9-24

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 34 No. 1
January
1989

日本不妊学会雑誌

第34巻 第1号
1989年1月1日

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

会　　告

第34回日本不妊学会総会および学術講演会
(第2回予告)

第34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ご参加をお願い申し上げます．

日時・会場

学術集会　　1989年9月2日（土），3日（日）……旭川市民文化会館
理事会・幹事会　1989年9月1日（金）……ニュー北海ホテル
総会・評議員会　1989年9月2日（土）……旭川市民文化会館
旭川市民文化会館　〒070 旭川市8条通9丁目　TEL 0166－25－7331
ニュー北海ホテル　〒070 旭川市5条通6丁目　TEL 0166－24－3111

学術講演会

本講演会では，招請講演，理事長講演，特別講演，シンポジウム，一般講演などを行う予定です．シンポジウムの詳細については，追ってお知らせいたします．

一般講演には，多数の演題をお申込み下さいますようお願い申し上げます．なお今回も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，**倫理規定を厳守して下さい．**

また**締切期日**が例年より早くなっておりますので，ご留意下さるようお願いいたします．

Ⅰ．招請講演

性機能と成長因子
水野正彦教授（東京大学産婦人科）
座長　坂元正一教授（東京女子医科大学母子総合医療センター）

Ⅱ．理事長講演

Insemination から IVF へ――昨日，今日，明日――
飯塚理八教授（慶應義塾大学産婦人科）
座長　黒田一秀名誉教授（日本不妊学会名誉会員）

Ⅲ．特別講演

1．排卵におけるリン脂質代謝産物の意義
石川睦男助教授（旭川医科大学産婦人科）
座長　藤本征一郎教授（北海道大学産婦人科）

2．神経内分泌学的にみた不妊症の基礎と臨床
川越慎之助講師（山形大学産婦人科）
座長　高木繁夫教授（日本大学産婦人科）

3．男性における受胎調節——造精機能の人為的制御
瀧原博史講師（山口大学泌尿器科）
座長　守殿貞夫教授（神戸大学泌尿器科）

IV．シンポジウム

不妊治療法の限界とその対応
座長 ┌八神喜昭教授（名古屋市立大学産婦人科）
　　 ├島崎　淳教授（千葉大学泌尿器科）
　　 └入谷　明教授（京都大学農学部）

V．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，1989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またはワープロで打ち書留郵便にて下記へお送り下さい．
〒078　旭川市西神楽4－5
旭川医科大学産婦人科学教室内
第34回日本不妊学会事務局
（担当：石川睦男）
TEL (0166)65－2111　㊥ 2562, 2560, 2561
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，**必ず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：**1989年4月30日（必着）**

演題発表方法

講演時間は7分，討論時間は3分の予定です．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．また発表形式(口演，ポスター)の最終決定は事務局にご一任願います．ポスターボードの大きさや討議方法などについては，後日，採用者にご連絡いたします．

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日の終了後に旭川市ニュー北海ホテルで行います．

1989年1月
第34回　日本不妊学会
会長　清水哲也

昭和63年度第2回通常総会

昭和63年度第2回通常総会は下記の如く京都市において開催され，石神理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採決を行った．

日　時　　昭和63年11月15日(火)　12時50分～13時20分
場　所　　京都市　国立京都国際会館
開会当時の会員数　　3398名
当日の出席会員数　　1794名（含委任状1295）

議　事

第1号議案　名誉会員推薦の件

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

第2号議案　役員改選の件

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

第3号議案　評議員改選の件

定款第19条に定める評議員の支部別定数については理事会，評議員会の原案通り下記の如く定めることを全員一致で承認した．

北海道支部　5名，東北支部　4名，中部支部　5名，北陸支部　4名
関西支部　8名，中国・四国支部　5名，九州支部　8名，関東支部　16名

第4号議案，次々期学術講演会および総会に関する件

1990年度学術講演会および総会は理事会，評議員会の原案通り，下記の如く開催することを全員一致で承認した．

担当支部　　関東支部
会　長　　島崎　淳
開催地　　千葉市

新名誉会員および新役員について

11月15日開催された昭和63年度第2回通常総会において次の7名の方々が新たに名誉会員として推薦，承認された．また役員(理事および監事)の改選が行われたので，11月16日新理事会を開き，互選により下記の如く理事長，副理事長，常任理事を選出するとともに，新評議員および幹事を選任した．

名誉会員

黒田一秀(北海道支部)，安藤弘(関東支部)，斎藤幹(関東支部)
高嶺浩(関東支部)，三矢英輔(中部支部)，石神襄次(関西支部)
蘭守龍雄(関西支部)

理事

理事長	飯塚理八	(関東支部)
副理事長	入谷明	(関西支部)
〃	島崎淳	(関東支部)
〃	高木繁夫	(〃)
理事(常任)	荒井清	(〃)
〃 (〃)	石島芳郎	(〃)
〃 (〃)	五十嵐正雄	(〃)
〃 (〃)	佐久間勇次	(〃)
〃 (〃)	水野正彦	(〃)
〃 (〃)	白井将文	(〃)
〃 (〃)	百瀬和夫	(〃)
〃 (〃)	清水哲也	(北海道支部)
〃 (〃)	森崇英	(関西支部)
〃 (〃)	久住治男	(北陸支部)
〃	友吉唯夫	(関西支部)
〃	広井正彦	(東北支部)
〃	八神喜昭	(中部支部)
〃	青野敏博	(中国四国支部)
〃	中野仁雄	(九州支部)
〃	永田行博	(〃)

監事

酒徳治三郎	(中国四国支部)
木下佐	(関東支部)
坂元正一	(〃)

本部評議員

北海道支部

金川弘司	河田啓一郎	熊本悦明	橋本正淑
藤本征一郎			

東北支部

折笠精一	高橋克幸	平野睦男	正木淳二

関東支部

阿曽佳郎	石田一夫	今村一男	岩崎寛和
大島博幸	大地隆温	高見沢裕吉	竹内正七
玉田太朗	寺島芳輝	中原達夫	浜田宏
藤井明和	町田豊平	毛利秀雄	矢内原巧

中部支部

川島吉良	杉山陽一	友田豊	福田透
三宅弘治			

北陸支部

泉徳和	片山喬	舘野政也	富永敏朗

関西支部

礒島晋三	岡田弘二	守殿貞夫	樋木勇
杉本修	谷沢修	森純一	吉田修

中国・四国支部

大森弘之	関場香	竹中生昌	堤義雄
前田一雄			

九州支部

大井好忠	岡村均	古賀脩	杉森甫
立山浩道	中山道男	宮川勇生	山辺徹

なお、本部評議員上記55名については，1989年1月1日より1990年12月31日まで評議員を委嘱します。本誌面をもって委嘱状とさせていただきます。また，支部評議員については，次号（34巻2号）に掲載致します。

幹　事

味香勝也　伊藤晴夫　打林忠雄　内海恭三
遠藤克己　岡田清己　鎌田正晴　守殿貞夫
楠原浩二　小林俊文　田中昭一　津端捷夫
堂地勉　百目鬼郁男　野田洋一　花田征治
平川舜　平野睦男　穂坂正彦　三橋直樹
毛利秀雄　矢内原巧

日本不妊学会誌

第34巻　第1号

1989年1月1日

——目　　次——

原　著

HMG-hCG 療法に対する Bromocriptine 併用の効果 ……友成廉平・他 …… 1
交配後6½日を経た家兎子宮内膜短期培養細胞における形態学的観察……立山一郎・他 …… 6
当科における不妊婦人に対する手術成績の検討……田中俊誠 …… 16
GIFT 用機器の開発とその成績……太田博孝・他 …… 21
酸素濃度の初期胚発育に及ぼす影響
——2-cell block との関連について—— ……竹内一浩・他 …… 26
Early Pregnancy Factor の産生機序と不妊症診断への
応用に関する研究……伊藤仁彦 …… 29
抗 Progesterone 剤 RU 486 の妊娠ラットに及ぼす影響について ……辻井　孝 …… 37
Deoxyribonucleic Acid α-Nucleotidyltransferase has two Forms
and 8.4s Deoxyribonucleic Acid α-Nucleotidyltransferase-Primase
Complex Synthesizes Deoxyribonucleic Acid on
Single-Stranded Deoxyribonucleic Acid of Bacteriophage fd ……S. Usuki …… 47
Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Causes Inducement of
DNA Polymerase α Activity and
Sequential DNA Synthesis During Cell Proliferation in
Immature Rat Ovaries ……S. Kubota et al. …… 56
ヒト妊娠初期脱落膜由来腺上皮細胞株と間質細胞株の
樹立とその性状……松本和紀・他 …… 62
LH 含量の異なる HMG 製剤を用いた排卵誘発成績の比較検討……藤田善子・他 …… 68
Decreased Thyrotropin Response to Metoclopramide in
Women with Hypothalamic Amenorrhea ……K. Seki & K. Kato …… 73
稀発月経を主訴とした11β-hydroxylase 部分欠損による
高アンドロゲン血症の1例……浅井光興・他 …… 76
多嚢胞性卵巣（PCOD）に対する異なる hMG 製剤の
排卵誘発効果の比較……楠原浩二・他 …… 80
腹腔鏡による子宮奇形の診断に関する検討……山崎裕行・他 …… 87
腹腔鏡により診断された Fitz-Hugh-Curtis 症候群の1例 ……土岐利彦・他 …… 92
当教室における不妊クリニック患者の推移……川口とし子・他 …… 96
精子機能テストとしての hypoosmotic swelling test と
一般精液検査との関連性について……吉野和男・他 ……101

ブタ精巣上体管腔内液のペントースサイクル……伊藤元博・他 ……107
ハムスターテストと Hypoosmotic swelling test との関連性について……高橋健太郎・他 ……113
Percoll 攪拌密度勾配法による選択精子性状の検討 ……高橋正明・他 ……119
ウシ頸管粘液（Penetrak）を用いたヒト精子機能の評価 ……中島敬和・他 ……126
乏精子症患者精子の精子機能に関する検討
——ヒト・ウシ頸管粘液内通過能ならびに
透明帯除去ハムスター卵による受精能について——……伊熊健一郎・他 ……134
Kallmann 症候群……布施秀樹・他 ……142
糖尿病患者にみられた精管の石灰化陰影……浜口毅樹・他 ……148
精子無力症における精子の微細構造について．
第4報．短尾精子症と思われた5例について……佐藤和宏・他 ……152
男子不妊症精液検査に於ける PENETRAK®の検討……伊藤直樹・他 ……159
Gossypol によるヒト精漿中乳酸脱水素酵素
—C_4 (LDH-C_4) 活性への影響についての検討 ……内島　豊・他 ……165
加令に伴う精巣の組織学的変化……柳　重行・他 ……169
Induction of the Acrosome Reaction of Hamster Sperm Cells
by the Membrane Mobility Agent, A2C, and Suppression
by the Disulfide Reducing Agent, Dithiothreitol……K. Sato ……175
地方部会講演抄録……180

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 34, No.1, 1989)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

Clinical Study on the Efficacy of Bromocriptine-hMG Combination Therapy for Induction of Ovulation ····· *R. Tomonari, R. Matsuoka, M. Tomonari, J. Yoshimatsu & H. Mori* ····· 1

Morphological Observations on Short-term Cultured Endometrial Cells from Rabbits at 6 ½ Days after Mating ····· *I. Takeyama, T. Mori, T. Tominaga & N. Kamitani* ····· 6

Results of Operations for Women with Sterility in Our Clinic ····· *T. Tanaka, M. Kume, H. Satoh, S. Moriya, N. Sakuragi & S. Fujimoto* ····· 16

Development of New Instruments for Gamete Intrafallopian Transfer and its Results ····· *H. Ota, M. Fukushima, H. Kodama & M. Maki* ····· 21

The Effect of Oxygen on the Development of Early Mouse Embryo *in Vitro* ····· *K. Takeuchi S. Yamamoto, A. Mori & Y. Nagata* ····· 26

Study on Early Pregnancy Factor: Mechanism of Production and its Clinical Application as a Diagnostic Method for Infertility ····· *K. Itoh* ····· 29

Effects of the Antigestagenic Agent RU 486 in Pregnant Rats ····· *T. Tsujii* ····· 37

Deoxyribonucleic Acid α-Nucleotidyltransferase has Two forms and 8.4S Deoxyribonucleic Acid α-Nucleotidyltransferase-primase Complex Synthesizes Deoxyribonucleic Acid on Single-Stranded Deoxyribonucleic Acid of Bacteriophage fd ····· *S. Usuki* ····· 47

Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Causes Inducement of DNA Polymerase α Activity and Sequential DNA Synthesis During Cell Proliferation in Immature rat Ovaries ····· *S. Kubota, Y. Ichikawa & S. Usuki* ····· 56

Establishment and Analysis of Property of Glandular Epithelial Cell Line and Stromal Cell Line Derived from Human Decidua of First Trimester ····· *K. Matsumoto, K. Kusuhara, Y. Odawara, N. Watanabe, H. Motoyama & M. Kawakatsu* ····· 62

Comparison of Effects of Three HMG Preparations with Different LH Contents on Ovulation Induction ····· *Y. Fujita, K. Tasaka, A. Miyake & O. Tanizawa* ····· 68

Decreased Thyrotropin Response to Metoclopramide in Women with Hypothalamic Amenorrhea ····· *K. Seki & K. Kato* ····· 73

An Oligomenorrheic Case of Hyperandrogenemia due to Partial 11β-Hydroxylase Deficiency ····· *M. Asai, I. Yamamuro & K. Higashide* ····· 76

Induction of Ovulation with Different Kinds of Human Menopausal Gonadotropins in Women with Polycystic Ovarian Disease ····· *K. Kusuhara, N. Watanabe, M. Kawakatsu, H. Motoyama, K. Mastumoto, Y. Odawara, K. Ochiai, A. Okamoto & Y. Terashima* ····· 80

Laparoscopic Diagnosis of Uterine Anomalies ····· *H. Yamasaki, K. Takahashi, A. Uchida, K. Yoshino, M. Kusakari & M. Kitao* ····· 87

A Case of Fitz-Hugh-Curtis Syndrome Diagnosed by Laparoscopy ····· *T. Toki, W. Chan, Y. Wada & H. Hoshiai* ····· 92

The Shifts and Changes of Infertile Patients in Our Clinic ····· *T. Kawaguchi, T. Suzuki, K. Asukai, K. Shirasu, T. Suzuki, Y. Kawai, M. Taga T. Uemura & H. Minaguchi* ····· 96

Correlation Between Data on the Routine Semen Analysis and the Hypoosmotic Swelling Test ····· *K. Yoshino, K. Takahashi M. Kusakari, A. Uchida, T. Shirai, A. Nishigaki, H. Yamasaki & M. Kitao* ·····101

Pentose Phosphate Cycle in the Boar Epididymal Fluid ····· *M. Ito, I. Atobe, H. Watanabe & H. Amano* ·····107

Correlation between the Zona-free Hamster Egg Human Sperm Penetration Test and the Human Sperm Hypoosmotic Swelling Test ····· *K. Takahashi, M. Kusakari, A. Uchida, H. Yamasaki, T. Shirai, K. Yoshino & M. Kitao* ·····113

Characterization of the Selected Spermatozoa by Means of the Simplified Percoll Density Gradient Stirring Method ····· *M. Takahashi, H. Ishikawa, Y. Yamamoto, S. Morikawa, M. Ochi, H. Chihara, T. Nagata & K. Kometani* ·····119

Evaluation of Human Sperm Function with Bovine Cervical Mucus (PENETRAK) ····· *Y. Nakajima H. Mizunuma, T. Utsugi, Y. Ibuki & M. Igarashi* ·····126

Sperm Function in Cases of Oligozoospermia: Evaluation by Sperm Penetration Test with Human and Bovine Cervical Mucus and Zona-Free Hamster Oocyte ····· *K. Ikuma, S. Suno, T. Matsuda, A. Hasegawa, K. Koyama & S. Isojima* ·····134

Kallmann's Syndrome ····· *H. Fuse, M. Takahara, H. Ishii, H. Sumiya & J. Shimazaki* ·····142

Calcification of the Vas Deferens in a Male Patient Associated with Diabates Mellitus ····· *T. Hamaguchi, K. Goto, M. Fujiwara, Y. Okuda, M. Shinozaki, M. Fujisawa, Y. Okamoto, N. Oka, H. Okada, M. Hazawa, O. Matsumoto & S. Kamidono* ·····148

Fine Structure of Asthenozoospermia in Infertile Men 4. Report of Five Cases with "short-tailed" Spermatozoa ····· *K. Satoh, H. Ishikawa, I. Maehara, S. Satoh, M. Kimura & S. Orikasa* ·····152

Studies of PENETRAK® on Seminalysis of Male Infertile Patients ····· *N. Itoh, H. Tachiki, A. Nanbu, N. Mikuma, Y. Takagi, T. Umehara, H. Maruta & Y. Kumamoto* ·····159

Effects of Gossypol on Human Specific Lactate Dehydrogenase—C_4 (LDH-C_4) ····· *Y. Uchijima, K. Yoshida & H. Saito* ·····165

Histological Changes of the Testis with Relation to Aging ····· *S. Yanagi, K. Yamaguchi, H. Ito & N. Maruyama* ·····169

Induction of the Acrosome Reaction of Hamster Sperm Cells by the Membrane Mobility Agent, A2C, and Suppression by the Disulfide Reducing Agent, Dithiothreitol ····· *K. Sato* ·····175

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

HMG-hCG療法に対するBromocriptine併用の効果

Clinical Study on the Efficacy of Bromocriptine-hMG Combination Therapy for Induction of Ovulation

大分医科大学産科婦人科学教室
友成廉平　松岡　良　友成美鈴
Rempei TOMONARI　Ryo MATSUOKA　Misuzu TOMONARI
吉松　淳　森　宏之
Jun YOSHIMATSU　Hiroyuki MORI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Medical College of Oita, Oita 879−56 Japan

HMG-hCG療法にBromocriptine (Br)を併用することによる卵胞成育促進効果について検討した．高PRL血症を除く排卵障害患者17名（うちPCOS 9名を含む．）にhMG-hCG療法を超音波断層法により卵胞をモニターしながら行なった．2.5−5mgのBrを月経開始日より次回月経開始日まで内服させ（Br（＋）周期），卵胞期初期，排卵前期，黄体期中期の血中estradiol (E_2), progesterone (P), prolactin (PRL)を測定し，Br（−）周期と比較した．またhMG総投与量についても比較した．Br投与により血中PRLは低下（$P<0.01$）したが，排卵前期・黄体期中期のE_2，PはBr投与により有意な差を認めなかった．Br投与によりPCOSを除く症例ではhMG総投与量が有意に減少した（$P<0.05$）．すなわちPCOSを除く排卵障害例では，Br投与によりhMG投与量を減量することが可能であり，より少量のhMGで充分な卵胞成熟が期待でき，黄体機能も充分に維持されることが明らかになった．
(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1),1−5, 1989)

緒　言

Prolactin（以下PRLと略）は，ヒトにおいて，卵巣の特異的Receptorと結合し，顆粒膜細胞におけるSteroid産生を抑制することが報告されている[1]．一方，高PRL血症の治療薬としてのBromocriptine（以下Brと略）は，その卵巣直接作用としてのEstradiol（以下E_2と略）の分泌促進および血中PRL抑制の間接作用の双方により卵胞発育を促すとする意見もある[2]．そこで今回我々は，HMG-hCG療法にBrを併用することによる卵胞発育促進効果の有無について検討した．

対　象

当科不妊外来を受診した，26〜38歳の排卵障害患者17名（うち，内分泌的PCO syndrome 9名）を対象とした．なお高PRL血症，潜在性高PRL血症の患者は除外した．PCO syndromeは，内分泌学的にLH 30ng/ml，FSH正常，LH/FSH比＞3，LH-RH testにおけるLH過反応の条件のすべてを満たすもののみとした．

方　法

Br（＋）周期には，月経開始日よりBr (Parodel ®) 2.5−5.0mg/dayを連日内服させ，月経周期の5

日目より hMG (Pergonal ®)を毎日 75－300IU 筋注した．一方，Br (－) 周期では，hMG を月経周期の第5日目より投与を開始した．hMG の投与は，超音波断層法により卵胞を monitoring しながら行ない，最大径が 2.0cm を越えた時点で hCG を投与した．

採血は，卵胞期初期の hMG 投与前，排卵前期，黄体期中期に肘静脈より行ない，血中の PRL，E_2，Progesterone（以下Pと略）を RIA 法にて測定し，Br (＋) 周期と Br (－) 周期との間で比較検討した．また，両周期間における hCG への切り換えまでに要した hMG の総投与量についても比較検討した．

RIA は，PRL は第一 RI 社の PRL キット II を E_2，P はミドリ十字社の RIA キットを使用し，すべての測定は duplicate により行ない，その intra-および intra-assay 値は 10％未満の信頼すべき値であった．

データは，mean±S.D.にて表示し，統計学的処理は，Mann-Whitney の U test により検定した．

結　果

HMG-hCG 療法中の 17 名の患者を，非 PCO 群と PCO 群に分け，Br（＋）周期と Br（－）周期における血中ホルモン動態を以下に示した．

1．PRL（図1）

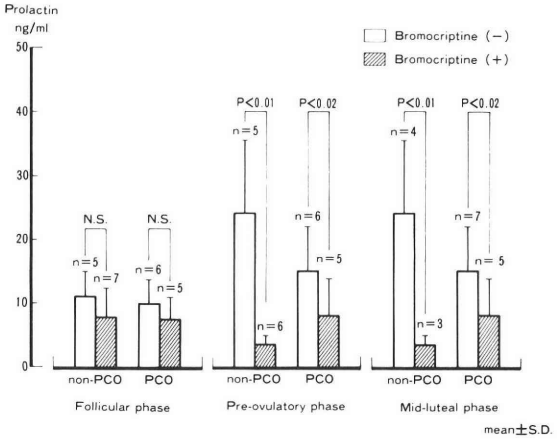


図1　PCO 群・non PCO 群における hMG-hCG 療法中の PRL 値におよぼす Br の効果

(a)非 PCO 群

卵胞期初期において，Br (－) 周期では 11.16±3.73ng/ml に対し，Br (＋) 周期 7.85±4.49ng/ml と両者間に有意差はみられなかった．しかし，排卵前期および黄体期中期においては，Br (－) 周期で各々 24.49±11.43ng/ml，20.61±6.79ng/ml に対し，Br (＋) 周期で 3.60±1.28ng/ml, 3.90±1.46ng/ml と Br の投与により有意な低下を認めた ($P<0.01$)．また，Br (－) 周期では，卵胞期初期より排卵前期，黄体期中期は有意に高値を示した ($P<0.05$) が，Br (＋) の投与により，排卵前期，黄体中期の PRL 値は卵胞期初期に比して有意の低値を示した．すなわち hMG の投与により排卵前期，黄体中期に PRL は増加するが，Br の投与はこれらの PRL の上昇を完全に抑制した．

(b) PCO 群

Br (＋) 周期においては卵胞期初期 9.98±3.62ng/ml であったが，hMG の投与と共に上昇し，排卵前期 15.17±7.14ng/ml，黄体期中期 28.75±14.17ng/ml に達した．一方，Br の投与はこれらの上昇を抑制し，卵胞期初期の 7.81±3.50ng/ml から有意な変動を示さなかった．

2．Estradiol（E_2）（図2）

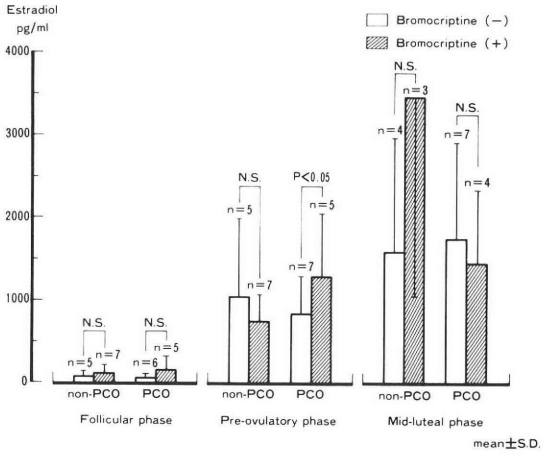


図2　PCO 群・non PCO 群における hMG-hCG 療法中の E_2 値におよぼす Br の効果

(a)非 PCO 群

Br (＋) 投与の有無による排卵前期および黄体中期の E_2 には有意差は認められなかった．黄体中期における E_2 値は有意差はなかったものの，Br 投与により増加する傾向がみられた．

(b) PCO 群

排卵前期において，Br (－) 周期 834±448pg/ml に対し，Br (＋) 周期 1300±764pg/ml と有意に高値を示した ($P<0.05$) が，他の phase では有意差は認められなかった．

3．Progesterone（P）（図3）

P は，Br 投与の有無による有意差をいずれの時期においても認めなかった．

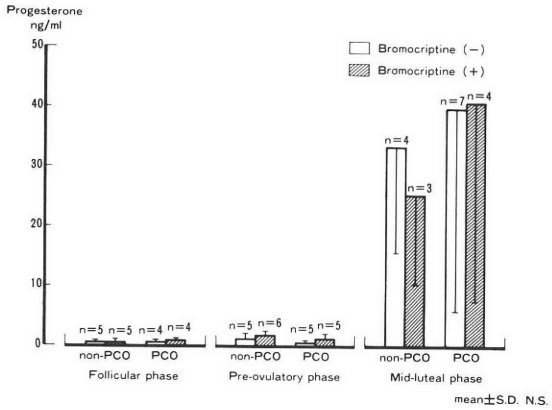


図3　PCO群・non PCO群におけるhMG-hCG療法中のP値におよぼすBrの効果

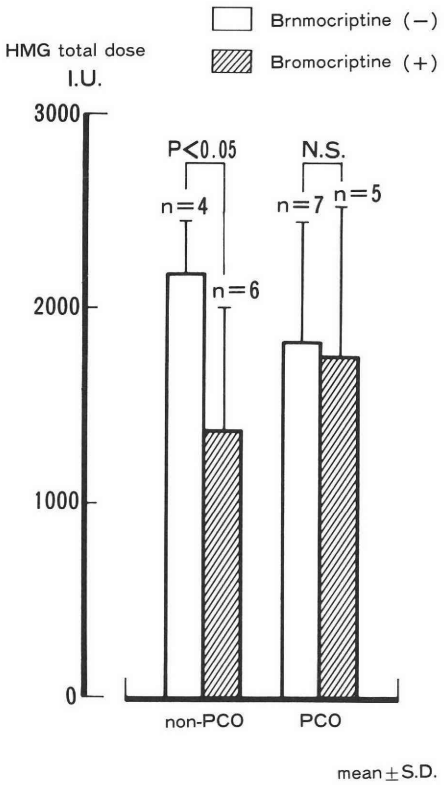


図4　PCO群・non PCO群における卵胞成熟に要する総hMG量におよぼすBrの効果

4．HMG総投与量（図4）

(a)非PCO群

HCGに切り換えるまでに要したhMGの総投与量を比較してみると，Br(−)周期で2181.3±264.1IUに対し，Br(+)周期では1379.2±612.9IUと有意に少なかった（P<0.05）．

(b) PCO群

PCO群においては，Br(−)周期1841.1±599.9IUに対し，Br(+)周期で1745.0±771.0IUと有意差を認めなかった．

5．E_2/log (hMG総投与量）比（図5）

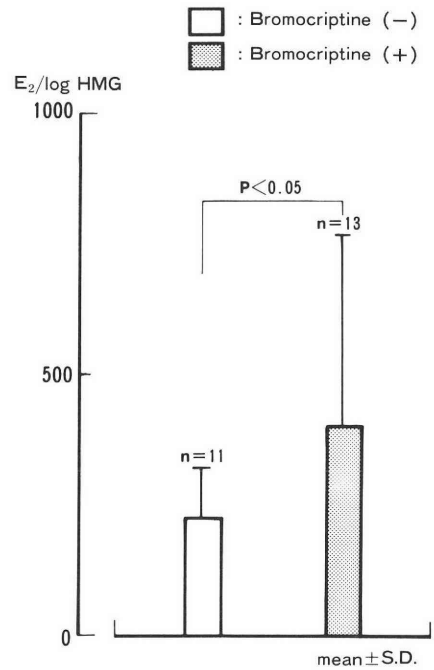


図5　hMGの単位投与量のE_2上昇効果（E_2／log hMG総量比）に及ぼすBrの効果（排卵前期のE_2値とそれまでに要したhMG総投与量の対数の比を比較した。）

HMG一単位当りの上昇効果をE_2/log (hMG総投与量)比をみることにより全症例で検討してみると，Br（−）周期で228.55±90.62に対し，Br（+）周期で393.5±373.91と有意に高く（P<0.05），BrによりhMGの生物効果が上昇していることが示唆された．

考　察

BrをhMG療法に併用することにより以下の結果をえた．

①hMG療法にBrを併用することにより，排卵前期，黄体中期にみられたPRLの増加を完全に抑制できる．

②卵胞発育に要したhMG総量は，PCOSを除く症例では，Brの併用により減量ができる．

③ PCOSを除く症例での排卵前期，黄体中期でのE_2，P値はBrの有無による差がみられず，Brの併用によりhMG投与量を減少させても，卵胞成熟，黄体機能には差がない．

④ PCOS症例ではhMG総投与量は減量できなかったが，排卵前期のE_2値はBrの併用により高値を示し，また全症例での排卵前期でのE_2/log hMG量がBrの併用により上昇することから，一般的にBrの投与は，hMGへの卵巣の反応性が増加することが示唆される．

本研究の初期の目的はhMGとBrとの併用によるPCOSでの卵巣過刺激症候群の頻度の減少であった．PCOの原因については，未だ明らかになっていないが，その本態は視床下部内のDopamineの減少にあるとする報告が多くみられる．Falaschi, P. et al.[3,4]は，ゴナドトロピン分泌機構とプロラクチン分泌機構に働くDopamine機構は異なっており，PCOの視床下部機能について視床下部内のDopamineが減少していることを述べている．また，Quigley, H. E. et al.[5]は，PCO症例ではDopamineを静脈内投与することにより，正常婦人に比べLHが有意に低下することから，PCOでは内因性Dopamine活性の低下を示唆している．さらにAlger, M. et al.[6]も，Dopamineのreceptor blockerであるmetoclopramideを投与すると，正常婦人では血中PRLが著明に増加するが，PCOでは増加が著明でないことから，内因性Dopamine活性の低下を示唆していた．このPCOに対し，Dopamine agonistであるBrを投与すれば，Brは低下した視床下部内のDopamine機構を正常化させLH分泌を正常化させることは，我々が既に報告している通りである[7]．このようにDopamine agonistの投与により内因性のLHを低下させ，LH/FSH比を可及的に正常化させることにより，hMGをPCOSに投与した場合に起こりやすい卵巣過刺激症候群を減少させる事が可能ではないかと考えた訳である．しかしながら結果に示したとおり，Brの投与によってもPCOSの排卵前期におけるE_2値を抑制することはできなったのみならず，逆に上昇させる結果となった．また卵胞成熟に要するhMG総投与量も減少させることはできなかった．むしろ，それらの結果はBrがhMGへの反応性を上昇させることを示唆すると考えられる結果であった．そこで非PCOS症例についてみると，Brは卵胞成熟に要するhMG投与量を減少させ，かつ，より少量のhMGにより排卵後形成された黄体機能は，Br投与を行なわなかった周期と変わらないことが判明した．

Maltin, W. H. et al.[8]は，Br 2.5mgを投与しLHの軽度の上昇を報告しており，青野ら[9]は，その作用機序として次のように想定している．すなわち，BrはDopamine receptorのうちD_2 receptorに特異的に結合するので，Dopamine neuronの節前receptorを刺激して内因性Dopamineの産生・放出を抑制する．その結果LH-RH neuronへの抑制がとれてLH-RHの分泌が亢進すると考えられている．このことが外因性のゴナドトロピンの減量につながるものと考えられる．

これらの中枢作用ばかりではなく，Brは卵巣への直接作用も有し，卵巣からのE_2分泌を促すことをSeppala, M. et al.[2]は報告している．

または，hMG投与によってE_2分泌が亢進し，その結果，上昇するPRLが卵発育を抑制するという，望ましくないPRLの上昇がBrにより抑制された結果であるとも解釈が可能である．

いずれにせよ，その機構は充分に明らかではないが，BrをhMG-hCG療法に併用することにより，もともと高PRL血症や潜在性高PRL血症のない患者でも，その有用性が認められたと考えられる．

文　献

1) McNatty, K. P., Sawers, R. S. and McNeilly, A. S.: A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human graafian follicle. Nature, 250: 653, 1974.

2) Seppälä, M., Unnérus, H. A., Hirvonen, E. and Ranta, T.: Bromocriptin increases plasma estradiol-17β conception in amenorrhea patients with normal serum prolactin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 43: 474, 1976.

3) Falaschi, P., del Pozo, E., Rocco, A., Toscano, V., Petrangeli, E., Pompei, P. and Frajese, G.: Prolactin release in polycystic ovary syndrome. Obstet. Gynec, 55: 579, 1980.

4) Falaschi, P. and del Pozo, E.: Effect of Bromocriptine on LH secretion in the polycystic ovary syndrome.
325-330. Ed. by Calne, D. B., McDonald, R. J., Horowski. R. and Wuttke, W., Lisuride and Other Dopamine agonists, Ravan Press, New York, 1983.

5) Quigley, M. E., Rakoff, J. S. and Yen, S. S. C.: Increased luteinizing hormone sensitivity to dopamine inhibition in polysystic ovary syndorome. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 231, 1981.

6) Alger, M., Matute. L. V., Mason, M., Canales, E. and Zarate, A.: Polycystic ovarian disease associated with hyperprolactinemia and defective metoclopramide response. Fertility and Sterility, 34: 70, 1980.

7) 森宏之，松岡良：Bromocriptin療法，産婦人科の実際 36，181，1987.
8) Martin, W. H., Rogal, A. D., Kaiser, D. L. and Thorner, M. O.: Dopaminergic mechanism and luteinizing hormone secretion. II. Differential effects of dopamine and Bromocriptine on luteinizing hormone release in normal women. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 650, 1981.
9) 青野敏博他：排卵誘発法の実際，産婦人科治療 53，278，1986.

Clinical study on the efficacy of bromocriptine-hMG combination therapy for induction of ovulation

Rempei Tomonari, Ryo Matsuoka, Misuzu Tomonari, Jun Yoshimatsu and Hiroyuki Mori

Department of Obstetrics and Gynecology, Medical College of Oita, Oita, 879−56 Japan

To evaluate the clinical effects of bromocriptine (Br) on hMG therapy for anovulatory women, 17 patients without hyperprolactinemia including 8 PCOS were treated by hMG combined with or without Br. 75-300 IU of hMG had been daily injected from the 5th. day of menstrual cycles until the follicle-diameter developed to 2 cm under the monitoring by ultrasonography. 5000-10000 IU of hCG was injected, when the follicle-diameter developed to 2 cm. 2.5-5 mg of Br was daily administrated from the 1st. day throughout cycles. Serum prolactin (PRL), estradiol (E_2) and progesterone (P) were measured by RIA in the early follicular, pre-ovulatory and mid-luteal phase. Total dose of hMG, PRL, E_2 and P were compared in Br(+) and Br(−) cycles.

Total dose of hMG was significantly diminished ($P<0.05$) by Br in cases without PCOS, while E_2 and P did not show any changes in both pre-ovulatory and mid-luteal phases. PRL showed marked decrease in both pre-ovulatory and mid-luteal phases ($P<0.01$). These date suggested that the follicle-maturation had been carried out by the less dose of hMG under Br administration, and that the luteal function of less dose of hMG combined with Br had been similar to the higher dose of hMG without Br.

(受付　1988年7月7日　特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

交配後6½日を経た家兎子宮内膜短期培養細胞における形態学的観察

Morphological Observations on Short-term Cultured Endometrial Cells from Rabbits at 6½ Days after Mating

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
Toshiro TOMINAGA　Naoyuki KAMITANI

Dapartment of Obstetrics and Gynecology,
Fukui Medical School

着床における子宮内膜細胞の役割を解明するために，交配後6½日を経た家兎子宮内膜細胞を短期培養し，これに形態学的考察を加えた．培養子宮内膜細胞はfibroblast-like cellsとepithelial-like cellsとから成り，電顕的に前者はその胞体中に豊富なrER，びまん性に存在した豊富な遊離ribosome，顆粒や少数の空胞を有し活発な増殖形態を示したが，後者は胞体中に部分的に局在した遊離ribosome，豊富な糖原顆粒，多数の空胞，顆粒，microbody like substanceを有し，退行性変化の形態を示した．また今回のfibroblast-like cellsは培養非妊家兎子宮内膜細胞の場合と異なり，collagen fibrilsの産生予備能力が皆無で特徴的であった．以上の経過はin vivoにおける家兎胞胚の着床期で子宮内膜細胞の変化に一致しており，子宮内膜上皮細胞は退行性変化と合胞化をきたしながら，また子宮内膜間質細胞は上皮への細胞分化を進めながら着床過程が進行していくと思われた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 6－15, 1989)

緒　言

現在，我々は家兎を使用してin vitro着床実験を施行している[1,2]が，その時使用している子宮内膜培養細胞は非妊家兎から得られたものである．すなわち非妊家兎より得られた子宮内膜培養細胞はculture dishの中で短期培養されているうちに，すでに機能的にも形態学的にも何らかの変化をきたし，その後，胞胚との実験的着床をきたすと思われる．この事がin vivo着床[3,4]とin vitro着床[1,2]との間にいかなる相違を生み出すのか大きな問題点の一つである．今回我々は交配後6½日経過した家兎，つまり胞胚を採取する時期にきている家兎で，その妊娠性の変化をきたしている子宮内膜細胞を採取し，短期培養を行って形態学的見地から観察を行った．これは非妊家兎より得られた子宮内膜短期培養細胞[5]と比較検討する事により多くの知見を得ることができ，かつ着床における子宮内膜（ヒトにおいてはごく初期の脱落

膜組織）側の役割解明に有用と考えられたからである．またこの点から着床時の in vivo 家兎子宮内膜組織の形態にも触れ，これらの培養細胞の由来に関しても考察を加えてみた．

研究方法

使用した家兎は交配後6½日を経過した雌の New Zieland White Rabbit (Keari 3.5kg) で，外科的に子宮を切除した．子宮内には双角子宮のそれぞれに直径約3～5mmの胞胚が8個づつ合計16個存在しており，これらの胞胚と子宮内膜との間に attachment はなかった[6]．子宮内膜組織は非妊家兎の時と異なりかなり肥厚しており（約2～3mm），組織採取も容易であった．この肥厚した子宮内膜組織を耳鼻科用剪刀を用いて丁寧に採取し，1mm³以下の fragments に細切後，0.25％トリプシン液 (Difco) にて個々の内膜細胞に分離した．この内膜細胞を Corning culture dish (35mm×10mm style) 1個の中に細胞数約10万個程度になるように調整し，培養液と共に入れ培養を開始した．以上の操作は厳重な無菌管理のもとに行なわれ，また培養液組成は Waymouth MB 752/1液 90%, fetal calf serum 10%, antibiotics (penicillin 100u/ml＋streptomycin 100μg/ml) 添加とした．medium change は2日毎とし，10日目の時点で位相差顕微鏡写真と透過型電子顕微鏡写真を撮った．なお透過型電子顕微鏡写真作成に当たっては，4％，paraform aldehyde および5% glutal aldehyde 等量混合液で前固定，1% osmium tetroxide で後固定を行ない，ethanol series で脱水後 epon 包埋し，超薄切片作成，ウラン・鉛二重染色を行って，透過型電子顕微鏡 (HITACHI-H600) にて観察した．超薄切片作成時には子宮内膜細胞の存在する面（すなわち dish の底面）に parallel の方向に切片を作成した．またこれとは別に着床期の状態にある家兎子宮内膜組織も採取し，in vivo の妊娠性変化をきたした子宮内膜組織の電顕的観察を行った．この試料作成は固定時間をやや延長させた以外はほとんど in vitro 培養細胞と同様の操作で行われた．

研究成績

1．培養細胞の位相差顕微鏡による光顕的所見
（写真1，2）

Corning culture dish の中で培養されている子宮内膜細胞が confluent な状態に達するのは非妊家兎の場合[5]より早く，培養開始後2日目であった．もちろん，培養開始時に入れた細胞数はほぼ同数（約10万個）に調整した．写真1および写真2は培養後10日目の位相差顕微鏡像であるが，光顕的にも明らかなように，培養後6日目頃にはこのように全面にわたって空胞と思われるような小さな泡沫の存在が認められた．写真1は fibroblast-like cells と考えられる部分であるが，細胞と細胞との境界が広く明瞭であるのが特徴である．しかも細胞自体の胞体も一般的な fibroblast に比べると幅広く，ところどころに卵円形に近い細胞も見られる．核はさほど目立たない．写真2は epithelial-like cells と考えられる部分である．個々の細胞は円形ないし正方形に近い形をしており，核がはっきり目立つのが特徴である．しかし核の大きさ自体はさほど大きい訳ではなく，悪性化などの傾向は認められない．ただ細胞の大小不同が明らかであり，大きい細胞は小さな細胞の10倍以上あるように思われる．このように fibroblast-like cells

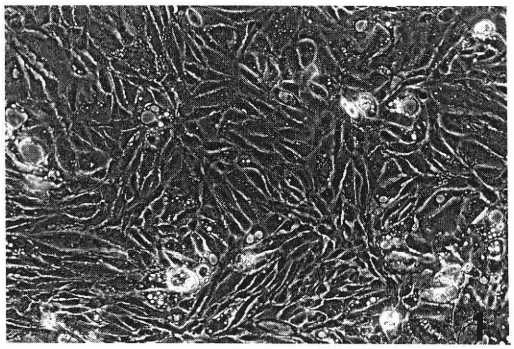


写真1　培養開始後10日目における交配後6½日を経た家兎子宮内膜細胞。特に fibroblast-like cells と考えられる部分である。全面に泡沫の存在が見られ，また活発な細胞増殖形態がうかがえる。
位相差顕微鏡×200

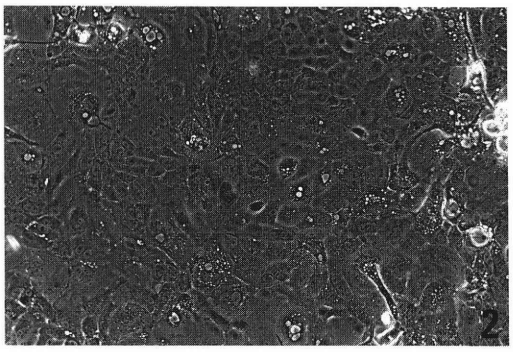


写真2　培養開始後10日目における交配後6½日を経た家兎子宮内膜細胞。特に epithelial-like cells と考えられる部分であるが，全体的に核が明瞭である。細胞の大小不同も目立ち，また泡沫の存在も見られる。
位相差顕微鏡×200

においても epithelial-like cells においても，前述したように空胞と考えられる泡沫の存在が至るところで見られ，しかも細胞増殖が非常に盛んであるため，dish に付着する事のできない細胞が明るい球形の細胞として培養細胞 sheet から浮かび上がって認められた．

2．培養細胞の透過型電子顕微鏡による所見
(写真3～12)

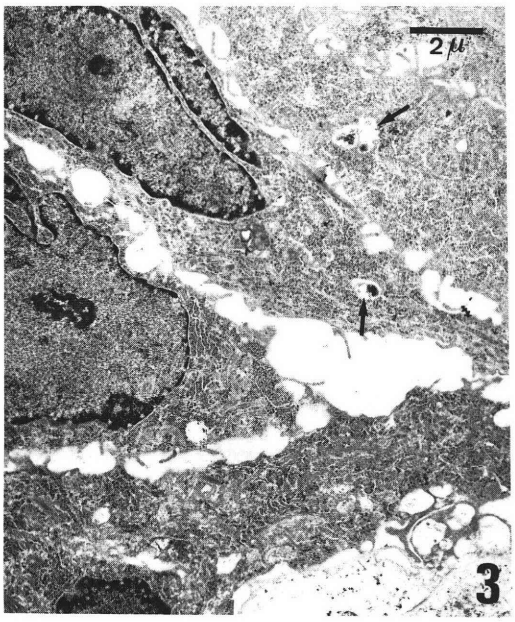


写真3　fibroblast-like cells と考えられる細胞の透過電顕像。胞体内にびまん性に存在する粗面小胞体と遊離 ribosome が特徴的である。また空胞の内部に物質を封入している像(↑)も認められる。
TEM×5,000 (ウラン・鉛二重染色)

写真3～6は写真1でみられた fibroblast-like cells の，写真7～12は写真2でみられた epithelial-like cells の透過電顕像である．写真3における細胞は全体的に見てやや細長い胞体を有しており，microvilli の数も少ない．核には浅い切れ込みがあるが異型性はさほど強くなく，核細胞質比も中等度である．胞体には豊富な粗面小胞体，遊離 ribosome を有しており，空胞と考えられるような電子密度の低い部分も数多く存在する．その空胞部分には内部にさらに物質を含んでいるものもある (↑)．また desmosome 様構築による細胞結合もみられる．写真4は desmosome 様構築の存在する部分の拡大像であるが，やはり空胞と考えられる電子密度の低い部分が

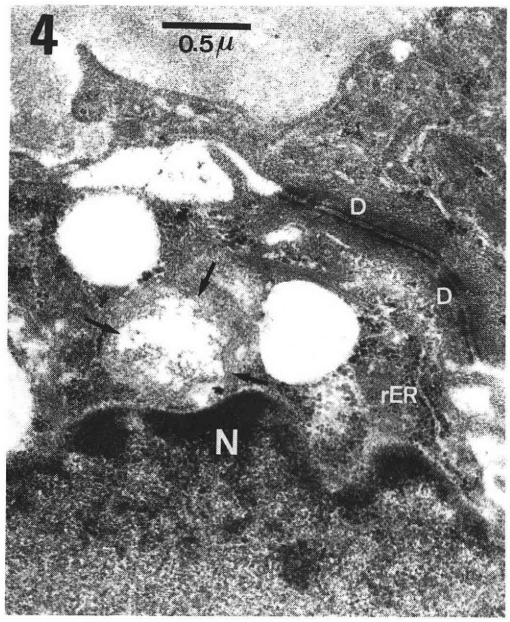


写真4　fibroblast-like cells の desmosome 様構築部分の拡大像。また空胞と封入物質が存在しているが，封入物質の周囲の形態はラメラ構造に変化する前段階と思われる(↑)。rER：粗面小胞体，D：desmosome 様構築，N：核
TEM×25,000(ウラン・鉛二重染色)

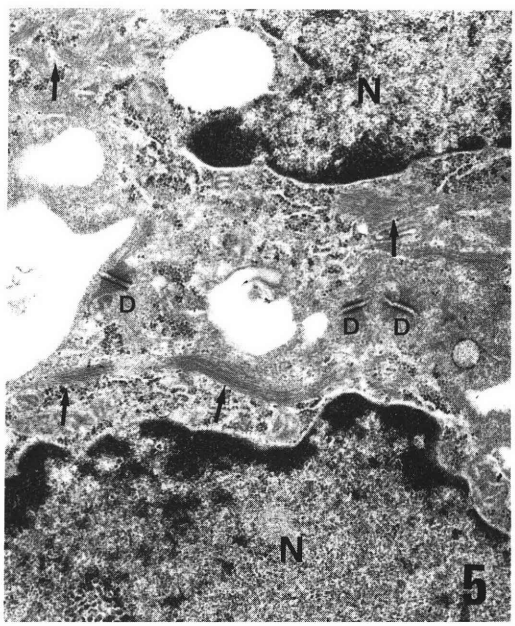


写真5　fibroblast-like cells で細胞質中に存在する様々な type の microfilament(↑)。D：desmosome 様構築，N：核
TEM×17,000(ウラン・鉛二重染色)

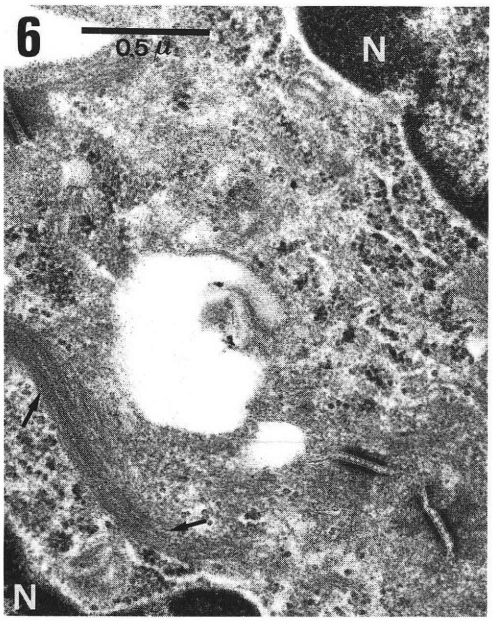


写真6　写真5のうち stress fiber と考えられる部分の拡大像(↑)。この環状束の中では2種類の方向の microfilament が混在している。
N：核　TEM×35,000(ウラン・鉛二重染色)

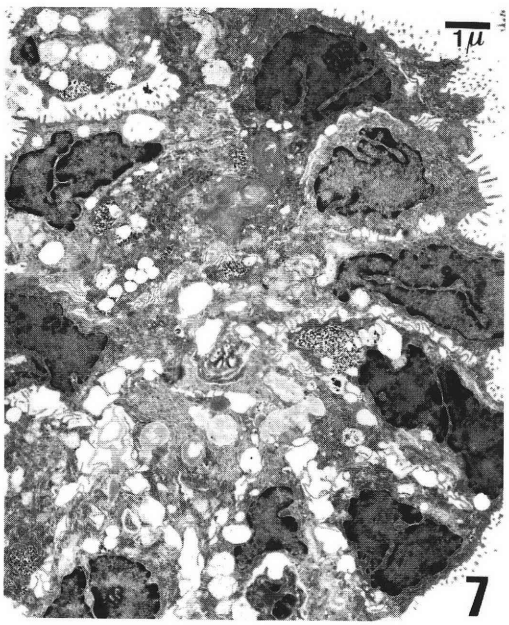


写真7　epithelial-like cells と考えられる細胞の透過電顕像。細胞は敷石状の配列をとっており，核異型性が強い。microvilli の数が多く，きわめて多数の空胞を有している。また糖原顆粒も豊富に認められる。
TEM×3,000(ウラン・鉛二重染色)

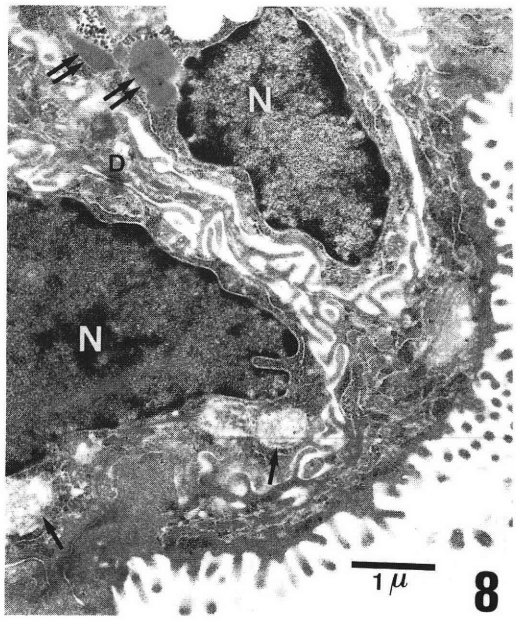


写真8　epithelial-like cells の強拡像。desmosome 様構築と豊富な遊離 ribosome，粗面小胞体が見られる。封入体を有する空胞(↑)と filament(crystal)構造を有する細胞内小器官(↑↑)が存在した。
D：desmosome 様構築，N：核
TEM×10,000(ウラン・鉛二重染色)

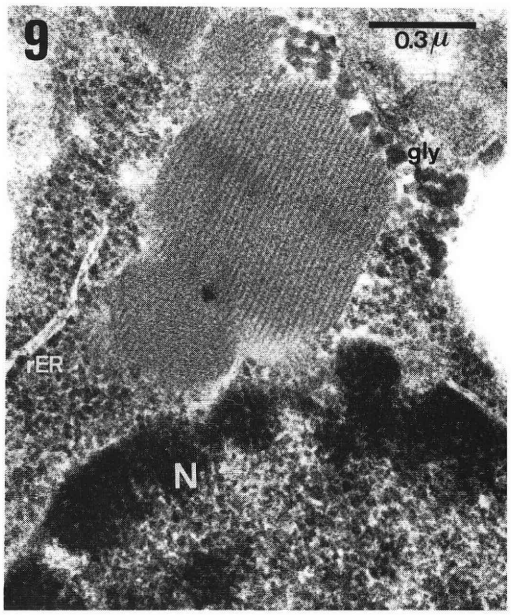


写真9　写真8の filament(crystal)構造を有する細胞内小器官のうち“だるま”型の拡大像。形態学的にこれらは microbody(peroxisome)と推測される。rER：粗面小胞体，gly：糖原顆粒，N：核
TEM×50,000(ウラン・鉛二重染色)

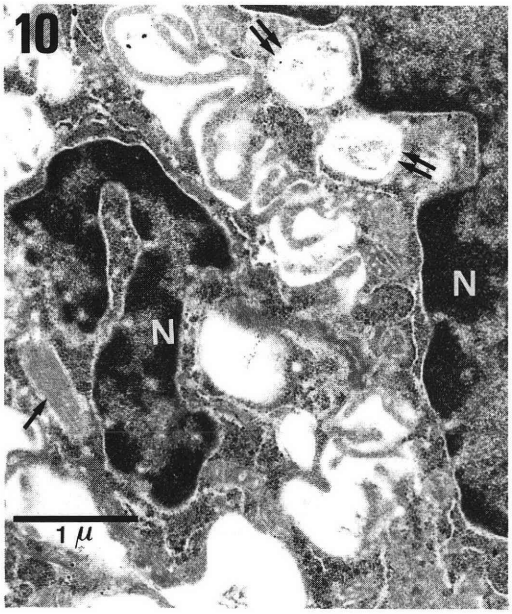


写真10　別のepithelial-like cell の microbody like substance を促えている(↑)が，filament 構造がやや不明瞭となってきている。封入体を有する空胞(↑↑)も存在している。N：核
TEM×17,000(ウラン・鉛二重染色)

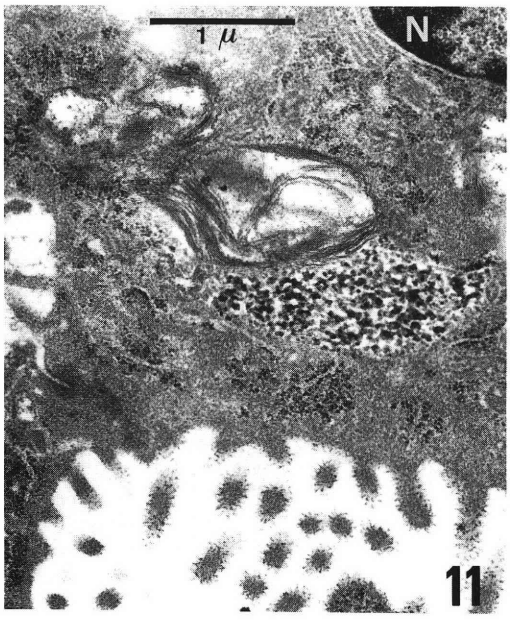


写真11　epithelial-like cell で，糖原顆粒の部分とラメラ構造を有する空胞部分とを拡大したものである。N：核　TEM×20,000(ウラン・鉛二重染色)

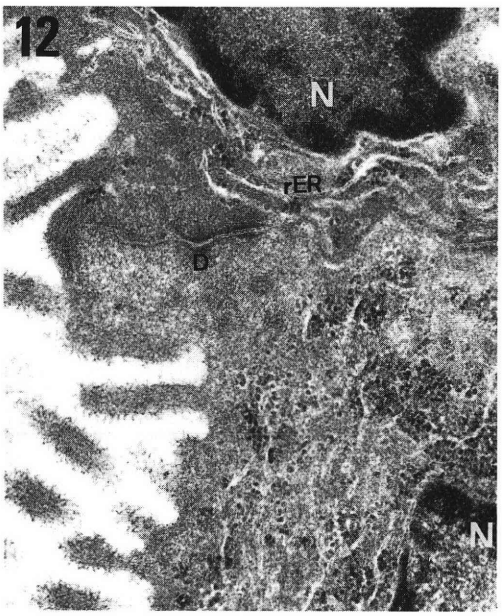


写真12　epithelial-like cells での遊離 ribosome と粗面小胞体を捉えている．遊離 ribosome はこのように細胞質内での分布が局在していた．粗面小胞体は核のまわりに同心円状に分布していた．rER：粗面小胞体，D：desmosome 様構築，N：核
TEM×30,000（ウラン・鉛二重染色）

存在する．その中に周囲から溶解しているような形で封入されている物質があり，周囲の形態はラメラ構造に変化する前段階と思われる(↑)．また粗面小胞体および遊離 ribosome もみられる．写真5は fibroblast-like cells の細胞結合部分を中心に細胞質周辺部を捉えたものである．ここでは細胞質中に様々な type の microfilament が見られる(↑)．すなわち filament の走行が細胞膜周辺に沿って環状束になっているもの，方向性の混じった tonofilament 様の短線維が数多く存在するものなどが認められる．また上方の細胞には空胞のまわりを ribosome が取り囲んでいる．写真6は写真5の環状束になった microfilament 部分を拡大したものである(↑)．この環状束の中では2種類の方向の microfilament が混在しており，培養線維芽細胞などによくみられる stress fiber だと考えられる．また細胞同志の接着部には desmosome 様構築が3か所認められる．写真7は epithelial-like cells の弱拡による電顕像である．ここに見られる細胞はその1つ1つが円形ないし正方形に近く，全体が敷石状の配列をとっている．個々の細胞では核膜の切れ込みがかなり深く，核異型性も強い．また fibroblast-like cells に比べて核細胞質比が大きく，極端に microvilli の数が多いのが特徴

である．細胞の接着形式はやはり desmosome 様構築であり，それらも所々に認められる．細胞質の中には空胞と思われる電子密度の低い部分が極めて多数存在しており，これは fibroblast-like cells に比べても極端に多い．空胞の中にラメラ構造を有するものや粘液と考えられる封入体を有するものもある．また糖原顆粒も豊富に認められる．写真8は強拡の電顕像であるが，やはり非常に多くの microvilli が特徴的である．desmosome 様構築も散見され細胞質内の遊離 ribosome，粗面小胞体も豊富に存在している．また封入体を有する空胞も見られる(↑)．写真左上方に“だるま”型と“棍棒”型の filament (crystal) 構造を有する細胞内小器官が存在している（↑↑）．これらは epithelial-like cells の中で時々認められる像であるが，fibroblast-like cells の中にはまったく認めることができなかった．これらの小器官のすぐ上方には糖原顆粒があたかも接するかのように存在しており，その周辺部には遊離 ribosome が密集していた．写真9は写真8における filament (crystal) 構造を有する細胞内小器官のうち主に“だるま”型の方を拡大したものである．この中では斜走する filament (crystal)構造が極めて sharp に捉えられており，形態学的にはこれらの小器官は microbody (peroxisome) ではないかと推測される．そのまわりには極めて豊富な遊離 ribosome が存在し，また糖原顆粒も認められる．写真10は別の microbody と考えられる部分を捉えているが(↑)，ここでは filament 構造がやや不明瞭となってきている．しかしそのまわりにはやはり豊富な遊離 ribosome の存在がある．また封入体を有する空胞も見られる（↑↑）．写真11は糖原顆粒の部分とラメラ構造を有する空胞部分とを拡大したものである．これらのまわりには遊離 ribosome と粗面小胞体が豊富に存在し，空胞部分ではラメラ構造の一部が内部に入りこんでおり，それと同時に粘液様物質をその内部に有していた．人では妊娠中期以降の脱落膜細胞で小胞体の長大化迷路状，同心円形成等の著しい変形がみられ[7]，これとやや似た像を呈しているが，小胞体の形態の違いから空胞中のラメラ構造を呈する物質は epithelial-like cells の産生した物質と考えられる．しかし今回の研究の中でそれらを分泌しているような像は捉えることができなかった．写真12は desmosome 様構築部分と遊離 ribosome，粗面小胞体の部分を拡大したものである．epithelial-like cells における遊離 ribosome は豊富ではあるが，このようにその分布が局在している．この点 fibroblast-like cells における遊離 ribosome はびまん性に極めて豊富に分布しているのが特徴である．また粗面小胞体は核のまわりに同心円状に分布し(↑)，子宮内膜細胞の妊娠性変化の特徴の一つと考えられた．

3．着床期における家兎子宮内膜組織の透過型電子顕微鏡による所見（写真13～18）

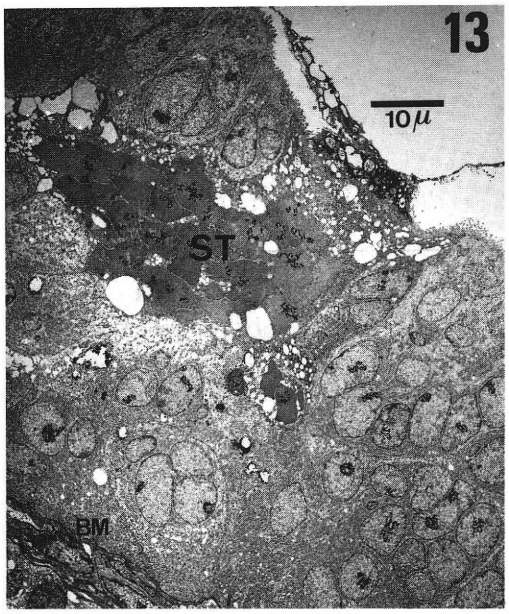


写真13　交配後7¾日における antimesometrial region で trophoblast 侵入部の家兎子宮内膜上皮細胞．内膜上皮細胞は合胞化し，浮腫，膨化の傾向にある．ST：syncytiotrophoblast，BM：基底膜　　TEM×1,000（ウラン・鉛二重染色）

写真13は交配後7¾日における antimesometrial region の trophoblast 侵入部で，子宮内膜上皮細胞を捉えたものである．この内膜上皮細胞は合胞化しているものが多く，さらに全体的に浮腫，膨化の傾向にある．糖原顆粒も数多く有し，空胞も目立ってきている．写真14はやはり交配後7¾日の同部位の内膜上皮細胞である．細胞個々の核異型，核の切れ込みはさほど強くないが，細胞質内の遊離 ribosome は極めて多く，空胞が数を増していた．microvilli も数多く存在し，細胞間は desmosome 様構築で接着していた．写真15は交配後7¾日の子宮内膜組織で，やはり antimesometrial region のものであるが，基底膜および毛細血管の部分を中心に内膜間質細胞を捉えたものである．ここでは培養細胞によく見られた低電子密度の空胞の中に封入体を有する構造が散見される．遊離 ribosome は極めて多く存在するが，糖原顆粒はまったく認められない．また局所的ではあるが内膜間質細胞が基底膜を押し上げ盛り上がっ

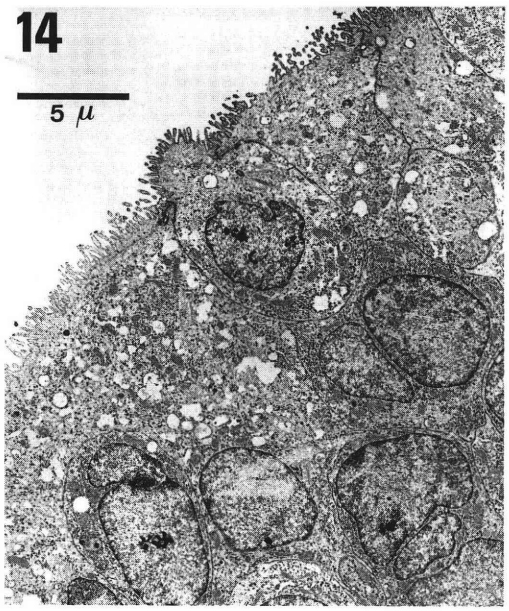


写真14　交配後7¾日のantimesometrial regionの内膜上皮細胞．細胞質内の遊離ribosomeと空胞がきわめて多い．
TEM×3,000（ウラン・鉛二重染色）

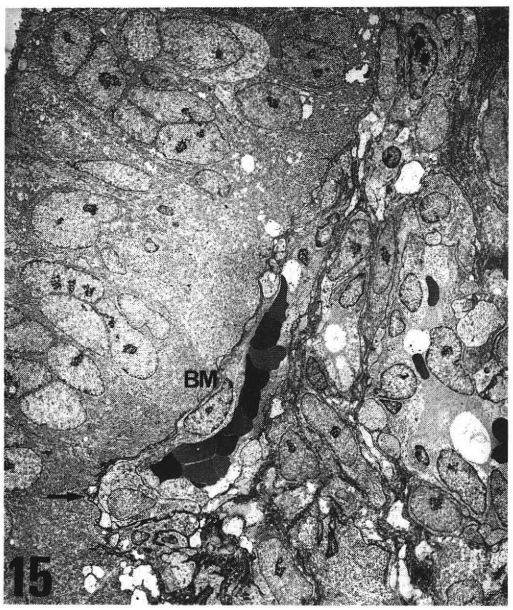


写真15　交配後7¾日のantimesometrial regionで子宮内膜組織を捉えているが，特に内膜間質細胞の増殖が著しく基底膜を押し上げている（↑）．この内膜間質細胞には遊離ribosomeは豊富であるが，糖原顆粒は皆無で浮腫，膨化の傾向はまったく認められない．BM：基底膜
TEM×1,000（ウラン・鉛二重染色）

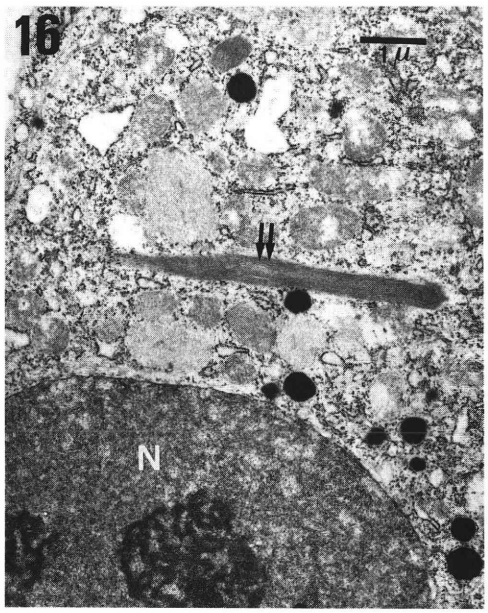


写真16　交配後7¾日のantimesometrial regionの内膜上皮細胞の強拡像．空胞とlysosomeが多く変性，壊死というantolysisの形態が現れてきた．microbody like substance（↑↑）の出現も特徴的であった．N：核
TEM×8,000（ウラン・鉛二重染色）

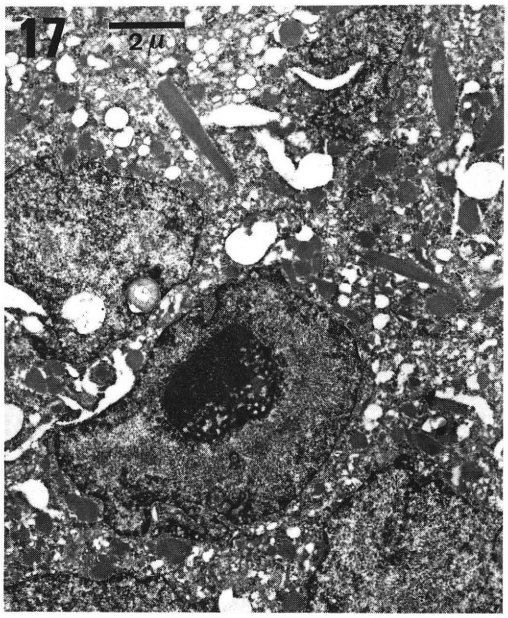


写真17　交配後7½日のmesometrial regionの内膜上皮細胞．数多くのcrystal構造を有するmicrobody like substanceの存在が見られた．
TEM×5,000（ウラン・鉛二重染色）

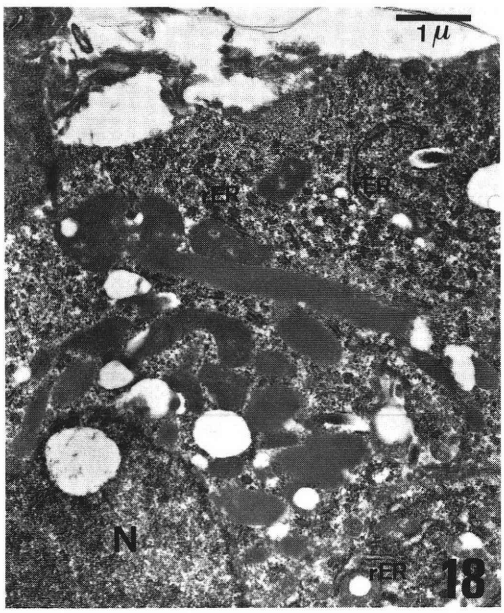


写真18　交配後7½日のmesometrial regionの内膜上皮細胞で，microbody like substanceを拡大したものである．crystal構造が著名であった．
rER：粗面小胞体，N：核
TEM×10,000（ウラン・鉛二重染色）

ていく構造も見られた（↑）．個々の細胞には浮腫，膨化の傾向はまったくみられない．写真16は交配後7¾日のantimesometrial regionの内膜上皮細胞の強拡大像である．細胞質の中には豊富なribosomeと粗面小胞体がみられるが，空胞あるいはその中に粘液様物質を封入したものも認められる．またlysosomeも存在し，この内膜上皮細胞には変性，壊死というautolysisの形態も現われてきた．しかし特徴的なのはcrystal構造を有する細胞内小器官（↑↑）の存在で，これは培養epithelial-like cellsで見られたmicrobody like substanceであろうと考えられる．写真17は交配後7½日のmesometrial regionにおける内膜上皮細胞である．ここでは数多くのcrystal構造を有するmicrobody like substanceの存在が見られる．また空胞や遊離ribosomeも豊富である．写真18は同様に交配後7½日のmesometrial regionの内膜上皮細胞でmicrobody like substanceを拡大したものである．crystal構造が明確に捉えられている．また粗面小胞体，遊離ribosome，空胞が豊富に存在していた．

考　察

以上，交配後6½を経た家兎子宮内膜短期培養細胞の形態を中心に，着床期におけるin vivo子宮内膜組織の形態にも触れてみた．今回の研究で明らかなように，妊娠性の変化をきたした家兎子宮内膜細胞の培養では，上皮性成分と間質性成分の区別は容易であり，形態上様々な相違が見られた．これに比べて非妊家兎から得られた子宮内膜短期培養細胞では光顕上epithelial-like cellsとみられる細胞は存在したものの，電顕上はそれらの細胞でさえ上皮と決定する要因に欠けていた[5]．このことは培養という一つのprocessの中で，短期間とはいえ非妊家兎由来の子宮内膜細胞はその上皮性成分のみがrejectされて間質性成分のみdominantとなってしまったのか，あるいは非妊家兎の場合，上皮性成分は培養することによって上皮の性格を失っていくのか，あるいは非妊家兎の上皮性成分は培養時dishの底面に生着できないのか不明である．しかしいずれにせよ，非妊家兎の場合には，fibroblast-like cellsは膨大な量のcollagen fibrilsを生産し，それらを胞体内に取り込んだり消化したりする調節機構を有していた．今回の妊娠性の変化をきたした子宮内膜細胞では，培養のどの部分を探してもcollagen fibrilsの存在は確認できなかった．これは子宮内膜間質性成分が着床に向けての妊娠性変化の中で，そのcollagen fibrilsの産生予備能力を失っていったものと推測される．しかしその反面，fibroblast-like cellsでは妊娠性の変化を行うに従って，胞体内の遊離ribosomeは増加してゆき，また非妊時と比べて活発な増殖形態がみられた．筆者らは家兎において胞胚と母体生殖器との着床で，後者の主役をなすのは子宮内膜間質細胞と考えているが[2,4]，今回の研究においてその着床における動態が示唆されている．すなわち内膜間質細胞は非妊時collagen fibrilsその他の産生能力を有しており，いったん受精，着床という妊娠初期の変化が起こってくると，盛んにそれらを産生し，着床に備え，かつ本体自身は着床時のtrophoblastの侵入に対して活発に増殖し，それらを包み込むように保護し，また防御するのである．これに対して子宮内膜上皮細胞は今回の培養細胞でも明らかなように，極めて多数の空胞に見られるような退行性変化と，局在した遊離ribosomeに見られる活発な物質産生能を呈した．これらは一見相反する事象のようにも考えられるが，着床期（特に交配後7¾）の子宮内膜上皮細胞では活発に増殖し合胞化していく形態と共に，個々の細胞は浮腫，膨化し，ついには変性，壊死に陥っていく形態とがみられる．これもやはり着床に向かっての内膜上皮細胞の適応と考えられ，活発な蛋白やホルモンの合成（封入体を有する空胞など）も着

床に必要な物質の産生機構の一つであろうし，また内膜上皮細胞に極めて多く存在した糖原顆粒も胞胚側の栄養源になっているものと推測される．これら子宮内膜側の一連の変化はもちろん胞胚と母体生殖器側とのinteractionの中で行われるものであり，collagen fibrilsなどもそのinteractionの産物の一つと考えられる．すなわち筆者らは前述した子宮内膜間質細胞の産生するcollagen fibrilsは着床における胞胚と母体生殖器とのattachment factorとしても働いていると推測している[1,2,3]．これに関連して，筆者らは家兎胞胚のin vitro着床実験[1,2]の変形を試みた．まず非妊家兎培養子宮内膜間質細胞に代えて，今回の実験で使った交配後6½日を経た培養子宮内膜間質細胞を用いたが、実験的着床は全く起こらなかった。これは交配後6½日を経た子宮内膜細胞にはcollagen fibrilsの産生能力がなく，interactionに呼応できなかったものと思われる．また胞胚の代わりにeponの玉（直径3～5mm）を使用したが実験的着床は惹起されなかった．これもinteractionが不完全に終わったためと考えられる．ただ今後，異種動物間の胞胚と母体生殖器のinteractionを試みる必要は残されている．

次に今回の培養内膜上皮細胞では，着床期の内膜上皮細胞と異なり，合胞化などの形態は皆無で核の異型性などが特に目立った．この理由の一つとして，培養内膜細胞ではblastocystとのinteractionがなく胞胚からのsignalを受けられなかったために合胞化できなかったのであろう．さらに内膜上皮細胞はin vivoで浮腫，膨化をきたし，変性，壊死(antolysis)に進む運命にあったもので，これを培養したことで細胞自体に様々の変化をもたらしたものと思われる．また内膜上皮細胞のみに特徴的に現れてきたfilament (crystal)構造を有する細胞内小器官，おそらくmicrobody (peroxisome)と推測される物質（microbody like substance）について触れる．これはNakaoらがcrystalloid proteinとして報告[8]しているものと同一と考えられるが，去勢した雌家兎にprogesteroneを投与し，その子宮内膜上皮細胞の胞体中に観察されている．また人でも去勢した婦人にprogesteroneとestrogenを投与し，その子宮内膜上皮細胞において観察されている．すなわち偽妊娠を起こさせた家兎と人において観察されているが，その詳細な機能や役割に関しては不明と結論づけている．今回の研究では着床期における子宮内膜上皮細胞，また培養内膜上皮細胞において，このmicrobody like substanceが観察されたが，筆者らは家兎胞胚のin vitro着床実験においてもtrophoblastの胞体中に同様の物質を証明している[2,3,9]．元来microbodyの働きに関しては明確に証明しえたものはなく，今後の研究に期待されている分野の一つであるが，脂質代謝，アミノ酸代謝，糖代謝に関連があるようである[10]．特に培養細胞とin vivo子宮内膜細胞においては，その上皮性成分にのみ多量の糖原顆粒が見られることから，糖代謝との関わりは深いと推測される．しかし偽妊娠も含めて着床に関係したtrophoblastや子宮内膜上皮細胞にのみこのmicrobody like substanceが出現しているのは，着床時において極めて重要な役割を果たしているのであろう．

最後に，着床の機序は動物の種によって異なり，胎盤の形態と機能に密接な関係がある[11]．このため人と家兎においても着床形態にかなりの相違が見られるが，種を超えた共通の本質的機構も存在する．特に妊娠性の変化をきたした子宮内膜組織，人では脱落膜組織と称するが，これには共通の変化が多く見られる．すなわち，子宮内膜上皮性成分の妊娠性変化は人においても家兎においても共に退行性変化を中心としたもので，人ではこれをArias-Stella反応と称する．また子宮内膜間質性成分の妊娠性変化は（人では特に脱落膜細胞化と称する），人においても家兎においても細胞分化を中心とする変化にほかならない．つまり間質細胞の上皮細胞へ向かう分化過程での変化現象[12]なのである．着床とは，母体生殖器側で主役を担う子宮内膜間質性成分が胞胚とのinteraction (trophoblastからのsignal) に呼応しながら分化過程を進めていく現象と解釈することができる．

文　献

1）立山一郎，富永敏朗，紙谷尚之，金嶋光夫，麻生武志，田中輝男：家兎胞胚のin vitro着床実験（Part Ⅰ），受精・着床'84：124，1985.
2）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：家兎胞胚のin vitro着床実験（続報），受精・着床'85：43，1986.
3）立山一郎，富永敏朗，紙谷尚之，下山直樹，松本貞夫：家兎胞胚の着床（in vitroからin vivoへ），産婦の世界，38：249，1986.
4）立山一郎，富永敏朗，紙谷尚之，松本貞夫，下山直樹，森　崇英：家兎胞胚の着床（in vivo現象を中心として），日受着誌，4（1）：135，1987.
5）立山一郎，森　崇英，富永敏朗，紙谷尚之：非妊家兎子宮内膜短期培養細胞における形態学的観察，日不妊誌，33：731，1988.
6）Denker, H. W.: Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, 53, part 5, p15, Springer-Verlag, 1977.
7）吉田吉信：ヒト子宮内膜間質細胞の妊娠性変化，

細胞，14：427，1982.
8) Nakao, K., Meyer, C. J. and Noda, Y.: Progesterone-specific protein crystals in the endometrium: An electron microscopic study, Amer. J. Obstet・Gynec., 111: 1034, 1971.
9) 富永敏朗，立山一郎，紙谷尚之，麻生武志，久保真，細川久実子：In virtoにおける胚盤胞と子宮内膜の相互作用，細胞，19，47，1987.
10) 小川和朗：細胞：p110：朝倉書店，1981.
11) 富永敏朗，麻生武志，小辻文和，紙谷尚之，春日健孝，立山一郎，根上　晃：着床の生物学，日産婦誌，39：2075，1987.
12) 立山一郎，森　崇英，富永敏朗，紙谷尚之：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，日不妊誌，33：513，1988.

Morphological observations on short-term cultured endometrial cells from rabbits at 6½ days after mating

Ichiro Tateyama and Takahide Mori

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

Toshiro Tominaga and Naoyuki Kamitani

Dapartment of Obstetrics
and Gynecology,
Fukui Medical School,
Fukui 910-11 Japan

Morphological observations on short-term cultured endometrial cells from rabbits at 6½ days after mating were carried out to study the role of endometrial cells during implantation. The cultured endometrial cells were shown to be composed of fibroblast-like cells and epithelial-like cells. Ultrastructural examination showed that, the former cells proliferated actively with an abundance of rough-surfaced endoplasmic reticulum, diffused free ribosomes, and granules and small numbers of vacuoles. However, the latter cells degenerated and demonstrated partially localized free ribosomes, abundant glycogen granules, large numbers of vacuoles, other granules and microbodylike substances in their cyotplasm. Moreover, it was characteristic that these fibroblast-like cells, which had no ability to produce collagen fibrils, differed from the cultured endometrial fibroblast-like cells from virgin rabbits.

These observations were consistent with the chages of the endometrial cells in the in vivo rabbit blastocyst implantation process, which progresses by the degeneration and incorporation of endometrial epithelial cells and the differentiation into epithelial cells of endometrial stromal cells.

(受付　1988年5月30日特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

当科における不妊婦人に対する手術成績の検討

Results of Operations for Women with Sterility in Our Clinic

北海道大学医学部産婦人科学教室

田中俊誠 Toshinobu TANAKA
久米麻美子 Mamiko KUME
佐藤春美 Harumi SATOH
守谷修而 Shuji MORIYA
桜木範明 Noriaki SAKURAGI
藤本征一郎 Seiichiro FUJIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hokkaido University School
of Medicine, Sapporo, 060 Japan

昭和59年1月より61年12月までの3年間に子宮卵管造影(Hysterosalpingography, HSG)，腹腔鏡検査（Laparoscopy)，および超音波断層法（Ultrasonography, USG）により卵管・卵巣自体もしくはその周囲に不妊の原因となる器質的変化が確認された婦人（n＝60）において，妊娠成立を目的とする各種の手術を施行した．施行した手術は卵管・卵巣周囲癒着剝離術（Lysis of peritubal and periovarian adhesions, n＝18)，卵管開口形成術（Salpingostomy, n＝12)，両側卵巣楔状切除術(Ovarian wedge resection, WR, n＝12)，卵巣嚢腫核出術（Ovarian cystectomy, n＝12)，卵管子宮内移植術（Tubouterine implantation, n＝6）等である．施行した手術全例における妊娠率は31.7％(19/60）であった．妊娠率が比較的高かった手術はWR（50.0％，6/12)，卵管・卵巣周囲癒着剝離術(44.4％，8/18)，および卵管開口形成術(33.3％，4/12）であり，逆に手術成績が悪かったのは卵巣嚢腫（エンドメトリオーマ）核出術ならびに卵管子宮内移植術であり，現在までに妊娠例は確認されていない．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 16－20, 1989)

緒　言

不妊の女性因子として卵管・腹膜因子の占める割合は30～40％[1]といわれている．Laparoscopy等の内視鏡の普及により従来機能性不妊として扱われていた不妊婦人の中に卵管・腹膜因子(Endometoriosisを含む）が不妊の原因となっている例が多く見つけられるようになり，その割合はさらに増加するものと思われる．わが国においても体外受精，胚移植(IVF-ET)が普及しつつあるが，森が報告[2]しているように必ずしも満足すべき成績は得られていない．従って卵管・腹膜因子が不妊の原因となっている婦人に対する手術の妊娠率を向上させることは非常に重要である．われわれが過去3年間に妊娠成立を目的として施行した各種の手術成績について検討した．

研究方法

北大産婦人科ならびに北大関連病院において昭和59年1月より昭和61年12月までに妊娠成立を目的とした各種の手術を受けた不妊婦人（n＝60）を対

象とした．我々の基準[3]に従って，多嚢胞卵巣症候群，Polycystic ovarian disease (PCOD) と診断された婦人に対してはWR (n=12)，卵管・卵巣周囲癒着 (n=18) に対してはmacro-もしくはmicrosurgeryによる癒着剝離術，卵管閉塞に対してmicrosurgeryによる卵管開口形成術 (n=12) を施行した．漿液性嚢胞腺腫 (n=1) ならびに卵巣子宮内膜症 (n=11) に対しては嚢腫核出術，卵管間質部閉塞例に対しては卵管子宮内移植術 (n=6) を施行した．microsurgeryで使用する糸はナイロンまたはデキソンの7－0～10－0，macrosugeryではデキソンまたはナイロン4－0～5－0を使用した．microsurgery用の器械は米国SSC社製，電気メスはunipolorのpinpoint coagulatorをそれぞれ使用した．術後の癒着防止策としては，すでに報告[4]してある様に，1）腹膜が露出されたら，術者，助手および手洗い看護婦は手袋のタルクを注意深く洗い落とす，2）卵管・卵巣および子宮等に対する操作は手術器具を用いて行ない，手による操作はできるだけ避ける，3）止血を完全にする，4）閉腹前に温生食水で腹腔内を洗い，デキストラン－70 (Xeran®，塩野義製薬KK，大阪) 100mlに副腎皮質ホルモン (Solu-Medrol®，日本アップジョンKK，東京) 250mgを溶解し腹腔内に注入する，5）卵管開口形成術施行例に対しては，術後1週間ならびに2週間後において可及的に通水療法を施行した．

各手術における妊娠率，手術から妊娠にいたるまでの期間，および妊娠例における流産ならびに子宮外妊娠の頻度について検討した．

手術後妊娠が成立しなかった婦人41例のうち16例においては卵管・卵巣周囲癒着の発症頻度についても検討した．

結　果

(1) 手術後の妊娠率；現在までに確認された妊娠例は19例で，妊娠率は31.7％となる．WR，卵管・卵巣周囲癒着剝離術および卵管開口形成術の妊娠率は，それぞれ50.0％(6/12)，44.4％(8/18)，33.3％ (4/12) であった．一方，卵巣子宮内膜症に対する嚢腫核出術ならびに卵管間質部閉塞に対する卵管子宮内移植術例においては現在まで1例も妊娠が成立していない（表1）．

(2) 手術から妊娠までの期間；PCODに対するWRにおいては施行後7.5±2.4 (n=6, M±SE) か月で妊娠が成立した．卵管・卵巣周囲癒着剝離術，および卵管開口形成術では術後それぞれ7.1±2.1 (n=8)，10.5±1.9 (n=4) か月に妊娠が成立した．なお，

表1　手術後の妊娠

手　術*	施行例数	妊娠例	妊娠率** (%)
両側卵巣楔状切除術	12	6	50.0
卵管・卵巣周囲癒着剝離術	18	8 4	44.4
卵管開口形成術	12	1	33.3
卵巣嚢腫核出術	12	1	8.3
漿液性嚢胞腺腫	1	1	100.0
卵巣子宮内膜症	11	0	0
卵管子宮内移植術	6	0	0
計	60	19	31.7

＊昭和59年1月～61年12月に施行した手術
＊＊昭和63年1月までの成績

1例の漿液性嚢胞腺腫核出術は術後4か月で妊娠が成立した（表2）．

表2　術後妊娠成立までの期間

手　術	妊娠までの期間(月数)	
	範囲	平均±SE
両側卵巣楔状切除術	1～14	7.5±2.4(n=6)
卵管・卵巣周囲癒着剝離術	1～15	7.1±2.1(n=8)
卵管開口形成術	8～16	10.5±1.9(n=4)
漿液性嚢胞腺腫核出術		4　(n=1)

(3) 手術後に成立した妊娠の経過；手術後に妊娠が成立した19例のうち13例 (68.4％) は正期産であった．子宮外妊娠は2例 (10.5％) に認められたが，卵管・卵巣周囲癒着剝離術および卵管開口形成術後の妊娠成立例であった（表3）．

表3　術後に成立した妊娠の経過

	例数	%
子宮内妊娠	17	89.5
正期産	13	68.4
妊娠継続中	3	15.8
流産	1	5.3
子宮外妊娠	2*	10.5

＊卵管・卵巣周囲癒着剝離術および卵管開口形成術後にそれぞれ一例づつ認められた。

(4) 術後の癒着発症頻度；術後妊娠が成立しなかった婦人における卵管・卵巣周囲癒着ならびに卵管閉塞の頻度について検討を加えた．術後の子宮卵管

造影（hysterosalpingography, HSG）による卵管・卵巣周囲癒着ならびに卵管閉塞は我々の基準[5]に従って読影した．検討した16例中15例（93.8％）に術後の癒着ならびに卵管閉塞が認められた．ことに卵巣子宮内膜症例に対する嚢腫核出術施行例においては検討した8例中全例に両側卵管・卵巣周囲癒着もしくは両側卵管閉塞が認められた．さらに，卵管子宮内移植術施行例では，検討した2例いずれにおいても手術側の強い卵管・卵巣周囲癒着ならびに卵管閉塞が確認された（表4）．

表4　術後に妊娠が成立しなかった婦人における卵管・卵巣周囲癒着ならびに卵管閉塞の発症頻度

手術	手術例数	検査例数	発症例数
両側卵巣楔状切除術	12	1	1
卵管・卵巣周囲癒着剥離術	18	3	2
卵管開口形成術	12	2	2
卵巣嚢腫核出術	12	8	8
卵管子宮内移植術	6	2	2
計	60	16	15

考　察

本研究で得られた手術成績から卵管・卵巣周囲癒着，卵管閉塞，PCOD，卵巣子宮内膜症を有する不妊婦人に対する管理法について考察したい．

PCODを有する婦人に対するWRは術後に高頻度に卵管・卵巣周囲癒着を引き起こし不妊の原因となることが報告[6]されて以来，欧米だけではなくわが国においても以前ほどWRは施行されなくなっている．われわれの教室においては，1976年1月より1986年12月までの間に46例にWRを施行し，30例（65.2％）に妊娠が成立し，そのうち10例（33.3％）が複数の生児を得ている．本研究の対象例においても現在までに6例（50％）が妊娠している（表1）．従って，clomipheneやhMG-hCGなどの排卵誘発法に抵抗性を示すPCOD婦人において，適当な術後の癒着防止策[4]を講じればWRは有効な治療法となり続けるであろう．術後1年半以上も妊娠が成立しないPCOD婦人においては，卵管・卵巣周囲癒着の発症を考慮して，laparoscopyによる検索が望ましい[4]．本研究においても，術後14か月間妊娠が成立しなかった婦人にlaparoscopyを施行し，両側の卵管・卵巣周囲癒着を認めている．

卵管・卵巣周囲癒着剥離術は肉眼的にendometriosisを認めない症例に対して行なった手術であり，原因は炎症性癒着・術後癒着等が考えられる．開腹時，癒着の程度の強いものは妊娠の成立が難しく，また再癒着も起こりやすいとの印象をえた．再癒着の防止が今後の妊娠率の改善につながると考えられる．われわれは研究方法の項で述べた防止策をroutineに施行しているが，今後は広範囲の癒着剥離術に対して癒着剥離面への腹膜移植法[7]や，術後早い時期（1～2週）でのlaparoscopic adhesiolysis[8]を施行して行きたい．

卵管開口形成術はmicrosurgeryの導入により術後の妊娠率が大きく向上した．しかし，術後の高い卵管の疎通性の回復率に比べ，妊娠率は必ずしも高くない．諸家の報告[9~12]では疎通性の回復率は74～97％であるが，妊娠率[9~14]は20～51％である．この差は藤井ら[15]も報告しているように，技術的な問題によるのではなく，術前の卵管の損傷の程度によってもたらされる．卵管内膜の線毛細胞が失われているような婦人では妊娠の成立は難しいので手術よりIVF-ETを選択すべきであろう．HSGとlaparoscopyの所見から総合的に卵管の形態学的変化を判断し，卵管開口形成術の適応を決めて行けば，今回われわれが得た妊娠率（33.3％）はさらに良くなるであろう．

新AFS分類によるminimalならびにmildの子宮内膜症に対してはホルモン療法，laparoscopy施行だけで経過を観察する待機療法でよいとの報告が多い[16~18]．しかし，1cm以上の大きさを有するendometriomaに対しては外科療法が選択されるべきとされている．Buttram, et al.[19]は手術療法によって中等症では60％，重症では35％の妊娠率を報告している．今回われわれがendometrioma，およびこれに伴う骨盤内癒着に対して施行した核出術，癒着剥離術では11例中1例も妊娠が成立していない．この原因として，1）全例が直径3cm以上のendometriomaを有する重症例であった，2）全例において，核出術施行中に嚢腫内容物が流出した，等が考えられる．永田[20]も直径3cm以上の嚢腫を伴うendometriosisは術後の妊孕率が低いと報告している．重症の内膜症に対してはIVF-ETやGIFTを念頭においた治療法を選択すべきであろう．

卵管子宮内移植術では，1）移植卵管が子宮より押し出される，2）移植卵管と子宮との縫合が難しいために，卵管腔が子宮内で正しく位置しない，3）移植卵管腔に子宮内膜が増殖する，等により成功率が低いとされている[21]．さらに，移植に際して卵管の切除による短縮は避けられず，妊娠が成立しても流産の転帰をとるものが多い．従って，卵管の間質部

からの閉塞例に対しては高木[7]も報告しているようにIVF-ETを優先させるべきであろう．

文　献

1) 野獄幸雄，澤田喜彰：女性不妊症．現代産科婦人科学大系，9巻，東京，中山書店，p47～54，1970.
2) 森　嵩英：生殖医学の進歩．日産婦誌，39：1254，1987.
3) Tanaka, T., Oikawa, M., Ohkochi, T., Sakuragi, N., Yoshida, H., Stoh, H., Moriya, S., and Fujimoto, S.: Effects of ovarian wedge resection on serum levels of gonadotropins and sex steriods and pulsatile LH release in patients with polycystic ovarian disease. Recent Reports on Gynecological Endocrinology, England, Parthenon Publishing, in Press.
4) 田中俊誠，藤本征一郎，大河内俊洋，他：多嚢胞卵巣症候群を有する婦人に対する卵巣楔状切除術について，産婦実際，36：219，1987.
5) 田中俊誠，藤本征一郎，及川　衛，桜木範明，一戸喜兵衛：卵管周囲癒着ならびに卵管通過性のHysterosalpingographyによる診断とLaparoscopyによる確認．日産婦誌，39：161，1987.
6) Toaff, R., Toaff, M. E., Peyser, M. R.: Infertility following wedge resection of the ovaries. Am. J. Obstet. Gynecol., 124: 92. 1976.
7) 高木繁夫，長田尚夫，中村陽行，他：マイクロサージェリー，特に術後癒着防止法を中心に．臨婦産，38：367，1984
8) Daniell, J. F., Pittaway, D. E.: Short-interval second-look laparoscopy after infertility surgery. A preliminary report. J. Reprod. Med., 28: 281, 1983.
9) Swolin, K.: Electromicrosurgery and salpingostomy: Long term results. Am. J. Obstet. Gynecol., 121: 418, 1975.
10) DeCherney, A. H., Case, N.: A comparison of treatment for bilateral fimbrial occulusion. Fertil, Steril., 35: 112, 1981.
11) 河上征治，永田哲朗，古川雄一：卵管形成術の症例の選択と術式の予後．産婦の世界，34：49，1982.
12) Lassen, B.: Late results of salpingostomy combined with salpingolysis and ovariolysis by electromicrosurgery in 54 wemen. Fertil. Steril., 37: 156, 1982.
13) Thie, J. L., Williams, T. J., Coulam, C. B.: Repeat tuboplasty compared with primary microsurgery for postinflammatory tubal disease. Fertil. Steril., 45: 784, 1986.
14) Luber, K., Beeson, C. C, Kennedy, J. F., Villanueva, B., Young, P. E.: Results of microsurgical treatment of tubal infertility and early second-look laparoscopy in the post-pelvic inflammatory disease patient: Implications for in vitro fertilisation. Am. J. Obstet. Gynecol., 154: 1264, 1986.
15) 藤井明和，井上正人，小林善宗：Microsurgery卵管形成術の適応と予後．産婦実際，34：973，1985.
16) Garcia, C. R., and S. S.. David.,: Pelvic endometriosis: Infertility and pelvic pain, Am. J. Obstet. Gynecol., 129: 740, 1977.
17) Schenken, R. S., and L. B. Malinak.: Conservative surgery versus expectant management for the infertile patient with mild endometriosis. Fertil. Steril., 37: 183, 1982.
18) Seibel, M., M. J. Berger., F. Weinstein., and M. L. Taymor: The effectiveness of danazol on subsequent fertility in minimal endometriosis. Fertil. Steril., 37:310, 1982.
19) Buttram, V. C., Jr., and J. W. Betts, Endometriosis. Curr. Probl. Obstet. Gynecol., 2: 17, 1979.
20) 永田行博：子宮内膜症と不妊症合併例への対応，臨婦産，40：899，1986.
21) Shirodkar, V. N.: Further Experiences in Tuboplasty. Aust. NZ. J. Obstet. Gynec., 5: 1, 1965.

