Rubin test の正診率

Rubin test 所見		laparoscopy					計
		通 過 性	癒着なし	軽度癒着	高度癒着	水 腫	
正緊張 55		通過	21	14	7	—	42
		閉塞	3	1	3	6	13
高緊張 20		通過	4	3	2	—	9
		閉塞	2	1	0	8	11
れん縮 23		通過	13	1	6	—	20
		閉塞	0	0	0	3	3
癒着 22		通過	10	3	0	—	13
		閉塞	1	0	3	5	9
狭窄 4		通過	1	1	0	—	2
		閉塞	0	0	0	2	2
閉塞 61		通過	13	6	5	—	24
		閉塞	4	3	9	21	37

表 6 Rubin test, HSG, laparoscopy の一致率

Rubin test	HSG	laparoscopy	計
通過	通過	通過	72
通過	通過	閉塞	16
通過	閉塞	通過	14
通過	閉塞	閉塞	21
閉塞	通過	通過	17
閉塞	通過	閉塞	5
閉塞	閉塞	通過	5
閉塞	閉塞	閉塞	32

表 7 Rubin test, HSG における癒着所見の比較

Rubin test		HSG	
癒着通過型 22		癒着通過型	3
		非癒着通過型	10
		閉塞型	9
非癒着通過型 103		癒着通過型	40
		非癒着通過型	36
		閉塞型	27

HSG		Rubin test	
癒着通過型 61		癒着通過型	3
		非癒着通過型	41
		閉塞型	17
非癒着通過型 54		癒着通過型	10
		非癒着通過型	37
		閉塞型	7

Laparoscopy を施行した症例のうち、不妊症例 128 例の 243 側卵管を対象とした。

HSG は卵胞期に、油性製剤の Lipiodol Ultra Fluid を X 線透視下で通常 3 ~ 7 ml 使用し、24 時間後の骨盤部単純写真における造影剤の拡散および卵管内あるいは卵管周囲の残像などを参考に通過性、癒着の有無を各卵管毎に検討した。

Rubin test は同じく卵胞期にアトム M-10 型卵管通気装置を使用し、Rubin の分類に従って、正緊張通過型、高緊張通過型、れん縮型、狭窄型、癒着型、閉塞型に分類、通過音の有無から各卵管毎に診断した。

Laparoscopy は tetracaine を用いた腰椎麻酔で行なうことが多く、115 例で残りの 13 例は硬膜外麻酔

を用いた。気管内挿管による全身麻酔は全く使用しなかった。腰椎麻酔後約 20 分以上経過してから Trendelenburg 体位をとり、笑気ガスあるいは room air で気腹し、腹腔内を観察した。Laparoscopy は町田社製あるいは EDER 社製を用い、通色素はインジゴカルミンを生食で希釈して使用した。

成 績

128 例の年齢は 20 歳から 42 歳、平均 30.5 歳で、30 歳から 34 歳の症例が最も多く、97 例が原発性、31 例が続発性不妊症であった(表 1)、不妊期間は 2 - 3 年の症例が多かった(表 2)。

Laparoscopy 施行例の既往歴を検討したが、開腹手術の既往を有する症例の中で最も多いのは虫垂切除術で、過半数を占めた。Laparoscopy で卵管閉塞や卵管周囲癒着など何らかの異常所見を有する率に関しては、開腹手術の既往歴のある群とそうでない群に有意の差はなかった(表 3)。

Laparoscopy に対する HSG の正診率を検討した。Laparoscopy の所見が正しいと仮定した場合、HSG で通過していると診断した時の正診率は 81.9% (104/127)、通過し、かつ癒着していないと診断した場合の正診率は 77.8% (49/63)、通過し、かつ癒着していると診断した場合の正診率は 42.2% (27/64)、また閉塞していると診断した場合の正診率は 77.3% (85/110) であった(表 4)。

同様に Rubin test の正診率を検討した、Rubin test で通過していると診断した場合の正診率は 69.4% (86/124)、閉塞していると診断した場合の正診率は 60.7% (37/61) であり、通過し、かつ癒着していると診断した場合の正診率は 13.6% (3/22) に過ぎなかった(表 5)。

次に Rubin test, HSG, Laparoscopy の 3 者の一致率を検討した。通過性の有無に関して 3 者の所見がすべて一致したのは 57.1% (104/182)、また Rubin test, HSG のみに関する通過性の一致率は 68.7% (125/182) であった(表 6)。

Rubin test, HSG における癒着所見を比較した。まず Rubin test で癒着型を示した場合、HSG での一致率は 13.6% (3/22) であった。また逆に HSG で癒着型とした場合、Rubin test でも同様の所見が得られたのは 5.0% (3/61) にすぎなかった(表 7)。

考 案

Laparoscopy を腰椎麻酔で行なうについては異論が多い⁷⁾。その理由は第 1 に Trendelenburg 体位をとった時に麻酔域が上昇し過ぎることがあること、第

2に横隔膜挙上による換気量の減少をコントロールできないことなどである。これらの理由から現在Laparoscopyの麻酔は気管内挿管を行なった調節呼吸による全身麻酔が主流となっている。しかし一方腰椎麻酔による呼吸、循環機能の変化は生理的範囲内のものであり、必ずしも禁忌ではないとする報告もある^{8,9}。128例のうち腰麻は115例であったがtotal spinal anesthesiaを含めてLaparoscopyの操作を中断あるいは全身麻酔に切り換えざるを得なかった症例は1例もなく、Laparoscopyの麻酔法として腰椎麻酔は十分安全な方法であると考えられた。

Laparoscopyを行なう場合、麻酔下、特に腰椎麻酔下で子宮頸部の筋緊張が低下し、色素が頸管から漏出して卵管閉鎖と誤診したり、生理的な状態では高緊張あるいはれん縮状態の卵管が麻酔下に正常化してしまう可能性があるなど、必ずしも絶対的な診断技術とは限らない。しかしRubin test, HSGに比較するとLaparoscopyはより直接的に卵管の状態を観察でき、3者の中では最も診断価値の高い検査法といえる。ここではLaparoscopyの所見が正しいと仮定した場合、Rubin test, HSGがどれほど正確に卵管の状態を反映するかを検討した。

まずHSGについて、通過性の有無に関しては各々81.9%、77.3%の正診率を得た。これらは諸家の報告とほぼ一致し^{3,4,5}、満足できる数値と思われる。しかし癒着の有無に関して、HSGで癒着していないとした正診率は比較的高かったが(77.8%)、癒着していると診断した場合の正診率は42.2%と低かった。24時間後の単純写真における卵管部位の残像を過剰診断したことが原因と思われる。このような症例の中には、通過しているが癒着ありと診断し、実際には卵管水腫で閉塞しているものも多く(11/64)、通薬水をすることによって逆に卵管繊毛を萎縮させてしまう可能性が生じる。従って、HSGでの癒着所見の読影には十分注意を要すると考えられた。

Rubin testでは両側卵管の総和として内圧グラフが描かれることとなり、一方が閉塞、他方が通過している場合、通過型の結果が得られる。通過音によって通過性の有無の鑑別はある程度可能であるが、例えば片側が狭窄あるいは癒着し、他側が正常の場合などは正確な診断が不可能となる。また頸管と針子との間からの二酸化炭素の漏出が微妙に子宮卵管内圧を修飾することも実際には非常に多い。Rubin testにおける通過性の有無に関する正診率(各々69.4%、60.7%)がHSGよりかなり低いのはそれらの原因によると考えられる。器質的な異常の有無、特に癒着の有無に関する正診率は非常に低く(13.6%)、診

断的価値が全くないといっても過言ではない。現在一般的に用いられている通気法の分類は、Rubinが1946年に実証的に提唱した分類に従っている^{10,11,12}。Rubinはその実証的な分類に理論的な説明を加えてはいるが、実際の生きた卵管は複雑であり画一化はできない。Rubin testにおける機能的な異常すなわち高緊張れん縮型をHSG, Laparoscopyで確認することは難しく、また実際にはこれらの症例に通薬水や抗れん剤などを使用して妊娠させることが報告されており^{1,13}、その診断的価値を基本的に失なわせるものではないが、器質的異常、特に癒着型の診断には慎重を要すると考えられた。

文 献

- 1) 田中昭一, 山本 弘, 遠藤俊明, 幡 洋, 藤井美穂, 下谷保治, 東口篤司, 橋本正淑: 当科不妊症外来の最近10年間の臨床統計。日不妊誌, 29: 431, 1984.
- 2) 広沢 清: 描写式子宮卵管通気曲線と子宮卵管造影像との関係について。日不妊誌, 4: 158, 1959.
- 3) Hutchins, C. J.: Laparoscopy and hysterosalpingography in the assessment of tubal patency. *Obstet. Gynecol.*, 49: 325, 1977.
- 4) Philipsen, T. and Hansen, B. B.: Comparative Study of hysterosalpingography and laparoscopy in infertile patients. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 60: 149, 1981.
- 5) 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意義。慶応医学, 59: 737, 1982.
- 6) 小池皓式, 三村三喜男, 大島 勉, 小川統久, 八神喜昭: 不妊症における腹腔鏡の意義について。日不妊誌, 27: 40, 1982.
- 7) 山本 浩, 落合 寛: 現代産婦人科学大系, 7C: 129, 中山書店, 1971.
- 8) 古賀詔子, 永井 宏, 岡村けい子: 腹腔鏡と腰椎麻酔。日産婦誌, 37: 1717, 1985.
- 9) Endler, G. C., Magyar, D. M., Hayes, M. F. and Moghissi, K. S.: Use of spinal anesthesia in laparoscopy for in vitro fertilization. *Ferti. Steril.* 43: 809, 1985.
- 10) Rubin, I. C.: Uterotubal insufflation, 178, the C. V. Mosby Company, St. Louis, 1947.
- 11) Rubin, I. C.: Rhythmic contractions and peristaltic movement in the intact human fallopian tube as determined by peruterine gas insufflation and the kymograph. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 14: 557, 1927.
- 12) Rubin, I. C.: Uterotubal insufflation. *Ferti. Steril.* 5: 311, 1954.
- 13) 山本 弘, 遠藤俊明, 幡 洋, 藤井美穂, 下谷保治, 東口篤司, 佐藤卓広, 田中昭一, 橋本正淑: 当科における最近5年間の不妊症の臨床統計。日

不妊誌, 29 : 122, 1984.

**The diagnostic value of
Rubin test and laparoscopy
in the assessment of
tubal patency**

Atsushi Azumaguchi, Yasuharu Shimoya,
Hiroshi Yamamoto, Hiroshi Hata,
Miho Fujii, Shoichi Tanaka
and Masayoshi Hashimoto

Department of Obstetrics and
Gynecology, Sapporo Medical
College, Sapporo

The diagnostic value of Rubin test, HSG and laparoscopy was evaluated in 128 infertile patients during the past 11 years.

Tubal patencies and obstructions were detected by laparoscopy in 81.9% and 77.3%, respectively where they were demonstrated by HSG. However HSG findings of tubal adhesion were detected only in 42.2% by laparoscopy. Tubal patencies and obstructions were detected by laparoscopy in 69.4% and 60.7%, respectively where they were demonstrated by Rubin test. However Rubin test findings of tubal adhesion were detected only in 13.6% by laparoscopy. We could conclude that diagnostic value of Rubin test was very low concerning tubal adhesion comparing with that of laparoscopy.

(受付 : 昭和 62 年 10 月 16 日)

卵管通過性に関する通気検査, 子宮卵管造影, 腹腔鏡検査の比較検討

A Comparative Study of Tubal Insufflation, Hysterosalpingography and Laparoscopy in the Diagnosis of Tubal Patency

大阪大学医学部産科婦人科学教室

亀田 隆	鮫島 義弘	信永 敏克
Takashi KAMEDA	Yoshihiro SAMEJIMA	Toshikatsu NOBUNAGA
加藤 宗寛	東 千尋	松崎 昇
Munehiko KATO	Chihiro AZUMA	Noboru MATSUZAKI
根来 孝夫	佐治 文隆	谷澤 修
Takao NEGORO	Fumitaka SAJI	Osamu TANIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka University Medical School
(Director: Prof. O. Tanizawa)

不妊婦人 55 名について laparoscopy を用いて色素通水検査を行い Rubin test および HSG による卵管通過性と比較検討を行った。laparoscopy により 17 例 (55%) が卵管の異常を有していた。Rubin test, HSG と laparoscopy との卵管通過性の不一致率は 40% と高かった。さらに laparoscopy と比較して Rubin test の false positive は 44%, false negative は 34% 認められ, HSG の false positive は 23%, false negative は 43% に認められた。HSG は false positive の率が Rubin test より低いことから卵管通過性の screening 検査として Rubin test より有用と考えられた。しかし, laparoscopy は正しい卵管通過性の判定ができるだけでなく, Rubin test や HSG では見い出せなかった卵管周囲癒着などの発見に極めて有用であることから特に長期の不妊婦人に欠くことのできない検査と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 564-568, 1988)

緒 言

卵管通過性検査は不妊検査のうちで最も重要な検査の 1 つであり, 不妊婦人の 25~50% に卵管通過性の異常があると言われている。一般に卵管通過性検査には卵管通気検査 (以下 Rubin test), 子宮卵管造影 (以下 HSG) が知られているが, 近年腹腔鏡検査 (以下 laparoscopy) による色素通水検査が広く行われるようになってきた。これらの検査法には各々長所と短所があり, その卵管通過性検査の成績は施設により異なる事も少なくない。しかしこれら卵管通

過性検査の中でも laparoscopy を用いた色素通水検査法は Rubin test や HSG に比較して最も確実な方法と言われている。

今回我々は 55 名の不妊婦人に施行された Rubin test, HSG, laparoscopy の卵管通過性検査成績の比較検討を行った。

対 象

対象は昭和 59 年 10 月より昭和 62 年 5 月までの 2 年 8 カ月の間に laparoscopy を施行した 55 名の不妊婦人である。55 名の不妊婦人の平均年齢は 32.5 ± 4.0

歳, 平均不妊期間 6.1±3.2 年, 平均不妊治療期間は 2.6±2.2 年, 原発性不妊 45 名 (82%), 続発性不妊 10 名 (18%) である。

方 法

Rubin test は炭酸ガスを用いた自動通気装置を使用して月経開始後 10 日以内で出血のない時期に施行した。卵管通過性の診断はキモグラフ, 下腹部聴診所見および横隔膜刺激による肩甲部痛によって判断した。

HSG は月経開始後 10 日以内で出血のない時期に施行した。子宮通水器および通水固定具を装着後, 水性造影剤である Endografin (日本シェーリング) を用手的に注入した。卵管通過性の診断は透視下およびレントゲンフィルムでの腹腔内漏出像で判断した。

また Rubin test, HSG の施行 20 分前に卵管攣縮を考慮し副交感神経遮断剤であるブスコパン注 (ペーリンガー) を患者に投与している。

laparoscopy は入院の上行われている。麻酔は全例挿管による全身麻酔 (GOE) を施行した。laparoscopy は Hasson 式 open laparoscopy を使用した¹⁾。open laparoscopy とは臍下 1 cm に小切開を加え, 筋膜および腹膜を切開し腹腔内に達した事を確認した上で, 気腹針も兼ね備えた腹腔鏡外套管を挿入する方法を言う。卵管通過性の診断は, 生理食塩水にて 10 倍に希釈したインジゴカルミンを子宮腔部固定した通水器より用手的に注入し, 卵管采よりの漏出をもって通過性ありと診断した。腹腔内の観察は, 常時小型テレビカメラを用いてモニターテレビにより行い, ビデオ録画によりその客観性と再現性に努めた。

3 つの卵管通過性検査は Rubin test, HSG, laparoscopy の順に, いずれも 6 か月以内のほぼ同時期に施行している。

結 果

1. laparoscopy の主適応とその診断

表 1 laparoscopy の主適応

	n	%
原因不明不妊	27	49
両側卵管閉塞	13	24
卵管周囲癒着	9	16
子宮内膜症	6	11
計	55	100

表 2 laparoscopy による診断

	n	%
卵管の異常	37#	55
子宮内膜症	19	28
原因不明不妊	10	15
子宮筋腫	1	2
計	67	100

子宮内膜症による卵管の異常も含む

表 3 laparoscopy による色素通水検査と Rubin test 及び HSG の卵管通過性の比較

	一致		不一致	
	n	%	n	%
Rubin test	28/44	64	16/44	36
HSG	33/53	62	20/53	38

表 4 Rubin test, HSG 及び laparoscopy における卵管通過性の比較

	Rubin test		HSG	
	laparoscopy n	%	laparoscopy n	%
false positive	4/9	44	3/13	23
false negative	12/35	34	17/40	43

表 5 laparoscopy と Rubin test との卵管通過性の比較

	laparoscopy の卵管通過性		
	(+)	(-)	計
Rubin test の (+)	23	4	27
卵管通過性 (-)	12	5	17
計	35	9	44

表 6 laparoscopy と HSG との卵管通過性の比較

	laparoscopy の卵管通過性		
	(+)	(-)	計
HSG の (+)	23	3	26
卵管通過性 (-)	17	10	27
計	40	13	53

55名の不妊婦人においてlaparoscopy前後の不妊原因のうちで最も大きな割合を占めていたのは、卵管の異常であった。55名の不妊婦人のlaparoscopyの主適応から何等かの卵管の異常を伴うと考えられたのは、両側卵管閉塞13例および卵管周囲癒着9例を合わせた22例であり、全体の40%を占めていた(表1)。laparoscopyによる診断の内訳は、表2に示す。卵管閉塞、卵管水腫、卵管周囲癒着などの何等かの卵管の異常が判明した例は、37例55%に認められた。またこの37例のうちで、12例は子宮内膜症に合併したものであった(表2)。

2. 卵管通過性検査の比較

55名の不妊婦人のうち、Rubin testは44名(80%)に、HSG(96%)およびlaparoscopyは55名(100%)全員に施行された。

卵管通過性に関して、Rubin testとlaparoscopyの一致例は28例(64%)、HSGとlaparoscopyの一致例は、33例(62%)であった(表3)。逆に卵管通過性検査の不一致率は、Rubin testとlaparoscopyの間で16例(36%)、HSGとlaparoscopyの間で20例(38%)であった。従ってRubin testやHSGとlaparoscopyとの間の卵管通過性は一致率および不一致率に相違を認めなかった。

さらに卵管通過性の不一致例に関するfalse positiveおよびfalse negativeについて検討を行った(表4, 5, 6)。ここで述べるfalse positiveとは、先に行われたRubin testあるいはHSGにおいて卵管通過性があると診断されたにもかかわらず、後に行われたlaparoscopyにおいて卵管通過性を認めなかった例をさす。またfalse negativeとは先に行われた検査において卵管通過性がないと診断されたにもかかわらず、後に行われたlaparoscopyにおいて卵管通過性を認めた例をさす。卵管通過性検査の不一致例の例数について、Rubin testとHSGとの間で比較を行った。Rubin testにおける成績は、false negativeが12例認められ、false positiveは4例であった。一方HSGにおける成績は、false negativeが17例、false positiveは3例であった。従って例数に関しては、Rubin testおよびHSGともにfalse negativeが多かった。しかしfalse positiveおよびfalse negativeをその百分率でみた場合、Rubin testはHSGとでは異なる結果を示していた。すなわち、false positiveは、Rubin testで44%にもものぼる割合であったが、HSGでは23%にすぎなかった。false negativeはRubin testで34%、HSGでは43%もの割合であった。従って卵管通過性の不一致例に関してRubin testではfalse positiveがやや多い。し

かしHSGではfalse negativeが多くfalse positiveは少ないことが判明した。

考 察

女性側の不妊原因として卵管の異常は、25~50%を占めると報告されている^{2,3,4,5}。一般に卵管通過性検査として、Rubin testやHSGが施行されているが、laparoscopyによる色素通水検査との間に診断の異なることが少なくない。今回はRubin test, HSGおよびlaparoscopyを施行した不妊症例の卵管通過性について比較検討を行った。その結果、Rubin testおよびHSG共にlaparoscopyとの一致率は約60%にすぎず、不一致率は約40%もの大きな割合であった。laparoscopyによる卵管通過性の確認に関しては、我々と同様に門田(1979)は通水診断との比較で68%、HSGとの比較で66%の一致率⁶⁾、小池ら(1982)はHSGとの比較で76%の一致率⁷⁾、Riceら(1986)はHSGとの比較で44%の一致率であったと報告している⁸⁾。報告により成績に多少の差があるものの、いずれの報告もRubin test, HSG通水検査だけでは、十分に卵管通過性を確認しえないという点で一致している。つまりRubin testやHSGで高度の卵管通過障害があると診断されても、実際にはマイクロサージャリーやIVF-ETなどの治療決定をこれらの所見のみで行うのは危険であると言える。従ってRubin testやHSGで高度の卵管通過障害があると診断された場合、まずlaparoscopyでその卵管所見を十分に把握した上で、治療方針を決定する事が重要と考えられる。

Rubin testやHSGの卵管通過性がlaparoscopyのそれと大きく異なる原因は明かではないが、我々の症例についてはlaparoscopyにおける全身麻酔の影響を無視できない。全身麻酔を行うことで全身および卵管の緊張を除くだけでなく、造影剤の直接刺激や注入する圧による痛みを除き卵管攣縮の発生を防ぐことができる。事実全身麻酔下にて施行されたHSGの所見はlaparoscopyのものと同様によく一致したという報告がなされている⁹⁾。その理由として卵管間質部の括約筋の緊張が麻酔によって除かれることが予測される⁹⁾。

Rubin testおよびHSGとlaparoscopyとの不一致例の検討からHSGではfalse positiveが少ないことが明らかとなった。Rubin testではfalse positiveが44%とfalse negativeの34%とほぼ同じであったが、逆にHSGではfalse negativeが43%とfalse positiveの23%より明らかに多かった。この成績は1986年にWHOが8施設で393名の不妊患者を対象に行

った Rubin test, HSG, laparoscopy の比較検討成績と一致したものであった¹²⁾。これによると Rubin test では false positive が 35% で false negative の 38% と同じぐらいの値であったが, HSG では false negative が 45% あり false positive の 9% を大きく上まわった。またこの中で HSG と laparoscopy の卵管通過性の一致したのは, 125 名の不妊婦人のうち 55% にすぎなかったと報告している。また同様に Gabos (1976) も HSG と laparoscopy の比較で, false negative (20%) が false positive (8%) より多いと報告している¹⁰⁾。

この様な HSG における false positive が false negative より少ない原因について, 2 つのことが考えられる。1 つは HSG で使用する造影剤は粘稠度が, 高いことがあげられる。Endografin は炭酸ガスやインジゴカルミンに比べて粘稠度が高く卵管を通過しにくい場合が考えられる。つまり粘稠度が高いために卵管狭窄や卵管攣縮がおこった場合, 通過しにくいと思われる。もう 1 つの原因は HSG はレントゲンによる腹腔内漏出像というはっきりした直接所見で診断していることから, false positive と判定することは少ないと考えられる。いずれの理由によって false positive が false negative より少ないのかは不明である。Rubin test と HSG の不妊検査としての有用性に関して, 今回の比較成績からだけでは優劣をつけることは難しい。しかし本研究結果から, 卵管通過性検査としては HSG の方が Rubin test より優れていると結論される。しかも HSG は Rubin test にはない子宮内腔描出, 卵管通過性の左右差の確認および卵管通過の判定などのさまざまな優れた特徴を有している。一方 Rubin test は, 手軽に反復実施可能な利点を有するが, 判定の信頼性に疑問をもつものも多い¹¹⁾, また同様の点から screening 検査として行うことに疑問視するむきもある¹²⁾。いずれにしても卵管通過性の決定的な確認は, laparoscopy によってなされるべきであり, 不妊検査として laparoscopy の積極的な活用が望まれる。

結 論

不妊婦人 55 名の Rubin test および HSG の卵管通過性と laparoscopy による色素通水検査とを比較し検討をおこなった。

1. laparoscopy により 37 例 (55%) が卵管の異常を有していた。
2. Rubin test および HSG と laparoscopy の卵管通過性の一致率はともに約 60%, 不一致率は約 40% であった。

3. HSG では false positive の率がその false negative や Rubin test の false positive や false negative より低かった。
4. 長期の不妊治療を行う上で Rubin test および HSG だけでなく laparoscopy 施行により卵管所見を確認する事が必要と考えられた。

文 献

- 1) Hasson, H. M.: A modified instrument and method for laparoscopy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 110: 886, 1971.
- 2) 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: 737, 1982.
- 3) Moghissi, K. S. and Sim, C. S.: Correlation between hysterosalpingography and pelvic endoscopy for the evaluation of tubal factor. *Fertil. Steril.*, 26: 117 8, 1975.
- 4) Philipsen, T. and Hansen, B. B.: Comparative study of hysterosalpingography and laparoscopy in infertile patients. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 60: 149, 1981.
- 5) 百瀬和夫, 向井治文: 卵管疎通性検査法, *産婦治療*, 51: 20, 1985.
- 6) 門田 徹, 松岡幸一郎: 卵管機能検査法, *産と婦*, 46: 1425, 1979.
- 7) 小池皓式, 三村三喜男, 大嶋 勉, 小川続久, 八神喜昭: 不妊症における腹腔鏡検査の意義について, *日不妊会誌*, 27: 40, 1982
- 8) Rice, J. P., London, S. N. and Olive, D. L.: Reevaluation of hysterosalpingography in infertility investigation. *Obstet. Gynecol.*, 67: 718, 1986.
- 9) Hutchins, C. J.: Laparoscopy and hysterosalpingography in the assessment of tubal patency. *Obstet. Gynecol.*, 49: 425, 1977.
- 10) Gabos, p.: A comparison of hysterosalpingography and endoscopy in evaluation of tubal function in infertile women. *Fertil. Steril.*, 27: 238, 1976.
- 11) 百瀬和夫: 不妊症と卵管異常, *臨産婦*, 38: 119, 1984.
- 12) World Health Organization: Comparative trial of tubal insufflation, hysterosalpingography and laparoscopy with dye hydrotubation for assessment of tubal patency. *Fertil. Steril.*, 46: 1101, 1986.

A comparative study of tubal insufflation, hysterosalpingography and laparoscopy in the diagnosis of tubal patency

Takashi Kameda, Yoshihiro Samejima,
Toshikatsu Nobunaga, Munehiro Kato,
Chihiro Azuma, Noboru Matsuzaki,
Takao Negoro, Fumitaka Saji
and Osamu Tanizawa

Department of Obstetrics
and Gynecology, Osaka
University Medical School
(Director: Prof. O. Tanizawa)

We used laparoscopy with dye hydrotubation to evaluate tubal findings in 55 infertile patients and compared with the results of tubal insufflation and hysterosalpingography. Laparoscopy showed 37 women (55%) to have tubal abnormalities including

tubal occlusion, hydrosalpinx and peritubal adhesions. Patency was proven positive in 61% of insufflation, 49% of hysterosalpingography and 75% of laparoscopy cases. Comparison of insufflation and laparoscopy showed a false-positive rate of 44% and a false-negative rate of 34% in 44 cases. The false-positive rate of hysterosalpingography versus laparoscopy was 23% and the false-negative rate was 43% of 53 cases. The results suggest that gaseous tubal insufflation is grossly inaccurate for tubal patency. Diagnostic reliability of hysterosalpingography is poor, but it is useful as a primary screening method. Laparoscopy with dye hydrotubation is an optimum method for assessing tubal patency as well as other intrapelvic diseases.

(受付: 昭和 62 年 12 月 16 日)

非イオン化水溶性造影剤による 子宮卵管造影法の試み

Clinical Evaluation of Low-osmotic Non-ionic Contrast Medium for Hysterosalpingography

東邦大学医学部第1産婦人科学教室

松島 弘 充 浅川 真 也 子 谷 垣 学
Hiromitsu MATSUSHIMA Mayako ASAKAWA Manabu TANIGAKI
古川 隆 正 齊 藤 真 一 百 瀬 和 夫
Takamasa FURUKAWA Shinichi SAITO Kazuo MOMOSE

1st Dep. Obstet. Gynec.,
Toho Univ., School of Med.

子宮卵管造影法 (HSG) に非イオン化・低浸透圧性造影剤イオパミドールを使用し、その造影能と副作用を従来の造影剤エンドグラフィンと比較検討した。

HSGの対象は84例で、そのうち不妊症の卵管疎通性判定が62例(74%)、子宮筋腫・下腹部腫瘍が17例(20%)、その他(6%)であった。

造影能は従来のものと差はなく、優れており、子宮像、卵管像、腹腔内流入像、いずれも明瞭に描出されており、満足すべき成績であった。

また副作用も少なく、中等度以上の症状を呈した症例は、84例中1例のみであり、従来の造影剤と明らかな差が認められた。

非イオン化水溶性造影剤は、今後、婦人科診断技術の向上と安全性の面で極めて有用と思われた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 569-573, 1988)

緒 言

子宮卵管造影法 (HSG) が婦人科領域に導入されてから、すでに半世紀を越えているが、その歴史は造影剤開発の歴史といっても差支えない。なかでも水溶性造影剤は第1世代、第2世代(トリヨード)と発展し、現在の第3世代に至っている(表1)。

今回われわれは最近、血管造影に用いられている造影剤イオパミドール(市販名:イオパミロン)をHSGに応用し、その副作用、造影効果などについて検討したので報告する。

1. 造影剤の歴史

当初、HSGには単純なヨード剤が用いられ、これが余りに刺激が強いため、間もなくヨード油に代わった。しかし、これは植物油のため吸収が遅く、

数年も体内に停滞するための障害も報告され(表2)、第2世代というべき有機ヨード剤(トリヨード)が登場した。

これらの水溶性剤は吸収されやすく、血管に入っても安全であり、さらに粘稠度も低く、通過性が良いという長所があるが、その一方で腹膜刺激症状が強く、術後の疼痛や発熱がしばしば認められたり、吸収性が良いため逆に腹腔内の癒着の判定が難しいといった欠点がある(表3)。

注入器具の洗浄・滅菌の容易さからいっても、局所の刺激さえなければ、水溶性剤の方が使いやすいが、現在もっとも汎用されているエンドグラフィンが登場してから、すでに30年を越え、その間にも副作用の少ない、より安全で、造影能の優れた理想的造影剤が追求され、ここに第3世代ともいべき造

表1 ヨード造影剤の歴史

世代	化学的分類		成分名 (年度)
第1世代	無機ヨード	イオン性	sodium iodine (1923)
	モノヨード		Uroselectan (1929)
	シヨード		Per-Abrosil (1932)
第2世代	有機ヨード	イオン性	acetrizoate (1950)
			diatrizoate (1954)
			metrizoate (1961)
			iothalamate (1962)
			iodamide (1965)
第3世代	トリヨード	非イオン性	ioxaglate (1975)
		低浸透圧	metrizamide (1972)
			iopamidol (1977)

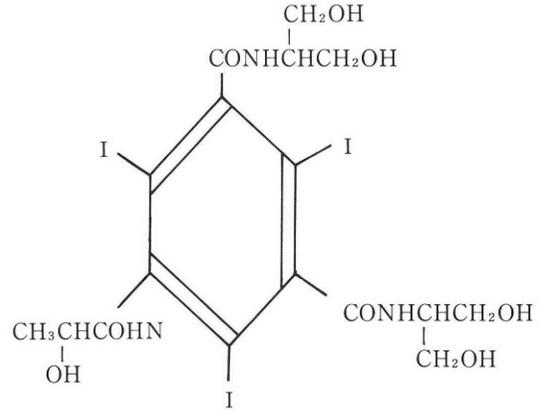


図1 イオパミドールの構造式

表4 イオパミドールの物性

分子量	777.1
ヨード濃度 (mgI/ml)	300
浸透圧比 (対生食比)	2.1
粘稠度 (cps 37℃)	4.7
PH	6.5~7.5

表2 油性剤 (Moiiodol, LipiodolUF, Popiodol) の特徴

- 長所 i) 造影能が優れている
 ii) 局所の刺激性が少ない
 iii) 吸収が緩徐で、残像撮影は1~7日後でも鮮明である
- 短所 i) 粘稠度はやや高く、見かけの卵管閉塞となりやすい (ただしエステル化ヨード油は水溶性と大差ない)
 ii) 吸収され難いため閉塞部位に長期間停滞し、異物肉芽腫を生ずることがある
 iii) 血管内に大量流入すれば肺栓塞などの危険がある

表5 イオパミロンによる HSG の対象

不妊	62例
子宮筋腫	11
卵巣腫瘤疑	6
月経異常 その他	5
計	84

表3 水溶性剤 (Sugiuron, Pyroceton, Urokolon, Endografin) の特徴

- 長所 i) 粘稠度が低く、通過性がよい
 ii) 吸収されやすい (10~30分)
 iii) 親水性で、血管内に入っても安全である
- 短所 i) 局所の刺激性が強い、術後の腹痛、発熱がしばしばみられる
 ii) 通過性が良好すぎ、吸収が早いため診断がやや難しい、ことに腹腔内癒着の判定には不利である

表6 HSG における造影効果の判定基準

コントラスト	診断	判定
良好	容易	卅
やや劣る	比較的容易	卅
劣る	可能	十
不良	不能	一

表7 不妊患者における HSG の造影効果

	子宮	卵管	腹腔内流入
卅	49(79.0%)	36(58.1%)	14(22.6%)
卅	12(19.4%)	20(32.3%)	25(40.3%)
十	1	5(8.1%)	19(30.6%)
一	0	1	4(6.5%)

表8 子宮筋腫・下腹部腫瘍における造影効果

	子宮	卵管	腹腔内流入
卅	8(47.1%)	3(17.6%)	0
++	8(47.1%)	9(52.9%)	2(11.8%)
+	1(5.8%)	3(17.6%)	11(64.7%)
—	0	2(11.6%)	4(23.5%)

検査対象

今回われわれが行なったイオパミドールによるHSGの対象は84例で、そのうち不妊症の卵管疎通性の判定が62例(74%)と大部分を占めている(表5)。

イオパミドールは粘稠度が低いため(エンドグラフィンの1/5程度)、透視しながら注入するとか、特に頸管から洩れない注意をするという手技上の工夫を必要とする。

つぎにHSGにおける造影効果を、コントラスト良好で診断容易な(卅)から、コントラストが得られず診断不能とされる(—)まで、4段階に分けて判定した(表6)。

成績

不妊症の62例では、子宮像は全例でほぼ完全な造影効果が得られ、子宮容量が大きくて卵管内に充分量の造影剤が入らなかった1例を除けば、卵管像もきれいに出現した(表7)。

腹腔内流入像では、4例(6.5%)で判定不能であったが、卵管疎通性の診断に関しては、ほぼ満足すべき結果が得られた。

子宮筋腫・下腹部腫瘍におけるHSG 17例についても、従来のエンドクラフィンと比べて、全く遜色のない造影効果が得られ(表8)、その診断の一部は、開腹・ラパロスコピーなどで確認された。

今回イオパミドールによる造影後の副作用は、術後PIDを合併した筋腫核出術後の1例にすぎず、従来の造影剤エンドクラフィンと明らかな差が認められた。

症例

症例1: 31歳・原発不妊1年(写真1)

イオパミドール4ml注入直後、子宮の形態、卵管疎通性、腹腔内流入像、いずれも明瞭に描出されており、造影能(卅)、正常と判定した。

症例2: 29歳・原発不妊1年(写真2)

強い月経痛でボンゾール療法を受けている。イオパミドール6ml注入直後では、子宮はやや右側にねじれ、左右卵管は挙上している。残像では腹腔内に流入した造影剤が停滞し、周囲癒着が疑われた。この症例は1カ月後のラパロスコピーで、子宮内膜症、両側卵巣チョコレート嚢腫と診断された。

考察

HSGが婦人科領域に導入されてから、より鮮明な影像を得るために、さまざまな努力がなされてき

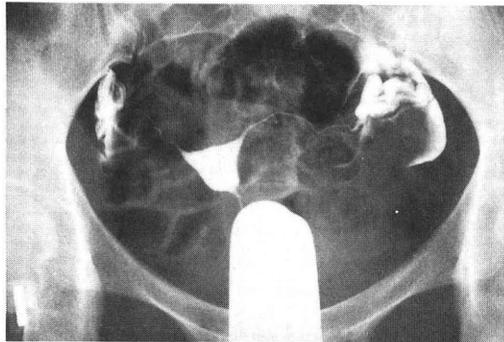


写真1

症例1: イオパミドール4ml注入直後

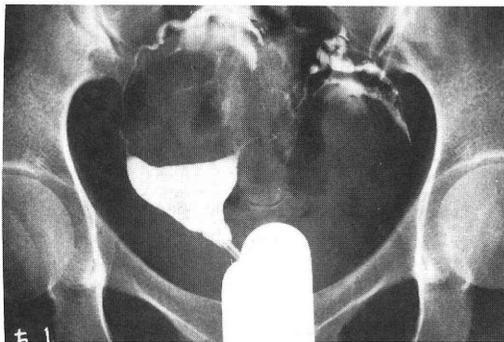


写真2

症例2: イオパミドール6ml注入直後

影剤(非イオン性、低浸透圧性)が登場した。

2. イオパミドール

イオパミドールは3ヨード・ベンゼン環を核とし、構造上の特徴として、側鎖に強力な親水性置換基を有し、ベンゼン環をマスクしている(図1)。

疎水基をマスクした立体構造とすることにより、非イオン化、水溶性で、かつ生物学的活性が低減し、浸透圧は従来の造影剤の約1/3(対生食比2.1)、粘稠度は4.7(cps 37°C)と低くなっている(表4)。

表9 造影剤副作用の重症度による分類
(Ansell, G. による)

軽 症	中等度	重症死亡
嘔 気	失 神	重篤な循環障害
軽い嘔吐	激しい嘔吐	意 識 消 失
熱 感	気管支痙攣	肺 浮 腫
軽い蕁麻疹	広汎な蕁麻疹	心 停 止
発 汗	呼吸困難	不 整 脈
痒 疹	頭 痛	
上腕痛	胸痛・腹痛	
	顔面浮腫	
	硬 直	

ており、特に造影剤の開発の影響は著しい。第1世代、第2世代(トリヨード)と造影剤は改良され²⁾、現在一般に使用されている造影剤は、造影効果が良好で、重大な副作用も少なくなっている。

しかし造影剤による副作用は幾つかあり、発生機序が不明のものもあるが、Ansell³⁾は造影剤のもつ特性から副作用の症状を表9のように分類している。婦人科領域だけでなく、他科におけるMyelography, Tomography, Digital Subtraction Angiography, Excretory Urographyなどにおいても、その使用頻度が著しく増加している一方で、水溶性造影剤による種々の副作用が問題となっている。

造影剤による自・他覚的副作用の発生には、高浸透圧性、非親水性が強く関与しているが、今回使用したイオパミドールは非イオン化、低浸透圧性で、従来の造影剤の約1/3になっており、合併症例はPIDを合併した1例のみであった。既往のエンドグラフィンによるHSG施行後に、疼痛・発熱・腹痛などの症状が認められた症例においても、今回のイオパミドールでは副作用は認められず、その有用性が感じられた。

また氷見・阿部ら³⁾によると、心血管造影における副作用は、従来の造影剤より非イオン化剤では有意に低下し、徳永ら⁴⁾によると、排泄性尿路造影においても副作用が減少しており、本剤は合併疾患のある患者にHSGを行なう上でも、安全性が高いと評価できる。

造影能に関しては、イオパミドールは粘稠度が低いため、HSGでは頸管から造影剤が洩れやすい点にとくに注意すれば、従来の水溶性造影剤(エンドグラフィン)と変わりなく、判定上の問題はないように思われる。

すなわちイオパミドールは造影能に優れ、排泄も

早く、安全性が高いが、今後の問題としては、かなり高価である点と、ハロゲン化したベンゼン環の化学毒性やアレルギー性反応など、第3世代の造影剤の特性からくる副作用については、さらに症例を重ね検討していく必要があろう。

(本論文要旨は、第97回日本不妊学会関東地方部会例会—東京において発表した。

イオパミドールによる造影に技術的協力をいただいた本学大森病院中央放射線部、資料を提供された日本シェーリング株式会社に感謝します。)

文 献

- 1) 百瀬和夫, 江口貞雄: 子宮卵管造影法, 注入圧曲線の作製とその実際, 中外医学社, :1965.
- 2) 片山 仁: 非イオン性造影剤の時を迎えて, 総論, 日独医報, 31: 438, 1986.
- 3) 氷見和久, 阿部博幸: 造影剤の心・循環器系への影響, 日独医報, 31: 470, 1986.
- 4) 徳永 仰, ほか, : 排泄性尿路造影におけるiopamidolの臨床評価, 日独医報, 31: 552, 1986.
- 5) Ansell, G.: Adverse reactions to contrast agents, Invest. Radiol., 5: 374, 1970.
- 6) Winfield, A. C. and Maxson, W. S.: Hexabrix as a contrast agent for hysterosalpingography, Invest. Radiol, 19: 389, 1984.
- 7) Claub, W.: The suitability of iopronide for hysterosalpingography, Pharma Research Report 5795: 762, 1984.
- 8) Rusell, J. G. and Maquire, B. G.: Metrizamide in hysterosalpingography, Brit. J. Radiol., 52: 421, 1979.
- 9) Gabriel, S. and Erik, A.: Hysterosalpingography with Amipaque, work in progress, 130: 795, 1979.

Clinical evaluation of low-osmotic non-ionic contrast medium for hysterosalpingography

Hiromitsu Matsushima, Mayako Asakawa,
Manabu Tanigaki, Takamasa Furukawa,
Shinichi Saito and Kazuo Momose

1st Dep. Obstet.
Gynec., Toho Univ.,
School of Med.

As for the hysterosalpingography we studied the ability of X-ray visualization and its reaction when a new lowosmotic, non-ionic contrast medium

(Iopamidol) was used instead of the older type of media (Endografin, et al.).

The total cases of HSG were 84, and in that numbers, 62 cases (74%) were sterility, 17 cases (20%) were uterine myoma or lower abdominal mass, others were 5 cases (6%). There was no difference in the ability of X-ray visualization comparing with the older one, and the hystero-gram, salpingogram, intraperitoneal spill were very good

and clear.

Furthermore, there was the great difference comparing with older medium in reaction. The only one case of adverse reaction was PID in a sterile patient after myomectomy 2 years ago.

It was concluded that Iopamidol will be the more useful contrast medium for HSG.

(受付 昭和63年3月16日特掲)

当科における卵管マイクロサージャリーの 術式別治療成績の検討

An Analysis of the Results after Microsurgical Tubosurgery in our Clinic.

東北大学医学部産婦人科

斉藤佳孝 戸沢秀夫 深谷孝夫
Yoshitaka SAITO Hideo TOZAWA Takao FUKAYA
星合 昊 矢嶋 聡
Hiroshi HOSHIAI Akira YAJIMA

Department of Obstetrics & Gynecology,
Tohoku University School of Medicine.

マイクロサージャリーを行った卵管性不妊患者の術式と妊娠率及び術後妊娠までの期間について報告した。

術後2年間以上 follow up できた125例のうち、34例(27%)が妊娠した。そのうち5例が子宮外妊娠、5例が自然流産、1例が胎状奇胎妊娠で、残りの23例(18%)が現在妊娠中(12週以上)を含めた正常妊娠経過例であった。全妊娠例中、術後1年以内の妊娠例は16例(47%)、2年以内のそれは30例(88%)であった。また、術後2年以上経過してから妊娠した4例は、全て正常妊娠例であった。

術式別にみると、付属器に限定した癒着を剥離した後の妊娠例8例全てが術後1年半以内に妊娠している。一方、卵管開口術・卵管采形成術後の妊娠は全て、術後半年以上経過してからの妊娠例であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 574-578, 1988)

緒 言

当科では1982年6月よりマイクロサージャリーを導入し、関連病院の症例を含めて現在までに約250人の患者に手術を施行した。このうち1985年7月までの3年2ヶ月の間に手術を行った最低2年間の follow up を経た125例の術式と妊娠率及び術後妊娠までの期間について検討を加えたので報告する。

対象および方法

1982年6月から1985年7月までの間に東北大学医学部付属病院および関連病院で、卵管性不妊のためにマイクロサージャリーを行った125例を対象とした。既往妊娠歴で分類すると、原発不妊68例(54%)、

続発不妊53例(42%)および妊娠歴不明4例(3%)であった(表1)。続発不妊中O子不妊の内容は、人工妊娠中絶後17例、自然流産早産後11例、子宮外妊娠後9例で、また、続発不妊の中には卵管結紮後の再疎通が3例含まれていた。

術式の分類は1980年のInternational Federation of Fertility and Sterility (IFFS)の分類¹⁾に従った。すなわち1)付属器に限定した癒着剥離術、2)(1)以上の癒着剥離術、3)卵管移植術、4)卵管吻合術、5)卵管開口術、6)卵管采形成術、7)その他、8)Combination、を大分類とした。小分類もIFFS分類に準じた。

手術効果の判定は、原則として術後6カ月経過しても妊娠しない症例には子宮卵管造影を行い、さら

表1 Microsurgeryによる卵管形成術を受けた患者の既往妊娠歴別分類
全125例(東北大:S57.6~S60.7)

1) 原発不妊	68	(54%)
2) 続発不妊	53	(42%)
0子不妊	37	(70%)
人工中絶後	(17)	
自然流産後	(11)	
子宮外妊娠後	(9)	
1子不妊	9	(17%)
2子不妊	6	(11%)
4子不妊	1	(2%)
3) 不明	4	(3%)
	125	(100%)

に術後1年経過しても妊娠しない症例にはSecond look laparoscopyを行って、術前との比較によって手術の有効性を評価した。これによって妊娠可能と判定されたものと妊娠したものを加えた総数を有効例数とし、残りを無効例数とした。follow upできなかった症例は“来院せず”に分類した。

子宮外妊娠、自然流産、胎状奇胎妊娠、等を含めてtotalの妊娠率とした。正常分娩に至った例及び妊娠継続中(妊娠12週以上)の症例を合わせたものを正常妊娠率として、1987年7月現在の数で表した(表2)。

結 果

125例中、34例(27%)が妊娠し、そのうち23例(18%)が現在妊娠中を含めた正常妊娠であった。全体の有効率は49%(125例中61例)で、無効及び来院せずが51%(64例)であった。

次に術式別の成績をみると、付属器に限定した癒着剥離術23例のうち、妊娠例は8例で、有効率は57%であった。これを程度に従って分けると、中等症での妊娠が6例(6/17)と重症例でのそれが2例(2/6)となる。付属器以上の癒着剥離術を行ったものは、中等症2例、重症14例で、そのうち妊娠したものは、中等症1、重症2例の計3例(19%)であった。有効率は全体として31%で、重症例に限れば21%であった。重症例中で妊娠したもののうち1例は、A I Hによって妊娠した胎状奇胎である。また、もう1例はヒト硬膜を用いて腹膜形成術を施行した症例である(表3)。

卵管吻合術の成績は表4に示した通りである。間質部—峡部吻合術では18例中3例が妊娠し、有効例は7例であった。間質部—膨大部吻合術では5例中妊娠したものは無く、有効例も無かった。峡部—峡

部吻合術では5例中妊娠例が1例で、有効例は3例であった。峡部—膨大部吻合術では2例中1例が妊娠し、有効例は2例であった。左右で異なった吻合術を施行したコンビネーションは5例中3例が妊娠し、有効例も3例であった。膨大部—膨大部吻合術と、膨大部—采部吻合術は、1例もなかった。吻合術全体では、妊娠例が35例中8例(23%)、有効例が15例(42%)であった(表4)。

卵管開口術の成績は、采部開口術では26例中8例(31%)が妊娠したが、その他は合計9例中1例も妊娠しなかった(表5)。

卵管采部形成術では軽度のもので2例妊娠した(表6)。

その他の術式では、子宮外妊娠に保存的手術を行ったものが2例で、どちらも峡部—膨大部吻合を行い、うち1例にはメソトレキセート療法を追加した。2例とも妊娠したがどちらも反復子宮外妊娠であった。Webster-Baldy法^{2,3)}も1例に施行し生児を得ている(表7)。

妊娠した症例を術式別に術後、妊娠までの期間でみると、全妊娠例中、術後1年以内に妊娠したものは、16例(47%)、2年以内とすると30例(88%)であった。また、2年以上経過してから妊娠したものは、全例正常妊娠であった。個々の術式別に見ると、付属器に限定した癒着剥離術後の妊娠は全て術後1年半の間に集中している。一方、卵管開口術、卵管采形成術後の妊娠は総て術後半年以上経過してからのものであった(表8)。

考 察

近年本邦においても卵管性不妊の治療としてマイクロサージャリーによる卵管形成術がひろく行われるようになった。治療成績に関しても、欧米諸家の報告^{4,5)}とほぼ近似したものが得られるようになってきた^{6,7)}。

今回の我々の成績は、既に述べたようであり、必ずしも良いとはいえない。ことに、重症例でのそれは低く、したがって手術適応及び術式の選択に関しては、検討の余地がある。たとえば、付属器以上の癒着剥離術や采部以外での卵管開口術などに対する手術適応は、議論の多いところであろう。

卵管性不妊症の治療法として、マイクロサージャリーに続いてIVF and ETを行う場合に、術後どれぐらいの観察期間を置いてそれに切り代えるべきかというのが大きな問題の一つとなっている。それは言い換えれば、術後どれぐらいの期間に妊娠が集中しているか、ということになる。諸外国においては、

表2 Microsurgery による卵管形成術の術式別成績 —IFFS 分類1980による—
(2年以上 follow up した症例)

	手術例数	妊娠例数 (%)	正常妊娠例数 (%)	手術有効例数 (%)	手術無効例数 (%)	来院せず
1. 付属器に限定した癒着剥離術	23	8	7	13	5	5
2. (1)以上の癒着剥離術	16	3	1	5	8	3
3. 卵管移植術	—	—	—	—	—	—
4. 卵管吻合術	35	8	6	15	10	10
5. 卵管開口術	35	8	5	17	8	10
6. 卵管采形成術	8	2	2	4	4	0
7. そ の の 他	3	3	1	3	0	0
8. Combination	5	2	1	4	0	1
計	125	34(27%)	23(18%)	61(49%)	64(51%)	

(東北大：S57.6～S60.7)

表3 癒着剥離術の成績 (東北大：S57.6～S60.7)

1) 付属器に限定した癒着剥離術

	手術例数	妊娠例数 (%)	正常妊娠例数 (%)	手術有効例数 (%)	手術無効例数 (%)
a) 軽 症	—				
b) 中 等 症	17	6	5	9	8
c) 重 症	6	2	2	4	2
計	23	8(35%)	7(30%)	13(57%)	10(43%)

2) 付属器以上の癒着剥離術

	手術例数	妊娠例数 (%)	正常妊娠例数 (%)	手術有効例数 (%)	手術無効例数 (%)
a) 軽 症	—				
b) 中 等 症	2	1	0	2	0
c) 重 症	14	2	1	3	11
計	16	3(19%)	1(6%)	5(31%)	11(69%)

表4 卵管吻合術の術式別成績 (東北大：S57.6～S60.7)

	手術例数	妊娠例数 (%)	正常妊娠例数 (%)	再疎通例数 (%)	再閉塞例数 (%)	不 明 (%)
a) 間質部—峡 部	18	3(17%)	2(11%)	7(39%)	7(39%)	4(22%)
b) 間質部—膨大部	5	0	0	0	1(20%)	4(80%)
c) 峡 部—峡 部	5	1(20%)	0	3(60%)	1(20%)	1(20%)
d) 峡 部—膨大部	2	1(50%)	0	2(100%)	0	0
e) 膨大部—膨大部	—					
f) 膨大部—采 部	—					
x) Combination	5	3(60%)	0	3(60%)	1(20%)	1(20%)
計	35	8(23%)	2(6%)	15(43%)	10(29%)	10(29%)

表5 卵管開口術の術式別成績

(東北大：S57.6～S60.7)

	手術例数	妊娠例数 (%)	正常妊娠例数 (%)	再疎通例数 (%)	再閉塞例数 (%)
a) 采部	26	8 (31%)	5 (19%)	15 (58%)	11
b) 膨大部	2	0	0	1 (50%)	1
c) 峽部	6	0	0	1 (17%)	5
x) Combination	1	0	0	0	1
計	35	8 (23%)	5 (14%)	17 (79%)	18 (51%)

表6 卵管采形成術の術式別成績

(東北大：S57.6～S60.7)

	手術例数	妊娠例数 (%)	手術有効例数 (%)	手術無効例数 (%)
a) By deagglutination and dilatation	6	2 (33%)	2 (33%)	4 (67%)
b) With serosal incision	1	0	1	0
x) Combination*	1	0	1	0
計	8	2 (25%)	4 (50%)	4 (50%)

* different type of fimbrioplasty on right and left tubes

表7 その他の術式別成績

(東北大：S57.6～S60.7)

	手術例数	妊娠例数 (%)	正常妊娠例数 (%)	手術有効例数 (%)	手術無効例数 (%)
Ectopic pregnancy	2	2* (100%)	0	2 (100%)	0
Webster-Baldy	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0
Combination	5	2 (40%)	1 (20%)	4 (80%)	1 (20%)

* 2例とも再び子宮外妊娠

表8 卵管形成術後妊娠例を術式別にみた術後妊娠までの期間 全34例

(東北大：S57.6～S60.7)

術後妊娠までの期間(M)	1～6	7～12	13～18	19～24	25以上
1. 付属器に限定した癒着剥離術	○●	○○○	○○○		
2. (1)以上の癒着剥離術		●		●	○
3. 卵管移植術	—	—	—	—	—
4. 卵管吻合術	○○●		○○	●	○○
5. 卵管開口術		○○●	○○●●		○
6. 卵管采形成術		○○			
7. その他		●	○	●	
8. Combination	○		●		

○ 正常妊娠 (現在妊娠中を含む)

● 子宮外妊娠 5例・流産 5例・胞状奇胎妊娠 1例

術後 1 年以内に妊娠例の大部分が集中している⁹⁾という報告がある。しかし、術後 2 年までは、妊娠率に有意の増加が認められる⁹⁾という報告もある。今回の我々の、術後、妊娠までの期間を調査した結果は、少なくとも術後 2 年間の観察期間をおくべきであるという意見を支持するものであった。

また、卵管形成術後に子宮外妊娠の頻度が高いということは、諸家の報告より明らかであるが^{10,11)}。今回の我々の結果で、2 年以上経過してから妊娠したものは、全例正常妊娠であったということは、術後 2 年以上経過すれば、卵管に対する手術操作が子宮外妊娠の誘因とはなりにくくなることを示唆する興味ある結果だと思える。

付属器に限定した癒着剥離術後の妊娠は全て術後 1 年半の間に集中して、一方、卵管開口術、卵管形成術後の妊娠は総て術後半年以上経過してからのものであったという事実は、変性した卵管内膜の回復にある一定の期間を必要とすることを示すものと思われる。

おわりに

以上、当科におけるマイクロサージャリーの治療成績を検討したが、今後、治療成績を向上させていくためには、技術の向上の他に術式の選択、改良、手術適応の見直し等が必要と思われる。現在のところ、卵管性不妊の治療においてマイクロサージャリーは、IVF and ET に先立って行われるべき方法と思われ、成績向上のために、さらに長期間にわたって検討と努力を重ねて行きたいと思う。

文 献

- Gomel, V.: Classification of operations for tubal and peritoneal factofs causing infertility. Clin. Obstet. Gynecol. 23: 1259, 1980.
- Baldy, J. M.: Treatment of uterine retrodisplacement. Surg. Gynec. Obstet. 8: 421, 1908.
- Baldy, J. M.: The surgical treatment of retroversion of uterus. Serg. Gynec. Obstet. 20: 614, 1915.
- Winston, R. M. L.: Microsurgery of the fallopian tube: From fantasy to feality. Fertil. Steril. 34: 521, 1980.
- Gomel, V.: Tubal reanastomosis by microsurgery. Fertil. Steril. 28: 59, 1977.
- 河上征治, 他: 卵管形成術の症例の選択と術式の子後, 産婦科の世界, 34: 597, 1982.
- 印牧義孝: マイクロサージャリーによる卵管精不妊の治療, 産婦人科の成果, 34: 603, 1982.
- Fayez, J. A. & Suliman, S. A.: Infertility surgery of the oviduct: Comparison between macrosurgery and microsurgery. Fertil. Steril. 37: 73, 1982.
- Patton, P. E.: Microsurgical reconstruction of the proximal oviduct. Fertil. Steril. 47: 35, 1987.
- Gomel, V.: Salpingostomy by microsurgery. Fertil. Steril. 29: 380, 1978.
- Silva, P. D., Paulson, R. J., Anderson, R. E. and Lobo, R. A.: Ectopic pregnancy in unrepaired distal tubal remnant after contralateral tubal anastomosis. Fertil. Steril. 47: 511, 1987.

