

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 34 No. 2

April
1989

日本不妊学会雑誌

第34巻 第2号

平成元年4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 3 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	平成元年 9 月 2 日 (土), 3 日 (日) ……旭川市民文化会館
理事会・幹事会	平成元年 9 月 1 日 (金) ……ニュー北海ホテル
総会・評議員会	平成元年 9 月 2 日 (土) ……旭川市民文化会館

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。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、演題数の約半分以上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 3 ヶ月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）

(1)排卵障害 田中昭一 助教授（札幌医科大学産婦人科）

(2)卵管通過障害 長田尚夫 講師（日本大学産婦人科）

(3)着床障害 辰己賢一 助手（京都大学産婦人科）

(4)造精障害 松本 修 助教授（神戸大学泌尿器科）

布施秀樹 助教授（富山医科薬科大学泌尿器科）

(5)精路通過障害 藤尾章司 助手（東邦大学泌尿器科）

(6) AID, AIH 杉村和男 講師（慶應義塾大学産婦人科）

(7)顕微受精 三宅正史 助手（京都大学畜産学科）

(8)卵子・胚の凍結保存 武田哲男 主任研究員（全農・中央研究所）

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、平成元年度会費（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：石川陸男) 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：平成元年 4 月 30 日（必着）

演題発表方法

講演時間は 6 分、討論時間は 2 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、採用者へご連絡致します。

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。

平成元年 4 月 第 34 回 日本不妊学会

会長 清水哲也

※ご宿泊・航空券・観光旅行のご案内は、192 ページめをご覧ください。

支部評議員について

下記 376 名について、1989 年 1 月 1 日より 1990 年 12 月 31 日まで支部評議員を委嘱します。
本誌面をもって委嘱状と致します。

北海道支部 支部評議員 (25 名)

石川睦男	一戸喜兵衛	大越隆一	小國親久
川倉宏一	菊川寛	小森昭	小柳知彦
酒井潔	千石一雄	高橋芳幸	小田中昭一
田中俊誠	田畑武夫	丹田均	野々村克也
芳賀宏光	林義夫	平尾和義哉	平野哲夫
古屋聖児	丸田浩	美甘和	山下幸紀
横尾和夫			

東北支部 支部評議員 (31 名)

秋山精治	安部徹良	石井延久	石橋功
一條貞敏	入澤俊氏	梅津元昭	太田博孝
小田隆晴	利部輝雄	金杉本恵吉	川越慎之助
木村正一	木村行雄	国本岩夫	児玉英七郎
佐藤和宏	品川信良	白谷和	菅原永利馬
高橋亨平	永井信晃	西星	信合
福島峰子	古橋信コ	吉田	
真木正博	宮川ウ		

関東支部 支部評議員 (158 名)

味香勝也	麻生武志	天野久夫	雨森良彦
雨宮章	新井正夫	荒木勤	荒木日出之助
飯田悦郎	石田肇夫	石原藤治	石橋雅夫
岩動孝一郎	伊藤晴武夫	伊吹令嘉	伊藤道友
伊藤光雄	井上光夫	岩田田隆己	上野隆精子
岩城章雄	岩沢実	梅田田三	梅津田耕一
植村次克平	大野虎之進	岡田川尚夫	岡田永田尚祥
遠藤良子	小笠野雅弘	尾川田英介	冲長斐藤
岡本洋久	荻落合宏一	長小加岸久	甲斐藤二
冲永高隆夫	加藤戸英夫	小加岸久	加木楠公
小田来村之弘	神木下原慶一	久小磯林賀	楠公小笹
河木坂高健朗	小林伯政	小佐	平林重男
熊柴田			

佐佐杉鈴高田館田堤百永西平福古増丸宗柳山吉渡	々藤江木崎口村目田瀬村川谷淵山像沼本田辺	木昭正悦	茂郎佶彦司武鄰武治男郎司一舜子博正正親恣一雄彰	佐佐杉鈴高武田陳津中中長根広藤穂松水村安山吉渡	藤村田谷辺端居村野岸川井坂本口山水本田邊	和正道雄清津捷光正正壯儔正英弘洸英	雄威男勝夫二男水夫生久男治信子彦亜司茂彦浩機茂	佐佐杉須高武田辻豐中新野福藤星松水目矢吉和	藤山藤橋田村井田嶋村島嶽井原野本野崎内原田出	嘉芳四寛輝佳昭弘唯幸端幸靖幸茂重鑛啓重	兵昭郎人雄彦藏忠裕夫雄夫正典郎夫泰光太郎雄靖	佐塩鈴相多田田土土中中西林福古牧松三矢山吉我	藤塚木馬賀崎村屋橋田山島畑野山橋追中田妻	孝幸秋広理文一瑛徹方哲恒栄直良英茂	道彦悦明吉寛貴雄慶浩也望也務彦久吉樹正寿子堯
------------------------	----------------------	------	-------------------------	-------------------------	----------------------	-------------------	-------------------------	-----------------------	------------------------	---------------------	------------------------	------------------------	----------------------	-------------------	------------------------

中部支部 支部評議員 (27名)

石押川鈴中花山	原木村森西田本	実雄一薫美治彦	稲可米玉成福余	葉世谷舍田島語	芳辰国輝郁	一夫男彦収穰夫	大風鈴寺野水和	池戸木尾口野田	哲貞正俊昌一圭	郎之利彦良郎介	大河鈴名野水	島上置出田谷	清治三男已彦
---------	---------	---------	---------	---------	-------	---------	---------	---------	---------	---------	--------	--------	--------

北陸支部 支部評議員 (20名)

赤打桑内布	祖父林原藤施	一知雄隆輔樹	荒大高南松	木川邑後田	克光昌千春	己央輔秋悦	飯大千長美	田沢鳥谷川	和哲真郁	質汎也常夫	泉河津藤山	陸屋龍幸	一郎三雄巖
-------	--------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	------	-------

関西支部 支部評議員 (34名)

浅伊加	野藤征史郎	定裕	足井神	高上埼	善彦秀	彦郎陽	生内香	駒海山	文恭浩	彦三二	市片斎	川山藤	茂和宗	孝明吾
-----	-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

下杉仲浜宮山	村本野田崎村	虎修良次博	男一介郎重三	新鈴西平村山	木川井上元	武貴	三瞭潔博旭雄	新高野前望	谷崎田川月	洋正眞	浩登一信人	須竹浜松森	川村田本川	和	佶喬孝修肇
--------	--------	-------	--------	--------	-------	----	--------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	---	-------

中国四国支部 支部評議員 (39名)

飯唯小己高竹奈林宮山	塚井川斐田内賀川本	修重秀元正伸征	務亞男豐敬文脩旨男治	石大香相高武中藤本湯	部橋川良橋田間原森原	知輝祐太實良正	行久征輔郎秀德篤治高	伊大加新高田丹松森吉	東濱藤甲柳中羽浦岡田	武紘啓皓俊政信	久三紘洋真幹二平明隆	上岡北菅瀧寺林見森	田谷尾原内尾下	一裕徹博弘保	之二学行史知要幸一
------------	-----------	---------	------------	------------	------------	---------	------------	------------	------------	---------	------------	-----------	---------	--------	-----------

九州支部 支部評議員 (42名)

赤石長門熊執中西東松森	嶺丸田田澤行村山浦	正忠幸淨律元久政講宏	次之夫徹一夫一吉弘平之	安今尾金熊竹中秦比水藥	部村上岡本内牟喜嘉元師	臣敏有一誠八国淳道	宏正一毅宏浩一郎郎一明	有江片川坂田中浜日迎	馬藤桐野本島村田高	直耕英秀日朝正正英俊	見作彦昭朗信彦一幸彦	池王加楠佐堂中濱肥森	田丸藤田久地村田田	友鴻雅哲雅政木憲	信一俊彦郎勉弘雄孜正
-------------	-----------	------------	-------------	-------------	-------------	-----------	-------------	------------	-----------	------------	------------	------------	-----------	----------	------------

日本不妊学会誌

第34巻 第2号

平成元年4月1日

——目 次——

原 著

- 男子不妊症患者精液中微量元素の季節変動について……………石川博通・他 …… 1
若年者および高齢者の精管のカテコールアミン
および結合タンパク質含量……………中田瑛浩・他 …… 6
精索静脈瘤患者における睾丸部深部温測定……………山口政俊 …… 11
男子不妊症症例の Sertoli 細胞機能に関する研究
——精漿中 transferrin および精漿中 inhibin 活性に関する検討—— ……高木良雄・他 …… 18
無精子症の臨床統計……………吉井慎一・他 …… 29
男子不妊症の臨床統計的観察……………金子克美・他 …… 33
Chordee without Hypospadias ……布施秀樹・他 …… 39
男子不妊症に対するペントキシフィリン及び塩酸ニカルジピンの効果……………中村潔史・他 …… 44
Clomiphene-hMG 刺激周期を利用した Percoll 洗浄精子による AIH ……児玉英也・他 …… 50
Fertilizing Capacity of the Zona-free Hamster Ova
Human Sperm Penetration Test and Sperm Characteristics
in Infertile Men with Abnormal Spermatozoa ……K. Takahashi et al. …… 56
Urinary hLH Surge in Infertile Women Results
in Low and Short……………T. Okamura et al. …… 62
不妊症における黄体中期のプロゲステロンとエストラジオールの相関性……………石黒 理・他 …… 70
思春期の続発性無月経の予後に関与すると推定される諸因子の解析
(follow up study) ……松本和紀・他 …… 76
Cortisol Response to Metoclopramide in Hyperprolactinemic Women
with Pituitary Microadenoma and Women with
Hypothalamic Amenorrhea ……K. Seki & K. Kato …… 82
ヒト卵成熟過程に伴う卵胞液中 Prostaglandins 動態に関する検討 ……菊川美一・他 …… 85
ヒト脱落膜の免疫学的意義に関する研究……………渡辺直生 …… 90
Putative Stimulation by Estrogen of the Induction of
Deoxyribonucleic Acid Polymerase α in the Endometrium
of the Human Uterus During the Menstrual Cycle ……S. Usuki et al. …… 96
早期流産 Early abortion に関する用語について ……高浜一宏・他 ……101
R-AFS III・IV期子宮内膜症の治療後2年間の妊孕性の検討
(付属器の左右別評価の有用性)……………中谷一夫・他 ……106

Danazol による子宮筋腫の治療

—細胞培養法による <i>in-vitro</i> の基礎実験—	大塚治夫・他	112
不妊症患者における子宮腔部びらんに対する CO ₂ レーザー蒸散法の 効果について	草刈万寿夫・他	116
家兔胚の <i>in vitro</i> 着床実験 (着床前期)	立山一郎	120
Hyaluronidase 処理により分類した排卵直前マウス卵胞卵の成熟度, 受精能および新生仔への発生能について	中潟直己	128
マウス 2 cell 胚を用いた培養液の検討	内田昭弘・他	135
The Effects of Anti-LH Serum and Sodium Pentobarbital on Superovulation in Rat	S. Kagabu & K. Mamba	140
Appearance of Unfertilized Ova Cleaving in the Ampulla of the Uterine Tube After Repeated Ovulation Inducement	K. Kanayama et al.	144
マウス初期胚の体外発育に及ぼす EDTA および BSA の影響	金 純・高橋徳太郎	149
ヒツジ切断 2 分離胚の自家移植	角田幸生	153
Aging Changes of Mice in the Size of Oocytes, Nuclei and Nucleoli	A. Narita & K. Ishida	157
レセルピン投与ラットにおける脱落膜反応について	辻井弘忠	165
The Effect of Intrauterine Bacterial Infection on Implantation of Fertilized Ova in Rats	M. Akaike et al.	170
地方部会講演抄録		178

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 34, No.2, 1989)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Seasonal Changes of Trace Elements in Semen in Patients
with Male Infertility *H. Ishikawa, H. Tomomasa,
S. Yoshii, H. Takeshima & K. Koiso* 1
- Contents of Catecholamine and Connective Tissue Protein in
Vasa Deferentia in Young and Aged Subjects *T. Nakada, I. Sasagawa,
K. Umeda, T. Terada, H. Furuta,
T. Katayama & J. Shimazaki* 6
- The Application of Intrascrotal Deep Body Temperature (DBT)
Measurement to the Patients with Varicocele *M. Yamaguchi* 11
- Study of Sertoli Cell Functions in Male Infertility
—Relationship between Seminal Plasma Transferrin and
Seminal Plasma Inhibin Activity— *Y. Takagi, Y. Kumamoto
& Y. Watanabe* 18
- Clinico-statistical Study on Azoospermia *S. Yohii, H. Tomomasa,
H. Takeshima, H. Ishikawa & K. Koiso* 29
- A Clinical and Statistical Study of Male Infertility *K. Kaneko, Y. Tabata,
K. Mukae, T. Arai, M. Honda,
T. Suzuki, I. Murahashi & E. Takasaki* 33
- Chordee without Hypospadias *H. Fuse, H. Sumiya, H. Ishii,
M. Takahara, Y. Shiseki & J. Shimazaki* 39
- Effects of Pentoxifylline and Nicardipine Hydrochloride
on Male Infertility *K. Nakamura, T. Mizutani, H. Oguri,
N. Suganuma, Y. Ishihara, Y. Tomoda,
I. Komdoh, T. Hayashi, T. Kimura, K. Matuzawa,
M. Ohsawa, O. Narita & K. Miyake* 44
- Artificial Insemination with Washed Spermatozoa During
Clomiphene Citrate and Human Menopausal
Gonadotropin-Stimulated Superovulatory Cycles *H. Kodama, M. Kato,
J. Fukuda, K. Ichinoseki,
M. Fukushima, M. Maki & H. Ota* 50

Fertilizing Capacity of the Zona-free Hamster Ova	
Human Sperm Penetration Test and Sperm Characteristics	
in Infertile Men with Abnormal Spermatozoa	<i>K. Takahashi, M. Kusakari,</i>
	<i>A. Uchida, H. Yamasaki,</i>
	<i>K. Yoshino & M. Kitao</i> 56
Urinary hLH Surge in Infertile Women Results	
in Low and Short	<i>T. Okamura, O. Nishii,</i>
	<i>T. Takeuchi & T. Yaginuma</i> 62
Correlation of Serum Progesterone and Estradiol Levels of	
Mid-luteal Phase in Infertile Women	<i>O. Ishihara, S. Ishihara,</i>
	<i>O. Tsutsumi, Y. Taketani & M. Mizuno</i> 70
Analysis for Factors of Possible Prognostic Significance in	
Secondary Amenorrhea during Puberty	<i>K. Matsumoto, K. Kusuhashi,</i>
	<i>N. Watanabe, Y. Odawara, M. Kawakatsu,</i>
	<i>H. Motoyama, M. Nagao, I. Yasue & Y. Terashima</i> 76
Cortisol Response to Metoclopramide in Hyperprolactinemic	
Women with Pituitary Microadenoma and Women with	
Hypothalamic Amenorrhea	<i>K. Seki & K. Kato</i> 82
The Role of Prostaglandins on the Oocyte Maturation	
in Human Preovulatory Follicles	<i>Y. Kikukawa, M. Kasamo,</i>
	<i>M. Ishikawa & T. Shimizu</i> 85
Study on Immunological Significance of Human Decidua	<i>N. Watanabe</i> 90
Putative Stimulation by Estrogen of the Induction of	
Deoxyribonucleic Acid Polymerase α in the Endometrium of	
the Human Uterus During the Menstrual Cycle	<i>S. Usuki, S. Kubota,</i>
	<i>Y. Ichikawa, A. Hosokawa & M. Okane</i> 96
Words and Definition of Early Abortion	<i>K. Takahama, H. Hoshiai & A. Yajima</i>101
Study on Fertilizability in R-AFS III and IV Endometriosis at	
2 Years after Completion of Therapy (Value of Side-to-Side	
Separate Evaluation of Adnexae)	<i>K. Nakatani, Y. Kimura & H. Hoshiai</i>106
Treatment of Uterine Leiomyoma with Danazol	
—Basal <i>in Vitro</i> Experiment by Cell Culture—	<i>H. Otsuka, S. Kusano</i>
	<i>& K. Yosida</i>112
Study on the Treatment of Vaporizatin for Uterine Cervical	
Erosion by CO ₂ Laser in Infertile Women	<i>M. Kusakari K. Takahasi,</i>
	<i>K. Yoshino & M. Kitao</i>116
<i>In Vitro</i> Studies on the Early Stage of Rabbit	
Blastocyst Implantation	<i>I. Tateyama</i>120

Relationship between the Degree of Cumulus Cell Detachment Caused by Treatment with Hyaluronidase and Maturation Division, Fertilization Capability, and Ability for Development of Preovulatory Oocytes to Normal Young in Mice	<i>N. Nakagata</i>	128
Study of Preserved Media Used for Mouse Embryo	<i>A. Uchida, K. Takahashi, K. Yoshino, M. Kusakari, H. Yamasaki & M. Kitao</i>	135
The Effects of Anti-LH Serum and Sodium Pentobarbital on Superovulation in Rat	<i>S. Kagabu & K. Mamba</i>	140
Appearance of Unfertilized Ova Cleaving in the Ampulla of the Uterine Tube After Repeated Ovulation Inducement	<i>K. Kanayama, T. Sankai, T. Endo & Y. Sakuma</i>	144
Effect of EDTA and BSA on Development of Mouse Zygotes <i>In Vitro</i>	<i>J. Kim & T. Takahashi</i>	149
Auto-transplantation of Bisected Embryos in the Sheep	<i>Y. Tsunoda</i>	153
Aging Changes of Mice in the Size of Oocytes, Nuclei and Nucleoli	<i>A. Narita & K. Ishida</i>	157
Deciduomal Response in Reserpine-Induced Pseudopregnant Rats	<i>H. Tsujii</i>	165
The Effect of Intrauterine Bacterial Infection on Implantation of Fertilized Ova in Rats	<i>M. Akaike, T. Fukuyasu & K. Ashida</i>	170

男子不妊症患者精液中微量元素の 季節変動について

Seasonal Changes of Trace Elements in Semen in Patients with Male Infertility

筑波大学泌尿器科 (主任: 小磯謙吉教授)

石川 博 通 友 政 宏 吉 井 慎 一
Hiromichi ISHIKAWA Hiroshi TOMOMASA Shin-ichi YOSHII

武 島 仁 小 磯 謙 吉
Hitoshi TAKESHIMA Kenkichi KOISO

Department of Urology,
University of Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan
(Director: Prof. K. Koiso)

男子不妊症患者の精液 474 検体に含まれている 15 種類の微量元素について誘導結合高周波プラズマ発光分析法を用いて各々の含有量を測定した。さらにそれぞれの元素の季節変動について検討した。同じ検体を用いて精液量, 精子濃度, 精子運動率および奇形率の季節変動についても検討した。

精液検査所見についてみると, 精子奇形率が夏・秋においてそれぞれ春・冬に比して有意に高かった。

微量元素では, Mg, Fe, Pb, Cd, Cr および Sr の 6 元素が有意な季節変動を示した。すなわち Mg は夏に最高値を示し, その他の 5 元素は春に最低値を示した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 197-201, 1989)

緒 言

精漿または精液中の微量元素含有量に関する報告は多く¹⁻³⁾, またそれと精液検査所見⁴⁻⁶⁾および前立腺疾患⁷⁻⁹⁾との関係について述べた知見も比較的多い。しかしながらこれらのうち微量元素レベルの変動について言及したものはない。このためわれわれは, あらゆる環境の変化と微量元素レベルとの関連について知りたいと考え, その第 1 歩として男子不妊症患者精液中の微量元素レベルおよび精液検査所見の季節変動について検討した。その結果若干の知見を得たので報告する。

対 象

過去 1 年間に筑波大学泌尿器科を受診した男子不妊症患者 (乏精子症および正精子症) から得られた

精液 474 検体を対象とした。

方 法

1. 精液の採取

精液は 5 日間の禁欲後, 外来にて用手法によって採取された。

2. 精液検査

得られた精液の液化を待った後, 精液量を測定し, 精子濃度, 精子運動率および精子奇形率をルーチンの方法で算定した。

3. 微量元素の測定^{6,10)}

精液 1ml に対し, 各々 2ml の原子吸光用硝酸および過塩素酸を加えて灰化処理し, 48 時間室温で放置した。その後 3 次蒸留水で 5 倍に希釈し, Jarrel-Ash 社製 Plasma Atomcomp. Direct-Reading Spectrometer Systems を使用し, 高周波誘導結合プラズマ

発光分析をそれぞれの検体につき行った。測定した元素は、Ca, Mg, Zn, Fe, Mo, Al, Be, Cu, Mn, Pb, Cd, Co, Cr, Ni および Sr の 15 種類であり、含有量は各々の標準溶液曲線から算定し、ppm で表示した。

4. 精液検査所見および微量元素含有量の季節変動の検討

検体を採取した時期に従い、春(3月～5月)、夏(6月～8月)、秋(9月～11月)、冬(12月～2月)の4群に分類し、各群の精液検査所見および微量元素含有量の平均値を算定し、それぞれ比較検討を行った。

結 果

1. 精液検査所見の季節変動

精液量、精子濃度、精子運動率および精子奇形率の季節別の平均値は表1の如くであった。前3者では、季節間の有意差は認められなかったが、精子奇

形率は、夏・秋の平均値が、それぞれ春・冬に比して有意に高かった ($p < 0.01$) (表1)。

2. 微量元素の季節変動

15種類の微量元素の季節別平均濃度は表2の如くであった(表2)。これらのうちで季節間の有意差が認められたものは、Mg, Fe, Pb, Cd, Cr および Sr の6元素であった。すなわち Mg および Pb は冬および春より夏に高く ($p < 0.01$) (図1および図2)、Fe は春、夏より冬に高かった ($p < 0.01$) (図3)。また

表1 精液検査成績の季節変動 (Mean±SD)

	精液量 (ml)	精子濃度 ($\times 10^5/\text{ml}$)	精子運動率 (%)	精子奇形率 (%)
春	3.4±1.2	27.5±28.7	54.2±22.9	19.8±11.1
夏	3.3±1.4	24.9±27.6	44.8±24.2	33.4±22.3
秋	3.4±1.5	30.8±37.1	52.7±23.8	32.4±14.5
冬	3.5±1.4	29.7±44.2	49.3±24.8	22.2±12.3

$p < 0.01$

$p < 0.01$

$p < 0.01$

表2 精液中微量元素濃度の季節変動 (ppm; Mean±SD)

微量元素 季節	Ca	Mg	Zn	Fe	Mo	Al	Be	Cu	Mn	Pb	Co	Cr	No	Sr
春	269.2 ± 98.3	111.1 ± 49.3	163.3 ± 78.6	0.14 ± 0.23	0.18 ± 0.16	0.08 ± 0.20	0.02 ± 0.13	0.037 ± 0.12	0.003 ± 0.008	0.034 ± 0.010	0.002 ± 0.005	0.014 ± 0.008	0.008 ± 0.022	0.053 ± 0.035
夏	288.3 ± 116.2	121.7 ± 61.3	177.4 ± 84.6	0.16 ± 0.30	0.21 ± 0.20	0.19 ± 0.41	0.003 ± 0.019	0.05 ± 0.11	0.016 ± 0.059	0.104 ± 0.225	0.008 ± 0.020	0.014 ± 0.040	0.042 ± 0.088	0.061 ± 0.033
秋	265.2 ± 103.4	107.2 ± 53.7	153.2 ± 81.9	0.19 ± 0.33	0.19 ± 0.18	0.21 ± 0.38	0.001 ± 0.003	0.046 ± 0.11	0.011 ± 0.033	0.081 ± 0.201	0.007 ± 0.017	0.040 ± 0.032	0.011 ± 0.080	0.068 ± 0.036
冬	270.0 ± 113.7	99.7 ± 51.6	154.5 ± 83.4	0.26 ± 0.16	0.22 ± 0.12	0.22 ± 0.33	0.0004 ± 0.003	0.048 ± 0.06	0.010 ± 0.010	0.050 ± 0.122	0.004 ± 0.010	0.006 ± 0.017	0.064 ± 0.052	0.070 ± 0.035

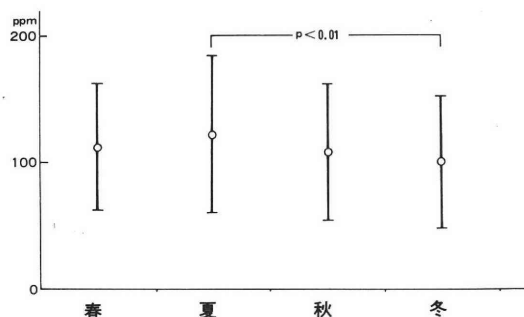


図1 精液中 Mg 濃度の季節変動 (Mean±SD)

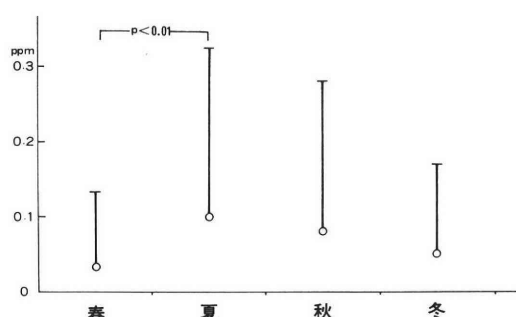


図2 精液中 Pb 濃度の季節変動 (Mean±SD)

Cr, Sr, および Cd はそれぞれ夏と秋と冬, 秋と冬および秋と夏において春より高かった ($p < 0.01$) (図 4, 5 および 6).

3. 精子奇形率と 6 元素との関係

精液検査所見のうち季節間で有意差の見られた精子奇形率と前述の 6 元素との関係を検討したが有意な相関は認められなかった。

考 察

今回の検討で季節変動のみられた元素は, Mg, Pb, Fe, Cr, Sr および Cd の 6 種類であり, Mg を除いた 5 元素の濃度が春において低値を示した。また精液所見では精子奇形率が夏, 秋に高く, 春, 冬に低いという結果であった。これらの元素の濃度変化と精子奇形率の変動との間に相関はなかったが, それぞれの成績は興味深いものであった。

微量元素についてみると, 現在まで季節変動に関して言及したものは皆無と言ってよいが, これらの元素と男子不妊症または精液所見との関連を述べたものは多く見られる^{1,6,11-17}。すなわち Mg については, その濃度と精子運動率は負の相関を示すとするもの^{1,6}、不妊患者では濃度が低下しているとするもの¹¹、また cAMP を介した精子の運動を促進

する adenylylate cyclase の活性化作用があるとも言われている¹²。Fe に関しては, その濃度と精子濃度とは正相関があり⁶、それをうらづけるものとして, Fe は精子中の mid-piece に局在するため, 他の金属に比して精子濃度が高いとの知見がある^{13,14}。Pb については, 不妊患者では, 妊孕性のある成人に比して精液内濃度が高いこと¹⁵、それを扱う人では正常に比べ精液所見が悪化していること¹⁶、実験的にヒト精子の運動性を悪化させることなどが示されている¹⁴。また Cd については Pb と同様不妊患者では精液内濃度が高く¹⁵、精子の運動性を低下させることなどが言われている^{4,17}。すなわち Cr, Sr についての記載はないが, Fe は精子の重要な構成成分であり, Mg は運動促進因子と考えられ, Pb および Cd は運動阻止因子と思われる。

次に精液検査所見の季節変動についてみると, 精液量は Spira は秋に多くなるとし¹⁸、Mortimer らは季節変動がないとしている¹⁹。精子濃度は Hotchkiss らは春に最大値をとると述べているが, 多くは秋から春にかけて高いとしている^{19,21,22}。精子運動率は Hotchkiss は冬に減少するとし²⁰、Spira は夏に最高に達すると述べている¹⁸。また精子奇形率は Spira が冬から春に高いとし, われわれとは全く逆の成績を示している¹⁸。このように精液検査所見の変動につい

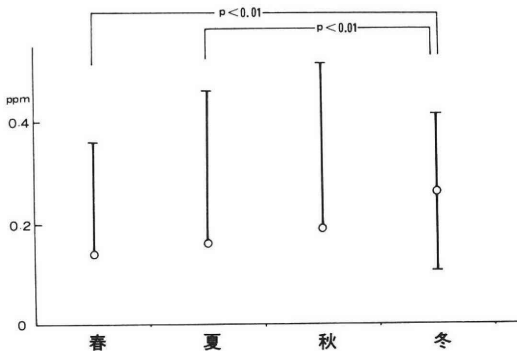


図 3 精液中 Fe 濃度の季節変動 (Mean ± SD)

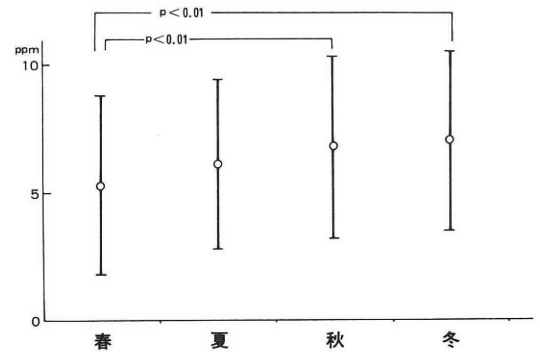


図 5 精液中 Sr 濃度の季節変動 (Mean ± SD)

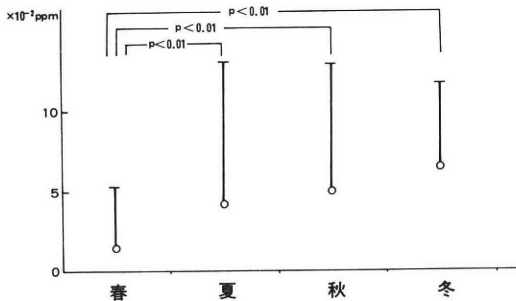


図 4 精液中 Cr 濃度の季節変動 (Mean ± SD)

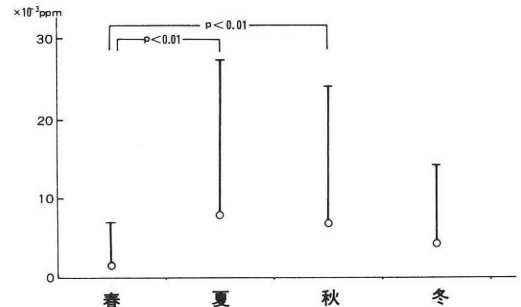


図 6 精液中 Cd 濃度の季節変動 (Mean ± SD)

ては、その成績は報告者によってかなり相違があるが、この原因として、われわれと Mortimer らは不妊患者について検討しているに対して、他は正常者を中心に述べていること、われわれも含めて例数(検体数)が少なく観察期間も短いことなどが考えられる。

以上のことから精液中の微量元素の変動を精液検査所見との関連で、正常者および不妊患者双方からの検体で長期にわたって分析することは非常に有用なと考えられた。また今回有意差のあった Mg, Fe や Zn, Ca などについては精液中の含有量が多く、精子の成熟を中心に重要な役割を果たしているためそれらによる不妊症の治療ということを念頭に入れながら観察していかなければならないし、Pb や Cd については、障害因子という概念を持って、季節以外の環境因子との関連性も検討していくべきであろう。

文 献

- 1) Eliasson, R., Lindholmer, C. and Leander, G.: Zinc and magnesium in seminal plasma. *Int. Urol. Nephrol.* 2: 309, 1970
- 2) Stankovic, H. and Mikac-Devic, D.: Zinc and copper in human semen. *Clin. Chim. Acta.* 70: 123, 1976
- 3) Harris, W. A., Harden, T. W. and Dawson, E. B.: Apparent effect of ascorbic acid medication on semen metal levels. *Fertil. Steril.* 32: 455, 1979
- 4) White, I. G. J.: The toxicity of heavy metals to mammalian spermatozoa. *Austral. Exp. Biol.* 33: 359, 1955
- 5) Holland, M. K. and White, I. H.: Heavy metals and human spermatozoa II. The effect of seminal plasma on the toxicity of copper metal for spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 27: 95, 1982
- 6) 石川博通, 小磯謙吉, 友政 宏, 吉井慎一, 武島仁, 梅山知一: 男子不妊症患者における精液中の微量元素に関する研究, 日泌尿会誌, 77: 1159, 1986
- 7) Willden, E. G. and Robinson, M. R. G.: Plasma zinc levels in prostatic disease. *Brit. J. Urol.* 47: 295, 1975
- 8) Feustel, A. and Wennrich, R.: Zinc and cadmium in cell fractions of prostatic cancer tissues of different histological grading in comparison to BPH and normal prostate. *Urol. Res.* 12: 147, 1984
- 9) Vaubiurdolle, M., Clarel, J-P., Cynober, L., Piton, A. and Galli, A.: Acidphosphatase and zinc in semen of subjects with no clinical evidence of prostate disease. *Clin. Chem.* 31: 878, 1985
- 10) 梅山知一, 小川由英: 尿路結石症における微量元素に関する研究, I. 尿路結石の分析 日泌尿会誌, 75: 1038, 1984
- 11) Papadimas, J., Vintis, J., Ikkos, D. and Mantalenakis, S.: Seminal plasma zinc and magnesium in infertile men. *Archiv. Androl.* 10: 261, 1983
- 12) Okamura, N. and Sugita, Y.: Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J. Biol. Chem.* 258: 13056, 1983
- 13) Pleban, P. A. and Mei, D.: Trace elements in human seminal plasma and spermatozoa. *Clin. chim. Acta.* 133: 43, 1983
- 14) Morisawa, M. and Mohri, H.: Heavy metals and spermatozoan motility. I. Distribution of iron, zinc and copper in sea urchin spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 70: 311, 1972
- 15) Umeyama, T., Ishikawa, H., Takeshima, H., Yoshii, S., Koiso, K.: A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 46: 494, 1986
- 16) Laneranjani, I. and Popeacu, H. I.: Reproductive ability of workman occupationally exposed to lead. *Arch. Environ. Health.* 30: 396, 1975
- 17) Steven, F. S., Griffin, M. M. and Chantler, E. N.: Inhibition of human acrosin activity. *Int. J. Androl.* 5: 401, 1982
- 18) Spira, A.: Seasonal variations of sperm characteristics. *Archiv. Androl.* 12 (Suppl.): 23, 1984
- 19) Mortimer, D., Templeton, A. A., Lenton, E. A. and Coleman, R. A.: Annual patterns of human sperm production and semen quality. *Archiv. Androl.* 10: 1, 1983
- 20) Hotchliss, R. S.: Factors in stability and variability of semen observations on 640 successive samples from 23 men. *J. Urol.* 45: 875, 1941
- 21) MacLeod, J., Heim, L. M.: Characteristics and variations in semen specimens in 100 normal young men. *J. Urol.* 54: 474, 1945
- 22) Tjoa, W. S., Smolensky, M. H., Hsi, B. P., Steinberger, E. and Smith, K. D.: Circannual rhythm in human sperm count revealed by serially independent sampling. *Fertil. Steril.* 38: 454, 1982
- 23) Marmar, J. L., Katz, S., Praiss, D. E. and De Benedictis, R. J.: Semen zinc levels in infertile and postvasectomy patients and patients with prostatitis. *Fertil. Steril.* 26: 1057, 1975
- 24) Homonnai, Z. T., Marzkin, H., Fainman, N., Paz, G. and Kracer, P. F.: The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fertil. Steril.* 29: 539, 1978

**Seasonal changes of
trace elements in semen in
patients with male infertility**

Hiromichi Ishikawa, Hiroshi Tomomasa,
Shin-ichi Yoshii, Hitoshi Takeshima
and Kenkichi Koiso

Department of Urology,
University of Tsukuba,
Ibaraki, 305 Japan
(Director: Prof. K. Koiso)

A total of 474 semen specimens from patients

with male infertility were analyzed for 15 trace elements by means of inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. Furthermore, seasonal variation for each trace element were investigated. Simultaneously, seasonal values for ejaculate volume, sperm density, sperm motility and abnormality were calculated.