Results of operations for women with sterility in our clinic

Toshinobu Tanaka, Mamiko Kume,
Harumi Satoh, Shuji Moriya,
Noriaki Sakuragi and Seiichiro Fujimoto

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hokkaido University School of Medicine,
Sapporo, 060 Japan

Several kinds of operations had been performed on 60 patients desiring their own babies from January, 1984 to December, 1986. Laparoscopy and/or hysterosalpingography (HSG) disclosed that patients undergone surgery had tubal, peritoneal, and ovarian factors as the cause for their infertility. Lysis of periadnexal adhesions was done macro- and/or microsurgically in 18 patients with peritubal and/or periovarian adhesions. Salpingostomatoplastik was also carried on microsurgically in 12 patients with bilateral occluded fimbriated end. Other operations performed macrosurgically were ovarian wedge resection (WR, n=12), ovarian cystectomy for ovarian endometrioma (n=11) and for simple cyst (n=1), and tubouterine implantation (n=6). Operations obtaining a relatively high pregnancy rate were WR (50.0%), salpingo-and/or ovariolysis (44.4%), and salpingostomatoplastik (33.3%). On the other hand, no pregnancy had been confirmed in patients undergone either cystectomy for

endometrioma (larger than 3cm in diameter) or tubouterine implantation. It is suggested from these data that either patients with severe periadnexal adhesions and/or tubal occlusion due to severe and extensive endometoriosis or patients with tubal occlusion of intramural segment might be better candidates for in vitro fertilization and egg tranfer than those for surgery.

(受付：1988年7月14日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

GIFT用機器の開発とその成績

Development of New Instruments for Gamete Intrafallopian Transfer and its Results

秋田大学医学部産婦人科学教室
太田博孝 福島峰子 児玉英也
Hirotaka OTA Mineko FUKUSHIMA Hideya KODAMA
真木正博
Masahiro MAKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita University School of Medicine, Akita 011 Japan

今回，我々は配偶子卵管内移植（GIFT）専用の機器を開発し，その治療成績を検討したので報告する．本機器は外套，キャップ，採卵針，移植用カテーテルから成る．その特徴は採卵針と移植用カテーテルの外套を統一したもので，これにより同一の穿刺孔から二つの異なる操作を可能にした．

治療対象は子宮内膜症，男性因子等の不妊原因からなる14例（15周期）である．卵胞刺激はclomiphene-hMG-hCGで行なった．精液は採卵の2時間前にとり，単層Percoll法（50％）で運動良好な精子を選別した．卵子と精子は培養液と共にカテーテル内に吸引し，腹腔鏡下で卵管采より卵管膨大部に注入した．

施行周期あたりの平均卵胞数は3.9個，平均採卵数は2.9個であり，従って穿刺卵胞あたりの採卵率は74.6％であった．3例に妊娠が成立し，1例は初期流産に終わり，1例は満期自然分娩，他の1例は現在妊娠19週で順調である．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 21—25 1989)

緒　言

Asch[1]らにより始められた配偶子卵管内移植(GIFT)法は卵管内で受精が起こるため，in vitroで受精させる体外受精・胚移植（IVF-ET）と比べ，より自然で，かつ高い妊娠率が得られ，急速に広まりつつある新しい不妊症の治療法である．しかし本法に用いられる機器はいまだ統一されたものがなく，各施設でそれぞれ考案したものを使用しているのが現状である．従って新しくGIFTを始めようとする施設は専用の機器を準備するのにとまどうことが多い．

著者らは1986年9月から1987年1月までロケット社製の採卵針を用いて，GIFT法を10例に施行したが，1例の妊娠例（初期流産）があったのみであった．そこで本法を再検討し，GIFT所要時間の短縮や配偶子操作時の至適温度の維持など種々の改良を加えた．この目的のために住友ベークライト社（東京）と協同して，同一の穿刺孔から二つの異なる操作，採卵と配偶子卵管内移植を可能にしたキットを開発し，その成績を検討したので報告する．

対象および方法

対象は秋田大学病院産婦人科不妊外来で治療を受けた14例，15周期である．このうち原発性不妊は13例，続発性不妊1例である．患者の平均年齢は32.1歳（28－36歳），平均不妊期間は7.3年（3－10年）であった．適応疾患は表1に示すように乏精子症が最も多く8例，次に子宮内膜症の6例であった．不妊原因が単一のものは9例，複合因子のものは5例

表1　配偶子卵管内移植を行なった対象疾患

対象疾患	例数
乏精子症	8
子宮内膜症	6
ヒューナー不良	2
多嚢胞卵巣	1
卵管性	1
精子無力症	1
計	19例

であった．卵管性因子は，卵管周囲癒着はあるが，両側の卵管疎通性は正常に保たれている例であった．

1．月経周期および卵胞発育のモニタリング

月経周期はclomiphene-hMG-hCGの刺激排卵周期とし，月経周期の3日目よりclomiphene 100mgを5日間投与した．HMGは150IUを，clomiphene最終日より連日筋注した．卵胞発育のモニタリングは図1に示すように超音波断層法（横河メディカルシステム：RT3600）と尿中エストロゲン半定量法（帝国臓器㈱：ハイモニターE）で行なった．LHサージの有無は尿中LH半定量法（持田製薬㈱：ハイゴナビス）で検討した．主席卵胞の最大径が18－20mmになった時点で入院させ，hCG 5000単位を筋注し，36時間後に採卵した．LHサージが認められた例は24－28時間後に採卵した．

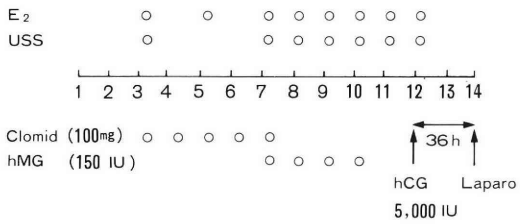


図1　卵胞刺激法と卵胞発育のモニタリング

2．採卵

患者への麻酔法は硬膜外麻酔にNLA麻酔を併用した．採卵は原則として2個以上の卵胞が発育した場合に行なった．同一孔で採卵と配偶子移植という二つの異なる操作を可能にするため，専用の外套を作製した（図2）．すなわち，外径12G（20mm），長さ92mmテフロン製の外套を内針と共に腹腔内に刺入した．内針を抜去，直ちにキャップを装着させ気腹用ガスの漏出を防止した．次いでキャップの小孔より採卵針を挿入し，卵胞を穿刺，卵胞液を吸引

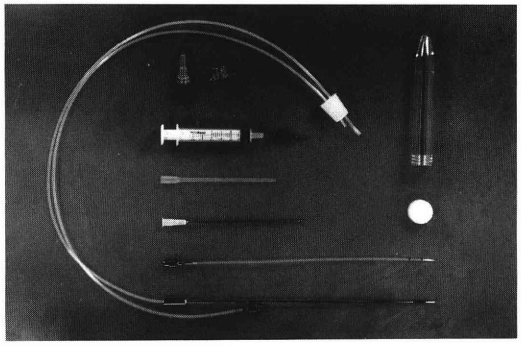


図2　配偶子卵管内移植用キット

した．採卵針は外径1.8mm，内径1.0mm，長さ216mmのステンレス製で内壁をテフロンでコートしたものを用いた．吸引はロケット社製（England）のサクションポンプを用い，100mmHgの陰圧で持続吸引した．卵胞液中に卵子を認めない場合は培養液で2回まで洗浄吸引した．吸引した卵胞液および洗浄液は直ちにculture dish（Falcon: 3001）に移し，実体顕微鏡下に卵子の有無を検索した．得られた卵子はorgan culture dish（Falcon: 3037）に入れ，卵管内移植時まで培養した．

3．培養液

培養液にはHam's F-10 (modified) を用いた．その組成は表2に示した．培養液使用の際は卵胞内洗浄用（FM）と配偶子培養・移植用（TM）に分けた．FMには1mg/mlのヘパリンを，TMには50％の非働化患者血清を加えて使用した．

表2　培養液の組成

Ham's F-10	9.8	g／L
Ca Lactate	527	mg／L
$NaHCO_3$	2100	mg／L
Na Pyruvate	52	mg／L
Penicillin-G	60	mg／L
pH	7.4	

4．精子の調整

精液は腹腔鏡手術開始2時間前に採取し，室温に30分間静置した．充分液化した精液を50% Percoll液上に静かに層積し，600×gで20分間で遠沈した．遠沈後上清を除去，10％非働化患者血清添加のHam's F-10を加え，軽く混和後再び500×gで10分間遠沈した．上清を除去，沈渣に10％非働化患者血清を添加したHam's F-10を加え，精子濃度が50μl

あたり30万となるように調整した．調整後移植時間まで炭酸ガス培養器内に静置した．

5．配偶子の卵管内移植

配偶子の移植には17Gエラスター針の外套(216mm)に1mlのツベルクリン注射器を接続して用いた．吸引の順序はまず5μl空気，1.5×10⁵個の精子を含んだ25μl精子懸濁液，5μlの空気，1－3個の卵子を含む35μl培養液，5μl空気，そして5μl培養液とした．このカテーテルをゴムキャップの小孔より腹腔内に挿入，カテーテルの先端を卵管采より卵管内約2cmのところに誘導し，全量を注入した．静かにカテーテルを抜去し，カテーテル内に残存卵子のないことを確認した．

6．黄体機能補助療法

黄体機能不全に対する予防として，3日目から40mgのallylestrenol (Gestanon®：日本オルガノン)を12日間服用させた．

成　績

1．本法による卵胞穿刺成功率は症例数，周期に対し，いずれも100%であった．穿刺卵胞数は周期当り3.9個，平均採卵数は2.9個で，卵胞あたりの採卵率は74.6%であった（表3）．

表3　配偶子卵管内移植施行例の成績

施行症例	14	—
施行周期数	15	—
穿刺卵胞数	59	—
平均卵胞数	59／15	3.9個
平均採卵数	44／15	2.9個
採卵率	44／59	74.6%
推定受精率	11／15	73.3%
妊娠率	3／15	20.0%

採卵成功例で1，2，3回目に採卵した率は，それぞれ47.7，38.6，13.6%であった．穿刺卵胞あたりではそれぞれ35.6，28.8，10.2%であった(表4)．

表4　採卵成績

採卵率	総卵子数あたり	%	穿刺卵胞あたり	%
1回目	21／44	47.7	21／59	35.6
2回目	17／44	38.6	17／59	28.8
3回目	6／44	13.6	6／59	10.2
計	44／44	100.0	44／59	74.6

GIFT後の末梢血中血小板減少度[2]からみた推定受精率は15周期中11周期73.3%であった．妊娠は3例に成立した．

2．妊娠例の検討

第1例目

妻29歳，夫30歳，不妊期間6年，多嚢胞卵巣症候群と左卵管周囲癒着のため，昭和58年クルドスコピー下で卵巣楔状切除術，卵管周囲癒着剝離術を行なった．またHuhnerテスト不良のため人工受精(AIH)を計12回施行した．GIFT周期では右卵胞より卵子を1個採卵し，精子と共に右卵管内に注入した．移植後15日目で尿中hCG 50IU/l陽性となり，基礎体温は高温相を持続した．しかし21日目より子宮出血が出現，基礎体温も下降し流産に終わった．

第2例目

妻34歳，夫33歳，不妊期間10年，昭和57年両側卵巣嚢腫のため腹式嚢腫核出術を受けた．その後通水を計17回行なったが妊娠せず，昭和61年腹腔鏡を行なったところ，右卵管采閉鎖，両側卵管周囲癒着と漿膜下子宮筋腫を認めた．このため同年マイクロサージェリー下で右卵管采開口術，癒着剝離術を，さらに子宮筋腫核出術を受けた．昭和62年7月1日腹腔鏡下で左右卵胞より卵子を各1個ずつ採卵，直ちに精子と共に右卵管膨大部に注入した．手術翌日より血小板減少を認め（図3），移植後14日目で

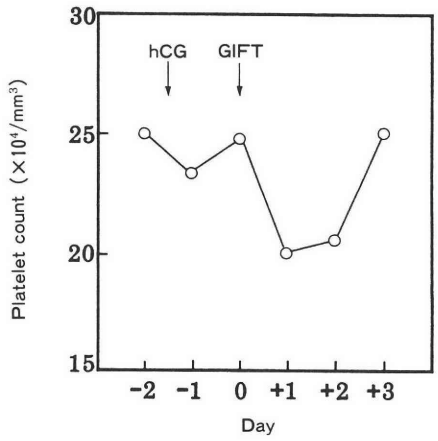


図3　症例2：配偶子卵管内移植後の末梢血中血小板数の推移

尿中hCG 50IU/l陽性となった．妊娠6週で胎児心拍を確認，妊娠7週と28週に切迫流早産で入院治療した．その後順調に経過，妊娠40週6日で男児を自然分娩した．

第3例目

妻34歳，夫37歳，不妊期間10年，乏精子症でAIH 6回，通水5回，clomiphene療法5クール，また妻は軽度の高プロラクチン血症(26ng/ml)でブロモクリプチン療法を計30週間行なったが妊娠しなかった．GIFT施行5か月前より夫の乏精子症に対し牛車腎気丸（ツムラ）により漢方療法を開始した．治療前の精子運動率は11－25％，総精子数は4－7×

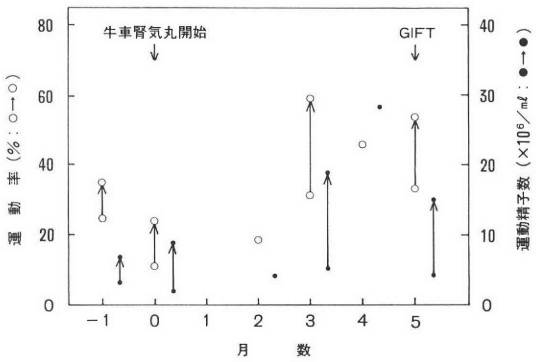


図4　症例3：牛車腎気丸服用期間中におけるPercoll処理前後での精子運動率・運動精子数濃度の変動

10^6/mlと重症型であった(図4)．GIFT施行時左卵胞より成熟卵子を計3個採卵，直ちに精子と共に左卵管内に注入した．移植後15回目で尿中hCG 50IU/l陽性となり，現在妊娠19週で順調である．

考　察

従来，腹腔鏡下で用いられる採卵針は直接腹壁を通して，腹腔内に挿入するものが多かった．このため採卵針内に腹壁の脂肪組織等が混入し，培養液によるフラッシュや再刺入などの操作を必要とした．著者らが考案した方法は専用の外套を用いるため，直接採卵針を刺入する必要がなく，直ちに採卵操作を行い得る．今回用いた採卵針の内径は1.0mmと他施設のそれと比較すると，やや細めである．しかし採卵率は穿刺卵胞あたり74.6％と高率で，諸家の報告[3]と遜色ない．この理由として著者らの採卵技術の向上，あるいは採卵針の内壁をテフロンでコーティングしているため，卵子，卵丘細胞が付着しにくいことなどが挙げられる．また必ずしも内径の大きい針程採卵率が向上するということでもないようである．同一の外套の使用により採卵後直ちに配偶子を卵管内に移植できるため，採卵針の抜去，移植用カテーテルの再挿入といった煩雑さがなく，また腹壁に不必要な創傷をつけることもない．本キットの使用により一部卵管周囲癒着のある例を除き，3孔式でGIFTが可能となり，気腹操作から移植終了まで1時間以内，多くは45分以内で終了させることが出来る．

GIFT法により妊娠率は本邦では18－35％[4~6]，諸外国では20－40％[1,7~10]に達している．一方IVF-ET法による妊娠率は本邦では低く，5－15％であるが，米国，オーストラリアの一流施設では15－35％[3,11~14]とGIFT法のそれと比べそれ程変わらない成績となってきている．本邦例でIVF-ETによる成績が比較的低い理由として幾つか考えられる．すなわち卵胞の発育をモニターするには超音波断層法による経日的計測に加え，その機能的発達を見るため，血中LH，エストラジオールやプロゲステロンの測定が必要不可欠である．本邦ではこれら3つのホルモンを同時に測る施設がまだ少ないということがある．また培養液，精子，卵子の品質管理にはそれに熱中出来る専門家等の参加による協力が必要であるが，本邦ではほとんど医師が多忙な臨床の合間に片手間で行なっているのが現状で，このことは結果を貧弱なものにする因子である．

GIFT法はin vivoで受精が起こるため，IVF-ET法と比べ，より自然に近い治療法といえる．現時点では妊娠率もIVF-ET法より高く，費用も安い．一側卵管が正常に保たれているという条件が満たされているなら，難治性不妊症に対して試みられるべき有効な治療法である．

文　献

1) Asch, R. H., Ellsworth, L. R., Balmaceda, J. P. and Wong, P. C.: Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. Lancet, Nov. 1034, 1, 1984.
2) O'Neill, C., Pike, I. L., Porter, R. N., Gidley-Baird, A., Sinosich, M. J. and Saunders, D. M.: Maternal recognition of pregnancy prior to implantation: Methods for monitoring embrynoic viability in vitro and in vivo. Ann. N. Y. Acad. Sci. 442: 429, 1985.
3) Jones, H. W., Jones, G. S., Hodgen, G. D. and Rosenwaks, Z.: In vitro fertilization -Norfork-. P52, Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1986.
4) 井上正人，小林善宗，本田育子，松山毅彦，宮川和子，藤井明和：配偶子卵管内移植(GIFT)の成績．産婦世界，38：721，1986.
5) 西　修，塩谷雅英，本田秀明，宮崎好一，佐々木太郎，山田　良：乏精子症・精子無力症に対するGIFTの有用性および男性不妊症に対する治療法．日不妊誌，32：474，1987.
6) 田中　温，戸枝通保，長沢　敢，山本　勉，中潟

直己：Original GIFT と new GIFT．産婦実際，36：1877，1987．
7) Guastella, G., Comparetto, G., Palermo, R., Cefalù, E., Ciriminna, R. and Cittadini, E.: Gamete intrafallopian transfer in the treatment of infertility: the first series at the University of Palermo. Fertil. Steril. 46: 417, 1986.
8) Nemiro, J. S. and McGaughey, R. W.: An alternative to in vitro fertilization-embryo transfer: the successful transfer of human oocytes and spermatozoa to the distal oviduct. Fertil. Steril. 46: 644, 1986.
9) Molloy, D., Speirs, A., Du Plessis, Y., McBain, J. and Johnson, I.: A laparoscopic approach to a program of gamete intrafallopian transfer. Fertil. Steril. 47: 289, 1987.
10) Matson, P. L., Yovich, J. M., Bootsma, B. D., Spittle, J. W. and Yovich, J. L.: The in vitro fertilization of supernumerary oocytes in a gamete intrafallopian transfer program. Fertil. Steril. 47: 802, 1987.
11) Beauchamp, P. J.: Human menopausal gonadotropins for follicular recruitment in in vitro fertilization and embryo transfer.: In human in vitro fertilization and embryo transfer. Edited by Wolf, D. P. and Quigley, M. M. P99, New-York, Plenum Press, 1984.
12) Kerin, J. F., Warnes, G. M., Quinn, P., Kirby, C., Jeffery, R., Mathews, C. D., Seamark, R. F., Texler, K., Antonas, B. and Cox, L. W.: In vitro fertilization and embryo transfer program, Department of Obstetrics and Gynecology, Universtiy of Adelaide at the Queen Elizabeth Hospital, Woodville, South Australia. J. In Vitro Fertil. Embryo Trans. 1: 63, 1984.
13) Sher, G., Mayville, J., Knutzen, V., Rubenstein, J. A., Stratton, C. J., Glass, M. J., Montakhab, M. M., Bilach, S. M. and Allenson, S. G.: The development of a successful non-university-based ambulatory in vitro fertilization/embryo transfer program: Phase I. Fertil. Steril. 41: 511, 1984.
14) Cohen, J., Purdy, J., Edwards, R., Rowland, G., Fehilly, C., Steptoe, P., Fishel, S., Webster, J. and Hewitt, J.: In vitro fertilization: a treatment for male infertility. Fertil. Steril. 43: 422, 1985.

Development of new instruments for gamete intrafallopian transfer and its results.

Hirotaka Ota, Mineko Fukushima, Hideya Kodama and Masahiro Maki

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita 011 Japan

We developed new instruments for gamete intrafallopian transfer (GIFT) and employed in the program in 14 cases (15 cycles).

The instruments consist of outer sleeve, cap, needle and transfer catheter. The sleeve is used for both follicular puncture and gamete transfer, which enabled us to perform the two, different procedures through the same puncture site.

Fourteen patients with the diagnosis of male factor, endometriosis or the others were treated with clomiphene citrate following human menopausal gonadotropin. Semen was collected 2 hours before oocyte pickup at surgery and treated by the technique of Percoll. After gamete evaluation, one to three oocytes and 150.000 motile sperm were loaded into a catheter and introduced through the fimbria. Patients received progesterone orally, 40 mg/day, from day 3 after GIFT for 12 days.

A mean number of follicles punctured and oocytes obtained per cycle are 3.9 and 2.9, respectively. Overall recovery rate of oocytes per follicle was 74.6% (44/59). Three patients became pregnant. One pregnancy aborted. One pregnancy proceeded to the delivery of viable infant. The other one is now ongoing pregnancy. Key words: GIFT, Infertility, fallopian tube, Instrument, Laparoscopy.

(受付　1988年7月21日特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

酸素濃度の初期胚発育に及ぼす影響
——2-cell block との関連について——

The Effect of Oxygen on the Development of Early Mouse Embryo *in Vitro*

鹿児島大学医学部産婦人科学教室（主任：永田行博教授）
竹内一浩　山元慎一　森　明人
Kazuhiro TAKEUCHI　Shinichi YAMAMOTO　Akito MORI
永田行博
Yukihiro NAGATA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, Kagoshima University,
Kagoshima 890, Japan
(Director: Prof. Yukihiro Nagata)

酸素濃度が初期胚発育にどのような影響を及ぼすかを検討するために，体外受精後の胚を胚盤胞まで培養し，次のような結果を得た．

1．1細胞期から胚盤胞への発育率は，終始5% CO_2 in airにて培養したA群は52.4％，前核期（後期1細胞期）より4細胞期まで5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2の3種ガスにて培養し，その他の時期は5% CO_2 in airとしたB群では75.4％，終始5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2の3種ガスで培養したC群では76.7％であり，A群が他の群に比して低い傾向にあった．

2．2細胞期から4細胞期までの発育率に限ってみると，A群は66.7％であり，B群の84.6％，C群の89.3％に比して有意に低値であった．ところが4細胞期から胚盤胞までの発育率はそれぞれ，84.6，94.5，92.0％で有意差はなかった．

以上の結果より，酸素濃度は初期胚の発育に影響することが明らかになった．とくに高濃度の酸素は前核期から4細胞期への発育の段階で悪影響を及ぼすと考えられ，酸素毒と2 cell-blockとの関連性が示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 26－28, 1989)

緒　言

体外受精・胚移植（IVF-ET）は現在多くの施設で行われるようになってきたが，その成功率は低く，不妊症の治療法としては決して満足の得られる成績ではない。その主要な原因として，体外培養の胚に及ぼす影響や着床の機序等が未だ完全に解明されていないためと考えられる．今回は胚の体外培養の問題点について検討した．

哺乳類の胚の培養については，1956年　Whitten[1]がマウスの初期胚を胚盤胞にまで発育させるのに初めて成功したことに始まった．さらにBrinster[2,3]は培地にピルビン酸と乳酸を用いることにより，2細胞期から胚盤胞期までより高率に発育することを見いだし，初期胚培養のための培地を確立した(表1)．しかし1細胞期から培養を始めると2細胞期までは発育するが，この2細胞期胚はその後培養を続けても4細胞期以降に発育しなかった．このように1細胞期から培養したときに2細胞期で発育が停止する現象は，“in vitro 2-cell block”と言われ，その詳

細は現在もなお不明である．このことは2細胞期以降での発育に関して，その能力を1細胞期から2細胞期の間で獲得する可能性を示唆するものであり，またこの間の培養がもっとも重要であるとも言える．今回われわれは，マウス初期胚を用いて酸素濃度の初期胚に及ぼす影響を検討し，2-cell block の解明を企図した．

実験方法

実験動物は8～12週齢のF_1雌マウス（C_{57}-black ♂×C_{3H}♀）を用いた．これらマウスはPMS（セロトロピン）5単位を腹腔内投与後，48時間後にhCG（ゴナトロピン）5単位を投与し過排卵誘起した．hCG投与17時間後に卵管膨大部より卵を採取した．精子はICRマウスの精巣上体尾部より採取し，90分の前培養ののち5～10×10^5/mlの濃度に調整し体外受精を行った．受精用培地はTYH（豊田ら[4]）を用い，発育培地はmodified Whitten's medium (5% BSA)を使用した（表1）．

表1　マウス初期胚培養のための培地

成分	培地（mM）	
	Brinster	modified Whitten's medium
NaCl	118.46	88.0
KCl	4.78	4.7
KH_2PO_4	1.18	1.1
$CaCl_2$	2.54	—
$MgSO_4.7H_2O$	1.18	1.1
$NaHCO_3$	24.88	22.6
Glucose	—	5.5
Na Pyruvate	0.25	0.2
Na lactate	25.0	21.6
Ca lactate	—	2.4
Penicilline	100IU/ml	100IU/ml
Streptomycin	50pg/ml	50pg/ml
BSA	1mg/ml	2.4mg/ml

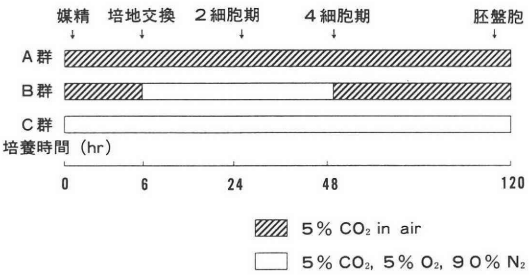


図1・3群における培養方法（ガス交換時期）

次に培養気相中の酸素濃度を3群に分けた(図1)．すなわちA群は終始5% CO_2 in airにて培養した群，B群は発育培地への交換時，すなわち前核期（後期1細胞期）より4細胞期まで5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2の3種ガスにて培養し，その他の時期は5% CO_2 in airとした群，C群は終始5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2の3種ガスで培養した群とした．これら3群の胚は培養開始24時間毎にその発育や変性率を位相差顕微鏡にて観察し，比較検討した．

結　果

3群の受精率および発育率を表2に示した．受精率はA群92.9％，B群94.2％，C群93.3％であり，3群間に有意の差は認められなかった．

しかし1細胞期から胚盤胞への発育率は，A群52.4％，B群75.4％，C群76.7％であり，A群がB群，C群に比して有意に低値を示した．次に2細胞期より4細胞期までの発育に限って検討してみると，A群では66.7％であり，B群の84.6％，C群の89.3％に比して有意に低値を示した．一方4細胞期に達した胚のみでの胚盤胞への発育率はA群84.6％，B群94.5％，C群92.0％であり，有意差は見られなかったが，A群で低い傾向にあった．

考　察

初期胚の培養には種々の因子が影響すると考えら

表2　3群における受精・発育率の比較

Group	1細胞期→2細胞期（%）	2細胞期→4細胞期（%）	4細胞期→胚盤胞（%）	1細胞期→胚盤胞（%）
A群(N＝42)	92.9	66.7[a,b]	84.6	52.4
B群(N＝69)	94.2	84.6[a]	94.5	75.4
C群(N＝30)	93.3	89.3[b]	92.0	76.7

a,b：$p<0.05$

れるが，今回は気相の及ぼす影響について検討した．過去の報告でWhitten[5]およびQuinn and Harlow[6]は高濃度の酸素が初期胚に対して毒性を示すことを報告しており，5％酸素濃度が至適濃度であると述べている．われわれの実験でも酸素濃度を空気中に含まれる22％（A群）から5％に下げることにより胚盤胞への発育率を高めることができた．

さらにわれわれの実験より，この酸素毒にもっとも反応しやすい時期は前核期，すなわち後期1細胞期より4細胞期の間であることが判明した．このことは実験B群とC群において胚盤胞への発育率に差がなかったことより実証できた．また4細胞期に到達した胚の胚盤胞期への発育率はA群がB群，C群に比して低い傾向にあり，このことは同じ4細胞期胚でもそれ以前の環境の相違によっては以後の発育に影響することを示唆している．言い替えれば，初期胚の培養において1細胞期より4細胞期の時期がもっとも重要であると言える．またこの実験から，酸素分圧が2-cell blockの重要な因子の一つであることは疑いないといえる．もちろん2-cell blockにはその他多くの因子が関与していると考えられる．その一つにEDTAの関与を述べた報告[7]もある．

現在のヒト体外受精においてはcritical periodともいえる1細胞期から4細胞期の培養が中心となる．しかし残念ながら，移植された4ないし8細胞期胚のその後の発育状況や胚の運命を知る手だてがなく，妊娠の成立を待ってしか評価できない．このため現時点においては，初期胚の体外培養をよりベストの状態で行うことが受精卵の側から見た体外受精成功への近道であるといえよう．今後さらに2-cell blockの完全な解明が待たれる．

文　献

1）Whitten, W. K.: Culture of tubal mouse ova. Nature, 177. 96. 1956
2）Brinster, R. L.: A method for in vitro cultivation of mouse ova from two cell to blastocyst. Exp. cell research, 32, 205. 1963
3）Brinster, R. L.: Studies on the development of mouse embryos in vitro IV. Interaction of energy sources. J. Reprod. Fert., 10, 227. 1965
4）豊田　裕，横山峰介，星冬四郎：マウス卵子の体外受精に関する研究，I及びII家畜繁殖誌，16，147，152．1968
5）Whitten, W. K.: Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv. in Biosci., 6. 129, 1971
6）Quinn, P. and Harlow, G. M,: The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. J. Exp. Zool., 206. 73, 1978
7）Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H.: The beneficial effect of EDTA on mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Develop Biol 61. 378, 1977

The effect of oxygen on the development of early mouse embryo *in vitro*.

Kazuhiro Takeuchi, Shinichi Yamamoto, Akito Mori and Yukihiro Nagata

Depatrment of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan
(Director: Prof. Yukihiro Nagata)

This study was performed to investigate the effect of oxygen on the development of early mouse embryos.

F_1 mouse embryos fertilized in vitro were cultured from one-cell to blastocyst stage in the following atmospheres: A. 5% CO_2 in air at 37°C from one-cell to blastocyst stage, B. 5% CO_2 in air from one-cell to four-cell stage, then 5% CO_2. 5% O_2. 90% N_2 from four-cell to blastocyst stage, C. 5% CO_2. 5% O_2. 90% N_2. from one-cell to blastocyst stage.

All the embryos were fertilized in TYH medium and were transfered to modified Whitten's medium as a growth medium after 6hrs. culturing.

The growth rates from one-cell to blastocyst stage in A, B and C groups were 52.4, 75.4, and 76.7% respectively. The growth rates from two-cell to four-cell stage in A group (66.7%) was significantly lower than those of other two groups (B: 84.6%, C: 89.3%). The growth rate from four-cell to blastocyst stage in A group was 84.6% and that was not different from those of the other two groups.

These results suggest that the oxygen has toxic effect mainly on around two-cell stage embryos in vitro.

（受付：1988年4月20日）

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

Early Pregnancy Factorの産生機序と不妊症診断への応用に関する研究

Study on Early Pregnancy Factor: Mechanism of Production and its Clinical Application as a Diagnostic Method for Infertility

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室（主任：飯塚理八教授）
伊 藤 仁 彦
Kimihiko ITOH

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

超早期妊娠関与因子（early pregnancy factor: EPF）に関し，体外受精・胚移植後および人工授精後の患者血清の活性を測定し，臨床的価値について検討を行った．さらに，産生機序の解明のため，血小板活性化因子（platelet activating factor: PAF）を用いて検討し，以下の知見を得た．

1）体外受精・胚移植において，胚移植後1日目から2日目にかけて活性の著明な上昇およびその後の活性の持続を認めた症例の予後は良好であり，EPF活性の推移が胚の予後推定に有用であることが示唆された．

2）人工授精において，① AIDの受精率はAIHより高い，② AIHにおいては，飯塚の妊孕係数に比例して受精率が高い，③洗滌濃縮AIHは有効であることが示唆された．

3）PAF投与により，発情期メスマウスにおいてEPF活性が惹起され，さらにPAF拮抗剤投与によりEPF活性惹起が抑制されたことより，EPFの産生に関しケミカルメディエターが関与する可能性が示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 29－36, 1989)

緒 言

妊娠超早期の受精卵と母体間のシグナルのひとつとして注目を浴びているearly pregnancy factor (EPF)は，1974年にMortonら[1]によって初めて報告された超早期妊娠関与因子で，マウスでは受精後6時間[1]，ヒトでは受精後48時間以内[2]に母体血液中に出現し，さらにヒト体外受精卵培養上清から受精後わずか15時間の前核期にEPF活性を検出したという報告[3]もあり受精の唯一のパラメーターであり，胚の予後に何等かの形で関与している物質であると考えられている．

日常の臨床において，X線被爆や薬剤服用の問題などで，1日も早い妊娠の診断法・切迫流産における予後推定の指標となり得る検査法の開発が望まれており，高感度のhCG測定法やpregnancy-specific β_1 glycoprotein (SP_1)に関する報告[4,6]がなされているが，いずれも基礎体温上高温相16日目以後における報告にとどまっている．

EPFの臨床応用として，著者ら[7,8]はすでに体外受

精・胚移植（IVF-ET）後の患者血液中のEPF活性について報告してきたが，さらに症例数を加え胚の予後推定にEPF活性をモニターすることが指標となり得るか否かについて検討を加えた．また，人工授精後の患者血清について受精の唯一のパラメーターであるEPF活性を測定することにより，各種不妊因子別および精液状態における受精率についても検討を行なった．

EPFの産生機序・生物学的意義および生化学的特性についてはいまだ不明な点が多く定説となるものはない．1985年にO'Neill[9,10]がマウスにおいて交配後2日目に血小板減少が認められ，さらにマウス受精卵培養液を脾摘マウスに腹腔内投与すると血小板減少が認められたと報告し，この物質をembryoderived platelet activating factor (EDPAF)と称している．また，IVF-ET後の患者末梢血中血小板が超早期より減少し，胚の予後を反映するとの報告[11,12]もなされている．そこで合成PAF（1-0-Hexadecyl-2-0-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine: Bachem fine chemicals)をマウス腹腔内に投与しEPF活性の測定を行ないEPFの産生機序について検討を加えた．

対象及び方法

1．体外受精・胚移植（IVF-ET）後の患者血清

東京歯科大学市川総合病院においてIVF-ET[13,14]行った患者30例に関し，EPF活性の推移を検討した．30例のうち8例は正常の妊娠経過をたどり分娩に至った症例で，9例は流産例，残る13例は妊娠徴候を示さなかった症例である．

検体は，胚移植前日より連日早朝6時に採血を行ない血清分離後－35℃で凍結保存し，56℃，30分間の非働化の後EPF活性を測定した．

2．人工授精後の患者血清

慶應義塾大学病院産婦人科不妊外来に通院し，人工授精を施行された患者210例のEPF活性を測定することにより各種不妊因子別および精液状態における受精率の検討を行った．

検体は，人工授精当日および3日目，5日目，7日目に採血を行ない血清分離後－35℃で凍結保存し，56℃，30分間の非働化の後EPF活性を測定した．

3．PAF投与マウス血清

PAF 5mgを無水エタノール1mlに溶解し，さらに0.25% bovine serum albumin (BSA fraction V powder: Sigma Chemical Co.)を含むphosphate buffered saline (PBS; 0.005M, pH7.4)で0.01ng/μlの濃度に調整した．マウスは生後6－8週のBALB/Cマウスを用い膣スメア法により性周期を発情前期・発情期・発情後期および休止期の4期に分類した．コントロール群にはPBS-BSA，テスト群には0.1ngから5ngのPAFを腹腔内に投与し，1時間後に心腔穿刺採血を行い，1時間室温放置後血清分離後－35℃で凍結保存し，56℃，30分間の非働化の後EPF活性を測定した．なお，実験を始めるにあたりPAFそのものにはEPF活性がないことを確認した．

さらに，PAFによるEPF活性惹起のメカニズムを探るために，PAFの受容体拮抗剤であるL 652731 (Merk)を用いて検討した．L 652731: 5ngをDimethyl sulphoxide (DMSO) 1mlに溶解し，さらに0.25% BSAを含むPBSで0.01ng/μlの濃度に調整した．あらかじめ，L 652731: 1ngを腹腔内投与した発情期メスマウスにPAF 1ngを投与し，1時間後に心腔穿刺採血を行ない先と同様にEPF活性の測定を行なった．

4．検出法と活性表示法

EPF検出は，当教室の末岡[3]，郭[15]が改良したmicro-plate assay系を用いた．男性末梢血リンパ球をFicoll Hypaque法で遠沈分離・調整後，あらかじめ非働化した検体で処理した後，抗リンパ球抗体および補体を加えて37℃，30分間インキュベーション後，ヒツジ赤血球を加えて遠沈法でE－ロゼット形成を行なった．スライドグラス上で染色鏡検し，ロゼット形成率を算定した．この際，再現性のある抗体としてT-cellモノクローナル抗体(OKT-11; Ortho Diagnostic Systems）を使用した．

EPF活性の評価法として，Morton[1]以来，抗体処理をしないロゼット形成率と比較し，75％以下に抑制する抗体の最大希釈倍数の対数をrosette inhibition titer (RIT)として表示するのが一般的だが，数値が繁雑となるため，末岡らの方法[3,15]に従い抗体の倍数希釈回数をrosette inhibition value (RIV)，さらに毎回の検出条件によるばらつきを補正するためにコントロールとのRIVの差をdissociation value (DV)として表示した．DV表示で2以上，すなわち，抗体の希釈倍数で2管差以上のものをEPF陽性として評価した．

なお，測定はすべてdouble blind studyを行なった．

また，統計学的処理は，t検定を行った．

結　果

1．体外受精・胚移植（IVF-ET）後の患者血清のEPF活性の推移

著者は，IVF-ET後の妊娠成功例・流産例・非妊娠例それぞれについて，retro spectiveに患者血清中のEPF活性につき検討を行なった．

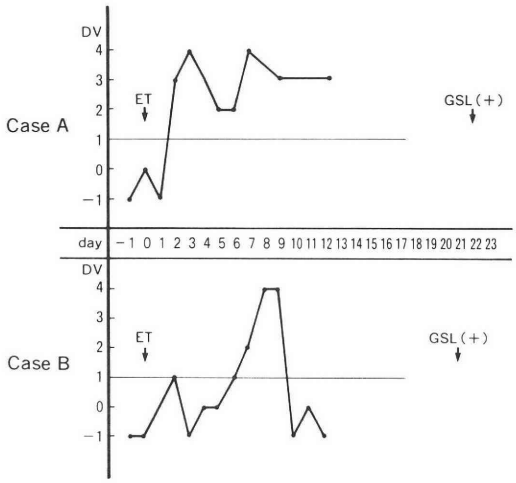


図1　体外受精・胚移植後の母体血液中のEPF活性
CASE A：正常妊娠例でET後1日目から2日目にかけての急速な活性上昇およびその後の持続を認める．
CASE B：絨毛組織を確認した流産例で活性の上昇開始は遅延し，速やかに消失している．

正常妊娠例および流産例におけるEPF活性の推移を示す（図1）．胚移植当日を0日とし，DV＝1以下をnon pregnant rangeとした．正常妊娠例Case Aは，胚移植後2日目よりEPF活性を認め，特に1日目から2日目にかけての活性上昇が著明であり，EPF活性を追跡した12日目まで常にDV＝2以上を示した．一方Case Bは，流産例におけるEPF活性の推移を示したものである．高温期5週で流産した症例であるが，DVは4まで上昇したにもかかわらず10日目には活性が消失しており，またEPF活性の上昇時期も6日目以降と正常妊娠例にくらべ著しく遅れている．この症例は，胚移植後21日目に早朝尿の妊娠反応が陽性（尿中hCG 1000IU/l以上）となったが，超音波断層検査において胎児を確認できず，胚移植後40日目に子宮内容清掃術を施行し，病理組織学的に絨毛組織が確認された症例であった．

また，chemical pregnancyであったと思われる症例におけるEPF活性の推移を示す（図2）．基礎体温上高温相が21日持続したが，尿中hCGは160IU/lまでしか検出されず，EPF活性もDV＝1以下のnon pregnant rangeであった．

30例のIVF-ET後の患者血液中EPF活性の推移を図3に示す．流産群と非妊娠群を比較すると，胚移植前日から胚移植後5日目のいずれも有意差（$P<0.05$）を認めず，活性もDV＝1以下のnon pregnant rangeであった．正常妊娠群においては，胚移植後1日目から2日目にかけての活性上昇が有意差（$P<0.05$）をもって認められ，その後も活性の持続を示し7日目まで活性が持続した症例には流産例は認めなかった．正常妊娠群と非妊娠群を比較すると，胚移植後1日目及び5日目では危険率5％以下で有意差を認め，さらに2日目から4日目では危険率1％

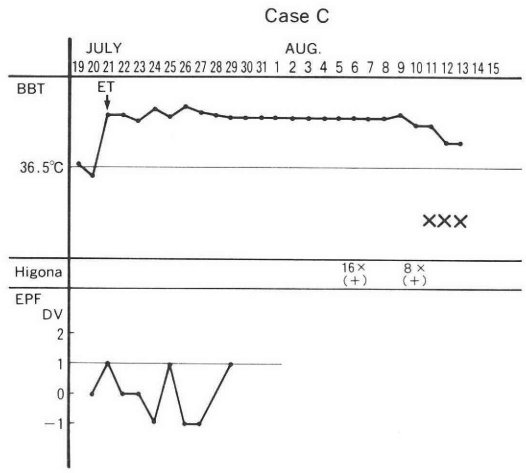


図2　体外受精・胚移植後の母体血液中のEPF活性（Chemical Pregnancy例）
BBT上高温相が21日持続したが，尿中hCGは500IU/l以下で，EPF活性も低値であった．

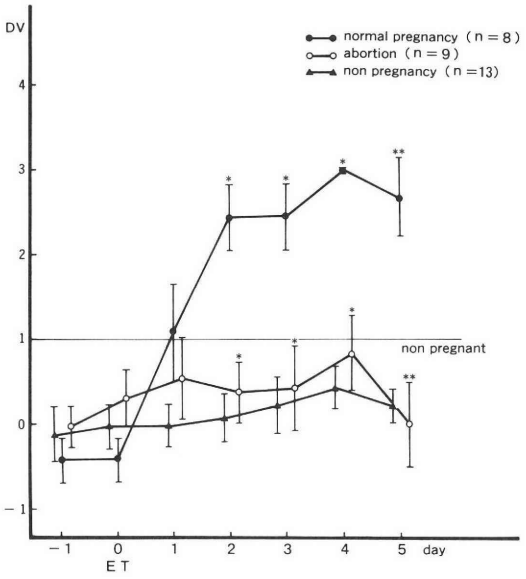


図3　体外受精・胚移植後の母体血液中EPF活性の推移
正常妊娠群は，ET後1日目から2日目にかけの活性上昇が著しくその後の推移も流産群・非妊娠群と比較して有意に異なる．（＊$P<0.01$，＊＊$P<0.05$）

以下で有意差を認めた．また，正常妊娠群と流産群との比較でも，胚移植後2日目から4日目では危険率1％以下で有意差を認め，5日目でも危険率5％以下で有意差を認めた．

以上のように統計学的にも，正常妊娠群と流産群・非妊娠群とは明らかに異なる推移を示す結果となった．

2．不妊症例における EPF 活性の検討

当院において，人工授精を施行した患者について，人工授精後3日目・5日目および7日目の EPF 活性を測定し，いずれか1日でも EPF 活性を認めた症例を EPF 陽性症例と判定した．

a．配偶者間人工授精（AIH）における EPF 活性の検討

AIH を施行した124例の EPF 陽性率を飯塚の妊孕係数[16]（F.I.＝精液1ml中の精子数×精子運動率×10^{-6}）を用いて検討した．妊孕係数に比例して EPF 陽性率が高くなり，F.I.＝30および50で段階的な増加を示している（図4）．

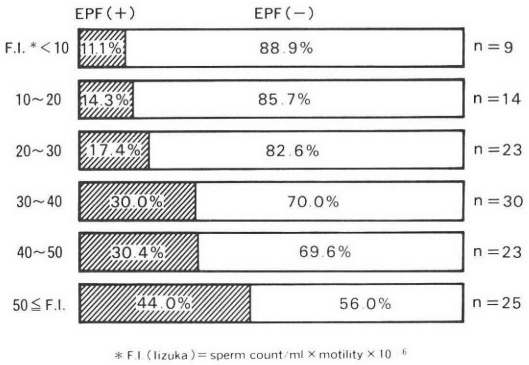


図4　飯塚の妊孕係数を用いた配偶者間人工授精における EPF 活性の検討
妊孕係数に比例して EPF 陽性率が高く認められた．
(n＝124, r＝0.965, p＜0.01)

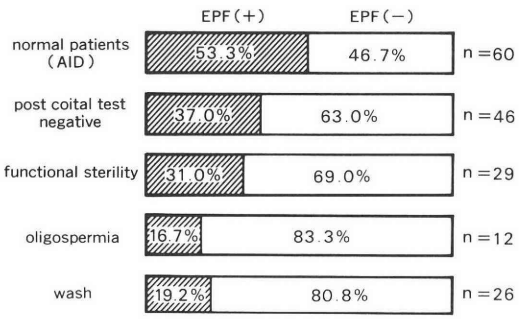


図5　各不妊因子別の EPF 活性
AID の EPF 陽性率は AIH より高く，洗滌濃縮 AIH の EPF 陽性率は精子減少症例より高かった．

b．各種不妊因子別の EPF 活性の検討

第1群は，女性因子（卵管因子・ホルモン因子）が正常で非配偶者間人工授精(AID)を施行した群で，60例中32例（53.3％）が EPF 陽性を示した．第2群は，女性因子が正常で男性因子も正常（精子数5000x10^4/ml以上，運動率60％以上）であるが3回以上の検査の結果，性交後テスト不良で AIH を施行した群で，46例中17例（37.0％）が EPF 陽性を示した．第3群は，女性因子および男性因子は第2群と同様であるが，性交後テスト良好で6周期以上のタイミング指導による自然性交でも妊娠に至らず AIH を施行した機能性不妊群で29例中9例（31.0％）が EPF 陽性を示した．第4群は，女性因子が正常で，精子数2000x10^4/ml以下の精子減少症群で，12例中2例（16.7％）が EPF 陽性を示した．第5群は，精

表1　PAF 投与後の EPF 活性

Serum sample	No. of mice	D V (mean±SD)	EPF activity
Control mice			
PAF injected males	10	0.4±0.5	−
PBS-BSA injected females (estrus)	10	0.1±0.7	−
PAF injected females			
Proestrus	18	0.1±0.7	−
Estrus	18	2.3±0.5	+
Metestrus	18	0.2±0.7	−
Diestrus	18	0.1±0.8	−

発情期メスマウスにおいてのみ PAF により EPF 活性が惹起された

子減少症例および精子運動率不良症例に対して飯塚らの方法[17]に従って洗滌濃縮AIHを施行した群で，26例中5例(19.2％)がEPF陽性を示した(図5)．

3．PAF投与後のマウス血中EPF活性の検討

PAF 1ng投与メスマウス群においては，発情前期・発情後期および発情休止期ではEPF活性を検出しえなかったが，発情期ではDV＝2から3のEPF活性を認めた．コントロール群としてのPAF 1ng投与オスマウス群およびBSA-PBS投与発情期メスマウス群においてはEPF活性を検出しえなかった(表1)．

また，発情期メスマウスにおけるPAF投与量とEPF活性強度の相関について検討を行なった結果，PAF 0.5ng以下ではEPF活性を検出し得なかったが，1ng以上ではDV＝2から3の活性を検出しPAF投与量とEPF活性強度の間に相関は認められなかった(図6)．

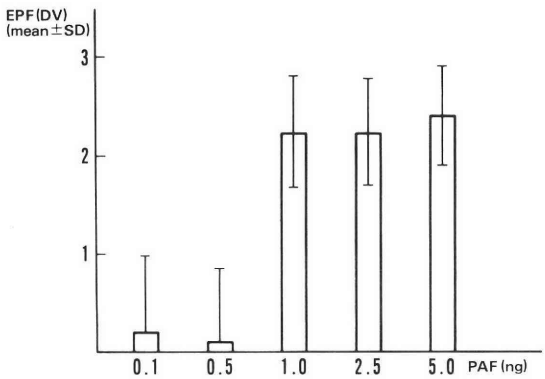


図6　PAF投与量とEPF活性
PAF 0.5ng以下ではEPF活性惹起されず，1ng以上では活性が惹起されたが，投与量と活性強度に相関は認められなかった．

さらに，PAF受容体拮抗剤(L 652731)の効果を検討した結果，PAF単独投与群において検出されたDV＝2から3のEPF活性がL 652731を前投与した群では検出されなかった．

考　案

1．胚の予後推定について

今日，日常の臨床において，X線被曝や薬剤服用の問題などで，超早期の妊娠診断法および切迫流産にけおる予後推定の指標となり得る検査法の開発が望まれており，hCGやSP_1を測定した報告がなされている．すなわち1988年に假野ら[6]は，基礎体温上高温相16日目の血中hCGを測定し10mIU/ml以上で妊娠の診断可能であり，さらに250mIU/ml以上であった50例のうち45例(90％)が予後良好であったことから，基礎体温高温16日目の血中hCGを測定することにより胚の予後を推定することが可能であると報告している．一方1988年にHoら[5]は，血中SP_1を測定し2μl/l以上で妊娠の診断可能であり，さらに排卵後16日目から20日目の間に2μl/l以上になった症例は予後良好であったことから，排卵後16日目から20日目にかけてのSP_1を測定することにより胚の予後を推定することが可能であると報告している．しかし，いずれの報告も着床後しかも排卵後16日目以後についての検討にとどまっている．

IVF-ET後の胚の予後推定に関しては，1985年にSinosichら[18]がpregnancy associated plasma-protein A (PAPP-A)・hCGおよびSP_1を測定し，PAPP-Aの推移をモニターすることが着床後における胚の予後推定に有用となり得ると報告している．しかしながら，この報告では尿の妊娠反応陽性となった症例を対象としており，胚移植直後における胚の予後については述べられていない．

IVF-ET後のEPF活性については，1985年にChenら[19,20]が，胚の予後を反映すると報告している．しかし，この報告では胚移植後2日目ないし3日目よりEPF活性を測定しているにすぎず，今回著者が測定したような胚の予後推定に重要な指標となる1日目から2日目にかけての急速な活性の上昇はとらえていないし，また胚移植後5日目までの検討はなされていない．

着床前の形態学的な因子を除いた胚の変性・着床不全・着床後の早期流産のいずれかを確認することはいまだ不可能である．しかし著者の研究では，妊娠徴候をしめさなかった症例でのEPF活性は極めて低く，流産例においても先に示したCase B(図1)のように活性上昇が6日目と遅れており，正常妊娠例で認められたような1日目から2日目にかけての急速な活性の上昇を認めず，正常妊娠例とは活性の推移が著しく異なることから，胚の予後推定にEPF活性の推移，特に1日目から2日目にかけての急速な上昇と，胚移植後5日目までの活性の持続が非常に有用であることが示唆される．

2．人工授精における受精率の検討

EPF活性が受精現象の唯一のパラメーターであることを利用し，EPF活性陽性率から人工授精における受精率の検討を行なった．

飯塚の妊孕係数(F.I.)[16]を用いてAIHにおける受精率の検討を行なった結果，妊孕係数と受精率に相関($n=124, r=0.965, p<0.01$)が認められ，男性条件が良好なほど受精率が高くなることが示唆された．

また，今回の研究ではF.I.＝30で段階的な受精率の増加を認めたが，これは精子数5000x10⁴/ml，運動率60％に相当し，我々の施設で定めている精液標準値と一致した．

AIDとAIHにおける受精率をみると，不妊因子が存在しないと考えられるAID群（60例）における受精率は53.3％で，これに対し男性因子が正常であるAIH群（75例）における受精率は34.7％でAID群に高い受精率を示唆する結果となった．当院不妊外来の統計[21]によると，AIHの妊娠率は施行例の33.1％，AIDの妊娠率は施行例の61.7％となっており，AIHの妊娠率が低い原因の一つとして，受精障害の存在が示唆された．

AIHの適応別受精率をみると，性交後テスト不良群においては37.0％，機能性不妊群においては31.0％で，性交後テスト不良群にやや高い受精率を示唆する結果となった．当院不妊外来におけるAIHの適応別妊娠成立率[22]によると性交後テスト不良群及び機能性不妊群では，それぞれ31％，20％となっており，このことからも性交後テスト不良症例に対してAIHの適用が有用であることが示唆された．

男性因子不良例における受精率をみると，洗滌濃縮AIH群およびAIH群ではそれぞれ19.2％，16.2％で，洗滌濃縮の効果があまり認められない結果となったが，我々の施設における洗滌濃縮適応例は重度精子減少症例（severe oligozoospermy）が多いためと推察する．すなわち，これら26例の洗滌濃縮前後の妊孕係数はそれぞれ，F.I.＝2.0，F.I.＝10.0であり，F.I.が10以下のAIH症例の受精率11.1％（図4）と比較すると，洗滌濃縮法の有効性が示唆された．

3．EPFの産生機序について

EPFの出現時期とその活性強度の推移は動物種によって異なるが，ヒトにおいては2相性の変化を示し受精直後に出現するearly EPFと，その後着床期頃より出現するlate EPFの2種の物質に分けて考え，この両者が必ずしも同一の産生部位・生体内作用をもたないと考えられている．

この点についてMorton ら[23~26]は，マウスに関して血清中のearly EPFをさらにEPF-AおよびEPF-Bの2種のコンポーネントに分離し，EPF-Aは性周期に一致して排卵前後の時期に卵管で産生され，もう一つのコンポーネントであるEPF-Bの存在のもとに活性化されてリンパ球に吸着するとし，EPF-Bは妊娠に依存して出現するもので，受精卵からのなんらかのシグナルで卵巣から放出される物質として，このシグナルをOvum Factorと称して報告している．

PAFは構造的にはリン脂質の一種でありヒトのみならずウサギ，ラット，マウスなど種々の動物において，アレルギーに関係した好塩基球・肥満細胞の他，好中球・単球・マクロファージなどの炎症性細胞，さらに最近では血管内皮細胞からも放出されることが知られている．その生理作用については，最も強力な血小板凝集作用のほかに，好中球・単球の活性化，降圧作用，気管支収縮作用，血管透過性亢進作用などを有することから免疫系・炎症系に重要な役割を果している新しいケミカルメディエーターである可能性が指摘されている．

1986年Orozco ら[27]は，PAFによって休止期・発情前期・発情期（Quackenbushマウス）にEPF活性が惹起されたと報告しているが，これに反し，著者の研究では発情前期・発情後期および休止期には活性を認めず，発情期にのみ活性が惹起される結果を得た．このことは，PAFはOvum Factorと同様にEPF-Bの産生を惹起する物質であることを示唆する．すなわち，EPF-Aは発情期にすでに産生されて血中に循環しており，この時期にPAFが作用したことによりEPF-AおよびBの2コンポーネントが結合し，ロゼット抑制を増幅するEPFの生物活性を惹起したことが推察される．

EPFが受精後直ちに出現し，卵分割と共に活性を増強させ，胚移植後に母体内に長く滞留する妊娠例に関してのみ極めて短期間に高い活性を生じることは，EPFが必ずしも受精卵だけから産生されているとは限らないと考えられる．まして着床以前から母体血液中に高いEPF活性を認めることは，受精卵のみから産生されるばかりでなく，受精卵からのEPFコンポーネントがトリガーとなり，母体の中で他のEPFコンポーネントが賦活されている可能性が示唆される．

PAF受容体拮抗剤投与によりEPF活性惹起が抑制されたことにより，ケミカルメディエーターを介したEPF出現のメカニズム解明に今後の検討が期待される．

稿を終えるに臨み，ご懇篤な御指導，御校閲を賜りました恩師飯塚理八教授に深謝致しますとともに，直接御指導，御鞭撻頂きました森定優講師，微生物学教室の斎藤和久教授，多田隈卓史助教授に深く感謝致します．体外受精に関する多大なご協力を頂きました東京歯科大学市川総合病院の大野虎之進教授，小田高久助教授・吉村慎一講師に感謝を捧げます．また，意義深い御教示を賜りました小林俊文助教授・名取道也講師・末岡浩博士に深く感謝致しま

す.

本論文の要旨は，第6回ヒト生殖国際会議(東京，1987年)，第5回日本受精着床学会(京都，1987年)，第32回日本不妊学会(金沢，1987年)において発表した.

なお，本研究の一部は文部省科学研究補助金，一般研究C (60570994) および奨励研究A (63771276) によった.

文　献

1) Morton H., Hegh V., Clunie G. J. A.; Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test. Nature, 249; 456, 1974
2) Morton H., Rolfe B., Clunie G. J. A., Anderson M. J., Morrison J.; An Early Pregnancy Factor detected in human serum by the rosette inhibition test Lancet; 394, 1977
3) 末岡　浩；Early Pregnancy Factorの研究——とくにヒト体外受精・胚移植に関して——日不妊誌，30；403，1985
4) Canfield R. E., O'Conner J. F., Birken S., Krichevsky A., Wilcox A. J.; Development of Assay for a Biomarker of Pregnancy and Early Fetal Loss. Environ. Health Perspect. 74: 57, 1987
5) Ho P. K., Chan S. Y. W., Tang G. W. K.; Diagnosis of early pregnancy by enzyme immunoassay of Schwanger-schafts-protein 1. Fertil. Steril., 49; 76, 1988
6) 假野隆司，出馬淳名，伊藤正尚；BBT高温16日目のHCG値による妊娠，及びその予後の判定．日不妊誌；33；330，1988
7) Itoh K., Sueoka K., Morisada M., Kobayashi T., Iizuka R.; Monitoring Early Pregnancy Factor in Maternal Circulation after in vitro Fertilization and Embryo Transfer. Japan Society for Medical Reproductive Immunology 1986, Proceedings of The lst Annual Meeting. Eds. Takeuchi S. P. 129, 1986
8) 伊藤仁彦，末岡　浩，森定　優，飯塚理八；Early Pregnancy Factor．産婦世界；39，311，1987
9) O'Neill C.; Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization in mice. J. Reprod. Fert., 73; 559, 1985
10) O'Neill C.: Examination of the causes of early pregnancy-associated thrombocytopenia in mice. J. Reprod. Fertil., 73; 567, 1985
11) O'Neill C., Pike I. L., Porter R. N., Gidley-baird A. A., Sinosich M. J., Saunders D. M.; Maternal Recognition of Pregnancy prior to Implantation: Methods for Monitoring Embryonic Viability in Vitro and in Vivo. Ann. NY. Acad. Sci., 442; 429, 1985
12) O'Neill C., Gidley-baird A. A., Pike I. L., Porter R. N. Sinosich M. J., Saunders D. M.; Maternal Blood Platelet Physiology and Luteal-Phase Endocrinology as a Means of Monitoring Pre- and Postimplantation Embryo Viability Following in vitro Fertilization. J. IVF and ET., 2; 87, 1985
13) 吉村慎一，小田高久，椎名正樹，角ゆかり，松本千秋，矢作みき，大野虎之進，飯塚理八；体外受精における成熟卵採取の時間について（第2報）Clomiphene-hMG-hCG療法．受精・着床'84；飯塚理八，坂元正一，鈴木雅洲，高木繁夫編，学会誌刊行センター，p.133，1985
14) 大野虎之進，吉村慎一，飯塚理八；ヒト胚培養法．体外受精・胚移植．鈴木雅洲編．金原出版．p.187，1985
15) 郭　宗正；Early Pregnancy Factorのassay系の改善とその臨床応用に関する研究．慶応医学，62；619，1985
16) 高島達夫，村山　茂，飯塚理八；不妊男子の精液所見．産婦世界，5；1099，1953
17) 飯塚理八，兼子　智，小塙　清，小林俊文；配偶者間人工授精へのPercoll精子洗滌濃縮法の応用，およびその分娩例の検討．産婦世界，39；993，1987
18) Sinosich M. J., Ferrier A., Saunders D. M. Monitoring of postimplantation embryo viability following successfull in vitro fertilization and embryo transfer by measurement of placental proteins. Fertil. Steril., 44: 70, 1985
19) Chen C., Jones W. R., Bastin F., Forde C.: Monitoring Embryos after in vitro Fertilization Using Early Pregancy Factor. Ann. NY. Acad. Sci. 442; 420, 1985
20) Chen C.: Early Pregnancy Factor in an in vitro Fertilization and Embryo Transfer Programme. Early Pregnancy Factor, Eds. Ellendorff F. and Koch E., P. 215, Perinatology Press, 1985
21) 飯塚理八，小林俊文，小塙　清；人工授精．産婦治療，46；192，1983
22) 小林俊文，藤田健一；人工授精の実際．周産期医学，10；1309，1980
23) Cavanagh A. C., Morton H., Rolfe B. E., Gidley-baird A. A.: Ovum factor: a first signal of pregnanncy. Am. J. Reprod. Immunol., 2; 97, 1982
24) Clarke F. M., Morton H., Rolfe B. E., Clunie G. J. A.; Partial characterisation of early pregnancy factor in the sheep. J. Reprod. Immunol., 2; 151, 1980
25) Morton H., Tinneberg H. R., Rolfe B. E., Wolf M., Merrler L,; Rosette inhibition test: a multicentre investigation of early pregnancy

factor in humans. J. Reprod. Immunol., 4; 251, 1982
26) Morton H.; Early pregnancy factor (EPF): a link between fertilization and immunomodulation. Aust. J. Biol. Sci., 37; 393, 1984
27) Orozco C., Perking T., Clarke F. M.; Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor activity in female mice. J. Reprod. Fert. 78; 549, 1986

Study on early pregnancy factor: mechanism of production and its clinical application as a diagnostic method for infertility

Kimihiko Itoh

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

Early pregnancy factor (EPF) is a pregnancy associated factor, and appears in mammalian maternal circulation at very early stage of the pregnancy even before implantation. The author detected the serum EPF activity from the patient of in vitro fertilization and artificial insemination in terms of the elucidation of the clinical insage of the detection of EPF. The interaction between EPF activity and platelet activating factor (PAF) was also analized to elucidete the mechanism of EPF production.

Obtained results were as follows:

1) In the cases of successful IVF-ET pregnancies, the remarkable elevation of EPF activity from the 1 day to 2 days after embryo transfer (ET) was obtained, and the EPF activity was positively detected in sera subsequently. Therefore, our study suggests that the monitoring of EPF activity is useful to predict the viability of the embryos after ET.

2) The AID group exibited higher percentage of positive EPF activity than the AIH group did.

3) Among the infertile factors, EPF positive rate was highest in the group of normal (AID), and the post coital test negative, the functional sterility, the AIH with condensed sperm, and the oligozoospermy were in order.

4) The EPF activity was detected in the mice only at the estrus after the injection of PAF. This activity was inhibited by the pre-medicated PAF antagonist. Therefore, our results suggest that some chemicalmediaters also participate in the onset of EPF production.

(受付：1988年8月11日特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

抗 Progesterone 剤 RU 486 の妊娠ラットに及ぼす影響について

Effects of the Antigestagenic Agent RU 486 in Pregnant Rats.

帝京大学医学部産科婦人科学教室（主任：荒井　清教授）
辻　井　　孝
Takashi TSUJII

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University, School of Medicine,
Tokyo 173, Japan
(Director: Prof. Kiyoshi Arai)

抗 Progesterone (P)剤 RU 486 の妊娠ラットに及ぼす影響について検討し，次のような結果が得られた．

(1) RU 486 は量依存性に流産誘発効果を認めたが，妊娠日齢が進むとその効果は減弱した．
(2) RU 486 で流産に至った群では投与2日後のPレベルが低値を示した．
(3)抗 Estrogen (E) 剤 tamoxifen は RU 486 の流産誘発効果を増強した．
(4)妊娠末期に RU 486 を投与すると量依存性に分娩が誘発された．
(5)P投与で過期妊娠としたラットに対しても，RU 486 は分娩誘発効果を認めた．
(6) RU 486 で分娩を誘発すると，投与24時間後のPレベルは投与前よりも有意に低値となった．
(7) RU 486 で分娩を誘発した群のトロホブラスト細胞では核濃縮化傾向を認めた．

以上の成績ならびに文献的考察より，ラットに対し RU 486 が流産，分娩誘発効果を有すること，さらにPが妊娠維持に不可欠であり，Pの消退が分娩開始の重要な要因であることが結論された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 37—46, 1989)

緒　言

Pが妊娠の維持に不可欠であることは妊娠ラットの黄体を摘出すると流産するが，Pを補充すれば流産を予防できる事実から知られてきた．多くの種で妊娠の初期には黄体がP産生部位として極めて重要な位置を占めるが，ヒトでは妊娠7週までに，羊ではおよそ妊娠10週頃にPの主たる産生部位は黄体より胎盤に移行するため，以後胎盤が妊娠の維持に不可欠となる[1]．またラットや家兎では黄体が妊娠全期間を通じPの産生部位となっている．一方，分娩発来におけるPの役割は明かでないが，ラット，イヌ，羊などでは分娩開始前に血中Pが低下し，ヒト，モルモット，サルなどでは分娩開始前後のP分泌に大きな変化が認められないと報告されている[2]．

Roussel-Uclaf 社で開発された合成ステロイド 17β-hydroxy-11β-(4-dimethylaminophenyl)-17-(prop-1-ynyl)-estra-4, 9-dien-3-one (RU 486, mifepristone) は，抗P作用，抗 glucocorticoid (Gl)作用を有し，レセプターに競合的に結合してその作用を発揮すると考えられている[3]．

本研究では RU 486 の抗P作用に着目し，その妊娠ラットに対する流産，分娩誘発作用について検討した．

実験対象および方法

1．実験対象

Wistar系12週令以後の妊娠雌ラットを用い，気温24±1.5℃，湿度50±15％，9時より22時までを照明点灯時間とし一定の条件下で飼育した．水および固形飼料は自由に摂取させた．腟内に精子を認めた日を妊娠第0日として起算した．妊娠第17日以降飼育する時は1匹ずつ隔離飼育した．

2．実験方法

(1)薬剤の調整：RU 486はTween 80を加え，ラット体重1kgあたり4mlとなるように蒸留水に懸濁させた．またPは40mg/mlとなるようにゴマ油で溶解した．他の薬剤はラット体重1kgあたり4mlとなるようにTween 80と蒸留水にて溶解調整した．コントロール（C）群にはラット体重1kgあたり4mlの生理食塩水を投与した．

(2) RU 486の流産誘発効果の検討

a．妊娠第9，12あるいは16日に，RU 486 2.5，5または10mg/kgをそれぞれ経口投与した．投与48時間後に断頭屠殺，開腹して生存胎仔数を検討した．b．妊娠第9日に，RU 486 2.5，5または10mg/kgをそれぞれ経口投与して48時間後の母体血中P値をradioimmunoassay (RIA)にて測定した．なお採取した血液はすべて血清分離後−20℃で保存した．c．妊娠第9日に，RU 486 2.5または5mg/kgと合成P剤であるmedroxyprogesterone acetate (MPA)10または20mg/kgを経口併用投与して48時間後の生存胎仔数を検討した．d．妊娠第9日に．RU 486 2.5 mg/kgと合成P剤であるcyproterone acetate (CYA)，norethisterone (NET) 10mg/kg，あるいは抗E剤であるtamoxifen (TAM)を経口併用投与して48時間後の生存胎仔数，母体血中Pを検討した．e．妊娠第9日に，RU 486 2.5mg/kgとdexamethasone (DX) 5mg/kgを経口併用投与して48時間後の生存胎仔数と母体血中corticosterone（B）を検討した．

(3) RU 486の分娩誘発効果の検討

a．妊娠第19日，15時にRU 486 2.5，5または30mg/kgをそれぞれ経口投与して妊娠期間および死産率を検討した．ラットの分娩状態を妊娠第20日より2時間ごとに観察，仔娩出開始確認時刻を妊娠期間とした．分娩終了時エーテル麻酔下に屠殺，腹部大動脈より母体血を採取してP，20α-hydroxy-4-pregnen-3-one (20α-OH-P)，Bを RIAにて測定した．b．妊娠期間を延長させるためEdgrenら[4]の方法に準じて，妊娠第17日より連日9時にP10mgを皮下投与，妊娠第21日，9時にRU 486 2.5，5または30mg/kgを経口投与した．P投与で過期妊娠となり分娩に至らなかったラットは，妊娠第24日以降で母仔共に死亡率が増加するため[4]，妊娠第24日，15時に帝王切開術（c/s）を施行した．また分娩開始確認後4時間を経過しても分娩が終了しない場合はc/sにて残りの仔を娩出させた．ラットの分娩状態は妊娠第22日より2時間ごとに観察し，上記aと同様の項目について検討した．c．妊娠第19日，15時にRU 486 2.5または30mg/kgを経口投与して6，12，18，24時間後にそれぞれ屠殺，母体血を採取した．生理食塩水投与のC群では48時間後にも検体を採取した．得られた母体血中のP，$PGF_2\alpha$をRIAにて測定した．摘出した子宮のcytosol Pレセプター（PR）およびEレセプター（ER）を測定した．また子宮および胎盤の組織学的変化を合わせて検討した．

(4)ホルモン測定法　a．P：P-11α-Succinate-BSAを家兎に免疫して得た抗血清（稀釈倍率1：50,000）と，ligandとしてP-1，2，6，7-^{3}H (NEN 106Ci/mmol) を用いてRIAを行った．得られた血清0.1mlとn・ヘキサン4mlとを振盪後ドライアイスで血清を凍結させた．次いで上清のn・ヘキサンを除去後，蒸発乾固して残渣をメタノール1mlに溶解させ，その0.2mlをRIAにて測定した．b．20α-OH-P: 20α-OH-P-3-CMO-BSA家兎抗血清（稀釈倍率1：5000）と20α-OH-P-1，2-^{3}H (NEN 50Ci/mmol)を用いてRIAを行った．血清0.1mlをエーテル4mlで抽出，乾固後上記aと同様にメタノールに溶解させ0.2mlずつ採取，RIAにて測定した．c．Corticosterone (B): B-3-CMO-BSA家兎抗血清（稀釈倍率1：8000）とB-1，2-^{3}H (NEN 52Ci/mmol)を用いてRIAを行った．血清0.1mlをジクロロメタン4mlで抽出，乾固後上記aと同様にメタノールに溶解させ0.2mlずつ採取しRIAにて測定した．d. $PGF_2\alpha$: Powell[5]の方法で抽出し，これを^{3}H標識$PGF_2\alpha$と特異的抗体を用いるAmersham社の$PGF_2\alpha$・^{3}H assay systemで測定した．

(5)組織標本の作製：摘出子宮の一部を10％緩衝ホルマリン溶液で固定してからパラフィン包埋を行った．5μm切片を作製して脱パラフィン後，HE染色を行いオリンパス社Vanox光学顕微鏡にて観察した．

(6) PR，ER測定法：測定まで摘出子宮は液体窒素中−80℃に冷凍保存した．子宮を0℃でホモゲナイズした後105,000×gで70分遠沈，上清をdextran coated charcoal (DCC)処理したものをcytosol分画とした．タンパク定量はBradford法[6]で行った．ligandに2nMの^{3}H-R5020 (NEN 86Ci/mmol)を用い，100倍量のcold R5020を入れたものを対照としてassay

を行った．この時使用したcytosol分画液は50-100μg/tube, incubation条件は0℃, overnightであった．incubate後DCCでfreeの^{3}H-R5020を吸着，遠沈，除外した後，上清の放射能を測定した．coldを加えたものと加えなかったものとの落差（dpm）を結合した^{3}H-R5020量として計算した．ERはligandに2nMの^{3}H-estradiol (NEN 96Ci/mmol)を用い，100倍量のcold estradiolを入れたものを対照としPR測定法と同様に測定した．

3．有意差検定：測定結果の統計学的処理は，Student's t-testにより行った．

研究成績

1．RU 486の流産誘発効果

(1) RU 486 2.5mg/kgを妊娠第9日に投与すると約半数の胎仔が流産し，妊娠第12日に投与した時はおよそ1/3の胎仔が流産した．しかし，同量を妊娠第16日に投与した場合，流産効果は殆ど認められなかった．また妊娠第9，12日にRU 486の5または10mg/kgを投与すると全例流産した．妊娠第16日にRU

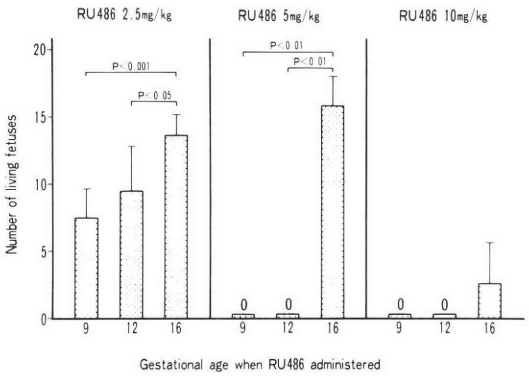


図1　Number of living fetuses confirmed two days after oral administration of various doses of RU 486 in intact pregnant rats. Number of living fetuses in control rats was 15.5±1.7. (n=5) The vertical bars indicate mean±S. D.

486 5mg/kg投与しても流産効果は発現しなかったが，10mg/kg投与した場合，およそ5/6の胎仔が流産した（図1）．RU 486の流産誘発効果は量依存性であり，また投与日の妊娠日齢が進むにつれて不良となった．

(2)妊娠第9日にRU 486 2.5, 5または10mg/kg投与48時間後の母体血中PはC群より有意に低値となった．またRU 486 2.5mg/kg投与群に比し，5，10mg/kg投与群ではPが有意に低下した（図2）．

(3) RU 486 2.5mg/kgの流産誘発効果はMPA

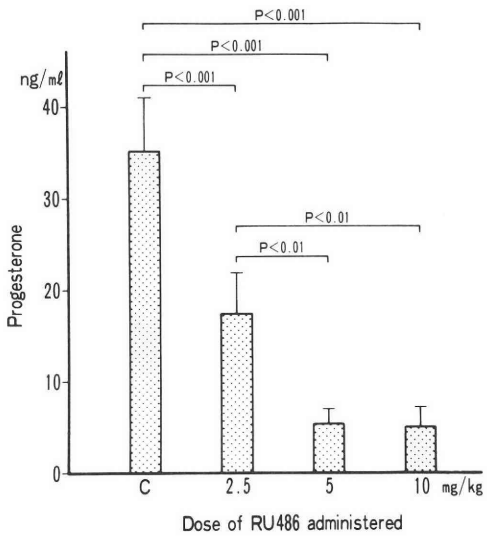


図2　Serum concentrations of progesterone on the 11th day of gestation in rats administered with various doses of RU 486 two days before decapitation. (n=5)

10mg/kgを併用投与した場合変化しなかったが，MPA投与量を20mg/kgに増量すると消失した．またRU 486 5mg/kgにMPA 20mg/kgを併用しても，流産誘発効果を阻止することが可能であった．

(4) RU 486 2.5mg/kg投与時の流産誘発効果は，CYAまたはNET 10mg/kgを併用投与しても抑制されなかった．一方，RU 486 2.5mg/kgとTAM 1mg/kgとを併用すると全例流産に至った．即ち抗E剤はRU 486の流産誘発効果を増強した．RU 486 2.5mg/kg投与群とRU 486 2.5mg/kg＋合成P剤10mg/kg投与群との間の血中P値に有意差を認めなかったが，全例流産をきたしたRU 486 2.5mg/kg＋抗E剤1mg/kg投与群ではPが有意に低下した（図3）．

(5)妊娠第9日にDX 5mg/kgをRU 486 2.5mg/kgと併用してもRU 486の流産誘発効果に影響を与えなかった．またRU 486 2.5mg/kg投与群とC群の血中B値に有意差を認めなかった．

2．RU 486の分娩誘発効果

(1) RU 486を妊娠第19日，15時に投与するといずれの群でも有意に妊娠期間を短縮することができた．またRU 486 2.5mg/kg投与群と30mg/kg投与群との間には有意差を認めた（$P<0.02$）（表1）．

(2)妊娠第17日より連日Pを投与した群では過期妊娠となり分娩に至らなかった．妊娠第21日，9時にRU 486を投与すると，2.5mg/kg投与群で5例中1例が分娩となった．5mg/kg投与群では全例分娩が開始し

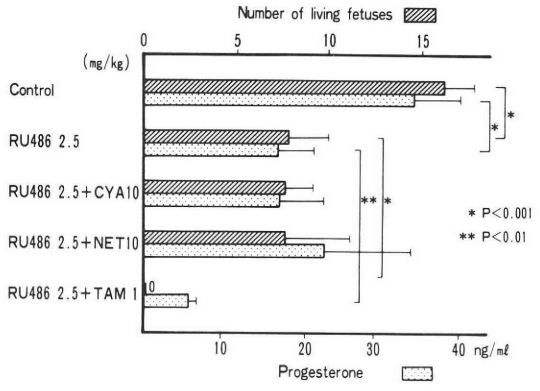


図3　Number of living fetuses & serum progesterone levels on the 11th day of gestation in rats administered with different agents (p. o.) two days before decapitation. CYA: cyproterone acetate, NET: norethisterone, TAM: tamoxifen. (n=5)

表1　The length of gestation as a single dose of RU 486 was given orally at 3 p.m.on day19 of gestation.

Agents administered (mg/kg)	n	Length of gestation(days)	Significant difference
(1) Control	4	21.97±0.47	
(2) RU 486 2.5	5	20.81±0.04	(1) vs. (2) (3) (4) p<0.01
(3) RU 486 5	5	20.73±0.07	(2) vs. (4) p<0.02
(4) RU 486 30	5	20.73±0.04	

たが，5例中3例では胎仔の娩出が不完全なため，残りの胎仔を娩出させるためにc/sが必要であった．RU 486 30mg/kg投与群では全例分娩となった（表2）．

(3)早産となったRU 486投与群の死産率はC群よりも高かった．またP+RU 486投与群の死産率は分娩に至らなかったP単独投与群よりも低値であった(表3)．

(4)分娩終了時の母体血中P, 20α-OH-P, B値を表4に示した．過期妊娠となったP投与群のP値は，分娩となったP+RU 486投与群のP値よりも有意に高値であった．またRU 486の投与量の差は，分娩終了時のP値に影響を与えなかった．20α-OH-P値はP投与群で最も高値となった．B値は各群間に有意差を認めなかった（表4）．

(5)妊娠第19日，15時にRU 486を投与した後の母体血中P値を検討すると，RU 486 2.5mg/kg投与群では投与12, 24時間後で投与前よりも有意に低下した（$P<0.05$）（$P<0.01$）．30mg/kg投与群では投与24時間後で同様の傾向を示した（$P<0.01$）．C群では生理食塩水投与48時間後に有意にPが低下した（$P<0.01$）（図4）．

(6)妊娠第19日，15時にRU 486を投与した後の腹部大動脈血中$PGF_2\alpha$値には一定の傾向を認めなかった．

(7)RU 486投与（妊娠第19日，15時）後の子宮cytosol PRはRU 486投与群がC群に比較し有意に減少し，RU 486 30mg/kg投与群でより顕著に減少した．また対照群では48時間後のPRは前値に比し有意に増加し，RU 486投与群でも24時間後のPRは増加した（表5）．子宮cytosol ERは同様の傾向を示さなかった．

(8)妊娠第19日，15時にRU 486を投与した時の子宮筋層，脱落膜，胎盤の組織学的変化を検討すると，子宮筋層，脱落膜についてはC群とRU 486投与群との間に明らかな形態学的差異が認められなかった．一方，胎盤について検討すると，RU 486 30mg/kg投与24時間後，即ち分娩前の胎盤ではC群の分娩前

表2　The length of gestation & the rate of c/s in progesterone-treated rats as a single dose of RU 486 was given orally at 9 a.m. on day 21 of gestation. ＊All the fetuses were not delivered spontaneously following an injection of progesterone alone.
※：A single dose of RU 486 5mg/kg initiated parturition, but in 3 of 5 cases(60%) RU 486 alone was not effective enough to give birth to all the fetuses.

Agents administered (mg/kg)	n	Length of gestation (days)	Rate of C/S (%)	Significant difference	
(1) P alone	5	24.63±0.00*	100		
(2) P+RU 486 2.5	5	24.22±0.92	80	(1) vs. (2) (3) (4)	p<0.001
(3) P+RU 486 5	5	22.90±0.62	60※	(2) vs. (3)	p<0.05
(4) P+RU 486 30	5	22.64±0.04	0	(2) vs. (4)	p<0.001

表3　Percent fetal or neonatal death in rats treated with RU 486 & progesterone (Number of dead fetuses & newborns/Number of total fetuses & newborns)

Agents administered (mg/kg)	Percent fetal & newborn death	Agents administered (mg/kg)	Percent fetal & newborn death
(1) Control	1.9 (1/53)	(5) P alone	46.4 (32/69)
(2) RU 486 2.5	9.9 (7/71)	(6) P+RU 486 2.5	17.9 (12/67)
(3) RU 486 5	42.3 (30/71)	(7) P+RU 486 5	10.1 (7/69)
(4) RU 486 30	34.3 (24/70)	(8) P+RU 486 30	0 (0/64)

表4　Serum concentrations of progesterone(P), 20α-hydroxy-4-pregnen-3-one(20α-OH-P) & corticosterone(B) in maternal rats at autopsy. RU 486 and progesterone were given as indicated in Tables 1 and 2.

Agents administered (mg/kg)	Length of gestation (days)	Serum levels of steroids (ng/mℓ)			Significant difference
		P	20α-OH-P	B	
(1) Control	21.97±0.47	4.67±2.67	9.19±5.57	32.10±3.44	①P (5) vs.(6) $p<0.02$ (5) vs.(7) $p<0.05$
(2) RU 486 2.5	20.81±0.04	2.86±1.44	8.18±1.31	36.36±7.60	
(3) RU 486 5	20.73±0.07	3.46±1.15	8.45±4.64	43.85±17.21	②20α-OH-P
(4) RU 486 30	20.73±0.04	2.26±0.25	7.32±1.52	26.10±11.00	
(5) P alone	24.63±0.00	13.58±4.92	22.60±3.66	38.00±13.62	(5) vs.(6) $p<0.01$
(6) P+RU 486 2.5	24.22±0.92	4.99±2.32	5.97±4.50	24.98±11.55	(5) vs.(7) $p<0.02$
(7) P+RU 486 5	22.90±0.62	5.59±2.68	15.90±3.50	21.26±5.64	③B
(8) P+RU 486 30	22.64±0.04	6.67±1.27	19.20±4.66	31.08±16.87	N.S.

figures are mean±S.D.

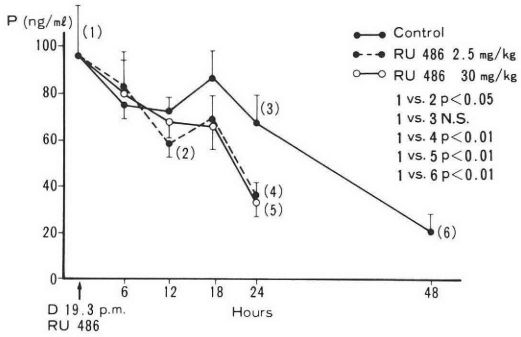


図4　Serum concentrations of progesterone after an oral administration of RU 486 at 3p. m. on day 19 of gestation. Pregnant rats were sacrificed 6, 12, 18 and 24 hours after the treatment. (n=5)

の胎盤と比較し，トロホブラスト細胞で核濃縮化傾向が認められた(図5)．同様の傾向はRU 486 2.5mg/kg投与時にも認められたが，30mg/kg投与時に比して軽度であった．

考　察

抗P剤RU 486はnorethindroneの誘導体であり17α位にpropynyl基を，11β位にdimethylamiophenyl基を有しており，Pに対してPRレベルで強い拮抗作用を有することが知られている．Gravanisら[7]は，Eを前投与した閉経後婦人にRU 486を投与すると子宮内膜が分泌期像を呈したことから，RU 486はある特定の条件下でP様作用を発揮することを報告しているが，Pの存在下RU 486はpure antagogonistとして作用すると考えられている．受精卵の着床，

表5　Cytosol PR concentration was measured in the uterus of RU 486-treated rats. Pregnant rats were administered with RU 486 at 3 p.m. on day 19 of gestation and sacrificed 6,12,18 and 24 hours later. The control rats were treated with saline. The control value before the injection of RU 486 was 1694.6±511.7 dpm/100μg protein. (n=5)

Hours after administered	Cytosol PR concentration (dpm/100μg protein)			Significant difference
	(1) Control	(2) RU 486 2.5mg/kg	(3) RU 486 30mg/kg	
6	2042.0±150.9	829.2±487.5	231.6±200.6	(1) vs.(2) $p<0.02$ (1) vs.(3) $p<0.001$
12	1548.4±549.9	1562.7±150.7	341.5±108.9	(1) vs.(3) $p<0.05$ (2) vs.(3) $p<0.001$
18	1289.4±727.4	1480.7±418.9	351.7±209.0	(2) vs.(3) $p<0.02$
24	1702.5±203.9	1576.0±240.2	879.0±350.4	(1) vs.(3) $p<0.05$ (2) vs.(3) $p<0.05$
48	3587.1±598.8			

figures are mean±S.D.

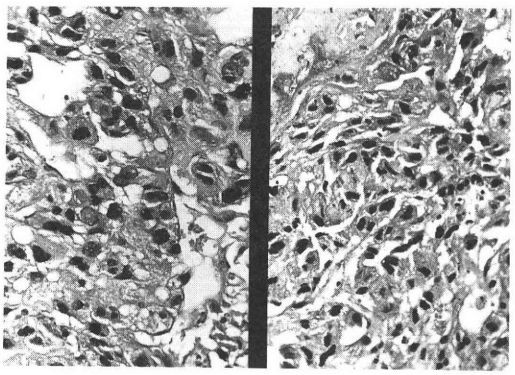


図5　Histological finding of the placenta (right) in the rat administered with RU 486 (30mg/kg/p.o.) at 3p. m. on day 19 of gestation and sacrificed after 24 hours. The placenta (left) of the control rat at 3p. m. on pregnancy day 21. Nuclear pyknosis of trophoblasts was observed in the RU 486-treated rat. (H. & E. original magnification×20)

妊娠の維持にPは不可欠であることから，RU 486の抗P作用を利用した性交後避妊薬，妊娠中絶薬などへの臨床的応用が検討されている[8]．

本研究でラット妊娠第9日に経口投与して流産率が50％となるRU 486の投与量は2.5mg/kgであることを見出した．さらに流産率が投与量や投与時期を変えると変化するか否かを検討した結果，RU 486の流産誘発効果は量依存的であり，投与日の妊娠日齢が進むにつれて無効率が高くなることが判明した．Philbertら[9]は妊娠第8日に卵巣を摘出した後，P75mg/kgとRU 486 5mg/kgを4日間併用投与すると全例流産したことを報告している．ヒトにおいても妊娠初期に投与した方がRU 486の流産誘発効果は良好であるが，これはヒト妊娠初期Pの主な産生源が未だ黄体であること，血中Pが比較的低値であることに由来すると考えられる[10]．Bartholomeuszら[11]はPがラット妊娠経過とともに上昇，妊娠第16，17日にピークを示し，分娩に先立つこと48時間前より急速に低下することを報告している．本研究で妊娠第9，12および16日にRU 486を投与した結果，第16日投与群で流産率が最も低かったが，この時期の血中Pが妊娠期間を通じて最高値をとるためと考えられた．ただしラット妊娠期間中，RU 486の代謝，PRに対する親和性が変化して，その流産効果に影響を与えている可能性も否定できない．RU 486の流産誘発効果はヒト妊娠初期では量依存傾向を認めなかったとする報告[12]もあるが，PRに対する親和性，個体の代謝，吸収の差異などによることが考えられる．RU 486のPRに対する親和性は種により異なり，ラットや家兎ではPよりも強く，ヒトや猿ではほぼ同等と言われ[3]，ニワトリではPRに対する親和性を認めないとされている[13]．

RU 486の流産誘発のメカニズムは未だ必ずしもその全貌が明かにされたわけではないが，レセプターレベルでのPとの拮抗が第一のステップと考えられる[10]．子宮内膜におけるPの作用が抑制される結果，子宮出血，胎盤の子宮壁からの剝離が起こり，二次的に黄体へluteolyticな作用が働き，同時に子宮内膜からPGの分泌が開始して子宮収縮，頸管の熟化が起こり流産が始まると推測される[8,14]．Couzinet[10]や

Kovacs[12]らはヒト妊娠初期にRU 486を投与すると，流産例では投与6－7日後よりhCG，Pが低下したことを報告して，トロホブラストの剥離が起こった結果luteolysisをきたしたと推論している。本研究で妊娠第9日のラットにRU 486を経口投与後48時間の母体血中P値の低下が確認された．流産率の上昇に呼応してPの低下が認められたこと，全例流産をしたRU 486 5および10mg/kg投与群間にPの有意差を認めなかったことから，Pは流産の結果二次的に低下したと考えられるが，ラット黄体へ本剤が直接作用した可能性も否定できない．RU 486はPRのレベルで抗P作用を発揮するのみで直接Pの分泌，代謝には影響しないと考えられてきたが[8,15]，Di Mattinaらは本剤がin vitroでヒト卵巣17α-hydroxylase活性を抑制したこと[16]，またヒト顆粒膜細胞を用いた培養実験で3β-hydroxysteroid dehydrogenase活性の抑制を認めたことから[17]，ヒト卵巣steroidogenesisへの直接作用を示唆した．

RU 486の流産効果を高めるために他の薬剤との併用が検討されている．Bygdemanら[18]によれば16-phenoxy-tetranor-PGE_2 methyl sulfonylamideの追加投与により不全流産，多量出血の発生率が低下した．今回の成績ではRU 486とDXを併用投与しても，流産誘発効果に影響がなく，Philbertら[9]と同様な結果を得た．またRU 486による血中B値の変動は認められなかった．ヒトではRU 486投与後，内因性のACTH, cortisolが増加するので，本剤の抗GI作用を発現させるためには抗P作用を発揮する量よりも大量を要すると言われている[9]．抗E剤TAMはRU 486の流産誘発効果を増強したが，斎藤ら[19]も同様の報告を行っている．ラット妊娠に対してEはluteotrophicにもluteolyticにも作用するといわれ，その詳細は明かでない[20]．Pasqualiniら[21]はモルモットのPR binding siteがTAMにより増大し，Pにより減少すること，さらにTAMによる増大効果はPの併用で阻止されたと報告している．TAMがRU 486の流産誘発効果を増大させた理由として，PRのstatusが変化した可能性，TAMの有するestrogenicな性質による可能性，および内因性Eがラット妊娠維持に関与している可能性などが推測された．

妊娠維持そして分娩発来のメカニズムの詳細は未だ明かでないが，ラット，家兎，羊など多くの動物でPは妊娠維持に不可欠であり，Pの消退が分娩開始の重要な因子と考えられている[22]．ラットにおいても分娩に先立ってPが低下すること[11,23]，妊娠後期にPを投与すると過期妊娠になること[4]が知られている．今回の成績より妊娠末期ラットにRU 486を投与すると，ほぼ24時間後に分娩となることが明らかとなった．これはRU 486がレセプターレベルでPと拮抗，Pの消退と同様に作用したためである．RU 486の分娩誘発効果は量依存性で，30mg/kg投与群は2.5mg/kg投与群よりも有意に妊娠期間が短縮した．またP投与で過期妊娠となったラットにおいてもRU 486で分娩の誘発が可能であった．子宮筋細胞間のgap junction (gjs)形成は分娩開始直前に観察され，子宮筋細胞を静的状態から分娩時の動的状態へ変化させて協調的子宮収縮を発来させる重要な変化と言われている[24]．妊娠後期のラットにRU 486を投与するとgjsの形成が増加したことより，Garfieldら[25]はこの機序を通じて子宮収縮が促進，分娩が開始すると推論した．Pで過期妊娠としたラットにRU 486を投与すると大量投与群では全例分娩となったが，投与量を減少すると分娩率も低下した．これはRU 486の投与量が少ないと，抗P作用の発現が不十分で子宮収縮が不完全なためである．RU 486がPG産生を亢進させるメカニズムは明らかでなく[26]，Kellyら[27]は子宮内膜細胞を用いた培養実験でRU 486が直接$PGF_2\alpha$産生を増大させることを報告したが，Haluskaら[28]はアカゲザルを用いた実験で直接作用に否定的な見解を述べている．今回，RU 486投与後の$PGF_2\alpha$レベル値に一定の傾向を認めなかったが，子宮静脈，子宮組織中のPGレベルに関しては，今後検討すべきであろう．RU 486投与24時間後のP値はいずれの群も投与前値に比し有意に低下したが，これは分娩開始による二次的な低下と考えられた．Garfieldら[25]も同様に妊娠第16日のラットにRU 486を投与すると全胎仔の70％が30－48時間後に娩出され，48時間後初めてP値が対照よりも有意に低下したことを報告している．今回の実験成績と比較すると，RU 486の分娩誘発効果は妊娠末期の方が優れていることが示唆された．RU 486投与24時間後のトロホブラスト細胞に核の濃縮化傾向が認められたが，これは変性所見のひとつで本剤の直接作用であるか否かは明らかでない．Dasら[29]はヒト胎盤を用いた培養実験でRU 486が量依存性にhCG, hPL, Pの分泌を抑制することを示し，トロホブラストへの直接作用の可能性を示唆した．RU 486で誘発された子宮収縮パターンは自然分娩のそれとは異なるとの報告[28]があり，分娩発来機序が若干異なる可能性も否定できない．RU 486投与による早産例で死産率が高かったのは仔の未熟性によると考えられた．Boscら[30]はRU 486で分娩を誘発，出生した仔のその後の発育には異常が無かったと報告している．またP投与で過期妊娠にした群の子宮内胎仔死亡率，死産率が妊娠日齢ととも

に高くなることは従来より述べられており[4], RU 486の影響は少ないと思われた. ラット cytosol PR を測定すると, RU 486 投与後減少が認められたが, これは本剤がレセプターと結合したためと考えられる[31]. RU 486 は cytosol PR と複合体を形成することでPに対し競合阻害を起こし抗P作用を発揮すると考えられている[3]が, それ以降の動態の詳細は未だ明かでない. 近年ステロイドホルモンは, 核に存在するレセプターと直接結合して作用を発揮するとの説[32]が提唱されており, 今後この点を含めた検討が必要である. またC群で 48 時間後の cytosol PR が増加したが, 血中Pの低下が原因の一つと考えられた.