An Analysis of the Results after Microsurgical Tubosurgery in our Clinic.

Yoshitaka Saito, Hideo Tozawa,
Takao Fukaya, Hiroshi Hoshiai
and Akira Yajima

Department of Obsteteics
& Gynecology, Tohoku
University School of Medicine.

From June 1982 to July 1985, 125 cases of microsurgical tubosurgeries were performed in our clinic. All of these cases have been followed up at least 2 years. Of the 125 cases, 34 (27%) patients got pregnant: 23 (18%) cases were normal pregnancies, 5 were ectopic pregnancies, 5 coursed with spontaneous abortions and 1 was hydatid mole. Among the 34 pregnancies, 16 (47%) occurred within the first year after the surgery, and 30 (88%) occurred within two years. The cases conceived more than 2 years after the operations were normal pregnancies, though they were only 4. All of the 8 pregnancies after periadnexal adhesiolysis occurred within 1 year and a half. All the pregnancies after salpingostomy and fimbrioplasty occurred more than six months after the operations.

(受付: 昭和 62 年 12 月 16 日)

ヒト体外受精用培養液中の 至適カリウム濃度に関する検討

The Effect of Potassium Concentration in the Culture Medium on the Mouse Embryo Development *In Vitro*

鳥取大学医学部産科婦人科

和田 省	関島 秋男	岩部 富夫
Tasuku WADA	Akio SEKIJIMA	Tomio IWABE
谷川 正浩	大野原良昌	寺戸 博文
Masahiro TANIKAWA	Yoshimasa OONOHARA	Hirofumi TERADO
戸田 稔子	菊川 章仁	見尾 保幸
Toshiko TODA	Akihito KIKUGAWA	Yasuyuki MIO
	前田 一雄	
	Kazuo MAEDA	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tottori University School of Medicine

着床前マウス1細胞胚及び2細胞胚培養を使いヒト体外受精用培養液中カリウム (K) 濃度を検討した。

2細胞胚(ICR×ICR)を1.2~17.8 mMの4種のK濃度のBWW(Biggers-Whitten-Whittingham)培養液中で72時間培養, 胞胚への発育を24時間ごとに観察した。胚の発育速度, 及び72時間培養後の胞胚発生率共に, 1.2, 6.0 mMで高く, 7.7, 17.8 mMでは, 6.0 mMに比較し有意に発生が抑制された ($P < 0.01$)。

さらに, 1細胞胚($F_1 \times F_1$)を1.2~17.8 mMの6種のK濃度で96時間培養し, 胞胚発生率を比較した。胞胚発生率は6.0 mMで良好な成績を示し, 1.2, 2.4, 4.2, 17.8 mMに比較し有意に高い発生率を示した ($P < 0.01$)。

以上の結果から, 培養液中K濃度はマウス初期胚発育を制御する重要な因子の1つであることが確認され, その至適濃度は6.0 mM前後であると考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 579-584, 1988)

緒 言

体外受精・胚移植 (*In vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET) は, 様々な原因の不妊症治療に広く応用され, 治療法として確立されてきた¹⁾。しかし, その妊娠率はいまだ低く様々な角度から改良・工夫が試みられている。

特に, 卵培養の基本となる培養液に関しても, 多

くの検討が行われているが^{2,3)}, 今だ一定の見解は得られておらず, 各施設で異なった培養液が使用されている。

著者ら⁴⁾は, ヒト IVF-ET に用いる至適培養液の検討の為, 数種の代表的培養液を用いてマウス初期胚の発育を比較検討し最も優れた成績を示した Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) 培養液⁵⁾を使用しているが, その理論的拠は十分に解明されて

表1 ヒト体外受精に使用されている主な培養液の組成とカリウム濃度

	Modified Earle's ¹²⁾ (mM)	Modified Whittens ¹³⁾ (mM)	Menezo's B2 ¹⁴⁾ (mM)	Modified Ham's F-10 ¹⁵⁾ (mM)	Whittingham's T6 ¹⁶⁾ (mM)	Biggers-Whitten Whittingham ⁵⁾ (mM)
CaCl ₂	1.80	—	—	0.29	1.78	—
KCl	5.36	4.77	3.82	3.82	1.42	4.78
MgSO ₄	0.81	1.19	0.81	0.62	—	1.19
NaCl	116.34	87.94	89.92	126.60	97.84	94.59
NaH ₂ PO ₄	1.01	—	—	—	—	—
Na ₂ HPO ₄	—	—	0.43	1.10	0.36	—
KH ₂ PO ₄	—	1.19	0.44	0.61	—	1.19
NaHCO ₃	25.00	22.62	29.76	25.00	25.00	25.07
Ca-lactate	—	1.71	1.62	0.79	—	1.71
Na-pyruvate	0.09	0.23	2.27	1.00	0.47	0.25
Glucose	5.55	5.55	6.66	6.11	5.55	5.56
Na-lactate(60% syrup)	—	19.80	—	—	24.88	21.58
MgCl ₂	—	—	—	—	0.47	—
Penicillin	+	+	+	+	+	+
Streptomycin	—	+	+	+	+	+
アミノ酸, ビタミン等	—	—	+	+	—	—
カリウム濃度(mM)	5.4	6.0	2.3	4.4	1.4	6.0

表2 ヒト及びマウス卵管液中カリウム濃度

	ヒ		ト		マウス	
	Borland et al. ¹¹⁾ (1980) (n = 7)		Lippes et al. ¹⁷⁾ (1972) (n = 10)		Roblero et al. ¹⁸⁾ (1976)	
			排卵前	排卵後	膨大部 (n = 25)	峡部 (n = 17)
カリウム濃度 (mM)	21.2 ± 0.24	9.9 ± 1.8	7.7 ± 0.9	17.8 ± 1.38	29.7 ± 3.63	

いない。

今回我々は、BWWが他の培養液に比較して、カリウム(K)濃度が高い点(表1)、報告されているマウス及びヒト卵管液中K濃度が血清及び従来の培養液中濃度に比較して極めて高い点(表2)などに着目し、培養液中K濃度が初期胚発育に及ぼす影響と、ヒト体外受精用培養液中の至適K濃度について、マウス初期胚培養により検討を行った。

方 法

1. マウス初期胚採取とその培養

マウス2細胞胚はICR (Slc: ICR)雌マウスより、1細胞胚はF₁ (C57BL/6 × CBA/N) 雌マウスより採取した。過排卵処理はPMSG (pregnant mare

serum gonadotropin, ピーメックス, 三共) 7.5 単位, 48 時間後にHCG (human chorionic gonadotropin, プレグニール, オルガノン) 10 単位を腹腔内投与した⁶⁾。雌マウスはHCG投与と同時にそれぞれ同種の成熟雄マウスと同居させ、翌日膈腔形成を確認し、ICR雌マウスはHCG投与後約48時間で、F₁雌マウスはHCG投与後20~22時間で屠殺し、卵管内よりそれぞれ2細胞胚, 1細胞胚を採取した。1細胞胚は採取後直ちにヒアルロニダーゼ(300U/ml, Sigma)を含む培養液中で2~3分間処理し、顆粒膜細胞を除去した。採取した胚は、ブールした後通常のBWW培養液2 mlを入れたディッシュ(Cat. No. 153066, Nunc) 中で2回洗浄し、実体顕微鏡下に正常形態のものを選んだ。さらに、10~20

表3 BWW培養液の組成とカリウム濃度の調整

組 成	BWW(K:6.0)	K ⁺	1.2	2.4	4.2	7.7	17.8	(mM)
Stock A								
NaCl	5.540 (g)		5.820	5.75	5.645	5.439	4.847	(g)
KCl	0.356		0	0.089	0.223	0.485	1.237	
Ca-lactate·5H ₂ O	0.527							
KH ₂ PO ₄	0.162							
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294							
Glucose	1.0							
Na-lactate	2.416							
Penicillin G	0.060/100ml							
Stock B								
NaHCO ₃	1.053/ 50ml							
Stock C								
Na-pyruvate	0.028/ 10ml							

最終調整： Stock A 1.0, Stock B 1.0, Stock C 0.1, 純水7.9

表4 各種カリウム濃度における ICR マウス 2細胞胚の発育

カリウム濃度 (mM)	8細胞胚及び桑実胚数(%) (培養後24時間)	桑実胚及び胞胚数(%) (培養後48時間)	胞胚数(%) (培養後72時間)
1.2 (n=46)	32 (70)	35 (76)	35 (76)
6.0 (n=70)	48 (69)	61 (87)	53 (76)
7.7 (n=59)	27 (46)※	38 (64)※	26 (44)※
17.8 (n=54)	17 (31)※	20 (37)※	17 (31)※

n：培養した2細胞胚数 ※：p<0.01, vs. 6.0mM

個ずつに分配し各種K濃度の培養液 1 ml を入れた 4-ウェル・ディッシュ (Cat. No. 134673, Nunc) で5% CO₂ in Air 37°Cにて培養した。

2細胞胚は採取後72時間培養し、24時間ごとに実顕微鏡下に発育を観察した。1細胞胚は同様に96時間培養後、expanded blastocyst (EB)への発生率を記録した

2. 培養液の作成とK濃度の調整

培養液は、各成分(和光純薬)を秤量後、保存可能な3種のstock溶液を作成し、これを調整し最終的にBWW培養液を作成した(表3)。検討したK濃度は、BWW培養液をもとにして浸透圧を一定に保つため、KClとNaClを表3に示すように置換し目的の濃度に調整した。なお、作成後すべての培養液の浸透圧は、305±5 mOsm/kgであり、浸透圧の調整は行わなかった。2細胞胚を使用した実験では培養液に添加蛋白を加えず、1細胞胚を使用した実験

ではウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) を 1 mg/ml 加えた。

K濃度の設定は、2細胞胚の検討では1.2, 6.0, 7.7, 17.8 mMの4種とし、1細胞胚では1.2, 2.4, 4.2, 6.0, 7.7, 17.8 mMの6種とした。これらK濃度はそれぞれ各種培養液、ヒト及びマウス卵管液中K濃度を参考にして決定した。すなわち1.2mMはWhittingham's T6 (T6), 2.4mMはMenezo's B2, 4.2mMはHam's F10, さらに6.0mMはBWWを想定し(表1), また7.7mMは排卵後ヒト卵管内液, 17.8mMはマウス卵管膨大部K濃度にほぼ相当する(表2)。

統計処理は、χ²検定を用い、K濃度6.0mMを基準にして、有意差検定を行った。

結 果

1. 培養液中K濃度の2細胞胚(ICR×ICR)発生に

表5 各種カリウム濃度における F₁マウス 1細胞胚の発育

カリウム濃度 (mM)	培養した 1細胞胚数 ^a	発育した胎胚数 (%)
1.2	46	30 (65)※
2.4	48	25 (52)※
4.2	50	34 (68)※
6.0	60	54 (90)
7.7	48	36 (75)
17.8	42	21 (50)※

a : 3 ~ 4 回の実験の合計数

※ : p < 0.01 vs. 6.0mM

表6 培養液中カリウム濃度に関する報告

	採卵時期	培養液	K濃度 (mM)	結 果
Wales ¹⁰⁾	2細胞胚	mKRB	0 ~ 48	胎胚発生率は 6 mM で最高 胎胚発生には少なくとも 0.8 mM が必要 胎胚発生は 6 mM 以上で抑制
Quinn et al. ²⁾	1細胞胚	HTF	1.4, 2.3, 3.2, 4.2, 5.1	胎胚発生率は 1.4 mM で有意な低値
Roblero et al. ⁸⁾	2細胞胚及び 3 ~ 4細胞胚	BWW	4.7 ~ 60 (4.7, 10, 25, 40)	胎胚発生率は 10 mM で最高 胚あたりの細胞数は 25 mM で最高 着床率は 25 mM で最高
Wiley et al. ⁹⁾	2細胞胚	T6	0.6, 1.4, 6.0	後期桑実胚発生率は 0.6 mM で最高

及ぼす影響

4種類のK濃度に調整したBWW培養液中で、2細胞胚を培養し24時間ごとにその発育を観察した。培養24時間後8細胞胚以上に発育した胚の割合は、1.2mMで70%、6.0mMで69%、7.7mMで46%さらに17.8mMで31%と、K濃度が高くなるに従って低下する傾向を示した。また培養48時間後の桑実胚以上に発育した卵の割合は、他の濃度に比較し、1.2、6.0mMで高値を示し、同様に培養72時間後のEBへの発生率も、1.2mM及び6.0mMで高値となり、7.7mM、17.8mMでは、6.0mMに比較し有意に低値を示した (P < 0.01) (表4)。

2. 培養液中K濃度の1細胞胚 (F₁ × F₁) 発生に及ぼす影響

F₁マウスの1細胞胚を6種のK濃度に調整したBWW培養液中で96時間培養し、EBへの発生率を検討した。代表的な体外受精用培養液中のK濃度を想定して決定した1.2mMから6.0mMのK濃度においては、K濃度6.0mMでEBの発生率は90%と最も高値を示し、排卵後ヒト卵管内液及びマウス卵管膨大部K濃度に相当する7.7、17.8mMでは、EBへ

の発生率は抑制された。

特に、これらの濃度のうち1.2、2.4、4.2、17.8mMでは、6.0mMに比較し有意に発生が抑制された (P < 0.01) (表5)。

考 察

ヒト体外受精に広く使用されている培養液はウサギ、マウス、ハムスター、モルモット等の動物実験により開発、改良されてきた⁷⁾。培養液の開発においては、殆どの培養液がヒト血清のイオン組成に基づいて作られているため、電解質濃度は血清値に近く、K濃度も血清中濃度と同等かそれ以下のものが多い (表1)。培養液中に含まれる主なイオン (Ca, K, Mg, リン酸イオン, 硫酸イオン, 炭酸水素イオン等) の至適濃度については、古くからマウス初期胚を使い研究されており、かなりの巾をもった至適範囲がある事が知られている⁷⁾。

一方、ヒト及びマウス卵管液の電解質組成は血清中と比較し、K濃度が高くCa濃度が低い事が報告されている⁸⁾。特にK濃度は非常に高く、ヒトやマウスにおいては、血清と比較し約3~5倍の高値となってい

る(表2)。

しかし、これら卵管液中高K濃度の必然性、あるいは初期胚発生の為の培養液中至適K濃度についての報告は少なく、一定の見解は得られていない(表6)。

本研究では、はじめにICR系マウスの2細胞胚培養を使い1.2~17.8 mMの4種のK濃度の培養液中でEBへの発育を観察した。72時間培養後のEBへの発生率は、培養液中K濃度が高くなるにつれ抑制される傾向を示した(表4)。

このことから、培養液中K濃度を卵管液中濃度に近づけてもマウス2細胞胚発育は促進されず、逆に発育は抑制される事が示唆された。

Robleroら⁸⁾は、培養液中K濃度4.7~60 mMをマウス2細胞~4細胞胚培養で検討し、25 mMのK濃度において発育した胚あたりの細胞数が最多となり、逆に胞胚形成率では、K濃度10 mMで最も良好な成績を示したことから、Kイオンは、分割と胞胚形成に異なった作用を有しているものと考え、高K濃度は胚の分化よりむしろ成長に重要な役割をもっているものと推論している。

本研究においても、24時間ごとの観察により分割の速度を検討したが、24時間培養後の8細胞あるいは桑実胚の発生率、さらに48時間培養後に桑実胚以上に発育した胚の割合も、K濃度が高くなるほど抑制され(表4)、今回の検討結果からは、Robleroらが示したような高K濃度の分割促進効果は認められなかった。

Wileyら⁹⁾はT6培養液を使用し、0.6, 1.4, 6.0 mMのK濃度を検討し、K濃度が低いほどマウス2細胞胚の桑実胚以降への発生率が高いと報告している(表6)。しかし、今回の我々の検討では、マウス2細胞胚を用いると、最も低いK濃度、すなわち1.2 mMで桑実胚以降への発生率は高値を示したものの、6.0 mMとの間に有意差は認められなかった。

そこで、2細胞胚よりさらに感受性が高いといわれる²⁾F₁マウスの1細胞胚培養を用いた検討結果では、EBへの発生率は他のK濃度に比較し、6.0 mMで最も良好な値を示し(図1)、Wileyらの成績と異なる結果となった。

しかし、今回の成績は、Walesの報告¹⁰⁾とよく一致しており、マウス初期胚培養における至適K濃度は6.0 mM前後と考えられる(表6)。また、Quinnら²⁾は1細胞胚を使い1.4 mMから5.1 mMまでの5種のK濃度を検討し、1.4 mMで胞胚への発生率は有意に低かったと報告しており、我々の1細胞胚による検討はこれにほぼ一致している。

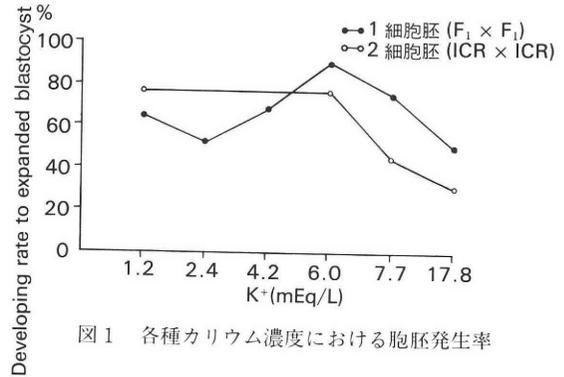


図1 各種カリウム濃度における胞胚発生率

生体内でのKイオンの作用としては、細胞内Kイオンの変化が、電解質以外の細胞膜透過、糖分解酵素の活性化、高分子の合成等の生物学現象に関係しているといわれており¹¹⁾、また精子の運動性、代謝、及び先体反応の促進作用ももつとされている⁸⁾。

これらのことを総合的に評価すると、卵管内の高K濃度は、Kイオンだけでなく、他の多くの因子と協同して初期胚発育をコントロールしているものと推測されるが、今回の検討で少なくともKイオンが重要な因子の1つである事が示唆された。

最後に、培養液中至適K濃度に関しては、上に述べたように、研究者により意見が大きく異なり、今後さらに卵管内環境及び、Kイオンと他の因子との相互作用等も検討し、至適培養液開発の一助としたい。

本研究の要旨は、第5回日本受精着床学会(昭和62年11月 京都)、第32回日本不妊学会(昭和62年11月 金沢)、及び第6回ヒト生殖国際会議(昭和62年10月 東京)において発表した。

文 献

- 1) Lilford, R. J. and Dalton, M. E.: Effectiveness of treatment for infertility. *Br. Med. J.*, 295: 155, 1987
- 2) Quinn, P., Kerin, J. F. and Warnes, G.M.: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.*, 44: 493, 1985
- 3) Gianaroli, L., Seracchioli, R., Ferraretti, A. P., Trounson, A., Flamigni, C. and Bovicelli, L.: The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer. *Fertil. Steril.*, 46: 907, 1986
- 4) Wada, T.: Evaluation of media, protein supplements and potassium concentration for human in vitro fertilization and embryo transfer by

- preimplanted mouse embryo development. *Acta. Obstet. Gynaec. Jap.*, 40: 640, 1988
- 5) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro. In *Methods in Mammalian Embryology*, (ed JC Daniel Jr), p101: WH Freeman and Company, San Francisco, 1971
 - 6) Quinn, P. and Whittingham, D. G.: Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos in vitro. *J. Androl.*, 3: 440, 1982
 - 7) Bavister, B. D.: Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success. In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, (eds L Mastroianni, Jr and JD Biggers) p41 Plenum Press, New York, 1981
 - 8) Roblero, L. S. and Rizzo, M. D.: High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertil. Steril.*, 45: 412, 1986
 - 9) Wiley, L. M., Yamami, S. and Van Muyden, D.: Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil. Steril.*, 45: 111, 1986
 - 10) Wales, R. G.: Effects of ions on the development of the pre-implantation mouse embryo in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 421, 1970
 - 11) Borland, R. M., Biggers, J. D., Lechene, C. P. and Taymor, M. L.: Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.*, 58: 479, 1980.
 - 12) Purdy, J. M.: Methods for fertilization and embryo culture in vitro. In *Human Conception In Vitro*. (eds RG Edwards and JM Purdy) p135 Academic Press, London, 1982
 - 13) Hoppe, P.C. and Pitts, S.: Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8: 420, 1973
 - 14) Testart, J., Lassalle, B. and Frydman, R.: Success of in vitro fertilization in spontaneous or stimulated cycles and technical procedures used. Fourth Reiner de Graaf Symposium, Follicular Maturation and Ovulation. Nijmegen, The Netherlands Excerpta Medica, p352, 1982
 - 15) Lopata, A., Johnston, I. W. H., Hoult, I. J. and Speirs, A. I.: Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. *Fertil. Steril.*, 33: 117, 1980
 - 16) Quinn, P., Warnes, G. M., Kerin, J. F. and Kirby, C.: Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 41: 202, 1984
 - 17) Lippes, J., Enders, R. G., Pragay, D. A. and Bartholomew, W. R.: The collection and analysis of fallopian tube fluid. *Contraception*, 5: 85, 1972
 - 18) Roblero L, Biggers JD, and Lechene CP: Electrophoresis of human fallopian tube fluid. *Contraception*, 5: 85, 1972
 - 18) Roblero, L., Biggers, J. D. and Lechene, C. P.: Electron probe analysis of the elemental microenvironment of oviducal mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 46: 431, 1976

The effect of potassium concentration in the culture medium on the mouse embryo development in vitro

Tasuku Wada, Akio Sekijima,
Tomio Iwabe, Masahiro Tanikawa,
Yoshimasa Oonohara, Hirofumi Terado,
Toshiko Toda, Akihito Kikugawa,
Yasuyuki Mio and Kazuo Maeda

Department of Obstetrics
and Gynecology,
Tottori University
School of Medicine

The effect of potassium (K) concentration on the development of mouse one-cell and two-cell embryos was investigated.

Two-cell embryos (ICR×ICR) were cultured for 72 hours in the Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) medium in which K concentrations were adjusted to 1.2, 6.0, 7.7, and 17.8mM. The development rates in 1.2 and 6.0mM K at 24 and 48 hours culture were higher than that of 7.7 and 17.8mM K. The expanded blastocyst rate in 6.0mM K was significantly higher than both that of 7.7 and 17.8mM K ($p < 0.01$).

One-cell embryos ($F_1 \times F_1$) were cultured for 96 hours in the BWW medium in which K concentration was varied 1.2 to 17.8mM K. The expanded blastocyst formation rate in 6.0mM K was significantly higher than that of 1.2, 2.4, 4.2, and 17.8mM K ($p < 0.01$).

The results suggest that K concentration in the culture medium is one of major factors which could influence the early embryo development and also both relatively lower and higher K concentrations may be detrimental to the embryo development.

(受付: 昭和 63 年 2 月 10 日特掲)

MENSTRUAL CA 125 AS A MARKER FOR PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS: A PRELIMINARY REPORT

Kentaro TAKAHASHI, Hiroko NAGATA, Akihiro UCHIDA,
Masuo KUSAKARI, Yoshimi ARAKI, Arata NISHIGAKI,
Takaaki SHIRAI, Kazuo YOSHINO and Manabu KITAO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University

Abstract: We simultaneously measured CA 125 levels in sera and menstrual blood of women with a normal ovulatory cycle and patients with endometriosis, in the menstrual phase. Serum CA 125 levels in the menstrual phase were significantly higher in the latter. CA 125 levels in the menstrual blood were higher than those in serum and CA 125 levels in the blood of patients with endometriosis, particularly adenomyosis were higher than those of normal ovulating women. The menstrual blood CA 125—the serum CA 125 ratio showed a tendency toward a high value in patients with adenomyosis. There was no difference between the ratio in patients with external endometriosis and that in normal ovulating women. Thus, serum CA 125 levels in the menstrual phase and the CA 125 levels in the menstrual blood can serve as a good marker for diagnosing adenomyosis.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 585–588, 1988)

Introduction

We¹⁻⁴⁾ reported that serum CA 125 was an effective marker for the diagnosis of endometriosis. Other investigators⁵⁻⁷⁾ found that the serum CA 125 levels in patients with endometriosis were significantly higher than those in healthy women, but changes in serum CA 125 levels do occur during the ovarian cycle and a relatively high level of CA 125 was observed in the menstrual phase⁸⁾. Therefore, when the serum CA 125 assay is used as a tumor marker for diagnosing endometriosis, serum CA 125 must be measured during the other phase except for the menstrual phase of the ovarian cycle, to avoid false positive results. We simultaneously measured serum CA 125 in the menstrual phase and CA 125 in the menstrual blood to see whether the

serum CA 125 levels in the menstrual phase could serve as a useful marker for diagnosing endometriosis, and also the CA 125 levels in the menstrual blood as well as the serum CA 125, as a possible marker for diagnosing endometriosis.

Materials and Methods

Thirteen Japanese women with a normal ovulatory cycle and 6 with endometriosis (2 adenomyosis and 4 external endometriosis) were studied. Ultrasonic scanning, laparoscopy and/or laparotomy were performed on all subjects. A histopathological diagnosis was made postoperatively in patients with adenomyosis. Four patients with external endometriosis were in stage IV of the Revised American Fertility Society (R-AFS) Classification⁹⁾. Normal ovulation was determined by basal body temperature and

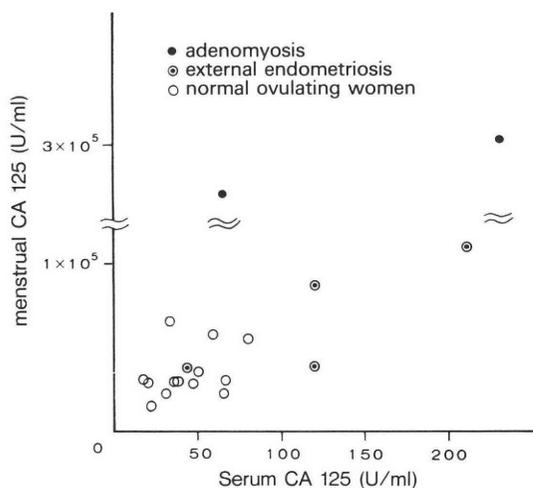


Fig. 1 Correlation between serum CA125 and menstrual CA125

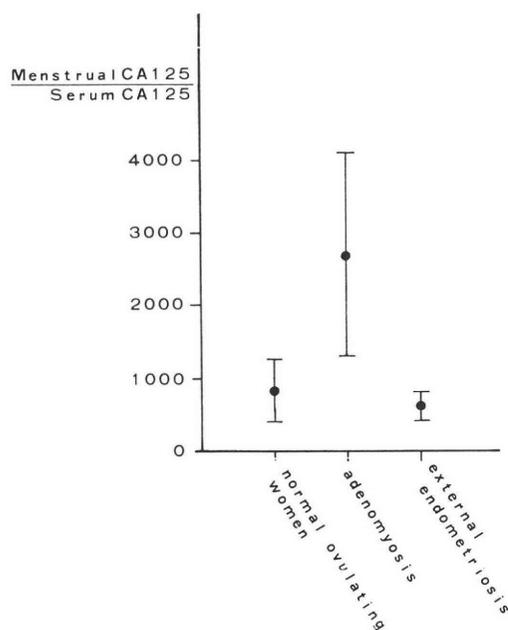


Fig. 2 Menstrual CA125-serum CA125 ratio

was confirmed by ultrasonography. CA 125 levels in the serum and the menstrual blood during the menstrual phase were simultaneously measured using a CA 125 Radioimmunoassay kit (Centocor, Inc., Malvern, PA, USA). Student's t-test was used for statistical analysis ($p < 0.05$).

Results

The serum CA 125 levels of normal ovulating women in the menstrual phase ranged from 17 to 80U/ml and the mean serum CA 125 level (\pm S.D.) was 44.1 ± 19.1 U/ml. The serum CA 125 level (Mean+2S.D.) was 82.3U/ml. We determined the cut off value to be 83U/ml. The menstrual CA 125 level of normal ovulating women in the menstrual phase ranged from 22000 to 63000U/ml and the mean CA 125 level (\pm S. D.) in the menstrual blood was 34539 ± 13987 U/ml. The CA 125 level (Mean+2S. D.) was 62513U/ml. We determined the cut off value to be 63000U/ml. The CA 125 levels in the menstrual blood was about 780 times higher than the serum CA 125 levels in the menstrual phase.

On the other hand, the serum CA 125 levels of patients with endometriosis in the menstrual phase ranged from 44 to 230 and the mean serum CA 125 level (\pm S. D.) was 131.7 ± 68.4 U/ml. The mean serum CA 125 level in those with endometriosis was statistically higher than that in those in the normal ovulating women ($P < 0.05$). The CA 125 levels in the menstrual blood of patients with endometriosis ranged from 37000 to 300000U/ml, in particular, these levels in two patients with adenomyosis were 270000 and 300000U/ml, respectively, and the mean CA 125 level (\pm S. D.) was 140500 ± 105686 U/ml. The CA 125 levels in the menstrual blood was about 1000 times higher than the serum CA 125 levels in the menstrual phase. In the menstrual blood, CA 125 levels in patients with endometriosis showed a trend toward a higher level than seen in normal ovulating women.

The correlation between serum CA 125 levels and CA 125 levels in menstrual blood is shown Figure 1. There was no statistical correlation between serum CA 125 levels and CA 125 levels in the menstrual blood. The serum CA 125 levels being high, the CA 125 levels in the menstrual blood tends to be high. The CA 125 levels in the menstrual blood of patients with adenomyosis are very high. The menstrual CA 125 levels in patients with external endometriosis are slightly higher than those in normal ovulating women and lower

than those in patients with adenomyosis.

Of the 6 patients, endometriosis was correctly predicted in 4, using 83U/ml of serum CA 125 in menstrual phase as the cut off value, therefore the sensitivity is 66.7%. Two cases (33.3%) were false negatives. All of the 13 normal ovulating women without endometriosis were accurately judged as negatives, thus the specificity was 100%. On the other hand, when using 63000U/ml of CA 125 in menstrual blood as the cut off value, the sensitivity was similarly 66.7%, but in one false positive case, the specificity was 92.3%.

The menstrual blood CA 125—the serum CA 125 ratio (M-S ratio of CA 125) is shown in Figure 2. The mean M-S ratios of CA 125 in normal ovulating women, in patients with external endometriosis and in patients with adenomyosis were 914 ± 485 , 604 ± 197 and 2698 ± 1393 , respectively. No differentiation of the mean M-S ratio of CA 125 between normal ovulating women and patients with external endometriosis was observed. The ratio in patients with adenomyosis showed a higher tendency than that in patients with external endometriosis.

Discussion

We confirmed that CA 125 was immunohistochemically present on the normal endometrial glandular epithelium and granular epithelium localized in muscle layers in case of adenomyosis¹⁰⁾. Therefore, the high serum CA 125 levels in the menstrual phase and high CA 125 levels in the menstrual blood may prove to be histologically related to the number of endometrial cells. The high levels of CA 125 in the menstrual blood of patients with adenomyosis may be explained from the findings described above. However, as the serum CA 125 levels and the CA 125 levels in the menstrual blood of patients with external endometriosis is also high, the levels of CA 125 may increase in the presence of internal pelvic inflammation. The M-S ratio of CA 125 in patients with adenomyosis is much higher than that in normal ovulating women, but the ratio in patients with external endometriosis is the same value as that in normal ovulating women or even lower. Therefore, the high serum

CA 125 levels in patients with external endometriosis may be related to the production of CA 125 from external endometriosis tissue and as a result of internal pelvic inflammation.

In summary, as the CA 125 levels in the menstrual blood of patients with endometriosis, particularly adenomyosis were higher than those in normal ovulating women, the CA 125 levels in the menstrual blood can serve as a good marker for diagnosing adenomyosis.

Acknowledgement

We thank M. Ohara (Kyushu Univ.) for comments on the manuscript.

References

- 1) Takahashi K, Nagata H, Yamane Y, Yoshino K, Shibukawa T, Murao F, Kitao M: Clinical usefulness of serum CA 125 in patients with endometriosis. *Shimane J. Med. Sci.*, 9: 82, 1985
- 2) Takahashi K, Kijima S, Yoshino K, Shibukawa T, Murao F, Kitao M: Differential diagnosis between uterine myoma and endometriosis using CA 125 as a new tumor marker of ovarian carcinoma. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 12: 99, 1986
- 3) Takahashi K, Yamane Y, Kijima S, Yoshino K, Shibukawa T, Kitao M: CA 125 antigen is an effective diagnostic for external endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 23: 257, 1987
- 4) Takahashi K, Kijima S, Yoshino K, Shibukawa T, Kitao M: Serum CA 125 as a marker for patients with external endometriosis. *Int. J. Fertil.*, (in press)
- 5) Giudice LC, Jacobs A, Pineda J, Bell CE: Serum levels of CA 125 in patients with endometriosis: a preliminary report. *Fertil. Steril.*, 45: 876, 1986
- 6) Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC Jr., Schaetzl E, Kistner RW, Knapp RC: Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil. Steril.*, 45: 630, 1986
- 7) Patton PE, Field CS, Harms RW, Coulam CB: CA-125 levels in endometriosis. *Fertil. Steril.*, 45: 770, 1986
- 8) Takahashi K, Yoshino K, Araki Y, Nishigaki A, Shirai T, Shibukawa T, Kitao M: Alterations in levels of CA 125 during the menstrual cycle. *Jap. J. Fert. Ster.*, 31: 44, 1986
- 9) The American Fertility Society: Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis: 1985. *Fertil. Steril.*, 43: 351, 1985
- 10) Kijima S, Takahashi K, Kitao M: Expression

of CA 125 in adenomyosis. Gynecol. Obstet. Invest., 23: 122, 1987

**子宮内膜症における
血清中及び月経血中 CA125
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 永田裕子 内田昭弘
草刈万寿夫 荒木芳美 西垣 新
白井孝昭 吉野和男 北尾 学

我々はヒト卵巣癌関連抗原である血清 CA125 値が子宮腺筋症の補助診断に利用可能である事を以前に報告した。今回、正常月経周期婦人及び子宮内膜症患者の月経血中と血清中の CA125 を同時測定し、以下の結果を得た。

1) 子宮内膜症患者では、正常月経周期婦人と比較して、月経時においても血清 CA 125 値は有意に高値を示した。2) 月経血 CA125 値は血清 CA125 よりも高値であり、子宮内膜症患者、特に子宮腺筋症患者においては、さらに高値であった。3) 月経血 CA125 値と血清 CA125 値の比を比較すると、子宮腺筋症患者では正常月経周期婦人より高値を示すのに対し、外性子宮内膜症患者では差が認められなかった。

以上より、月経血 CA125 値の測定で子宮腺筋症は診断可能と推測される。

(受付：昭和 62 年 12 月 7 日)

不妊治療による妊娠の管理について
—分娩時年齢，初経産を一致させた
自然妊娠群との比較検討から—

Studies of Pregnancy, Delivery and
the Newborn after Treatment of Infertility

倉敷中央病院産婦人科

高橋 晃 夏山 知 木花 敏 雅
Akira TAKAHASHI Satoshi NATUYAMA Toshimasa KIHANA
江見 信之 高倉 賢二 浮田 昌彦
Nobuyuki EMI Kenji TAKAKURA Masahiko UKITA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kurashiki Central Hospital

不妊治療により妊娠の成立した154例(不妊群)について検討を行った。対照群1は自然妊娠例668例で、対照群2としては不妊群と同数の分娩時年齢，初経産別を一致させた自然妊娠例を用いた。

不妊群の流産率は13.0%であり、高年初産婦率は対照群1に比して高率であった。不妊群の妊娠中の異常としては切迫流産率がいずれの対照群に比しても高率であったが、切迫早産、貧血、妊娠中毒症、NSTスクリーニングで異常となる頻度には差を認めなかった。不妊群で帝王切開術の頻度は対照群1に比して高率であったが、対照群2との間には差はなかった。胎児仮死、分娩時多量出血の頻度も同様の結果であった。不妊群からの出生児の男女比は65:35といずれの対照群に比しても男児出生が多くみられた。先天奇形を含めた生後1週間の罹病状態には対照群と差を認めなかった。

以上より、不妊治療による妊娠の管理は妊娠初期の流産に対する配慮を除けば、症例が高年初産婦でない限り、自然妊娠例と同等でよいと考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 589-595, 1988)

緒 言

近年の不妊治療のめざましい進歩は従来妊娠が絶望視されていた不妊症婦人にも光明を見せている。妊娠の成立は不妊治療の第一目標であるが、健全生児を得ることがその最終目標であることは言うまでもない。そのためには不妊治療による妊娠を管理する上で特別の配慮が必要か否かの検討が必要となる。不妊治療の成績についてはこれまでに多くの報告があるが、不妊治療により成立した妊娠の転帰、さらに出生した児の異常の有無についての検討は、限られた薬剤使用の場合を除いては、未だ少ない。今回われわれは当院において不妊治療によって成立した

妊娠の転帰と新生児の予後について検討し、その妊娠管理について考察を加えたので報告する。

対 象

対象は昭和59年10月より昭和61年12月までの2年3カ月の間に当院不妊外来において妊娠に成功した154例である(不妊群)。これらについて妊娠の転帰を検討し、この中より胎児喪失例、転医例を除いた114例について妊娠中、分娩中の異常、出生児の罹病率を検討した。対照としては、昭和61年度中に当院で分娩した自然妊娠者の中で、妊娠初期より当院で妊娠の全経過を扱った668例を用いた(対照群1)。さらに、不妊群に年齢と初・経産を一致させ

表1 不妊群内訳

		原発不妊症 (N=80)	続発不妊症 (N=74)	全 体 (N=154)
初診時年齢 (歳)		27.2±2.9	28.8±3.7	28.0±3.4
不妊期間 (年)		2.3±1.7	1.8±1.8	2.1±1.8
※ 不妊 因子	排 卵 障 害	34 (42.5%)	24 (32.4%)	58 (37.7%)
	黄体機能不全	32 (40.0%)	31 (41.9%)	62 (40.3%)
	子宮因子	4 (5.0%)	12 (16.2%)	16 (10.4%)
	頸管因子	5 (6.3%)	8 (10.8%)	13 (8.4%)
	卵管因子	10 (12.5%)	15 (20.3%)	25 (16.2%)
	腹腔因子	7 (8.8%)	10 (13.5%)	17 (11.0%)
	男性因子	30 (37.5%)	18 (24.3%)	48 (31.2%)
	機能性不妊	8 (10.0%)	7 (9.5%)	15 (9.7%)
治療期間 (年)		0.8±0.7	0.8±0.5	0.8±0.6

※：重複あり

(1984.10.1-1986.12.31)

表2 妊娠成立周期の治療法

	妊娠例	+AHI周期妊娠例	+手術療法後妊娠例	計
Cl	8			8
Cl+HCG	20	7		27
Cl+Pred	1			1
Cl+Pred+HCG	7			7
Cl+Brom	2			2
Cl+Brom+HCG	15	4	1	20
Cl+Pred+Brom+HCG	2	1		3
Brom	3			3
Brom+HCG	10	4		14
HCG	28	8	3	39
HCG+HMG	4	3		7
HSG, 子宮内膜診後	11			11
無治療周期	6		6	12
計	117例	27例	10例	154例

(Cl=clomiphene, Pred=prednisolone, Brom=bromocriptin)

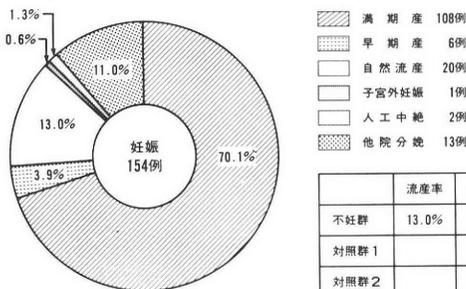


図1 妊娠の転帰

た自然妊娠者114例を汎用コンピューターに入力してあるdata baseより無作為に抽出し、対照群2とした。

結 果

不妊群154例における原発不妊と続発不妊はそれぞれ80例,74例で,その割合はほぼ1:1であった。平均初診時年齢は28.0±1.8歳,平均不妊期間は2.1±1.8年で,不妊因子の検討では78%に卵巣機能異常がみられたが,原発不妊と続発不妊では不妊因

	流産率	早産率
不妊群	13.0%	5.3%
対照群1		4.9%
対照群2		4.4%

子の内訳に大きな差異はなかった。妊娠成立までの平均治療期間は 0.8 ± 0.6 年であった(表1)。不妊治療の内訳を表2に示す。手術療法が行われた10例は子宮内膜症をはじめとする腹腔内癒着離4例、卵管のmicrosurgery 2例、子宮奇形の手術1例などであった。また、子宮卵管造影術後、あるいは子宮内膜日付診施行周期での妊娠が12例、休業期間の妊娠が12例にみられた(表2)。

不妊群の妊娠の転帰は、満期産が108例と70.1%を占め、妊娠24週以降の分娩の中での早産率は5.3%であった。この早産率は対照群とほぼ同率であった。胎児の喪失は流産20例、子宮外妊娠1例、人工妊娠中絶2例で、流産率は13.0%であった。なお、他院分娩の13例は全て妊娠中期以後に転医しており、この中に流産等の胎児喪失はない(図1)。

流産の20例のうち19例が胎児心拍確認以前の流産で、残りの1例は22週、品胎の流産であった。人工妊娠中絶となった2例のうち1例は本人が染色体構造異常保因者であるために希望した妊娠19週時の羊水染色体検査で4q trisomyが、他の1例は妊娠15週で行った超音波断層法にて胸部二重結合体児がそれぞれ発見されたものである(表3)。

不妊群の中で妊娠24週以後の分娩をし、その転帰が明かな症例は114例であり、これらについて以下の妊娠、分娩、出生児の検討を行った。分娩時の平均年齢は 29.3 ± 3.3 歳で対照群1との間に差がな

かったが、不妊群の初・経産婦別は87例：27例で対照群1に比して有意に初産婦が多く、また、高年初産率も不妊群では22.8%と対照群1に比して有意に高率であった。前述の方法で作成した対照群2の初・経産婦別の数、高年初産率は不妊群と全く一致している(表4)。

妊娠中の経過では、切迫流産となる頻度が不妊群では28.6%と対照群1、対照群2に比して有意($P > 0.01$)に高かった。その他の切迫早産、頸管無力症、貧血、妊娠中毒症、NSTスクリーニングで異常となる頻度には対照群1、対照群2の各々との間に差を認めなかった(図2)。

不妊群の平均分娩週数は39.1週、分娩所要時間は初産婦15時間19分、経産婦6時間40分であった。また、多胎の頻度は1.75%であったが、これらのいずれも対照群との間に差を認めなかった(表5)。

分娩時の異常としては、帝王切開術となる頻度が不妊群では11.4%と対照群1に比して有意に($P < 0.01$)高率であったが、対照群2との間には有意差を認めなかった。胎児仮死の頻度29.0%、500g以上の分娩時出血量をみる頻度18.9%も同様に対照群1との間には有意差($P > 0.05$)を認めたが、対照群2との間には差を認めなかった(図3)。

14例の帝王切開術施行の適応は、潜在胎児仮死、分娩時胎児仮死、遷延分娩によるものなどの胎児仮死に関連した適応が8例と過半数を占めていた。不

表3 胎児喪失の内訳

自然流産	20例
(胎児心拍確認以前)	19例
(妊娠22W 品胎流産)	1例
子宮外妊娠	1例
人工妊娠中絶	2例
(妊娠19W 羊水検査にて染色体異常)	1例
(妊娠15W 超音波断層法にて胎児奇形)	1例

(1984.10.1-1986.12.31)

表4 検討対象

	不妊群	対照群1	対照群2
症例数(人)	114	668	114
平均年齢(歳)	29.3 ± 3.3	28.0 ± 3.7	29.3 ± 3.3
初・経産	87 : 27	295 : 373	87 : 27
高年初産婦率	22.8%	5.1%	22.8%

(1984.10.1-1986.12.31)

表5 分娩時所見

	不妊群	対照群1	対照群2
分娩週数	39.1 ± 1.8 週	39.0 ± 1.8 週	39.0 ± 1.9 週
分娩所要時間			
初産婦	15時間19分	14時間36分	13時間30分
経産婦	6時間40分	6時間24分	5時間25分
分娩時出血量	326 ± 267 g	266 ± 183 g	296 ± 208 g
胎位(頭位：骨盤位)	108 : 6	637 : 31	103 : 11
多胎の頻度	1.75 %	0.45 %	0 %

(1984.10.1-1986.12.31)

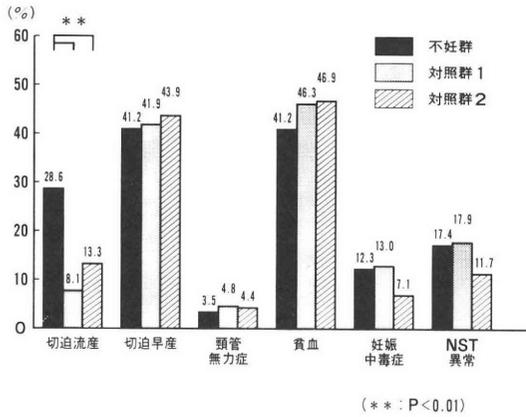


図2 妊娠中の異常

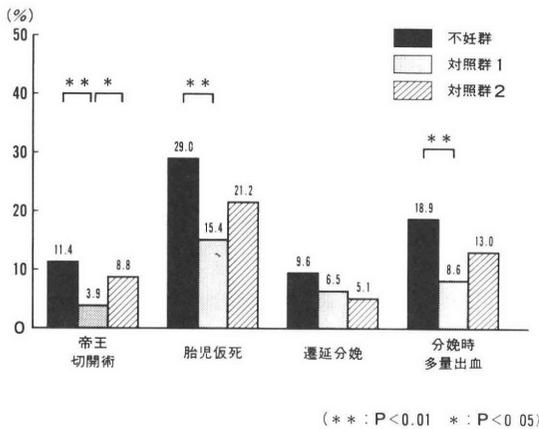


図3 分娩時の異常

表6 帝王切開術の適応

潜在胎児仮死	1例	胎児仮死	8例
分娩時胎児仮死	5例		
遷延分娩	2例		
双胎・第1児骨盤位			1例
児頭骨盤不均衡			1例
子宮手術後(Jones-Jones 術後)			1例
喘息	1例	妊娠合併症	2例
真性糖尿病	1例		
既往帝王切開術			1例
計			14例

(1984.10.1-1986.12.31)

妊治療に直接つながるものとしては双角子宮に対して行われた Jones-Jones 手術後の 1 例があった (表 6)。

不妊群 114 例中には双胎が 2 例あり出生児数は 116 人であるが、この男女比は 65:35 となり、対照群 1、対照群 2 に比して有意に ($P < 0.05$) 男児出生が多くみられた。114 例の中で A I H による妊娠は 20 例あり、双胎例を含めたこの中での男女比は 11:10 であった。S G A の頻度 10.5%、Apgar score 7 点以下の頻度 7.1% などには対照群との間に差はみられなかった (表 7)。

さらに、出生時より生後 1 週間までの出生児の状態について、先天奇形を含めた疾患の罹病率の検討を行った。不妊群よりの出生児に心疾患としてフェロー四徴症、A S D が各々 1 例、また、内外反足、母斑、副耳などの小奇形が少数例あったが、対照群との間に大きな差は認めず、不妊治療により出生した児に特有の疾患もなかった (表 8)。

考 察

不妊症の定義は従来 2 年以上の不妊期間とされているが、今回の対象の平均不妊期間は 2.1 年であり、中には 1 年未満の不妊期間の者もあった。原発不妊では結婚前より排卵障害のあった症例が引き続き不妊症として加療を受けたり、高年齢の結婚のために早期より検査加療を希望された者などが含まれており、続発不妊では当院、あるいは他院で不妊治療により妊娠の成立を見たものの流産に終わった症例が再度の治療を希望して来院している。特に近年は晩婚に加えて少産の傾向が顕著であり、当院では挙児希望で来院した者は、初診時年齢などを考慮の上で不妊期間にこだわらずに検査治療を行っている。

不妊治療による妊娠においてその経過、出生児に特別の留意を要するか否かを検討するためには、厳密な意味での対照群との比較が必要である。今回の対照群 1 は昭和 61 年度中に妊娠初期より当院で妊娠の全経過を扱った自然妊娠者 668 例で、里帰り分娩、何らかの異常のために妊娠途中より紹介を受けた症例は除外してある。さらに、不妊治療による妊娠では高年初産婦の頻度が高いことが従来指摘されており、今回の検討結果に、不妊治療による影響に加えて高年初産婦であることによる影響が加わることが考えられた。今回の不妊群でも高年初産婦率は 22.8% と対照群 1 に比して有意に高率であった。そこで、不妊群の分娩時年齢および初産産を一致させた 114 例の自然妊娠者を無作為に抽出し、対照群 2 とし、高頻度の高年初産婦からおこる影響を除外した検討

表 7 出生児所見

	不妊群	対照群 1	対照群 2
男女 (比) ※+	♂ 74人 ♀ 42人 (65 : 35)	♂ 344人 ♀ 321人 (52 : 48)	♂ 56人 ♀ 58人 (49 : 51)
生下時体重 ++	♂ 3060.4 ± 373.5 g ♀ 2976.2 ± 421.9 g	♂ 3059.0 ± 471.9 g ♀ 3025.1 ± 406.7 g	♂ 2961.6 ± 470.0 g ♀ 2913.8 ± 445.4 g
SGA の頻度 ++	10.5 %	8.6 %	12.4 %
生下時身長 ++	49.2 ± 1.9cm	49.0 ± 2.5cm	48.8 ± 2.2cm
アプガー・スコア 7点以下の頻度	8.7 ± 1.2 7.1 %	8.8 ± 1.0 4.8 %	8.8 ± 1.1 5.4 %

(※ : P < 0.05 不妊群 vs. 対照群 1 & 対照群 2)

(+ : 双胎を含む ++ : 双胎を除く)

表 8 新生児期の異常

	不妊群	対照群 1	対照群 2
呼吸器疾患	1 (RDS 1)	7 (RDS 4, MAS 2) 肺炎 1	4 (RDS 1, MAS 2) 肺炎 1
循環器疾患	3 (ファロー四徴 1) ASD 1, PDA 1)	9 (先天性心疾患 6) PDA 3	0
血液疾患	1 (貧血 1)	4 (メレナ 3, 貧血 1)	3 (メレナ 2, 貧血 1)
消化器疾患	1 (腸炎 1)	1 (腸炎 1)	0
高bilirubin血症	21	165	24
溶血性疾患	0	4	2
腎・泌尿器疾患	1 (水腎症 1)	2 (腎不全 1 ポッター症候群 1)	0
頭蓋内出血	1		2
神経系疾患	1 (けいれん 1)	1 (水頭症 1)	0
代謝・内分泌疾患	0	6 (低血糖 2, 低Ca 3) 低Na 2, くる病 1)	2 (低血糖 1, 低Ca 1)
感染症	0	2 (敗血症 2)	0
染色体異常	0	1	0
四肢疾患	3 (内外反足 2 下趾配列異常 1)	2 (内外反足 1) LCC 1)	1 (内外反足 1)
その他	2 (母班 1, 副耳 1)	8 (母班 6, 副耳 2)	0

(1984.10.1 - 1986.12.31)

を合わせて行った。不妊治療の内訳は前述したが、当院では IVF-ET, GIFT は行っていないため、これらの治療による妊婦管理の問題点は以下の検討には含まれていない。

不妊治療による妊娠では高率の流産が懸念されるが、今回の検討では 13.0% であり、自然妊娠の場合の流産率 10-11% に比してやや高率であったが、これまでの諸家の報告²⁻⁷⁾による不妊治療による妊娠の流産率 10.2-19.4% と大きな差はなかった。切迫流産は対照群 1, 対照群 2 に比して有意に高率であ

った。今回は投薬以上の治療を要した症例を切迫流産としたが、不妊群では貴重な妊娠であるために予防投与的に治療が行われた症例が相当数含まれている可能性も考えられる。切迫早産、早産率には対照群との間に差はみられなかった。

分娩経過では帝王切開術となる率が対照群 1 に比して有意に高率であったが、その適応は医学的なものに限られており、社会的なものはない。対照群 2 との比較では差がなかったことより、この高率の帝王切開術率は不妊治療による妊娠に特有なものでは

なく、高年初産婦が増加することにより生じたものと考えられる。高橋ら⁵⁾も高年初産婦の妊娠では30歳未満の不妊患者の妊娠に比して有意に高率の帝王切開術率であったと報告している。この他、胎児仮死、分娩時多量出血の頻度が高いことについても同様に考えられる。

出生児の男女比は対照群1, 対照群2に比して有意に男児出生が多くみられた。これまでの報告では田中ら⁹⁾が男性因子で、また西村ら⁹⁾が排卵障害、男性因子では男児出生が多いとしている他は男女比について記されていないものが多い。この男児出生が多くみられた原因については不明である。なお、AIHによる妊娠の男女比はほぼ1:1であった。その他の出生児についての検討はこれまで生下時体重、Apgar scoreなど分娩時の状態までの観察がほとんどであったが^{3,4,8-10)}、今回われわれはさらに生後1週間までの罹病率を検討した。いずれの対照群に比しても特に増加する異常は認められず、妊娠中期の羊水染色体検査で発見された4q trisomyも本人が染色体構造異常保因者であったことより生じたと考えられる。山田ら⁹⁾は生後1年までの体重増加を追跡調査しているが、乳幼児の標準体重増加曲線に比較して異常がなかったとしている。

結 語

以上より、不妊治療による妊娠では切迫流産にたりやすく、男児が多く出生するが、出生児の状態は自然妊娠例との間に差を認めない。分娩時には帝王切開術の率が高く、胎児仮死、多量出血もきたしやすくなるが、年齢および初産産を一致させた対照群との比較検討により、不妊治療による妊娠のためではなく、高頻度の高年初産婦という因子に伴うものであることを明らかとした。従って不妊治療による妊娠の管理は妊娠初期の流産に対する配慮を除けば、症例が高年初産婦でない限り、自然妊娠例と同等でよいと考えられる。

なお、本論文の主旨は第32回不妊学会総会(金沢)で発表した。

文 献

- 1) 倉智敬一：現代産婦人科体系 17-A「流早産」21. 中山書店, 1974.
- 2) 米谷国男, 高橋正明, 千原啓, 越知正憲：当大病院開設後10年間における不妊患者妊娠・分娩例の産科学的検討。日不妊会誌, 31:278, 1986.
- 3) 福田勝, 清田明憲, 奥山輝明, 古谷博：当科不妊外来における妊娠例とその予後の検討。日不妊会誌, 29:78, 1984.