As to semen qualities, sperm abnormality rate in summer and autumn were significantly higher than those in spring and winter.

Of 15 trace metals 6 elements-Mg, Fe, Pb, Cd, Cr and Sr had significant seasonal variation; Mg had the highest concentration in summer and other elements had the lowest concentration in spring.

(受付: 1988 年 5 月 24 日)

若年者および老齡者の精管の カテコールアミンおよび結合織タンパク質含量

Contents of Catecholamine and Connective Tissue Protein in Vasa Deferentia in Young and Aged Subjects

千葉大学医学部泌尿器科学教室

中 田 瑛 浩 島 崎 淳
Teruhiro NAKADA Jun SHIMAZAKI

Department of Urology, Chiba University
School of Medicine, Chiba, 280 Japan

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

笹 川 五 十 次 梅 田 慶 一
Isoji SASAGAWA Keiichi UMEDA
寺 田 為 義 古 田 秀 勝
Tameyoshi TERADA Hidekatsu FURUTA

片 山 喬
Takashi KATAYAMA

Department of Urology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical & Pharmaceutical University,
Toyama, 390-01 Japan

若年者 18 人, 老年者 22 人の新鮮精管を切除し, その norepinephrine, non-collagenous protein, collagen, elastin 含量を測定した. 若年者群の精管の norepinephrine ないし non-collagenous protein 含量は老年者群のそれよりそれぞれ 2.2 倍 ($p < 0.001$) ないし 1.5 倍 ($p < 0.001$) 高く, 若年者群の精管の collagen ないし elastin 含量は老年者群のそれよりそれぞれ 52.2 % ($p < 0.001$) ないし 54.9 % ($p < 0.001$) 低値であった. norepinephrine, non-collagenous protein は contractile property に富む vasoactive substance と見なされている. したがって norepinephrine, non-collagenous protein の若年者による増加ないし, 老年者による減少が, ヒト精管の運動に亢進ないし抑制的に作用する可能性が示唆された.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 202—206, 1989)

緒 言

ヒト精管の筋層内にある神経分布は最近, 明らかになりつつある¹²⁾. 精管収縮に関与する物質としてはヒトでは norepinephrine (NE) が motor transmitter として重要で, その収縮運動は α_1 -adrenoceptor を介しているとの見解が有力である⁹⁾. 実際, ヒト精管を

副睾丸に近い部位で電気刺激すると収縮が生じるが, これは tetrodotoxin や α -adrenoceptor 阻害剤で抑制できることから, 神経末端から分泌される NE を介して α_1 -adrenoceptor 刺激が精管の収縮に関与するとの報告もある⁹⁾. 一方, NE のほかに精管の神経系に存在する adenosine triphosphate (ATP)¹⁸⁾ や α , β -methylene ATP²⁾ が postsynaptic P_2 -purino-

ceptor を介して精管運動を亢進させることが述べられており Ca^{++} の influx の変化も精管運動に影響を与えることが報告された¹⁷⁾。このように NE 以外の物質が精管運動に促進的に作用することが、最近、注目を集めている。著者らはラットないしヒトの動脈に存在する non-collagenous protein が神経を介して平滑筋の収縮に関与することを報告した^{13,14)}。このタンパク質のヒト精管における検索はなされておらず、ヒトにおける精管の含量も不明である。これらの点を解明するため、若年者および老年者のヒト精管について、本研究を行った。

対象および方法

20 歳から 36 歳、平均 29.0 ± 1.1 (平均値 $\pm$ 標準誤差) 歳の 18 人の若年者および 60 歳から 84 歳、平均 73.4 ± 1.5 (平均値 $\pm$ 標準誤差) 歳の老年者より、それぞれ副精巣尾部より 3 ~ 5 cm 離れた部位で精管を 2 ~ 3 cm 切離し、検索に供した。前者は避妊手術の際に、後者は前立腺疾患の手術に付随してそれぞれ行った。切除標本に付着した結合組織、脂肪組織を除去し、二分してから -80°C にて凍結保存した。検体の一部はカテコールアミンの測定に用いた。すなわち、組織の 5 倍量の 0.4N HClO_4 、0.01% cysteine および internal standard として 3, 4-dihydroxybenzylamine を混じてからホモジェネートし、10000g にて 20 分間沈殿し、上清を ODS- $5\mu\text{m}$ カラム (Bioanalytical Systems, Inc.) にかけて HPLC 法にてカテコールアミンを分離した²⁰⁾。移動相は $10\mu\text{M}$ EDTA、0.2mM sodium octylsulfate を含む pH 3.1 の 0.05M NaH_2PO_4 緩衝液である。これらの手技の詳細は他誌に記載されている^{15,16)}。

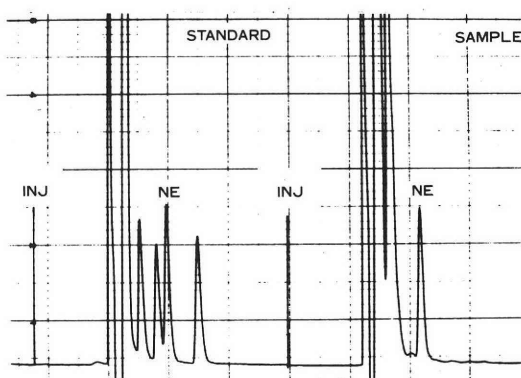


Fig. 1 Extraction of norepinephrine (NE) in human vas deferens by HPLC method.

INJ : injection of a prepared sample.

残った検体は 5 % trichloroacetic acid (TCA) 中

でホモジェネートし、 90°C で 40 ~ 50 分間加熱した。遠沈後、precipitate に同様の加温処理を加えることを合計 3 回、反復した。さらに常温の 5 % TCA にて 2 回洗滌し、これらの上清を混和してから 30 ~ 40 時間蒸留水中にて透析し、凍結乾燥して得た collagen を定量した⁷⁾。collagen の一部は磷酸緩衝液に溶解させ、タンパク質濃度を測定した。precipitates は 0.1N NaOH で洗滌し、 $90-95^\circ\text{C}$ の加温処理を 50 分間加えてから、酸を滴下し中性とした。これらの検体を室温にて 24 時間放置した後、755 g にて 15 分間遠沈した。これらの precipitates には elastin が混じておりアセトンついでエタノールにて洗滌し、オープンにて乾燥した後、重量を測定した²¹⁾。一方、中性化した溶液には non-collagenous protein が混合しており、これに予め氷冷しておいた検体の 1/10 容の 50 % TCA を加えてから ice bath にて 30 ~ 50 分間冷却した。これを低温下にて遠沈し、precipitate は cold の 5 % TCA にて 2 回洗滌し、さらに $90-95^\circ\text{C}$ の 5 % TCA にて 30 分間洗滌してから、遠沈した。precipitate はアセトン、エタノールの順でそれぞれ洗滌し、乾燥させてから non-collagenous protein 重量を測定した¹⁹⁾。

いずれのタンパク質分画も mg/g で示した。各群間の平均値の比較は student t-test による。

結 果

平均年齢 29 歳の若年者群および平均年齢 73 歳の老年者群の精管 NE, non-collagenous protein, collagen, elastin 含量および collagen/elastin 比の平均値を Table 1 に示す。若年者群の精管の NE 含量は老年者群のそれに比し 2.2 倍 ($p < 0.001$) 高値であった。前者の精管の non-collagenous protein 含量は後者のそれより 1.5 倍 ($p < 0.001$) 高値であった。これに対し若年者群の精管の collagen 含量, elastin 含量は老年者群のそれのそれぞれ 52.2% ($p < 0.001$), 54.9% ($p < 0.001$) を占めるにすぎなかった。量群の精管の collagen/elastin 比には有意差はなかった。

両群の各測定値と年齢との相関関係を Table 2 に示す。若年者群においては、年齢と精管の non-collagenous protein との間には負の相関関係が認められたが、年齢と NE 含量, 年齢と collagen 含量, 年齢と elastin 含量, 年齢と collagen/elastin 比との間にはそれぞれ有意の相関関係は認められなかった。老年者群においては年齢と精管の NE 含量, 年齢と non-collagenous protein 含量との間にそれぞれ負の相関が認められた。一方、年齢と精管の collagen 含量, 年齢と elastin 含量には正の相関関係が認められ

Table 1 Contents of norepinephrine, non-collagenous protein, collagen, elastin and collagen/elastin ratio in vasa deferentia in young subjects and aged subjects.

Variables	Young subjects (n = 18)	Aged subjects (n = 22)
Age (years)	29.0 ± 1.1	73.4 ± 1.5***
Norepinephrine (μg/g)	18.1 ± 0.8	8.2 ± 0.5***
Non-collagenous protein (μg/g)	57.0 ± 2.1	37.6 ± 1.9***
Collagen (μg/g)	10.6 ± 1.0	20.3 ± 0.9***
Elastin (μg/g)	10.0 ± 1.0	18.2 ± 0.8***
Collagen/Elastin	1.07 ± 0.04	1.12 ± 0.04

Each value represents mean ± S.E.

***P<0.001 : Compared to Young subjects.

Table 2 Correlation between age (X) of the patients and the content of vasoactive substances (Y) in vasa deferentia in examined subjects.

Variables in vasa deferentia	Young subjects (n = 18)	Aged-subjects (n = 22)
Norepinephrine	Y = 23.1-0.18X r = -0.25, p < 0.05	Y = 25.8-0.24X r = -0.64, p < 0.01
Non-collagenous protein	Y = 145.0-3.7X r = -0.69, p < 0.01	Y = 123.3-1.2X r = -0.89, p < 0.001
Collagen	Y = 10.1+0.017X r = 0.04, p > 0.05	Y = -16.3+0.50X r = 0.79, p < 0.001
Elastin	Y = 12.5-0.09X r = -0.24, p > 0.05	Y = -9.9+0.38X r = 0.70, p < 0.001
Collagen/Elastin	Y = 0.75+0.01X r = 0.32, p > 0.05	Y = 0.92+0.0038X r = 0.15, p > 0.05

た。

考 察

老衰したラットの精管の adrenoceptor の反応は幼若ラットのそれより低下しているとの報告がある^{6,10)}。同じ動物の精管でも epididymal portion と prostatic portion ではその反応も異なるので、検索に際し、精管の切除部位は一定にした方がよい。因に精管 distal 部位 (精巣附近の精管) では proximal 部位 (尿道附近の精管) より noradrenergic innervation が低下しているとの報告もある⁵⁾。著者らが行った精管の切除部位はすべて陰のう部であるので distal 精管といえよう。ヒトでは精管の収縮に α_1 -adrenoceptor が関与するとの報告があり⁹⁾、NE が transmitter と考えられている^{4,9)}。このようにヒト精管の NE は精管の運動に重要な役割を果たしていると推測されているが、ヒトにおける精管のカテコールアミン含量については従来、ほとんど報告されていない。本研究により

各年代別の精管の NE 含有量が明らかになった。また加齢とともに精管の NE 含量が減少することも判明した。同様の傾向は精管の non-collagenous protein 含量についても同様であった (Table 1)。血管における non-collagenous protein 代謝は hexamethonium, clonidine など神経系の活性を抑制する薬剤の投与ないし除神経術により減少することが判明している^{13,14,22)}。すなわち精管においても血管と同様、神経支配を受け、若年者では精管に存在する収縮物質も多量に存在するが、老齢になるとその含量も減少することが本研究により明白となった。いずれにせよ、NE 以外に ATP¹⁷⁾、Ca イオン¹⁷⁾、morphine¹¹⁾、 α , β -methylene ATP^{2,5)}、性ホルモン³⁾などが精管運動に影響を与えるとの報告があるが、ヒト精管にも non-collagenous protein が存在し、ほぼ NE と同様の age-dependent change を示したことは興味深い。

collagen 代謝は高血圧動物の大動脈、腸間膜動脈

において亢進していることが知られている¹³⁾。精管の elastin 含量も高齢者では高値であったが (Table 1), 血中の elastin derived peptide も加齢とともに増加すると報告されている。これは elastic structure の degradation を反映するといわれているが、精管の collagen, elastin 含量が増加する理由は、それらのタンパク質代謝が亢進するのか、degradation が低下するのかは不明である。著者らの本研究で得られた成績と、その推測されるメカニズムを Fig.2 に示した。non-adrenergic component が精管運動にいかなるメカニズムで関与するかを検討する必要がある。[本論文の要旨は昭和63年5月19日、第76回日本泌尿器科学会総会 (盛岡) において報告した。]

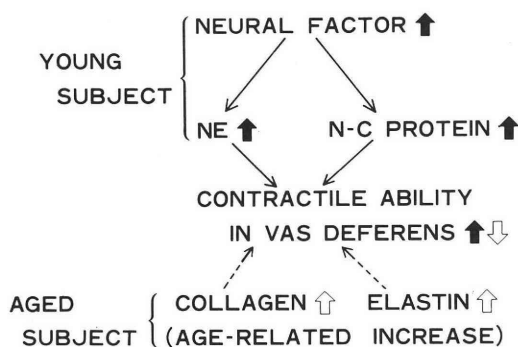


Fig.2 Speculated mechanism of contractile ability of human vas deferens. NE : norepinephrine, N-C protein : non-collagenous protein.

↑ : increase of examined substance probably resulting in increasing contractile ability (↑) of vas deferens in young subject.

⇕ : increase of examined substance probably resulting in reducing contractile capability (⇕) of vas deferens in aged subject.

文 献

- 1) Allcorn, R. J., Cunnane, T. C. and Kirkpatrick, K.: Actions of α , β -methylene ATP and 6-hydroxydopamine on sympathetic neurotransmission in the vas deferens of the guinea-pig, rat and mouse: support for cotransmission. *Br. J. Pharmacol.* 89: 647, 1986
- 2) Amobi, N. and Smith, C. H. I.: Effects of α , β -methylene ATP on biphasic responses of rat vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 133: 75, 1987
- 3) Belis, J. A. and Longhurst, P. A.: Hormonal influence on the neurogenic response of the hamster vas deferens. *J. Urol.* 133: 729, 1985
- 4) Busatto, P. and Jurkiewicz, A.: Simultaneous measurement of contractile effects in the cir-

- lar and longitudinal smooth muscle of the rat vas deferens by drugs perfused externally or via the lumen. *Brit. J. Pharmacol.* 85: 737, 1985
- 5) Dixon, J. S., Gilpin, C. J., Gilpin, S. A., Gosling, J. A. and Grant, J. F. B.: The effects of vasectomy on the autonomic innervation of the human vas deferens. *J. Urol.* 137: 1014, 1987
- 6) Docherty, J. R. and O'Malley, K.: An examination of age-related changes in pre- and post-synaptic α -adrenoceptors in the rat isolated vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 73: 321, 1981
- 7) Fitch, S. M., Harkness, M. L. R. and Harkness, R. D.: Extraction of collagen from tissues. *Nature*, 176: 163, 1955
- 8) Fovaeus, M., Andersson, K.-E. and Hedlund, H.: Calcium channel blockade and contractile responses in the isolated human vas deferens. *J. Urol.* 138: 654, 1987
- 9) Hedlund, H., Anderson, K.-E. and Larsson, B.: Effect of drugs interacting with adrenoceptors and muscarinic receptors in the epididymal and prostatic parts of the isolated human vas deferens. *J. Auton. Pharmacol.* 5: 261, 1985
- 10) Hyland, L. and Docherty, J. M.: Further examination of the effects of aging on the adrenoceptor responsiveness of the rat vas deferens. *Europ. J. Pharmacol.* 110: 241, 1985
- 11) Iizuka, H., Tsuda, T., Shimada, A., Kaneko, T. and Yanagita, T.: Pharmacological characteristics of the contractile response of the vas deferens in shrews (*Suncus murinus*). *Lab. Animal Science*, 36: 701, 1986
- 12) Mc Connell, J., Benson, G. S. and Wood, J. G.: Autonomic innervation of the urogenital system: adrenergic and cholinergic elements. *Brain Res. Bull.* 9: 679, 1982
- 13) Nakada, T.: Enhanced protein synthesis in genetically hypertensive rats: its possible role for causing hypertension. *Internat. Urol. Nephrol.* 17: 71, 1985
- 14) Nakada, T., Kimura, M., Watanabe, H., Yamori, Y. and Lovenberg, W.: Increased non-collagen protein synthesis in the posterior cerebral artery in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension*, 4 (suppl. 3): 93, 1986
- 15) Nakada, T., Koike, H. and Katayama, T.: Participation of central norepinephrine in the development two-kidney, one clip Goldblatt hypertension. *J. Urol.* 135: 1066, 1986
- 16) Nakada, T., Koike, H. and Katayama, T.: Low level of superoxide dismutase activity in pheochromocytoma. *J. Urol.* 138: 9, 1987
- 17) Raviprakash, V., Mishra, S. K. and Panda, J. N.: Effect of verapamil on the non-adrenergic response of the field stimulated rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*

- 331: 347, 1985
- 18) Sneddon, P. and Westfall, D. P.: Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in guinea-pig vas deferens. *J. Physiol. (London)* 347: 561, 1984
 - 19) Skosey, J. L., Zak, R., Martin, A. F., Aschenprenner, V. and Rabinowitz, M.: Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 31: 145, 1972
 - 20) Wagner, J., Vitali, P., Palfreyman, M. G., Zraika, M. and Hust, H.: Simultaneous determination of 3, 4-dihydroxy-3-methoxyphenylamine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylamine, norepinephrine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Neurochemistry*, 38: 1241, 1982
 - 21) Wolinsky, H.: Response of the rat aortic media to hypertension: morphological and chemical studies. *Circ. Res.* 26: 507, 1970
 - 22) Yamori, Y., Nakada, T. and Lovenberg, W.: Effect of antihypertensive therapy on lysine incorporation into vascular protein of the spontaneously hypertensive rat. *Europ. J. Pharmacol.* 38: 349, 1976

**Contents of catecholamine and
connective tissue protein in
vasa deferentia in young
and aged subjects**

Teruhiro Nakada, Jun Shimazaki,
Department of Urology,
Chiba University, School of Medicine,
Chiba, 280 Japan

Isoji Sasagawa, Keiichi Umeda,
Tameyoshi Terada, Hidekatsu Furuta,
and Takashi Katayama
Department of Urology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical & Pharmaceutical University,
Toyama, 390-01 Japan

Contents of norepinephrine, non-collagenous protein, collagen and elastin in vasa deferentia in 18 young subjects and 22 aged patients were determined. The amounts of norepinephrine and non-collagenous protein in vasa deferentia in young subjects were 2.2 fold ($p < 0.001$) and 1.5 fold ($p < 0.001$) greater than those in aged subjects, respectively.

While contents of collagen and elastin in this organ in the former group of subjects were 52.2% ($p < 0.001$) and 54.9% ($p < 0.001$) lower than those of the latter group of patients. Norepinephrine and non-collagenous protein are considered to be nerve transmitters and to possess the contractile ability in some vasculatures. Elevated or reduced amounts of these substances in vasa deferentia in young or aged subjects appears to play an important role in the movement of human vasa deferentia.

(受付: 1988 年 6 月 7 日)

精索静脈瘤患者における睾丸部深部温測定

The Application of Intrascrotal Deep Body Temperature (DBT) Measurement to the Patients with Varicocele

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

山 口 政 俊

Masatoshi YAMAGUCHI

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi 756, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

精索静脈瘤患者において陰囊内温度の上昇が、造精機能障害の一因となりうることは古くから論じられてきた。従来その診断は視・触診により行われており客観性に乏しかった。著者は精索静脈瘤をより客観的に診断するために外来受診時、操作が簡単で非侵襲性である深部温測定をこころみた。

対象は、精索静脈瘤根治術前後の経過観察が可能であった40症例で各Grade別に検討をくわえた。左側睾丸部立位での最高温の検討では各Grade間で温度差が認められ、Gr. IIIで最高値を示した。また体位変換による左側睾丸部の温度変化 (ΔT) では、術前群の平均値が $+1.14^{\circ}\text{C}$ であったのに対して術後群では -0.61°C であった。各Grade間での術前左側睾丸部 ΔT は、Gr. I, $+0.13^{\circ}\text{C}$, Gr. II, $+1.23^{\circ}\text{C}$, Gr. III, $+2.01^{\circ}\text{C}$ と明らかな傾向を示した。以上の結果から睾丸部深部温測定は精索静脈瘤の補助診断法の一つとして有用であると思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 207-213, 1989)

結 言

男子不妊症患者において、精索静脈瘤の存在が造精機能に重大な影響を及ぼしその主要な原因の一つであることは古くから論じられている。Dubin¹⁾は、男子不妊症患者1294例中512例(39%)で精索静脈瘤がその原因であったと報告している。精索静脈瘤における造精機能障害の発生機序に関しては、未だ明らかにされていない部分があり諸説がある。このうち有力とされているものは、内精巣静脈内の血液逆流に起因する陰囊内温度上昇によるという説^{2,3)}と、腎静脈や副腎静脈などカテコールアミンなどの造精機能に対し有害な代謝産物やホルモンを豊富に含んだ血液が内精巣静脈を逆流し、精巣での精子形成に障害をあたえたとする説⁴⁾である。明確な説明がなされていないのになお精索静脈瘤が男子不妊症の原因とされるのは、精索静脈瘤の根治術が精液所見と妊娠率の改善をもたらすとされているためである。諸

家の報告により差はあるが、精索静脈瘤根治術後の妊娠成功率は7~45%⁵⁾とされている。男子不妊症の治療が完全に確立されていない現状では、他の療法に比較して妊娠成功率が高い精索静脈瘤根治術は積極的に行なうべき治療の一つであると考えられる。したがって男子不妊症の診断と治療において、精索静脈瘤の存在の有無を知ることは重要な意味をもつ。この点で精索静脈瘤を正しく診断することが必要かつ重要である。従来、精索静脈瘤の診断は立位にてValsalvaの手法を用い視・触診により行なわれてきたが、日常の診療で軽度の精索静脈瘤を診断することはむずかしく、また客観性にも乏しかった。そこで最近では診断機器の開発により、サーモグラフィ⁶⁾、超音波ドップラー法⁷⁾、超音波検査法⁸⁾、シンチスキャン⁹⁾、深部体温測定など侵襲のすくない検査法が補助診断法として用いられるようになってきた。著者はこのなかでも、不妊外来におけるスクリーニング検査として、外来受診時短時間で、操作が簡単

で、非侵襲性である深部体温測定を試みた。

方 法

1. 対象・分類

対象は、山口大学医学部附属病院泌尿器科不妊外来を受診した精索静脈瘤患者で精索静脈瘤の根治術をおこない術後も経過観察できた 40 症例である。年齢分布は 22 歳～37 歳、平均 30.1 歳であった。この 40 症例をこれまでの報告に従い 3 群に分類した。内訳は、Gr.I (14 例)、Gr.II (11 例)、Gr.III (15 例) である。

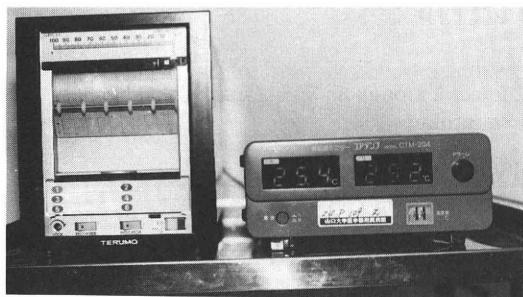


Fig. 1 TERUMO Recorder (TFR-102) and Deep Body Temperature Monitor CORETEMP (CTM-204).

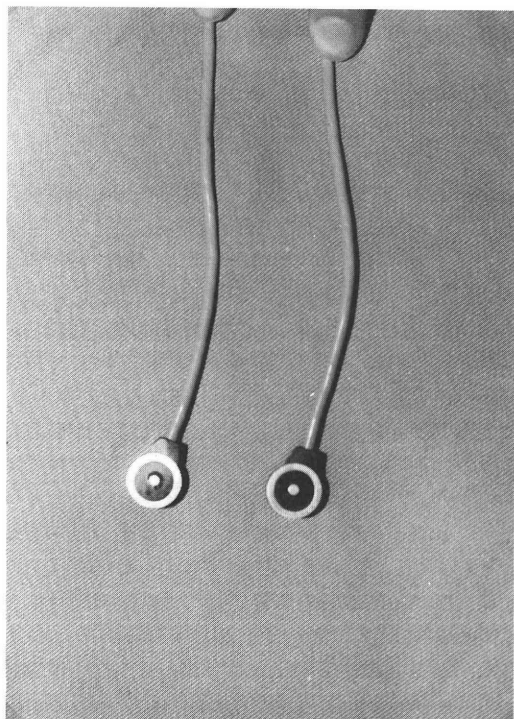


Fig. 2 CORETEMP Probe (PD-7).

2. 使用機器・方法

使用機器は、深部体温測定装置(深部温モニター、コアテンプ CTM-204)、毎分 2 打点の連続打点器 (Fig. 1)、及び熱流補償型プローブ (PD-7) (Fig. 2)、である。

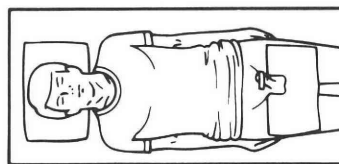
室温 24℃～25℃ で、約 10 分間仰臥位にて断熱材エアークラップを装着の上、下半身を暴露し、両側睾丸部に熱流補償型プローブを装着後連続打点器にて経時的睾丸部深部温を記録した。測定開始後約 10 分で立位とし、仰臥位及び立位時の最高温と立位直後の温度変化を測定した。なお立位後測定温度の上昇を示さないものは、約 7 分後の値を測定した (Fig. 3)。

結 果

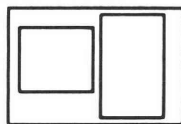
1. 左側睾丸部深部温

精索静脈瘤根治術前の仰臥位及び立位における辜

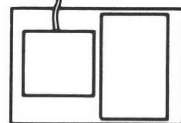
Room temperature (24℃～25℃)



1. at rest for 10 minutes.



2. at the supine position.



3. at the standing position.

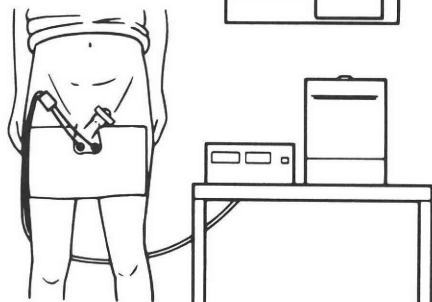


Fig. 3 Procedure of examination.

丸部深部温の最高温と視・触診上の Grade 分類との相関を検討した (Fig. 4). 仰臥位では各 Grade 間に温度差が認められなかったのに対し、立位では Grade が高くなるにつれて測定温度は上昇しており、特に Gr. I と Gr. III との間にも約 1.2℃ の温度差が認められ明らかに相関が認められた。これらの結果から個々の環境温や体温の変化による影響を最小にし、仰臥位から立位への postural change による睾丸温度に対する影響をより明確にするために、立位直前から立位最高温までの温度変化 (ΔT) を検討した (fig. 5). 根治術前では、全症例の ΔT の平均値は +1.14℃ であり全ての Grade でプラスを示し、立位における睾丸部深部温の平均値と同様の傾向を示すが Grade 分類とその相関はより明らかとなっている。また Gr. I と Gr. II との間には約 1.1℃ の温度差が、さらに Gr. II と Gr. III との間には約 0.8℃ の温度差が認められた。一方根治術後では、全症例の ΔT の平均値は -0.61℃

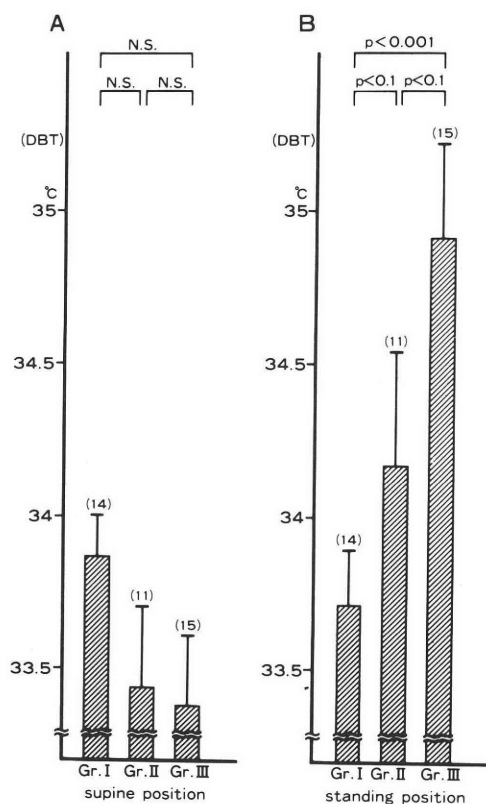


Fig. 4 left DBT of the preoperation group.

- A, supine DBT; The mean DBT among each group is not significant.
 B, standing DBT; The mean DBT of the grade III group is higher than that of the other two groups.

であり、全ての Grade でマイナスを示し各 Grade 間に温度差が認められなくなった。

2. 右側睾丸部深部温

各 Grade 間の仰臥位における右側睾丸部深部温の最高温と視・触診上の Grade 分類との検討 (Fig. 6) では、左側と同様各 Grade 間に温度差が認められなかった。一方立位における検討では、左側睾丸部深部温の最高温が Grade 分類とよく相関したのに対し温度差は認めれず明らかな相関は示さなかった。温度変化 (ΔT) の検討 (Fig. 7) では、根治術前で全症例の ΔT の平均値は -0.06℃ であり、また Grade 別の検討では Gr. I 及び Gr. II でマイナスを示したのに対し、Gr. III でのみプラスを示し、これらの間には約 0.6℃ の温度差が認められた。一方根治術後での全症例の ΔT の平均値は -0.47℃ であり、また Grade 別の検討では左側と同様いずれもマイナスを示し各 Grade 間に温度差は認められなかった。

3. Gr. I 群における根治術前後の ΔT

根治術前後における左側睾丸部 ΔT の平均値の検討 (Fig. 8, A) では、温度差は約 0.7℃ であり、術後

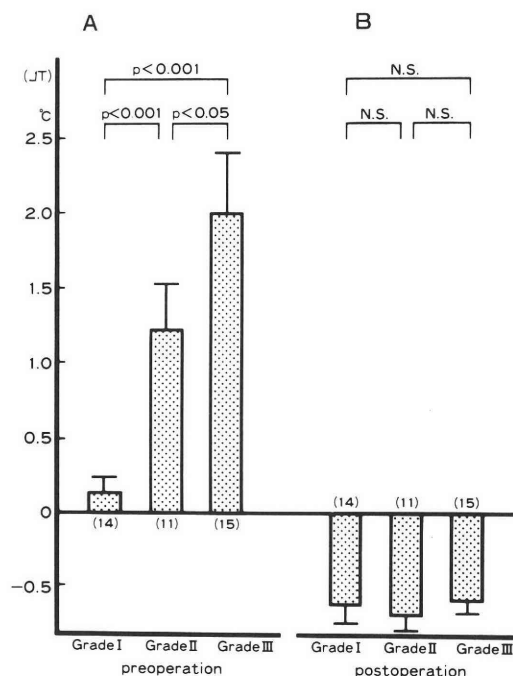


Fig. 5 ΔT of the left side.

- A, ΔT of the preoperation group; Its difference is more remarkable than the left standing DBT.
 B, ΔT of the postoperation group; The mean ΔT among each group is not significant.

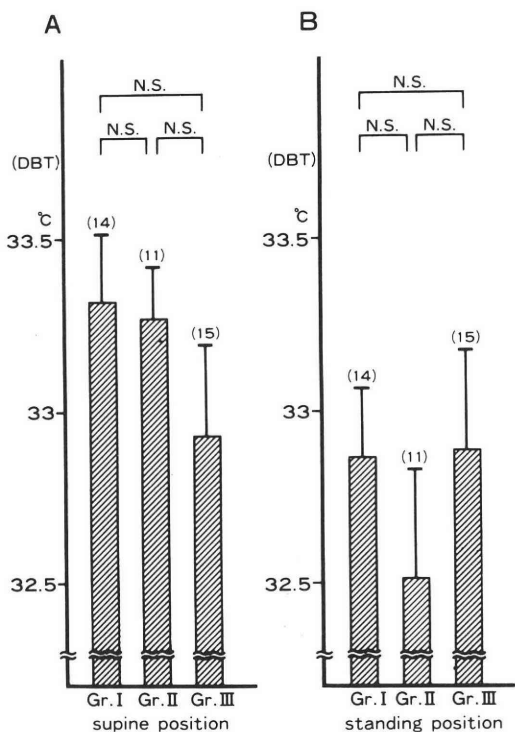


Fig. 6 right DBT of the preoperation group.

A, supine DBT; The mean DBT among each group is not significant.

B, standing DBT; The mean DBT among each group is not significant.

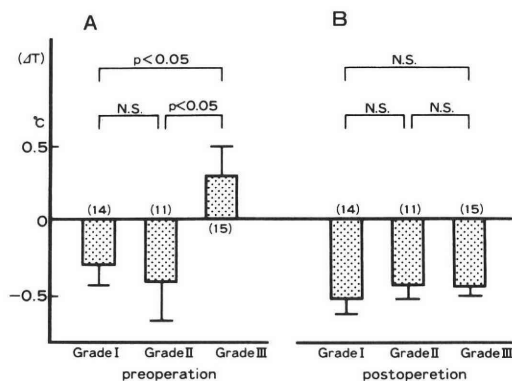
ΔT は陰転化を示した。また根治術後1例を除く全例で ΔT の下降を呈し、術後なお ΔT がプラスを示したのは1例のみであった。右側睾丸部 ΔT の平均値の検討 (Fig. 8, B) では、温度差は認められず、根治術後の ΔT の変化に一定の傾向を示さなかった。

4. Gr. II群における根治術前後の ΔT

根治術前後における左側睾丸部 ΔT の平均値の検討 (Fig. 9, A) では、温度差は約1.9°Cであり、術後 ΔT は陰転化を示した。また根治術後全例で ΔT の下降を呈し、 ΔT がプラスを示すものはなかった。右側睾丸部 ΔT の平均値の検討 (Fig. 9, B) では、Gr. Iと同様根治術前後に温度差は認められず、根治術前後の ΔT の変化にも一定の傾向を示さなかった。

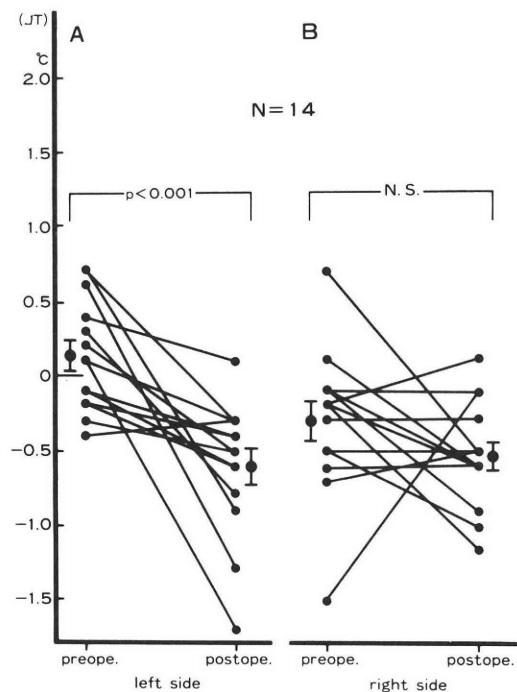
5. Gr. III群における根治術前後の ΔT

根治術前後における左側睾丸部 ΔT の平均値の検討 (Fig. 10, A) では、温度差が認めれ術後 ΔT は陰転化を示すなど他の二群と同様であったが、約2.6°Cとより大きな値を呈した。また ΔT は全例で術前はプラスを示したのに対し術後はマイナスを示した。

Fig. 7 ΔT of the right side.