今回の実験成績より, Pがラットの妊娠維持, 分娩開始に重要な役割を担っていることが確認された. 一方, 分娩前にPの消退が認められない妊婦においても RU 486 の分娩誘発効果が確認されており[33], 本剤の作用機序についてさらに検討を加える必要があると考えられる.

稿を終えるに臨み御指導, 御校閲を賜わりました恩師荒井清教授に深謝致します. また直接御指導, 御鞭撻頂いた神戸川明助教授に心から謝意を表し, 御協力頂きました土橋一慶講師, 吉村幸子, 小林美和子, 荒川聡子各研究員ならびに教室各員に感謝致します.

なお本文の要旨は第 38 回日本産科婦人科学会学術講演会, 第 59, 60 回日本内分泌学会学術総会, 第 94 回日本不妊学会関東地方部会, 第 32 回日本不妊学会学術講演会および 8th International Congress of Endocrinology において発表した.

文　献

1) Liggins, G. C.: Initiation of spontaneous labor. Clin. Obstet. Gynecol. 26: 47, 1983
2) 加藤　紘：妊娠ラットにおける黄体の意義とその調節機序, 山口医学, 31：351, 1982
3) Baulieu, E. E.: RU 486: An antiprogestin steroid with contragestive activity in women. In: The antiprogestin steroid RU 486 and human fertility control, pl, Plenum Press. 1985
4) Edgren, R. A. and Peterson, D. L.: Delay of parturition in rats by various progestational steroids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123: 867, 1966
5) Powell, W. S.: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. Prostaglandins. 20: 947, 1980
6) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248, 1976
7) Gravanis, A., Schaison, G., George, M., De Brux, J., Satyaswaroop, P. G., Baulieu, E. E. and Robel, P.: Endometrial and pituitary responses to the steroidal antiprogestin RU 486 in postmenopausal women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60: 156, 1985
8) Garfield, R. E. and Baulieu, E. E.: The antiprogesterone steroid RU 486: a short pharmacological and clinical review, with emphasis on the interruption of pregnancy. In: Bailliere's clinical endocrinology and metabolism. p207, Baillieres Tindall. 1987
9) Philbert, D., Moguilewsky, M., Mary, I., Lecaque, D., Tournemine, C., Secchi, J. and Deraedt, R.: Pharmacological profile of RU 486 in animals. In: The antiprogestin steroid RU 486 and human fertility control, p49, Plenum Press. 1985
10) Couzinet, B., Le Start, N., Ulmann, A., Baulieu, E. E. and Schaison, G.: Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (mifepristone). N. Eng. J. Med. 315: 1565, 1986
11) Bartholomeusz, R. K., Bruce, N. W., Martin, C. E. and Hartmann, P. E.: Serial measurement of arterial plasma progesterone levels throughout gestation and parturition in individual rats. Acta Endocrinol. 82: 436, 1976
12) Kovacs, L., Sac, M., Resch, B. A., Ugocsai, G., Swahn, M. L., Bygdeman, M. and Rowe, P. J.: Termination of very early pregnancy by RU 486-an antiprogestational compound. Contraception. 29: 399, 1984
13) Groyer, A., Le Bouc, Y., Joab, I., Radanyi, C., Renoir, J. M., Robel, P. and Baulieu, E. E.: Chick oviduct glucocorticosteroid receptor, specific binding of the synthetic steroid RU 486 and immunological studies with antibodies to chick oviduct progesterone receptor. Eur. J. Biochem. 149: 445, 1985
14) Kelly, R. W., Healy, D. L., Cameron, M. J., Cameron, I. T. and Baird, D. T.: RU 486 stimulation of PGF_2-alpha production in isolated endometrial cells in short term culture. In: The antiprogestin steroid RU 486 and human fertility control, p259, Plenum Press. 1985
15) Ververt, H. A. M. and Haspels, A. A.: Preliminary results with the antiprogestational compound RU 486 (mifepristone) for interruption of early pregnancy. Fertil. Steril. 44: 627, 1985
16) Di Mattina, M., Loriaux, D. L., Albertson, B. D., Falk, R. J. and Tyson, V.: Effect of the antiprogestin RU 486 on human ovarian steroidogenesis. Fertil. Steril. 48: 229, 1987
17) Di Mattina, M., Albertson, B., Seyler, D. E., Loriaux, D. L. and Falk, R. J.: Effect of the

antiprogestin RU 486 on progesterone production by cultured human granulosa cells: inhibition of the ovarian 3β-hydroxysteroid dehydrogenase. Contraception. 34: 199, 1986
18) Bygdeman, M. and Swahn, M, L.: Progesterone receptor blockade effect on uterine contractility and early pregnancy. Contraception. 32: 45, 1985
19) 斎藤憲康，鈴木利明，川越慎之助，広井正彦．：抗Progesterone製剤の流産作用と抗Estrogenならびに Prostaglandinの効果．日内分泌会誌（第60回日本内分泌学会学術総会抄録集）．63：488，1987
20) Tamura, H.: Role of the nongravid part of the uterus in the luteolytic effects of estrogen in pregnant rats. Endocrinol. Japon. 30: 615, 1983
21) Pasqualini, J. R., Nguyen, B. L., Sumida, C., Giambiagi, N. and Mayrand, C.: Tamoxifen and progesterone effects in target tissues during the perinatal period. J. Steroid. Biochem. 25: 853, 1986
22) Csapo, A. I.: Force of labor. In: Principles and practice of obstetrics and perinatology. p761, John Wiley & Sons. 1981
23) Labhsetwar, A. P. and Watson, D. J.: Temporal relationship between secretory patterns of gonadotropins, estrogens, progestins, and prostaglandin-F in peripaturient rat. Biol. Reprod. 10: 103, 1974
24) 斎藤良治：妊娠ラット子宮筋における分娩発来機序—gap junction形成と nuclear estradiol receptor濃度変動との相関について—．秋田医学．9：233，1983
25) Garfield, R. E., Grasc, J. M. and Baulieu, B. B.: Effects of the antiprogesterone RU 486 on preterm birth in the rat. Am. J. Obstet, Gynecol. 157: 1281, 1987
26) 石原　理，石原智子，鹿志村文子，武谷雄二，木下勝之，佐藤和雄，水野正彦：着床期マウス子宮内膜における RU 486のプロスタグランジン産生に及ぼす影響について．日本受精着床学会誌．4：141，1987
27) Kelly, R. W., Healy, D. L., Cameron, M. J., Cameron, I. T., and Baird, D. T.: The stimulation of prostaglandin production by two antiprogesterone steroids in human endometrial cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 62: 1116, 1986
28) Haluska, G. J., Stanczyk, F. Z., Cook, M. J. and Novy, M. J.: Temporal changes in uterine activity and prostaglandin response to RU 486 in rhesus macaques in late gestation. Am. J. Obstet. Gynecol. 157: 1487, 1987
29) Das, C. and Catt, K. J.: Antifertility actions of the progesterone antagonist RU 486 include direct inhibition of placental hormone secretion. Lancet. 2: 599, 1987
30) Bosc, M. J., Germain, G., Nicolle, A., Mouren, M., Philbert, D. and Baulieu, E. E.: Control of birth in rats by RU 486, an antiprogesterone compound. J. Reprod. Fert. 79: 1, 1987
31) 福岡秀興，神保利春：RU 486と Glucocorticoid及び Progestin Receptor複合体特性の比較検討．日内分泌会誌．64：698，1988
32) Faber, L. E., Wakin, N. G. and Duhring, J. L.: Evolving concepts in the mechanism of steroid action: Current developments. Am. J. Obstet. Gynecol. 156: 1449, 1987
33) Cabrol, D., D' Yvoire, M. B., Mermet, E., Cedard, L., Sureau, C. and Baulieu, E. E.: Induction of labour with mifepristone after intrauterine fetal death. Lancet. 2: 1019, 1985

Effects of the antigestagenic agent RU 486 in pregnant rats

Takashi Tsujii

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University,
Tokyo 173, Japan
(Director: Prof. Kiyoshi Arai)

The effects of the antigestagenic agent RU 486 in pregnant rats were investigated.

Administration of RU 486 induced abortion in a dose dependent manner. A larger dose of RU 486 was necessary to interrupt pregnancy in the late pregnancy as compared with the early pregnancy. P levels of RU 486-treated rats were decreased. The low levels might have been the result of abortion. Antiestrogen tamoxifen showed a synergistic effect when used in combination with RU 486.

Premature labor was initiated in rats by RU 486. Administration of P resulted in prolonged pregnancy. RU 486 interrupted pregnancy of the P-treated rats. In some cases RU 486 was not effective enough to give birth to all the fetuses. Uterine contractions induced by RU 486 might be inadequate. Effects of RU 486 on induction of labor during late gestation was dose dependent. The mortality rate of the fetuses during expulsion was correlated with pre-or postmaturity but not with toxicity of RU 486. P levels declined significantly 24 hours after the RU 486-treatment. It is probably a consequence of decreased synthesis of P following parturition. Nuclear pyknosis of trophoblasts was observed in the RU 486-treated rats. RU 486 may have a direct effect on the trophoblasts.

These results demonstrate that P is required for

the maintenance of pregnancy and withdrawal of P is one of the first steps in the initiation of parturition in rats.

(受付　1988年9月9日特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

DEOXYRIBONUCLEIC ACID α-NUCLEOTIDYLTRANSFERASE HAS TWO FORMS AND 8.4S DEOXYRIBONUCLEIC ACID α-NUCLEOTIDYLTRANSFERASE-PRIMASE COMPLEX SYNTHESIZES DEOXYRIBONUCLEIC ACID ON SINGLE-STRANDED DEOXYRIBONUCLEIC ACID OF BACTERIOPHAGE fd

Satoshi USUKI

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

Abstract: Three forms of deoxyribonucleic acid α-nucleotidyltransferase (DNA polymerase α) sedimented at about 8.4S, 6.6S and 3.4S by the sucrose gradient centrifugation from sea urchin eggs and embryos.

The 8.4S and 6.6S forms corresponded to DNA polymerase α and the 3.4S form to DNA polymerase β. Only the 8.4S form was capable of catalyzing ribonucleotides-dependent DNA synthesis, using single-stranded DNA as the template, suggesting the DNA primase to be associated with 8.4S DNA polymerase α.

Furthermore, *de novo* deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis by the pure DNA polymerase α (8.4S DNA polymerase α)-primase complex, prepared from a nuclear extract of sea urchin embryos, was studied *in vitro* with single-stranded DNA of bacteriophage fd as a template. Product analysis of DNAs showed that the complex synthesizes a wide range of DNAs as to size on the template. The amount of DNA increased linearly with the incubation time from 15 to 120 min with the similar size distributions of the synthesized DNAs.

These results suggest that sea urchin DNA polymerase α is classified as DNA polymerase α, 8.4S with DNA primase, and DNA polymerase α, 6.6S without DNA primase, and that the DNA polymerase α-primase complex synthesizes defined sizes of DNAs on the template with the similar DNA chain elongation rate (about 620 bases/min at 26℃).

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 47-55, 1989)

Introduction

Recently, Usuki and co-workers[1~17] reported that DNA polymerase α, one of three kinds of DNA polymerase (α, β and γ) in eukaryotes (Table 1)[18~25], is involved in the events related to the reproductive process (Fig. 1). Multiple forms of the DNA polymerase α have been reported, but the biochemical properties distinguishing them from each other are not known[26].

Recently, the association of DNA primase, a subunit of DNA polymerase α involved in the

primer RNA synthesis of Okazaki fragments[27,28], with DNA polymerase α was reported in a variety of eukaryotes[29~31]. In sea urchin embryos, the heterogeneity of DNA polymerase α[32,33] and DNA primase activity[28] has been described. The DNA polymerase α-primase complex seems to participate in the formation of Okazaki fragments, 25-300 bases in length attached with small

Table 1. Nomenclature for DNA polymerases

DNA polymerase	α	β	γ
Terms used previously	I[18,19], II[20,21], C[22,23], 6-8S[24], maxi[25],	II[18,19], I[20,21], N[22,23], 3.4S[24], min[25]	III[18,19], R[21]
Sedimentation constant	7−10S	3−4S	6, 8S
Molecular weight (dalton)	150,000−250,000	38,000−40,000	150,000−250,000
pH	−4.5	8.5−9.0	5−6
Sensitivity to			
SH-inhibitors	High	Low	High
Aphidicolin	Sensitive	Resistant	Resistant
N-Ethylmaleimide	Sensitive	Resistant	Sensitive
ddTTP	Resistant	Sensitive	Sensitive
Template/primer			
Activated DNA	+	+	−
Poly(rA)/oligo(rT)	−	+	+

DNA polymerase; called also DNA deoxynucleotidyltransferase, DNA nucleotidyltransferase or DNA pyrophosphoxylase.

4 pyrophosphate + $(DNA)_n$

DNA polymerase ↓↑

4 deoxynucleoside triphosphates + $(DNA)_{n+1}$

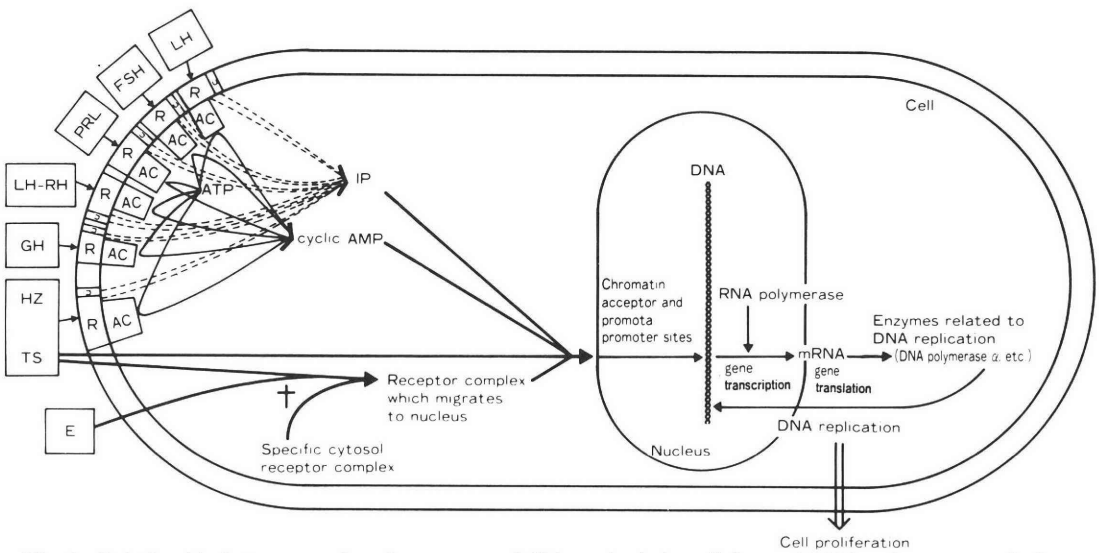


Fig. 1 Relationship between various hormones and Chinese herbal medicine and DNA polymerase α during ovarian follicle growth.

R, receptor; U, factors undetermined at present; AC, adenylate cyclase; GH, growth hormone; PRL, prolactin; E, estrogen; HZ, Hachimijiogan; TS, Tokishakuyakusan; IP_3, inositol 1, 4, 5-triphosphate.

RNA[34], *in vivo*[29,30,35]. The present study was carried out to examine whether DNA polymerase α has different molecular sizes, and to determine the amount of DNA products and the DNA chain elongation rate in order to provide some insight into the *in vivo* function of the DNA polymerase α-primase complex.

Materials and Methods

The unfertilized eggs and blastulae (embryos developed for 15 hr at 20℃ after fertilization) of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, were washed three times with sea water and three times with 1.0M glucose prior to use.

Unlabelled deoxyribonucleoside 5'-triphosphates, ribonucleoside 5'-triphosphates and 2', 3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate (ddTTP) were purchased from Boehringer Mannheim (West Germany). [^{3}H] deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP, 96.8 Ci/mmol), [^{3}H] deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP, 42.9 Ci/mmol) and [^{35}S] deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP) αS (1,015 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, U. S. A.). Calf thymus DNA was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, U. S. A.), and activated as described previously[36]. Aphidicolin was a gift from Dr. S. Ikegami (Department of Applied Biochemistry, Hiroshima University). N-Ethylmaleimide was a product of Wako Pure Chemicals (Osaka). Bacteriophage fd DNA was a gift from Dr. T. Yagura (Saitama Cancer Center Research Institute). Poly (dc), λ DNA-Hind III fragments and φX174 RF DNA-Hae III fragments were obtained from P-L Biochemicals (Milwaukee, U. S. A.), Nippon Gene (Toyama) and New England Biolabs (Beverly, U. S. A.), respectively.

Sucrose gradient centrifugation

The unfertilized eggs ($1x10^5$) and blastulae ($1x10^5$) were homogenized in 1.0 ml of a solution containing 0.25 M sucrose, 20 mM potassium phosphate buffer (PPB, pH 7.9), 5 mM 2-mercaptoethanol and 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged at 10,500 x g for 30 min. To the resulting supernatant (1.0 ml) were added 2 mg of bovine serum albumin (BSA) and 58 mg of NaCl, followed by the addition of 0.3 ml of distilled water. An aliquot (0.4 ml) of the supernatant was applied onto a 4.6 ml of 10-20% (w/v) sucrose gradient containing 20 mM PPB (pH 7.9), 5 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 M NaCl and 1 mg/ml BSA. Centrifugation was carried out at 48,000 rpm for 21 hr, using a Hitachi swinging-bucket rotor RPS55T. The fractions (0.28 ml) were then collected from the bottom of the centrifuge tube. To determine sedimentation coefficients of the DNA polymerases, beef catalase (11.3S), yeast alcohol dehydrogenase (7.6S) and horse hemoglobin (4.4S) were centrifuged in a same run.

Preparation of the DNA polymerase α-primase complex from sea urchin embryos

The embryos (about $5x10^5$) were homogenized in a 20 ml solution containing 0.25 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM $MgCl_2$ and 1.0% Triton X-100 with a Teflon-glass homogenizer, followed by centrifugation at 2,000 x g for 10 min. The precipitate was resuspended in 20 ml of the above solution without Triton X-100, and then centrifuged at 2,000 x g for 10 min. Again the precipitate was resuspended in 1.0 ml for 0.25 M sucrose, 25 mM Tris HCl (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 1.0 M NaCl and 1 mg/ml BSA, followed by centrifugation at 10,500 x g for 20 min. Thus obtained supernatant (200 μl) was applied to a 4.8 ml 10-20% linear sucrose gradient containing 20 mM PPB (pH 7.9), 0.25 M NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM EDTA and 1 mg/ml BSA, and then centrifuged at 48,000 rpm for 18 hr in a rotor. After the centrifugation, fractions (0.2 ml each) were collected from the bottom of the tube and aliquots of the fractions were assayed for DNA polymerase α-primase activity. The fraction showing the activity was used for the experiments.

Measurement of DNA polymerase activity

The enzyme solution (5 μl) was incubated for 60 min at 26℃ in the standard reaction mixture (25 μl) containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 μM each of dATP, deoxycitidine 5'-triphosphate (dCTP), dGTP, and dTTP (containing 1.0 μCi [^{3}H] dTTP), 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 100 μg BSA, 10% glycerol and 4.0 μg of activated DNA. Following incubation, the radioactivity incorpo-

rated into the acid-insoluble fraction was determined as described previously[3]. DNA polymerase activity was defined as the pmol deoxynucleotide 5'-monophosphate (dNMP) incorporated into the acid-insoluble fraction/60 min/26℃. To distinguish DNA polymerase α from β, the assays were conducted simultaneously with and without inhibitors (20 μg/ml aphidicolin, 20mM N-ethylmaleimide and 100 μM dideoxythymidine 5'-triphosphate).

Measurement of DNA polymerase α-primase activity

To determine the activity of the DNA polymerase α-primase complex, the ribonucleotides-dependent (NTP-dependent) DNA synthesizing activity and the poly(dC)-dependent DNA synthesizing activity were measured. Each was defined as pmol dNMP incorporated into the acid-insoluble fraction/60 min/26℃.

An NTP-dependent DNA synthesis was carried out as described in measurement of DNA polymerase activity, except that 1.0 μg single-stranded DNA of bacteriophage fd was added, instead of activated DNA, in the presence and absence of NTPs (1 mM ATP, 500 μM each of CTP, GTP and deoxyuridine 5'-triphosphate [UTP]). The difference in activity with and without NTPs was designated NTP-dependent DNA synthesizing activity.

Poly(dC)-dependent DNA synthesis was carried out as described in measurement of DNA polymerase activity, except that, instead of dATP, dCTP, dTTP and activated DNA, 1.0 μg poly(dC) and 1.0 μCi [^{3}H] dGTP were used in the presence and absence of 200 μM GTP. The difference in activity with and without GTP was designated poly(dC)-dependent DNA synthesizing activity.

DNA synthesis by the DNA polymerase α-primase complex with single-stranded DNA of bacteriophage fd as a template

Aliquots of the enzyme solution were incubated for definite times at 26℃ in a 25 μl standard reaction mixture containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 μM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (containing 1.0 μCi [^{3}H]dTTP or [^{35}S]-dATPαS), 1.5 mM ATP, 500 μM each of CTP, GTP, and UTP, 10 mM $MgCl_2$, 40 mM NaCl, 10 μg BSA, 10% glycerol and 2.0 μg (0.94 pmol) single-stranded DNA of bacteriophage fd. To determine the DNA synthesizing activity, 25 μl of 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl and 50 mM EDTA was added after the incubation, and then incorporation of [^{3}H] deoxythymidine 5'-monophosphate into the acid-insoluble fraction was determined as described previously[33]. To analyze the reaction products by gel electrophoresis, 50 μl of 1.5% sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl and 50 mM EDTA was added after the incubation with [^{35}S] dATPαS, and then the DNA fraction was extracted according to Dillon *et al.*[37].

Analysis of the DNA products

The [^{35}S]-labelled DNA products were subjected to gel electrophoresis in 0.7% neutral agarose gel for 15 hr at 20 v/14 cm, and in 1.4% alkaline agarose gel for 14 hr at 30 v/14 cm, according to the methods of Sugden *et al.*[38] and Ikeda *et al.*[39], respectively. After the electrophoresis, each gel was stained with 5 μg/ml ethidium bromide, followed by visualization of the DNA under a UV lamp at 304 nm. The gel was then dried on DEAE paper and cut into 3 mm slices, and then the radioactivity in each slice was counted in a toluene-based scintillator.

Other methods

Protein content was determined by the method of Lowry *et al.*[40] using BSA as a standard. All chemical reagents were of analytical grade and organic solvents were distilled prior to use.

Results

On sucrose gradient centrifugation, the DNA polymerase showed three peaks of activity (8.4±0.6, 6.6±0.4 and 3.4±0.2 S; mean±SD) (Fig. 2). The 8.4S and 6.6S activities corresponded to DNA polymerase α, while the 3.4S activity corresponded to DNA polymerase β. The NTP-dependent DNA synthesizing activity co-sedimented with only 8.4S activity, suggesting the 8.4S activity to correspond to the DNA polymerase α-primase complex. In Fig. 3, the 8.4S fraction catalyzed DNA synthesis with single-stranded DNA of bacteriophage fd as a template in the presence of

ATP, CTP, GTP and UTP, and the DNA synthesis was due to DNA polymerase α but not DNA polymerase β or γ. Almost all of DNA products synthesized *in vitro* was seen at a position corresponding to single-stranded DNA of bacteriophage fd on alkaline agarose gel electrophoresis (data not shown). The newly synthesized DNAs, more than 90% of which was separated from the template, increased linearly with the 120 min incubation time, and showed a wide size range of 200-6,000 bases with similar size distributions (Fig. 4). The 3,000-6,000 base-DNA was synthesized during the first 5-15 min incubation (Fig. 4). The amount of newly synthesized DNA, contained in the defined DNA bands shown as I, II, III, IV and V in Fig. 4, was plotted *versus* the incubation time, and the amount increased linearly with the incubation time (data not shown). The mean lengths of the DNAs were 4,000, 1,700, 1,000, 600 and 250 bases for I, II, III, IV and V in Fig. 4, respectively. In Table 2, the DNA chain elonga-

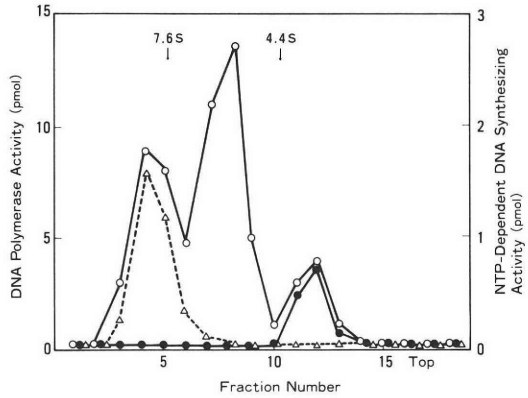


Fig. 2 Separation of DNA polymerase activity by sucrose gradient centrifugation. The arrows indicate the positions of yeast alcohol dehydrogenase (7.6S) and horse hemoglobin (4.4S). DNA polymerase activity with activated DNA as the template (o, 20 mM N-etylmaleimide-treated; ●, N-ethylmaleimide-untreated); ribonucleotides (NTP)-dependent DNA synthesizing activity with single-stranded DNA of bacteriophage fd as the template (△).

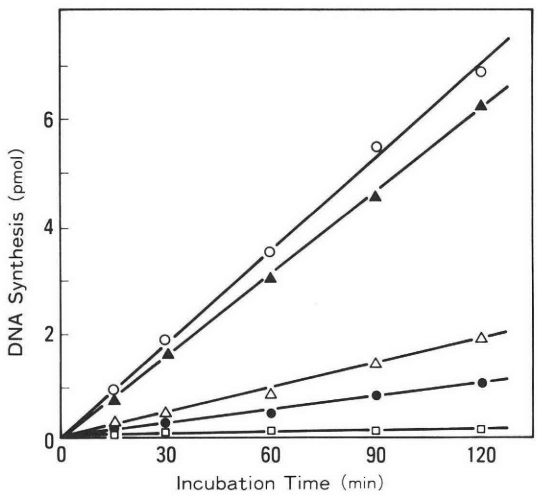


Fig. 3 Time course of DNA synthesis by the DNA polymerase α-primase complex with single-stranded DNA of bacteriophage fd. ○, DNA synthesis in the standard reaction mixture; ●, ribonucleotides omitted; △, 20 μg/ml aphidicolin added; ▲, 100 μM 2', 3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate added; □, 20 mM N-ethylmaleimide added.

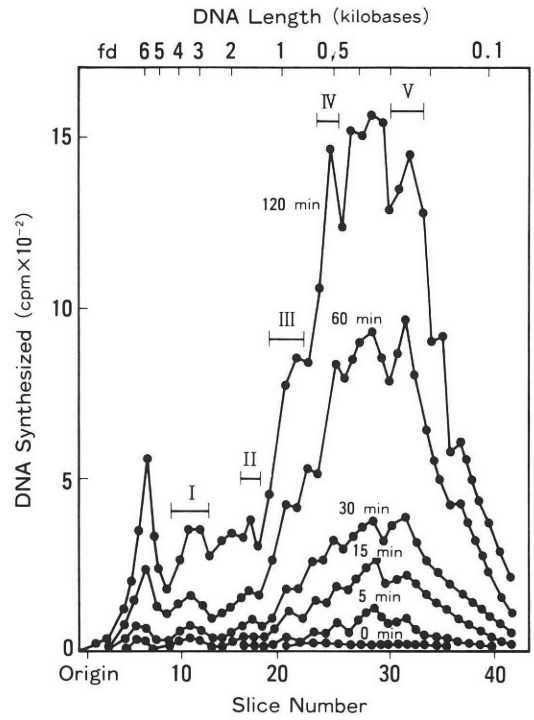


Fig. 4 New DNA synthesis by alkaline agarose gel electrophoresis. DNA synthesis was carried out with the DNA polymerase α-primase complex (5 μl of fraction number 5 in Fig. 2) in the presence of [^{35}H]dATP$_{\alpha}$S. The incubation times for the DNA synthesis are shown in the Figure. fd denotes the position of bacteriophage fd single-stranded linear DNA (6,408 bases in length).

Table 2. Defined sizes of DNAs and DNA chain elongation rates.

DNA bands	Mean lengths of DNAs (bases)	DNA chain elongation rates (bases/min)
I	4,000	666
II	1,700	425
III	1,000	625
IV	600	750
V	250	625

I, II, III, IV, and V correspond to the DNA bands indicated by bars I, II, III, IV and V in Figure 4.

tion rate for each DNA was determined by dividing the mean length of each DNA (bases) by the time, initial appearance time of a defined size of DNA, when the amount of DNA was 0 cpm. The mean rate was approximately 620 bases/min (618±107; mean±SD). This rate was greater than of *in vivo* Okazaki fragments.

Discussion

In this study, the DNA polymerase α was classified as DNA polymerase α, 8.4S with DNA primase, and DNA polymerase α, 6.6S without DNA primase. It is well known that the DNA polymerase α-primase complex participates in the formation of small ribonucleic acid (RNA) and catalyzed DNA chain elongation with RNA using single-stranded DNA as a primer[28~31,35]. The present DNA polymerase α (8.4S DNA polymerase α)-primase complex synthesized DNA on single-stranded DNA of bacteriophage fd through the same mechanism as that in the case of the purified DNA polymerase α-primase complex as reported previously [28~31,35].

The DNA synthesis occurred on defined regions of the template, independently of the incubation time, and defined sizes of DNAs are synthesized repeatedly at the same DNA chain elongation rate, approximately 620 bases/min at 26℃. König et al.[41] reported that the DNA polymerase α-primase complex synthesizes defined sizes of DNAs, of approximately 600-2,000 bases in length, on single-stranded DNA of bacteriophage fd in Xenopus laevis and that the sizes of DNAs synthesized depend on the structure distribution on the template.

The properties of the present DNA polymerase α-primase complex are consistent with those for the Xenopus complex, suggesting that the synthesis of the defined sizes of DNAs may also depend on the structures of the template.

The mean present DNA chain elongation rate for the DNAs was approximately 620 bases/min and greater than *in vivo* Okazaki fragments[42]. This also suggests that some factors other than the 8.4S DNA polymerase α-primase complex participate in the *in vivo* formation of Okazaki fragments.

Recently, Shioda[43] prepared another crude DNA polymerase α-primase complex from sea urchin blastulae the DNA synthesis of which was approximately 5-10-fold greater than that of the present complex under the same conditions. There may exist at least two DNA polymerase α-primase complexes in the sea urchin blastula. Therefore, the present DNA chain elongation rate, lower than that for another complex, seems to be due to the properties of the complex itself rather than the conditions used. The complex seems to function *in vivo* in association with other factors which maintain the *in vivo* elongation rate.

Recently, the DNA polymerase α has been shown to be closely involved in the events related to the reproductive process[1~17]. So, the biochemical elucidation of the action of DNA polymerase α is also a very intriguing problem to be investigated, as to basic and clinical aspects, and such a study might provide unique models for understanding the mechanism of further metabolic pathways leading to DNA replication in relation

to the reproductive system.

In summary, sea urchin DNA polymerase α seems to be classified as two forms, 8.4S with DNA primase and 6.6S without DNA primase, and the 8.4S DNA polymerase α-primase complex may synthesize defined sizes of DNAs with the similar DNA chain elingation rate (about 620 bases/min) (Fig. 5).

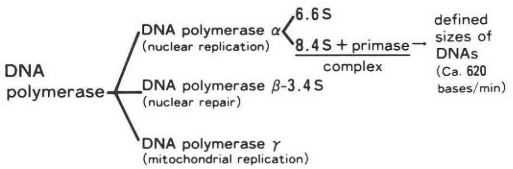


Fig. 5 DNA polymerase α and DNA polymerase α-primase complex in the sea urchin.

Acknowledgements

The author is grateful to thank Dr. M. Shioda, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan, for making the DNA polymerase determinations. The author also wishes to thank Miss Y. Hayasaka and Mrs. M. Kusumi for the technical assistance, and Miss N. Morohashi for typing this paper. This work was supported in part by the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan and Tsukuba University Project Research.

References

1) Usuki, S., Iwasaki, H., Usuki, Y. and Shioda, M.: Effects of LH, FSH and prolactin on induction of DNA polymerase α and β by rat preovulatory follicles. In Gamete Quality and Fertility Regulation, pp. 63-72. Eds R. Rolland, M. J. Heineman, S. G. Hillier and H. Vemer. Amsterdam-New York: Excerpta Medica, 1985.

2) Usuki, S. and Iwasaki, H.: Effects of LH and FSH on estrogen, progesterone and testosterone secretion by rat preovulatory follicles incubated or perifused in vitro. In Growth and Differentiation of Cells in Defined Environment, pp 285-288. Eds H. Murakami, I. Yamane, D. W. Barnes, J. P. Mather, I. Hayashi and G. H. Sato. Berlin-New York: Springer-Verlag, 1985.

3) Usuki, S. and Shioda, M.: Increase in DNA polymerase α activity associated with DNA synthesis due to FSH or oestrogen in ovaries of immature rats. J. Endocr., 110: 353, 1986.

4) Usuki, S. and Iwasaki, H.: LH and FSH induce DNA polymerase α activity required for DNA replication by preovulatory follicles. Jap. J. Fert. Ster., 31: 234, 1986.

5) Usuki, S.: Gonadotropic regulation of DNA polymerase-αactivity in rat preovulatory follicles. Jap. J. Fert. Ster., 31: 371, 1986.

6) Usuki, S. and Shioda, M.: Follicle-stimulating hormone and estrogen elevate deoxyribonucleic acid α-nucleotidyltransferase activity in relationship to deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovaries. Am. J. Obstet. Gynecol., 155: 447, 1986.

7) Usuki, S., Iwasaki, H., Miyakawa, S., Saitoh, M., Okane, M. and Shioda, M.: Chinese herbal medicines and gonadal steroidogenesis. J. Med. Pharm. for WAKAN-YAKU (Japanese press), 3: 219, 1986.

8) Usuki, S. and Shioda, M.: Induction of DNA polymerase α in isolated immature rat ovaries by follicle-stimulating hormone. Horm. metab. Res., 19: 508, 1987.

9) Usuki, S., Usuki, Y., Sakamoto, K. and Shioda, M.: LH-RH stimulates inducement of DNA polymerase α prior to DNA synthesis in immature rat ovaries. In Neuroendocrinology of Reproduction, pp 59-67. Eds R. Rolland, J. Heineman, N. Naaktgeboren, J. Schoemaker, H. Vemer and W. Willemsen. Amsterdam-New York: Elsevier Science Publishers, 1987.

10) Usuki, S. and Usuki, Y.: Follicle-stimulating hormone induces deoxyribonucleic acid polymerase α before deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovarian follicles perfused in vitro. Obstet. Gynecol., 71: 307, 1988.

11) Usuki, S.: Effects of Tokishakuyakusan on DNA replication. JAMA (Suppl.), II: 38, 1988.

12) Usuki, S., Kubota, S. and Usuki, Y.: Effects of luteinzing hormone-releasing hormone on induction of DNA polymerase α activity and DNA synthesis in hypophysectomized immature rat ovaries. Biomed. Res., 9: 133 1988.

13) Usuki, S. and Shioda, M.: DNA polymerase α activity in the endometrium of the human uterus and rat uterus during the 4-day estrous cycle. In Placental and Endometrial Proteins, in press, Ed. Y. Tomoda. Utrecht: VNU Science Press, 1988.

14) Shioda, M. and Usuki, S.: Deoxyribonucleic acid polymerase α activity in the endometrium of human uterus during the menstrual cycle. Am. J. Obstet. Gynecol, 159, Res., in press, 1988.

15) Usuki, S.: Tôki-syakuyaku-san stimulates cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate accumulation and deoxyribonucleic acid α-nucleotidyltransferase activity in rat ovaries. Jap. J.

Fert. Ster., 33: 385 1988.
16) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicines (Ba-Wei-Di-Huang-Wan, Dang-Gui-Shao-Yao-San and Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan) on steroidogenesis, cyclic AMP accumulation and DNA polymerase α activity in rats. Sterility and Chinese Medicine. The Oriental Healing Arts Institute International Bulletin., in press, 1988.
17) Usuki, S.: Hachimijiogan and Tokishakuyakusan enhance deoxyribonucleic acid α-nucleotidyltransferase activity in relationship to DNA synthesis by ovarian follicles via a cyclic AMP system. Am. J. Chin. Med. Med., XVI: 37, 1988.
18) Lewis, B. J., Abrell, J. W., Smith, R. G. and Gallo, R. C.: DNA polymerase in human lymphoblastoid cells infected with similar sarcoma virus. Biochem. Biophys. Acta, 349: 148, 1974.
19) Matsukage, A., Bohn, E. W. and Wilson, S. H.: Multiple forms of DNA polymerase in mouse myeloma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 71: 578, 1974.
20) Baril, E. F., Jenkins, M. D., Brown, O. E., Laszlo, J. and Morris, H. P.: DNA polymerase I and II in regenerating rat liver and Morris hepatomas. Canc. Res., 33: 1187, 1973.
21) Fry, M. and Weissbach, A.: A new deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase from HeLa cell mitochondria. Biochemistry, 12: 3602, 1973.
22) Sedwick, W. D., Wang, T. S.-F. and Korn, D.: Purification and properties of nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerases from human KB cells. J. Biol. Chem., 247: 5026, 1972.
23) Sedwick, W. D., Wang, T. S.-F. and Korn, D.: "Cytoplasmic" deoxyribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem., 250: 7045, 1975.
24) Chang, L. M. S. and Bollum, F. J.: Variation of deoxyribonucleic acid polymerase activities during rat liver regeneration. J. Biol. Chem., 247: 7948, 1972.
25) Chang, L. M. S. and Bollum, F. J.: Induction of DNA polymerase in mouse L cells. J. Mol. Biol., 74: 1, 1973.
26) Weissbach, A.: The functional roles of mammalian DNA polymerase. Arch. Biochem. Biophys. 198: 386, 1979.
27) Benbow, R. M., Gaudette, M. F., Hines, P. J. and Shioda, M.: Initiation of DNA replication in eukaryotes. In Control of Animal Cell proliferation, pp. 449-475. Eds A. L. Boynton and H. L. Leffert. New York: Academic Press, 1985.
28) Yagura, T., Kozu, T., Seno, T., Saneyoshi, M., Hiraga, S. and Nagano, H.: Novel form of DNA polymerase α associated with DNA primase activity of vertebrates. J. Biol. Chem. 258: 13070, 1983.
29) Conaway, R. C. and Lehman, I. R.: A DNA primase activity associated with DNA polymerase α from Drosophila melanogaster embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79: 2523, 1982.
30) Shioda, M., Nelson, E. M., Bayne, M. L. and Benbow, R. M.: DNA primase activity associated with DNA polymerase α from Xenopus laevis ovaries. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79: 7209, 1982.
31) Kozu, T., Yagura, T. and Seno, T.: *De novo* DNA synthesis by a novel mouse DNA polymerase associated with primase activity. Nature, 298: 180, 1982.
32) Racine, F. M. and Morris, P. W.: DNA polymerase alpha and beta in the California urchin. Nucl. Acids Res., 5: 3945, 1978.
33) Shioda, M., Nagano, H. and Mano, Y.: Association of DNA polymerase α and β with rough endoplasmic reticulum in sea-urchin eggs and changes in subcellular distribution during early embryogenesis. Eur. J. Biochem., 108: 345, 1980.
34) DePamphilis, M. L. and Wassarman, P. M.: Replication of eukaryotic chromosomes: a close-up to the replication fork. Ann. Rev. Biochem., 49: 627, 1980.
35) Yagura, T., Kozu, T. and Seno, T.: Mouse DNA replicase: DNA polymerase associated with a novel RNA polymerase activity to synthesize initiator RNA of strict size. J. Biol. Chem., 257: 11121, 1982.
36) Fansler, B. and Loeb, L. A.: Sea urchin nuclear DNA polymerase. Methods Enzymol., 29: 53, 1974.
37) Dillon, J. R., Bezanson, G. S. and Yeung, K.-H.: Basic techniques. In Recombinant DNA Methodology, pp. 1-114. Eds J. R. Dillon, A. Nasim and E. R. Nestmann. New York: John Wiley and Sons, 1985.
38) Sugden, B., DeTroy, B., Roberts, R. J. and Sambrook, J.: Agarose Slab-gel electrophoresis equipment. Anal. Biochem., 68: 36, 1975.
39) Ikeda, J., Longiaru, M., Horwitz, M. S. and Hurwitz, J.: Elongation of primed DNA templates by eukaryotic DNA polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77: 5827, 1980.
40) Lowry, OH, Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
41) König, H., Riedel, H. D. and Knippers, R.: Reactions *in vitro* of the DNA polymerase-primase from Xenopus laevis eggs: a role for

ATP in chain elongation. Eur. J. Biochem., 135: 435, 1983.
42) Shimada, H. and Terayama, H.: Discontinuous DNA replication in developing sea urchin embryos. Dev. Biol., 54: 151, 1976.
43) Shioda, M.: Ribonucleotides-dependent DNA synthesis with nuclear membrane-DNA polymerase α-fraction of sea urchin embryos. Zool. Sci., 3: 199, 1986.

DNA polymerase α と DNA 合成

筑波大学臨床医学系産婦人科

臼杵　悊

近年，DNA polymerase α が卵巣や子宮におけるホルモン作用による DNA 合成の代謝経路で重要な役割をはたしていることが明らかにされつつあるが，DNA polymerase α の化学的特性については不明の点が多い．

今回は DNA polymerase の形と DNA 合成能について *in vitro* での実験を行なったので報告する。

ウニの卵ないし胚をホモジネート後，蔗糖密度勾配で DNA polymerase 活性を分離し，沈降速度（S）でピークを形成した部分の DNA polymerase 活性の測定と DNA primase との結合能について検討した．ついで，DNA polymerase α-primase 複合体を蔗糖密度勾配で分離させ，バクテリオファージ fd の single-stranded DNA を用いて DNA 合成能を調べ，アガロースゲルを用いた電気泳動で DNA 鎖の長さと DNA 鎖の延長比について検討を加えた．

蔗糖密度勾配で DNA polymerase は 8.4S, 6.6S および 3.4S の 3 つのピークを形成し，前 2 者は DNA polymerase α に，後者は DNA polymerase β に相当し，8.4S DNA polymerase α が DNA primase と複合体を形成し，DNA 合成基質からの DNA 合成を促進させた．

DNA polymerase α-primase 複合体の DNA 合成は 100～6,000bases に至ったが，一定の DNA 鎖の延長比（約 620bases/分）をもって DNA 合成をさせた。

以上の事実は DNA polymerase α には 2 つ形(8.4S, 6.6S) が存在し，その内 8.4S のみが DNA primase と複合体を形成し，一定の DNA 鎖の延長比（約 620bases/分)をもって DNA を合成させることが明らかとなった。

(受付：1988 年 1 月 21 日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE CAUSES INDUCEMENT OF DNA POLYMERASE α ACTIVITY AND SEQUENTIAL DNA SYNTHESIS DURING CELL PROLIFERATION IN IMMATURE RAT OVARIES

Sayuri KUBOTA, Yoshihito ICHIKAWA and Satoshi USUKI

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

Abstract: To provide some insight into how the luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) is involved in cell proliferation in ovaries, the deoxyribonucleic acid (DNA) polymerase activities and DNA content of ovaries from LH-RH-treated hypophysectomized immature rats were measured. Six hours following LH-RH administration (0.2−200 μg/rat), DNA polymerase α activity and the specific activity (activity per DNA content) were found to have increased significantly ($p<0.01$) in a dose-dependent manner. Thereafter (for 12 hours following the treatment), the ovarian DNA content increased significantly ($p<0.01$) with 20 or 200 μg of LH-RH. Any change detected in the DNA polymerase β activity due to the hormone treatment was not significant.

These results suggest that LH-RH causes the inducement of DNA polymerase α activity prior to DNA synthesis for cell proliferation during ovarian follicle growth.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 56−61, 1989)

Introduction

The hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) has been reported to have receptors in granulosa, thecal and luteal cells at all stages of cellular differentiation[1], and to both directly stimulate and inhibit ovarian functions[2]. However, very few studies have been performed on the effects of this hormone on DNA synthesis and cell division. The authors recently showed evidence pointing to the possibility that LH-RH causes the inducement of DNA polymerase α activity, required for DNA replication[3], and sequential DNA synthesis in immature rat ovaries[4], and the role of LH-RH is hypothesized as shown in Figure 1.

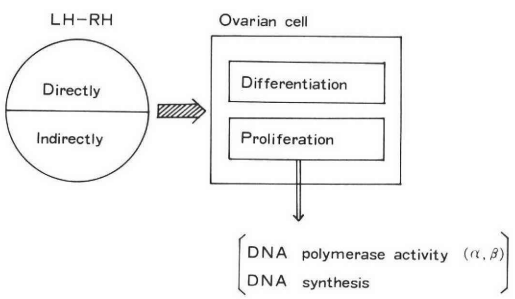


Fig. 1 Hypothetic role of LH-RH in ovarian DNA synthesis.

The present study was carried out to investigate the time-courses of changes in DNA polymerase α activity or sequential DNA synthesis in hypophysectomized immature rats treated with various doses of LH-RH.

Materials and Methods

LH-RH (synthetic LH-RH, gonadorelin in hydrochloride; AY-24, 031−A−26, prepared at Ayerst Research Laboratories, Montreal, Canada) was kindly provided by Drs. S. Raiti (University of Maryland, Baltimore, Maryland, U. S. A.) and G. Bialy (Contraceptive Development Branch, Center for Population Research, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, Maryland, U. S. A.).

Immature female rats of the Wistar-Imamichi strain, obtained from the Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama, Japan), were maintained in an environment illuminated daily from 08.00 to 20.00 h. The rats were hypophysectomized at 21 days of age via the parapharyngeal approach. The animals were treated with LH-RH (0.2, 2, 20 or 200 μg/0.2 ml of 0.9% saline/rat, subcutaneously) at 25 days of age. Standard purine chow and water were always available, but after the hypophysectomy an aqueous solution of 5% glucose was used as the source of drinking water. The animals were killed by decapitation under mild ether anesthesia at 3, 6 or 12 hours following LH-RH treatment. The control group received saline alone. Following autopsy, the ovaries were quickly removed and the oviducts and surrounding tissue were stripped off. Large follicles (more than 0.25 mm in diameter) were removed from the isolated ovaries under a dissecting microscope and used for the enzyme and DNA measurements (Fig. 2). DNA polymerase α and β activity was determined from incorporation of [^{3}H] deoxythymidine-monophosphate into the acid-insoluble fraction with activated DNA as a template, and the DNA content was determined according to Burton[5]. The DNA polymerase activity and DNA content were expressed as pmol deoxynucleotide 5'-monophosphate (dNMP) incorporated into the DNA fraction in 20 minutes at 37℃/mg protein and μg/mg protein, respectively.

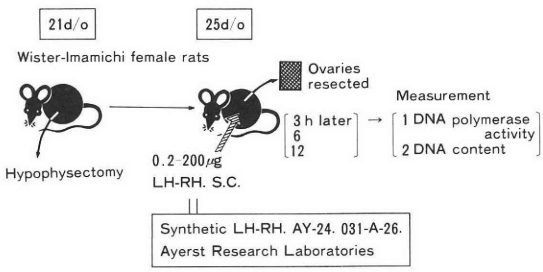


Fig. 2 Experimental procedure.

The protein content was determined by the method of Lowry et al.[6] with bovine serum albumin as the standard.

The estradiol-17β (E_2) level in the serum at 3, 6 and 12 hours following LH-RH treatment was determined by radioimmunoassay. Blood samples were obtained at autopsy and centrifuged at 3,000 r. p. m for 10 minutes at 4℃. The sera were frozen at −20℃ until assayed for E_2 according to the method of Usuki[7].

All chemical reagents were of analytical grade and organic solvents were distilled prior to use. Student's t-test was used for statistical analysis and significant differences were determined at the level of $p<0.05$.

Results

In untreated or saline-treated hypophysectomized rat ovaries, no significant changes in DNA polymerase α or β activities, DNA content or specific activity (activity/μg of ovarian DNA) were observed during the 12 hours following hypophysectomy (data not shown). The time-courses of changes in ovarian DNA polymerase activities and DNA synthesis caused by LH-RH (0.2, 2, 20 or 200 μg/rat) were followed in hypophysectomized rats (Figs. 3 and 4). DNA polymerase α activity increased gradually following 0.2−200 μg/rat LH-RH treatment, reaching a peak 6 hours after the treatment and then showed a plateau or slight decrease (Fig. 3). The ovarian DNA content began to increase from 6 hours following the LH-RH treatment and the increase became significant ($p<0.01$) at 12 hours after 20−200 μg/rat LH-RH treatment (Fig. 4). In Figure 5, the specific activity of DNA polymerase α also increased significantly ($p<0.01$) from 6 hours fol-

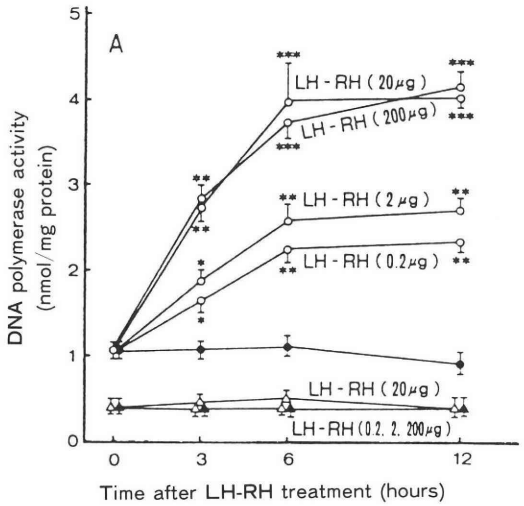


Fig. 3 Time courses of changes in DNA polymerase activity caused by LH-RH in hypophysectomized immature rat ovaries. Hypophysectomized rats were administered 0.2−200 μg/rat of LH-RH at 25 days of age and DNA polymerase α activity was then measured as described in the text. Only saline was administered to the control. The activity of DNA polymerase α was expressed as DNA polmerase α activity per mg protein of an ovary. Each value is the mean ± S. E. M. (*vertical bars*) of six observations.
DNA polymerase α activity (○, LH-RH-treated; ●, saline-treated);
DNA polymerase β activity (△, LH-RH-treated; ▲, saline-treated).
*: significantly different from the control, $p<0.05$;
**: significantly different from the control, $p<0.01$;
***: significantly different from the control, $p<0.001$.

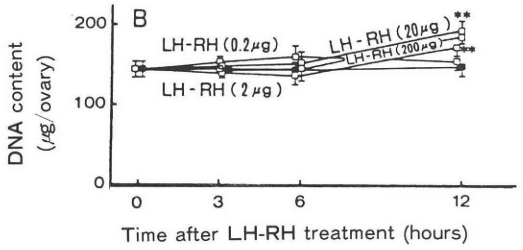


Fig. 4 Changes in DNA content caused by LH-RH in hypophysectomized immature rat ovaries. Hypophysectomized rats were administered 0.2−200 μg/rat of LH-RH at 25 days of age and DNA content was then measured according to Burton[5]. Each value is the mean ± S. E. M. (*vertical bars*) of six observations.
□, LH-HR-treated; ■, saline-treated.
*: significantly different from the control, $p<0.01$.

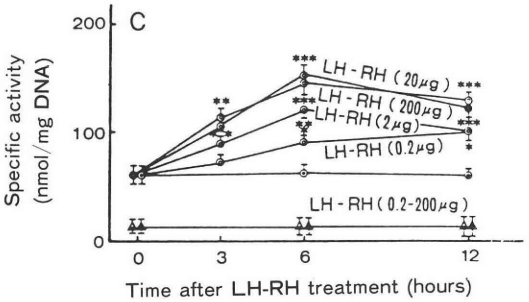


Fig. 5 Time courses of changes in specific activity caused by LH-RH in hypophysectomized immature rat ovaries. Hypophysectomized rats were administered 0.2−200 μg/rat of LH-RH at 25 days of age and DNA polymerase α activity and DNA content were then measured as described in the text. Only saline was administered to the control. The specific activity of DNA polymerase α was expressed as DNA polymerase α activity per DNA content. Each value is the mean ± S. E. M. (*vertical bars*) of six observations. Specific activity of DNA polymerase α (◎, LH-RH-treated; ⊙, saline-treated); specific activity of DNA polymerase β (△, LH-RH-treated; ▲, saline-treated).
*: significantly different from the control, $p<0.05$;
**: significantly different from the control, $p<0.01$;
***: significantly different from the control, $p<0.001$.

lowing LH-RH treatment. More effective stimulation was obtained with 20−200 μg/rat of LH-RH than with 0.2−2 μg/rat. However, there was no significant difference in DNA polymerase α activity, DNA content or specific activity between 20 and 200 μg/rat of LH-RH. The DNA polymerase β activity or specific activity of DNA polymerase β did not change with these doses (Figs. 3 and 5).

In Table 1, DNA polymerase α activity in the follicular extracts used in this experiment is additive, and neither activators nor inhibitors could be

Table 1. Effects on DNA polymerase α activity of mixing together different kinds of ovarian extracts from hypophysectomized immature rats. The values are means ± S.E.M. for three assays.

Source of mixed ovarian extracts		DNA polymerase α activity (pmol)		
A	B	A	B	A+B
HPX	S-HPX	2.1±0.2	2.4±0.2	4.2±0.3
HPX	LHRH-HPX	2.1±0.2	6.9±0.5	9.0±0.4
S-HPX	LHRH-HPX	2.4±0.2	6.9±0.5	9.4±0.8

Supernatant fractions of ovarian homogenates were obtained from hypophysectomized rats (HPX), saline-treated HPX rats (S-HPX) and LH-RH-treated HPX rats (LHRH-HPX) as under Materials and Methods. A, B and A+B represent the supernatant used (A+B: mixture of supernatants A and B) or its DNA polymerase α activity. DNA polymerase α activity was expressed as pmol dNMP incorporated in 20 min at 37℃. There was no significant difference in DNA polymerase α activity when the sum of the two activities of A and B was compared with the activity of the mixture (A+B).

detected in the extracts. To investigate the effects of serum E_2 on DNA polymerase α activity, the E_2 level was measured. The serum E_2 levels at 3, 6 and 12 hours following LH-RH treatment (0.2−200 μg/rat) ranged from 65.0 to 109.2 pg/ml, these levels being not statistically significant compared with those in the control group (87.2±3.5; mean ± S. E. M.).

Discussion

Although many studies have demonstrated the direct stimulatory effect of LH-RH itself on ovarian functions, very little work has been done in human and rat in regard to the direct effects of LH-RH on cellular proliferation during ovarian follicular growth. Recently, Usuki and Shioda[8], and Usuki and Usuki[9] found that FSH or estrogen causes an increase in DNA polymerase α, an essential component for DNA replication in eukaryotic cells[3], activity per cell *in vivo* in the rat ovary and that this increase in activity is accompanied by DNA synthesis. In the present *in vivo* study, DNA polymerase α activity, which tends to decrease following hypophysectomy in intact rat ovaries[8], was enhanced significantly by LH-RH treatment, indicating that LH-RH possibly increases DNA polymerase α activity *in vivo* in immature rat ovaries.

No activator of the enzyme may be involved in this increase, since the enzyme activity was found to be additive when LH-RH-treated and-untreated ovarian extracts were mixed and then assayed for the activity. This increase in activity caused by LH-RH seems to be due to an increase in the enzyme molecule itself.

The nuclear DNA content per ovary increased significantly during 12 hours following LH-RH treatment but did not change with an increase in the inducement of DNA polymerase α.

The specific activity of DNA polymerase α (DNA polymerase α activity per μg DNA) also increased in parallel with the increase in DNA polymerase α activity. These findings confirm the observation in the previous study[8] that the level of DNA polymerase α activity is controlled at the cellular level in the ovary.

The present study involved the use of ovarian follicles; therefore it may be difficult to define which ovarian cells were responsible for the induction of DNA polymerase α activity, since ovarian GnRH receptors are widely distributed in luteal, thecal and granulosa cells at all stages of cellular differentiation[1]. The cellular site of action of GnRH remains to be determined.

Dorrington et al.[10] reported that LH-RH independently stimulates estrogen production in granulosa cells cultured *in vitro*. However, in our *in vivo* experiment, the E_2 level in the serum

showed no significant change compared with that in the case of the hormone-untreated controls, indicating that LH-RH may not have indirectly enhanced DNA polymerase α activity or DNA content via E_2 production. The mechanism involved in the latter also remains to be elucidated.

Since the enzyme induction is supposed to be a prerequisite for DNA synthesis during ovarian growth as reported previously[11], it is suggested from these findings that LH-RH functions to induce DNA polymerase α and sequential DNA synthesis during ovarian follicular growth (Fig. 6). The physiological significance of the direct ovarian action of LH-RH is also a very intriguing problem to be investigated, as to both basic and clinical aspects, and such a study might provide unique models for understanding the mechanism of the LH-RH action in cellular proliferation during ovarian follicular growth.

Acknowledgements

The authors thank Dr. G. Baily, Contraceptive Development Branch, Center for Population Research, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, Maryland for providing the synthetic LH-RH. Appreciation is also expressed to Ms. M. Kusumi and Miss Y. Hayasaka for their skillful technical assistance. The authors are also acknowledged to Miss N. Morohashi for her typing the manuscript. This work was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan and the Tsukuba University Project Research.

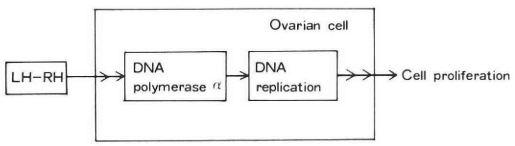


Fig. 6 Postulated role of LH-RH during ovarian follicular growth.

References

1) Pelletier, G., Seguin, D., Dube, D., and St.-Arnaud, R.: Distribution of LHRH receptors in the rat ovary. Biol. Reprod. (Suppl) 26: 151A, 1982.
2) Hsueh, A. J. W., Adashi, E. Y., Jones, P. B. C., and Welsh, Jr. T. H.: Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. Endocr. Rev. 5: 76, 1984.
3) Hübscher, U.: DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: mode of action and biological implications. Experientia 39: 1, 1983.
4) Usuki, S.: Effect of luteinizing hormone-releasing hormone on DNA synthesis, growth factors and renin activity in immature rat ovaries in vivo. Jpn. J. Fert. Steril. 33: 4, 1988.
5) Burton, K.: A Study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315, 1956.
6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 198: 265, 1951.
7) Usuki, S.: Effects of Hachimijiogan, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on estrogen and progesterone secretion in ovarian follicles. Jpn. J. Fert. Steril. 32: 276, 1987.
8) Usuki, S., and Shioda, M.: Follicle-stimulating hormone and estrogen elevate deoxyribonucleic acid α-nucleotidyltransferase activity in relationship to deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovaries. Am. J. Obstet. Gynecol. 155: 457, 1986.
9) Usuki, S., and Usuki, Y: Follicle-stimulating hormone induces DNA polymerase α prior to DNA synthesis in immature rat ovarian follicles perifused in vitro. Obstet. Gynecol. 71: 307, 1988.
10) Dorrington, J., Mckeracher, H., Munshi, S., and Gore-Langton, R.: LHRH independently stimulates steroidogenic enzymes in granulosa cell cultures. Endocrinology 110 (Suppl): 178, 1982.
11) Usuki, S. and Shioda, M.: Induction of DNA polymerase α in isolated immature rat ovaries by follicle-stimulating hormone. Horm. metab. Res. 19: 508, 1987.

Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)の卵巣細胞増殖に及ぼす影響について

筑波大学臨床医学系産科婦人科

窪田早百合　市川喜仁　臼杵　悊

LHRHの卵巣機能に及ぼす直接作用に関する研究は比較的多くあるが，細胞増殖に関する研究は極めて少ない．我々は，既にLHRHがDNAの合成を促進させることを明らかにした．今回はLHRHに対するDNA polymerase活性，ないしDNA合成のdose responseとtime courseについて，下垂体摘出（HPX）ラットを用いて，in vivoでの検討を加えたので報告する．

21日齢のWistar-Imamichi系雌ラットにHPXを施行し，HPX後4日目に0.2－200μg/ラットのLHRH (synthetic LHRH; AY－24, 031－A－26)を皮下投与した．LHRH投与後3，6，12時間目にエーテル麻酔下で断頭屠殺し，卵胞を摘出し，卵胞組織中のDNA polymerase(α, β)活性，およびDNA量を測定した．

DNA polymerase α活性，およびDNA量は，LHRHの投与で各々コントロール群に比べ，有意な増加($P<0.001$, $P<0.01$)を示した．一方，DNA polymerase β活性は，LHRHの投与で有意な変化を示さなかった．また，DNA polymerase αのspecific activityは，コントロール群に比し有意な増加を示したが，DNA polymerase βのspecific activityには変化が認められなかった．

以上の事実は，LHRHは卵胞細胞内のDNA polymerase α活性を増加させ，DNA合成を促進させ，卵巣の細胞増殖に関与することを示している．

さらにLHRHは卵巣においてDNA修復酵素であるDNA polymerase β活性には直接作用を有しないことが明らかとなった．

(受付：1988年2月23日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

ヒト妊娠初期脱落膜由来腺上皮細胞株と間質細胞株の樹立とその性状

Establishment and Analysis of Property of Glandular Epithelial Cell Line and Stromal Cell Line Derived from Human Decidua of First Trimester

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室
松本和紀　楠原浩二　小田原靖
Kazunori MATSUMOTO　Koji KUSUHARA　Yasushi ODAWARA
渡辺直生　許山浩司　川勝雅彦
Naoiku WATANABE　Hiroshi MOTOYAMA　Masahide KAWAKATSU
寺島芳輝
Yoshiteru TERASHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Jikei University School of Medicine

正常妊娠第11週の脱落膜を人工妊娠中絶術時採取し，奥村の濾紙法にてクローニングを行ない，腺上皮細胞株（Decidual Epithelial cell line: DE株）と間質細胞由来の線維芽細胞株（Decidual Fibroblast cell line: DF株）の2株を樹立した．両株は共に約15か月間，15～20代の継代を行なった．細胞数倍加時間はDE株で，45.2時間，DF株で約11日である．単層培養においてDE株は上皮性敷石状配列を示し，接触阻止が起こらず，容易にpiling up状態を示す．一方DF株は紡錘形のFibroblastでconfluenceでは各細胞が交錯してnet状を示しpiling upはみられない．核型は異数性に幅広く分布するが，そのmodeはDE株でtriploidyからtetraploidyに分布し，DF株ではtriploidy付近に存在する．明らかなmarker chromosomeは見られない．超微形態学的にはDE株はcytoplasmic微絨毛が多く，細胞内小器官がよく発達し，活発な分泌機能をうかがわせた．一方，DF株には著明なlysosomeを認めた．DE株，DF株共に培養液にEstrogenを添加することによりDNA合成能が，Progesterone添加により蛋白合成能でそれぞれ高められた．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 34(1), 62—67, 1989)

緒　言

ヒト妊娠脱落膜は分泌期内膜から、妊卵の着床，絨毛の分化増殖により分化形成され，妊卵の維持，絨毛の侵入に対する母体防禦等数多くの機能が推定されている．

また近年脱落膜細胞のプロラクチン産生，プロスタグランディン産生，等が詳細に報告されつつあり，免疫学的関与も議論され注目を集めている．

着床周辺期および妊娠初期の子宮内膜および脱落膜の機能を検索する一つの有力な手段として、細胞培養系の樹立は有用と考えられ，既に幾つかの株の

樹立が報告されている．我々はEstrogen, Progesteroneに反応性を有する細胞株即ち，腺上皮細胞株(DE株)と間質由来の線維芽細胞株(DF株)を樹立したので，その性状，超微形態学的所見等を報告する．なおEstrogenとProgesteroneに対する反応性はin vitroにて，^{3}H-thymidine (Thd) up takeをもって細胞増殖能を，^{3}H-Proline (Pro) up takeをもって細胞の蛋白合成能をそれぞれ検討した．

研究方法

1．材料と株樹立

正常妊娠第11週の脱落膜を人工妊娠中絶術時無菌的に採取し，抗生剤入りPenicillinG 50u/ml, Streptsmycin 50μg/ml (GIBCO) Hanks' Solutionで充分に洗浄した後，細切し，Dispase 900IU/ml添加Ham F−10で解離遠沈後，Pelletをgrowth mediunにて分散させ，約5×10^5/mlの浮遊単離細胞を静置培養した．1週間後上皮細胞の敷石状colonyと線維芽細胞の混在するMonolayer sheetを得た．これより奥村の濾紙法にて両細胞を別々に分離増殖せしめた．継代培養はDispase 900IU/ml添加Ham F−10あるいは0.25% Tripsin solutionで細胞を剝離し，遠沈後growth mediumで1：2，あるいは1：4 splitで行なった．

2．増殖曲線 (Growth curve)，細胞数倍加時間(Population Doubling time)，細胞密度(Saturation density) 5×10^4/mlの浮遊単離細胞を35mm plastic dishに植込み，連日6〜14日間，3dishの細胞数を産出し，その平均をもって増殖曲線を作制，倍加時間及び細胞密度を測定した．なお培地交換は隔日に行なった．

3．形態学的観察

培養細胞は位相差顕微鏡で観察すると共に透過型電顕で観察した．透過電顕用標本はrubber policemanで細胞を剝離し，PBS 1%GLA (in PBS, PH7.3)で15分間前固定後2%ショ糖加PBSで洗浄し，ついでMillonig buffer 1%OsO_4 (PH7.3)にて15分間後固定した．その後，上昇アルコール系列で脱水し，Epon (Epok812)−Aralditeに包埋し，超薄切片作製後ウラン，鉛による電子染色を施し，TEM (JEOL, JEM−100B)にて観察した．

4．核型分析

培養細胞に1×10^{-7}Mのcolcemidを4〜6時間作用させ，0.2% Kcl solutionで15分間処置し，3：1 alcohol acetic-acid mixtureで固定後室温乾燥させGiemsa染色し鏡検した．

5．Estrogen, Progesteroneに対する反応性の検討

①細胞をDispase 300IU/mlにて解離し，24 well multichamber plateに約2×10^4/well細胞をseedした．

②MediumはEagle MEM, Dextran coated charcoal (DCC)処理にて内因性Steroidを除去したFCSを2%添加して，各well 1ml使用した．

③細胞をseedした後，Estradiol−17β (E_2) (Sigma社製)を終濃度10^{-10}M〜10^{-7}M，Progesterone (P_4) (Sigma社製)を終濃度10^{-9}M〜10^{-6}Mとなるよう添加した．溶媒に用いたalcoholはいずれも終濃度0.1%以下となるようにし，0.1%以下ではalcoholは細胞増殖に影響を与えないことを予備実験で確認した．各群4個のwellにて実験を行なった．

④3日間培養後Thymidine−5'−H_3,L−Proline−5−H_3を各々1μCi添加し，更に1時間培養した．

⑤SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)を終濃度1%となるよう加え細胞を可溶化した．

⑥冷TCA (Trichloro Acetic Acid)を終濃度5%となるよう加え，沈殿した酸不溶性分画をWhatmanのglass microfibre filterで回収した．

⑦液体シンチレーションカウンターにて細胞内に取り込まれた放射能を測定した．

実験成績

1．細胞株の樹立

ヒト妊娠初期脱落膜由来腺上皮細胞株（DE株）と間質線維芽細胞株（DF株）の2株を得た．両細胞株は12% FCS添加Ham F−10mediumにて継代培養した．

2．増殖曲線（G.C.），細胞数培加時間（D.T.）

DE株（図1）とDF株（図2）の増殖曲線を示す．DE株は12代，DF株は5代継代時のものである．倍加時間はDE株で45.2時間，DF株で約11日であった．

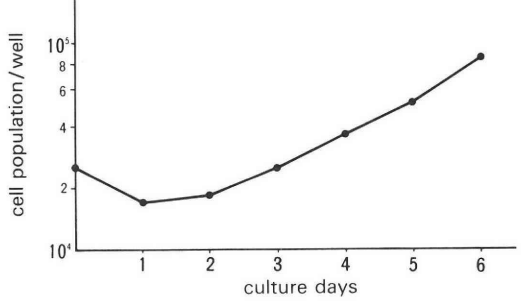


図1　DE cell（上皮性細胞）の増殖曲線
D.T.＝45.2hrs

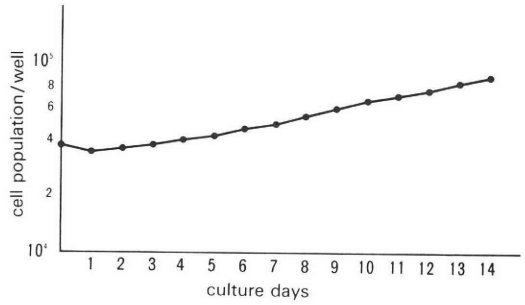


図2　DF cell（間質線維芽細胞）の増殖曲線
D.T＝11 days

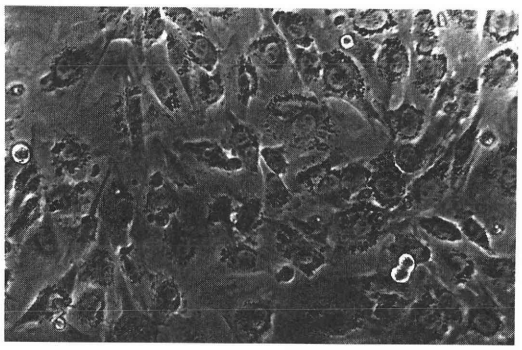


写真1　DE cell の位相差顕微鏡
細胞は方形ないし菱形で微絨毛を多くもつ．
上皮性敷石状配列を示す．接着性である．

3．形態学的観察

①ＤＥ株：上皮性敷石状配列を示すが接触阻止がおこらず，容易に pile up する．細胞は方形ないし菱形で adhesive である（写真1）．

TEM では著明な cytoplasmic projection を認め，よく発達した細胞内小器官から分泌機能の旺盛な細胞であることをうかがわせた（写真2）．

②ＤＦ株：紡錘形の細長い fibroblast で confluence になると細胞が交錯して Net を形成する．pile up はみられない（写真3）．

TEM では著明な lysosome 様顆粒を認める．（写真4）．

4．核型（Karyotype）分析

ＤＥ株は15代，ＤＦ株は7代継代時に核型分析を行なった．

染色体は両株とも異数性に幅広く分布し，その mode は DE 株で triploidy から tetraploidy に分布し，DF 株では triploidy 付近に存在した．写真5，6に両株の Karyotype を示す明らかな marker chromosomes は認められなかった．

5．Estrogen, Progesterone に対する反応性の検討．

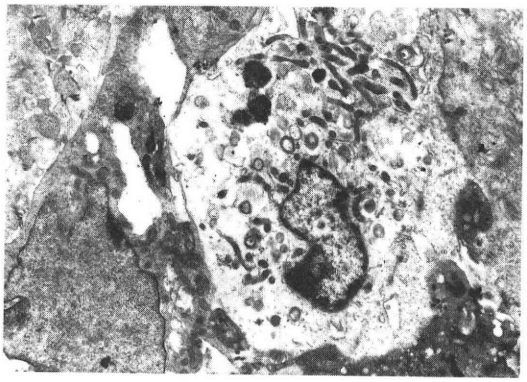
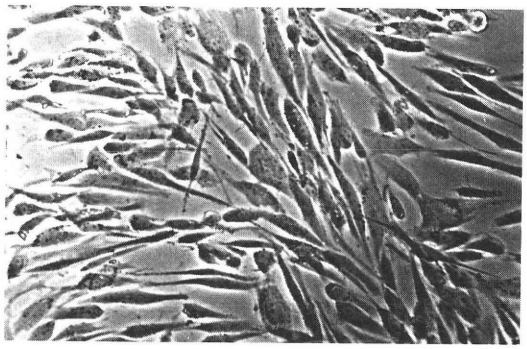


写真2　DE cell の TEM　×5000
細胞内小器官がよく発達している．
分泌機能の旺盛な細胞であることをうかがわせる．



紡錘型の間質線維芽細胞

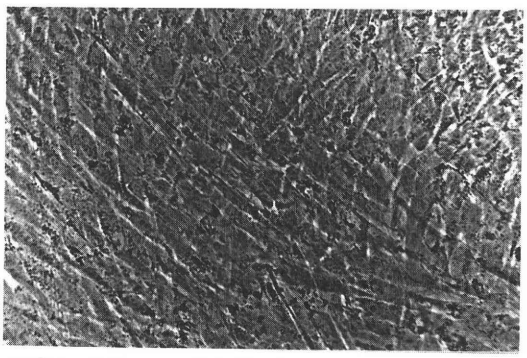


写真3　DF cell の位相差顕微鏡
飽和状態になると細胞が交錯に網状になる．

① DE-cell の ^{3}H－Thd uptake は E_2 10^{-9}M で促進され，それよりも高い濃度ではむしろ抑制された（図3）．

② DF-cell の ^{3}H－Thd uptake は E_2で濃度依存性に促進された（図3）．

③ DE-cell の ^{3}H－Thd uptake は P_4 10^{-8}M で軽度促進された（図4）．

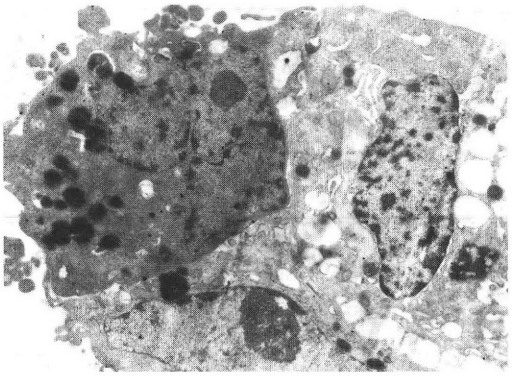


写真4　DF cell の TEM
lysosome 顆粒も多く含んでいる．
×5000

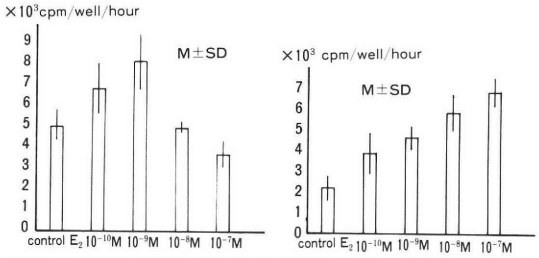


図3　各細胞の³H－Thd. 取り込みに及ぼす Estradiol－17β の効果
DE cell は E_2－17β10^{-9}M でもっとも DNA 合成能が高く，DF cell では E_2－17β に濃度依存性にＤＮＡ合成能が高くなる．

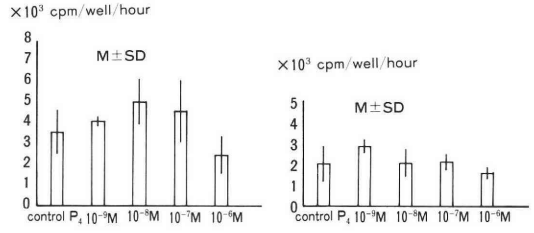


図4　各細胞の³H－Thd. 取り込みに及ぼす Progesterone の効果
Progesterone により DNA 合成能はさほどの影響をうけていない．

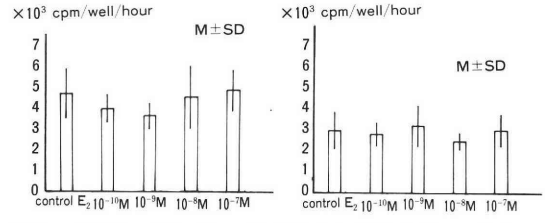


図5　各細胞の³H－Pro. 取り込みに及ぼす Estradiol－17β の効果
E_2－17β は蛋白合成能にはさほどの影響を与えてはいない．

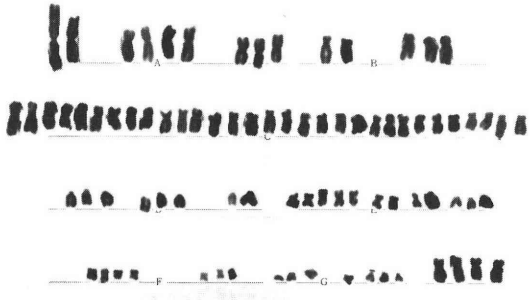


写真5　DE cell の核型分析

写真6　DF cell の核型分析

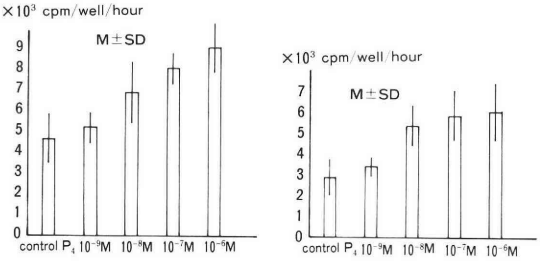


図6　各細胞の³H－Pro. 取り込みに及ぼす Progesterone の効果
Progesterone 添加によりＤＥ株，ＤＦ株共に蛋白合成能は促進される．

④ DF-cell の³H－Thd uptake は P_4 によりほとんど影響を受けなかった（図4）．
⑤ DE-cell, DF-cell 共に E_2 では³H－Pro uptake はほとんど変化しなかったが(図5)，P_4 にて濃度依存性に促進された（図6）．

考　案

従来ヒト正常子宮内膜細胞株樹立の報告はいくつかあるが[1~12]，脱落膜由来細胞株の樹立は数少ない[13]．我々は今回妊娠初期脱落膜由来の上皮性腺細胞株と間質細胞株を樹立した．

近年 IVF-ET の技術の進歩と共にヒトにおける受精現象の詳細はしだいに明らかにされつつある．しかしながら着床とその周辺期における胚―内膜相関

は今だに未知の部分が多く，IVF-ET 成功率を高くする為にもこの着床期の解明が急がれるところである．

今回我々の樹立した脱落膜細胞株は Estrogen, Progesterone の各 Steroid hormone に対し，in vivo で観察される反応と似た反応を in vitro で示しており、着床とその周辺期における内膜側の生物学的特性を知る上での重要な研究手法を開発することが出来るものと期待される．

(稿を終わるに臨み，御指導を頂きました石川博教授（慈恵医大第2解剖学）に深謝致します．)

文　献

1) Centola, G. M., Cisar, M. and Knab, D. R.: Establishment and morphologic characterization of normal human endometrium in vitro. In Vitro, 20: 451, 1984.
2) Siegfried, J. M., Nelson, K. G., Martin, J. L. and Kaufman, D. G.: Histochemical identification of cultured cells from human endometrium. In Vitro, 20: 25, 1984.
3) Hiratsu, T.: In vitro cultivation of human endometrium and the influences of steroid hormones on a cell line derived from the endometrium. Kobe J. Med. Sci., 14: 29, 1968.
4) 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: 352, 1980.
5) Varma, V. A., Melin, S. A., Ademec, T. A., Dorman, B. H., Shiegfried, J. M., Walton, L. A., Carney, C. N. Norton, C. R. and Kaufman, D. G.: Monolayer culture of human endometrium: Methods of culture and identification of cell types. In Vitro, 18: 911, 1982.
6) Dorman, B. H., Varma, V. A., Siegfried, J. M., Melin, S. A., Ademec, T. A., Norton, C. R. and Kaufman, D. G.: Morphology and growth potential of stromal cell cultures derived from human endometrium. In Vitro, 18: 919, 1982.
7) Kirk, D., King, R. J. B., Heyes, J., Peachey, L., Hirsch, P. J. and Taylor, R. W. T.: Normal human endometrium in cell culture. I. Separation and characteriaztion of epithelial and stromal components in vitro. In Vitro, 14: 651, 1978.
8) Liszczak, T. M., Richardson, G. S., MacLaughlin, D. T. and Kornblith, P. L.: Ultrastructure of human endometrial epithelium in monolayer culture with and without steroid hormones. In Vitro, 13: 344, 1977.
9) Fleming, H. and Gurpide, E.: Growth characteristics of primary cultures of stromal cells from human endometrium. J. Steroid Biochem., 16: 717, 1982.
10) Lindenberg, S., Lauritsen, J. G., Nielsen, M. H. and Larsen, J. F.: Isolation and culture of human endometrial cells. Fertil. Steril. 41: 650, 1984.
11) Satyaswaroop, P. G., Bressler, R. S., De La Pena, M. M. and Gurpide, E.: Isolation and culture of human endometrial glands. J. clin. Endocrinol. Metab., 48: 639, 1979.
12) 中妻嘉夫：人子宮内膜由来の新培養細胞株特にその細胞生物学的特性について．日産婦誌　25：191，1973.
13) 立山一郎，富永俊朗，紙谷尚之，森崇英：正常人脱落膜より得られた細胞系（TTK−1cell lines）のヌードマウスへの移植実験．日産婦誌　36：2115，1984.

Establishment and analysis of the property of a glandular epithelial cell line and stromal cell line derived from human decidua of first trimester

Kazunori Matsumoto, Koji Kusuhara, Yasushi Odawara, Naoiku Watanabe, Hiroshi Motoyama, Masahide Kawakatsu and Yoshiteru Terashima

Department of Obsterics & Gynecolgy
Jikei University School of Medicine,
Tokyo 105, Japan

Two cell lines, i. e. a glandular epithelial cell line (decidual epithelial: DE cell line) and stromal cell line (decidual fibroblast: DF cell line), derived from the human decidua (taken from the uterus at the 11th week of normal pregnancy at the time of artificial abortion), were established through cloning by Okumura's filter paper method. Both cell lines were maintained by 15−20 subcultures for about 15 months. The doubling time was 45.2 hours for the DE cell line and approximately 11 days for the DF cell line. In monolayer culture, cells of the DE line were found to be arranged like stepping stones as are epithelial cells in vivo and readily piled up without showing contact inhibition. Cells of the DF line, on the other hand, were spindle-shaped fibroblasts, at confluences were found to cross each other to form a network and did not show pilig up. Cells of both lineages were aneuploid

and ranged widely in ploidy, its mode of distribution being from triploidy to tetraploidy for the DE cell line and at around triploidy for the DF cell line. There was noted no noticeable marker chromosome. Ultrastructurally, DE cells had prominent cytoplasmic projections, which implies that these cells have active secretory function, while cells of the DF lineage had prominent lysosomes. The capacities of both DE and DF cells to synthesize DNA and protein were augmented by estrogen and progesterone, respectively.

(受付：1988年4月12日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

LH含量の異なるHMG製剤を用いた排卵誘発成績の比較検討

Comparison of Effects of Three HMG Preparations with Different LH Contents on Ovulation Induction

大阪大学医学部産科婦人科学教室
藤田善子 Yoshiko FUJITA　田坂慶一 Keiichi TASAKA　三宅侃 Akira MIYAKE
谷澤修 Osamu TANIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka University Medical School

異なったLH含量を有する3種類のHMG製剤を無排卵婦人23症例に使用しその臨床効果を比較検討した．1)排卵率は，HMG「日研」83.9％，ヒュメゴン82.4％，パーゴナル77.2％で，各々のHMG製剤の間で差はなかった．2）HCG切り替え時の血中E_2値は，HMG「日研」916±276pg/ml，ヒュメゴン1283±326pg/ml，パーゴナル1024±277pg/mlであった．又，主席卵胞の大きさは，HMG「日研」25.1±1.8mm，ヒュメゴン23.6±1.2mm，パーゴナル22.0±1.4mm．又，直径10mm以上の卵胞数はHMG「日研」3.9±0.5個，ヒュメゴン3.7±0.5個，パーゴナル3.2±0.5個であった．各治療間で卵胞発育のパラメーターに差は認められなかった．3）OHSS発生率は，HMG「日研」6.5％，ヒュメゴン5.9％，パーゴナル4.5％と各治療間に差は認められなかった．以上の成績より，LH含量の異なるHMG製剤での排卵誘発成績に大きな差はなく，特にLH含量の少ないHMG「日研」でもOHSS発生頻度が減少することはなさそうである．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 68—72, 1989)

緒　言

近年，GIFT法，IVF-ET法等，不妊症治療の著しい進歩により，最も強力な排卵誘発剤であるHMG製剤の果たす役割は非常に重要なものである．しかし，卵巣過剰刺激症候群(OHSS)や多胎妊娠等の副作用の問題がいまだ解決されておらず、その使用にあたっては，細心の注意を必要とするところである．

副作用発生の要因としては，ゴナドトロピンに対する性腺の感受性，HMG製剤の投与方法，HCG製剤の投与方法，HMG製剤中のFSH/LH含量比等が考えられる．これらの要因の中で，HMG製剤のFSH/LH比は，FSH含量が一定とされているため，LH含量が問題となるわけであるが，今回，我々は実際に臨床使用されているHMG製剤3種をとりあげ，LH含量の差（表1）が，排卵率，妊娠率，OHSS発生率等に，どのように関係しているかについて卵胞発育を含めて検討を行なったので，その成績を報告する．

対象と方法

昭和62年6月初めより10月末までの5ケ月間に，大阪大学医学部附属病院産婦人科ホルモン外来を受診した，排卵障害を有する婦人計23例を対象とした．

表1　各種HMG製剤におけるFSH 75単位に対するLH含量

製剤名	LH含量(IU)
HMG「日研」	2～4
ヒュメゴン	58～109
パーゴナル	75

表2　対象患者及び各種基礎値

	HMG「日研」	ヒュメゴン	パーゴナル
症例数	22	14	16
年齢（歳）	31.3±0.9	30.4±0.9	32.2±1.1
体重（kg）	49.3±1.2	50.9±1.4	48.9±1.5
LH（mIU/ml）	23.7±2.7	24.8±3.5	21.4±2.9
FSH（mIU/ml）	12.9±2.8	11.2±1.2	12.5±3.8
PRL（ng/ml）	14.3±1.6	13.5±1.8	12.5±1.9

＊mean±SE.

表3　各種HMG製剤による治療成績

	HMG「日研」	ヒュメゴン	パーゴナル
症例数	22	14	16
周期数	31	17	22
総投与量（IU）	735±82	690±84	900±157
投与期間（日）	4.9±0.9	4.9±0.5	5.6±0.9
排卵率（対周期）	83.9	82.4	77.2
妊娠率（対周期）	3.2	5.9	4.5
OHSS発生率(対周期)	6.5	5.9	4.5

＊mean±SE.

その内訳は，無排卵周期症3例，第Ⅰ度無月経17例，第Ⅱ度無月経3例であるが，第Ⅰ度無月経には多嚢胞性卵巣症候群（PCO）と診断された3例が含まれている．これらの症例は全例不妊を主訴とし，原発不妊が21例，続発不妊が2例であった．また，他の不妊因子である卵管因子，子宮因子，頸管因子，及び精液因子の異常は認めなかった．

23例中，22例にHMG「日研」，14例にヒュメゴン，そして16例にパーゴナルを使用した．また，そのうち8例に3種の製剤全てを使用した．

各々のHMG製剤別に、対象とした症例の年令，体重，血中LH，FSH及びPRLの基礎値を表2に示したが，ヒュメゴン，パーゴナル，そしてHMG「日研」何れのHMG製剤を使用した症例の背景に特記すべき相違点はなく，また血中LH，FSH，PRL基礎値に有意差はなかった．

HMG投与は原則として，消退出血開始後5日目より75～150IU/日，連日筋注し，卵胞成熟をはかる．卵胞成熟徴候は，超音波Bスキャン，頸管粘液スコア，尿中エストロゲン値で追跡し，HCGへの切り替えは，尿中エストロゲン値75ng/ml以上，頸管粘液スコア9点以上，Bスキャン上，卵胞径18mm以上の時点で行ない，HCG5000IUを筋注した．さらに，HCGは必要に応じ，黄体期にも追加投与した．HCG投与時及び黄体期に採血を行ない，血中エストラジオール（E_2），血中プロゲステロン値をRIAにて測定した．

卵巣腫大は，内診及び超音波Bスキャンによりcheckし，長径が8cm以上をもって卵巣過剰刺激症候群（OHSS）とした．

排卵の有無は，BBT及び黄体期プロゲステロン値を参考にして判定した．

結　果

23症例，70周期の治療成績を表3にまとめた．HMG「日研」の治療周期は31周期，ヒュメゴンは17周期，パーゴナルは22周期で，1周期あたりの総投与量はHMG「日研」735±82IU，ヒュメゴン690±84IU，パーゴナル900±157IUであり，1周期あたりの投与期間はHMG「日研」4.9日，ヒュメゴン4.9日，パーゴナル5.6日であった．総投与量，投与日数はそれぞれの治療別に差を認めなかった．

排卵率を比較してみるとHMG「日研」は31周期中26周期，83.9％，ヒュメゴンは17周期中14周期，82.4％，パーゴナルでは22周期中17周期，77.2％と各々の治療別排卵率に有意差はなかった．また，排卵例において，排卵までに要したHMGの投与量はHMG「日研」728±81IU，ヒュメゴン630±90IU，パーゴナル840±160IUとそれぞれの間に大きな差は認めなかった．

妊娠例は，HMG「日研」，ヒュメゴン，パーゴナルで各々1例ずつ認められ，全て単胎であり，現在妊娠経過観察中であるが，周期あたりの妊娠率はHMG「日研」3.2％，ヒュメゴン5.9％，パーゴナル4.5％であった．

OHSSの発生については，HMG「日研」で2例，ヒュメゴンで1例，パーゴナルで1例認められたが，いずれも片側性で，腹水貯留のような重篤な症状はなく，可及的安静にて軽快した．周期あたりのOHSS発生率は，HMG「日研」6.5％，ヒュメゴン5.9％，

表4　各種 HMG 製剤治療における卵胞発育のパラメーターの比較

	HMG「日研」	ヒュメゴン	パーゴナル
HCG 切り替え時の血中エストラジオール値 (pg/ml)	916±276	1,283±326	1,024±277
最大卵胞長径 (mm)	25.1±1.8	23.6±1.2	22.0±1.4
卵胞数(φ>10mm) (個)	3.9±0.5	3.7±0.5	3.2±0.5
黄体期プロゲステロン値 (ng/ml)	30.3±8.3	23.1±3.3	30.5±8.1

＊mean±SE

パーゴナル 4.5％で，3者の間にほとんど差はなかった．

排卵周期における HCG 切り替え時の血中エストラジオールの値，最大卵胞長径，卵胞数，及び HCG 切り替え後1週間目の血中プロゲステロンの値を各治療別に表4に示した．まず，HCG 切り替え時の血中エストラジオール値は，HMG「日研」916±276pg/ml，ヒュメゴン 1283±326pg/ml，パーゴナル 1024±277pg/ml で，治療別に有意差は認められなかった．黄体期血中プロゲステロン値も，HMG「日研」30.3±8.3ng/ml，ヒュメゴン 23.1±3.3ng/ml，パーゴナル 30.5±8.1ng/ml で3者に有意差は認められなかった．

また，HCG 切り替え時の最大卵胞長径，直径 10mm 以上の卵胞数と3種の HMG 製剤治療との関係について，最大卵胞長径は HMG「日研」で約 25.1mm，ヒュメゴンで約 23.6mm，パーゴナルで約 22.0mm と全く有意差は認められなかった．卵胞数は HMG「日研」で 3.9 個，ヒュメゴンで 3.7 個，パーゴナルで 3.2 個とどの HMG 製剤を使用してもほぼ同じ数であった．

23 症例の中で，HMG「日研」，ヒュメゴン，パーゴナルの3種の HMG 製剤全てを周期毎に順次投与した8症例の検討では，排卵は HMG「日研」で全例に，ヒュメゴンでも全例に，パーゴナルでは8例中7例に認められた．OHSS の発生は，HMG「日研」とヒュメゴンに各々1例ずつみられたが，パーゴナルではみられなかった．又，妊娠例はどの HMG 製剤においてもなかった．（表5）

考　案

正常排卵周期における FSH/LH 比は各々の時期において異なる．仲野[1]によれば，正常排卵周期の bioreactive FSH/LH 比は卵胞期 1.36，排卵前期 0.69 及び排卵期 0.69 であるという．従って，HMG 製剤を使用する際にはこの比率に近似するように使い分

表5　同一8症例における各種製剤による治療成績

	HMG「日研」	ヒュメゴン	パーゴナル
排卵率	8 (100%)	8 (100%)	7 (87.5%)
OHSS 発生率	1 (12.5%)	1 (12.5%)	0 (0%)
妊娠率	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

ければ，OHSS の発生を阻止し，多発排卵も予防でき，自然な排卵現象を得ることができると推測される．ところが，現在我々が使用している HMG 製剤は FSH と LH が単離されておらず，性成熟期婦人下垂体が含有する FSH・LH と質的に異なっているという報告もあり[2]，又，同一製剤であっても生物製剤であるがゆえに lot により FSH/LH 比は多少異なっているので，各 HMG 製剤を組み合わせて自然排卵時の血中レベルの変動を得ようとすることは不可能である．故に，FSH/LH ほぼ1である HMG 製剤を使用せざるを得ないのが現状であった。

倉智[3]らがまとめたヒュメゴンについての全国 36 施設，2166 症例，6096 周期における排卵誘発成績によると周期別排卵率は 64.5％，妊娠率は 13.3％，OHSS 発生率は 5.3％である．パーゴナルについては我国での多数例での検討はないが，Thompson & Hansen[4]による 1286 症例，3002 周期で 64.5％の周期別排卵率，11.9％の妊娠率，1.3％の OHSS 発生率をみている．これらの成績は，ヒュメゴンとパーゴナルの臨床効果にほとんど差がないことを示している．今回，我々の，FHS に比べて LH 含量の非常に少ない HMG「日研」を加えた各種製剤治療別成績でも，もとより症例数，周期数が異なるものであるから，単純な比較は困難であろうが，同等の排卵誘発成績を得，又，LH 含量の異なる3種の HMG 製剤間には差を認めなかった．この点について，Jacobson[5]らは LH 含量の少ない製剤の方が排卵率が低かったとし，Kase[6]らは FSH/LH 比と排卵率には一定の傾

向が認められなかったと報告していて，一定の見解はない．生体側の感受性の条件における差が考えられるが，我々の同一症例で反復投与した8症例でも比較したが，3製剤間に排卵率における差は認められなかった．

OHSS発生とFSH/LH比の関係についても諸家の報告があるが，一定の見解は得られていない．Lousverence[7]，Jacobson[5]，Rosenberg[8]Shearman[9]及びThompson[4]はFSH/LH比は，OHSS発生に関与しないとしているが，Crooke[10]はFSH/LH比が高くなればOHSS発生率は低下すると述べ，Taymor[11]はLH含量が少ない方がOHSS発生が少ないとしている．淵[12]らも家兎を用いた実験により高FSH/LH比製剤の方がOHSS及び多発排卵などの副作用が多いことを示唆し，五十嵐[13]もFSH/LH比がOHSS発生に関与していると報告している．これら見解の相違は，研究者によりOHSSの診断基準が異なることの他，個体によってゴナドトロピンの感受性に差があることなどによると考えられる．卵胞発育のパラメーターについて，Pure FSH (Metrodin)とパーゴナルを比較検討した結果，発育卵胞数や，HCG切り替え時の血中エストラジオール値等に差を認めたという報告[14]，差がなかったという報告[15]があり，一定の見解は得られていない．

今回，我々が得た排卵誘発結果においては，OHSSの発生及び深い関係を有する血中エストラジオール値，超音波検査所見にHMG製剤のLH含量の違いによる差は認められなかったものの，これはあくまでも通常の投与法における事である．今後，FSH/LHの調整の条件及び投与方法の違いにより，OHSS，多胎発生の防止への努力がなされるべきと考えられる．

文　献

1) 仲野良介：排卵とFSH：LH比―新しいゴナドトロピン療法の試み―，産と婦，42：43，1975
2) 浜田雄行，杉並　洋，矢野浩史，松浦俊平：性成熟期婦人下垂体および種々のHMG製剤に含有されるLHおよびFSHの質的・量的な比較検討，日不妊会誌，32（2）：236，1987
3) Keiichi Kurachi, Toshihiro Aono, Masakuni Suzuki, Mutsuo Hirano, Takuro Kobayashi and Manabu Kaibara: Results of HMG (Humegon)-HCG therapy in 6096 treatment cycles of 2166 Japanese women with anovulatory infertility, Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., 19: 43, 1985
4) Thompson, C. R. and Hansen, L. M.: Pergonal (menotropins): A summary of clinical experiences in the induction of ovulation and pregnancy, Fertil. Steril., 21: 844, 1970
5) Jacobson, A. and Marshall, J. R.: Ovulatory response rate with human menopausal gonadotropins of varying FSH/LH ratios., Fertil. Steril., 20: 171, 1969
6) Kase, N., Mroueh, A., Buxton, C. L.: Pergonal therapy of anovulatory infertility., Am. J. Obstet. Gynecol., 100: 176, 1968
7) Louwerens, B.: The clinical significance of FSH/LH ratio in gonadotropin preparations of human origin., Acta Obstet. Gynecol. Scand., 48: 31, 1969
8) Rosemberg, E. and Nwe, T. T.: Induction of ovulation with human postmenopausal gonadotropins. Experience with 23 patients., Fertil. Steril., 19: 197, 1968
9) Shearman, R. P.: Induction of ovulation., Aust. Ann. Med., 15: 266, 1966
10) Crooke, A. C., Butt, W. R., Palmer, R. F., and Morris, R.: Clinical trial of human gonadotropins., J. Obstet. Gynecol., 70: 604, 1963
11) Taymor, M. L., Sturgis, S. H., Goldstein, D. P. and Lieberman, B.: Induction of ovulation with human postmenopausal gonadotropin, Fertil. Steril., 18: 181, 1967
12) 淵　利雄，石丸忠之，黄　宏駿，増崎英明，鮫島哲郎，藤下　晃，山辺　徹：HMG-HCG投与時の副作用発現因子に関する考察―家兎による実験的検討―，臨婦産，39：895，1985
13) 五十嵐正雄，鈴木　勉，宮本　薫，浅野目和宏：精製HMGによる卵巣腫大・多発排卵予防効果，日産婦会誌，36（9）：1692，1984
14) Hoffman, D. I., Lobo, R. A., Compeau, J. D., Tsai, H. M., Holmberg, E. A., Ono, T., Frederick, J. J., Platt, L. D. and diZerega, G. S.: Ovulation induction in clomiphene-resistant anovulatory women: Differential follicular response to purified urinary follicle-stimulating hormone (FSH) versus purified urinary FSH and luteinizing hormone, J. Clin. Endocrinol Metab., 60: 922,1985
15) Venturoli, S., Paradisi, R., Fabbri, R., Magrini, O., Porcu, E. and Flamigni, C.: Comparison between human urinary follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropin treatment in polycystic ovary, Obstet. Gynecol., 63: 6, 1984

Comparison of effects of three HMG preparations with different LH contents on ovulation induction

Yoshiko Fujita, Keiichi Tasaka,
Akira Miyake and Osamu Tanizawa

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka University Medical School,
Osaka 553, Japan

The effects of HMG preparations with different LH contents, HMG "NIKKEN", Humegon and Pergonal were compared.