- 4) 西村敏雄, 岡村均, 藤井信吾, 野田洋一, 神崎秀陽, 伴千秋, 本橋亨, 麻生武志, 藤田泰彦, 木下幹久：不妊外来における妊娠成功例とその予後の検討。日不妊会誌, 27:260, 1982.
- 5) 高橋正明, 伊藤誠, 米国国男：当科における高年初産者の実態について。日不妊会誌, 29:390, 1984.
- 6) 山本弘, 遠藤俊明, 幡洋, 藤井美穂, 下谷保治, 東口篤司, 佐藤卓広, 田中昭一, 橋本正淑：当科における最近5年間の不妊症の臨床検討。日不妊会誌, 29:394, 1984.
- 7) 寺田夏樹, 前川岩夫, 内藤正文, 小堀常雄, 高見沢裕吉：最近の当教室における不妊外来統計。日不妊会誌, 28:69, 1983.
- 8) 田中昭一, 山本弘, 藤井美穂, 遠藤俊明, 下谷保治, 東口篤司, 佐藤卓広, 郷久鉦二, 橋本正淑：当科不妊外来における妊婦成功例の妊娠分娩経過の検討。日不妊会誌, 31:101, 1986.
- 9) 山田紳介, 占部清, 清水健治, 関正明, 長川富保, 林伸旨, 早田幸司, 吉田伸隆, 秋本暁久, 関場香：不妊治療後妊娠とその予後。日不妊会誌, 27:54, 1982.
- 10) 森下一, 森崇英, 嶋川ひろ子：当科不妊外来における妊娠成功例の妊娠, 分娩経過の検討。日不妊会誌, 28:89, 1983.

Studies of pregnancy, delivery and the newborn after treatment of infertility

Akira Takahashi, Satoshi Natuyama,
Toshimasa Kihana, Nobuyuki Emi,
Kenji Takakura and Masahiko Ukita

Department of obstetrics
and Gynecology,
Kurashiki Central Hospital

A retrospective study was conducted on the course of pregnancy, delivery and the status of the newborn in 154 patients who had been treated for infertility in our hospital from October 1984 to December 1986 (Infertile group).

Control group 1 consisted of 664 patients with spontaneous pregnancies, but elderly primipara was significantly less than in the study group, so, another control group 2, of patients with spontaneous pregnancies, was created in which the number, rate of primipara and multipara, age at delivery were same as in the study group.

Thirteen percent of pregnancies in the infertile group resulted in spontaneous abortion and the incidence of threatened abortion was higher than

in either control group. On the other hand, the incidence of premature labor, anemia, toxemia and abnormal pattern of NST screening during pregnancy was not significantly different between the infertile group and the control groups. The rate of cesarian section, fetal distress and postpartum hemorrhage in the infertile group was higher than in control group 1, but not significantly different than in control group 2. The rate of male versus female newborn was higher in the infertile group

than in either the control group. No particular malformations or neonatal complications were recognized in the infertility group.

The above findings indicate that unless a patient is an elderly primipara, gestational management in patients treated for infertility can be carried out as in a cases of natural conception, except for recognition of an increased risk of abortion during the early stage of pregnancy.

(受付：昭和62年12月20日)

当科不妊外来における臨床的統計の推移

Statistical Data on Women Treated in the Infertility Clinic at Shimane Medical University

島根医科大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 北尾 学教授)

西 垣 新	高橋 健太郎	山崎 裕行
Arata NISHIGAKI	Kentaro TAKAHASHI	Hiroyuki YAMASAKI
草刈 万寿夫	内田 昭弘	白井 孝昭
Masuo KUSAKARI	Akihiro UCHIDA	Takaaki SHIRAI
荒木 芳美	吉野 和男	北尾 学
Yoshimi ARAKI	Kazuo YOSHINO	Manabu KITAO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University

昭和54年10月15日より昭和62年3月31日までに当科不妊外来を受診した挙児希望患者432名を対象とし、システム化後の4年間(昭和58~61年度, A群)とシステム化前の4年間(昭和54~57年度, B群)とを比較検討して以下の結果を得た。

- (1) 初診時年齢は原発性, 続発性共に両群間で差は認められなかった。
- (2) 初診時不妊期間はA群の方が短い傾向にあった。
- (3) 不妊原因では男性因子の占める割合がB群では14.4%であったが, A群では24.9%と増加した。
- (4) 妊娠率は24.1% (B群) から35.4% (A群) へと上昇が認められ, 原発性, 続発性の別では続発性の方が両群とも妊娠率は高値であった。不妊原因別の妊娠率では, 殆どどの因子においてA群の方が高値であった。
- (5) 初診時不妊期間と妊娠率では不妊期間5年未満, 5年以上ともにA群の方が妊娠率は高値を示した。
- (6) 初診より妊娠までの期間は大半が2年以内に妊娠しており, 両群間に差は認められなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 596-601, 1988)

緒 言

不妊外来においては系統的な診断, 治療が重要であることはいうまでもない。当科では昭和54年10月15日の附属病院開院以来, 特殊外来として不妊外来を設置しているが, 昭和58年4月1日より不妊症患者を登録制にし, 新しく系統的に診療を開始した。この新しいシステム化後4年が経過したので, 治療効果の判定をするために, システム化前後の各4年間に臨床統計的に比較検討を行い, 若干の知見を得たので文献的考察を加えて報告する。

研究対象および方法

昭和54年10月15日より昭和62年3月31日までに当科不妊外来を受診した挙児希望患者432名を対象とした。昭和58~61年度の初診者237名をA群, 昭和54~57年度の初診者195名をB群とし, 両群間での比較検討を行った(表1)。

研究成績

1) 初診時年齢分布

図1に初診時年齢分布を示す。原発性不妊患者に

表1 研究対象

	初診患者数 (名)	不妊外来初診患者数(名)		
		原発性	続発性	計
A群	7871	141(1.8)	96(1.2)	237(3.0)
B群	5222	115(2.2)	80(1.5)	195(3.7)

A群：昭和58～61年度 () %
 B群：昭和54～57年度

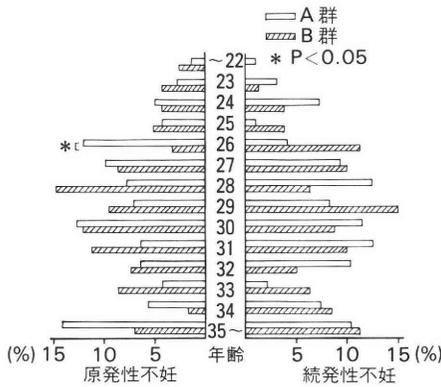


図1 初診時年齢

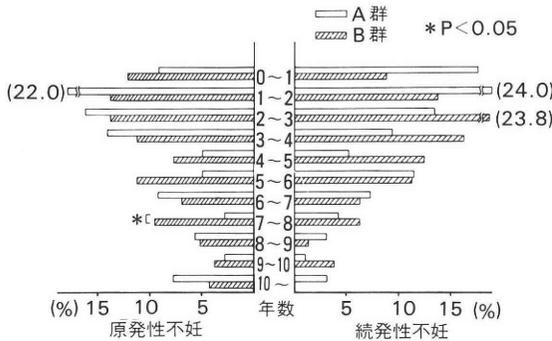


図2 初診時不妊期間

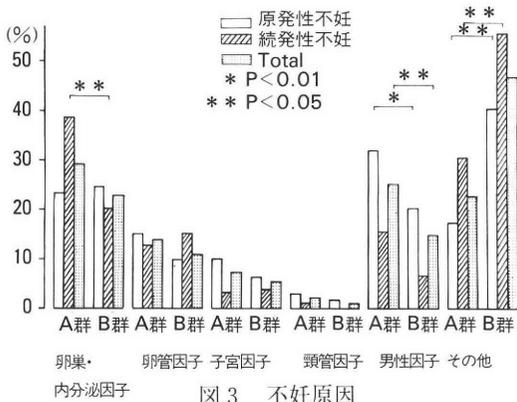


図3 不妊原因

おける初診時年齢分布はA群では26歳が有意に増加し、26～30歳が中心で、35歳以上の増加が目立った。続発性不妊患者では、24歳以下及び30～32歳の増加傾向が認められたが、A群、B群間で大きな変化は認められなかった。

2) 初診時不妊期間

初診時不妊期間の分布は、原発性不妊ではA群はB群にくらべ不妊期間7～8年の患者が有意に少なく、10年以上の患者が増加傾向を示した。続発性不妊においてはA群で不妊期間1～2年の患者をピークにして0～3年の患者が中心であり、B群にくらべ早期に受診する傾向が認められる反面、逆に10年以上の長期不妊患者の増加傾向も認められた(図2)。

3) 不妊原因

図3に不妊原因のA群とB群の比較を示す。なお不妊原因が複数存在している場合は、より妊孕力に大きな影響を与えると思われる因子を不妊原因とした。不妊原因重複例はA群で48例、B群で16例みられた。A群ではB群にくらべ、原因不明が含まれるその他の割合が減少した。また男性因子の増加も目立ち、合計で14.4%から24.9%へと増加を示した。続発性不妊では卵巣・内分泌因子の有意な増加がみられた。

4) 年度別妊娠数

年度別妊娠数を図4に示す。妊娠数は年々増加傾向にあり、昭和58年度以降は原発性、続発性ともに10名以上の妊娠者数を維持している。

5) 妊娠率

妊娠率の比較では、原発性、続発性ともにA群では妊娠率の向上が認められ、特に続発性不妊ではB群の25.0%から44.8%へと上昇し、合計でも24.1%から35.4%へと約10%、妊娠率が上昇した(図5)。

6) 不妊原因別の妊娠率

図6に不妊原因別の妊娠率を示す。統計的な有意差は認められなかったが、原発性、続発性ともに殆んどの原因因子において妊娠率が増加しており、特に頸管因子での増加が目立った。

7) 妊娠成立周期の治療法

妊娠成立周期の治療法(図7)では、排卵誘発剤はA群では原発性不妊で増加傾向にあり、続発性では逆に減少傾向であった。HSGと無治療では、原発性、続発性ともにA群で減少傾向がみられた。しかしAIH、AIDは逆に増加傾向を示した。また続発性ではその他が有意に増加を示した。

8) 初診時不妊期間と妊娠率

図8に初診時不妊期間と妊娠率との関係を示す。

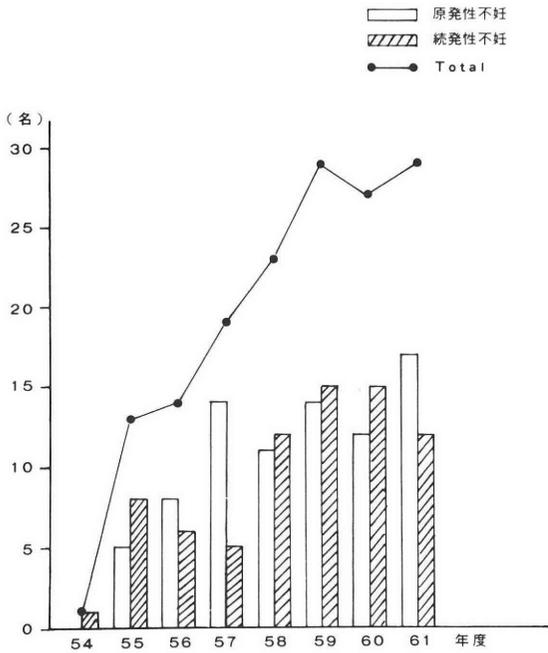


図4 年度別妊娠数

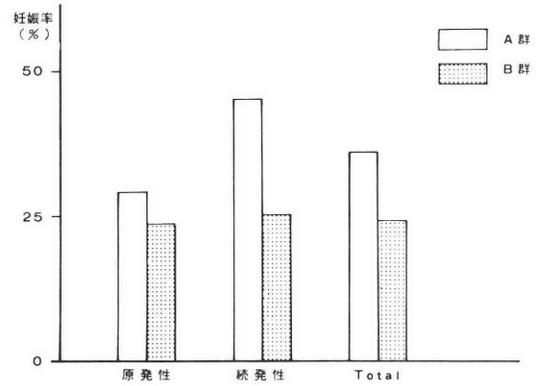


図5 妊娠率

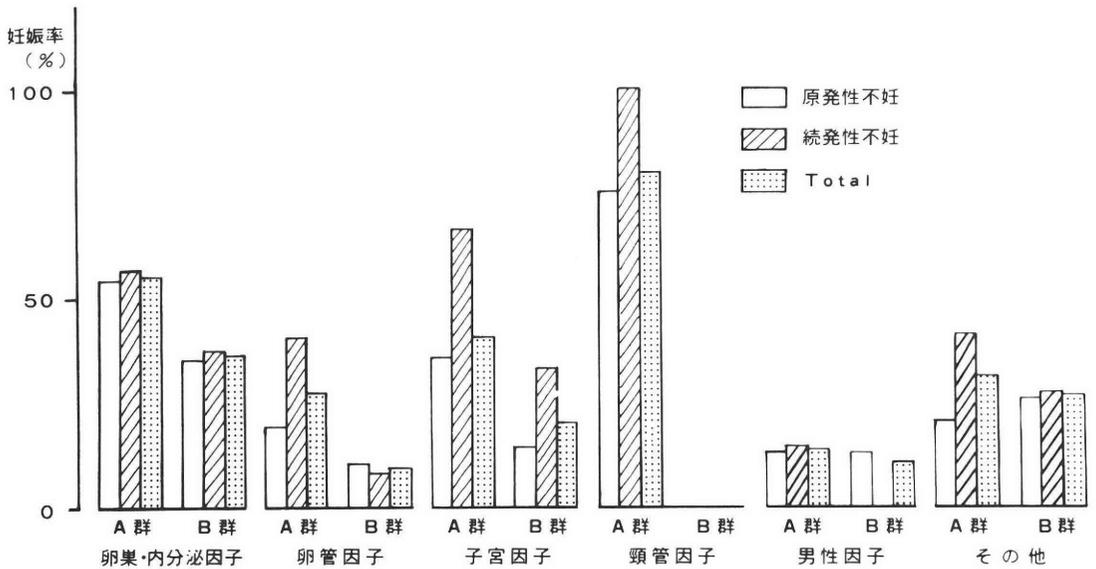


図6 不妊原因別の妊娠率

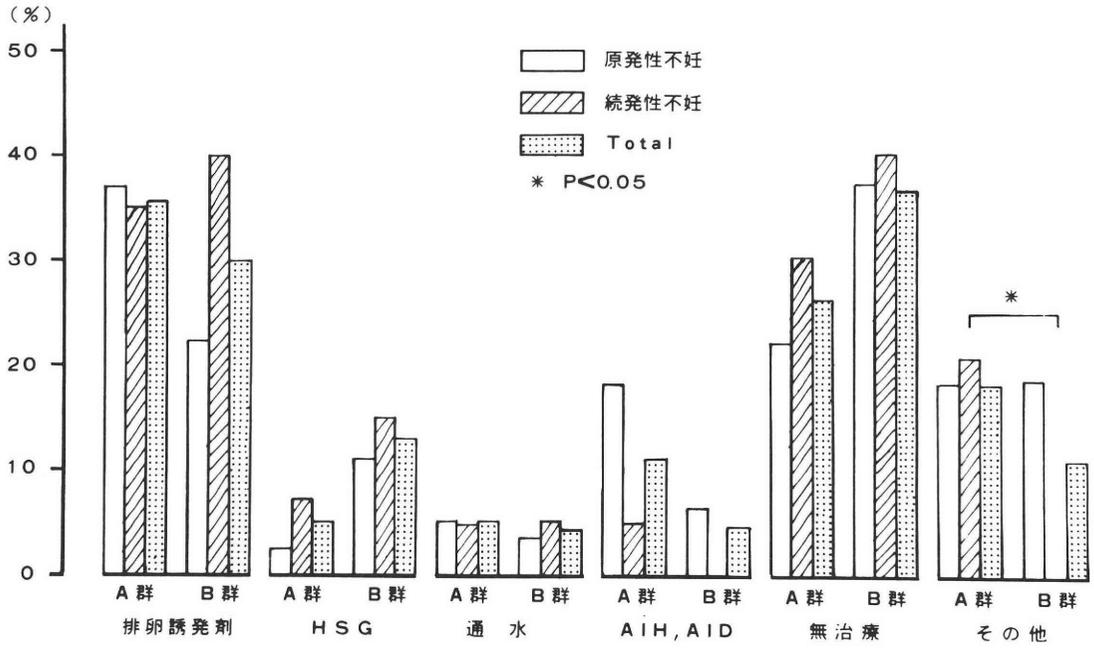


図7 妊娠成立周期の治療法

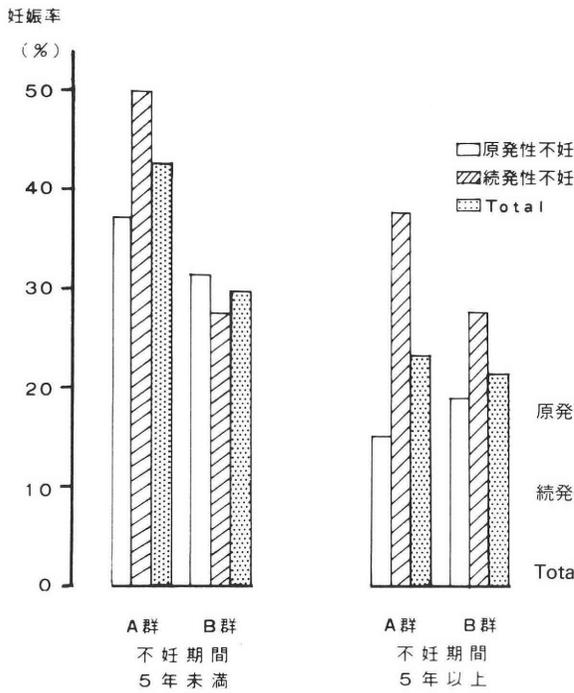


図8 初診時における不妊期間と妊娠率

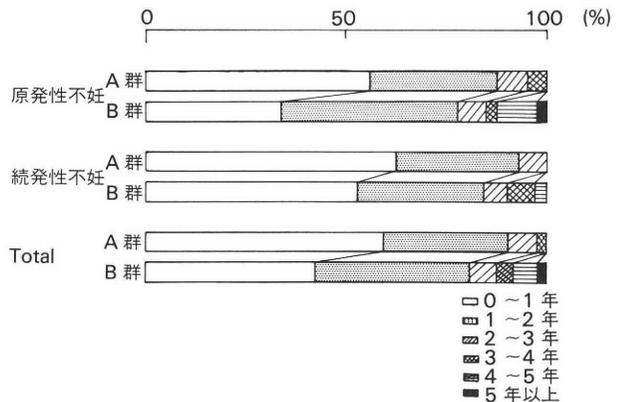


図9 初診より妊娠成立までの期間

不妊期間 5 年未満では原発性、続発性ともに妊娠率の上昇が認められた。不妊期間 5 年以上の長期不妊群では続発性不妊において妊娠率の上昇が認められた。

9) 初診より妊娠成立までの期間

初診より妊娠成立までの期間は、原発性不妊患者において、B 群では 1～2 年が最も多く、5 年以上かかって妊娠する例もみられたが、A 群では 56.1% が 1 年以内に、87.8% が 2 年以内に妊娠し、4 年以内に 100% が妊娠した。続発性不妊患者においては、B 群では 1 年以内に 53.1% が妊娠し、原発性不妊と同様に長期間で妊娠するものもみられたが、A 群では 1 年以内に 62.8%、2 年以内に 93% が妊娠しており、3 年以内に 100% が妊娠した。このように A 群では原発性、続発性共に妊娠成立周期が短期になる傾向がみられた (図 9)。

考 察

不妊外来患者に対して、不妊症専門外来の設置、不妊症専用カルテの使用、系統的な不妊検査の実施といったシステム化は妊娠率向上に有効であり、橋本ら¹⁾もその有効性を報告している。当科においても昭和 58 年度からは不妊症患者の登録制、および不妊症専用カルテの使用を実施しており²⁾、年々妊娠者の数も増加しておりシステム化の効果が現われつつある。今回、そのシステム化の効果判定のためにシステム化前後で臨床統計的に検討してみた。

産婦人科初診総患者に対する不妊外来患者の割合については 2～30%^{3,4,5,6)}とさまざまであるが、当科では地域性もあり、A 群、B 群とも 3% 台であり変化は認められなかった。初診時年齢については、A 群の原発性不妊で 35 歳以上が増加している。これは他院で治療を受けたり、治療を途中で中断した長期不妊患者が最近の IVF-ET を含めた不妊症治療のめざましい向上をマスメディアを介して知り、多く受診するようになったためと思われる。逆に A 群の続発性不妊では 24 歳以下の若年者の受診が増加しており、若年者の不妊期間に対する考え方が短縮傾向にある事を物語っている。

初診時不妊期間についても A 群では 2 年未満の患者が増加している反面、10 年以上の患者も増加しており、早期の不妊外来受診と、長期不妊例の受診増加という両極化が進んできたように思われる。長期不妊群については我々が以前に報告⁷⁾しているように早期の受診、診断、治療が必要である。

不妊原因では卵巣内分泌因子、男性因子の増加と原因不明群を含むその他の減少が目立った。これは

laparoscopy の積極的な施行、血清 CA 125 の測定を含めた系統的な原因検索の効果と、不妊症患者の夫に seminalysis を必ず行うようになったためと思われる。卵巣内分泌因子の増加はこの中に高プロラクチン血症を含んでおり、そのための増加と思われる。

不妊原因別の妊娠率では頸管因子での増加が目立ち、これは子宮腔部びらんに対する CO₂ レーザー治療や AIH による妊娠例の増加によると思われる。今回の統計処理には加えていないが、B 群の中で 58 年度以降に妊娠した例が原発性で 14 名、続発性で 12 名あり、これらを加えると A 群での妊娠率はさらに上昇すると思われる。

妊娠成立周期の治療法として A 群では AIH、AID が増加しており、これは精子 swim up 洗浄濃縮法による精子濃度 20×10⁶/ml 以下の severe oligozoospermia の治療⁸⁾を取り入れた効果が現れたためと思われる。また A 群で続発性のその他が有意に増加しているのは、子宮内膜症におけるダナゾール治療後の妊娠例が増加したためと思われる。

おわりに

新しい系統的な診療体制により、妊娠率の向上が認められたので、システム化前後での臨床的統計を比較検討し、若干の文献的考察を加えて報告した。

本論文要旨は第 25 回日本不妊学会中・四国総会(於松山)で発表した。

文 献

- 1) 橋本正淑, 田中昭一: わが講座における不妊外来, 産婦治療, 50: 73, 1985.
- 2) 北尾学, 高橋健太郎, 吉野和男: 不妊外来の実際とすすめ方, 産婦治療, 53: 312, 1986.
- 3) 楠田雅彦, 納島廉正, 熊本熙史, 福嶋恒彦: 教室における不妊婦人の統計的観察, 日不妊会誌, 14: 95, 1969.
- 4) 高田 久: 農村都市における不妊症の実態, 日不妊会誌, 19: 137, 1974.
- 5) 百瀬和男, 平敷好雄, 大村 剛, 田中リナ: 中規模病院における不妊外来—大学不妊クリニックとの比較, 日不妊会誌, 19: 123, 1974.
- 6) 飯塚理八: 不妊症学, p 2, 金原出版社, 東京 1974.
- 7) 高橋健太郎, 吉野和男, 荒木芳美, 西垣 新, 白井孝昭, 草刈万寿夫, 内田昭弘, 北尾 学: 島根医大附属病院産科婦人科不妊外来における長期不妊の臨床的統計, 日不妊会誌, 32: 311, 1987.
- 8) 吉野和男, 柳光寛仁, 草刈万寿夫, 白井孝昭, 西垣新, 高橋健太郎, 北尾学: 当科で施行している精子 swim up 洗浄濃縮法を用いた AIH の有用性に関する研究, 日不妊会誌投稿中.

**Statistical data on women
treated in the infertility
clinic at Shimane
Medical University**

Arata Nishigaki, Kentaro Takahashi,
Hiroyuki Yamasaki, Masuo Kusakari,
Akihiro Uchida, Takaaki Shirai,
Yoshimi Araki, Kazuo Yoshino
and Manabu Kitao

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University.

We assessed data on 432 infertile women examined in the infertility clinic of Shimane Medical University from October 1979~March 1987. Two groups were prepared those examined in the first four years (B) and those seen in the last four years (A).

Results were as follows:

- 1) Those in both groups were much the same age at the time of the first visit (NSS).
- 2) The infertile period of those in Group B had covered a longer period, at the first visit.
- 3) Concerning factors related to infertility, the male related factor was 24.9% in Group A and 14.4% in Group B.
- 4) Rate of pregnancy increased from 24.1% in Group B to 35.4% in Group A, the rate being higher in secondary rather than primary sterile women. With regard to the causes of sterility, almost all factors were related to a higher rate of pregnancy in Group A.
- 5) Concerning the period of infertility at the first visit, the rate of pregnancy was higher, either 5 years above or below in those in Group A.
- 6) Almost all subjects become pregnant within two years of the first visit (NSS).

(NSS: no statistical significance)

(受付 昭和62年12月23日)

TRUE HERMAPHRODITISM WITHOUT DEMONSTRATION OF EXISTENCE OF GONADS

Takashi OKAMURA, Toru TAKEUCHI, Osamu NISHII
and Tsutomu YAGINUMA

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

Abstract: The diagnosis of true hermaphroditism should be made only if the coexistence of ovarian and testicular tissues can definitely be demonstrated. This case, however, may be regarded as true hermaphroditism for the following reasons despite the facts that neither male nor female gonads could be discernible: (1) the existence of tube, fimbria, tiny uterus, deferens duct and epididymis; (2) 46, XY of karyotype; (3) long lasting high levels of testosterone; (4) normal levels of 17α -Hydroxyprogesterone and 5α -dihydrotestosterone; and (5) normal release of glucocorticoid in response to adrenocorticotropic hormone.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 602-605, 1988)

Introduction

A 23-year-old single nulligravid girl was referred to the University of Tokyo's Endocrinology Clinic at Mejirodai, Tokyo, Japan for primary amenorrhea. Her genitalia was feminine-appearing at birth except mild clitoromegaly and she has kept her own course until 23 years of her age. She underwent left ocular enucleation at the age of 14 because of congenital glaucoma. She has a younger brother also suffering from congenital glaucoma. Breast development was noted at the age of 13, followed by growth of axillary and pubic hair. We can't ask her mother about details during pregnancy because her whereabouts is unknown after she was divorced from her husband.

Physical examination revealed a phenotypic female, 165 cm tall and weighing 70 Kg. Pubic and axillary hair was present in normal amount. Moderate hirsutism was observed on the skin, thigh and above upper lip. Breast development corresponded to Tanner stage II with no galactorrhea. Her blood pressure was normal but arrhythmia (ventricular extrasystol) was noted.

Pelvic examination revealed a normal male escutcheon, moderate clitoromegaly (2.5×1.8), vagina of small caliber but of normal depth with atrophic mucosa. The uterus was small and adnexa were not palpable. Normal carrying angles and normal 4th metacarpals were noted. Neurologic examination was intact. Peripheral blood karyotype with Giemsa staining and G banding was 46, XY with 30 cells counted. A Y-chromosome was identified and X chromatin was not present on buccal smear on two separate occasions.

Laboratory studies including complete blood count, serum chemistries and thyroid function test showed that all were within normal limits. Gonadotropin levels were elevated with a luteinizing hormone (LH) level of 94mIU/ml and a follicle stimulating hormone (FSH) value of 82mIU/ml. Serum prolactin was 12ng/ml; cortisol, 16.8 μ g/dl; T, 3.4ng/ml (normal range in female is 0.3 to 0.7ng/ml); estradiol (E_2), 17pg/ml; progesterone, 0.5ng/ml; 17α -Hydroxyprogesterone, 0.28ng/ml; corticosterone, 2.28ng/ml; 11-deoxycortisol, 1.27ng/ml; desoxycorticosterone, 0.0404ng/ml; de-

Table 1 Hormone evaluations in 24-hours urinary specimens on ACTH test, dexamethazone suppression test and HCG stimulation test,

		Before	After ACTH injection	After Dexa. medication	After Dexa. + HCG administration
Androsterone	(mg/day)	2.4	3.5	0.45	1.49
Etiocholanolone	(mg/day)	2.3	3.2	0.76	2.84
Dehydroepiandrosterone	(mg/day)	0.29	1.6	<0.05	<0.05
11-ketoandrosterone	(mg/day)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
11-ketoetiocholanolone	(mg/day)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
11 β -Hydroxyandrosterone	(mg/day)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
11 β -Hydroxyetiocholanolone	(mg/day)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Pregnanetriol	(μ g/day)	0.47	1.1	0.32	0.36
17-KGS	(mg/day)	8.9	37.4	3.2	3.1
17-OHCS	(mg/day)	7.4	25.6	1.1	1.2

(Dexa : dexamethazone)

Table 2 Serum hormone levels.

	Before (Day 0)	After ACTH injection (Day 1)	After Dexa. (Day 2)	After Dexa. + HCG medication	After Dexa. + HCG administration	3 Months after operation
T (ng/ml)	3.4, 3.0, 3.7	2.6	2.6	2.2	3.6	3.0
E ₂ (pg/ml)	17			17	20	13
FSH (mIU/ml)	82					76
LH (mIU/ml)	94					95

Testosterone (T) levels on ACTH test, dexamethazone suppression test and HCG stimulation test (Dexa : dexamethazone). And estradiol (E₂), FSH and LH levels before and after operation.

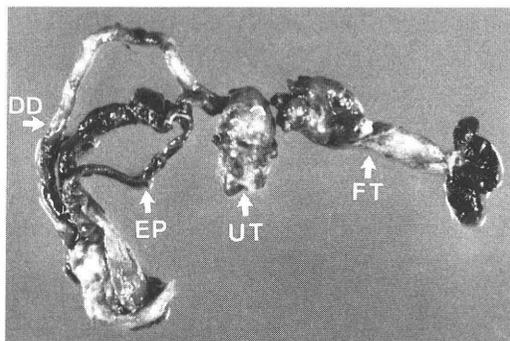


Fig. 1 Removed specimens, a small uterus (UT), normal tube (FT), epididymis (EP), and deferens duct (DD).

hydroepiandrosterone (DHEA), 4.8ng/ml; androstendione, 0.881 ng/ml; 5 α -dihydrotestosterone (DHT), 0.177 ng/ml; 17 α -OH-pregnenolone, 6.4ng/ml (normal range is 0.1 to 4ng/ml); and etiocholanolone, 0.16ng/ml. Blood samples were drawn 3 times a day and the mean serum T was measured at the first day of admission (Day 0). The mean T on Day 0 was 3.1ng/ml. The next day (Day 1), 250 μ g adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in 500 ml of saline solution was injected intravenously for 6 hours from 9 a. m. Dexamethazone was given orally at the dose of 1 mg every 8 hours from Day 2 to 12. Human chorionic gonadotropin (HCG) 3000 IU per day was injected

intramuscularly every other day from Day 8 to 12 together with dexamethazone administration. Blood samples were drawn at 9 a. m. and 24-hour urinary samples were collected on Day 0, 1, 2, 7 and 13. The extra blood sample was drawn immediately after the termination of ACTH injection.

As shown in Table 1, 17-KS, 17-KGS, 17-OHCS and pregnanetriol in the 24-hour urinary specimen on Day 0 were all within normal limits. After ACTH stimulation test, the increment of 17-KGS and 17-OHCS indicated 3 times over the baseline. The urinary content of 11-oxy-17-KS did not indicate the remarkable change after dexamethazone and HCG administration. The urinary contents of 11-deoxy-17-KS were suppressed after dexamethazone medication and increased again after HCG injection with dexamethazone medication but did not exceed the basal levels, respectively. The serum level of T was suppressed to 2.2ng/ml by dexamethazone medication and increased to 3.6ng/ml by HCG administration (Table 2). The serum cortisol release responded to ACTH was within normal range.

Exploratory laparotomy revealed a small uterus. At the left side of the uterus, there were normal Fallopian tube and fimbria but no ovary. At the other side, there was a fibrous band being encapsulated by a smooth peritoneal reflection extended to the right inguinal canal. No identifiable mass was felt in the right inguinal canal and every part of true pelvis. Left salpingectomy and hysterectomy were performed, followed by amputation of the right band at the most distal region.

The uterus had a cylindrical configuration and measured 1.8×0.9×0.9cm. Histologic examination revealed an endometrial gland without any evidence secretion. The Fallopian tube and fimbria were normal. The fibrous band of the right side of the uterus consisted mainly of 2 cords substances about 11 cm in length (Fig. 1). Microscopic examination of these cords revealed that one was a deferent duct and the other was an epididymis. These two cords drawn closely to each other at the distal region which was epididymis histologically. For the cosmetic purpose, amputation of clitoris were performed consecutively because "she" was brought up as

female. Microscopic examination of the clitoris revealed well-developed corpus cavernosum without any evidence of corpus spongiosum. In this respect, it may be appropriate to regard this material as a clitoris, histologically.

Discussion

True hermaphroditism with a 46, XY karyotype is uncommon, representing 13% to 16% reported cases of true hermaphroditism for which cytogenetic studies were performed^{1,2,3}. Furthermore, this intersexual disorder is uncommon over the age of 23 because it presents itself at an early age and is treated early in developed countries.

Concerning the laboratory findings, the level of pituitary gonadotropin, T and 17 α -OH pregnenolone were high. Conversion of cholesterol to pregnenolone is a rate-limiting step in the steroid pathway and one of the principal effects of LH stimulation. Therefore, the higher levels of pregnenolone were responsible for higher gonadotropin. Increased levels of gonadotropin are recognized in most patients with true hermaphroditism^{1,4,5}. Gunasegaram et al⁶) stated that increased gonadotropin may be causally related to defective activity of 5 α -reductase transforming T to DHT and/or androgen insensitivity of the hypothalamus. After gonadectomy, the levels of gonadotropin as well as T were decreased⁶. It may be caused that the hypothalamic GnRH content rapidly decreased after castration⁷). Since in this case, however, the gonads could not be removed, the gonadotropin and T levels continued to remain high. Higher T may be induced by higher gonadotropin but it is unknown the affects of T on gonadotropin secretion⁸). Berkovitz et al¹) showed that T rose following HCG stimulation and there was no significant accumulation of precursors in two patients (13 months and 4 months of age) with true hermaphroditism. In our case, T levels also increased following HCG administration during dexamethazone medication, but the peak of T response to HCG slightly exceeded that of initial pretreatment control levels. These are suggested that small ovarian composition may be existed, and/or receptors for LH (or HCG) in this gonad

may be desensitized or down-regulated by the high levels of T over a period of 23 years⁷⁾.

In conclusions, this case could not discernible neither male gonad nor female gonad, but high levels of T and the response of T to HCG indicated the existence of gonads including male and female tissues, somewhere⁹⁾. Therefore, this case may be regarded as true hermaphroditism. Gonadectomy was necessary to avoid development of gonadal neoplasia, but in spite of our persuasion, the patient refused further examination and treatment.

References

- 1) Berkovitz, G. D., Rock, J. A., Urban, M. D. and Migeon, C. J.: True Hermaphroditism. The Johns Hopkins Medical J., 151: 290, 1982.
- 2) Huffman, J. W., Dewhurst, C. J. and Capraro, V. J.: Children with Ambiguous Genitalia. The Gynecology of Childhood and Adolescence, 175, 1981.
- 3) Quigley, M. M., Vaughn, T. C., Hammond, C. B. and Haney, A. F.: Production of Testosterone and Estrogen in Vitro by Gonadoblastoma. Obstet. Gynecol., 58: 253, 1981.
- 4) Sloan, M. S., Rosenberg, S. M. and Brown, J. A.: Primary Amenorrhea and Virilization in A True Hermaphrodite with A Rare Dicentric Y Chromosome. Obstet. Gynecol., 64: 64S, 1984.
- 5) Villanueva, A. L., Benirschke, K., Campbell, J., Wachtel, S. S. and Rebar, R. W.: Complete Development of Secondary Sex Characteristic in A Case of 46, XY Pure Gonadal Dysgenesis. Obstet. Gynecol., 64: 68S, 1984.
- 6) Gunasegaram, R., Mathew, T. and Ratnam, S. S.: Sertoli Cell Tumor in A True Hermaphrodite: Suggestive Evidence for Ectopic

Gonadotropin Reproduction by The Tumor. Brit. J. Obstet. Gynecol., 88: 1252, 1981.

- 7) Bardin, C. W.: Pituitary Testicular Axis. Reproductive Endocrinology (ed. Yen, S. S. C. and Jaffe, R. B.), 177, 1986.
- 8) Martini, L.: Androgen Metabolism in The Brain and in The Anterior Pituitary: Role in The Feedback Control of Gonadotropin Secretion. The Anterior Pituitary Gland (ed. Bhatnagar, A. S.), Raven Press, New York, 73, 1983.
- 9) Horton, R.: Markers of Peripheral Androgen Production. Sexual Differentiation: Basic and Clinical Aspects (ed. Serio, M. et al.), Raven Press, New York, 261, 1984.

性腺の存在を証明しえなかった

真性半陰陽の一症例

東京大学医学部附属病院分院産婦人科

岡村 隆 竹内 亨 西井 修

柳沼 恣

真性半陰陽は卵巣および精巣が同一個体に存在する比較的稀な奇形である。本症例は、表現型は女性であるにもかかわらず染色体は46, XYを示し、開腹所見では子宮、卵管、精管および精巣上体を認めた。しかし、雌雄性腺は認められず確定診断を行なえなかった。従って各種のホルモン検査によりその診断を試みた。副腎皮質ホルモン値は正常範囲であり、刺激試験においても異常反応は認められなかった。17 α -OH Progesterone, 5 α -DHTも正常値を示した。血清 Testosterone (T)は高値を示し精巣の存在を、またHCGに対するTの上昇反応は卵巣の存在を疑わせた。従って本症例は雌雄性腺を証明出来なかったが真性半陰陽が最も疑われた。

(受付: 昭和62年10月9日)

芍薬甘草湯 (S-K) の高 testosterone
血症性婦人における血中 androgens 濃度の低下作用,
排卵誘発効果と安全性—多施設協同研究

Effect of SHAKUYAKU-KANZO-TO on Serum Testosterone
Levels and Ovulation in Amenorrheic Women with
High Serum Testosterone Levels

産婦人科 S-K 研究会 (代表 小林拓郎)

Department of Obstetrics and Gynecology S-K study group

東京大学医学部付属病院分院

柳 沼 恣 岡 村 隆 竹 内 亨
Tsutomu YAGINUMA Takashi OKAMURA Toru TAKEUCHI
西 井 修 小 林 拓 郎
Osamu NISHII Takuro KOBAYASHI

Faculty of Medicine, University of Tokyo at Mejirodai

秋田大学医学部

福 島 峰 子
Mineko FUKUSHIMA

Akita University School of Medicine

秋田赤十字病院

藤 盛 亮 寿
Ryoju FUJIMORI

Akita Redcross Hospital

新潟大学医学部

荒 川 修 佐 藤 芳 昭 竹 内 正 七
Osamu ARAKAWA Yoshiaki SATO Shoshichi TAKEUCHI

Niigata University School of Medicine

川口済生会病院

岡 村 泰
Yasushi OKAMURA

Kawaguchi Saiseikai Hospital

慶応大学医学部

小林 俊文 飯塚 理八
Toshifumi KOBAYASHI Rihachi IIZUKA

School of Medicine, Keio University

東京大学医学部

北川 浩明 桑原 慶紀 水野 正彦
Hiroaki KITAGAWA Yoshinori KUWAHARA Masahiko MIZUNO

Faculty of Medicine, University of Tokyo

横浜市立大学医学部

飛鳥井 邦雄 植村 次雄 水口 弘司
Kunio ASUKAI Tsugio UEMURA Hiroshi MINAGUCGHI

Yokohama City University School of Medicine

名古屋大学医学部附属病院分院

大沢 政己 成田 収
Masami OSAWA Osamu NARITA

Nagoya University School of Medicine at Higashiku

大阪大学医学部

青野 敏博 谷澤 修
Toshihiro AONO Osamu TANIZAWA

Osaka University Medical School

京都府立医科大学

玉舎 輝彦 岡田 弘二
Teruhiko TAMAYA Hiroji OKADA

Kyoto Prefectural University of Medicine

大分医科大学

森 宏之 木川 源則
Hiroyuki MORI Tomonori KIGAWA

Medical College of Oita

大分県立病院

谷口 一郎 肥田 木 孜
Ichiro TANIGUCHI Tsutomu HIDAKI

Oita Prefectural Hospital

投与し、2週毎に血清ホルモン濃度を測定した。これらの患者において、血清 T, FSH と LH 濃度は正常月経周期卵胞期初期におけるより有意に高値であり、一方、血清 E_2/E_1 と E_2/T 比は後者より有意に低値であった。S-K 投与により、血清 T 濃度は投与の2週から有意に低下し、その後も16週まで低下し続け、血清 E_2/E_1 と E_2/T 比は投与の2週から有意に上昇し、その後16週まで E_2/E_1 比はこの値を維持し、 E_2/T 比は上昇傾向を示した。さらに、血清 androstenedione (Δ^4A) 濃度と free T 濃度を測定するために十分な血液が得られた患者において、これらの濃度の有意な低下がまた認められた。S-K 投与中、血清 FSH 濃度はほとんど不変であったが、血清 LH 濃度は有意ではないが比較的大きい変動を示した。これらの結果は、S-K がおそらく卵巣に直接作用して、この aromatase 活性を高めたことを示唆する。

S-K 投与中、無排卵患者の 42.3% (33/78) に排卵が認められ、挙児希望患者の 17.6% (22/68) に妊娠が成立した。S-K 投与中、どんな副作用も認められなかった。

かくて、S-K は、高 testosterone 血症性の無排卵、不妊症そしておそらく男性化徴候患者に安全で有効な薬物である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 606-616, 1988)

緒言

血中の testosterone (T) 濃度が高い状態において、排卵障害の発生頻度が高いことが知られてきている^{1,2)}。この高 T 血症を始めとする hyperandrogenism における排卵障害の治療にいて、glucocorticoids あるいは glucocorticoids と clomiphene citrate との併用、そして未だ確定的ではないが spironolactone が使用されてきた^{2,3)}。しかし、glucocorticoids や spironolactone は、それ本来の作用による副作用のために長期間の使用は困難であると考えられる。最近、漢方薬である S-K (ツムラ) が、高 T 血症性の無排卵性不妊患者において、その血中 T 濃度を低下させ、しかもあるものに排卵を起こし妊娠に至らせしめることがあり、そして副作用の発生がないことが報告されてきている^{4,5,21)}。しかし、これらは比較的少数例での研究であった。そこで本研究は、多施設における多数の高 T 血症性婦人に S-K を使用して、第一にこれらの血中 T 濃度が確かに低下するかどうかを検討し、次にこれに随伴した他の内分泌学的状態の変化と排卵効果を調べた。かくて、S-K のかかる状態の改善の機構と、その臨床応用の有用性を検討した。

対象患者

ほぼ全国に分布する 13 施設において、血清 testosterone (T) 濃度が 0.7ng/ml 以上とされた 128 人の患者を対象にした。これらのうち、服薬が不十分であった 2 例、治験中ホルモン測定がほとんど行われなかった 1 例と、後に血清 T 濃度を一括して測定した時に、投与開始時のその濃度が 0.7ng/ml 未満であった 15 例の計 18 例を統計解析から除外した。

患者の年齢は、 26.70 ± 0.40 (S E) 歳、身長

156.7 ± 0.49 cm、そして体重は 52.9 ± 0.82 kg であった。110 例中、無排卵 (無月経)、稀発性排卵 (稀発月経)、そして正常周期の患者は、それぞれ 78 例、15 例 (両者で 84.5%)、そして 17 例であった。既婚者は 82 例で、79 例が不妊症患者であった。これらのうち原発性不妊症患者は 56 例であった。その 79 例中、無排卵が 55 例、稀発性排卵が 10 例、そして正常周期が 14 例であった。

方法

74 例の患者において、予め dexamethasone (DEX) 抑制試験が行われた。DEX の 1錠 0.5mg を朝・夕 2 回 1 週間内服せしめた。DEX 投与前後の血清 T 濃度を測定して、表 1 に従って、その由来を判定した³⁾。

芍薬甘草湯 (S-K) (ツムラ) 1 日 7.5g を 3 分割 (食間) して、月経あるいは消退出血の 5 日目から 16 週間連日内服せしめた。

S-K 投与中 2 週毎に採血し、その血清をホルモン測定 (S-K 投与終了後) まで -20°C に保存した。

血清中の T, estrone (E_1), estradiol (E_2), cortisol,

表 1 血中 testosterone (T) の卵巣、副腎あるいは両者由来の決定法

Dexamethasone (DEX) 抑制試験の判定基準*		
血中 T 濃度 (ng/ml)		由来
DEX 前 - DEX 後	DEX 後	
>0.42	>0.28	卵巣・副腎
>0.42	≤ 0.28	副腎
≤ 0.42	>0.28	卵巣

* 正常卵胞期初期の血清 T 濃度の上限を 0.7ng/ml、そしてこの副腎由来部分を 60% としたものの。

表2 高T血症患者における、S-K投与前の諸血清ホルモン濃度と、S-K投与中血清T濃度の低下と関連した他の諸血清ホルモン濃度

ホルモン	患者		N	正常周期婦人 (卵胞期初期)	
	S-K投与前	S-K投与中 ¹⁾		(N=6) ²⁾	S-K投与前との比較
T (ng/ml)	0.95±0.02	0.68±0.02	109	0.43±0.06	p<0.001
	p<0.001				
E ₁ (pg/ml)	87.69±44.4	73.96±4.05	98	74.16±11.6	N.S.
	p<0.05				
E ₂ (pg/ml)	60.84±8.28	75.63±8.64	101	70.83±9.76	N.S.
	N.S.				
E ₂ /T	64.76±8.05	115.5±13.3	101	168.8±16.9	p<0.001
	p<0.01				
E ₂ /E ₁	0.65±0.04	0.73±0.07	98	0.99±0.08	p<0.01
	N.S.				
cortisol (μg/dl)	13.17±0.52	12.70±0.50	100	11.63±0.21	N.S.
	N.S.				
F S H (mIU/ml)	10.48±0.46	9.90±0.42	98	7.50±0.76	p<0.01
	N.S.				
L H (mIU/ml)	37.75±2.22	33.87±1.75	98	12.50±1.64	p<0.001
	N.S.				
P R L (ng/ml)	15.79±0.94	15.70±0.82	96 ³⁾	13.80±0.31	N.S.
	N.S.				

- 1) S-K投与中血清T濃度が最低値を示した時のホルモン濃度.
- 2) 東大分院産婦人科における値 (S-K治験と同じ測定法による).
- 3) これらのうち10人 (10.6%) の血清PRL濃度は30ng/ml以上であった.

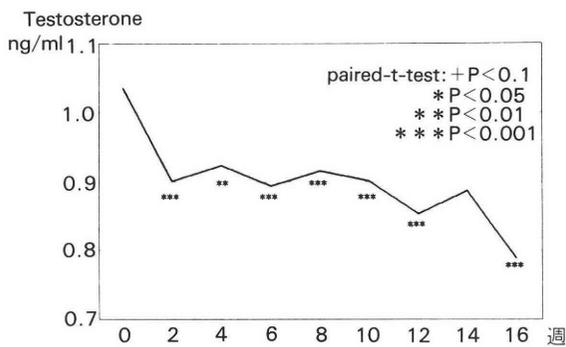


図1 S-K投与中の血清 testosterone 濃度

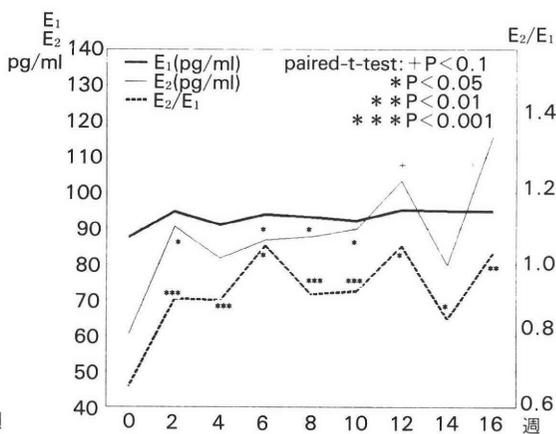


図2 S-K投与中の血清estrone(E₁)とestradiol (E₂)濃度およびE₂/E₁比

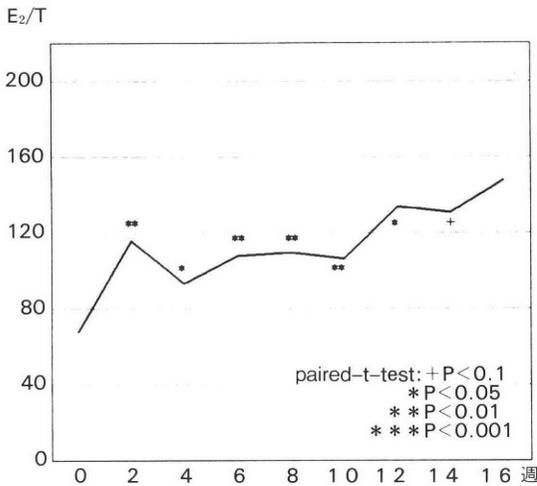


図3 S-K投与中の血清estradiol(E₂)濃度(pg/ml)と testosterone(T)濃度(ng/ml)比(E₂/T)

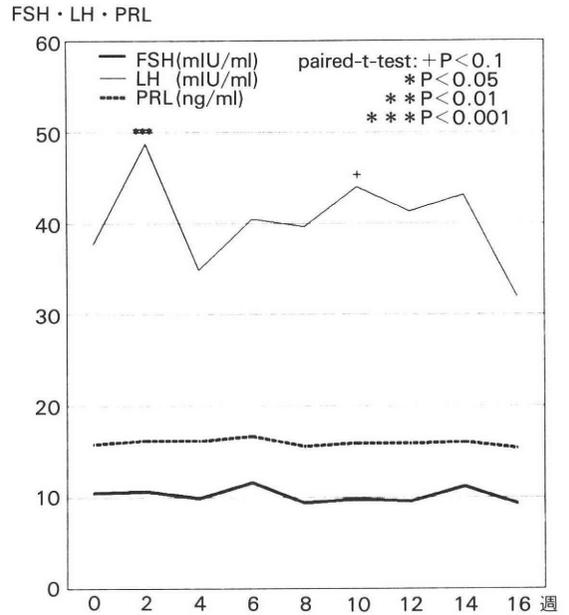


図4 S-K投与中の血清FSH, LH, prolactin(PRL)濃度

表3 高T血症患者における、S-K投与前の諸血清ホルモン濃度と、S-K投与中血清T濃度の低下と関連した他の諸血清ホルモン濃度-12例の検討-¹⁾

ホルモン	患者 (N=12)		正常周期婦人 (卵胞期初期) (N=6)	
	S-K投与前	S-K投与中	S-K投与前との比較	
T(ng/ml)	1.15±0.008	0.61±0.005	0.43±0.06	p<0.001
		p<0.001		
free T (pg/ml)	29.20±2.60	12.00±0.80	9.40±0.70	p<0.001
		p<0.001		
Δ ⁴ A (ng/ml)	2.38±0.17	1.90±0.17	0.91±0.12	p<0.001
		p<0.05		
DHEAs (ng/ml)	2038.3±246.0	1573.7±152.4	1017.1±234.9	p<0.01
		p<0.05		

1) 表2の注1), 2) 参照.