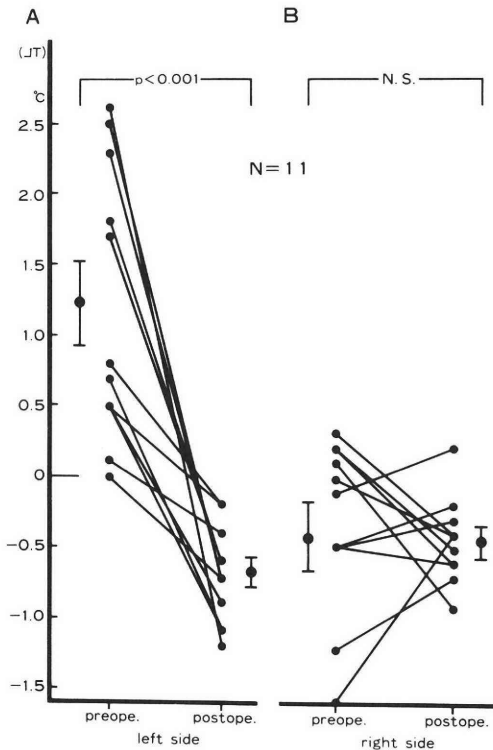
A, ΔT of the preoperation group; The mean ΔT is +0.29°C in the grade III group, whereas it is around -0.4°C in the other two groups.

B, ΔT of the postoperation group; The mean ΔT among each group is not significant.

Fig. 8 ΔT of the grade I group.

A, ΔT of the left side; The mean ΔT is +0.13°C in the preoperation group, whereas it is -0.61°C in the postoperation group.

B, ΔT of the right side; The mean ΔT between preoperation and postoperation group is not significant.

Fig. 9 ΔT of the grade II group.

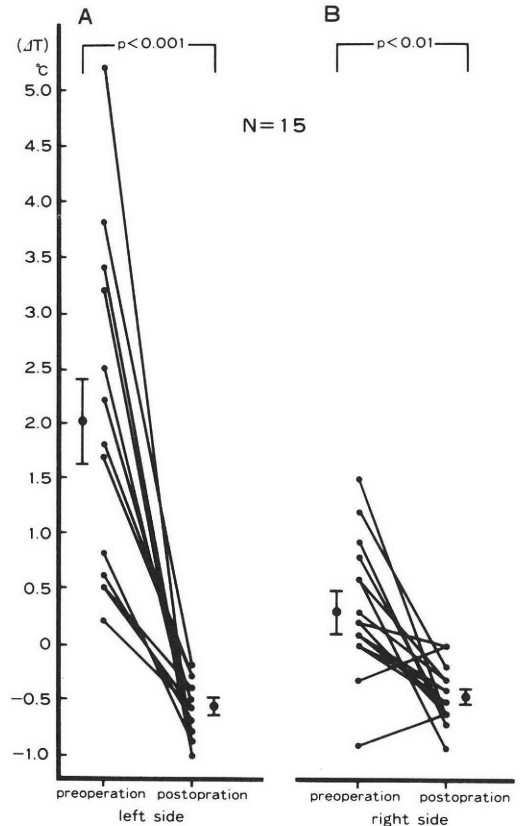
A, ΔT of the left side; The mean ΔT is $+1.23^{\circ}\text{C}$ in the preoperation group, whereas it is -0.66°C in the postoperation group.

B, ΔT of the right side; The mean ΔT between preoperation and postoperation group is not significant.

右側睾丸部丸部 ΔT の平均値の検討 (Fig. 10, B) では、他の二群とは異なり術前はプラスを示したのに対し術後はマイナスを示し温度差が認められ約 0.7°C であった。また根治術後 2 例でのみ ΔT の上昇を呈したがプラスを示すものはなかった。

考 察

深部体温測定法は Fox ら¹⁰⁾により開発され、戸川ら¹¹⁾によって改良されたものである。通常体表の温度は、外気温の影響を受けて深部の温度より低くなる。しかし体表を断熱材で覆って外気温の影響を防ぐと、体表は深部と等しい温度になることが知られており、本検査法はこの原理を応用したものである。プローブ装着部皮膚表面温度が上昇すると比較増幅器を通してプローブ内のヒーターにフィードバックがかかり、外壁のアルミニウムブロックが、プローブ装着部皮膚表面温度と等しくなるように制

Fig. 10 ΔT of the grade III group.

A, ΔT of the left side; The mean ΔT is $+2.01^{\circ}\text{C}$ in the preoperation group, whereas it is -0.57°C in the postoperation group.

B, ΔT of the right side; The mean ΔT is $+0.29^{\circ}\text{C}$ in the preoperation group, whereas it is -0.44°C in the postoperation group.

御される(熱流補償)。その結果、プローブ中央付近では皮膚からの熱放散がほとんどなくなり、皮膚表面温度と熱源のある深部温度とが等しい温度で平衡を保つことにより深部温度を測定することができる。このため各分野において深部体温測定の有用性が評価され、皮膚科疾患や血管病変および神経障害に基づく末梢血行障害などの診断・経過観察など、幅広く実際に臨床に応用されている。泌尿器科領域においても、臨床上触診や病歴のみでは診断困難な陰嚢内疾患に対し、客観的診断法の一つとして期待され、なかでも血管病変である精索静脈瘤の診断には特に有用であると思われ、今回の検討をくわえた、つまり精索静脈瘤の診断とも関連する陰嚢および陰嚢内の温度調節機構の問題とのつながりである。睾丸および陰嚢内温度は体腔内温度より $2^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 低いと

されているが、この温度調節機構として陰囊自体や精索血管系の役割が重要視される。温度調節機構に障害があったり、また睾丸が高温環境下にあると造精機能に障害がみられることは、動物実験などですでに証明されている¹²⁾。このように睾丸の造精機能に対する温度の影響を無視することはできず睾丸部の温度測定は不可欠となった。そこで Aggeer ら¹³⁾は、精索静脈瘤根治術前後の精液所見と睾丸温度を測定し、精索静脈瘤患者の睾丸温は術前群では左側が右側に比べ 0.1°C 高く、術後群では逆に 0.2°C 低くなったとし、温度低下が著名なほど精液所見が改善されると報告しており“some effect of temperature rise cannot be excluded”と結論付けている。しかし、従来睾丸温度の測定は麻酔時針状プローブにより、睾丸周囲かあるいは直接睾丸を穿刺することにより行われてきた。このためこの方法では測定条件などに難点があり、特に術後の観察には不適當であった。Zorgniotti ら²⁾は、測定方法に工夫をこらすことにより、これらの問題を解決しようと試みた。そして 1973 年精索静脈瘤患者の両側睾丸温は、コントロール群に比べ高く、温度が高いほど睾丸容積も小さいとし、立位と仰臥位との温度差の検討ではコントロール群で立位において 0.6°C 睾丸温が低下するのに対し、精索静脈瘤患者では温度低下が少なく、左右の温度差は立位の方が大きかったと報告している¹⁴⁾。今回の著者の結果でも、根治術前における左側睾丸深部温は高温を示し立位でその傾向はより顕著となった。また立位直後の温度変化 (ΔT) でも、根治術前の左側でのみプラスを示した。これらは本検査法が精索静脈瘤の存在診断に有用であることを示唆している。Comhaire ら³⁾は、サーモグラフィーで Grade 別の温度の比較検討を行ない、subclinical なものや Gr. I と Gr. II・III との間には相関があると報告している。著者の Grade 別の ΔT の検討でも Grade とよく相関を示し、本検査法は Grade 別の診断にも有用であることが示された。また根治術前の右側睾丸部 ΔT が Gr. III でのみプラスを示したのに対し、Gr. II ではマイナスを示したことは、左側の高度の精索静脈瘤による温度上昇が右側へ影響をおよぼしている可能性を示唆している。さらに精索静脈瘤根治術後、全ての Grade で ΔT がマイナスを示し Grade 別の温度差がなくなったことは、精索静脈瘤患者では根治術により睾丸の環境温が改善されたことを示している。これらの結果から深部体温測定装置による睾丸部深部温測定では、従来の麻酔下侵襲性睾丸温測定と異なり、非侵襲性に、外来受診時短時間に、簡単に睾丸部温を知ることができるため、男子不妊外来にお

いて、精索静脈瘤の存在診断のスクリーニング法として有用であることが示された。

以上睾丸部深部温測定の有用性をのべてきたが次に挙げるような問題も残されている。睾丸部温の測定時には、特に仰臥位においてその後方に大腿の高温帯があるため、その影響を排除しなければならない。我々は断熱材エアークラップを陰囊と大腿との間に装着することにより、大腿部温の遮断に成功した。サーモグラフィーにおいて、板状断熱材によりこれを遮断するとの報告もある¹⁵⁾が、体位変換を必要とする本法では適当ではない。また陰囊部に炎症性疾患がある場合や、陰囊が未発育かあるいは皮膚が硬化しているため睾丸の位置が高く軀幹に近い場合には、高温を示すのでこれらは除外せねばならない。また陰毛が濃密な場合には、プローブが適切な位置に装着されにくく低温を示すことがあるため注意を要する。

このように臨床に応用する上で、注意を必要とする部分はあるが、睾丸部深部温測定が精索静脈瘤の存在診断・Grade 別診断に有用であり、術後の経過観察にも有用であることを述べてきた。今後は精索静脈瘤患者における術前・術後の睾丸深部温の変化と精液所見の変化などについて検討を行ない、陰囊内の温度変化と造精機能との関係についての問題、さらに精索静脈瘤と男子不妊症との関係などについて研究が進められなければならない。

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師酒徳治三郎教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、本研究に直接御指導御鞭撻を頂きました瀧原博史講師に深く感謝致します。また、基礎生理体温について御指導頂きました山口大学医学部第二生理学村山恵教授に深謝致します。

文 献

- 1) Dubin, L. and Amelar, R. D.: Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility, *Fertil. Steril.* 22: 469-474, 1971
- 2) Zorgniotti, A. W. and MacLeod, J.: Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil. Steril.* 24: 854-863, 1973
- 3) Comhaire, F., Monteyne R. and Kunnen, M.: The value of scrotal thermography as compared with selective retrograde venography of the internal spermatic vein for the diagnosis of “subclinical” varicocele. *Fertil. Steril.* 27: 694-698, 1976
- 4) Comhaire, F. and Vermeulen, A.: Varicocele sterility: Cortisol and catecholamines. *Fertil. Steril.* 25: 88-95, 1974

- 5) Vermeulen, A. and Vandeweghe, M.: Improved fertility after varicocele correction: fact or fiction? *Fertil. Steril.* 42: 249-256, 1984
- 6) Monteyne R. and Comhaire, F.: The Thermographic Characteristics of Varicocele: an Analysis of 65 Positive Registrations. *Brit. J. Urol.* 50: 118-120, 1978
- 7) Hirsh, A. V., Kellett, M. J., Robertson, G. and Pryor, J. P.: Doppler Flow Studies, Venography and Thermography in the Evaluation of varicoceles of Fertile and Subfertile Men. *Brit. J. Urol.* 52: 560-565, 1980
- 8) McClure, R. D. and Hricak, H.: Scrotal ultrasound in the infertile man: Detection of subclinical unilateral and bilateral varicoceles. *J. Urol.* 135: 711-715, 1986
- 9) Comhaire, F., Vandeweghe, M. and Simons, M.: Comparison between thermography and venous scintigraphy in the Evaluation of varicocele. *Inter J. Andrology*, 4: 663-668, 1981
- 10) Fox, R. H. and Solman, A. J.: A new technique for monitoring the deep body temperature in man from the intact skin surface. *J. Physiol.* 212: 8-10, 1970
- 11) 戸川達男, 根本 鉄: 熱流補償法を利用した生体温度計測装置, 医器材研報(東京医歯大), 7 : 75-83, 1973
- 12) Steinberger, E. and Dixon, W. J.: Some Observations on the Effect of Heat of the Testicular Germinal Epithelium. *Fertil. Steril.* 10: 578-595, 1959
- 13) Agger, P.: Scrotal and testicular temperature: Its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil. Steril.* 22: 5, 286-297, 1971
- 14) Zorgniotti, A. W., Toth, A. and Macleod, J.: Infrared thermometry for testicular temperature determinations. *Fertil. Steril.* 32: 3, 347-348, 1979
- 15) Gold, R. H., Ehrlich, R. M., Samuels, B., Dowdy, A., and Young, R. T.: Scrotal thermography. *Radiology*, 122: 129-132, 1977

The application of intrascrotal deep body temperature (DBT) measurement to the patients with varicocele.

Masatoshi Yamaguchi

Department of Urology, Yamaguchi
University School of Medicine,
Yamaguchi 756, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

Traditionally, varicoceles have been diagnosed by inspection and palpation; however, physical examination alone provides only limited accuracy.

The intrascrotal deep body (intratesticular) temperature measurement was utilized in order to make the diagnosis of varicoceles more objective, because this method is portable, simple and non-invasive. Forty patients with varicocele examined before and after varicocelectomy were classified into three groups by their grade; Gr. I group consists of 14 patients, Gr. II group consists of 11 patients and Gr. III group consists of 15 patients. The bilateral intrascrotal temperatures were monitored at the supine position and continuously at the standing position.

The maximum temperatures at both positions were compared before and after varicocelectomy. The mean temperature of the varicocele group was higher than that of the post-varicocelectomy group at the standing position. Was studied The difference in temperature (ΔT) due to postural change from supine to standing. The mean ΔT of the left testes was $+1.14^{\circ}\text{C}$ in the varicocele group, whereas it was around -0.61°C in the post-varicocelectomy group. There was a difference in the left ΔT in the proportion to each grade.

It was concluded that DBT gives a practical index of the intrascrotal temperature and is useful as an objective method for clinical evaluation of patients with varicocele, for the postoperative management as well as the diagnosis.

(受付: 1988 年 6 月 23 日)

男子不妊症症例の Sertoli 細胞機能に関する研究 —精漿中 transferrin および精漿中 inhibin 活性に関する検討—

Study of Sertoli Cell Functions in Male Infertility —Relationship between Seminal Plasma Transferrin and Seminal Plasma Inhibin Activity—

札幌医科大学泌尿器科学教室 (主任: 熊本悦明教授)

高 木 良 雄 熊 本 悦 明
Yoshio TAKAGI Yoshiaki KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical College,
Hokkaido 060, Japan (Director: Prof. Y. Kumamoto)

札幌医科大学解剖学教室 (主任: 高橋杏三教授)

渡 辺 勇 一
Yuichi G. WATANABE

Department of Anatomy, Sapporo Medical College,
(Director: Prof. K. Takahashi)

男子不妊症症例の精漿中 transferrin を RIA により, また精漿中 inhibin 活性を rat 下垂体器官培養による生物学的方法で測定し, 精子発生機能障害時の Sertoli 細胞機能について検討した。精漿中 transferrin は, normospermia (精子数 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上, N 群) で $39.5 \pm 3.1 \mu\text{g}/\text{ml}$, subnormal sperm count 群 (精子数 $20 \leq < 40 \times 10^6/\text{ml}$, SN 群) で 27.1 ± 2.3 , oligozoospermia (精子数 $< 20 \times 10^6/\text{ml}$, O 群) で 24.8 ± 2.3 , azoospermia (A 群) で 17.2 ± 2.1 であった (mean $\pm$ S.E.)。精漿中 inhibin 活性 (FSH 分泌抑制率) はそれぞれ N 群 $34.5 \pm 2.7\%$, SN 群 26.1 ± 4.6 , O 群 26.0 ± 2.8 , A 群 16.3 ± 2.7 であった。精漿中 transferrin と germinal cell index との間 ($r=0.79$, $p<0.05$) および精漿中 inhibin 活性と germinal cell index との間 ($r=0.46$, $p<0.05$) には正の相関傾向が認められた。精漿中 transferrin および精漿中 inhibin 活性は, 精子発生能障害の程度を知る指標として有用であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 214-224, 1989)

緒 言

近年精子発生能障害を Sertoli 細胞の機能面から検討する試みが行われてきている。Sertoli 細胞機能を反映するマーカーとしては ABP, inhibin, transferrin など多くの物質の報告があり¹⁾, 既に一部では男子不妊症などでも検討されている。著者らも男子不

妊症症例の精漿中 inhibin 活性を測定し, 精子発生能障害が高度なほど精漿中 inhibin 活性が低下することを報告した²⁾。しかし精漿中 inhibin 活性物質 (FSH 分泌抑制物質) には前立腺あるいは精囊腺由来のものも含まれていることがあきらかとなり, 精漿中 inhibin 活性が必ずしも Sertoli 細胞機能を反映していない可能性が示唆されている。一方精漿中 transfer-

rin はそのほとんどが精巢由来であり、Sertoli 細胞の機能を良く反映していると考えられている³⁾。

男子不妊症の原因が未だ明らかにされていない現状では不妊症の精子発生能障害の病態を Sertoli 細胞の機能面から検討することは有用と思われる。そこで今回著者らは、男子不妊症症例の精漿中 transferrin と精漿中 inhibin 活性を同時に測定し、これらのマーカーと従来から精子発生能障害の指標として用いられてきた精子数、睾丸の精細管組織所見、精子発生能に関連する各種血中ホルモン、精子形成時の段階で精細胞から分泌され则认为られている精漿中 hCG- β と比較した。そしてこれらマーカーの有用性ならびに精子発生能障害における Sertoli 細胞機能の変化について検討したので報告する。

対象および方法

1. 男子不妊症症例

札幌医大泌尿器科不妊外来を受診した男子不妊症症例 142 例を対象とした。内訳は azoospermia 32 例, oligozoospermia ($<20 \times 10^6/\text{ml}$) 41 例, subnormal sperm count 群 ($20 < <40 \times 10^6/\text{ml}$) 21 例, normal sperm count 群 ($\geq 40 \times 10^6/\text{ml}$) 48 例であった。

2. 精液の採取

4～5 日以上禁欲期間をおいた後、用手法で射精させ精液を採取した。精液は液化後精液量、精子数などを測定した。その後精液は $2000 \times g$ 30 分間遠沈を行ない、上清を採取して精漿とし測定まで凍結保存した。

3. 精漿中 transferrin の測定

精漿中 transferrin の測定は、RIA 2 抗体法で行なった。標準品としては、human transferrin (Sigma 製) を使用した。radio-isotope 標識 transferrin は、¹²⁵I transferrin (Amarsham 製) を使用し、抗体は抗ヒト-transferrin sheep 血清 (Amarsham 製)、抗 sheep IgG donkey 血清 (Amarsham 製) を使用した。測定範囲は 5～1000ng/ml、精度は intra-assay で 6.3～7.1%、inter-assay で 0.7～9.4% であった。また精漿の希釈試験の結果では、200～800 倍の希釈の間で良好な希釈定量性を示したので、以後の精漿の測定は、200 倍希釈で行った。

4. 精漿中 inhibin 活性の測定

精漿中 inhibin 活性の測定は、既に報告した方法で行なった²⁾。すなわち 22～24 日齢雄 rat の下垂体を摘出後正中断し、一方の下垂体を control に、他方には charcoal で処理して steroid hormone を除去した精漿 150 μ l を添加し、1 時間 incubation を行なった。その後 LH-RH 10ng を培養液に添加し、さらに 4 時間

incubation を継続した。incubation 終了後培養液の FSH を測定した。培養液中の FSH の測定は、NIAMDD-pituitary agency より提供された rat FSH RIA kit を使用し、radioimmunoassay で測定した。標準品は FSH-RP-1 を用いた。inhibin 活性は、精漿添加群と非添加群の FSH の比であらわした。なお測定に関する基礎的な検討については既に報告した²⁾。

5. 精漿中 hCG- β の測定

精漿中 hCG- β の測定は、CIS 製 hCG- β kit を用いて、RIA 2 抗体法で測定した。なお測定に関する基礎的な検討は、当教室の斎藤⁴⁾が既に報告している。

6. 血清 LH, FSH, testosterone の測定

不妊症症例の血清 LH, FSH, testosterone の測定は、各々 LH キット「第一」(第一ラジオアイソトープ)、FSH キット「第一」(第一ラジオアイソトープ)、Testosterone test set (Wien) を用いて測定した。

7. 睾丸組織所見

睾丸生検により採取した睾丸組織は Bouin 液で固定後、hematoxylin-eosin 染色を行なった。精細管の組織所見の評価は、Johnsen の mean score および Germianl cell index により行なった。Johnsen score⁵⁾ は、精細管内の精細胞の成熟度によって 10 段階に分類 score 化し、約 20 精細管の平均値を求めたものである。また Germinal cell index は当教室の加藤⁶⁾、寺田⁷⁾が報告した方法であり、精細管内の Sertoli 細胞と精細胞数を各々算出して比をとり、Sertoli 細胞あたりの精細胞数を germianl cell index としたものである。

結 果

1. 精漿中 transferrin と精子発生能に関する他の parameter との関連性

精漿中 transferrin は、男子不妊症症例中 89 例、精管結紮術後症例 5 例について測定した。精漿中 transferrin と他の各種 parameter との関連性について検討した結果を以下に示した。

①精漿中 transferrin と精子数との関連性

図 1 に示したように、精漿中 transferrin は normal sperm count 群では $39.5 \pm 3.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (mean $\pm$ S.E.), subnormal sperm count 群では $27.1 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{ml}$, oligozoospermia 群では $24.8 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{ml}$, azoospermia 群では $17.2 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と精子数が減少するにつれて、精漿 transferrin も減少する傾向が認められた。また、精管結紮術後症例では、 $11.8 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ と低値を示した。

②精漿中 transferrin と血中 FSH, LH, testosterone との関連性

②- 1. 精漿中 transferrin と血中 FSH

精漿中 transferrin と血中 FSH との間には有意な負の相関傾向が認められた ($R = -0.45$, $P < 0.01$) (図 2).

②- 2. 精漿中 transferrin と血中 LH

精漿中 transferrin と血中 LH の間には負の相関傾向が認められた. ($r = -0.35$, $p < 0.01$) (図 3).

②- 3. 精漿中 transferrin と血中 testosterone

精漿中 transferrin と血中 testosterone の間には有意な相関傾向は認められなかった ($r = 0.14$, n.s.) (図 4).

③精漿中 transferrin と精細管組織所見との関連性

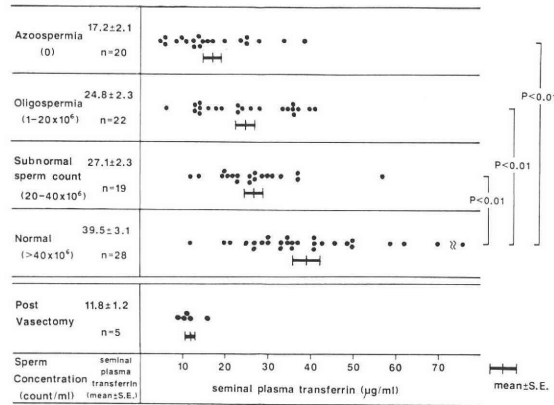


図 1 Relationship between seminal plasma transferrin and sperm concentration

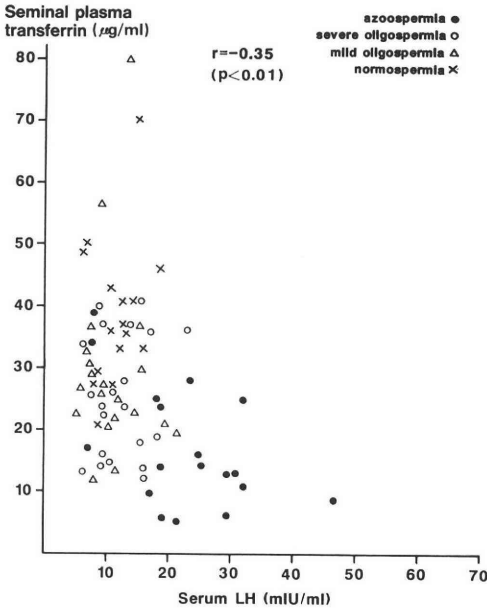


図 3 Serum LH and seminal plasma transferrin —Their correlation—

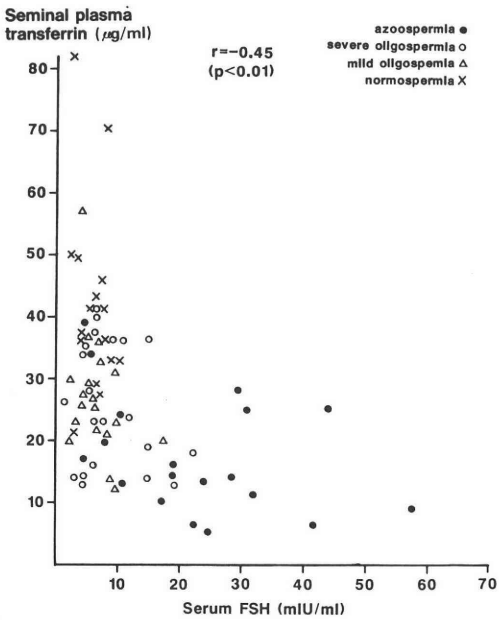


図 2 Serum FSH and seminal plasma transferrin —Their correlation—

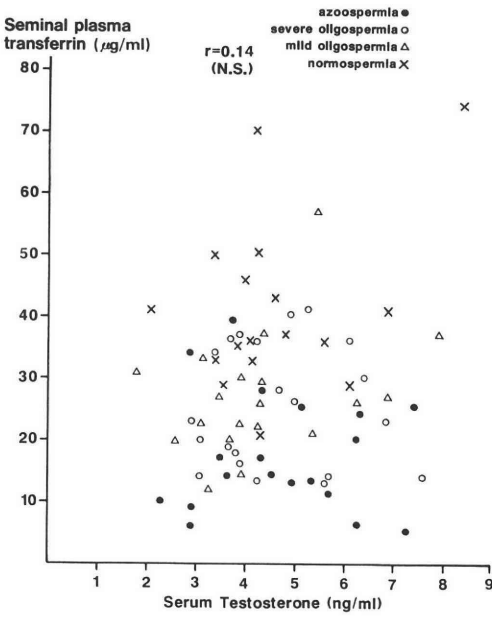


図 4 Serum testosterone and seminal plasma transferrin —Their correlation—

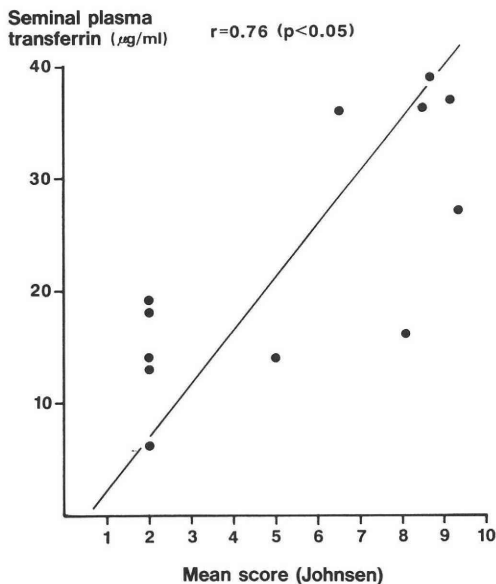


図5 Mean score (Johnsen) and seminal plasma transferrin

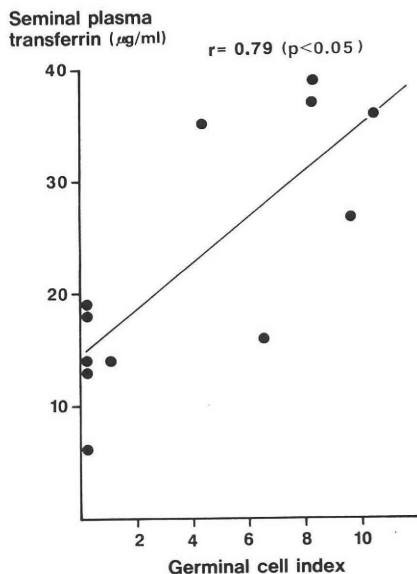


図6 Germinal cell index and seminal plasma transferrin

精漿中 transferrin を測定した症例のうち、睾丸生検を施行したのは12例であった。以下に精漿中 transferrin と Johnsen score および germinal cell index との関連性について検討した結果を示した。

③-1. 精漿中 transferrin と Johnsen score との関連性

図5に示したが、精細管の組織障害度がつよい Joh-

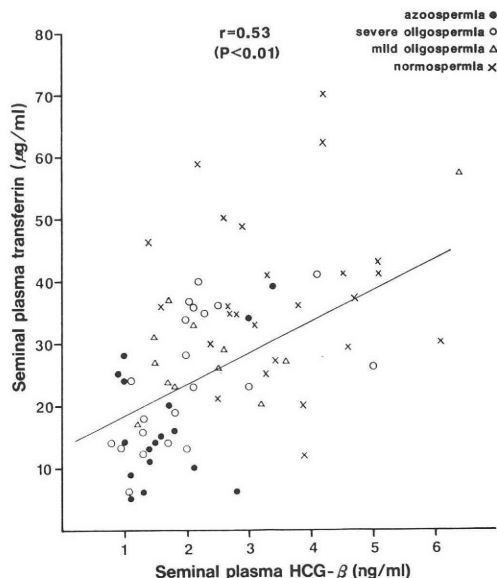


図7 Seminal plasma transferrin and seminal plasma hCG-β
—Their correlation—

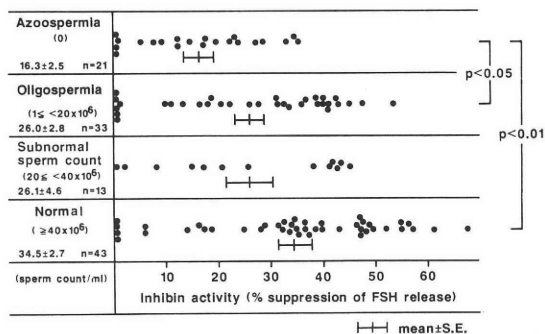


図8 Relationship between seminal plasma inhibin activity and sperm concentration

nsen の mean score が2 および5 の6例では精漿中 transferrin は全例20μg/ml以下を示した。一方 mean score が6以上の6例中5例(83%)では、精漿中 transferrin は20μg/ml以上を示した。また mean score と精漿中 transferrin の間には有意な相関傾向が認められた($r=0.76$, $p<0.05$)。

③-2. 精漿中 transferrin と germinal cell index との関連性

精漿中 transferrin と germinal cell index とのあいだにも有意な正の相関傾向が認められた($r=0.79$, $p<0.05$) (図6)。

④精漿中 transferrin と精漿中 hCG-β との関連性

精漿中 transferrin と精漿中 hCG-β を同時に測定したのは75例であった。これら症例における精漿中 transferrin と精漿中 hCG-β との間には有意な相関傾

向が認められた ($r=0.53$, $p<0.01$) (図7).

2. 精漿中 inhibin 活性と精子発生能に関する他の parameter との関連性

対象症例のうち 110 例に精漿中 inhibin 活性を測定し、他の各 parameter との関連性について検討した結果を以下に示した.

①精漿中 inhibin 活性と精子数との関連性

図8に示したが、normal sperm count 群では、FSH 分泌抑制率 (精漿中 inhibin 活性) は $34.5 \pm 2.7\%$ (mean $\pm$ S.E.), subnormal sperm count 群では $26.1 \pm 4.6\%$, oligozoospermia では $26.0 \pm 2.8\%$, azoospermia では $16.3 \pm 2.5\%$ と精子数が減少するにつれて inhibin 活性が低下する傾向が認められた.

②精漿中 inhibin 活性と血中 FSH, LH, testosterone との関連性

②-1. 精漿中 inhibin 活性と血中 FSH

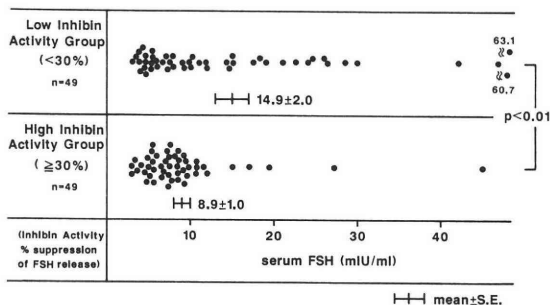


図9 Relationship between serum FSH and seminal plasma inhibin activity

精漿中 inhibin 活性と血中 FSH との間には有意な相関傾向は認められなかった ($r=0.19$, n.s.). しかしながら図9に示したように、不妊症症例を精漿中 inhibin 活性が 30%以上の高 inhibin 活性群と 30%未満の低 inhibin 活性群の2群に分けて両者の血中 FSH を比較すると、低 inhibin 活性群では血中 FSH は 15.8 ± 1.7 mIU/ml (mean $\pm$ S.E.) で、血中 FSH が 8.9 ± 1.0 mIU/ml の高 inhibin 活性群と比較して明らかな高値を示した.

②-2. 精漿中 inhibin 活性と血中 LH

精漿中 inhibin 活性が 30%以下の低 inhibin 活性群では血中 LH は 15.8 ± 1.7 mIU/ml (mean $\pm$ S.E.), 精漿中 inhibin 活性が 30%以上の高 inhibin 活性群では 12.8 ± 1.3 mIU/ml であったが、両群間に有意な差は認められなかった.

②-3. 精漿中 inhibin 活性と血中 testosterone

血中 testosterone は低 inhibin 活性群では 0.46 ± 0.02 ng/ml, 高 inhibin 活性群では 0.48 ± 0.02 ng/ml で、両群間に有意な差は認められなかった.

③精漿中 inhibin 活性と精細管組織所見との関連性

精漿中 inhibin 活性を測定した症例のうち、睾丸生検を施行したのは 22 例であった。これらの精漿中 inhibin 活性と Johnsen score および germinal cell index との関連性について検討した結果を以下に示した.