1) The effects of the three preparations on the rate of ovulation were not significantly different, the rates being 83.9% with HMG "NIKKEN", 82.4% with Humegon and 77.2% with Pergonal.
2) The serum levels of estradiol at the time of HCG injection were 916±276 pg/ml in HMG "NIKKEN", 1283±326 pg/ml in Humegon, and 1024±277 pg/ml with Pergonal. The sizes of leading follicles were 25.1±1.8mm with HMG "NIKKEN", 23.6±1.2mm with Humegon and 22.0±1.4mm with Pergonal. The numbers of follicles with diameter of over 10mm are 3.9±0.5 with HMG "NIKKEN", 3.7±0.5 with Humegon and 3.2±0.5 with Pergonal. Thus these parameters of follicular maturation were not significantly different with the three drugs.
3) The rates of the ovarian hyperstimulation syndrome were 6.5% with HMG "NIKKEN", 5.9% with Humegon and 4.5% with Pergonal, respectively, which were also not significantly different.
4) It is concluded that HMG "NIKKEN", which has a lower LH content than Humegon or Pergonal was as effective as the latter two drugs, but may not be advantageous for reducing the rate of the ovarian hyperstimulation syndrome.

(受付：1988年2月24日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

DECREASED THYROTROPIN RESPONSE TO METOCLOPRAMIDE IN WOMEN WITH HYPOTHALAMIC AMENORRHEA

Katsuyoshi SEKI and Koichi KATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
National Defense Medical College,
Saitama, 359 Japan

Abstract: There are experimental data which suggest an inhibitory role for dopamine (DA) in the regulation of thyrotropin (TSH) secretion. In the present study, TSH responses to a DA antagonist, metoclopramide (MCP), were evaluated in women with hypothalamic amenorrhea. We found low basal TSH levels and decreased TSH responses to MCP in these women compared to normal women in the early follicular phase. The blunted TSH response to MCP may be related to the increased dopaminergic tone which is considered to be operative in women with hypothalamic amenorrhea.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 73－75, 1989)

Introduction

The administration of dopamine (DA) decreases basal thyrotropin (TSH) levels in humans[1], and the administration of metoclopramide (MCP), a DA antagonist, increases serum TSH levels in men and women[2-4]. These findings are consistent with an inhibitory role for DA in the regulation of TSH secretion. An increased dopaminergic inhibition of luteinizing hormone (LH) secretion occurs in some women with hypothalamic amenorrhea[5]. Consequently, dopaminergic regulation of TSH secretion may be altered in such women. In the present report we describe low basal TSH levels and decreased TSH responses to MCP in women with hypothalamic amenorrhea.

Materials and Methods

The subjects of this study were 5 normal women in the early follicular phase of the menstrual cycle, and 10 normoprolactinemic women with hypothalamic amenorrhea (Table 1). Basal serum LH, follicle stimulating hormone (FSH) and prolactin (PRL) levels in women with hypothalamic amenorrhea were similar to those in normal women. Basal estradiol (E_2) levels were significantly lower in women with hypothalamic amenorrhea than in normal women (Table 1). The diagnosis of hypothalamic amenorrhea was by exclusion; none of these women had identifiable

Table 1 Basal hormone levels (mean ± SE) in normal women and women with hypothalamic amenorrhea

	Normal women (n=5)	Hypothalamic amenorrhea (n=10)
FSH (ng/ml)	360 ± 42	338 ± 23
LH (ng/ml)	82.0 ± 10.3	63.5 ± 12.0
PRL (ng/ml)	11.6 ± 3.1	8.4 ± 1.4
E_2 (ng/ml)	46.2 ± 6.7	22.6 ± 4.6 **
TSH (μU/ml)	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2 *
FT_4 (ng/dl)	3.3 ± 0.3	2.5 ± 0.2
FT_3 (pg/ml)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1

Serum FSH and LH were expressed in terms of ng LER 907/ml. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs normal women.

pituitary or ovarian abnormalities, and we assuemed that the acyclic gonadotropin secretion in these women was due to functional derangement of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion[6,7]. None of the subjects was taking any medication at the time of the studies. Starting at 0930 to 1000 h, each received 10 mg of MCP as an iv bolus dose after two baseline samples had been obtained (−15 and 0 min); additional blood samples were obtained 15, 30, 60, 120 and 180 min after MCP administration. Serum TSH was determined in all samples, whereas LH, FSH, PRL, E_2, free thyroxine (FT_4) and free triiodothyronine (FT_3) were determined on baseline samples only. Serum LH, FSH, PRL and E_2 were determined by radioimmunoassay (RIA) as previously described[8]. Serum TSH was measured by immunoradiometric assay using kits obtained from Commissariat a l'Energie Atomique (Gif-sur-Yvett, France). The sensitivity of the TSH assay was 0.04 μU/ml. FT_4 and FT_3 were determined by RIA using RIA kits obtained from Amersham International PLC (Buckinghamshire, England). The within- and between-assay coefficients of variation were less than 10% in each assay. Mean basal concentrations were obtained by averaging two baseline samples collected before MCP administration. The area under the curve (AUC) was calculated by the trapezoid integration method. The Wilcoxon's two-sample rank test was used for statistical comparison of the AUC. All other statistical analyses were performed using Student's t test.

Results

Basal TSH concentrations were significantly lower in women with hypothalamic amenorrhea than in normal women, though FT_4 and FT_3 were not significantly different in the two groups of women (Table 1). The administration of MCP increased serum TSH levels both in normal women and women with hypothalamic amenorrhea (Fig. 1). Serum TSH concentrations were significantly higher at 15, 30 and 120 min after MCP administration in normal women ($p<0.05$ at 15 and 120 min, $p<0.01$ at 30 min), and at 30 and 60 min in women with hypothalamic amenorrhea

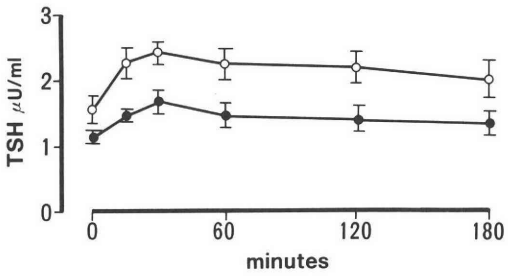


Fig. 1. Mean (± SE) serum TSH levels in 10 women with hypothalamic amenorrhea (●) and in 5 normal women in the early follicular phase (○) before and after the administration of MCP.

($p<0.05$ at 30 min, $p<0.01$ at 60 min) compared to the basal concentrations. The AUC of TSH after MCP administration was significantly ($p<0.05$) smaller in women with hypothalamic amenorrhea than in normal women (57.5±20.5 μU/ml·min, mean±SE, vs 119.4±20.7 μU/ml·min).

Discussion

In the present study we found a significant rise in serum TSH levels in normal women, though we failed to detect this change in our previous study[8]. The immunoradiometric assay for TSH used in the present study is more sensitive than the TSH RIA used in our previous study. Therefore, it is likely that use of the sensitive TSH assay enabled us to detect a rise in serum TSH levels in normal women in the present study. We found decreased basal TSH levels and blunted TSH responses to MCP in women with hypothalamic amenorrhea. An augmented TSH response to DA receptor blockers is found in hyperprolactinemic women[8)–10)], and this response has been related to increased dopaminergic inhibition of TSH secretion in these women. If this were the case, the blunted TSH response to MCP may indicate a decreased dopaminergic inhibition of TSH secretion in women with hypothalamic amenorrhea. However, this interpretation is not compatible with the hypothesis that women with hypothalamic amenorrhea may have increased dopaminergic activity[5,11]. Recently, Agner et al. found that the infusion of 0.4 and 4.0 μg/kg·min DA decreased serum TSH levels in normal men-

struating women in the early follicular phase, and that the infusion of 4.0 μg/kg·min DA reduced the TSH response to MCP[12]. Thus, the low basal TSH levels and the blunted TSH response to MCP in women with hypothalamic amenorrhea may be related to an increased dopaminergic tone. Further studies are needed to elucidate the role of DA in the regulation of TSH secretion in women with hypothalamic amenorrhea.

References

1) Leebaw, W. F., Lee, L. A. and Wolf, P. D.: Dopamine affects basal and augmented pituitary hormone secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 480-486, 1978.
2) Scanlon, M. F., Weightman, D. R., Mora, B., Heath, M., Shale, D. J. and Snow, M. H.: Evidence for dopaminergic control of thyrotrophin secretion in man. Lancet 2: 421-423, 1977.
3) Sowers, J. R., McCallum, R. W., Hershman, J. M., Carlson, H. E., Sturdevant, R. A. L. and Meyer, N.: Comparison of metoclopramide with other dynamic tests of prolactin secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 679-681, 1976.
4) Healey, D. L. and Burger, H. G.: Increased prolactin and thyrotrophin secretion following oral metoclopramide: dose-response relationships. Clin. Endocrinol. 7: 195-201, 1977.
5) Quigley, M. E., Sheehan, K. L., Casper, R. F. and Yen, S. S. C.: Evidence for increased dopaminergic and opioid activity in patients with hypothalamic hypogonadotropic amenorrhea. J. Clin. Endocrinol. Metab. 50: 949-954, 1980.
6) Lachelin, G. C. L. and Yen, S. S. C.: Hypothalamic chronic anovulation. Amer. J. Obstet. Gynecol. 130: 825-831, 1978.
7) Crowley, W. F., Filiari, M., Spratt, D. I. and Santoro, N. F.: The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. Recent Prog. Horm. Res. 41: 473-526, 1985.
8) 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: 166-170, 1982.
9) Quigley, M. E. and Yen, S. S. C.: Evidence for increased dopaminergic inhibition of secretion of thyroid stimulating hormone in hyperprolactinemic patients with pituitary microadenoma. Amer. J. Obstet. Gynecol. 137: 653-655, 1980.
10) Scanlon, M. F., Rodriguez-Arnao, M. D., McGregor, A. M., Weightman, D., Lewis, M., Cook, D. B., Gomez-Pan, A. and Hall, R.: Altered dopaminergic regulation of thyrotrophin release in patients with prolactinomas: comparison with other tests of hypothalamic-pituitary function. Clin. Endocrinol. 14: 133-143, 1981.
11) Hagen, C., Petersen, K., Djursing, H. and Andersen, A. N.: Evidence of altered dopaminergic modulation of Prl, LH and TSH secretion in patients with normoprolactinaemic amenorrhoea. Acta Endocrinol. 106: 8-14, 1984.
12) Agner, T., Hagen, C., Andersen, A. N. and Djursing, H.: Increased dopaminergic activity inhibits basal and metoclopramide-stimulated prolactin and thyrotropin secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. 62: 778-782, 1986.

視床下部性無月経における metoclopramide に対する TSH の反応の低下

防衛医科大学校産科婦人科

関 克義 加藤宏一

ドーパミン (DA) が TSH の分泌調節に抑制的に作用することを示唆する実験成績が報告されている．今回，視床下部性無月経患者において，DA 拮抗剤である metoclopramide (MCP) に対する TSH の反応を検討した．これらの患者において，正常婦人(卵胞期初期)と比較して，血中 TSH の基礎値および MCP に対する反応は減少していた．これは視床下部無月経患者において亢進していると考えられる DA 活性と関連していることが推測される．

(受付：1987年8月21日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

稀発月経を主訴とした 11β-hydroxylase 部分欠損による 高アンドロゲン血症の1例

An Oligomenorrheic Case of Hyperandrogenemia due to Partial 11β-Hydroxylase Deficiency

愛知医科大学産婦人科
浅井光興
Mitsuoki ASAI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Aichi Medical University

知多市民病院産婦人科
山室理　東出香二
Osamu YAMAMURO　Koji HIGASHIDE

Department of Obstetrics and Gynecology,
Chita City Hospital

排卵障害の一因として高アンドロゲン血症があり，副腎性高アンドロゲン血症の代表的疾患としては副腎性器症候群がある．ステロイド合成系酵素の部分的欠損症においても多毛などの男性化症状とともに卵巣機能不全を示すことが報告されている．われわれは，11β-hydroxylase の部分的欠損症による高アンドロゲン血症を経験したので報告する．

症例は稀発月経を主訴に来院．多毛症を認めたため各種ホルモンを測定したところ，DHEA-S 2638 ng/ml，T 81.9 ng/dl と高値であった．基礎体温表では無排卵であり，クロミフェンにも反応しなかった．ACTH 刺激試験により 11β-hydroxylase の基質である 11β-deoxycorticosterone および 11-deoxycortisol は高値を示し 11β-hydroxylase の部分的欠損症による高アンドロゲン血症と診断した．デキサメサゾン投与により DHEA-S，T は著明に減少し，クロミフェンの併用により排卵周期を回復した．
(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 76—79, 1989)

無月経や稀発月経などの卵巣機能不全症に多毛・痤瘡などの男性ホルモン過剰症状を伴っていることがあり，両者の合併は高アンドロゲン血症を強く疑わせる．高アンドロゲン血症は副腎性，卵巣性および両者の混合性に大別[1]され，副腎性の代表的な疾患としては副腎性器症候群，卵巣性では Stein-Leventhal 症候群がある．また副腎性高アンドロゲン血症を呈する患者の中にステロイド合成系酵素の部分的欠損症が含まれており，これらの例では各種ホルモン血中濃度の測定だけでは明らかな異常を示さず ACTH 刺激試験によってはじめて明らかになる例があると報告されている[2-5]．

われわれは，稀発月経を主訴に受診した患者に著明な多毛を認めたため，各種ホルモン測定や ACTH 刺激試験を施行し，11β-hydroxylase の部分的欠損症による高アンドロゲン血症と診断し得た症例を経験したので報告する．

症　例

患者は32歳で稀発月経を主訴に昭和61年2月来院．初経は14歳で，月経は不整であった．昭和60年10月に結婚し，基礎体温を測定していたが，低温相のみで不整に無排卵性月経が発来していた．既往歴および家族歴には特記すべき事項はなく，妊娠分娩歴もない．身長158 cm，体重65 kgと肥満を認めた．多毛症は生来のものであり，大腿部，下腹部に特に著明であり，下腹部においては外陰部より臍部にまで達する男性型発毛であった．顔面には痤瘡を著明に認めている．初診時所見は，子宮は前傾前屈で正常大，左卵巣は鶏卵大に腫大していた．外陰部は著明な多毛を認める以外正常であり，陰核肥大も認めなかった．血圧は128/80 mmHgと正常，血液一般，血液生化学も異常なく，血清電解質も正常であった．内分泌検査所見を表1に示した．LH，FSHは正常範囲内であったが，DHEA-Sは2638 ng/mlと高値であり，テストステロン(T)も81.9 ng/dlとやや高値であった．また尿中の17-OHCS，17 KSはともにやや高値であった．ACTHは25 pg/nl以下であり，CTにても副腎に特に異常所見を認めなかった．プロゲステロン30 mg筋注にて消退性出血を認めたがクロミフェン(CC)により排卵は誘発されなかった．以上より副腎性高アンドロゲン血症を強く疑ったが，卵巣腫瘍摘出術が優先すると考えられた．しかし結婚後4か月の時点であり，手術の同意が得られず，経過観察を行っていた．この間の基礎体温はやはり低温相のみで稀発性に無排卵性月経が発来していた．

昭和61年10月，左卵巣腫瘍摘出術を施行．ムチン性腺腫であり，PCOは認めなかった．手術の影響がなくなったと思われる術後7日目および10日目に2回ACTH-testを施行した．検査方法は，前夜にデキサメサゾン(DEX)を1 mg内服させ，午前10時にテトラコサクチド(コートロシン)250 μgを静注．前値および60分値を測定した(表2)．11β-deoxycorticosterone (DOC)および11-deoxycortisol (CpS)は過剰反応を示したが，corticosterone (CpB)およびcortison (CpF)は正常範囲内の反応を示していた．また，11β-hydroxylase活性の指標となるDOC/CpBおよびCpS/CpFはそれぞれ0.0252および0.0133と非常に高値であり，11β-hydroxylaseの部分欠損症と診断された．

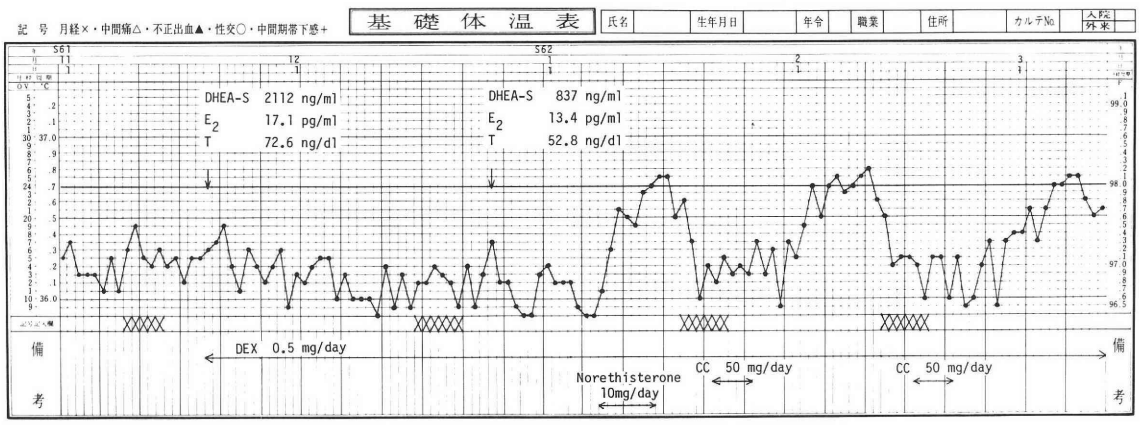
以上の結果より，11β-hydroxylaseの部分欠損症による副腎性高アンドロゲン血症と診断し，昭和61年11月よりDEX 0.5 mg/dayの投与を開始した．DHEA-SはDEX投与開始前の2112 ng/mlから投

表1　内分泌検査所見

LH	13.6	mIU／ml
FSH	7.5	mIU／ml
PRL	10.5	ng／ml
E_2	17.1	pg／ml
T	81.0	ng／dl
DHEA－S	2638	ng／ml
ACTH	＜25	pg／ml
Cortisol	14.2	μg／ml
17－OHCS	9.1	mg／day
17－KS	9.8	mg／day

表2　ACTH刺激試験

		前値	60分値
11-deoxycorticosterone (DOC)	(ng/ml)	0.064	0.507
		0.090	0.339
11-deoxycortisol (CpS)	(ng/ml)	0.04↓	3.07
		0.133	2.88
Corticosterone (CpB)	(ng/ml)	1.73	19.4
		0.2 ↓	14.0
Cortisol (CpF)	(μg/dl)	1.1	22.5
		0.9	22.3



与一ケ月後には837 ng/mlと著明に減少しており，Tも72.6 ng/dlから52.8 ng/dlと明らかに低下した．DEX投与後約50日間経過をみたが無排卵であったため，消退性出血後CC 50 mg/dayを5日間投与したところ第15日目に排卵した．以後もCCを使用しないと排卵は起こらなかった．黄体機能不全を認めたためhCG療法を併用したが，妊娠には至らず，昭和62年7月転居のため他院へ治療を依頼した．

考　察

高アンドロゲン血症は副腎性，卵巣性およびその混合性に大別され，これらの鑑別には各臓器の抑制試験や刺激試験が施行される[1]．副腎性高アンドロゲン血症の診断は，一般にはDEXによる抑制試験により行われるが，ACTH刺激試験によって異常を示す例も多い[6,7]．本症例においては，DEX 0.5 mg/dayの投与によりDHEA-Sばかりでなく Tも明らかに低下し副腎性高アンドロゲン血症と診断された．また，副腎性高アンドロゲン血症の中にはステロイド合成系酵素の部分的欠損症が含まれていることが報告され，これらの診断にはACTH刺激試験が有用であると報告されている[2-5]．部分的欠損している酵素の種類は基質，生成物の比をとることにより明らかにされ，11 β-hydroxylaseの場合には，DOC/CpB, CpS/CpFが指標となる．Maroulisら[8]は，多毛症の原因としては一般的ではないとしながらもCpS/CpFが高い症例を34例の多毛症の患者中3例に認めている．またNaritaら[5]は，42例の多毛症患者中，DOC/CpB, CpS/CpFが共に高い症例を一例報告している．今回のわれわれの症例では，Naritaらの方法と同様の方法で検索しているが，DOC/CpBは0.0252, CpS/CpFは0.0133であり，正常値DOC/CpB：0.0025～0.015, CpS/CpF：0.001～0.003に比べ両者とも非常に高値であり，11 β-hydroxylationの障害が明らかにされた．

Zachmann[9]らは，11 β-hydroxylase欠損による先天性副腎過形成25例について報告しているが，その中で病態に非常に差があることを述べており，外陰部の奇形を伴う，いわゆる副腎性器症候群を呈するものから，単に多毛，稀発月経を示すのみのものまであるとしている．本症例においては，外表奇形は全くなく，高血圧や塩類喪失も認めず，多毛症および無排卵性の稀発月経を認めたのみである．

高アンドロゲン血症がどのような機序で排卵障害を起こすかについては，特にPCOを中心に報告されているが[10,11]，過剰なアンドロゲンによりゴナドトロピン分泌の不全が起こることに起因すると考えられている．副腎性の高アンドロゲン血症によりPCOに類似した病態，つまりLH/FSHの上昇も多く報告されているが，本症例ではLH/FSHは1.8であり開腹手術時にPCOも認めなかった．

副腎性および卵巣との混合性高アンドロゲン血症ではDEX療法が第一選択となる．投与量はDHEA-Sを指標に400 mg/ml以下に抑制するのがよいとされている[1]．本症例の場合DEX療法後も837 ng/mlでありまだ不十分であったと考えられる．この様な場合でもCCとの併用により排卵誘発が可能であり，DEX投与により血中アンドロゲンが低下しCCへの反応性が高まるためと報告されている[12]．

多毛症と排卵障害を合併する症例ではまず高アンドロゲン血症を疑い，その原因を調べそれに対する適切な治療が必要である．本症例は副腎性高アンドロゲン血症であり，11 β-hydroxylaseの部分的欠損症と診断し，DEX療法およびCC併用療法による排卵周期を回復し得た．

文　献

1) Maroulis, G. B.: Evaluation of hirsutism and hyperandrogenemia. Fertil. Steril, 36: 273, 1981.
2) Newmark, S. Dluhy, R. G., Williams, G. H., Pochi, P. and Rose, L. I.: Partial 11-and 21-hydroxylase deficiencies in hirsute women. Am. J. Obstet. Gynecol. 127:594, 1977.
3) Gibson, M., Lackritz, R., Schiff, I. and Tulchinsky, D.: Abnormal adrenal responses to adrenocorticotropic hormone in hyperandrogenic women. Fertil. Steril. 33: 43, 1980.
4) Guthrie, G. P., Wilson, E. A., Quillen, D. L. and Jawad, M. J.: Adrenal androgen excess and defective 11β-hydroxylation in women with idiopathic hirsutism. Arch. Intern. Med. 142: 729, 1982.
5) Narita, O., Masahashi, T., Asai, M., Ohsawa, M., Kikkawa, F., Hanai, K., Ohwaki, M., Suganuma, N., Mizutani, S. and Tomoda, Y.: Role of adrenal androgens and deffective 11β-hydroxylation in hyperandrogenic anovulatory women. Jap. J. Fert. Ster. 31: 385, 1986.
6) Fleetwood, J. A., Leigh, R. J., Hall, R. and Smith, P. A.: Evidence for an underlying adrenocortical abnormality in hirsute women, Clin. Endocrinol. 3: 457, 1974.
7) Meikle, A. W., Worley, R. J. and West, C. D.: Adrenal corticoid hyperresponsiveness in hirsute women. Fertil. Steril. 41: 575, 1984.
8) Marlous, G. B., Manlimos, F. S., Garza, R. and Abraham, G. E.: Serum cortisol and 11-desoxycortisol levels in hirsute premenopausal women. Obstet. Gynecol. 48: 388, 1976.

9) Zachmann, M., Tassinari, D. and Prader, A.: Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11β-hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. J. Clin. Endocrinol. Metab. 56: 222, 1983.
10) Yen, S. S. C.: The polycystic ovary syndrome. Clin. Endocrinol. 12: 177, 1980.
11) Lobo, R. A. and Goebelsmann, U.: Effect of androgen excess on inappropriate gonadotropin secretion as found in polycystic ovary syndrome. Am. J. Obstet. Gynecol. 142: 394, 1982.
12) Chang, R. J. and Abraham G. E.: Effect of dexamethasone and clomiphene citrate on peripheral steroid levels and ovarian function in a hirsute amenorrheic patient. Fertil. Steril. 27: 640, 1976.

An oligomenorrheic case with hyperandrogenemia due to partial 11β-hydroxylase deficiency.

Mitsuoki Asai

Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University, Aichi 480-11, Japan

Osamu Yamamuro and Koji Higashide

Department of Obstetrics and Gynecology, Chita City Hospital, Aichi 478, Japan

It is well known that hyperandrogenemia is one of causes of anovulation. In the cases of partial deficiencies of steroid synthetases, anovulatory women with hirsutism have been reported. We report an oligomenorrheic woman with hyperandrogenism due to partial 11β-hydroxylase deficiency.

The patient complained of the oligomenorrhea. High levels of dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) and testosterone (T) with severe hirsutism were observed. Oligomenorrheic anovulatory cycles were shown in BBT chart and the ovulation could be not induced by clomiphene citrate. High responsiveness of the substrate for 11β-deoxycortisol was observed following the administration of ACTH (cosyntropin, 250μg).

These results showed that this case was the hyperandrogenism due to partial 11β-hydroxylase deficiency. The levels of DHEA-S and T were remarkably suppressed by the oral administration of dexamethasone (0.5mg/day) and then the ovulatory cycles were obtained using with clomiphene citrate.

(受付：1988年4月8日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

多嚢胞性卵巣（PCOD）に対する異なるhMG製剤の排卵誘発効果の比較

Induction of Ovulation with Different Kinds of Human Menopausal Gonadotropins in Women with Polycystic Ovarian Disease

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室

楠原浩二 Koji KUSUHARA
渡辺直生 Naoiku WATANABE
川勝雅秀 Masahide KAWAKATSU
許山浩司 Hiroshi MOTOYAMA
松本和紀 Kazunori MASTUMOTO
小田原靖 Yasushi ODAWARA
落合和彦 Kazuhiko OCHIAI
岡本愛光 Aiko OKAMOTO
寺島芳輝 Yoshiteru TERASHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Jikei University School of Medicine.

19例の多嚢性卵巣患者(PCOD)に組成の異なる2種のhMG製剤を投与し，その排卵誘発効果ならびに副作用について比較し以下の結果を得た．投与した2種のhMGは，通常のhMG(Humegon®(HMGと略))と，LHの含有量が低値の日研－HMG®（N-HMGと略）である．

1）排卵にいたるまでのhMGの投与回数およびFSHに換算した総投与量はHMG, N-HMGに有意な差はみられなかった．

2）排卵誘発率は症例数あたりHMG 91.2％，N-HMG 100.0％，周期数あたりのそれはHMG 77.9％, N-HMG 81.8％であり両剤ともにすぐれた排卵誘発効果を得たが両剤に有意差はみられなかった．

3）妊娠率はHMGが症例数あたり64.3％，周期数あたり27.5％であるのに比し，N-HMGのそれは症例数あたり50.0％，周期数あたり36.4％でありほぼ同様であった．

4）副作用の発症を比較すると，OHSSの発生率はHMGに比しN-HMGは低率でかつ軽度であった．しかし多胎妊娠の発生率は症例数が少ないため比較が困難であった．

5）N-HMG投与時におけるLH/FSH比は投与が進むにつれ低下し，生理的レベルに達し，さらに内因性LH surgeと考えられる排卵前の急峻なLHの上昇がみられる例が存在した．

以上の事より低LH含有のN-HMGはPCODには従来のhMGと同様のすぐれた排卵誘発効果を有するとともに，OHSSの発症が少ない点より有用と考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 80—86, 1989)

緒　言

多嚢胞性卵巣 polycystic ovarian disease（以下PCODと略）の治療にはclomidあるいはclomid＋predonisolone，clomid＋bromocriptine等のclomid variation法がまず行われるが，その排卵誘発効果は必ずしも満足し得るものではない．

また従来より有効性が報告[1]されている卵巣楔状切

除法もその排卵誘発効果は一時的であり，かつ術後の卵管－卵巣周囲癒着の発生も稀でなく，卵管性不妊に至る例もある事が報告され[2,3]，最近では頻用されない傾向にある．

一方，hMGはその強いゴナドトロピン作用よりPCODに対しても高い排卵誘発効果を有する事が報告されている[4,5]が，その反面，強度の卵巣過剰刺激Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) が発生しやすい事も事実である[6]．

なぜPCODにhMGを投与すると重篤なOHSSが発症するかは充分に解明されていないが，hMG中に含まれるLHが関与している事は容易に推定し得る．そこでhMG中に含まれるLHを極力除外する事によりOHSS等の副作用を軽減しつつ，FSHのもつ卵胞成熟作用によりPCODにも排卵誘発が期待し得るのではないかと考えるのは当然の事である．

そこで今回，著者らはPCODと診断し得た症例のうち，cloimid単独，あるいは種々のclomid variation法にても排卵にいたらなかったPCODに対しHumegon®，日研hMG®の2種のhMGを投与し，排卵率，妊娠率からみた両hMG剤の有用性と副作用の両面を比較し検討した．

研究対象ならびに方法

1．検索対象

検索対象は，高LH＋正FSH血症を有し内分泌学的にPCODと診断し得，かつ後にのべるclomidおよびそのvariation法にて排卵にいたらなかったPCODの19症例である．その臨床的，内分泌学的プロフィールを表1に示した．年齢は，平均28.5歳±4.7歳（22～38歳）である．全例何らかの月経異常を有し，その内訳は第1度無月経12例・63.2％，無排卵周期症7例・36.8％である．その治療前のホルモン値は，LHは平均41.9±10.5 miu/ml (M±SD) と高値，FSHは12.7±3.1 miu/mlと正常値を示し，高LH＋正FSHパターンを示した．estradiolは95.3±51.8 pg/mlと比較的高値を示した．prolactinは，平均15.0±5.3 ng/mlであり，この中には25 ng/ml以上の高PRL例は存在しなかった．またtestosteroneは平均1.2±0.3 ng/mlであり全体では正常範囲上限にあり著しい高testosteroneの症例はみられなかった．

これらに対し行ったLH-RH testの結果を図1に示した．19例のうち2例すなわちgestagenの投与に

表1　PCOD　19例のプロフィール

症例	年令	月経異常	LH	FSH	E_2	PRL	Test.	hMG/hCG以前の治療内容
1. O. M.	24	1° am	42	9.2	74.2	8.4	1.0	①CL②CL＋Pds③CL＋BCP：failure
2. M. Y.	22	anov.cycle	57	14	75.6	13	1.2	①CL②CL＋Pds：failure
3. K. J.	22	anov.cycle	46	9.4	——	——	——	①CL：failure
4. S. S.	29	anov.cycle	38	18	64.7	——	1.3	①CL②CL＋hCG：failure
5. T. E.	27	1° am	50	19.5	49	——	1.96	①CL②CL＋hCG：failure
6. I. N.	24	1° am	51	17	53	21.1	1.25	①CL②CL＋Pds③CL＋CL：failure
7. U. S.	25	anov.cycle	52	11	58	8.6	1.1	①CL②CL＋Pds③CL＋CF：failure
8. H. E.	35	oligomenorrhea	35	11	55.5	11	——	①CL：failure
9. N. S.	38	1° am	32	16	182	——	——	①CL：failure
10. H. K.	35	1° am	41	14	59.7	11	1.1	①CL②CL＋Pds③CL＋BCP：failure
11. S. T.	26	oligomenorrhea	49	12	96.4	——	0.7	①CL②CL＋Pds：failure
12. I. K.	29	1° am	51	11	116	18	1.1	①CL②CL＋Pds③CL＋BCP：failure
13. O. Y.	28	1° am	32	12	199	22	1.0	①CL②CL＋BCP③CL＋Pds：failure
14. N. M.	26	1° am	44	10	119	9.4	0.9	①CL②CL＋Pds③CL＋BCP：failure
15. K. I.	29	1° am	29	11	82.2	23	1.2	①CL：failure
16. N. S.	36	1° am	29	8.3	81.1	20	0.9	①CL②CL＋Pds③CL＋BCP：failure
17. Y. M.	30	1° am	21	11	43.6	14	——	①CL：failure
18. I. Y.	27	1° am	35	16	——	——	1.2	①CL：failure
19. E. A.	29	anov.cycle	62	11	211	——	1.3	①CL：failure
28.5±4.5＊(才)		1 am：12 anov ＋：7 oligo	41.9 ±＊ 10.5 (miu/mℓ)	12.7 ±＊ 3.1 (miu/mℓ)	95.3 ± 51.8 (pg/mℓ)	15.0 ±＊ 5.3 (ng/mℓ)	1.2 ±＊ 0.3 (ng/mℓ)	(CL：Clomiphene Pds：Predonisolone BCP：Bromocriptine (＊Mean±S.D)

よる消退出血の開始から10日目以内にLH-RH testを施行した2例はLHが正常反応を示しているが，他の17例は全てLH過剰反応とFSH正常反応を示し，PCODに定型的なLH，FSHの解離を示した．

これらPCOD 19例にclomid単独投与，あるいは種々のclomid variation法を行ったが全く排卵にいたらないか，一時的に排卵するものの持続的排卵にいたってはいない．

2．方法

方法は前記clomid resistantなPCODに対し通常hMG (Humegon®，以下HMGと略)，あるいは，LH低含有のHMG，すなわちNIKKEN-HMG®(以下N-HMGと略)を図2に示すようなプロトコールに従い投与した．すなわち，月経あるいは消退出血開始第5日目よりHMGあるいはN-HMGを1回2 vials即ちFSH量にして150 iuを連日筋注投与した．投与期間中は超音波断層法にて卵胞の成熟をモニタリングし，最大卵胞径が20 mmにいたった時点でHMGまたはN-HMGの投与を中止し，HCG 5000 iuを1回筋注投与した．その間，随時採血し血中LH，FSH，E_2をRIAにて測定した．

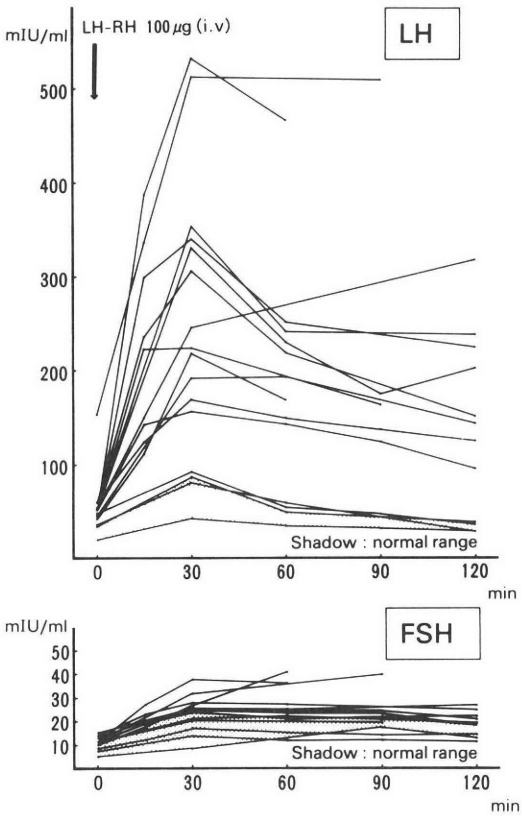


図1　PCOD 19例のLH-RH test

以上のプロトコールに従い排卵誘発を試み，HMGとN-HMG投与両群の排卵率，妊娠率，副作用等につき比較した．

成　績

1．排卵率，妊娠率の比較

HMGあるいはN-HMGにて排卵誘発を試みた群の排卵率，妊娠率の結果を表2に示した．すなわちHMGは14例・36周期に，またN-HMGは8例・11周期に投与を行なった．うち3例は両剤を異なる周期に投与した重複例である．

まず排卵までの投与期間を比較すると，HMGは平均8.5±2.2日であるのに比し，N-HMGは9.8±1.5日と後者がやや延長する傾向がみられるものの両群間に有意差は見られなかった．同様に排卵までの総投与量をFSHに換算して比較すると，HMGは1411.2±605.8 iu，一方N-HMGは1572.7±391.6 iuであり両群間に有意差は見られなかった．

排卵率を比較すると，HMGの排卵誘発成功率は症例数あたり91.2％，投与周期あたり77.9％であった．

一方N-HMGの排卵成功率は，症例数あたり100.0％，投与周期あたり81.8％でありHMG同様高い排卵誘発効果を得た．

排卵後の黄体期間を両群間で比較すると，HMGは11.8±1.8日，N-HMGは10.6±1.6日と後者がやや短い傾向がみられるものの両群間に有意差は見られなかった．

表2　PCODに対するHMG/hCG、N-HMG/hCGの治療成績

	症例	周期	投与期間 (日)	総投与量 (IU)	排卵率 %症例	排卵率 %周期	黄体期間 (日)	妊娠率 %症例	妊娠率 %周期
HMG	14	36	8.5 ±2.2	1411.2 ±605.9	91.2	77.9	11.8 ±1.8	64.3	27.5
N-HMG	8	11	9.8 ±1.5	1572.7 ±391.6	100.0	81.8	10.0 ±1.6	50.0	36.4

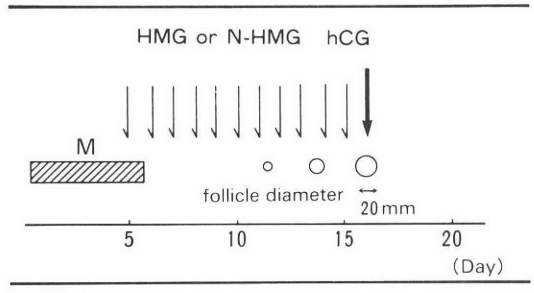


図2　PCODに対するhMG/hCG投与法のプロトコール

妊娠率を比較すると，HMGは症例数あたり64.3％，周期数あたり27.5％の妊娠率であった．一方N-HMGの妊娠率は症例数あたり50.0％，周期数あたり36.4％であり，両群間に有意差はなく，両群とも比較的良好な妊娠率を得た．

2．副作用の比較

HMG投与群とN-HMG投与群の副作用，特にその代表的なものである卵巣過剰刺激症候群OHSSと多胎妊娠につき比較したものが表3である．OHSSの程度はLunnenfeldの分類[7]に従い，第1度から第3度に分類した．

HMGではOHSSは14例中7例50％に発現し，その程度は，比較的軽症の第1度・1例，中等症の第2度・2例，重症な第3度が4例であった．

一方N-HMGでは8例中1例にOHSSが発症したにすぎず，かつ，この一例は第2度の中等症の例であった．このようにHMGに比しN-HMGは，OHSSの発症の頻度が少なく，かつ程度が軽症であった．

また多胎妊娠の発生を比較すると，HMGは9妊娠中2例・22.2％が多胎であり，その内訳は4胎と双胎の各1例であった．一方N-HMGでは妊娠例が僅か4例であるが，多胎は双胎の1例のみであった．このように多胎妊娠の頻度は両群にあまり差はみられなかったが妊娠症例数が少ないため今回の成績より単純にこの点を比較するのは困難であった．

3．治療周期における血中LH値，LH/FSH比の推移

HMG投与例およびN-HMG投与例のそれぞれ7周期における投与期間中における血中LHの推移を比較し図3に示した．

HMG, N-HMG両群とも投与にしたがい血中LHレベルは低下する傾向を示したが，特にN-HMG投与群では7例中6例がLH 20 iu/ml以下と著明に低下した．さらにこのうち6例ではHCGの切り替え投与以前にLHのsurgeとも思えるLHの上昇が観察された．

またLH/FSHを比較すると図4に示すように両群ともに投与にしたがいLH/FSH比が低下し，特にN-HMGでは全例LH/FSH 2以下を示した．

表3　hMG/hCGとN-HMG/HCGの副作用の比較

	OHSS発生率 (%症例)	OHSSの程度(症例) I	II	III	多胎妊娠
HMG	50.0(7/14)	1	2	4	22.2%(2/9) *
N-HMG	12.5(1/8)	0	1	0	25.0%(1/4) **

＊4胎1例，双胎1例
＊＊双胎1例

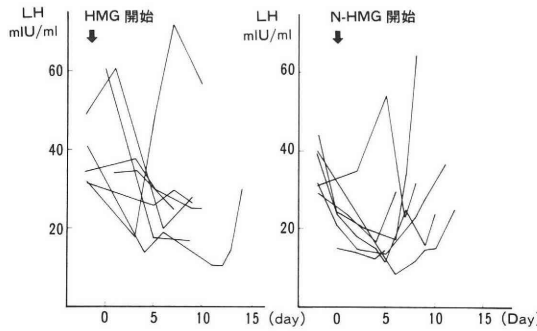


図3　HMGまたはN-HMGによる血中LHの推移

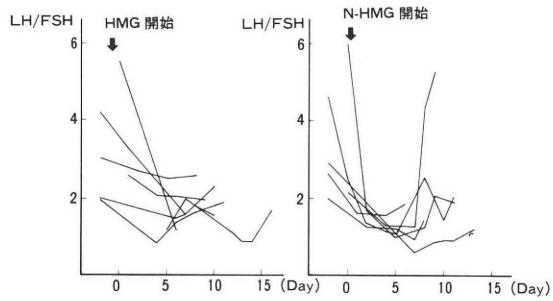


図4　HMG, N-HMG投与周期におけるLH/FSHの推移

考　察

PCODのうちclomid単独投与あるいはclomid＋predonisolone, bromocriptineなどのclomid variation法にても排卵にいたらないclomid resistantなPCODの治療は比較的やっかいなものである．従来，これに対し卵巣楔状切除術が行われたが，その排卵誘発効果は一時的であり，かつ卵巣卵管周囲癒着を発生せしめ，続発性の卵管性不妊に至る事も稀ではないという[2,3]．したがって，かつてしばしば行われた本法も繁用されなくなりつつある．そのような背景から最近本症に対するhMG療法が再評価されつつある．事実Wang[4]の報告でも本症に対するhMG-hCG療法の排卵誘発率は97.4％と高く，その妊娠率も65.9％と比較的良好な成績を得ている．

しかし，hMG-hCG療法のこのような高い排卵誘発効果とは裏腹に副作用の合併も重大な問題である．すなわち最大の副作用とも言うべき卵巣過剰刺激症候群OHSSの発生率は少ない報告[8]でもmildとsevereをあわせ4.5％，高いものではmildとsevereをあわせ60％[9]の高率に達する．しかもその多くは程度が比較的重症なものである．また多胎妊娠も少なくない[4,10]．

このようなhMG-hCGによる副作用を軽減するため様々な工夫が試みられている．すなわちhMGの投

与量，投与期間を血中 estradiol でモニタリングする方法[4]や，超音波による卵胞成熟のモニタリング法[5]などがその例である．しかしそれでも副作用の予防のための決定的な方法とはなり得ないようである．中枢性排卵障害に対して投与する hMG-hCG 療法でも OHSS は稀ではない[11]．しかし PCOD の場合はその頻度，程度とも格段に多い．このように PCOD に hMG に投与すると OHSS が好発するがその発生原因は充分に解明されていない．本症に特有な高 LH および LH/FSH 比が高い事が関係しているものと推定され[12]，これにさらに外因性に LH を加えることにより OHSS 発症の引き金になるものと考えられる．この事を勘案すると LH の含有を極力少なくした hMG が本症の排卵誘発には好都合ではないかと考えるのは当然である[9]．

そこで今回 LH 含有量が 1 vial あたり 4 miu 以下と低 LH 含有の hMG，すなわち HMG-日研 (N-HMG) を使用し通常の HMG (1 vial あたり LH 75 iu，FSH 75 iu 含有) と排卵率，妊娠率，副作用等について比較した．

まず排卵率は通常 HMG が症例数あたり 91.2％，投与周期あたり 77.9％であるのに比し，N-HMG は症例数あたり 100.0％，投与周期あたり 81.8％と HMG 同様高い排卵誘発効果を得た．また妊娠率も HMG が周期数あたり 27.5％であるのに対し N-HMG は 36.4％とむしろ高い妊娠率を得た．

一方最大の副作用である OHSS の発生では，HMG が 50.0％と約半数に OHSS が発症し，かつその程度が II，III度の重症であるのに比較して，N-HMG ではわずか 1 例・12.5％と発症率は低率で，かつその程度も軽度であった．このように PCOD に対する HMG と N-HMG の差は OHSS の発生が少ない事が最大の差異であった．この様に低 LH 含有 hMG では OHSS の発症が軽減し得る結果を得たが，その理由としては次のように考えられる．すなわち PCOD では tonic な血中 LH が高値である一方，FSH は正常値を保つため，FSH は LH に比較し相対的に低値であるといえる．一方，FSH は顆粒膜細胞の receptor の数，細胞数を増加せしむる事が知られているが[13]，さきにのべた様な相対的 LH 優位の PCOD では FSH receptor の数が逆に減少してしまうと考えられる[14]．

またこのような環境では顆粒膜細胞における aromatase 活性も抑制され，その結果 androgen が蓄積し卵胞は発育せず閉鎖にいたるという[15,16]．

したがって PCOD の排卵誘発には少しでも LH 含有量の少ない hMG が理想的である事は容易に推定し得ることろである．今回使用した N-HMG は 1 vial 中に含有される FSH は 75 iu であるのに比し LH は 1～4 iu とされて，既に述べた理由より PCOD の排卵誘発には合目的といえる．Seibel[12]は今回著者が使用した N-HMG とほぼ類似の LH，FSH 組成からなる urinayFSH (uFSH＝FSH 40～50 iu/vial＋LH 0.4 iu/vial) を PCOD に投与し，排卵率 45％(通常 hMG の排卵率 59％)，妊娠率 20％(hMG 30％) と今回の著者の成績とほとんど同様の成績を得，かつ OHSS は hMG が 30.8％であったの比し uFSH は皆無であったとの結果を得ている．しかも Seibel[12]は uFSH のみを連続投与し，LH surge 形成のための hCG を全く投与していないが，それでも内因性の LH surge が出現し排卵にいたるという．今回我々は N-HMG を卵胞最大径が 20 mm にいたる時点まで投与し hCG に切り替えているが，hCG を投与する以前に LH surge の立ち上がりとも考えられる LH の上昇を示した例が多く存在し，内因性 LH surge の存在が示唆された．また Kamrava[17]によれば PCOD に低用量 FSH を長期投与すると，投与にしたがい血中 FSH は上昇し，かつ LH が下降し LH/FSH 比が低下するという．その機序として FSH 投与にて上昇した estradiol が negative feed back メカニズムにより視床下部を介し，あるいは直接的に下垂体に作用し LH が下降するためと推定している．今回の著者の成績でも FSH は著明な変化を示さないが N-HMG を投与するにしたがい LH が下降する事により LH/FSH 比が下降し生理的状態に入っている．

さらに N-HMG が，HMG と異なる効果を示した理由として単に LH/FSH 比の差ばかりではなく浜田[18]が指摘するように N-HMG が他の HMG 製剤と質的に異なっている事に基因する可能性も考えられる．

最近，PCOD の排卵誘発には G_n-RH の律動的投与[19,20]あるいは G_n-RH analogue＋hMG の律動的投与[21]など試みられ良好な成績を得ている．しかしその投与法は必ずしも簡便な方法とは言い難い．その点から今回我々が投与を試みた N-HMG は投与法が簡便かつ容易な方法といえる．さらに本剤に含まれる LH を除外する事により本症の排卵誘発に対する簡便かつ安全な排卵誘発を行われるものと期待し得る．

文　献

1) Adashi, E. Y., Rock, J. A., Guzick, O.: Fertility following bilateral ovarian wedge resection: a polycystic ovary syndrome. Ferti. Steril., 36: 320－325, 1981.

2) Kistner, R. W.: Peri-tubal and peri-ovarian adhesions subsequent to wedge resection of the ovaries, Fertil. Steril., 20: 35−42, 1969.
3) Weinstein, D., Polishuk, W. Z.: The role of wedge resection of the ovary as a cause for mechanical sterility. Surg. Gynecol. Obstet., 141: 417−418, 1975.
4) Wang, C. F., Gemzell, C.: The use of human gonadotropins for the induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. Fertil. Steril., 33: 479−486, 1980.
5) 杉並 洋，伊藤孝徳，浜田雄行，矢野浩史，松浦俊平：多嚢胞卵巣 (Polycystic ovarian disease: PCOD) 例における hMG-hCG 排卵誘発と超音波断検査による卵胞成熟モニタリング，日不妊誌，31：244−250，1986.
6) Grooke, A. C., Butt, W. R., Palmer, R.: Effect of human pituitary follicular-stimulating and chorionic gonadotropin in Stein-Leventhal Syndrome, Brit. Med. J., 1: 1119−1123, 1963.
7) WHO-Scientific Group Report 1976 Agent stimulating gonadal function in the human World Health Organization, Technical Report Serials Number 514.
8) Tsapoulis, A. D., Zourlas, P. A., Comninos, A. C.: Observations on 320 infertile patients treated with human gonadotropin (human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin), Fertil. Steril., 29: 492−495, 1978.
9) Raj, S. G., Berger, M. J., Grimes, E. M. Taymor, M. L.: The use of gonadotropins for the induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. Fertil. Steril., 28: 1280−1284, 1977.
10) Thompson, C. R., Hanson, L. M.: Pergonal (menotropins): a summary of clinical expenence in the induction of ovulation and pregnancy. Fertil. Steril., 21: 844−853, 1970.
11) Schenken, J. G., Weinstein, D: Ovarian hyperstimulation syndrome, current survey. Fertil. Steril., 30: 225−268, 1987.
12) Seibel, M. M., McArdle, C., Smith, D., and Taymor, M. L.: Ovulation induction in polycystic ovary syndrome with urinary follicle-stimulating hormone or menopausal gonadotropin. Fertil. Steril., 43: 703−708, 1985.
13) Erickson, G. F., Hsuch, A. J. W., Quigley, M. E., Robar, R. W., Yen, S. S. C.: Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries. J. Clin. Endocrinol, Metab., 49: 514−519, 1979.
14) Rajaniemi, H. J., Ronneberg, L., Kanppila, A.: Luteinizing hormone receptor in ovarian follicles of patients with polycystic ovarian disease., J. Clin. Endocrinol, Metab., 52: 1054−1057, 1980.
15) Axelrod, L. R., Goldzieher, J. W.: The polycystic ovary, III Steroid biosynthesis in normal and polycystic ovarian tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab., 22: 431−446, 1962.
16) Axelrod, L. R., Goldzieher, J. W.: Enzymic inadequacies of human polycystic ovaries. Arch. Biochem. Biophys., 95, 547−548, 1961.
17) Kamrava, M., Seibel, M. M., Berger, M. J., Thompson, I., Taymor, M. L.: Reversal of persistent anovulation in polycystic ovarian disease by administration of chronic low-dose follicle-stimulation hormone, Fertil. Steril., 37: 520−523, 1982.
18) 浜田雄行，杉並　洋，矢野浩史，松浦俊平：性成熟期婦人下垂体および FSH の質的・量的な比較検討，日不妊会誌，32：236−245，1987.
19) Hurwitz, A., Rosenn, B., Palti, Z., Ebstein, B., Nar-Nir, R.: The hormonal response of patients with polycystic ovarian disease to subcutaneous low frequency pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone, Fertil. Steril., 46: 387−384, 1986.
20) Mason, P., Adams, J., Morris, D. V., Tucker, M., Price, J. Van Der Spuy, S. M., Sutherland, I., Chambergs, G. R., Wheeler, M. J. and Jacobs, H. S.: Induction of ovulation with pulsatile luteinizing hormone releasing hormone. Br. Med. J., 288: 181−185, 1984.
21) Hampes, P. G. A., Van Weissenbrceck, M. M., Burger, C. W., and Schoemaker, J.: The additional use of Buserelin in HMG-HCG ovulation induction in PCO; A double blind controlled study, In gonadotropin Down-Regulation in Gynecological Practise, eds. R. Roeland. 391, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986.

Induction of ovulation with different kinds of human menopausal gonadotropins in women with polycystic ovarian disease

Koji Kusuhara, Naoiku Watanabe, Masahide Kawakatsu, Hiroshi Motoyama, Kazunori Matsumoto, Yasushi Odawara, Kazuhiko Ochiai, Aiko Okamoto and Yoshiteru Terashima

Department of Obstetrics and Gynecology, JIKEI University School of Medicine, Tokyo 105, Japan

In patients with polycystic ovarian disease (PCOD), ovulation was induced with human

menopausal gonadotropin (Humegon® (HMG)) and human chorionic gonadotropin (hCG) or with another kind of human menopausal gonadotropin (Nikken-HMG® (N-HMG)) and human chorionic gonadotropin.

A total of 36 treatment cycles of HMG/hCG were administered to 14 infertile patients. Twelve (91.2%) of patients ovulated, and nine (64.3%) conceived with HMG/hCG.

And a total of 11 treatment cycles of N-HMG/hCG were administered to 8 infertile patients.

Eight (100.0%) of patients ovulated, and four (50.0%) conceived with N-HMG/hCG.

HMG/hCG and N-HMG/hCG resulted in comparable rates ovulation and conception.

But the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome apperared lower with N-HMG/hCG than HMG/hCG.

This is excellent point of N-HMG/hCG in induction of ovulation with pcod women.

(受付：1988年2月27日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

腹腔鏡による子宮奇形の診断に関する検討

Laparoscopic Diagnosis of Uterine Anomalies

島根医科大学医学部産科婦人科学教室
(主任：北尾　学教授)

山崎裕行　高橋健太郎　内田昭弘
Hiroyuki YAMASAKI　Kentaro TAKAHASHI　Akihiro UCHIDA
吉野和男　草刈万寿夫　北尾　学
Kazuo YOSHINO　Masuo KUSAKARI　Manabu KITAO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University

腹腔鏡により6例の子宮奇形を診断した．6例は双角単頸子宮1例，双角双頸子宮1例，中隔子宮腟中隔1例，双頸子宮腟中隔1例，Mayer-Rokitansky-Küster症候群2例である．中隔子宮腟中隔の1例は子宮卵管造影法の診断と一致せず、双頸子宮腟中隔の1例は腹腔鏡により最終診断をした．Mayer-Rokitansky-Küster症候群は腹腔鏡により確定診断した．

以上より，その安全性，軽度の侵襲性を考慮すれば，子宮奇形の診断はもちろん，他の婦人科領域の診断にも腹腔鏡は必要欠くべからざる検査法である．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 87－91, 1989)

はじめに

胎生初期に左右一対のMüller管の発育により子宮，卵管，腟上部2/3が形成される．しかし，この形成機転が何らかの原因で障害されMüller管の癒合が妨げられると，その程度により，種々の子宮や腟の奇形が生じてくる．その子宮奇形の診断には，子宮卵管造影法（HSG）などが用いられるが，近年腹腔鏡により子宮の形態を直接観察することができ，その奇形の程度や治療法の決定に役立っている．今回，腹腔鏡を施行し，子宮奇形の6症例を経験したので，若干の文献的考察を加えて報告する．

症　例

症例1：T.Y.　27歳，主婦

主訴：挙児希望

月経歴：初経12歳，規則的で28日周期，持続4日間，量は中～多量

身長159 cm，体重45 kgで外見は正常女性型で，内診では子宮腟部は双頸であり，子宮体部は鶏卵大，硬．両側附属器には異常を認めず，腟も異常所見を認めなかった．DIPにて右腎は腫大し，左腎は造影されず，レノグラムでは左腎は無機能腎（無形成腎）であった．HSGでは双頸双角であり，卵管の通過性は良好であった（図1）．腹腔鏡所見は，子宮は双角で，くるみ大，各々の角に卵管が一本ずつ付着しており，卵管，卵巣には特に異常を認めなかった（図2）．以上より，双角双頸子宮と診断した．

症例2：T.U.　17歳，高校生

主訴：原発性無月経

身長164.2 cm，体重52.5 kgであり，乳房発育恥毛発育は正常であった．外陰部は大陰唇，小陰唇などの発育は正常で，外尿道口も正常な部位に位置していたが，腟入口部は完全に閉鎖しており（図3），直腸診でも子宮らしい腫瘤を触知するのみであった．基礎体温は二相性で，基礎体温上は排卵が認められた．ホルモン学的検査ではほぼ正常女性範囲内であり，染色体は46 XXと正常女性型であった．DIPで

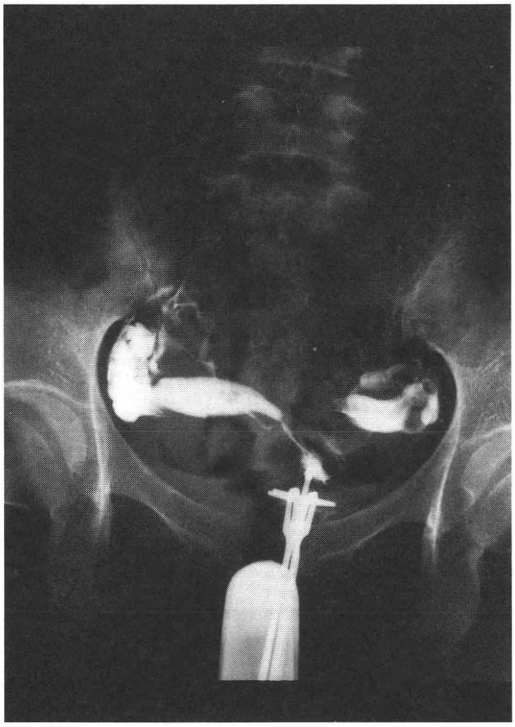


図1　症例1のHSG像

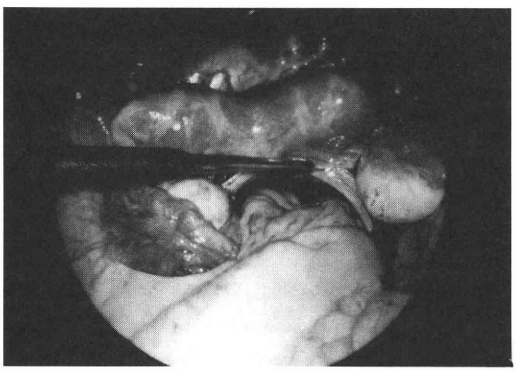


図2　症例1の腹腔鏡所見

は右腎が重複腎盂尿管であった．腹腔鏡では，子宮は痕跡状で角部に相当する位置からは正常な形と大きさの卵管が形成されており，両側卵巣は形，大きさとも正常であった（図4）．以上より，Mayer-Rokitansky-Küster症候群と診断した．

症例3：R.T.　18歳，高校生

主訴：原発性無月経

身長158 cm，体重67 kgで肥満を認めるも全身所見に異常を認めず乳房や陰毛の発育は正常であった．外陰部の発育は正常であったが腟入口部は完全に閉鎖しており（図5），直腸診にても子宮は触知できなかった．ホルモン学的にはほぼ正常女性範囲内であり，基礎体温は二相性で，基礎体温上は排卵が認められた．染色体は46 XXで正常女性型であった．腹腔鏡では子宮は双角で発育は非常に悪く，痕跡であった．両側の卵管はほぼ正常な形態を示し，卵巣は両側とも形，大きさは正常であった（図6）．以上よりMayer-Rokitansky-Küster症候群と診断した．

症例4：S.K.　27歳，主婦

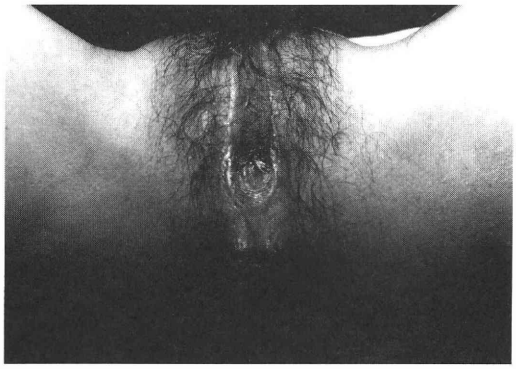


図3　症例2の外陰部

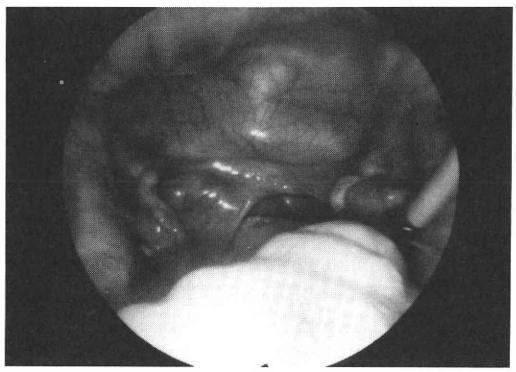


図4　症例2の腹腔鏡所見

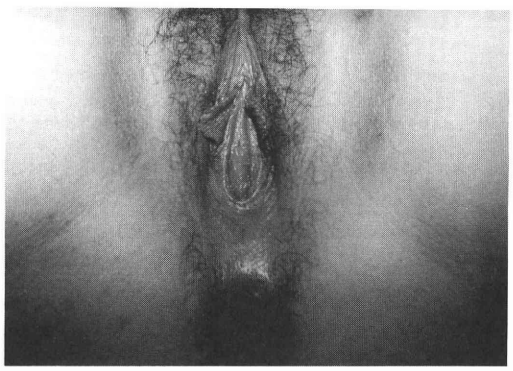


図5　症例3の外陰部

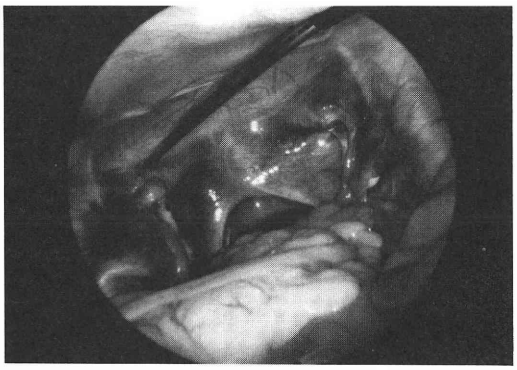


図6　症例3の腹腔鏡所見

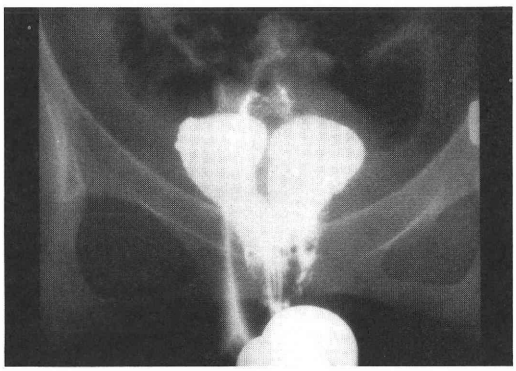


図7　症例4のHSG像

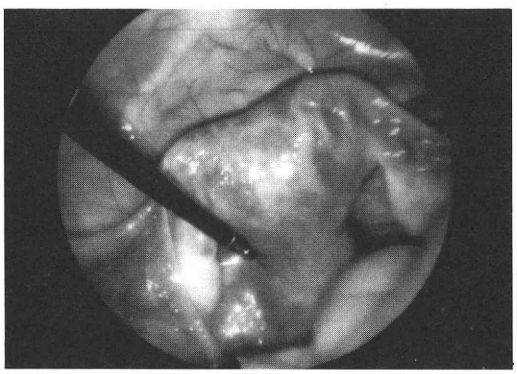


図8　症例4の腹腔鏡所見

主訴：挙児希望

月経歴：初経は14歳で，不規則性で持続5日間。量は少量で時々月経困難症を認めた。

身長161.4 cm，体重46.5 kgで全身所見には特に異常を認めず，外陰部も異常はなかった．内診にて，子宮腟部は双頸で，腟中隔を認め，子宮体部は鶏卵大であり表面不整であった．基礎体温は低温一相性であり，ホルモン検査では血中LH値が比較的高値であり，他は正常女性範囲内であった．HSGでは双

図9　症例5のHSG像

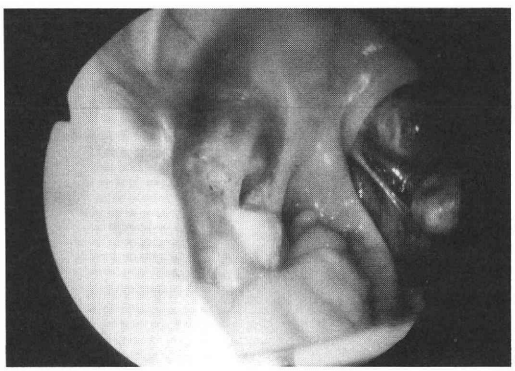


図10　症例5の腹腔鏡所見

頸双角子宮が疑われた(図7)．腹腔鏡では子宮は内子宮口のところで後方に屈曲し，一見一つの子宮に見えたが，子宮底中央部にくぼみがあった．卵巣は左右とも超母指頭大であったが，小さいが多数の嚢胞形成があり，多嚢胞性卵巣様であった．卵管は正常であった(図8)．以上より中隔子宮及び腟中隔と診断した．

症例5：Y.K.　29歳，主婦

主訴：挙児希望

月経歴：初経は11歳で月経周期は不規則で，持続は6日間，量は多い．

身長158 cm，体重57.5 kgで，やや肥満のほかは外見上異常は認めなかった．外陰部，腟は異常を認めず，内診にて子宮頸部は鳩卵大，子宮体部は鶏卵大で附属器には異常を認めなかった．ホルモン検査では正常女性範囲内であった．HSGでは双角単頸子宮が疑われた(図9)．腹腔鏡を施行したところ，子宮は双角で右角は小鶏卵大，左角も小鶏卵大であった．右卵巣は超母指頭大，左卵巣は母指頭大で，左右の子宮角間に後腹膜がおおいかぶさっていた（図10)．以上より単頸双角子宮と診断した．

症例6：T.T.　30歳，主婦

主訴：女性性器の精査目的　挙児希望

月経歴：初経は12歳で，月経周期は30日．持続は4日間，量は中等量

身長158 cm，体重51 kgで，全身所見にとくに異常を認めず，外陰部も異常なかった．内診にて，腟中隔があり，子宮腟部は小指頭大，子宮体部は鶏卵大で表面不整であった．DIPでは右不完全重複尿管がみられた．HSGでは腟が左右2個存在し，左右の腟腔は上部で管状に連っており，子宮は右側の腟とつながっており，両側卵管の通過性は良好であった．左腟側にもう一つ子宮があるかどうかは不明であった(図11)．重複子宮を疑い腹腔鏡を施行したが，大きさ，形とも正常で表面は平滑であった．卵管，卵巣もとくに異常を認めず，腹腔鏡的には特に異常所見はみられなかった(図12)．以上より，この症例は双頸子宮，腟中隔と診断した．

図11　症例6のHSG像

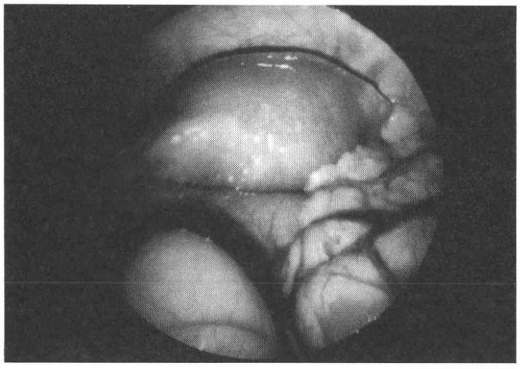


図12　症例6の腹腔鏡所見

考　察

子宮の発生は女性性腺原基の刺激を受けMüller管より形成されるが，左右のMüller管の癒合不全によりいろいろな子宮奇形が生じてくる[1]．子宮奇形の分類については臨床的に困難なものもあるが，一般にはJarchoの分類が用いられることが多い[2]．本症例ではいずれも腹腔鏡により総合的に確定診断を下しているが，最近では腹腔鏡は安全に，侵襲も比較的少なく，入院期間も短かくて済み，効率的なため，婦人科領域において診断，治療に広く用いられるようになっている．アメリカでは，AAGL (American Association of Gynecologic Laparoscopists) の提唱した腹腔鏡の適応が示されている[3,4]．婦人科領域の腹腔鏡の有用性について，Musichら[5]は従来の不妊症ルチーン検査で原因不明とされた機能性不妊の中にも腹腔鏡により不妊原因の見つかる場合があると報告している．また，子宮内膜症では腹腔鏡により腹膜表面を詳細に観察することができ，腹膜表面に散布するblue berry spotの発見が容易となり，治療の効果判定もより有効となり，投薬中止のtimingを把握することができる[4]．他に，子宮外妊娠を疑う症例，原因不明の骨盤内腫瘤，疼痛等の正確な診断に利用されている[6]．当科でも昭和58年7月より腹腔鏡を施行しており[7]，今回，その中で子宮奇形の症例について検討を加えた．症例1，症例5に関してはHSGの所見と腹腔鏡の所見が一致しているが，症例4ではHSGでは双角双頸子宮が疑われ，腹腔鏡により，中隔子宮，腟中隔と最終的に診断されている．症例6に関しても最終的には腹腔鏡により診断が決

定している．症例2，症例3のMayer-Rokitansky-Küster症候群では腹腔鏡により索状の子宮と正常の卵巣・卵管が認められ腟欠損症等の臨床所見と合わせて確定診断がなされた．坂東ら[8]はHSGと腹腔鏡による双角子宮の分類の対比を行っているが，やはりHSGの所見と腹腔鏡の所見が異なる症例があると報告している．本論文の挙児希望症例4例のうち，その後の治療により，症例4，5，6が妊娠，分娩し生児を得た．

以上のことより，腹腔鏡は子宮奇形に関して必要な検査であることはもちろんであるが婦人科領域の他の疾患の診断，治療にも有用であると思われ，その安全性，軽度の侵襲性により，今後婦人科領域の必須検査となりうる可能性があると思われた．

おわりに

侵襲性の少ない腹腔鏡の施行により，子宮の奇形を含めた骨盤内の病変の診断，治療法の選択がより正確に行うことが可能になると考えられた．

文　献

1）Langman, J.：人体発生学, ed 4：p 220　医師薬出版，1983.
2）Jarcho, J.: Malformations of uterus. Am. J. Surg. 71: 106, 1946.
3）Phillips, J. M.: Endoscopy in Gynecology ANAAGL (American Association of Gynecologic Laparoscopists) Book, 2, 1977.
4）Phillips J. M.: Laparoscopy, Williams & Willkins, Co Baltimore, 52, 1977.
5）Musich, J. R. and Behrman, S. J.: Infertility laparoscopy in perspective: Review of five hundred cases. Am. J. Obstet. Gynecol. 143: 293, 1982.
6）対木　章，今泉英明，森良一郎，京野広一，桃野耕太郎，長池文康，斉藤　晃，星　和彦，星合　昊，鈴木雅州：婦人科領域における腹腔鏡検査の意義—当院における腹腔鏡施行症例の検討—産科婦人科，51：63，1984.
7）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.
8）板東　尚，山崎典子，松本　央，田中良憲：子宮卵管造影法による双角子宮像と腹腔鏡による子宮卵管形態の対比—いわゆる双角子宮の総合的分類に対する提案．産婦中四会誌，33：151，1985.

Laparoscopic diagnosis of uterine anomalies

Hiroyuki Yamasaki, Kentaro Takahashi, Akihiro Uchida, Kazuo Yoshino, Masuo Kusakari and Manabu Kitao

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

One case, each of bicornic-monocollic uterus, bicornic-bicollic uterus, utero-vaginal septum, bicollic uterus with vaginal septum, and two of Mayer-Rokitansky-Küster syndrome were diagnosed laparoscopically. In case of utero-vaginal septum, findings of HSG differed from those at laparoscopy. Bicollic uterus with vaginal septum was correctly diagnosed using laparoscopy as were 2 cases of Mayer-Rokitnasky-Küster. Therefore, laparoscopy facilitates the diagnosis of uterine anomalies and useful for detecting other gynecological diseases. The extent of invasion is slight and the procedure is safe.

(受付：1988年3月13日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

腹腔鏡により診断された Fitz-Hugh-Curtis 症候群の1例

A Case of Fitz-Hugh-Curtis Syndrome Diagnosed by Laparoscopy

十和田市立中央病院産婦人科
土岐利彦　陳偉業
Toshihiko TOKI　Wai-Ip CHAN

Section of Obstetrics and Gynecology,
Towada City Hospital

東北大学医学部産婦人科学教室
和田裕一　星合昊
Yuichi WADA　Hiroshi HOSHIAI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tohoku University School of Medicine

症例は21歳の未婚女性で，下腹痛・不正性器出血の他に右上腹部の激痛があり，EIA法で子宮頸管にクラミジア陽性であった．腹腔鏡検査で，肝右葉前面被膜の一部に限局性の炎症所見を認め，また，子宮体部漿膜面と両側卵管にも広汎な炎症像が認められた．本症例は，*Chlamydia trachomatis* 感染による骨盤腹膜炎と肝周囲炎の合併で，いわゆるFitz-Hugh-Curtis症候群の1例と考えられる．
(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 92－95, 1989)

はじめに

Chlamydia trachomatis（以下CT）による尿路性器感染症は，最近新たなsexually transmitted diseases (STD) の1つとして，欧米だけでなく，本邦でも注目を集めている．特に産婦人科領域のCT感染は，母児垂直感染や不妊症の原因として，重大な問題となってきている．最近我々は，CT感染により骨盤腹膜炎と肝周囲炎の合併した，いわゆるFitz-Hugh-Curtis症候群の1例を，腹腔鏡によって診断したので報告する．

症　例

I. N.　21歳，未婚女性，0妊0産．
家族歴・既往歴；特記すべきことなし．
月経歴；初経11歳，30日型，整．最終月経は，昭和62年9月13日より7日間．

主訴；下腹痛，不正性器出血，右上腹部痛．

現病歴；昭和62年9月27日に下腹痛と少量の不正性器出血があり，近くの産婦人科医を受診，クラミジア感染症と診断され治療を受けた．その後症状はやや軽快したが，10月10日朝，突然右上腹部の激痛が出現し，当院救急部を受診，急性腹症として当院第1内科に入院した．入院時，右上腹部の著明な圧痛と筋性防御を認め，白血球数は15100，赤沈1時間値43と炎症所見もあり，急性胆のう炎として抗生物質（CMX 2g/日）を開始した．発熱はなかった．10月11日の上腹部超音波検査では，肝・胆道系・膵に異常を認めず，血液生化学検査では，肝・腎機能はすべて正常であった．右上腹部痛は次第に軽減したが，クラミジア感染の疑いがあるということで，10月12日当科に紹介された．

内診上，子宮および両側附属器に軽度の圧痛を認めたのみで，その他には特に異常を認めず，帯下もほぼ正常であった．超音波検査でも，骨盤内には特に異常所見を認めなかった．しかし，EIA法のクラミジアザイムで子宮頸管にクラミジア陽性であり，血中抗クラミジア(CT)抗体価も，IgG 1280倍(IgM 10倍以下)と高値であった．淋菌培養は陰性，また，白血球数10700，CRP 1＋であった．

以上より，骨盤腹膜炎に伴う肝周囲炎，いわゆるFitz-Hugh-Curtis症候群を疑い，腹腔鏡検査を施行するため，10月15日に当科に転科となった．10月16日GOEによる全身麻酔下，型の如く腹腔鏡検査を行なった．上腹部では，肝左葉と胆のうには異常なし．肝右葉下縁の右よりに大網の癒着があり，癒着部は充血像を呈していた．さらに肝右葉前面の尾側よりに，長径4−5 cmの不整形の病巣を認めた．この病巣は全体的に赤色調のうっ血像を呈し，周囲は白色の瘢痕状で，健常部との境界は比較的明瞭であった．表面は不整で，軽い隆起を認めたが，クレーターのような陥凹所見はなかった．主病巣以外にも，1 cm程度の小さな病巣が周囲に数ケ認められ，所見はほぼ同様であった(写真1，2)．以上のような病変は，肝被膜の限局性炎症によるものと思われた．肝病変部の生検，クラミジア分離は残念ながら行なわなかった．この肝病変部に相対する壁側腹膜には，軽い充血像が認められたが，いわゆるviolin-string状の線維性癒着は見られなかった．

次に骨盤内の所見としては，ダグラス窩に中等量の血性腹水が存在していた．子宮体部漿膜面には，炎症による広汎なうっ血，浮腫が認められ，右卵管角付近に大網の癒着を認めた．両側の卵管は軽度に腫大していたが，急性炎症による浮腫と思われた(写真3)．色素通過試験では，両側卵管とも通過していた．卵巣は両側とも異常を認めず，子宮内膜症の所見もなかった．さらに，骨盤内と肝右葉の間の上行結腸漿膜面や，右側の壁側腹膜を詳細に観察したが，炎症所見は全く認められなかった．なお，ダグラス窩の腹水培養では，好気性菌・嫌気性菌ともに陰性で，クラミジアザイムではクラミジア陰性であった．腹水細胞診でも，炎症細胞と中皮細胞のみで，異常

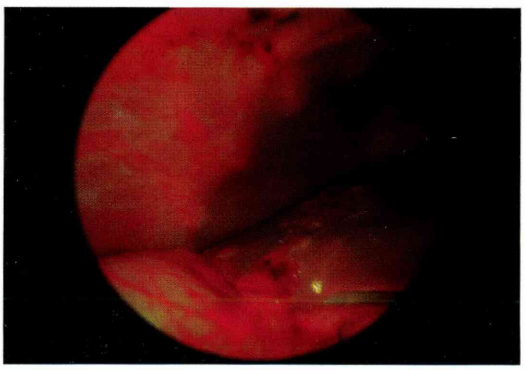


写真1　右上腹部の腹腔鏡所見．肝右葉前面に炎症性病変を認め，肝下縁に大網の癒着を認める．壁側腹膜にも充血像が見られる．

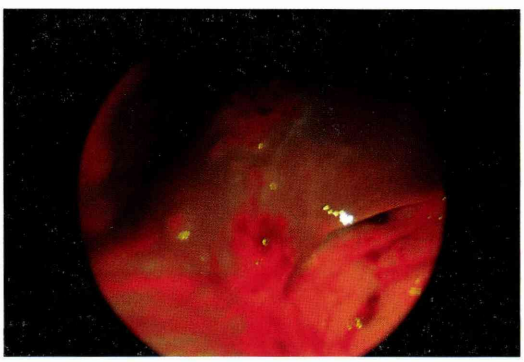


写真2　肝病変と大網の癒着部．

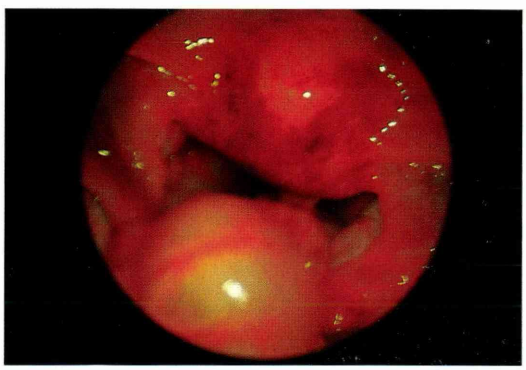


写真3　骨盤内臓器の腹腔鏡所見．子宮および両側卵管には広汎なうっ血・浮腫を認める．ダグラス窩に血性腹水の貯留が見られる．

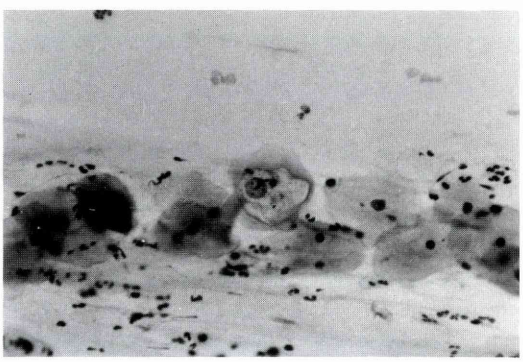


写真4　子宮膣部細胞診で見られた，HPV感染によるkoilocytotic atypia．(パパニコロ染色×300)

な細胞は見られなかった．

術後より，オフロキサシン1日300 mgを2週間投与した．右上腹部痛と下腹痛は，ともに投与後数日で消失した．同時に，sexual partnerにもオフロキサシン1日300 mgを2週間服用させた．なお，腹腔鏡施行前の子宮膣部細胞診では，クラミジアに特徴的な封入体は見られなかったが，写真4に示したような，koilocytotic atypiaが認められた．

10月20日に退院となり，以後外来で経過観察したが，症状は全く消失しており，10月30日にはEIA法でクラミジアも陰性化していた．その後も症状の再発は見られていない．

考　察

Fitz-Hugh-Curtis症候群（以下FHCS）は，Curtis[1]およびFitz-Hugh[2]により報告された，泌尿生殖器感染症に伴う肝周囲炎（perihepatitis）である．当初は淋菌感染によるものと考えられていたが，近年はクラミジア感染のほうが重要視されるようになってきた[3]．PID（pelvic inflammatory disease）の症状の他に，突然起こる右上腹部痛が特徴的で，体動時や呼吸時に疼痛が増強し，急性胆のう炎や胆管炎の症状に類似すると言われている[4]．FHCSの確定診断は，腹腔鏡による肝表面と骨盤内臓器の観察である．急性期には，肝表面の点状出血や線維性分泌物，および卵管の浮腫・充血が認められ，慢性期には，骨盤内バンド状の癒着や，肝表面と周辺臓器との線維性癒着，いわゆるviolin-string状の癒着が観察されると言われている[1,5]．肝被膜の炎症部位から直接CTを分離することは，理想的ではあるが，臨床的には容易ではない．今回の症例は，比較的急性期のものと考えられ，肝表面の限局した炎症像のみで，特徴的とされている，violin-string状の癒着[1]は認められなかったが，大網の癒着が認められた．文献で言う“perihepatitis”とは，かなりあいまいな表現であるが，本症例について言えば，この本態はliver capsule局所の限局した炎症であろうと思われる．

クラミジア感染は，今やPIDや卵管炎の最も主要な起因菌の1つと言われているが[6]，FHCSの場合に，骨盤内の炎症が肝被膜にまで波及する経路としては，
①右paracolic space経由の経腹膜行性，
②後腹膜リンパ行性，
③血行性
の3つが考えられている[5]．

今回の症例に関しては，腹腔鏡で右側の壁側腹膜と上行結腸漿膜面，周辺腹膜を詳細に観察したが，明らかな炎症所見は認められなかった訳であるが，肝被膜への感染経路に関しては，今後の検討が必要と思われる．

本邦でも，FHCSと考えられる症例が報告されているが[7,8]，腹腔鏡で肝表面と骨盤内を観察し，肝病変と骨盤腹膜炎を同時に確認した症例はほとんど見られない．しかし，すでに菅生らが指摘しているように[8]，このような症例は，的確に診断すれば比較的多数例存在しているものと思われる．今後，クラミジア感染の症例では肝病変にも注意する必要があり，また逆に，若年女性が胆のう炎様の症状を呈する場合には，FHCSの可能性があることも考慮に入れるべきであると考える．

本症例のような若年未婚女性のクラミジア感染症は，最近かなり問題になっているが，潜在しているものも多いと思われる．今後，CTによる卵管炎，ひいては卵管通過障害が，不妊症の原因の1つとして重大な問題になることが予測される．本症例に関しても，以上のような点に充分注意して，経過観察をしていくつもりである．

(肝臓の腹腔鏡所見について御教示をいただいた，東北大学医学部第三内科講師　大槻昌夫先生に深謝いたします．)

文　献

1) Curtis, A. H.: A cause of adhesions in the right upper quadrant. J. A. M. A., 94: 1221, 1930.
2) Fitz-Hugh, T.: Acute gonococcic peritonitis of the right upper quadrant in women. J. A. M. A., 102: 2094, 1934.
3) Wang, S-P., Eschenbach, D. A., Holmes, K. K., Wager, G. and Grayston, J. T.: Chlamydia trachomatis infection in Fitz-Hugh-Curtis syndrome. Am. J. Obstet. Gynecol., 138: 1034, 1980.
4) Wood, J. J., Bolton, J. P., Cannon, S. R., Allan, A., O'Connor, B. H. and Darougar, S.: Biliary-type pain as a manifestation of genital tract infection: the Curtis-Fitz-Hugh syndrome. Br. J. Surg., 69: 251, 1982.
5) Keane, J. A. N., McKimm, R. J. and David, C. M.: Perihepatitis associated with pelvic infection: the Fitz-Hugh-Curtis syndrome. N. Z. Med. J., 95: 725, 1982.
6) Mårdh, P-A., Ripa, T., Svensson, L. and Weström, L.: Chlamydia trachomatis infection in patients with acute salpingitis. N. Engl. J. Med., 296: 1377, 1977.
7) 山下幸孝，梶村幸三，梶山　徹，玉田　尚，西尾彰功，山本富一，洲崎　剛，兼松雄象：Chlamydia trachomatis感染による肝周囲炎（Fitz-Hugh-Curtis症候群）と考えられた3例，日消誌，83：

2612, 1986.
8) 菅生元康, 南澤　豊,郭　宗明, 藤原敏博, 小泉佳男：右上腹部痛をともなったChlamydia trachomatis頸管炎, 日産婦誌, 39：1675, 1987.

A case of Fitz-Hugh-Curtis syndrome diagnosed by laparoscopy

Toshihiko Toki and Wai-Ip Chan

Section of Obstetrics and Gynecology,
Towada City Hospital, Aomori 034, Japan

Yuichi Wada and Hiroshi Hoshiai

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tohoku University School of Medicine,
Miyagi 980, Japan

The case was a 21-year-old woman, who had violent pain at the right upper quadrant in addition to lower abdominal pain and atypical genital bleeding. She was Chlamydia-positive in uterine cervical canal according to enzyme immuoassay (EIA) method. Laparoscopy revealed a localized inflammatory change on the capsule of anterior wall of liver, and diffuse inflammation was also observed on the serosal surface of the uterine body and both the fallopian tubes. This case, which presented a complication of perihepatitis and pelvic inflammatory disease due to Chlamydia trachomatis infection, was regarded as a case of Fitz-Hugh-Curtis syndrome.