FSH, LH と prolactin (PRL)濃度は、1 個人の全検体を必ず一括して、RIAにより測定した。その後、S-K 投与前の血清と血清T濃度が最低値を示した血清が十分量残っている血清において、Δ⁴-androstenedione (Δ⁴A) と dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAs)濃度がまたRIAにより、そして free T 濃度が centrifugal ultrafiltration 法⁶⁾により一括して測定された。これらのホルモン測定の測定内および測定間変異係数は、DHEAs の測定間のそ

れが 15%であったのを除いては、すべて 10%以下であった。

東大分院において、28~35 日の正常月経周期の健康婦人の卵胞期初期の血清中のこれらのホルモン濃度がまた同様に測定され、これらを正常値とした。

排卵は、基礎体温の上昇あるいはその都度測定された血清 progesterone 濃度 > 5 ng/ml によって判定した。

S-K 治験終了後、若干の患者は8ヶ月間追跡され、これらの患者のこの期間における治療、排卵率と妊娠率が調査された。

統計学的解析は、S-K 投与中の血清ホルモン濃度の変化に関しては Student's paired t test によって、その他は Student's t test によって行われた。

結 果

DEX抑制試験：この試験によって、血清の高T濃度が、卵巣、副腎あるいは両者由来とされた患者の割合は、それぞれ66.2%、6.8%あるいは27.0% (総数74例) であった。

S-K 投与前の血清ホルモン濃度(表2)：正常婦人の卵胞期初期に比較して、これらのホルモンのうちT, FSH と LH は有意に高値であり、E₂/T比がまた有意に高値であった。一方、E₂/E₁比は、有意に低値であった。E₁, E₂, cortisol そして PRL は有意に異ならなかった。

S-K 投与中の血清T濃度の変化(図1)：血清T濃度はS-K 投与中、明らかに低下した。すなわち、投与の2週に既に有意に低下し (0.90±0.02 ng/ml)、その後も徐々に低下し、12週にはさらに低下し16週には最低値 (0.78±0.06 ng/ml) となった。一方、血清T濃度が0.7ng/ml以下になった患者の割合は、投与の2、6、14と16週において、それぞれ23、26、33、42と52%であった。

S-K 投与中の血清E₁とE₂濃度およびE₂/E₁比の変化(図2)：S-K 投与中、血清E₁濃度はほとんど変化しなかった。血清E₂濃度は全体的には次第に上昇する傾向を示し、2、6、8と10週においては有意に高値となった。一方、E₂/E₁比は、投与の2週に有意に上昇し、以後16週まで有意な高値を持続し、特に6、12と16週においては1.0以上となった。

S-K 投与中の血清E₂/T比の変化(図3)：S-K 投与の2週に、この比は有意に上昇し、10週までにこの高値は持続し、12週にはその比はさらに上昇し、その後16週まで上昇傾向が認められた。

S-K 投与中の血清cortisol濃度：S-K投与によって、血清cortisol濃度には、ほとんど変化しなかった。

S-K 投与中の血清FSH, LH と PRL濃度(図4)：S-K投与によって、血清FSHとPRL濃度は、ほとんど変化しなかった。一方、血清LH濃度は、S-K投与中、血清FSH濃度に比較して、大きい変動が認められたが、2週においての有意な高値を除いては、これらは有意な変化ではなかった。

S-K 投与中、血清T濃度の低下と関連したかもし

表4 S-K 治験中および治験後8か月間の排卵率と妊娠率

	排卵率	妊娠率
S-K 治験中	33/78 (42.3%)	12/68 (17.6%)
S-K 治験後		
S-K 単独	1/2 (50.0%)	3/5 (60.0%)
CC 単独	4/9 (44.4%)	5/12 (41.7%)
CC + S-K	3/3 (100%)	2/3 (66.7%)
CC + Pred	3/3 (100%)	0/3 (0%)

* S-K：芍薬甘草湯
 CC：clomiphene citrate
 Pred：prednisolone

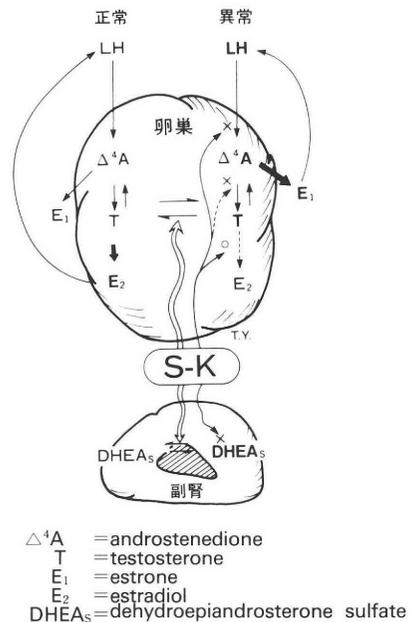


図5 S-K (芍薬甘草湯)による高T血症性排卵障害の改善機構

れない他のホルモンの血清濃度(表2、3)：S-K投与中、血清T濃度が最低値を示した時に、同時に測定された他のホルモンの血清濃度を表2と3に示した。血清T濃度の有意な低下と同時に、血清E₁濃度の有意な低下と、血清E₂/T比の有意な上昇が認められた。血清E₂濃度とE₂/E₁比の上昇傾向および、血清LH濃度の低下傾向が認められた。(表2)。

12例の患者において、S-K投与前と血清T濃度が最低値を示した時の血清中の△⁴AとDHEAsそしてfree Tがさらに測定された(表3)。これらのS-K投

与前の血清濃度は、いずれも正常婦人の卵胞初期濃度よりも有意に高値であった。血清T濃度がS-K投与により投与前の1.88分の1に低下したのに対し、free T濃度は投与前の2.93分の1にも低下した。血清 Δ_4A とDHA s濃度がまたS-K投与により有意に低下していた。

S-K投与中の排卵率(表4):対象の110例中78例(70.9%)が無排卵患者であった。これらのうち33例(42.3%)に、S-K投与中に排卵が認められた。

S-K投与中の妊娠率(表4):拳児希望者が79例いたが、このうち11例には子宮、卵管および男性因子の不妊原因が認められた。S-K投与中に妊娠した者は12例であり、従って妊娠率は17.6%であった。12例中9例は無排卵あるいは稀発排卵患者であった。

S-K治験後の排卵率と妊娠率(表4):S-K治験終了後、8ヶ月間追跡しえた患者は77例であった。これらのうち、S-K継続投与とclomiphene citrate(CC)、CC+S-KおよびCC+prednisoloneによる排卵誘発が行われた無排卵患者は17例であった。これらの治療を受けた不妊症患者は21例であった。少数例ではあるが、排卵率に関しては、S-KとCC、そしてCC+S-KとCC+prednisoloneの間でほとんど差はないようであった。

妊娠率に関しては、S-K単独はCC単独よりも、そしてCC+S-KはCC+prednisoloneよりも高いことが認められた。しかし、不妊因子(無排卵、稀発排卵および原因不明正常周期)の構成がそれぞれの治療間で異なった。すなわち、S-Kの対象患者はすべて正常周期であった。CC+S-Kの対象患者は、無排卵が1人で稀発排卵が2人であり、それぞれの1人が妊娠した。

S-K治験の、これらの期間中、S-Kによると考えられる副作用は認められなかった。

考 察

以前、著者の一人は、28~30日の正常月経周期を有する健康婦人の血清T濃度は、 $0.57 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$ ($0.42 \sim 0.73 \text{ ng/ml}$, $N=7$)であることを示した¹⁾。最近、同様な血清T濃度が同じ測定法において、 $0.43 \pm 0.06 \text{ ng/ml}$ ($0.30 \sim 0.72 \text{ ng/ml}$, $N=6$)であることが確認された(表2)。さらに、以前、血清T濃度が 0.68 ng/ml 以上の婦人において月経間隔が35日あるいは45日以上に延長する割合が有意に高くなることがまた示された¹⁾。

そこで、今回の治験の対象患者を血清T濃度が 0.7 ng/ml 以上のものとした。これらの110例の患者中84.5%は無月経あるいは稀発性月経であったが、こ

れは上述の諸事実から理解されうる。

これらの患者の74例において予めS-K投与前にDEX抑制試験が行われ、高血清Tの由来を表1に従って判定した。すなわち、それが卵巣、副腎そして両者由来とされた患者の割合は、それぞれ約66%、7%、そして、27%であった。多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)患者において血清T濃度が一般に正常婦人よりも高いことはよく知られている²⁾。PCOS患者の一報告において、血清Tの由来を表1によって判定すると、それらの臓器由来の割合はそれぞれ約50%、13%、そして、38%になった²⁾。その割合は今回の我々の患者における割合とほぼ類似しており、我々の患者の中にはPCOS患者がある程度含まれていると思われる。事実、PCOSにおけるように我々の患者の平均血清T濃度は勿論であるが、平均血清LH濃度、 E_2/T 比も正常婦人の卵胞初期よりも有意に高値であり、一方 E_2/E_1 比は有意に低値であった。しかし、これらの患者の平均血清FSH濃度は正常婦人のそれよりも有意に高く、これは典型的なPCOSの場合とは異なり、これらの患者の中には、PCOS類似疾患の患者がまた含まれていたと考えられる。これらのホルモン濃度の結果は、PCOSにおけると同様に、これらの患者のステロイド代謝過程において、($T \rightarrow \Delta^4A \rightarrow E_1$)の過程が亢進し、($T \rightarrow E_2$) (aromatase 活性)の過程が低下していることを示唆している(図5)。

さて、今回の治験の第一の目的であるS-Kの血清T濃度に対する効果は次のようなものであった。すなわち、血清T濃度は、S-K投与の2週には既に有意に低下し($P < 0.001$)、以後16週まで徐々に低下する傾向をみせ、16週には $0.78 \pm 0.06 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.001$)までになった(図1)。血清T濃度が正常周期婦人の卵胞初期の血清T濃度の上限以下となった患者の割合は、S-K投与中次第に増加した。そして投与開始後16週には、それは57%となった。

これらの結果は、S-Kは 0.7 ng/ml 以上の血清濃度を明らかに低下しうることを示し、以前の諸報告^{4,5,21)}を確認するものである。これらの患者の42.3%は、S-K投与中排卵周期を回復した。一般に排卵周期において血清T濃度は卵胞初期から次第に上昇する²⁾。従って、S-K投与中の排卵周期の回復が、本研究におけるS-Kによる血清T濃度の低下効果の証明をある程度打ち消したかもしれない。

正常月経周期の卵胞初期に比較して、これらの患者の血清 E_1 濃度はやや高い傾向にあり、血清 E_2 濃度は軽度に低い傾向にあった。S-K投与中、血清 E_1 濃度は有意に変化せず、一方血清 E_2 濃度は投与中上

昇傾向を示した(図2)。これらを反映して、S-K投与前の血清 E_2/E_1 比は正常月経周期の卵胞期初期よりも低い傾向にあったが、S-K投与の2週から有意に上昇し、その後さらに上昇傾向を示し、投与の6週以後は平均的には正常値(約1)に近い値を示した(図2)。

さらに、Tから E_2 への転換 aromatase 活性を示唆する血清 E_2/T 濃度比は、S-K投与前においては正常月経周期の卵胞期初期よりも有意に低値であったが、S-K投与の2週において既に有意に上昇し、その後も次第に上昇する傾向を示した(図3)。

これらの結果は、これらの患者におけるTから E_2 への転換の障害すなわち aromatase 活性の障害が、S-K投与中に次第に正常化したことを示唆する(図5)。

卵巣において aromatase 活性が低下して androgens 産生が高まる場合、即ちTや Δ_4A の産生が高くなる場合には、末梢組織特に脂肪組織において Δ_4A から E_1 への転換が増加する。かくして生じた過剰の E_1 は、おそらく下垂体LH産生細胞のLHRHに対する感受性を持続的に高める。従ってかかる状態において血中LH濃度も高くなる。このLHは卵巣の莢膜細胞に作用してさらに、androgens産生を亢進する。かくして、androgens $\rightarrow E_1 \rightarrow LH \rightarrow$ androgensの悪循環が形成される(図5)。卵巣内の過剰のandrogensは卵胞の発育を阻止し閉鎖卵胞を形成し、排卵を阻止し、あるいは黄体機能を短縮せしめる²⁾。かくて卵巣内には多数の卵胞や嚢胞が存在するようになる。これらから過剰のinhibinが分泌されるならば、これはFSHの放出を阻止する。FSHにはその主要な作用として顆粒膜細胞におけるaromatase活性を高める作用がある。従って卵巣におけるandrogensの産生が亢進している時には放出されるinhibinの量に依存的にaromatase活性は低下するであろう。かくして、これは前述の悪循環に拍車をかけることになる。従って、このような状態の治療のためには、この悪循環のどこかを断ち切ることが必要である。これには、wedge resection, pill, spironolactone, cyproterone acetate³⁾, medroxyprogesterone acetate⁷⁾, ketoconazole^{8,9)}などがある。

しかし、wedge resectionとspironolactoneを除いては、それらの作用機構から考えて当然のことながら E_2 産生をも阻止して排卵を抑制してしまう。Wedge resectionによっては排卵を起こしうるが、この有効期間は僅か1年程度であり¹⁰⁾、しかも手術後の癒着が不妊の原因を新たに加える^{10,11)}。Spironolactoneの排卵誘発の効果は確定的でなく、多尿

や多飲の副作用の発生が報告されている³⁾。従って、本研究の結果から、上述の悪循環を切り排卵を起こすために、S-Kがこれらの薬物より、より適切であると考えられる。

図4に示したように、S-K投与中、血清FSHとPRL濃度はほとんど不変であった。血清LH濃度は、S-K投与前に比較して投与の2週において有意に高値となった。それ以後は有意ではないが、FSHやPRLと比較して大きい変動を示した。これは、おそらくLH本来のpulsationと、発生しつつあった排卵の前期あるいは発生した排卵の周期における血清LH濃度の変化によると思われる。すなわち、血清 E_2 濃度の有意な最高値の時に一致して投与の2週($P < 0.001$)と10週($P < 0.1$)における血清LH濃度が、S-K投与中に最高になった。かくて、S-KがLH放出に直接影響するかどうかは、この研究においては示され得ないが、LHの変動があるとすれば、それはおそらく大部分S-Kの間接的、すなわち E_2 を介しての作用によると考えられる。視床下部・下垂体系を使用したin vitroの研究は、S-KがLH放出に影響しないことを示している²⁾。

これらの患者のS-K投与前の平均血清FSH濃度は、正常婦人の卵胞期初期におけるより有意に高値であった。これは典型的なPCOSの場合とは異なる所見であり、前述したようにPCOS類似疾患が、これらの患者の中になんかなり含まれているためと思われる。

S-K投与前の平均血清PRL濃度は正常者と異ならなかった。この血清PRL濃度はS-K投与中ほとんど変化しなかった。PCOSの場合に高PRL血症が存在することがあるが、これは血中 E_1 濃度の持続的高値によるといわれる。S-K投与中、平均血清 E_1 濃度は変化しなかったため、平均血清PRL濃度がまた変化しなかったと考えられる。一方、これらの患者の約10%において、血清PRL濃度が30 ng/ml以上であった。これらに対しては、S-Kはその平均濃度を有意に低下せしめた(結果には示さなかった)。これらの患者の血清 E_1 濃度がまたS-K投与中に有意に低下した(必ずしも時期は一致しなかったが)。従って、そのS-Kの血清PRL濃度の低下作用は血清 E_1 濃度の低下を介するものかもしれないが、その直接作用を除外し得ない。詳細は別に報告する。

これらの患者において、血清T濃度がS-K投与中に最低値になった時の他のホルモンの血清濃度を表2と3に示した。S-K投与前に比較して、 E_1 が有意に低下し、 E_2/T 比が有意に上昇したことが注目される。これらは、血清T濃度の低下が、図5に示した

ステロイド代謝過程の正常化を伴っていることを示唆している。さらに、十分量の血清が得られた 12 例について、freeT, Δ_4 A と DHEAs が測定されたが、これらは S-K 投与前には正常月経周期の卵胞期初期よりも有意に高値であった。S-K 投与中、これらは、いずれも、血清 T 濃度が最低値の時には有意な低下となった(表 3)。特に freeT は約 3 分の 1 に低下し、この低下は総 T が約 2 分の 1 に低下したのに比較して高度であった。これは T 産生の減少と共に血清 E_2/T 比の増加による血清 T- E_2 binding globulin の増加によると考えられる。従って、S-K は高 T 血症における T の男性化作用を抑制しうると考えられ、かかる場合における S-K の臨床応用が今後十分に期待される。痤瘡に対して S-K が著効であったとする一例が発表されている¹³⁾。 Δ_4 A の低下は E_1 の有意な低下と共に、血清 T 濃度の低下がステロイド代謝過程の正常化によることをさらに強く示唆するものである。この時に、血清 FSH 濃度は不変であったので、S-K のこの aromatase 活性の亢進は、FSH を介するものではないと推測される。DHEAs の大部分は副腎から分泌される。従って、今回示された S-K による血清 DHEAs 濃度の低下は、S-K が副腎における androgens 産生をまた抑制しうると示唆する。DEX 抑制試験により高 T の由来が副腎とされた症例が 5 例認められた。結果には示さなかったが、これらの患者の平均血清 T 濃度がまた S-K 投与中有意に低下することが認められた。この事実は、上述の示唆を支持するかもしれない。我々の患者においてもそうであるが、前述した PCOS 患者において高血清 T の由来を副腎に持つ患者が 35~50% はいる²⁾。これがこれらの患者の治療に glucocorticoids が有効であるとされる一つの理由であると考えられる。従って、卵巣と副腎の両者において androgens 産生を抑制しうると考えられる S-K は、かかる疾患の治療上より有効であると考えられる。

今回の治療にいて注目されるべきことは、S-K 投与中、S-K によると考えられる副作用が全く発現しなかったことである。

S-K の、ヒト卵巣におけるステロイド代謝に対する考えられうる作用を図 5 に示した。かかる作用が、ラットの in vivo と in vitro の実験によって示されてきた^{14,15,16)}。そして、かかる作用が芍薬と甘草の両者によるものであり、しかもそれらの成分である paeoniflorin と glycyrrhizin (glycyrrhetic acid) によることが確認されてきた^{17,18)}。

今回の患者中、78 例が無排卵患者であったが、S-K 投与中に 33 例 (42.3%) に排卵が認められた。挙児

希望の 79 例中、子宮・卵管および男性に不妊原因が認められた 11 例を除いた 68 例のうち 12 例 (17.6%) が S-K 投与中に妊娠した(表 9)。PCOS 患者の排卵誘発・妊娠のために clomiphene citrate (CC) はよく使用される。しかし、特に高 T 血症性の無排卵患者を対象にした CC の成績の報告はなく、かかる患者における S-K と CC の効果を比較しえない。しかし、症例数は少ないけれども、今回の S-K 治療の終了後 8 ヶ月間の追跡期間中に、CC 単独治療を受けた 9 人中 4 例 (44.4%) に排卵が認められた。一方、S-K 継続投与した 2 例中 1 例が排卵した。今回の治療患者の中に、排卵・妊娠に関して CC が無効であった患者がかなり含まれていたことは確かであるがどの程度かは不明である。この治療以外においても、CC が無効であったが S-K が有効であった患者が経験されてきている¹⁹⁾。これらを考慮すると、高 T 血症性排卵障害に対する S-K の排卵効果は、CC のそれにほぼ等しいように思われる。さらに、CC と S-K あるいは prednisolone との併用において、いずれにおいても 3 例中 3 例が排卵し同じ成績であった。すなわち少数例ではあるが、CC との併用において S-K が glucocorticoids と同様な効果を発揮すると思われる。しかし、その作用機構は両者において異なるかもしれない。S-K はおそらく glucocorticoids と同様に副腎性 androgens 産生を抑制し、一方卵巣において本来存在した、さらに CC によって誘発された T 過剰産生²⁰⁾ を抑制したかもしれない。Glucocorticoids の主な作用は副腎に対するものであるが、卵巣に対する作用は明確ではない³⁾。かかる患者の排卵障害に対する glucocorticoids 単独の効果は約 55% であることが報告されていて²⁾、S-K のそれに近い。

今回の高 T 血症性排卵障害の挙児希望患者における S-K による妊娠率は 17.6% であった。かかる症例に対する CC の効果の成績の報告はない。表 4 に示したように、S-K 治療終了後において、S-K 単独あるいは S-K と CC の併用は、それぞれ CC 単独あるいは prednisolone と CC の併用よりも妊娠率が高いようであることがみとめられた。しかし挙児希望の患者の月経周期の状態がそれぞれの群において異なったので、正確な比較にはなっていない。

今回の患者の中にも含まれていると考えられる PCOS の患者における CC の効果は報告によって異なるが、最大の効果を示すのは、排卵率において約 90%、そして妊娠率において約 50% である。一般に、ある薬物の高い排卵率は高い卵巣作用(刺激)を反映する。このために、かかる薬物においては卵巣過剰刺激の副作用の発生がより高くなる。これは特に

今回の患者のように元来血中LH濃度が高い無排卵・無月経の治療において著明である。事実、かかる患者において最低量のCC(1日50mg5日間)により卵巣過剰刺激が発生することは時々経験される。この意味では、今回の治験において示されたようにS-Kにはかかる副作用の発生は皆無であり、S-Kはかかる患者の治療の第一選択の薬物であると考えられ、特に未婚のかかる患者に対して安心して使用される薬物である。

要約すると、S-Kは、高T血症性の無排卵あるいは不妊症(PCOSやPCOS類似疾患を含む)患者における排卵誘発と妊娠のための治療に安全で有効な薬物である。これは、S-Kが卵巣におけるステロイド代謝を正常化し、さらにおそらく副腎性androgens産生を抑制するためと考えられる。従って、S-Kは、同時にかかる患者の痤瘡や多毛などの男性化徴候の改善にも有効であると考えられる。これらの意味で、S-Kは特に若年の、未婚のあるいはきょう児を急がない婦人の高T血症性無月経の治療のための第一選択の薬物である。さらに児を希望するかかる状態の婦人に対しては、S-Kの単独あるいはCCとの併用治療が試みられるとよいと考える。

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。日本不妊誌 28；74, 1983.
- 2) 柳沼 恣，小林拓郎：高 androgen 血症と排卵障害およびその芍薬甘草湯による治療の研究(1)。高 androgen 血症と排卵障害。産婦人科漢方研究のあゆみ II：56, 1985 参照
- 3) 柳沼 恣，小林拓郎：高 androgen 血症と排卵障害その芍薬甘草湯による治療の研究(II)。高 androgen 血症の治療。産婦人科漢方研究のあゆみ III：56, 1986 参照
- 4) 柳沼 恣，泉 隆一，安井 洋，新居 隆，川端 正清，藤盛亮寿，荒川 修：漢方薬による排卵誘発—高アンドロゲン血症性稀発月経性不妊症に対する効果—。日産婦誌 34；939, 1982.
- 5) 岡村 泰，大野 剛：不妊症にお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：49, 1984.
- 6) 竹内 亨，西井 修，岡村 隆，柳沼 恣，川名 尚：Centrifugal Ultrafiltration 法による free testosterone パーセントの決定。日内分泌誌 63；1364, 1987.
- 7) Wortsman, J., Singh, K. B. and Murphy, J.: Evidence for the hypothalamic origin of the polycystic ovary syndrome. Obstet. Gynecol. 58; 137, 1981.
- 8) Carvalho, D., Pignatelli, D. and Resende, C.: Ketoconazole for hirsutism. Lancet 2; 560, 1985.

- 9) Molozowski, S., Mericq, U. and Cassorla, F.: Effect of ketoconazole on rat ovarian steroidogenic enzymatic activities. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 52; 403, 1986.
- 10) Buttram, V. C. and Vaquero, C.: Post-ovarian wedge resection adhesive disease. Fert. Steril. 26; 874, 1975.
- 11) Toaff, R., Toaff, M. E. and Peyser, M. R.: Infertility following wedge resection of the ovaries. Am. J. Obstet. Gynecol. 124; 92, 1976.
- 12) 三宅 侃，田坂慶一，大塚志郎，吉本泰弘，青野敏博，谷澤 修：間脳—下垂体連続還流システムによる温経湯の LH 分泌機構の検討。産婦人科漢方研究のあゆみ II：105, 1985.
- 13) 竹内 亨，西井 修，岡村 隆，柳沼 恣，小林拓郎：著明な痤瘡を伴った高アンドロゲン血症婦人の芍薬甘草湯による治療。第 68 回 日産婦人科東連合地方部会議演抄録 No.187, 1985.
- 14) 竹内 亨，西井 修，岡村 隆，柳沼 恣，小林拓郎，坂本賢二，油田正樹：芍薬甘草湯のラット子宮・卵巣重量および血清テストステロン濃度に対する影響。第 57 回 日本内分泌学会総会，1984.
- 15) 竹内 亨，西井 修，岡村 隆，柳沼 恣，小林拓郎：Androgen-sterilized rat の血清 testosterone 濃度に対する芍薬甘草湯，芍薬と甘草の効果。第 58 回 日本内分泌学会総会，1985.
- 16) 太田博幸，福島峰子，真木正博：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。日本不妊誌 32；486, 1987.
- 17) 竹内 亨，西井 修，岡村 隆，柳沼 恣，芍薬および Paeoniflorin のラット卵巣機能に及ぼす影響。第 32 回 日本不妊学会総会，1987.
- 18) 竹内 亨，西井 修，岡村 隆，柳沼 恣，川名尚：Paeoniflorin と glycyrrhizin の卵巣 testosterone 産生抑制作用。第 40 回 日本産婦人科学会総会，1988.
- 19) 柳沼 恣：高アンドロゲン血症性排卵障害不妊の症例。熊谷 朗監修：現代の漢方治療。p395, 東洋学術出版，東京，1985.
- 20) Dupon, C., Rosenfield, R. L. and Cleany, R. E.: Sequential changes in total and free testosterone and androstendione in plasma during spontaneous and Clomid-induced ovulatory cycles. Am. J. Obstet. Gynecol. 115; 478, 1973.
- 21) Yaginuma, T., Takeuchi, T., Nishii, O., Okamura, T. and Kobayashi, T.: Effect of traditional herbal medicine, Shakuyaku-Kanzo-To on serum testosterone levels in oligomenorrhic women. Jpn. J. Fertil. Steril. 33; 67, 1988

Effect of SHAKUYAKU-KANZO-TO on serum testosterone levels and ovulation in amenorrhic

**women with high serum
testosterone levels**

Department of Obstetrics and Gynecology
S-K study group
Tsutomu Yaginuma, Takashi Okamura,
Toru Takeuchi, Osamu Nishii
and Takuro Kobayashi

Faculty of Medicine,
University of Tokyo at Mejirodai

Mineko Fukushima

Akita University School
of Medicine

Ryoju Fujimori

Akita Redcross Hospital

Osamu Arakawa, Yoshiaki Sato
and Shoshichi Takeuchi

Niigata University School
of Medicine

Yasushi Okamura

Kawaguchi Saiseikai Hospital

Toshifumi Kobayashi and Rihachi Iizuka

School of Medicine,
Keio University

Hiroaki Kitagawa, Yoshinori Kuwahara
and Masahiko Mizuno

Faculty of Medicine,
University of Tokyo

Kunio Asukai, Tsugio Uemura
and Hiroshi Minaguchi

Yokohama City University
School of Medicine

Masami Osawa and Osamu Narita

Nagoya University School
of Medicine at Higashiku

Toshihiro Aono and Osamu Tanizawa

Osaka University Medical School

Teruhiko Tamaya and Hiroji Okada

Kyoto Prefectural University
of Medicine

Hiroyuki Mori and Tomonori Kigawa

Medical College of Oita

Ichiro Taniguchi and Tsutomu Hidaki

Oita Prefectural Hospital

SHAKUYAKU-KANZO-TO (S-K) was administered in daily dose of 7.5g for 16 weeks and blood samples were obtained every 2 weeks for determining serum hormone levels in 110 women with high serum testosterone (T) levels ($>0.7\text{ng/ml}$).

Serum testosterone, FSH and LH levels before the administration were significantly higher and serum E_2/E_1 and E_2/T ratio lower than in the early follicular phase of women with the normal menstrual cycle.

During the administration of S-K, serum T levels fell significantly at 2 weeks and serum E_2/E_1 and E_2/T ratio rose significantly at 2 weeks, followed by the further decrease in serum T levels, the high values in serum E_2/E_1 ratio and the further rise in serum E_2/T ratio until 16 weeks.

In women, from whom sufficient blood samples to measure serum androstenedione and free T levels were obtained, these levels were shown to lower in parallel with serum T levels. Serum FSH levels did not change at all and LH levels varied greatly but not significantly during the administration. Ovulation occurred in 42.3% of anovulatory women.

These results suggest that S-K stimulates the aromatase activity in the ovary, resulting in decreasing the T secretion and inducing ovulation.

No side effects were found during the administration.

(受付：昭和 63 年 1 月 20 日特掲)

卵巣機能不全不妊症に対する漢方療法

Kampo-Treatment on Ovarian Dysfunctional Infertilities

假野クリニック

假野 隆 司

Takashi KANO

Kano Clinic, Nippombashi,
Minami-ku, Osaka, 542

432例の卵巣機能不全不妊症の証を決定することで同症の病因を考察した。最も証の分布が多かったのは加味逍遙散(195例, 45.1%)で、次いで当帰芍薬散, 桂枝茯苓丸の順であった。加味逍遙散の症例は重症例が、当帰芍薬散, 桂枝茯苓丸の症例は軽症例が多い傾向が認められた。生児分娩を確認した88例の正常妊娠例で最も例数が多かったのは加味逍遙散(34例)であり、妊娠率が高かったのは当帰芍薬散(27.0%)であった。また流産率は温経湯, 加味逍遙散で高率であった。正常妊娠者の61.4%は卵巣機能賦活の目的で用いた薬物が漢方薬のみであった。以上の結果より、現代の卵巣機能不全不妊症の病因を漢方医学的に考察すると、ストレスに起因すると思われる心因性反応による中枢性卵巣機能不全と、瘀血に起因する骨盤内循環不全(骨盤内鬱血)が多いと考えられた。また、瘀血が原因の卵巣機能不全症には正しい証診断に基づく漢方薬が極めて有効と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 617-622, 1988)

緒 言

漢方薬が卵巣機能不全症に有効なことが次第に明らかになってきた^{1,6)}。しかし、一般不妊臨床の場では、漢方療法の基本である随証療法は、その診断基準が難解なこともあって普及しているとは言い難く、不妊症には当帰芍薬散、といった西洋医学的な診断名優先の処方が大勢を占めているのが現状である。しかし、このような使用法では漢方薬本来の効果を適正に評価することは困難であるし、西洋医学的薬物と作用を比較することも適切でない。そこで、卵巣機能不全不妊症に対する漢方療法を見直す目的で、簡略化した証の決定で随証療法を行なった症例を解析して、現代ではどのような証を持った卵巣機能不全症が多いか、証と卵巣機能不全症の西洋医学的な分類の間には相関性があるのか、いかなる方剤が有効か、といった点を明らかにすべく今回の研究を行なった。

対象と方法

昭和59年3月から、62年12月までに假野クリニ

ックを拳児希望で来院し、内分泌学的検査で卵巣機能不全症と診断されて、体格体形、腹診、自覚症状、便通(表1)から証を決定した方剤による漢方療法が副作用の発現なく3ヶ月以上可能であった432例を対象とした。卵巣機能不全症は以下の基準^{7,8)}で5型に分類した。

血中 estradiol, progesterone は第一ラジオアイソトープ社製 125I-RIA Kit で測定した。

黄体機能不全症: BBT-3~0day 血中 estradiol が 150pg/ml 以上で、BBT+5~8day の血中 progesterone 値が 10 ng/ml 未満の症例。

卵巣機能不全症: BBT-3~0day 血中 estradiol 値が 150pg/ml 未満で、BBT+5~8day の血中 progesterone が 10 ng/ml 未満の症例。

無排卵周期症

第I度無月経

第II度無月経

妊娠の予後は分娩で生児を得た症例を正常妊娠、BBT+16day の HCG-HAR test(ハイゴナビス、持田)⁹⁾または HCG-EIA Kit(HCG テストパック、ダイナボット)が陽性を示した後に出血をきたした症

表1 漢方薬の「証」

方剂名	虚实	腹 診	自 覚 症 状	便通
大柴胡湯	強実	胸脇苦満 心下痞硬 腹直筋緊張	肩こり, 口の中が粘つき苦い, みぞおちがつかえる	硬
小柴胡湯	実	胸脇苦満 心下痞硬 腹直筋緊張	ほてり, 肩こり, 悪心, 口の中が粘つき苦い, みぞおちがつかえる	中
柴胡桂枝乾姜湯	虚	胸脇苦満	冷え性, 不眠, 易興奮性, 易疲労性, 口の中が粘つき苦い	軟
当帰芍薬散	虚	瘀血圧痛 膈上悸 胃内停水 (振水音)	冷え性, しびれ感, めまい, 肩こり, 易疲労性, 頭痛	軟
加味逍遥散	間	胸脇苦満 瘀血圧痛	ほてり, 冷え性, 不眠, 易興奮性, 神経質, 鬱症状, 易疲労性, 肩こり, 頭痛	不問
桂枝茯苓丸	実	瘀血圧痛	ほてり, 発汗, 冷え性, 肩こり, 頭痛	硬
人參湯	虚	心下痞硬	冷え性, 食欲不振, 顔色が悪い, みぞおちがつかえる, 易疲労性, のどが渇く, 胃がもたれる	硬
温経湯	虚	瘀血圧痛	ほてり, 冷え性, 動悸, 肌が荒れやすい	中

表2 方剂別症例数 (率)

方 剂 名	症例数 (率)
大柴胡湯	1 (0.2%)
小柴胡湯	4 (0.9%)
柴胡桂枝乾姜湯	19 (4.4%)
当帰芍薬散	96 (22.2%)
加味逍遥散	195 (45.1%)
桂枝茯苓丸	85 (19.7%)
人參湯	13 (3.0%)
温経湯	19 (4.4%)
計	432(100.0%)

表3 方剂別の原発性不妊症と続発性不妊症

方 剂 名	原発性不妊 (名) (%)	続発性不妊 (名) (%)
大柴胡湯	1(100.0%)	0 (0.0%)
小柴胡湯	4(100.0%)	0 (0.0%)
柴胡桂枝乾姜湯	16 (84.2%)	3 (15.8%)
当帰芍薬散	74 (77.1%)	22 (22.9%)
加味逍遥散	171 (83.2%)	24 (11.8%)
桂枝茯苓丸	78 (91.8%)	7 (8.2%)
人參湯	11 (84.5%)	2 (15.5%)
温経湯	18 (94.7%)	1 (5.3%)
計	373 (86.3%)	59 (13.7%)

表4 方剂別の卵巣機能不全型

方 剂 名	黄体機能不全症	卵胞黄体機能不全症	無排卵周期症	第I度無月経	第II度無月経
大柴胡湯	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1(100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
小柴胡湯	1 (25.0%)	3 (75.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
柴胡桂枝乾姜湯	4 (21.0%)	13 (68.4%)	2 (10.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
当帰芍薬散	45 (46.9%)	35 (36.5%)	10 (10.4%)	9 (9.4%)	7 (7.3%)
加味逍遥散	47 (24.1%)	73 (37.4%)	28 (14.4%)	21 (10.8%)	25 (12.8%)
桂枝茯苓丸	45 (52.9%)	24 (28.2%)	6 (7.1%)	4 (4.7%)	6 (7.1%)
人參湯	4 (30.8%)	6 (46.1%)	1 (7.7%)	2 (15.4%)	0 (0.0%)
温経湯	8 (42.1%)	9 (47.4%)	2 (10.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
計	154 (35.6%)	163 (37.7%)	50 (11.6%)	36 (8.3%)	38 (8.8%)

例を流産とした。

結果

432例の中で「証」が最も多く分布したのは加味逍遙散の195例(45.1%)であり、次いで当帰芍薬散、桂枝茯苓丸、温経湯、柴胡桂枝乾姜湯、人參湯、小柴胡湯、大柴胡湯の順であった(表2)。大柴胡湯の一例は肥満症の治療を目的に投与されたものである。原発性不妊と続発性不妊別に分けると、原発性不妊は小柴胡湯、温経湯、桂枝茯苓丸の証を示す症例が多く、続発性不妊は当帰芍薬散の証を示す症例が高

率であった(表3)。

卵巣機能別に検討すると、実熱証の症例では軽症例が高率であり、逆に寒虚証の症例では重症例が高率であった。卵巣機能不全型別では、黄体機能不全症では桂枝茯苓丸が、卵巣黄体機能不全症では柴胡桂枝乾姜湯が、無排卵周期症では加味逍遙散(症例数一例の大柴胡湯は除く)が、第1度無月経では人參湯が、最重症の第II度無月経では加味逍遙散が最も高率であった。方剤別では加味逍遙散が他の方剤に比べて重症卵巣機能不全症に高率に分布する傾向が認められた(表4)。

方剤別の妊娠例を検討すると、正常妊娠では一例の大柴胡湯を除けば症例数では加味逍遙散の34名が最も多く、次いで当帰芍薬散、桂枝茯苓丸、人參湯、柴胡桂枝乾姜湯、温経湯の順であった。一方、流産は症例数では加味逍遙散の32歳が最も多く、次いで当帰芍薬散、桂枝茯苓丸、温経湯、柴胡桂枝乾姜湯、人參湯の順であった。率では温経湯の21.1%が最も高く、次いで加味逍遙散、当帰芍薬散、柴胡桂枝乾姜湯、桂枝茯苓丸、人參湯の順であった。小柴胡湯には妊娠例はなかった。(表5)。

正常妊娠例のうち卵巣機能賦活を目的として用いた薬物は漢方薬単独例が全体の61.4%を占めた。方剤別では人參湯、温経湯、桂枝茯苓丸、当帰芍薬散が高率であった。併用した西洋医学的薬物はHMG

表5 方剤別の正常妊娠と流産

方 剤 名	正常妊娠(名)(%)	流産(名)(%)
大 柴 胡 湯	1(100.0%)	0(0.0%)
小 柴 胡 湯	0(0.0%)	0(0.0%)
柴胡桂枝乾姜湯	2(10.5%)	2(10.5%)
当 帰 芍 薬 散	26(27.0%)	12(12.5%)
加 味 逍 遙 散	34(17.4%)	32(16.5%)
桂 枝 茯 苓 丸	21(24.7%)	7(8.2%)
人 参 湯	3(23.1%)	1(7.6%)
温 経 湯	1(5.3%)	4(21.1%)
計	88(20.4%)	58(13.4%)

表6 正常妊娠における方剤別の併用薬物

方 剤 名	漢方薬単独	HMG (Clomiphene)	Bromocriptine	Clomiphene	Cyclofenil
大 柴 胡 湯	0(0.0%)	1(100.0%) (0)(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
小 柴 胡 湯	0(0.0%)	0(0.0%) (0)(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
柴胡桂枝乾姜湯	1(50.0%)	0(0.0%) (0)(0.0%)	1(50.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
当 帰 芍 薬 散	16(61.5%)	4(15.4%) (2)(7.9%)	2(7.7%)	1(3.8%)	1(3.8%)
加 味 逍 遙 散	19(55.9%)	9(26.5%) (1)(2.9%)	3(8.8%)	1(2.9%)	1(2.9%)
桂 枝 茯 苓 丸	14(66.7%)	5(23.8%) (1)(4.8%)	1(4.8%)	0(0.0%)	0(0.0%)
人 参 湯	3(100.0%)	0(0.0%) (0)(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
温 経 湯	1(100.0%)	0(0.0%) (0)(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
計	54(61.4%)	23(26.1%)	7(7.9%)	2(2.3%)	2(2.3%)

が最も多く、次いで bromocriptine, clomiphene, cyclofenil の順であった。西洋医学的薬物の併用は加味逍遙散の証を認める症例に多く、薬物では、HM G が最も多かった (表 6)。

考 察

卵巣機能不全不妊症に漢方療法を行なう場合、随証療法が効果的なことは論を待たないが、厳密な証の決定は難解、煩雑で一般的でない。このために、不妊症には当帰芍薬散、といった診断名優先の西洋医学的処方幅広く行なわれているのが現状である。不妊症治療に限らず、漢方薬が西洋医学者に完全に評価されていない理由は証の決定が難解なことのほか、二重盲検法の実施が技術的に困難なため薬効の客観的評価が難しい、方剤の薬理作用に不明な点が多い、などの理由が上げられる。そこで証診断を簡略化し、西洋医学的に診断した現代の卵巣機能不妊症の病因を漢方医学的に考察してみた。

女性は男性に比べて漢方医学的腹診が容易である上に、ほてり、冷え性などの自覚症状を訴え易い。そこで、著者は腹診、自覚症状を重視した証の簡略決定法を考案し、この方法で証を決定した随証療法で十分な効果が上がることを明らかにした⁷⁾。

不妊症には前述の如く当帰芍薬散が多く処方されるが、栄養事情が改善した現代では、同方剤の「証」のような典型的な寒虚証の症例は多くない。すなわち、熱実証が少なくないのである。熱実証の患者に補剤の当帰芍薬散を投与する卵巣機能賦活効果が上がらないばかりか、「ほてり」などの自律神経失調症状や便秘を増悪させる。

そこで、現代の卵巣機能不全不妊症の「証」の分布を 432 名で検討してみた。すると、加味逍遙散が最も多く、次いで当帰芍薬散、桂枝茯苓丸の順であり、著者の過去の報告⁶⁾を追認した。この結果、現代の卵巣機能不全不妊症は精神神経関連症状と瘀血を有する例が多いことが明らかになった。

この事実から卵巣機能不全の原因を考えると、加味逍遙散のように精神神経関連症状が顕著な症例では、各種ストレスによる心因性反応が原因となって性腺内分泌中枢機能に失調をきたして gonadotropine 分泌不全がおこり中枢性卵巣機能不全症になると考えられた。このような症例は心身不妊症と言える。

不眠、神経質、鬱症状などの精神神経関連症状は卵巣機能不全の原因ではなく結果とも考えられるが、今回の症例のほとんどが症状発現が卵巣機能の異常に先行していたために卵巣機能不全症は心因性反応の結果と考えられた。

一方、瘀血は西洋医学的には、血液が円滑に流動しない状態、と理解されおり、瘀血圧痛を認める症例では骨盤内循環不全(骨盤内鬱血)が強く疑われる。瘀血による骨盤内循環不全が引き起こす卵巣機能不全の一因として卵巣の gonadotropine receptor の機能低下⁹⁾が明らかになっている。したがって、駆瘀血作用のある漢方薬は骨盤内の循環動態(鬱血)を改善することで卵巣機能不全の改善に寄与すると考えられる。さらに瘀血の改善は卵管、子宮機能の改善にもつながり、女性の妊孕力を総合的に高めると考えられる。

「証」毎に卵巣機能不全の程度を考察すると、実熱証には軽症例が多いの対して、寒虚証に重症例が多い。寒虚証の症例は全身的に生理機能が低下している状態であり、生殖能力も全般的に低下していると考えられる。また、重症になるほど加味逍遙散の証を示す症例が高率になる傾向が認められ、第二度無月経で最も頻度が高かった。このように加味逍遙散の「証」を認める例に重症例が多いのは卵巣機能不全の原因が中枢性と末梢性の両因子が複合しているためと考えられた。加味逍遙散の「証」を示す症例に続発性不妊症が少ないのも重症例が多い反映と考えられる。

正常妊娠は症例数では加味逍遙散が最も多かったが、妊娠率では当帰芍薬散が最も高率であり、特に黄体機能不全症での妊娠が多かった。当帰芍薬散はラット黄体の progesterone 分泌を促進する作用^{10,11)}が認められており、妊娠例のほとんどで progesterone が増加している事実から、ヒトでも黄体機能賦活作用があると考えられた。次いで妊娠率が高率であったのは桂枝茯苓丸であった。

以上の事実から瘀血が卵巣機能不全の唯一の原因となっている例(特に実熱証)では漢方薬が効果的であると考えられた。

しかし、駆瘀血剤が全て不妊症に効果的というわけではない。駆瘀血剤は瀉剤に多いが、瀉剤の妊娠率が低いことは経験的に知られており、強力な駆瘀血作用を有する通導散、桃核承気湯では妊娠例は希で、妊娠してもほとんどが流産に終わるため、これらの方剤は不妊症に使われることはない。

これに対して寒虚証に使用される当帰芍薬散などの補剤が妊孕力を高めることは古来より経験的に知られており、ために寒虚、瘀血が証である当帰芍薬散が最も妊娠率が高いものと考えられた。しかし、妊娠率が高率だからといって、不妊症、即当帰芍薬散と考えることは間違いである。同剤の証は全体の 30% 程度に認められるに過ぎないからである。

実証の方剤は先に述べたように例え証が存在して

も妊娠率は極めて低いが、桂枝茯苓丸は例外である。したがって実証の症例には多少証が異なっても同剤を使用すべきと考えられた。

小柴胡湯には妊娠例が認められなかったが、この理由は同方剤が瀉剤の一つに数えられているためと思われる。ただし小柴胡の「証」が認められるケースは腹診で心下痞硬、と胸脇苦満を認めるため、例え実証であっても桂枝茯苓丸ではなく加味逍遙散を処方すべきである。

一方、強力瀉剤である大柴胡湯に正常妊娠が一例認められたが、これは同方剤によって著名な体重減少(10 kg)が認められたことが卵巣機能の改善につながったためと考えられた。今回の結果には加えていないが著者は防風通聖散、三黄瀉心湯を桂枝茯苓丸と併用した三例の肥満症合併不妊症で正常妊娠例を経験している。最も効果が認められた症例は、投与前は122 kgであった体重が、約2年で24 kg減少し、妊娠の成立を見た。このように肥満症を併用した症例に体重減少を目的として瀉剤を用いることは差し支えなく、肥満の改善により卵巣機能の改善が期待できると考えられた。

正常妊娠例では卵胞期に卵胞成熟賦活を目的として用いた薬物は漢方単独が最も多く、この中には第11度無月経の症例も含まれていた。併用した西洋薬ではHMGが最も多く、次いでbromocriptineで、clomiphene, cyclofenil 併用例の妊娠は最も低率であった。しかし、Clomipheneの妊娠例のうち第11度無月経の一例はclomiphene単独では排卵しなかったが、加味逍遙散の併用で排卵し、妊娠が成立した。この事実から、「証」が合った漢方薬はclomiphene, cyclofenilの作用を高めると考えられた⁶⁾。

流産例では、妊娠率が低い温経湯が最も高率であった。同方剤はラット下垂体に作用してLH¹²⁾, FSH^{12,13)}の産生および放出を刺激することが明らかになっており、間脳性無月経に有効と考えられているが、今回の研究では同方剤の「証」を示す症例には第II度無月経の症例が存在しないこと、温経湯の「証」が当帰芍薬散に近似しており、妊娠の成立をみなかった例や流産を経験した例で当帰芍薬散に処方を変更して妊娠が成立した症例を3例経験していることから、「証」が存在しても温経湯に拘らず当帰芍薬散を処方する方がよいと考えられた。

次いで流産が高率なのは加味逍遙散であったが、これは重症例が多いのと、同方剤は駆瘀血作用が弱いので未成熟な卵子が排卵、受精したために起こった妊卵の異常、あるいは完全に改善されない瘀血の悪影響のために子宮内膜のestrogenによる増殖作用、

あるいはprogesteroneによる分泌作用の反応不全のために初期妊娠の維持に悪影響を残しているためと考えられた。

以上の結果から、卵巣機能不全不妊症へ漢方薬を導入する時、随証療法が原則であること、正しく使用された漢方薬は時に西洋医学的薬物をも凌駕する効果を挙げること、さらに漢方薬の作用機序は心因性反応の抑制による中枢機能の改善、瘀血の改善による卵巣、卵管、子宮機能の改善であることが明らかになった。しかし、方剤の西洋医学的な薬理作用が明らかになっている方剤については証を無視した診断名優先の処方を行なっても良い。高testosterone血症¹⁴⁾やbromocriptineが悪心、嘔吐のために使用出来ない高prolactin血症¹⁵⁾では芍薬甘草湯の併用で妊娠を経験することが多いからである。

漢方医学的な証診断によれば、現代の卵巣機能不全不妊症例の過半数は精神神経症状を有することが明らかになった。心因性反応の妊孕力への悪影響は卵巣機能に留まらず、卵管、子宮機能、さらに男性の造精機能にも及ぶ可能性が高い、したがって、現代の不妊症治療は精神科的アプローチも含めた総合的かつ全人的な診療が要求されているといえよう。

文 献

- 1) 亀井 清, 中村幸雄, 吉村泰典, 飯塚理八, 村田高明: 不妊領域における漢方薬療法による治療. 産婦の世界, 32: 731, 1980.
- 2) 村田高明, 宇田川康博, 林 茂隆, 北井啓隆, 倉沢滋明: 不妊と漢方療法, 臨産婦, 35: 343, 1981
- 3) 玉舎輝彦, 大野洋介, 山田俊夫, 和田圭介, 藤本次良, 岡田弘二: 不妊疾患患者ならびに排卵障害を訴える未婚女性に対する漢方療法の試み, 日不妊誌, 27: 472, 1982.
- 4) 矢内原巧, 野嶽幸正, 上原一浩, 金沢元美, 高橋諄, 中山徹也: 機能性不妊と漢方療法. 産婦の世界, 34 (増刊): 135, 1982.
- 5) 假野隆司, 西川 潔: 更年期様不定愁訴を有する卵巣機能不全症に対する漢方療法. 日不妊誌, 30: 367, 1985.
- 6) 假野隆司: 漢方薬の「証」から考察した不妊症(卵巣機能不全症)の病因, 漢方医学, 11: 32, 1987.
- 7) Kano, T., Nishikawa, K., Kurobe, Y. and Ishii, K.: Etiology of luteal insufficiency (hyposecretion of progesterone) in relation with BBT patterns. Jpn. J. Fertil. Steril. 29: 92, 1984
- 8) Kano, T. and Nishikawa, K.: Etiological study on hyposecretion of progesterone in the aspect of echographically measured follicle diameters and serum estradiol and progesterone in patients categorized by BBT patterns. Jpn. J. Fertil. Steril. 30: 5, 1985

- 9) 假野隆司, 出馬淳名, 伊藤正尚: BBT 高温 16 日の HCG 値による妊娠, およびその予後の判定・日不妊誌, 投稿中
- 10) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicines on progesterone secretion by corpus luteum. *Jpn. J. Fertil. Steril.* 31: 482, 1986
- 11) Usuki, S.: Effects of Tokishakuyakusan and its components on progesterone secretion by corpora lutea. *Jpn. J. Fertil. Steril.* 32: 1, 1987
- 12) 三宅 侃, 田坂慶一, 大塚志郎, 吉本泰弘, 青野敏博, 谷沢 修: 間脳-下垂体連続還流システムによる温経湯の LH 分泌機構の検討. *日産婦誌*, 37: 2821, 1985
- 13) 武谷雄二, 林 直樹, 久具宏司, 水野正彦: 下垂体前葉に対する温経湯の直接作用. *日不妊誌*, 32: 557, 1987.
- 14) 柳沼 恣, 竹内 享: 高 androgen 血症と排卵障害および芍薬甘草湯による治療(III), 産婦人科漢方研究のあゆみ No4, 診断と治療社, p 29, 1987
- 15) 福島峰子, 成田章子, 太田博孝, 脇坂 晟: 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 No4, 診断と治療社, p 93, 1987

Kampo-treatment on ovarian dysfunctional Infertilities

Takashi Kano

Kano Clinic, Nippombashi,
Minami-ku, Osaka, 542

The etiology was investigated after making a diagnosis of disease in "Zheng" and treatment with Kampo-medicines in 432 patients with ovarian dysfunctional infertilities. KAMISHOUYO-SAN was the most preferred medicine (195 patients, 45.1%), and TOKISHAKUYAKU-SAN and KEISHIBUKURYOU-GAN followed. KAMISHOUYO-SAN show a tendency to treated in the more critical cases and TOKISHAKUYAKU-SAN and KEISHIBUKURYOU-GAN in the lighter cases. The many cases in 88 patients who had normal gestation and delivered normal baby were treated with KAMISHOUYO-SAN (34 patients), and the high ratio of pregnancy was shown in the patients treated with TOKISHAKUYAKU-SAN (27.0%). The high ratio of abortion was shown in the patients treated with UNKEI-TO and KAMISHOUYO-SAN. The patients who had normal gestation (61.4%) were treated with only Kampo-medicine and without modern medicine for the stimulation of follicular function.

It was supposed by the choice of Kampo-medicines for symptomatic treatment that the two factors, the central ovarian dysfunction caused by psychoneurosis under the stresses and the intrapelvic circular insufficiency (intra-pelvic congestion) caused by "Oketu", may be common etiologies of modern ovarian dysfunctional infertilities. It was also suggested that the treatment with Kampo-medicines after suitable diagnosis by "Zheng" is very effective for the ovarian dysfunction caused by "Oketu".

(受付: 昭和 63 年 1 月 11 日特掲)

抗プロゲステロン剤 RU486 の 着床阻止作用に関する検討

Antinidatory Activity of Anti- Progestational Compound RU486

鹿児島大学医学部産婦人科学教室 (主任: 永田行博教授)

鷓木 康資 竹内 一浩 永田 行博
Yasushi UNOKI Kazuhiro TAKEUCHI Yukihiro NAGATA

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

抗 progesterone 作用を有する合成 steroid RU486 の受精卵に対する着床阻止作用について検討した。I C R系成熟雌マウスを過排卵処理し、腔栓を認めた day1 より day5 のいずれかに RU486 を 1, 2.5, 5, 10, あるいは 20mg/kg を 1 回腹腔内投与し、day6 に着床数を確認した。さらに day14 に屠殺し胎仔数、子宮重量、胎仔の平均体重を測定した。

その結果、day6 における着床数は RU486 を 5mg/kg 以上の投与群で control に比べ有意に低値を示し、RU486 は着床阻止作用を有することが明らかになった。この着床阻止作用はとくに day4, 5 に投与した場合に著しかった。day14 における胎仔数、子宮重量も 5mg/kg 以上の投与群で有意に低値を示したが、胎仔が存在した場合には平均胎仔体重に差はなかった。

以上より RU486 は着床阻止作用を有し、morning-after pill として応用可能と考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 623-627, 1988)

緒 言

RU486 は progesterone receptor (PR) には progesterone (P) の約 5 倍、glucocorticoid receptor には dexamethasone の約 3 倍の親和性をもつ合成ステロイドで、receptor level で抗 P 作用を示すため、欧米では数年前より月経周期の調節や初期妊娠の中絶に応用した報告がみられる。この薬剤の作用機序は子宮内膜への直接作用のほか、視床下部-下垂体-卵巣系を介する作用や卵巣への作用が考えられるが、子宮内膜直接作用が主であると思われる。著者らは RU486 による受精卵の子宮内膜への着床阻止作用を検討することによって、本薬剤の避妊薬、morning-after pill としての応用の可能性を検討してみた。

実験方法

実験動物には 8~14 週令の I C R系マウスを用い

た。図1のように、PMS 5IU を雌マウスに腹腔内投与し、48 時間後に hCG 5IU を同様に投与して過排卵処理をした。同雄マウスと mating させ、翌朝腔栓を認めた時点を day1 として実験に供した。

day1 より day5 の間のいずれかに 1, 2.5, 5, 10 あるいは 20mg/kg の RU486 を 1 回腹腔内投与した。day6 の午後に尾静脈より brilliant blue 色素を静注し、約 15 分後にネブタール麻酔下に後側背部より開腹し、色素に染まった着床部の有無とその数を確認した(図2)。同マウスは day14 に再開腹し胎仔数の確認と子宮重量の測定を行った。なお、control には 70% ethylalcohol のみを投与した。

実験成績

1. RU486 投与量と着床数、胎児数、子宮重量および胎仔体重

RU486 投与量別に day6 における着床数および day14 における胎仔数、子宮重量、胎仔体重を表 1 に

1. 実験動物：ICR系マウス(8-14週齢)

2. 方法

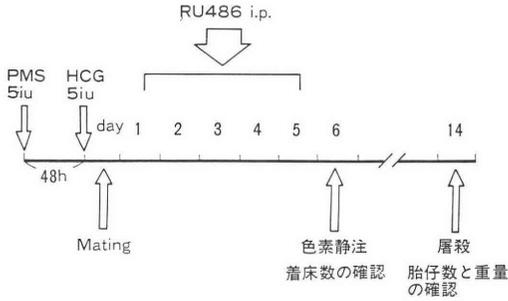


図1 実験動物と方法

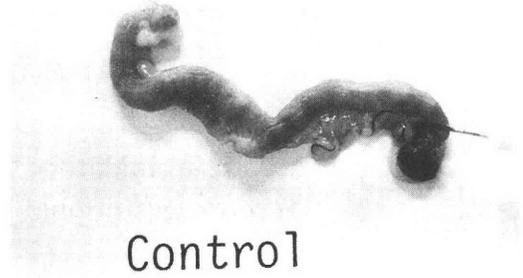


図2 Day 6における着床部の色素沈着(コントロール)

表1 RU486投与量と着床数, 胎仔数, 子宮重量及び胎仔体重 (M±S E)

RU486投与量	0mg/kg (control)	1mg/kg	2.5mg/kg	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
着床数	16.2±2.5	8.9±3.6	11.5±3.6	4.5±1.5	3.6±1.6	2.7±1.2
胎仔数	12.3±2.3	8.1±3.4	9.0±3.9	2.3±1.4	3.2±1.7	1.5±0.8
子宮重量(mg)	5053±1090	4263±1539	3535±1334	1065±528	1881±709	700±338
胎仔体重(mg)	111.2±21.5	136.8±9.0	126.6±8.4	120.9±1.3	125.8±19.7	100.9±5.2
n	10	11	11	25	15	23

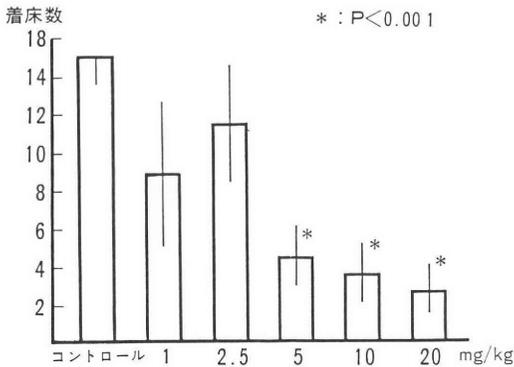


図3 着床数におよぼすRU486の影響

示した, day6における着床数は図3のように, controlの16.2±2.5個に対して, 1mg/kg, 2.5mg/kg投与例では差がなかったが, 5mg/kgでは4.5±1.5個, 10mg/kgでは3.6±1.6個, 20mg/kgでは2.7±1.2個と有意(P<0.001)に少なく, 5mg/kg以上で着床が阻止された, day14における胎仔数はcontrolの

12.3±2.3匹に対して, 5mg/kgでは2.3±1.4匹(P<0.001), 10mg/kgでは3.2±1.7匹(P<0.05), 20mg/kgでは1.5±0.8匹(P<0.005)とday6での着床数とほぼ同様の傾向を示した. 子宮重量は胎仔数と相関するため表1のように胎仔数と同様の傾向を示した, また, day14における一匹あたりの平均胎仔体重はcontrolの111.2mgに対して1~10mg/kg投与例では120.9~136.8mgとむしろ高値を示した, 20mg/kg投与例では100.9mgと低値を示したが有意差はなかった. また, 肉眼的に胎仔に外表奇形等の異常を認めたものはなかった.