③-1. 精漿中 inhibin 活性と Johnsen score との関連性

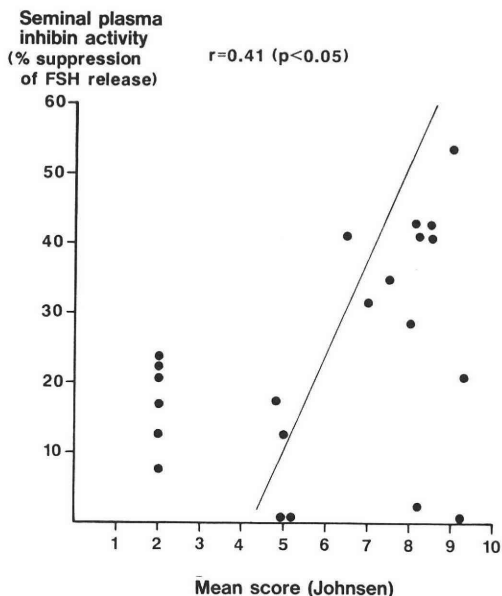


図10 Mean score (Johnsen) and seminal plasma inhibin activity

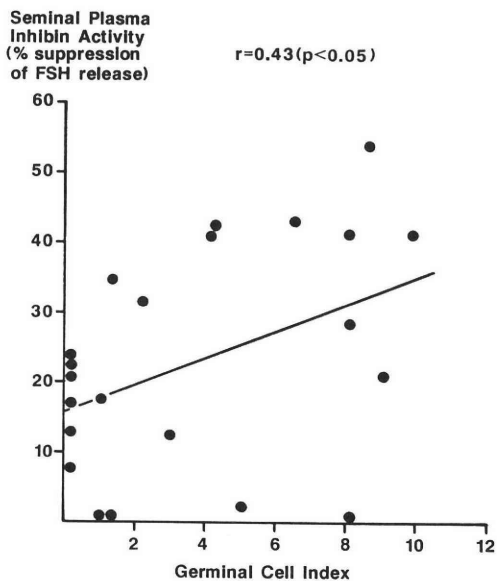


図11 Germinal cell index and seminal plasma inhibin activity

図 10 に示したが, Johnsen の mean score が 2 すなわち Sertoli cell only tubules である 6 例および mean score が 5 すなわち (primary) spermatocytes までの出現しかない 4 例では全例精漿中 inhibin 活性は 25 % 以下を示した。一方 spermatids 以降の精細胞が出現する mean score が 6 以上の 12 例中 9 例 (75 %) では精漿中 inhibin 活性は, 25 % 以上を示した。

③-2. 精漿中 inhibin 活性と germinal cell index との関連性

精漿中 inhibin 活性と germinal cell index との間には有意な正の相関傾向が認められた ($r=0.43$, $p<0.05$) (図 11)。

④精漿中 inhibin 活性と精漿中 hCG- β との関連性

精漿中 inhibin 活性と精漿中 hCG- β を同時に測定したのは 57 例であった。これらの症例における精漿中 inhibin 活性と精漿中 hCG- β との間には正の相関傾向が認められた ($r=0.44$, $p<0.01$) (図 12)。

3. 精漿中 transferrin と精漿中 inhibin 活性との関連性

精漿中 inhibin 活性と精漿中 transferrin を同時に測定したのは 75 例であった。これらの症例における

精漿中 inhibin 活性と精漿中 transferrin との間には正の相関傾向が認められた ($r=0.46$, $p<0.01$) (図 13)。

考 察

1. 精漿中 transferrin

transferrin は, 鉄結合性蛋白質で, 血中では約 300mg/ml と高濃度に存在している⁸⁾。Skinner らは⁹⁾ Sertoli 細胞培養を行ない, Sertoli 細胞で transferrin が産生されていることを明らかにしている。今回の著者らの検討でも正常精子数の精漿中 transferrin は平均 39.5 μ g/ml であるのに対し, 青管結紮をした症例では平均 11.8 μ g/ml と著明に低下し, 精漿中 transferrin の約 70 % は精巣由来であると考えられた。

精巣性 transferrin の性質については, Skinner ら⁹⁾ が rat の Sertoli 細胞培養により検討し, Sertoli 細胞で産生された精巣性 transferrin は, 免疫学および電気泳動上, 血中の transferrin と同様のパターンを示すと報告している。しかしながら Wilson と Griswold¹⁰⁾によると, 精巣性 transferrin は糖鎖に fucose を含み, 糖鎖に fucose を含まない血中 transferrin とは必ずしも同一のものではないことが示唆さ

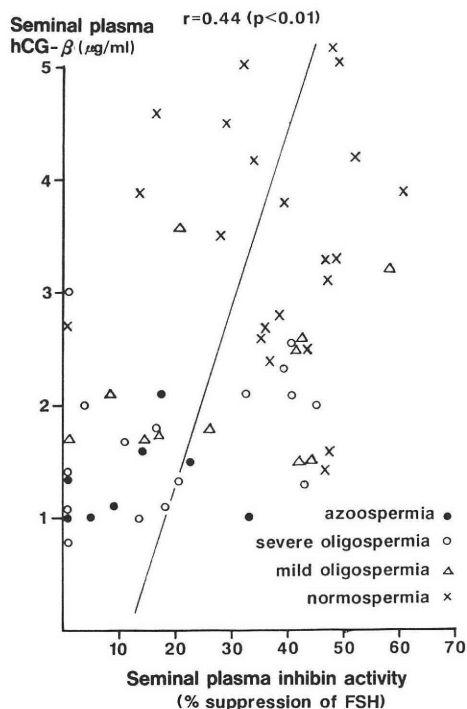


図12 Seminal plasma inhibin activity and seminal plasma hCG- β
—Their correlation—

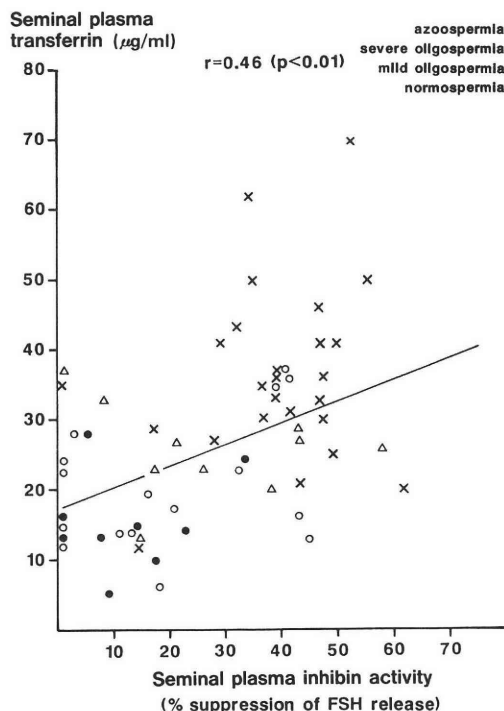


図13 Seminal plasma inhibin activity and transferrin
—Their correlation—

れている。

精巢性 transferrin は、rat の Sertoli 細胞の実験から AMP, androgen, retinol, insulin などに刺激されて分泌が亢進する¹¹⁻¹³。また Holmes ら¹⁴はヒト Sertoli 細胞単独の培養に比べて Sertoli 細胞と精細管周囲細胞を同時に培養したほうが transferrin の産生が上昇することより、精細管周囲細胞から transferrin の分泌を刺激するなんらかの物質が産生されていると示唆している。一方精子発生能と鉄の関連性について検討した報告として石川ら¹⁵が、精液中の微量元素の測定を行ない、鉄の含有量と精子濃度との間に相関傾向が認められると報告している。また Morisawa ら¹⁶は精子の中間部で cytochrome C 酸化酵素活性が高く、同様に鉄の含有量も多いと報告している。この様な結果から精巢性 transferrin は精細胞に必要な鉄を運搬する機能をもっており、これによって精子発生能に関与していると考えられる¹²。

しかし臨床的な問題として、ヒトの精子発生能障害例における精漿中 transferrin を検討した報告は少ない。Holmes ら³は radioimmunoassay により、また Caldini ら¹⁷は ELISA により男子不妊症症例の精漿中 transferrin を測定し、精子数が少ないものほど精漿中 transferrin が低値を示すことを報告している。今回の著者らの測定結果も、Holmes ら、Caldini らの報告と同じ結果であった。さらに組織学的に精子発生能障害の程度を評価する Johnsen score count および germinal cell index と transferrin は正の相関傾向が認められた。

精漿中 hCG- β は、精子成熟の過程で精細胞から精細管に分泌されていると考えられている^{4,18}。そこで著者らは、精漿中 hCG- β と精漿中 transferrin の関連性についても検討してみた。精漿中 transferrin は、精漿中 hCG- β とも有意な正の相関傾向を示しており、Sertoli 細胞機能と精子発生能は密接な関連性をもっていることが示された。

これら今回の測定結果から、男子不妊症の精子発生能障害度を検討する際、精漿中 transferrin は Sertoli 細胞の機能を反映するマーカーとして有用であることが明らかとなった。

2. 精漿中 inhibin 活性

inhibin は、精巢の Sertoli 細胞あるいは卵巣の顆粒膜細胞から分泌され、FSH の feedback factor としてホルモン調節機構に関与していることが、明らかとなっている^{19,20}。

inhibin の研究は現在卵胞液由来のものについて研究が進んでいる。卵胞液から精製された inhibin は α と β_A あるいは α と β_B の 2 つの subunit からなり、イ

オウ結合によりつながった分子量約 32,000 の蛋白ホルモンであることが判明している²¹⁻²⁵。

一方精巢由来のものについては研究が遅れている。その原因は精液中には精巢由来以外に精囊腺、前立腺からも FSH 分泌抑制物質が分泌されているためである。事実、Ramasharma ら²⁶はヒト精漿から inhibin を精製し α -inhibin と、Sheth ら²⁷は β -inhibin と命名し報告しているがこれらのホルモンは前述の卵巢性 inhibin と同じ名称であるが、全く異なった構造の物質である。その後これらの物質は各々精囊腺あるいは前立腺由来であることが明らかとなっている²⁸。

しかし精巢から inhibin が分泌されていることは紛れもない事実であり、例えば Seethalakshmi ら²⁹は rat に停留睪丸を作成し、停留睪丸 rat の睪丸の Sertoli 細胞培養を行なうと、培養液への inhibin の分泌は低下したが、停留睪丸を解除した場合には inhibin の分泌が正常値近くまで戻ると報告している。また Au ら³⁰は停留睪丸 rat の睪丸中 inhibin 含量を測定すると低下していると報告している。このように動物実験では、精子発生能障害時には睪丸からの inhibin の分泌が低下すると報告されている。また Noguchi³¹はサル Sertoli 細胞培養液中に inhibin 様物質のあることを報告し、霊長類の精巢も inhibin を産生していることを証明している。従って今後精巢由来 inhibin の構造決定、測定法の開発が望まれる。

このような状況から現在のところ精子発生能障害と inhibin との関係についての臨床的な検討は、主に精漿中 inhibin について検討されてきている。Scott ら³²は下垂体単層培養による生物学的測定法で、男子不妊症症例の精漿中 inhibin 活性を測定し、無精子症で精漿中 inhibin 活性が低値を示したと報告している。今回の測定の結果でも前述の Scott らの報告にみられるように、精子数が減少しているものほど精漿中 inhibin 活性は低値を示した。しかしながら、著者らの結果では、無精子症や、高度の乏精子症の症例においても精漿中 inhibin 活性が比較的高い値を示す者が認められた。これらの症例のうち睪丸生検を施行した者について検討すると、精漿中 inhibin 活性が高い症例では精細管の組織像では Johnsen score count や germinal cell index が高く、比較的精子発生能障害が軽度であるものが多く認められた。この様に精漿中 inhibin 活性は精子発生能障害と関連性をもって変化していると考えられる。しかし先に述べたように精漿中 inhibin は精巢由来のみではなく前立腺あるいは精囊腺由来の FSH 分泌抑制物質もあるため、精子発生不全との詳細な検討には今後解決されなければならない問題が多く残されている。

3. Sertoli 細胞機能と精子発生能障害

これまで精漿中 transferrin, 精漿中 inhibin 活性について別個に述べてきたが, 次に Sertoli 細胞機能と精子発生能障害という総合的な面について著者の考えを述べてみたい。

Sertoli 細胞は精細管内の精細胞を支持し, 精細胞へ栄養を供給する機能をもっており, これによって精子発生過程に関与している³³⁾。また Sertoli 細胞が正常に機能するためには, 下垂体から分泌される FSH および間質の Leydig 細胞から分泌される testosterone が必要であり, これらのホルモンが単独あるいは協調して Sertoli 細胞の機能維持にあたっていることはよく知られている³⁴⁾。

しかし Sertoli 細胞はどのような機序で精子発生過程に関与しているのか, Sertoli 細胞の機能維持に関与しているのはホルモンだけなのかなどについて不明の点が多く残されている。ところが最近の研究から Sertoli 細胞が精子発生過程に関与する機序についていくつかの点が明らかになってきた。

まずその第一は, 下垂体から分泌されている FSH による endocrine がまずあげられる。Sertoli 細胞には inhibin, ABP, transferrin, plasminogen activator などの蛋白を合成する機能があるが, これらは FSH によって調節されている。この Sertoli 細胞で作られた各種の蛋白が精子発生過程で重要な働きをしていることが明らかになりつつある。

inhibin は FSH の feedback factor であるが, 最近の研究から inhibin の構造が transforming growth factor- β (TGF- β) と非常に類似しており, inhibin には細胞増殖に促進的に働く作用も持っている可能性があげられている³⁴⁾。また transferrin についても, rat をもちいて transferrin の産生量を精子形成の各 stage で比較すると, 精子形成の stage IX~X IV で急速に産生量が増加することから, transferrin は減数分裂後の精細胞に関係があると Wright³⁵⁾は述べている。また plasminogen activator は Lacroix³⁶⁾が rat の Sertoli 細胞の培養実験で発見したが, この酵素は inter Sertoli cell junction を開き, 精細胞を通過させる作用を持つ可能性があるとして述べている。

このように Sertoli 細胞が様々な蛋白を産生し, これが精子発生過程に関与する機序が次第に明らかになってきている。

今回我々はヒトの臨床症例を用いて精漿中 transferrin を検討したが, その結果精子発生障害の程度が比較的軽度の oligozoospermia で既に transferrin の低下を認めた。このことは Sertoli 細胞の軽度の機能低下により, 精子形成過程に障害がおこる可能性

のあることを示すものと考えられた。このような軽度の oligozoospermia では一般に血中 FSH は軽度上昇し, 血中 LH や testosterone は正常値に保たれている場合が多い³⁷⁾。従って Sertoli 細胞の機能低下は機能維持に必要な FSH や testosterone が Sertoli 細胞に到達しにくくなったか, あるいはこれらに対する反応性が低下した可能性が考えられる。三宅³⁸⁾は, 男子不妊症において精細管壁の肥厚と血中 FSH が正の相関傾向が示すことから精細管壁の肥厚が FSH の Sertoli 細胞への到達を障害している可能性があるとして述べている。

しかし Sertoli 細胞機能に関与している第 2 の因子として Sertoli 細胞と精細胞, Sertoli 細胞と Leydig 細胞などの間でお互いの機能に関与しあっているという paracrine の考えも近年提起されている^{39,40)}。Saez ら³⁹⁾は Sertoli 細胞培養に精細胞特に preleptoten spermatocytes を加えると Sertoli 細胞の DNA 産生が増加することから精細胞が Sertoli 細胞の機能を刺激する可能性を報告している。また Galdieri ら⁴¹⁾は rat の Sertoli 細胞を精細胞特に pachytene spermatocytes と同時に培養した場合 Sertoli 細胞から ABP の産生が増加すると報告している。これらの報告にもあるように精細胞は Sertoli 細胞機能に影響を与えていると考えられる。

次に Sertoli 細胞と Leydig 細胞との間の相互作用についても, Benahmed ら⁴²⁾は Sertoli 細胞と Leydig 細胞を同時に培養すると hCG の刺激による Leydig 細胞からの testosterone の産生が増加することより Sertoli 細胞が Leydig 細胞の LH に対する反応性を高める作用を持つと報告している。また Skinner ら⁴³⁾は testosterone が精細管周囲細胞に作用して, Sertoli 細胞での transferrin や ABP の産生を刺激する物質を産生させていると報告している。このように Sertoli 細胞と Leydig 細胞は相互に影響しあって精子発生過程に関与していると考えられる。

以上のように近年では Sertoli 細胞機能は FSH や testosterone による endocrine に加えて, 精細胞と Sertoli 細胞, Leydig 細胞と Sertoli 細胞の間での局所的な場における paracrine の概念も導入されつつあり, 男子不妊症における Sertoli 細胞機能については今後さらに検討されるべき問題が多い。

前述したように精漿中 inhibin 活性については性腺由来であるかについて議論もあり, 現時点では精漿中 transferrin のほうが精子発生能障害をよく反映していると考えられる。また精漿中 transferrin は組織学的な精子発生能障害を示す Johnsen score および germinal cell index もつよい相関傾向を認め, 無精

子症や高度の乏精子症において、睾丸生検の結果をある程度予測できる可能性があると考えられた。inhibin については、今後精巣由来の inhibin について、その構造が明らかになり、より正確な測定系が確立される日が近いと考える。

結 語

1) 男子不妊症症例の精漿中 transferrin, 精漿中 inhibin 活性を測定し、精子発生能障害時の Sertoli 細胞機能について臨床的な検討を行なった。

2) 精漿中 transferrin, 精漿中 inhibin 活性は両者とも精子数が減少している症例ほど低値を示した。

3) 精漿中 transferrin, 精漿中 inhibin 活性の両者と、組織学的に精細管内の精細胞成熟障害の程度を示す Johnsen の mean score および germinal cell index との間には正の相関傾向が認められた。

4) 精漿中 transferrin, 精漿中 inhibin 活性はともに精細胞の成熟に関する生化学的なマーカーである精漿中 hCG- β と正の相関傾向を示した。

以上の成績より、精漿中 transferrin および精漿中 inhibin 活性は精子発生能と密接な関連性を有しており、精子発生能障害の程度のより詳細な指標となりうる可能性が示唆された。

本論文の要旨の一部は第 57 回内分泌学会総会および第 59 回内分泌学会秋期学術大会において発表した。

文 献

- 1) Tindall, D. J., Rowley, D. R., Murthy, L., Lipshutz L. I. and Chang, C. H.: Structure and biochemistry of the Sertoli cell. *International Review of cytology*, 94: 127-149, 1985
- 2) 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: 15-21, 1987
- 3) Holes, S. D., Lipshutz, L. I. and Smith, R. G.: Transferrin and gonadal dysfunction in man. *Fert. Steril.* 38: 600-603, 1982
- 4) 齊藤誠一, 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 ヒト精漿成分の研究 第 1 報. *日泌尿会誌*, 75: 1970-1981, 1984
- 5) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25, 1970
- 6) 加藤修爾: 睾丸機能の研究 第 2 報 器官培養下におけるヒト睾丸の Spermatogenesis の研究. *日泌尿会誌*, 63: 519-538, 1972
- 7) 寺田雅生: 睾丸機能の研究 第 3 報 精子発生不

全睾丸の精細管内細胞数の研究. *日泌尿会誌*, 64: 930-948, 1973

- 8) Putnam, F. W. In *The Plasma Proteins*, Vol. I: pp 265-316, Academic Press, N. Y. 1975
- 9) Skinner, M. K. and Griswold, M. D.: Sertoli cells synthesize and Secrete Transferrin-like protein. *J. Biol. Chem.*, 255: 9523-9525, 1980
- 10) Wilson, R. M. and Griswold, M. D.: Secreted proteins from rat Sertoli cells. *Exp. Cell Res.* 123, 127-135, 1979
- 11) Skinner, M. K. and Fritz, I. B.: Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82: pp114-118, 1985
- 12) Skinner, M. K. and Griswold, M. D.: Multiplication stimulating Activity (MSA) can substitute for insulin to stimulate the secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells. *Cell Biology International Reports*, Vol. 7: 441-446, 1983
- 13) Hugginvik, J., Sylvester, S. R., and Griswold, M. D.: Control of transferrin mRNA synthesis in Sertoli cells. *Annals New York Acad. Sci.*, 438: 1-7, 1984
- 14) Holmes, S. D., Lipshutz, L. I. and Smith, R. G.: Regulation of transferrin secretion by human Sertoli cells cultured in the presence or absence of human peritubular cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 59: 1058-1062, 1984
- 15) 石川博通, 小磯謙吉, 友政 宏, 吉井慎一, 武島仁, 梅山知一: 男子不妊症患者における精液中の微量金属に関する研究. *日泌尿会誌*, 77: 1159-1163, 1986
- 16) Morisawa, M. and Mohri, H.: Heavy metals and spermatozoan motility. I. Distribution of iron, zinc and copper in sea urchin spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 70: 311-316, 1972
- 17) Caldini, A. L., Orlando, C., Barni, T., Messeri, G., Pazzagli, M., Baldi, E. and Serio, M.: Measurement of transferrin in human seminal plasma by a chemiluminescent method. *Clin. Chem.* 32: 153-156, 1986
- 18) Klaue, W.: On the concentration of hCG-like material in human semen. *Int. J. Andrology*, 2: 43-48, 1979
- 19) Steinberger, A., and Steinberger, E.: Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinol.*, 99: 918-921, 1976
- 20) Erickson, G. F. and Hsueh, A. J. W.: Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 103: 1960-1963, 1978
- 21) Ling, N., Ying, S.-Y., Ueno, N., Esch, F., Denoroy, L. and Guillemin, R.: Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7217-7221, 1985
- 22) Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Fukuda, M., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H.: Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 396-403, 1985
 - 23) Rivier, J., Spiess, J., McClintock, R., Vaughan, J. and Vale, W.: Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 120-127, 1985
 - 24) Rovers-ton, D. M., Foulds, L. M., Leversha, L., Morgan, F. J., Hearn, M. T. W., Burger, H. G., Wettenhall, R. E. H. and de Kretser, D. M.: Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 220-226, 1985
 - 25) Ying, S.-Y.: Inhibins and activins: chemical properties and biological activity. *P. S. E. B. M.* 186: 253-264, 1987
 - 26) Ramasharma, K., Sairam, M. R., Seidah, M. G., Chretien, M., Manjunath, P., Schiller, P. W., Yamashiro, D. and Li, C. H.: Isolation, structure and synthesis of a human seminal plasma peptide with inhibin-like activity. *Science* 223: 1199-1202, 1984
 - 27) Sheth, A. R., Arabatti, M., Carlquist, M. and Jornvall, H.: Characterization of a polypeptide from human seminal plasma with inhibin (inhibition of FSH secretion)-like activity. *FEBS lett.* 165: 11-15, 1984
 - 28) Burger, H. G. et al.: Inhibin: Definition and nomenclature, including related substances. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 66: 885-886, 1988
 - 29) Seethalakshmi, L. and Steinberger, A.: Effect of cryptorchism and orchidopexy on inhibin secretion by rat Sertoli cells. *J. Androl.* 4: 131-135, 1983
 - 30) Au, C. L., Robertson, D. M. and de Kretser, D. M.: In vitro bioassay of inhibin in testes of normal and cryptorchid rats. *Endocrinol.* 112: 239-244, 1983
 - 31) Noguchi, K., Keeping, H., Winters, S. J., Saitoh, H., Ohshima, H. and Troen, P.: Identification of inhibin secreted by cynomolgus monkey Sertoli cell culture. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 64: 783-788, 1987
 - 32) Scott, R. S. and Burger, H. G.: Inhibin is absent from azoospermic semen of infertile men. *Nature*, Vol. 285: 22, 246-247, 1980
 - 33) 宮地幸隆: Sertoli 細胞とインヒビン. 山村雄一監修, 性 I, 代謝 16 巻 臨時増刊号, p265-272, 1979
 - 34) Mason, A. J., Hayflick, J. S., Ling N., Esch, F., Veno, N., Ying, S. Y., Guillemin, R., Niall, H., and Seebing, P. H.: Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature*, 318: 659-663, 1985
 - 35) Wright, W. W., Parvinen, M., Musto, N. A., Gunsalus, G. L., Phillips, D. M., Mather, J. P. and Bardin C. W.: Identification of stage-specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* 29: 257-270, 1983
 - 36) Lacroix, M. and Fritz, I. B.: The control of the synthesis and secretion of plasminogen activator by rat Sertoli cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 26: 247-258, 1982
 - 37) 丸田 浩, 青山竜生: 睪丸下垂体系の研究 第 2 報 精子発生能および Leydig 細胞機能と Gonadotropin の関係について. *日泌尿会誌*, 65: 654-677, 1974
 - 38) 三宅弘治: 突発性不妊精巣の病態生理. *臨泌*, 42: 105-114, 1988
 - 39) Saez, J. M., Tabone, E., Perrard-Sapori, M. H. and Rivarola, M. A.: Paracrine role of Sertoli cells. *Medical Biology*, 63: 225-236, 1985
 - 40) Sharpe, R. M.: Endocrinology and paracrinology of the testis. In Lamb, J. C. and Foster, P. D. eds, *Physiology and toxicology of male reproduction*. Academic Press, San Diego, 1988
 - 41) Gaydieri, M., Monaco, L. and Steranini, M.: Secretion of androgen binding protein by Sertoli cells is influenced by contact with germ cells. *J. Androl.*, 5: 409-415, 1984
 - 42) Benahmed, M., Reventos, J., Tabone, E. and Saez, J. M.: Cultured Sertoli cell mediated FSH stimulatory effect on Leyding cell steroidogenesis. *Am. J. Physiol.* 248: E176-E181, 1985
 - 43) Skinner, M. K., and Fritz, I. B.: Identification of a non-mitogenic paracrine factor involved in mesenchymal-epithelial cell interactions between testicular peritubular cells and Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 44: 85-97, 1986

Study of sertoli cell functions in male infertility —Relationship between seminal plasma transferrin and seminal plasma inhibin activity—

Yoshio Takagi and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology,
Sapporo Medical College,
Hokkaido 060, Japan
(Director: Prof. Y. Kumamoto)

Yuichi G. Watanabe*

Department of Anatomy,
Sapporo Medical College,
(Director: Prof. K. Takahashi)

The transferrin level of seminal plasma and inhibin activity in seminal plasma were determined in 140 men with infertility. The transferrin level of seminal plasma was determined by radioimmunoassay. The activity of inhibin in seminal plasma was biologically determined by rat anterior pituitary incubation and calculated as the rate of inhibition of follicle stimulating hormone (FSH) secretion from rat anterior pituitary gland. The transferrin level was $39.5 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$ in patients with the normal sperm count ($n=28$), $27.1 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ in those with subnormal sperm count ($n=19$), 24.8 ± 10 .

$6 \mu\text{g/ml}$ in those with oligozoospermia ($n=22$) and $17.2 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ in those with azoospermia ($n=20$); thus transferrin level was low when the sperm count decreased. The inhibin activity level was $34.5 \pm 2.7\%$ (mean $\pm$ S. E. %) in patients with the normal sperm count ($n=43$), $26.1 \pm 4.6\%$ in those with subnormal sperm count ($n=13$), $26.0 \pm 2.8\%$ in those with oligozoospermia ($n=33$) and $16.3 \pm 2.5\%$ in those with azoospermia ($n=21$). There tended to be a positive correlation ($r=0.76$, $p<0.05$) between the transferrin level and Johnsen score count, a histological indicator of the severity of disturbance in spermatogenetic ability. There also tended to be a positive correlation ($r=0.41$, $p<0.05$) between inhibin activity and Johnsen score count. There was a positive correlation between the transferrin level and inhibin activity. These results suggest that the transferrin level of seminal plasma and the activity of inhibin in the seminal plasma are clinically useful indices to evaluate the severity of spermatogenetic disturbance.

(受付: 1988 年 9 月 16 日特掲)

無精子症の臨床統計

Clinico-statistical Study on Azoospermia

筑波大学泌尿器科

吉 井 慎 一 友 政 宏 武 島 仁
Shin-ichi YOSHII Hiroshi TOMOMASA Hitoshi TAKESHIMA
石 川 博 通 小 磯 謙 吉
Hiromichi ISHIKAWA Kenkichi KOISO

Department of Urology, University of Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

昭和 58 年 4 月より昭和 63 年 3 月までの 5 年間に不妊外来を受診し、無精子症と診断された 79 人について臨床的検討を加えた。睾丸生検や精嚢腺造影等で診断のついた 48 例では、原発性が 32 例、閉塞性が 16 例であった。これらについて検討すると、原発性無精子症では睾丸容量は有意に小さく、血清 FSH, LH は有意に高値を示した。 $(P < 0.01)$ 。更に血清テストステロンは原発性無精子症で有意に低値を示した。 $(P < 0.01)$ 。無精子症では睾丸容量と血清 FSH, LH さらにはテストステロン値より、閉塞性の因子が強く疑われるときには、マイクロサージェリーを含めた積極的な手術を施行すべきと考える。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 225-228, 1989)

緒 言

現在、男子不妊症患者に対して色々な治療が試みられているが、その成績は必ずしもよいとは言えない。特に無精子症はその多くが原発性であり有効な治療法は殆どなく、一部の閉塞性無精子症に対して手術療法が施行されているのみである。今回、無精子症の患者の臨床的検討を行ったので報告する。

対 象

対象は、昭和 58 年 4 月より昭和 63 年 3 月までの 5 年間に筑波大学泌尿器科外来を受診した 331 人の男子不妊症患者中、3 回の精液検査の結果、無精子症と診断された 79 人である。患者の平均年齢は 32.6 歳で、20 歳代が 50 人と最も多かった。

方 法

患者の年齢、不妊期間、既往歴等につき問診を行った。次に副睾丸、精管、前立腺の触診を行ない、睾丸容量はオーキドメーターを用いて測定した。更

に特殊検査として、睾丸生検を 27 例 (34%) に、精嚢腺造影を 6 例に、試験切開を 3 例に施行した。また 12 例に染色体検査を施行した (表 1)。

表 1 特 殊 検 査

睾丸生検	27 例
精嚢腺造影	6 例
試験切開	3 例
染色体検査	12 例

これらの成績をもとに、無精子症を原発性と続発性の 2 群に分類した。血清 FSH, LH, テストステロン、プロラクチン、さらに血清 IgG, IgA, IgM を午前 9 時から 11 時 30 分の間に採血し測定した。さらに、これら 2 群間でそれぞれ比較検討した。

また、これらによって治療法を決めたが、その成績についても検討した。

結 果

無精子症で原因の明らかなものは 25 例であった。

精管結紮術を施行したものは5例で、染色体検査の結果クラインフェルター症候群は11例あり、すべてXXYでモザイク型は存在しなかった(表2)。

表2 原因疾患

精管結紮術後	5 例
両側副睾炎	5 例
両側精管欠損	3 例
両側鼠径ヘルニア術後	1 例
XXY (Klinefelter's syndrom)	11 例

次に無精子症の診断であるが、睾丸生検、精嚢腺造影、染色体検査により診断のついたもの、更に問診にてその原因が明らかなものは48例であった。そのうち原発無精子症は32例、閉塞性無精子症は16例であった(表3)。

表3 無精子症の分類

1. 睾丸生検、精嚢腺造影、染色体検査施行(48例)	
原発性無精子症	32 例
閉塞性無精子症	16 例
2. 睾丸容量と血清FSH値より予測されるもの(31例)	
原発性無精子症	25 例
閉塞性無精子症	6 例

これら48例について検討を加えると、睾丸容量は原発性無精子症($9.1 \pm 5.3\text{ml}$)が閉塞性無精子症($18.4 \pm 4.8\text{ml}$)に比べて有意に小さかった($P < 0.01$)。血清FSH, LHは原発性無精子症で $48.8 \pm 25.9\text{mIU/ml}$, $27.4 \pm 13.5\text{mIU/ml}$ で、閉塞性無精子症では $10.7 \pm 5.8\text{mIU/ml}$, $11.0 \pm 4.4\text{mIU/ml}$ となっており、FSH, LHともに原発性無精子症で有意に高値を示した($P < 0.01$)。血清テストステロン値は、原発性無精子症($4.3 \pm 2.1\text{ng/ml}$)が閉塞性無精子症($6.0 \pm 1.7\text{ng/ml}$)に比べて有意に低かった($P < 0.05$)。血清プロラクチン, IgG, IgA, IgMではいずれも有意差は認めなかった(図1)。

原発性無精子症のなかで染色体検査の結果クラインフェルター症候群と診断のついた患者についてみると、睾丸容量は $3.8 \pm 1.4\text{ml}$ でその他の原発性無精子症 $12.0 \pm 4.4\text{ml}$ に比べてさらに小さくなっていた($P < 0.01$)。FSH, LHは $72.1 \pm 28.0\text{mIU/ml}$, $42.1 \pm 2.7\text{mIU/ml}$ で他の原発性無精子症にくらべ更に高値を示していた($P < 0.01$)。血清テストステロンは $2.5 \pm 1.7\text{ng/ml}$ で他の原発性無精子症 $5.3 \pm 1.7\text{ng/ml}$ に比べさらに低値を示した($P < 0.01$)。更に、血清IgAが $171.8 \pm 66.4\text{mg/dl}$ で他の原発性無精子症に比べ有意に低くなっていた($P < 0.05$)(図2)。

以上の結果より残りの31例を睾丸容量と血清FSHより分類すると、原発性無精子症25例、閉塞性無精子症6例となり、先に診断のついている48例と合

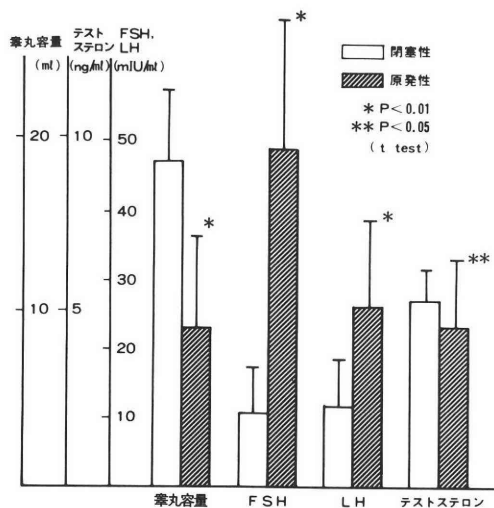


図1 原発性と閉塞性無精子症の睾丸容量、血清FSH, LH, テストステロン値の比較

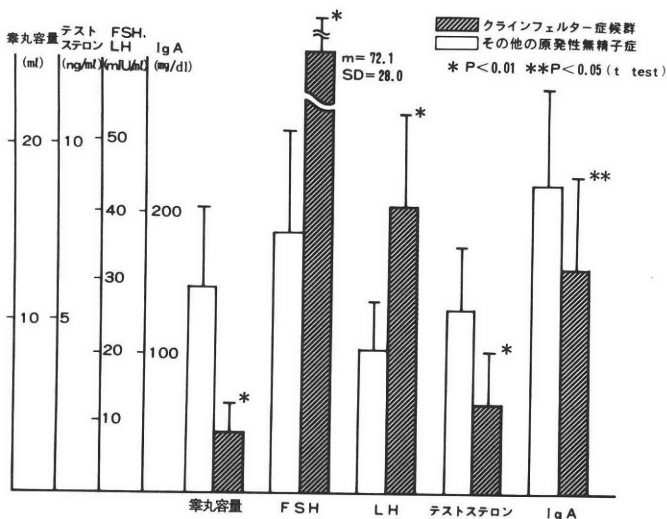


図2 クラインフェルター症候群と他の原発性無精子症との比較

わすと、原発性無精子症 57 例、閉塞性無精子症 22 例で約 7 : 3 となった (表 3)。

治療は、原発性無精子症と診断のついた例では原則として治療はせず、患者の希望によって A I D を施行している病院に紹介した (15 例)。閉塞性無精子症に対しては積極的に治療を進めており、精管結紮後の患者で 5 人に精管吻合術、両側の副睾丸炎にたいして 1 例に副睾丸精管吻合術をそれぞれマイクロサージェリーにて施行した。その結果その全例に運動精子の出現を見た。また先天性精管欠損の患者 1 例に人工血管を用いて人工精液留を増設し約半年間人工受精に必要な精子を得ている。これらの中で副睾丸精管吻合術の一例に妊娠が成立した (表 4)。

表 4 治 療

精管 — 精管吻合術	5 例
副睾丸 — 精管吻合術	1 例
人工精液留造設術	1 例
(A I D)	(15 例)

また、閉塞性無精子症を疑って精嚢腺造影を施行したところ、1 例で検査後に精液所見の正常化を見た。

考 察

無精子症は、男子不妊症患者の 20~30 % を占めると言われている^{1,2,3,4)}。無精子症は大きく原発性と閉塞性に分かれ、その比率は約 4 : 1 とされている。今回の症例では精管結紮術後の症例が 5 例含まれているため、閉塞性の占める割合が幾分多くなっているが、大体他施設の報告に近かった。

無精子症の分類法については、睾丸生検、精嚢腺造影を施行すればある程度確実であり、さらにクラインフェルター症候群ではモザイク型以外はその殆どが原発性無精子症を伴っており⁵⁾、睾丸容量の小さく血清 F S H、L H の高値に加え、血清テストステロンの低下を認めた場合、染色体検査は積極的に施行し原発性無精子症の診断確定に役立たすべきと考える。しかし、睾丸容量と血清 F S H 値などから閉塞性か原発性かを推測することも十分に可能と考えられるため⁶⁾、各症例に関して患者の同意を得たうえで診断と治療を個別に選択することも必要と考える。

治療法に関しては、最近のマイクロサージェリーや、人工受精の技術の進歩に伴い、閉塞性無精子症では、精管吻合術⁷⁾や副睾丸精管吻合術^{8,9)}、更には人工精液留造設術にて妊娠に到る症例も報告されている¹⁰⁾。

このため、これらの方法を積極的におこなうべきと考える。さらに、無精子症の症例で睾丸容量と血清 F S H の値より閉塞性の因子が強く疑われるときには、精管精管吻合術あるいは副睾丸精管吻合術中に、精嚢腺造影、睾丸生検を施行しても良いと考えられる。原発性無精子症に関しては現在有効な治療法はないため、原因の究明も含め今後も研究を行うべきであろう。

結 語

1. 無精子症患者について臨床的検討を行った。
2. 男子不妊症患者 331 人中 79 人を占めており原発性無精子症は 57 人、閉塞性無精子症は 22 人であった。
3. 睾丸生検は施行しなくても、睾丸容量と血清 F S H 値より大体分類可能と思われた。
4. 閉塞性無精子症が疑われた場合はマイクロサージェリーを含めた積極的な治療が必要である。

文 献

- 1) 山本雅憲, 三宅弘治, 欄 芳郎, 笥 秀夫, 後藤 百万, 高村真一, 蔡 紹謨, 三宅英輔: 男子不妊症の臨床統計的観察, 日本不妊会誌, 27 : 369, 1982
- 2) Ishikawa, H., Tomomasa, H., Yoshii, S., Takeshima, H. and Koiso, K.: Clinico-statistical sutudy on male infertility. Nishinohon J. Urol. 47: 721, 1985
- 3) Tomomasa, H., Yoshii, S., Takeshima, H., Ishikawa, H. and Koiso, K.: Clinico-statistical sutudy on male infertility. Nishinohon J. Urol. 48: 799, 1986
- 4) 吉井慎一, 友政 宏, 武島 仁, 石川博通, 小磯謙吉: 男子不妊症の臨床統計, 西日泌尿, 49 : 487, 1987
- 5) M. Leipoldt, B. Eiben, W. Krause and W. Engel: Nekrozoospermia in Mosaic Klinefelter's Syndrome. Andrologia. 19: 175, 1987
- 6) 大橋輝久, 森岡政明: 男子不妊症の内分泌環境, 西日泌尿, 44 : 545, 1982
- 7) 武島 仁, 石川博通, 岡野克紀: Microsurgery による精管—精管吻合術, 臨必 40 : 981, 1986
- 8) 石川博通, 根本真一, 相川 厚, 篠田正幸, 長倉和彦, 田崎 寛: 男子不妊症の外科的治療, 日本不妊会誌, 28 : 106, 1983
- 9) 石川博通, 武島 仁, 矢島恒忠, 小磯謙吉, 岡野克紀, 相川 厚: 男子不妊症患者における精管副睾丸吻合術 (microsurgery の導入), 手術 38 : 7, 1984
- 10) 三浦一陽, 田中貞雅, 松橋 求, 牧 昭夫, 高波真佐治, 藤尾幸司, 白井将文, 安藤 弘: 人工精液瘤による妊娠成功例。

日本不妊会誌, 32 : 359, 1987

Clinico-statistical study on azoospermia

Shin-ichi Yoshii, Hiroshi Tomomasa,
Hitoshi Takeshima, Hiromichi Ishikawa
and Kenkichi Koiso

Department of Urology, University of Tsukuba,
Ibaraki 305, Japan

A statistical analysis was performed on 79 patients with azoospermia who had visited our infertility clinic for recent 5 years from April 1983

to March 1988.