(受付：1988年4月4日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

当教室における不妊クリニック患者の推移

The Shifts and Changes of Infertile Patients in Our Clinic

横浜市立大学医学部産婦人科教室（主任：水口弘司教授）

川口とし子 Toshiko KAWAGUCHI
鈴木猛 Takeshi SUZUKI
飛鳥井邦雄 Kunio ASUKAI
白須和裕 Kazuhiro SHIRASU
鈴木敏旦 Toshiasa SUZUKI
河合康夫 Yasuo KAWAI
多賀理吉 Michiyoshi TAGA
植村次雄 Tsuguo UEMURA
水口弘司 Hiroshi MINAGUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology
Yokohama City University, School of Medicine
(Director: Prof. Hiroshi Minaguchi)

今回，昭和55年6月より昭和60年5月に至る5年間の不妊外来統計（60年度群）を行ない過去に発表した5年ごとの統計（50年度群，55年度群）と比較し，不妊外来の推移について検討し，次の結果を得た．

(1)原発不妊の割合は67.7％で，50，55年度群と比べて差はみられなかった．

(2)原発不妊症例において，結婚年齢の高齢化が認められた．

(3)不妊原因別症例数の推移では，卵巣因子の増加を認めたが，機能性不妊は，3群とも差が認められなかった．

(4)不妊期間が短いほど妊娠率は高いが，4～8年と不妊期間が比較的長い症例でも妊娠率の上昇が認められた．

(5)卵巣性不妊の治療では，新しく導入されたbromocriptine療法の妊娠率が46.2％と高く卵巣性不妊症例の妊娠率上昇に大きく寄与した．

(6)全体の妊娠率の推移は，26.4％，29.5％，37.6％と上昇し，不妊症治療の進歩がうかがわれた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 96－100, 1989)

はじめに

昭和55年6月から昭和60年5月までの5年間に当科不妊外来を受診した不妊期間1年以上の新患患者を60年度群として，既に報告した50年度群（昭和44年1月から昭和50年5月までの受診患者）[5]，55年度群（昭和50年6月から昭和55年度5月までの受診患者）[6]，と比較検討し，その推移において幾つかの結果を得たので報告する．また，不妊原因の第1位を占め，その治療効果の向上が注目される卵巣性不妊に関しては，60年度群における治療方法と妊娠率についての検討も試みた．

成　績

(1)不妊外来患者数と妊娠率（表1）

60年度群の患者総数は662名であり，そのうち原発不妊は448名（67.7％），続発不妊は214名（32.3％）であった．その妊娠率をみると60年度群全体で37.6％，原発不妊で36.2％，続発不妊で40.7％であった．50，55，60年度群での推移をみると，原発不妊，続発不妊が全体に占める割合は，55年度群で他の2群に比べて続発不妊が少なくなっているが，

表1　不妊外来患者数と妊娠率

	不妊外来患者数	妊娠例数（妊娠率%）
50年度群	895	236(26.4)
原発不妊	594(66.4%)	147(24.7)
続発不妊	301(33.6%)	89(29.6)
55年度群	775	229(29.5)
原発不妊	567(73.2%)	166(29.3)
続発不妊	208(26.8%)	63(30.3)
60年度群	662	249(37.6)
原発不妊	448(67.7%)	162(36.2)
続発不妊	214(32.3%)	87(40.7)

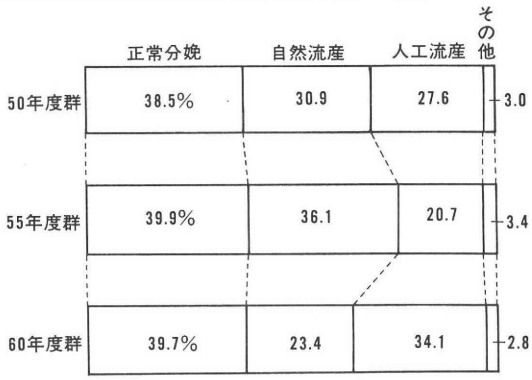


図1　続発不妊の最終妊娠

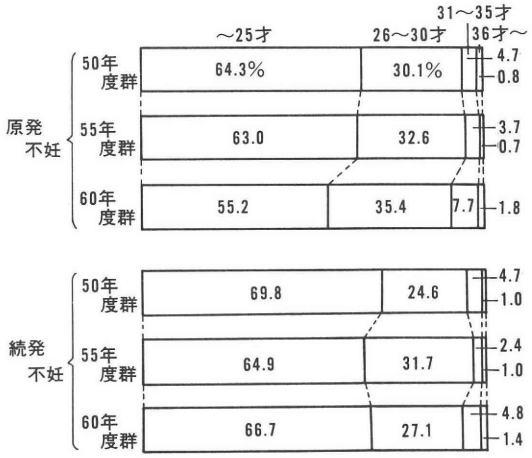


図2　結　婚　年　齢

おおむね原発不妊が続発不妊の約2倍であった．妊娠率については，50，55，60年度群各群の妊娠率は全体で26.4％，29.5％，37.6％，同様に原発不妊で24.7％，29.3％，36.2％，続発不妊で29.6％，30.3％，40.7％であり，妊娠率の上昇が認められた．

(2)続発不妊の最終妊娠（図1）

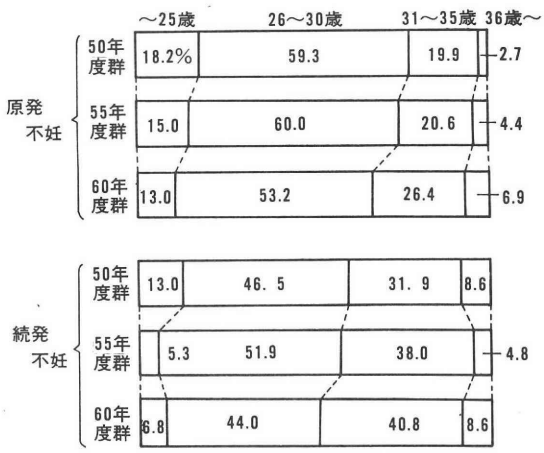


図3　初　診　年　齢

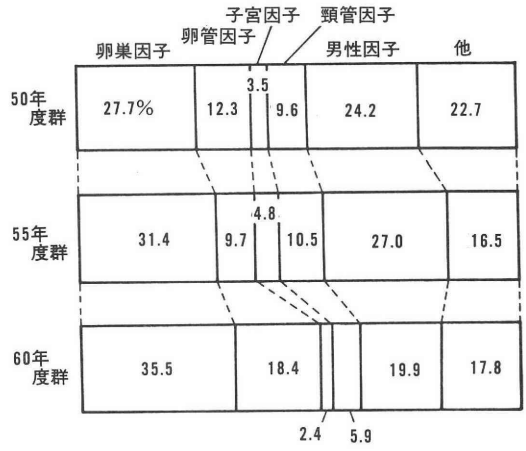


図4　不　妊　原　因

50，55，60年度群で，正常分娩の割合に差はなく約40％を占め，自然流産と人工流産の和は約60％を占めた．

(3)結婚年齢（図2）

原発不妊については，他の2群に比べ60年度群では，25歳以下で結婚した患者の割合が減少し(50年度群64.3％，55年度群63.0％，60年度群55.2％)，不妊症患者の結婚年令が高くなる傾向が認められた．しかし，続発不妊では特徴ある変化は認められなかった．

(4)初診年齢（図3）

原発不妊については，31歳以上で初診した患者の割合は，50，55，60年度群で，22.6％，25.0％，33.3％と増加し，初診年齢についても高齢化が認められた．続発不妊でも同様の傾向が認められた．

(5)不妊原因（図4）

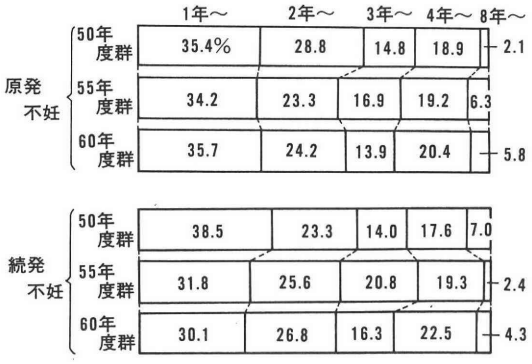


図5　不　妊　期　間

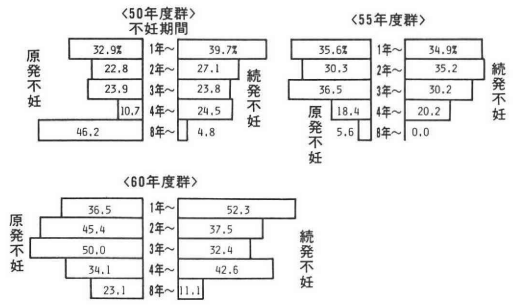


図6　不妊期間別妊娠率

どの群も，卵巣因子，男性因子，卵管因子，頸管因子，子宮因子の順に多く，その順位に変化はなかった．60年度群では，他の2群に比べて卵管因子が増加，男性因子が減少していた．3群を通して，卵巣因子は漸増傾向にあった．機能性不妊の割合は，特に変化を認めなかった．

(6)不妊期間（図5）

3群を通して，原発不妊，続発不妊とも特徴ある変化は認められなかった。

(7)不妊期間別妊娠率（図6）

不妊期間別に分類した患者の妊娠率をみると，60年度群では他の2群に比べ，どの不妊期間においても妊娠率が上昇している．8年以上の不妊期間をもつ症例については，どの群も症例数が少ないため特徴ある変化は認められなかったが，不妊期間が4～8年である症例をみると，その妊娠率は，原発不妊で50年度群10.7%，55年度群18.4%，60年度群34.1%と上昇，続発不妊でも50年度群24.5%，55年度群20.2%，60年度群42.6%と上昇した．これらよ

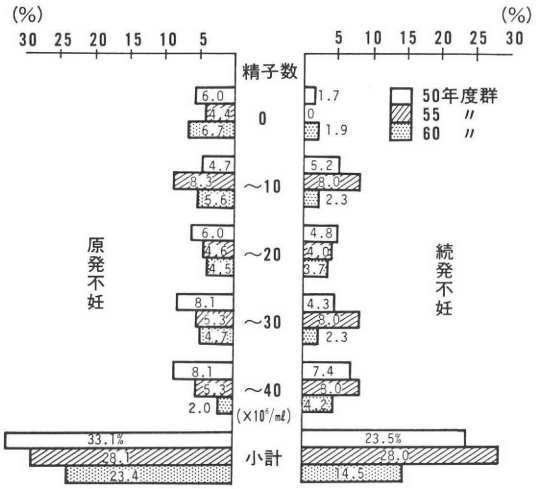


図7　男性不妊症例の精子数別分布

卵巣性不妊症例の原因と治療、及び妊娠率（妊娠症例数／総数）

治療／原因	クロミフェン単独	クロミフェン＋HCG	クロミフェン＋DA agonist	クロミフェン＋プレドニゾロン	DA agonist	HMG＋HCG	芍薬甘草湯	カウフマン療法	LH・RH	HCG	他	妊娠率
黄体機能不全	9/27	7/13	2/5	−	14/28	0/2	−	−	−	13/16	1/29	41/110(37.3%)
散発性無排卵	9/24	3/6	1/4	−	1/5	−	1/2	0/1	1/2	−	4/13	19/54 (35.2%)
持続性無排卵	3/5	1/2	2/6	1/2	1/4	1/1	2/3	−	0/1	−	2/2	10/21(47.6%)
1度無月経	3/12	1/5	2/6	−	5/9	1/3	0/1	−	−	−	0/4	10/31 (32.3%)
2度無月経	2/8	0/3	1/1	−	3/6	1/4	−	0/3	0/1	−	0/1	6/19 (31.6%)
	26/80 (32.5%)	12/29 (41.4%)	8/22 (36.4%)	1/2 (50%)	24/52 (46.2%)	3/10 (30%)	3/6 (50%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	13/16 (81.3%)	7/49 (14.3%)	86/235(36.6%)

り，比較的長い不妊期間をもつ症例でも，妊娠率が上昇しつつあることが示された．

⑻男性不妊症例の精子数別分布（図7）

当科では，精子数 40×10^6/ml 以下の症例を乏精子症として扱っている．60年度群では，男性不妊症例の占める割合は，原発不妊で23.4％，続発不妊で14.5％，全体で19.9％であった．高度の乏精子症，特に精子数 10×10^6/ml 以下である症例は原発不妊では全体の12.3％，続発不妊では全体の4.2％であり，高度の乏精子症は続発不妊が少なく，原発不妊が多いことが示された．しかし，それ以外，特に特徴ある傾向は認められなかった．

⑼卵巣性不妊症例の原因と治療および妊娠率（表2）

60年度群における卵巣性不妊症例について，不妊原因とその治療方法およびその妊娠率について考察を試みた．原因による内訳は，黄体機能不全110例，排卵障害125例，（うち散発性無排卵54例），持続性無排卵21例，1度無月経31例，2度無月経19例）であった．各々を治療方法別に分類し，妊娠症例／総数の如き分数で示した．なお妊娠成功例は妊娠に直接寄与したと思われる治療法をもって分類したが，妊娠不成功例は主たる治療法をもって分類した。60年度群の卵巣性不妊症例に対し，最も多い治療方法は，クロミフェン単独投与であり，(80例)，クロミフェンとHCG，DA agonist，プレドニン等との併用療法もあわせると133例となり，全体(235例)の56.6％を占めた．次に多いのがDA agonist療法で52例，クロミフェンとの併用も22例あった．妊娠率をみると，黄体機能不全37.3％散発性無排卵35.2％，持続性無排卵47.6％，1度無月経32.3％，2度無月経31.6％であり，全体で36.6％の成績であった．治療法別妊娠率をみると，HCG療法81.3％であり，黄体機能不全に対しHCGが効果的であった．クロミフェン＋プレドニン併用療法，芍薬甘草湯療法は50％の妊娠率を示したが，症例数が少ないので，あまりはっきりとしたことが言えない．DA agonist療法は46.2％と高い妊娠率を得た．クロミフェン単独療法の妊娠率は32.5％であるが，これにHCGを併用すると41.4％，DA agonistを併用すると36.4％，プレドニン併用で(症例数は少ないのであるが)50％と，併用療法で効果が上がることが示された．しかし，DA agonist単独療法で妊娠率46.2％であるのに比べ，クロミフェンとの併用で36.4％と低下している．これは，DA agonist単独療法で妊娠に成功しなかった症例にクロミフェンを併用したことによると思われる．この他，HMG-HCG療法では30％，カウフマン療法では0％，LH-RH療法では25％の妊娠率であった．

考　察

原発不妊の割合は60年度群で67.7％で，50年度群55年度群に比較して大きな変化はみられなかった．諸家の報告をみても，寺田[1]は68.4％，高橋[2]は約60％と，続発不妊より原発不妊が多いと報告している．続発不妊症例において，その最終妊娠が人工流産であるものの割合が増加していることは注目に値する．結婚年齢については，原発不妊において高齢化の傾向がみられたが，これは日本人全体での結婚年齢の高齢化がみられること[3]，更に対照群に比して原発不妊患者では結婚年齢が高いこと[4]を反映している．不妊原因の分類については報告者により統一をみていないが，われわれは過去の報告[5,6]に従い，6群に分類した．前述の如くその順位は過去の報告と変化をみないが，1位の卵巣因子の着実な増加が認められる．“その他”とは，いわゆる機能性不妊であり，婦人科学の進歩につれて減少することが予想されるが，今回の結果ではあまり変化が認められなかった．今回の報告では不妊期間が1年以上の症例を扱っているが，不妊期間別の妊娠率は原発不妊，続発不妊とも不妊期間が短いほど妊娠率が高かった．また全体では，ほぼすべての妊娠期間において妊娠率の上昇がみられたが，これは50年度群と比較した時の55年度群についても同様の傾向がみられ，進歩する医学を物語っていると考えられる．

男性不妊に関しては過去の報告と同様の結果であったが，続発不妊の場合でも乏精子症（40×10^6/ml以下）が認められ，精液検査が全例になされるべき必要性が示唆される．

不妊原因の1位を示す卵巣因子においても妊娠率の大幅な上昇が認められた．われわれの過去の報告[5,6]と比較して，今回の妊娠率の上昇の最大要因はdopamine agonistであるbromocriptineの登場であろう．実際妊娠例中bromocriptineが関係している例は32例に及び，その半数は黄体機能不全患者である．当教室においても排卵期や黄体後期にprolactinが上昇するいわゆるtransient hyperprolactinemiaやTRHに過剰反応を示す黄体機能不全患者にbeomocriptineが有効であることを証明している[7,8]．以上の如く，卵巣性不妊の治療は時の流れとともに変化し，50年度群は，clomiphene療法が主であったのに対し，55年度群ではHMG-HCG療法が，更に60年度群ではbromocriptineの登場が治療成績の向上に大きな役割を果たしたといえる．

（本論文の要旨は，1986年11月，第31回日本不妊学

会（仙台）にて発表した。）

文　献

1）寺田夏樹，前川岩夫，内藤正文，小堀恒雄，高見沢裕吉：最近の当教室における不妊外来統計，日本不妊学会雑誌，28：69，1983
2）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：島根医大付属病院婦人科不妊外来における長期不妊の臨床的統計，日不妊誌32：149，1987
3）厚生統計協会：厚生の指標，34（9）：73，1987
4）植村次雄，鴻崎次夫，塩島令儀，鈴木直行，吉川絹子：不妊患者の結婚年齢，既住妊娠に関する統計学的考察，日不妊誌18：188，1973
5）三上正憲，植村次雄，鈴木直行，高口三郎，塩島令儀：当教室における不妊クリニック統計，日不妊誌22：202，1977
6）松山明美，白須和裕，大森治郎，鈴木直行，植村次雄：当教室における不妊クリニック患者の推移，日不妊誌26：313，1981.
7）植村次雄，飛鳥井邦雄，水口弘司：prolactin（PRL）と黄体機能，産と婦，53：1215，1986.
8）飛鳥井邦雄，植村次雄，水口弘司：TRHで過剰反応を示した症例の検討，日不妊誌，31：246，1986

The shifts and changes of infertile patients in our clinic

Toshiko Kawaguchi, Takeshi Suzuki, Kunio Asukai, Kazuhiro Shirasu, Toshiasa Suzuki, Yasuo Kawai, Michiyoshi Taga, Tsuguo Uemura and Hiroshi Minaguchi

Department of Obstetrics and Gynecology
Yokohama City University, School of Medicine,
Kanagawa 232, Japan
(Director; Prof. Hiroshi Minaguchi)

The infertile patients treated for the latter 5 years (June 1980-May 1985) in our clinic were analyzed and compared with two groups analyzed previously, group l; the infertile patients treated from January 1965 to May 1975, group 2; those treated from June 1975 to May 1980.

①The rate of primary sterility was 67.3%, that was similar to that of the former two groups.
②The marriage-age of the primary sterility patients was tend to be older.
③On the cases of sterility, the ovarian factor was the highest incidence and increased recently.
④The pregnancy rate was high in the cases with short infertile periods.
⑤The Bromocriptine therapy contributed to the rise of pregnancy rate in the cases with ovarian disturbance.
⑥The total pregnancy rate was 37.6% that was higher than the former groups (group 1: 26.4%, group 2: 29.5%).

（受付：1988年2月16日）

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

精子機能テストとしての hypoosmotic swelling test と一般精液検査との関連性について

Correlation Between Data on the Routine Semen Analysis and the Hypoosmotic Swelling Test

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　草刈万寿夫
Kazuo YOSHINO　Kentaro TAKAHASHI　Masuo KUSAKARI
内田昭弘　白井孝昭　西垣　新
Akihiro UCHIDA　Takaaki SHIRAI　Arata NISHIGAKI
山崎裕行　北尾　学
Hiroyuki YAMASAKI　Manabu KITAO

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

Hypoosmotic swelling test と一般精液検査との関連性をみるために，hypoosmotic swelling test は精子尾部が膨化している b～g type と精子尾部全体が膨化している g type の割合をそれぞれ算出し，一般精液検査としての総精子濃度，精子運動率および運動精子濃度と比較検討し，以下の結果を得た．正常精液群と異常精液群の総精子膨化率では正常精液群が有意な高値を示し，正常精子濃度の総精子膨化率及び g type 精子膨化率は異常精子濃度に比べて有意な高値を示した．また，精子運動率および運動精子濃度と総精子膨化率，総精子濃度および運動精子濃度と g type の精子膨化率との間には弱い正の相関関係が認められた．以上より，hypoosmotic swelling test は一般精液検査と相関があり，精子機能テストとして検査方法も容易であり，有用な精液検査であると推定できる．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 101－106, 1989)

緒　言

精液所見が正常であるにもかかわらず男性不妊であるケースは臨床的には時に経験するものである．しかし，逆に乏精子症でも妊娠することがあり，一般精液検査のみでヒト精子の受精能力を判定するには疑問がある．そこでヒト精子の受精能力を確認するには in vivo あるいは in vitro で，ヒト卵子とヒト精子が受精するかどうかを検査するのが最も確実である．しかし，ヒト卵子は採取の困難性に加え，不妊外来の検査法として実施するには倫理的にも問題がある．そこで，ヒト卵子に代わる動物卵子が利用出来れば検査法として成り立つのであるが，幸いに 1976 年，Yanagimachi ら[1]は，ヒト精子が透明帯除去ハムスター卵に侵入可能であることを発見し，ヒト精子の受精能力検査として利用されている．当科でもこのハムスターテストを施行しているが[2]，その技術は煩雑であり，一般臨床ではより容易な検査

法が必要である.その検査法の一つにJeyendranら[3]の開発したhypoosmotic swelling testがあり,これはヒト精子に低浸透圧負荷を加え,精子の尾部に認められる著明な膨化程度を形態学的に観察し,尾部細胞膜の機能をもとにして,ヒト精子の受精能を判定しようとするものである.今回,われわれはhypoosmotic swelling testと一般精液検査を比較検討し,若干の知見を得たので,文献的考察を加えて報告する.

研究対象及び方法

1）研究対象：当科不妊・内分泌外来を受診した異常精液所見の不妊男性患者18名を対象とし,正常精液所見である健康男子6名を対照として比較検討した.

2）精液の準備：精液検査条件は5日間以上禁欲の後,用手法にて精液を採取し,室温で約30分間液化させた後,精子数を算定し,60×10^6/ml以上の精子濃度で,精液量2ml以上,精子運動率60％以上,精子奇形率15％以下のものを正常精液とした.

3）hypoosmotic swelling testの方法：図1に示すように,150mOsmolの低浸透圧となる溶液を作成し,30～60分間,37℃,5％CO_2下でインキュベートした後,倒立位相差顕微鏡（×400）で検鏡した.

4）hypoosmotic swelling testの判定：100以上の精子を算定し,図2に示すように,a～gまでの7種類のtypeに分類した.a typeは変化がなく,b～g typeは精子尾部が膨化していると判定し,その割合を算出した.また,g typeのように精子尾部全体が大きく膨化している精子は尾部細胞膜が無傷であり,精子機能は良好であると推定されるので,このg typeの膨化精子の割合も算出した.

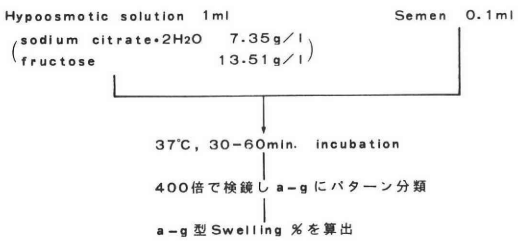


図1　Hypoosmotic swelling test

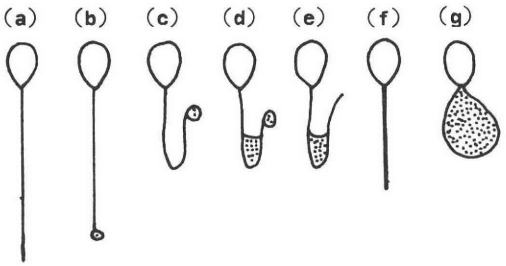


図2　Swollen spermの分類

研究結果

1）正常精液群と異常精液群とのhypoosmotic swelling testの比較

hypoosmotic swelling testの精液所見による比較を表1に示す.正常精液群(精子濃度60×10^6/ml以上で精子運動率60％以上)の総精子膨化率は67.3±12.5％であり,異常精液群(精子濃度60×10^6/ml以下または精子運動率60％以下）の48.6±12.2％に比べて有意に高値であった($P<0.05$).またg typeの精子膨化率は統計学には有意差は認められなかったが正常精液群が異常精液群に比べて高い傾向にあった.

2）精子濃度とhypoosmotic swelling test

精子濃度のみで比較すると表2に示すように,正常精子濃度（60×10^6/ml以上）の総精子膨化率(61.9±11.0％)およびg typeの精子膨化率(22.8±9.0％)は異常精子濃度に比べて有意な高値を示した($P<0.05$).しかし,精子濃度とhypoosmotic swelling testの精子膨化率との間には有意な相関関係は認められなかった（図3）.

Table 1.　Hypoosmotic swelling test and semen analysis

Sample group	Percentage of total swollen sperm		Percentage of swollen sperm (g type)	
	Mean±S.D.	Range	Mean±S.D.	Range
Normal sperm	67.3±12.5*	52.2－90.9	23.1±10.7	4.4－35.5
Abnormal sperm	48.6±12.2*	23.1－66.0	16.4± 8.4	4.0－29.0

Normal sperm : total sperm concentration≧60×10^6/ml and motility≧60%

＊$P<0.01$

Table 2. Hypoosmotic swelling test and semen analysis (total sperm concentration)

Sample group	Percentage of total swollen sperm		Percentage of swollen sperm (g type)	
	Mean±S.D.	Range	Mean±S.D.	Range
Normospermic	61.9±11.0*	48.6−90,9	22.8±9.0**	4.4−35.5
Oligozoospermic	44,7±12.9*	23.1−63.3	13.4±7.3**	4.0−26.0

Normospermic : total sperm concentration≧60×10^6/ml
*P<0.01　　**P<0.05

Table 3. Hypoosmotic swelling test and semen analysis (motility)

Sample group	Percentage of total swollen sperm		Percentage of swollen sperm (g type)	
	Mean±S.D.	Range	Mean±S.D.	Range
High motility	60.5±14.2	42.5−90.9	19.8±10.0	4.4−35.5
Low motility	49.0±13.3	23.1−66.0	17.0± 9.0	4.0−29.0

High motility : motility≧60%

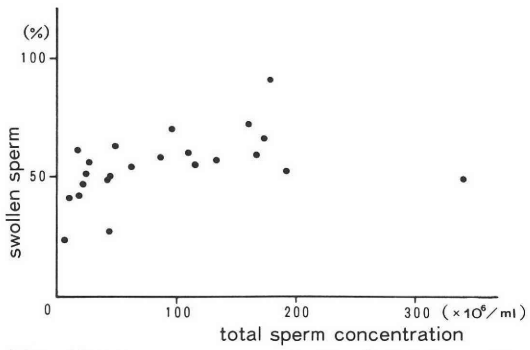


図3　Total sperm concentration と total swollen sperm との関係

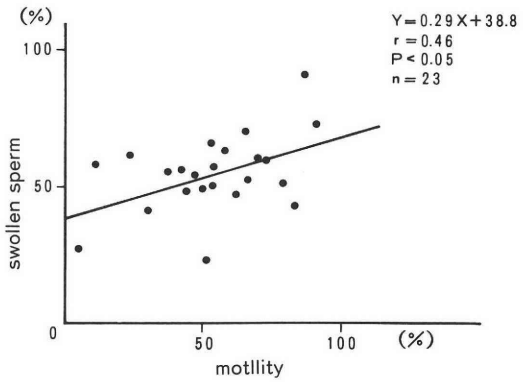


図4　Motility と total swollen sperm との関係

3）精子運動率と hypoosmotic swelling test

精子運動率のみで比較すると，正常精子運動率(60%以上)の方が総精子膨化率および g type 精子膨化率ともに異常精子運動率（60%未満）に比べて高値を示したが，両者ともに有意差は認められなかった(表3)．しかし，図4に示すように精子運動率と hypoosmotic swelling test の総精子膨化率との間には，相関係数 r =0.46 で有意な正の相関関係が認められた(P<0.05)．同様に，運動精子濃度との関係をみると(図5)，運動精子濃度と hypoosmotic swelling test の総精子膨化率との間には相関係数 r =0.56 で有意な正の相関関係が認められた（P<0.01)．

4）妊孕係数と hypoosmotic swelling test

飯塚ら[4]の提唱する妊孕係数(運動精子濃度×10^6)で正常精液所見の最低条件（精子濃度 60×10^6/ml×精子運動率 60（%）×10^6=36）で正常，異常に分け

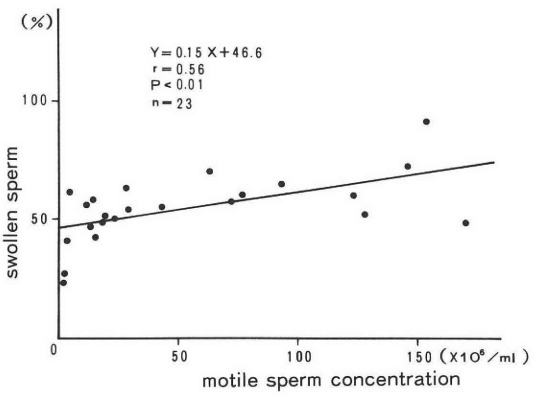


図5　Motile sperm concentration と total swollen sperm との関係

Table 4. Hypoosmotic swelling test and semen analysis (fertility index, F.I.)

Sample group	Percentage of total swollen sperm		Percentage of swollen sperm (g type)	
	Mean±S.D.	Range	Mean±S.D.	Range
Normal F.I.	63.1±11.7*	48.6−90.9	24.6±8.6*	4.4−35.5
Abnormal F.I.	46.3±12.6*	23.1−63.3	13.4±6.9*	4.0−26.0

Normal F.I. : F.I.≧36
*P<0.01

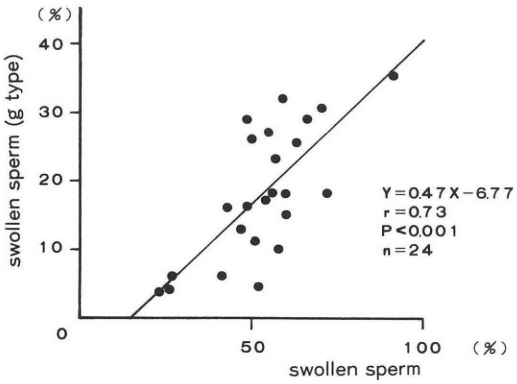


図6　Total swollen sperm と swollen sperm (g type) との関係

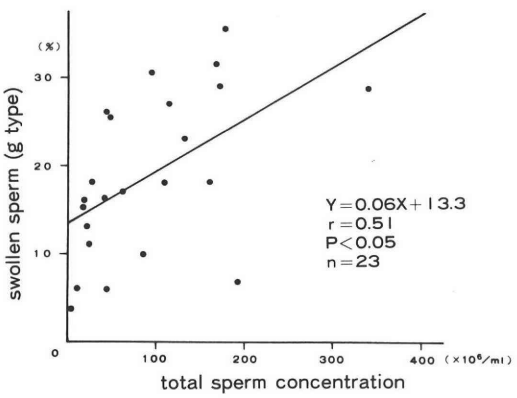


図7　Total sperm concentration と swollen sperm (g type) との関係

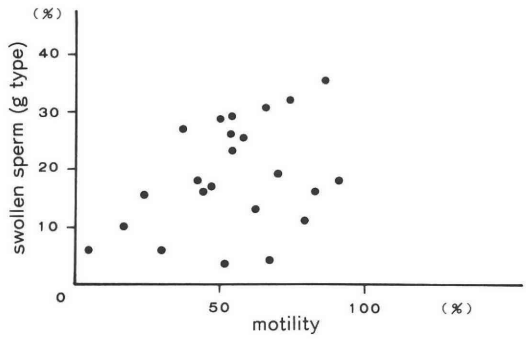


図8　Motility と swollen sperm (g type) との関係

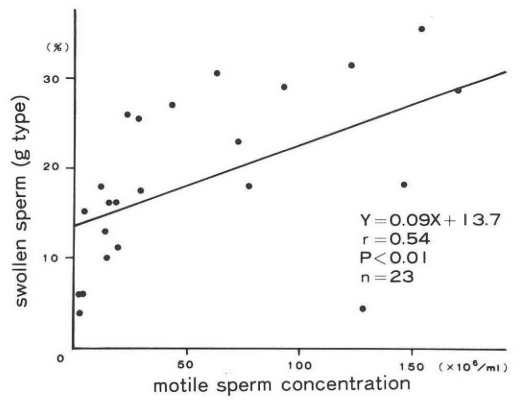


図9　Motile sperm concentration と swollen sperm (g type) との関係

てみると，表4に示すように，正常な妊孕係数の総精子膨化率が異常な妊孕係数の総精子膨化率に比べて有意な高値を示した．

5）hypoosmotic swelling test (g type)

hypposmotic swelling test における総精子膨化率 (b〜g type) と g type 精子膨化率との関係は図6に示すように，相関係数 r =0.73 で有意な正の相関関係が認められた(P<0.001). そこで，精液所見と g type 精子膨化率との関係をみると，図7に示すように，総精子濃度との間には相関関係 r =0.51 で有意な正の相関関係が認められた(P<0.05)．しかし，精子運動率と g type 精子膨化率との間には有意な正の相関関係は認められなかった(図8)．そこで，運動精子濃度との関係をみると，図9に示すように，運動精子濃度と g type 精子膨化率との間には相関係数 r =0.54 で有意な正の相関関係が認められた (P<0.01)．

考　察

ヒト精子は射精されたのち，生理的な変化である受精能獲得過程（capacitation）を経て，先体反応（acrosome reaction）を起こし，透明帯を通過し，卵実質内に侵入し，雄性前核を形成し受精に至る．このことより，精子濃度，精子運動率，奇形率などの精液所見のみで精子の受精能力を判定することは困難であり，実際，精液所見が正常範囲内でも不妊となっている症例は日常診察ではそれほど珍しいことではない．ヒト精子が透明帯除去ハムスター卵に侵入可能であることを1976年，Yanagimachi ら[1]が報告しているが，このハムスターテストは操作が煩雑で，一般不妊外来でのルチン検査としての実施は不可能である．hypoosmotic swelling test は1984年 Jeyendran ら[3]によって開発されたもので，精子の受精能力を精子の尾部が低浸透圧負荷で膨化することにより判定しようとするものである．hypoosmotic swelling test はヒト精子に関しては Jeyendran ら[3]の報告が最初であるが，哺乳類，特に牛精子についてはそれ以前にも検討が行なわれており，Drevius[5]は低浸透圧溶液の組成の種類および浸透圧の大小により精子尾部膨化の状況が異なると報告している．

一般精液所見と hypoosmotic swelling test の結果についての検討では，Chan ら[6]は，精子濃度 20×10^6/ml，精子運動率 40 %で，正常，異常精子に分け，その精子膨化率を比較しているが，それぞれの精子膨化率に有意差があると報告している．そして，精子運動率と精子膨化率との間には弱い正の相関関係があるとしている．今回の検討では正常精液群（精子濃度 $60\times10/^6$ml 以上，精子運動率 60 %以上）と異常精液群との間には，正常精液群の総精子膨化率の方が異常精液群の総精子膨化率よりも有意な高値を示した．また，総精子濃度のみでの比較では有意差を認めたが，精子運動率のみの比較では有意差は認められなかった．しかし，正常な妊孕係数の総精子膨化率が異常な妊孕係数の総精子膨化率に比べて有意な高値であり，運動精子濃度，精子運動率と，hypoosmotic swelling test の総精子膨化率との間には弱いけれども有意な正の相関関係が認められた．また，g type 精子膨化は，精子尾部全体が球状に膨化し，精子尾部細胞膜の機能は良好であると推定されるので，g type のみの精子膨化率について検討すると，b～g type 精子膨化率と g type 精子膨化率との間には有意な正の相関関係が認められ，正常精液群と異常精液群とに分けた場合，正常精液群の g type 精子膨化率が異常精液群の g type 精子膨化率より高値の傾向を示し，飯塚ら[4]の提唱する妊孕係数での比較でも有意差が生じ，総精子濃度，運動精子濃度と g type 精子膨化率との間には有意な正の相関関係が認められた．以上のことにより，hypoosmotic swelling test において，b～g type 精子膨化率および g type 精子膨化率はより妊孕性に影響があると思われる運動精子濃度と関連性が深く，ヒト精子の受精能を b～g type 精子膨化率で判定する代わりに g type 精子膨化率のみの判定が可能と推測される．しかし，g type 精子膨化がより妊孕性に深く関与があるかどうかは今後の検討が必要である．

また，他のヒト精子受精能力テストとの関連性に関しては，Jeyendran ら[3]は透明帯除去ハムスターテストと良好な相関関係を示すと報告しているが，Chan ら[6]はハムスターテストとは相関関係はなく，精子の別々の機能面，つまり，ハムスターテストは精子と卵子の相互作用や受精を，hypoosmotic swelling test は精子運動率のような精子の膜の機能面をみていると報告している．しかし，Van der Ven ら[7]はヒト体外受精において受精した精子の hypoosmotic swelling test はほとんどが精子膨化率 60 %以上であり，受精しない精子の精子膨化率はほとんどが 60 %以下で，hypoosmotic swelling test は受精に関する能力の指標となると報告している．

以上より，hypoosmotic swelling test は一般精液検査と相関があり，また，精子機能検査として一般不妊外来で容易に施行できる検査であり，有用な精液検査の一つであると推定できる．

文　献

1）Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Rogers, B. J.: The use of zona-free amimal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15: 471, 1976.

2）高橋健太郎，吉野和男，高木　司，草刈万寿夫，内田昭弘，柳光寛仁，白井孝昭，西垣　新，北尾学：当科で施行している透明帯除去ハムスター卵子へのヒト精子侵入試験（ハムスターテスト）について．産婦世界，39：1001，1987.

3）Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Gravo. B. G., Zaneveld L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 70: 219, 1984.

4）飯塚理八，小林俊文，遠藤勝英：人工受精の実際，産婦治療，53：264，1986.

5）Drevius, L. O.: The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and

univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models: J. Reprod. Fert., 28: 41, 1972.
6) Chan, S. Y. W., Fox, E. J., Chan, M. M. C., Tsoi, W., Wang, C., Tang, L. C. H. Tang, G. W. K., Ho, P.: The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysts, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. Fertil. Steril,: 44: 668, 1985.
7) Van der Ven, H. H., Jeyendran, R. S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K., Zaneveld,: Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization J. Androl., 7: 190, 1986.

Correlation between data on the routine semen analysis and the hypoosmotic swelling test

Kazuo Yoshino, Kentaro Takahashi, Masuo Kusakari, Akihiro Uchida, Takaaki Shirai, Arata Nishigaki, Hiroyuki Yamasaki and Manabu Kitao

Department of Obstetrics and Gynecology, Shimane Medical University Izumo, 693 Japan (Director: Prof. M. Kitao)

We studied the correlation between data on the routine semen analysis and the hypoosmotic swelling test. Sperm were examined for typical tail abnormalities indicative of the occurrence of hypoosmotic swelling and particularly for swollen areas that completely enveloped the curved tail of the sperm (g type). The percentage of swollen sperm (b-g type, g type) was calculated. Analysis were made of the total sperm concentration, sperm motility and motile sperm concentration. The mean percentage of the swollen sperm (b-g type) in normal semen samples was significantly higher than that seen in the abnormal semen samples. The mean percentage of swollen sperm (b-g type, g type) in case of a normal sperm concentration was significantly higher than that seen in case of abnormal sperm concentration. Positive but weak correlations were observed between total sperm concentration and the percentage of swollen sperm (g type), between sperm motility and the percentage of swollen sperm (b-g type) and between motile sperm concentration and the percentage of swollen sperm (b-g type, g type), respectively. Therefore, the hypoosmotic swelling test correlates with data on the routine semen analysis, hence is a pertinent clinical test for examinations of sperm.

(受付：1987年12月25日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

ブタ精巣上体管腔内液のペントースサイクル

Pentose Phosphate Cycle in the Boar Epididymal Fluid

東邦大学第1産婦人科学教室
伊藤元博　跡部一郎
Motohiro ITO　Ichiro ATOBE

1st. 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

ブタ精巣上体を使用し，その頭部，体部，尾部の管腔内液のペントースサイクル活性の変化について検討した．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NADP依存酵素を特異的に吸着する2', 5'ADP-Sepharose 4Bを用いたaffinity chromatographyにより分離，精製し，各部位のペントースサイクル活性を比較検討した．なお，精巣上体管腔液は，尾部を除き精巣上体組織と共に細片し，得られた活性から組織活性を減法し比較した．

本経路活性は頭部で2317.7±96.1mU/ml(組織を含む)，体部で6521.7±182.8mU/ml(組織を含む)，尾部で270.3±25.9mU/mlであった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 107−112, 1989)

緒　言

精子が高度に迂曲した精巣上体管腔内を通過する間に受精能を獲得し，受精能の発現，維持に精巣上体因子が関与すること，また精巣上体機能がアンドロジェン依存であることは定説となっている．しかし，精巣上体通過中にみられる種々の精子成熟変化と精巣上体の変化との相互関係，その変化の機能的意義，精巣上体管腔内環境と精子間の相互作用については十分明らかにされていない．

われわれは脂質，ステロイド合成に深く関与するペントースサイクルが，ブタ精巣上体頭，体，尾部管腔液でどのような推移を辿るかを検索し，同時にその機能的意義について考察した．

方　法

1）ブタ精巣上体管腔液の採取およびその粗抽出液の作製（図1，2）

精巣上体は，屠殺後1時間前後の生殖可能なブタ精巣上体を使用した．

精巣上体は頭，体部に分割し[1]，付着している血管，結合織，脂肪組織を取り除き，管腔内液と共にKRBG

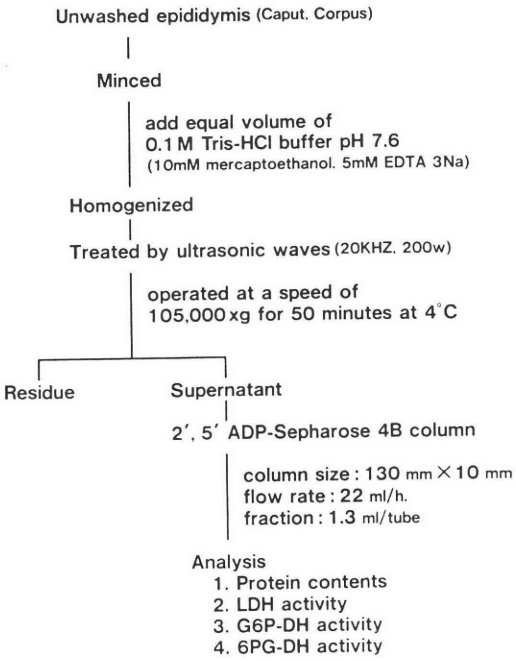


図1　Experimental Procedure

(pH7.4)中で細片した．細片後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20KHz，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．一部を蛋白量，酵素活性の測定に使用した．なお，管腔内液としての活性は，組織活性より減法して比較した．実験に供した各組織は3.0gである．

精巣上体尾部管液は，精管を露出し，切開を加え，切開部位より尾部に向けてチューブを挿入し，注射器により空気を注入する．この空気圧を利用して尾部管液を採取する．実験に使用した液量は約3.0mlで光顕にて精子の直進運動を認めた．この尾部管腔液に0.1M Tris-HCl bufferを等量加え良く攪拌後，超音波を施行した．超音波施行後，4℃，105,000g，60分間超遠心し，得られた上清を尾部管腔液の粗抽出液とし，その一部を蛋白量，酵素活性の測定に使用した．

2）2', 5'ADP-Sepharose 4B[2]による精製（図1，図2）

方法は本誌既報[3,4]に準じた．

3）蛋白量および各酵素活性の測定

(1)蛋白量

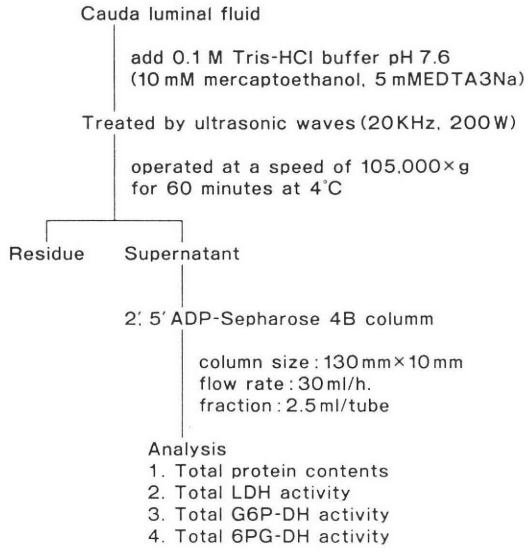


図2　Experimental Procedure

Marison[5]の方法に準じた．

(2) LDH活性

Hill変法[6,7]にもとづき測定した．

(3) G6P-DH, 6PG-DH活性

G6P-DH活性はLöhr-Wallerの方法[8]，6PG-DH活性はWolfsonらの方法[9]にもとづき測定した．

活性値の表し方

1μM/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．

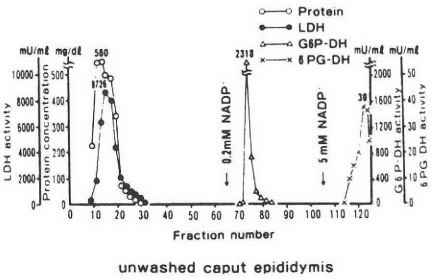
結　果

1）ブタ精巣上体頭，体，尾部粗抽出液からのG6P-DHの分離

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3，4，5，に示す．図左は管腔内液を含めた組織(unwashedと表現した)のaffinity chromatogramで，図右は管腔内液を除去した管組織のaffinity chromatogramである．図5左は尾部管液のaffinity chromatogramである．

2）精巣上体各部位のG6P-DH活性

精巣上体尾部管液と管腔内液を含めた頭部，体部管組織のG6P-DH活性を表1に，精巣上体各部位の管組織のG6P-DH活性を表2に示す．G6P-DH活性は体部で6521.7±182.8mU/mlと最も高く，次いで頭部で2317.7±96.1mU/ml，尾部で270.3±25.9mU/mlと急激に低下した．頭部，体部のG6P-DH活性より



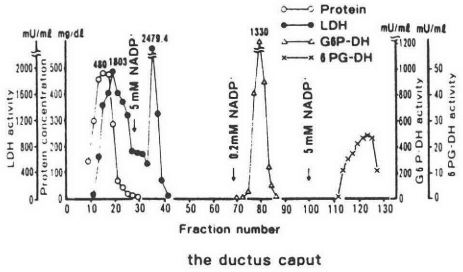
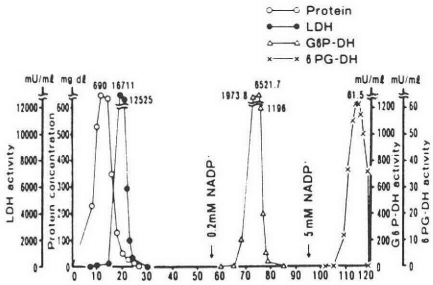


図3　affinity chromatography of Boar epididymis extract on 2'5'ADP-Sepharose 4B



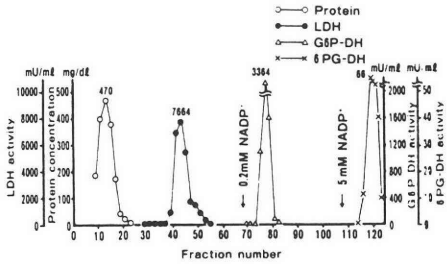
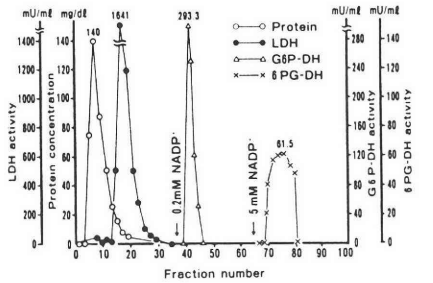


図4　affinity chromatography of Boar epididymis extract on 2'5'ADP-Sepharose 4B



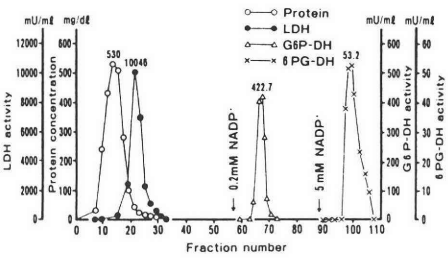


図5　affinity chromatography of Boar epididymis extract on 2'5'ADP-Sepharose 4B

表1　Glucose-6-phosphate Dehydrogenase activities of cauda luminal fluid and unwashed epididymal tissue from boar.

Caput	n=5	
	2317.7±96.1 mu/ml	
Corpus	n=5	
	***6521.7±182.8mu/ml	
Cauda	n=5	
	***270.3±25.9mu/ml	

value ; Mean±SD

The data were statistically analysed using Students't'test and significant differences between unwashed epididymal tissue and cauda luminal fluid were indicated by asterisks (***p< 0.001).

表2　Glucose-6-phosphate Dehydrogenase activities of epididymal tissue from boar.

Caput	n=5	
	1123.2±82.7mu/ml	374.4±27.6mu/ml/g
Corpus	n=5	
	**3617.2±101.3mu/ml	**1205.7±33.8mu/ml/g
Cauda	n=5	
	**379.6±17.3mu/ml	**126.5±5.8mu/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).

表2の各々の管組織の活性を減法しても結果は同じである.

考　察

精巣上体は，精子産生場所である精巣から放出された精子をその貯蔵場所である尾部まで送り込む．この高度に迂曲した精巣上体管腔を精子が通過するのに約2週間を要し[10]，この間に精子は種々の変化を受け受精能を獲得する．この精子成熟は，精巣上体頭部から尾部へと連続的に変化する管腔内環境に遭遇して初めて完成する．

われわれはこの環境因子のうち，ペントースサイクルの代謝能の変化を頭部，体部，尾部について検討した．ペントースサイクルは，脂肪酸，ステロイドなどの合成と深い関連をもちながら現在十分な検討がされていない．

精巣上体液の採取に当り，尾部液は空気圧法を用い，頭部，体部液は管腔内液を保存した状態で組織と共にminceし，以前実験した精巣上体管各部位のペントースサイクル活性（未発表）を減法して検討した．精巣上体液採取法はいろいろ開発されているが[11]，技術的にも煩雑で，同条件での採取も難しく，採液量が少ないなど，未だ幾つかの難点がみられる．しかし，われわれの方法でも本経路の変化を生じる部位を検討する目的としては十分と考えられる．

ペントースサイクルの鍵酵素であるG6P-DH活性は，精巣上体体部液で最も高く，次いで頭部，尾部では急激に低下した．この結果は精巣上体各部位の組織にみられた結果と全く同じである．

精巣上体液および精巣上体管のペントースサイクルに関する研究は，過去にわずかに散見するにすぎない[12~15]．これらの報告はいずれも頭部から尾部に移行するにつれてペントースサイクル活性が減少していく結果を示しており，本活性が体部において最も高値を示したわれわれの結果と明らかに相違している．この不一致は使用動物の種属間の違いと考えられる．Johnsonら[12]によると，ラットでは頭部より尾部で，マウス，ラビットでは尾部より頭部で本活性は活発であることを報告しており，この結果は，精子の成熟過程のある時期に，その組織あるいは精子によってペントースサイクルが利用されていることを示唆すると同時に，本活性が特別な部位および特別な部位に存在する精子において種属間に相違があることを示している．

精巣上体はその機能本来を維持するためにアンドロジェンに依存していることは定説となっている．精巣上体に蓄積されるglyceryl-phosphorylcholineやcarnitine[11]はアンドロジェン依存性であり，ペントースサイクルも同じようにコントロールされている[14,16]一方，解糖系の酵素活性の上昇がプロラクチンの直接作用によるものであるとする報告もある[17]．Balasubramanian[15]らは副腎摘除ラットで，精巣上体管組織および精巣上体液を含む管組織の解糖系酵素について検討している．精巣上体頭部ではコントロール群に比べ，副腎摘除群のG6P-DH, 6PG-DH活性が有意な上昇を示したことから，頭部におけるNADPHの利用率が副腎摘除によって高まり，その結果脂質生成が増大した可能性を示唆している．Sholl[18]らは，ラットの発育過程の精巣上体に，アンドロジェンの増加時期と一致してG6P-DH, 6PG-DH活性の増加を認め，ペントースサイクルが精巣上体でステロイド，脂質合成にNADPHを供給している可能性を示唆した．

われわれの実験結果からも，精子成熟の際立った変化がみられる精巣上体頭部，体部においてG6P-DH活性が高値を示した事実は，両部位においてペントースサイクルがステロイドおよび脂質合成に関与している可能性が考えられる．

精子貯蔵場所である尾部管腔液に最も低い活性が認められたが，射精精子のそれと比較すると本経路活性はより活発に働いている[19]．従って射精精子では不活性な状態にあるペントースサイクルが，尾部管精子では何らかの役割を演じている可能性がある．

精巣上体尾部精子の受精能維持は，尾部管内に分泌されたdihydrotestosterone[20]が精子内に取り込まれ，3α-androstanediolに還元される機序によるとする報告がある[21]．

精子が精巣上体頭，体部を通過するに要する時間は2日から5日で，従って精巣上体内での精子成熟に要する時間は5日以内である[10]．この短期間に誘起される種々の精子変化と精巣上体機能との関連を説明することは今後の興味ある研究課題と考えるが，ペントースサイクルが頭，体部および管腔内液で活性化していることは，その生理的作用と考え合わせると脂質およびステロイド合成との関連を示唆し，尾部では受精能維持に関与している可能性が考えられる．

(なお，本論文の要旨は第32回日本不妊学会総会で報告した.)

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) Brodelius, P., Larsson, P.-O. and Mosbach, K.: The synthesis of three AMP-analogues: N^6-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N^6-(6-aminohexyl)-adenosine 2', 5'-bisphosphate, and N^6-(6-aminohexyl)-adenosine 3', 5'-bisphosphate and their applications as general ligands in biospecific affinity chromatography. Eur. J. Biochem., 47: 81, 1974.
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) Marison, M. B.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 284, 1976.
6) Hill, B. R. and Levi, C.: Elevation of a serum component in neoplastic disease. Cancer Res., 14: 513, 1954.
7) Hill, B. R.: Some properties of serum lactic dehydrogenase Cancer Res., 16: 460, 1956.
8) Löhr, G. W. and Waller, H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In methods of enzymatic analysis. Vol. 2. Bergmeyer, H. U. ed., 636, Academic Press, New York, 1974.
9) Wolfson, Jr. S. K. and Ashman, H. G. W.: Isocitric and 6-phosphogluconic dehydrogenase in human blood serum. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 96: 231, 1957.
10) 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.
11) Brooks, D. E., Hamilton, D. W. and Mallek, A. H.: Carnitine and glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rat. J. Reprod. Fert., 36: 141, 1974.
12) Johnson, A. D. and Turner, P. C.: Epididymal carbohydrate metabolism- I . Glucose-1-^{14}C and glucose-6-^{14}C 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) Brooks, D. E.: Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. Biochem. J., 156: 527, 1976.
15) Balasubramanian, K., Pereira, B. M. J. and Govindarajulu, P.: Effect of adrenalectomy and corticosterone replacement on epididymal carbohydrate metabolism-Studies on mature male rats. Andrologia, 15: 71, 1983.
16) Brooks, D. E.: Control of glycolytic enzymes by androgens in the rat epididymis. J. Endocr., 71: 335, 1976.
17) Pereira, B. M., Balasubramanian and Govindarajulu, P.: Influence of hypothyroidism on epididymal enzymes involved in carbohydrate metabolism studies in pubertal and adult rats. Int, J. And., 6: 294, 1983.
18) Sholl, S. A. and Leathem, J. H.: Effect of postnatal maturation and castration on rat epididymal carbohydrate metabolism. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 142: 635, 1973.
19) 伊藤元博，中岡義明，渡辺　仁，江川恵基，天野久夫：ブタ精巣上体尾部および尾部精子におけるペントースサイクル．日不妊誌，32：22，1987.
20) Setty, B. S., Leask, J. T. S. and Waites, G. M. H.: In vitro metabolism of (^{3}H)-androstenedione in the rat epididymis and vas deferens. Andrologia, 15: 339, 1983.
21) Lubicz-Nawrocki, C. M.: The effect of metabolites of testosterone on the viability of hamster epididymal spermatozoa. J. Endocr., 58: 193, 1973.

Pentose phosphate cycle in the boar epididymal fluid

Motohiro Ito and Ichiro Atobe

1st. Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University, School of Medicine, Tokyo 143, Japan

Hitoshi Watanabe and Hisao Amano

Department of Biochemistry, Toho University, School of Medicine, Tokyo 143, Japan

An increase in fertilizing capacity of spermatozoa occurs during passage through the epididymis suggesting that this organ provides a major source of substrates to support the maturation process. In this regard, an increase in carbohydrate metabolism relative to epididymal function has indicated that glucose is a major metabolic substrate and

that a high pentose cycle activity exists in the organ[12,13].

The activity of the pentose-shunt enzymes was studied in epididymal luminal fluid.

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.

G6P-DH was quite active in the caput-corpus region of the epididymis, particularly in the corpus segment and lowest in the cauda.

From the alterations in epididymal fluid enzyme activities obtained in the present study, the pentose cycle may be important in supplying NADPH for steroid and phospholipid synthesis in the epididymis.

(受付：1988年2月18日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

ハムスターテストとHypoosmotic swelling testとの関連性について

Correlation between the Zona-free Hamster Egg Human Sperm Penetration Test and the Human Sperm Hypoosmotic Swelling Test

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　草刈万寿夫　内田昭弘
Kentaro TAKAHASHI　Masuo KUSAKARI　Akihiro UCHIDA
山崎裕行　白井孝昭　吉野和男
Hiroyuki YAMASAKI　Takaaki SHIRAI　Kazuo YOSHINO
北尾　学
Manabu KITAO

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

不妊症外来における男性因子の検索には一般精液検査が行われているのが現状である．しかし，正常精液所見を示すにもかかわらず，不妊症例も多く，ヒト精子の受精能を確認するためには，精子の機能テストが必要であり，現在は，透明帯を除去したハムスター卵子を用いて，間接的に精子のcapacitationを知るハムスターテスト(ZSPT)や低浸透圧負荷により精子の尾部細胞膜の形態学的変化を観察し，間接的に精子の受精能を知るHypoosmotic swelling test (HOST)などが利用されている．

今回，精子の受精能の判定の為にZSPTとHOSTを同時に行い，その有用性について検討した．その結果，ZSPTとHOSTとの間の相関関係は認められなく，ZSPTで低値を示したものでもHOSTは良好な結果であったものもあり，またその逆も認められた．しかし，両テスト共に低値を示したものに妊娠例は1例もなく，妊娠症例は共に高値を示したものが多かった．

以上により，HOSTはZSPTの代用には成り難く，精子受精能の判定には両検査の併用が望ましいことが推定された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 113－118, 1989)

緒　言

不妊症外来における男性因子の検索には一般精液検査が行われているのが現状である．しかし，正常精液所見を示すにもかかわらず，不妊症例も多く，ヒト精子の受精能を確認するためには，精子の機能テストが必要であり，現在は透明帯を除去したハムスター卵子を用いて，間接的に精子のcapacitationを知るハムスターテスト (Zona-free hamster egg sperm penetration test; ZSPT)[1,2,3]や低浸透圧負荷により精子の尾部細胞膜の形態学的変化を観察し，間接的に精子の受精能を知るHypoosmotic swelling test (HOST)[4,5,6]などが利用されている．今回，精子の受精能の判定の為にZSPTとHOSTを同時に行

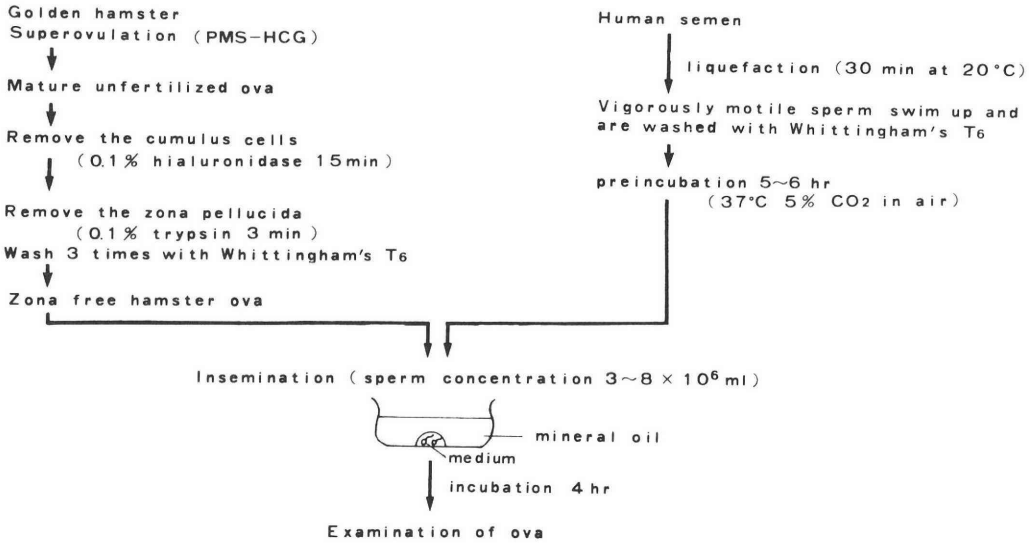


図1　当科における ZSPT の概要

い，その有用性と関連性について検討し，若干の知見を得たので報告する．

研究対象及び方法

研究対象は島根医大附属病院産科婦人科不妊・内分泌外来を受診した不妊夫婦のうち，ZSPT と HOST を同時に施行した 22 名の男性とした．

ZSPT の概要は図 1 に示すように，過排卵処理したゴールデンハムスターより得られた卵子を hyaluronidase, trypsin で処理し，swim up 洗浄濃縮法により回収された精子と受精させた．判定は頭部膨化精子もしくは尾部をともなった雄性前核が確認できた場合に侵入とし，侵入率を計算した．

HOST は図 2 に示すように，精液 0.1ml と Hypoosmotic solution 1ml を混ぜ，30－60 分間，37℃で incubation した後，精子の形態を観察した．精子の尾部細胞膜の形態学的変化は Jeyendran ら[4]に従い，図 3 のように a ～ g に分類し，100 以上の精子を観察し，それぞれのパーセンテージを算出した．

それぞれのテストの基準値は，我々が以前に報告した ZSPT 40%[7], total swollen sperm を用いた HOST (以下 t-HOST と略す) 42%, g type swollen sperm を用いた HOST (以下 g-HOST と略す) 14%[8]を用い，基準値以上を精子機能良好とした．

統計学的処理は Student's t-test で行った．

結　果

22 名の精液検査所見及び ZSPT, HOST の結果を表 1 に示す．ZSPT における精子の侵入率は 0～100%

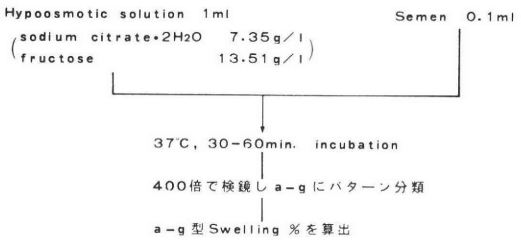
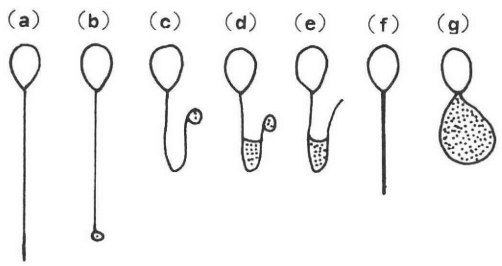


図2　Hypoosmotic swelling test の概要



a: no change
b-g: various types of tail changes

図3　Hypoosmotic swelling test における尾部膨化精子の模型

に分布しており，平均は 32.6±29.4 %であった．また HOST における total swollen sperm の割合 (t-HOST) は 14～79 %で平均 42.3±15.7 %であり，g type swollen sperm の割合 (g-HOST) は 1～29%で平均 13.7±8.7%であった．このうち，妊娠は 6 例に認められ，自然妊娠 3 例(症例 8，11，15)，AIH 妊娠 3 例 (症例 4，6，9) である．ZSPT で当科の基準 40 %以上を満たしたものは 10 例あり，妊娠

表1　精液検査所見，ZSPT 及び Hypoosmotic swelling test の結果

Patients	Seminalysis			ZSPT	Hypoosmotic swelling test		pregnancy
	Total sperm concentration ($\times 10^6$/ml)	Motile sperm concentration ($\times 10^6$/ml)	Sperm motility (%)	Penetration rates (%)	Total (%)	g type (%)	
1. F.K.	44	2	4.5	0	27.0	6.0	−
2. M.H.	0.1	0.1	50	0	26.0	4.0	−
3. F.C.	10	3	30	0	41.0	6.0	−
4. N.K.	173	93	54	56.0	66.0	29.0	+
5. O.K.	18	15	83	64.7	42.5	16.0	−
6. H.K.	26	11	42	55.6	56.0	18.0	+
7. S.M.	7	0.8	11	55.6	23.1	3.8	−
8. S.E.	192	128	67	72.7	52.2	4.4	+
9. K.K.	133	72	54	47.4	57.0	23.0	+
10. S.M.	340	170	50	47.4	48.6	28.8	−
11. S.H.	120	81	68	2.5	79.0	18.0	+
12. N.A.	31	11	36	25.0	58.0	22.0	−
13. K.F.	70	45	64	100	37.5	15.4	−
14. A.M.	96	58	60	38.9	48.8	25.2	−
15. S.M.	105	84	80	66.7	50.0	23.2	+
16. F.T.	6	3	50	0	14.0	1.0	−
17. T.M.	14	11	79	10.0	39.4	7.3	−
18. A.M.	22	4	18	45.5	15.0	2.5	−
19. A.M.	5	2	40	8.3	32.4	12.0	−
20. O.M.	4.9	0.3	6.1	0	35.8	8.3	−
21. I.N.	20	6	30	13.6	42.0	12.0	−
22. N.K.	22	4	18	7.4	42.0	16.0	−
Mean±S.D. (range)	66.3±82.2	36.6±47.4	45.2±23.3	32.6±29.4 (0～100)	42.3±15.7 (14.0～79.0)	13.7±8.7 (1.0～29.0)	

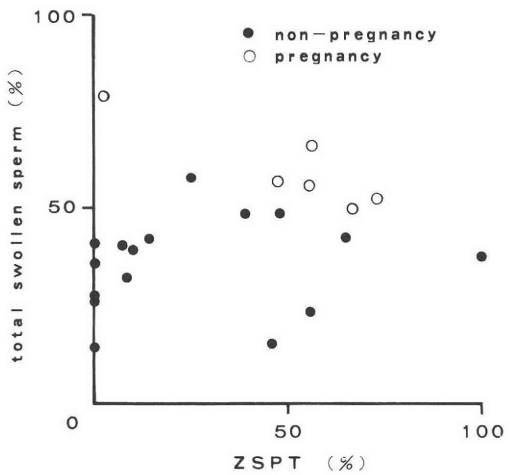


図4　ZSPT と total swollen sperm との関係

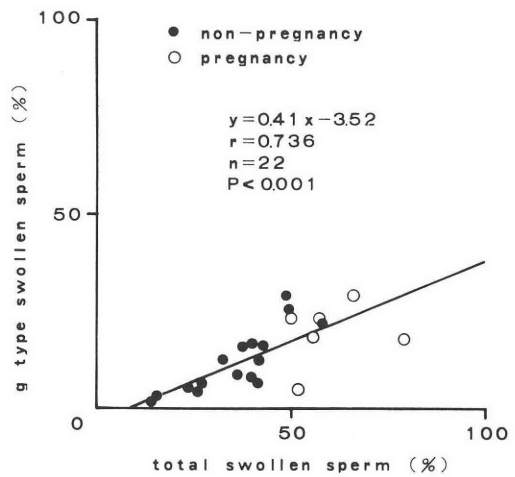


図5　Hypoosmotic swelling test における total swollen sperm と g type swollen sperm との関係

症例6例のうち5例（83.3％）が基準値以上であった．またt-HOSTで基準値以上の症例は12例あり，妊娠症例は全て基準値以上であった．同様にg-HOSTで基準値以上は11例あり，妊娠症例6例のうち5例（83.3％）が基準値以上であった．ZSPTとt-HOSTで検討すると，共に基準値以上のものは7例，共に基準値以下のものは7例あり，共に基準値以上のもの7例のうち5例（71.4％）が妊娠しており，共に基準値以下の7症例において，妊娠症例は1例もなかった．しかし，症例11のようにZSPT 2.5%と低値にもかかわらず，t-HOSTは79％と高値で自然妊娠した症例もあった．

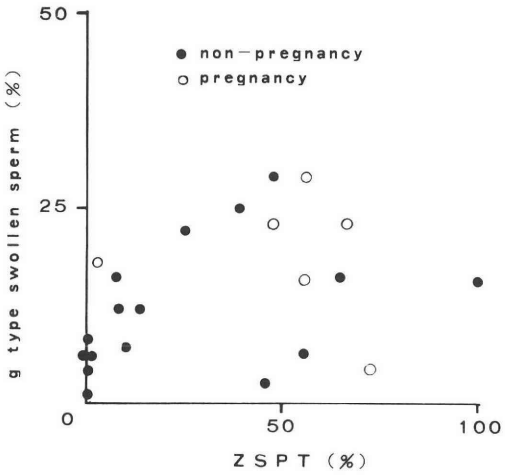


図6　ZSPTとg type swollen spermとの関係

ZSPTの侵入率とt-HOSTとの間には有意な相関関係は認められなかった．しかし，妊娠症例は全例total swollen spermの割合が50%以上で，ZSPTの侵入率も1例を除き40％以上であった（図4）．

t-HOSTとg-HOSTとの間には1％以下の危険率で正の相関関係が認められた（図5）のでt-HOSTの代わりにg-HOSTを用いZSPTとの関係をみてみた．しかし，図6に示すように，侵入率とはやはり有意な相関関係は認められなかった．

一般精液検査で当科の基準である精子濃度60×10^6/ml，運動率60％以上，奇形率15％以下の正常精液所見を示した5症例と，異常所見を示した17症例とに分け，ZSPTとHOSTとの平均値を比較検討すると（表2），侵入率は正常精子群で56.2±33.1％，異常精子群で25.7±24.1％であり，5％以下の危険率で有意に正常精子群の方が高率であった．しかし，HOSTにおいてはt-HOST, g-HOSTともに正常精子群の方が高値の傾向は認められたが，統計的な有意差は認められなかった．

当科におけるZSPTの基準値40%を用いて，HOSTの値で比較してみると，t-HOST, g-HOSTともに，平均値において統計的に有意差は認められなかったが，若干，ZSPT 40％以上の群で高値の傾向が認められた（表3）．そこで，Chanら[5]によるZSPTの分類を利用し，HOSTの値を比較検討すると（表4），t-HOST, g-HOSTとともに，ZSPT 0%とZSPT 10%

表2　ZSPT及びHOSTにおける正常精子と異常精子との比較

Subjects	No. of patients	ZSPT	HOST	
		penetration rates(%)	total(%)	g type(%)
normal sperm	5	56.2±33.1[a]	53.5±13.7	17.2±7.3
abnormal sperm	17	25.7±24.1[b]	38.6±14.2	13.0±9.2

a－b：P<0.05

表3　当科における基準ZSPT値とHypoosmotic swelling testの平均値

ZSPT	Hypoosmotic swelling test (Mean±S.D.)	
	total (%)	g type (%)
40%以上	44.8±15.0	16.4±9.5
40%未満	40.3±15.9	11.5±7.2

表4　Chanらの分類によるZSPT値とHypoosmotic swelling testの平均値

ZSPT	Hypoosmotic swelling test (Mean±S.D.)	
	total(%)	g type(%)
0％	28.8±9.3[a]	5.1±2.4[c]
>0% and <10%	51.1±20.1	15.3±2.5[d]
≧10%	45.4±13.3[b]	16.5±8.9[e]

a-b：P<0.05
c-d：P<0.01
c-e：P<0.001

以上で，平均値に有意な差が認められた．そして，その統計的な有意差はt-HOSTよりg-HOSTの方に強く認められた．

考　察

IVE-ET法の導入により，ヒトにおける受精，着床のメカニズムがより高度に研究されつつある現在，精子の受精能を従来よりの精液量，精子濃度，運動率，奇形率等を検索する一般精液検査の結果のみで判定する事はあまりにも不正確である．そのために，精子の機能検査が必要となってきた．

精子が受精を完遂するためにはcapacitationと呼ばれる機能的変化を遂げる必要がある．その精子のcapacitation能力を間接的に知る方法としてZSPTが用いられている[1,2,3]．しかし，その方法は煩雑であり，一般臨床でルチンに用いるのは不可能である．

Jeyendranら[4]は「精子の細胞膜機能が正常であれば，その精子機能も良好である」という仮説のもとにhypoosmotic swelling test (HOST) をヒト精子で応用した．この検査は，ヒト精子に低浸透圧負荷を加え，精子の尾部に認められる著明な膨化を形能学的に観察し，尾部細胞膜の機能をもとに，ヒト精子の受精能を判定しようというもので，より容易な精子機能検査法である．

もし，ZSPTの代用としてHOSTが有効であるならば，一般臨床の場で，精子の機能検査が簡単に出来るはずであり，一般精液検査とHOSTの併用により，精子の妊孕能はある程度判定可能である．そこで，今回はZSPTとHOSTとの関連性を検討したのであるが，結論から言うと，ZSPTとHOSTとの強い関連性は見出せなかった．この事はChanら[5]の報告と一致する．Chanら[5]も述べているように，ZSPTとHOSTとは精子の異なった機能面を判定している．つまり，ZSPTは精子の卵子への侵入，受精に関する機能の判定であり，HOSTは精子の運動性に関する精子細胞膜の機能の判定である．しかし，Jeyendranら[4]や柳沢ら[9]はZSPTとの良好な相関関係を認めており，まだまだ検討の余地がある．我々の検討では，ZSPTとHOSTとの個々の値での相関関係は認められなかったが，ある一定の基準ZSPT値を決めて，HOSTの平均値で比較すると統計的にも有意差があり，この点よりは，ZSPTとHOSTとは関連性があると言っても過言ではないと思う．また，ZSPT 0%つまり，精子のcapacitation能力のない群とZSPT 10%以上の群とで比較する場合，HOSTはg typeの膨化精子の割合のみで判定する方が，総膨化精子の割合で判定するよりも，より関連性が認められた．

このように，g typeのように尾部全体が大きく膨化している精子は，精子の運動性もよく，capacitation獲得も良好である事が推察される．

症例が少なく，今後検討の余地があるが，今回の検討でHOSTの総膨化精子の割合が50%以上，かつZSPT値40%以上であれば妊孕能力の良好な精子と推察出来る．

結論としては，ZSPTもHOSTも精子の機能検査には違いないが，精子の異なった機能面を見ており，両検査共に結果の良好な精子は当然，精子の受精機能は良好であると判定出来るが，その一つのみの検査の判定では誤ちを犯す可能性もある．故に，HOSTはZSPTの代用とは成り難く，精子受精能の判定には両検査の併用が望ましい．

文　献

1）Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Bio. Reprod., 15: 471, 1976

2）星　和彦，斉藤　晃，京野広一，対木章，桃野耕太郎：ハムスター卵子を用いた精子の受精能検査．細胞工学，3：595，1984

3）Margalioth, E. J., Navot, D., Laufer, N., Lewin, A., Rabinowitz, R. and Schenker, J. G: Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human in vitro fertilization. Fertil. Steril., 45: 665, 1986

4）Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. and Zaneveld, L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fert., 70: 219, 1984

5）Chan, S. Y. W., Wang, C., Fox, E. J., Tang, L. C. H., Chan, M. M. C., Tang, G. W. K., Tsoi, W. and Ho, P.: The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routin semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. Fertil. Steril., 44: 668, 1985

6）Van den Ven, H. H., Jeyendran, R. S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K. and Zaneveld, L. J. D.: Correlation between human sperm swelling in Hypoosmotic medium (Hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. J. Androl., 7: 190, 1986

7）高橋健太郎，吉野和男，白井孝昭，西垣　新，内田昭弘，草刈万寿夫，北尾　学：ハムステーテストと一般精液検査との関連性についての検討．日不妊誌，投稿中

8）吉野和男，高橋健太郎，白井孝昭，西垣　新，内

田昭弘，北尾　学：異常精液患者における精子機能テスト（Hypoosmotic swelling test）に関する研究．日産婦誌，投稿中
9）柳沢洋二，吉田竹郎，津端捷夫，高木繁夫：精子の機能テストとその有用性．臨婦産，40：195，1986

Correlation between the zona-free hamster egg human sperm penetration test and the human sperm hypoosmotic swelling test

Kentaro Takahashi, Masuo Kusakari, Akihiro Uchida, Hiroyuki Yamasaki, Takaaki Shirai, Kazuo Yoshino and Manabu Kitao

Department of Obstetrics and Gynecology, Shimane Medical University, Shimane 693, Japan (Director: Prof. M. Kitao)

A routine semen analysis has long been the standard test for male fertility. Nevertheless, there are numerous infertile cases despite normal characteristics of the semen. To ascertain the sperm fertilizing capacity, a functional test is necessary. The zona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) and the hypoosmotic swelling test (HOST) can be used to test male infertility. In the present study, we studied the correlation between findings using the ZSPT and the HOST.

The results are as follows:

There was no significant correlation between the ZSPT and the HOST, and good values in the HOST were recognized in some with a low percentage in the ZSPT. A good values in the ZSPT were observed in some with a low percentage in the HOST. Pregnancy did not occur when values of both the ZSPT and the HOST were low. Conversely, high values in the ZSPT and the HOST led to pregnancy.

Therefore, we suggest that the HOST cannot be used as a substitute for the ZSPT, rather use of both ZSPT and HOST is necessary to estimate the fertility potential of human sperm.

（受付：1988年2月29日）

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

Percoll 攪拌密度勾配法による選択精子性状の検討

Characterization of the Selected Spermatozoa by Means of the Simplified Percoll Density Gradient Stirring Method

藤田学園保健衛生大学 坂文種報徳會病院 産婦人科

高橋正明 石川洋 山本陽子
Masaaki TAKAHASHI Hiroshi ISHIKAWA Yoko YAMAMOTO
森川重敏 越知正憲 千原啓
Shigetoshi MORIKAWA Masanori OCHI Hiromu CHIHARA
永田哲朗 米谷国男
Tetsuro NAGATA Kunio KOMETANI

Department of Obstetrics & Gynecology,
Fujita Gakuen Health University
Banbuntane Hotokukai Hospital

当科不妊外来に通院治療中の20例に，80% Percollを用いた攪拌密度勾配法により洗滌濃縮した精子を用い90回の配偶者間人工受精（A.I.H.）を行った．このPercoll処理前後の精子性状の変化を検討した．精子運動率は処理前56.6±19.4%，処理後71.4±20.6%，精子奇形率は処理前9.8±5.5%，処理後5.4±4.0%と両者共$P<0.01$で有意に改善されたが，精子濃度（$\times 10^6$/ml）は処理前53.6±43.1，処理後44.1±42.9と$P<0.01$で劣化した．回収率に関しては一般精子16.1±10.1%，運動精子22.2±20.5%，直進運動精子26.4±26.0%といずれも低いが，直進運動精子が有意に選択的に回収されていることが判明した．精液中の細菌の変化を28例で検討したところ，処理前の精液で無菌のものは一例もなく，10^4以上出現しているものが全体の60%を占めた．処理後は無菌になった5例を含め25例（90%）で細菌数の減少をみた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 119－125, 1989)

緒　言

不妊症の原因としての男性因子は，当科における昭和47年より10年間の統計[1]で不妊症患者773例中115例と全体の15%を占め，また，不妊因子別にみた妊娠率は24%と最低であった．諸家の報告[2,3,4]においても，その妊娠率は極めて低いのが現状である．周知の通り，ここ数年来の産婦人科領域における不妊症治療は格段の進歩を遂げつつあり，この男性不妊治療に関しても造精機能の改善を目的に各種薬剤を投与する方法およびSwim-up法や洗滌濃縮によって優良精子を選別して，これを配偶者間人工授精（A.I.H.）に用いるなど，各種の新しい試みがなされて来た．

今回われわれは繁雑な外来診察においても比較的簡単に処理でき，かつ優良精子の選択性にすぐれていると思われるPercollによる攪拌密度勾配法に着目し，同法による選別精子を用いたA.I.H.を不妊患者20例に延べ90回行った．その際用いた精液処理前後における精子運動率，奇形率，濃度，直進運動精子

濃度，回収率，精液中の細菌についてしらべ，A.I.H. に用いる優良精子の選別法として同法の有用性を検討した．

対象および方法

1）対象

当科不妊外来通院中で人工授精を行った症例のうち，精子濃度 30×10^6/ml 以下の精子減少例 8 例，運動率 20 %以下の精子運動不良 6 例，長期機能性不妊 5 例，逆行性射精 1 例，計 20 例（延べ 90 回）を対象とした．

2）Percoll の調整

今回われわれが用いた方法は，昭和 61 年の第 5 回日本アンドロロジー学会において兼子ら[5]によって発表された 80% Percoll を用いた攪拌密度勾配法である．その調整法は表 1 の如く，まず I 液と II 液を調整し，その I 液と Percoll 原液で 90 %の等張 Percoll を，これに II 液を加え 80% Percoll を調整した．操作はできるだけ無菌的に行い，I 液，II 液ができた時点で，さらにそれぞれをミリポアフィルターにかけて滅菌した．その保存に関しては，I 液は 4℃で，II 液は凍結保存をし 10 日に一度の割合で新しく 80% Percoll を調整し使用した．また使用にあたって 80% Percoll 90ml に対し，ヒト血清アルブミンを 30mg の割合で添加した．

3）攪拌密度勾配法の操作手順

図 1 に示す如く，マスターベーションで得られた精液を室温で液化を待ち，その精液全量を 80% Percoll 約 6ml に層積し，精液と Percoll 層の上半分ほどを滅菌されたディスポーザブルの 1cc ブルーシリンジの内筒を逆さに利用し，1 ～ 2 回上下に攪拌した．この操作により連続した密度勾配を形成した．スィングアウトローターにて 2000rpm 30 分間遠心分離，成熟した運動良好精子は管底の pellet 中に回収され，

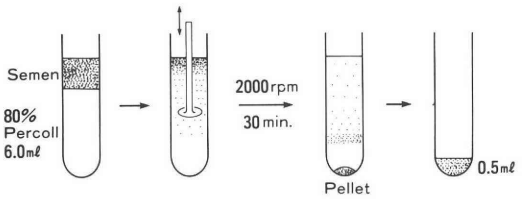


図 1　攪拌密度勾配法

未成熟精子，他細胞成分，精漿等は上層に残留するので，ピペットを用い pellet 部分約 0.5ml を残して上層を除去，軽く振って精子を再懸濁し，一部は下記の精子性状の検討に，他は A.I.H.に供した．

4）精液および精子の検定法

精子数は MAKLER の算定板を用い，奇形率はブリリアント・クレシルブルーを塗布したスライドグラスを使用し，また精子運動率，直進率に関しては無作為に 100 匹の精子を観察し，まったく不動のもの，直進運動をしているもの，その他の運動をしているものに分け算定し求めた．また精液中の細菌に関しては，もとの精液と Percoll 処理後の精液それぞれで行った．菌種の同定には DHL 寒天培地，血液寒天培地を用い，菌数測定には簡易定量キットである BCB スライドを使用し 18～24 時間培養後，コロニー数を算定した．

5）その他

逆行性射精の一例については，生食水にて膀胱洗滌後，膀胱内に II 液（または生食水）を 20ml 注入，マスターベーション後採尿させ，室温に約 20 分放置し液化したものを遠沈管数本に分注し 1800rpm 5 分間スィングアウトローターにて遠沈，すべての遠沈管の下層 1cc づつを回収し，それを 80% Percoll を用いた攪拌密度勾配法で洗滌濃縮し A.I.H.に供した．

表 1．80% Percoll 調製法

1．I 液

HEPES　4.7g
NaCl　8.0g
$NaHCO_3$　1.0g
→（滅菌蒸留水）→ 100mℓ（IN-NaOH で pH 7.4に調整）

2．II 液

HEPES　4.7g
Hanks　9.8g
$NaHCO_3$　1.0g
→（滅菌蒸留水）→1000mℓ（IN-NaOH で pH 7.4に調整）

① Percoll 原液 90mℓ＋I 液10mℓ → 90% Percoll 100mℓ

② 90% Percoll 80mℓ＋II 液10mℓ → 80% Percoll 90mℓ

結　果

1）精子運動率

図2はPercoll処理前後における精子運動率の改善の程度を示したもので，処理後の運動率を処理前の運動率で除した値（%）で示した．全体の85%で運動率は改善されており，さらに，処理前のMean±S.D.（%），56.6±19.4，処理後71.4±20.56とP<0.01で有意差をもって精子運動率の改善が認められた．

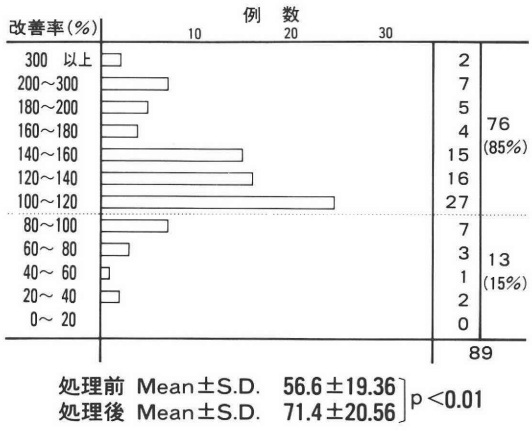


図2　パーコール処理による精子運動率の改善率

2）精子奇形率

図3はPercoll処理前後における精子奇形率の改善の程度を示したもので，同様に処理後の精子奇形率を処理前のそれで除した値（%）で示した．全体の87%に精子奇形率の改善が認められ，それぞれのMean±S.D.（%）は，処理前9.8±5.5，処理後5.4±4.0とやはりP<0.01で有意に改善されていた．

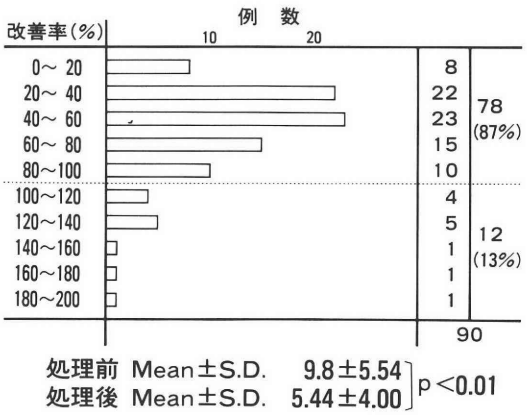


図3　パーコール処理による精子奇形率の改善率

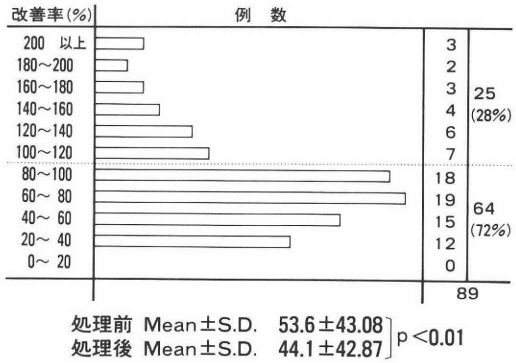


図4　パーコール処理による精子濃度の改善率

3）精子濃度

図4はPercoll処理前後における精子濃度の改善の程度を示したもので，やはり処理後の精子数（/ml）を処理前のそれで除した値（%）で示した．しかしながら精子数に関しては，全体の72%でその濃度は逆にうすくなっていた．Percoll処理前後における濃度（Mean±S.D.）は処理前53.6±43.1，処理後44.1±42.9（P<0.01）で有意に精子濃度は希釈されていた．ただしここでいう精子濃度の変動は数値上のことで，精子の質的差異に関して対比はしていない．

4）直進運動精子濃度

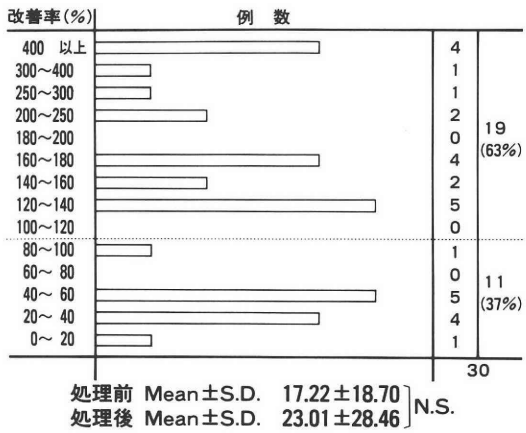


図5　パーコール処理による直進運動精子濃度の改善率

図5はPercoll処理前後での直進運動精子濃度の改善の程度を示したもので，精子の直進運動率（%）と精子濃度（/ml）より直進運動精子濃度を算出し，Percoll処理後の直進精子濃度を処理前のそれで除し

た値 (%) で示した．全体の 63 %でその濃度は改善されてはいたものの，統計学的に処理すると Mean±S.D.は，処理前 17.2±18.7，処理後 23.0±28.5 とばらつきが大きすぎるため，有意差は認められなかった．

表 2．精子回収率の比較

	Mean±S.D.(%)
① 精子回収率	16.08±10.08
② 運動精子回収率	22.16±20.53
③ 運動直進精子回収率	26.42±26.03

①−②　$p < 0.10$で有意差あり
①−③　$p < 0.05$で有意差あり

5）精子回収率

表 2 は Percoll 処理による精子回収率を，一般精子，運動精子，直進運動精子それぞれに関して統計的に比較検討したものである．精子回収率 16.1±10.1 %，運動精子回収率 22.2±20.5 %，そして直進運動精子回収率 26.4±26.0 %と，一般精子に比べ運動精子ではP＜0.1 で，その回収率は良好であった．さらに直進運動精子に関してはP＜0.05 で回収率に明らかな差がみられた．つまり本法においては，一般的に優良精子とされている直進運動精子が選択的に回収されることが証明できた．

表 3．精液中に出現した菌種（全28例）

菌　種	例数
Staphylococcus epidermidis	18
α-Streptococcus	11
γ-Streptococcus	11
Staphylococcus aureus	9
G(+)桿菌	8
Neisseria	5
Micrococcus	3
Enterococcus faecalis	2
真　菌	2
Acinetobacter lwoffii	1
G(+)短桿菌	1

6）精液中に出現した細菌の種類

表 3 に Percoll 処理前の原精液中に存在し，分離培地により同定された，すべての細菌を示した．検査を施行した 28 例中，無菌だった精液は一例もなく，その多くは下部尿道に常在する Staphylococcus epidermidis や α, γ-Streptococcus などであったが，Staphylococcus aureus や Neisseria なども分離された．

表 4．パーコール処理前後の細菌数

処理前の菌数	例数
10^6/mℓ以上	1
10^5～10^6	9
10^4～10^5	7
10^3～10^4	6
10^3未満	5
	28

処理後の菌数	例数	%
無　菌	5	17.9
減　少	20	71.4
不変または増加	3	10.7
	28	100

7）Percoll 処理後の精液中の細菌数

表 4 は Percoll 処理前の原精液中の細菌数と処理後の細菌数の変化を示したものである．原精液の細菌数をみると，10^4以上のものが，17 例 (60 %) と多かった．これに対し Percoll 処理後の細菌数は，まったく無菌になった 5 例を含め 25 例 (90 %) の細菌数の改善をみた．

考　察

妊娠が成立するためには男女両性が正常性機能をもつことが必要であり，どちらか一方でも性機能障害があれば妊娠の成立はむずかしい．不妊治療の最終目的が女性側の妊娠であり，また分娩により健全な生児を得ることにあるため，どうしても女性側の診断，治療あるいはその後の妊娠管理に重点をおいてしまい，男性側の不妊原因の検討が等閑に付されていることが決して少なくないと思われる．実際，男性側の検査としては，婦人科医が精液検査を行うのみで女性不妊の治療に入っていってしまうことが少なくないと思われる．

さて，男性不妊症に対する治療は大きく分けて 2 つあり，1 つは薬物療法に代表される精液そのものの性状を改善する方法と，もう 1 つは今回われわれが行った様に，射精された精液性状を改善する方法である．その他，精索静脈瘤などに対して行う手術療法がある．薬物療法[6]には，クロミフェン，ビタミン B_1，B_{12}，E，ATP，アミノ酸，カリクレイン，CoA，漢方薬などに代表される非ホルモン療法と，

HCG, PMSG. HMG. HMG-HCG, テストステロンなどのホルモン療法, その他副性器感染に用いられる抗生剤などがあげられる. 一般的には男性側のホルモン定量等の精査も行わないまま, 産婦人科にてほとんど盲目的に副作用の少ない非ホルモン剤等を, 長期に連用させている様な例も少なくないと思われる. しかしながら薬物療法の有効性にはおのずから限度があると考えられ, 必ずしも満足できる成績といえないものもかなりある.

今日, 最も一般的に行われている男性因子に対する治療法はA.I.H.であろう. この適応は精液性状不良, 性交障害, 性交後精子上昇試験陰性, 長期機能性不妊の4つに分けられるが, そのうち主な部分を占める精液性状不良例に対するA.I.H.の成績は特に低い. そこで, 射精された精液性状を改善し, A.I.H.に用いようとするいくつかの方法が考案され, 報告されてきた.

今回われわれが用いたのは, Pharmacia Fine Chemicals製のポリビニルピロリン被覆コロイドシリカゲル－Percoll－で, 浸透圧を増すことなく任意の密度を調整できる特性を有している. Percollは1963年Mateyko, Kopac[7]により遠心分離に使用できる媒体として報告されて以来, 細胞膜に浸透せず細胞に対して無毒であるなどの利点より, 血液や各種細胞の分離に用いられて来た. またForster[8]らにより, Percollを使用した洗滌濃縮精子を用いてのハムスターテストにて, 精子妊孕力に対してPercollは障害のないことが確認された.

これまでにPercollを用いての精子洗滌濃縮法として, 主に精子濃度の改善を目的とした20% Percollを用いた単層Percoll精子洗滌濃縮法[10]や, 活発な前進運動精子を選択的に濃縮し得る, 多層（4層, 8層, 12層）Percoll不連続密度勾配遠心分離法[10]などが報告されて来たが, 今回その簡便法ともいえる80% Percollによる攪拌密度勾配法による検討を行ったわけである. 同法の特徴は80% Percollと精液を攪拌することにより, 80% Percollと精液との間で連続した密度勾配を形成し, これを利用して多層Percoll不連続密度勾配遠心分離法と同様な効果を得ようとするものである.

今回のわれわれの成績では精子運動率に関しては, 全体の85％に改善が認められ, その改善率は平均約1.3倍だった. また精子奇形率は全体の87％に改善が認められ, 平均すると奇形精子出現率は0.56倍に減少した. 一方, 精子濃度に関しては, 全体の72％に逆に希釈されており, 平均約0.8倍に減少していた. その理由は原精液中に不良精子の割合が多かったことのみならず, 精液と80% Percollの層積面における攪拌が充分でなかったために, 密度界面が形成されてしまい, そこに精子がトラップされ, 回収率がおちたためと思われる. これは攪拌回数をもっと増加し, Percollと精液を充分に混和することにより, ある程度回避できると思われる. 事実, 今回のわれわれの方法での精子回収率は不良で, 一般精子として16.08±10.08%, また直進運動精子でも選択的に回収されているとはいえ26.42±26.03%と低い値であった. 真田ら[9]は20% Percollを用いた単層Percoll精子洗滌法にて, 精子濃度4.29±3.7倍(mean±S.D.), 精子運動率1.92±1.1倍(mean±S.D.)原精液に比して上昇したと報告している. 小塙ら[10]は, 不連続密度勾配遠心分離法を使用した4層Percoll精子洗滌法にて, 精子運動率はすべての例で改善し, 精子回収率は68.3±13.6％(mean±S.D.), 前進運動精子回収率は82.1±4.4％(mean±S.D.)であったと前者と同様にすぐれた成績を示した.