2. RU486の投与日と着床率(表2)

RU486の投与日による着床率(1個以上の着床が認められたマウスの率)をみると, day1よりday3までの投与の場合, いずれの投与量でもday4, 5の投与に比べ着床率が高かった. 合計すると, day1, 2, 3の投与では39匹中21匹(53.8%)に着床がみられたのに対し, day4, 5の投与では46匹中10匹(21.7%)で, 両群間に有意差(P<0.005)を認めた.

3. 着床数と胎仔数の比較

day6で着床の認められた27匹で着床数とday14で確認した胎仔数との差をみた. 図4のようにday6

表 2 RU486投与日による着床率 (%)

投与日	投与量	1mg/kg	2.5mg/kg	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg	計
day1 - day3		4/4 (100)	4/4 (100)	3/7 (42.9)	4/8 (50.0)	6/16 (37.5)	21/39 (53.8)
day4 - day5		1/7 (14.3)	2/7 (28.6)	6/18 (33.3)	0/7 (0)	1/7 (14.3)	10/46 (21.7)

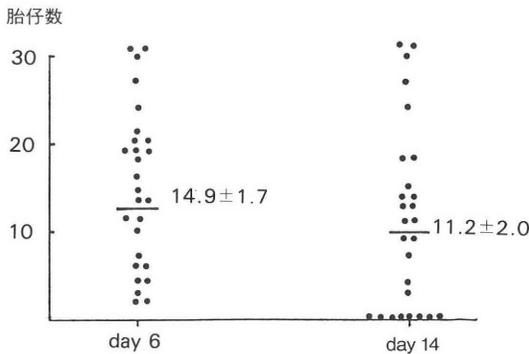


図 4 Day 6 における着床数と Day 14 における胎仔数の比較

での着床数 14.9 ± 1.7 個に対して、day14 の胎仔数は 11.2 ± 2.0 匹と減少の傾向がみられた。しかしコントロールでも 16.2 ± 2.5 個が 12.3 ± 2.3 匹と減少していた。

4. 子宮内膜の組織学的検討 (図 5)

図 5 上段は day2 に溶媒のみを投与した control, 下段は RU486 20mg/kg を投与したマウスの day4 における子宮内膜の H. E. 染色である。control では核下空胞がみられ分泌期内膜の像を呈しているが、RU486 投与例では増殖期のままであった。

考 察

RU486 は分子量 429.58 の 19-norsteroid で、1980 年代に入ってフランスの Roussel Uclaf で開発された抗 P 剤である。その臨床報告は 1982 年ころよりみられ、月経周期のコントロール¹⁾や初期妊娠の中絶に应用したものが多く、Vervest *et al*²⁾ は最終月経後 55 日目までの 35 名と、56~70 日までの 9 名に RU486 100mg/日または 200mg/日を 4 日間投与し、55 日までの 35 名中 29 名 (82.6%)、70 日までの 9 名中 3 名 (33.3%) で完全流産を起こし得たと報告している。また Hodgen³⁾ は妊娠初期の macaque monkey 5 匹に、妊娠 34 日目より 4 日間 RU486 含有タンポンを挿入して、全例に妊娠中絶が起こったと述べている。このように、妊娠のごく初期には RU486 単独でも有効率が高いが、妊娠週数の進んだものでは効果が弱く、prostaglandin 剤の併用や吸引法を必要とする例が多くなる。Kovacs *et al*⁴⁾ は最終月経より 42 日以内の妊婦 36 名に RU486 を投与したところ、完全流産は 61% に過ぎなかったため、むしろ吸引法との併用を勧めている。

このような中絶薬としての応用法に対して、最近では妊娠の有無にかかわらず月経周期の 24 日目ころから RU486 50~400mg/日を 4、5 日間内服させ、予定月経のころに子宮出血を起こさせるといった避妊法が検討されている。しかしこの方法は避妊ではなく広義の中絶であるという批判も一部には存在する。

著者らは本薬剤を純粋な避妊薬、とくに morning

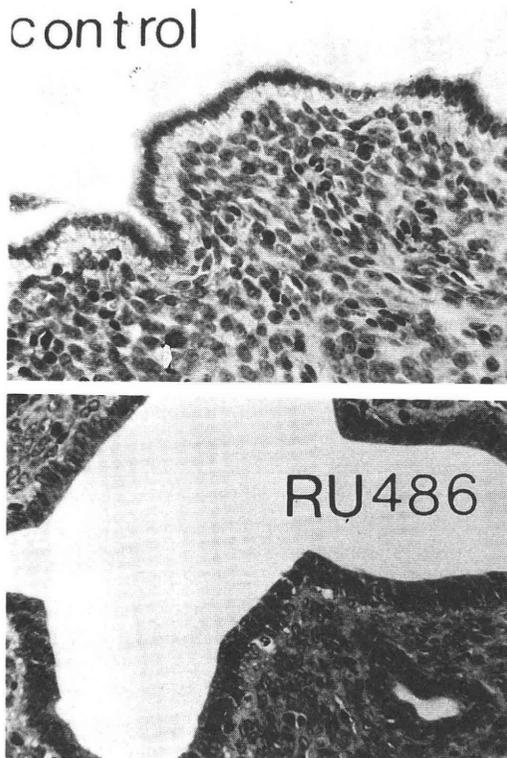


図 5 子宮内膜への影響 (上段: コントロールマウス, 下段: RU486 投与マウス)

after pill として応用できないかと考え、ICRマウスで受精卵の着床阻止作用を検討してみた。その結果、5mg/kg以上の投与で明らかに着床を阻止することがわかったが、この着床阻止作用はとくに着床直前のday4, day5に投与した場合に効果的で、day1, 2, 3に投与した場合は着床例が多く、53.8%に着床がみられた。これはRU486の作用持続時間が36時間程度といわれていることから、day3までの投与では着床の起こるday6のころにはすでにその効果が消失しているためではないかと考えられる。

day6での着床数 14.9 ± 1.7 個に対して、day14で確認した胎仔数は 11.2 ± 2.0 匹と減少を示し、この間における一部胎仔の吸収や流産の可能性が考えられる。しかしcontrolでも同様の傾向がみられることから、これはRU486の影響よりもday6における手術操作や麻酔の影響あるいは途中での自然流産によるものかもしれない。

今回得られたRU486の着床阻止作用の発現機序は子宮内膜への直接作用が主であると考えている。しかしそれ以外にも黄体に作用して退縮を起こす経路や視床下部-下垂体-卵巣系を介して子宮内膜に作用する可能性を否定できない。RU486の卵巣機能に及ぼす影響についてはSchaison *et al*⁵⁾が32名の月経正順婦人で検討している。彼らは黄体期4日目よりRU486を25mg/日、50mg/日、100mg/日のいずれかの量で4日間投与し、頻回にE₂とPの推移を検討しているが、100mg/日投与例では14名中8名で出血開始後3日以内に黄体退縮を起こしBBTが下降したが、残りの6名では出血は起こったもののBBTは予定月経まで高温相を持続したと述べている。また、50mg/日では8例中3例、25mg/日では10例中2例にしか黄体退縮及びBBTの下降は認めなかったと報告している。

RU486のgonadotropin (Gn)分泌に及ぼす影響についてはHealy *et al*¹⁾がcynomolgus monkeyでは1.0~1.8mg/kgの投与量で変動はなかったと述べている。一方、前述のSchaison *et al*⁵⁾は黄体期4日目からのRU486 100mg/日4日間投与で8名中7名にGn低下を認めているが、この7名のうち5名では黄体退縮は起こらなかったと報告している。また、50mg/日では4名中2名、25mg/日では5名中1名のみGn低下を認め、dose dependentであったとしている。合計すると10名でGn低下を認めているが、そのうち5名は黄体退縮を起こさず、また逆に黄体退縮を起こした17名のうち2名ではGn分泌には変化がなかったと述べている。

最近までRU486にはP agonistとしての作用はな

いと考えられてきたが、Koering *et al*⁶⁾は去勢したcynomolgus monkeyにE₂及びPを投与後RU486を与えると強い抗P作用を示すが、E₂投与後にRU486のみを与えると分泌期内膜への移行を示すことから、弱いprogestomimeticな作用があると述べている。同様にGravanis *et al*⁷⁾は、17名の閉経婦人にE₂を投与後、Pのみ、RU486のみ、またはP+RU486を投与したところ、PまたはRU486を投与したもては子宮内膜が分泌期像を呈したが、両者を投与したもては増殖期のままであったとして、ある条件下でprogestomimetic activityを有すると報告している。

RU486の着床阻止作用をヒトに応用する場合、薬剤の投与時期は着床直前の黄体期4、5日目から数日間が適当と思われるが、この場合Schaison *et al*⁵⁾の報告のように、RU486投与開始後と予定月経時の2回子宮出血が起こる可能性があるため実用的ではないかもしれない。しかし、出血を起こさずに着床だけを阻止する投与量があるかもしれないし、また抗E₂剤等の他の薬剤の併用によってこの目的が達せられる可能性もある。

最近、Collins *et al*⁸⁾は性周期の正順な雌のcynomolgus monkey5匹に月経周期10日目より3日間RU486 5mg/日を投与して、LH surgeの約12時間前から認められるP上昇⁹⁾に拮抗させるとLH surgeを著しく遅延させられたと報告しており、排卵抑制による避妊薬としての可能性も期待される。

本論文の要旨は第38回日本産科婦人科学会総(東京, 1986年)およびXII World Congress on Fertility & Sterility (Singapore, 1986年)において発表した。

文 献

- 1) Healy, D. L., Baulieu, E. E. and Hodgen, G. D.: Induction of menstruation by an antiprogestone steroid (RU486) in primates: Site of action, Dose-response relationships, and hormone effects. *Fertil. Steril.* 40: 253, 1983
- 2) Vervest, H. M. and Haspels, A. A.: Preliminary results with the antiprogesterone RU486 (mifepristone) for interruption of early pregnancy. *Fertil. Steril.* 44: 627, 1985
- 3) Hodgen, G. D.: Pregnancy prevention by intravaginal delivery of a progesterone antagonist: RU486 tampon for menstrual induction and absorption. *Fertil. Steril.* 44: 263, 1985
- 4) Kovacs, L., Sas, M., Resch, B. A., Ugocsai, G., Swahn, M. L., Bydeman, M. and Rowe, P. J.: Termination of very early pregnancy by RU486-an antiprogesterone compound. *Contraception* 29: 399, 1984

- 5) Schaison, G., George, M., Lestrat, N., Reinberg, A. and Baulieu, E. E.: Effects of the antiprogesterone steroid RU486 during midluteal phase in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 484, 1985
- 6) Koering, M. J., Healy, D. L. and Hodgen, G. D.: Morphologic response of endometrium to a progesterone receptor antagonist, RU486, in monkeys. *Fertil. Steril.* 45: 280, 1986
- 7) Gravanis, A., Schaison, G., George, M., Brux, J. DE., Satyaswaroop, P. G., Baulieu, E. E. and Robel, P.: Endometrial and pituitary responses to the steroidal antiprogesterin RU486 in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 156, 1985
- 8) Collins, R. E. and Hodgen, G. D.: Blockade of the spontaneous midcycle gonadotropin surge in monkeys by RU486: A progesterone antagonist or agonist? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 1270, 1986
- 9) Hoff, J. D., Quigley, M. E. and Yen, S. S. C.: Hormonal dynamics at midcycle: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 792, 1983

**Antinidatory activity of
anti-Progestational
compound RU486**

Yasushi Unoki, Kazuhiro Takeuchi
and Yukihiro Nagata

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

RU486 is a new synthetic steroid with the properties of progesterone and glucocorticoid antagonist at receptor level. The present study has been performed to evaluate antinidatory activity of this compound. After hyperstimulation with PMS and hCG, mature female ICR mice were mated and defined as day1 of pregnancy when vaginal plug was confirmed next morning, and administered a single i. p. dose of RU486 (1, 2.5, 5, 10, 20mg/kg) or solvent on day1, 2, 3, 4, or 5. On day 6, intravital stain was performed with brilliant blue i. v. and blue-stained implantation sites in uterus were counted. The animals were killed on day14 and litter size and weights of uterus and fetuses were measured.

The following results were obtained:

(1) Number of implantation sites ($M \pm SE$) at day6 were significantly less in mice injected 5 (4.5 ± 1.7), 10 (3.6 ± 1.6) or 20mg/kg (2.7 ± 1.2) of RU486 than the control (16.2 ± 2.5). (2) Antinidatory activity of RU486 was significantly reduced in mice injected at day1-3 (46.2%) than day 4-5 (78.3%). (3) Litter size at day14 (11.2 ± 2.0) was less than that of day6 (14.9 ± 1.7). (4) Mean weight of fetuses in RU486 injected group (125 ± 6 mg) was not different from the control (111 ± 22 mg).

These results suggest that RU486 is effective as a morning-after pill as well as an abortifacient drug.

(受付: 昭和62年11月27日)

EFFECTS OF HACHIMIJIOGAN AND KEISHIBUKURYOGAN ON TESTICULAR TESTOSTERONE PRODUCTION IN RATS

Satoshi USUKI

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

Abstract: This study was conducted to clarify the effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on testosterone, Δ^4 -androstenedione and estradiol- 17β (E_2 - 17β) secretion by the testis *in vivo*.

Ten-week old male Wistar-Imamichi rats were orally given 20-200 μ g of HZ or KB daily for 3-5 days prior to autopsy on week 11. The testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 - 17β concentrations in serum, and testosterone and E_2 - 17β concentrations in ovarian tissue were determined by radioimmunoassaying.

The testosterone concentrations in testicular tissue after daily treatment with 20 and 200 μ g/day of HZ for 5 consecutive days were significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.02$, respectively) increased, while the concentrations in testicular tissue after daily treatment with 20 and 200 μ g/day of KB for 5 consecutive days were significantly ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively) decreased. The Δ^4 -androstenedione and E_2 - 17β levels showed no significant changes.

These results suggest that HZ stimulates the testis to produce testosterone, and that KB decreases testosterone production.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 628-634, 1988)

Introduction

There are few basic studies on the relationship between Chinese herbal medicines and hormones.

Recently, Usuki et al¹⁾, and Usuki^{2,3)} have reported that HZ increases the serum E_2 - 17β level and stimulates spermatogenesis in oligozoospermic men, and that HZ and KB decrease the medium testosterone and E_2 - 17β levels in the testes incubated *in vitro*.

Recent investigations^{4,5)} have shown that intratesticular testosterone levels of about a hundred fold higher than peripheral plasma testosterone will maintain spermatogenesis, and it is further well known that testosterone formed by the interstitial cells of the testes under the influence of LH is transported to the Sertoli cells, where it

is converted to E_2 - 17β under the influence of FSH, and that this testosterone- E_2 - 17β system is conceived to constitute an interstitial cell-Sertoli cell messenger system⁶⁾.

The purpose of this study was to clarify the changes in testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 - 17β secretion on *in vivo* administration to male rats of HZ and KB.

Materials and Methods

Animals and treatment

Adult male Wistar-Imamichi rats were purchased from the Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama, Japan) and fed ad libitum with a photoperiod of 12hr (0800-2000h) in an air-conditioned room during the experiment. The animals, when aged 283 or 285 days, were treated daily with

HZ (20-200 μ g/day, p. o.) and KB (20-200 μ g/day, p. o.), respectively, for 5 or 3 days prior to autopsy, for which they were killed by decapitation under mild ether anesthesia at 290 days of age. After sacrifice, the testes were removed quickly, trimmed off peritesticular bursa, weighed and then kept at -20°C until assayed for tissue testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 -17 β .

At the same time, the hypophyses were resected and weighed. Blood samples were also collected at sacrifice and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4°C and then the supernatant fractions were stored at -20°C until the testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 -17 β concentrations were determined by radioimmunoassaying.

Hachimijogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB)

Extracts of HZ and KB were donated from Tsumurajuntendo Co., Ltd. (Tokyo, Japan), and the detailed components were given in full previously⁷⁾.

Radioimmunoassay of testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 -17 β

Testicular tissues were homogenized in 1.5ml of cold 0.02M phosphate buffer in saline three times, for 30 sec each time, at 1,200 rpm with a Potter-Elvehjem glass homogenizer in an ice bath. The homogenate was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4°C and then the supernatant was used for the steroid assay.

Aliquots of the supernatants after centrifugation of blood samples and testicular tissue homogenates were assayed for testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 -17 β by radioimmunoassaying.

The antiserum was raised in a rabbit immunized against testosterone-3-oxime-BSA (bovine serum albumin), Δ^4 -androstenedione-3-oxime-BSA and estradiol-6-oxime-BSA, respectively.

The testosterone-antiserum cross-reacted with 5 α -dihydrotestosterone (117%), androst-4-one-3, 17-dione (1.23%), androsterone (0.14%), progesterone (0.19%) and E_2 -17 β ($<0.09\%$), Δ^4 -androstenedione-antiserum with testosterone (5.43%), androsterone (4.75%), progesterone (1.38%) and E_2 -17 β ($<0.072\%$), and the E_2 -17 β -antiserum cross-reacted with testosterone (0.29%), Δ^4 -androst-4-ene-3, 17-dione (0.44%), dehydroepian-

drosterone ($<0.08\%$) and progesterone ($<0.08\%$).

Testosterone-1 β , 2 β - ^3H (sp. act. 47Ci/mM: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U. S. A.), Δ^4 -androstene-dione-1, 2- ^3H (sp. act. 45.9Ci/mM: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U. S. A.), or E_2 -6, 7- ^3H (sp. act. 130Ci/mM: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U. S. A.) was used for assay and recovery reagent. 20 μ l of plasma or 200 μ l of the supernatant of the homogenate was extracted three times with 8ml of ethyl ether, evaporated under N_2O at 50°C , and then chromatographed on a Sephadex LH-20 microcolumn using hexane, benzene and methanol (80:10:10, v/v/v) for testosterone and Δ^4 -androstenedione or benzene and methanol (85:15, v/v) for E_2 -17 β . The separated fractions were subjected to radioimmunoassaying. The testosterone, Δ^4 -androstenedione and E_2 -17 β antisera were diluted 1:20,000, 1:8,000 and 1:50,000, respectively, in borate buffer (0.05M, w/v: pH 8.0) containing BSA (0.06%, w/v), calf gammaglobulin (0.05%, w/v) and 10,000 dpm testosterone-1 β , 2 β - ^3H , Δ^4 -androstenedione-1, 2- ^3H or E_2 -6, 7- ^3H .

Each antiserum was added to the separated fraction after evaporation. The samples were incubated with 0.25ml of each antiserum for 20 min at room temperature. Blanks and standard samples of testosterone, Δ^4 -androstenedione or E_2 -17 β (0, 10, 50, 100, 200, 400 and 800pg) were assayed in duplicate together with the experimental samples.

Furthermore, 0.25ml of 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/v) was added to the incubation in order to separate bound and unbound steroid, incubated for 10 min at room temperature and then centrifuged for 10 min at 3,000 rpm at 4°C . The supernatant fractions were collected, and then the liquid scintillation counting was carried out by scintillation fluid (a mixture of 0.3% DPO (w/v) and 0.03% dimethyl POPOP (w/v) in toluene and Instra-Gel; Packard Instruments, Downers Grove, Illinois, U.S.A; 1:1, V/V, 10ml). Water blanks were below 10pg for testosterone, Δ^4 -androstenedione or E_2 -17 β .

Accuracy was assessed by adding known quantities of testosterone, Δ^4 -androstenedione or E_2 -17 β (0, 20, 50, 100, 200 and 500pg/ml) to the serum

and assaying the extracts. The mean within (intra)-assay variance of testosterone, Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ were 9.92, 11.02 and 7.6%, respectively, and the mean between (inter)-assay variance of testosterone, Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ were 13.5, 14.9 and 12.6%, respectively.

The linear regression analysis of the results gave the equation $y=0.88x+46.2$ for testosterone, $y=0.97x+56.07$ for Δ^4 -androstenedione and $y=1.01x+17.4$ for $E_2-17\beta$, where y =steroid quantified and x =steroid added.

The mean extraction efficiencies of testosterone, Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ were 85.8 ± 11 , $0.56.7 \pm 3.1$ and $74.7 \pm 4.7\%$, respectively. The assay sensitivities of testosterone, Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ were all 20pg/ml.

All hormone assay values were expressed in pg/ml or ng/ml serum or pg/g or ng/g wet weight of testicular tissue.

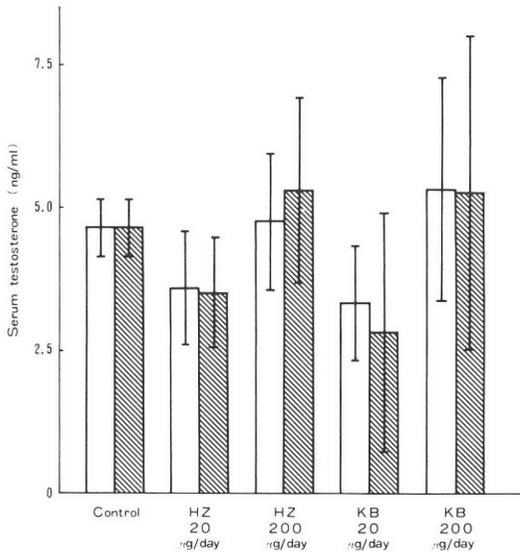


Fig. 1 Effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on testosterone secretion in venous serum of 10-week old male rats.

The animals, when aged 283 or 285 days, were treated daily with HZ and KB (20-200 μ g/day, p. o.), respectively for 3-5 days prior to sacrifice, and the serum testosterone concentrations were assayed as under Materials and Methods.

The data represent the mean \pm SD for five observations.

□; 3-day treatment, ▨; 5-day treatment.

Transmission electron microscopy

The testes were cut into 1mm pieces in 2.5% glutaldehyde in distilled water and placed on a shaker at 4°C for 3 hr. After postfixating for 1 hr in a 1% solution of osmium tetraxide in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.3, the samples were dehydrated in graded alcohol solutions and propylene oxide and embedded in mixture of Epon and Araldite. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate before observation with an electron microscope.

Other methods

All chemical reagents were of analytical grade and organic solvents were redistilled prior to use. Student's t-test was used for the statistical analysis, and differences were considered to be significant at the level of $P < 0.05$.

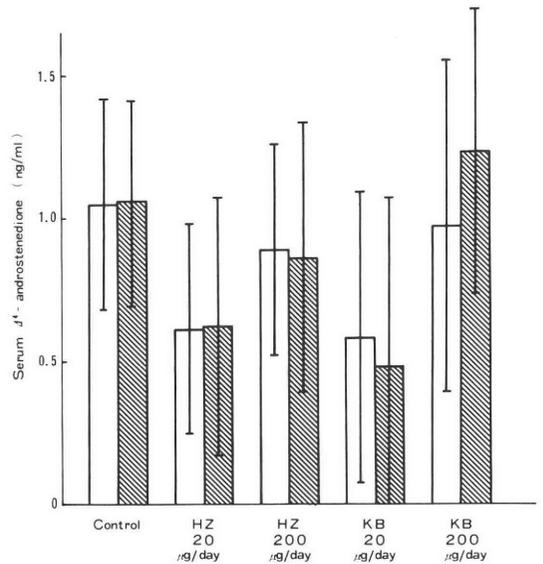


Fig. 2 Effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on Δ^4 -androstenedione secretion in venous serum of 10-week old male rats.

The animals, when aged 283 or 285 days, were treated daily with HZ and KB (20-200 μ g/day, p. o.), respectively for 3-5 days prior to sacrifice, and the serum Δ^4 -androstenedione concentrations were assayed as under Materials and Methods.

The data represent the mean \pm SD for five observations.

□; 3-day treatment, ▨; 5-day treatment.

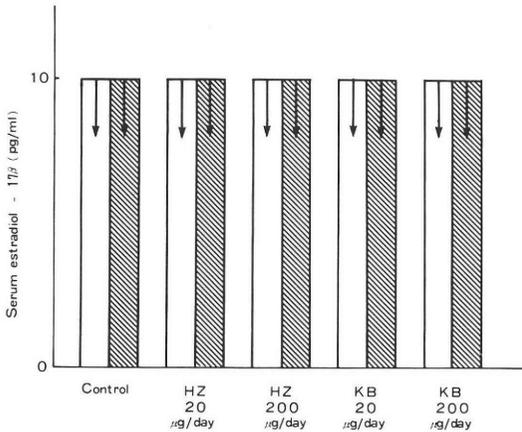


Fig. 3 Effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on estradiol-17 β secretion in venous serum of 10-week old male rats.

The animals, when aged 283 or 285 days, were treated daily with HZ and KB (20-200 μ g/day, p. o.), respectively for 3-5 days prior to sacrifice, and the serum estradiol-17 β concentrations were assayed as under Materials and Methods.

The data represent the mean \pm SD for five observations.

□; 3-day treatment, ▨; 5-day treatment.

Each arrow (\downarrow) represents the value below 10pg/ml.

Results

Figures 1,2 and 3 show the serum testosterone, Δ^4 -androstenedione and E₂-17 β concentrations in rats treated perorally with HZ and KB, respectively.

As shown in Fig. 1, the serum testosterone concentrations after daily treatment with 20 and 200 μ g of HZ or KB were 3.59 \pm 1.01; mean \pm SD, 4.78 \pm 1.21, 3.32 \pm 0.98 and 5.32 \pm 1.97 for 3 consecutive days, and 3.48 \pm 0.93, 5.29 \pm 0.66, 2.81 \pm 2.10 and 5.25 \pm 2.75ng/ml for 5 days, respectively, and there was no significant difference when compared with in the control group (4.63 \pm 0.53). The serum Δ^4 -androstenedione levels after treatment with 20 and 200 μ g/day of HZ or KB (0.61 \pm 0.37, 0.89 \pm 0.37, 0.58 \pm 0.51 and 0.97 \pm 0.58 for 3 days, and 0.62 \pm 0.45, 0.85 \pm 0.47, 0.48 \pm 0.59 and 1.22 \pm 0.50ng/ml for 5 days, respectively) also showed no significant difference as compared with in the control group (1.05 \pm 0.37) (Fig. 2).

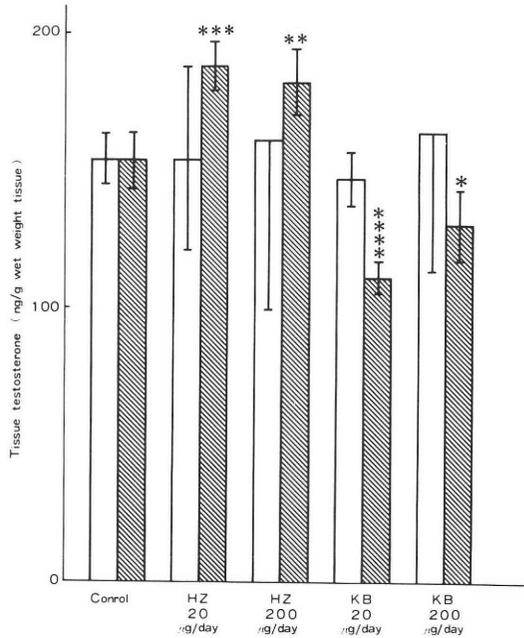


Fig. 4 Effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on testosterone concentrations in testis of 10-week old rats.

The animals, when aged 283 or 285 days, were treated daily with HZ and KB (20-200 μ g/day, p. o.), respectively for 3-5 days prior to sacrifice, and the testicular tissue testosterone concentrations were assayed as under Materials and Methods.

The data represent the mean \pm SD for five observations.

□; 3-day treatment, ▨; 5-day treatment.

*: Significantly different from the control group, P<0.05.

** : Significantly different from the control group, P<0.02.

***: Significantly different from the control group, P<0.01.

****: Significantly different from the control group, P<0.001.

As shown in Fig. 3, the serum E₂-17 β values were all below 10pg/ml.

Subsequently, the testosterone and E₂-17 β concentrations in testicular tissue were measured. As shown in Fig. 4, the tissue testosterone concentrations after daily treatment with 20 and 200 μ g of HZ for 3 and 5 consecutive days were 155.34 \pm 32.51 and 161.37 \pm 62.15 for 3 days, and 188.14 \pm 9.34 and 182.46 \pm 11.83ng/g wet weight tissue for 5 days, respectively, and the 5-day treatment groups

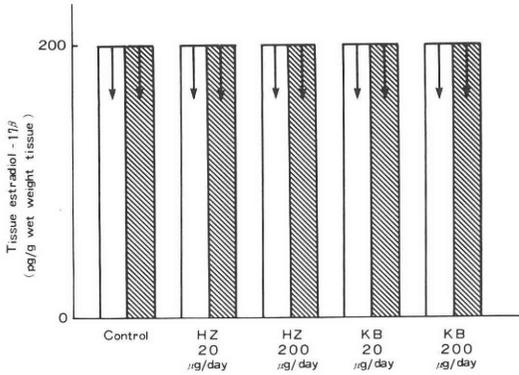


Fig. 5 Effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on estradiol-17β concentrations in testis of 10-week old rats.

The animals, when aged 283 or 285 days, were treated daily with HZ and KB (20-200μg/day, p. o.), respectively for 3-5 days prior to sacrifice, and the testicular tissue estradiol-17β concentrations were assayed as under Materials and Methods.

The data represent the mean ± SD for five observations.

□; 3-day treatment, ▨; 5-day treatment.

Each arrow (↓) represents the value below 200pg/g wet weight tissue.

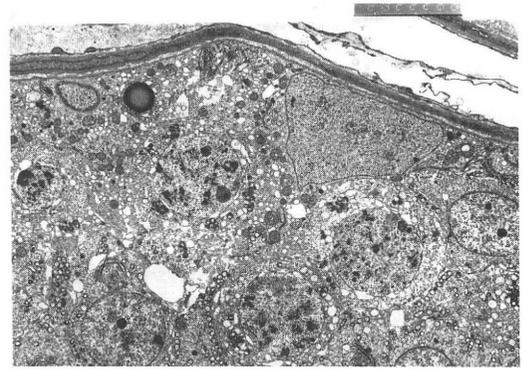


Fig. 6 An electron microscopic photograph of semithin section of testis of 11-week old rat (control). x2,000

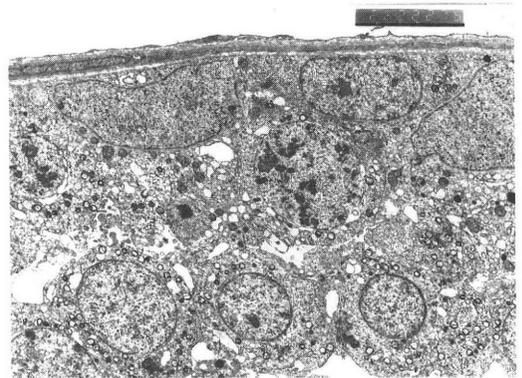


Fig. 7 An electron microscopic photograph of semithin section of testis of 11-week old rat after treatment with 200μg/day of Hachimijiogan for 5 consecutive days. x2,600

Table 1. Effects of Hachimijiogan (HZ) and Keishibukuryogan (KB) on the weights of the testes and hypophysis in rats. Ten-week old male rats were treated daily with HZ and KB (20-200μg/day,

p. o.), respectively for 3-5 consecutive days prior to autopsy, sacrificed when aged 290 days, and the testes and hypophysis were weighed.

Treatment	No.	Testes (g) mean ± SD	Hypophysis (mg) mean ± SD		
Control	3 days	5	1.28 ± 0.06	6.4 ± 1.7	
	5 days	5	1.28 ± 0.07	6.4 ± 1.7	
HZ 20 μg/day	3 days	5	1.28 ± 0.07	6.3 ± 1.5	
		5 days	5	1.27 ± 0.10	6.5 ± 1.7
	200 μg/day	3 days	5	1.26 ± 0.09	6.4 ± 1.7
		5 days	5	1.28 ± 0.06	6.4 ± 1.7
KB 20 μg/day	3 days	5	1.28 ± 0.07	6.3 ± 1.8	
		5 days	5	1.31 ± 0.08	6.4 ± 1.5
	200 μg/day	3 days	5	1.29 ± 0.08	6.4 ± 1.8
		5 days	5	1.28 ± 0.07	6.3 ± 1.8

were significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.02$, respectively) increased as compared with in the control group (154.15 ± 10.16). In contrast, the tissue testosterone levels after treatment with 20 and $200 \mu\text{g}/\text{day}$ of KB were 147.32 ± 9.87 and 163.82 ± 51.32 for 3 days, and 111.00 ± 4.57 and 130.29 ± 13.03 for 5 days, respectively, and the 5-day treatment groups were significantly ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively) decreased when compared with in the control group (Fig. 4).

The tissue $E_2-17\beta$ levels after treatment with 20 and $200 \mu\text{g}/\text{day}$ of HZ and TS were all below $200 \text{pg}/\text{g}$ wet weight tissue as in the control group (Fig. 5).

The Δ^4 -androstenedione concentrations in testicular tissue showed no significant changes (data not shown).

As shown in Table 1, the peroral administration of 20- $200 \mu\text{g}/\text{day}$ of HZ and KB for 3-5 consecutive days had no significant effect on the weights of the testes and hypophysis. Furthermore, observation with electron microscope showed no conspicuous changes in testicular morphology before and after treatment with HZ and KB (Figs. 6 and 7).

Discussion

Recently, Usuki et al¹⁾ and Usuki³⁾ have reported that HZ increases the serum $E_2-17\beta$ level and improves spermatogenesis in oligozoospermic men. In contrast, it is also known that HZ and KB decrease the testosterone and $E_2-17\beta$ secretion by the rat testes incubated *in vitro*²⁾. In this *in vivo* study, treatment with 20- $200 \mu\text{g}/\text{day}$ of HZ for 5 days significantly increased the testosterone concentrations in testicular tissue, although the serum concentrations showed no significant changes. In contrast to HZ, KB significantly decreased the testosterone levels in testicular tissue without significant changes in the serum levels. These results suggest that HZ stimulates the testis to produce testosterone, which is necessary for spermatogenesis⁴⁾, but that KB decreases testosterone.

Recently, Usuki^{8,9)} has proved that HZ and TS stimulate ovarian steroidogenesis via the mediation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP). Therefore, it is possible that these

effects on testosterone concentrations may be mediated by a cyclic AMP system. This mechanism remains to be elucidated.

The Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ concentrations had no significant changes, indicating that HZ and KB have no effects on the Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ secretion.

The ability of the Sertoli cells of the mammalian testis to secrete estrogens is well established⁶⁾, and the testosterone-estradiol system may constitute an interstitial cell-Sertoli cell messenger system⁹⁾. This fact supports the evidence that HZ increases the serum $E_2-17\beta$ level and improves spermatogenesis³⁾. However, the results of this study show no evidence of increasing $E_2-17\beta$ secretion. The increased secretion of $E_2-17\beta$ by HZ in men³⁾ may be attributed to the production in the organ other than testis or to the dose and duration of administration of HZ. Clarification of this is still to be elucidated.

The results of these *in vivo* studies can be summarized as follows: a) the testosterone concentrations in testicular tissue are significantly increased by peroral treatment with 20- $200 \mu\text{g}/\text{day}$ of HZ for 5 consecutive days, and in contrast, b) the tissue concentrations are significantly decreased by treatment with 20- $200 \mu\text{g}/\text{day}$ of KB for 5 consecutive days, and c) the Δ^4 -androstenedione and $E_2-17\beta$ levels show no significant changes by daily treatment with 20- $200 \mu\text{g}$ of HZ and KB.

These results lead to the conclusion that HZ stimulates rat testes to produce testosterone, but that KB decreases testosterone production. This conclusion supports the fact that HZ stimulates spermatogenesis, because testosterone is well known to be absolutely inevitable for spermatogenesis⁴⁾. However, the role of KB is questionable.

Clarification of the discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies and the possible mechanism of the effects of HZ and KB on the testis must await further study.

Acknowledgements

The technical assistance of Mrs. M. Kusumi, Miss M. Yoshimine and Mrs. S. Kawamura is

greatly appreciated.

The help of Miss N. Morohashi in the preparation of the manuscript is also acknowledged.

This work was partly supported by University of Tsukuba Project Research and a grant from the Japan-China Medical Association.

References

- 1) Usuki, S., Shigemitsu, S., Nishida, M. and Iwasaki, H.: Effects of Hachimijiogan on spermatogenesis and hormones. In *Advances in Chinese Herbal Medicines* (ed. S. Takeuchi and S. Sakamoto) No.1: 57-67. Diagnosis and Therapy (Japanese Press), Tokyo, 1984.
- 2) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicines on testosterone and estrogen secretion by adult rat testes. In *Advances in Chinese Herbal Medicines* (ed. S. Takeuchi and S. Sakamoto) No.1: 110-116. Diagnosis and Therapy (Japanese Press), Tokyo, 1984.
- 3) Usuki, S.: Hachimijiogan changes serum hormonal circumstance and improves spermatogenesis in oligozoospermic men, *Am. J. Chinese Med.*, XIV: 37-45, 1986.
- 4) Steinberger, E., Smith, K. D., Tcholakian, R. K., Chowdhury, M., Steinberger, A., Ficher, M. and Paulsen, C. A.: Steroidogenesis in human testes. In *Male Fertility and Sterility* (ed. R. E. Manicini and L. Martini), 149-174, Academic Press, London, 1974.
- 5) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility—a review. *Andrologia*, 11: 77-107, 1979.
- 6) Armstrong, D. T., Moon, Y. S., Fritz, I. B. and Dorrington, J. H.: Synthesis of estradiol-17 β by Sertoli cells in culture: stimulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP. In *Hormonal Regulation of Spermatogenesis* (ed. by F. S. French, V. Hansson, E. M. Ritzen and S. N. Nayfeh), 85-96, Plenum Press, New York, 1975.
- 7) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicines on progesterone secretion by corpus luteum. *Jap. J. Fert. Ster.*, 31: 482-486, 1986.
- 8) Usuki, S.: Chinese herbal medicine and gonadal steroidogenesis. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 19, 3: 219-222, 1986.
- 9) Usuki, S.: Tōki-syakuyaku-san stimulates tissue cyclic AMP and DNA polymerase α activity in rat ovaries. *Jap. J. Fert. Ster.*, 33: 385-396, 1988.

睾丸組織中の testosterone 産生は八味地黄丸によって促進し 桂枝茯苓丸で減少する

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 愷

目的：成人男性に八味地黄丸（H Z）を投与すると血中の estradiol-17 β （E₂）が増加するが、ラットでの incubation 実験では H Z および桂枝茯苓丸（K B）での medium 中の testosterone および E₂ は減少することが明らかとなった。このことから、H Z ないし K B が steroidogenesis に関与することが示唆され、今回はこれらのラット血中及び睾丸 steroidogenesis に及ぼす影響について *in vivo* での検討を加えた。

方法：10 週齢の Wistar-Imamichi 系雄ラットに 20 ないし 200g/日の H Z ないし K B エキス剤（ツムラ順天堂）を 3 ないし 5 日間連続投与の後、エーテル麻酔下で断頭・屠殺し、血中の testosterone, Δ^4 -androstenedione, E₂ および睾丸組織中の testosterone および E₂ 濃度を R I A にて測定した。

同時に、睾丸および下垂体の重量、睾丸の電顕（TEM）学的検討も行った。

結果：睾丸組織中の testosterone 濃度は、20 μ g/日 5 日間の H Z および K B の投与で各々 188.14 \pm 9.34；mean \pm SD（P<0.01），111.00 \pm 4.57（P<0.001），200g/日 5 日間の投与で 182.48 \pm 11.83（P<0.02）および 130.29 \pm 13.03ng/g wet weight tissue（P<0.05）と control 群（154.15 \pm 10.16）にくらべ H Z では有意な増加を、K B では有意な減少を示した。

一方、血中 testosterone, Δ^4 -androstenedione, E₂ および睾丸組織中 E₂ 濃度は control 群にくらべ有意な差が認められなかった。

H Z および K B の投与群と control 群の間で睾丸・下垂体重量および TEM 上変化は認められなかった。

結論：H Z は睾丸で testosterone の産生を促進させるが、K B は減少させる。

この事実は、H Z の spermatogenesis 改善作用の一つを説明するものであるが、K B の役割については不明である。

（受付：昭和 61 年 10 月 21 日）

ブタ精巣上体のペントースサイクル活性

Pentose Phosphate Cycle in the Caput, Corpus and Cauda Epididymal Tissue from the Boar

東邦大学第1産科婦人科学教室

伊藤 元博 跡部 一朗
Motohiro ITO Ichiro ATOBE

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

東邦大学生化学教室

渡辺 仁 天野 久夫
Hitoshi WATANABE Hisao AMANO

Department of Biochemistry, Toho University,
School of Medicine

ブタ精巣上体の頭部、体部、尾部におけるペントースサイクル活性の推移について検討した。本経路の鍵酵素である Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PG-DH) を 2', 5'ADP-Sepharose 4B を用いた affinity chromatography により分離、精製した結果、本経路活性は、頭部で 374.4 ± 27.6 mU/ml/g、体部で 1205.7 ± 33.8 mU/ml/g、尾部で 126.5 ± 5.8 mU/ml/g であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 635-638, 1988)

緒言

精巣から精巣上体管腔に放出された精子は、この時点ですでに特殊に分化された細胞になっているが、卵子との受精能の獲得および受精卵の正常な胚発生への移行能力を獲得するには、精巣上体頭部から尾部に至る管腔内で成熟という一連の変化を受けねばならない。この成熟過程に関与する因子は多数あるが精巣上体管通過中に生じる種々の成熟変化との相互関係、精巣上体管各部位での変化およびその機能的意義などはまだ十分に解明されていない。

本研究は精巣上体頭部、体部、尾部におけるペントースサイクル活性の変化について検索した。

実験方法

1) ブタ精巣上体各部位の粗抽出液作製 (図1)
屠殺後1時間前後の生殖可能精巣上体を実験に供した。精巣上体は頭部、体部、尾部に分割し¹⁾、付着

している血管、結合織、脂肪組織を取り除き、KRBG (pH7.4) で管腔内を洗浄し²⁾、精子および管腔内溶液を排除する。次に KRBG 中で細片するが、この際、次のホモジナイズに備え十分細片する必要がある。細片後再度 KRBG で洗浄し、洗浄後 10 mM メルカプトエタノール、5 mM EDTA3Na を含む 0.1M Tris HCl buffer pH7.6 を等量加え、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズ (800rpm, ストローク5回) し、引き続き発振周波数 20 KHz, 200w の出力で1分間づつ3回超音波処理をした。超音波処理後、4℃, 105,000g, 50分間冷却遠心し、得られた上清を東洋濾紙No.7で濾過した。

この濾液を精巣上体各部位の粗抽出液とし、その一部を蛋白量、酵素活性の測定に使用した。実験に供した精巣上体各組織は各々3.0gである。

2) 2,5, ADP-Sepharose 4B による精製 (図1)
方法については本誌既報^{3,4)}に準じた。
3) 2,5, ADP-Sepharose 4B

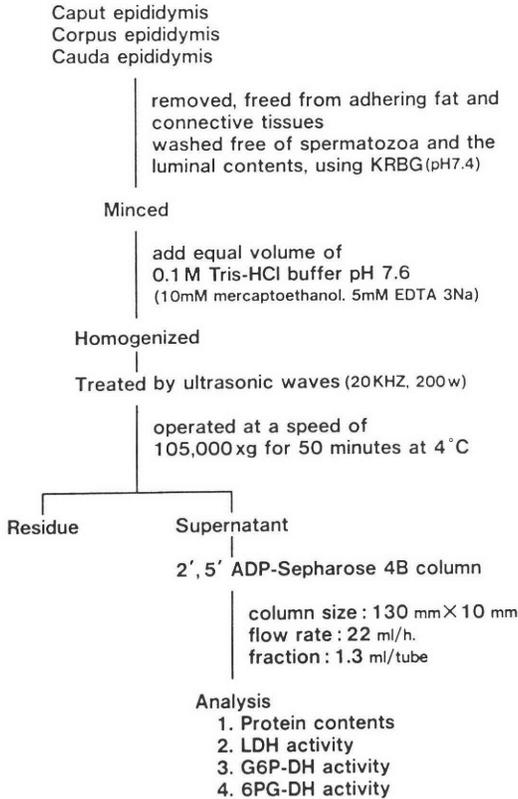


Fig. 1 Experimental Procedure

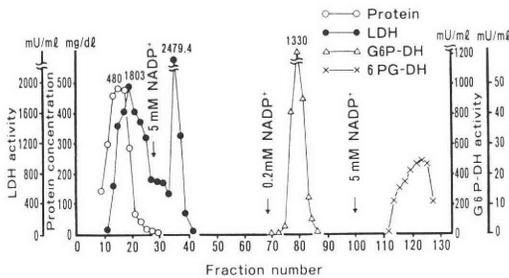


Fig. 2 The ductus caput

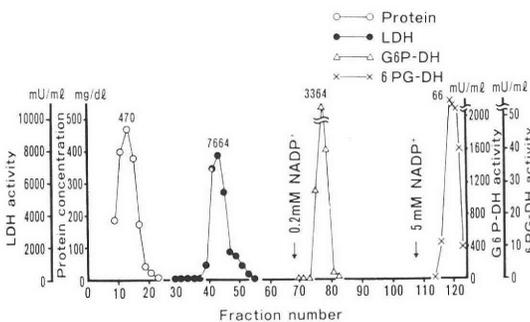


Fig. 3 The ductus corpus

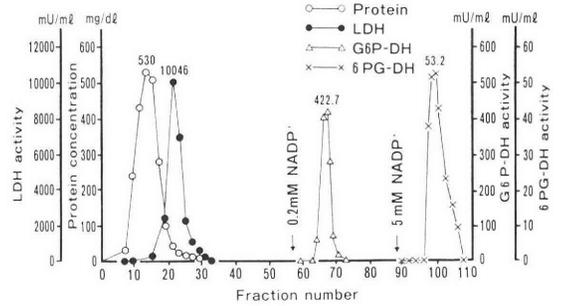


図 4 The ductus cauda

Table. 1 Glucose-6-phosphate dehydrogenase activities of epididymal tissue from boar.

Caput	n=5	1123.2 ± 82.7 mu/ml	374.4 ± 27.6 mu/ml/g
Corpus	n=5	**3617.2 ± 101.3 mu/ml	**1205.7 ± 33.8 mu/ml/g
Cauda	n=5	**379.6 ± 17.3 mu/ml	**126.5 ± 5.8 mu/ml/g

value ; Mean ± SD

The data were statistically analysed using Students' t-test and significant differences between the caput and corpus epididymidis or cauda epididymidis were indicated by asterisks (**p<0.01).

ファルマシア社製で, Sepharose 4B に N⁶-(6-amino-hexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate を cyanogen bromide method によりカップリングさせたものである⁵⁾.

4) 蛋白量および各酵素活性の測定

(1)蛋白量

試料 0.1ml に Bradford 試薬 5ml を加え, 595nm における吸光度を測定し蛋白量を求めた⁶⁾.

(2)LDH 活性

Hill 変法^{7,8)} にもとづき測定した。

(3)G6P-DH, 6PG-DH 活性

G6P-DH 活性は Löhr-Waller の方法⁹⁾, 6PG-DH 活性は Wolfson らの方法¹⁰⁾ にもとづき測定した。活性値の表わし方

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

実験結果

1) ブタ精巣上体頭部, 体部, 尾部粗抽出液からの G6P-DH の分離 (図 2, 図 3, 図 4)

精巣上体各部位から得られた粗抽出液を 2',5' ADP-Sepharose 4B を充填したカラムに添加し, affinity chromatography を施行した結果を図 2,

3, 4に示す。

2) 精巣上体各部位のG6P-DH活性

表1に頭部, 体部, 尾部のG6P-DH活性を組織1g当りで表した。

考 案

精巣上体機能は, 精巣より放出された未成熟な精子をその頭部から尾部へ輸送し, 貯蔵し, その間卵子との受精が可能になる迄成熟させてゆく環境を整備することにある。一方, 精子はこの管腔内環境変化に遭遇しつつ, その構造, 形態, 比重および代謝能, 受精能の変化を受ける。一般に哺乳動物では, 精巣上体通過に要する日数は8~15日間といわれており, ことに精子が際立った変化を示す精巣上体頭部, 体部の通過には2~5日間を要する¹¹⁾。この精巣上体通過中に生じる種々の精子成熟変化と精巣上体の機能的意義, 精巣上体各部位における各種成熟因子の変化などについては十分解明されていない。

われわれは精巣上体の精子成熟因子のうち代謝能, ことにペントースサイクル活性が精巣上体頭部, 体部, 尾部の各部位でどのように変化するか検索し, 同時に本経路の機能的意義について考察した。

Johnson¹²⁾, Kraft¹³⁾らは, ラット, ラビット, マウスの精巣および精巣上体頭部, 尾部における糖代謝を放射性グルコースを用いて検討している。彼らによるとペントースサイクル活性は, ラビット, マウスでは尾部より頭部で高く, ラットではそれが逆転していると報告している。この結果は, 精子の成熟過程のある時期にその組織あるいは精子によってペントースサイクルが利用されていることを示唆し, 同時に, 異なった場所の精子だけでなく, 特別な部位の精子において種族間に相違があることを証明している。

Brooks¹⁴⁾はラット輸精管を結紮し, 精巣上体管腔内の精子を皆無にした状態で精巣上体各部位の解糖系酵素を測定している。ペントースサイクルの鍵酵素であるG6P-DH活性はJohnsonらと同様, 頭部で高く, 末端部位で低値を示した。

われわれの実験では彼らと異なった結果が得られた。ペントースサイクル活性は体部で最も高く, 次いで頭部, 尾部では急激に低下している。この実験結果の相違はどこからきたのだろうか。最も考えられる原因は動物種族間の相違であろう。Johnsonらの報告ではラビット, マウスとラット間で, 本経路活性の推移に違いがあることを示している。しかし, 彼らは体部での活性値は測定していない。次に実験方法ではBrooksはhomogenizeした組織を10分

間, 600gで遠心し, 得られた上清を用いて酵素活性を測定しているが, 代謝系は主に細胞質ゾルで行われていることを考えると, この分画を得るには105,000gの遠心速度が必要である。さらにわれわれは, 超遠心で得られた上清をNADP依存酵素を特異的に吸着する2',5'ADP-Sepharose4Bでaffinity chromatographyを施行し, 蛋白や他の酵素を排除した溶出液より酵素活性を測定した。この方法は検出値が極めて安定し, 粗抽出液で経験するバラツキは最小限に抑えられる。

いずれにしても精子成熟変化が顕著に現れる精巣上体頭部, 体部でペントースサイクルが活発に働いていることは事実である。

しかしこれらの結果から, 精巣上体機能に対するペントースサイクルの作用機序, あるいは精子成熟変化との関連などについて推論することは困難であるが, 精巣上体に脂質合成のためのNADPHを供給しているという説もある^{14,15)}。

精巣上体管は高度に迂曲した長管であり, この管腔内を通過しつつ精子は様々な成熟変化を受けるだけに, 個々の成熟変化と成熟因子との関連を知ること極めて難しいが, 少なくとも脂肪酸, ステロイド合成との関連の深いペントースサイクルが精巣上体頭部, 体部, 就中体部において極めて高い活性を有する事実は, 今後精巣上体機能を研究する上で興味ある知見と考える。

なお, 本論文の要旨は第6回アンドロロジー学会で報告した。

文 献

- 1) Hamilton, D. W.: The mammalian epididymis. In: Biology of Reproduction. H. Balin and St. Glasser (Eds.). Amsterdam: Excerpta Medica, 268, 1972.
- 2) Brooks, D. E. and S. J. Higgins: Characterisation and androgen dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. J. Reprod. Fertile., 59: 363, 1980
- 3) 有沢克夫, 中岡義明, 渡辺 仁: アフィニティークロマトグラフィーによるブタ精子のグルコース-6-リン酸脱水素酵素, 6-ホスフォグルコン酸脱水素酵素の分離, 日不妊誌, 42: 30, 1985.
- 4) 伊藤元博, 中岡義明, 渡辺 仁, 江川恵基, 天野久夫: ブタ精巣におけるペントースサイクルと解糖, 日不妊誌, 31: 22, 1986.
- 5) Brodelius, P., Larsson, P.-O. and Mosbach, K.: The synthesis of three AMP-analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2', 5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3', 5'-

bisphosphate and their applications as general ligands in biospecific affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.*, 47: 81, 1974.

- 6) Marison, M. B.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 284, 1976.
- 7) Hill, B. R. and Levi, C.: Elevation of a serum component in neoplastic disease. *Cancer Res.*, 14: 513, 1954.
- 8) Hill, B. R.: Some properties of serum lactic dehydrogenase. *Cancer Res.*, 16: 460, 1956.
- 9) Löhner, G. W. and Waller, H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In methods of enzymatic analysis. Vol. 2. Bergmeyer, H. U. ed., 636, Academic Press, New York, 1974.
- 10) Wolfson, Jr. S. K. and Ashman, H. G. W.: Isocitric and 6-phosphogluconic dehydrogenase in human blood serum. *Proc. Soc. Exper. Bio. Med.*, 96: 231, 1957.
- 11) Amann, R. P., Johnson, L., Thompson, Jr. D. L. and Pickett, B. W.: Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biol. Reprod.*, 15: 586, 1976.
- 12) Johnson, A. D. and Turner, P. C.: Epididymal carbohydrate metabolism- I. Glucose-1-¹⁴C and glucose-6-¹⁴C metabolism by mouse, rat and rabbit tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A: 599, 1971.
- 13) Kraft, L. A. and Johnson, A. D.: Epididymal carbohydrate metabolism-II. Substrates and pathway utilization of caput and cauda epididymal tissue from the rabbit, rat and mouse. *Comp. Biochem. Physiol.*, 42B: 451, 1972.
- 14) David, E. Brooks: Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. *Biochem. J.*, 156: 527, 1976.
- 15) Sholl, S. A. and Leatham, J. H.: Effects of postnatal maturation and castration on rat epididymal carbohydrate metabolism. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 142: 635, 1973.

Pentose phosphate cycle in the caput,

corpus and cauda epididymal tissue from the boar

Motohiro Ito and Ichiro Atobe

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

Hitoshi Watanabe and Hisao Amano

Department of Biochemistry,
Toho University,
School of Medicine

The epididymis plays the role of providing the sperm cell an environment through which it is transported and in which the cell becomes mature to the extent that it is able to fertilize ovum. While a great deal of effort has been devoted to epididymal histology and histochemistry and to the sperm maturation stages there appears to be very little research done concerning the cellular metabolism and the environment in which this entire process takes place.

This study was done to determine the activity of the pentose phosphate cycle in the caput, corpus and cauda epididymal tissue from the boar.

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

From the present study, the activity of G6P-DH was estimated as 374.4 ± 27.6 , $1,205.7 \pm 33.8$ and 126.5 ± 5.8 mU/ml/g for the caput, corpus and cauda, respectively.

At this point, it is not possible to state the relative role of the sperm cells and the tissue of the epididymis to the pentose phosphate cycle activity. But the results presented in this study suggests that the pentose cycle is utilized by the tissue or the sperm at some time during gamete maturation.