1) Based on the findings of the testicular biopsy and spermatovesiculography, 48 of 79 patients were divided into primary azoospermia group (32 cases) and obstructive azoospermia group (16 cases).

2) The testicular volume in primary group were smaller than that of obstructive group ($P < 0.01$).

3) The levels of FSH and LH in primary group were higher than those of obstructive group ($p < 0.01$).

4) The level of testosterone in primary group was lower than of obstructive group ($p < 0.01$).

5) Microsurgical treatment should be done for the patients who are diagnosed as having obstructive process.

(受付 : 1988 年 7 月 26 日)

男子不妊症の臨床統計的観察

A Clinical and Statistical Study of Male Infertility

獨協医科大学泌尿器科学教室

金子 克 美	田 畑 行 義	迎 圭 一 郎
Katsumi KANEKO	Yukiyoshi TABATA	Keiichiro MUKAE
荒 井 哲 也	本 田 幹 彦	鈴 木 徹
Tetsuya ARAI	Mikihiko HONDA	Toru SUZUKI
村 橋 勲	高 崎 悦 司	
Isao MURAHASHI	Etsuji TAKASAKI	

Department of Urology, Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan
(Director: Prof. E. Takasaki)

昭和49年7月より同61年12月の間に獨協医科大学泌尿器科を受診した188名の男子不妊症患者に
対し、臨床統計的観察をおこなった。

- (1)不妊主訴患者は、男子新患者総数の2.4%を占めた。
- (2)受診年齢は、26～35歳までが最も多く全体の80.3%を占めた。
- (3)結婚後、5年以内に77.6%が受診した。平均2.9年であった。
- (4)原因疾患は、82.4%が不明、明らかなもので最多は精索静脈瘤10例であった。
- (5)精液所見では、無精子症例が71例、37.8%と他施設に比し高値を示した。
- (6)治療結果は、Vit. E+Kallikrein+Vit. B_{1,6,12}合剤投与群にて最も良好であり、精子濃度有効率37.5%、精子運動率有効率18.8%であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 229-234, 1989)

緒 言

近年、男子不妊症患者は、増加傾向にあり¹⁾、当院泌尿器においても、同様な状態である。今回、われわれは、昭和49年7月獨協医科大学付属病院開設以来、泌尿器科を受診した男子不妊症患者に対して、臨床統計的観察を行ったので、治療成績を中心に報告する。

対象及び方法

昭和49年7月より同61年12月までに当科を受診した不妊主訴患者188名を対象とした。これらに対して、受診年齢、不妊期間、不妊原因疾患、初診時精液所見、治療薬物別統計などの検討を行った。治

療薬物統計においては、薬物療法別にI群 HCG+HMG, II群 Serotropin, III群 Vit. E+Kallikrein+Vit. B_{1,6,12}合剤, IV群 Nicomol+Pentoxifylline+Kallikrein+Vit. B_{1,6,12}合剤, V群 Thyroidhormon+Vit. E に分類を行った。

結 果

1) 外来患者頻度

男子新患者総数における、不妊主訴患者の割合は年度別に2.3～2.5%を占め、平均で2.4%であった。

2) 受診年齢

患者年齢は、23歳から48歳に分布し、26歳～30歳が81名と最も多く、次が31歳～35歳で70名であり、両者を合わせると、全体の80.3%を占めた(表

表 1 受 診 年 齢

21 ~ 25歳	12例 (6.4%)
26 ~ 30	81 (43.1%)
31 ~ 35	70 (37.2%)
36 ~ 40	19 (10.1%)
41 ~	6 (3.2%)
計	188例

表 2 男子不妊症の原因統計

原 因	症例数	%
性染色体異常		
Klinefelter	5	2.7
XXY	1	0.5
精索静脈瘤	10	5.3
停留睾丸	1	0.5
逆行性射精	1	0.5
精路閉塞 (両側)	5	2.7
睾丸炎 (両側)	8	4.3
Hypogonadotropic hypogonadism	2	1.1
特 発 性	155	82.4
計	188	100

表 3 精子濃度による分類

	精子濃度 ($\times 10^6 / \text{ml}$)	症例数	%
A	40 ~	49	26.1
B	20 ~ 40	19	10.1
C	10 ~ 20	16	8.5
D	1 ~ 10	23	12.2
E	0 ~ 1	10	5.3
F	0	71	37.8
計		188	100

表 4 薬物療法別分類

	薬 物 療 法 内 容	例 数
I	HCG + HMG	12
II	Serotropin	20
III	Vit E + Kallikrein + Vit B _{1, 6, 12}	16
IV	Nicomol + Pentoxifylline + Kallikrein + Vit B _{1, 6, 12}	10
V	Thyroid hormon + Vit E	9
		67

表 5 治療効果判定基準*

判 定	精 子 濃 度		運 動 率
	$20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下	$20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上	
有 効	$10 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上増加	$20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上増加	20%以上増加
不 変	$10 \times 10^6 / \text{ml}$ 未満増減	$20 \times 10^6 / \text{ml}$ 未満増減	20%未満増減
悪 化	$10 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上減少	$20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上減少	20%以上減少

* 寺田他・1983

表 6 I 群における治療成績

精子濃度分類	例 数	精子濃度有効率(%)	精子運動率有効率(%)	妊 娠 例 数
A	2	0	0	0
B	0	/	/	/
C	2	50	100	2
D	3	0	0	0
E	0	/	/	/
F	5	0	0	0

1).

3) 不妊期間

不妊期間は最短 3 ヶ月から最長 16 年であり, 平均 2.9 年であった。

4) 不妊原因疾患

原因が明らかなもの 33 例では, 精索静脈瘤 10 例, 5.3 %と最多, 次いで両側睾丸炎 8 例, 性染色体異常 6 例であった。しかし, 大多数は特発性のものであり 155 例, 82.4 %を示した (表 2)。

5) 初診時精液所見

精子濃度にて分類を行った。A 群 ($40 \times 10^6/\text{ml}$) 49 例, B 群 ($20 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$) 19 例, C 群 ($10 \times 20 \times 10^6/\text{ml}$) 16 例, D 群 ($1 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$) 23 例, E 群 ($0 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$) 10 例, F 群 ($0/\text{ml}$) 71 例という分布を示した (表 3)。

6) 治療薬物別統計

治療薬物別に分類を行い I ~ V 群とした (表 4)。

治療効果の評価可能な症例は 67 名であり, 効果判定は寺田ら^{2,3)}の治療効果判定基準に従った (表 5)。薬物投与期間は, I, II 群で 10 ~ 20 週, 10 週目に精液検査上効果無い症例は投与を中止した。III, IV, V 群にては最短 3 ヶ月最長 18 ヶ月である。I 群にて精子濃度有効例は 1 例, 8.3%, 運動率有効例は 2 例, 16.7%。妊娠成功例は 2 例, 16.7%。妊娠成功例は

表 7 II 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効率(%)	精子運動率有効率(%)	妊娠例数
A	2	0	50	0
B	5	20	0	1
C	2	100	0	1
D	6	33	0	1
E	1	0	0	0
F	4	0	0	0

表 8 III 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効率(%)	精子運動率有効率(%)	妊娠例数
A	7	43	14	2
B	2	50	50	0
C	1	100	100	1
D	4	25	0	0
E	2	0	0	0
F	0	/	/	/

表 9 IV 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効率(%)	精子運動率有効率(%)	妊娠例数
A	1	0	0	0
B	4	0	25	0
C	1	0	0	0
D	4	25	0	1
E	0	/	/	/
F	0	/	/	/

表 10 V 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効率(%)	精子運動率有効率(%)	妊娠例数
A	1	0	0	0
B	2	50	0	0
C	3	0	33	0
D	1	0	0	0
E	2	0	0	0
F	0	/	/	/

2 例, 16.7%, すべて精子濃度別分類において C 群であった(表 6). II 群にて精子濃度有効例 5 例, 25%, 運動率有効例 1 例, 5%. 妊娠成功例の 3 例, 15% は精子濃度有効が得られた B, C, D 各群より生じた(表 7). III 群にて精子濃度有効例は 6 例, 37.5%, 運動率有効例は 3 例, 18.8% であり A, B, C 群は両者において有効例を生じた. 妊娠成功例は 3 例, 18.8% であった(表 8). IV 群にて精子濃度, 運動率有効率共に 10% を示した. 妊娠成功例は D 群に 1 例認めた(表 9). V 群にて精子濃度, 運動率有効率ともに 11% をしめしたが妊娠例は見られなかった(表 10).

考 案

1) 外来患者頻度

泌尿器科男子外来患者総数に占める, 不妊主訴患者割合は, 諸家によると^{1,4-6)}, 5.9~12.5% の範囲内である. しかし, 自験例では年度別頻度において, 2.3~2.5% と低値を示し, 全体では, 2.4% であった. これは不妊原因の主体が女性側にあると考えがちな地域性, 専門医の不足, 患者自身の自覚不足, 医療側の患者に対する啓蒙不足, 等が原因として想定された.

2) 受診年齢

受診年齢は, 26~35 歳が全体の 80.3% を占め, 諸家の報告^{1,6-8)}と一致した.

3) 不妊期間

平均 2.9 年であり, 5 年目までに 77.6% が受診し, 不妊期間は 2~3 年であり^{9,10)}, かつ 5 年目までに約 70% 程度が受診するとの報告⁹⁾と一致する.

4) 不妊原因疾患

既往歴の聴取及び精査にて, 原因疾患の明らかなものは 33 名, 17.5% であり白井ら⁴⁾が報告するとおり多くは特発性のものであった. 原因としては, 精索静脈瘤が最多であり, 精路閉塞の症例を加えると 33 名中 15 名, 45% を占め, 外科的治療の適応となる症例の多いことをしめした. 又, 当施設における精路閉塞の症例は, 陰囊内又は鼠径部手術による症例 3 例, 先天性精管欠損と思われる症例 2 例であったが, これらの症例にわれわれは外科的治療を施行したが十分な結果を得ておらず, 諸家の報告¹¹⁾と同様に microsurgery の必要性を痛感している.

5) 初診時精液所見

乏精子症の分類においては, 各施設ごとに異なった区分を用いていることが多く^{4,6,12,13)}, 文献上の比較を行うことは問題がある. しかし, 無精子症の比較は可能であり, 当施設において 71 名, 約 38% を示

し他施設の約 2 倍の値を示した¹⁶⁾. これは受診患者の多くが産婦人科医の紹介であることが一因であると推察される. 今後さらに, 産婦人科医との協力関係が重要と思われた.

6) 治療薬物別分類

当施設において, 男子不妊症患者はまず非内分泌療法を約 3 ヶ月おこない, 効果の見られた者は継続, 効果のない者は内分泌療法に変更する¹⁴⁾. ただし無精子症患者については初めより内分泌療法を行うのを常としている. gonadotropin の男子不妊症における効果について Schill¹⁵⁾によると無精子症にて 47.7% の効果があったとしているが, 我々の施設では I, II 群において全く効果を認めず, 乏精子症患者においても彼の報告と比し低値であった. しかし, 無精子症例を I, II 群より除くとほぼ同等の値を示した. gonadotropin 療法における効果は諸家の報告¹⁵⁻¹⁹⁾にても, 精子所見の良好な者に有効率が高いが, われわれの結果も同様であり, この療法の問題点は精子数 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下にあり, 今後の検討が望まれる. 当施設における非内分泌療法は kallikrein 製剤を中心として, 多剤併用療法を行っているが, 決して満足のゆく結果をえてはおらず, 諸家²⁰⁻²²⁾の kallikrein 単独投与と比較しても低い有効率であり, 薬剤の選択, 組み合わせ, 適応症例の再検討を現在行っている. 妊娠成功例は V 群をのぞく各群に見られ, 9 例中 4 例は精子濃度分類で C 群であるが, これは各治療群で良好な反応を示した者の多くが C 群であったことと相関すると思われた.

結 語

昭和 49 年 7 月より同 61 年 12 月までに, 獨協医科大学泌尿器科外来に不妊を主訴として受診した患者 188 名に対して, 臨床統計的観察をおこなった.

1) 不妊主訴患者は, 男子新患総数の 2.4% を占めた.

2) 受診年齢は, 26~35 歳までで全体の 80.3% を占めた.

3) 不妊期間は, 平均 2.9 年であり 5 年以内に 77.6% が受診した.

4) 不妊原因疾患は, 82.4% が不明であり, 明らかなもので最多は精索静脈瘤 10 例 5.3% であった.

5) 精液所見では, 無精子症症例が 71 例, 37.8% と他施設に比して高値であった.

6) 治療結果は, Vit. E+Kallikrein+Vit. B₁₂ 合剤投与群 16 名にて最も良好であり, 精子濃度有効率 37.5%, 精子運動率有効率 18.8% であった.

本論文の要旨は、第32回日本不妊学会総会において発表した。

文 献

- 1) 堀 夏樹, 山崎義久, 有馬公伸, 柳川 真, 杉村芳樹, 田島和洋, 栃木宏水, 加藤広海, 斎藤 薫, 多田 茂: 男子不妊症の臨床統計的観察, 日不妊誌, 27: 161, 1982
- 2) 寺田為義, 柳 重行, 片山 喬: 男子不妊症患者の精液所見に及ぼすカリクレイン (BAYd 7687) の効果, 日不妊誌, 28: 42, 1983
- 3) 中村幸雄, 岩崎 皓, 木下裕三, 野口和美, 高井修道: 男子不妊に対するミオアクチンC注の効果, 日不妊誌, 18: 61, 1973
- 4) 白井将文: 精子形成障害, 特に男子不妊症について, 臨泌, 26: 281, 1972
- 5) 石神襄次: 男子不妊の治療, 臨泌, 31: 475, 1977
- 6) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊東晴夫, 島崎 淳: 男子不妊症の臨床的観察, 日不妊誌, 28: 197, 1983
- 7) 長沼弘三郎, 後藤俊弘, 前山泰典, 岡元健一郎: 男子不妊症の臨床的観察, 西日泌尿, 39: 611, 1977
- 8) 桜井叢人, 関根昭一: 男子不妊症の臨床的観察, 西日泌尿, 43: 725, 1981
- 9) 小松洋輔, 友吉唯夫, 岡田謙一郎, 高山秀則: 男子不妊症の臨床統計的観察ならびその追跡調査成績について, 日不妊誌, 14, 346, 1969
- 10) 平野章次, 沢木 勝, 大川光央, 黒田恭一: 男子不妊症の臨床統計的検討, 日不妊誌, 20, 11, 1975
- 11) 石川博道, 相川 厚, 武島 仁, 小山雄三, 中村聡: 男子不妊症の臨床統計学的検討, 日不妊誌, 29: 329, 1984
- 12) Eliasson, R.: Diagnosis in male infertility. *Int. J. Androgy*, Suppl. 1: 53, 1978
- 13) Cockett, A. T. K., Netto, I. C. V., Dougherty, K. A. and Urry, R. I.: Semen analysis: A review of samples from 225 men seen at an infertility clinic. *J. Urol.* 114: 560, 1975
- 14) 石神襄次: 男子不妊症の臨床. 日医事新報告. No. 3147: 13, 1984
- 15) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility—a review. *Andrologia*, 11: 77, 1979
- 16) 奥山明彦, 水谷修太郎: 男子不妊症の治療経験 第1報: HCG/HMG 剤の併用について, 泌尿紀要, 26: 563, 1980
- 17) 奥山明彦, 園田孝夫, 水谷修太郎: 男子不妊症の治療経験 第2報: HCG, HMG 各剤の投与量と妊娠性の予後について, 泌尿紀要, 27: 355, 1981
- 18) 谷風三郎, 守殿貞夫: 特発性男子不妊に対するゴナドトロピン治療, 日不妊誌, 23: 107, 1978
- 19) 羽間 稔, 守殿貞夫, 石神襄次, 熊本悦明, 丸田浩, 大野一典, 志田圭三, 山中英寿, 大島博幸, 根岸壮治, 竹内信一, 今村一男, 吉田英機, 岩動治三郎, 清水芳幸, 川井修一: 特発性男子不妊に対するhMG-hCG併用療法の臨床評価, 日不妊誌,

29: 315, 1984

- 20) Schirren, C., Schill, W. B. and Hofmann, N.: The influence on semen parameters of subfertility patients. In: *Kininogenase Kallikrein 2* (Haberland, G. L., Rohen, J. W., Schirren, C. and Huber, P., Eds.) III, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975
- 21) Schill, W. B.: Improvement of sperm motility in patients with asthenozoospermia by kallikrein treatment. *Int. J. Fertil.* 20: 61, 1975
- 22) Ishigami, J. and Kamidono, S.: Clinical experiences with kallikrein in male infertility. In: *Kininogenase Kallikrein 2* (Haberland, G. L., Rohen, J. W., Schirren, C. and Huber, P., Eds.) 155, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975

A clinical and statistical study of male infertility

Katsumi Kaneko, Yuki Yoshi Tabata,
Keiichiro Mukae, Tetsuya Arai,
Mikihiko Honda, Toru Suzuki,
Isao Murahashi and Etsuji Takasaki

Department of Urology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan
(Director: Prof. E. Takasaki)

A clinical and statistical analysis was performed in 188 infertile male patients who had visited to our clinic from July of 1974 to December of 1986.

An incidence rate of infertile patients was 2.4% as compared to that of the total male out-patients. The peak of patient's age ranged from 26 to 35 years old. The period of infertility after marriage was all within 5 years, and its mean period was 2.9 years. Most of the patients (82.4%) had unknown causes, whereas approximate 17% of patients had some causes such as varicocele testis (5.3%), bilateral orchitis (4.3%) and so on. In semen analysis, 71 patients showed azoospermia.

The 67 of these 188 patients receiving medication were divided into 5 groups; and followings were results.

group 1: HCG+HMG

The percentages of improvement about sperm count and motility were 8.3% and 16.7% respectively, and pregnancy occurred in 2 cases.

group 2: Serotropin

The percentages of improvement about sperm count and motility were 25% and 5% respectively, and pregnancy occurred in 3 cases.

group 3: Vit. B1, 6, 12+Vit. E+Kallikrein

The percentages of improvement about sperm

count and motility were 37.5% and 18.8% respectively, and pregnancy occurred in 3 cases.

group 4: Vit. B₁, 6, 12+Nicoml+Pentoxifylline+Kakkikrein

The percentages of improvement about sperm count and motility were 10% and 10% respectively, and pregnancy occurred in 1 case.

group 5: Thyroid hormon+Vit. E

The percentages of improvement about sperm count and motility were 11% and 11% respectively, and pregnancy did not occur in any case.

(受付: 1988 年 5 月 13 日)

Chordee without Hypospadias

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	角 谷 秀 典	石 井 弘 之
Hideki FUSE	Hidenori SUMIYA	Hiroyuki ISHII
高 原 正 信	始 関 吉 生	島 崎 淳
Masanobu TAKAHARA	Yoshio SHISEKI	Jun SHIMAZAKI

Department of Urology, School of Medicine,
Chiba University, Chiba 280, Japan
(Director: Prof. J. Shimazaki)

Chordee without Hypospadias 7例につき臨床的検討を加えた。主訴は陰茎の腹側への屈曲6例、排尿異常1例であった。既往歴に特記すべきものはなかった。出生時の父の年齢がやや高令であった。染色体型は、5例が46XYと正常男子型、1例が46XY, inv(9p+, q-)であった。4例は、尿道海綿体、Buck氏筋膜およびdartos筋膜を欠き、Devine & Hortonの分類の1型に相当した。1例は尿道海綿体をみとめたが、後2者を欠き、同分類の2型であった。1型のものは、chordeeとともに尿道を摘除し、後に尿道形成術を施行した。2型の1例はChordeeのみの摘除により尿道屈曲が是正された。以上、本症の発生学的重症度を決定し、それに応じた術式を選択することが重要と考えた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 235-239, 1989)

緒 言

外尿道口が陰茎亀頭の正常部位に開口し、陰茎が腹側に屈曲する奇形は、Chordee without hypospadiasと呼ばれる。本症は、尿道下裂の約4%を占めるといわれており、比較的稀れな疾患といえる^{1,2)}。今回、千葉大学における本症例について検討したので報告する。

対象および方法

昭和51年～62年の間にChordee without hypospadias 7例がみられたので、その臨床像をみた。手術は原則として3～4歳に施行した。本症をDevine & Horton³⁾に従って3型に分類し、それに応じた術式を選択した。尿道形成術は、皮膚管法⁴⁾にておこなった。

結 果

主訴：陰茎の屈曲が6例、1例は排尿異常を主訴とした (Table 1)。

既往歴：喘息および左中耳炎をそれぞれ1例にみ

たが、他例には特記すべきものはなかった。母親が妊娠中、流産防止のため黄体ホルモンの投与をうけたものが1例あった。

出生時父母年齢：両親とも18歳であった1例を除いて父30～36歳、母26～29歳であり、前者がやや高齢の傾向をみた。

外陰部所見：4例は外尿道口が亀頭の正常部位に開口していたが (Fig. 1)、他3例は亀頭冠状溝に開口していた (Fig. 2)。陰茎は、いずれも腹側に屈曲していた。睪丸は、いずれの例も両側とも陰嚢部に触知した。

染色体検査：6例に施行し、5例は46XYと正常男子型であったが、46XY, inv(9p+, q-)のものが1例あった。しかし、この例も奇形の程度は他と変りはなく、またその他の泌尿器系臓器奇形はなかった。

手術所見：症例1；陰茎屈曲部の尿道周囲に線維性のchordeeがあった (Fig. 3)。それを摘除すると陰茎の腹側への屈曲が是正された。尿道は海綿体に囲まれており、Devine & Hortonの分類の2型に相当した (Table 1)。

Table. 1 症例概要

症例	年齢	主訴	既往歴	出生時 父 母 年 齢		母親, 妊娠中 ホルモ ン剤服 用	染色 体型	病 型 (Devine & Horton による)	一次手術	二次手術	術 後 合併症
				父	母						
1	9 歳	陰茎屈曲	(-)	30	26	(+)	46XY	2 型	chordee 摘除	—	(-)
2	1 ヲ月	陰茎屈曲	(-)	33	26	(-)	46XY	1 型	尿道および chordee 摘除	尿道形成術	尿瘻
3	3 ヲ月	陰茎屈曲	(-)	36	28	(-)	46XY				
4	1歳1 ヲ月	陰茎屈曲	(-)	35	28	(-)					
5 *	3 歳	陰茎屈曲	喘息	30	28	(-)	inv 46XY (9p+,q-)	1 型	尿道および chordee 摘除	尿道形成術	(-)
6 *	4 歳	陰茎屈曲	(-)	30	28	(-)	46XY	1 型	尿道および chordee 摘除	尿道形成術	(-)
7 *	4 歳	排尿異常	左中耳炎	18	18	(-)	46XY	1 型	尿道および chordee 摘除	予 定	(-)

* 外尿道口，冠状溝に開口



Fig. 1 症例 1 の外陰部所見

外尿道口は亀頭の正常部位に開口していたが，陰茎は腹側に屈曲していた。ゾンデは外尿道口を示す。

症例 2；尿道が海綿体を欠き，尿道粘膜のみからなっており，前述の分類の 1 型であった。尿道の剥

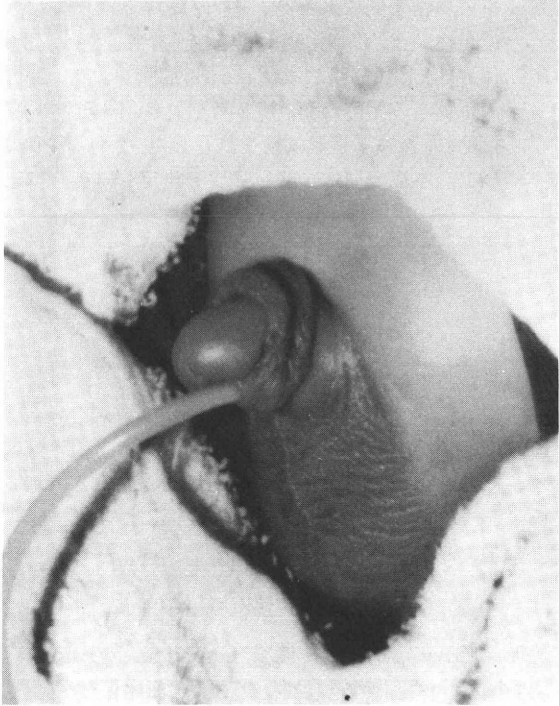


Fig. 2 症例 7 の外陰部所見

陰部の腹側への屈曲をみとめた。外尿道口は，亀頭の冠状溝に開口していた。

離を試みたが，一部損傷したため，亀頭部尿道および尿道海綿体に囲まれた近位部尿道を残し，chordeeとともに海綿体を欠く尿道を摘除した。さらに Nesbit 法⁵⁾に準じて背面皮膚を腹側へ移動した。6 ヲ月後，亀頭部尿道と近位部尿道との間に尿道を形成した

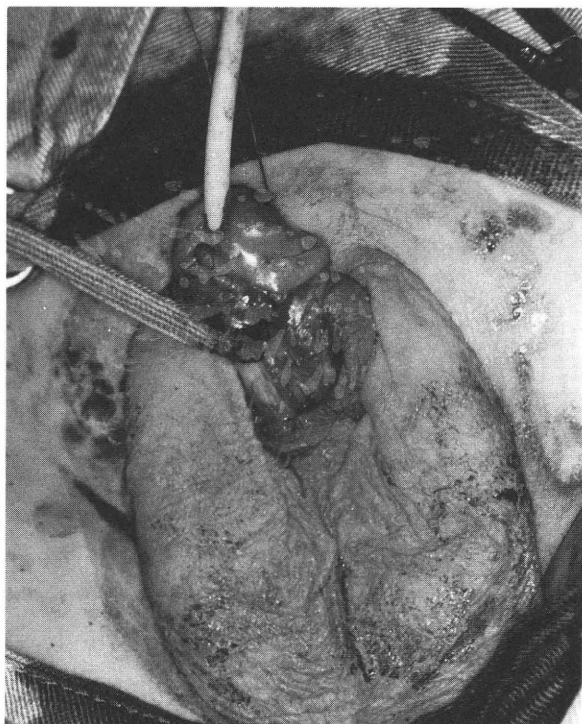


Fig. 3 症例 1 の手術時所見

尿道周囲の chordee を摘除すると海綿体に囲まれた尿道が現われ、陰茎の屈曲が是正された。

(Fig. 4).

症例 5, 6 および 7 ; 尿道は尿道粘膜のみよりなっており、海綿体を欠いており 1 型であった。chordee とともに尿道を摘除した。その後、尿道形成術を施行した。

術後経過 : 症例 1 は、術後 7 年経過するが、陰茎の屈曲なく、排尿も正常である。症例 2 は、陰茎の腹側への屈曲は、是正されたが、新尿道と亀頭部尿道との吻合部に尿瘻が生じた。外尿道口と尿瘻との距離が 3mm と短かったので、両者間を切離した。6 年経過した現在、排尿に異常なし。症例 5, 6 および 7 は、いずれも陰茎屈曲は改善した。尿道形成術をおこなった前 2 者は、それぞれ術後 1 年 2 カ月、1 年経過した現在、尿瘻、尿道狭窄等の合併症をみていない。

考 按

Chordee without hypospadias は、1926 年、Sievers が最初に記載した疾患である⁶⁾。本症を外尿道口が亀頭の正常部位にあるもののみに規定する場合と、外尿道口の位置が冠状溝までにあれば本症を含むとする意見がある⁷⁾。われわれは、外尿道口の位



Fig. 4 症例 2 の尿道形成術後

尿道および chordee 摘除を施行後、6 ヶ月で尿道形成術を施行した。

置が冠状溝まであれば、その位置の相違は、本質的なものではないと考え、後者に従った。ちなみに自験例では、4 例は、外尿道口が亀頭の正常と思われる位置に、3 例は冠状溝に開口していた。

ヒト男子尿道の発生は⁸⁾、胎生 8 週から生殖結節がアンドロゲンの働きにより陰茎となり、その後方に位置する尿生殖溝上で生殖ヒダの末端がゆ合して尿道が形成される。次に尿道周囲の間葉組織が発達して尿道海綿体、Buck 氏筋膜および dartos 筋膜の順で正常な尿道が完成する。なお chordee は発生の途中で存在するもので、胎生 16 週～20 週で最大となり、漸次縮小するといわれている⁹⁾。ちなみに早産児では、Chordee が存在し陰茎が腹側に屈曲しているが、生後しだいに消失していくという。

尿道およびその周囲組織の形成は、先に述べた如く、アンドロゲンの作用により行なわれるので、その作用に影響する薬物などは、本症の発生に関与する可能性がある。自験例でも症例 1 の母親に黄体ホルモン服用の既往があった。ちなみに本剤と尿道下裂の発生との関連が指摘されている¹⁰⁾。

Devine & Horton³⁾は、尿道周囲の間葉組織の発生障害の様式により本症を 3 型に分類した。すなわ

ち 1 型は、尿道は存在するが、尿道海綿体、Buck 氏筋膜および dartos 筋膜が発達せず、これらが chordee となったもので、もっとも障害の強い型といえる。Hurwitz ら⁷⁾は、この 1 型がもっとも頻度が高かったとしたが、自験例も 80 % が 1 型であった。2 型は、尿道および尿道海綿体が存在するが Buck 氏筋膜および dartos 筋膜を欠くものである。3 型は尿道、尿道海綿体および Buck 氏筋膜まで存在するが、dartos 筋膜が発育せず chordee となったものである。なお Kramer ら¹¹⁾は、陰茎海綿体の背側と腹側の発育が不均衡のため腹側に屈曲をきたしたものを 4 型としており、本邦でも何例かの報告をみる¹²⁻¹⁶⁾。この 4 型は、前に述べた 1 ~ 3 型と発生機転を異にしているが、両者が合併することもあるので、chordee を欠くが、広義には本症に含めてもよいであろう。

治療は勃起時、屈曲のため性交障害をきたすものないし将来、その恐れのあるものに対して行なわれる。その際、症例の発生学的重症度を決定し、それに応じた術式を選択することが重要である。

1 型で外尿道口が亀頭の正常部位にある場合は、まず海綿体を欠く尿道の剥離および chordee の摘除を試みる。しかし、このような尿道を損傷せずに剥離することは困難であり、chordee とともに尿道を摘除せざるをえない場合が多く¹⁷⁾、自験の症例 2 も尿道の剥離時、損傷をきたし摘除となった。尿道を摘除した場合は、尿道形成術が行なわれるが、合併症として尿瘻や尿道憩室が報告されており、自験の症例 2 も尿瘻をきたした。一方、このような海綿体を欠く尿道が保存できた場合でも、将来、尿道狭窄や尿道短縮による陰茎屈曲の再発もいわれており^{17,18)}、十分な経過観察が必要である。

次に 1 型で外尿道口の後退をみるものは、海綿体を欠く尿道を chordee とともに摘除とするのが大方の意見であり¹⁸⁾、自験 3 例もそれに従った。

2 型および 3 型は尿道の剥離が比較的容易であり、尿道の伸展性もあるので、chordee の摘除により陰茎の屈曲が是正されることが多い。自験の症例 1 も chordee の摘除により満足のゆく結果をえた。

4 型に対しては、陰茎背側の白膜の縫縮¹⁹⁾がおこなわれ、良好な成績が報告されている^{15,20,21)}。その場合、背側の神経血管束を損傷しないよう注意を要する。なお 2 型および 3 型で chordee の摘除によっても陰茎屈曲が改善されない場合は、同様な方法が試みられる。

結 語

chordee without hypospadias 7 例を経験した。

治療に際し、その症例の発生学的重症度を決定し、それに応じた術式を選択することが重要と思われた。

本論文の要旨は、第 7 回日本アンドロロジー学会において発表した。

文 献

- 1) Culp, O. S.: Struggles and triumphs with hypospadias and associated anomalies: Review of 400 cases. *J. Urol.*, 96: 339-351, 1966
- 2) 生駒文彦, 島 博基, 藪元秀典: 尿道の合併症と予後成績. *小児医学*, 14: 448-467, 1981
- 3) Devine, Jr. C. J. & Horton, C. E.: Chordee without hypospadias. *J. Urol.* 110: 264-271, 1973
- 4) 伊藤晴夫, 村上光石, 宮内大成, 川村健二, 布施秀樹, 山口邦雄, 片海善吾, 島崎 淳: 尿道下裂の手術成績—最近試みた改良法について—, *西日泌尿*, 45: 555-558, 1983
- 5) Nesbit, R. M.: Plastic procedure for correction of hypospadias. *J. Urol.*, 45: 699-702, 1941
- 6) Sievers, R.: Cited by Huffstadt, A. J. C. and Bouman, F. G.: Congenital short urethra without hypospadias. *Arch. Chir. Neerl.* 15: 104-110, 1963
- 7) Hurwitz, R. S., Ozersky, D. and Kaplan, H. J.: Chordee without hypospadias: Complications and management of the hypoplastic urethra. *J. Urol.* 138: 372-375, 1987
- 8) 木川源則, 大島博幸: 性の分化と異常. p 30, 医歯薬出版, 東京, 1983
- 9) Kaplan, G. W. & Lamm, D. L.: Embryogenesis of chordee. *J. Urol.*, 114: 769-772, 1975
- 10) Aaskog, D.: Maternal progestins as a possible cause of hypospadias. *New Engl. J. Med.* 300: 75-78, 1979
- 11) Kramer, S. A., Aydin, G. and Kelalis, P. P.: Chordee without hypospadias in children. *J. Urol.*, 128: 559-561, 1982
- 12) 新島端夫, 西 光雄, 平野 学, 池 紀征, 石 正臣: 先天性陰茎腹側彎曲症の手術治験例. *手術*, 31: 1005-1007, 1977
- 13) 中島幹夫, 辻村玄弘, 横関秀明: 先天性陰茎湾曲症の 2 例. *西日泌尿*, 40: 913-915, 1978
- 14) 松村陽右, 西 光雄, 後藤喜夫, 新島端夫: 陰茎湾曲症の手術——3 例の経験——. *日泌尿会誌*, 69: 408, 1978
- 15) 荒木 徹, 沖宗正明, 松元鉄二: 先天性勃起時陰茎湾曲症の 1 例. *臨泌*, 38: 157-159, 1984
- 16) 成田晴紀, 三宅弘治, 三矢英輔: 先天性陰茎湾曲症の 3 例. *日不妊会誌*, 30: 130-135, 1985
- 17) Cendron, J. and Melin, Y.: Congenital curvature of the penis without hypospadias. *Urol. Clin. N. Amer.* 8: 389-395, 1981

- 18) Hurwitz, R. S.: Chordee without hypospadias. *Dial. Ped. Urol.*, 9: 1, March, 1986
- 19) Nesbit, R. M.: Congenital curvature of the phallus; Report of three cases with description of corrective operation. *J. Urol.* 93: 230-232, 1965
- 20) Persky, L., Hoffman, A., DesPrez, J.: The repair of chordee without hypospadias. *J. Urol.* 98: 216-218, 1967
- 21) Bennett, A. H. and Gittes, R. F.: Congenital penile curvature without hypospadias. *Urology*, 16: 364-366, 1980

Chordee without hypospadias

Hideki Fuse, Hidenori Sumiya,
Hiroyuki Ishii, Masanobu Takahara,
Yoshio Shiseki and Jun Shimazaki

Department of Urology, School of Medicine,
Chiba University, Chiba 280, Japan
(Director: Prof. J. Shimazaki)

Clinical observations on 7 cases of chordee without hypospadias were performed. Six cases had chief complaints of ventral curvature of the penis and one case had a chief complaint of disturbance of miction. The ages of their fathers at their birth were rather high. Their karyotypes were 46 XY and 46 XY, inv (9p+,q-) in 5 cases and one case, respectively. Four cases had type I, the urethral spongiosum, Buck's fascia and the Dartos layer being deficient. One case had a type II urethra, in which the spongiosum is normal but Buck's fascia and the dartos layer are absent. In the cases of type I, their chordee and urethrae were resected and thereafter urethroplasty was performed. One case of type II underwent the resection of chordee and the curvature of the penis was corrected. It was concluded that it was important to select the surgical procedure according to the type of lesion present.