精液中の細菌に関しては, 多種の菌が見い出された. 大多数のものは性器の常在細菌叢に属するものであったが, 60％の例に10^4以上の細菌がみとめられ, 副性器感染が存在する可能性が示唆された. Percoll処理後の細菌数に関する検討であるが, 小塙ら[10]は4層Percoll不連続密度勾配遠心分離法による一例について検索して, ほぼ無菌になることを発表している. われわれの結果では28例中5例で無菌となっており, 全体の90％で菌数の減少をみた. ただし, もし攪拌を多く行えばそれだけ細菌の減少率も悪くなることが想像される. Percoll処理後の無菌化を図ることは, A.I.H.後の感染を予防する意味でも大切なことである.

さて, 現在この対象とした20例のうち, 妊娠の成立はわずか2例であるが, その一例は長期機能性不妊の一例で, 精液性状がその時によりかなり変化し, 良好な時Percollなしの A.I.H.にて妊娠した. 他の一例はPercoll処理精子によるA.I.H.により妊娠した逆行性射精の例であった.

長谷川ら[11]はPercoll処理精子の妊孕能をGelatin substrate slide test (G.S.S.T.)を使用して, 精子妊孕能の指標の一つであるacrosin proteolytic activity (A.P.A.)から検討し, Percoll選別精子は有意にA.P.A.も高値をとることを報告している. またForsterら[8]は60％, 70％, 80％, 90～100％の4種のPercollにて選別した精子でハムスターテストを行い, 同一症例の原精子で行った結果と比較を行っているが, 80％, 90～100％のPercollで選別された群において, 良好な成績を示すことを報告している. しかし高田

ら[12]は精子濃度 20×10⁶以下の 10 例，および機能性不妊の 4 例の精液を BWW 液により遠沈および swim up 法にて洗滌濃縮を行った実験群と，健康男子の正常精液で行った対照群を同じハムスター・テストによって比較すると，妊娠率は精子濃度，運動率のみに起因するものではなく，精子自体の受精能に問題があると反論している．いろいろな方法による選択良好精子の妊孕能に関する解析は，今後の課題であると思われる．

今回われわれは，多層 Percoll 不連続密度勾配法の簡便法ともいえる 80% Percoll 攪拌密度勾配法による選択精子の正常に関する検討を行った．比較的簡単に短時間に行えるこの方法は，一般外来ででも利用できる利点があり，また優良精子とされる直進運動精子を選択的に回収することがわかった．しかし回収率が悪く，手技に関する工夫，改良などが必要であると思われた．また精液中の細菌数に関しては充分な減少が期待できることがわかった．しかし実際に妊娠率をあげるためには，まず男性不妊患者に対する Hormonal な検索ばかりでなく，副性器感染症の有無を泌尿器科医と連携して解決していくこと，また選択精子の受精能を高める方法を考究していくことが肝要である．

本論文の要旨は第 32 回日本不妊学会学術講演会（於金沢市，1987）において発表した．

文　献

1）米谷国男，伊藤誠，高橋正明，千原啓，越知正憲：当大学病院開設後 10 年間における不妊症患者の統計的観察，日不妊会誌，30：28，1985.

2）杉並洋，黒田譲治，冨岡尚徳，矢野浩史：不妊症治療に関する 1 考察：当科不妊外来昭和 53～59 年受診患者の成績を基にして，日不妊会誌，32：518，1987.

3）吉野和男，高橋健太郎，松永功，沢田康治，渋川敏彦，北尾学：島根医大附属病院産婦人科不妊外来における臨床的統計，日不妊会誌，30：385，1985.

4）富田哲夫，桑原恕隆，杉浦幸一，石間友明，松井一成：当教室おける最近 5 年間の不妊症に関する統計的考察，日不妊会誌，28：94，1983.

5）兼子智：精子洗浄濃縮法．日本アンドロロジー学会第 5 回学術大会講演抄録集，p20.，1986.

6）長田尚夫，井上武夫，星野孝夫，矢島通孝：男性不妊症例における妊娠例の検討．日不妊会誌，31：540，1986.

7）Mateyko, G. M. and Kopac, M. J.: Cytophysical studies on living normol and neoplastic cells. Annals New York Academy of Sciences, 105: 185. 1963.

8）Forster, M. S. and Stenchever, M. A.: Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs. Fertil. Steril, 40: 655, 1983.

9）真田利男，小塙清，元山鎮夫，山口禎章，飯塚理八：密度勾配遠心分離法を使用した単層 Percoll 精子洗滌法の AIH への応用，日産婦関東連合地方部会会報，43：140，1986.

10）小塙清：人工受精，体外受精に供する精子調整法に関する研究—とくに Percoll 密度勾配遠心法を使用した精子洗滌濃縮法と良好精子の選択法—．慶應医学 62：351，1985.

11）長谷川剛志，平山寿雄，小田隆晴，広井正彦：多層パーコール精子洗滌法による精子選別と Acrosin proteolytic activity との相関．日不妊会誌，31：681，1986.

12）高田喜嗣，長谷川昭子，香山浩二，磯島晋三：乏精子症患者精子の受精能に関する研究：洗浄濃縮精子による受精率および透明帯除去ハムスター卵に対する in vitro に於ける受精能について，日産婦誌，33：2041，1981.

Characterization of the selected spermatozoa by means of the simplified Percoll density gradient stirring method

Masaaki Takahashi, Hiroshi Ishikawa, Yoko Yamamoto, Shigetoshi Morikawa, Masanori Ochi, Hiromu Chihara, Tetsuro Nagata and Kunio Kometani

Deparment of Obstetrics & Gynecology, Fujita Gakuen Health University Banbuntane Hotokukai Hospital, Aichi 454, Japan

Ninety semen samples obtained from 20 infertile husbands under AIH program were compared before and after the treatment by 80% Percoll density gradient stirring method.

The motility of sperm before and after the treatment was improved from 56.6%±19.4% to 71.4%±20.6% ($P<0.01$). Anomaly rate of spermatozoa went down satisfactorily from 9.8±5.5% to 5.4±4.0% ($P<0.01$). However, the concentration of spermatozoa (/ml×10⁶) decreased in number from 53.6±43.1 to 44.1±42.9 ($P<0.01$). Although the total number of spermatozoa, the number of motile spermatozoa and the number of straight-moving spermatozoa were recovered at the lower rate of 16.1±10.1, 22.2±20.5% and 26.4±26.0%, respectively, it was

found that the straight-moving spermatozoa were selectively recovered among three of them. A total of 28 sperm samples were also examined with respect to bacterial contamination before & after the treatment with Percoll. There was no aseptic sample before the treatment. Sixty percent of the samples were contaminated with over 10^4 numbers of bacteria. Twenty-five out of 28 samples (90%) were improved in number of bacteria. Five samples became aseptic after the treatment by this method.

As a conclusion, this simplified Percoll method was understood its usefulness for AIH and other fertilization programs.

(受付：1988 年 3 月 7 日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

ウシ頚管粘液 (Penetrak) を用いたヒト精子機能の評価

Evaluation of Human Sperm Function with Bovine Cervical Mucus (Penetrak)

群馬大学医学部産科婦人科学教室
中島敬和　水沼英樹　宇津木利雄
Yoshikazu NAKAJIMA　Hideki MIZUNUMA　Toshio UTSUGI
伊吹令人　五十嵐正雄
Yoshito IBUKI　Masao IGARASHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Gunma University Shcool of Medicine, 371 Japan

ウシ頚管粘液をガラス管に充填したPenetrak (in vitro sperm penetration test) を使用して得た結果と全精子濃度，全運動精子濃度，直進運動精子濃度，全運動率，直進運動率，Huhnerテスト，およびZona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) との関係を検討した．

1．Penetrakを使った精子の上昇距離（mm）は，74例で全精子濃度とは相関係数R＝0.459（P＜0.001），全運動精子濃度とはR＝0.632（P＜0.001），直進運動精子濃度とはR＝0.698（P＜0.001），全運動率とはR＝0.402（P＜0.01），直進運動率とはR＝0.497（P＜0.001）と，すべて有意に相関していた．

2．ZSPT（%）は40例で全運動率との間に相関係数R＝0.376（P＜0.05）の弱い有意の関係を認めただけであった．

3．PenetrakとZSPTとは，31例で相関係数R＝0.567（P＜0.01）と弱いながら有意の関係を示し，Penetrak良好な14例中ZSPT不良例はなかったが，Penetrak不良17例中ZSPT良好例は15例中88％に存在した．

4．Penetrakによる上昇距離は，Huhnerテスト良好群では33.7±14.6 mm，不良群では17.0±11.3 mmで両者間に有意差を認めた（P＜0.05）．

以上より，手技・判定が容易で客観性および再現性のあるPenetrakは，精子運動機能をみる一つの指標になりうると考えられる．また，Huhnerテストとよく相関することから，精子機能をみる意味のHuhnerテストの代用となり，ZSPTとの関係から，PenetrakはZSPTのスクリーニングとなりうる可能性があると思われる．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 126－133, 1989)

緒　言

従来から行なわれている精子運動機能評価法には，精子運動率，運動精子数，Huhnerテスト，Kremerテストなどが知られているが，それぞれ一長一短があり，特にHuhnerテストやKremerテストにおいては，対象となる頚管粘液の性状になどにより，その結果が大きく左右されるため精子運動機能の正確な評価は難しく，また個体間の比較はほとんど不可能に近い状態であった．

一方排卵前のウシの頚管粘液はヒトの排卵期頚管粘液と物理学的および生化学的性状が類似しているばかりでなく[1,2]，ヒト精子をよく通過させることが知られている[3,4]．Penetrak (SERONO DIAGNOSTICS 社) はこのウシの頚管粘液をガラス管に充塡したものであるが，今回，我々は Penetrak を用い，従来の一般精液検査法との比較を行ない，さらに精子受精能力評価法である Zona-free hamster egg sperm penetration test (以下 ZSPT) を同時に行ない，精子の運動能と受精能との関係を検討した．

対象および方法

対象は昭和62年3月より9月まで当院不妊外来を受診した25歳から45歳の男性患者58名83例で，用手的に採精後37℃で30分静置液化したのち以下の各検査を行なった．

一般精液検査法は Makler の計算板[5]を使用して，200倍の倍率で全精子濃度，全運動精子濃度，直進運動精子濃度，全運動率（全運動精子濃度÷全精子濃度），直進運動率（直進運動精子濃度÷全精子濃度）について調べた．

ウシの頚管粘液を用いた Penetrak とは，精子の貫通性をみる検査で，運動能を客観的に，より簡単に観察することを目的として開発されたもので，ウシの発情期頚管粘液のため一度に大量に収集でき，同一ロットでたくさんの検体に使えるが，我が国ではこれについての報告は乏しい[6]．

Penetrak を用いた検査手技は Instruction に従って行なった(表1)．すなわち添付の well 内に 0.2 ml の液化精液を注入し，ウシ頚管粘液を充塡したガラス毛細管を所定の部位でカットし，well 内に2本たてた．常温静置90分後，目盛の入ったスライドガラスの上にガラス管をのせ顕微鏡下100倍にて最大上昇距離を測定し，その2本の上昇距離の平均値をもって検体の運動距離とした．

表1　Test Procedure

Thaw two tubes at room temperature for 15 minutes, then break cleanly at score.
↓
Place 0.2 ml fully liquified semen into sample cup.
↓
Place both Penetrak tubes into the semen sample.
↓
Incubate at room temperature for 90 minutes.
↓
Remove one tube and wipe clean of residual specimen.
↓
Place tube on the calibrated slide, and read under phase optics microscope.
↓
Record distance traveled (in mm) by vanguard sperm.
↓
Remove second tube from specimen and repeat procedure.

一方 ZSPT は，Yanagimachi らの方法に準じて施行した[7]．すなわち，6週から8週令のゴールデンハムスターに，PMS 35 IU 投与し，その55時間後に HCG 50 IU 投与したのち，18時間後に卵管を摘出し，卵を採取した．Cumulus は 0.1% Hyaluronidase 処理5分，透明膜は 0.1% Trypsin 処理2分にて除去した．Medium は Ham's F 10 を使用した．

精子は37℃ 30分静置液化後10％非働化臍帯血清添加 Ham's F 10 にて洗浄したのち，5時間の Preincubation を行ない，上記処理卵と Interaction させ，5時間後 Orcein 染色し，位相差顕微鏡下で鏡検した．

貫通の有無の判定は，頭部膨化精子ないし尾部を伴った雄性前核が認められた場合を陽性とした．

今回，すべての検査および判定を同一検者が行なった．Penetrak は56名74例に施行し，32名40例については，ZSPT を行なった．このうち31例で Penetrak と ZSPT を同時に行なった．なお，各群間の有意差検定は Student t-test を用いて行なった．

結　果

1．Penetrak の検査値に影響を与える諸因子

①再現性（図1）

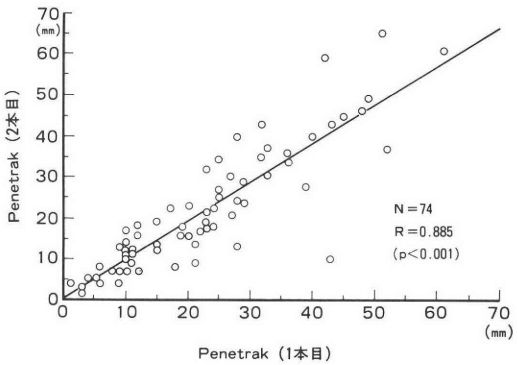


図1　Penetrak の再現性

Penetrak の再現性ないしバラツキをみる目的で同時に検査した74例同一検体2本間の相関を調べた．その結果，相関係数 R＝0.885，P＜0.001 と再現性良好であった．

②経時的変化（図2）

時間経過による精子上昇距離および設定された90

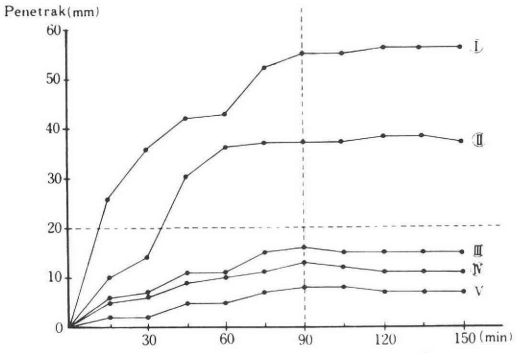


図2　精子上昇距離の経時的変化

分後に鏡検することが妥当かどうか検討する目的で，15分毎に150分まで経時的に変化を調べた．その結果，Penetrak不良例3例（図2のIII，IV，V）では90分前後，良好例2例（図2のI，II）では90分以後プラトーに達することが示され，90分で鏡検することは妥当と思われた．

③温度（図3）

Penetrakに及ぼす温度の影響を調べる目的で7例を用いて，常温(25℃)，37℃，4℃における精子上昇距離をみた．その結果，25℃で27.6±10.4 mmであったものが，37℃では33.1±18.4 mmとやや増加傾向が見られ，とくにPenetrak良好例にその傾向が強かったが有意差はなかった．一方，4℃では4.4±1.6 mmと25℃および37℃に比べて有意に低下していた（ともにP<0.01）．

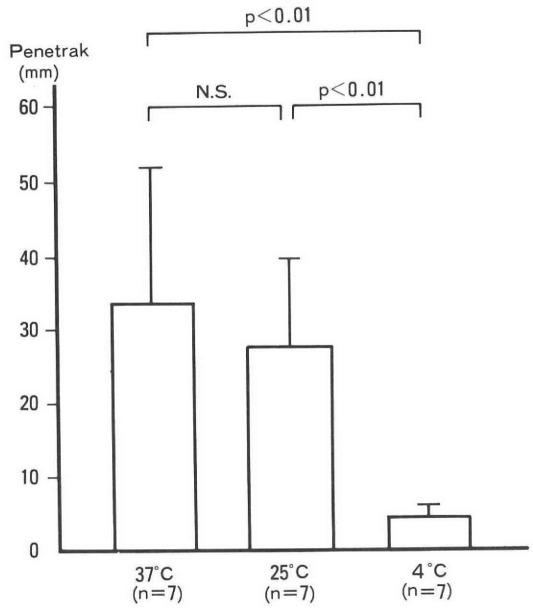


図3　温度とPenetrak

今回，正常な上昇を行ないうる最低温度，最高温度の検討は行なわなかったが，今回のデータから判断する限り，25℃以上37℃まではほぼ安定した上昇を示すことが示唆された．

2．従来の精液検査とPenetrak, ZSPTとの関係（今回検定に用いた対象の精液所見を表2に示した．）

精子の運動能を評価すると考えられるPenetrakが従来の精液検査のいかなる部分を反映しているのか，また受精能をみるとされるZSPTは従来の検査とどのような関係があるのか調べる目的で以下の検討を行なった．

①全精子濃度との相関（図4）

表2　精液検査結果

	Number	Mean	Range	S.E.
全精子濃度	83	5280万/mℓ	50～41,000万/mℓ	687
全運動精子濃度	83	2520万/mℓ	0～18,000万/mℓ	365
直進運動精子濃度	83	1750万/mℓ	0～15,000万/mℓ	281
全運動率	83	44.2%	0～93%	2.43
直進運動率	83	29.9%	0～89%	2.24
Penetrak	74	22.0mm	2.5～58mm	1.58
ZSPT	40	36.3%	0～86%	3.52

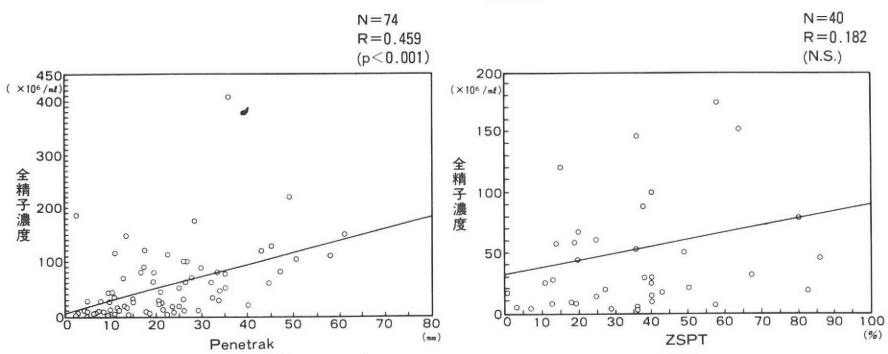


図4　全精子濃度とPenetrak，ZSPTの相関

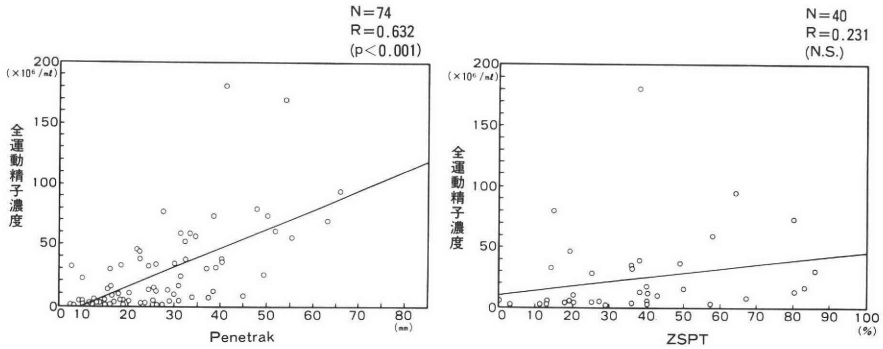


図5　全運動精子濃度と Penetrak，ZSPT の相関

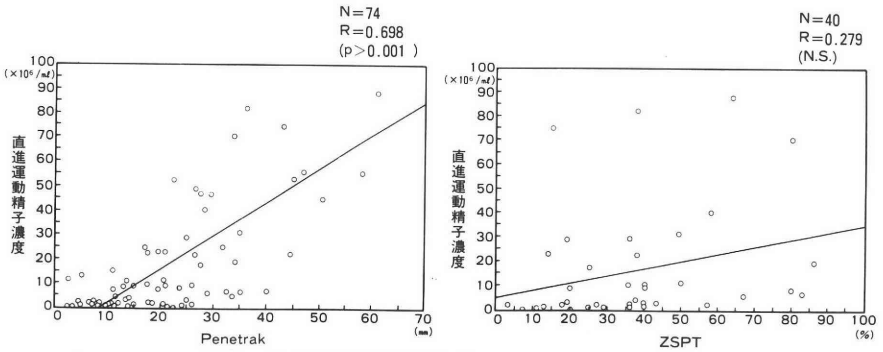


図6　直進運動精子濃度と Penetrak，ZSPT の相関

全精子濃度は74例の Penetrak との間で R＝0.459，P＜0.001 と有意の相関を示したが，40例の ZSPT との間には有意の関係はみられなかった．

②全運動精子濃度との相関（図5）

全運動精子濃度は74例の Penetrak との間で R＝0.632，P＜0.001 と有意の相関を示したが，40例の ZSPT との間では有意の関係はなかった．

③直進運動精子濃度との相関（図6）

直進運動精子濃度は74例の Penetrak との間で R＝0.698，P＜0.001 と最もよく有意の相関を示したが，40例の ZSPT との間では有意の関係を示さなかった．

④全運動率との相関（図7）

全運動率は74例の Penetrak との間で R＝0.402，P＜0.01 との有意の関係を示し，また40例の ZSPT との間でも R＝0.376，P＜0.05 と有意の相関を示した．

⑤直進運動率との相関（図8）

直進運動率は74例の Penetrak との間で R＝0.497，P＜0.001 と有意の相関を示したが，40例の ZSPT との間では有意の関係を示さなかった．

以上のように，Penetrak は従来の精液機能検査の

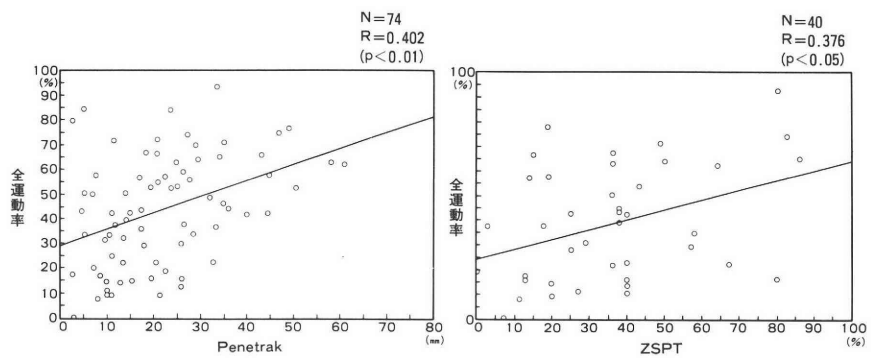


図7　全運動率と Penetrak，ZSPT の相関

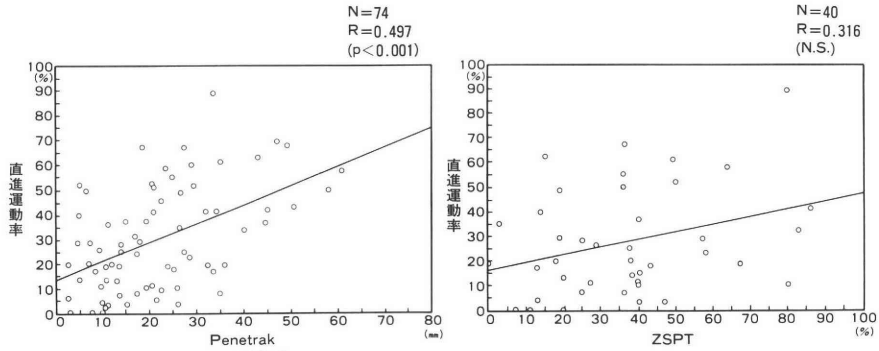


図 8　直進運動率と Penetrak，ZSPT の相関

うち，上記 5 つのパラメーターすべてとかなりよく相関しており，とくに in vivo で卵管内到達精子数とよく相関するとされる[8]直進運動精子濃度ともっともよく相関していた．

一方，in vitro における精子受精能検査とされる ZSPT は，従来の精液検査のうち，全運動率とのみ弱い相関を認めただけであり，他の要素とは有意の関係を認めなかった．

3．Penetrak と ZSPT との相関（図 9）

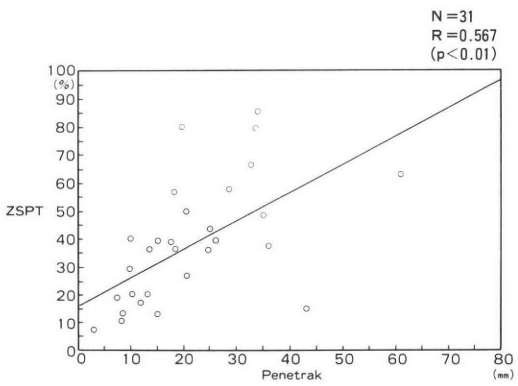


図 9　Penetrak と ZSPT の相関

Penetrak による精子運動能と ZSPT により判定した精子受精能との関係をみる目的で両者について相関の有無を検討した．31 例で調べた Penetrak と ZSPT との相関係数は R＝0.567，P＜0.01 と有意の関係を認めた．しかしながら，Penetrak が不良であっても ZSPT は良好，すなわち運動能と受精能の解離を示す症例が存在した．

そこで Takemoto らの報告[9]に基づき ZSPT の正常値を 10 %以上とし，また Penetrak の正常値を 20 mm 以上（設定された基準は，Penetrak 20 mm 以下を不良，20 mm から 30 mm を判定保留，30 mm 以上を良好として判定しているが，今回便宜的に 20 mm で 2 つの群に分けた）としてすべての症例を分類してみた（表 3）．

表 3　Penetrak と ZSPT の関係

		Penetrak	
		good	poor
ZSPT	good	14	15
	poor	0	2

Penetrak ： poor ＝ 0～20㎜未満
　　good ＝ 20㎜以上

ZSPT ： poor ＝ 0～10%未満
　　good ＝ 10%以上

Penetrak-good で ZSPT-good は 14 例（45 %），Penetrak-poor で ZSPT-good は 15 例（48 %），Penetrak-poor で ZSPT-poor は 2 例（7 %）となり，Penetrak-good で ZSPT-poor の症例は存在しなかった．　以上の結果より，Penetrak 良好例では全例 ZSPT 良好であり，一方 Penetrak 不良例では ZSPT 良好例と不良例に分かれることが明らかとなった．

4．Penetrak と Huhner テスト

Huhner テストは精子と頚管粘液の適合性を見るもので日常最も汎用されている検査であり，in vitro のウシ頚管粘液貫通能検査である Penetrak と比較した．

今回我々は，Huhner テストの判定を以下の基準で行なった．

良好：強拡大にて精子が 10 以上で，かつ運動精子が 5 以上存在する場合

不良：運動精子が存在しない場合

判定保留：上記条件を満たさない場合

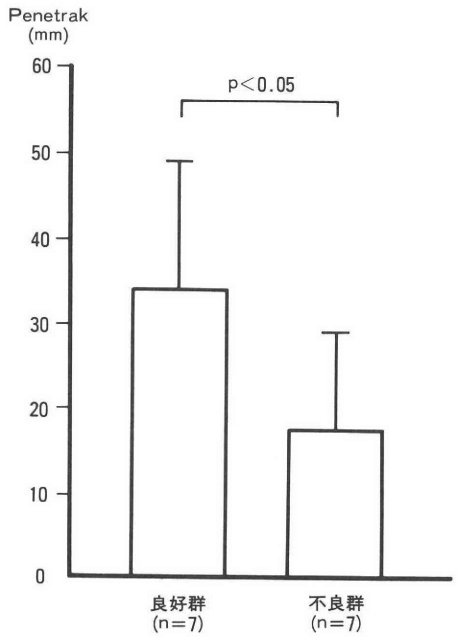


図10　Penetrak と Huhner テストの関係

判定保留13例を除く結果を図10に示す.

良好群：33.7±14.6 mm（n＝7）

不良群：17.0±11.3 mm（n＝7）

であり，P<0.05で有意差を認め，Penetrak は精子機能をみる意味の Huhner テストの代用となりうると考えられた.

考　察

精子機能の客観的評価法として，精子の運動率，精子数，直進運動精子数など主に精液中における精子の数量的な計算法が最も一般的であり，今なお多くの施設において汎用されているが，この方法では採精精子の性状，鏡検部位，検者間によりかなりのバラツキがあるのも事実である．しかしながら古くから，直進運動精子数と妊娠率は関係がある[10]と考えられ，また元島[8]は卵管内精子数は，inseminate した精液の精子数，殊に運動性のある精子の数と深い比例関係をみており，計数的な精液検査法は，ある程度スクーリニングとしての使命を果たしているものと考えられる.

一方，最近になって，Yanagimachi ら[7]はヒト精子が透明膜除去後のハムスター卵内へ侵入できる現象を見出し，これをハムスターテスト（ZSPT）と名付け，以来精子の持つ受精能の一般的な検査法として臨床応用されるようになった.

これらのことは，精子の機能には運動能および受精能の2面があり，それぞれ別個に評価されるべきことを示唆するものである.

従来，精子の運動能の評価は，前述のように簡便な計算板を用いて測定しており，また最近では精度の向上を目差して，顕微鏡写真[11]や映画を撮影して運動精子の軌跡を解析する方法[12]，レーザーを利用して運動精子の運動を解析する方法[13]などが開発されているが，特殊な装置のためコストが高く，スペースも必要であったり，時間のかかるものもあり，まだ一般的とは言えない．そのうえ，これらの方法は根本的には精液中における精子の運動を観察する方法であって，その精子の妊孕性を正確に評価する方法とは言い難い．なぜなら妊娠に直接関与する精子は，精液中を浮遊する精子ではなく，頚管粘液中を侵入し，子宮腔内および卵管内を進行し，卵子と受精できる能力のある精子であるからである.

第一関門としての精子－頚管粘液の適合性の有無は，精子の妊孕能を評価するうえで最も primitive であり，かつ重要な検査方法であると言える．従来，この目的のために，Huhner テストが最も広く導入されてきているが，これはあくまでも夫婦間の適合性を判定する検査であり，頚管粘液の性状（量，質，感染症の有無など）により，大きく左右されるという欠点のため，客観的かつ絶対的な運動能の評価をするうえで，いろいろ不便な点があった．また精子卵管内到達の第一関門としての頚管粘液中には，精子運動を抑制する作用を持つマクロファージや，特殊な抗体が存在する[14]ことは良く知られた事実である.

今回使用した Penetrak は，女性側因子を除外し，常に一定の条件下で精子の機能を評価することができ，Huhner テストの欠点を補なう画期的な検査法となり得る可能性を持つと思われる．今回，我々の行った Huhner テスト良好群，不良群との間の運動距離において宮崎[6]らの報告と同様に有意差を認めた．本検査の最大の懸念は，ヒト頚管粘液の代わりにウシの頚管粘液を使用している点であるが，ヒト頚管粘液とウシ頚管粘液は，レオロジカルにも[1]，糖蛋白の組成においても極めて類似している[2]ことが知られ，ウシ頚管粘液もヒト精子をよく通過させ，運動様式も似ていることが報告されている[3,4]．しかしながら，ヒト精子は，ヒト頚管粘液中に比べ，ウシ頚管粘液中ではその進行速度が変化するという報告もあり[15]，両者が必ずしも同等とは言い難いようである．恐らく種特異性に基づく差などが精子の進行速度に影響を与えていると思われる.

Penetrak が一般の臨床検査に十分使用され得るか

否かは，Penetrak を用いて得られる測定値が，測定環境や測定手技にどれだけの影響を受けずに済むかということであるが，我々が行なった限りでは，外的温度の影響では25℃以上ではほぼ安定していること，2本間の相関も R＝0.885, P＜0.001 と再現性も極めて良好であることが示され，また Penetrak は冷凍保存後融解して実験に使用するが，この頚管粘液も新鮮な頚管粘液中と同様にヒト精子が有意差なく進入すると報告されている[16]．

精子進入距離の判定は，検査開始後90分で行なうよう Instruction では指示してあるが，図1に見るように各検体間でピークに達する時間は多少異なるが，90分以後減弱する例もみられることから，90分での判定は合理的であると考えられる．

今回，各種精液所見と Penetrak を用いた精子の運動距離との相関を調べたが，全精子濃度，全運動精子濃度，直進運動精子濃度，全運動率，直進運動率のすべてのパラメーターと Penetrak の進入距離との間には有意の正の相関を示した．この中で，特に全運動精子濃度，直進運動精子濃度との間では，それぞれ R＝0.632，R＝0.698 と高い相関が得られたが臨床的に卵管内到達する精子数は，特に直進運動精子濃度と相関することが示されており[8]，間接的ながら Penetrak の成績が卵管内進入能を反映していることを支持するものとして興味深い．

従来の精液所見と Penetrak との間には有意の正の相関が得られたのに対し，精液所見と ZSPT との間には，わずかに全運動率との間に極めて弱い相関がみられただけであった．ZSPT は，精子の卵内への侵入能，換言するなら受精能を見る検査として利用されている検査法であるが，Rogers らも ZSPT と精子濃度，運動率との間に相関はなかった[17]と報告しており，従来の精液所見とは必ずしも平行関係にあるとは限らないようである．そのうえ，ZSPT はコストや時間がかかり，手技が難しく，各施設で受精率にバラツキがあるため，その評価・判定をめぐって論議のある検査である[18,19]．

一方，ZSPT と Penetrak とは，R＝0.567 (P＜0.01) の正の有意の相関が得られた．このことは，Penetrak 良好例，すなわち運動能の良好な精子はある程度受精能も良好であることを示唆するものと思われるが，実際に表3に示したように Penetrak にて良好と診断された症例では，ZSPT 不良例が1例も存在しなかったという事実からも裏付けられると思われる．

今回，我々は，ZSPT，Penetrak の正常値(cut-off 値) をそれぞれ，10％以上，20 mm 以上としたが，この cut-off 値をどこに設定するかによって，表3に示した結果にも若干の変更が加わる可能性はある．それでも，今回の我々のデータは運動能の良好な精子は受精能も良好に保持していることを示すもので，Penetrak は，精子運動能の新しい評価法であり，ZSPT のスクリーニングとなりうる可能性があると思われる．

稿を終わるにあたり本研究のため Penetrak を提供して下さいましたセローノ・ジャパン(株)に深謝致します。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) Lee, W. I., Verdugo, P., Blandau, R. J. and Gaddum-Rosse, P.: Molecular arrangement of cervical mucus: a reevaluation based on laser lightscattering spectoscopy. Gynecol. Invest., 8: 254, 1977.
2) Meyer, F. A.: Camparison of structural glycoproteins from mucus of different sources. Biochem. Biophys. Acta, 493, 272, 1977.
3) Alexander, N. J.: Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil. Steril. 36: 201, 1981.
4) Moghissi, K. S., Segal, S., Meinhold, D. and Agronow S. J.: In vitro sperm cervical mucus penetration: Studies in human and bovine cervical mucus. Fertil. Steril., 37: 823, 1982.
5) Makler, A.: The improved ten-micrometer chamters for raped sperm count and motility evaluation. Fertil. Steril. 33: 337, 1980.
6) 宮崎豊彦，田辺清男，名取道也，青木　類，遠藤勝英，小林俊文，飯塚理八：ウシ頚管粘液を用いたヒト精子の運動性評価．日不妊会誌，32：630，1987.
7) Yanagimachi, R., Yanagimachi H. and Rogers B. J.: The use of zona free of animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Bio. Reprod. 15: 471, 1976.
8) 元島正信：精子の女性性器内移動について．日不妊誌，20：86，1975.
9) Takemoto, F. S., Rogers, B. J., Wiltbank, M. C., Soderdahl, D. W., Vaughn, W. K., and Hale, R. W.: Comparison of the penetration ability of human spermatozoa into bovine cervical mucus and zona-free hamster eggs. Journal. Andrology. 6: 162, 1985.
10) MacLeod, J. and Gold, R. Z.: The male factor in fertility and infertility. Fertil. Steril., 4: 10, 1953.
11) Janick, J. and Maclod, J.: The measurement of human spermatozoa motility. Fertil. Steril., 21: 140, 1970.

12) Philips, D. M.: Comparative analysis of mammalian sperm motility. J. Cell Biol., 53: 561, 1972.
13) Touannet, P.: Measurement of human sperm motility of an optical doppler effect. 427 Urban and Schwarzouberg, 1979.
14) Manarang, P. S. and Behrman, S. J.: Spermatoxicity of immune sera in human infertility. Fertil. Steril., 22: 145, 1971.
15) Gaddum-Rosse, P., Blandau, R. J., Lee, W. I.: Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II. human spermatozoa in bovine mucus. Fertil. Steril., 33: 644, 1980.
16) Bergman, A., Anti, A., David, M. P., Homonnai, Z. T., Paz, G. F.: Penetration pf human eiaculated spermatozoa into human and bovine cervical mucus. I. correlation between penetration values. Fertil. Steril., 36: 363, 1981.
17) Rogers, R. J., Van Campen, H., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. Fertil. Steril., 32: 664, 1979.
18) 井上正人，小林善宗，本田育子，金子みつ恵，藤井明和：精子の受精能力検査—透明除去帯ハムスター卵子貫通試験—：ペリネイタルケア，4：247，1985.
19) Yanagimachi, R.: Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamate Reseach, 10: 187, 1984.

Evaluation of Human Sperm Function with Bovine Cervical Mucus (Penetrak)

Yoshikazu Nakajima, Hideki Mizunuma
Toshio Utsugi, Yoshito Ibuki
and Masao Igarashi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Gunma University Shool of Medicine.

In vitro cervical mucus penetration test (Penetrak) is a new and simple test which measures forward migration of sperm into capillary tube filled with bovine cervical mucus. In this study we attempted to evaluate clinical usability of Penetrak test by comparing with routine semen analysis and sperm penetration test using zona-free hamster eggs, and the following results were obtained.

(1) Penetrak showed significant correlation with each parameter of routine semen analysis such as total sperm concentration ($r=0.459$, $P<0.001$), total motile sperm concentration ($r=0.632$, $P<0.001$), progressive motile sperm concentration ($r=0.698$, $P<0.001$), total motile sperm rate ($r=0.402$, $P<0.01$) and progressive motile sperm rate ($r=0.497$, $P<0.001$). On the other hand, ZSPT showed no significant correlation with routine semen analysis except total motile sperm rate alone ($r=0.376$, $P<0.05$).

(2) Weak but significant correlation was found between Penetrak test and ZSPT ($r=0.567$, $P<0.01$).

(3) Every semen sample which was evaluated normal by Penetrak, was also showed positive ZSPT, while 88% of the semen samples which showed abnormal migration by Penetrak were positive by ZSPT.

(4) The mean sperm migration rate by Penetrak of patients with good postcoital test was 33.7 ± 14.6mm, While that of those with poor postcoital test 17.0 ± 11.3 respectively.

Thus, present study demonstrated that Penetrak is reliable to assess the quality of sperm in terms of motility, concentration and ability to penetrate zona-free hamster eggs. In addition, it is suggested that Penetrak can serve as an alternative not only to postcoital test but also to ZSPT.

(受付：1988年8月4日特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

乏精子症患者精子の精子機能に関する検討
—ヒト・ウシ頚管粘液内通過能ならびに透明帯除去ハムスター卵による受精能について—

Sperm Function in Cases of Oligozoospermia: Evaluation by Sperm Penetration Test with Human and Bovine Cervical Mucus and Zona-Free Hamster Oocyte

宝塚市立病院産婦人科
伊熊健一郎　須野成夫
Kenichiro IKUMA　Shigeo SUNO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Takarazuka Municipal Hospital, Hyogo, 665 Japan

兵庫医科大学産科婦人科学教室
松田孝之　長谷川昭子　香山浩二
Takayuki MATSUDA　Akiko HASEGAWA　Koji KOYAMA
礒島晋三
Shinzo ISOJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hyogo Medical College, Hyogo, 663 Japan

ヒトおよびウシ頚管粘液(CM)を用いて，乏精子症患者精子のCM内精子通過能について検討をすると共に，透明帯除去ハムスター卵を用いたin vitro受精系を用いて乏精子症患者精子の受精能について検討を加えた．

1）ウシCMとヒトCMの性状には大差はないが，採取量ではヒトCMの0.2～0.5mlに対して，ウシCMでは5～30mlの大量採取が可能であった．

2）乏精子症患者精液を用いた精子CM内通過試験では，両CM内での精子の動態はほぼ同様であり，6時間までの検査であればウシCMはヒトCMの代用が可能であった．

3）乏精子症患者精子の透明帯除去ハムスター卵の受精率は，正常男性精子の受精率74.7％(124/166)に対して，18例中12例が受精率0％で，他の6例においても5～33％で平均は15％(9/60)であった．

4）乏精子症患者精子のCM内通過性不良群のPoorやNegativeを示す症例の精子受精率は0％で，また通過性がGoodと判定された症例においても受精率は0～20％と悪かった．

以上の結果より，男性不妊症例の中でも特に乏精子症症例においては，従来の精液の性状検査以外に，ヒトまたはウシCMを使用した精子CM内通過能検査に加えて，透明帯除去ハムスター卵を使用した受精能検査による精子自体の機能検査が必要であることが明らかとなった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1),134－141, 1989)

緒　言

男性側の不妊症の検査として，従来の精液量・精子数・運動率・奇形率等の精液の性状検査以外に，最近では，精子の頚管粘液 (CM) 内通過性検査や動物卵を用いた精子受精能検査といった，精子自体の生殖機能についての検討が注目されるようになって来ている．

精子 CM 内通過性検査としては，古くより in vivo 検査としての Post Coital Test (Huhner Test[1])，in virto 検査としての Sperm CM Contact Test (Miller-Kurzrok Test[2])や Sperm Penetration Test (Kremer Test[3])等が臨床的に汎用されてきた．最近では人工 CM[4,5]やウシ CM[6,7,8]を用いた精子通過試験も検討されはじめている．

また，精子の受精能検査については，1976年に Overstreet ら[9]は，死体から採取したヒト卵を用いた in vitro での受精実験系を確立したが，同年に，Yanagimachi ら[10]は透明帯除去ハムスター卵とヒト精子との融合に初めて成功した．以来，この透明帯除去ハムスター卵を用いたヒト精子の受精能検査については数多くの報告[11~14]がなされ，臨床検査の地位を確立して来た．著者らも，この受精能検査を臨床検査に応用すると同時に，各種臨床研究の研究手段に応用し興味ある研究成果を報告してきた[15~19]．

精子濃度と妊娠率に関しては必ずしも統一した見解はないが，一般的には乏精子症 (20×10^6/ml 以下の精子濃度) では妊娠率が極めて悪いことが認められており[20]，doner 精液を用いて行なう AID や頚管不妊因子のために行なう AIH の妊娠成功率に比べて，乏精子症男性不妊因子に対して行なわれる AIH の妊娠成功率の極めて低いことが報告されている[21,22]．乏精子症患者の妊娠率を良くするための手段として，分画射精精液[23,24]，アルブミン溶液カラムによる分画活動精子[25,26]，あるいは我々の洗浄濃縮活動精子[18]等を用いた AIH が試みられているが，依然として妊孕率は低く，乏精子症患者精子には精子濃度や精子運動性等の因子以外に，受精能そのものが障害されている可能性が考えられている．

本論文では，乏精子症患者精子を用いて，精子の CM 内通過能についてウシ CM とヒト CM とでの比較検討と共に，透明帯除去ハムスター卵に対する受精能についても検討を加えた．

方　法

1．ヒト CM およびウシ CM の採取

採取方法の詳細については既に報告したが[8]，ヒト CM は血中精子不動化抗体を保有しない正常月経周期婦人より排卵1～2日前のものを，またウシ CM は発情期の未経産 Holstein 乳牛より採取した．両 CM は色調・粘稠性・シダ状結晶形成・牽糸性・pH・採取量等を調べた後，後述の Kremer 試験により，正常精子が2時間以内に 5cm 以上上昇し得る Good と判定した CM をプラスチック製小容器に入れ，−20℃で凍結保存し，実験に際しては室温で融解後直ちに実験に用いた．

2．精液採取

乏精子症患者は，不妊外来受診患者の夫で，血中精子不動化抗体を保有せずに，精子濃度が 20×10^6/ml 以下で，女性側には不妊症の原因が認められない男性を対象とし，精液は用手方で採取した．他方，正常精子は精子濃度 40×10^6/ml 以上で運動率が 70%以上の血中精子不動化抗体を保有しなくて，妊孕性が判明している健康男性より採取した．

3．in vitro 精子 CM 内通過試験 (Kremer 試験)

本法の詳細については既に報告したが[8,27]，要旨は写真1に示すようにヘマトクリット毛細管 (1.5×75mm) に CM を約 6cm 吸引し，一端をテルモシール (仁丹テルモ K.K.) で密閉し他端を精液貯溜槽 (径 3mm，高さ 15mm のガラス容器) に浸して直立させ，精子の経時的 (30分，1時間，2時間，3時間，6時間，12時間，24時間) 上昇距離ならびに各距離 (1cm, 3cm, 5cm) での上昇精子数・運動率・生存時間等を顕微鏡下 (100倍) で判定するものである．実際の臨床応用に際しては簡便法として，先行精子の経時的な上昇距離のみを測定し，その判定は下記に示す従来の我々の基準を採用した．

Good：2時間以内に運動精子が 5cm 以上上昇するもの

Fair：2～6時間で運動精子が 5cm 以上上昇するもの

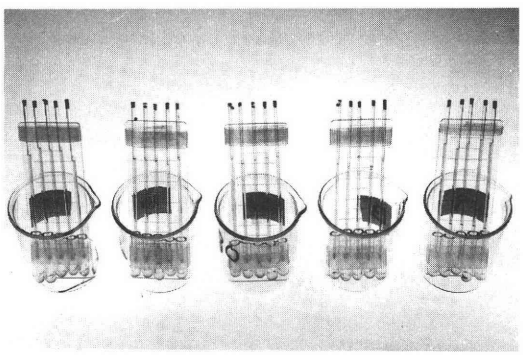


写真1　Procedure for the sperm penetration test by Kremer's method.

Poor：2～6時間で運動精子が1～4.9cmの範囲にとどまるもの
Negative：6時間で運動精子が0.9cm以下であるか，または全く運動精子を認めないもの

4．透明帯除去ハムスター卵の調整方法と洗浄精子の調整方法

その方法の概略を図1に示す．まずハムスター卵は，成熟雌ゴールデンハムスター（8週命）の発情前期に，PMS50単位と54時間後にhCG50単位の腹腔内投与による過排卵処置をし，hCG投与後17時間目に開腹して卵管より採卵した．直径35mm深さ10mmのPetri Dish (Falcon No. 1008) のパラフィンオイル下のBiggers-Whitten-Whittengham (BWW) 培養液[28]0.2mlの中にこれらの卵を浮遊させ，0.1%の割合でhyaluronidaseを加えて10分間反応させて卵丘細胞を除去し，次いでBWW液で洗浄後，0.1% Trypsin BWW液中で1分間反応させて透明帯を溶解除去した後，新たなBWW液中に移したものを透明帯除去ハムスター卵として実験に用いた．

次いで精子の調整は，室温にて30分間放置液化させた精液にBWW液12mlを加え，キムワイプ（十條キンバリーK.K.）で濾過し，600Gで5分間遠沈し，沈殿精子をさらにBWW液で2回洗浄した．この洗浄精子をパラフィンオイル下のBWW液0.2ml中に入れ，37℃の5%炭酸ガス培養器内で5時間前培養を行ないcapacitationを誘導させた精子を受精実験に用いた．

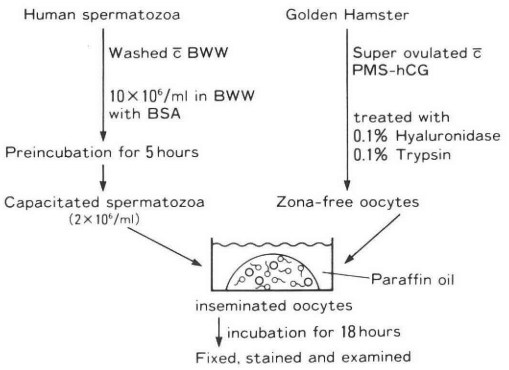


図1　Procedure for in vitro fertilization

5．透明帯除去ハムスター卵の受精実験方法と受精卵の判定方法

受精に際しては，パラフィンオイル下のBWW培養液中に透明帯除去ハムスター卵とcapacitation後の精子 (2×10^6ml) を加え，37℃の5%炭酸ガス培養器内で本培養を行なった．正常精子を用いて培養時間と受精率の関係を検討したところ，18時間の培養が高率で安定した受精率が得られた（表3）ことより，以降は18時間本培養を行なった．

受精の判定としては，精子と一緒に培養した卵を取り出し，5%ホルマリン液で卵を固定し，0.25%ラクモイド液で染色した後，位相差顕微鏡下で，卵細胞質内に膨化精子の頭部および尾部の検出の有無で受精を判定した．写真2は受精卵を示しており，膨化精子頭部と尾部が観察される．右側の精子は卵に結合をしているが受精はしていない．

結　果

1．ヒトCMとウシCMの比較

正常精液を用いたKremer試験でGoodと判定されたヒトCMとウシCMの物理科学的性状の比較検討を表1に示すが，pH・牽糸性・シダ状結晶形成（写真3）は両者で極めて類似している．ただ1回のCM

表3　Effect of incubation time on in vitro fertilization

Time (hr)	No. of examined eggs	No. of fertilized eggs	%
5 + 2	15	2	13
3	14	5	36
4	15	5	33
5	14	7	50
18	14	12	86

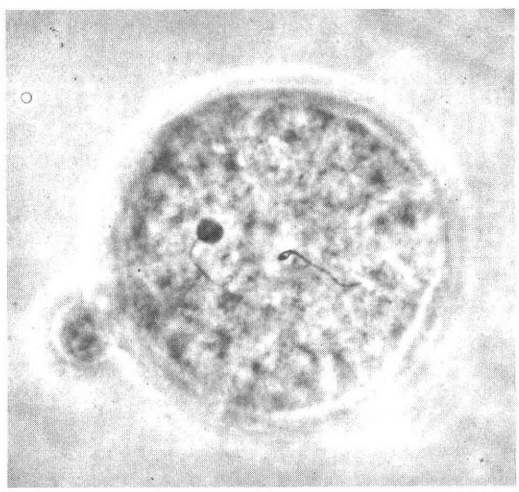


写真2　Zona-free hamster egg inseminated with human spermatozoa. One penetrated spermatozoon with enlarged head and tail and another spermatozoon binded to membran were visible.

採取量は，ヒトの0.2～0.5mlに比べてウシでは5～30mlと数十倍から百倍近くも大量に採取が可能である．

2．ヒトCMとウシCM内での乏精子症患者精子の動態

乏精子症患者精子を用いたKremer試験を行なった際における1cmの場所での精子運動性(生存時間)を2時間・6時間・12時間・24時間後に比較検討した(図2)．ヒトCM内では，それぞれ100％・88％・73％・20％で，ウシCM内では100％・54％・9％・0％と12時間以降は極端に低下したが，6時間までの精子CM内通過性に対しては判定可能とした．図3には6症例の乏精子症患者精液での精子上昇状態についてヒトCMとウシCMとで比較したものである．Goog・Fairを示す症例A・B, Poorを示すC・D, NegativeのE・Fとそれぞれ両CM内での精子

表1　Comparison of physical properties of Human CM and Bovine CM.

	Human CM	Bovine CM
Volume	0.2～0.5ml	5～30ml
PH	6.6～7.8	6.8～7.8
Spinnbarkeit	15～20cm	15～20cm
Ferning	＋～＋＋	＋～＋＋

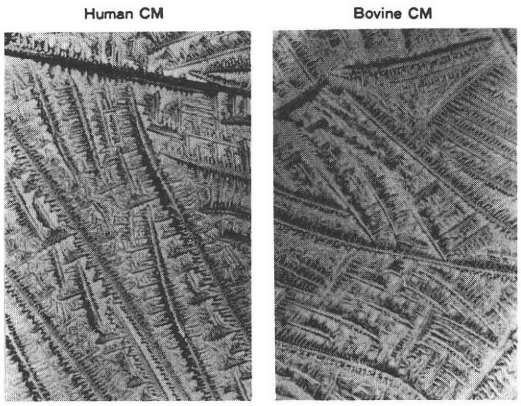


写真3　Comparison of ferning patterns of Human CM and Bovine CM.

上昇性は極めて類似している．さらに症例を増やして表2に示している．これらの結果は乏精子症患者精子のCM内通過能を検討する上において，ウシCMはヒトCMに充分代用し得るものと考えられる．

3．正常男性精子を用いた受精に要する時間の検討

受精率を安定にする目的で，本培養時間を検討したものを表3に示す．2時間・3時間・4時間・5

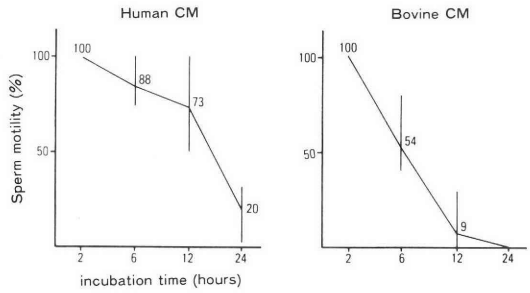


図2　Comparison of the sperm motility from oligozoospermic semen in Human CM and Bovine CM.

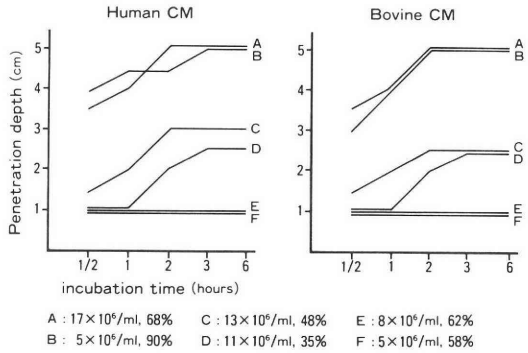


図3　Comparison of the penetration depth of spermatozoa from oligozoospermic semen in Human CM and Bovine CM.

時間・18時間培養したところ，受精率はそれぞれ13％・36％・33％・50％・86％で，乏精子症患者精子の受精実験には18時間の本培養が適当であると判断して行なった．

4．乏精子症患者精子による受精率

表4に示すごとく，対照として妊孕性が判明している男性精子の受精率が74.7％であった受精系において，18症例中12症例において受精率が0％で，他の6症例においても33％・20.0％・16.7％・14.3％・10.0％・5.0％，平均で15％ (9/60) と非常に受精率が低かった．

5．乏精子症患者精子のウシCM・ヒトCM内通過性ならびにその精子の受精率との比較検討

表5のごとくに，精子通過性が不良なNegative・Poorを示す3症例の精子の受精率は0％であり，たとえ通過性が良好なGoodの3症例の精子でも受精率は20.0％・16.7％・0％と極めて低率であった．

表2 Comparison of the sperm penetration test with oligozoospermic semen in Human CM and Bovine CM

	Patients name	age	Sperm counts ($\times 10^6$/mℓ)	Sperm motility (%)	Sperm penetration test	
					Human CM	Bovine CM
1.	E. N.	34	30	79	Good	Good
2.	M. T.	33	24	35	Poor	Poor
3.	K. K.	34	18	42	Good	Fair
4.	K. Y.	33	17	68	Good	Good
5.	I. M.	33	13	48	Poor	Poor
6.	N. N.	31	11	35	Poor	Poor
7.	A. K.	28	6	62	Poor	Poor
8.	A. K.	30	5	90	Good	Fair
9.	M. S.	31	4	30	Poor	Poor
10.	J. N.	27	3	22	Negative	Negative
11.	I. K.	33	2	44	Poor	Poor
12.	Y. A.	32	2	40	Poor	Poor

表4 In vitro fertilization rates of zona free hamster eggs by spermatozoa from patients with oligozoospermia.

Patients name	age	Sperm counts before treatment ($\times 10^6$/ml)	No. of examined eggs	No. of fertilized eggs	Fertilization rates (%)
1. H. T.	44	20～30	12	4	33.3
2. E. N.	34	〃	5	1	20.0
3. K. K.	34	10～20	6	1	16.7
4. T. S.	35	〃	7	1	14.3
5. K. S.	32	〃	6	0	0
6. A. K.	32	〃	8	0	0
7. K. Y.	33	〃	4	0	0
8. I. M.	33	〃	4	0	0
9. N. N.	31	〃	4	0	0
10. A. A.	35	＜10	10	1	10.0
11. T. H.	45	〃	20	1	5.0
12. T. K.	35	〃	6	0	0
13. S. K.	32	〃	11	0	0
14. T. Y.	35	〃	10	0	0
15. R. U.	32	〃	19	0	0
16. T. T.	34	〃	18	0	0
17. Y. S.	28	〃	12	0	0
18. J. N.	27	〃	4	0	0
Control		80～100*	166	124	74.7

* Average counts from 4 men who have more than one child.

表5 Corelation of the sperm penetration test and the in vitro fertilization test by spermatozoa from patients with oligizoospermia.

Patients name	age	Sperm counts ($\times 10^6$/ml)	Sperm motility (%)	Sperm penetration test		Fertilization rates (%)
				Human CM	Bovine CM	
1. E. N.	34	30	79	Good	Good	20.0
2. K. K.	34	18	42	Good	Fair	16.7
3. K. Y.	33	17	68	Good	Good	0
4. I. M.	33	13	48	Poor	Poor	0
5. N. N.	31	11	35	Poor	Poor	0
6. J. N.	27	3	22	Negative	Negative	0

考　察

男性側の不妊の原因として，無精子症患者に妊孕性がないのは当然であるが，一般的に 20×10^6/ml 以下の精子濃度しかない乏精子症患者の妊孕性が非常に悪いことが報告されている[20]が，正常精子濃度をもつ男性に比べて著しく妊孕性が低くなる原因については，まだ充分な解明はされていない．また乏精子症の原因には性器感染症・内分泌障害・染色体異常や精索静脈瘤・停留睾丸といった器質的な異常が考えられているが，妊孕性障害の機序との関係についても明らかではない．

しかしながら，臨床的な原因がなにであったとしても，乏精子症患者精子では Huhner 試験で CM 内への精子侵入が傷害されている場合が多く[29,30]，精子自体の CM 内通過性能力が妊孕性障害の原因の1つとして考えられている．そのために，治療法として CM の障壁を除くために，種々の方法での人工受精 (AIH) が行なわれている．例えば，単に射精精液を子宮腔内に注入する方法以外に，分画射精精液を頚管内または子宮腔内に注入する方法[23,24]，アルブミン溶液カラムに精液を重層してカラムに移行した活動精子のみを子宮腔内に注入する方法[25,26]，キャップ状の容器に精液を入れて子宮膣部に装着させて精液と CM を接触させた状態にして精子進入を促進させる方法[31,32]，著者らが既に発表した“layering method”の方法で[33,34]遠沈後に上層に浮遊してくる活動精子を集めた洗浄濃縮活動精子による方法[18]等が試みられている．しかし，乏精子症患者での妊娠率は正常 Doner 精子を用いて行なった人工受精 (AID) の妊娠率[21]や頚管因子のための AIH[22]に比べて非常に低い値である．特に，著者らの方法では，10例の乏精子症患者精液から受精抑制因子 (decapacitaion facor) をもつと考えられる精漿成分を除去し，さらに精子の濃度と活動性が改善された精子を用いて排卵時に一致した延べ30回の AIH においても1例も妊娠しなかった[18]．またこれら10症例の精子を用いて透明帯除去ハムスター卵との受精実験をしたところ，受精率は対照群の 73.3％に対して，7名が受精率 0％でほかの3名も 33.3％・10.0％・5.0％で平均では 14.3

% (6/42) と著しい受精能の低下が見られた[18].

これらのことは，乏精子症の妊孕性障害の原因には，活動精子の数の問題だけではなく，前述した様な精子のCM内通過能や，さらには精子の受精能といった精子自体の機能面に欠陥があることを示唆するものである.

本論文においては，まず6症例の乏精子症患者精液を用いてヒトCM内とウシCM内での精子通過状態について比較検討をしたところ，図3のごとくにGood・Poor・Negative等全く類似した通過動態が認められ，表2に示すごとく12例における比較でもほとんど同じ結果であり，正常精液精子を用いた著者らの報告[8]や諸家の報告[7,35,36]からも，ウシCMはヒトCMに代用し得るものである．この事実は，正常精子では良好に通過し得るCM内でも乏精子症患者精子は通過障害があり，精子自体の通過機能に問題がある事を示すものである．今後，臨床的には精子自体のCM通過能といった機能面からの検査も必要となり，最近ではコマーシャルベースでウシCMのキット (PENERAK®: SERONODIAGNOSTICS, U.S.A.) も登場しており，今後ますます，精子CM通過性機能評価として本検査が注目されると思われる.

次いで，乏精子症患者精子の18症例での透明帯除去ハムスター卵を用いて受精能について検討したところ，表4のごとくに正常精子の受精率は平均74.7% (57.1～92.3%) で，一方乏精子症群では5.4% (0～33.3%) と非常に悪い受精率を示した．この事は，受精実験では正常群も乏精子症群も反応系における精子濃度は全く同じにもかかわらず受精率に著しい差があるのは，精子自体の受精能力そのものに欠陥がある事を示しており，Aitkenら[37]や井上ら[38]の結果報告とも類似している.

最後に，乏精子症患者精子のヒト・ウシCM内の通過能と同時に行なった受精率の比較を表5に示したが，たとえCM内通過性が良好な精子でも受精率は20.0%・16.7%・0%と非常に悪く，PoorやNegativeのようなCM内通過能に問題のある精子では受精率0%であった.

Soules[39]やTempletonら[40]も精子受精能検査とHuhner検査あるいはLaparoscopyにより腹腔から精子回収率を検討しており，従来の精液検査所見と精子の性器内上昇能とはほとんど相関を認めなかったが，受精とは良く相関し，精子の生殖機能をみるためには精子の受精能検査が必要としている.

今後，精液検査の一つに，精子の機能面を調べるために，ヒトまたはウシCMを用いた精子通過能や透明帯除去ハムスター卵を用いた受精能の検討が非常に重要となって来るものと思われる.

(稿を終えるにあたりウシCMを提供下さいました大阪府農林技術センター能勢種畜場の西村先生に深く感謝致します．なお，本論文の要旨は，第28回日本不妊学会学術講演会 (演題番号162) にて報告した.)

文　献

1) Huhner, M.: Necrospermia and viability of spermatozoa in the cervical canal. J. Am. Med. Associ., 107: 1581, 1936.
2) Miller, E. G. and Kurzrok, R.: Biochemical studies of human semen. III. Factors affecting migration of sperm through the cervix. Am. J. Obstet. Gynecol., 24: 19, 1932.
3) Kremer, J.: A simple sperm penetration test. Int. J. Fertil., 10: 209, 1965.
4) Lorton, S. P., Kummerfeld, H. L. and Foote, R. H.:Polyacrylamide as a substitute for cervical mucus in sperm migration tests. Fertil. Steril. 35: 222, 1981.
5) Goldstein, M. C., Wix, L. S., Foote, R. H., Feldschuh, R. and Feldschuh, J.: Migration of fresh and cryopreserved human spermatozoa in polyacrylamide gel. Fertil. Steril., 37: 668, 1982.
6) Bergman, A., Amit, A., David, M. P., Homonnai, Z. T. and Paz, G. F.: Penetration of human ejaculated spermatozoa into human and bovine cervical mucus. I. Correlation between penetration values. Fertil. Steril., 36: 363, 1981.
7) 宮崎豊彦，田辺清男，名取道也，青木　類，遠藤勝英，小林俊文，飯塚理八：ウシ頚管粘液を用いたヒト精子の運動性評価．日不妊会誌，32：630，1987.
8) 伊熊健一郎，斎藤行生，武田守弘，香山浩二，礒島晋三：代用婦人頚管粘液に関する研究—ウシ頚管粘液についての検討—．日産婦誌，40：888，1988.
9) Overstreet, J. W. and Hembree, W. C.: Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro. Fertil. Steril.,27:815, 1976.
10) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod., 15: 471, 1976.
11) Rogers, B. J., Campen, H. V., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fetilizing ability using zona-free ova. Fertil. Steril.,32: 664, 1979.
12) Binor, Z., Sokoloski, J. E. and Wolf, D. P.: Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. Fertil. Steril., 33:321, 1980.

13) Tyler, J. P. P., Pryor, J. P. and Collins, W. P.: Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 63: 499, 1981.
14) Berger, T., Marrs, R. P., Saito, H. and Kletzky, O. A.: Factors affecting human sperm penetration of zona-free hamster ova. Am. J. Obstet. Gynecol., 145: 397, 1983.
15) 伊熊健一郎，長谷川昭子，神野真知子，香山浩二，礒島晋三：試験管内受精実験による受精に対するヒト精子頚管粘液内通過性の意義．日産婦誌，32：1506，1980.
16) 長谷川昭子，香山浩二，礒島晋三：Zona-free ハムスター卵とヒト精子の in vitro 受精系に対する抗精子抗体の影響．日産婦誌，32：1507，1980.
17) 長谷川昭子，伊熊健一郎，窪田耕三，繁田　実，高田喜嗣，香山浩二，礒島晋三：Zona-free ハムスター卵の in vitro 受精系でみた頚管粘液のヒト精子 capacitation への影響．日不妊会誌，25：541，1980.
18) 高田喜嗣，長谷川昭子，香山浩二，礒島晋三：乏精子症患者精子の受精能に関する研究，：洗浄濃縮精子による受精率および透明帯除去ハムスター卵に対する in vitro に於ける受精能について．日産婦誌，33：2041，1981.
19) 伊熊健一郎，長谷川昭子，香山浩二，礒島晋三：ヒト精子の頚管粘液内通過の意義．—試験管内受精実験による精子の受精能獲得についての検討—．日産婦誌：投稿中
20) MacLeod, J. and Gold, R. Z.: The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoön counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. J. Urol., 66: 436, 1951.
21) Nachtigall, R. D., Faure, N. and Glass, R. H.: Artificial insemination of husband's sperm. Fertil. Steril., 32: 141, 1979.
22) Hull, M. E. Magyar, D. M., Vasquez, J. M., Hayes, M. F. and Moghissi, K. S.: Experience with intrauterine insemination for cervical factor and oligospermia. Am. J. Obstet. Gynecol. 154: 1333, 1986.
23) Amelar, R. D. and Hotchkiss, R. S.: The split ejaculate. Its use in the management of male infrertility. Fertil. Steril., 16: 46, 1965.
24) Decker, W. H.: Pooled and frozen homologous (husband) semen for artificial insemination. Infertility, 1: 25, 1978.
25) Glass, R. H. and Ericsson, R. J.: Intrauterine insemination of isolated motile sperm. Fertil. Steril., 29: 535, 1978.
26) Dmowski, W. P., Gaynor, L., Lawrence, M., Rao, R. and Scommegna, A.: Artificial insemination homologous with oligospermic semen separated on albumin columns. Fertil. Steril., 31: 58, 1979.
27) 伊熊健一郎，窪田耕三，高田喜嗣，鎌田敏雄，香山浩二，礒島晋三：抗精子抗体の頚管粘液内精子通過性に及ぼす影響．1．血中精子不動化抗体保有不妊婦人における頚管粘液精子適合試験並びに頚管粘液中微量精子不動化試験．日不妊会誌，25：1，1980.
28) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro. In "Methods in mamalian embryology". Edited By Daniel J. C., Freeman and Co., San Francisco, pp. 86-116, Table 6-5, 1971.
29) Davajan, V., Nakamura, R. M. and Kharma, K.: Spermatozoan transport in cervical mucus. Obstet. Gynecol. Surv., 25: 1, 1970.
30) Tredway, D. R., Buchanan, G. C. and Drake, T. S.: Comparison of the fractional postcoital test and semen analysis. Am. J. Obstet. Gynecol., 130: 647, 1978.
31) Whitelaw, M. J.: Use of the cervical cap to increase fertility in cases of oligospermia. Fertil. Steril., 1: 33, 1950.
32) Whitelaw, W. J.: The cervical cap self-applied in the treatment of severe oligospermia. Fertil. Steril., 31: 86, 1979.
33) Isojima, S. and Koyama, K.: Microtechnique of sperm immobilization test. Immunology of Reproduction. 215, 1978 (ed. K. Branov. Bulgarian Academy of Sciense.).
34) 伊熊健一郎：子宮頚管内精子通過性に及ぼす抗精子抗体の影響に関する研究．兵医大学会誌，9：1，1984.
35) Alexander, N. J.: Evaluation of male in fertility with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil. Steril., 36: 201, 1981.
36) Moghissi, K. S., Segal, S., Meinhold, D. and Agronow, S. J.: In vitro sperm cervical mucus penetration.: Studies in human and bovine cervical mucus. Fertil. Steril., 37: 823, 1982.
37) Aitken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, 0., Templeton, A. and Less, M. M.: An analysis of semen quality and sperm function in cases of oligozoospermia. Fertil. Steril., 38: 705, 1982.
38) 井上正人，金子みつえ，内村道隆，篠原正樹，本田育子，藤井明和：Zona-free ハムスター卵を用いたヒト精子の受精能力の検討（VI）—乏精子症患者55例の分析．日不妊会誌，27：609，1982.
39) Soules, M. R., Moore, D. E., Spadoni, L. R. and Stenchever, M. A.: The relationship between the postcoital test and the sperm penetration assay. Fertil. Steril., 38: 384, 1982.
40) Templeton, A., Aitken, J., Mortimer, D. and Best, F.: Sperm function in patients with unexplained infertility. Br. J. Obstet. Gynecol., 89: 550, 1982.

Sperm function in cases of oligozoospermia: Evaluation by sperm penetration test with human and bovine cervical mucus and zona-free hamster oocyte

Kenichiro Ikuma and Shigeo Suno

Department of Obstetrics and Gynecology,
Takarazuka Municipal Hospital, Hyogo, 665 Japan

Takayuki Matsuda, Akiko Hasegawa,
Koji Koyama and Shinzo Isojima

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hyogo Medical college,
Hyogo, 665 Japan

Sperm function was evaluated in patients with oligozoospermia by Kremer's sperm penetration test (SPT) with human and bovine cervical mucus (CM) and in vitro fertilization test with zona-free hamster oocytes.

The biophysical properties of human and bovine CMs were quite similar. Sperm penetration distance and density were also quite similar in both CMs in 6 hours, but thereafter sperm motility decreased much faster in bovine CM than in human CM. The fertilization rate of spermatozoa from 18 patients was 0% in 12 cases and 5～33% in 6 cases. These figures were much lower than the 74.7% in fertile normospermic men. On the other hand, the fertilization rate was always 0% in patients whose SPT was evaluated as "poor" or "negative" and also as low as 0～20% even in patients whose SPT was rated as "good".

These results suggest that in studies of male sterility due to oligozoospermia in vitro fertilization tests with zona-free hamster oocyts are indispensable in addition to SPT with human or bovine CM.

(受付:1988年7月19日特掲)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

Kallmann 症候群

Kallmann's Syndrome

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
(Director: Prof. J. Shimazaki)

4例の Kallmann 症候群につき臨床的検討を加えた．
低アンドロゲンによると思われる症状を主訴としたものが3例，陰嚢内に睾丸を触知しないことを主訴としたものが1例あった．
4例中3例は指極が身長を上回っており，恥毛は数本みとめたものがあったが，他の例は，恥毛をみとめなかった．
染色体型はいずれも 46 XY。全例に嗅覚障害をみた．
血中 LH および FSH は正常下限～低値を示し，血中テストステロン値は，全例去勢レベルであった．
LH-RH 試験で，比較的良好な反応をみたものがあったが，他は低反応であった．
hCG 試験は，1例で血中テストステロン値が正常域に達したが，3例は低反応であった．
hCG 投与を3例に試み，2例は，血中テストステロン値の上昇をみないため，テストステロンの補充とした．hCG 投与により造精機能の導入および2次性徴の発現をみた例は，テストステロンの補充により，これらが維持された．
1例に LH-RH の間歇性投与を試み，経過観察中である．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 142—147, 1989)

緒　言

無嗅覚あるいは，嗅覚減退を伴う低ゴナドトロピン性性腺不全症は，Kallmann 症候群と呼ばれているが[1]，近年その報告数が増加しており，必ずしも稀れな疾患ではない．

我々も，本症を4例経験したので報告する．そのうち1例は，以前，一部報告したが[2]，今回のシリーズに加えて他症例と比較検討した．

対象および方法

1973年1月より1987年6月までに千葉大学医学部泌尿器科で経験した Kallmann 症候群は4例であった．これらにつき主訴，初診時年令，身体所見，染色体型，内分泌学的所見，治療および予後について検討した．

血中ホルモン値の測定は，LH，FSH およびテストステロンそれぞれ LH キット「第1」，FSH キット「第1」およびテストステロン '栄研' にて行なった．

LH-RH 試験[3]は，LH-RH タナベ注射薬® (田辺) 100 μg 静注にて，hCG 試験[3]は，ゴナトロピン®(帝国臓器) 4000 単位3日連続筋注にて行なった．

精液は，5日間禁欲後，用手にて採取し鏡検に供した[4]．

染色体検査は，末梢血リンパ球培養によった．

嗅覚は，経静脈性嗅覚検査にて判定した[5]．

治療は，hCG 1000 単位，週2回より開始した．一部例に hMG（ヒュメゴン®，日本オルガノン）75 単位，週2回投与も併用した．これらゴナドトロピンにて効果をみないものは，テストステロン（エナルモンデポー®，帝国臓器）250 mg，3週に1回の補充とした．LH-RH の間歇的皮下投与については，自動注入ポンプにより2時間に1回，LH-RH を25-50 ng/kg 体重を投与した[6]．

結　果

1）主訴：症例1が睾丸を陰嚢内に触知しないことを主訴としたが，他3例は低アンドロゲンによると思われるものであった（Table 1）．

2）身体所見：症例1を除いて，いずれも指極が身長より大であった．なお症例1は，28歳の現在，身長 153 cm，体重 45 kg である．恥毛は、症例3で数本みとめたが，他の例は，いずれもみとめなかった．全例，前立腺を触知しなかった（Table 1）．

3）染色体型：いずれも 46 XY と正常男子型であった（Table 1）．

4）合併症：いずれも嗅覚障害をみた．停留睾丸を1例にみとめた（Table 1）．

5）血中ホルモン値：全例，血中テストステロン値が 100 ng/dl 以下と去勢レベルであった．血中 LH および FSH は正常下限～低値を示した（Fig. 1）．

Table 1.　症例概要

症例	主　訴	初診時年令（歳）	身長（cm）	体重（kg）	指極（cm）	恥毛	前立腺	睾丸容積（mℓ）左	睾丸容積（mℓ）右	睾丸組織像	染色体型	合併症
1	左陰嚢部に睾丸触知せず	15	126	24.5	121	(－)	ふれず	／	／	／	46XY	嗅覚障害 左停留睾丸
2	射精をみず	26	180	65.0	186.5	(－)	ふれず	4	5	／	46XY	嗅覚障害
3	性器発育不全	33	175	69.5	190	数本	ふれず	2	欠	／	46XY	嗅覚障害
4	二次性徴欠如	16	170	59.0	180	(－)	ふれず	2	2	未熟な精細管をみた。	46XY	嗅覚障害

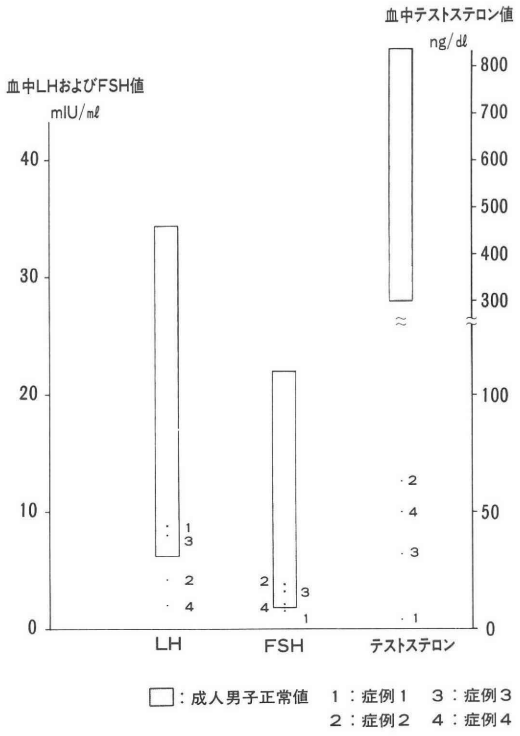


Fig. 1　血中ホルモン値

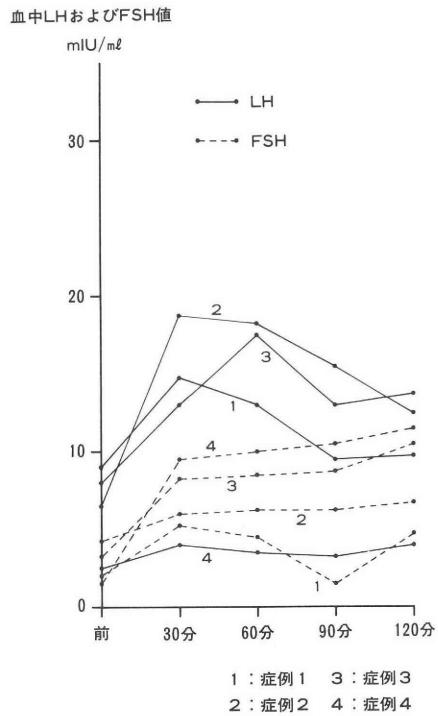


Fig. 2　LH-RH 試験

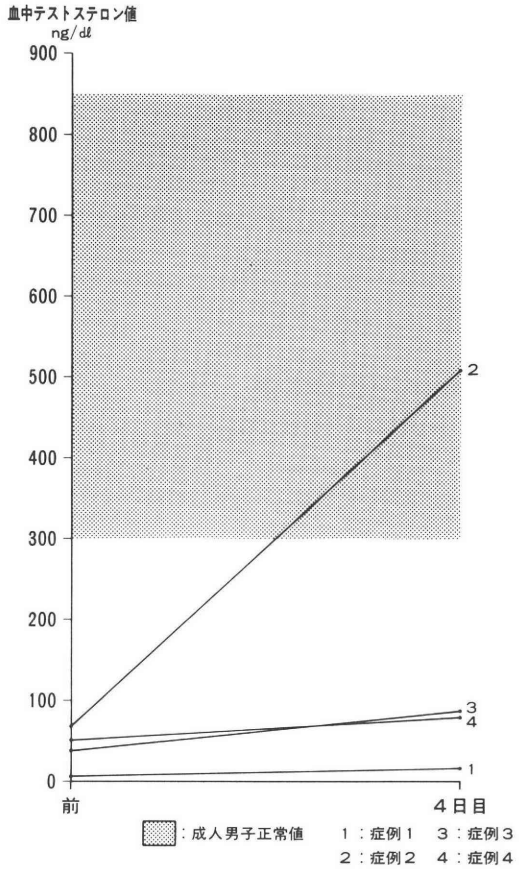


Fig. 3　hCG 試験

6）LH-RH 試験：症例2が比較的反応良好であったが，他例は低反応であった（Fig. 2）．

7）hCG 試験：症例2は hCG 4000 単位3日間投与後，515 ng/dl と前値の7倍となり，成人男子正常値に達したが，他の3例は低反応であった(Fig. 3)．

8）治療経過：症例1は，hCG 1000 単位週2回投与より開始したが，血中テストステロン値が上昇せず，2次性徴の発現も不十分のため，エナルモンデポーに変更し，変声，恥毛の出現等をみた．その後，5年間来院しなかったが，結婚予定のため挙児希望にて来院．hCG 2000 単位および hMG 150 単位をそれぞれ週2回投与し，経過観察中である（Fig. 4）．

症例2は，hCG 1000 単位，週2回投与より開始し，造精機能の導入および2次性徴の発現をみた．1年4か月後，hCG 1000 単位，週1回投与とした．1984年2月結婚，妻の妊娠をみ，2400 g の男児をえた．その1年後，再び 3040 g の男児をえた．その後は，挙児希望しないためエナルモンデポーに変更．10か月経過するが，精子濃度および血中テストステロン値は軽度低下にとどまっている（Fig. 5）．

症例3は，hCG　1000 単位投与にて2次性徴の発現不十分のため，エナルモンデポーに変更し，比較的良好な2次性徴の発現をみた．

症例4は，LH-RH 25 ng/kg 体重/2時間の間歇的皮下投与を施行したが，3か月経過後，血中テストステロン値の上昇をみなかったため，50 ng/kg 体重/2時間とし，経過観察中である（Fig. 4）．

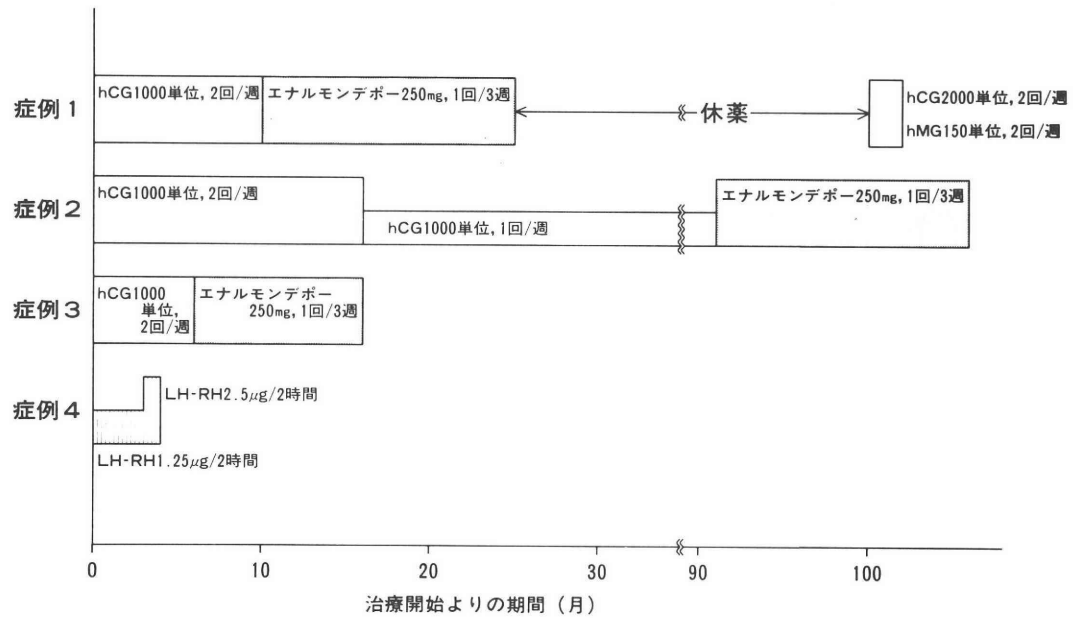


Fig. 4　治療経過

考　案

嗅覚障害を伴う低ゴナドトロピン性性腺不全症は，1944年Kallmannにより報告され，以後，Kallmann症候群と呼ばれる[1]．本症は，嗅覚障害のほかに，色覚異常，知能障害，髄伴運動失調，難聴，口蓋裂，停留睾丸等を伴う[7,8]．自験例でも，症例1に停留睾丸をみたが，これは，本症に特有なものというより低ゴナドトロピン性性腺不全症に随伴したものと考えられる[9]．

本症は，下垂体の異常によるものではなく，視床下部のLH-RH分泌不全によって起こるものと考えられており，さらに視床下部に近接する嗅覚中枢の障害が加わったものである[10,11]．

本症の家族内発生が報告されており，その遺伝様式は，常染色体優性遺伝[12]，常染色体劣性遺伝[13]等，諸説あるが，不明である．近藤ら[14]の本邦67例の集計では，染色体型は男女とも正常核型とされており，自験例でも，すべて46 XYと正常であった．

LH-RH投与に対してLH，FSHの反応は，無反応より正常まで差がある[15]．自験例も症例2は比較的良好な反応を示したが，他の例は低反応であった．このような例もLH-RHの連続投与にて反応をみるとされるが[16]，症例4は，ゴナドトロピンに反応をみなかった．一定時期に下垂体が刺激されることが必要であり，それ以後の刺激では，その回復に限界があり，症例間にこの限界に差があるといえる．

hCGによるLeydig細胞の反応も同様に，症例間に差があり[17]，自験例でも同様であった．hCGに良好な反応を示した症例2は，造精機能導入をみており，hCGに対する反応は予後を推測する因子となりうるであろう[9]．

治療は，2次性徴の発現および造精機能導入を目的として行なわれる．造精機能の導入には，テストステロンおよびFSHの両者が必要なので[18]，LH作用をもつhCGとFSHを含むhMGの併用が望ましい．症例2は，hCGのみで造精機能の導入をみたが，本例では，睾丸容積が比較的大きいこと，およびFSH値が低値ではあるが正常範囲内にあることより，病変が軽度のものといえる．

hCGおよびhMGの投与量および間隔は，岩動は[19]，それぞれ5000単位，150単位を，週2回投与，奥山ら[20]は，hCG 3000～5000単位，hMG 75単位を週1～2回投与としている．自験例は，hCG 1000単位，hMG 75単位より開始し，血中テストステロン値等を指標として，さらに増量している．ゴナドトロピンの補充は，週1～2回と投与回数が多いのが欠点である．そこで，テストステロン投与後でも，ゴナドトロピンの補充で造精機能が期待できることより[21]，2次性徴，リビドおよび性交能力をテストステロンで維持し，子供を欲する時に，ゴナドトロピンに移行すれば良いといえる．

次に症例2で注目すべきことに，hCGにより導入された造精機能が外因性のテストステロンにより維持されたことである．Baranetskyら[22]も，後天性の低ゴナドトロピン性性腺不全症がテストステロンの補充で造精機能が維持されたと報告しており，一度導入された造精機能は，テストステロンの補充で維

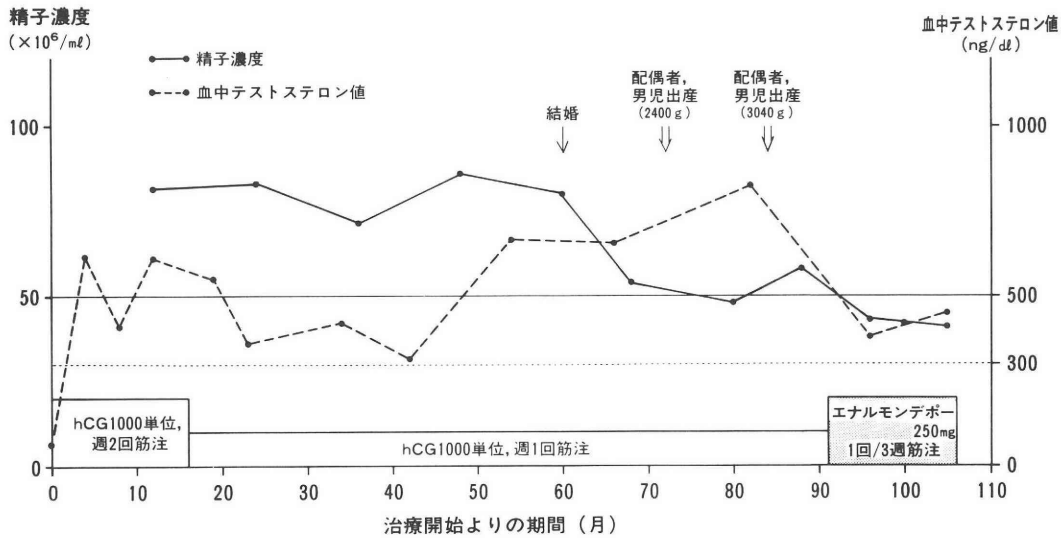


Fig. 5　症例2の治療経過

持されうるといえる．一方，我々は，hCGおよびhMGにより精液中に精子をみた低ゴナドトロピン性性腺不全症にテストステロン補充としたところ無精子症となった例を経験している(未発表)．造精機能の維持に要するアンドロゲン量は，症例により差があるのだろう．

本症はLH-RHの分泌不全によるものなので，LH-RHの投与が合目的といえる．最近，生理的リズムに合わせて，pulsatileにLH-RHを投与する方法も試みられ，良好な成績が報告されている[23]．自験の症例4にHoffmanら[24]に従って25 ng/kg体重のLH-RHを2時間に1度投与したが，効果をみとめず，増量し経過観察中である．LH-RHの投与法に，さらに工夫がなされるとともに，本法による治療が今後，主流を占めるようになるだろう．

結　語

Kallmann症候群4例につき，その臨床像および治療につき検討を加えた．ゴナドトロピンにより造精機能導入をみた後，テストステロンの補充で造精機能の維持をみた例があった．1例にLH-RHの間歇的投与を試みた．

文　献

1) Kallmann, F. J., Schoenfeld, W. A. and Barre, S. F.: The genetic aspects of primary eunuchoidism. Amer. J. Ment. Defic., 48: 203-236, 1944.
2) 布施秀樹，伊藤晴夫，皆川秀夫，川村健二，島崎淳：造精機能導入に成功したKallmann症候群の1例．泌尿紀要，28：1167－1172，1982.
3) 島崎　淳，伊藤晴夫：性腺機能(男子)．日本臨床，37：2595－2599，1979.
4) 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，28：197－204，1983.
5) 内藤準哉，金子敏郎：味覚・嗅覚異常．綜合臨床，29：1463－1468，1980.
6) 布施秀樹，角谷秀典，石井弘之，高原正信，島崎淳：低ゴナドトロピン性性腺不全症に対するLH-RHの間歇的投与．日不妊会誌，33：99－104，1988.
7) Lieblich, J. M., Rogol, A. D., White, B. J. and Rosen, S. W.: Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann's syndrome). Am. J. Med., 73: 506-519, 1982.
8) Males, J. L., Townsend, J. L. and Schneider, R. A.: Hypogonadotropic hypogonadism with anosmia-Kallmann's syndrome. Arch. Intern. Med., 131: 501-507, 1973.
9) 布施秀樹，角谷秀典，片海善吾，高原正信，伊藤晴夫，島崎　淳：低ゴナドトロピン性類宦官症．日不妊会誌，31：360-366，1986
10) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility. Andrologia, 11: 77-107, 1979.
11) Kovacs, K. and Sheehan, H. L.: Pituitary changes in Kallmann's syndrome: a histologic, immunocytologic, ultrastructural and immunoelectron microscopic study. Fertil. & Steril., 37: 83-89, 1982.
12) Santen, R. J. and Paulsen, G. A.: Hypogonadotropic eunuchoidism. I. Clinical study of the mode of inheritance. J. Clin. Endocrinol. Metab., 36: 47-54, 1973.
13) Hockaday, T. R. D.: Hypogonadism and lifelong anosmia. Postgrad. Med. J., 42: 572-574, 1966.
14) 近藤福次，藤井敬三，岡村廉晴，徳中荘平，高村孝夫，八竹直：Kallmann症候群の2例．泌尿紀要，32：129－134，1986.
15) Marshall, J. C., Harsoulis, P., Anderson, D. C., McNeilly, A. S., Besser, G. M. and Hall, R.: Isolated pituitary gonadotrophin deficiency: Gonadotrophin secretion after synthetic luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-releasing hormone. Brit. Med. J., 16: 643-645, 1972.
16) Oettinger, M., Bruneteau, D. W., Pasroudakis, A. and Greenblatt, R. B.: FSH and LH response to LHRF in Kallmann's syndrome. Obst. Gynec., 47: 233-236, 1976.
17) 中田恵輔，和泉元衛，石丸忠彦，宇佐利隆：Kallmann症候群の4例―内分泌学的検討を中心として―．日本臨床，39：678－683，1981.
18) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol. Rev., 51: 1-22, 1971.
19) 岩動孝一郎：Gonadotropin deficiencyによる男子hypogonadism症例に対するhCG/hMG併用療法についての検討．日不妊会誌，28：189－196，1983.
20) 奥山明彦，並木幹夫，小出卓生，園田孝夫，宇都宮正登，伊東博，吉岡俊昭，板谷宏彬，西本直光，水谷修太郎：睾丸間質機能の検討，第8報：低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に対するゴナドトロピン長期投与の経験．日泌尿会誌，74：1205-1212，1983.
21) Burger, H. G., Dekretser, D. M., Hudsin, B. and Wilson, J. D.: Effects of preceding androgen therapy on testicular response to human pituitary gonadotropin in hypogonadotropic hypogonadism: A study of three patients. Fertil. & Steril., 35: 64-68, 1981.
22) Baranetsky, N. G. and Carlson, H. E.: Persistence of spermatogenesis in hypogonadotropic hypogonadism treated with testosterone. Fer-

til. & Steril., 34: 477-482, 1980.
23) Skarin, G., Nillius, S. J., Ahlsten, G., Tuvemo, T. and Wide, L.: Induction of male puberty by long-term pulsatile subcutaneous LH-RH therapy. Upsala J. Med. Sci., 89: 73-80, 1984.
24) Hoffman, A., Crowley, W. F. Jr.: Induction of puberty in men by long-term pulsatile administration of low-dose gonadotropin-releasing hormone. N. Engl. J. Med., 307: 1237-1241, 1982.

Kallmann's syndrome

Hideki Fuse, Masanobu Takahara,
Hiroyuki Ishii, Hidenori Sumiya
and Jun Shimazaki

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

The clinical observations on four cases of Kallmann's syndrome were performed.
Three cases had the symptoms caused by low androgen and the other case had a chief comlpaint of lack of testis in the scrotum.
In 3 of 4 cases, their arm span was larger than their stature.
One case had several pubic hairs, but the others had no pubic hair.
The karyotype was 46XY in all cases.
All cases were found to have anosmia.
The basal levels of LH and FSH in blood were low normal or low. The basal level of testosterone in blood was low in all cases.
One case had rather good response but the others had low response to LH-RH test.
In one case, the testosterone level in blood reached normal range after hCG test, but the others had low response to hCG test.
In 2 of 3 cases, the testosterone levels in blood were not elevated after hCG administration, therefore the testosterone replacement was performed.
In one case, appearance of sperms in semen was observed and secondary characteristics appeared after hCG administration, which were maintained by testosterone replacement.
Pulsatile LH-RH treatment was performed in one case.