(受付: 昭和62年12月12日)

洗滌濃縮精子の凍結保存に関する研究

Cryopreservation of Washed and Concentrated Human Sperm by Percoll Density Gradient

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

翁 文 開 小林 俊 文 兼 子 智

Wun-Kai WON Toshifumi KOBAYASHI Satoru KANEKO

李 顕 銑 飯 塚 理 八

Hsien-Kung LEE Rihachi IIZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University, Tokyo, 160,

主に精子濃縮を目的とした単層 Percoll 法および運動良好精子を選択的に濃縮し得る攪拌密度勾配法を用いて洗滌濃縮した精子の凍結保存を試み、さらに精子蘇生率向上をはかるため洗滌濃縮精子に適合した KS-II 精子凍結保存液を創製するとともに凍結プログラムを新たに開発した。

洗滌濃縮精子に適した凍結プログラムを検討した結果、凍結における潜熱発生、植氷の有無は精子蘇生率に影響せず、5°C までは緩速 (1°C/分)、5°C 以下は急速 (-30°C/分) で凍結するプログラムが最も良好な精子蘇生率を与えた。

単層 Percoll 法では主に精子濃縮により、攪拌密度勾配法では精子濃縮ならびに運動率の向上により大幅な Fertility Index (FI, 精子濃度/ml X 精子運動率 (%) X 10⁻⁸) の改善が得られた。洗滌濃縮精子は原精液よりも凍結融解後の精子蘇生率が高く、特に攪拌密度勾配法を用いた場合には融解後の運動率は原精液を上回っていた。本研究において精子濃縮および高い精子蘇生率により凍結融解後においてもほぼ原精液に匹敵する FI が得られることが示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33 (3), 639-644, 1988)

結 言

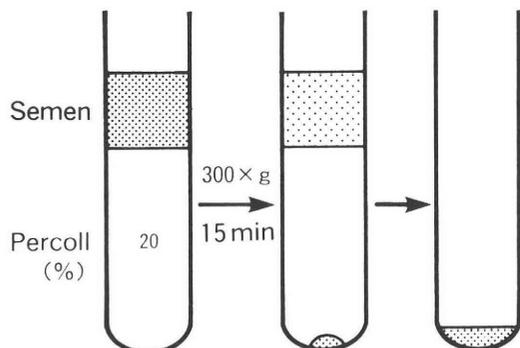
1958年、飯塚らが本邦初の凍結保存精液を用いた人工授精による分娩例を報告して以来、われわれは精子凍結保存法を非配偶者間人工授精 (artificial insemination with donor's semen, AID) に臨床応用してきた¹⁾。凍結精液を用いた AID の分娩例について詳細な follow up を行った結果、妊娠経過、流産率、児の発育等に異常を認めていない²⁾。また知的発育の指標として DQ, IQ を比較したところ一般の児童よりむしろ優れていた²⁾。これらの知見は凍結保存操作が精子妊孕性に影響しないことを示唆している。

一般にヒト精子の凍結保存は精液を卵黄、グリセリンを主体とする凍害防止剤 (精子保存液) と混和し、直接液体チッソに投入するか、プログラムフリ

ーザーを用いて凍結する^{3,4)}。本法による精子凍結は、保存液による希釈、凍結融解過程における精子運動率の低下から運動精子数が減少するため、その応用は主に良好精液を対象とする AID に限定されてきた。

近年、われわれは Ficoll, Percoll を密度勾配担体として用いた遠心分離法を精子の洗滌濃縮に応用し、精液性状不良症例の配偶者間人工授精 (artificial insemination with husband's semen, AIH) に臨床応用してきた^{5,6,7,8)}。精子濃縮は精子妊孕性向上の観点から凍結保存に供する精子の調製に有意義であると考えられる。本論文は AIH への精子凍結保存法の応用を目的として、主に精子濃縮を目的とした単層 Percoll 法⁸⁾および運動良好精子を選択的に濃縮し得る攪拌密度勾配法⁹⁾を用いて調製した精子の凍結保

A Mono-Layer Method



B Scheme of continuous-step density gradient

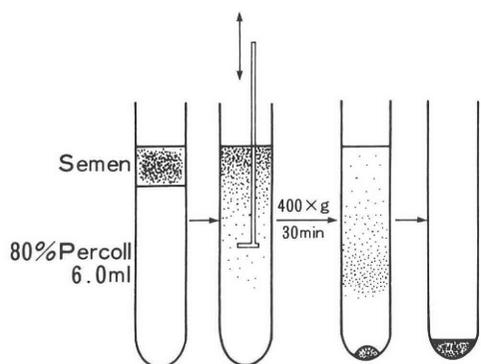


図1 単層Percoll法、攪拌密度勾配法による精子洗滌濃度の模式図

存を試み、精子蘇生率の向上をはかるため洗滌濃縮した精子に適した凍結保存液を創製するとともに凍結プログラムを新たに検討した。

方 法

精子調製法

精液は4日間禁欲後に用手的に採取し、約30分間室温で液化した。精子数はトーマ氏血球算定盤を用い、精子運動率は鏡検法により主観的に判定した。精子性状の評価は飯塚のFertility Index (FI)を指標とし、精子数/ml X 精子運動率 (%) X 10^{-8} から算出した。Percoll¹⁰⁾ (Pharmacia Fine, Chemicals,

表1 KS-II精子保存液の調製

溶液A	
Na Cl	5.8 g
K Cl	0.4 g
MgSO ₄	0.098 g
NaHPO ₄	0.108 g
NaHCO ₃	2.0 g
Tris	2.4 g
ショ糖	16.0 g
グリシン	10.0 g
乳酸 Ca	0.75 g
蒸留水 1000ml	
HCl で pH7.4に調製	
溶液A	600ml
グリセリン	150ml
卵黄	250ml
1000ml	

Uppsala, Sweden)はその9容に0.1M HEPES緩衝化1.5M NaCl, pH7.4, 1容を加えて等張化した後、0.01 M HEPES緩衝化Hanks液, pH7.4を用いて20%および80% Percoll液を調製した。調製したPercoll液にはヒト血清アルブミン(1.0mg/ml)と抗生物質を添加し、4°Cで保存した。

精子凍結保存に供する精液の洗滌濃縮には、単層Percoll法および攪拌密度勾配法を用いた。図1にこれらの方法の模式図を示した。単層Percoll法は20% Percoll液4.0mlに射精精液全量を層積し、シングアウトローターを用いて300xg, 15分間遠心分離した。密度勾配上に残留した精漿およびPercoll層を除去し、沈澱した精子を0.5mlに再懸濁した(図1A)。攪拌密度勾配法は80% Percoll 6.0mlに射精精子全量を層積した後、Percoll層の上半分と精液をL型攪拌棒を用いて数度攪拌し、連続密度勾配を作製した。シングアウトローターを用いて400Xg 30分遠心分離すると、運動良好精子は沈澱中に選択的に濃縮されるので、上層を捨て0.5mlに再懸濁した(図1B)。

精子凍結保存

精子冷凍保存には従来当教室で用いてきた卵黄、グリセリンを主体としたKS精子凍結保存液¹¹⁾を改良したKS-II保存液を用いた。KS-II保存液はより複雑な塩組成を採用するとともに緩衝剤としてTris-グリシン、精子代謝基質として乳酸を添加した。その組

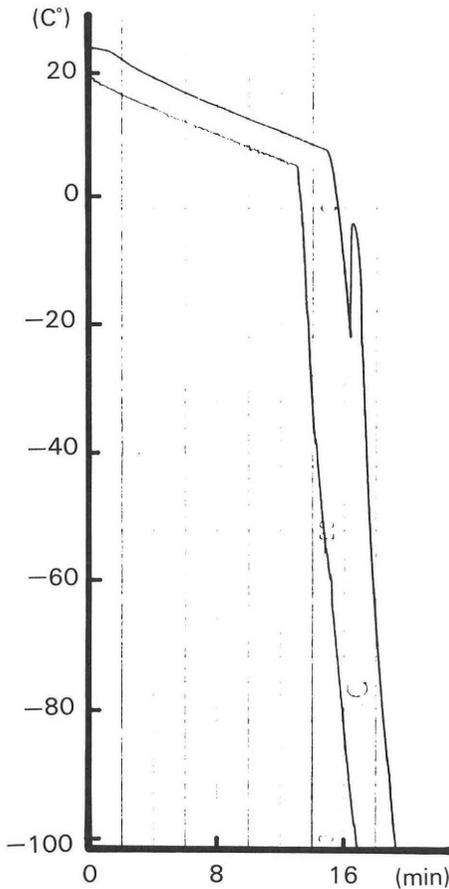


図 2 凍結プログラムおよび実際の凍結曲線

成を表 1 に示した。KS-II 保存液は調製した塩溶液にグリセリン、卵黄を添加した後 10,000 xg, 30 分間遠心分離して不溶物を除去し、 -40°C で凍結保存した。原精液または洗滌濃縮精子は等量の KS-II 保存液と混和した後 0.5ml プラスチックストローに充填し、ポリエチレングリコールパウダーで封入した。ストローはプログラムフリーザー (大阪酸素製) に装着し、室温から 5°C までは $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却し、 5°C から -80°C までは $-30^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で急速凍結を行った。試料温度が -80°C に達したら約 10 分間ホールドし、その後液体チッソに浸漬した。試料は 24 時間以上保存した後ストローを微温湯に投入して融解し、約 10 分間保温した後精子運動率を観察した。精子蘇生率 (%) は凍結融解後の運動率を原精液の運動率で除して求めた。

結 果

図 2 は凍結プログラムおよび実際の凍結曲線を示

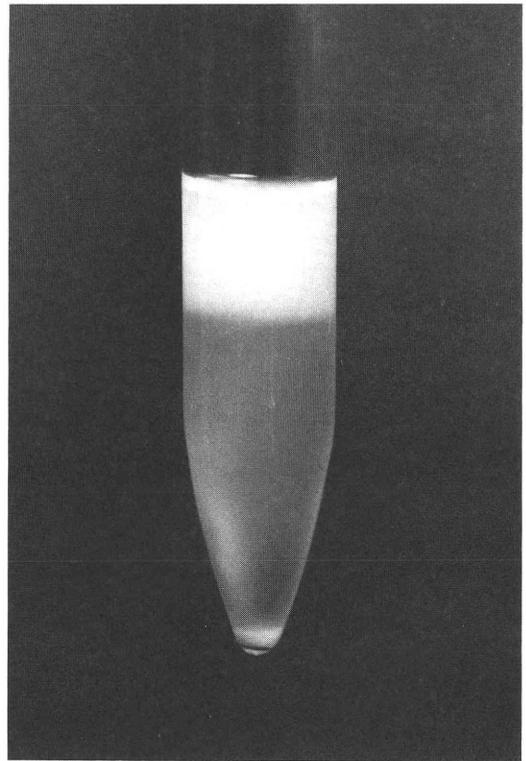


図 3 単層 Percoll 法による精子洗滌濃縮 (遠心分離後の状態)

している。種々のプログラムを作成して精子蘇生率に対する影響を検討した結果、凍結時の潜熱の発生は精子蘇生率にあまり影響せず、また精子凍結はできるだけ速い速度で行ったほうが蘇生率が高いことが明らかとなったので凍結速度は $-30^{\circ}\text{C}/\text{分}$ に設定した。

図 3 は単層 Percoll 法における遠心分離後の状態を示しており、精子は沈澱中に濃縮されている。種々の精液性状を有する精液標本 24 例に単層 Percoll 法を施行した結果、精子濃度は $44.8 \pm 23.8 \times 10^6/\text{ml}$ から $93.5 \pm 30.7 \times 10^6/\text{ml}$ に濃縮され、運動率も $52.7 \pm 27.5\%$ から $67.1 \pm 26.8\%$ に向上した。その結果 F I は 28.6 ± 17.2 から 61.7 ± 25.7 へ顕著に改善された (表 2)。原精液に KS-II 保存液を等量混合して凍結保存した結果、融解後の運動率は $30.2 \pm 21.2\%$ (精子蘇生率 $74 \pm 44\%$) であったが、凍結保存液による希釈のため F I は 10.5 ± 9.0 と大きく低下した。一方単層 Percoll 法により濃縮した精子を同様に凍結保存した場合には融解後の運動率は $39.4 \pm 23.0\%$ (精子蘇生率 $85 \pm 31\%$) であったが、精子濃縮の効果により F I の低下は補償され、F I は $23.8 \pm$

表2 単層 Percoll 法、攪拌密度勾配法による精子洗浄濃縮とその凍結保存

	原 精 液		洗滌濃縮精子		凍結融解後運動率(%)	
	精子数 ($\times 10^6$)	運動率 (%)	精子数 ($\times 10^6$)	運動率 (%)	原 精 液	洗滌濃縮精子
単層 Percoll法 n=24	44.8 \pm 23.8 (28.6 \pm 17.2)	52.7 \pm 27.5	93.5 \pm 30.7 (61.7 \pm 25.7)	67.1 \pm 26.8	30.3 \pm 21.2 (10.5 \pm 9.0)	39.4 \pm 23.0 (23.8 \pm 13.4)
攪拌密度 勾配法 n=23	56.3 \pm 19.5 (31.5 \pm 21.3)	64.7 \pm 14.5	98.3 \pm 23.9 (81.2 \pm 27.6)	85.0 \pm 7.10	42.8 \pm 15.9 (8.25 \pm 5.4)	70.7 \pm 10.3 (28.3 \pm 18.3)

平均 \pm S.D.

() 内はFertility Indexを示す。

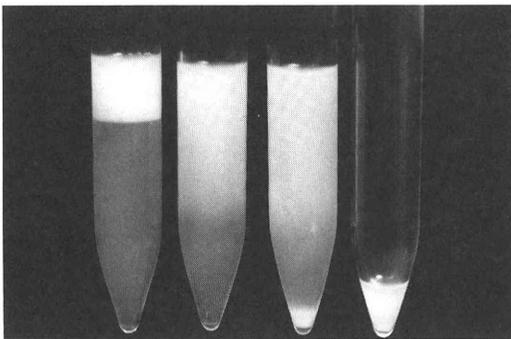


図4 攪拌密度勾配における運動良好精子の選択的濃縮
左から精液を層積、精液とPercoll層を攪拌、遠心分離後
(運動良好精子は沈澱中に濃縮されている)、Percoll層
を除去して精子を再懸濁した状態を示している。

13.4と原精液にほぼ匹敵する値が得られた(表2)。

図4は攪拌密度勾配法における遠心分離前後の状態を示している。運動良好精子は沈澱中に濃縮されており、非運動精子、未成熟精子、他の細胞成分等はPercoll密度勾配上層に残留している。23精液標本に本法による洗浄濃縮を施行した結果、精液性状は56.4 \pm 7.3 \pm 19.5 X 10⁶/ml, 64.7 \pm 14.5%(原精液)から98.3 \pm 23.9 X 10⁶/ml, 85.0 \pm 7.10%(洗滌濃縮精子)へと改善され、特に運動率の向上が顕著であった。FIは31.5 \pm 21.3から81.2 \pm 27.6に向上した。

原精液を凍結、融解した際の運動率は42.8 \pm 15.9%(精子蘇生率62 \pm 16%)であったが、攪拌密度勾配法を用いて調製した運動良好精子は凍結、融解後も70.7 \pm 18.3%と高い運動率を示し、精子蘇生率は107 \pm 27%と、精子性状はむしろ原精液より良好であった。融解後のFI(28.3 \pm 18.3)は精子濃縮、運

動率向上の効果により原精液をそのまま凍結した場合(8.25 \pm 5.4)と比べて大幅な改善が認められ、原精液のFIにほぼ匹敵した。

以上の結果から精子凍結保存に際し、あらかじめ精液を洗滌濃縮することは精子妊孕性向上に極めて有用であると考えられる。

考 察

従来精子凍結保存は、AIDにおいて被授精者に合致する新鮮Donnor精液を毎常用意できない場合における精液備蓄の観点から臨床応用されてきたが、同時に本法による精子凍結は保存液による希釈、凍結融解過程における精子妊孕性の低下などにより、その応用が良好精液を対象とするAIDに限られていた。精液性状が不良な症例を対象とするAIHにおいても凍結保存は臨床上重要な意義を持っている。冷凍精液の妊孕性向上を図るには、1. 精子をあらかじめ濃縮して保存液添加による精子濃度低下を補償する、2. より高い蘇生率を得るため、洗滌濃縮精子に適した保存液を創製する、3. 至適な凍結プログラムを作成する、などの方策が考えられるので、本研究ではこの3点について検討を行った。

Percollはコロイド状シリカゲルであり、密度1.13g/mlまで浸透圧を増すことなく任意の密度を調製し得¹⁰⁾、細胞の育成性¹²⁾、精子妊孕性¹³⁾、に影響しないことが報告されている。われわれは主に精子減少症を対象として人工授精に供する精子の調製に単層Percoll精子洗滌濃縮法を臨床応用してきた⁹⁾。これまでに35例の妊娠、分娩に成功しているが、児に異常を認めず¹⁴⁾、Percollの精子への応用は安全と考えられる。精子は成熟の過程で細胞質を失って密度が増加し、未成熟精子では1.09g/ml以下であるのに対して成熟精子では1.11~1.12g/mlに達する¹⁵⁾。成熟した運動良好精子の選択的濃縮を目的として4段

の不連続 Percoll 密度勾配 (1.07~1.10 g/ml) を開発した⁷⁾。本法を基礎的検討ならびに人工授精に応用し、11例の分娩例を得ている¹⁴⁾。臨床応用を行う際に不連続密度勾配の作製は複雑であることから、操作の簡便化を図るため密度1.10 g/mlに相当する80% Percollに直接精液を層積しL型攪拌棒を用いて連続密度勾配を作成する攪拌密度勾配法を新たに開発した⁹⁾。本法は表2に示したように精子濃縮と同時に運動率の向上が認められ、大幅なFIの改善が得られる。本研究においては新たに洗浄濃縮精子の凍結保存に適したKS-II保存液を創製した。修正 Earle 液に緩衝剤として Tris, グリシン, 凍害防止剤として卵黄, グリセリンおよび精子保護作用を有する2糖類であるショ糖を添加し、代謝基質として乳酸を用いた。近年、精子の凍結にはプログラムフリーザーが繁用されるようになり種々の精子凍結プログラムが報告されてきたが、本研究では精液ではなく洗浄濃縮精子を凍結するためにKS-II保存液を新たに創製するとともに、最適な凍結条件を見いだすため凍結プログラムを検討した。凍結速度、潜熱の発生、植水の必要性について検討を行った結果、凍結時潜熱の発生および植水操作有無はほとんど精子蘇生率に影響しないことが明らかとなり、また5℃までは緩速(1℃/分)、5℃以下は急速(-30℃/分)に凍結した場合に最も良好な精子蘇生率が得られた。

単層 Percoll 法または攪拌密度勾配法を用いて精子を洗浄濃縮を行ったところ、表2に示したように単層 Percoll 法では主に精子濃縮により、攪拌密度勾配法では精子濃縮と運動率向上の効果により大幅なFIの改善が得られ、保存液添加による精子濃度低下を補償できた。KS-II保存液は良好な精子蘇生率を与え、特に選択的に濃縮した運動良好精子の場合は融解後においても運動率は原精液のそれを上まわっていた。これらの結果は、あらかじめ精子を濃縮することにより凍結保存の過程における精子妊孕性の低下を十分に補償し得ることが示唆された。

本研究において得られた成果は、従来AIDに限定されてきた精子凍結保存法の応用が精液性状不良な症例を対象とするAIHにも応用しうることを示しており、AIH施行上1. 夫が必ずしも排卵日に来院する必要がない、2. 精子減少症等において数回分の射精精液を凍結備蓄することにより十分な精子数が得られる、3. 1排卵周期に数回採精が可能なことから排卵推定日周辺における頻回授精を施行できる。

文 献

- 1) 飯塚理八, 小林俊文: ヒト精子凍結保存と人工授精への応用. 現代産婦人科学大系, 年間追補, P 45, 中山書店, 1979-B
- 2) Mochimaru, F.: Artificial insemination with frozen donor semen; Its current status and follow-up studies. Keio J. Med. 28: 33, 1979
- 3) Matheson, G. W., Carlborg, L. and Gemzell, C.: Frozen human semen for artificial insemination. Am. J. Obstet. Gynecol. 104: 495, 1969
- 4) Mahadevan, M. and Trounson, A. O.: Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions of preservation of human spermatozoa. Andrologia 16: 52, 1984
- 5) 兼子 智, 森脇千秋, 佐藤博久, 小林俊文, 飯塚理八: ヒト精子の客観的運動能解析法の開発—特に Ficoll 溶液を用いた洗浄精子について. 不妊誌, 25: 491, 1980
- 6) 兼子 智, 小林俊文, 真田利男, 飯塚理八: Ficoll 密度勾配遠心分離法を用いた精子妊孕性改善法の AIH への応用. 家畜人工授精誌, 4: 101, 1982
- 7) 兼子 智, 小埜 清, 小林俊文, 飯塚理八: 体外授精に供する精子の調製について. 受精着床 83, P 51, 学会出版センター, 1984
- 8) 小埜 清: 人工受精, 体外受精に供する精子調製法に関する研究. 慶応医学, 62: 3351, 1985
- 9) Kaneko, S., Sato, H., Kobanawa, K., Kobayashi, T. and Iizuka, R.: The simplified procedure, a continuous step density gradient, for the selective concentration of progressively motile sperm. Develop. Growth and Differ., 28 (Supplement): 45, 1986
- 10) Pertoft, H., Hirtensstein, M. and Kagedal, L.: Cell separations in a new density gradient medium, Percoll. In Cell populations, Methodological Surveys (B) Biochemistry. Vol 9, p 67, Ellis Horwoods Ltd, 1979
- 11) 真井徳幸: スロー法によるヒト精子凍結保存の研究. 日不妊誌, 26: 132, 1981
- 12) Krunick, J. T., Gronvick, K. O. and Kimura, A. K.: Long term growth in vitro of human T-cell blasts with maintenance of specificity and function. J. Immunol. 122: 1255, 1979
- 13) Hyne, R. H., Stojanoff, A. and Clarkgen, G. N.: Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation. Fertil. Steril., 45: 93, 1986
- 14) 飯塚理八, 兼子 智, 小埜 清, 小林俊文: 人工受精への Percoll 精子洗浄濃縮法の応用, およびその分娩例の検討. 産婦人科の実際, 印刷中
- 15) Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T., Mohri, H. and Iizuka, R.: Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedi-

mentation in Percoll density gradient. *Biomed. Res.*, 5: 187, 1984

**Cryopreservation of washed
and concentrated human
sperm by Percoll
density gradients**

Wun-Kai Won, Toshifumi Kobayashi,
Satoru Kaneko, Hsien-Kung Lee,
and Rihachi Iizuka

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

Cryopreservation of human semen usually accom-
pany the quantitative (dilution with a cryo-medium)

and qualitative (some damages during freeze-thaw processes) deteriorations. To get higher fertilizeability in the frozen-thawed semen, it would be very effective to concentrate the sperm from whole ejaculate prior freezing as well as to achieve better survival rate.

Human semen were washed and concentrated sperm by means of Percoll density gradients; mono-layer Percoll method was mainly focused on the concentration of sperm and the continuous-step density gradient in Percoll isolated the mature sperm with good motility. Then they were cryopreserved using a biological freezer (room temp. to 5°C; -1°C/min, -5°C to -80°C; -30°C/min) with a new developed cryo-medium (KS-II medium). Sperm concentration prior freezing and higher survival rates prevented the decrease in the quality of thawed semen.

(受付: 昭和 63 年 3 月 3 日特掲)

Migration-Gravity Sedimentation Method を利用した 運動精子回収法, 及び同法の A I H への応用

AIH Using the Sperm Collected by the "Migration-Gravity Sedimentation" Method

京都大学医学部婦人科学産科学教室

辰 巳 賢 一 Kenichi TATSUMI	野 田 洋 一 Yoichi NODA	松 本 央 Hisashi MATSUMOTO
馬 岡 陽 Yoh UMAOKA	矢 野 樹 理 Juri YANO	福 田 愛 作 Aisaku FUKUDA
江 見 信 之 Nobuyuki EMI	高 井 一 郎 Ichiro TAKAI	泰 井 俊 造 Shunzo TAI
	神 崎 秀 陽 Hideharu KANZAKI	森 崇 英 Takahide MORI

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

昭和 60 年初～昭和 61 年末の間教室では精液を無処理で子宮に注入する A I H を行っていた。しかしこの間の A I H による妊娠率は治療周期あたり 2% という低値であり、その原因の一つとして注入精液の調整法に問題があると考えられた。そこで A I H の際、遠沈操作を用いない運動精子回収法である migration-gravity sedimentation method (MS 法) による精液調整を行い、その効果を検討した。昭和 62 年 1 月末より 2 カ月間に当科で施行した A I H 57 回の精液調整をすべて MS 法により行った。この間の MS 法による平均運動精子回収率は 39.8%、回収した精子浮遊液の精子運動率は 92.9% であり、また乏精子症の精液からもほぼ同率の運動精子回収が可能であった。これらの精子浮遊液を子宮腔上部に注入する A I H により 57 周期中 3 周期に妊娠例を得た。(妊娠率 5%) A I H の際、精液調整に MS 法を用いることにより妊娠率が向上した事からみて、MS 法は A I H の精液調整法として有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 645-650, 1988)

緒 言

我々の教室では昭和 60 年初～昭和 61 年末の間、配偶者人工受精 (A I H) を行う際に精液を無処理で子宮腔に注入する方法をとってきた。しかしこの 2 年間の京大病院妊孕外来における A I H による妊娠率は、患者あたり 5%、治療周期あたり 2% という低値であった。精液中の精漿は受精を阻害することが報告されており¹⁾、また本来子宮に入らない精漿を子宮腔に注入するのは非生理的である。Wiltbank

ら²⁾は精液を洗浄し精漿を取り除いた精子を用いて A I H を行う事により、また Kerin ら³⁾は layering method を用い精液より精漿を除去し回収した運動性良好精子を子宮腔上部に注入する A I H を行うことにより高い妊娠率を得た。しかし精子洗浄も layering method も精子浮遊液を調整する段階で遠沈操作を必要とする。遠沈操作は sperm にダメージをあたえ精子の受精能を阻害する可能性がある⁴⁾。1983 年 Tea らは、migration-gravity sedimentation phenomenon を利用した運動精子回収器を開発し、精液より遠沈

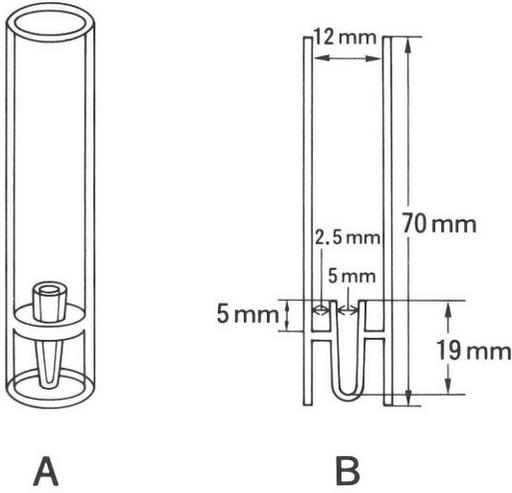


図1 MS管

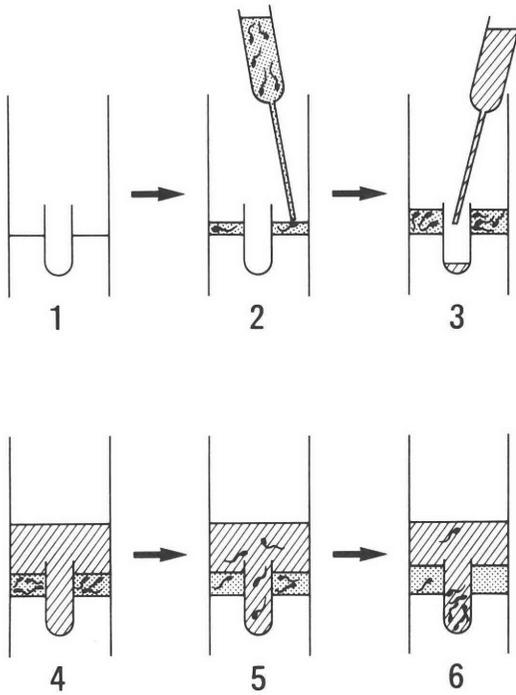


図2 migration-gravity sedimentation method
点描部は精液、斜線部は培養液を示す。

操作を加えること無く精漿を取り除き、運動精子のみを高率に回収することに成功した (MS法)⁵⁾。今回我々は、この精子回収器をA I Hの精子調整に用いその有用性について検討した。

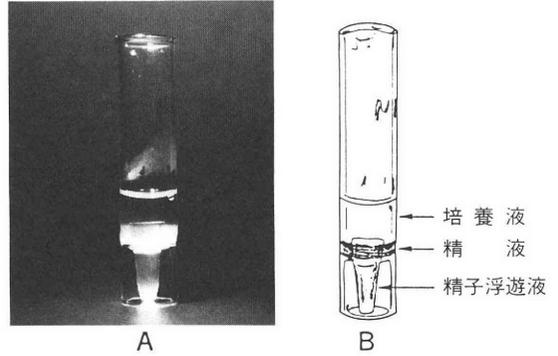


図3 運動精子回収直前のMS管。内管底に運動精子が集まっている。

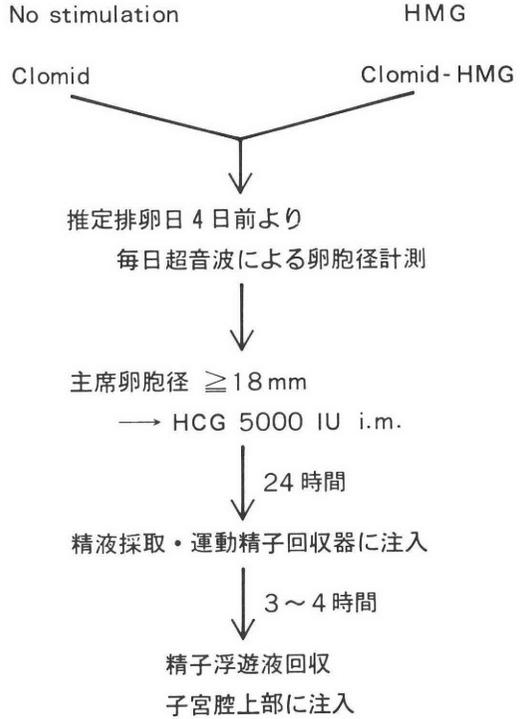


図4 今回行ったAIHのプロトコール

対象および方法

MS法に用いる精子回収器 (MS管) は Tea らの文献⁵⁾をもとにして作成した。その構造は、図1 Aに示す様に円筒型をしたガラス管 (外管) の中に小ガラス円錐 (内管) を逆さに組み込んだものであり図1 Bにその断面図を示す。MS法による精子回収法を図2に示す。まず内管の外側と外管の内側の間の

溝に精液を0.3ml注入する。(図2-2)精液は内管の上縁より1-2mm下まで達する。次にHam's F-10溶液を1.5ml内管の底から注入し、精液上に重層する。(図2-3~4)。これを37°C、5% CO₂の条件下で培養すると、精液中から精子が内壁を越えて(migration) (図2-5)内管の底に集まる(gravity sedimentation) (図2-6)。数時間後に内管の底から運動精子浮遊液を回収する。図3に精子回収直前のMS管の写真を示す。

MS法の至適精子培養時間を検討するために、各培養時間の運動精子回収率を計測した。妊孕性のある6名の健康男子より用手法にて精液を採取し、Maklar chamberにより精子数、運動率、奇形率を計測した後、1検体あたり7本のMS管の精液注入溝に精液0.3mlずつ分注、Ham's F-10溶液を加えて培養を開始し、1、2、3、4、6、8、10時間後に各検体あたり1本ずつのMS管を培養器より取り出し、内管底、および上清より0.1mlずつの精子浮遊液を回収し運動精子回収率(回収した精子浮遊液中の運動精子総数/注入した精液中の運動精子総数)を計算した。

次に昭和62年1月28日より3月20日の間に当科妊孕外来にて行われたA I H 57回の精液調整をすべてMS法にて行った。A I Hのプロトコールは図4の様に、排卵推定日の4日前より連日経膈超音波断層装置(横河, RT-3000)を用いて卵胞径の計測をおこない、主席卵胞径が18mmに達した日に原則としてhCG 5000単位を筋注、その24時間後に夫より用手法にて精液採取、液化させた後その1.2mlを4本のMS管に分注し、MS法にて3-4時間の培養の

後、内管の底より精子浮遊液を1MS管あたり0.1mlずつ計0.4ml回収し、その運動精子回収率を計算した後、Kerinら³⁾の方法に従い子宮腔上部にトムキャットカテーテルを用いて精子浮遊液を注入した。

結果

1. MS法による運動精子回収率の経時的变化

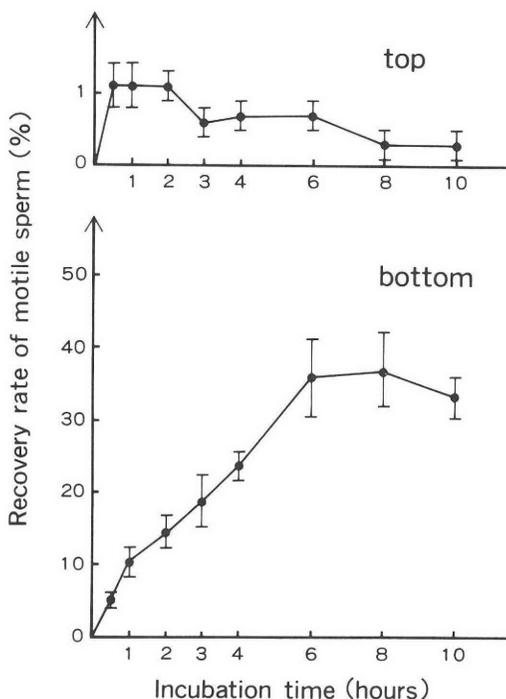


図5 MS法による運動精子回収率の経時的变化

表1 原精液精子濃度と運動精子回収率

原精液精子濃度	運動精子回収率 (%)	回収精子運動率 (%)
≥40×10 ⁶ /ml n=36	41.8±7.8	97.1±1.0
10×10 ⁶ ~40×10 ⁶ /ml n=12	36.5±9.2	85.8±6.9
<10×10 ⁶ /ml n=9	36.1±13.3	85.6±7.5

All values are mean ± SE

表2 原精液精子運動率と運動精子回収率

原精液精子運動率	運動精子回収率 (%)	回収精子運動率 (%)
≥40% n=40	40.0±6.9	96.0±1.6
<40% n=17	39.3±9.6	85.6±5.5

All values are mean ± SE

表3 今回のAIHによる妊娠例

症 例	1	2	3
年 齢	30 歳	29 歳	31 歳
不 妊 期 間	5 年	6 年	6 年
過去AIH回数	8 回	6 回	2 回
不 妊 原 因	不 明	不 明	男 性 因 子
誘 発 法	Clomid + HMG Natural surge	Clomid + HMG Natural surge	Clomid + HMG HCG
原精液			
濃 度	$100 \times 10^6/\text{ml}$	$80 \times 10^6/\text{ml}$	$43 \times 10^6/\text{ml}$
運 動 率	80 %	60 %	86 %
回収精液			
濃 度	$65 \times 10^6/\text{ml}$	$20 \times 10^6/\text{ml}$	$22 \times 10^6/\text{ml}$
運 動 率	100 %	100 %	100 %
注 入 量	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
経 過	正 常 分 娩	胞 状 奇 胎	流 産

6例の健常精液の運動精子回収率の経時的変化を図5に示す。bottomは内管の底からの回収率、topは外管の培養液上清より回収した精子の回収率を示す。内管底からの運動精子回収率は培養開始6時間目まで時間と共に増加し約36%に達した後プラトーとなった。一方上清中の運動精子回収率は、いずれの時間も1%前後でありMS法では、運動精子の大部分は内管の底に集まることが明らかとなった。なお回収精子の運動率はいずれの時間も90%以上であった。

2. 不妊患者夫精液よりのMS法による運動精子回収

当科妊孕外来通院患者夫44名57例の精液よりのMS法による運動精子回収率は、全症例を平均すると39.8%、回収精子の運動率は92.9%であった。表1に示すように原精液濃度が4000万/ml以上、1000万-4000万/ml、1000万/ml以下の場合運動精子回収率はそれぞれ41.8%、36.5%、36.1%であり、回収精子の運動率はそれぞれ97.0%、85.8%、85.6%と何れの場合にも回収率、回収精子の運動率には有意差を認めなかった。また表2に示すように原精子運動率が、40%以上、40%未満の場合運動精子回収率は40.0%、39.3%であり、回収精子の運動率はそれぞれ96.0%、85.6%と両者の間で運動精子回収率、回収精子運動率に有意差を認めなかった。

次に44名57周期にMS法を用いたA I Hを行った。患者の平均年齢は33.5歳、平均不妊期間6.1年、平均過去A I H回数4.9回、A I Hの適応は男性因

子19名、原因不明不妊18名、子宮内膜症5名、排卵障害2名であった。

妊娠は3例でA I H周期あたり5%、その内訳は正常妊娠1例、胞状奇胎1例、流産1例であった。その詳細を表3に示す。なお表中、第1例、第2例の誘発法のnatural surgeというのは、患者の都合等でhCG投与せずにA I Hを行ったことを意味する。

考 案

われわれはA I Hを行う際にBBTおよび尿中エストロゲン測定により推定した排卵日に精液0.3-0.6mlを無処理で子宮内に注入するA I Hを行ってきた。しかし昭和61年初-昭和62年末までの当科におけるA I Hによる妊娠率はA I H治療周期あたり2%、患者あたり5%という低値であった。A I H成功の要因は、精液の調整法と、A I Hを行うタイミングと考えられる。精液の調整法としては、一般には我々と同様に精液そのものを子宮頸管、または子宮腔内⁴⁾に注入することが多い⁶⁾。しかし精液中の精漿が受精を阻害する事が知られており¹⁾、また精漿は感染源ともなり得る事から精漿を除去するために、精子洗浄^{1,7)}が、また精漿の除去のみならず運動良好精子を多く回収する目的でアルブミンカラム法⁸⁾、Percoll法^{4,9)}、layering法^{3,10)}等が考案され、これらの方法を用いたA I Hの高い妊娠率が報告されている。しかしこれらの方法は遠沈操作を加える必要があり、精子に対してダメージを与え⁴⁾精子の受精能を阻害する可能性がある。そこで我々は、遠沈操作を加えることなく

精液より運動精子のみを高率に回収できるMS法に注目した。われわれ0.3mlの精液から0.1mlの精子浮遊液を回収することにより平均39.8%の運動回収率を得たが、Teaらは0.2mlの精液から0.2mlの精子浮遊液を回収することにより平均57%の運動精子回収率を得たとしており⁹⁾、これらの値はlayering法による運動精子回収率59.3-97.6% (星ら)¹⁰⁾、58% (Harrisら)¹¹⁾に匹敵する値である。またMS法により、表1、表2に示すように乏精子症、精子無力症の患者の精液からも平均36%以上の運動精子回収率を得た事から見て、MS法は精液所見の悪い例にも期待できる方法と考えられた。ただ症例数の少ないこともあり今回のAIHの妊娠例の中には精液所見の悪い例は含まれていなかった。我々は現在MS管の容量を増加させ、一度に全精液を処理し回収運動精子数を増加させたり、培養液に様々な物質を添加して更に良い回収率が得られるよう工夫している。

今回のAIHの成績はこれまでの当科のAIHの成績より向上したもののなお低い妊娠率しか得られなかった。この原因としては精子回収法そのもの自身よりAIHを行うタイミングに問題があったと考えられる。今回のプロトコールでは原則としてhCGを投与して排卵を誘発した。しかし妊娠に至った症例の2例までは患者の都合でhCGを投与せずに推定排卵日にAIHを行ったものである。我々は外来の時間制約があるためhCG投与時刻の約28時間後にAIHを行ったが、理想的にはhCG投与とAIHとの間隔は36時間程度にすべきと考えられる。もう一つの問題としてhCGを投与した40症例のうち9例にAIH翌日になっても卵胞が破裂しない症例があり、hCGにより排卵させるよりKerinら⁹⁾の様に血中又は尿中LHをモニターし内因性LHサージを検出した翌日にAIHをした方が良いのではないかと考えている。

今回のAIHの成績は未だ満足出来るものでは無かったが、MS法は遠沈操作を必要とせずに高率に運動精子を回収できる画期的な精子回収法であり、今後の改良次第で不妊治療の大きな助けとなる可能性があると考えられた。

MS法およびAIHに関し御助言を頂いた、South Australia, Adelaide 大学産婦人科 Colin Matthews 教授並びに同教室の諸先生方に深謝致します。

なお本論文の要旨は第6回日本アンドロロジー学会および第5回日本受精着床学会にて発表した。

文 献

1) Kanwar, K. C., Yanagimachi, R. and Lopata,

A.: Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 31: 321, 1979.

- 2) Wiltbank, M. C., Kosasa, T. S. and Rogers, B. J.: Treatment of infertile patients by intrauterine insemination of washed spermatozoa. *Andrologia* 17: 22, 1985.
- 3) Kerin, J. F. P., Peek, J., Warnes, G. M., Kirby, C., Jeffrey, R., Matthews, C. D. and Cox, L. W.: Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. *Lancet* 1: 553, 1984.
- 4) Lessley, B. A. and Garner, D. L.: Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Res.* 7: 49, 1983.
- 5) Tea N. T., Jondet M. and Sholler R.: A "migration-gravity sedimentation" method for collecting human motile spermatozoa. *Pathol. Biol. (France)* 31/8: 688, 1983.
- 6) 小林俊文, 藤田健一: 人工授精の実際, 周期産期医学, 10/9: 13, 1980.
- 7) Marrs, R. P., Vargyas, J. M., Saito, H., Gibbons, W. E., Berger, T. and Mishell, D. R.: Clinical applications of techniques used in human in vitro fertilization research. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146: 477, 1983.
- 8) Glass, R. H. and Ericsson, R. J.: Intrauterine insemination of isolated motile sperm. *Fertil. Steril.* 29: 535, 1978.
- 9) 兼子 智, 小堀 清, 小林俊文, 飯塚理八: 体外受精に供する精子の調整について, 受精, 着床, 83: P 51, 学会出版センター, 1984.
- 10) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 齊藤 晃, 鈴木雅州, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行っている精液静置法 "layering method" による精液中からの良好精子の分離, 日不妊会誌, 28: 101, 1983.
- 11) Harris, S. J., Milligan, M. P., Masson, G. M. and Dennis, K. J.: Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). *Fertil. Steril.* 36: 219, 1981.

AIH using the sperm collected by the "migration-gravity sedimentation" method

Kenichi Tatsumi, Yoichi Noda,
Hisashi Matsumoto, Yoh Umaoka,
Juri Yano, Aisaku Fukuda,
Nobuyuki Emi, Ichiro Takai,
Shunzo Taii, Hideharu Kanzaki

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

The pregnancy rate of artificial insemination with husband's semen (AIH) in the infertility clinic of Kyoto University Hospital has been relatively low (only 2% per cycle in a period between Jan. 1985 and Dec. 1986). To improve this pregnancy rate, a new sperm preparation technique using a double concentric sperm collecting tube (MS tube) was introduced. MS tube was developed by Tea et al as an apparatus for collecting motile sperm from ejaculated semen by the "migration-gravity sedimentation" phenomenon without centrifugation step (MS method). In the present study, the usefulness of the MS method as sperm preparation technique for AIH was evaluated.

Semen sample was obtained from the husband of 57 infertile couples on the day of ovulation. After liquified for 30 min, the semen sample was subject-

ed to routine analysis, and deposited into the outer tube of the MS tube. The semen layer was then overlaid with Ham's F-10 medium, and incubated at 37°C under an atmosphere at 5% CO₂/95% air. Three hours later the motile sperm suspension was recovered from the bottom of internal conical tube, analyzed, and inseminated into the uterine cavity.

The mean recovery rate of the motile sperm from the ejaculated semen by the MS method was 39.8%, and the mean motility of the recovered sperm was 92.9%. Almost the same recovery rates were obtained from oligozoospermic (sperm concentration 10×10^6) or asthenozoospermic (motility <math>< 40\%</math>) semen samples (36.1% and 39.3% respectively). Three pregnancies including one abortion and one hydatidiform mole were established following the 57 inseminations. (pregnancy rate: 5%)

The improvement of pregnancy rate shows the usefulness of MS method as the sperm preparation technique for AIH.

(受付:昭和63年3月7日特掲)

精細管内 Androgen 濃度の研究第2報

Study on Intratubular Androgen Levels, Report 2

岡山大学医学部泌尿器科 (主任: 大森弘之教授)

大橋 輝久 入江 伸 大橋 洋三
Teruhisa OHASHI Shin IRIE Yozo OHASHI
古川 雅人 山下 良孝 永井 敦
Masato FURUKAWA Yoshitaka YAMASHITA Atushi NAGAI
大森 弘之
Hiroyuki OHMORI

Department of Urology,
Okayama University Medical School
(Director: Prof. Hiroyuki Ohmori)

前立腺癌 15 例, 精巣静脈瘤 13 例, 男子不妊症 57 例より得られた精巣を用いて, 精巣内, 精細管内 testosterone (T) および 5α -dihydrotestosterone (DHT) 濃度, さらに一部症例に精細管内 DHT 結合蛋白 (DHT-BP) および androgen receptor (AR) を検討し, 以下の如き結果を得た.

- 1) 精巣内 T と精細管内 T との間に軽度の相関性 ($r = 0.56$) が得られ, 精細管内 T は leydig 細胞より分泌される内因性 T の影響を受けることが判明した.
- 2) 精細管内 T, DHT とともに精細管壁の厚さとの間に密接な関連性は認められなかった.
- 3) LH-RH analogue 投与により精巣内および精細管内 androgen 濃度は著明に低下し, また AR も測定感度以下であったが, DHT-BP は認められたことより, DHT-BP 即ち androgen binding protein は血流中の testosterone-estrogen binding globulin と同様, 精細管内における carrier protein であることが示唆された.
- 4) 精巣摘除術で得られた 16 精巣において AR を検討したが, 粗核内 AR の方が細胞質内に比較して多く認められた.

以上より, 精細管内 androgen および AR がヒト精子形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 651-656, 1988)

緒言

著者らは前報¹⁾において精細管内 androgen 濃度の測定法を確立し, spermatogenesis との関連性について検討した. 今回は精巣内 androgen 濃度, 精細管内 5α -dihydrotestosterone 結合蛋白 (DHT-BP) および androgen receptor (AR) との関連性を中心に検討したので報告する.

対象ならびに方法

1. 対象

対象は前立腺癌 15 例, 精巣静脈瘤 13 例および先天性精管欠損を含む男子不妊症例 57 例の計 85 例である.

2. 方法

1) 採取および処理方法

精巣生検あるいは精巣摘除術で採取した精巣組織を一部はブアン液で固定, 顕微鏡用とし, 残りを精

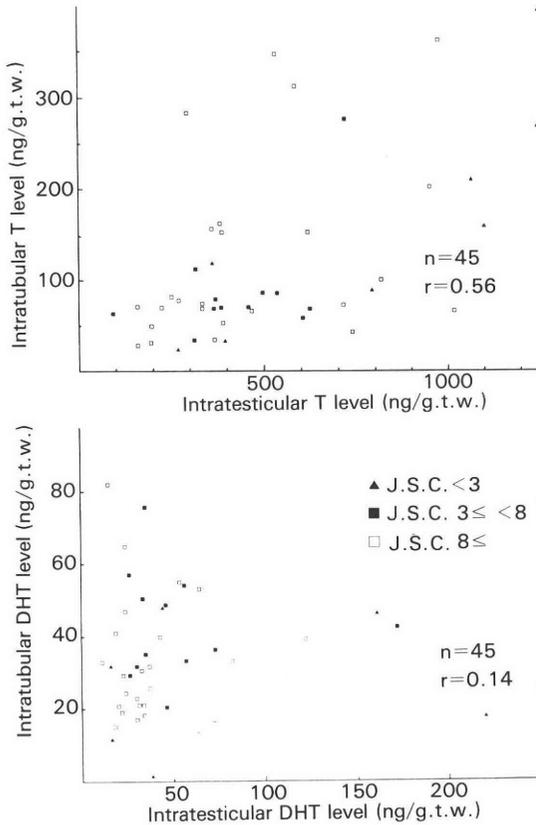


Fig. 1 Correlation between intratubular and intratesticular androgen levels

巢内 androgen 濃度測定用および精細管分離を行い、精細管内 androgen 濃度測定用に供した。なお精巣摘除術例では精細管内 DHT-BP および A R を測定した。

精巣採取後直ちに穂坂ら²⁾の報告した collagenase および mesh No. 100 を用いた two step incubation system により精細管を分離し、直ちに測定に供さない場合は -80°C のフリーザーで保存した。

2) 測定方法

(1) 精細管内 T, DHT (intratubular T, DHT) および精巣内 T, DHT (intratesticular T, DHT)

精巣および分離精細管をソニケーターにて破碎し、既報で述べた R I A 法¹⁾にて測定した。

(2) 精細管内 DHT binding protein (DHT-BP) および A R

分離精細管を TEDGM. buffer を加えてホモゲナイズし、 4°C 、800g、20 分間遠沈し、さらに上清を 4°C 、105,000g、60 分間遠沈後 0.25% dextran coated charcoal (DCC) 処理したものを精細管内あるいは

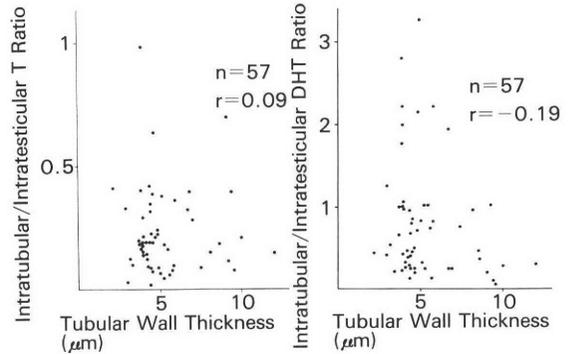


Fig.2 Correlation between intratubular/intratesticular androgen ratio and tubular wall thickness

cytosol 分画とした。また前述 800g にて遠沈後の pellet を洗滌し、TEDGK buffer を加えてホモゲナイズし、 4°C 、105,000g、60 分間遠沈後の上清を D C C 処理したものを crude nuclear extract 分画とした。

cytosol, crude nuclear extract を各々、 ^3H -DHT, ^3H -methyltrienolone (^3H -R1881) を legand とし、既に前立腺で報告した D C C 法を用いた exchange assay^{3,4)}にて DHT-BP および A R を測定し、scatchard plot analysis にて解離定数 (K d) および最大結合部位数 (Bmax) を求めた。

成 績

1. 精細管内および精巣内 androgen 濃度の関連性 (Fig. 1)

精細管内 T と精巣内 T および精細管内 DHT と精巣内 DHT との関連性を 45 例において検討したが、各々相関係数 $r = 0.56, 0.14$ であった。このことは T に関し、軽度の相関を認めることより精細管内 T が内因性 T の影響をある程度受けることが示唆された。

なお T, DHT とともに精子形成障害すなわち mean germinal epithelium count of Johnsen⁵⁾ (JSC) 別の検討では、密接な関連性は認められなかった。

2. 精細管壁肥厚の影響 (Fig. 2)

精細管障害が進むと、精細管壁の肥厚が著明になることはよく知られている。そこで精細管壁肥厚と精細管内 androgen 濃度との関連性を検討した。すなわち、精細管壁が肥厚すれば leydig cell より分泌された T, あるいは DHT の精細管移行が障害されるのではないかといった観点より、intratubular/intratesticular level ratio と精細管壁の厚さとの関連性をみた。なお精細管壁はオリパス社製デジタル測微接

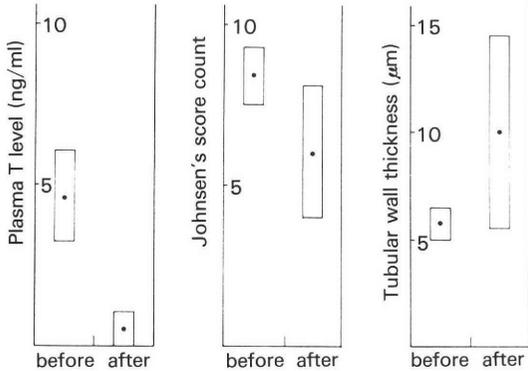


Fig. 3 Effect of LH-RH analogue on plasma testosterone level, Johnsen's score count and tubular wall thickness

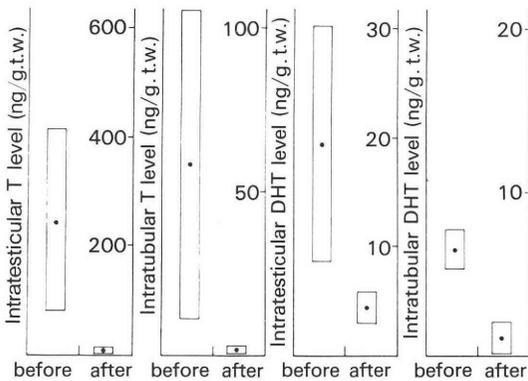


Fig. 4 Effect of LH-RH analogue on intratesticular and intratubular androgen levels

眼装置 (OSM-D4) を用い、50 か所以上の精細管壁の厚さを測定し、その平均値で示した。

その検討結果は、Fig. 2 に示した如くで、T, DHTとも intratubular/intratesticular level ratio と精細管壁の厚さとは密接な関連性はないことが判明した。

3. LH-RH analogue 投与の影響 (Fig. 3, 4)

前立腺癌患者 6 例に対し LH-RH analogue を 3 ~ 4 ヶ月投与し、その前後で精巢生検を行い、LH-RH analogue の精巢管に対する影響を検討した。

血中 T は当然のことながら、1.2ng/ml 以下と著明に低下した。なお 1.0ng/ml 以上の例は比較的若年者であった。また精巢所見は J S C で 5 ~ 6 と spermatogenic arrest の状態を呈し、同時に精細管壁も著明な肥厚を認めた。

一方、精巢内 T, DHT は全例 10 ng/gtw 以下、また精細管内 T, DHT も 3 ng/gtw 以下と血中 T と同様、著明な低下を示した。

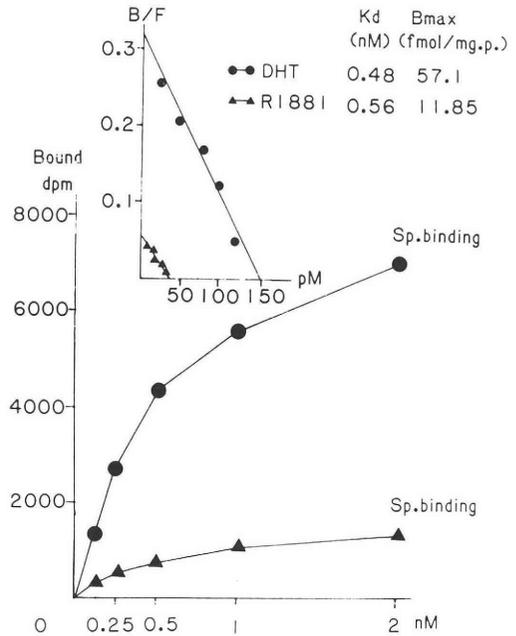


Fig. 5 3H-DHT and 3H-R 1881 binding studies of intratubular fluid and cytosol fraction in case 8

以上より、LH-RH analogue 投与により精巢内 androgen が低下すると、精細管内へ移行する androgen も著明に低下し、また精細管障害を来たすことが判明した。

4. 精細管内 androgen 濃度と精細管内 DHT-BP および AR の関連性 (Fig. 5, Table 1)

Fig. 5 に 67 歳前立腺癌患者精巢における intratubular fluid いわゆる cytosol 分画における binding study, すなわち saturation curve および scatchard plot analysis の結果を示した。DHT-BP, AR とも 0.5 ~ 1nM から saturate され、前者の Kd は 0.48 nM, 後者は 0.56 nM であり、Bmax は各々 57.1 fmol/mg protein および 11.85fmol/mg protein であった。なお DHT-BP の Bmax が非常に高いのは AR も含まれているためと考える。

次に精巢摘除術で得られた 16 精巢を用いて、精細管内 androgen 濃度と精細管内 DHT-BP および AR との関係を検討したのが Table 1 であるが、T, DHT と DHT-BP あるいは AR との間に密接な関連性は認められなかった。なお DHT-BP は 9.7 ~ 130.7 fmol/mg protein 認められ、一方、cytosol AR の Bmax は n. d. ~ 11.9 fmol/mg protein, crude nuclear AR は n. d. ~ 44.7 fmol/mg protein 認められ、AR に関

Table 1 Values of intratubular testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, DHT-binding protein and R 1881 receptor in 16 testes obtained from 10 patients.