(受付: 1988年7月8日)

男性不妊症に対するペントキシフィリン及び 塩酸ニカルジピンの効果

Effects of Pentoxifylline and Nicardipine Hydrochloride on Male Infertility

名古屋大学医学部産婦人科学教室

中 村 潔 史	水 谷 哲 也	小 栗 久 典
Kiyoshi NAKAMURA	Tetsuya MIZUTANI	Hisanori OGURI
菅 沼 信 彦	石 原 豊	友 田 豊
Nobuhiko SUGANUMA	Yutaka ISHIHARA	Yutaka TOMODA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagoya University School of Medicine, Aichi 461, Japan

名古屋大学医学部分院産婦人科学教室

近 藤 育 代	林 隆 行	木 村 敏 男
Ikuyo KOMDOH	Takayuki HAYASHI	Toshio KIMURA
松 沢 克 治	大 沢 正 己	成 田 収
Katsuji MATUZAWA	Masami OHSAWA	Osamu NARITA

Department of Obstetrics and Gynecology, The Branch Hospital,
Nagoya University School of Medicine

名古屋大学医学部泌尿器科学教室

三 宅 弘 治
Koji MIYAKE

Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

精子濃度が60%未満の精子無力症の男性不妊患者に対してペントキシフィリン300mg/日、または塩酸ニカルジピン60mg/日の内服治療を試みた。投与前と投与後75日以上経過した時点での精液所見について、精液量、精子濃度、運動率、総運動精子数を比較検討し、結果を得た。

1. ペントキシフィリン投与21例中6例(28.6%)に、また塩酸ニカルジピン投与32例中3例(9.4%)に妊娠の成立を見た。

2. ペントキシフィリン投与群では総運動精子数の有意な上昇($P=0.028$)がみられ、塩酸ニカルジピン投与群では精子運動率の有意な改善($P=0.001$)がみとめられた。

3. ペントキシフィリン投与にて妊娠した症例の中にはasthenozoospermiaの症例が一例含まれていた。

以上のことから、ペントキシフィリン及び塩酸ニカルジピンは精子無力症に対して有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 240-245, 1989)

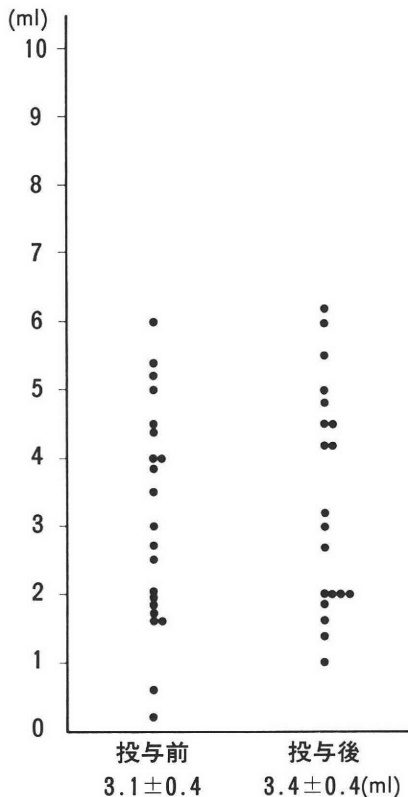


図1 ペントキシフィリン投与による精液量の変化

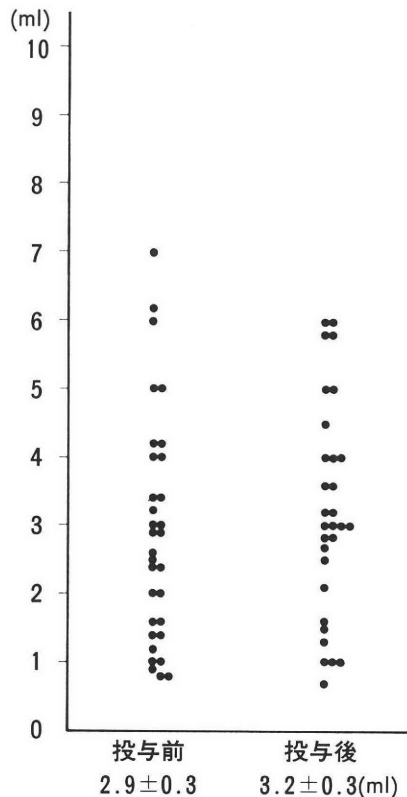


図2 塩酸ニカルギン投与による精液量の変化

緒 言

不妊夫婦の原因の30%は男性側に存在し、20%は男性と女性双方に起因するといわれ、男性因子をあわせて50%に及ぶ¹⁾。男性不妊の大半を占める azoospermia, oligozoospermia, asthenospermia に対する治療は、未だ確立されておらず A I H, または薬物療法がいろいろと試みられてきた。このうち薬物療法としては、抗エストロゲン剤、アロマターゼ阻害剤、ゴナドトロピン製剤、ゴナドトロピン放出ホルモン、テストステロン、カリクレイン、漢方薬、ATP、ビタミンB₁₂などが用いられてきた。しかし、残念ながら満足な結果が得られていないのが現状と思われる。今回我々は、主に脳環境改善剤として用いられるペントキシフィリンおよび降圧剤である塩酸ニカルギンを男性不妊症患者に投与し、その臨床効果を精液所見を中心に検討したのでここに報告する。

対象と方法

1986年1月より1987年12月までに名古屋大学医

学部付属病院産婦人科外来を受診した不妊夫婦のうち、精液所見が運動率60%未満の精子無力症と診断された53例を対象とした。不妊期間は1年4カ月から12年で、夫の年齢は、25歳から37歳であった。このうち21例に対しては、ペントキシフィリンを1日300mg連日経口投与し、また他の32例に対しては塩酸ニカルギン1日60mg連日経口投与した。投与前と内服開始後75日以上経過した時点を投与後として、5日間以上禁欲の後、手取的に採取した精液の量、精子濃度、運動率、及び総運動精子数(精液量×精子濃度×運動率)を比較検討した。統計処理は Student t test を用い数値は Mean±SE で示した。

成 績

1. 精液量 (図1, 図2)

ペントキシフィリン投与前 3.1 ± 0.4 ml より投与後 3.4 ± 0.4 ml, そして塩酸ニカルギン投与前 2.9 ± 0.3 ml より投与後 3.2 ± 0.3 ml と上昇傾向を示したが、統計学上有意な差は認められなかった。

2. 精子濃度 (図3, 図4)

ペントキシフィリン投与前 $(36.6 \pm 7.9) \times 10^6$ /ml よ

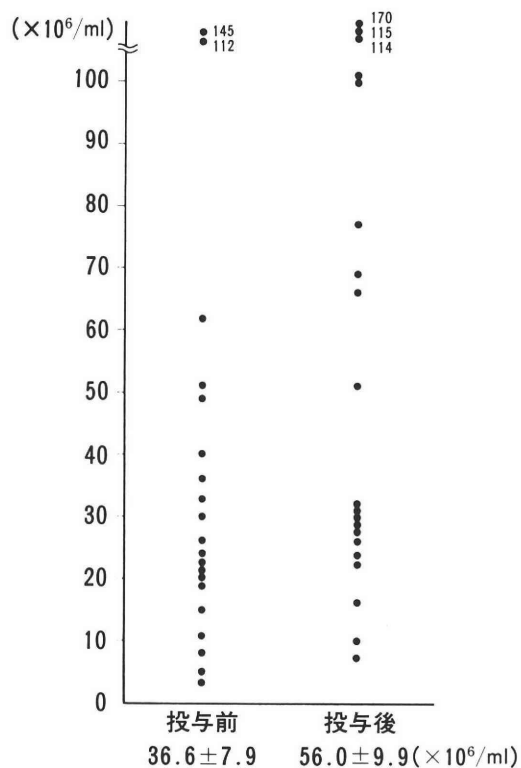


図3 ペントキシフィリン投与による精子濃度の変化

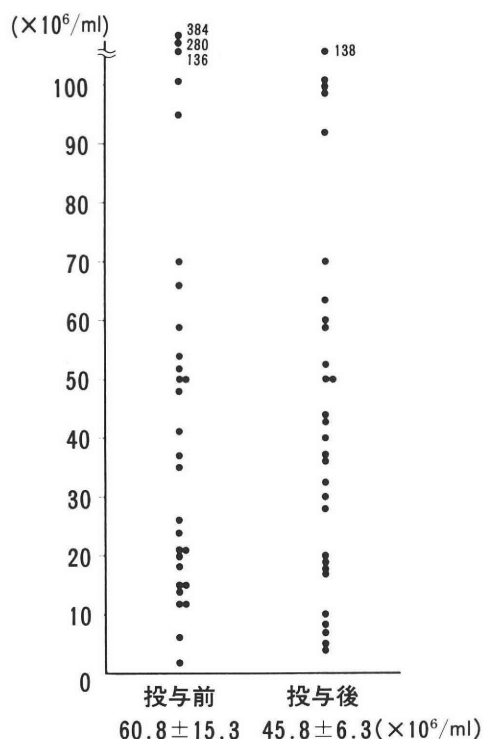


図4 塩酸ニカルジピン投与による精子濃度の変化

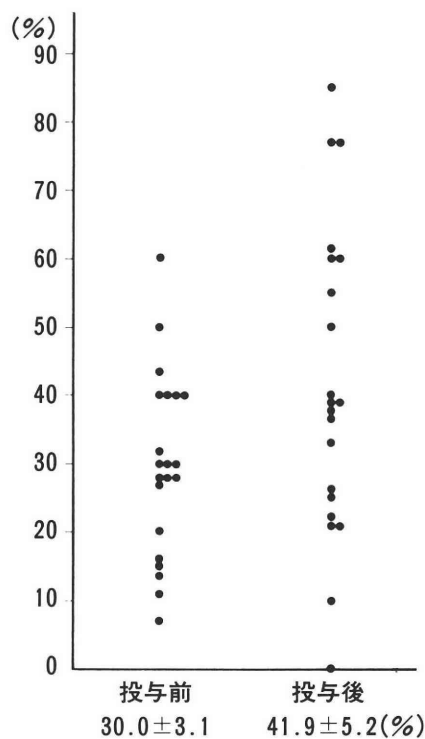


図5 ペントキシフィリン投与による運動率の変化

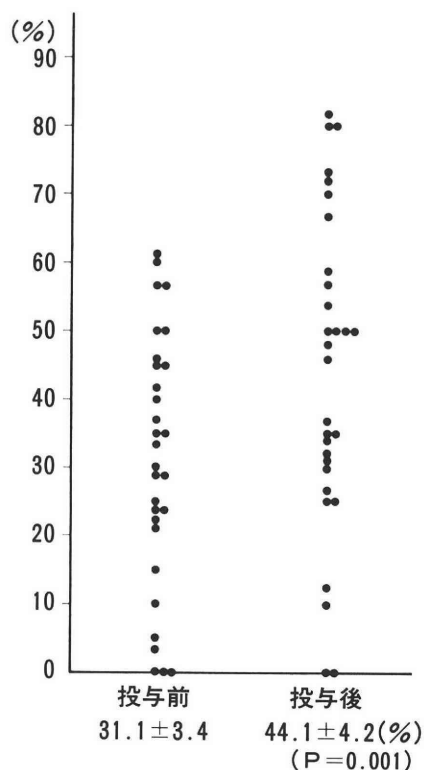


図6 塩酸ニカルジピン投与による運動率の変化

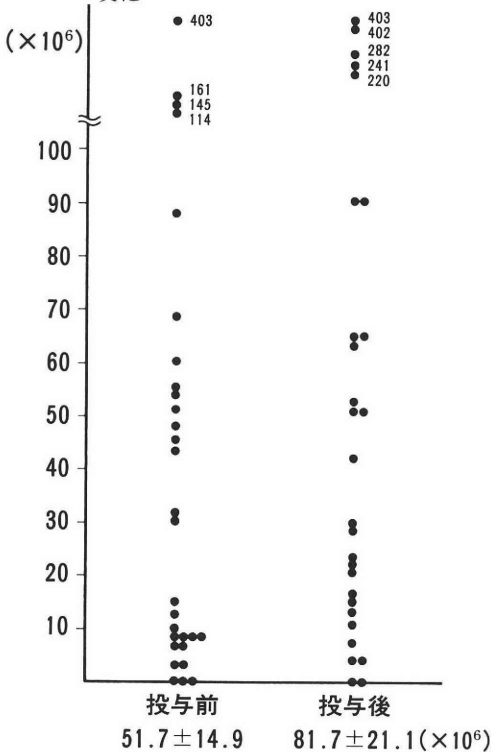
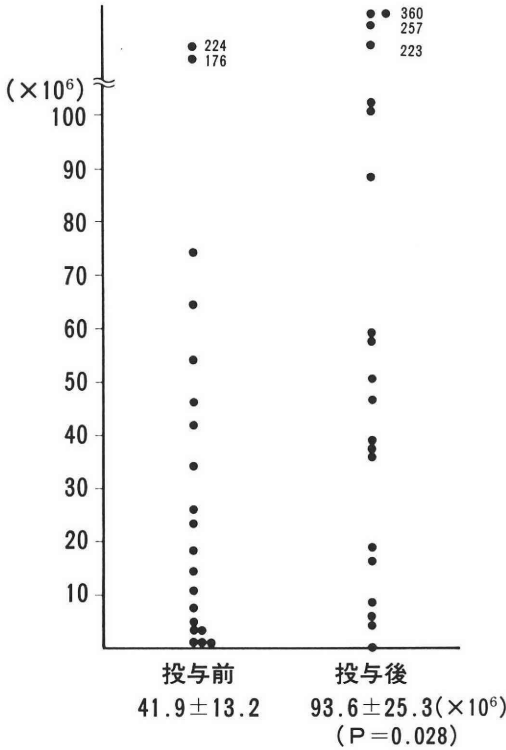


図8 塩酸ニコルジピン投与による総運動精子数の変化

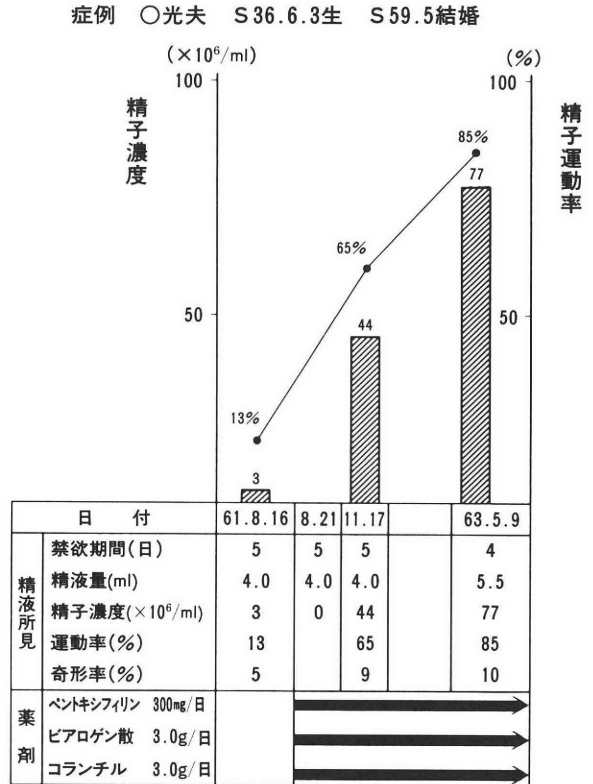


図9 ペントキシフィン投与により妊娠した1例

り投与後 $(56.0 \pm 9.9) \times 10^6/\text{ml}$ と改善傾向を認めた。塩酸ニコルジピン投与群では32例中15例で低下したが、投与前値の大きなものが含まれていたためと思われる。いずれも統計学上有意差はなかった。

3. 運動率 (図5, 図6)

注目した運動率であるが、ペントキシフィン投与前 $30.0 \pm 3.1\%$ であったものが投与後 $41.9 \pm 5.2\%$ と改善傾向を示した。妊娠例も6例中3例は投与後に著明に改善し投与前の2倍以上となっている。統計学上有意差はなかった。塩酸ニコルジピンは、投与前 $31.1 \pm 3.4\%$ であったものが $44.1 \pm 4.2\%$ と投与後は、やはり上昇傾向を認め、32例中25例に改善がみられ統計学上有意差 ($P=0.001$) を認めた。しかし、運動率0%であった3例は殆んど変化はみられなかった。

4. 総運動精子数 (図7, 図8)

ペントキシフィリン投与前 $(41.9 \pm 13.2) \times 10^6$ であったものが投与後 $(93.6 \pm 25.3) \times 10^6$ となり、21例中16例に改善がみられ、統計学上有意差 ($P=0.028$) を認めた。塩酸ニコルジピンは投与前 $(51.7 \pm 14.9) \times 10^6$ が投与後 $(81.7 \pm 21.1) \times 10^6$ となったが有意差

はなかった。

5. ペントキシフィリン、及び塩酸ニカルジピン投与後の妊娠例

ペントキシフィリン投与 21 例中 6 例 (28.6%), 塩酸ニカルジピン投与 32 例中 3 例 (9.4%) に妊娠の成立をみた。

6. ペントキシフィリン投与により妊娠した 1 例 (図 9)

ペントキシフィリン投与後、著明に精液所見が改善し、妊娠に至った症例を紹介する。

夫 26 歳、妻 24 歳、昭和 60 年 5 月結婚。以後妊娠せず昭和 61 年 1 月、当科を受診した。夫には Mumps の既往があり、妻には軽度の月経不順をみとめた。夫は諸検査にて azoospermia と診断された。以後、A I H にて加療すると同時に昭和 61 年 8 月 17 日よりペントキシフィリン 300mg/日を連日投与開始した。投与前、精子濃度 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 13% であったが投与後 3 カ月目には、それぞれ $44 \times 10^6/\text{ml}$ 、65% と著明に改善し昭和 62 年 5 月、投与後 8 カ月目で自然性交により妊娠した。

考 察

メチルキサンチン誘導体であるペントキシフィリンは、本邦では脳循環改善剤として主に用いられており、細胞のフォスフォジエステラーゼを阻害しサイクリック AMP を増加させる作用のあること、及び赤血球変形能改善、血漿フィブリノーゲン低下などにより抹消循環を改善させる作用のあることが知られている。ヨーロッパでは以前より、メチルキサンチン誘導体には、asthenospermia に対する精子活性化作用のあることが知られ、中でもペントキシフィリンは、作用時間の長いことと水溶性の高いことから男性不妊治療薬として使われ、その有用性や作用機序に関しての報告がみられる。

Turner らは、健康男性の精液にフルクトースを加え、これに濃度が 0.6mM となるようにサイクリック AMP、ペントキシフィリンを添加したところコントロール群に比べこの 2 群では、添加後 4 時間で有意に活動前進精子の割合が高く、いずれも精子の活動時間の延長していることを明らかにした²⁾。更に APARICO らは、asthenospermia の患者の精液に濃度が 0.15, 0.30, 0.60mM となるようにペントキシフィリンを添加し、0.30 及び 0.60mM の濃度の 2 群で添加 2 時間後、4 時間後にはコントロール群に比べ有意に運動精子数の多いことを示し、同じく精子の活動時間の延びることを明らかにした³⁾。また、彼らは、oligoasthenospermia の症例にペントキシフィリン 1

日 1200mg を 4 ~ 12 カ月間投与し、良好な前進運動精子をはじめ運動精子数の著明な増加を認めている⁴⁾。

Heite らは、oligoasthenospermia の症例に 1 日 1200mg を 6 ~ 9 カ月間投与し、精子濃度、運動率、奇形率に関し著明な改善をみた。彼らは、ペントキシフィリンは微小循環を改善し、精巣上体と更に血管の豊富な精巣の機能に好影響を及ぼし精子濃度、運動率の上昇をもたらすと考えた⁵⁾。

また、Wang らは、idiopathic oligozoospermia の症例に 1 日 1200mg のペントキシフィリンを 6 カ月にわたって投与したが、精子濃度と運動率はいずれも有意な変化がみられなかったと報告した⁶⁾。これに対して、Maramba は Wang らの報告から最近ペントキシフィリンの効果を見直す目的で oligoasthenoteratospermia の症例に対し、同じく 1 日 1200mg を 6 カ月間投与したところ、精子濃度と運動率の著明な改善がみられ、14% が妊娠したと述べている。また、ペントキシフィリン投与例の精液中の ATP の低下、フルクトースの上昇を示し、ペントキシフィリンのフォスフォジエステラーゼ阻害作用により精子中のサイクリック AMP が上昇し ATP が低下、及び性嚢上皮中のフルクトース産生が増加し精子の代謝に影響すると推論している⁷⁾。

このように精子濃度、運動率の改善がみられるという報告が多い。我々の成績は、対象例を運動率 60% 未満としたことや、投与量が 1 日 300mg などの対象、方法の異なる点はあるものの総運動精子数の有意な上昇を認め、28.6% の妊娠成立をみたことから、これらにほぼ準じた結果であったと考える。

さて一方、塩酸ニカルジピンであるが、これはカルシウム拮抗剤であり脳循環改善、血圧下降を目的として使用されるのが一般的である。しかし、その薬理作用には、フォスフォジエステラーゼ抑制作用や赤血球変形能改善も報告されており^{8,9)}、カルシウム拮抗剤ではあるが、ペントキシフィリンと同様の効果を期待して投与してみた。妊娠率は、9.4% であったが、運動率は著明に改善した。有用な薬剤と考えられるが、まだ男性不妊症に対する報告はないために今後さらに十分症例を重ね、検討が必要と思われる。

男性不妊に対し確立した治療を欠く現在、精子運動能の改善を目的としてペントキシフィリン、塩酸ニカルジピンを投与することは十分に意義のあるものと考ええる。特にペントキシフィリンは、妊娠例で示したように重症例にも有効であると思われる。今後、更に投与の適応基準、投与量などの検討が必要であろう。

文 献

- 1) Lipschultz LI, Howards SS: Evaluation of the subfertile man. Infertility in the Male. New York, Churchill Livingstone, 1983
- 2) Turner, E. A. de., Aparicio, M, J., Turner D., Schwarzsstein, L.: Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate and a B-blocking agent on human sperm motility, Feertil. Steril. 29: 328, 1978
- 3) Aparico. N. J., E. A. de Turner, L. Schwarzsstein and D. Turner: Effect of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline on human sperm motility. andrologia 12: 49-54, 1980
- 4) Aparico, N. J., L. Schwarzsstein and E. a. de Turner: Pentoxifylline (BL191) by oral administration in the treatment of asthenozoospermia. andrologia 12: 228-231, 1980
- 5) Heite, H. J.: The effect of Trental on spermio-graphic parameters, a clinical study in patients with reduced fertility, Singapore Med. j. 20: 38, 1979
- 6) Wang, C., C. W. Chang, K. K. Wong and K. K. Yeung.: Comparison of the effectiveness of placebo, clomiphene citrate, mesterolone, pentoxifylline and testosterone rebound therapy for the treatment of idiopathic oligospermia. Fertil. Steril. 40: 358-365, 1983
- 7) Marama P, Baraghini GF, Carani C, et al: Further studies on the effects of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligoasthenozoospermia. Andrologia 17: 612-616, 1985
- 8) 竹中登一: 東邦医学雑誌, 26, 48, 1979
- 9) 永川祐三 他: 脈管学, 26, 1105, 1986

**Effect of pentoxifylline
and nicardipine hydrochloride
on male infertility**

Kiyoshi Nakamura, Tetsuya Mizutani,
Hisanori Oguri, Yutaka Ishihara
and Yutaka Tomoda

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagoya University School of Medicine
Aichi, 461 Japan

Ikuyo Kondoh, Takayuki Hayashi,
Toshio Kimura, Katwuji Matsuzawa,
Masami Ohsawa and Osamu Narita

Department of Obstetrics and Gynexology,
The Branch Hospital,
Nagoya University School of Medicine,

Koji Miyake

Department of Urology,
Nagoya University School of Medicine

We tried to study the effects of pentoxifylline or nicardipine hydrochloride administration to patients with asthenospermia (below 60%) over a period of 75 days. Fifty-three infertile men (age 25 to 37 years) were incorporated. And twenty-one cases were treated with pentoxifylline 300mg daily per oral, another thirty-two cases were treated with nicardipine chloride 60mg daily orally. Semen volume, sperm concentration, sperm motility, and total motile sperm number (semen volume x concentration x motility) were determined before therapy, as well as after therapy. Pentoxifylline therapy significantly increased total motile sperm number from 41.9×10^6 to 93.6×10^6 ($p=0.028$). Nicardipine chloride therapy significantly improved sperm motility from 31.1 to 44.1% ($p=0.001$). Pregnancy was obtained by 6 patients (28.6%) with pentoxifylline treatment and 3 patients (9.4%) with nicardipine chloride treatment. Either pentoxifylline or nicardipine chloride could be a useful treatment of patient with asthenospermia.

(受付: 1988 年 5 月 9 日)

Clomiphene-hMG 刺激周期を利用した Percoll 洗浄精子による AIH

Artificial Insemination with Washed Spermatozoa During Clomiphene Citrate and Human Menopausal Gonadotropin-Stimulated Superovulatory Cycles

秋田大学医学部産科婦人科学教室

児 玉 英 也	加 藤 充 弘	福 田 淳
Hideya KODAMA	Mitsuhiro KATO	Jyun FUKUDA
一 関 和 子	福 島 峰 子	真 木 正 博
Kazuko ICHINOSEKI	Mineko FUKUSHIMA	Masahiro MAKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita University School of Medicine, Akita 010, Japan

秋田組合総合病院産婦人科

太 田 博 孝
Hirotaka OTA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita Union General Hospital

難治性の男性因子や頸管因子による不妊夫婦に対して、Clomid-hMG 刺激周期を利用した Percoll 洗浄精子(単層 Percoll, 50%) による AIH を施行した。28 組 59 周期の治療の結果、稽留流産 1 例、子宮外妊娠 1 例を含む 9 例に妊娠が成立し、妊娠率は症例当り 32.1%, 周期当り 15.2% であった。男性不妊例では、Percoll 法により少なくとも $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上(範囲 38×10^6 から 99×10^6) の運動精子が媒精可能であった周期に妊娠が成立しており、妊娠周期 6 例の運動精子濃度の平均濃縮率は 3.6 倍であった。運動精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の症例では殆ど精液所見の改善が認められず、妊娠例もなかった。精子不動化抗体陽性例の妊娠は認めなかった。卵巣刺激法からは、hCG 投与時の血中 E_2 値が $1000 - 2500 \text{ pg/ml}$ の範囲で妊娠例が集中していた。Clomid 投与後 hMG を隔日投与する方法と連日投与する方法で、過激刺激周期の頻度、妊娠率に有意差は認めなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 246-251, 1989)

緒 言

男性因子や頸管因子等による不妊では、その治療の一手段として AIH (artificial insemination of husband's sperm) が試みられる^{1,2)}。しかし、その治療効果は満足できるものではなく、自然の妊娠率と差がないとする報告すら存在する²⁾。これに対して近

年、主に IVF (*in vitro* fertilization) の経験で得られた技術を導入することにより、AIH の成績が向上することが報告され、注目されている³⁻⁷⁾。すなわち、IVF において一般的な刺激周期の利用と、優良精子回収法の導入である。それにより、排卵期により多くの受精能力の高い精子を高濃度に子宮内に注入することが可能となり、また排卵する卵子を増

加させることにより受精および着床のチャンスが増加すると考えられる。当科において、従来のA I Hの治療で妊娠しえなかった男性因子、頸管因子の不妊症患者に対して、CC (clomiphene citrate) -hMG (human menopausal gonadotropin) 刺激周期を利用して、Percoll法により選択された優良精子を用いたA I Hを試みた。その結果、有意な妊娠率の改善が認められたので、今回その成績を、特に妊娠例の背景因子の検討を中心に分析したので報告する。

方 法

当科不妊外来で、男性因子、頸管因子による不妊原因で通常のA I Hを3-4回以上施行しても妊娠しなかった症例を適応とした。男性因子の診断は、少なくとも2回以上の精液検査において、精子濃度 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下または活動率35%以下の両方またはいずれかを満足した症例とした。なお、これら男性に対しては、その精液所見の改善の目的のため、A I H施行期間中に補中益気湯や八味地黄丸等の漢方薬を内服させた。頸管因子は、男性因子が存在しないにもかかわらず、少なくとも2回以上の性交後試験の成績が不良であることにより診断した。また、子宮卵管造影および腹腔鏡により、卵管因子および子宮内膜症(A F S分類II期以上)の存在が認められた例は、今回の検討から除外した。以上の診断基準を満足した不妊夫婦に対し、1985年12月より1987年7月までに男性因子21例43周期、頸管因子7例16周期、合計28例59周期の治療を行った。頸管因子と診断された夫婦の2例および男性因子と診断された1例が、女性側の血清による微量精子不動態試験で陽性であった。

表1 CC-hMG 刺激周期を利用した Percoll 洗浄 AIH による妊娠例

症例	分類	期間	適応因子	妊娠転帰
K.K. 32歳	原発性	5年	乏精子症	単胎妊娠
R.Y. 29歳	原発性	6年	乏精子症	単胎妊娠
K.N. 35歳	続発性	12年	乏精子症	稽留流産
K.S. 28歳	原発性	7年	乏精子症	子宮外妊娠
S.S. 30歳	原発性	2年	精子無力症	単胎妊娠
T.W. 27歳	原発性	4年	精子無力症	単胎妊娠
H.H. 31歳	原発性	8年	頸管因子	単胎妊娠
A.A. 35歳	続発性	6年	原因不明	単胎妊娠
M.T. 29歳	原発性	4年	原因不明	単胎妊娠

不妊期間

妊娠率 9/28症例 32.1%
9/59周期 15.2%

CC-hMGの投与スケジュールは、1986年12月より1987年3月までは月経周期の4日目よりCCを一日100mg 5日間内服、周期の8日目よりhMG150IUを連日筋注した(A法、31周期)。その後の1987年4月より1987年7月までは、hMGの投与法を月経周期の8日目より連日投与から隔日投与に変更して同様に施行した(B法、28周期)。B法はhMGの投与法以外はA法と同じである。卵胞のmonitoringは超音波断層法と尿中estrogen(ハイモニター-E、帝臓)によって行い、主席卵胞の最大卵胞径18mm以上、尿中estrogen値50ng/mlを目安にhCG(human chorionic gonadotropin)への切り換えをおこなった。A法B法共にhCG投与の翌日に、以下に述べる単層Percoll法により調整された精子を用い、A I Hを施行した。hCG切り換え日の血中E₂(estradiol)値を、RIAにて測定した。

単層Percoll法は、まず採取された精液を十分液化させた後、その約2mlを50%Percoll 6mlに上層して600×gで20分遠心した。その上清を除いて得られた沈査にHam'F-10培地(10%非動物血清入り)を約5ml加え500×gで10分遠心、得られた沈査に同様のHam'F-10培地を約500μl加えた。これを約1時間5%CO₂ incubatorにてincubateした後、媒精した。

結 果

稽留流産1例、子宮外妊娠1例を含む9例に妊娠が成立し、妊娠率は症例当り32.1%、周期当り15.2%であった。正常妊娠は全て単胎妊娠であった。妊娠患者の概要を表1に示す。

1) 単層 Percoll 法による精液調整

Percoll法による調整前、調整後の精子濃度および精子運動率の変化を、図1に示した。調整前と調整後で精子濃度は平均1.5倍に濃縮され、精子運動率は平均1.4倍に改善した。精子濃度の濃縮は症例に

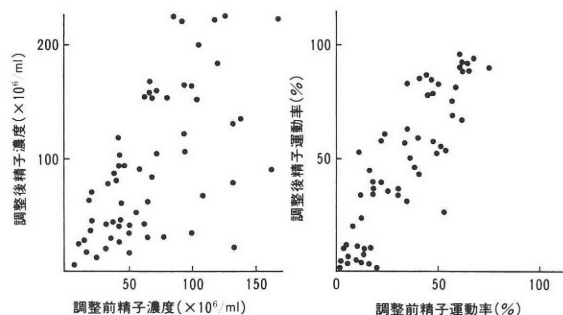


図1 単層 Percoll (50%) 洗浄法による精子濃度(左)と精子運動率(右)の変化

より格差が大きく調整後で調整前と比較して必ずしも濃縮されていない症例が34%存在した。これに対して、精子運動率が改善しなかった症例は11%にすぎず、運動率の改善がPercollによる調整法の特徴であると考えられた。