(受付：1988年2月16日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

糖尿病患者にみられた精管の石灰化陰影

Calcification of the Vas Deferens in a Male Patient Associated with Diabates Mellitus

冨士原病院
浜口毅樹 Takeki HAMAGUCHI
後藤紀洋彦 Kiyohiko GOTO
冨士原正保 Masayasu FUJIWARA
Fujiwara Hospital

神戸大学泌尿器科学教室
奥田喜啓 Yoshihiro OKUDA
篠崎雅史 Masashi SHINOZAKI
藤沢正人 Masato FUJISAWA
岡本恭行 Yasuyuki OKAMOTO
岡伸俊 Nobutoshi OKA
岡田弘 Hiroshi OKADA
羽間稔 Minoru HAZAMA
松本修 Osamu MATSUMOTO
守殿貞夫 Sadao KAMIDONO
Department of Urology, Kobe University, School of Medicine

患者は無症候性顕微鏡的血尿を主訴とした56歳の男性である．7年前より糖尿病の治療を受けており，通院中血尿を主訴として当科外来紹介され，精査の結果精管に石灰化陰影が認められた．精路石灰化は治療を要することが少ない．その報告例は自験例も含めて26例の報告と少ない．糖尿病に合併することが多く自験例もふくめ9例に認められる．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 148－151, 1989)

緒　言

無症候性顕微鏡的血尿を主訴とした56歳の男性に精管の石灰化陰影を認めたので文献的考察を加えて報告する．精路石灰化の報告例は自験例も含めて26例と少ない．糖尿病に合併することが多く自験例もふくめ9例に認められる．

症　例

56歳男子，自転車修理販売業

初診日：1985年12月6日

主訴：無症候性顕微鏡的血尿

現病歴：糖尿病にて内科通院中顕微鏡的血尿を認めたため当科紹介受診，排尿時痛や腰痛などの自覚症状は認められなかった．7年前より糖尿病で食事療法を続けており，過去1年間で10kgの体重減少をみた．それ以外には結核など既往歴として特記すべき事はなかった．

家族：子供2人健在（妻とは離婚）

現症：体格中等度，栄養良；161.5cm　63.5kg (115%のobesity) 両腎触知せず膀胱部，外性器に異

常なく前立腺は両葉母指頭大で中央溝触知し表面平滑硬度正常で圧痛はない．肝が2横指触知されたが，腹部に圧痛，筋緊張などは認められなかった．精液検査は施行できなかった．

血圧：120/80　mmHg, ECG; V_5, V_6ST flat でU波が陽性．眼底；Scott の分類でII a.

尿所見；色調清明，蛋白（−），糖（±），尿沈渣で白血球（−），赤血球　2～3／視野．

血液所見；白血球 $71\times10^2/mm^3$，赤血球 $544\times10^4/mm^3$, Hg18.0g/dl, Ht48.7%，血小板 $15.1\times10^4/mm^3$, BUN16mg/dl, Cr0.9mg/dl, GOT33IU/L, GPT28IU/L, T.P.8.8g/dl, Na136mEq/L, K4.2mEq/L, Ca10.1mEq/L, CRP0.3mg/dl，空腹時血糖；225mg/dl，1日血糖；朝食前160mg/dl, 朝食後2時間260mg/dl，昼食前181mg/dl，昼食後2時間142mg/dl，夕食前125mg/dl，夕食後2時間236mg/dl，午後11時132mg/dl，IRI；前7.4MCU/M6 (4～9.2), 60分後9.5MCU/M6(4～9.2), 120分後21.2MCU/M6 (4～9.2), HbA_1 12.3% (5.6～7.9), HbA_1C11.2% (3.5～6.5)

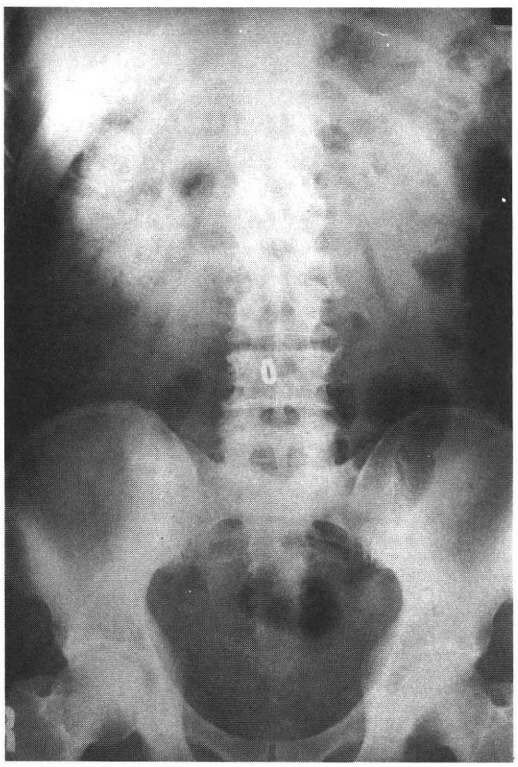


Fig. 1　腎骨盤部単純撮影で，両側精管膨大部と思われる部位に約5cmの逆八の字状の石灰化様陰影を認めた．

X線撮影所見：単純撮影で両側精管膨大部と思われる部位に約5 cmの逆八の字状の文節様構造を呈する石灰化様陰影を認めた．(Fig. 1) 排泄性腎盂造影では両腎とも排泄良好で腎盂腎杯の変形なく，尿管の拡張や走行異常も認められなかった．

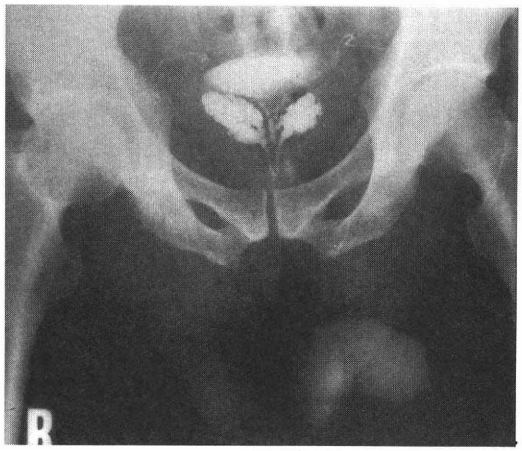


Fig. 2　精嚢造影で，両側精管膨大部に一致した虫様状の石灰化陰影を認めた．

精嚢造影所見；両側精管膨大部に一致した文節構造を呈する石灰化様陰影を認め，管状の内腔に造影剤が線状に明らかに注入されているので精管と確認された (Fig. 2)．

Fig. 3　骨盤部CTでは精管に石灰化陰影が認められた．

骨盤部CT所見；精管に石灰化陰影が認められた (Fig. 3)．

膀胱尿道鏡所見；膀胱内に異物認めず，前立腺の突出は軽度であった．精阜にも異常は認められなかった．

超音波断層撮影；軽度前立腺肥大と前立腺結石が認められたが，精嚢には異常はみられなかった．

経過：精路石灰化は治療を要することが少ないとされており，自験例も摘出などの処理を行うことな

く経過観察中であり，現在著変なく順調である．

考　案

精路石灰化はまず剖検により1830年にClementが報告し，ついでX線の石灰化陰影として1922年に，Kretchmerにより報告された．わが国では1960年に並木[1]の報告を第1報とし，現在までに25例が報告されているのみである．上月[2]によると精路石灰化の診断はX線撮影により容易に診断され，石灰化像は精管，精嚢の走行に一致し逆八の字状に走る索状陰影として認められるとされている．症状としては血尿，血精液症及び精嚢の疼痛を示すことがあるが，ほとんどは無症候性であるとされている．河井らによると精路系はいずれの部位でも石灰化は起こるとされているが精管，精管膨大部及び精嚢の順に高率に発生するとしており，これまでの報告例においても25例中19例が精管のみの石灰化であった．

合併症並びに既往症として最も多く見受けられる疾患は糖尿病で，25例中8例，(自験例を入れると26例中9例) に見られた．欧米ではふるくから糖尿病に合併して精管の石灰化が起こることが知られており糖尿病患者は正常対照者にくらべ精管石灰化の平均発生率が10歳若かったとされている[4,5]．本邦において坂本ら[6]は糖尿病患者84例中4例 (4.8%) に精管石灰化を認め，非糖尿病患者451例中1例(0.2%)よりも高率であったとしている．また，結核並びに慢性炎症に合併することが多く，希な報告として1971年にSilberら[7]は慢性腎不全患者で二次性副甲状腺機能亢進症による高カルシウム血症に精管石灰化を合併した症例を，また，小松ら[8]は悪性リンパ腫に続発した精管石灰化を報告し，腫瘍そのものによる精管の変性，化学療法剤による作用を原因にあげている．

組織学的には炎症に起因する例は粘膜層にも石灰化がおよび管腔と閉塞されており，非炎症性の例は筋層のみの石灰化であるとされている[9]．原[10]はX線

Table 1

症例	年度	報告者	部位	合併症	年令	診断
1	1960	並木ら(1)	精嚢	精嚢結石		組織診
2	同	上月ら(2)	両側精管膨大部	左精管結石	37	X線
3	同	同	同	神経因性膀胱	56	X線
4	1962	水本ら(11)	同＋右精嚢	左腎結核	28	X線
5	同	高田ら(12)	両側精管		67	組織診
6	1964	西尾ら(13)	同	BPH、膀胱結石	73	X線
7	同	同	同	肺結核、尿管結石	45	X線
8	1965	原ら(10)	同	左尿管結石	45	組織診
9	1966	水本ら(14)	同	淋疾、前立腺硬化	77	X線
10	1967	駒瀬ら(15)	同	淋疾血精液症	48	組織診
11	1968	海野ら(16)	両側精嚢		34	X線
12	同	田原ら(17)	両側精管	なし	30	X線
13	同	藤田ら(18)	精管	糖尿病	61	X線
14	同	同	同	同＋陰茎癌	66	X線
15	同	同	同	糖尿病	50	X線
16	1979	坂本ら(6)	同	同	48	X線
17	同	同	同	同	54	X線
18	同	同	同	同	51	X線
19	同	同	同	同	57	X線
20	1980	石塚ら(19)	同	なし	22	X線
21	同	同	同	なし	34	X線
22	1981	中山ら(20)	両側精管	糖尿病、陰茎潰瘍	61	X線
23	1982	小松ら(8)	同	糖尿病	25	X線
24	1983	熊崎ら(21)	両側精嚢	左腎結石	83	X線
25	1987	和田ら(22)	両側精管	男性不妊症	40	X線
26	同	浜口ら	同	糖尿病	56	X線

検査所見上では精管石灰化と極めて類似した所見を呈しながら，組織学的検索では筋層中に化骨の認められた1例を報告している．自験例でも化骨の可能性は残されているが，1951年Wilsonら[4]がまとめた剖検例19例での病理組織ですべて精管石灰化であったとしていることから，本陰影も精管の化骨の可能性は低いと考え，石灰化として報告した．しかし，過去に精管の石灰化として報告されているもののなかには本例も含め精管の化骨症例が含まれている可能性が推察される．

治療は特別の症状がないかぎり積極的な治療の必要は無いとされており，我々の症例も経過観察にとどめている．

結　語

7年前より糖尿病の加療を受けていた56歳男性で，両側精管石灰化が発見された．自験例は精路石灰化例としては本邦26例めにあたり，糖尿病患者に合併した症例としては9例目である．

(本論文の要旨は，第4回日本アンドロロジー学会に於て発表された．)

文　献

1) 並木徳重郎：精嚢腺石灰化の1例．日泌尿会誌 51：115，1960
2) 上月実・森脇宏：精管石灰化について．臨床皮泌 14：665～669，1960
3) 川井博：精嚢腺・精管の石灰化．市川篤二他編：日本泌尿器科全書・第7巻 p222～P224，金原出版
4) Wilson, L. L., Marks, J. H.: Calcification of vas deferens; its relation to diabetes mellitus and atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 245: 321～325, 1951
5) Ellenbogen, P. H., Talner, L. B.: Uroradiology of Diabates Mellitus. Urology 8: 413～419, 1976
6) 坂本静男・氷室一彦・太田明生：糖尿病患者のL線写真にみられる精管石灰化像について．糖尿病 22：1035，1979
7) Silber, S. J., McDonald, F. D,: Calcification of the Seminal Vesicles and vas Deferens in a Uremic Patient. J. Urol. 105: 542～544, 1971
8) 小松潔・時修一・井上幹夫：悪性リンパ腫患者にみられた精管の石灰化．西日泌尿．44：1231～1234，1982
9) Culver, G. J., Tannenhaus, J.: Calcification of vas deferens in diabetes. J. Amer. Med. Assoc. 173: 648～651, 1960
10) 原信二・正司武夫・宇野博志：精管化骨の1例．泌尿紀要．11：989～992，1965
11) 水本龍助：精管の石灰化について．臨床皮泌．16：529～531，1962
12) 高田全・長谷川真常：興味ある精管疾患の2例．泌尿紀要 8：332，1962
13) 西尾徹也：精管の石灰化．臨床皮泌 18：611～614，1964
14) 水本龍助・鈴木良徳：精管石灰化．臨床皮泌 20：1265，1966
15) 駒瀬元治・根岸壮治：精管石灰化症の1例．日不妊会誌 12：265，1967
16) 海野良二：精嚢腺 calcification の1例．臨皮 22：711～713，1968
17) 田原達雄：精管の石灰化．臨泌 22：933，1968
18) 藤田進・常田孝和・鈴木キミ・地原洋子：糖尿病患者の精管石灰化について(第1報)．糖尿病 13：42，1968
19) 石塚栄一・岩崎晧・藤井浩：精管に石灰沈着を生じた2症例．日泌尿会誌 71：521，1980
20) 中山実：両側精管石灰化症の1例．西日泌尿 43：859，1981
21) 熊崎匠・原田忠・石川清：精嚢結石の1例．臨泌 37：473～475，1983
22) 和田都生・木津典久・鈴木隆志・大矢晃・能登宏光・森田隆：男性不妊症患者にみられた精管の石灰化．西日泌尿 49：927～929，1987

Calcification of the vas deferens in a male patient suffering from diabetes mellitus

Takeki Hamaguchi, Masayasu Fujiwara and Kiyohiko Goto

Fujiwara Hospital, Kyoto 620, Japan

Yoshihiro Okuda, Masashi Shinozaki, Masato Fujisawa, Yasuyuki Okamoto, Nobutoshi Oka, Hiroshi Okada, Minoru Hazama, Osamu Matsumoto and Sadao Kamidono

Department of Urology, Kobe University, School of Medicine, Hyogo 650, Japan

A case of calcification of the spermatic cord accompanied with diabetes mellitus in a 56 years old man is reported. Diabetes remains by far the most common cause of vas or seminal vesicle calcification, and the onset of radiographically visible calcification occurs ten years earlier, on the average, in diabetic men than in men without diabetes.

(受付：1988年2月24日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

精子無力症における精子の微細構造について．第4報．短尾精子症と思われた5例について

Fine Structure of Asthenozoospermia in Infertile Men. 4. Report of Five Cases with "short-tailed" Spermatozoa.

東北大学医学部泌尿器科学教室（主任：折笠　精一教授）

佐藤和宏　石川博夫　前原郁夫
Kazuhiro SATOH　Hiroo ISHIKAWA　Ikuo MAEHARA
佐藤滋彰　木村正一　折笠精一
Sigeaki SATOH　Masaichi KIMURA　Seiichi ORIKASA

Department of Urology,
Tohoku University School of Medicine,
Miyagi, 980 Japan.

われわれの定義による精子無力症40例の内5例は，光顕上短尾精子が多くの割合を占めていた症例であった．

これらの内4例はいわゆるshort-tailed spermatozoaと思われ，2例の精子，精巣の電顕所見より，尾部の各構成要素は，dynein arm等を除きほぼ全てみられるものの，その規則正しい配列は全く欠如していた．精子細胞では，manchette, distal centriole, annulate lamellaeの異常が観察された．

他の1例は精子の電顕的観察よりcoiled tailの精子症と思われたが，既往歴からは精巣上体の機能異常との関係が示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 152－158, 1989)

緒　言

われわれの定義による精子無力症40例の内[1]，5例は精液検査において短尾精子が多くの割合を占めている症例であった．今回は5症例の精液検査所見等と共に，3例の精子微細構造，2例の精巣微細構造の観察結果について報告し，主に病因論等について若干の考察を加えたい．

対象および方法

対象および精子，精巣の電顕をえる方法等については第1報[1]で述べてあるので省略する．

結　果

5症例の精液検査所見，精巣容量，血清ホルモン値をtable 1に示す．これらの内症例1）～4）は既往歴に特記すべきものを認めないが，症例5）は3歳時の両側ソ経ヘルニア手術が原因と思われる両側精管閉塞例であり，精液所見は昭和60年5月に左精管再吻合術を施行した後のものである．これら5症例の内症例1）2）で精子，精巣の微細構造を，症例5）で精子の微細構造を観察した．既往歴，精液所見，光顕，電顕所見等より症例5）は光顕上の短尾の発生機序が1）～4）のと異なる事が想定されたので以下分けて述べる．

Table 1. Results of semen analysis in the cases with short-tailed spermatozoa

name (ID number)	volume (mℓ)	sp. density (10^6/mℓ)	motility (%)	SMEI	living sperm (%)	abnormality (%)	testes size(mℓ)
1) M. I. [redacted]	1.8 (1.2-2.5)	26 (14-72)	0 (0)	0 (0)	54 (33-73)	91 (90-95)	rt. 18 lt. 15
2) K. S. [redacted]	1.9 (0.9-2.2)	25 (9-41)	8.8 (2-16)	4.3 (0-21.4)	74 (56-96)	62 (30-80)	rt. 15 lt. 15
3) T. E. [redacted]	5.1 (3.6-6.8)	17 (4-34)	0.6 (0-3)	0 (0)	70 (51-91)	87 (70-90)	rt. 15 lt. 15
4) T. K. [redacted]	3.6 (2.5-5.0)	17 (11-21)	1.0 (0-3)	0 (0)	60 (38-78)	77 (70-80)	rt. 25 lt. 15
5) M. F. [redacted]	4.4 (3.4-5.3)	32 (1-81)	14.6 (0-28)	5.2 (0-19.1)	48 (22-88)	62 (45-80)	rt. 12 lt. 15

mean(range). n=5 (case 1), n=11 (case 2), n=7 (case 3), n=7 (case 4), n=3 (case 5) serum hormonal data : (case 2), LH 10.0mIU/mℓ, FSH 4.1mIU/mℓ, PRL 9.2ng/mℓ, T 724ng/dℓ (case 5), LH 14.6mIU/mℓ, FSH 9.6mIU/mℓ, PRL 11.2ng/mℓ, T 563.6ng/dℓ.

①症例1)～4)の光顕，電顕所見：光顕上精子の形態は頭部のみまたはそれに接続するごく短い尾部が認められ (fig. 1b)，精液検査上この様な精子が多くの割合を占め運動性は殆ど認められない．これを電顕で観察すると (fig. 1a, 2)，頭部はまれに huge vaculole with whorls of membranes[2]をみる他は，chromatin の condensation, acrosome 等は概ね正常と思われた．

これに対し尾部の形態は全く正常と異なっていた．その概略は中間部，主部の形成がなされていない，即ち尾部の基本的な構造である軸糸 (axoneme) の“9＋2”の構造がみられず，中間部の特徴である mitochondria の規則正しい配列もみられなかった．

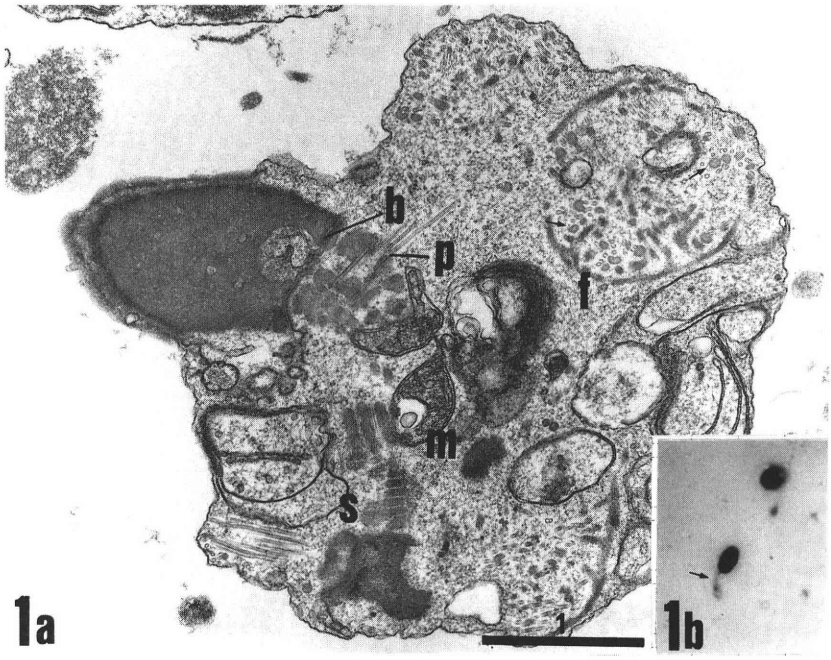
これを詳細に検討すると，basal plate, neck piece の構成要素である striated column, proximal centriole 等は不完全ながら認められる事もあるが(fig. 1a)，全く認められぬ事もある (fig. 2)．mitochondria の発達は良くない．線維鞘 (fibrous sheath) と思われる構造物 (fig. 1a, 2) は一部で正常を模する様な配列を示した (fig. 1a)．外側緻密線維 (outer dense fiber) は mitochondria と随伴してみられる傾向がある (fig. 1a). microtubules は完全な“doublet microtubules”としてみられる事は少なく“singlet”や片方が開裂してみられる事が多く，dynein arm は全くみられなかった (fig. 1a). その他膜様構造物がしばしばみられた (fig. 2)．

以上を要約すると，尾部の各構成要素は dynein arm 等を除き不完全ながらみられるものの，それらの規則正しい配列は全く欠如し，長さ 4～5μm 程度の cytoplamic droplet 内に at random に配列してみられた．

精巣の精子細胞の微細構造を fig. 3, 4, 5 に示す．fig. 3 は chromatin の condensation の状態より step 5 の精子細胞と思われるが，basal plate, capitulum, proximal centriole, annulus 等が頭部と離断してみられる．頭部の一部である basal plate が neck piece と共にみられる事から，この状態は頭部と尾部が別々に発達した結果ではなく，ある時期に頭部と neck piece の離断がおこったものと想像されるが，実際の所は不明である．

fig. 4 は chromatin の condensation の状態から step 6 の精子細胞と思われる．この図での特徴は manchette の起始部が核膜と接してみえない事（通常起始部は fig. 5 の如くである)，distal centriole とそれに続く尾部の構造が全くみられない事，過剰な annulate lamellae がみられる事である．fig. 5 は step 5 の精子細胞であり，核，acrosome はほぼ正常と思われるが neck piece，ことに distal centriole 以下の構造は全く認められない．fig. 5 の様な精子細胞の構造は症例2において比較的多くみられた．

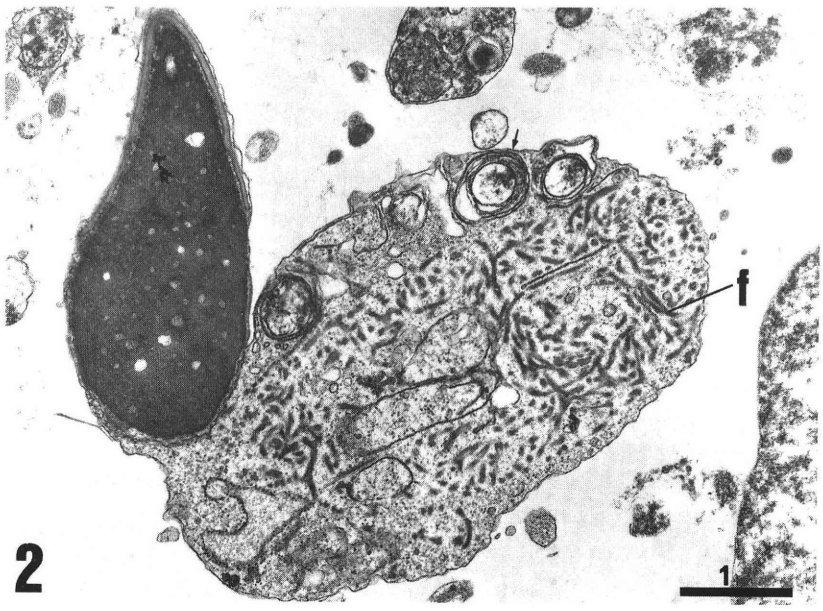
②症例5の光顕，電顕所見：精子の光顕像は fig. 6a の如きものが多くの割合を占め，一見短尾精子症を思わせる．fig. 6b は精子のやや oblique な section と思われ，共通の原形質膜内辺縁部に複数の主部の斜断面像がみられる．精子の電顕像ではこの様なものが多くみられ，いわゆる coiled tail であると考えられた．fig. 7 では4つの異なる部位の主部が共通の原形質膜内にみられる．この像は主部の coiling や屈



(bar: μm)

fig. 1a　TEM of the short-tailed spermatozoa. b: basal plate, s: striated column, p: proximal centriole, m: mitochondria, f: fibrous sheath, arrow: outer dense fiber.

fig. 1b　Light micrograph of the short-tailed spermatozoa. arrow: rudimentary tail.



(bar: μm)

fig. 2　TEM of the short-tailed spermatozoa. f: fibrous sheath, arrow: membrane like structure.

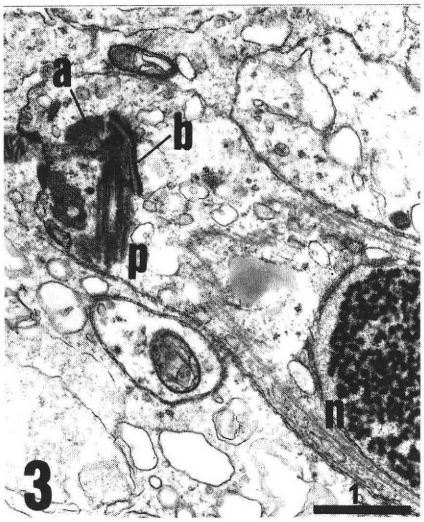


fig. 3 The spermatid in step 5. b: basal plate, p: proximal centriole, a: annulus, n: nucleus.
(bar: μm)

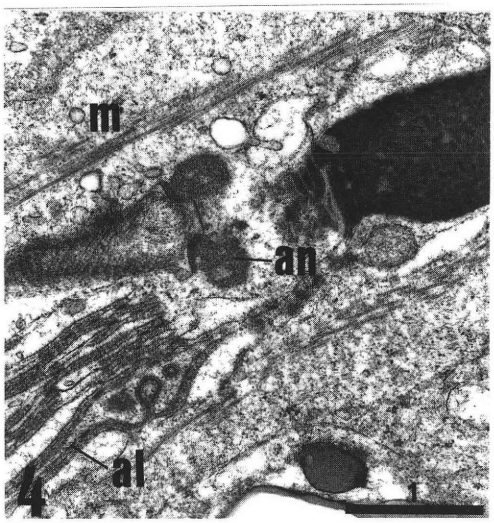


fig. 4 The spermatid in step 6. m: manchette, an: annulus, al: annulate lamellae.
(bar: μm)

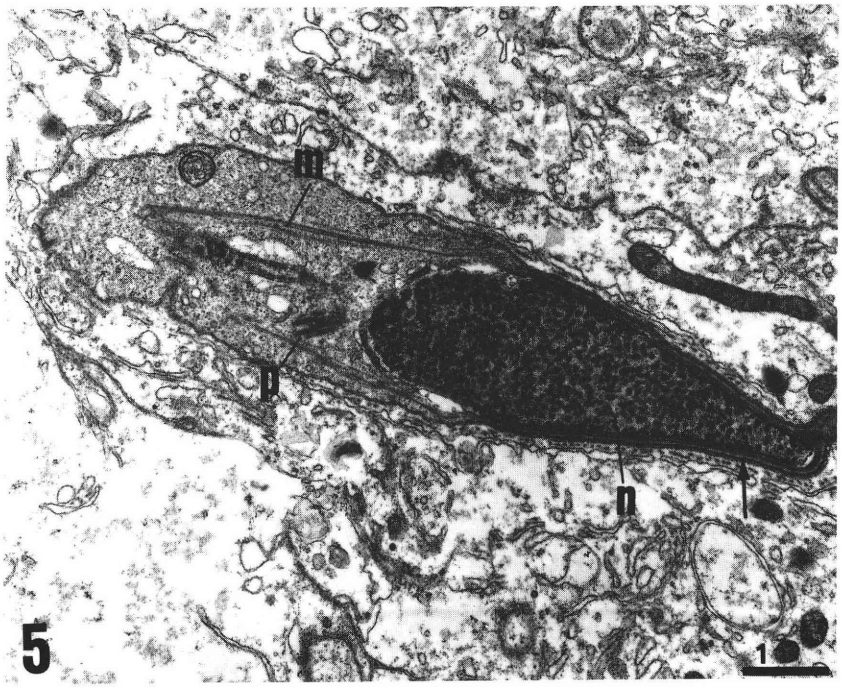


fig. 5 The spermatid in step 5. arrow: acrosome, n: nucleus, m: manchette, p: proximal centriole.
(bar: μm)

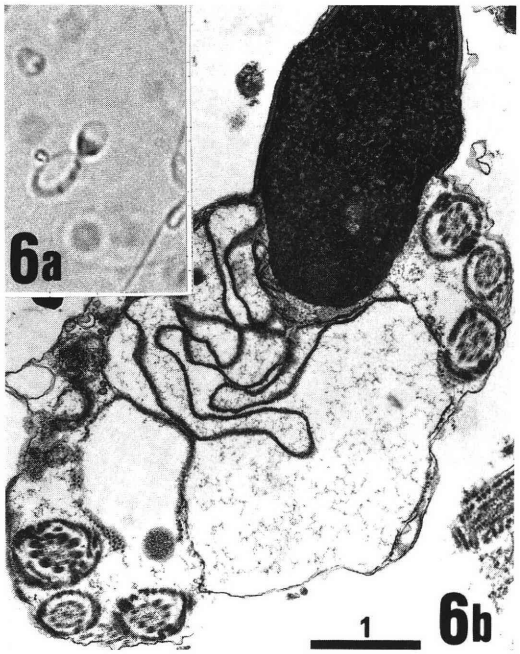


fig. 6a　Light micrograph of the coiled spermatozoa.
fig. 6b　TEM of the coiled spermatozoa (oblique section).

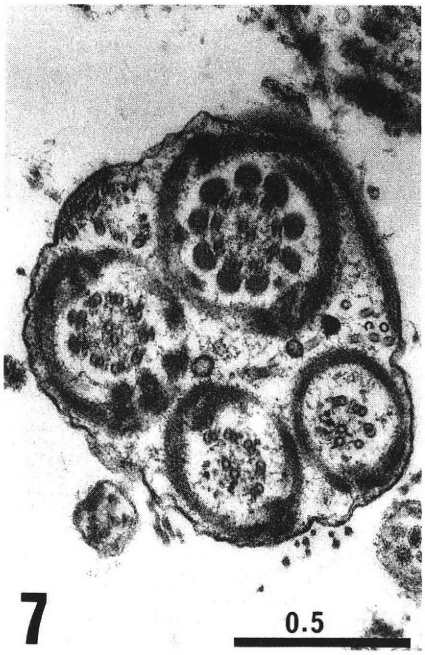


fig. 7　Electron micrograph showing four profiles of the deformed principal pieces at different levels in a serial plasma membrane.

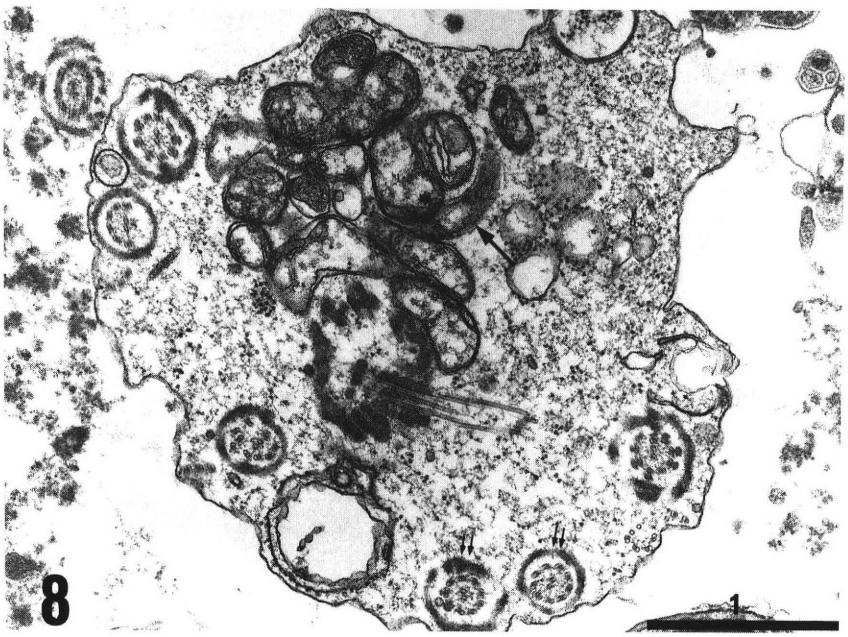


fig. 8　Transverse section through middle piece region. In the cytoplasmic droplet, irregularly arranged mitochondrias (arrow) and the coiled principal pieces are seen (double arrow).

曲を考えるよりも，多尾精子の横断面像と考えた方が妥当と思われるが，尚検討を要する．fig. 8では配列の著しく乱れたmitochondriaや複数のcoilingしていると考えられる主部の断面像がみられる．中間部の形態異常と主部のcoilingはしばしば随伴してみられるが，その因果関係は不明である．

考　察

症例1）～4）の様な短尾精子症（short-tailed spermatozoa）は我々の調べ得た範囲ではヒトではRossら[3]の2例，Baccettiらの2例[4]の他Pedersonら[5]，McClureら[6]，外山ら[7]により報告されており，牛では9例の報告がみられる[8,9,10]．名称としてはshort-tailed, tail-less, tail stump sperm defect等がみられるが，今回はBaccettiらにならいshort-tailedとした．本症はきわめて稀な奇形精子症と思われ，その頻度はRossらは1000例中2例と述べている．

精液検査所見では中等度の乏精子症を呈し運動性は殆どみられない．短尾を呈する精子の占める割合は高くRossら[3]は83～100%と述べており，我々の例でも症例2を除き70～95%と高率にみられた．

本症の精子がimmotile spermatozoaである理由は光顕上の観察からも明らかであるが，その原因の検討には精子，精巣の電顕的検討が有用である．

精子の微細構造では頭部の構造はほぼ正常としている報告が多いが[4,6,7]，Rossら[3]は頭部の形態を定量的に観察し40～50%にacrosomeの形態や核の濃縮に異常がみられると述べている．将来治療としてdirect microinjection of spermatozoa to egg[11,12]が施行される様になれば頭部の形態の問題はより詳細に検討されるべきであろう。

尾部の微細構造の概要は結果で述べた通りであり，文献上もほぼ同様の記載である[3~7]．

精子細胞の微細構造の観察所見では，前述の精子形態異常はspermiogenesisの過程で既におこっており，外山らはmanchetteの異常，Baccettiらはproximal, distal centrioleおよびmanchetteの異常が原因ではないかと推測している．我々の観察した精子細胞ではheadとneck pieceの離断，distal centriole以下の消失，manchetteの位置異常，annulate lamellaeの過剰等がみられた．

spermiogenesisはspermatidがspermatozoaへと変化していく精巧な過程であり，ヒトでは8つのstepに分けて考えられている[13]．その概要はacrosomeの形成，核の濃縮および尾部の形成と伸長であり，これらの微妙な形成過程にはSertoli細胞等を介した何らかの制御機構が存在するのかもしれない．本症はこうした制御機構の重大な欠陥により生じたとも考えられるが，実際の観察ではdistal centrioleがみられなかった事より少なくともdistal centrioleの異常が原因の1つと考えられた．尚牛の例では同胞に同様の変化がみられた事より遺伝性と想定されているが[8]，ヒトでは明らかではない．

症例5は電顕観察上いわゆるcoiled tail[14,15]に属するものと考えられた．本症の原因としては精巣内のspermiogenesisに主な原因を求めるもの[2]，精巣上体に主たる原因があると考えるもの[16]がある．ヒトの精巣上体が精子の成熟，形態の変化にどの様な役割を担っているか未だ不明な点も多いが，本症が精管結紮後の解除例である事を考えるとcoiled tailにおける精巣上体の何らかの関わりが強く示唆されて興味深い．以上の事は精巣，精巣上体の微細構造の変化を観察できれば解決する問題と思われる．

結　語

1）精子無力症40例の内，光顕上短尾精子が多くの割合を占めていた5例について報告した．

2）この内4例はいわゆるshort-tailed spermatozoaと思われ2例の精子，精巣の微細構造の観察結果について報告した．精子細胞の観察結果よりdistal centrioleの異常が原因の1つではないかと推察した．

3）他の1例は精子の微細構造上，coiled tailと思われ，精巣上体の機能異常との関係について若干の考察を加えた．

（本論文の要旨は第31回日本不妊学会総会および日本アンドロロジー学会第6回学術大会において発表した．稿を終えるにあたり電顕所見について御教示頂いた静岡大学農学部家畜繁殖学教室　小島義夫教授に深謝致します．また御協力頂いた当科検査室高橋勝治氏に感謝致します．）

文　献

1）佐藤和宏，石川博夫，前原郁夫，佐藤滋彰，木村正一，折笠精一：精子無力症における精子の微細構造について，第1報．精子無力症の臨床的事項に関する一考察．日不妊会誌．32：338，1987.

2）Bartoov, B., Eltes, F., Weissenberg, R. and Lunenfield, B.: Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy, Arch. Androl., 5: 305, 1980.

3）Ross, A., Christie, S. and Edmond, P.: Ultrastructural tail defects in the spermatozoa from

two men attending a subfertility clinic. J. Reprod. Fert., 32: 243, 1973.
4) Baccetti, B., Burrini, A., Pallini, V., Renieri, T., Rosati, F. and Menchini Fabris, G. F.: The short-tailed human spermatozoa. Ultrastructural alterations and dynein absence. J. Submicr. Cytol., 7: 349, 1975.
5) Pederson, H. and Hammen, R.: Ultrastructure of human spermatozoa with complete subcellular derangement. Arch. Andr., 9: 251, 1982.
6) McClure, R. D., Brawer, J. and Robaire, B.: Ultrastructure of immotile spermatozoa in an infertile male: a spectrum of structural defects. Fertil. Steril., 40: 395, 1983.
7) 外山芳郎，永野俊雄，角谷秀典，布施秀樹，島崎淳：精子尾部形成不全による男子不妊症の一例．電子顕微鏡的検討，日本アンドロロジー学会，第5回学術大会，講演抄録集，P．68，1985.
8) Vierula, M., Alanko, M., Remes, E. and Vanha-Perttula, T.: Ultrastructure of a tail stump defect in an Ayrshire bull. Andrologia, 15: 303, 1983.
9) Arriola, J., Johnson, L. A., Kaproth, M. and Foote, R. H.: A specific oligoteratozoospermia in a bull: The sperm tail defect. Theriogenology, 23: 899, 1985.
10) Vierula, M., Alanko, M., Anderson. M. and Vanha-Perttula, T.: Tail stump sperm defect in Ayrshire bulls: Morphogenesis of the defect. Andrologia, 19: 207, 1987.
11) 亀山賢次，浜野光市，菅原七郎，正木淳二：体外成熟培養牛卵胞卵子への精子注入に関する研究，II，凍結乾燥精子頭部の注入，哺乳卵研誌，2：25，1985.
12) Satoh, K., Endo, M., Wakata, S.: Fertilization of rabbit eggs by sperm injection. 12 th World Congress on Fertil. and Steril., abstract, p. 841, 1986.
13) Holstein, A. F. and Roosen-Runge, E. C.: Atlas of human spermatogenesis. ed. l: p. 86, Berlin, Grosse verlag, 1981.
14) Kojima, Y.: Fine structure of boar sperm abnormality: Tightly coiled tail. Japan J. Anim. Reprod., 24: 89, 1978.
15) Jadot-Van de Casseye, M., Schoysman, R., Smets, G. and G Gepts, W.: Ultrastructural aspects of asthenozoospermia. Int. J. Androl., 3: 15, 1980.
16) Holt, W. V.: Epididymal origin of a coiled tail sperm defect in a boar. J. Reprod. Fert., 64: 485, 1982.

Fine structure of asthenozoospermia in infertile men. 4. Report of five cases with "short-tailed" spermatozoa.

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

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine Miyagi 980, Japan

In forty cases of proven asthenozoospermia, five cases were considered to be "short-tailed" spermatozoa by ordinary semen analysis. However, clinical and fine structural studies revealed that one case was "tightly coiled tail" and four were "short-tailed".

Fine structure of the spermatozoa and the testes were studied by TEM in two cases with short tailed spermatozoa. The spermatozoa had rudimentary tails, whereas the heads appeared almost normal. The cytoplasmic droplet contained incomplete elements of normal tail except dynein arms, but they distributed without regularity.

From the fine structure of the spermatid, the basic disturbance appeared to be a regulatory defect in the spermiogensis.

(受付：1988年2月13日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

男子不妊症精液検査に於ける PENETRAK®の検討

Studies of PENETRAK® on Seminalysis of Male Infertile Patients

札幌医科大学泌尿器科学教室（主任：熊本悦明教授）

伊藤直樹 Naoki ITOH　立木仁 Hitoshi TACHIKI　南部明民 Akitami NANBU
三熊直人 Naoto MIKUMA　高木良雄 Yoshio TAKAGI　梅原次男 Tsugio UMEHARA
丸田浩 Hiroshi MARUTA　熊本悦明 Yoshiaki KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical College, Sapporo, 060 Japan
(Director: Prof. Y. KUMAMOTO)

男子不妊症患者の精液検査に於いて，より質的な精子運動性の所見を得るための試みが最近なされている．今回牛頸管粘液を含む capillary tube (PENETRAK®) を用いて 74 例の男子不妊症患者の精子直進運動性を測定し，精子濃度，運動率との関与を多変量解析にて検討した．重回帰分析にて求めた重相関係数は 0.641, また penetration に対する運動率の寄与率は 37.3％, 精子濃度を加えることでの寄与率の増分はわずか 3.8％であり運動率の関与が大きいものと考えられた．また妊娠例は 4 例であったが，いずれも精子濃度，運動率のいずれか一方は正常値以下であった．しかしこれら 4 例の penetration 値はすべて正常値であり，今後妊孕性評価の上で penetration 測定は有用である事が示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 159－164, 1989)

緒　言

男子不妊症患者の妊孕性の検討は精液検査に於ける精子濃度，および運動率の評価が中心となることは言うまでもない．しかし近年，特にその運動性を詳細に分析し，例えば直進運動精子と円形運動精子を分けるといった，より質的な所見を以て妊孕性を評価するようになってきた．Computer system を用いた精子運動性の多角的解析[1]により精子直進運動性，前進速度の測定が短時間で可能となり，妊孕性との関係も最近報告されている[2]．

しかし computer system を用いた検査は設備が高価であり，どの施設でも実施できない問題点が残されており，より廉価でしかも再現性の高い精子運動性の検査法が望まれていた．今回我々は Serono Japan 社より提供された牛頸管粘液を含む capillary tube (PENETRAK®) を用い比較的簡便に精子直進運動性（以下 penetration とする）を測定し得た．これは牛頸管粘液中での人精子の運動性が人頸管粘液中での運動性とよく相関する性質を応用した方法である[3]．男子不妊症患者に於ける penetration の成績，penetration への精子濃度，運動率の関与の統計学的解析，さらに妊娠例についての検討も併せて報告する．

対象及び方法

対象は 1987 年 4 月より 1988 年 1 月までの間札幌

医科大学泌尿器科不妊専門外来を受診した74例の無精子症を除いた男子不妊症患者である．5日間以上の禁欲後に用手法にて得た精液を均一化するまで約20-30分間室温放置後，量，pH，白血球数を測定，次にMakler Counting Chamberを用いて精子濃度，運動率，奇形率を求めた．Penetrationの測定は以下の様に行なった．PENETRAK®は牛頸管粘液を含むcapillary tubeであり－20℃－－30℃にて保存されているため室温にて融解した後（Fig. 1A）の如く一方を折り頸管粘液が精液に接触するように専門cupへtubeを立てる（cupには精液0.2mlを入れる）．90分後に測定用のscale（Fig. 1B）を用い，200倍鏡検にて精液接触面よりの精子最大到達点を測定し，penetration値とした．なおすべてduplicateにて測定した．

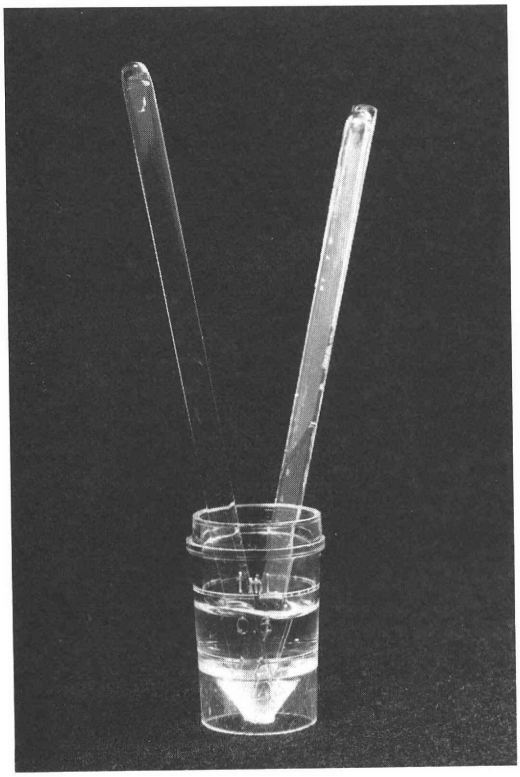


Fig. 1A　PENETRAK® (a flat capillary tube with estrus bovine cervical mucus) is inserted into sample cup.

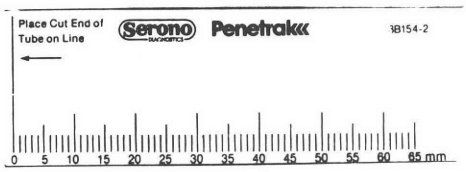


Fig. 1B　Graduated microscope slide

我々はpenetrationの程度と精子濃度，運動率との相関性を検討するにあたり，従来の単相関と，さらに多変量解析[4]を用いて解析した．多変量解析はpenetration値を基準変数，精子濃度と運動率を説明変数として重回帰分析と林の数量化理論Ⅰ類にて解析した．重回帰分析に於いてはすべての変数を連続変数として用い，数量化理論に於いては精子濃度と運動率をTable 1に示したカテゴリーを用いて検討した．

Table. 1　Category of sperm count and sperm motility in this study

	category
sperm count ($x10^6$/ml)	1. ＜10 2. 10≦ ＜20 3. 20≦ ＜40 4. 40≦
sperm motility (%)	1. ＜25 2. 25≦ ＜50 3. 50≦ ＜75 4. 75≦

また妊娠例（4例）について，精液所見とpenetrationとの比較検討を行なった．

結　果

1．penetration測定に於ける再現性の検討（Fig. 2）

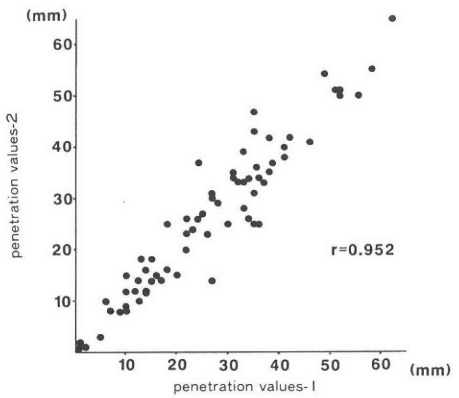


Fig. 2　Comparison of two penetration values on the same semen

Duplicateにて測定したpenetration値はFig. 2に示す如く相関係数0.952と良好な再現性を呈した．そこで以後の検討に於いては平均値を算出しpenetration値とした．

2．不妊症患者に於けるpenetration値の分布（Fig. 3）

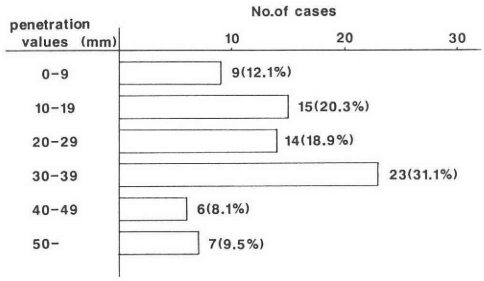


Fig. 3　Distribution of penetration values

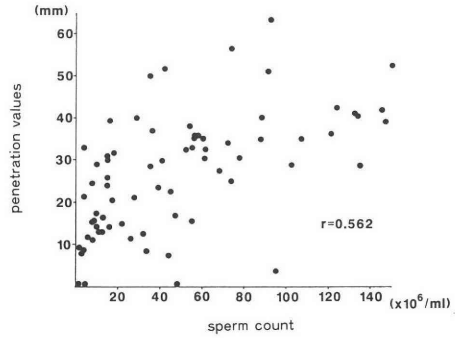


Fig. 4　Correlation between penetration values and sperm count

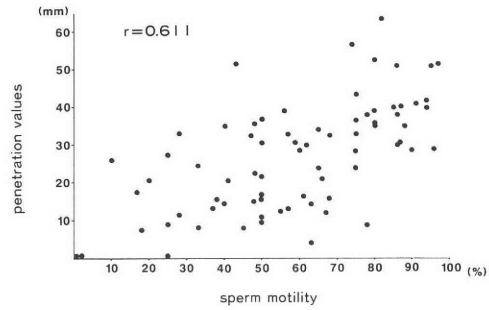
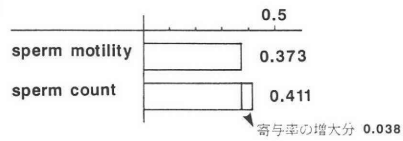


Fig. 5　Correlation between penetration values and sperm motility

1. 重相関係数　R=0.641

2. 寄与率



3. 標準偏回帰係数 と t 値

	標準偏回帰係数	t 値
sperm motility	0.477	4.331*
sperm count	0.236	2.145*

(*p<0.05)

Fig. 6　重回帰分析による sperm count, sperm motility の Penetration へ及ぼす影響の検討

Fig. 3 に男子不妊症 74 例についての penetration 値の分布を示した．20-40mm に多く分布し平均は mean±S.D.にて 27.3±14.2mm であった．

3．Penetration 値と精子濃度との関係 (Fig. 4)

Penetration 値と精子濃度との間には，相関係数 r＝0.562（P＜0.01）と有意の相関を認めた．

4．Penetration 値と運動率との関係 (Fig. 5)

Penetration 値と運動率との間には相関係数 r＝0.611（P＜0.01）と有意の相関を認めた．

5．多変量解析を用いた penetration へ及ぼす精子濃度,運動率の関与 (Fig. 6, Fig. 7)

以上の様に精子濃度,運動率ともに penetration 値と有意の相関を示した．しかしこれらの因子と penetration との関係は決して一元的なものではなく多元的に関与していると思われる．そこで精子濃度，運動率の penetration への本来の関与の程度を多変量解析にて検討した．

①重回帰分析（Fig. 6）

まずすべての変数を連続変数として扱う重回帰分析を行なった．重回帰式により算出された予測値と実測値の相関を示す重相関係数(R)は 0.641 と良好な相関を示し，これらの説明変数の penetration への関与が大きいことが推測された．重回帰分析に於いては実測値の分散＝予測値の分散＋残差の分散　という等式が成立ち，予測値の分散／実測値の分散を寄与率と呼び，あてはまりの良さを示す．運動率の penetration に対する寄与率は 37.3％，精子濃度を加えることで寄与率は 3.8％増大し 41.1％となった．(この項目の選定順は変数増加法によっている．) またデータを標準化した後の重回帰式に於ける各因子の係数であり因子の重みを示す標準偏回帰係数は運動率 0.477, 精子数 0.236 と運動率が高値であり penetration への関与が大きいものと推測された．その有意性を示す t 値（偏回帰係数／標準誤差）はどちらも 2 を越える有意なものであり penetration を説明する重要な factor であることを示した．

以上より運動率, 精子濃度は penetration へ関与する重要な因子であり，特に運動率の寄与が大きいことを数量化して示した．またこの結果は臨床的な印象ともほぼ一致した．さて実際の臨床上，運動率、精子濃度は実数値よりはむしろどの程度の範囲に属するかという質的な印象を持ち評価すると思われる．そこで次に運動率，精子濃度をいくつかのカテゴリーにわけ penetration の程度への影響を検討した．

②林の数量化理論第 I 類（Fig. 7）

運動率は全体を 25％ずつ 4 つのカテゴリーに，精子濃度は 10×10^6/ml, 20×10^6/ml, 40×10^6/ml を境

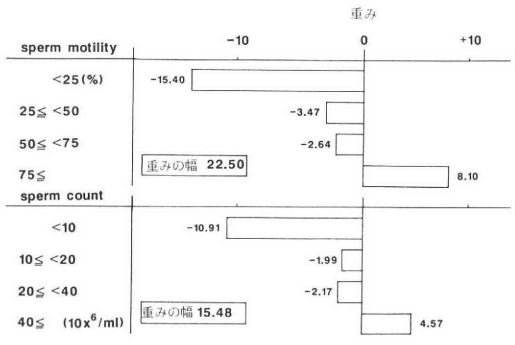


Fig. 7　数量化理論第Ⅰ類による sperm count, sperm motility の Penetration へ及ぼす影響の検討

として4つのカテゴリーに分けた（Table 1）．なお基準変数である penetration は連続変数のまま用いるため，林の数量化理論第Ⅰ類にて分析した．この解析で得られる標準化数量，いわゆる重みに関してを(Fig. 7)に示した．重みとは各カテゴリー因子の penetration に対する関与の程度を示すが0を中心として右側が正に，左側が負に関与することを示す．運動率，精子濃度とも不良になるほど penetration に対しての負の影響を及ぼすことがわかる．この重みの全体の幅は重みの範囲と表現するが運動率の方がより大きく，このカテゴリーで見た場合運動率の関与が大きいことが数量化されて示されている．また精子濃度 40×10^6/ml 以上，運動率 75%以上の群が penetration に対し正の重みを示していた．

さて以上の様に penetration への精子濃度，運動率の関与を統計学的に解析したが，もちろん penetration には他にもいくつかの factor が関与するであろうと推測される．逆に penetration 測定にて従来の精液所見以外の情報を得られる可能性の有無が問題となる．そこで次に臨床的な面より，特に妊娠例につき一般精液所見と penetration 値を検討した．

6．妊娠例に於ける penetration 値の検討 (Table 2)

妊娠例は74例中4例（5.4%）であり，うち3例は AIH 施行例であった．case 1，2については精子濃度は低値であり，また case 3，4に関しては運動率がやや低下しており4例とも一般精液検査上は完全に正常所見ではない．しかし全例とも penetration は 20mm 以上，うち3例は 30mm 以上と良好な値を示していた．なお治療としては case 1，2に対しては clomiphen citrate, case 3に対しては mecobalamine, kallikrein の併用，case 4は前立腺炎を合併しており抗生物質の投与をそれぞれ行なっていた．

Table 2　Seminal findings of 4 fertile men

	case 1	case 2	case 3	case 4
sperm count ($x10^6$/ml)	16	27	60	56
sperm motility (%)	56.3	66.7	40	48
penetration values (mm)	39.5	24	35	36
medication	clomid AIH	clomid AIH	methycobal kallikrein AIH	antibiotics

考　案

男子不妊症に対する精液検査は妊孕性の検討，治療効果の判定上有用であり従来より精子濃度，運動率の評価を中心として施行されてきた．現在広く用いられている Makler counting chamber は精子濃度測定に関して，かなり信頼性は高いと思われる[5]．しかし運動率の評価に関して，Makler counting chamber による算出では，1．運動精子を一瞬のうちに count する必要があり再現性に疑問がある．2．運動しているか，或いは運動していないかという基準で判定するため運動の質（直進運動か，円形運動か）まで考慮できない，という欠点があった．現在までの男子不妊症に対する研究の歴史を振り返ると，精子濃度すなわち spermatogenesis に関しては睾丸像の評価[6,7]，また精漿中の諸物質，transferrin[8]，kallikrein[9]，hCG-β[10]，inhibin[11]等との関係等多くの報告があり，実際それらは臨床的に応用され spermatogenesis の評価に役立っている．一方精子運動性に関しての研究は Makler ら[12]の Multiple exposure photography method，Overstreet[13]らの time-exposure photography などの photographical method から，Katz ら[14]の Videomicrography を用いた方法へと発展し，現在では Videomicrography と computer system による画像処理を組合せた方法[1]が報告されている．しかし実際の臨床への応用は繁雑な手技や高価な設備を必要とする理由より遅れている．また Knuth ら[15]は computer system による画像処理に関して画像の条件設定にて解析結果が異なると報告しており今後の開発，改良が待たれるところである．以上の理由より精子運動性に関し廉価で再現性，信頼性が高く，特に直進運動性を正しく評価し得る様々な方法の開発が強く待ち望まれていたのである．今回我々が用いた牛頸管粘液を含む capillary tube (PENETRAK®) は測定方法が簡便で再現性も高く，また cost 面でも廉価であり直進運動性を測り知る上で有用と考えられた．PENETRAK®は tube 内に牛頸管粘液を含むが，Bergmann らは[2]人頸管粘液

中の場合と牛頸管粘液中での人精子の運動性が非常によく相関することを報告している．つまりPENETRAK®を用いた精子直進運動性の評価は十分客観性を持つものと考えられる．

またpenetration値の正常値(cutoff値)の設定が必要である.Penetration値を従来の精液所見だけでは得られない新たな妊孕性の評価基準として用いるためにはpenetrationの値の正常値は実際に妊孕性を有する男性を対象として設定すべきである．Serono社の基礎資料[16]では妊孕性を有する38例中30例（79％）がpenetration 30mm以上であり，逆に妊孕性を有しない群22例ではpenetration 30mm以上を示すのはわずかに1例（5％）であったと報告しており30mm以上をfertile, 20-30mmをsubfertile，としている．Alexanderら[17]はflat tubeを用いたin vitro penetrationの検討で21mm以上を正常範囲としている．今回妊孕性を有する男性を対象とした検討はできなかったが，ある程度の目安を知るため今回の症例群を精子濃度20×10^6/ml, 運動率50％を基準として，この両方の基準を満たす群と，それ以外の群とでpenetration値を比較検討して見た.(Fig. 8)

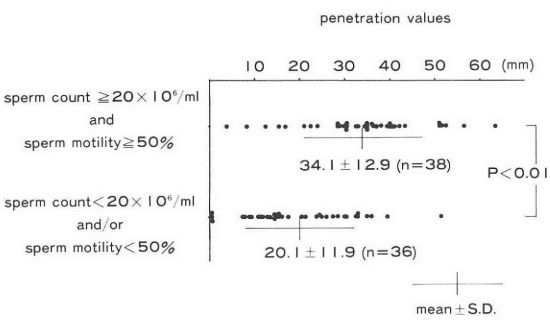


Fig. 8　Penetration values and sperm findings

異常群ではほとんどが30mm以下のpenetration値を示した．しかし正常群ではpenetrationの平均値は高いが幅広い分布を示し，penetration値の不良の症例は少なからず存在した．このdiscrepancyは従来の運動率の評価自体にやはり問題があることと，penetration測定にて従来の精液所見以外の新たな情報を得られる可能性を示している．実際に4例の妊娠例について検討すると精子濃度，運動率のいずれか一方は異常であるが，penetration値はほぼ良好の値となっている．今後さらに症例を重ね，妊孕性とpenetration値との関係を検討する必要があると思われる．

Penetration値と精子濃度，運動率との関係はそれぞれ相関係数が0.562, 0.611と有意のものであった．David[18]らも人頸管粘液を用いたin vitroでのpenetration testの結果，penetration値と精子濃度，運動率の単相関係数はそれぞれ0.327, 0.776と運動率との高い相関を示し正しい運動率の評価方法であると報告している．しかしpenetrationへの精子濃度，運動率の関与の程度はそれぞれまったく単独に関与しているわけではなく多元的に影響を及ぼしていると考えられる．この様に一つの事象に対し多因子が関与する条件の中で，その事象に対しての各因子の関与を統計的に解析するのに多変量解析は適している．今回の検討でまず重回帰分析においては重相関係数が0.641と高く精子濃度，運動率の2因子でpenetrationのかなりの部分が説明され，また寄与率，偏相関係数より運動率の関与が大きいことが判明した．ここで注意すべきことは精子濃度と運動率との間に内部相関が強いために($r=0.563$)多変量解析に於いて運動率の関与が強くでた可能性があることである．また林の数量化理論では本来性別，症状の有無といった離散変数を用いるものであるが本稿では精子濃度，運動率を先に示したカテゴリーに分けて検討してみた．ただしこの様に連続変数をカテゴリー分けする場合カテゴリーが変れば重みの範囲，場合によっては正負の関与も逆転することもありうるわけで，その結果は慎重に検討する必要がある．今回用いた数量化理論におけるカテゴリー分けは精子濃度，運動率とも従来より用いられている分類であり，またほぼ納得できる結果であったことより適切な数量化理論モデルと思われた．

結　語

①男子不妊症患者74例に対しPENETRAK®を用いて精子直進運動性(penetration値)を測定し，同時に精子濃度，運動率との検討を多変量解析を用いて検討した．

②Penetration値に対する精子濃度，運動率の関与は，単相関係数ではそれぞれ0.562, 0.611と大きな差を認めなかったが，重回帰分析後の偏回帰係数はそれぞれ0.236, 0.477と運動率の関与が大きいことが示された．この結果は臨床的印象とも一致するものであった．

③妊孕能を判定するcutoff値は設定できなかったが精子濃度40×10^6/ml以上，かつ運動率50%以上の群では殆どが30mm以上のpenetration値を示し，一つの基準となり得る可能性を示した．一方精子濃度，運動率のいずれか，あるいは両方が不良の症例でも有効なpenetrationを示すものもあり妊娠例の検討からも，penetration測定で新たな情報が得られる可能性が示唆され今後さらに症例を重ね検討するこ

とが必要と思われた.

本論文の要旨は第32回日本不妊学会総会（金沢）にて発表した.

RENETRAK®を提供していただいたセローノジャパン社に感謝致します.

文　献

1) Katz, D. F. and Davis, R. O.: Automatic analysis of human sperm motion. J. Androl 8: 170, 1987.
2) Mathur, S., Carlton, M., Ziegler, J., Rust, P. F. and Williamson, H. O.: A computerized sperm motion analysis. Fertil Steril 46: 484, 1986.
3) Bergman, A., Amit, A., David, M. P., Homonnai, Z. and Patz,G. P.: Penetration of human ejaculated spermatozoa into human and bovine cervical mucus. I. Correlation between penetration values. Fertil Steril 36: 363, 1981.
4) 富永祐民：多変量解析の応用. 治療効果判定のための実用統計学. 再改定版, p50－75, 蟹書房, 東京, 1987.
5) Makler, A.: The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. Fertil Steril 33: 337, 1980.
6) 熊本悦明：睾丸機能不全の臨床的検討　第1編身体医学の問題. 日泌尿会誌　54：1063, 1963.
7) 寺田雅生：睾丸の研究　第3報精子発生不全睾丸の精細管内細胞数の研究（germinal cell index 及び spermatogenic curve を中心にして）. 日泌尿会誌　64：930, 1973
8) OrlandO, C., Natali, A., Caldini, A. L., Maver, A., Barni, T., Forti, G., Wood, W. G., Serino, M. and Straaburger, C. J.: Ceruloplasmin and transferrin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubular function? Fertil Steril 43: 290, 1985.
9) 斎藤誠一, 熊本悦明, 大野一典, 丸田　浩, 島本和明, 飯村　功：男子生殖器における kallikrein-kinin 系の研究　日不妊会誌　30：276, 1985.
10) 斎藤誠一, 大野一典, 熊本悦明：ヒト精漿中 hCG-β と精子発生能との関連性・日泌尿会誌　75：1970, 1984.
11) 高木良雄, 熊本悦明, 渡辺勇一：男子不妊症患者精漿の INHIBIN 活性. 日不妊会誌　32：177, 1987.
12) Makler, A.: A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. Fertil Steril 30: 192, 1978.
13) Overstreet, J. W., Katz, D. F., Hanson, F. W. and Fonseca, J. R.: A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. Fertil Steril 31: 162, 1979.
14) Katz, D. F. and Overstreet, J. W.: Sperm motility assessment by videomicrography. Fertil Steril 35: 188, 1981.
15) Knuth, U. A., Yeung, C. and Nieschlag, E.: Computerized semen analysis: Objective mesurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. Fertil Steril 48: 118, 1987.
16) PENETRAK®貼付資料. Serono Diagnostics, Inc
17) Alexander, N. J.: Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil Steril 36: 201, 1981.
18) David, M. P., Amit, A., Bergman, A., Vedwab G., Patz, G. F. and Homonnai, Z. T.: Sperm penetration in vitro: Correlation between parameters of sperm quality and the penetration capacity. Fertil Steril 32: 676, 1979.

Studies of PENETRAK® on seminalysis of male infertile patients

Naoki Itoh, Hitoshi Tachiki, Akitami Nanbu, Naoto Mikuma, Yoshio Takagi, Tsugio Umehara, Hiroshi Maruta and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology, Sapporo Medical College, Sapporo, 060, Japan
(Director: Prof. Y. Kumamoto)

Recently, some methods were developed to investigate more qualitative findings related to sperm motility. Mesurements were made of sperm penetration values in 74 male infertile patients by capillary tube with bovine cervical mucus (PENETRAK®). Relationships between penetration values and sperm count, sperm motility were studied using multivariate analysis. In multiple regression analysis, multiple correlation coefficient was 0.641. The contribution rate explained by sperm motility was 37.3% in penetration values. 3.8% of contribution rate was increased by included sperm count. So sperm motility seemed to be major factor in penetration values.

Although the penetration values were almost normal, sperm count or sperm motility was lower than normal range in 4 fertile patients. Therefore the possibility was suggested that measurement of sperm penetration might be a new index on evaluation of semen analysis.

（受付：1988年8月15日特掲）

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

Gossypolによるヒト精漿中乳酸脱水素酵素－C_4 (LDH-C_4) 活性への影響についての検討

Effects of Gossypol on Human Specific Lactate Dehydrogenase－C_4 (LDH-C_4)

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科
内島 豊　吉田謙一郎　斉藤 博
Yutaka UCHIJIMA　Ken-Ichiro YOSHIDA　Hiroshi SAITO

Department of Urology, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School

精漿中から精製・分離したヒトLDH-C_4に対するgossypolの作用を検討した. LDH-C_4は精巣および精子に特異的に存在する酵素で，特に精子ではLDHの80%がLDH-C_4であり，精子の代謝と密接な関わりを持つことが示唆されている.

ヒトLDH-C_4活性はgossypolにより強く抑制され，5×10^{-6}Mではその80%が，また1×10^{-4}Mの濃度では100%抑制された.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 165－168, 1989)

緒　言

Gossypolはcotton plantに存在する黄色のpolyphenolic色素（分子量518.54；$C_{30}H_{30}O_8$）であるが[1]，近年男子経口避妊薬として中国などで臨床的に使用され，本剤が経口避妊薬として有効であることが報告されている[2].

Gossypolの投与により，精子の運動性の低下とそれに続く無精子症の発生を見ることが本剤の経口避妊薬としての主要な作用であると考えられている[2]. この他gossypolは精巣・精子に特異的に存在するlactate dehydrogenase-C_4（以下LDH-C_4と略す）に対し，強力な抑制効果を示すことも報告され[3,4]，LDH-C_4がGossypolの標的酵素であることが示唆されている[5].

今回，我々はヒト精漿中より精製・分離したLDH-C_4を用い男子避妊薬としてのgossypolの作用機序を明らかにする事を目的とし，本剤のLDH-C_4への影響を検討したので，ここに報告する.

対象および方法

埼玉医科大学医療センター泌尿器科不妊外来を受診した症例について，最低4日間の禁欲後，用手法にて採取した射精液を3,000回転20分間遠心沈殿

Table 1　Purification procedures of seminal plasma LDH-C_4.

Seminal Plasma
↓←precipitation by 40-60% of $(NH_4)_2SO_4$
Oxamate-Sepharose 4B affinity column chromatography
↓←0.5×10^{-6}M NADH
↓←0.2×10^{-6}M NADH
↓←1.6×10^{-3}M NAD
AMP affinity column chromatography
↓←Buffer
↓←1.6×10^{-3}M NAD
↓⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯→LDH-C_4
↓←0.5×10^{-6}M NADH
LDH-1～LDH-5

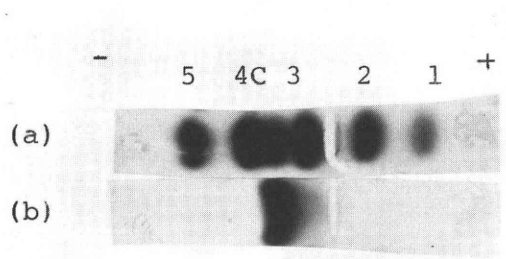


Fig.1a　Agar gel electrophoresis

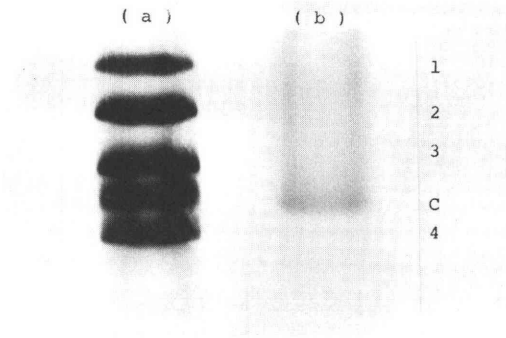


Fig.1b　Polyacrylamide gel electrophoresis

後，上清を試料とした．

精漿中 LDH-C_4の精製・分離はすでに報告しているが[6]，簡単に記述すると，精漿 100ml を 4℃ 10,000g で 60 分間遠心沈殿後，その上清に対して 40－60％硫安塩析を施行し，生じた沈殿物を 1 昼夜 0.5M NaCl 含有 0.05M　PBS で透析し，その後試料を Oxamate-Sepharose 4B カラムクロマトグラフィー法および AMP カラムクロマトグラフィー法を使用して LDH-C_4を精製・分離した (Table 1).

Agar gel 電気泳動法および polyacrylamide gel 電気泳動法で 1 本の LDH 活性バンドを示すことを確認した (Fig. 1a, 1b).

精製・分離した LDH-C_4の活性値は 46.500mU/mg protein であり，比活性は 541 倍に増加した (Table 2)

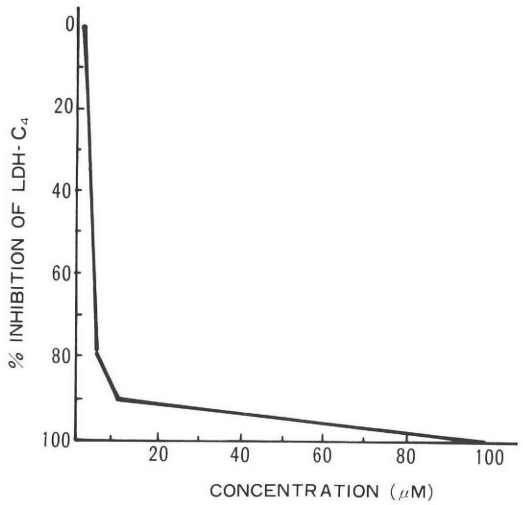


Fig.2　Inhibition curve of LDH-C_4 activity by gossypol.

Gossypol acetic acid は Sigma 社製を使用し，95％エタノールに溶解して用いた．すべての反応液は測定直前に調節した．

精製・分離した LDH-C_4 (744mU/ml，蛋白量 16ng/ml) と pyruvate (最終濃度 0.115mM) および種々の濃度の gossypol actic acid を 15 分間室温で混和させた後，NADH (最終濃度 0.9mM) を加えて，吸光度の変化を UV－180 (島津社製) を使用して波長 340nm で測定した．

成　績

Fig. 2 に LDH-C_4活性に対する gossypol の抑制効果を示す (Fig. 2). Gossypol は濃度に比例して強い LDH-C_4活性の抑制効果を示し，それぞれ gossypol 濃度が 1×10^{-6}M では抑制率が 0％であったが 5×10^{-6}M で 80％，1×10^{-5}M で 90％，5×10^{-5}M で 95％の抑制率を示した．また 1×10^{-4}M では LDH-C_4活性

Table 2　Purification steps of seminal plasma LDH-C_4

Purification step	Total protein (mg/ml)	Total activity (mU/ml)	Specific activity (mU/mg protein)
Seminal plasma	12.033	1029	86
Pooled eluants after Oxamate-Sepharose column	0.023	556	24,174
Pooled eluants after AMP-Sepharose column	0.016	744	46,500

は完全に抑制された.

なお95%エタノールはLDH-C_4活性に有意の影響を示さなかった.

考　案

LDH-C_4は精巣に特異的に存在する酵素であり[7], Mough[5]はこの酵素がgossypolの精巣に対する主要な標的酵素であり, 本酵素の抑制がgossypolの避妊効果と密接な関わりが存在することを示唆した. Leeら[8]はLDH-$_4$アイソエンザイムの中でもLDH-C_4の方が, LDH-A_4やLDH-B_4より強くgossypolに抑制され, その作用は非可逆的で濃度依存性を示すと報告し, この抑制がNADHで部分的にブロックされることから, gossypolとLDH-C_4の反応は基質への補酵素結合部分で行なわれることを指摘した.

Goggypolの酵素への阻害形式について, Olgiatiら[9]は, gossypolはLDH-C_4に対しNADHとは競合的阻害作用(ki=30μM)を示し, 基質(lactateおよびpyruvate)とは非競合的阻害作用(lactate; ki=52μM, pyruvate; ki=220μM)を示すと報告している.

本実験においてgossypolは精製・分離したLDH-C_4に対して強い阻害作用を示した. GossypolのLDH-C_4に対する阻害作用はTsoやKimら[3,10]からも報告されている. Tsoらはブタ精子を用いgossypol濃度が1.8×10^{-5}MでLDH-C_4活性の抑制がみられ, 1.3×10^{-4}Mでその50%の活性の抑制が, また3.2×10^{-4}Mでは70%の活性が抑制されたと報告した. Kimらもラットおよびハムスターの精巣を用いLDH-C_4に対するgossypolの抑制効果を検討し, 5×10^{-5}Mで50%の活性の抑制がみられ, 1×10^{-4}Mでは酵素活性の90%が抑制されたと報告している. これらの報告に対し本実験では比較的低濃度のgossypolでLDH-C_4活性が強く抑制されたが, この違いはおそらくは前2者の報告と測定方法および測定条件が同一でないこと, また前2者ではいずれも精製・分離したLDH-C_4ではなくcrudeな試料を使用していることに起因するものと思われる. Gossypolはアルブミンなどと強い親和性を示すが[11], crudeの試料中には多くの蛋白が存在するため, 前2者の実験ではgossypolの作用が阻害された事も否定できない.

LDH-C_4は精子においてはmiddle pieaceに大部分存在し, しかもcytosolのみならずミトコンドリアの膜にも存在することが知られている[12,13]. またgossypolの投与により, 精子においてはATP濃度が低下し[14], 組織学的にもミトコンドリアの障害が早期に認められるとの報告がみられる[15]. これらの報告はヒトにおいてもgoggypolの避妊効果はLDH-C_4活性の抑制が関与している事を示唆する.

しかしながらKallaら[16]はgossypolの精子運動性への影響はATPase活性の抑制によるとしており, この他gossypolはミトコンドリア内電子伝達系に作用するとの報告[17]もなされている. またLDH-C_4へのgossypolの作用効果の検討で, 臨床的に(−)−gossypolとは異なり避妊効果を持たない(+)−gossypolもin vitroでは(−)−gossypolと同等のLDH-C_4活性への抑制効果を示すことが報告されており[10], 更にgossypolの投与によりin vivoでは避妊効果を生じにくい動物でもin vitroではLDH-C_4活性が強く抑制されることも報告されている[18]. 以上の事実はLDH-C_4のみがgossypolの避妊効果の主要な働きを代弁するだけでないことを示唆するものであろう. 本実験においてはLDH-C_4はgossypolにより強く抑制されたが, gossypolの主たる作用がLDH-C_4活性の抑制にあるのかどうかを判断するためには, 更に充分な検討か必要であると考えられる.

結　語

精漿中から精製・分離したヒトLDH-C_4に対するgossypolの作用を検討した. ヒトLDH-C_4活性はgossypolにより強く抑制され, 5×10^{-6}Mではその80%が, また1×10^{-4}Mの濃度では100%が抑制された.

文　献

1) Abou-Donia C. B.: Physiological efects and metabolism of gossypol Residue Rev. 61: 125, 1976.
2) Chongthammakun, S., Ekavipat, C., Sanitwongse, B. and Pavasuthipaist, K.: Effects of gossypol on human and monkey sperm motility in vitro. Contraception 34: 323, 1986.
3) Tso, W-W. and Lee, C-S.: Lactate dehydrogenase-X: an isozyme particularly sensitive to gossypol inhibition. Int. J. Androl. 5: 205, 1982.
4) Eliasson, R. and Virji, R.: Effects of gossypol acetic acid on the activity of LDH-C4 from human and rabbit spermatozoa. Int. J. Androl. 6: 109, 1983.
5) Maugh, T. H.: Male ""pill"" blocks sperm enzyme. Science 212: 314, 1981.
6) 内島　豊, 平賀聖悟, 根岸壮治：ヒト乳酸脱水酵素−X (C_4) [LDH-X(C_4)] の研究 1. ヒトLDH-X (C_4) の精製・分離, 日泌尿会誌, 76：546, 1985.
7) Blanco, A. and Zinkham, W. H.: Lactate dehydrogenases in human testes. Science 139: 601,

1963.
8) Lee, C-Y. G., Moon, Y. S., Yuan, J. H. and Chen, A. F.: Enzyme inactivation and inhibition by gossypol. Moll. Cell. Biochem. 47: 65, 1982.
9) Olgiati, K. L. and Toscano, W. A.: Kinetics of gossypol inhibition of bovine lactete dehydrogenase X. Biochem. Biophy. Res. Commun. 115: 180, 1983.
10) Kim, I. C., Waller, D. P. and Fong, H. H. S.: Inhibition of LDH-X by gossypol optical isomers. J. Androl. 6: 344, 1985.
11) Royer, R. E. and Vander Jagt, D. L.: Gossypol binds to a highaffinity binfding site on human serum albumin. FEBS Lett. 157: 18, 1983.
12) Clausen, J.: Lactate dehydrogenase isoenzymes of sperm cells and testes. Biochem. J. 111: 207, 1969.
13) Machado de Domenech, E., Domenech, C. E., Aoki, A. and Blanco, A.: Association of the testicular lactate dehydrogenase isozymes with a special type of mitochondria. Biol. Reprod. 6: 136, 1972.
14) Wichmann, K., Kapyaho, K., Sinervirta, R. and Janne, J.: Effect of gossypol on the motility and metabolism of human spermatozoa. J. Reprod. Fert. 69: 259, 1983.
15) Yu, Z-H.: Damage of sperm mitochondria and decrease of lactate denydrogenase−X in gossypol-feds rats. Adr. Contracept. Del. Syst. 1: 75, 1985.
16) Kalla, N. R. and Vasudev, M.: Studies on the male antifertility agent-gossypol acetic acid. II. Effect of gossypol acetic acid on the motility and ATPase activity of human spermatozoa. Andrologia 13: 65, 1981.
17) Tso, W-W. and Lee, C-S.: Variations of gossypol sensitivity in boar spermatizoal electron transport chain segments. Cotraception 24: 569, 1981.
18) Morris, I. D., Higgins, C., and Matlin, S. A.: Inhibition of testicular LDH-X from laboratory animals and may by gossypol and its isomers. J. Reprod. Fert. 77: 607, 1986.

Effects of gossypol on human specific lactate dehydrogenase-C_4 (LDH-C_4)

Yutaka Uchijima, Ken-Ichiro Yoshida and Hiroshi Saito

Department of Urology Saitama Medical Center Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

LDH-C_4 is specific isoenzymes from other LDH isoenzymes with regard to its locality and kinetic properties. Because about 80% of LDH of spermatozoa contain is LDH-C_4,it must be strongly related to very specific metabolic process of sperm. In order to investigate the action mechanisms of gossypol, which is a new medicine as an oral contraceptive, effects of gossypol on LDH-C_4 was examined.

Materials and Methods: LDH-C_4 from human seminal plasma was purified by Oxamate-Sepharose 4B affinity column chromatography and AMP affinity column chromatography. The homogeteity of LDH-C_4 was proved by agar gel electrophoresis and polyacrylamide disc gel electrophoresis. Gossypol was dissolved in 95% ethanol. LDH activity was analysed spectrophotometrically. The cuvette contained 0.1 M PBS (pH 7.4), 0.2 mM pyruvate, and 0.115 mM NADH. Gossypol was added to give a final concentration of between 1×10^{-6}M and 1×10^{-4}M.

Results: Ethanol did not inhibit LDH-C_4 activity. Gossypol inhibited LDH-C_4 activity in a dose-dependent manner when tested at concentration of 5×10^{-6}M, 1×10^{-5}, 5×10^{-5} M and 1×10^{-4}M.

(受付：1988年2月23日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

加令に伴う精巣の組織学的変化

Histological Changes of the Testis with Relation to Aging

帝京大学医学部附属市原病院泌尿器科学教室（主任：伊藤晴夫教授）
柳　重行　山口邦雄　伊藤晴夫
Shigeyuki YANAGI　Kunio YAMAGUCHI　Haruo ITO

Department of Urology, Teikyo University
School of Medicine, Ichihara Hospital
(Director: Prof. H. ITO)

東京都老人総合研究所基礎病理学部
丸山直記
Naoki MARUYAMA

Department of Pathology, Tokyo
Metropolitan Institute of Gerotology

精巣の老人性変化を組織学的に検討した．66歳から96歳までの73例の剖検例より得た精巣組織を用い，以下の結論を得た．

1．70歳未満でも半数の症例で部分的に精細管の硝子化が見られ，これは精巣の血管支配の遠位にあたる部位に顕著であった．

2．精子形成能の障害は加令とともに進行するが，85歳以上でも¼の症例で精子の出現が認められた．

3．精細管壁の肥厚と精巣内小動脈の硬化所見との間には有意の相関がみられ，加令に伴う精巣障害は，小動脈硬化が原因の一つであることが分った．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 169－174, 1989)

緒　言

社会の高齢化に伴い，老人の性の問題がクローズアップされてきた．われわれは高齢者の性機能を把握するための一つの研究として，加齢に伴う精巣の組織学的変化の特徴について，剖検例の精巣で検討し，特に造精機能の障害の程度と，その原因について若干の知見を得たので報告する．

対　象

対象は東京都養育院病理部での高齢者剖検例73例であり，年齢は66歳から96歳で平均77歳である．既往歴に泌尿器科疾患および精巣に影響を与えると思われる疾患のない症例を選び，かつ，死因として肺炎・窒息等による呼吸不全・脳血管障害・心筋梗塞等の心疾患により，ほぼ急死の状態で死亡した症例を選択した．これら73例を年齢により表1に示した5つのグループに分け，比較検討した．死因についても各グループ別にみると表1のようである．

精巣組織標本は，10％ホルマリン固定後パラフィン包埋し，精巣の長軸に沿った矢状断切片を作成し，ヘマトキシリン－エオジン染色をおこなった．組織学的な比較を簡明化するため，次の4点に注目した．

1．一切片に見られる全精細管の中での硝子化した精細管の割合．

2．硝子化していない精細管について，そのJohnsen

表1　年令別症例数及び死因

group	年　令	症例	死因			
			呼吸不全	脳血管障害	心疾患	その他
1	70才未満	10	4	2	3	1
2	70 ～ 74	18	12	1	5	0
3	75 ～ 79	11	4	3	4	0
4	80 ～ 84	18	9	5	4	0
5	85才以上	16	11	1	4	0
計		73	40	12	20	1

表2　精細管の硝子化率

group	(No.)	全精細管数に対する硝子化精細管数の割合(%)	全症例に対する硝子化精細管を有する症例の割合(%)
1	(10)	9.2±11.9	50
2	(18)	13.3±12.1	83
3	(11)	17.9±11.0	91
4	(18)	31.5±24.9	94
5	(16)	43.5±28.0	100

表3　Johnsen Score Count と精子出現率

group	(No.)	Johnsen Score Count	精子を認める症例(%)
1	(10)	7.5±1.5	80
2	(18)	6.1±2.1	50
3	(11)	5.5±1.9*	27
4	(18)	4.6±2.1**	27
5	(16)	4.3±2.3**	25(90才以上0%)

**P<0.01　*P<0.05：group 1 と比較

表4　精細管内径と精細管壁の厚さ

group	(No.)	精細管内径(μm)	精細管壁の厚さ(μm)
1	(10)	185.5±38.5	14.5± 6.5
2	(18)	174.5±44.5	23.0±11.5*
3	(11)	173.0±45.0	23.3± 9.0*
4	(18)	149.2±51.6	28.0±10.0**
5	(16)	128.5±49.5**	29.0±12.5**

**p<0.01　*p<0.05：group 1 と比較

表5　睾丸内小動脈の動脈硬化所見

group	(No.)	血管壁の厚さ(D)／血管内径(R)（D R比）
1	(10)	0.41±0.12
2	(18)	0.48±0.17
3	(11)	0.54±0.35
4	(18)	0.53±0.11*
5	(16)	0.55±0.17*

*P<0.05：group 1 と比較

Score Count の平均値

3．精細管内径と精細管壁の厚さの測定

4．精巣内小動脈の硬化の程度の指標として，血管内径（R）に対する血管壁の厚さ（D）(D/R 比)

以上につき光顕にて，各グループ間で比較検討した．

結　果

1．精細管の硝子化（図1）

組織標本内に見られる全精細管数に対する硝子化

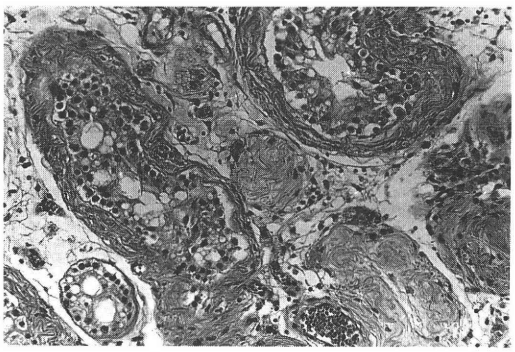


図1　80歳．部分的な精細管の硝子化と精細管壁の波状肥厚を認める
（H-E　染色　400×）

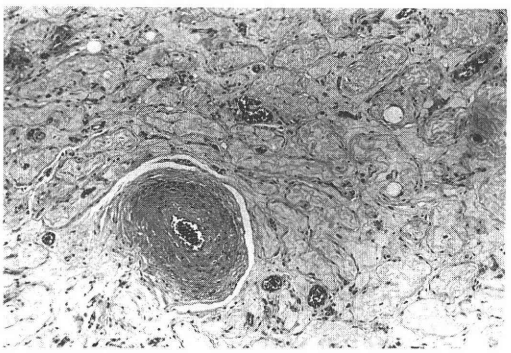


図2　96歳．広範な精細管の硝子化と顕著な精巣内小動脈の硬化所見を認める
（H-E　染色　100×）

精細管数の割合いのグループ別平均を表2に示した．70歳未満で約10％の精細管に硝子化が見られる．また全症例の50％で部分的に精細管の硝子化がみられる．この硝子化の範囲は加齢とともに広がり，85歳以上の症例では43.5％の範囲に広がり，すべての症例で部分的に硝子化した精細管がみられる．

また，この硝子化の見られる部位としては精巣上体頭部に面した精巣上極に著明であり，次に精巣上体側の精巣後面に多く見られた．

2．Johnsen Score Count[1)]

硝子化していない精細管について，Johnsen Score Countの平均値をグループ別に表3に示した．Johnsen Score Countの平均値は加齢とともに低下し，70歳未満のGroup 1に比べ，75歳以上の各グループとも統計学上有意の低下がみられた．また一つでも精細管内に精子を認める症例の割合は，70歳未満では80％と高率であるが，加齢とともに減少する．しかし85歳以上でも25％に精子が認められた．

3．精細管内径と精細管壁の厚さ

表4に示すように精細管内径は，70歳未満では，平均185.5μmであるが，加齢とともに内径は縮小し，85歳以上のグループとの間には有意の差が見られる．これに対して精細管壁の厚さは加齢とともに増加し70歳以上の各グループでは70歳未満に比べ統計学上有意差がある．

4．精巣内小動脈の硬化所見（図2）

精巣内小動脈の硬化所見の指標として血管内径（R）に対する血管壁の厚さ（D）の比（D/R）を以て比較した．表5に示すように加齢とともにD/Rは増加し，70歳未満に比べ80歳以上ではD/Rは有意に増加している．

5．精細管硝子化率と小動脈硬化所見の関係

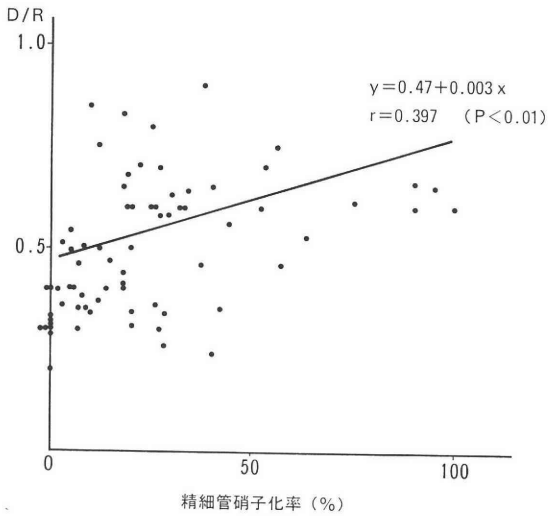


図3　精細管硝子化率と小動脈硬化所見（D/R）の関係

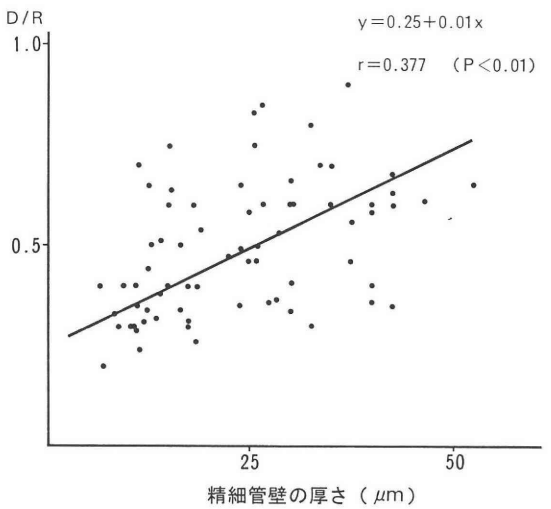


図4　精細管壁の厚さと小動脈硬化所見（D/R）の関係

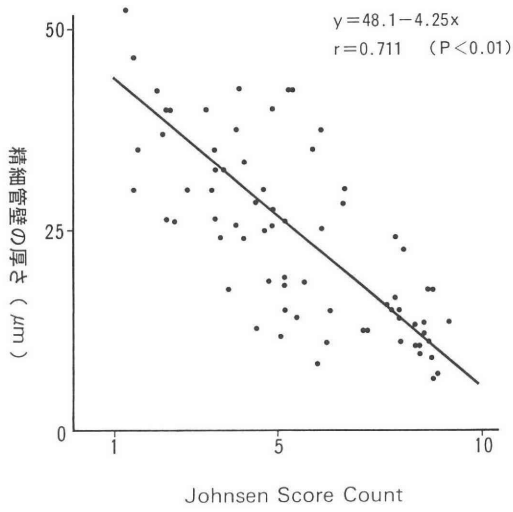


図5　Johnsen Score Count と精細管壁の厚さの関係

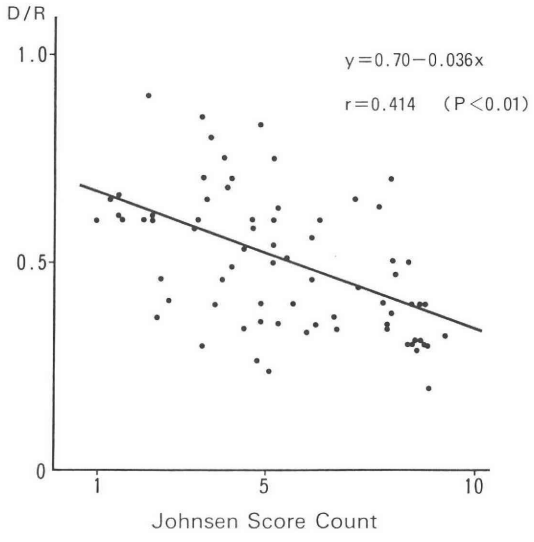


図6　Johnsen Score Count と小動脈硬化所見(D/R)の関係

図3に示すように，相関係数 r＝0.397 で P＜0.01 で有意の正の相関がみられる．

6．精細管壁の厚さと小動脈硬化所見の関係

図4に示すように，相関係数 r＝0.377 で P＜0.01 で有意の正の相関がみられる．

7．Johnsen Score Count と精細管壁の厚さの関係

図5に示すように，相関係数 r＝0.711 で，P＜0.01 で有意の負の相関がみられる．

8．Johnsen Score Count と小動脈硬化所見の関係

図6に示すように，相関係数 r＝0.414 で P＜0.01 で有意の負の相関がみられる．

考　案

高齢化社会を迎え，高齢者の性に関する問題も多く取上げられるようになってきた．性機能を論ずる際に，その基本となる精巣機能をまず把握しなければならない．そこでまず，高齢者の精巣の組織学的変化について検討した．精巣の年齢に伴う変化については，すでにいくつかの報告がみられ，黒土[2]は急死，事故死の358例の精巣を組織学的に検討し，間質細胞はすでに20歳代後半より退行性変性が出現し，50歳代ではこれが著明となり，精細管の肥厚も急増し造精機能の低下がみられることを報告している．また，一条[3]は剖検例の精巣を年齢別にその変化を血管支配の面から検討し，30歳代で部分的にせよすでに精子形成能の低下が見られると報告している．これらの報告から，極めて早期から精巣の組織学的変化が始まっていることに驚かされる．われわれの結果は，70歳以上の高齢者が主体であるが，70歳未満でも半数以上で精細管の硝子化がみられ，早期より変化が始まることが推測された．しかし，85歳以上でも¼の症例で精巣内に精子形成を認め，生殖能力が残されていることが分り，また，精巣の変化には個体差が極めて大きい事も判明した．

精細管の変性の部位は，矢状断面上，精巣上極付近と精巣上体側の精巣後面に多くみられる．この部位は，精巣の血管支配の遠位にあたり，毛細血管網の発達していない部位で[4]，この部位の変性が老人性変化の特徴であると一条は述べている．古く，Harrison & Barclay[5]により，精巣の動脈硬化は内臓諸器官の血管変化の一環として起こると考えられ，また，精巣間質の小動脈の動脈硬化を年齢別に検討し，思春期より硬化所見を認めたとの Hatakeyama ら[6]の報告にあるように，驚くべき早期に精巣の変化は始まっている．われわれの症例でも，精巣以外の血管変化を調べるとおおむね一致した変化がみられ，この動脈硬化の程度の差は個々まちまちであり，その結果，精巣の変化に個体差が現われたとおもわれた．精巣動脈の硬化所見の程度と精細管の硝子化率との間の関係をみると明らかな相関関係が見られること，血管支配に一致した硝子化が認められることから，動脈硬化が精細管硝子化の原因と考えられる．また，この動脈硬化所見と精細管壁の厚さとの間にも正の相関関係がみられ，造精機能の指標である Johnsen Score Count と精細管壁の厚さ，及び動脈硬化所見との間に負の相関関係が認められる事より，動脈硬化が造精機能障害の一つの原因と考えられる．しかし，これは精巣の血流障害の面のみからの結論であ

り，間質機能を含めた内分泌学的研究の結果が，この問題の解明に必要と思われた．

最後に性機能との関連についてであるが，われわれの症例は生前の性生活の実体に関しては資料がなく，正確な性行動の把握は不可能である．われわれがある老人施設で行なったアンケート調査の結果では，性行為を欲すると答えた者は，80歳未満では83％と高率であるが，80歳代では21％と低下している．60歳以上全体では45％の者が性行為を欲するとの結果であり，大工原[7]の報告とほぼ匹敵する．また，妻もしくは性的なパートナーのいる者では，80歳未満では全例性交可能で，1年以上性交のないインポテンツ例はないが，80歳代では90％がパートナーがいるにもかかわらず，インポテンツであった．白井[8]は性欲は年齢と関連はないが，勃起力は加齢による神経・血管系障害の増加とともに低下し，また，加齢による内分泌機能低下に伴い低下すると報告，熊本ら[9]は80歳以上でインポテンツの割合は87.5％と報告しており，われわれの結果もほぼ同様であった．精巣組織の変化から考えると，高齢者の性機能はもう少し保たれていてよいとの印象を受けるが，本人のみならずパートナー側の因子も大であり，パートナーを含めての把握が重要と思われた．

結　語

高齢者（66歳～96歳）73例の剖検例の精巣組織像を検討し，以下の結論を得た．

1．70歳未満でも半数の症例ですでに部分的な精細管の硝子化が見られ，その割合は加令とともに増加し，精巣の血管支配の遠位にあたる部位に顕著であった．

2．精子形成能の障害は加令とともに進行するが，85歳以上でも¼の症例で精子の出現が認められた．

3．精細管壁の肥厚と精巣内小動脈の硬化所見，Johnsen Score Count，精細管の硝子化の割合との間には有意の相関がみられ，加令に伴う精巣障害は，小動脈硬化が原因の一つであることが判明した．

（なお，本論文の要旨は，第31回日本不妊学会総会において発表した．）

文　献

1）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: 1, 1970

2）黒土　稔：睾丸及び前立腺の組織学的研究　横浜医学　22：55，1971

3）一条貞義：血管支配よりみた精巣の老人性変化　日泌尿会誌　60：304，1969

4）F. Suzuki and T. Nagano: Microvasculature of the human testis and excurrent duct system-Renin-casting and scanning electron-microscopic studies. Cell tissue Res 243: 79, 1986

5）Harrison, R. G. and Barclay, A. E.: The distribution of the testcular artery (internal spermatic artery) to the human testis. Brit. J. Urol. 20: 57, 1948

6）Hatakeyama, S., Sengoku, K. and Takayama, S.: Histological and submicroscopic studies on arteriolar hyalinosis of the human testis. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ 13: 511, 1966

7）大工原秀子：老人の性（実態調査から）総合リハ　7：855，1979

8）白井将文：老年者の性機能　日本臨床　39：574，1981

9）熊本悦明，丸田　浩：老年者の性機能　老人科診療　5：269，1984

Histological changes of the testis with relation to aging

Shigeyuki Yanagi, Kunio Yamaguchi and Haruo Ito

Department of Urology,
Teikyo University School of Medicine,
Ichihara Hospital, Chiba 299-01, Japan
(Director: Prof. H. Ito)

Naoki Maruyama

Department of Pathology,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerotology,
Tokyo 173, Japan

Senile changes of the testis were histologically observed. The materials used for histological studies were obtained from 73 autopsy cases between the ages of 66 and 96.