Case	Side	J.S.C.	T (ng/g.t.w.)	DHT	DHT-BP (fmol/mg.p.)	Cytosol R1881-R (fmol/mg.p.)	Nuclear
1 *	R	2.1	0.2	N.D.	80.0	N.D.	—
	L	2.0	0.6	0.3	23.2	N.D.	—
2	R	8.6	22	4	21.9	N.D.	—
	L	8.8	29	3	30.7	N.D.	—
3	R	8.7	25	3	14.4	N.D.	—
	L	9.0	45	5	10.2	N.D.	—
4	R	8.9	120	37	13.0	N.D.	—
	L	8.9	111	27	9.7	N.D.	—
5	R	9.0	85	13	9.8	N.D.	—
	L	8.9	111	27	9.7	N.D.	—
6	R	9.1	12	0.8	53.0	10	29
	L	9.3	19	1.4	26.8	9.6	44.7
7	R	8.7	32	3	57.1	11.9	29.4
	L	8.7	47	5	50.1	8.0	15.8
8	R	8.7	47	5	50.1	8.0	15.8
	L	8.7	47	5	50.1	8.0	15.8
9 *	R	6.5	0.1	0.2	59.3	N.D.	N.D.
	L	6.4	0.1	0.2	79.7	N.D.	N.D.
10*	R	5.6	0.6	N.D.	130.7	N.D.	N.D.

* LH-RH analogue treatment

しては cytosol より crude nuclear extract に多く認められることが判明した。

また DHT-BP について興味ある点は、*印で示した LH-RH analogue 投与例において、精細管内 T、DHT の著明減少とともに A R は全例 n. d. を呈したが、DHT-BP は 23.2~130.7 fmol/mg protein 認められた。これは A R が n. d. であることより androgen binding protein (ABP) であると考えられ、A B P は androgen が微量であっても、十分量存在することが示唆された。

考 察

ラットにおける検討⁶⁾で、F S H と T の共同作用により、A B P が sertoli 細胞で産生され、T と結合し、精細管内における T 濃度の調節を行い、精子形成を惹起するとともに、精細管腔を精巣上体まで移行し、精子の成熟にも関与するといわれている。

まず精細管内 T、DHT に関してであるが、精細管内 T と精巣内 T との間に関連性が認められ、精細管内 T は leydig 細胞より分泌される内因 T の影響を受けることが判明した。一方、精細管内 DHT と精巣内 DHT との間には関連性はみられず、このことは精細管内で T が少量ながら存在する 5 α -reductase²⁾に

より DHT に転換されることを示唆するものである。

次に精細管壁の厚さの問題であるが、不妊症患者の精細管壁は精子形成障害が進むにつれ、厚さが増すことはよく知られている。内因性 T は leydig 細胞より分泌され、濃度勾配により精細管内に移行するといわれており、精細管壁肥厚の影響を受ける可能性が考えられる。

そこで精細管内 T、DHT と精細管壁の厚さとの関連性について検討したが、著者らの成績ではまったく関連性は認められなかった。また老人精巣で精細管壁の肥厚はみられるも、精細管内 T、DHT 濃度および精子形成が十分認められていること、さらに LH-RH analogue 投与例にみられる著明な精細管壁肥厚および精子形成障害が認められることを考慮すると、精細管壁の著明な肥厚がない限り、精細管内への T、DHT の移行は障害されないものと考えられる。

一方、ヒトにおける A B P の検討^{7,8)}で、その物理化学的性質は testosterone-estrogen binding globulin (TeBG) と沈降定数、分子量ともほぼ同じで、非常に類似しており、わずかに DHT に対する解離時間が A B P の方が長いのみである。ただ、concanavalin A sepharose を用いた affinity chromatography にて、TeBG は全量吸着されるが、A B P は

部分的にしか吸着されないため、この方法によりA B Pの purification が行われている⁸⁾。しかし、A B Pと TeBG が非常に類似していることは事実であり、このことからA B Pが血流中の TeBG と同様、androgen の carrier protein としての性格を有していることも考えられる。

著者らの LH-RH analogue 投与後の精巣における検討で、血中、精巣内および精細管内 T, DHT 濃度の著明な低下にもかかわらず、DHT-BP は存在し、さらにA Rが測定感度以下であることより、このDHT-BP はA B Pであると考えられる。すなわちA B Pが精細管内における carrier protein であることが示唆されるところである。

なお Lee らの検討⁹⁾では、ヒト精巣より分離したA B Pと精巣内T濃度とは相関係数 $r = 0.93$ と相関性が認められているが、著者らの検討結果では精細管内T濃度とDHT-BPとの間に密接な関連性は認められなかった。この理由として、一つにはDHT-BP はA B PとA Rとの和であることが挙げられるが、一方、LH-RH analogue 投与例において、前述した如く、精巣内Tが低値でもA B Pは存在することより、必ずしもA B Pは精巣内Tに依存するものではないと考える。

また Waheed¹⁰⁾らは妊婦血清より TeBG を分離し、これを抗原として家兎に免疫し、抗血清を作成し、前述したA B Pとの生物学的活性および免疫学的活性について検討している。その結果、両者は非常に類似しており、わずかに carbohydrate 量が異なるのみであったと報告し、ヒトにおけるA B Pの検討に抗 TeBG 血清を用いて測定可能であると述べている。著者らも TeBG の R I A キットにて精細管内A B Pを測定しているが、この結果については稿をあらためて報告する。

A B Pが TeBG と同様、精細管内における carrier protein であり、精細管内T濃度の調節に関与しているとすれば、精子形成に対し androgen が作用するための receptor 即ちA Rの存在が必要であるが、今回の検討で精細管内A Rが存在することが判明した。ヒト精細管におけるA Rの局在部位は未だ不明であるが、Grootegoed らのラットにおける検討¹¹⁾で、sertoli 細胞にA Rが存在すること、さらに Sanborn¹²⁾らは androgen によりラット sertoli 細胞質A Rがコントロールされているといった報告を考慮すると、ヒトにおいても主として sertoli 細胞に存在すると考えてよい。さらに著者らの成績で、A Rは細胞質よりも粗核分画に多く存在することからも、前立腺組織と同様、crude nuclear AR が精子形成に重要な役

割を果している可能性が示唆される。また前立腺組織におけるA RはDHT濃度と密接な関連性があることより⁴⁾、今後は精細管内A Rあるいは微量組織で測定可能な精細管内DHT濃度の検討が必要であると考える。

結 語

ヒト精細管内 T, DHT 濃度を測定し、精巣内 T, DHT および精細管壁の厚さとの関連性、さらには LH-RH analogue 投与による影響を検討した。

またヒト精細管内DHT-BP およびA Rを検討し、ヒト精細管内にA Rが存在し精子形成に何らかの役割を果し、さらにはA B Pが carrier protein である可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御協力頂いた三菱油化株式会社、伊藤昭夫先生並びに本学泌尿器科、湯川厚巳技官、また貴重な御助言を頂いた帝京大学医学部産婦人科、神戸川明助教教授に深謝いたします。なお本論文の要旨は第59回日本内分泌学会総会ワークショップ「男女性腺をめぐる最近の進歩」および第12回世界不妊会議（シンガポール）にて発表した。また本研究の一部は文部省科学研究費、昭和59年度(59771095)の援助により行なわれたものである。

文 献

- 1) 入江 伸, 大橋輝久, 大橋洋三, 古川雅人, 永井敦, 山下良孝, 大森弘之: 精細管内 Androgen 濃度の研究 第1報. 日不妊会誌, 33: 236, 1988.
- 2) 穂坂正彦, 西村隆一, 高井修道, 原田昌興: ヒト分離精細管における testosterone の代謝. 日不妊会誌, 28: 143, 1983.
- 3) 森岡政明, 武田克治, 東條俊司, 光畑直喜, 大橋輝久, 大森弘之, 齊藤利興: ヒト前立腺 cytosol における R1881 binding receptor と DHT 濃度について. 日内分泌会誌, 59: 1228, 1983.
- 4) 森岡政明, 大橋洋三, 藤田幸利, 武田克治, 東條俊司, 大橋輝久, 大森弘之: ヒト前立腺組織内 DHT 濃度並びに cytosol, crude nuclear extract 分画中の DHT 濃度と R1881 receptor assay の相関について. 日泌尿会誌, 75: 96, 1984.
- 5) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human teste: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones, 1: 2, 1970.
- 6) Dym, M., Raj, M. and Chemes, H. E.: Response of the testis to selective withdrawal of LH or FSH using antigonadotropic sera. in The Testis in Normal and Infertile Men, (Ed.) Troen, T. and Nankin, H. R., p97, Raven press, New York, 1977.
- 7) Hsu, A., Nankin, H. R. and Troen, P.:

Androgen-binding protein in human testis: effect of age. in *The Testis in Normal and Infertile Men*, (Ed.) Troen, P. and Nankin, H. R., p421, Raven press, New York, 1977.

- 8) Hsu, A. and Troen, P.: An androgen binding protein in the testicular cytosol of human testis: comparison with human plasma testosterone-estrogen binding globulin. *J. Clin. Invest.* 60: 1611, 1978.
- 9) Lee, J. A., Yoshida, K., Hosaka, M., Stratico, D., Hus, A., Winters, S. J., Oshima, H. and Troen, P.: Studies of the human testis. XV. androgen-binding protein and function of leydig cells and tubules in aged men with prostatic carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 1105, 1980.
- 10) Waheed, A., Winters, S. J., Farrow, G. M., Oshima, H. and Troen, P.: Studies of the human testis. XIX. preparation of an antibody to human testosterone-oestradiol-binding globulin and its application to the study of testicular androgen-binding protein. *Acta Endocrinol.*, 108: 284, 1985.
- 11) Grootegoed, J. A., Peters, M. J.: Mulder, E., Rommerts, F. F. G. and Van der Molen, H. J.: Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 9: 159, 1977.
- 12) Sanborn, B. M., Wagle, J. R. and Steinberger, A.: Control of androgen cytosol receptor concentrations in sertoli cells: effect of androgens. *Endocrinology*, 114: 2388, 1984.

Study on intratubular androgen levels, report 2

Teruhisa Ohashi, Shin Irie,
Yozo Ohashi, Masato Furukawa,

Yoshitaka Yamashita, Atushi Nagai
and Hiroyuki Ohmori

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

Both intratesticular and intratubular androgen levels, testosterone (T) and 5 α -dihydrotestosterone (DHT) levels, were determined by radioimmunoassay in 15 patients with prostatic cancer, 13 with varicocele and 57 with male infertility. Moreover, intratubular DHT binding protein (DHT-BP) and androgen receptor (AR) were also investigated with exchange assay using dextran-corted charcoal in some of those cases. The results were as follows:

- 1) Slight correlation ($r=0.56$) was present between intratesticular T and intratubular T. This data considered that intratubular T was affected by endogenous T secreted from leydig cells.
- 2) No significant relationship of intratubular T and DHT was present with the thickness of seminiferous tubular wall.
- 3) Both intratesticular and intratubular androgen levels decreased significantly by LH-RH analogue therapy, and AR also decreased below the sensitivity, while, DHT-BP was detectable. Therefore, it was suggested that androgen binding protein might be a intratubular carrier protein as same as testosterone-estrogen binding globulin in circulating blood.
- 4) The crude nuclear AR was higher than the cytosol AR in 16 testes obtained by orchietomy from prostatic cancer patients.

Therefore, it was suggested that intratubular androgen and AR might play a role on human spermatogenesis.

(受付: 昭和 62 年 7 月 27 日)

Makler 算定盤の使用経験

Comparison between Two Methods for the Measuring of Human Spermatozoa

山口大学医学部泌尿器科

林 田 英 嗣 石 津 和 彦 山 川 弦 一 郎
Hidetsugu HAYASHIDA Kazuhiko ISHIZU Gen-ichiro YAMAKAWA
磯 山 理 一 郎 瀧 原 博 史 酒 徳 治 三 郎
Riichiro ISOYAMA Hiroshi TAKIHARA Jisaburo SAKATOKU

Department of Urology, School of Medicine, Yamaguchi University

Makler 算定盤と Improved Neubauer Hemocytometer で精子濃度および運動率について比較を行い若干の知見を得たので報告する。

対象：Azoospermia を除く当不妊外来受診患者 32 名。結果：精子濃度において Makler 算定盤と hemocytometer の間で $P < 0.001$ の有意相関を認めたが、一般に Makler 算定盤が高値を示す場合が多かった。運動率において Makler 算定盤と Hemocytometer の間で $P < 0.001$ の有意差で Makler 算定盤が高くでる傾向がある。スライドガラスによる検鏡と Makler 算定盤の間では有意差はみられなかった。

以上の結果は、算定盤の構造および算定液の影響が大きいと思われ、Makler 算定盤が、Hemocytometer に比し有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 657-660, 1988)

緒 言

精液検査は、男子不妊症の診断及び治療効果の判定に重要な役割をもっており、迅速かつ正確な測定が要求される。施設により異なった算定盤を使用している場合、又、同一施設においても算定盤を変更する場合など、精液検査の Date を比較するためには、算定盤の精度を確認しておく必要がある。今度、教室では精液自動解析装置の導入が検討され、これに使用されている Makler 算定盤と従来より当科で使用している Improved Neubauer Hemocytometer との間で精子濃度、及び運動率について比較を行なったので報告する。

対象および方法

対象：Azoospermia を除く当不妊外来受診患者 32 名。精子濃度は 32 名について、運動率は 20 名について測定した。

方法：図 1 に示す如く Hemocytometer では、射精液を 20-30 分放置し液状化を待つ。次に算定液にて希釈を行なう。スライドガラスによる直接検鏡(以下、Direct と略す)により 30/F 以上のとき 20 倍希釈、10-30/F のとき 10 倍希釈、10/F 以下のとき原液を使用した。その後 10×40 倍で算定を行なった。なお希釈液は Lock 氏液を使用した。温度は室温放置とし、冬期のみ 26°C で保温した。

Makler 算定盤の場合、同様に 20-30 分放置後、原液を算定盤にのせ 10×20 倍で算定した。

なお、両方の算定に際して Micro warm plate(図 2) を使用し、温度の低下を防いだ。

精子濃度については、Hemocytometer 及び Makler 算定盤で測定、運動率については Direct, Hemocytometer, Makler 算定盤で測定比較した。

結 果

Azoospermia を除く 32 名について、縦軸に Mak-

Hemocytometer	Makler
1) 射精液を20~30分放置し十分液状化する。	1) 射精液を20~30分放置し十分液状化する。
2) 希釈 10 or 20倍	2) Makler 算定盤に乗せる。
Direct	3) 10×20倍で検鏡。
30/F 以上 ⇨ 20 倍	
10/F ~ 30/F ⇨ 10 倍	
10/F 以下 ⇨ 原液	
3) Hemocytometer に乗せる。	
4) 10×40倍で検鏡。	

精子数算定液 (Lock 氏液)	
NaCl	9 g
KCl	0.25 g
CaCl ₂	0.15 g
Glucose	1.0 g
water	qs
ad 1000ml	

図1 精子算定順序

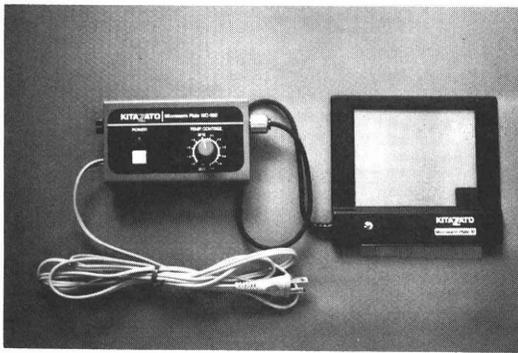


図2 Micro warm plate

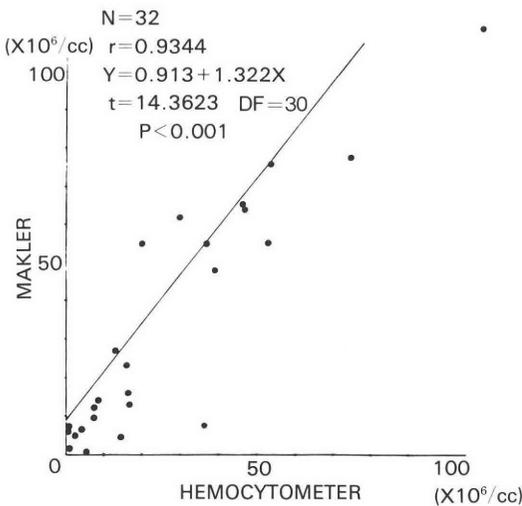


図3 精子濃度についてMakler, Hemocytometerの相関を示している。

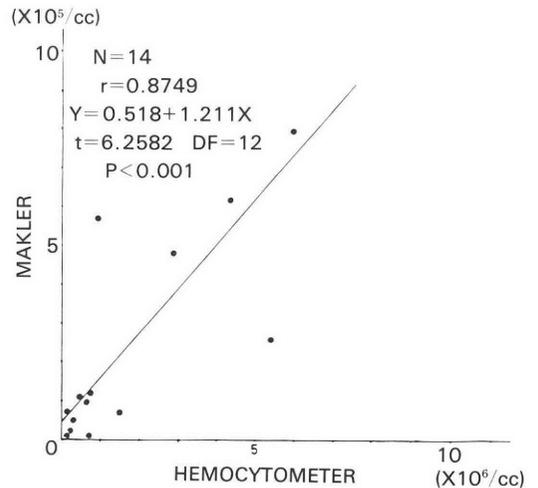


図4 10×10⁶/cc以下の精子濃度について、Makler, Hemocytometerの相関を示している。

ler 算定盤,横軸に Hemocytometer による精子濃度を図3に表わした。相関係数 $r=0.9344$, 回帰直線 $Y=0.913+1.322X$ となり $P<0.001$ で有意の相関を示した,又グラフよりわかる様に Makler 算定盤の方が高値を示す場合が多かった。

図4は,同様に精子濃度を表わしているが,一般に oligospermia の場合,測定のパラツキが大きくなると考えられ,10×10⁶/cc以下の濃度について表示した。対象は32名中の14名とした。相関係数 $r=0.8749$, 回帰直線 $Y=0.518+1.211X$ $P<0.001$ で,これも有意の相関を示した,この場合も,Makler

算定盤の方が高値をとる場合が多かった。

Hemocytometer, Makler, Direct における精子運動率を図 5 に示した。左側が Hemocytometer と Makler 算定盤である。P < 0.001 の有意差で Makler 算定盤の方が高くでる傾向があった。4 例程低下がみられるが、これは検体が不妊患者のものであり、測定に対しての時間経過が関係しているものと思われる。右側は Makler と Direct を示している。両者間の運動率については、有意の差があるとは言えな

かった。なお、測定は、Direct, Hemocytometer, Makler の順に可及的にすばやく行なった。

Makler 算定盤及び Hemocytometer の測定のバラツキをみるため、それぞれ同一人の正常精子濃度を 10 回測定したものを図 6 に示した。Makler 算定盤で CV=9.681, Hemocytometer で CV=9.0059 であった。

以上より精子濃度において Makler 算定盤 (25.242 ± 6.3536, Mean ± SE) と Hemocytometer (34.278 ± 8.9884) の間で有意の相関 (P < 0.001) を示した。しかし、Makler 算定盤が高値をとる場合が多かった。

精子運動率において、Direct (51.75 ± 5.310) と Makler 算定盤 (52.96 ± 4.194) の間に有意の差はみられないが、Hemocytometer (32.99 ± 3.117) と Makler 算定盤 (52.96 ± 4.194) の間に有意の差 (P < 0.001) がみられた。

考 察

Makler 算定盤は、1978 年 Makler¹⁾により発表された算定盤である。カバーガラスとの間隔が 10 μm となる様に作られており、精子運動を水平方向にのみ限定している。Makler 算定盤の grid は、1 mm 平方の正方形を縦横 10 に分けてあり一般に横 10 格子の精子数を 200 倍で検鏡し、これを 10⁵倍したものが、1 cc の精子数である。oligospermia の場合、全 100 格子中の精子数を数え 10⁵倍する。運動率は、縦横 3 格子の 9 格子中の運動精子及び全精子を数え計算する。

Improved Neubauer Hemocytometer の grid は、

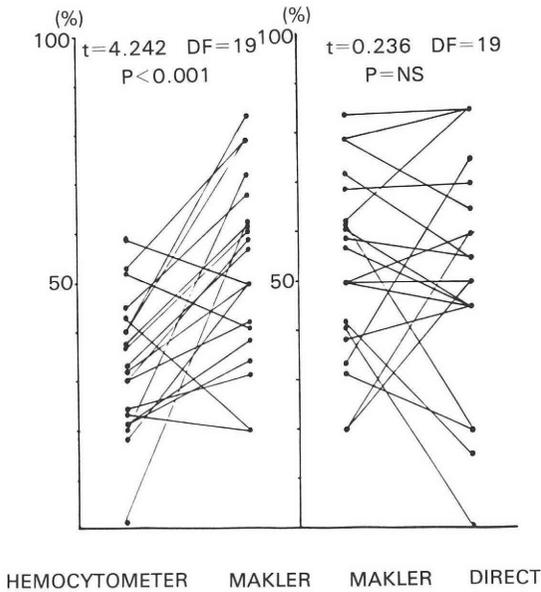


図 5 Hemocytometer, Makler, Direct での精子運動率を示している。

Makler											
drop No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
count (10 ⁶)	76	74	88	78	86	87	93	82	98	96	
	Mean		85.8								
	SD		8.3106								
	SE		2.6281								
	CV		9.6861								
Hemocytometer											
drop No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
count (10 ⁶)	112	132	136	142	128	148	130	119	123	147	
	Mean		131.0								
	SD		11.8608								
	SE		3.7507								
	CV		9.0059								

図 6 Makler, Hemocytometer にて、同一精子を 10 回測定したものを示している。

1 mm 平方の正方形を縦横 5 つに分け 5 格子又は全格子中の精子を 400 倍にて検鏡する。Hemocytometer はカバーガラスとの間隔が $100\mu\text{m}$ となる様に作られており count 数を 10^5 倍したのが、1 cc 中の精子数となる。

精子濃度において、Makler 算定盤及び Hemocytometer との間に有意の差をもって相関がみられたものの Makler 算定盤が高い値を示すものが多かった。Menkveld²⁾ からも同様の結果を出している。これは、顕微鏡の焦点が大きく関係していると考えられる。400 倍の場合、焦点の合う距離が短いうえ、Hemocytometer の空間が $100\mu\text{m}$ と広いため数え落しがあるものと思われる。

一方、Makler によると、Makler 算定盤はカバーガラスとの間隔が $10\mu\text{m}$ となる様に作られており、又 200 倍で検鏡するため 1 ヶ所で焦点が合い数え落しが少ないとしている。

運動率については、Hemocytometer と Makler 算定盤の間で、有意の差を示した。これは希釈液及びピペット操作による影響が考えられる。一方、Direct と Makler 算定盤の間では、有意の差はみられなかった。Makler 算定盤は、 $10\mu\text{m}$ の空間を作り精子運動を水平方向にのみ制限しているが、この影響はほとんどないものと思われる。

結 論

Makler 算定盤は Hemocytometer に比し、操作が簡単で正確であり充分有用であると思われた。

(本論文の要旨は昭和 62 年 8 月松山市で開催された第 25 回日本不妊学会中国四国支部総会で発表した。)

文 献

- 1) Makler A.: A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.* 30, 313-318.
- 2) Menkveld A., Vanzyl J. A. and Kotze T. J. V.: A statistical comparison of three methods for the counting of human spermatozoa. *Andrologia.* 16, 554-558.

Comparison between two methods for the measuring of human spermatozoa

Hidetsugu Hayashida, Kazuhiko Ishizu, Gen-ichiro Yamakawa, Riichiro Isoyama, Hiroshi Takihara and Jisaburo Sakatoku

Department of Urology,
School of Medicine,
Yamaguchi University,
Ube, Japan
(Director; Prof. J. Sakatoku)

Two methods for the counting of human spermatozoa were compared and evaluated. One method was the Improved Neubauer hemocytometer and the other was Makler counting chamber.

The correlation coefficient of sperm count was very high. ($r=0.9344$) In many cases, however, the count of Makler counting chamber was than that of homocytometer.

In sperm motility a significant difference was seen between Makler counting chamber and homocytometer, ($P<0.001$) But a significant difference was not seen between Makler counting chamber and ordinary slide method.

(受付: 昭和 62 年 10 月 13 日)

閉塞性無精子症に対する 顕微鏡下一層縫合による精管精管吻合術

One-Layer Microscopic Vasovasostomy for Obstructive Azoospermia

千葉大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 島崎淳教授)

角谷秀典 布施秀樹 高原正信
Hidenori SUMIYA Hideki FUSE Masanobu TAKAHARA
石井弘之 島崎 淳
Hiroyuki ISHII Jun SHIMAZAKI

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

帝京大学市原病院泌尿器科 (主任: 伊藤晴夫教授)

伊藤晴夫
Haruo ITO

Department of Urology, Teikyo University Ichihara Hospital
(Director: Prof. H. Ito)

閉塞性無精子症 12 例に対し顕微鏡下一層縫合による精管精管吻合術を施行した。経過を追えた 11 例中 7 例 (63.6%) に妊娠成立をみた。うち 1 例は 28 年前に両側ソ径ヘルニア根治術による精管結紮例であった。術後の精子濃度から予後は推定しえなかった。閉塞期間・術中の vas fluid 中の精子の存在と予後との相関はなく、sperm granuloma の存在はそれのない方が術後精子濃度・妊娠について良好な結果であった。また閉塞部位が直部のものは曲部のものに比し良好な成績であり、精管切除術は直部で施行すべきと考えられた。本手術法は閉塞無精子症に対する有効な治療法と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 661-667, 1988)

緒言

現在、男子不妊手術として精管切除術が一般化している。一方、離婚率の増加に伴いその復元手術に対する要望も増加するものと考えられる。我々は、すでに顕微鏡使用による精管再吻合術について報告したが、その後の症例を加え術後成績とそれに関与する因子について検討した。

対象および方法

昭和 56 年 4 月より昭和 61 年 3 月までの 5 年間に、千葉大学医学部付属病院泌尿器科において 12 例に対

して精管精管吻合術を施行した。手術時年齢は 25 歳から 49 歳、平均 37.9 歳であった。原因は、不妊目的の精管切断術後 11 例、小児期の両側ソ径ヘルニア手術による精管結紮 1 例である。精路の閉塞期間は、4 ヶ月から 28 年 6 ヶ月、平均 9 年 4 ヶ月であった(表 1)。

術前血清ホルモン値の測定は 10 例に施行したが、各症例とも正常範囲内であり、その平均値は LH 10.4 mIU/ml, FSH 7.4 mIU/ml, テストステロン 466.5 ng/dl であった。

手術術式: 辜丸側および精のう側の精管を剥離し、瘢痕化した両断端をカミソリメスに直角に切断する。

表 1 精管再吻合術施行症例

症 例	手術時年齢	術前子供の有無	精管結紮よりの期間	再吻合の理由
1.	41	1 人	2 年	経済事情好転
2.	41	2 人	8 年	再 婚
3.	36	無	6 年	妻の病氣回復
4.	25	2 人	4 ヶ月	再 婚
5.	49	1 人	15年	再 婚
6.	46	2 人	13年	再 婚
7.	46	2 人	19年	再 婚
8.	39	1 人	6 年	再 婚
9.	29	2 人	4 年	再 婚
10.	30	無	28年 (2才時のヘルニア手術より)	無精子症
11.	40	3 人	2 年	再 婚
12.	32	2 人	9 年	再 婚

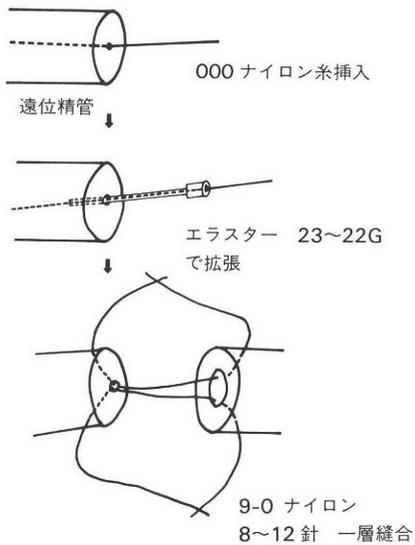


図 1 精管吻合方法

精のう側精管の内腔は狭小化していることが多いので、3-0 ナイロン糸を通しこれをガイドとしてエラストマーを挿入し内腔の拡張を行ない、粘膜の吻合が容易となるようにした(図1)。同時にエラストマーより生理食塩水を注入し精管の通過性を確かめた。吻合は手術様顕微鏡下に両端針9-0モノフィラメントナイロン糸にて8-12針の一層縫合により行なった。ステントの使用はしていない。

結 果

術後、精液検査で精子の出現をみたのは、術後1

ヵ月目のみ精液検査をした症例8を除くと、11例中10例、90.9%であった(表2)。妊娠成立は経過を調査しえなかった症例8を除く11例中7例、63.6%にみとめ、精管切断術後8年の症例2では、術後2年、3年4ヵ月に女児2人の出産をみた。初回妊娠の推定受胎日は15ヵ月以内であった。

術後精液所見の推移は、妊娠例でも症例3、6のように精子濃度の急激な上昇をみた場合、症例4、5、10のように3ヵ月目まで精子濃度の上昇がみられなかった場合とがあり、非妊娠例でも $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の精子濃度を示した場合もあり、精子濃度からその後の妊娠を推定しえないと考えられた(図2)。

精のう側の遠位精管の位置が、左右とも精管曲部にあったものは6例、一側が直部で他側が曲部のもの1例、左右とも直部以上のものは5例であった。ソ径ヘルニア術後の症例10では、右は内ソ径輪付近、左は外ソ径輪下方で結紮してあった。sperm granulomaは記載のあった7例中4例、精管切断術後の6例中4例、66.6%にみとめた。睾丸側精管の切除端よりのvas fluid中に少数でも精子の証明されたのは、記載のある8例全例にみとめた。睾丸生検は6例に施行したが、各症例で左右差はなく、そのJohnsenのscore count²⁾は5.7~6.7と精子形成能の低下をみた(表3)。

術後成績とそれに関連すると考えられる因子について検討した(表4)。閉塞期間は、精子出現、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、妊娠のいずれにも関係しなかった。sperm granulomaの有無では、それを見とめない方が精子濃度、妊娠について良好な結果であった。遠位精管の位置は直部にあるものが良好な結果

表2 術後経過

症 例	精 液 所 見									妊 娠	出 産
	前	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月	30ヶ月		
1.	3.0ml 0	↓								+	女 児 (11ヶ月後)
2.	4.0ml 0		4.2ml 0	3.4ml 22×10^6 36%	4.2ml 53×10^6 36%	4.4ml 52×10^6 34%	3.4ml 24×10^6 20%	3.2ml 46×10^6 20%	2.8ml 43×10^6 16%	++	女児(2年後) 女児(3年4ヶ月後)
3.	6.2ml 0		5.4ml 45×10^6 18%	6.6ml 106×10^6 60%	↓					+	女 児 (1年5ヶ月後)
4.	0.7ml 0	3.0ml 21×10^6 18%			↓					+	人 工 中 絶
5.	2.8ml 0	1.7ml 10×10^5 0%		↓		2.0ml 25×10^5 22%				+	女 児 (1年1ヶ月後)
6.	2.4ml 0	1.0ml 25×10^6 10%	↓							+	女 児 (1 年 後)
7.	0.6ml 0	0.3ml 9×10^5 16%			1.0ml 2×10^5 10%	2.0ml 24×10^6 20%	2.0ml 19×10^6 18%	2.1ml 10×10^6 38%	1.5ml 21×10^6 42%	-	
8.	1.5ml 0	1.0ml 0%								-	
9.	2.0ml 0	2.2ml 35×10^4 0%	3.0ml 50×10^4 0%	5.0ml 0	3.2ml 0	4.5ml 0				-	
10.	2.0ml 0		5.8ml 16×10^4 0%	↓ 4.8ml 13×10^6 0%	6.6ml 8×10^4 0%	6.0ml 13×10^6 14%	6.5ml 20×10^6 6%	5.6ml 31×10^6 16%		+	男 児 (1年4ヶ月後)
11.	1.1ml 0		1.0ml 12×10^6 48%					1.2ml 32×10^6 32%		-	
12.		4.4ml 1×10^4 0	4.5ml 0	6.4ml 0						-	

↓:推定受胎日

であった。sperm in vas fluidと予後との関係は明らかではなかった。

妊娠例と非妊娠例について関連因子について検討した(表5)。両群で手術時年齢、長期閉塞の有無、血清ホルモン値で差をみとめなかった。辜丸生検は施行例が少ないが、妊娠例でscore countは若干良好であった。sperm granulomaは妊娠例で40%に、うちソ径ヘルニア術後例を除いた場合50%にみとめ、非妊娠例は2例と少ないが100%にみとめた。遠位精管がどちらか一方でも直部にある割合は、妊娠例71.4%、非妊娠例25.0%であり妊娠例が高かった。術後精子濃度が $20 \times 10^6/ml$ 以上をしめた割合は、

妊娠例66.7%、非妊娠例50.0%と両者差はなかった。

考 察

精管精管吻合術は、macrosurgical vasovasostomyとmicrosurgical vasovasostomyに大別される。また、後者については縫合法によりone-layer^{3,4)}とtwo-layer^{5,6)}の報告がある。macrosurgical vasovasostomy^{7,8,9,10,11,12)}後の妊娠率は、39%~57%と報告されている。一方microsurgical vasovasostomydでは43%~71%と報告され^{13,14,15)}、前者に比し良好な成績である。本法のうち、two-layer法は

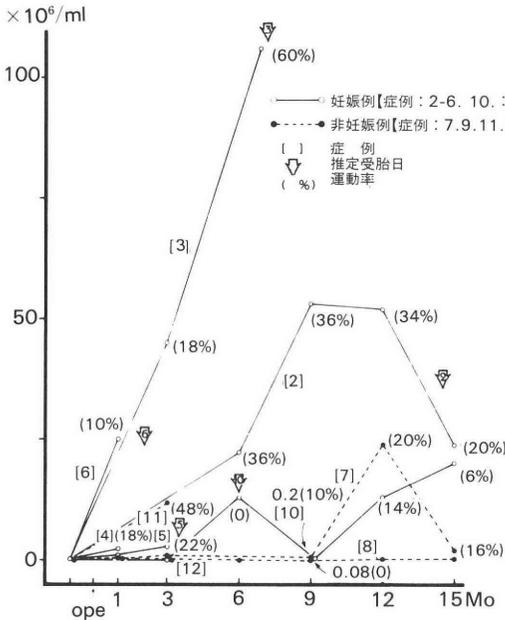


図 2 術後精液所見の変化

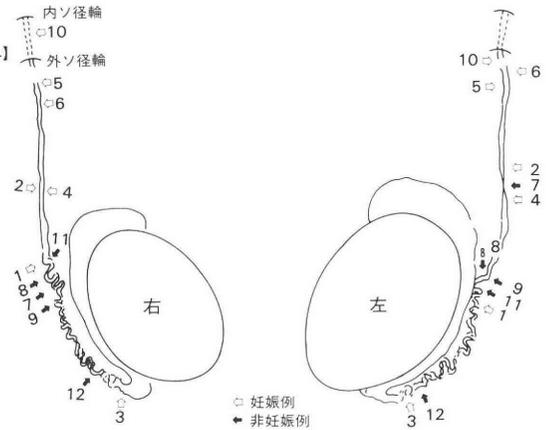


図 3 吻合部位と妊娠との関係

表 3 術中所見

Case No.	遠位精管の位置		sperm granuloma	sperm in vas fluid	score count
	右	左			
1.	曲部	曲部	不明	不明	6.7
2.	直部	直部	-	不明	-
3.	曲部	曲部	+	不明	6.6
4.	直部	直部	+	+	-
5.	直部	直部	不明	+	-
6.	直部	直部	-	+	-
7.	曲部	直部	+	左のみ+	-
8.	曲部	曲部	不明	+	6.2
9.	曲部	曲部	不明	不明	5.7
10.	直部	直部	-	+	-
11.	曲部	曲部	不明	+	5.7
12.	曲部	曲部	+	+	6.3

Silber¹⁶⁾により報告されて以来、多くの報告がなされているが two-layer 法の欠点としては手技の困難なこと、手術時間が長い点が挙げられる^{1,3)}。one-layer 法は、two-layer 法に比し、縫合部の muscular bridge を生じ sperm leakage の原因となるという指摘もある¹⁷⁾が、粘膜と粘膜の縫合を正確に行なうことにより解決されると考える。Lee ら¹⁸⁾は、近位精管壁の厚さにより one-layer 法と two-layer 法の適応を決めているが、我々は 3-0 ナイロン糸ガイド下にエラスト

ーにて狭小化した遠位精管内腔の拡張を行ない正確な粘膜粘膜縫合の一助としている。ステントの使用については、Shessel ら¹⁹⁾は 2-0 ナイロン糸をステントとして用い one-layer 法を行ない 70% の妊娠率という良好な成績を報告しているが、ステントの使用は sperm leakage の原因となり sperm granuloma を形成し再閉塞を生じるため使用しないのが一般的であり¹⁷⁾、我々も用いていない。また、Thomas ら¹⁸⁾は犬を用いた実験で microsurgical vasovasostomy

表4 術後成績と関連因子

	精子出現 (n=10)	20×10 ⁶ /ml以上 (n=10)	妊 娠 (n=11)
閉塞期間			
< 9年	5 / 5 (100%)	3 / 5 (60.0%)	4 / 6 (66.7%)
≥ 9年	5 / 5 (100%)	3 / 5 (60.0%)	3 / 5 (60.0%)
sperm granuloma			
有	4 / 4 (100%)	2 / 4 (50.0%)	2 / 4 (50.0%)
無	3 / 3 (100%)	3 / 3 (100%)	3 / 3 (100%)
不明	3 / 3 (100%)	1 / 3 (33.3%)	2 / 4 (50.0%)
遠位精管			
直部	6 / 6 (100%)	4 / 6 (66.7%)	5 / 6 (83.3%)
曲部	4 / 4 (100%)	2 / 4 (50.0%)	2 / 5 (40.0%)
sperm in vas fluid			
有	7 / 7 (100%)	4 / 7 (57.1%)	4 / 7 (57.1%)
不明	3 / 3 (100%)	2 / 3 (66.7%)	3 / 4 (75.0%)

表5 妊娠群と非妊娠群との比較

	妊 娠 群 (n=7)	非妊娠群 (n=4)
年 齢	39.4±8.4才	36.7±7.7才
閉塞期間 (≥9年)	3/7 (42.9%)	2/4 (50.0%)
LH	11.4±4.1mlU/ml	10.6±4.0mlU/ml
FSH	7.5±2.8mlU/ml	7.2±0.9mlU/ml
test.	472±164ng/dl	473±266ng/dl
score count	6.65±0.07 (n=2)	5.90±0.35 (n=3)
sperm granuloma	2/5 (40.0%) (不明2例)	2/2 (100%) (不明2例)
遠位精管の位置 (直部)	5/7 (71.4%)	1/4 (25.0%)
20×10 ⁶ /ml以上	4/6 (66.7%) (対象外1例)	2/4 (50.0%)

を行ないステント群では組織学的にも高率に閉塞をきたしたと報告している。

術後妊娠までの期間は、Middletonら¹²⁾はmacro-surgical例であるが妊娠例の73%は1年以内と述べており、自験例でも初回妊娠の推定受胎日は15ヵ月以内であった。

術後成績に関与する因子としては、閉塞期間が第1に挙げられる^{17,18,21)}。一般に長期閉塞があると精路内圧の上昇をきたし、精巣上体管の破裂・閉塞をきたすといわれている²²⁾。Silber²³⁾は精管精管再吻合の際、精管断端から精子をみとめなかった症例で精巣上体管の切断端に精子をみており精管精管吻合術の

失敗の一因としている。またSharlip²⁴⁾は161例の精管精管吻合術を顕微鏡下に行ない、長期経過を追った10例のうち無精子症の3例で再手術を施行し両側の精巣上体の繊維化・瘢痕形成とその近位部の精子充満をみたし報告し、Silber同様の指摘をしている。閉塞後10年以上経過した例は精巣上体精管吻合術の適応という考えもある¹⁷⁾が、自験例では閉塞期間と精子出現・術後精子濃度20×10⁶/ml以上・妊娠のいずれとも関係せず、精管切除術後15年と13年、両側ソ径ヘルニア術後28年の長期閉塞例3例で妊娠成立をみた。また精管切除術後の10年以上の例で妊娠成立に至らなかった例は、術後19年の症例7のみであるが比較的良好な精液所見を得ている。したがって、一般に精巣上体精管吻合術の妊娠率は低く^{25,26)}、長期閉塞例においても精管精管吻合術が第1に選択すべき術式と考える。

精管断端のsperm granulomaの形成は、Silber²⁷⁾は精管切除術後の30-40%にみられspermの漏出の結果、精路内圧の上昇を防ぎ、sperm granulomaをみとめる例では術後成績は良好であるとしている。自験例でsperm granulomaについて記載のあったのは12例中7例で7例中4例にsperm granulomaをみたが、Silberとは逆の傾向をみとめた。

精管断端のvas fluidの肉眼所見は、透明なものの子後は良好で、濃厚でクリーム色のものでは不良とされている²⁸⁾。vas fluidの鏡検でspermをみとめる例は一般に術後妊娠率は高く、spermをみる頻度は閉塞期間6年以下では70%、9年以上では30%と

報告されている²⁹⁾。さらに Silber³⁰⁾はこの vas fluid 中の sperm につき詳細な検討をしている。すなわち、5段階に分類し、grade1:運動性のある形態的に正常な精子を多数みとめるもの、grade2:運動性のない形態的に正常な精子を多くみとめるもの、grade3:ほとんどが精子頭部のみであり、少数の正常の精子を伴うもの、grade4:精子頭部のみのも、grade5:精子及び精子成分を全くみとめないもの、と分けており、多くが grade4 に該当していると報告している。自験例で、術後ではなく retrospective に観察したが8例中全例に少なくとも片側性に精子成分をみとめたが、Silber 同様 grade4 が多数を占めていた。また、この grade と閉塞期間・精管内径との相関を報告している。

精管精管吻合術時の睾丸生検所見は左右差なく Johnsen の mean score count は 5.7~6.7 と低下しており、各精細管で spermatozoa・spermatid をみとめるものもあり score に大きな幅をみた。松田ら³¹⁾は 7.6~8.8 と報告しており自験例は低い傾向にあった。

術後精液所見は精子濃度の改善に比し運動率の低値をみとめ、その原因としては副睾丸機能の低下が指摘されている³²⁾。また抗精子抗体の関与を指摘するものもあるが³³⁾、Belker ら²¹⁾は抗精子抗体の関与を否定しており今後検討すべき課題である。

自験例では閉塞部が直部にあるものは曲部のものに比し良好な結果を得ており Lee¹⁸⁾の報告と同様であり、精管切除術は直部で行なうべきと考えられた。これは手技的な問題を提起しており、適当な精管固定器の使用³⁴⁾、あるいは Strauch³⁴⁾、Leonaed ら³⁵⁾、Cedenho ら³⁶⁾は臨床例・動物実験で簡便な吻合法を報告しているが、簡便かつ確実な吻合法の工夫が必要と考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1:2, 1970.
- 3) Wilischer, M. M. K. and Novicki, L. C. D. E.: Simplified technique for microscopic vasovasostomy. *Urology*, 15: 147, 1980.
- 4) Sharlip, I. D.: Vasovasostomy: Comparison of two microsurgical techniques. *Urology*, 17: 347, 1981.
- 5) Silber, S. J.: Perfect anatomical reconstruction of vas deferens with a new microscopic surgical technique. *Fertil. Steril.*, 28: 72, 1977.
- 6) Belker, A. M.: Microsurgical two-layer vasovasostomy. *Urology* 16: 376, 1980.
- 7) Phadke, G. M. and Phadke, A. G.: Experiences in the re-anastomosis of the vas deferences. *J Urol*, 97: 888, 1967.
- 8) Fallon, B. Jacobo, E. and Bunge, R. G.: Restoration of fertility by vasovasostomy. *J Urol*, 119: 85, 1978.
- 9) Fallon, B., Miller, R. G. and Gerber, W. L.: Nonmicroscopic vasovasostomy. *J Urol*, 126: 361, 1981.
- 10) Middleton, R. G. and Henderson, D.: Vas deferens reanastomosis without splints and without magnification. *J Urol*, 119:763, 1978.
- 11) Lee, L. and McLoughlin, M. G.: Vasovasostomy: a comparison of macroscopic and microscopic techniques at one institution. *Fertil Steril*, 33: 54, 1980.
- 12) Middleton, R. G., Smith, J. A., Moore, M. H. and Urry, R. L.: A 15-year followup of a nonmicrosurgical technique for vasovasostomy. *J Urol*, 137: 886, 1987.
- 13) Silber, S. J.: Vasectomy and vasectomy reversal. *Fertil Steril*, 29: 125, 1978.
- 14) Fenster, H. and McLoughlin, M. G.: Vasovasostomy: Is the microscope necessary? *Urology* 18: 60, 1981.
- 15) Cos, L. R., Valvo, J. R., Davis, R. S. and Cockett, A. T. K.: Vasovasostomy: Current state of the art. *Urology*, 22:567, 1983.
- 16) Silber, S. J.: Microscopic technique for reversal of vasectomy. *Surg. Gynecol. Obstet.* 143: 630, 1976.
- 17) McClure, R. D.: Microsurgery of the male reproductive system. *World J Urol*, 4:105, 1986.
- 18) Lee, H. Y.: A 20-year experience with vasovasostomy. *J Urol*, 136:413, 1986.
- 19) Shessel, F. S., Lynne, C. M. and Politano, V. A.: Use of exteriorized stents in vasovasostomy. *Urology*, 17: 163, 1981.
- 20) Thomas, A. J., Pontes, J. E., Buddhdev, H. and Pierce, J. M.: Vasovasostomy: Evaluation of four surgical techniques. *Fertil Steril*, 32: 324, 1979.
- 21) Belker, A. M., Konnak, J. W., Sharlip, I. D. and Thomas, A. J.: Intraoperative observations during vasovasostomy in 334 patients. *J Urol* 129: 524, 1983.
- 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) Silber, S. J.: Epididymal extravasation following vasectomy as a cause for failure of

- vasectomy reversal. *Fertil Steril*, 31:309, 1979.
- 24) Sharlip, I. D.: The significance of intravasal azoospermia during vasovasostomy: answer to a surgical dilemma. *Fertil Steril*, 38: 496, 1982.
 - 25) Fogdestam, I., Fall, M. and Nilsson, S.: Microsurgical epididymovasostomy in the treatment of occlusive azoospermia. *Fertil Steril*, 46: 925, 1986.
 - 26) Lee, H. Y.: A 20-year experience with epididymovasostomy for pathologic epididymal obstruction. *Fertil Steril*, 47: 487, 1987.
 - 27) Silber, S. J.: Sperm granuloma and reversibility of vasectomy. *Lancet*, 2:588, 1977.
 - 28) Silber, S. J.: Microsurgery of the male ductal system. *Reproductive infertility microsurgery in the male and female*: p78-161, Baltimore, Williams&Wilkins Co., 1984.
 - 29) Lee, H. Y. and Members of the Vasectomy Study Project: Observations of the results of 300 vasovasostomies. *J Androl*, 1: 11, 1980.
 - 30) Silber, S. J.: Microscopic vasectomy reversal. *Fertil Steril* 11: 1191, 1977.
 - 31) 松田公志, 西村一男, 野々村光生, 岡田謙一郎, 吉田修, 真田俊吾, 高橋陽一: 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, 日不妊誌, 32: 352, 1987.
 - 32) Martin, D. C.: Microsurgical reversal of vasectomy. *Amer J Surg*, 142: 48, 1981.
 - 33) 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.
 - 34) Strauch, B.: Folding-approximating clamp to simplify microvasovasostomy. *Urology*, 16:295, 1980.
 - 35) Leonard, S. A. and Thomas, R.: New technique for microscopic vasovasostomy. *Urology*, 22: 188, 1983.
 - 36) Cedenho, A. P., Hayashi, H. and Sadi, A.: Mi-

cro-surgical anastomosis of vas deferens by a telescopic technique. *Urol Res*, 15: 243, 1987.

One-layer microscopic vasovasostomy for obstructive azoospermia

Hidenori Sumiya, Hideki Fuse,
Masanobu Takahara, Hiroyuki Ishii
and Jun Shimazaki

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

Haruo Ito

Department of Urology,
Teikyo University
Ichihara Hospital
(Director: Prof. H. Ito)

We herein report the twelve cases of obstructive azoospermia, eleven cases; postvasectomy, one case; bilateral vas ligation by inguinal hernia operation twenty-eight years ago.

Pastoperative fertility status was not predicted by sperm concentration after vasovasostomy. There was no positive correlation between the duration of obstruction or the presence of sperm in vas fluid and the success rate of vasovasostomy. Better prognosis was obtained in the patients without sperm granuloma and with obstruction at straight vas. Therefore vasectomy should be performed at straight vas.

One-layer microscopic vasovasostomy was recommended for obstructive azoospermia.

(受付: 昭和62年12月1日)

EFFECT OF PORCINE KALLIKREIN TREATMENT ON MALE INFERTILITY

Masayoshi YOKOYAMA, Osamu KAMEI, Hiroshi SEIKE
and Masafumi TAKEUCHI

Department of Urology, Ehime School of Medicine

Abstract: Twenty-four patients with male infertility were treated with porcine kallikrein tablets. Seminal kallikrein activity (KA) and concentration (KC) were measured and compared to the values of seminalysis. In 10 patients, KA and KC were measured before and after the treatment. KA and KC were significantly correlated to the motile sperm density prior to the treatment. The kallikrein treatment improved the seminalysis and fertility in spite that it did not enhance KA and KC in seminal plasma. These results suggested that the oral kallikrein treatment improved fertility by a certain indirect way such as improving testicular blood circulation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 668-670, 1988)

Introduction

Kallikrein, which was reported to be effective for improvement of the sperm motility *in vitro*¹⁾, has been used clinically for the treatment of male infertility. Many clinical reports indicated that porcine kallikrein tablets improved sperm density, motility and fertility²⁻⁷⁾. Some investigators believed that the kinins generated by kallikrein played some important roles in fertility⁸⁾. However, the mechanism of improving the seminalysis by kallikrein treatment is not clear because it is unlikely that porcine kallikrein would be absorbed and secreted to the seminal plasma through the blood testicular barrier in the natural form. In this study we measured the kallikrein concentration and enzymatic activities in seminal plasma of 24 cases with male infertility and compared them to the values of seminalysis. In 10 patients, we measured the kallikrein concentration and activities in the seminal plasma before and after the oral kallikrein treatment.

Materials and methods

This study includes 24 patients with male infer-

tility. Seven (<5mil.) were azoospermia, 7 (5-40mil.) were oligospermia and 10 were normospermia (>40million). Mean ages were 32.8 ± 4.0 years for husbands and 30.6 ± 4.1 for spouses. Two husbands had high ligation of spermatic veins more than 6 months prior to the initiation of kallikrein treatment. Six wives had mild gynecological abnormalities, 4 of them had endometriosis, one had menoxenia and one had uterine insufficiency. Kallikrein^R was orally administered to 24 patients with male infertility at a dose of 90 or 120 KU/day for 16 weeks.

Kallikrein concentration was measured by radioimmunoassay using purified human urinary kallikrein and antibody kindly offered by Dr. Nishimura (Department of 2nd Internal Medicine, Ehime University).

Kininogenase activity was measured by SRL with radioimmunoassay using antibody against bradykinin.

Results

The kallikrein concentration and activity in seminal plasma were measured in 24 patients prior to the kallikrein treatment. They had a

Table 1 Values of correlation ratio between the parameters

	VOLUME	CONC.	MOTIL.	ANOM.	MSD
KC	-0.200	0.462	0.038	-0.073	0.563 *
KA	-0.126	0.497	0.099	0.092	0.593 *

* indicates $p < 0.05$ KC and KA correlate well ($r = 0.812$, $p < 0.01$)

Table 2 Change of seminalysis after kallikrein treatment

	before	after	significance
volume	2.12 ± 1.08	2.13 ± 1.02	n.s.
conc.	36.0 ± 28.8	47.1 ± 29.5	n.s.
anom.	71.0 ± 20.9	66.2 ± 27.2	n.s.
motil.	35.8 ± 22.3	43.6 ± 25.4	n.s.
MSD	13.1 ± 10.2	25.5 ± 23.1	*

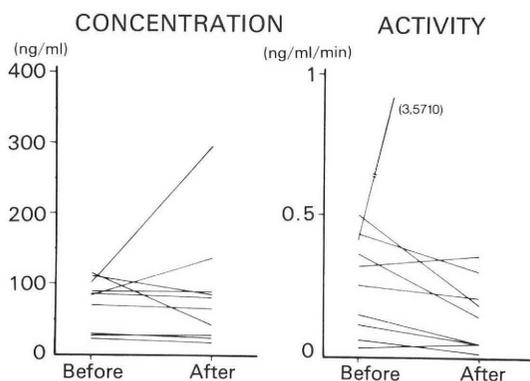
* indicates $p < 0.05$ 

Fig. 1 Concentration and activity of seminal kallikrein before and after the oral kallikrein treatment.

significant correlation to the motile sperm density, while they had no significant correlations to sperm density, motility or abnormality (Table 1). The kallikrein concentration had a very close correlation to the kallikrein activity measured with radioimmunoassay using anti-bradykinin antibody. ($r = 0.812$, $p < 0.01$)

In 24 patients who had kallikrein treatment showed significant improvement of motile sperm density. Sperm concentration or motility ratio were also improved although statistically not significant (Table 2). In 10 patients, kallikrein activities and concentration in seminal plasma were measured before and after the kallikrein treatment (Fig. 1). The kallikrein concentration and activity failed to improve significantly after the kallikrein treatment except for one case, who showed marked increase of kallikrein concentration and activity after that. There was no correlation between the response to the treatment and the initial seminal quality.