2) 運動精子濃度の改善からみた妊娠例の検討

精子濃度と精子運動率を掛けた値を運動精子濃度とし、それが調整前と調整後でどれだけ変動したかを、男性因子の患者については図2に、頸管因子の患者は図3に示した。男性因子例では運動精子濃度は平均2.2倍の改善を示したが、症例により個人差

が認められた。9例(32%)の患者については全ての治療周期でほとんど改善を認めなかったが、これらの7例は精子濃度が $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の重度の乏精子症で、一般に運動精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の症例では、殆ど精液所見の改善が認められなかった。妊娠例6例はいずれも運動精子濃度の改善率の高い周期に妊娠しており、妊娠周期における平均改善率は3.6倍であった。また妊娠周期における調整後の運動精子濃度は全例 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上(範囲 32×10^6 から $99 \times 10^6/\text{ml}$)であった。頸管因子症例の運動精子濃度は、おおむね高い改善率(平均2.5倍)を示した。妊娠例3例の調整後の運動精子濃度は 36×10^6 から $88 \times 10^6/\text{ml}$ の範囲で、調整により運動精子濃度が減少したにもかかわらず妊娠した例が1例存在した。

3) A法とB法の成績の比較

A法とB法の成績の比較を表2に示した。hCG投与時の発育卵胞(最大卵胞径14mm以上)個数はA法にやや多かったが、有意な差は認められなかった。hCG投与時の血中 E_2 値、過剰刺激(hCG投与時の血中 E_2 値 $\geq 2500\text{pg/ml}$)の頻度はA法にやや多かったが、同じく有意な差は認められなかった。妊娠率はA法よりB法が高かったが有意な差は認められなかった。hCG投与時の血中 E_2 値をA法とB法で比較し

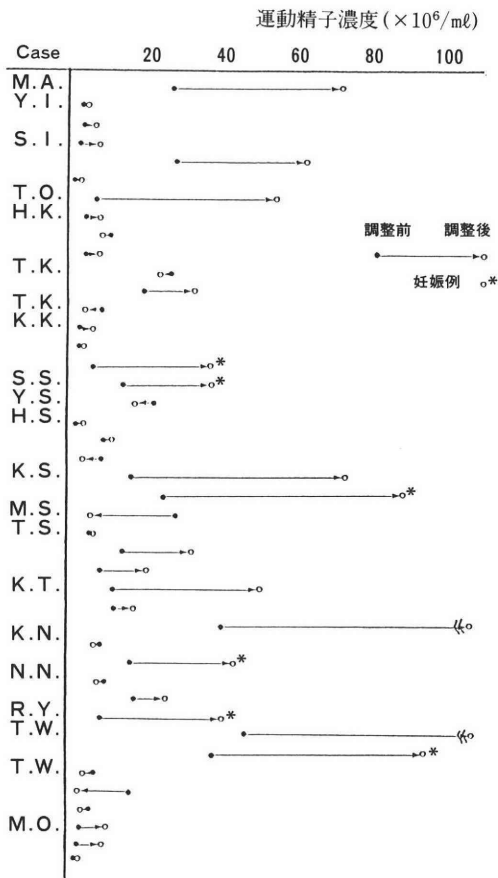


図2 男性因子患者の単層 Percoll 洗浄法による運動精子濃度の改善

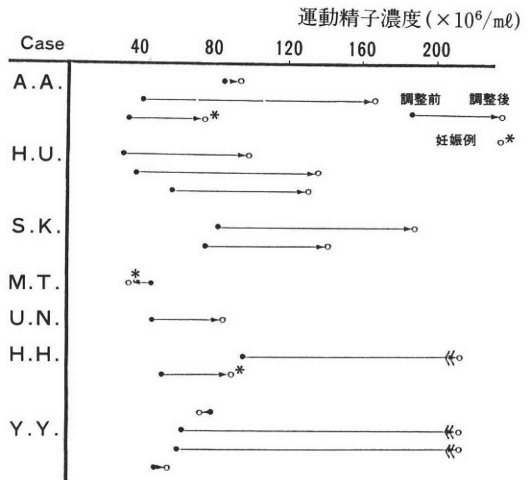


図3 頸管因子患者の単層 Percoll 洗浄法による運動精子濃度の改善

表2 hMG連日投与(A法)または隔日投与(B法)によるhCG投与時の血中 E_2 値

	hMG使用本数 (n, M $\pm$ SD)	発育卵胞個数 (n, M $\pm$ SD)	hCG投与時血中 E_2 値 (pg/ml, M $\pm$ SD)	過剰刺激の頻度* (%)	妊娠率 (%)
A法	4.5 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 2.8	2201 $\pm$ 1370	38.7	12.9
B法	2.7 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 1.7	1701 $\pm$ 935	21.4	17.8

* hCG投与時の血中 $E_2 \geq 2500\text{pg/ml}$

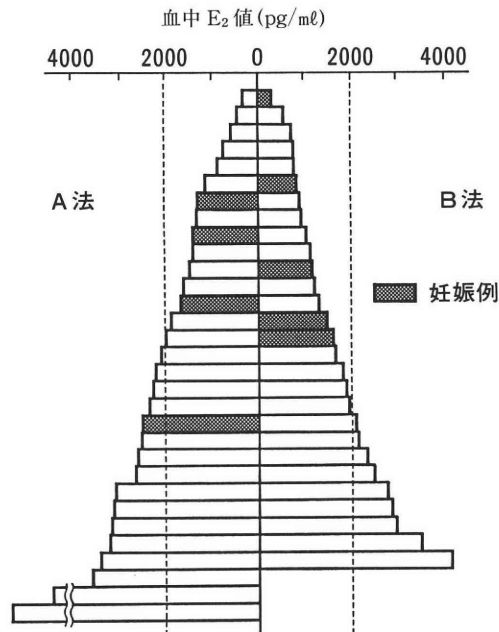


図4 hCG投与時の血中E₂の、A法とB法の比較

て図4に示した。妊娠周期はA法とB法共に、血中E₂値1000~2500pg/mlに集中し、2500pg/ml以上の周期では妊娠は認められなかった。

考 察

I V Fにおいて一般的となった刺激周期の利用がA I Hにも導入され、妊娠率の改善が期待できることが、各施設より報告されている。1985年にSherら³⁾が、hMG刺激周期を利用して、遠心法により洗浄採取された精子を体外培養後に媒精し、35%の妊娠率を得たと報告している。最近ではMelisら⁷⁾がCC-hMG刺激周期を利用して、各症例当り6周期の治療で58.8%、Kemmannら⁵⁾がCC-hMGまたはhMG単独の治療を主体にして20.5%という妊娠率を報告している。当科の妊娠率は32.1%で、今回の検討例が通常のA I Hを施行しても妊娠しなかった不妊例に限ったことから考えて、評価できる数値とおもわれる。

最近、各種洗浄精子のA I Hにおける有効性が報告されているが、本当に洗浄精子の利用が男性因子を改善しうることについては、まだ議論がある。乏精子症の治療に関しては、洗浄精子が有効であったとする報告⁸⁾とそうでなかったとする報告⁹⁾がある。今回の検討では、高度な乏精子症では殆ど精液所見の改善がみられず、結果として妊娠例は得られていない。運動精子が少なくとも $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の濃

度で注入され得た症例のなかに妊娠例が認められ、それ以下では妊娠例認められない。このことから、洗浄操作で運動精子がある程度に濃縮されうることが妊娠成立の重要な因子となると考えられる。抗精子抗体の治療に関しては、精子凝集抗体陽性の患者に対して洗浄精子を用いたところ、40%の妊娠率を得たというConfinoの報告⁹⁾がある。しかし、この抗体は実際の不妊との相関が精子不動化抗体より低いとされ、今回の検討での精子不動化抗体陽性例は少数であるが妊娠は成立しなかった。

刺激周期の利用について、従来より過剰刺激の予防が妊娠率向上の重要な因子となることが示唆されている。今回の結果でもhCG切り換え時の血中E₂値が2500pg/ml以上の周期では妊娠は認められておらず、適度の刺激を行うことが重要と考えられる。しかし、それは個々の患者で薬剤に対する反応が大きく異なることから、実際には非常に難しい問題である。しかし、この問題は現在日進月歩であり、刺激法の発達および卵胞発育のmonitoringの更なる進歩により、患者に適切な反応を惹起させることが期待できる。そうすると、A I Hにおいても刺激周期の利用がより一般的になっていくと思われる。今回の、clomiphene投与後のhMGの連日投与と隔日投与を比較した検討では、若干隔日投与した方が過剰刺激が少なくなり妊娠率が高くなる傾向が認められたが、有意な差はなかった。

今回の検討では、注入する精子そのものをより妊孕性の高い状態へ調整しようとする男性側因子の改善の試みと、女性の性周期を利用していく上でより有利な刺激周期の利用という女性側因子の改善の試みが同時に行われている。従って、妊娠率の改善にどちらの要因が大きく作用したかという問題は、明瞭ではない。しかしながら、今回の検討以前に著者は、単に刺激周期の利用だけで洗浄精子を用いないで治療を30周期ほど行ったが1例の妊娠しか得られなかった。また、今回の治療と平行して別な患者群に対して自然周期を利用したPercoll法によるAIHを施行したが、めだった妊娠率の改善は得られなかった。このような経験より著者は、男性と女性の両方の因子で寄与したとの印象をもっている。しかし、自然周期を利用した場合、排卵を予測する為だけに患者を頻回に通院させて管理するのは実際問題として困難であり、AIHのtimingを設定する過程が十分でないことから、刺激周期との厳密な比較は難しいといえる。これに対してMelisら⁷⁾は、単に刺激周期だけの利用で有効な成績を得たと、女性因子を重視する報告をしている。

さて実際にこのようなA I Hの有効性が認識されるにあたって、この治療をIVFやGIFT等の先進的治療に対し臨床的にいかに位置づけるかが、新たな問題となってきている。この治療には、IVFやGIFTに比較して、患者の経済的および肉体的負担がはるかに少ないという大きなmeritが存在する。現在我々は、男性因子の患者に関しては、 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の運動精子が回収される場合は、症例によってGIFTを施行する前に、薬剤に対する患者の反応を確かめる意味からも、治療を試みている。重症の男性因子例では、Hamster test等により精子そのものに受精能力があるかどうかの検討が重要となると考えられる。頸管因子に関しては、精子不動化抗体強陽性例では最近の報告から¹⁸⁾ I V Fが最適と考えられるが、それ以外の症例では、この治療法は有力であると考えている。Dodsonら⁶⁾は、hMG単独刺激周期でAIHを行うことにより、子宮内膜症、頸管因子、原因不明不妊の治療をおこない、正常女性の受胎率に匹敵する成績を得たと報告している。そして、IVFやGIFTとの比較検討のため、prospectiveなcontrolled trialの必要性を訴えている。

最後に、精子の調整に協力していただいた児玉智子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Nachtigall, R. D., Faure, N. and Glass, R. H.: Artificial insemination of husband's sperm. *Fertil. Steril.* 32: 141, 1979
- 2) Allen, N. C., Herbert, C. M. III., Maxson, W. S., Rogers, B. J., Diamond, M. P. and Wentz, A. C.: Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil. Steril.* 44: 569, 1985
- 3) Sher, G., Knutzen, V. K., Stratton, C. J., Montakhab, M. M. and Allenson, S. G.: In vitro sperm capacitation and transcervical intrauterine insemination for the treatment of refractory infertility: Phase I *Fertil. Steril.* 41: 260, 1984
- 4) Curz, R. I., Kemmann, E., Brandeis, V. T., Becker, K. A., Beck, M., Beardsley, L. and Shelden, R.: A prespective study of intrauterine insemination of processed sperm from men with oligoasthenospermia in superovulated women. *Fertil. Steril.* 46: 673, 1986
- 5) Kemmann, E., Bohrer, M., Shelden, R., Fiasconaro, G. and Beardsley, L.: Active ovulation management increases the monthly probability of pregnancy occurrence in ovulatory women who receive intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 48: 916, 1987
- 6) Dodson, W. C., Whitesides, D. B., Hughes, C. L., Easley, H. A. and haney, A. F.: Superovulation

with intrauterine insemination in the treatment of infertility: a possible alternative to gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 48: 441, 1987

- 7) Melis, G. B., Paoletti, A. M., Strigi, F., Fabris, F. M., Canale, D. and Fioretti, P.: Pharmacologic induction of multiple follicular development improves the success rate of artificial insemination with husband's semen in couples with male-related or unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 47: 441, 1987
- 8) Kerin, J. F. P., Peek, J., Warnes, G. M., Kirby, C., Jeffrey, R., Matthews, C. D. and Cox, L. W.: Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. *Lancet.* 1: 533, 1984
- 9) Confino, E., Friberg, J., Dudkiewicz, A. and Gleicher, N.: Intrauterine insemination with washed human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 46: 55, 1986
- 10) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 淡路英雄, 松山穀彦, 藤井明和: 体外受精卵卵管内移植 (IVF-ETR). 産婦の実際. 36: 1869, 1987

Artifitial Insemination with washed spermatozoa during clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin-stimulated superovulatory cycles

Hideya Kodama, Mitsuhiro Kato,
Jyun Fukuda, Kazuko Ichinoseki,
Mineko Fukushima and Masahiro Maki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita University School of Medicine,
Akita 010, Japan

Hirotaoka Ota

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita Union General Hospital

We treated refractory infertile couples related to male or cervical factor with AIH (artificial insemination with husband's semen) using modern technique. All women were hyperstimulated with CC (clomiphene citrate)-hMG (human menopausal gonadotropin) regimen and inseminated with husband's spermatozoa washed through mono-layer Percoll (50%). Nine women of 28 cases, 59 cycles, conceived. The pregnancy rate per patients or cycles were 32.1% or 15.2%, respectively. This tech-

nique was extremely successful when density of motile sperm after preparation was over 30×10^6 /ml and serum estradiol level of the women at the time of hCG injection was under 2500pg/ml. The semen samples showing less motile sperm density than 10×10^6 /ml were scarcely improved nevertheless preparation with the Percoll solution. Three

women with sperm immobilization antibodies failed to conceive. Though the interval of hMG administration changed every day to every other day, the frequency of hyperstimulated ovaries and pregnancy rate were not significantly varied.

(受付：1988 年 8 月 24 日)

FERTILIZING CAPACITY OF THE ZONA-FREE HAMSTER OVA HUMAN SPERM PENETRATION TEST AND SPERM CHARACTERISTICS IN INFERTILE MEN WITH ABNORMAL SPERMATOZOA

Kentaro TAKAHASHI, Masuo KUSAKARI, Akihiro UCHIDA,
Hiroyuki YAMASAKI, Kazuo YOSHINO and Manabu KITAO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University, Shimane 693, Japan
(Director: Prof. M. Kitao)

Abstract: The zona-free hamster ova sperm penetration test (ZSPT, hamster test) can be used to test male infertility. We examined forty-six men whose female partners had visited our clinic for infertility. We studied the correlation between ZSPT and common semen analysis and evaluated the fertilizing ability of spermatozoa from infertile men with abnormal sperm, by examining pregnancy rates after AIH, using washed and concentrated spermatozoa and also the penetration rate to zona-free hamster ova.

Results are as follows:

1. There is a statistical relation between the ZSPT test and common semen analysis.
2. The penetration rates of the ZSPT were statistically very low in case of abnormal spermatozoa and unexplained infertility, in contrast with 59.2% in case of spermatozoa from control fertile men.
3. When the spermatozoa contain over $9 \times 10^6/\text{ml}$ motile sperm and more than a 30% sperm penetration rate, pregnancy is expected to occur following insemination with and concentrated sperm.

Thus, the ZSPT is a practical functional test which can be used to study of the fertilizing capacity of human spermatozoa.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 252–257, 1989)

Introduction

Clinical evaluation of sterility in the male relies mainly on examination of the sperm, either by quantification of the measurable components of the fluid seminal fraction or by examination of the spermatozoa (concentration, motility and morphology). However, these examinations do not reveal the functional capacity. The most suitable system available for the study of sperm

penetration of the ovum is the *in vitro* fertilization of human oocytes. However, for practical purposes, it is obvious that other methods have to be used and two techniques have been proposed: one, which concerns non-living human oocytes¹⁾, and the other, which is the penetration of human spermatozoa in zona-free hamster ova²⁾. Numerous data appeared to the superiority of the zona-free hamster ova sperm penetration test (ZSPT, hamster test)^{3–7)}. However, the methods and the

standard interpretation of the ZSPT remain controversial. We examined the relationship between the ZSPT and routine semen analysis and investigated the usefulness of this test. The fertilizing abilities of spermatozoa from infertile men with abnormal sperm (oligozoospermia, severe oligozoospermia, poor motility and asthenozoospermia) and unexplained sterility were evaluated by examining pregnancy rates after artificial insemination of washed and concentrated spermatozoa from the husband (AIH).

Materials and Methods

The subjects were 46 men whose female partners had visited our infertility clinic. Sterility in the female was ruled out. Eight men who had fathered more than one child served as the controls.

A semen sample from each man was obtained by masturbation following 3 or more days of abstinence from sex. Thirty minutes after collection of the semen sample, each sample was examined, at room temperature. Forty-six infertile men were classified into 5 groups (group A: oligozoospermia less than $40 \times 10^6/\text{ml}$ of total sperm concentration, group B: severe oligozoospermia less than $20 \times 10^6/\text{ml}$ of total sperm concentration, group C: low sperm motility more than 40% and less than 60% of sperm motility, group D: asthenozoospermia less than 40% of sperm motility and group E: unexplained sterility).

Our experimental protocol of the ZSPT is shown in figure 1. Ova for fertilization collected from superovulated golden hamsters were treated

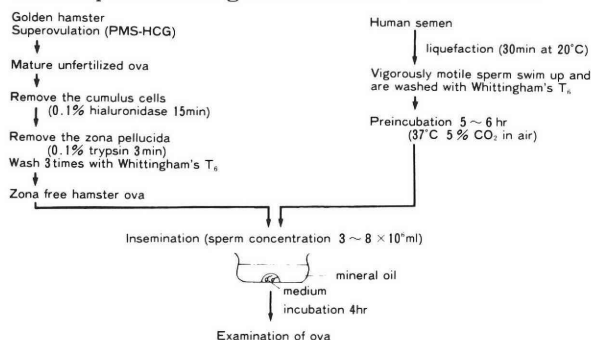


Fig. 1 Protocol of the zona-free hamster ova human sperm penetration test for male sterility.

with hyaluronidase and trypsin. Spermatozoa were centrifuged and washed twice with Whittingham's T_6 . The medium used for *in vitro* fertilization was Whittingham's T_6 solution containing 3% human serum albumin. The concentration of spermatozoa at insemination was approximately $3-8 \times 10^6/\text{ml}$. When the concentration of spermatozoa was extremely scanty, the maximum concentration of spermatozoa was used. Ova containing at least one decondensed sperm head or pronucleus with the adjacent sperm tail in the cytoplasm were considered "penetrated". The penetration rate is defined as the percentage of the penetrated ova among all tissues examined.

Forty women whose male partners had abnormal sperm were given 2–8 times (mean 3 times) AIHs (washed and concentrated spermatozoa).

Statistically significant differences were determined using Student's t-test.

Results

Relationship between the penetration rates and sperm characteristics was examined in 49 semen samples, except those from the unexplained sterility group. The correlation between penetration rates and total sperm concentration is shown in figure 2a. The positive regression line ($y = 0.35x + 11.9$) was determined ($p < 0.001$). The deeper the total sperm concentration, the higher was the penetration rate. Penetration rates also correlated with sperm motility ($r = 0.534$, $p < 0.001$; figure 2b). The correlation between penetration rates and motile sperm concentration was highly significant ($r = 0.730$, $p < 0.001$; figure 2c).

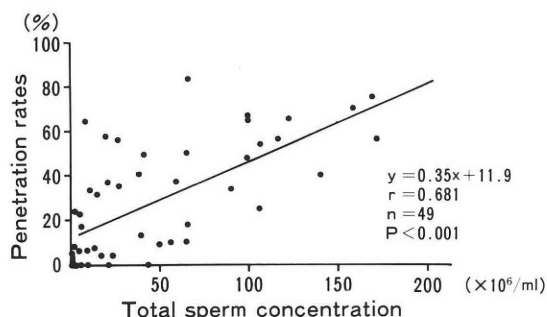


Fig. 2a Correlation between total sperm concentration and penetration rates.

The mean motile sperm concentration and the mean penetration rate in each group are shown in Table 1. The mean motile sperm concentration in group A-E was statistically lower than that in the control. However, the mean motile sperm concentration of groups E and C were $56.8 \times 10^6/\text{ml}$ and $42.7 \times 10^6/\text{ml}$, respectively, that is higher values than the standard fertile motile sperm concentration of $36 \times 10^6/\text{ml}$ in our clinic⁸⁾. The mean penetration rates of control, group A, B, C, D and E were 59.2 ± 11.0 , 32.6 ± 21.0 , 11.8 ± 16.0 , 45.4 ± 21.8 , 23.6 ± 21.4 and $19.8 \pm 13.6\%$, respectively. Statistically, no difference in the mean penetration rates was observed between control and group C. On the other hand, mean penetration rates in groups except group C were statistically lower value than in the controls. The mean penetration rates in groups B and E were particularly low.

Three pregnancies following AIH and two spontaneous pregnancies in group C and three pregnancies by AIH in group B materialized. Forty women of 41 male partners with abnormal

sperm were treated by AIH and another had a spontaneous pregnancy, without AIH treatment. The mean penetration rates of $16.2 \pm 18.9\%$ in the non-pregnant women were statistically lower value than in the controls ($P < 0.001$). The mean penetration rates of $48.7 \pm 17.4\%$ in the pregnant women were statistically higher value than that in the non-pregnant women ($P < 0.001$). However, statistically no difference in the mean penetration rate was observed between control and pregnant groups.

The relationship between penetration rates and motile sperm concentration in patients treated with AIHs is shown in figure 3a. The penetration rates in case of 7 pregnancies ranged from 31.6 to 83.3%. The motile sperm concentration in 7 pregnancies ranged from 9×10^6 to $45 \times 10^6/\text{ml}$. Fourteen of 40 treated by AIH had penetration rates in

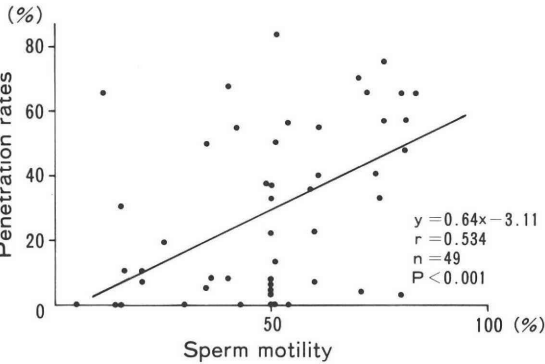


Fig. 2b Correlation between sperm motility and penetration rates.

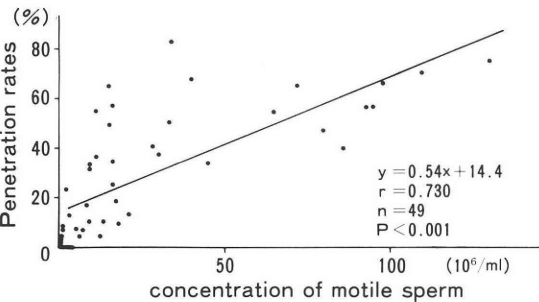


Fig. 2c Correlation between concentrations of motile sperm and penetration rates.

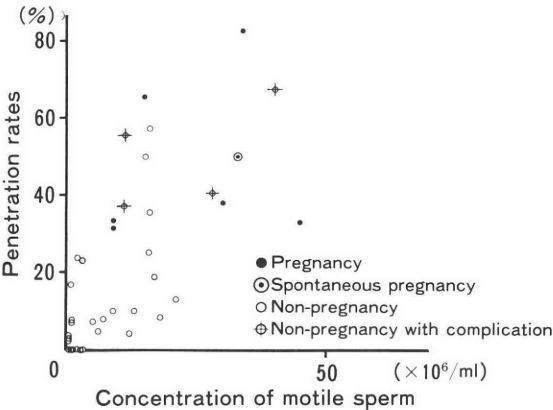


Fig. 3a Relationship between concentrations of motile sperm and penetration rates in women artificially inseminated (AIH)

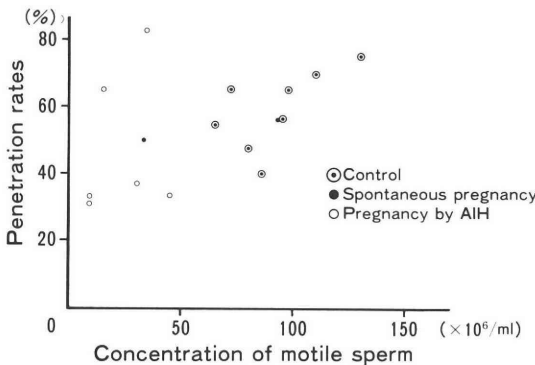


Fig. 3b Relationship between concentrations of motile sperm, penetration rates and pregnancy.

excess of 31.6%. Fifty percent of 14 with the penetration rates in excess of 31.6% were related to a pregnancy. However, as 4 of these 14 had complications of polycystic ovary syndrome, 7 (70%) of the 10 were related to pregnancy. Similarly, the pregnancy rate in cases of motile sperm concentrations in excess of $9 \times 10^6/\text{ml}$ was 7/17 (41%). The relationship between the penetration rates and the motile sperm concentration in all pregnant cases, including controls is shown in figure 3b. Spontaneous pregnancy occurred in only with a motile sperm concentration exceeding $65 \times 10^6/\text{ml}$ and the penetration rate over 40%.

The fertilizing capacity of spermatozoa from husbands of 5 sterile couples, of an unknown cause was examined by the ZSPT. 41.9, 26.7, 10.3, 17.5 and 2.5% penetration rates were obtained (Table 2). Though these 5 men were considered to have a normal spermatozoa, determined by

seminalysis, the spermatozoa from 4 men showed a low penetration rate but no pathological findings.

Discussion

Binor et al.⁹⁾ reported that the concentration of motile sperm was the most important factor for penetration of the ova and that penetration was not evident when the concentration was less than $6 \times 10^6/\text{ml}$. On the contrary, the penetration of spermatozoa with a $3-5 \times 10^6/\text{ml}$ concentration of motile sperm was recognized by Yanagimachi et al.²⁾. We found that the penetration rates in case with a concentration of less than $1 \times 10^6/\text{ml}$ motile sperm ranged from 0 to 16.7% and the penetration rates could be assessed in cases of a low sperm concentration (the motile sperm concentration less than $1 \times 10^6/\text{ml}$).

Though Rogers et al.¹⁰⁾ and Hall¹¹⁾ reported that there was no correlation between the sperm concentration and the penetration rates and between motility and the penetration rates, the positive correlation between sperm concentration and the penetration rates and between motility and the penetration rates was statistically evident in our study. In particular, correlation between the motile sperm concentration and the penetration rates was highly significant. Therefore, with regard to the relationship between common semen analysis and penetration rates of the ZSPT, the penetration rates seem to be most closely related to the concentration of motile sperm.

We observed that penetration rates of spermatozoa from men who had fathered more than one

Table 1. Concentrations of motile sperm and penetration rates (Mean $\pm$ S.D.)

Groups	Subjects	Concentrations of motile sperm ($\times 10^6/\text{ml}$)	Penetration rates (%)
Control	8	92.0 ± 19.8^a	$59.2 \pm 11.0^{a'}$
Group A	7	13.9 ± 7.0^b	$32.6 \pm 21.0^{b'}$
Group B	20	3.3 ± 3.9^c	$11.8 \pm 16.0^{c'}$
Group C	6	42.7 ± 23.6^d	$45.4 \pm 21.8^{d'}$
Group D	8	16.3 ± 10.2^e	$23.6 \pm 21.4^{e'}$
Group E	5	56.8 ± 14.0^f	$19.8 \pm 13.6^{f'}$

$a'-b': P < 0.05$

$a-d, a-f, a'-e': P < 0.01$

$a-b, a-c, a-e, a'-c', a'-f': P < 0.001$

$a'-d':$ not significant

Table 2. *In vitro* fertilization rates of zona-free hamster eggs by spermatozoa from patients with unexplained sterility (Group E)

Patient no.	Total sperm concentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	Concentrations of motile sperm ($\times 10^6/\text{ml}$)	Sperm motility (%)	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated	Penetration rates (%)
1	80	57	71	43	18	41.9
2	86	60	70	15	4	26.7
3	72	45	63	29	3	10.3
4	60	41	68	40	7	17.5
5	120	81	68	40	1	2.5
Mean $\pm$ S.D.	83.6 ± 20.2	56.8 ± 14.0	68.0 ± 2.8	33.4 ± 10.4	6.6 ± 6.0	19.8 ± 13.6

child was significantly higher than that of spermatozoa from men with abnormal characteristics of the sperm. In particular, penetration of spermatozoa from men with severe oligozoospermia was extremely low. Therefore, differences in the fertilizing ability between normal sperm characteristics and abnormal sperm characteristics was confirmed. On the other hand, in cases of infertility of unknown cause, the value of ZSPT was low. This suggests an impairment in the fertilizing ability of the spermatozoa, in some sterile men. Although the common semen analysis may show a normal range, cases of male sterility of an unknown cause should be positively examined using the ZSPT.

The ZSPT may be considered the ultimate test for sperm fertilizing ability. The potential benefits of the ZSPT for prescreening patients undergoing human in vitro fertilization (IVF) programs have been reported^{7,12,13}. However, the usefulness of the ZSPT for IVF was the objective of the study, rather the sperm fertilizing capacity in case of AIH. In the present study, a male with spermatozoa over $65 \times 10^6/\text{ml}$ of motile sperm concentration and more than 40% of sperm penetration rated can expect to impregnate his partner. On the other hand, if the male has a spermatozoa count of over $9 \times 10^6/\text{ml}$ and a concentration of less than $65 \times 10^6/\text{ml}$ of motile sperm and more than 30% and less than 40% of sperm penetration rates can expect impregnation by AIH, using washed and concentrated sperm.

In conclusion, the ZSPT is at present the only practical, functional test available for studying the fertilizing capacity of human spermatozoa.

Acknowledgment

We thank M. Ohara for comments.

References

- 1) Overstreet, J. W., Hembree, W. C.: Penetration of the zona pellucida of non-living human oocytes by human spermatozoa *in vitro*. *Fertil. Steril.* 27: 815, 1976
- 2) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., 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

- 3) Margalioth, E. J., Laufer, N., Navot, D., Voss, R., Schenker, J. G.: Reduced fertilization ability of zona-free hamster ova by spermatozoa from male partners of normal infertile couples. *Arch. Androl.* 10: 67, 1983
- 4) Wickings, E. J., Freischem, C. W., Langer, K., Nieslag, E.: Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men. *J. Androl.* 4: 261, 1983
- 5) Aitken, R. J.: Diagnostic value of the zona-free hamster oocyte penetration test and sperm movement characteristics in oligozoospermia. *Int. J. Androl.* 8: 348, 1985
- 6) Koulischer, L., Debry, J. M.: The hamster test in a series of 120 infertile patients. *Acta Europaeae Fertilitatis*, 16: 251, 1985
- 7) Margalioth, E. J., Navot, D., Laufer, N., Lewin, A., Rabinowitz, R., Schenker, J. G.: Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 45: 665, 1986
- 8) Takahashi, K., Yoshino, K., Shirai, T., Nishigaki, A., Uchida, A., Kusakari, M., Kitao, M.: Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration test and seminal examinations. *Jap. J. Fert. Ster.* in press.
- 9) Binor, Z., Sokoloski, J., Wolf, D.: Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil. Steril.* 33: 321, 1980
- 10) Rogers, B. J., Van Campen, H., Ueno, M., Lambert H., Bronson, R., Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil. Steril.* 32: 664, 1979
- 11) Hall, J. L.: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.* 35: 457, 1981
- 12) Margalioth, E. J., Navot, D., Laufer, N., Morosef, S., Rabinowitz, R., Yarkoni, S., Schenker, J. G.: Zona-free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 40: 386, 1983
- 13) Wolf, D. P., Sokoloski, J. E., Quigley, M. M.: Correlation of human *in vitro* fertilization with the hamster egg bioassay. *Fertil. Steril.* 40: 53, 1983

男性不妊症患者における一般精液検査と ハムスターテスト

島根医科大学医学部産科婦人科学教室

高橋健太郎 草刈万寿夫 内田昭弘
山崎裕行 吉野和男 北尾 学

ヒト精子の capacitation の有無を判定する方法として zona-free hamster ova sperm penetration test (ZSPT, ハムスターテスト) がある。今回、当科不妊外来を訪れた 46 名の不妊男性患者を対象とし、ハムスターテストと一般精液検査との関連性について検討した。また、妊孕能検査としての本テストの評価も試みた。その結果、精子濃度、運動精子濃度及び運動率と

侵入率との間にはともに統計的に比較的強い正の相関関係 ($P < 0.001$) が認められた。平均侵入率は正常精子群で 59.2 % であったが、異常精子群及び原因不明群は全て、正常精子群より低値であった。また、自然妊娠には $33 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の運動精子濃度及び 50 % 以上の侵入率が必要であり、AIH 妊娠には $9 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の運動精子濃度及び 30 % 以上の侵入率が必要であると推測される。また、一般精液検査では正常精子でも原因不明症例は積極的なハムスターテストが望ましい。
(受付: 1988 年 3 月 16 日)

URINARY hLH SURGE IN INFERTILE WOMEN RESULTS IN LOW AND SHORT

Takashi OKAMURA, Osamu NISHII, Toru TAKEUCHI
and Tsutomu YAGINUMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, University of Tokyo, Mejirodai, Tokyo, Japan

Abstract: An improved semiquantitative immunoassay method, utilizing monoclonal antibodies, which can reliably detected urinary human luteinizing hormone (hLH) at levels from 2.5 to 640 mIU/ml has been developed. Using this method, the hLH in 3-hour urine sample (3U) in 8 women with a normal menstrual cycle (C group) and 12 women with infertility were analyzed. The 12 infertile women were divided into 2 groups according to the peak hLH levels: Patient-1 (P-1) group (5 women) had peak levels above 80 mIU/ml, and patient-2 (P-2) group (7 women) had levels of 40 mIU/ml and less. The mean ($\pm$ SD) duration of midcycle hLH surge in C, P-1 and P-2 groups were 55.6 ± 11.7 , 37.4 ± 5.7 and 24.6 ± 8.3 hours, respectively. The differences between C and P-1, and P-1 and P-2 groups were statistically significant ($p < 0.02$ and $p < 0.05$, respectively). The mean ($\pm$ SD) peak hLH level of the 3 groups were 140.0 ± 11.7 , 96.0 ± 35.8 and 32.1 ± 14.1 mIU/ml, respectively. The difference between C and P-1 groups was not as significant ($p < 0.1$) as that ($p < 0.01$) of the P-1 and P-2 groups. Estradiol (E_2) level in the same 3U samples was analyzed by RIA after hydrolisis of urine. The day of urinary E_2 surge, occurring during the preovulatory phase, corresponded with the day of hLH surge. The mean value of E_2 surge in the P-2 group was more significant than that in the C group ($p < 0.05$). Furthermore, the urine hLH release in the P-2 group responded well to LH-RH administration. These findings suggest that a small quantity of LH-RH secretion in infertile women might lead to hLH surge insufficiency.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 258–265, 1989)

Introduction

Human luteinizing hormone (hLH) surge during the midcycle is of importance in facilitating follicle rupture, stimulating progesterone secretion, activating biologic and morphologic development of oocyte, and promoting the expansion of the cumulus oophorus and its detachment from the granulosa layer of the follicle wall. Therefore, it is important to detect the onset, the peak level and the duration of hLH surge in midcycle. A new method of micrometric measurement of hLH in urine has been previously reported (D86002

EIKEN CHEMICAL Co., Ltd. Japan)¹⁾. This method utilizing monoclonal antibodies can reliably detect hLH from 2.5 mIU/ml to 640 mIU/ml for about 2 hours. The correlation coefficient between the serum hLH values obtained by radioimmunoassay and the urine hLH value obtained by this method was significant. The study group, comprised 8 women of normal cycle and 12 infertile women, were tested by this method using urine sampled every three hours while awake during the periovulatory phase. Furthermore, 11 infertile women who underwent artificial insemination with husband's seminal

fluid participated in a separate study.