The results were summarized as follows.

1. The hyaloid change of the testis was observed in the half of the group under 70 years. The changes of the testis were prominent in the upper areas of the testis which correspond to the periphery of the arterial supply.

2. The reduction of the spermatogenesis was increased with aging, but in the quarter of the group over 85 years, the spermatogenesis was observed.

3. The thickening of the basement membrane of the seminiferous tubules was significiantly correlated with the degree of the arteriosclerosis of the testis.

It is concluded that the arteriosclerosis of the testis would be most prominent in the etiology of the senile lesions of the testis.

(受付：1988年2月24日)

日本不妊学会雑誌
第34巻 第1号 1989

INDUCTION OF THE ACROSOME REACTION OF HAMSTER SPERM CELLS BY THE MEMBRANE MOBILITY AGENT, A2C, AND SUPPRESSION BY THE DISULFIDE REDUCING AGENT, DITHIOTHREITOL

Kahei SATO

Department of Applied Biological Science,
College of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Kanagawa 252, Japan

Abstract; In the present study, effects of A2C and dithiothreitol (DTT) on the induction of the acrosome reaction of hamster sperm cells were examined. A2C, the membrane mobility agent, accelerated the onset of the acrosome reaction of hamster sperm cells. The sperm cells incubated continuously in the medium containing A2C (0.5-5.0μg/ml) underwent the acrosome reaction by 1hr after the start of incubation, but control sperm cells showed only 3.3% acrosome reaction 1 hr after the incubation. The acrosome-reacted cells were capable fertilization as assessed by their ability to fertilize ovulated hamster eggs.

DTT inhibited A2C-mediated acrosome reaction of hamster sperm cells.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(1), 175－179, 1989)

Introduction

Before fertilization can occur, mammalian sperm cells must undergo capacitation and then the acrosome reaction (Yanagimachi, 1981)[1]. It is estimated that these biological processes in sperm cells are a series of complex biochemical and morphological chages. Capacitation is associtated with changes in surface-adsorbed materials, redistribution of intramembraneou protein practicales, and the changes in the membrane lipids; the subsequent acrosome reaction involves multiple fusions between the outter acrosome membrane and the overlaying sperm plasma membrane, which allow the release and exposure of acrosomal enzymes possibily necessary through the egg investiments (Yanagimachi, 1981)[1].

Recently, certain lysophospholipids have been found to promote lipids the onset of the acrosome reaction and yield hyperactivated, fertile guinea pig sperm cells (Fleming and Yanagimachi, 1982)[2]. Further, in guinea pig sperm cells a new class of lipid-related molecules (A2C), membrane mobility agent, design to promote lipid disorder, promotes capacitation (Fleming et al., 1982)[3]. According to their report, A2C has been to be not induced the acrosome reaction in guinea pig sperm cells. Furthermore, they observed promotion of capacitation in guinea pig sperm cells by A2C was inhibited by dithiothreitol (DTT), disulfide-reducing agents. Thus, it is of interest to examine the effect of A2C on the induction of capacitation or the acrosome reaction in mammalian sperm cells without guinea pig sperm cells.

In the present study, effects of A2C and DTT on the acrosome reaction of hamster spermatozoa were examined.

Materials and Methods

Medium and Reagents

The standard medium used for sperm incubation was a modified Tyrode solution 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemicals) (Sato and Suzuki, 1985)[4]. The medium used was filtrated by Milipore filter (Milipore Inc.,) and the pH of the medium was adjusted to 7.4 immediately before use. Amount of A2C of 1 mg per 1 ml of BSA-free medium were dispersed. Dispersion was carried out by a brief sonication for 15-20 min with a sonicator (Kokusai Denki) immediately after use. An equal volume of A2C suspension was mixed with a volume of medium containing BSA. DTT (Sigma Chemicals) was dissolved in the medium immediately before use.

Incubation and Examination of Hamster Sperm cells

Preparation, incubation and examination of sperm cells were carried out, as previously described (Sato and Suzuki, 1985)[4]. Briefly, sperm cells were recovered from the distal cauda epididymis of adult male golden hamsters. Sperm cells were suspended in the standard medium and the cells were swimed up under a CO_2 incubator (Hirasawa Inc.) (37°C, 5% CO_2 in air) for 15 min. After swim-up the sperm cells were suspended in the standard medium with or without the reagents (A2C, DTT) at a concentration of 5-6 x 10^6 sperm cells/ml and incubated under mineral oil. The sperm suspension was incubated at 37°C under 5% CO_2 in air. At verious intervals after the start of incubation, survival and the acrosome reaction of the sperm cells were examined by the phase-contrast microscope, as described previously (Sato and Suzuki, 1985)[4].

Collection and insemination of eggs

Mature females of golden hamster were superovulated by an intraperitoneal injection of 25 IU PMSG (Teikoku Hormon Co.) followed by an intraperitoneal injection of 25 IU hCG (Teikoku Hormone Co.) 52 hr later. PMSG was given in the late morning of day 1 of the estrous cycle (the day of ovulation) and hCG was given in the evening of day 3. About 15.5 hr after hCG injection, eggs were recovered from female oviducts by rupturing the ampulla with fine needles. The eggs were freed from the cumulus cells by treating them for 10 min with 0.1% bovine hyaluronidase. Eggs to be inseminated were transferred into 1 ml of fresh standard medium under mineral oil in a plastic dish and kept at 37°C for less than 30 min.

Results

Effect of A2C on the occurence of the acrosome reaction

When sperm cells were incubated continously in the medium containing A2C in various concentrations, at hourly intervals after the start of incubation the cells were examined to check the incidence of the acrosome reaction and its survival rate. The results were presented in Table 1. The percentage of sperm cells that underwent the acrosome reaction increased with increasing A2C concentrations Further, under the present experimental conditions, the opitimum concentration of A2C for inducing the acrosome reaction was 1.0 μg/ml. At this concentration of A2C over 70% of the sperm cells were alive and motile, and about 70% of the acrosome reaction was observed 1 hr after incubation of the sperm cells. While, control sperm cells exhibited only 3.3% acrosome reaction. As shown in Fig. 1, high concentration of A2C (2.5-5.0μg/ml) were detrimental for sperm survival.

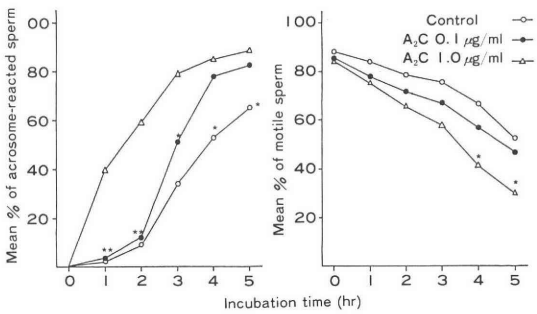


Fig. 1 Hamster sperm survival and the acrosome reaction in media with or without A2C
* P<0.05 compared to control
* * P<0.001 compared to control

Table 1. Survival and the acrosome reaction of golden hamster spermatozoa incubated in media with or without A2C

A_2C (μg/ml)	Mean % of motile sperm (mean % of acrosome-reacted sperm) at various times of incubation					
	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr
0(Control)	88.1 (0)	83.8 (3.3)	78.4 (9.2)	75.6 (34.1)	66.6 (52.9)	52.5 (65.2)
0.05	86.7 (0)	80.0 (4.0)	71.6 (9.2)	68.3 (42.0)	61.7 (71.5)	50.0 (82.2)
0.1	85.0 (0)	78.3 (3.2)	71.6 (12.2)	66.7 (50.9)	56.7 (77.8)	46.7 (82.4)
0.5	85.0 (0)	80.0 (14.3)	70.0 (29.4)	61.7 (69.1)	56.7 (77.3)	45.0 (87.5)
1.0	85.0 (0)	75.5 (39.4)	65.6 (58.8)	58.3 (79.0)	41.7 (85.3)	30.0 (88.5)
2.5	78.3 (0)	70.0 (48.5)	62.5 (60.5)	55.0 (81.0)	40.0 (84.5)	27.5 (90.7)
5.0	78.3 (0)	69.1 (49.8)	60.8 (68.5)	50.0 (81.7)	40.8((87.2)	27.5 (92.0)

Fertility of A2C-treated sperm in the presence or absence of DTT

Under the present of DTT, fertility of A2C-treated sperm cells was examined. When A2C-treated sperm cells were mixed with ovulated eggs in the standard medium, 100% of the eggs inseminated were fertilized (27 out of 27 eggs in 3 experiments), indicating that these sperm cells were highly fertile. On the other hand, when eggs were treated with various concentrations (0-1.0 μg/ml) of DTT for 1 hr and then inseminated with highly fertile A2C-treated sperm cells, fertilzation was partially or completely blocked. However, the washing of eggs restored fertility in 42% of the eggs.

Effect of DTT on the acrosome reaction of hamster sperm cells by A2C

The continous presence of DTT in the incubation medium suppressed the incidence of the acrosome reaction by A2C (Table 2, Fig. 2). The percentage of sperm cells that underwent the acrosome reaction were decreased with increasing DTT concentration 2-3 hr after the start of incubation. But, 4 and 5 hr after incubation the inhibitory effect of DTT became less.

Discussion

The present study demonstrated that A2C promoted the acrosome reaction of hamster

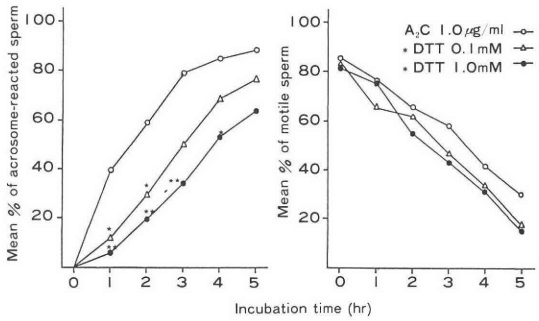


Fig. 2 Hamster sperm survival and the acrosome reaction in media containing A2C with or without dithiothreitol (DTT)
* $P<0.05$ to control
** $P<0.01$ to control

Table 2. Survival and the acrosome reaction of golden hamster spermatozoa incubated in media containing A2C with or without dithiothreitol(DTT)

conc. of A2C + DTT (μg/ml)	(mM)	Mean % of motile sperm (mean % of acrosome-reacted sperm) at various times of incubation					
		0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr
0	0	88.1 (0)	83.8 (3.3)	78.4 (9.2)	75.6 (34.1)	66.6 (52.9)	52.5 (65.2)
1.0	0	85.0 (0)	75.5 (39.4)	65.6 (58.8)	58.3 (79.0)	41.7 (85.3)	30.0 (88.5)
1.0	0.1	83.0 (0)	66.0 (12.0)	62.0 (29.7)	47.0 (50.0)	34.0 (68.9)	18.0 (77.1)
1.0	0.5	85.0 (0)	74.0 (6.4)	58.0 (22.7)	45.0 (40.7)	32.0 (60.0)	15.0 (69.2)
1.0	1.0	82.0 (0)	75.0 (6.2)	55.0 (19.5)	43.0 (34.4)	31.0 (53.3)	15.6 (63.9)

sperm cells in the chemically defined medium. Fleming et al (1982) have reported that A2C promoted the capacitation of guinea pig sperm cells in Ca-free medium and, upon the addition of Ca, leaded to a synchronous acrosome reaction and fertile sperm cells. In the present study, A2C induced the acrosome reaction in hamster sperm, indicating the possibility that A2C also promote the capacitation of hamster sperm cells. On the other hand, Fleming et al (1982)[3] have reported that A2C can not induce the acrosome reaction. According to them, guinea pig sperm cells incubated in A2C in Ca-free medium for 1 hr undergo a rapid acrosome reaction upon the addition of Ca, but control sperm cells, which incubated in A2C-free medium for 1 hr then exposed to Ca, exhibited only 2% acrosome reactions. The reason for this discrepancy of the respons to A2C between guinea pig and hamster sperm cells can not be explained, but it might be due to differences of mechanisms in the sperm capacitation or acrosome reaction. At present time, molecular mechanisms of capacitation and the acrosome reaction are not fully understood (Yanagimachi, 1981)[1] and factors reposible for the differences observed cannot be identified.

The acrosome reaction is inhibited by DTT in the present study. However, DTT can not block completely the acrosome reaction. In guinea pig sperm this reagent is reported to block capacitation rather than the acrosome reaction (Fleming et al., 1982)[3]. While, Yanagimachi et al. (1983)[5] have reported that capacitation of guinea pig sperm cells in vitro is inhibited by DTT and precapacitated sperm cells are unable to undergo the acrosome reaction in the presence of DTT. This result indicats that DTT also blocks the acrosome reaction. Further studies on the effects of DTT on the incidence of capacitation and the acrosome reaction are heeded. It is known that in guinea pig sperm cells capacitation and the acrosome reaction can be separated clearly (Fleming and Yanagimachi, 1981)[2]. However, in hamster sperm cells the acrosome reaction and capacitation can not be clealy distinguished or separated. Thus, in the present stydy we could not know whether DTT inhibited capacitation or not. To analyze the effect of reagents on capacitation and the acrosome reaction, it is necessary condition to separate these biological phenomena.

In the present study, A2C-treated sperm cells fertilized 100% of eggs. This result is agreement with that of guine pig sperm cells (Fleming et al., 1982)[3].

References

1) Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. In: Fertilization and embryonic development in vitro, edited by Mastroianni, L. and Biggers, J. D., Plenum Press, New York and london. pp 81, 1981.

2) Fleming, A. D. and Yanagimachi, R.: Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa, with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. Gamate Res., 4: 253, 1981.

3) Fleming, J. D., Kosower, N. S. and Yanagimachi, R.: Promotion of capacitation of guinea pig spermatozoa by the membrane mobility agents, A2C and inhibition by the dislfide-reducing agent, DTT. Gamete Res., 5: 19. 1982.

4) Sato, K. and Suziki, Y.: In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution. J. Mamm. Ova Res., 2: 149. 1985.

5) Yanagimachi, R., Haung, T. T. F., Fleming, A. D., Koswer, N. S., and Nicolson, G. L.: Dithiothreitol, a disulfide-reducing agent, inhibits capacitation, acrosome reaction, and interaction with eggs by guinea pig spermatozoa. Gamete Res., 7: 145. 1983.

A2C によるハムスター精子の先体反応誘起と Dithiothreitol (DTT) による A2C 先体反応誘起効果の抑制

日本大学農獣医学部応用
生物科学科動物細胞学研究室

佐藤嘉兵

ハムスター精子を用いて，近年 membrane mobility agent として注目されている A2C の先体反応誘起効果について検討を加えた．A2C 添加培養液中に浮遊させたハムスターの精巣上体尾部精子は，その添加濃度 0.1 または 1.0μg/ml において，明らかに control 精子に比

べて先体反応が促進された．また，このA2C処理精子を用いて体外受精を行なったところ，非常に高い受精能力を示した．しかしながら，A2C添加培養液中で連続的に精子を培養すると培養時間と共にその生存率は低下した．一方，disulfide reducing agentとして知られているDTT (0.1, 0.5, 1.0mM/ml) をA2C, 1.0μg/mlと共に培養液に添加した場合，A2Cの先体反応誘起効果は抑制された．しかし，精子の生存率の低下は改善されなかった．

(受付：1988年2月17日)

地方部会講演抄録

昭和63年度日本不妊学会中部支部学術集会

日　　時：昭和63年7月2日（土）
場　　所：三重県医師会館

1．当科における治療法別にみた男子不妊症の成績

塚本勝己・山本逸夫・林　宣男
杉村芳樹・田島和洋・栃木宏水
川村寿一　　（三重大泌尿器）

対象症例は特発性男子不妊症72例で，うち42例は漢方を中心とした非内分泌療法を，残り30例は非内分泌療法無効のため，クエン酸クロミフェン療法を行なった．

精子濃度は，非内分泌療法で38.1％の著効・有効をみ，内分泌療法では36.7％であった．

精子運動率は，非内分泌療法にて47.6％が著効・有効であり，内分泌療法では36.6％であった．

また精子濃度と運動率を点数で総合判定する小寺の判定法を用い，治療効果の総合判定をした．非内分泌療法では，著効・有効率は57.1％で，内分泌療法では，46.7％であった．

両治療法ともに，男子不妊症に対して有効であると考えられたが，投与適性の検討が必要と思われた．

2．特発性乏精子症および精索静脈瘤を伴う乏精子症に対する治療法の検討

篠田正幸・堀場優樹・高梨勝男
名出頼男
（藤田学園保健衛生大泌尿器）

特発性乏精子症に対するkallikrein (KAL)療法は一定の評価がなされているが，われわれはKALの作用機序の一つとしてSertoli細胞機能賦活作用が考えられることを確認している．

一方，精索静脈瘤患者のSertoli細胞機能障害を示唆する報告も見られるため，精索静脈瘤を伴う乏精子症患者に対し，初期治療としてKAL 120KU/dayの投与を行なった（1群）．また内精静脈高位結紮術後，精液所見が改善しない症例に対しても同様の治療を行なった（2群）．1群の有効率は30.0％，妊娠率は25％であった．2群の有効率は27.2％，妊娠率は15.4％であった．一方，高位結紮術の有効率は30.4％，妊娠率は20.5％であった．

LH, FSHが異常値を示した症例はこれら3者の治療に対し，大部分が反応しなかった．

3．人工精液瘤植込の1例

麦　雅好・絹川常郎・大竹　浩
相馬駛量（市立岡崎病院泌尿器）
渡辺丈治（小牧市民病院泌尿器）
三宅弘治　（名古屋大学泌尿器）

男性不妊症の原因として精路通過障害は，男性不妊患者の約7.4％を占めるといわれている．その原因として，幼小児期における両側ソケイヘルニア根治術，両側の停留睾丸に対する睾丸固定術などによる医原性による場合や，炎症性疾患，先天性疾患などがあげられる．

われわれは，両側ソケイヘルニア根治術後の無精子症に対し，人工精液瘤造設術を試みた1例を報告する．

4．Percollを用いた精子洗浄濃縮法にて妊娠に成功した逆行性射精の1例

石川　洋・越知正憲・千原　啓
山本陽子・永田哲郎・米谷国男
（藤田学園保健衛生大坂文種報徳会病院産婦）

逆行性射精は，1947年Swabbにより最初に報告されている．AIHにより妊娠に成功したことを最初に報告したのはHotchkissで，本邦でも1971年白石の報告以来，19例が妊娠に成功している．今回われわれは，膀胱内射精液をPercollにて洗浄濃縮し，AIHを行ない，6回目に妊娠に成功したので報告する．

症例は26歳，不妊を主訴に外来受診し，精査の結果女性側の不妊原因は認められないため，男性不妊を疑った．泌尿器科にて逆行性射精を診断されたため，膀胱洗浄液によるAIHを行ない，6回目に妊娠し，現在妊娠7か月まで順調に経過している．AIHにおいて，高濃度の運動性の高い精子を得るため，各施設において種々の工夫がなされているが，今回われわれが行なったPercollによる洗浄濃縮法は有効であり，膀胱洗浄液に混入する尿や細菌などの除去に有用であると考えられる．

5．当院で行なっている精液洗浄 AIH の現況

松澤克治・石原　豊・小栗久典
水谷哲也・菅沼信彦・友田　豊
（名大産婦）
木村敏男・林　隆行・中村潔央
近藤育代・大沢政巳・成田　収
（名大分院産婦）

われわれは体外受精の成功という経験を通して，精子の処理・卵子の前培養・受精卵の培養には培養液が大きな役割を果たしていることを知った．体外受精の培養液には Ham's F-10 medium (以下 HF-10) を使用しているが，この HF-10 を用いて，用手法にて採取した精液を 10～20 分間放置液化後，2 倍量の HF-10 を加え 1600rpm 10 分間遠心，上清除去後，再度同操作を行ない，沈澱を 0.5ml の HF-10 に均一に懸濁し，AIH に供するという洗浄 AIH を行ない，良好な成績を得た．

昭和 61 年 3 月～62 年 8 月の間に 90 組，363 周期に対し洗浄 AIH を行ない，12 例の妊娠を得た．うち流産が 1 例あり，誕生した児には明らかな異常は認めなかった．

6．子宮内膜症に対する Hormone (Danazol・Buserelin・Gestrinone) 療法の臨床的検討

松澤克治・石原　豊・小栗久典
水谷哲也・菅沼信彦・友田　豊
（名大産婦）
中村　潔・近藤育代・林　隆行
木村敏男・大沢政巳・成田　収
（名大分院産婦）
正橋鉄夫・浅井光興・鈴木正利
（愛知医大産婦）

子宮内膜症の治療法には，Hormone 療法・手術療法およびその併用療法があるが，近年特に Hormone 療法に進歩が著しく，Danazol 療法の普及と共に，19-nor steroid の誘導体である Gestrinone，および LHRH agonist である Buserelin が臨床応用されるに至っている．

今回，われわれは昭和 59 年より 3 年間に，月経困難症・性交痛・不妊等を主訴として当大学附属病院を受診し，臨床的に子宮内膜症と診断された症例に対し，Buserelin を 14 症例に，Gestrinone を 34 症例に使用する機会を得たので，同時期に施行した Danazol 療法 102 症例との，自・他覚症状改善度・副作用発現率・1 年後の再発率等を中心に比較検討を行なった．また，Buserelin11 症例，Gestrinone17 症例の挙児希望子宮内膜症症例については，同時期の Danazol 60 症例，保存手術 36 症例と，妊娠率を中心に比較検討を行なった．

7．脱落膜における Prolactin の存在様式とその分泌調節機構について

中　義尚・中　　淳・西山真人
矢納研二・山本稔彦・杉山陽一
（三重大産婦）

アビジンビオチペロキシダーゼ法を用いた免疫組織学的染色では，子宮内膜間質細胞は妊娠時，非妊娠時を問わずその脱落膜化を来たすと，Prolactin (以下 PRL) の特異染色を示すようになり，染色強度は，脱落膜化の程度と相関する傾向を認めた．このことは，着床周辺に PRL が子宮内膜に高濃度に存在することを意味し，その生理作用を類推する上で，非常に興味深い，また，妊娠初期脱落膜細胞の培養実験により，脱落膜性 PRL の分泌は，control 群に比し，c-AMP dependent protein kinase の賦活剤である Forskolin の添加より，危険率 1％以下の有意差をもって容量依存性に促進され，protein kinase C の賦活剤である phorbol 12 myristate 13 acetate，および epidermal growth factor の添加により，危険率 1％以下の有意差をもって容量依存性に抑制されることがわかり，これらの細胞内の mediator が，各々 PRL 分泌調節に関与している可能性が示唆された．

8．習慣流産における凝固線溶系の関与について

錦見直子・青木耕治・中谷剛彬
八神喜昭　　（名市大産婦）

習慣流産の原因の 1 つとして凝固異常の関与が注目されている．今回，凝固線溶系の異常が原因と考えられる習慣流産 2 症例を経験したので，症例を呈示し，それを中心にして，習慣流産における凝固線溶系の関与について考察したい．

症例 1．非妊時から APTT 値の延長を認め，妊娠初期に延長傾向が増大した．妊娠初期の AT III，プラスミノーゲンは低値を示し妊娠 8 週で流産した．

症例 2．非妊時から APTT 値延長，妊娠初期に延長傾向増大し，AT III，プラスミノーゲンの低下を認めた．この症例は妊娠 7 週からプレドニゾロン・アスピリン療法，および AT III・ヘパリン療法を行ない，現在妊娠 24 週で妊娠継続中である．

9．体重減少性無排卵症にみられる高カロチン血症について

榊原知代・山田隆祥・三輪　是
戸谷良造・鈴置洋三
(国立名古屋病院産婦)

10．合成 steroid の構造と排卵抑制効果について

草西　洋・川鰭市郎・今井篤志
森　秀弘・玉舎照彦
(岐阜大産婦)

各種経口合成 steroid 剤による排卵抑制効果を利用して，婦人科では避妊目的に使用されている．各種経口 steroid は視床下部―下垂体系に働き negative feed back 作用により gonadotropin の分泌を抑制する．日常，経口避妊薬として用いられる estrogen は ethynylestradiol と mestranol であり，progestogen は主に norethisterone と d-norgestrel である．この他，排卵抑制効果を有するものの，子宮内膜萎縮効果が強いために子宮内膜症治療薬として期待されているものに danazol と gestrinone がある．

norethisterone と d-norgestrel の構造上の違いは steroid 環の 13 位の核間 methyl が ethyl に変わっているだけであるが，この構造上のささいな変化が，steroid の progesterone receptor との結合親和性に大きな差異を生じさせる．その結果，臨床使用にあたって，d-norgestrel は norethisterone に比較して少ない量で同等の排卵抑制効果を有する．danazol と gestrinone との間にも同様のことがいえる．danazol と gestinone とは構造上若干の違いがあるが，前者は 13-methyl であるのに対し，後者は 13-ethyl を有する．そして臨床使用にあたっては，gestrinone は danazol に比較して少量の投与量で同等の臨床効果を有する．

以上のことから，steroid の 13 位は排卵抑制に重要な関わりを持っていることが推察される．

11．体外受精法における hMG 製剤を用いた卵胞刺激法の検討

貝田清隆・生田克夫・万歳　稔
花田征治・八神喜昭
(名市大産婦)
水野金一郎　(名市大看護短大)

IVF-ET では成熟卵胞を多数得る事が重要である．そこで hMG 製剤の種類および投与法による違いを検討した．FSH と LH を等量含有する製剤 (hMG) と低 LH 含有 (FSH) の 2 種類を用い，月経周期第 3 日より 2A を投与する方法と月経周期 3 日，4 日の 2 日間のみ 4A 投与する方法で，4 種類の組合せ (2hMG, 2hMG＋2FSH, 2FSH, 2＋2FSH) で比較検討した．対象は卵管性不妊，機能性不妊，男性因子による不妊の計 9 例，31 周期とした．

[結果] 2hMG 法は 8 症例 13 周期，投与日数：6.7±1.6 日，投与打ち切り翌日の E2 値：435.4±153.6pg/ml，発育卵胞数：4.3±2.1 個．2hMG＋2FSH 法は 3 症例 3 周期，それぞれ 7.3±0.6 日，383.5±48.5pg/ml，5.0±1.7 個．2FSH 法は 3 症例 5 周期，それぞれ 6.8±1.3 日，602.8±154.1pg/ml，7.0±1.6 個．2＋2FSH 法は 6 症例 10 周期，それぞれ 6.8±1.5 日，453.0±188.0pg/ml，5.6±2.7 個．4 種類の刺激方法間で，10mm 以上の発育卵胞数に 2hMG 法，2FSH 法との間で差を認めたが，投与日数，血中 E2 に有意差は見られなかった．

12．当院における体外受精―胚移植の現況

館山祐子・吉村俊和・神谷貴之
丸山邦之・市川文隆・蛯原照男
多田　伸・作井久孝・廣田　穣
沢田富夫・吉村泰典・河上征治
福島　穣
(藤田学園保健衛生大産婦)

両側卵管閉塞による不妊を適応として，1987 年 1 月より 18 症例に体外受精－胚移植 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) を施行した．当院では全例に卵巣刺激法として hMG-hCG 療法を使用している．月経周期 3 日目より hMG150IU/day を連日投与し，血中および尿中 estradiol 値，卵胞径計測により卵胞発育を追跡し，卵胞発育確認後，hCG5000IU を筋注，腹腔鏡下に採卵を施行した．培養液としては，マウス卵の受精後発育の検討 (quality control) 結果より，BWW を使用している．IVF 施行 18 症例における採卵数，受精数，分割卵数の平均は，各々の周期あたり 2.44±0.35，1.56±0.28，1.17±0.32 (mean±SE) であった．また受精率，分割率は，各々の採取卵あたり 63.6％，47.7％を示していた．18 症例中 1 例の妊娠が確認され，5 月 18 日現在妊娠 17 週で経過良好である．今回は，当院における 1 年 3 か月間の IVF-ET の現況について報告する．

13. 卵管マイクロサージェリー施行例における Second look operation

稗田茂雄・野口昌良・薮下廣光
浅井光興・正橋鉄夫・石原　実
(愛知医大産婦)

本邦において，卵管閉塞症や卵管周囲癒着症に対してマイクロサージェリーが導入されて，すでに10年の月日が流れた．この間，婦人科マイクロサージェリーに関する基本的手技と機器に関しては，ほぼ一定の形態が整ったと考えられている．

その結果多くの施設から手術後の成績についての報告がされるようになってきている．われわれの教室においても昨年の当学会においてこれまでの成績について報告したが，マイクロ手術後再び開腹して術後の腹腔内の状況を見る機会はきわめてまれである．このマイクロ手術後の Second look operation から術後の腹腔内の状態を再検することは，今後のマイクロ手術への対応上，意義深いものと考えられる．そこで教室で経験した卵管形成術後の子宮外妊娠2例，帝王切開例1例，再閉塞による再手術例1例，以上4例についての Second look operation 時の状況について検討し，報告する．

第98回日本不妊学会関東地方部会

日　　時：昭和63年7月9日（土）
場　　所：笹川記念会館

1．各排卵誘発群における排卵率と診断に関する研究

山田悦郎・入江　宏・清水洋一
山縣邦彦・中村文武・秋谷　清
(東京医大産婦)

〔目的〕排卵障害を有する婦人を対象に，超音波断層法による卵胞径と尿中 Estrogen との相関を求め，ハイモニターEの有用性を検討した．

〔成績〕clomid 単独療法群において，排卵は83周期中58周期(排卵率69.9％)，尿中E 50ng/ml 以上の周期では57周期中54周期（94.7％），卵胞径20mm 以上では65周期中54周期(83.1％)，尿中E 50ng/ml 以上卵胞径20mm 以上の周期では52周期中50周期（96.2％）であった．clomid 療法における尿中Eと卵胞径との間には，高い相関関係は認められなかったが，一定レベル以上を示した周期においては，有意な相関が認められた．HMG-HCG 療法群では，排卵は63周期中54周期（排卵率85.7％）であり，尿中E 75ng/ml 以上では，43周期中41周期（95.3％）卵胞径24mm 以上では，42周期中40周期(95.2％)．尿中E 75ng/ml 以上，卵胞径24mm 以上では33周期中32周期(96.9％)に排卵を認め，尿中Eと卵胞径の相関係数は，0.755，危険率0.01と高い相関を認めた．

2．オルガノン LH カラーによる排卵時期のモニタリングに関する検討

田中　温・戸枝通保・金子隆弘
長沢　敢・山本　勉
(越谷市立病院産婦)
高田道夫　(順天堂大産婦)

排卵時間を正確に予知することは不妊症治療の成績を向上する上で最も重要なことである。今日われわれは尿中 LH 検出試薬－オルガノン LH カラーを使用し，排卵時期のモニタリングを行ない，その有用性について検討したので報告する．

〔結果〕①LH カラーの陽性率は97％（65/67)であった．②ハイゴナビスキットによる LH 濃度と LH カラーの比較では100IU/ℓ以上より陽性化を示し，200IU/ℓ以上では約90%で LH カラーは陽性を示した．③LH カラーが陽性を確認した時点より排卵までの時間が24時間以内であった症例は98％(59/60)であった．④AIH 58例中4例（7％），GIFT 3例中2例で妊娠に成功した．

〔結論〕排卵予定日2～3日前から1日2回尿中 LH 濃度を LH カラーで測定すれば,症例の9割以上で排卵を24時間以内に予知することができた.本法の使用により AIH のタイミング決定は著明に簡便となることが判った．

3．新しい AIH 針―フレスポイト―の使用経験

戸枝通保・田中　温・金子隆弘
長沢　敢・山本　勉
(越谷市立病院産婦)
高田道夫　(順天堂大産婦)

AIH の妊娠率を向上させる要因としては排卵時期のモニタリングや良好精子の選別と同時に AIH 操作の改善が重要である。

今回われわれは AIH 針として北里サプライ社製のフレスポイトを使用してみた。フレスポイトは塩化ビニール製で軟かく，Mサイズと Lサイズとがあり，それぞれ6.5cm, 8cm である．

従来の AIH 針に比較して優れているのは①挿入が容易である．②挿入時の出血が少ない．③ディスポーザブルである等であり，劣っている点としては①頸管が変形している場合は挿入が困難であり，頸管

内で曲って，外子宮口に戻って出てくる，②針に角度をつけるのがむずかしい等である．

以上の結果よりフレスポイトはAIH針として有用である事が判った．

4．Asherman症候群治療後妊娠の1例

児島孝久・宇野かおる・沼口正英
田村　学・曽　栄輝・木村宗昭
堀口雅子・佐藤孝直
（虎の門病院産婦）

Ashermen症候群の治療は比較的難治性と思われがちであるが，われわれは治療後2年目に妊娠し，無事分娩に至った例を経験したので報告する．

症例は31歳，1経妊0経産．昭和54年妊娠3か月で人工中絶を受けた．昭和56年結婚．4年間の不妊と経血量減少を主訴に60年5月当科初診．BBT正常，性交後試験，通気通水正常．子宮卵管造影で子宮内腔癒着が疑われた．同年12月IUD挿入したが，効なく抜去．昭和61年5月当科入院．5月23日子宮鏡を実施し子宮内腔狭小および内腔ゆ着を認め，超音波ガイド下に子宮内腔剝離拡張術を施行．その後8Frの小児用留置カテを10日間留置，プレマリン，ヒスロンによるホルモン療法を施行した．術直後の月経より経血量の増加をみ，同年8月のHSGでも改善がみられた．その後特に治療を行わなかったが，62年7月を最終月経に妊娠した．妊娠経過は順調で，妊娠38週0日，2908 g，Ap9の女児を経腟分娩に至った．以上文献的考察を含め，報告した．

5．多のう胞性卵巣におけるインスリン抵抗性

渡辺研一・石塚文平・岩田美智恵
近藤俊彦・松本一彦・浜田　宏
（聖マリアンナ医大産婦）

日本人では肥満，多毛を伴った古典的な多嚢胞性卵巣症候群(PCO)を見ることは少ない．近年，PCOにおいてインスリン抵抗性（IR）の存在が報告されているが，今回われわれは日本人の非肥満，非多毛の内分泌学的PCOにおけるIRにつき検討した．15名のPCO症例（P群）の75 g OGTT時の血糖およびIRIの反応を25名の正常コントロール群（C群）と比較した．OGTT各時点の平均血糖，IRI値に両群間に有意差はなかった．P群では血糖値総和(ΣBG)が666.6±33.5mg/dlとC群の562±11mg/dlを有意（$P<0.05$）に上回った．ΣIRIもP群で有意（$P<0.05$）に高かった．(237±9.2VS172.9±11μu/ml，$P<0.02$)．P群では血中アンドロステンジオン値とΣIRIに有意な正の相関が見られた．($r=0.70$，$P<0.05$)．血中DHEA値はΣIRIと相関を示さなかった．以上，日本人の非肥満PCO症例にもIR抵抗性が存在し，その程度は卵巣アンドロゲン分泌と相関を有する事が示された．

6．RU486投与家兎から回収した卵子の正常性と投与家兎の妊孕性について

山海　直・金山喜一・遠藤　克
佐久間勇次
（日大，農獣医，獣医生理）
梅津元昭・正木淳二
（東北大，農，家畜繁殖）

目的　RU486（ルセル社，フランス）は，プロゲステロンと競合的に拮抗する製剤であり，演者らは，これまでにRU486を投与した家兎において正常な分割卵子は回収されるが，これらの卵子は母体に着床しないことを報告した．今回は，これらの卵子の正常性について，また，RU486を投与した家兎の妊孕性について検討を試みた．

方法　供試家兎は，日本白色在来種で成熟雄と交配し，その直後にhCGとRU486 5mg/headを同時に皮下投与した．交配後30時間目に卵管を潅流して卵子を回収して体外培養，あるいは同期化した家兎に移植した．また，RU486を処理していない家兎から回収した卵子を，RU486を処理した家兎に移植した．なお，検索は，11日目に開腹手術して卵巣および子宮の着床胎児などについて行なった。

結果　RU486を投与した家兎から回収した卵子を培養した結果，すべての卵子がblastocystに発育し，また，2例のrecipientに移植した結果，それぞれ着床胎児を認め，9例の産子を得た．RU486を処理していない家兎からの卵子を処理したrecipientに移植した結果，着床胎児を認めることができなかった．

以上のことから，RU486を処理した家兎から得られた卵子の正常性，また，着床の阻止は母体側の着床性変化に起因することが明らかになった．

7．ヒト精子のエネルギー代謝に及ぼすゴシポールの作用機序について

池田　誠・中村正久・冲永荘一
荒井　清　　（帝京大産婦）

中国で発見された綿実より抽出されるゴシポールは，画期的な男性避妊薬として注目を浴びた．しかし，その作用機序については，まだ不明な部分が多い．今回われわれは，in vitro系でゴシポールを射精精子に投与し，運動率とエネルギー代謝に及ぼすこの薬剤の影響を検討した．

ヒト精子の運動率は，ゴシポール投与（100μM）によって著しく低下した．またピルビン酸代謝においては二相性を示し，10μM以下では代謝促進，10μM以上で代謝阻害が観察された．

ゴシポールは，ラット精子細胞において，電子伝達系と酸化的リン酸化の脱共役剤として作用し，エネルギー代謝を阻害することをすでに当教室において報告している．今回の実験結果において，ゴシポールは，ヒト精子においても，脱共役剤として作用し，その結果ATP合成を阻害し，運動率を低下させる可能性があることが示唆された．

8．ハムスターテスト侵入率0％の精子運動率について

岡部親宜・福田　勝・臼井直行
岩佐　剛・武内裕之・町田正弘
伊藤　哲・高田道夫
（順天堂大産婦）

ハムスターテストはヒト精子の妊孕能判定法として広く利用されている．今回われわれは侵入率0％の8名の不妊男性患者について，一般精液検査の精子運動率およびSwim up後の良好精子培養後の運動率について検討した．すでに児を得ている男性の精液をコントロールとして，ハムスターテストに用いた．コントロール群の侵入率は79％であった．一般精液検査の運動率はコントロール群で75％，侵入率0％群で67％と有意な差を認めなかった．しかしSwim up後の良好精子培養22時間後ではコントロール群の運動率が84％に対し侵入率0％群は45％と有意に低かった．このことは，ハムスターテスト成績にテスト施行時の精子運動率が強く影響するものと考えられた．さらにこれら侵入率0％群の精子はlife-timeが短いものと考えられ，短い精子前培養での再テストが必要と思われる．

9．精子培養時間とヒト精子capacitationについて

福田　勝・中村　靖・臼井直行
岩佐　剛・武内裕之・町田正弘
伊藤　哲・高田道夫
（順天堂大産婦）

十分な精子培養によりヒト精子はcapacitation，acrosome reactionを起こすことが知られている．ヒト卵胞液はヒト精子acrosome reactionを誘発する．私たちはこの卵胞液を使いacrosome reactionの発生を見ることで各培養時間の精子capacitationの推移について検討した．acrosome reactionに対してはFITC pea lectin，また死滅精子の判定にはHochest 33258を用い，これら死滅精子をacrosome reaction assayより除外した．培養時間0，3，6，10，22時間目でacrosome reactionの発生率（%AR）を見た．%ARは自然発生で0，0.4，1.9，3.3，6.0%であったが，卵胞液によるacrosome reaction誘発では0，2，4，12.6，24.9，45.2％と培養時間とともに%ARが著明に増加した．このことはヒト精子の培養液中での自然%ARは低いが培養時間とともにcapacitationを得た精子が増加していることを推論させる．

10．正prolactin血症例におけるTRH負荷試験の分析

安江育代・川勝雅秀・武田　修
落合和彦・楠腹浩二・寺島芳輝
（慈恵大産婦）

正prolactin（PRL）血症を示す排卵性不妊12例および排卵障害不妊53例（第一度無月経17例，第二度無月経16例，無排卵周期症11例，遅延排卵6例，PCOD 3例）にTRH500μgの静注負荷を行ない，PRLのピーク値が130ng/ml以上であるものを潜在性高PRL血症とし，その病態および臨床的意義について検討した．その結果，TRH負荷試験では排卵性不妊群が最もよく反応し，排卵障害が高度な程，反応性が乏しい傾向であった．また潜在性高PRL血症は排卵性不妊群の66.7％に認められ，排卵障害不妊群の13.2％に比し高率であった．このことより潜在性高PRL血症は，高PRL血症とは異なり排卵障害の原因とはなりにくいことが推定された．さらに，排卵性不妊群における潜在性高ＰＲＬ血症は黄体機能不全と直接の関連を示さなかった．また黄体機能不全に対するbromocriptin投与は有効と考えられるが，その機序は，PRLを介するものではないことが示唆された．

シンポジウム

1．卵胞発育と卵巣内因子

安水洸彦（山梨医大産婦）

卵胞の発育に伴い，卵胞内顆粒膜細胞の急速な増殖と，卵胞周囲の顕著な血管形成が観察される．この局所的細胞増殖と血管誘導現象から，卵巣の内因性growth factorとangiogenesis factorの存在を推測し，ブタ卵胞期卵巣を用いて一連の研究を行ない，以下の所見を得た．

1．ブタ卵巣のwhole ovary cytosol, theca conditioned media, thecal cytosol中には培養顆粒膜細

胞, BALB/C 3T3 細胞に対する growth factor が存在する．種々の生化学的処理，硫安塩析，イオン交換クロストグラフィー，ゲルクロマトグラフィーの結果より，この growth factor は莢膜由来であり，40％以下の硫安に可溶の，易熱性，cationic な蛋白様物質で，分子量 12,400～25,000 であることが判明した．

2．Thecal cytosol の粗抽出物中の angiogenic activity を，培養ウシ副腎毛細血管内皮細胞に対する遊走刺激率，細胞増殖率および CAMC (chick chorioallantoic membrane) 法にて測定した結果，莢膜には強力な angiogenesis factor が含有されていることが判明した．

2．卵胞成熟における Epidermal Growth Factor の意義

堤　　治（東京大産婦）

Epidermal growth factor (EGF) はマウス顎下腺から抽出されたポリペプチドの細胞増殖因子である (分子量約 6000)．EGF は培養顆粒膜細胞においてその増殖や機能分化を制御することから卵胞および卵の成熟と EGF の関係が注目される．われわれはヒト卵胞液を分析したところ EGF 様物質が高濃度 (1ng/ml 以上) に存在することを発見した．この EGF 様物質の濃度と卵の成熟度は正の相関があり EGF の成熟に関与することが示唆された．実験動物卵を用いた成績では EGF レセプターが卵に存在し EGF が卵の成熟（減数分裂の再開・卵内代謝活性上昇）に促進的に働くことが明らかとなった．また顎下腺を切除した EGF 欠乏マウスにおいては妊娠は成立しても分娩に至る率は低く EGF に生理作用があることが示唆された．

3．卵胞発育におけるインヒビンの意義

田谷一善（東京農工大家畜生理学）

哺乳動物においては，下垂体からの卵胞刺激ホルモン（FSH）と黄体形成ホルモン（LH）の分泌を調節する性腺からの情報担体はステロイドホルモンのみであると考えられてきた．しかし，近年，雌では卵胞の顆粒層細胞，雄ではセルトリー細胞を分泌源とするインヒビンの存在が明らかにされ，下垂体からの FSH 分泌を選択的に抑制している事実が次第に明らかにされてきた．本シンポジウムでは，ラットを用いて雌の卵巣活動(細胞発育，排卵，黄体形成，卵胞閉鎖)に伴うインヒビンと FSH の分泌変化について検討した私どもの成績を紹介し，卵胞発育におけるインヒビンの意義として次のような仮説を提唱した．

「卵胞は発育に伴い，ステロイドホルモンに先行して顆粒層細胞がインヒビンを分泌し，下垂体からの FSH 分泌を抑制することにより卵巣での発育卵胞数を調節している」．

4．卵胞発育における性ステロイドの局所作用

臼杵　恭（筑波大産婦）

5．ヒト卵胞発育調節機序：各種内分泌環境下における卵胞発育の動的観察からみて

荒木重雄（自治医大産婦）

各種婦人(正常周期, PCO, 妊娠, 17α-hydroxylase 欠損症，下垂体摘出後など）の卵胞形態と内分泌環境を詳細に調べ次の結論を得た．

1)ヒトにおいて gonadotropin を欠く状態では卵胞は直径 200μ 以上に成長できない．2)estrogen および androgen の欠く状態では健全な卵胞は直径 2.2mm 程度の段階までしか成長せず，いわゆる主席卵胞予備群の段階に達しない．また，胞状卵胞の大部分は閉鎖に陥ることから estrogen および androgen は小および中胞状卵胞の正常な成長に極めて重要な役割を担っていることが示唆されている．3）主席卵胞予備群(直径 4.7mm 前後) の卵胞に適度の FSH 刺激が加われば主席卵胞への成熟が始まる．最初に estrogen 産生の面で優位に立った卵胞は主席卵胞としての主導権を獲得し，その後の低 FSH の状態でも成熟を続け排卵へと向かう．4）次席卵胞群では十分な aromatase が誘起されず androgen 蓄積が起こり，その局所作用によりさらに閉鎖へと進むと推定される．5)妊娠，PCO および排卵前後の卵胞の状態からみて主席卵胞予備群の卵胞までは高 LH (HCG)の状態でも閉鎖は促進されない．6)LH surge 後，単一主席卵胞は排卵するが他の大卵胞は閉鎖し，最大非閉鎖卵胞は主席卵胞予備群のレベルにもどり，次周期の発育を待つ．

第 26 回日本不妊学会中国・四国支部総会

日　　時：昭和 63 年 8 月 20 日（土）
場　　所：岡山東急ホテル

1．下垂体性標準品を用いたLH, FSH-IRMA系に関する基礎的および臨床的検討

安井敏之・植田敏弘・漆川敬治
兼松豊和・東敬次郎・苛原　稔
青野敏博　（徳島産婦）

〔目的〕LH, FSHに対するモノクロナール抗体を使用，IRMA系を測定原理とし，標準品として各々WHOの1st IRP-LHと2nd IRP-HPGを採用した血中LH, FSHの新しいRIA系が開発されたので基礎および臨床的検討を行なった．
〔対象と方法〕両測定系の基礎検討および各年齢の正常男女，妊婦，各種内分泌疾患患者血清について従来の二抗体法測定系と比較し臨床検討を行なった．
〔結果〕両測定系の測定範囲は共に0.5～200mIU/mlであり，二抗体法測定系との相関では，LHが相関係数0.93，$Y=0.265X+0.376$（$n=2918$），FSHが0.97，$Y=0.717X+0.328$（$n=3119$）と高い相関を示し，その測定値は二抗体法測定系に比べ，LHでほぼ1/4に，FSHは2/3になった．
〔考察〕両測定系は従来の測定系に比べ，迅速性，簡便性に優れ，精度，再現性とも満足でき，測定値も臨床状態とよく一致し，今後広く利用されるものと考えられる．

2．高速液体クロマトグラフによる血中メラトニンの微量定量法の開発

岡谷裕二・相良祐輔
（高知医大産婦）

メラトニンは松果体で生合成される活性アミンであるが，ヒト排卵機構におけるメラトニンの病態生理学的意義については未だ明確ではない．従来，血中メラトニンの測定は，その含量の点からRIAを中心に行なわれてきたが，抗血清の特異性の点から，その濃度についても報告者によりバラツキが大きい．今回筆者らは，新たにAmperometric Detectorを用いた高速液体クロマトグラフにより，血清中メラトニンの微量定量法の開発を試みた．HPLC装置は，逆理化Chromatic P321，カラムは逆相系RP-18，展開溶媒は20%CH_3CN-0.1M Sodium acetate-Citrate (pH4.1) とし，flow rate 0.5ml/minで，試料投与後30分以内にmelatoninの分離定量が可能であった．最小検出感度は15.0pg (Signal-Noise Ratio 3)であり，回収率は77.7±3.5%，Interassay CVは4.4%であった．本測定法により，夜間に増量する血中メラトニンの測定は可能であり，臨床応用が可能であることを明らかにした．

3．妊娠初期絨毛および脱落膜の核内プロゲスチンレセプターの検討

板東　尚・浅井政房・相良祐輔
（高知医大産婦）

妊娠初期におけるプロゲステロン（P）の妊娠維持の作用機序を明らかにするため，正常妊娠例におけるヒト絨毛および脱落膜の核内プロゲスチンレセプター(PR)を比較検討した．妊娠5週から14週に得た絨毛および脱落膜組織より核分画を作製し，これに^{3}H-R5020および非標識R5020, cortisolを加えインキュベートし，特異的結合放射能を測定した．最大結合部位数（Bmax）および解離定数（Kd）はscatchard分析により求めた．またそれぞれのPRの0.6MKC1による抽出率を比較した．脱落膜核内にはBmax3.65±1.99fmol/μg DNA，Kdは0.96±0.84nM程度のPRが存在していた．一方絨毛にはBmax 9.17±5.58fmol/μg DNA，Kd2.25±1.64nM程度のPRが存在することが判明した．絨毛PRのKC1抽出可能分画は脱落膜PRに比べ明らかに少なかった．レセプターレベルの結果よりプロゲステロンは妊娠初期に子宮脱落膜のみならず絨毛にも作用し，その効果を発現する可能性が強く示唆された．

4．マウス卵管上皮の周期性変化に関する走査型電子顕微鏡的観察

寺戸博文・杉本伴芳・岩部富夫
関島秋男・大野原良昌・谷川正浩
戸田稔子・和田　省・菊川章仁
見尾保幸・前田一雄
（鳥取大産婦）

〔目的〕性周期を同期化したICR系マウスの卵管峡部の無線毛細胞の表面像と細胞内構造の周期的変化を走査型電子顕微鏡で観察した．
〔方法〕ICR系の成熟雌マウスにPMSG, HCGを投与することにより排卵周期を同期化し，卵胞期前期，卵胞期後期，排卵期，黄体期のマウスを準備した．一側の卵管は内腔観察用に，他側卵管は細胞内小器官観察用に処理した．
〔結果〕卵管峡部内腔には，卵胞期前期，後期と分泌が亢進してゆき，排卵期には多量の粘液様物質が観察された．また黄体期になると分泌像は認められなくなった．一方これに同期して細胞のゴルジ装置は前期には3－4層の層板状を呈していたが，後期になるとこれに加え空胞が出現し，排卵期には層板状でなく蜂巣状の構造が観察された．黄体期には蜂巣状と層板状の構造が混在していた．

〔考察〕ICR系成熟雌マウスの卵管峡部上皮は周期的に変化し，受精・分割の場として重要な役割を果たしているものと考えられた．

5．pure FSHを用いた排卵誘発法の検討

苛原　稔・植田敏弘・漆川敬治
安井敏之・兼松豊和・東敬次郎
青野敏博　　（徳島大産婦）

〔目的〕最近，hMG製剤より特異的にLH成分を除去したpure FSH製剤が開発されたので，無排卵症患者に対しpure FSH療法を行ない，その有用性を検討した．

〔対象と方法〕無排卵症患者13例（多嚢胞性卵巣症候群7例，第二度無月経5例，無排卵周期症1例）に対し，月経第4～6日目よりpure FSHを75～225単位ずつ連日投与した．投与期間中は，各種ホルモン測定，超音波断層法，頸管粘液検査等を行ない，卵胞の発育をモニターし，その成熟を認めた後hCGを投与した．hCG投与後は排卵の確認，OHSS等の副作用の有無を検討した．

〔結果〕pure FSH療法を行なった13症例23周期における症例別排卵率は92.3％（周期別は78.3％），妊娠率は2例，15.4％(8.7％)であり，周期別OHSS発生率は17.4％であった．

〔考察〕pure FSHの臨床検討により，その高い排卵誘発率および低い副作用出現頻度がわかり，無排卵症患者の治療に有用であることが示唆された．

6．マウス体外受精後の胚発生に及ぼす添加タンパクの影響

谷川正浩・杉本伴芳・岩部富夫
関島秋男・大野原良昌・寺戸博文
戸田稔子・和田　省・菊川章仁
見尾保幸・前田一雄
（鳥取大産婦）

〔目的〕ヒト体外受精，胚移植のための至適培養環境の検討のため，マウス体外受精を使用し，培養液中添加タンパクの受精，胚発生に及ぼす影響を検討した．

〔方法〕培養液はBWW液を用い，タンパク供給源として，Bovine Serum Albumin (BSA); 1mg/ml, Human Serum Albumin (HSA); 1mg/ml, Human Serum (HS); 10%, Fetal Cord Serum (FCS); 10%を添加した．F1 Hybridマウスを過排卵処理し，精巣上体精子を媒精した．各タンパク添加培養液において2細胞胚，胚盤胞への発生率，変性率を比較検討した．

〔結果〕BSA添加培養液で，2細胞胚，胚盤胞への発生率において最も好成績を示し，変性率も最も低値であった．HSA, HS添加培養液ではBSA添加培養液に比べ胚盤胞への発生率で低値を示し，変性率で高値を示した．FCS添加培養液では2細胞胚への発生率は比較的高値を示したが，胚盤胞発生率は低く，変性率は高値を示した．

7．精子不動化抗体のヒト精子acrosome reactionに対する影響

西田荘哉・村山真治・出口圭三
森　一正・加川俊明・板東律雄
東敬次郎・大頭敏文・中山孝善
山野修司・鎌田正晴・松下光彦
青野敏博　　（徳島大産婦）

〔目的〕精子不動化抗体による受精阻害作用の機序解明のため，triple stain法を用いて精子不動化抗体がacrosome reactionに及ぼす影響を検討した．

〔方法〕精子を7.5%正常婦人血清および7.5%精子不動化抗体陽性血清を含む培養液内で行ない，経時的に精子運動率測定を行なうとともに，triple stain法を施行しacrosome reactionの状態を観察した．

〔結果〕精子運動率および死滅精子数はcontrol群とanti-sperm群で差は認められなかった．Live acrosome reacted spermの割合は，control群では培養時間とともに有意に増加したのに対し，anti-sperm群では増加が認められなかった．また，anti-sperm陽性血清を含む培養液内で培養した精子をcontrol血清を含む培養液に移した場合，移した後にacrosome reactionが経時的に増加した．

〔結論〕精子不動化抗体は，acrosome reactionの誘起を抑制することにより受精を阻害する可能性が示唆された．

8．ヒト受精におけるD-mannoseの役割

森　一正・大頭敏文・鎌田正晴
青野敏博　　（徳島大産婦）

〔目的〕受精における卵透明帯糖鎖構造の役割を明らかにするために，各種のレクチンまたは糖で前処理したヒト卵透明帯，精子を用いた透明帯貫通試験を行なった．

〔方法〕透明帯は，1）各種のレクチン（100μg/ml）で1時間前処理，2）レクチンで前処理後，阻害糖(0.1M)で洗浄，3）糖（0.1M）で30分前処理し，精子は糖（50mM）で30分前培養した後に，それぞれ透明帯貫通試験を行なった．

〔結果〕1）透明帯をレクチン（ConA, RCA, WGA）

で前処理すると精子の透明帯への結合および貫通が阻害された．2）レクチンの阻害糖で洗浄すると，RCA, WGAによる阻害作用は消失したが，ConAの場合は不可逆的でD-mannoseで洗浄した後も阻害作用を認めた．3）精子をD-mannoseで前培養すると精子の透明帯への結合および貫通が阻害された．
〔考察〕精子が卵を認識する際には透明帯糖鎖構造，特に，D-mannose残基が重要な役割を担っている事が示唆された．

9．Swim up法によって選別される精子の性状

加川俊明・村山真治・出口圭三
西田荘哉・板東律雄・東敬次郎
中山孝善・山野修司・松下光彦
青野敏博 (徳島大産婦)

〔目的および方法〕IVF-ETおよびGIFT施行時の精子選別法として一般にswim up法が用いられているが，その精子性状については，運動率良好であること以外明確ではない．今回われわれは，triple stain法，swell testをswim up法施行前後に行ない，選別後の精子性状の変化を検討した．
〔結果〕①swim up法の精子運動率，精子膨化率に対する効果；精子運動率は，swim up後に有意な上昇が認められた．さらに，精子膨化率に関しても，swim up後は有意に上昇した．②acrosome reactionに対するswim up法の効果；live acrosome non-reacted spermの割合は，swim up後に有意の上昇がみられた．一方，live acrosome reacted spermに関しては，swim up後に有意に低下した．
〔結論〕swim up法によって得られた精子は，swim up前の精子と比較して，運動率が良好で，膜機能が正常であり，しかもacrosome reactionを起こしていない精子が選別されていることが判明した．

10．精巣上体管の閉塞を伴ったFSH単独欠損症の1例

河原弘之・渡辺慶太・田中啓幹
(川崎医大泌尿器)

〔症例〕M.O. 31歳男，3年9カ月の不妊を主訴に当科外来受診．
〔来院時検査成績〕二次性徴，正常．精巣容量 左＝右22ml．精液検査 容量2.4－3.2ml azoospermia．内分泌検査 LH5.9mIU/ml, FSH2.0mIU/ml以下，T4.6ng/ml, PRL8.1ng/ml, $E_2$30.9pg/ml, $P_4$0.2ng/ml以下，その他TSH, GH, cortisolは正常．LH-RH負荷試験LHは正常反応，FSHは低反応．手術検査所見 精巣上体尾部：拡張(－)，精子(－)，体部：拡張（＋），精子（＋）．精巣生検：市川・熊本分類IIIc（＋）．
〔結果〕以上よりazoospermiaの原因は精巣上体管の閉塞によると考えepididymo-vasostomyを行なった．現在まで本邦で4例の男子例が報告されているが，気管支拡張症やEmpty Sella，神経性食思不振症，Immotile cilia症候群を伴っているものであった．
本邦5例目と考えられるFSH単独欠損症を経験したので若干の文献的考察を加え報告する．

11．男性不妊に対するKallikrein並びに補中益気湯の効果—とくに両薬剤の選択の個別的規準設定の試み—

本田龍三・塚原優己・向田哲規
岡谷裕二・相良祐輔
(高知医大産婦)

無精子症を除く男性不妊患者に対し，カリクレイン（300KU/日，K群）補中益気湯（7.5g/日，H群）を3カ月以上投与し，両者の精液所見に対する効果を比較すると同時に，両者の薬剤選択への個別的規準設定を試みた．
〔成績〕精液量についてはいずれも効果は認められなかった．運動率については，40％以下のものについては両薬剤の増加作用には差が認められなかったが，40％以上では，K群にのみ増加作用が認められた．精子濃度については4,000万以下では両薬剤とも増量傾向を示し，4,000万以上ではH群にのみ増加作用が示された．Fertility Index 80以下の症例についてK群，H群の投与前後値はK群：21.3±19.7, 49.5±39.3，H群：21.0±18.0，82.8±68.1で，いずれも投与後に有意の増加が認められた．
以上の成績から，精子濃度については4,000万，運動率については40％を境に規準を設定することにより両薬剤の選択の個別化の可能性が示された．

12．男子不妊症に対するα-blocker, β-stimulant併用療法の臨床的検討

山下良孝・永井 敦・大枝忠史
小浜吉照・大橋輝久・大森弘之
(岡山泌尿器)

最近男子不妊症に対するα-blocker, β-stimulant併用療法の有効性が報告されている．今回われわれは，不妊を主訴として当科を受診した患者に対しα-blockerとして塩酸ブナゾシン(デタントール®)2mg, β-stimulantとして塩酸プロカテコール（メプチン®)100μgの連日内服を，3カ月から6カ月間行ない臨床的有用性について検討した．対象は，当科

を昭和62年4月より，63年6月までに受診した50症例である．

治療前精子濃度を，Group 1：無精子症（8例），Group 2：1,000万/ml未満(33例)，Group 3：1,000万/ml以上(9例)の3群に分け治療効果を検討した．結果は著明改善，改善を合わせた有効率でみると精子濃度では，G－1，0％，G－2，3.3％，G－3，22.2％，運動率ではG－1，12.5％，G－2，27.2％，G－3，55.6％であった．また総合評価の有効率はG－1，12.5％，G－2，42.4％，G－3，66.7％と，いずれも治療前精液濃度の高いものほど有効率が高かった．なお妊娠は3例（6％）に認められた．

13．精管再吻合術の手術成績

山本志雄・森岡政明・戦　泰和
藤田幸利　　(高知医大泌尿器)

1984年4月より，1988年6月までに挙児を希望する7症例に対して精管再吻合術を行なった．手術時年齢は28歳から40歳まで平均34.6歳で，精管閉塞の原因は精管結紮術による症例5例，小児期のherniorrhaphyによる症例が2例であった．精管結紮術後群の再吻合までの期間は4年から11年，平均8年間であり，herniorrhaphy群2例は術後25年以上経過していた．再吻合術に際し，6例は拡大鏡を用い7－0ナイロン糸で6針，1例は顕微鏡下手術で7－0ナイロン糸で7針縫合を行なった．手術成績は7例中2例が追跡不能であり，追跡可能症例5例中4例は術後の精液検査で精子を確認し，内2例に妊娠を認めた．残り1例は術後一度精子が確認されたが再度閉塞を来たし，人工精液瘤の手術を予定している．以上，当科で行なった精管再吻合術症例の手術成績を報告する．

14．外性器異常を示した45，X/46，XYq-/47，XYq-Yq-のモザイクの1例

宇都宮慎・佐々木克・水之江知哉
三春範夫・豊田紳敬・上田克憲
藤原　篤　　(広島大産婦)
大浜紘三　　(国立呉病院産婦)

症例は在胎39週，2620 gにて出生，主訴は外性器異常で，外陰部以外に奇形は認められなかった．外陰部は陰茎様のPhallusと二分陰嚢を示したが，陰嚢内には内容物を触知しなかった．尿道造影では，泌尿生殖洞，膀胱，腟ならびに子宮腔が造影された．生後2カ月で内性器の状態を確認するため開腹し，同時に陰核形成術，腟形成術を行なった．開腹時所見では，子宮の右側には精管様組織と睾丸を認め，また左側には卵管が認められたが，左側の性腺は明瞭でなかった．

細胞遺伝学的検索の結果，末梢リンパ球，皮膚組織ともに，45，X/46，XYq-/47，XYq-Yq-の核型を示し，Q分染法ではすべてのY染色体で長腕の螢光部分が欠失していた．モザイクの比率はTリンパ球では94.3：4.3：1.4，Bリンパ球では94.2：2.9：2.9，皮膚では90.3：6.5：3.2とほぼ一定していた．

15．神経血管保存および逆U字皮弁法を用いた外陰部形成術を行なったAGSの1例

磯山理一郎・山川弦一郎・石津和彦
林田英嗣・瀧原博史・酒徳治三郎
(山口大泌尿器)

先天性副腎性器症候群（adrenogenital syndrome以下AGS)の女児では生来ambiguousな外性器を呈し，ステロイド補充療法を行なっていても外性器に種々の程度の進行性男性化をきたすので形成手術の適応となる．手術は患者の将来の機能面および精神心理面を考慮し，可能なかぎり正常に近い形成術が望まれ多くの術式が発表されている．

最近われわれは男性化の強い3歳8カ月のAGS女児に神経血管保存的陰核形成と逆U字皮弁法を用い腟口形成を行ない，さらに包皮を用いて小陰唇形成を試み，ほぼ満足すべき結果を得たので報告する．

16．子宮奇形合併不妊症の妊娠症例

青江尚志・光井行輝・高橋史郎
秋本晄久（岡山済生会病院産婦）

今回われわれは子宮奇形が不妊症の原因と考えられた症例を経験したので報告する．

症例は，重複子宮に腟不全中隔を合併しており，かつ男性因子として乏精子症，低運動率も存在していた．

昭和59年8月原発性不妊症を主訴に当科外来受診，以後女性に対しては，clomid, HMG, HCG, AIH等の療法を施行し，男性に対しては，ユベラ等の経口投与を行なった．昭和62年7月29日尿ゴナビス(＋)，8月5日USGにてGS確認．8月26日USGにて胎児心拍動確認する．以後骨盤位ながらも妊娠経過は順調であったが，妊娠36週6日に前期破水を認めたために帝王切開術にて昭和63年3月15日児娩出した．児は男児で体重2180 gであり，1分後アプガースコアは9点であった．

尚，当科過去5年間における子宮奇形合併妊娠のべ19例のうち，骨盤位にて分娩に至ったものは6例

であり，帝王切開術を施行したものは8例であった．

17．正プロラクチン血性排卵障害に対するクロミフェン，ブロモクリプチン併用療法の有効性に関する検討

安井敏之・植田敏弘・漆川敬治
兼松豊和・東敬次郎・苛原　稔
青野敏博　（徳島大産婦）

〔目的〕今回われわれは，クロミフェン（Cl）無効の正プロラクチン血性排卵障害に対し，ブロモクリプチン（Br）併用治療を行ない，その作用機序を検討した．
〔方法〕血清プロラクチン（PRL）値が30ng/ml以下であり，かつCl治療が無効な無排卵周期症および第一度無月経患者7例に対し，Cl単独周期とCl, Br併用周期について，各種内分泌検査を行ない，月経周期12日目にLHのパルス状分泌の測定を行なった．
〔成績〕7例は全例Br併用により排卵が認められた．排卵期エストラジオール（E_2）および黄体期プロゲステロン（P）は併用周期で有意に上昇し，LHのパルス状分泌もその頻度は1.6±0.73回／4時間から4±0.53回／4時間と，併用により有意（$P<0.01$）に増加した．
〔結論〕以上の成績より，Brの作用としてLHの律動性の回復の可能性が示され，その結果として排卵に至ったものと考えられ，Cl単独にて排卵の認められない症例に対するCl, Br併用療法の有効性が示唆された．

18．排卵障害に対するclomiphene-tamoxifen併用療法

北川博之・矢野浩史・武田康成
杉並　洋・松浦俊平
（愛媛大産婦）

Clomiphene抵抗性の排卵障害15症例に対してclomiphene-tamoxifen併用療法を施行し，その成績をclomiphene単独療法と比較検討した．

Clomiphene単独療法では78周期中37周期(47.4％)に排卵を認めた．Clomiphene-tamoxifen併用療法では39周期中27周期（69.2％）に排卵を認め，その排卵誘発効果は有意に（$P<0.05$）高かった．また各症例毎の検討では15症例中10症例においてclomiphene-tamoxifen併用療法により排卵率の向上を認めた．またclomiphene単独療法には一度も反応せずに，ゴナドトロピン療法においてのみ排卵していた5症例のうち4症例においてclomiphene-tamoxifen併用療法により排卵誘発に成功した．今回の検討においてclomiphene-tamoxifen併用療法により妊娠の成立は3周期／27排卵周期（11.1％）に認めた．

19．温経湯の排卵障害婦人に対する効果について

吉野和男・高橋健太郎・西垣　新
白井孝昭・真鍋　敦・北尾　学
（島根医大産婦）

温経湯は視床下部，下垂体に作用し，LH-RH分泌の促進，LH-RHに対する反応性を亢進させること，また，クロミフェンと同時に投与するとクロミフェンと温経湯が相加的か相乗的に働くことにより排卵が惹起されるということが報告されている．

そこで，今回当科を受診した稀発排卵周期6例，無排卵周期7例，第1度無月経3例に対して温経湯を1日7.5g投与し，その効果について検討した．結果として，全体で16例中13例（81.3％）にその有効性が認められ，温経湯のみの投与では4例中3例（75.0％），クロミフェンとの併用群では12例中10例（83.3％）に有効であった．また疾患別では第1度無月経で100％（3例中3例）有効であり，全体で妊娠例は4例（25.0％）認められた．以上のことより，温経湯は排卵障害婦人に対して有効であることが示唆された．

20．芍薬甘草湯投与による多嚢胞性卵巣症候群の血中ホルモン値の比較検討

白井孝昭・高橋健太郎・吉野和男
西垣　新・江田芳美・北尾　学
（島根医大産婦）

不妊症患者のうち超音波断層装置で多嚢胞性卵巣を認め，血中testosterone（T）値が100ng/dl以上であるものを多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）と定義し，超音波学的にgeneral cystic pattern（GCP，11名），peripheral cystic pattern（PCP，23名）に分類し，芍薬甘草湯（7.5g/day）を4～24週間投与し，血中T値，LH/FSH比，E_1/E_2比の変化を検討した．全体では血中T値は投与4週間後30例に低下が認められ，平均値でも有意な低下を示し，LH/FSH比は24週間後に有意な低下を認めたが，E_1/E_2は変化しなかった．GCPでみると血中T値は低下を認めるも再び上昇し，PCPでは低下し前値と24週間値においてGCPとPCPで有意差を認めた．LH/FSH比はPCPで低下率が高かった．妊娠はGCPで3例，PCPで7例に認められ，妊娠例では血中T値の低下率が高く，LH-FSH比，E_1/E_2比でも低下傾向を示した．

以上よりGCP症例とPCP症例，またPCOSでの

妊娠症例と非妊娠症例における芍薬甘草湯の効果は相違があることが示唆された.

21. 芍薬甘草湯投与による高アンドロゲン血症性無排卵症の治療及びその妊娠例の内分泌学的検討

福岡秀興・神保利春
(香川医大母子)

無排卵症，黄体機能不全症等の卵巣機能障害をひきおこすものに高アンドロゲン血症がある．多くの抗アンドロゲン剤が知られているが，副作用の少ないものとして漢方製剤芍薬甘草湯がある．今回高アンドロゲン血症のある無排卵周期症に使用し，自然排卵の発来および妊娠に至った2症例を経験したのでその内分泌学的推移を含め報告する．共に高 testosterone 血症 (1.5, 1.6ng/ml) があり，高 LH 血症 (LH/FSH 比>4) および LH-RH 試験での LH の高反応を示し，PCO 症の内分泌状態にあった．芍薬甘草湯 5.0g/日を約2ヵ月間投与して，testosterone の低下 (0.8, 0.9ng/ml) を認めるとともに自然排卵が出現した．同時に LH 基礎数値の低下，LH-RH 試験での LH の低反応化をみた．なお黄体機能不全 (short luteal phase) があり，clomid を併用して，共に妊娠に至った．以上芍薬甘草湯は高 Androgen，高 LH 血症の治療に有効であることが示された．文献的考察も追加する．

22. 多嚢胞性卵巣症候群の診断における経腹・経腟超音波検査の比較検討について

西垣　新・高橋健太郎・吉野和男
白井孝昭・永田裕子・江田芳美
内田昭弘・草刈万寿夫・真鍋　敦
北尾　学　　(島根医大産婦)

近年，経腟超音波プローベの開発により内性器，特に卵巣の形態観察がより鮮明に，容易になってきた．

そこで，今回昭和63年1月より6月までに当科不妊・内分泌外来を受診した多嚢胞性卵巣 (PCO) 患者20名に経腹および経腟超音波検査を施行し，比較検討したので報告する．経腟超音波で PCO と診断した20名のうち，経腹超音波でも PCO を認めたのは9名であった．当科における多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の内分泌学的診断基準 (LH≧25mIU あるいは LH/FSH 比≧2.5，血中テストステロン≧100ng/dl，E_1/E_2比≧1.0) を満たすものは6名であり，このうち5名は経腹および経腟超音波で PCO を認めたが，1名は経腟超音波でしか PCO が認められなかった．

以上より経腟超音波検査は PCO のスクリーニング検査として有用であることが示唆された．

23. 多嚢胞性卵巣症候群に対する治療的超音波ガイド下卵胞穿刺術による排卵誘発の試み

戸田稔子・杉本伴芳・岩部富夫
関島秋男・大野原良昌・谷川正浩
寺戸博文・和田　省・菊川章仁
見尾保幸・前田一雄
(鳥取大産婦)

多嚢胞性卵巣症候群 (以下 PCOD) は，排卵障害の原因として知られており，その治療には従来より種々の薬物療法や外科的治療が行なわれてきたが，その効果は不確実かつ一時的である．当科では，PCOD に対する新たな治療法として，侵襲が極めて少なく，簡便かつ安全性の高い超音波ガイド下卵胞穿刺術を実施することを試みており，今回本法による妊娠例も経験したので報告する．

LH-RH 負荷試験に対する LH 過剰反応と高 androgen 血症により PCOD と診断された不妊患者のうち，wedge resection の適応と考えられた難治性の排卵障害患者2症例に対し，治療的卵胞穿刺術を施行した結果，容易に排卵誘発可能となり，1症例に妊娠が成立した．穿刺術後の LH-RH 負荷試験で，2症例とも正常反応を示したことより，性中枢－卵巣系の正常化を介して排卵が誘発されたことが，示唆された．

24. 子宮内膜症性不妊の治療方針について

矢野浩史・武田康成・北川博之
杉並　洋・松浦俊平
(愛媛大産婦)

対象は昭和59年1月から62年3月までの間に，不妊症診断の目的にて腹腔鏡検査を施行した224例である．子宮内膜症は151例 (67.4％) に認められた．追跡可能であった139例の内，50例 (36.0％) が妊娠した．その内訳は待期療法：32例，薬物療法：16例，手術療法：2例であった．流産率は12.5％，25.0％，0％であり，薬物療法後の流産率が高い傾向にあった．年度別治療方針と妊娠率を検討した．昭和59年は診断後，直に薬物療法を行なった．昭和60年は病巣焼灼，腹腔洗浄などの腹腔鏡下操作を導入し，また，薬物療法の前に約6ヵ月間の待期療法期間を設けた．さらに，昭和61年以降は待期療法中に通水療法を行なっている．妊娠率は，それぞれ16.2％ (6／37)，19.0％ (8／42)，26.6％ (16／60) と上昇傾向にある．腹腔鏡は子宮内膜症の診断のみ

ならず，妊孕能の向上など治療的効果を有しているので，可能な限り施行すべきであると思われる．

25．直腸粘膜に認められた外性子宮内膜症の1症例

高橋健太郎・吉野和男・永田裕子
西垣　新・白井孝昭・江田芳美
草刈万寿夫・内田昭弘・山崎裕行
真鍋　敦・北尾　学
（島根医大産婦）

不妊症患者の中で子宮内膜症の占める臨床的意義は年々増加傾向にある．子宮内膜症の病巣の多くは子宮，卵巣，骨盤腹膜が主であり，腸管子宮内膜症の報告例は意外と少ない．今回，ダナゾール反復投与例において直腸粘膜まで及んだ，外性子宮内膜症を経験したので報告する．

症例は38歳，主婦．昭和59年9月に不妊を主訴に来院．外性子宮内膜症 Beecham 分類4度の診断で手術療法，ダナゾール療法を施行．その後，CA-125，超音波装置，腹腔鏡等で follow-up 中に2回のダナゾール再投与を施行した．昭和62年9月頃より月経時に一致して粘血便が認められ，直腸鏡検査の結果，直腸粘膜に異所性子宮内膜が認められ，腸管子宮内膜症と診断し，現在4度目のダナゾール療法中である．

26．超音波ガイド下経腟的採卵法における採卵前腟洗浄法の検討

大野原良昌・杉本伴芳・岩部富夫
関島秋男・谷川正浩・寺戸博文
戸田稔子・和田　省・菊川　章仁
見尾　保幸・前田一雄
（鳥取大産婦）

体外受精・胚移植（IVF-ET）における採卵法として超音波ガイド下経腟的採卵法が一般的におこなわれているが，経腹的採卵に比較し経腟的採卵では，腟内細菌による採取卵の contamination の危険性が懸念される．そこで，今回 IVF-ET 時に二つの異なる腟洗浄法を行ない，その成績を比較したので報告する．

卵管性不妊，子宮内膜症にて IVF-ET の適応となった13症例30周期を生理食塩水洗浄群（第1群）と0.02％ヒビテングリコネート＋生理食塩水腟洗浄群（第2群）の2群に分けた．第1群では受精率73.2％／卵，分割率53.3％／受精卵であった．第2群ではそれぞれ76.2％，68.8％であり，1症例に clinical pregnancy を認めた．腟内細菌培養では，洗浄前，生食洗浄後，生食・ヒビテン洗浄後の順に発育細菌叢の減少を認めた．

二つの洗浄法で分割率に差を認めたことより，腟洗浄の重要性が確認された．

27．ヒト体外受精における卵成熟度の判定と受精・分割率との関連

和田　省（山口赤十字病院産婦）
杉本伴芳・岩部富夫・関島秋男
大野原良昌・谷川正浩・寺戸博文
戸田稔子・菊川章仁・見尾保幸
前田一雄（鳥取大産婦）

IVF-ET を実施する上で，卵の正確な成熟度および発育能力を評価する事は重要な問題の1つであるが，成熟度は Cumulus-Corona (C-C) の所見から推定しているのが現状である．

今回，われわれは昭和62年1月から12月までに当科で IVF-ET を施行した36症例，92周期を対象とし，卵採取時 C-C 観察から推定した成熟度と受精・分割率との関係を検討した．採取した卵は，実体顕微鏡下に成熟度を mature (M), intermediate (INT), immature (IMM), postmature (PM) に分け，M，INT および PM 卵は6～8時間，IMM 卵は10～12時間の前培養後受精した．採取した卵は，M卵129個，INT 卵88個，IMM 卵18個，PM 卵10個，変性卵2個の計247個で受精率，分割率はそれぞれM卵67％，51％，INT 卵54％，35％，IMM 卵28％，11％であった．

さらに C-C 除去による卵観察を試みたのであわせて報告する．

28．当科における IVF-ET および GIET の検討

武田康成・矢野浩史・北川博之
安藤雅章・杉並　洋・松浦俊平
（愛媛大産婦）

昭和62年9月から63年2月までの6ヵ月間に施行した IVF-ET (IVF) 9例および GIFT 8例について検討した．IVF は卵管閉塞8例，乏精子症1例に，GIFT は子宮内膜症5例，乏精子症2例，原因不明1例に施行した．IVF は1例（卵管閉塞），GIFT は3例（全て子宮内膜症）が妊娠に成功した．成功率はそれぞれ11.1％，37.5％であった．hMG 連続皮下投与法による過排卵誘起を行ない，超音波プローベにより経腟的採卵を行なった．IVF における平均採卵数は4.0個（成熟卵2.2個），受精率は44.5％（成熟卵80％）であった．妊娠成功例は5個採卵され，3個が受精した．GIFT における平均採卵数は3.9個

(成熟卵2.8個)であった．妊娠群における採卵数は5.7個(成熟卵4.3個)，非妊娠群のそれは2.8個(成熟卵1.9個)であり妊娠群において多い傾向にあった．hMG連続皮下投与法は従来の方法に比べ優れた排卵誘発効果を有しているので，IVFあるいはGIFTにおいて有用であると思われた．

29．IVF-ETおよびGIFT妊娠例の解析

本山洋明・藤井好孝・安藤正明
山崎史行・吉岡　保
(倉敷成人病センター南くらしき病院産婦・医科学研究所)

われわれは昭和63年5月までにGIFTで8例，IVF-ETで2例，計10例の妊娠に成功した．対患者当たり妊娠率はGIFT：27.6％，IVF-ET：20.0％であった．IVF-ET妊娠の2例は共に両側卵管閉塞であり，1例は正常妊娠進行中である．著明な卵管水腫を呈した他の1例は胎児心拍を認めたが卵管膨大部妊娠であった．開腹し卵管開口術を同時に施行した．GIFT妊娠8例中6例が正常妊娠であり，2例は流産と外妊であった．GIFT 29症例の平均年齢および不妊期間は34.7歳，10.6年，妊娠群で32.3歳，8.5年，非妊娠群で35.4歳，11.1年であった．不妊原因別に見ると男性因子11例中妊娠4例，妊娠率36.4％と良好な成績であった．原因不明不妊群は同じく14例中4例，28.6％であった．以上よりGIFTにおいて，より若く不妊期間が短いほうが妊娠しやすい傾向がある事，およびGIFTが男性因子による不妊に有効である事が示唆された．

30．精子自動分析装置の使用経験

林田英嗣・石津和彦・山川弦一郎
磯山理一郎・瀧原博史・酒徳治三郎
(山口大泌尿器)

精液検査は，男子不妊症において必要不可欠な基本的な検査である．従来より算定盤を使用し顕微鏡下に精子濃度，精子運動率，精子奇形率を計算していた．しかし客観性に乏しく，どのparameterが妊孕性と結びつくか不明である．このたび，当科不妊外来ではHamilton-Thorn Research社製のMotility Analyzer HTM2030を導入したので報告する．

測定には，Makler chamberを使用し，このChamberは，従来より使用しているHemocytometerと精子濃度において有意の相関を示し，運動率において，Hemocytometerより有意に良好な結果を示すことは既に報告した．HTM2030は従来のparameterに加え，精子運動の直進性および頭部の振幅等多くのparameterを測定可能であり，精子運動と妊孕性の解明の一助となると期待される．

31．精子自動分析装置による精子運動速度の測定

石津和彦・林田英嗣・山川弦一郎
磯山理一郎・瀧原博史・酒徳治三郎
(山口大泌尿器)

〔目的および方法〕運動率正常精子群(射精後1時間での精子運動率60％以上，N＝22)と運動率異常精子群(精子運動率60％未満，N＝19)の間での各自の精漿中における精子運動速度の変化の差を明らかにする目的で，精子自動分析装置を用いて精子運動能を経時的に測定した．本装置では全精子の平均運動速度直接表示されないため，新たに考案した．
〔結果〕運動率正常精子群は運動率異常精子群に比べ精子運動速度は射精後早期から有意に低下し，低下の割合も大きかった．射精後5時間目で射精後1時間に比べ50％以上の運動速度を保持しえた精子は，運動率正常精子では12例(55％)であったのに対し，運動率異常精子群ではわずか1例(5％)であった．
〔結論〕精子の運動率と精漿中での精子運動速度の保持性は関連性があると推定された．

32．男子不妊症患者精巣生検組織の画像解析

松岡則良・杉元幹雄・安川明広
竹中生昌　　(香川医大泌尿器)

〔目的〕男子不妊症において造精機能に及ぼす間細胞の関与を明らかにすることを目的として，今回は男子不妊症患者の精巣組織における間細胞の変化ならびに精細管の形態像を検討した．
〔方法〕男子不妊症患者23名についてホルマリン固定した精巣生検組織のパラフィン包埋切片を画像解析装置にて，精細管断面積，間細胞の大きさ，また精細管面積と間細胞面積の比率を算定した．
〔結果〕不妊患者の精細管断面積／間細胞面積は平均0.87であった．正常精巣組織では2.56であった．間細胞の大きさの変化については検討中である．

33．男子不妊症の臨床統計学的観察(1978-1987)

西田秀樹・福田和夫・宮川征男
(鳥取大泌尿器)

1978年1月より1987年12月までの鳥取大学医学部泌尿器科外来における男子不妊主訴新来患者数は184例で，15歳以上男子新来患者の3.9％にあたる．来院時年齢は30～34歳，不妊期間は1～5年にpeakを認めた．42％の患者に流行性耳下腺炎や高熱疾患，精路や精路周囲の手術などの既往を認めた．

病因分類では，造精機能障害が97％を占めた．精液所見では，無精子症と10×10^6/ml以下の高度乏精子症が70％を占めた．睾丸生検所見では，高度造精機能低下と造精機能なしが67％を占めた．FSHは無精子症で高値を示したが，LH, testosteroneと精子濃度との関係はなかった．精嚢腺造影では，Ⅰ型とⅡ型が70％を占め，年齢角度はⅢ型に幼若型が多かった．精嚢腺の発育形態に比例して，精液量が増減する傾向を認めた．

34．卵胞および黄体の系統的個別機能評価法

森岡信之・向田哲規・中野祐滋
岡谷裕二・相良祐輔
（高知医大産婦）

尿中Estrogen（E）測定による卵胞機能と排卵予知，および妊孕性の良否判定を目的とした黄体機能の三要素の系統的個別化の可能性について検討し，臨床上有用と考えられる成績を得たので報告する．
〔方法〕月経周期5日目より連日夜間9時間尿中Eを測定し，Eが前日の1.5倍に増加する点をE Spurtとし，それ以後のE増加分を連日加算し累積E量（CE）とした．黄体期7～9日目にhCG 5,000iu 3日間連続投与し，前後のProgesterone（P）値を測定し，その増加量の検討を行なった．
〔成績〕clomid投与群のE SpurtのE増加量は5μg以下，5～10μg，10μg以上のA，B，C群に群別でき，B，C群のday-1のCE値が18.2μg, 36.0μg以上では24時間以内に80～100％に排卵が起こり，さらにA，B，C群のCE値とhCG投与後のP増加量は有意の相関が認められた．従ってCE, hCG負荷後のPを測定することで，排卵予知，卵胞機能に相関した黄体機能の系統的個別機能評価法の臨床応用への有用性を示した．

35．当科不妊外来における妊娠例の排卵期および黄体期のホルモン動態の検討

片山隆章・新谷恵司・多賀茂樹
名越一介・林　伸旨・占部　清
吉田信隆・関場　香
（岡山大産婦）

不妊外来妊娠例の排卵期および黄体期のestradiol（E_2）およびprogesterone（P）の動態を検討した．
対象は当科不妊外来にて昭和62年1月より12月までの間に妊娠した症例のうち，基礎体温が判定可能であり，排卵期または黄体期にE_2，Pを測定し，高プロラクチン血症等の合併症を認めないもののうち，今回は特に妊娠周期に検査を行なった36例とした．その治療内容は無治療のもの9例，clomidを投与したもの14例，sexovidを投与したもの9例，HMGを投与したもの4例であった．検討の結果，排卵期のE_2は無治療群で249pg/ml,clomid群で492，sexovid群で196，HMG群で1418であり，黄体期6日から8日までのE_2，Pはそれぞれ，無治療群で131pg/ml, 9.9ng/ml，clomid群で431，27.0，sexovid群で278, 15.4，HMG群で2443, 120.7であった．排卵期・黄体期のE_2，Pは無治療群に比べてHMG群で高値を，clomid群は比較的高値を示した．

36．不妊症患者における超音波子宮内膜エコーの変化と黄体機能不全との関連性に関する研究

田口俊章（鳥取県立中央病院産婦）

〔対象と方法〕当院不妊外来通院中の患者のうち基礎体温が2相性を示す56名につき201回子宮内膜エコーを観察し，坂本の分類に準じType 1～4に分けた．また30名については，黄体期中期の血中E_2，P値を測定し内膜エコーとの関連性を調べた．
〔結果〕①子宮内膜エコーパターンは月経周期に伴いType 1→2→3→4と移行する傾向があった．②Type 1は－1～－2DAY，Type 2は－3DAY～＋1，Type 3は±0～6DAY，Type 4は＋6～＋8DAYに多く観察された．③子宮内膜エコーの厚さは月経周期と共に増し，排卵日前後で6～7mm，最も厚くなる＋5～＋7DAYで11mmあった．④黄体期中期のE_2はType 2>3>4>1>の順，PはType 3>2>4>1，P/E_2はType 4＞3＞1＞2の順となり，黄体機能を最も反映しているといわれているP/E_2においてTypeが進むにつれて黄体機能がよいと考えられた．⑤子宮内膜の厚さとE_2，P，P/E_2との間には相関がなかった．

特別講演

男子不妊症の2，3の問題

島崎　淳（千葉大泌尿器）

訂正とお詫び

本誌第33巻第4号133(815)頁の「第106回日本不妊学会関西地方部会」一般講演第10番目の演者名 和田和孝 は 浜田和孝 の誤りです。訂正してお詫び申し上げます。

関連学会開催のお知らせ

第 13 回世界不妊学会（IFFS）

開催期間：1989 年 10 月 1 日～10 月 6 日

開 催 地：The Palais des Congrès, マラケシュ（モロッコ）

Abstract：1989 年 3 月 30 日　締切

登　　録：4 月 30 日までは　　325US$
5 月 1 日～ 9 月30日　350US$
現地登録　　450US$

プログラム内容詳細および抄録用紙,登録用紙は㈱日本不妊学会事務局(Tel 03-272-7077)へお問い合せ下さい。

第12回産婦人科マイクロサージャリー学会

日時：1989年8月2日（水）　ワークショップ
8月3日（木）　学術講演会
場所：城山観光ホテル
〒890 鹿児島市新照院町41番1号
Tel　0992-24-2211
会長：永田行博（鹿児島大学教授）

連絡先：鹿児島市宇宿町1208番1号
鹿児島大学医学部産科婦人科学教室
Tel　0992-64-2211　内線2122

第29回日本産科婦人科内視鏡学会

日時：1989年8月4日（金），5日（土）
場所：城山観光ホテル
〒890 鹿児島市新照院町41番1号
Tel　0992-24-2211
会長：永田行博（鹿児島大学教授）

連絡先：鹿児島市宇宿町1208番1号
鹿児島大学医学部産科婦人科学教室
Tel　0992-64-2211　内線2122

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，平がなを用い，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

百瀬和夫（委員長）

味香勝也　石島芳郎　遠藤克
小林俊文　佐久間勇次　白井将文
平川舜　穂坂正彦

EDITORIAL BOARD

Kazuo MOMOSE (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA　Yoshiro ISHIJIMA　Tuyoshi ENDO
Toshihumi KOBAYASHI　Yuzi SAKUMA　Masafumi SHIRAI
Shun HIRAKAWA　Masahiko HOSAKA

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　㈱アイシーエス企画内
（Tel. 03-272-7077）

日本不妊学会雑誌　34巻1号

1988年12月25日　印刷
1989年1月1日　発行

編集兼発行者　百瀬和夫
印刷者　安永修
東京都文京区関口1—43—5
印刷所　有限会社ルーブ社
東京都文京区関口1—43—5
発行所　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㈱アイシーエス企画内
Tel（03）272—7077
振替口座番号　東京　7—93207