Discussion

Following the report by Stüttgen that oral kallikrein treatment increased sperm density in oligospermic patients⁹, many clinical reports have confirmed the favorable effect of kallikrein treatment on male infertility. However, the role of kallikrein-kinin system in male genital organ is still unclear in spite of many experimental investigations. Saitoh reported that seminal kallikrein concentration seemed to have positive correlation to the sperm motility although azospermic patients had significantly high kallikrein concentration in seminal plasma¹⁰. Our data confirmed that kallikrein concentration and activity were positively correlated to the motile sperm density in 24 patients.

In this study 24 patients were treated with oral porcine kallikrein. The motile sperm density, which seems to be the most reliable marker for male infertility, improved significantly after the treatment as well as in many previous reports. The kallikrein concentration and activities, however, did not change significantly after the treatment. This implies that the kallikrein given orally might have no direct effect enhancing the seminal kallikrein content but have indirect ones on the function of male genital organs, possibly improving testicular blood circulation¹¹. As the number of cases were small in this study, we could not have any answer on the question about the indication of the drug, i. e. what types of infertility would respond well? We hope that the kallikrein-kinin system in male genital organs would be clarified more definitely in the future and that appropriate criteria for the indication of kalli-

krein treatment would be applied.

References

- 1) Colpi, G. M., Crosti, C., Parini, A. and Ohnmeiss, H.: A direct action of kallikrein on spermatozoal motility? Acta Eur. Fertil. 17: 279-281, 1986.
- 2) Kamidono, S., Hazama, M., Matsumoto, O., Takada, K.-I., Tomioka, O. and Ishigami, J.: Kallikrein and male subfertility. Usefulness of high-unit kallikrein tablets. Andrologia 13: 108-120, 1981.
- 3) Batterink, G. J., Kremer, J. and Jager, S.: The effect of oral kallikrein treatment on sperm motility in asthenozoospermia.: Int. J. Androl. 6: 173-179, 1983.
- 4) Izzo, P. L., Ganale, D., Bianchi, B., Meschinin, P., Esposito, G., Menchini Fabris, G. F., Fasani, R. and Ohnmeiss, H.: The treatment of male subfertility with kallikrein. Andrologia. 16: 156-161, 1984.
- 5) Mičić, S., Bila, S., Ilić, and Sulović, V.: Treatment of men with oligoasthenozoospermia and asthenozoospermia with kallikrein. Acta Eur. Fertil. 16: 51-54, 1985.
- 6) Saitoh, S., Kumamoto, Y., Ohno, K., Maruta, H., Shimamoto, K. and Iimura, O.: Studies on kallikrein-kinin system in human male sexual organ. III. Studies on effects of kallikrein tablets on male infertile patients. Jap. J. Fert. Ster. 30: 286-292, 1985.
- 7) Hirayama, T., Hasegawa, T., Hiroi, M. and Oda, T.: Effects of high-unit kallikrein on fertilizing capacity for male infertility. Jap. J. Fert. Ster. 32: 391-396, 1987.
- 8) Matsumoto, O., Hazama, M., Takada, K., Tomioka, O., Kamidono, S., Ishigami, J., Kallikrein and Male Infertility: Usefulness of High-unit Kallikrein Tablets. Jap. J. Fert. Ster.

25: 531-539, 1987

- 9) Stüttgen, G.: Cinical substantiation of the effects of kallikrein. Kininogenases-Kallikrein. 1: 189-193, 1973.
- 10) Saitoh, S., Kumamoto, Y., Ohno, K., Maruta, H., Shimamoto, K. and Iimura, O.: Studies on kallikrein-kinin system in human male sexual organ. II. Studies on human seminal kallikrein and ACE. Jap. J. Fert. Ster. 30: 281-285, 1985.
- 11) Saitoh, S.: Studies on kallikrein-kinin system in the male sexual organ. IV. Studies on the action of increasing testicular blood flow with kallikrein. Sapporo Med. J. 55: 381-396, 1986.

男性不妊症における カリクレイン錠の効果

愛媛大学泌尿器科

横山雅好 亀井 修 清家 泰
竹内正文

男性不妊症患者 24 名に対しカリクレイン製剤による治療をおこなった。

精漿中のカリクレイン濃度 (KC) およびカリクレインのキニノゲナーゼ活性 (KA) をそれぞれラジオイムノアッセイにて測定した。この中の 10 名では KC と KA をカリクレイン投与の前後で測定した。KC および KA は運動精子濃度と有意の相関を示した。カリクレイン投与により精漿中の KC および KA に変化は見られなかったが、精液所見および妊孕性は改善された。これらの結果から、カリクレインの治療効果は睾丸の血液循環の改善など間接的なものであることが示唆された。

(受付: 昭和 63 年 2 月 1 日特掲)

クエン酸タモキシフェンによる 特発性男子不妊症の治療

Treatment with Tamoxifen Citrate in Idiopathic Infertility

千葉大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 島崎 淳教授)

布施 秀樹 高原 正信 石井 弘之
Hideki FUSE Masanobu TAKAHARA Hiroyuki ISHII
角谷 秀典 島崎 淳
Hidenori SUMIYA Jun SHIMAZAKI

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

特発性男子不妊症 26 例に対して、クエン酸タモキシフェンを投与した。精子濃度の改善率は 31%、精子運動率のそれは 19% であった。1 例に妻の妊娠をみた。血中テストステロン値の低値のものに精液所見の改善をみた例が多かった。LH ないし FSH の高値のものは、治療に反応しにくかった。治療により血中 LH、FSH、テストステロンおよびエストラジオール値は上昇したが、プロラクチン値は変化しなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 33(3), 671-676, 1988)

緒 言

特発性男子不妊症の治療は、内分泌療法と非内分泌療法に大別できる。最近、前者が後者より優っているとの報告が多い^{1,2)}。以前、当教室で、前者に属するクエン酸タモキシフェンの成績が良好と報告した³⁾。そこで同じ抗エストロゲン剤のクエン酸タモキシフェンを投与し、その治療成績を検討したので報告する。

対象および方法

千葉大学泌尿器科に不妊を主訴に来院し、特発性男子不妊症と診断した患者 26 例を対象とした。無精子症は除外した。

ノルパデックス®(クエン酸タモキシフェン) 20 mg を連日投与した。12 週投与し、投与前後の精液所見、血中 LH、FSH、プロラクチン、テストステロンおよびエストラジオール値の変動を検討した。精液は、5 日以上禁欲させ、用手法にて採取し、室温に 30 分放置後、鏡検に供した。血中ホルモン値の測定はそ

れぞれ H L H “栄研” キット、H F S H “栄研” キット、プロラクチンリアビーズ II キット (ダイナボッド社)、テストステロン I 125 キット (栄研) およびエストラジオール H₃ キット (C I S 社) によった。

治療による精液所見の変化は、飯塚ら⁴⁾による治療効果判定基準により評価した。著効および有効のものを改善群、不変および悪化のものを非改善群とした。

結 果

- 1) 年齢: 26 歳より 41 歳までに分布し、平均 32 歳であった。
- 2) 結婚より来院までの期間: 18 か月から 110 か月であり、平均 48 か月であった。
- 3) 治療前精液所見: 精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の高度乏精子症⁵⁾が 6 例、 $10 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6/\text{ml}$ の中等度乏精子症が 7 例、 $30 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6/\text{ml}$ の軽度乏精子症が 4 例であり、正常精子濃度のものが 9 例と最も多かった。運動率は、ほぼ均等に分布しており、50% 以上の正常運動率を示したのも 4 例あった (Table

Table 1 治療前精液所見

精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子濃度						計
	~10	10~20	20~30	30~40	40~50	50以上	
~10	1	2				1	4
10~20					1	1	2
20~30	3	1		1		1	6
30~40	1	1		1		2	5
40~50		2				3	5
50以上	1		1	1		1	4
計	6	6	1	3	1	9	26

Table 2 治療効果

	精子濃度		計	精子運動率
	$30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上	$30 \times 10^6/\text{ml}$ 未満		
著効 有効	4 1	1 2	5 3	2 3
不変 悪化	1 7	8 2	9 9	17 4
計	13	13	26	26

Table 3 治療効果と血中ホルモン値

	LH	FSH	テストステロン	プロラクチン	エストラジオール
改善群	前 [6.36 ± 1.19] N.S. 12週 [8.82 ± 3.42]	[8.65 ± 4.03] N.S. [9.98 ± 5.04]	[4.42 ± 1.39] P<0.05 [9.45 ± 2.64]	[10.04 ± 3.83] N.S. [9.82 ± 3.93]	[18.86 ± 6.54] P<0.05 [32.71 ± 12.53]
非改善群	前 [6.65 ± 3.78] P<0.05 12週 [12.30 ± 8.46]	[9.33 ± 4.25] N.S. [13.59 ± 9.90]	[6.29 ± 3.28] P<0.05 [10.29 ± 3.91]	[11.18 ± 5.20] N.S. [11.11 ± 5.28]	[17.69 ± 7.54] P<0.05 [30.88 ± 11.37]

1).

4) 治療成績：精子濃度における効果は、精子濃度 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の 13 例のうち 4 例が著効、1 例が有効であり、計 5 例 (39%) が改善した。 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の 13 例では、それぞれ 1 例および 2 例であり、改善例は 3 例 (23%) であった。精子運動率は 26 例中 5 例 (19%) のものが改善した (Table 2)。1 例に妻の妊娠をみたが、精子濃度および運動率ともに不変であった。

5) 治療前後のホルモン値と治療効果：治療前の LH, FSH, プロラクチンおよびエストラジオール値は、いずれも改善群と非改善群とに差をみなかったが、テストステロン値は、改善群のそれが有意に低値を示した (P<0.05) (Table 3)。

治療前 LH 値が高値のものは、改善したものがすくなかった。治療後 26 例中 22 例 (85%) のものが上昇し、治療前に比し、有意に上昇した (P<0.05)。改善群にくらべて、非改善群で高い上昇をみたが、

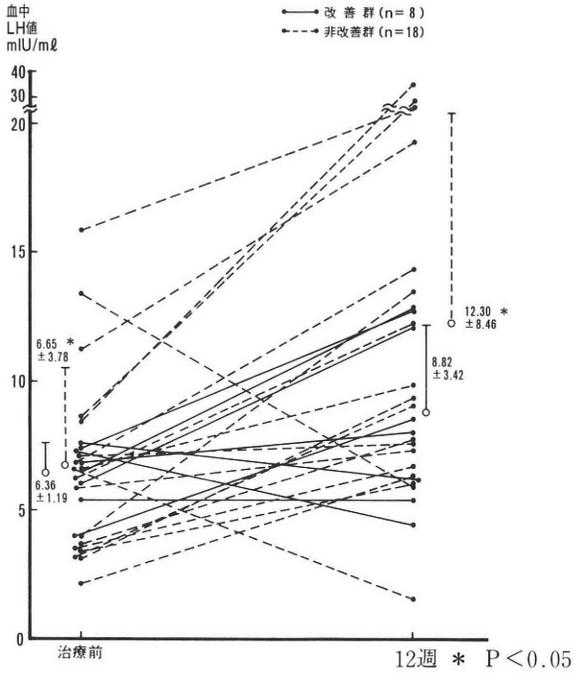


Fig. 1 治療前後の血中 LH 値の変動

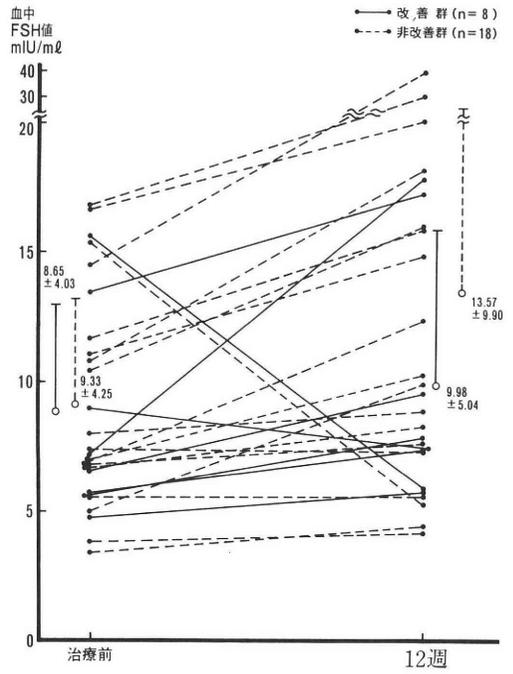


Fig. 2 治療前後の血中 FSH 値の変動

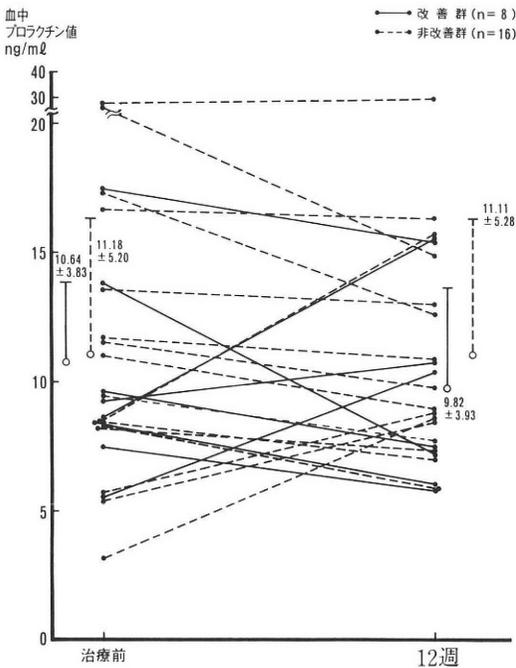


Fig. 3 治療前後の血中プロラクチン値の変動

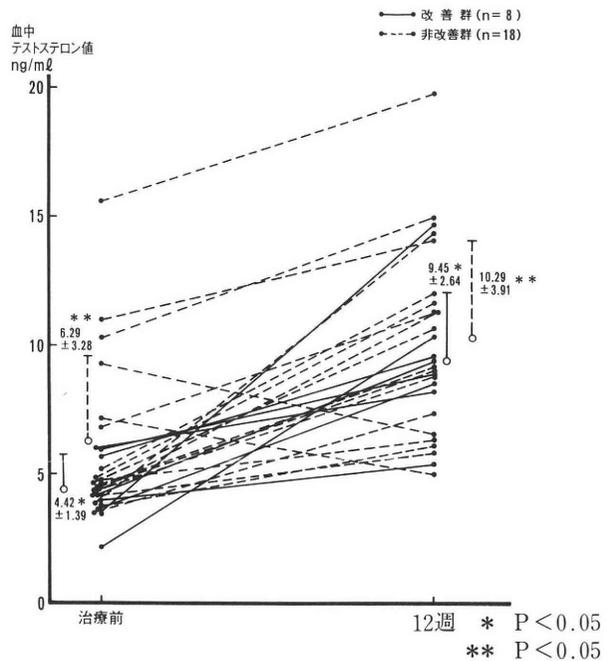


Fig. 4 治療前後の血中テストステロン値の変動

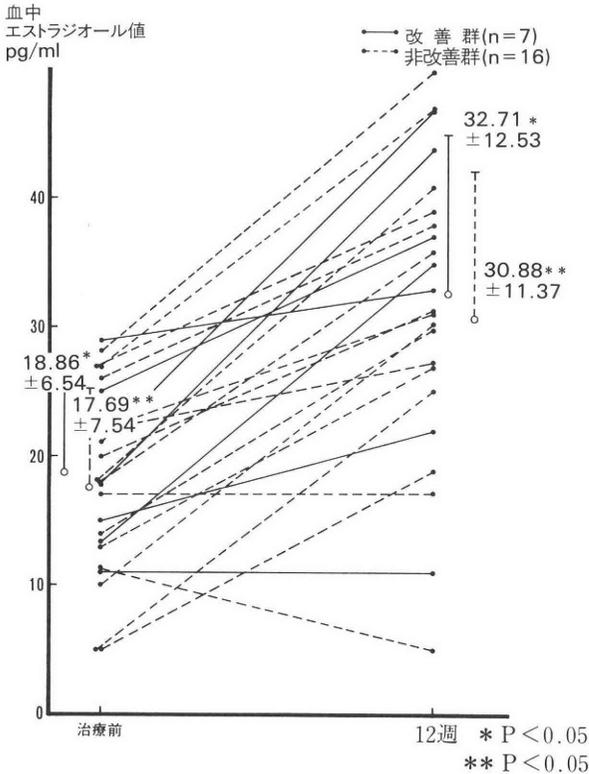


Fig. 5 治療前後の血中エストラジオール値の変動

統計的有意差はなかった (Fig. 1).

治療前 FSH 値の比較的高値のものは改善例が少なかった。治療後 26 例中 21 例 (81%) が FSH 値の上昇をみた。改善例、非改善例で後者の上昇の幅が大であった。(Fig. 2).

プロラクチン値は、治療による変化は少なかった (Fig. 3).

テストステロン値は、治療後、前値の 2 倍となった ($P < 0.05$)。改善群のほうが治療後、高い上昇をみた (Fig. 4).

エストラジオール値もテストステロン値と同様、治療後有意に上昇したが ($P < 0.05$)、改善群と非改善群とに差をみなかった (Fig. 5).

6) 副作用: 1 例に皮膚の発疹をみたが、他に重篤なものをみなかった。

考 案

特発性男子不妊症の内分泌療法として、外因性のゴナドトロピンの補充すなわち hCG ないし hCG, hMG 併用と内因性のゴナドトロピンを高める治療がある。後者としては、従来より抗エストロゲン剤の

クエン酸タモキシフェンが試みられてきた。クエン酸タモキシフェンは、視床下部のレセプター部位にエストロゲンあるいはアンドロゲンと競合して結合するため、ネガティブ・フィードバック機構を阻害し、ゴナドトロピンの分泌を高め、これにより不妊患者の睾丸を刺激することになる⁶⁾。しかし、クエン酸タモキシフェン自体にエストロゲン作用があり、大量投与では、造精機能に悪い影響を及ぼすとされている⁷⁾。今回、試みたクエン酸タモキシフェンは、同じ抗エストロゲン剤であり、その作用機序は、クエン酸タモキシフェンと同様であるが、エストロゲン作用が弱く⁸⁾、クエン酸クロミフェンより有望と考えられている。

1976 年、Comhaire⁹⁾が、はじめて本剤を男子不妊症に試み、良好な成績を報告した。その後も本剤が有効とする治療成績が報告されてきた¹⁰⁻¹⁷⁾。自験例も改善率 30% とほぼ満足できる成績であった。ところが最近、Török ら¹⁸⁾は、本剤の二重盲検試験を行い、その効果をもとめなかったとしており、今後、厳密な判定方式で評価する必要がある。

本剤の投与量は、20 mg とするものが多く、LH, FSH, テストステロンおよびエストラジオールいずれも高値となるとされている^{19,20)}。自験例も本剤 20 mg 投与で 80~90% の例が、これらホルモン値の上昇をみた。一方、5 mg, 10 mg でもホルモン値の変動は、20 mg の場合と差がないとする報告もあり²¹⁾、至適投与量については、今後さらに検討を要する。

本剤の作用機序が内因性のゴナドトロピンの上昇にあるので LH ないし FSH のすでに高値の例は、精液所見の改善は望めないと思われる。自験例でも、これらゴナドトロピンの高い例に精液所見の改善をみたものは少なかった。ゴナドトロピンの上昇している例は、造精機能障害がより高度であると考えられるので、そのことも本剤の治療効果の少ない原因と思われる。

自験例で、治療前にテストステロン値が低値のものが、造精機能の改善をみた。このような例は、テストステロンの不足が造精機能障害に関与している可能性があり、本剤による睾丸内テストステロンの増加が、造精機能の改善を促したものと思われる。

Schill ら¹⁷⁾は、本剤を短期間投与し、FSH の反応をみない例に精液所見の改善をみたとしている。その結果を以下の如く説明している。本剤は、直接セルトリ細胞に働き、インヒビンの合成および分泌を高め、それが下垂体前葉よりの FSH の分泌を抑制する。セルトリ細胞が障害をうけている例は、本剤によるインヒビンの分泌増加をみないため、FSH

の分泌が抑制されず高値となる。このようなセルトリ細胞の機能低下した例は、造精機能の改善が望めない。一方、自験例の如く、FSHの反応性と精液所見の改善とに関係をみないとするもの²²⁾、あるいは逆に、FSHの反応性のよいものに精液所見の改善をみたとするものもあり²³⁾、意見の統一をみない。今後、さらに検討を要するものと思われる。

以上、述べたようなホルモンの所見等により、本剤の対象症例を選択することで、その治療成績がさらに向上するものと思われる。

結 語

特発性男子不妊症 26 例に対してクエン酸タモキシフェンを投与し以下の結果をえた。

- 1) 精子濃度の改善をみたものが 31%、精子運動率は 19% の例で改善した。1 例に妻の妊娠をみた。
- 2) 血中 LH, FSH, テストステロンおよびエストラジオール値は、いずれも治療後、上昇した。血中プロラクチン値は、治療前後で変化なかった。
- 3) 血中テストステロン値の低いものに、精液所見の改善をみた例が多かった。血中 LH ないし FSH 値の高い例は、改善例が少なかった。
- 4) 副作用として 1 例に皮膚発疹をみた。

本論文の要旨は、第 32 回日本不妊学会総会において発表した。

文 献

- 1) Schill, W.-B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility a review. *Andrologia*, 11: 77, 1979.
- 2) Ross, L.S.: Diagnosis and treatment of infertile men: a clinical perspective. *J. Urol.*, 130: 847, 1983.
- 3) 角谷秀典, 川村健二, 伊藤晴夫, 島崎 淳, 村上信乃: 特発性男子不妊症のホルモン療法. *日不妊会誌*, 30: 97, 1985.
- 4) 飯塚理八, 己斐秀豊, 高橋輝雄, 仁科進弘: 男性不妊に対する Vitamedin の効果. *臨婦*, 20: 41, 1966.
- 5) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴夫, 島崎 淳: 男子不妊症の臨床的観察. *日不妊会誌*, 28: 56, 1983.
- 6) Schellen, T. M. C. M.: Clomiphene treatment in male infertility. *Int. J. Fertil.*, 27: 136, 1982.
- 7) Heller, C. G., Rowley, M. J. and Heller, G. U.: Clomiphene citrate: a correlation of its effect on sperm concentration and morphology, total gonadotrophins, ICSH, estrogen and testosterone excretion and testicular cytology in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29: 638, 1968.
- 8) Hemworth, B. M.: Effect of the anti-cancer drug

- tamoxifen on spermatogenesis. *IRCS Med. Sci. Libr. Compend*, 3: 627, 1975.
- 9) Comhaire, F.: Treatment of oligospermia with tamoxifen. *Int. J. Fertility*, 21: 232, 1976.
 - 10) Willis, K. J., London, D. R., Bevis, M. A., Butt, W.R., Lynch, S. S. and Holder, G.: Hormonal effects of tamoxifen in oligospermic men. *J. Endocrinol.*, 73: 171, 1977.
 - 11) Vermeulen, A. and Comhaire, F.: Hormonal effects of an anti-estrogen, tamoxifen, in normal and oligospermic men. *Fertil. Steril.*, 29: 320, 1978.
 - 12) Schill, W. B. and Landthaler, M.: Tamoxifen treatment of oligozoospermia. *Andrologia*, 12: 546, 1980.
 - 13) Traub, A. I. and Thompson, W.: The effect of tamoxifen on spermatogenesis in subfertile men. *Andrologia*, 13: 486, 1981.
 - 14) Bartsch, G. and Schreiber, K.: Tamoxifen treatment in oligospermia. *Europ. Urol.*, 7: 283, 1976.
 - 15) Buvat, J., Gauthier, A., Ardaens, K., Buvat-Herbautet, M. and Lemaire, A.: Effects du tamoxifen sur les hormones et le sperme de 80 sujets oligospermiques et asthenospermiques. *J. Gynec. Obstét. Biol. Reprod.*, 11: 407, 1982.
 - 16) Frajese, G., Amalfitano, M. M., Murgiano, S. and Isidori, A.: Evidence of a possible direct effect of tamoxifen in the treatment of idiopathic oligospermia. *Abstr. Meeting Amer. Soc. Andrology*, 22, 1983.
 - 17) Schill, W. B. and Schillinger, R.: Selection of oligozoospermic men for tamoxifen treatment by an antiestrogen test. *Andrologia*, 19: 266, 1987.
 - 18) Török, L.: Treatment of oligozoospermia with tamoxifen (open and controlled studies). *Andrologia*, 17: 497, 1985.
 - 19) Buvat, J., Ardaens, K., Lemaire, A., Gauthier, A., Gasnault, J. P. and Buvat-Herbaut, M.: Increased sperm count in 25 cases of idiopathic normogonadotropic oligospermia following treatment with tamoxifen. *Fertil. Steril.*, 39: 700, 1983.
 - 20) Schieferstein, G., Adam, W., Armann, J., Bantel, E., Cörlin, R., Egenrieder, H., Fierlbeck, G., Hook, B., Schiek, A., Schubring, G. and Schürer, R.: Therapeutic results with tamoxifen in oligozoospermia II. Hormonal analysis and semen parameters. *Andrologia*, 19: 333, 1987.
 - 21) Dony, J. M. J., Smals, A. G. H., Rolland, R., Fauser, B. C. J. M. and Thomas, C. M. G.: Effect of lower versus higher doses of tamoxifen on pituitary-gonadal function and sperm indices in oligozoospermic men. *Andrologia*, 17: 369, 1985.
 - 22) Schöfer, H., Werner, H. and Milbradt, R.:

Treatment of male subfertility with tamoxifen: prediction of therapeutic efficiency by a short-time therapy test? Abstract No. 63, 4th Internat. Forum of Andrology, June 15-20, 1986, Paris, France.

- 23) Desmond, A. D., Lewis-Jones, D. J. and Machin, D. F.: Experience with tamoxifen in male infertility. Proc. Annual Conference Soc. for the study of Fertility, Bristol, July 13, p121, 1985.

Treatment with tamoxifen citrate in idiopathic infertility

Hideki Fuse, Masanobu Takahara,
Hiroyuki Ishii, Hidenori Sumiya
and Jun Shimazaki

Department of Urology,
School of Medicine,
Chiba University, Chiba

(Director: Prof. J. Shimazaki)

Twenty-six cases of idiopathic male infertility were treated with tamoxifen citrate (20mg oral daily).

Sperm concentration and sperm motility improved in 31% and 19% of the patients, respectively.

Only one patient impregnated his wife following treatment.

Patients with low basal plasma levels of testosterone tended to respond to the treatment. On the other hand, patients with elevated basal plasma levels of LH or FSH did not respond to the treatment.

During the treatment, the plasma levels of LH, FSH, testosterone and estradiol were risen significantly. But the plasma levels of prolactin remained unchanged.

(受付: 昭和 62 年 12 月 11 日)

地方部会講演抄録

第97回日本不妊学会関東地方部会

日時：昭和63年1月30日（土）

場所：武蔵野公会堂

1. 不妊治療における排卵日の推定

——頸管粘液・卵胞径・尿中LH測定と比較

片山恵利子・遠藤勝英・菅原正人
杉山 武・飯田悦郎
(荻窪病院産婦)

自然排卵を有する不妊患者13周期に対し、排卵前後にわたって、頸管粘液（CM）・卵胞径・尿中LH濃度をモニターし、各検査法でどの程度まで排卵を予測しうるか検討した。

①卵胞径：経腔プローブによる連日の観察で、全例排卵を確認できた。しかし、卵胞消失の前日の卵胞径は16～27mm（平均21.3mm）に及び、卵胞径のみでは排卵日の予測の難しい場合もあった。

②CM：大半の症例で排卵前、典型的な結晶を示したが、排卵の3～4日前からCMの変化が持続するため、何日後に排卵するか予測できない場合も多かった。

③尿LH濃度（MS 8001）：モノクローナル抗体を用いた血中LH濃度測定試薬（MS 8001）を尿中LH濃度測定に応用し、早朝尿を連日測定した。全周期において卵胞消失の前日に著明なLH濃度の上昇を認め、排卵の予測が可能であった。

ハイゴナピス：ハイゴナピスによる早朝尿のモニターでは、約半数の症例においてのみ排卵前のLHの上昇の検出が可能であった。

2. Organon LH Color を用いた排卵の予測について

田村 勉・田辺清男・福庭一人
竹原祐志・佐藤陽子・郡山 智
飯塚理八（慶応大産婦）

不妊症領域において、排卵時期を事前に推定することは極めて重要な事である。今回われわれは、試薬の色調の変化を肉眼で判定することにより簡単に尿中LHを測定することができるゾル粒子免疫測定法を用いた「オルガノンLHカラー」を使用する機会を得たので、その臨床的有効性について検討した。本キットの検出感度は50IU/Lであり、30分で判定

可能である。A I HおよびA I D施行予定の婦人17名、延べ27周期の尿を朝夕2回連続採取し、本キットにて判定しタイミングの指標とした。血中LHサージを示した日のLHカラーの陽性率は朝、夕の尿では各々70数%を示し、全体では100%陽性を示した。排卵時期を予測するための本キットによる測定は、人工授精を施行するタイミングを決定するうえで有用であり、特に頸管粘液分泌不全や遅延排卵を呈するような症例においては非常に有用であった。

3. 固相法RIA法による血中E₂測定とその基礎的臨床的検討

岡 親弘・牧野恒久・元山鎮雄
原 崇文・楠 伊吹・飯塚理八
(慶応大産婦)

B/F分離に遠心分離を必要とせず、incubationに37°Cで1時間しか要しないチューブ固相法を用いて正常月経周期をもつ非妊婦人の血中エストラジオール濃度、正常妊娠中およびIVF-ETにおける血中エストラジオール濃度を測定し検討した。

正常月経周期において排卵時約300pg/mlのpeakを示し、妊娠中は初期より漸増し妊娠末期には約28ng/mlを示した。2抗体法測定との相関は卵胞期と黄体期で相関関数はそれぞれ $r=0.92$ 、 $r=0.91$ と良い相関を示し、IVF-ETの2症例では血中エストラジオール濃度は卵胞発育と共に漸増し、排卵時にそれぞれ800pg/ml、3000pg/mlのpeakを示した。

4. 妊娠維持に関わる免疫抑制機構

田中忠夫・周 宜興・篠原洋介
倉島富代・堤 紀夫・伊藤治英
(国立大蔵病院産婦)

胎児のどの細胞にも、母体にとって異物であるHLA抗原が表現されている。にもかかわらず、妊娠は維持される。胎生という現象は、母体に当然生じている異物拒絶反応を克服するもう一つ高度の仕組みがあって、それで成り立っているであろう。

夫リンパ球接種により妊娠の維持に成功した原因不明の習慣流産症例を対象に、免疫調節体の1つである抗イディオタイプ抗体が、母体に誘導されているか否かを検索した。

検索した4例のすべてに、抗HLA抗体の存在の有無にかかわらずMLRを抑制する抗イディオタイ

ブ抗体の存在が認められた。

このことは、原因不明の習慣流産に対する予防法としての母体への夫リンパ球接種の原理が、抗原刺激を強めることにより、妊娠維持にかかわる抗イデオタイプ抗体などの免疫抑制性の機構を増強させる点にあることを示唆している。

5. 精子運動速度の測定法とその臨床的意義

佐藤孝道・児島孝久・小方由美子
(虎の門病院産婦)

精子運動速度の測定法とその意義について、computer automated semen analyzer (以下 CASA) とストロボコープを用いて検討した。ストロボコープは 200msec. 5 回照明とした。その結果、以下のことが明らかとなった。

①精子計算盤上に乗せた精液性状が安定するには約 10 分を要する。

②CASA とストロボコープで測定した精子運動速度には比較的良好な相関 ($r=0.787$) がある。

③精子運動の直進性については、両測定法の間で、相関が認められなかった ($r=0.318$)。

④原精液の精子移動距離 (ストロボコープ) が 24.9 microns/sec. 以下の症例では、妊娠例がなかった。

⑤精子数が 40×10^6 /ml 以上の症例の 29.6% が 24.9 microns/sec. 以下の精子移動距離であったのに対し、 40×10^6 /cc 未満では 58.8% が 24.9 microns/sec. であった。

⑥精子運動率についても 60% 以上と未満では有意の差がみられた。

以上より精子運動速度の測定の臨床的意義は高いと考えられる。

6. 当院不妊外来における AIH の分析

安田撰子・安達知子・岩下光利*
篠崎百合子・大平 篤・武田佳彦
坂元正一*

(東京女子医大産婦*, 同母子総合医療センター)

1984 年 10 月より 1987 年 9 月までの 3 年間に当院不妊外来において一度でも A I H を施行した者 70 例、計 278 回について、その適応、妊娠率、予後等を分析した。これは不妊患者 673 例中 10.4% に相当した。

①妊娠成功例は 14 例 20.0% であり、平均 A I H 回数 3.2 回、13 例 93% が 6 回までに妊娠に至った。

②A I H の適応は Hühner test 陰性、乏精子症、頸管粘液不全、機能性不妊等で、そのうち前 2 者の頻度が高く両者で 75.6% を占めた。

③乏精子症では男性側への治療にもかかわらず、精子数 1300 万/ml 未満では全例妊娠不成功であった。

④A I H 周期外での自然妊娠は 10 例 14.3% に認められた。

⑤A I H 妊娠例の流産率は 28.5% と高い傾向にあった。

A I H 妊娠例の 93% は 6 回までに妊娠している事より、A I H 治療 6 ~ 7 回施行しても妊娠しない症例については、精子 swim up 法および GIFT, IVF-ET 等の治療を行なうべきであると考えられた。

7. 通気・HSG 後の妊娠症例についての検討

成 鑑非・塩津英美・五味淵秀人
三橋直樹・水野正彦
(東大産婦)

以前から通気法・子宮卵管造影施行後に妊娠する症例が多く経験される。われわれは過去 4 年間の当科不妊外来妊娠例 216 名の中で、通気法や子宮卵管造影により妊娠したと思われた症例それぞれ 30 例と 14 例を対象に検討した。通気法後妊娠例はその 70% が検査周期あるいはその次周期に妊娠した。飯塚の分類に準じて波形別頻度をみると、妊娠群もコントロール群も正常型が 80% を占め、原発と続発性不妊群に差異がなかった。しかし癒着型や混合型では妊娠群が有意に高かった。また妊娠群には初圧が高く、内圧が正常な波動と共に漸減するパターンを示す例が有意に多かった。子宮卵管造影後妊娠群は通気後妊娠群と同様、検査周期あるいはその次周期に約 65% が妊娠した。そのうち約 60% は正常所見であった。しかし、癒着あるいは片側閉塞などの所見のある症例も認められた。また通気法で狭窄型、閉塞型と診断された例の中にも子宮卵管造影施行後に妊娠した例が認められた。

8. 当科における子宮外妊娠の保存療法

宇野かおる・横尾郁子・田村 学
児島孝久・曾 栄輝・木村宗昭
堀口雅子・佐藤孝道
(虎の門病院産婦)

昭和 61 年 8 月から 62 年 12 月までの 17 か月間に、17 例の子宮外妊娠 (頸管妊娠を除く) を経験し、うち 15 例の卵管妊娠中 12 例に対し、保存的手術療法を施行した。手術方法は、部分切除端々吻合法が 2 例、切開法が 6 例、圧出法が 1 例、切開々口法が 1 例、部分切除開口法が 2 例であった。その後の転帰としては、1 例に再度の子宮外妊娠、1 例に 2 回の

正常妊娠, また別の1例で手術側の通過性は正常で, 対側の卵管に水腫を認めた。

子宮外妊娠の保存的手術療法に関しては, その後の外妊頻度の上昇というリスクもあり議論の多いところであるが, 体外受精や胚移植法の成功率が安定しているとはいきれない現状では, 1本でも多く通過性のある卵管を残す必要がある。その意味で保存的療法は, 積極的に試みられるべき治療法と考える。

9. Culdoscopic GIFT 法の実際について

久保春海・白井 彰・安部裕司
片山 進・小島栄吉
(東邦大第1産婦)

GIFT法はラパロスコピー下操作をはじめ, ミニラパロトミー法, オープンラパロスコピー法等が行なわれている。また最近, 超音波下採卵後, 子宮鏡下に卵管カラーテルを挿入し, 配偶子を卵管膨大部に送り込む方法も考案されている。われわれはこれ等の技術的難点を克服するため, クルドスコピー下にGIFT法を実施している。クルドスコピー法は皮膚切開, 縫合, ガス気腹などの処置が不要なため, 操作はかなり簡易化され, 気腹ガス(CO₂ etc)による卵子への影響も心配がない。患者への侵襲も少ないため, 静麻下で実施し得る。したがって, 卵子の成熟培養または受精卵を卵管内に移植する方法(New GIFT, IVF-ETR)等の場合にも有効な手段であると考えられる。採卵, 移植操作にはラパロと比較し, 多少の習熟が必要であるが, 採卵後, 移植率, 妊娠率には差を認めなかった。

10. 非イオン化水溶性造影剤イオパミロンによる子宮卵管造影法の試み

松島弘充・浅川真也子・谷垣 学
斉藤真一・百瀬和夫
(東邦大第1産婦)

子宮卵管造影法が婦人科領域に導入されてから, すでに半世紀を越えており, その歴史は造影剤開発の歴史ともいえる。

造影剤も第1・第2世代と発展し, 造影能の面ではほぼ満足されたが, 近年, 副作用の問題が重視され, より安全な造影剤が求められるようになり, 第3世代の造影剤(非イオン性, 低浸透圧性)の誕生となった。

私たちはこの非イオン化水溶性造影剤イオパミドールの子宮卵管造影への応用を試みた。

対象は84例中, 不妊症は62例(74%)で, 子宮

像, 卵管像ともにほぼ全例で良好な造影効果が得られた。また腹腔内流入像においても, 卵管疎通性の診断に関しては, 満足すべき結果を得た。子宮筋腫, 下腹部腫瘍17例でも, 従来のエンドグラフィンと比べて, 遜色のない造影効果が得られ, 発熱・疼痛・悪心嘔吐などの副作用は, 術後PIDの1例を認めたにすぎなかった。

11. HSG における非イオン性造影剤 (Iotrolan) の効果

塩津英美・成鑑非・五味淵秀人
三橋直樹・水野正彦
(東大産婦)

Iotrolanは, その生物学的活性の低下, 等浸透圧化等により, 種々の生体反応を軽減させた非イオン性, ダイマー型脊髓造影剤である。今回われわれは, これをHSGに使用する機会を得たので, 従来汎用されて来た, イオン性造影剤Iodipamideとの比較を含め, その有用性につき検討した。

Iotrolanは, Iodipamideに比べその注入圧は有意に低く, また疼痛自覚の出現頻度も低かった。HSG後の拡散不良例の出現頻度, 卵管描出時の左右差の出現頻度には有意差を認めなかった。以上より, Iodrolanは, 従来HSGにおいて, 大きな障害となっていた疼痛を軽減させ, かつ, その造影, 診断に対しては悪影響を及ぼさない事が推察され, より有用な造影剤である事が認められた。おな今後, その特性からより微細な造影, 診断に対する有用性が期待され, 今後検討していく積りである。

12. 高プロラクチン血症を有しながらBBT上2相性を示した症例

角ゆかり・田辺清男・芝 徹
小西康博・飯塚理八
(慶応大産婦)
小田高久・大野虎之進
(東京歯大市川病院産婦)

高プロラクチン血症を有しながらBBT上2相性を示した3症例について検討を加えた。症例1は, 卵胞期のPRL138ng/ml, 黄体期169ng/ml, 症例2は同様に卵胞期66ng/ml, 黄体期80ng/ml, 症例3は82ng/ml, 110ng/mlで, 症例1と2は正常月経周期であったが, 症例3は周期により遅延排卵あるいは黄体機能不全が認められた。年齢は31~38歳であった。血清とゲルろ過にかけた各フラクションをRIAとBioassayでPRL値を測定した。症例1と2では生物学的活性の低いbig-big PRLの割合が高く,

生物学的活性の高い little PRL の割合が低い、全体の生物学的活性が低くなり、正常月経周期となっていることが推測された。症例 3 では、ゲルろ過のフラクションパターンは正常の場合と似ており、RIA, Bioassay 共に高値であり、臨床経過を考えると、精神的ストレスによる高 PRL 血症の影響が推測された。

13. 高プロラクチン血症が疑われた症例の臨床的検討

石川雅一・川内博人・中原優人
根本玲子・神谷貴之・中居光生
新井正夫 (北里大産婦)

北里大学病院産婦人科における内分泌外来受診患者のうち、初回プロラクチン (PRL) 値が 20 ng/ml 以上を呈した高 PRL 血症 233 例について報告した。受診時の主訴では、続発無月経を含む月経異常が 53.5% と最も多かった。原因別頻度は特発性が 41% と最多で、次いで薬剤性、一過性、腺腫性、産褥性の順であった。初回 PRL 値と原因別分類の関係では、PRL 値 50 ng/ml 未満では特発性、一過性が多く、50 ng/ml 以上では薬剤性、腺腫性の頻度が高かった。産褥性は全例 PRL 値 200 ng/ml 未満であり、1000 ng/ml 以上は腺腫性のみ認められた。乳汁分泌は PRL 値 50 ng/ml 未満では出現頻度は少なく (24%)、50 ng/ml 以上で高頻度 (71%) に認められた。下垂体腺腫の検索はトルコ鞍 X 線単純撮影、CTscan, NMRscan により行なわれ、PRL 値 200 ng/ml 以上で 14 例中 8 例 (57.1%) と高率に認められた。

14. 3 種の HMG 製剤による排卵誘発の比較検討 (同一症例での検討)

長尾 充・松本和紀・久志本建
(町田市市民病院産婦)
近藤正樹 (近藤産婦)
許山浩二・川勝雅秀・渡辺直生
楠原浩二・寺島芳輝
(慈恵大産婦)

近年、HMG 療法が広く行なわれ効果を上げていく一方、副作用 (OHSS 等) の頻度が高いなどの問題点もしばしば指摘されている。

今回われわれは、4 例の視床下部性 II° 無月経と 1 例の PCO 患者に対して、FSH/LH 比が高く、LH 活性の少ないとされている日研 HMG を含めた 3 種の HMG 製剤を同一症例に対し、各周期毎に順次投与し周期間の排卵率、HMG 製剤の総投与量、副作

用の発現率等を比較検討した。成績は、視床下部性 II° 無月経患者に 3 剤の差は認められなかったが、1 例のみであるが PCO 症例では排卵率は差がないものの、OHSS 発症率は日研 HMG が他 2 剤に比し低かった。以上より日研 HMG は排卵率に明らかな差は認められないが、OHSS の発症率は低く、PCO 症例の排卵誘発法として、今後大いに期待できると考えられる。

15. HMG による家兎の過排卵誘起に関する検討

山海 直・谷本仁子・金山喜一
遠藤 克・佐久間勇次
(日大農獣医獣医生理)

【目的】家兎の過排卵誘起は、一般に PMSG や FSH を 3~5 日間にわたり皮下投与する方法が試みられているが、これら連続投与方法は煩雑であり排卵数に大きな個体差がみられる。演者らは、PMSG の静脈内 1 回投与方法およびグリセリンを溶媒とした FSH の皮下投与方法による簡便確実な家兎の過排卵誘起法を考案した。今回は、排卵誘発剤としてヒトに用いられている HMG の静脈内 1 回投与と 3 日間皮下投与による過排卵の誘起を試みた。

【方法】供試家兎は、日本白色種 38 例で購入後 1 か月以上の予備飼育を行ない、体重が 2.8~3.0 kg のものを用いた。HMG の静脈内 1 回投与の投与量は 15, 25, 50, 75 および 100iu とした。その後 72 時間目に複数の雄と交配し、直後に hCG75iu を静脈内投与した。交配後 30 時間目に開腹して、排卵点数、未破裂卵胞数および出血卵胞数について観察し、さらに、卵管および子宮を摘出灌流して回収卵子数、分割像による受精について観察した。また、HMG の皮下投与は、10, 20, 30 および 40iu を 1 日 1 回 3 日間皮下投与して、最終投与から 24 時間目に雄と交配し、同様に検討を試みた。

【結果】静脈内 1 回投与区における排卵数は、15, 25, 50, 75 および 100iu で、12.2, 8.0, 14.8, 18.8 および 9.8 個であり、15 個以上の過排卵個体は、1/5, 1/5, 3/5, 0/5 および 0/4 であった。また、受精率は 56.4, 36.4, 37.5 および 0% であった。なお、HMG の LH 作用による排卵点は 2.8, 5.4, 7.6, 8.4 および 7.5 個であった。未破裂卵胞数は、8.4, 11.2, 12.8, 12.4 および 13.0 個、出血卵胞数は、5.0, 1.4, 6.2, 12.2 および 6.0 個であった。1 日 1 回 3 日間の連続皮下投与区における排卵数は、34.3, 70.5, 77.8 および 59.5 であり、15 個以上の過排卵個体が供試 14 例の全例に認められた。受精率は 73.9~94.1% と高率であった。30iu × 3 日の試験区で 97 個の排卵点を認め

たものもあった。なお、HMGのLH様作用による排卵個体は1例も認められなかった。

以上のように、HMGを用いて家兎に過排卵を誘起することができたが、HMGを静脈内に1回投与する方法より、1日1回3日間連続皮下投与する方法が排卵数、受精率ともに優れており、従来の方法に代わる最も有効な家兎の過排卵誘起方法となり得る可能性が示唆された。

16. マウス2細胞期胚から得られた分離胚の移植成績

中山克彦・亀山祐一・石島芳郎
(東農大家畜繁殖)

われわれは簡単に割球を分離することができるEDTAを用いて、マウス2細胞期胚を分離し、一卵性双子を作出する研究を進めており、すでに分離された割球は体外培養により高率に胚盤胞まで発育すること、さらにそれらの胚を移植することを報告した(哺乳卵研誌, 3(2), 1986, 4(1), 1987)。今回、移植法を検討し、双子を含む産子を得るのに成功したので報告する。分離胚はCF#1×C57BLおよびF₁×C57BLの2細胞期胚を用いレシピエントにはCF#1雌を用いた。1対の分離胚をレシピエントに移植した結果、1対の双子を含む計4匹の産子が得られたが、妊娠率は芳しくなかった。妊娠率を上げるため、1対の分離胚を無処理の培養胚(CF#1胚)8個とともに移植した結果、妊娠率が改善され、2対の双子を含む計6匹の産子が得られた。さらに正常に妊娠した雌に1対の分離胚を移植した結果、1対の双子を含む計9匹の胎子が得られたが、移植により正常な妊娠が阻害される傾向にあった。以上のことから、分離胚に移植して産子を得るには、無処理胚と複合的に移植する方法が無難なように思われた。

17. 過排卵処理マウスの妊娠後半期の胎子生存に及ぼすプロラクチンおよびhCGの影響

石島芳郎(東農大家畜繁殖)

過排卵処理マウスを妊娠させた場合、妊娠中・後期に胎子死亡が高率に起こることが知られている。この改善策として、伊藤ら(1976)は妊娠初期にプロラクチンを投与し、その後にhCGを追注するのが有効なことを報告しており、さらに種市ら(1986)は、hCGに変えてプロジェステロンの追注でも良いことを明らかにしている。本研究では、過排卵処理マウスの妊娠後期の胎子死亡をプロラクチンまたはhCG単独の投与で改善できないかどうか検討した。

C F # 1 系マウスの雌にPMSG5IU, 48時間後hCG5IUの過排卵処理を行ない、直後交配したものを供試した。プロラクチンは日量5IU, hCGは日量3IUを妊娠の11, 12, および13日, 14, 15および16日, または17, 18, 19日に投与し, 妊娠18または19日の胎子生存率を過排卵対照区と比較した。その結果, 妊娠11, 12および13日に投与したプロラクチンおよびhCGは胎子死亡率を改善できなかったが, 14, 15および16日ならびに17, 18, 19日に投与した場合は両ホルモンともに胎子死亡を改善する傾向が認められた。

シンポジウム

「開業医レベルより見た不妊症検査」

I. 精液検査, フーナートテスト

佐藤博久(立川共済病院)

不妊症のうちに占める男性不妊の割合は約30~40%と高く、精液検査は男性不妊の診断に際して最も重要な検査である。通常、4日間の禁欲期間をおいて用手的(マスターベーション)に採取し、精液量、精子濃度、精子運動率そして奇形率等を検査する。検査は射精後1時間以内に行なうのが理想的であり、診断は2回以上の検査で総合的に行なうことが重要である。

フーナートテストはBBT、頸管粘液、膣スミア等を事前に検査し排卵期に合わせて行なう。性交後3時間程で検査できるよう来院し、膣内、頸管内、そして子宮腔内の3か所採取する。頸管以上での運動精子の割合で結果を判定するが、2回以上行なった結果いずれも不良のとき陰性と判断する。精液検査とフーナートテストの臨床的意義をA I Hの成績から検討した。134例の検査異常例で45例(33.6%)がA I Hで妊娠したが、この間における自然妊娠は5例(3.7%)であり、不妊検査における精液検査とフーナートテストの重要性が示された。

II. 超音波断層検査(経膣プローブ)

渡辺 拡(公立阿伎留病院産婦)

最近普及しつつある経膣プローブについて実際の検査手順と、有効な検査対象例を紹介し、経膣プローブの利点欠点についても述べた。利点としては、①膀胱充満法が不要で直ちに検査可能、②近距離の描出が細部も鮮明、③穿刺アプローチが短い、などがあり、一方欠点としては、①有効視野範囲が狭い、②女性合助者が必要、③副障害について統一見解がない、などがある。もちろん内診台を使えないものや、大量出血時などは使用困難である。使用当初は、

画像の理解に多少時間を要しても、卵胞発育の経時的観察や卵胞穿刺など不妊治療に果たす重要な役割りはもとより、前置胎盤や子宮外妊娠、また流産などの診断にも極めて有効であり、今後ますます普及してゆくものと思われる。

III. バルーン式子宮卵管通気、造影法

中村幸雄 (杏林大産婦)

用いるバルーンカテーテルは、小児用の Foley カテーテル (No.8~12) である。まずスコ腔鏡をかけ、消毒後ピンセットでバルーンを子宮腔内に挿入する。通常は何等抵抗なくスルスルと挿入可能である。挿入困難の場合は、マルチン単鉤鉗子をかけて子宮腔部を固定しながら挿入すると容易に入る。どうしても挿入困難の場合は、特製のマンドリンをバルーンに入れて、挿入する。カテーテル挿入後、水 1.5~2 ml をバルーン内に注入して、ふくらませ、手前に引きながら内子宮口を閉鎖しつつ、造影剤(またはガス、薬剤)を注入する。造影剤としては、ヨードテスト不要のリビヨドールウルトラフルイドを用いている。本法の長所は、①疼痛が従来の方法にくらべ極めて少ない、②操作が容易、③もれが少ない。陳旧頸管裂傷のため従来の方法でもれが多い症例にも、用いうる、④通気、通水、子宮卵管造影法が同一の方法で行ないうる等が挙げられる。

IV. 子宮内膜検査 (Endometriogram)

安藤一道・水沼英樹・伊吹令人
五十嵐正雄 (群馬大産婦)

子宮内膜検査は、黄体機能不全の診断に必要な不可欠な検査である。この検査の実施方法および時期については、若干議論の分かれるところであるが、当科では、高温相 5~7 日目の着床期に、頸管拡張をせず無麻酔で、子宮底部に近い前壁または側壁より一部採取している。今回のテーマである Endometriogram は、Noyes らの子宮内膜日付診断の基準を参考に、1967 年、五十嵐により自動的かつ客観的に診断する目的で考案されたものである。月経周期における正常子宮内膜の特徴的組織所見を供覧後、具体的な Endometriogram の利用法について説明する。なお、子宮内膜検査を実施するにあたり、正確な排卵日の把握が前提条件となり、このためには血中 LH surge の把握が理想的である。最後に、Johannisson らの子宮内膜の形態学的分析を参考に、腺細胞について検討した結果、核下空胞の割合が血中 LH surge から 7 日目以後に急減し、日付診断に有用であることが示唆された。

V. 尿中ホルモン測定

野嶽幸正 (昭和大産婦)

不妊診療に用いられる尿中ホルモン測定法を排卵の予測を中心に臨床応用を検討した。

不妊診療中の 29 例につき同時検査した血中 LH サージを排卵予測上 0 日として基準にした。

尿中エストロゲン (E) と尿中 LH については外来で使える簡易測定法が実用化されている。

尿中 E 値 (ハイモニター E) は血中 LH サージと一致する増加パターンを示した。

尿中 LH 値 (カラーテストによる) は、LH サージの前後陽性率が增加するが、個々の症例では陽性の持続日数が一致せず LH サージを予測しにくい。

尿中プレグナンダイオール値は血中プロテストロンのピークに 1 週間遅れて黄体期後半に増加する。

血中 LH サージとの一致率で排卵を予測すると、尿中 E のピークを利用すれば 71% であるが、基礎体温の変化、頸管粘液シグネ結晶出現、尿中 E のピーク、尿中 LH カラーテスト陽性の 4 因子を組合せ、基礎体温の変化を前提として他の 2 因子が確認されると LH サージとの一致率は 75% となる。

VI. 血中ホルモン測定

堤 治 (東京大産婦)

不妊症診療において、血中ホルモン測定は、治療方針の決定やその効果判定のために重要な日常検査である。東大産婦人科不妊外来では、全例に月経周期第 5 日目の血中 LH、FSH、プロラクチン (PRL) 基礎値測定を行なう。基礎値に異常ある時 (LH \geq 30iu/ml, FSH \geq 25iu/ml) または卵巣機能不全の疑いのある時は、LH-RH test を加える。Low-well, low-poor, high-well あるいは単独高 LH 血症 (PCO) に分類判定し、個別的に治療方針を立てる。PRL 基礎値 25 ng/ml 以上は高 PRL 血症としてパロデルの投与を行なう。20~25 ng/ml では TRH test の結果、高反応であればパロデルを投与する。BBT 高温期 (7 日目) に、エストラジオール (E₂)、プロゲステロン (P) 測定し、黄体機能の評価を行なう。P が 10 ng/ml 未満を黄体機能不全の目安とし、治療の適応とする。クロミフェン、hMG 等の投与で P 値は上昇し、治療効果の指標にもなる。刺激周期ごとに hMG-hCG では P/E 比が減少し、妊娠予後との相関に興味が持たれている。

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名に従うこと。特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に入れて括弧で囲む、すなわち
著者名：題名、誌名、巻数(号数)：ページ数、

年次

- 例1. Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy. Amer. J. Obstet. Gynec. 25: 104, 1933
 2. 足高善雄, 竹村 喬, 美並義博: 最近1カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察, 日不妊誌, 4: 13, 1956
- b. 単行本の場合
著者名：題名、巻数：ページ数、発行所、年次
- 例1. Rovinsky, J. J. and Guttmacher, A. F.: Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy, ed 2: p68, 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)アイシーエス企画内 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62年9月)

ランニング・タイトル(和文で25字以内、英文では40 letters以内)を記載してください。(昭和63年1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	

事務局からのお知らせ

日本不妊学会の業務委託をしている(株)国際会議事務局の社名が(株)アイシーエス企画と変わりました。従って日本不妊学会事務局の住所は下記のとおりになります。

社団法人 日本不妊学会
〒103 東京都中央区日本橋2-14-9
加商ビル (株) アイシーエス企画内
(Tel. 03-272-7077)

日本不妊学会雑誌 33 卷 3号

昭和63年6月25日印刷
昭和63年7月1日発行

編集兼発行者	飯塚理八
印刷者	安永修
印刷所	東京都文京区関口1-43-5 有限会社ルーブ社
発行所	東京都文京区関口1-43-5 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) アイシーエス企画内 Tel (03) 272-7077 振替口座番号 東京 7-93207