The present study was designed to determine of the infertility might be explained at least in part, on the basis of the level and duration of urinary hLH in the midcycle surge.

Materials and Methods

Eight women with a regular menstrual cycle (28-31 days) and 12 women with infertility of unknown cause participated in this study. The basal body temperature (BBT) was recorded and a biphasic shift in the curve was noted for all 20 women. Nine of 12 women were placed on 100mg of clomiphene citrate daily for 5 days from the fifth day of the menstrual cycle. One woman was given 150 IU of human menopausal gonadotropin (hMG) every other day for 6 times and then, was given 5,000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) intramuscularly. The remaining 2 were never on medications.

Five of the 12 women participated in repeat studies on separate occasions. They were given 100 μ g of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) intramuscularly in one bolus at the initiation of hLH surge. The urine samples (3U) for all 20 women were collected every 3 hours while awake from the 11th day of the menstrual cycle to the day of hLH surge termination. The blood samples of the eight normal women were drawn at noon on the same day of urine sampling. All urine hLH concentration in the 3U samples were determined by a new micrometric method for hLH on all such occasions. Urine estradiol (E_2) levels, however, were analyzed by radioimmunoassay (RIA) in a single assay after hydrolysis of urine.

Eleven women who underwent artificial insemination with husband's seminal fluid (AIH) participated in a separate study. Five of these 11 women were given 5,000 IU of hCG and 6 were given 100 μ g of LH-RH intramuscularly after AIH. Blood samples were drawn at 0, 30 and 60 minutes after hCG or LH-RH administration. All the blood samples were centrifuged after clotting and the sera were stored at -40°C pending assay. Serum E_2 and hLH levels in these samples were determined by RIA. The intra-assay coefficient of

variation for serum E_2 and hLH were both below 10%. Student's *t* test and Gaussian reference distribution were used for statistical analysis.

The procedures of urinary hLH and E_2 level determination are summarized as follows.

Urine hLH: 1. Make the urine samples two-fold dilutions with urine diluent which is used specify. The calibrators of each well were adjusted to 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 and 640 mIU/ml. 2. Add one drop of antibody coated-latex suspension into each well. 3. Shake the well vigorously, and read the agglutination 2 hours later. A semi-quantitative estimate is made by the last dilution which shows agglutination. For a detail description of this method please refer to the above-mentioned paper¹⁾. The initiation of the hLH surge was defined as a nadir value of greater than 2.5 mIU/ml followed by successively increasing value to the peak.

Urine E_2 : 1. The pH of the sample is adjusted to pH 5.0 by adding 1N-NaOH or CH_3COOH (40%). 2. Buffer solution: Add 70.5 ml of 1N-NaOH to 100 ml of 1N- CH_3COOH and complete to 500 ml with distilled water. 3. Enzyme diluted solution: Add 60 μ g of *Helix pomatia* juice (REACTIFS IBF, France) containing 100,000 Fishman units of β -glucuronidase to 10 ml of buffer solution. 4. Add 0.7 ml of enzyme-diluted solution to 0.1 ml of pH adjusted urine sample and incubate for 30 minutes at 62°C . 5. Hydrolyzed urine sample was used for RIA analysis.

Results

The patterns of urine hLH surge in normal women (control (C) group) are given in Figure 1. Each pattern was rather similar in form. The overall hLH surge could be divided into 3 phases: the ascending phase, increasing rapidly from the initiation of hLH surge to 80 mIU/ml, the high plateau phase at levels of 80 mIU/ml and over, and the descending phase, decreasing rapidly from the plateau phase to 5 mIU/ml. Every women in the C group had peak levels of 80 mIU/ml or over, and the plateau phase was maintained for 6 to 24 hours in all but one case. The patterns of hLH surge secretion in the P-1 and P-2 groups are shown in Figs. 2 and 3. In the P-1 group, the

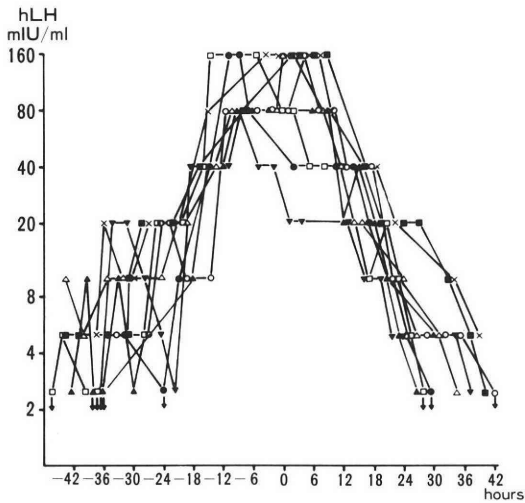


Fig. 1 3-hour urinary hLH surge in preovulatory phase in the C group. Data were centered at the median of the hLH surge above 20 mIU/ml. Note those data are plotted on a logarithmic scale. Arrow indicates the values less than 2.5 mIU/ml.

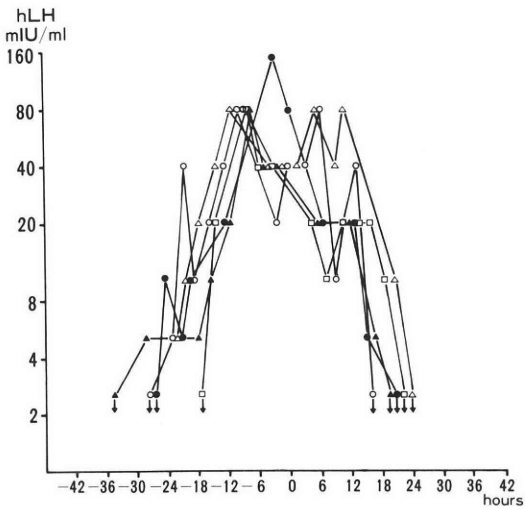


Fig. 2 3-hour urinary hLH surge in preovulatory phase in the P-1 group. Data were centered at the median of the hLH surge above 20 mIU/ml.

plateau phase was lower and unstable, and the descending phase assumed a more steep downward curve compared with that of the C group. The hLH surge and plateau phase in the P-2 group were the shortest duration. In general, urinary hLH was not detectable except during the midcycle surge as previously reported¹⁾. In all of the C group, however, a small fluctuating hLH secre-

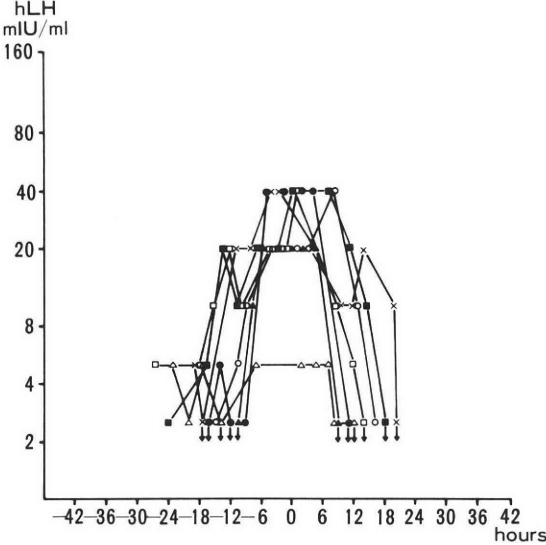


Fig. 3 3-hour urinary hLH surge in preovulatory phase in the P-2 group. Data were centered at the median of the hLH surge above 5 mIU/ml.

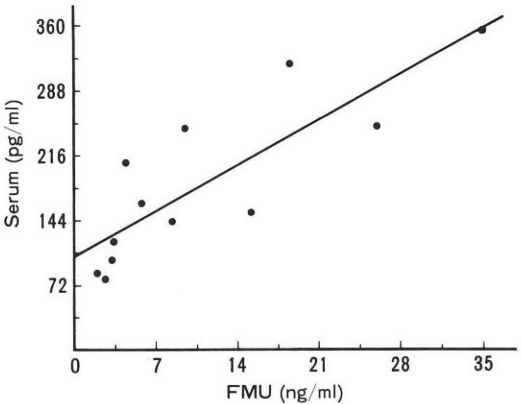


Fig. 4 The correlation between the serum E₂ value and the first morning urine (FMU) E₂ value on the following day. These data were obtained by single assay RIA.
[Y=7.24X+103.5, r=0.8367 (p<0.01)]

tion from 5 to 20 mIU/ml was manifested 3.5 to 19.5 hours before the true hLH surge. This fluctuation observed in 7 women in both patient groups, too. The mean ($\pm$ SD) urine hLH surge duration and peak of the 3 groups are summarized in Table 1. Each itemized duration in the C group was significantly long compared with those in the P-1 group ($p<0.01$ to $p>0.05$). There also were significant differences between the P-1 and the P-2 groups ($p<0.01$ to $p<0.05$). The mean hLH peak value in the C group tended to be higher than that

Table 1. The mean surge ($\pm$ SD) itemized durations and peaks of hLH surge in preovulatory phase in 3 groups.

	Duration of hLH secretion (hours)					Levels of hLH peak (mIU/ml)
	$\geq 40\text{mIU/ml}$	$\geq 20\text{mIU/ml}$	$\geq 10\text{mIU/ml}$	$\geq 5\text{mIU/ml}$	hLH surge	
C group (n = 8)	28.2 $\pm$ 5.9	40.3 $\pm$ 8.8	51.2 $\pm$ 11.9	63.1 $\pm$ 13.6	55.6 $\pm$ 11.7	140.0 $\pm$ 37.0
P-1 group (n = 5)	15.6 $\pm$ 8.5	25.2 $\pm$ 5.9	35.2 $\pm$ 4.2	41.1 $\pm$ 3.6	37.4 $\pm$ 5.7	96.0 $\pm$ 35.8
P-2 group (n = 7)	3.1 $\pm$ 3.8	11.4 $\pm$ 5.8	19.4 $\pm$ 11.0	25.7 $\pm$ 9.6	24.6 $\pm$ 8.3	32.1 $\pm$ 14.1
p ₁	< 0.02	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.02	< 0.1
p ₂	< 0.02	< 0.01	< 0.02	< 0.02	< 0.05	< 0.01

p₁ Statistical significance between C and P-1 groups

p₂ Statistical significance between P-1 and P-2 groups

Table 2 The mean ($\pm$ SD) values of urinary E₂ peak in preovulatory phase.

	n	E ₂ (mean $\pm$ SD)ng/ml
C group	8	17.8 $\pm$ 8.4
P-1 group	5	21.6 $\pm$ 11.5
P-2 group	7	46.5 $\pm$ 30.1*

n number of cases

* Significant difference between C and P-2 groups (p < 0.05)

in the P-1 group but no significant difference (p < 0.1) was observed. However, there were significant differences between the C and P-2 groups or between the P-1 and P-2 groups (p < 0.01).

In the C group, E₂ values in serum and in hydrolyzed urine were determined by RIA. As shown Fig. 4, there was a definite correlation between the E₂ values in serum and those in the first morning urine on the following day, with a correlation coefficient of 0.8367 (p < 0.01). The peak values of E₂ in serum and in urine were noticed on the previous day and on the day of hLH surge, respectively. The mean ($\pm$ SD) urine E₂ values in the C, P-1 and P-2 groups were 17.8 $\pm$ 8.4 ng/ml, 21.6 $\pm$ 11.5 ng/ml and 46.5 $\pm$ 30.1 ng/ml, respectively. The mean E₂ value in the P-2 group tended to be higher than that in the other groups and there was a significant difference (p <

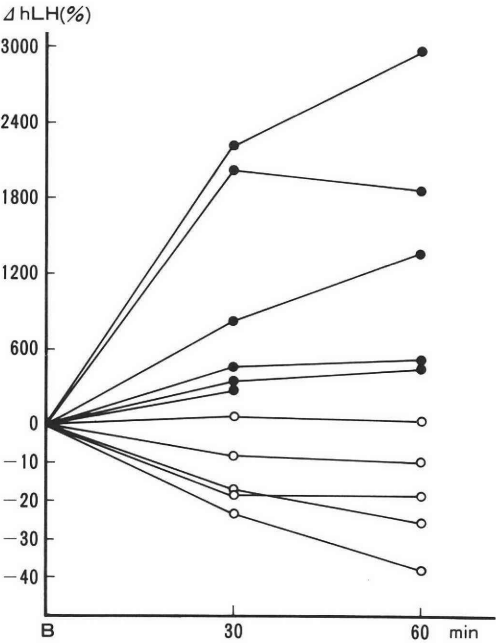


Fig. 5 The percent change in serum hLH release in response to LH-RH (filled circle) and hCG (open circle).

0.05) between the C and P-2 groups (Table 2). There was no significant difference however, between the C and P-1 groups.

Two women in the P-1 group and 3 in the P-2 group were intramuscularly administered 100 μ g

Table 3 The increment of hLH surge durations and peaks following LH-RH administration

	Before LH-RH administration		After LH-RH administration	
	Peak (mIU/ml)	Duration (hours)	Peak (mIU/ml)	Duration (hours)
P-1 group	80	33.0	160	35.0
	160	40.0	320	58.0
P-2 group	40	22.5	160	52.5
	40	17.0	320	48.5
	40	9.0	1280	24.5

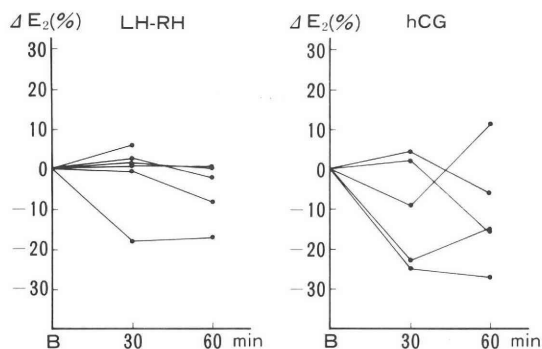


Fig. 6 The percent change in serum E₂ level following LH-RH and hCG administration.

LH-RH in one bolus at the initiation of the hLH surge. The hLH surge duration and peak in the 3U samples after LH-RH administration was longer and higher in all 5 women than before administration. However, striking differences were noticed in the P-2 group (Table 3).

The results of serum hLH and E₂ responses to hCG or LH-RH in 11 women who underwent AIH are shown in Figs. 5 and 6. With administration of hCG, serum hLH was reduced in 4 women, with a poor response in one woman. However, serum hLH responded well to LH-RH administration in 6 women. The individual responses of serum E₂ level to hCG or LH-RH quite varied.

Discussion

Urinary hLH analyses to detect the time of ovulation are now made by dipstick^{2,5)}, hemagglutination reaction^{6,7)} or LH color. However, these methods have some drawbacks, such as a small number of calibrators, cross reaction to hCG or difficulty in reading the intensity of blue color. We have previously reported that our improved micrometric semiquantitative method solves each of these problems and maintains a good correlation with serum hLH values obtained by radioimmunoassay¹⁾. Hence the most important urinary hLH surges in infertile women could be measured precisely by this method.

As shown in Figs. 1, 2 and 3, the hLH surge patterns in each group were somewhat similar in form. A small fluctuating hLH secretion was manifested before the true hLH surge in all cases in the C, and 3 in the P-1 and 4 in the P-2 groups.

These fluctuations were marked in the C group. This may be influenced by the high amplitude hLH pulsatile secretion in periovulatory phase as in serum⁸⁾. Therefore, the hLH pulsatile secretions in the P-1 and P-2 groups may be impeded. The mean duration of hLH surge was 55.6 ± 11.7 hours which was significantly long compared with that in the P-1 and P-2 groups. The plateau phase in the C group, which was maintained for 6 to 24 hours, may lead to the difference in hLH surge duration between the C and the P-1 groups. Hoff et al.⁹⁾ reported the mean duration of serum hLH surge as 48.7 hours and that of the peak plateau level, 14 hours. The disparity may be due to the difficulties in discerning the initiation and termination of serum hLH surge and/or the effects of metabolic clearance. The mean duration and peak of hLH surge in the P-2 group were 24.6 ± 8.3 hours and 32.1 ± 14.1 mIU/ml, respectively, which were short and low significantly compared with the C or P-1 groups. According to the BBT charts of each case in the P-2 group, the duration of the high phase was within normal limits but the difference between the low and high phase was small. Hence this inadequate hLH surge in the P-2 group may lead to the anovulation regardless of the biphasic shift on the BBT chart. By dipstick, the urinary hLH surge, which was defined as the value equal to or exceeding the 40 mIU/ml calibrator, correlated completely (100%) with the biphasic BBT record, and judging from ultrasound and serum progesterone, however, the biphasic BBT record was regarded as the ovulatory cycle^{10,11)}. But in this study, the peak level and duration of hLH surge were indistinct.

Table 1 shows the mean durations of itemized hLH secretion during surge. The durations of each itemized hLH secretions in the C group were significantly longer than those of the P-1 and P-2 groups. Gaussian reference distribution was used to determine the probability that a randomly selected hLH surge duration may be greater than 24 hours. As a result, the chance of an hLH surge duration of 24 hours or longer was 76.1% (>40 mIU/ml), 96.8% (>20 mIU/ml), 98.9% (>10 mIU/ml) and 99.8% (>5 mIU/ml) in the C group, 57.9% (>20 mIU/ml), 99.6% (>10 mIU/ml) and 99.9% (>

5 mIU/ml) in the P-1 group and 56.7% (>5 mIU/ml) in the P-2 group, respectively. Therefore, the initiation of hLH surge in the C and P-1 groups was always detected in the urine sampling at least once a day but in the P-2 group it was not detected in about half of the samples. However, urinary hLH level measurements by the method of dipstick or LH color are determined by comparison of the intensity of the blue color and with the calibrator at only 20 and 40 mIU/ml, or only 50 mIU/ml. Therefore, in once a day urine sampling, urinary hLH surge was detected in almost all C group samples and in about half of the P-1 group samples by dipstick, and in less than half of the C group samples by LH color. Baker et al.⁵⁾ reported that single daily measurements would only give results >40 IU/l calibrator in 65% to 80% of cycles. When compared with our results, these figures were high. This may be caused by hormonal normality in the subjects who underwent AIH. Consequently, if full usefulness of the dipstick method is to be attained, more samples per day are necessary. But it remains unclear whether the LH color is useful as a reliable detection method of hLH surge in infertile patients.

Urinary E_2 values were determined whether the differences of hLH surge in the three groups were derived from the E_2 level. Preliminary hormone measurements revealed that serum E_2 on a particular day corresponded to urinary E_2 in the first morning urine on the following day (Fig. 4) and the day of urinary E_2 peak occurrence coincided with the day of urinary hLH surge (Day 0). These results were in agreed with those of other reports^{12,13)}. Therefore, the peak E_2 values for each woman on Day 0 were used for E_2 surge in the preovulatory phase. As shown in Table 2, the mean value of E_2 surge in the P-2 group, contrary to our expectation, was significantly high compared with that in the C group. However, there were no significant differences between the C and P-1 groups, and the P-1 and P-2 groups. It seemed that the ovulatory induction in the P-1 and P-2 groups led to high E_2 secretion. High E_2 surge in the P-2 group did not provoke a greater midcycle hLH than that of the C group. This suggests that the E_2 concentration necessary to achieve a posi-

tive feedback was not sustainable for approximately 50 hours, or the positive action of estrogen did not sufficiently increase the hLH quantity in the pituitary gland during midcycle. Messinis et al.¹⁰⁾ showed that serum E_2 levels in women stimulated with follicle stimulating hormone are higher in the cycle without hLH surge than in those with the surge, and these patients usually show a PCO type gonadotropin pattern. These may ultimately be dependent upon a defect in the central nervous system.

The duration and the peak of urinary hLH surge before and after LH-RH administration were determined to examine the quantity of hLH in the pituitary gland (Table 3). Both the duration and peak responded well to the LH-RH administration in all but one case. In the one case in the P-2 group, an exaggerated peak response was noticed following LH-RH administration with a poor duration. It seemed that this was due to a high concentration of hLH in the pituitary gland released at a stroke in response to the LH-RH administration prohibiting the duration from reaching normal. Therefore, the accumulation of LH-RH in the pituitary gland in the P-1 and P-2 groups seemed to be a normal quantity. Furthermore, striking differences in the response to LH-RH were noticed within the P-2 group. Hence, it can be suggested that the insufficiency of the hLH surge in the P-2 group was, regardless of the high E_2 values, caused by the fact that the positive feedback could not function sufficiently and thus there was not enough LH-RH secretion.

The women who underwent AIH were used to administer hCG as a surrogate hLH surge for the purpose of prompt ovulation and maintenance of the luteal phase. The effects of hCG on intrinsic serum hLH were examined and compared with those of LH-RH (Fig. 5). With the administration of hCG, intrinsic hLH tended to be reduced. Contrary to this, serum hLH responded well to the LH-RH administration. On the other hand, hCG and LH-RH did not appear to exert an effect on E_2 secretion within 1 hour of administration (Fig. 6). It remains obscure whether human oocytes maturing *in vivo* following hCG administration are comparable to oocytes of natural physiologi-

cal maturation. Sebel, et al.¹⁴⁾ have reported that meiosis resumes earlier following hCG administration and the range of time elapsing between onset and completion of each stage of maturation are more varied following the natural stimulus for meiotic maturation. Therefore, the LH-RH pulsatile administration can be recommended for infertile women in an attempt to obtain a gradual increase in plasma hLH concentration during the preovulatory surge.

In view of these results, it seems that the midcycle surge of hLH in infertile women was insufficient and the best therapy regarding the hLH surge was LH-RH or hCG in one bolus administration in the P-1 group and LH-RH pulsatile administration in the P-2 group in the preovulatory phase. Furthermore, this micrometric semiquantitative immunoassay method was valid for the detection of hLH surge in midcycle and is available for the treatment of infertility. Acknowledgement: We wish to thank Miss K. Kigasawa for the excellent technical assistance for the analyses and Eiken Chemical Co., Ltd. for the kit preparation.

References

- 1) Okamura T., Takeuchi, T., Nishii, O. and Yaginuma, T.: A new method of micrometric measurement for hLH in urine, under contribution
- 2) Hirsh, K. E., Goldzieher, J. W., Gibbons, W. E. and Besh, P. K.: Evaluation of the ovustick urinary luteinizing hormone kit in normal and stimulated menstrual cycle, *obstet. Gynecol.* 67: 450, 1986
- 3) Knee, G. R., Feinman, M. A., Strauss III, J. F., Blasco, L. and Goodman, D. B. P.: Detection of the ovulatory luteinizing hormone (LH) surge with a semiquantitative urinary LH assay, *Fertil. Steril.* 44: 707, 1985
- 4) Quagliarello, J. and Arny, M.: Inaccuracy of basal body temperature charts in predicting urinary, luteinizing hormone surge, *Fertil. Steril.* 45: 334, 1986
- 5) Baker, H. W. G., Bangah, M. L., Burger, H. G., Kovacs, G. T., Summerbell, D and Warnes, G. M.: Timing of ovulation of the urinary luteinizing hormone surge with an enzyme-linked monoclonal antibody dipstick. *Aust. NZ. J. Obstet. Gynecol.* 26: 79, 1986
- 6) Varma, T. R., Patel, R. H. and Everard, D.: Determination with Hi-Gonavis of luteinizing hormone levels in urine compared with those in plasma, *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 89: 87, 1982
- 7) Ho, P. C., Kwan, M., Chan, S. Y. W., Chan, P. H. and Tang, L. C. H.: Rapid urinary LH assay for prediction of ovulation, *Aust. NZ. J. Obstet. Gynecol.* 25: 230, 1985
- 8) Steele, P. A., Mc Donnell, L. F. and Judd, S. J.: Activity of gonadotropin-releasing hormone neurons during preovulatory luteinizing hormone surge, *Fertil. Steril.* 45: 179, 1986
- 9) Hoff, J. D., Quigley, M.E. and Yen, S. S. C.: Hormonal dynamics at midcycle: A reevaluation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 792, 1983
- 10) Messinis, I. E. and Templeton, A. A.: Endocrine and follicle characteristics of cycles with and without endogenous luteinizing hormone surge during superovulation induction with pulsatile follicle-stimulating hormone, *Hum. Reprod.* 2: 11, 1987
- 11) Corson, S. L.: Self-prediction of ovulation using a urinary luteinizing hormone test, *J. Reprod. Med.* 31: 760, 1986
- 12) Weerasekera, D. A., Kim, J. B., Barnard, G. J. and Collins, W. P.: Multiple immunoassay: the simultaneous measurement of two urinary steroid glucuronides as an index of ovarian function, *J. Steroid. Biochem.* 18: 465, 1985
- 13) Adlercreutz, H., Brown, J., Collins, W., Goebelsman, U., Kellie, A., Campbell, H., Spieler, J. and Braissand, G.: The measurement of urinary steroid glucuronides as indices of the fertile period in women, *J. Steroid. Biochem.* 17: 695, 1982
- 14) Seibel, M. M., Smith, D. M., Levesque, L. L., Borten, M. and Taymor, M. L.: The temporal relationship between the luteinizing hormone surge and human oocytes maturation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142: 568, 1982

不妊婦人の尿中 LH サージは短い

東京大学医学部附属病院分院産婦人科

岡村 隆 竹内 亨 西井 修
柳沼 恣

尿中 LH を 2.5-640mIU/ml まで測定可能なキットが開発された。この方法を用いて、8 例の正常婦人 (C 群) と 12 例の不妊婦人の 3 時間尿における LH サージの検出を試みた。

不妊婦人はそのピーク値により 2 群 ($P-1 \geq 80\text{mIU/ml}$, $P-2 \leq 40\text{mIU/ml}$) に分類した。3 群における平均

LHサージ持続時間は、それぞれ 55.6 ± 11.7 , 37.4 ± 5.7 , 24.6 ± 8.3 時間であり、C群とP-1群、P-2群およびP-1群とP-2群に有意差を認めた ($P < 0.02$, $P < 0.05$) また各群の平均ピーク値は、 140.0 ± 11.7 , 96.0 ± 35.8 , 32.1 ± 14.1 mIU/ml であり、C群とP-2群およびP-1群とP-2群に有意差 ($P < 0.01$) を認めた。また同検体中の Estradiol (E_2) を測

定した。その結果、P-2群の E_2 はC群に比し有意に高値を示した。以上の結果、 E_2 高値にもかかわらず不妊婦人のLHサージは短く、このことは、恐らく中枢に対する E_2 の Positive Feedback 障害によるものと考えられた。

(受付：1988 年 9 月 22 日特掲)

不妊症における黄体中期のプロゲステロンと エストラジオールの相関性

Correlation of Serum Progesterone and Estradiol Levels of Mid-luteal phase in Infertile Women

東京大学医学部産科婦人科学教室

石 原 理 石 原 智 子 堤 治
Osamu ISHIHARA Satoko ISHIHARA Osamu TSUTSUMI
武 谷 雄 二 水 野 正 彦
Yuji TAKETANI Masahiko MIZUNO

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,
University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

不妊婦人の黄体中期にプロゲステロン (P_4) およびエストラジオール (E_2) を測定し、黄体機能不全における P_4 と E_2 の相関、また各種排卵誘発剤の黄体中期 P_4 、 E_2 に対する影響を検討した。

(1) 黄体中期の P_4 と P_4/E_2 には、正の相関を認めた ($P < 0.001$)。また、いずれも黄体期が長いほど高値をとった。

(2) LHRH テストおよび TRH テストにより、PCO (A群)、潜在性高プロラクチン血症 (B群)、その他 (C群) に分類すると、各種治療周期における P_4 と P_4/E_2 に、それぞれ特徴的な傾向が示された。

(3) 黄体中期に P_4 と同時に E_2 を測定し、 P_4/E_2 を指標にすることで、様々な治療周期における黄体機能の評価が可能となった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 266-271, 1989)

緒 言

着床期のステロイドホルモン環境は、子宮内膜および受精卵に多大な影響を与える。なかでも、プロゲステロン (P_4) は、子宮内膜日付診とともに、黄体機能不全の指標として用いられ、 P_4 が低値を取る症例において、妊孕性が低下することが知られている¹⁻³⁾。

in vitro の組織培養や細胞培養系においても、着床に関与すると考えられているプロスタグランジンの産生を初めとするアラキドン酸代謝を、 P_4 が調節する可能性が示されている^{4,5)}。また、受精卵の形態学的、生化学的成熟に P_4 の関係していることが示唆されている⁶⁾。

一方、エストラジオール (E_2) は、*in vitro* にお

いて、子宮内膜細胞のグリコーゲン代謝やアラキドン酸代謝等に著しい影響を与えることが知られているが⁷⁻⁹⁾、*in vivo* における子宮内膜への影響や P_4 との関係については、不明点が多い。

そこで、今回、不妊婦人を対象として、黄体中期に P_4 、 E_2 を測定し、いわゆる黄体機能不全における P_4 と E_2 の相関、また各種排卵誘発剤の黄体中期 P_4 、 E_2 に対する影響を検討した。

方 法

22歳から47歳の不妊婦人 (平均 30.73 ± 4.17 歳) 175人を対象とし、基礎体温および超音波断層法により、排卵の確認された周期において、黄体中期 (高温相6から8日目) に採血し、 P_4 および E_2 をRIAにて測定した。

Table 1. Serum levels of gonadotrophin and prolactin at early follicular phase and ovarian steroids at mid luteal phase in natural ovulatory cycles of various infertile patients. (mean $\pm$ S.D.)

	age (year)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	PRL (ng/ml)	P ₄ (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	P ₄ /E ₂
PCO (n = 12)	30.2 $\pm$ 2.9	35.0* $\pm$ 8.2	12.7* $\pm$ 3.0	18.6 $\pm$ 9.5	8.43 $\pm$ 3.99	140.2 $\pm$ 34.4	64 $\pm$ 30
latent hyperPRLemia (n = 35)	30.2 $\pm$ 3.9	14.8* $\pm$ 5.1	11.5* $\pm$ 5.4	18.9 $\pm$ 5.9	8.21** $\pm$ 4.13	122.6 $\pm$ 41.1	71 $\pm$ 36
others (n = 128)	30.9 $\pm$ 4.2	14.7* $\pm$ 5.8	9.8* $\pm$ 3.3	17.1 $\pm$ 7.6	9.76** $\pm$ 4.02	120.7 $\pm$ 53.1	88 $\pm$ 39

PCO : polycystic ovary syndrome
LH : luteinizing hormone
FSH : follicle stimulating hormone
PRL : prolactin
P₄ : progesterone
E₂ : estradiol
(* : P < 0.01
** : P < 0.05)

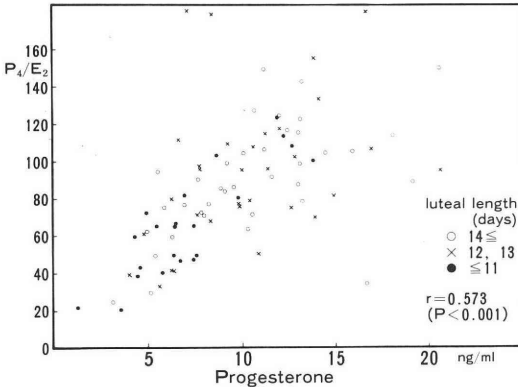


Fig. 1 Correlation between progesterone values and progesterone/estradiol in mid luteal phase of natural ovulatory cycles. (n=95)

P₄: progesterone
E₂: estradiol

対象症例には、あらかじめ卵胞前期（月経周期第 5 日前後）に LHRH テスト（LHRH 100 μ g i.m.）および TRH テスト（TRH 500 μ g i.m.）を施行した。その結果、卵胞前期の LH 基礎値 25mIU/ml 以上かつ FSH 基礎値 15mIU/ml 以下で、LHRH に対する LH の過剰反応を示すいわゆる PCO 症例 12 例（A 群）、および卵胞前期の PRL 基礎値 25ng/ml 未満かつ TRH 負荷後 PRL 値 150ng/ml 以上を示す潜在性高プロラクチン血症例 35 例（B 群）が含まれており、A、B 群に含まれない 128 例を C 群とした。

まず、薬剤非投与周期で排卵を有する症例において、黄体中期に P₄、E₂ を測定した。次いで、クロミフェン、プロモクリプチン、hMG-hCG を投与した治療周期のうち、排卵を認めた周期において、黄体中

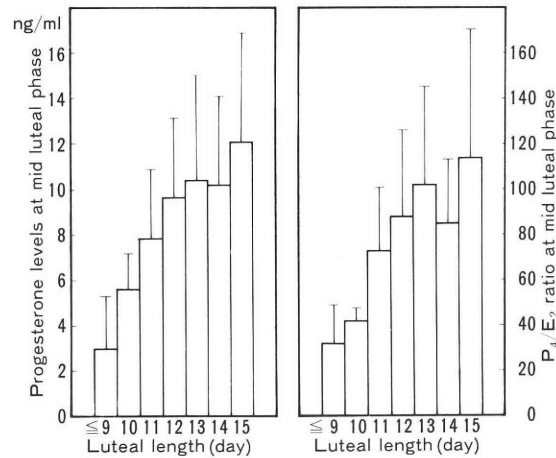


Fig. 2 Serum progesterone levels and progesterone/estradiol according to the luteal length in natural ovulatory cycles. (n=95)

期 P₄、E₂ を測定した。ただし、同一症例にかならずしも、すべての治療を施行しているのではないので、それぞれの成績の症例数は同一ではない。また、結果の推計学的処理は、Student's t test によった。

結 果

（1）薬剤非投与周期の P₄ および P₄/E₂

対象症例の年齢、LH、FSH、PRL の基礎値、薬剤非投与周期の黄体中期 P₄、E₂、P₄/E₂ を Table 1 に示す。各群症例の年齢に有意差は認められない。

LH は、A 群（PCO）において、他の 2 群より有意に高値をとり、FSH は C 群において、他の 2 群より有意に低値をとった。また、黄体中期の P₄ に

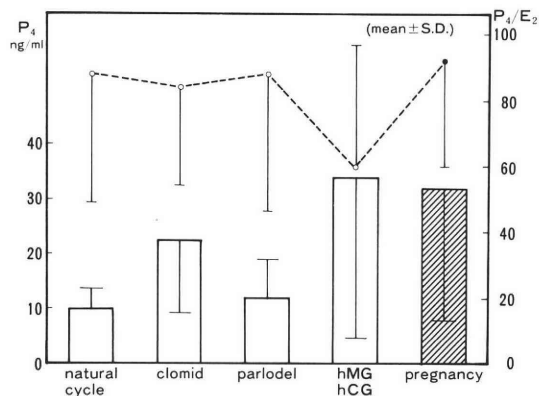


Fig. 3 Serum progesterone levels (bars) and progesterone/estradiol (open circles) in various stimulated cycles and pregnant cycles. (n=199)
P₄: progesterone
E₂: estradiol

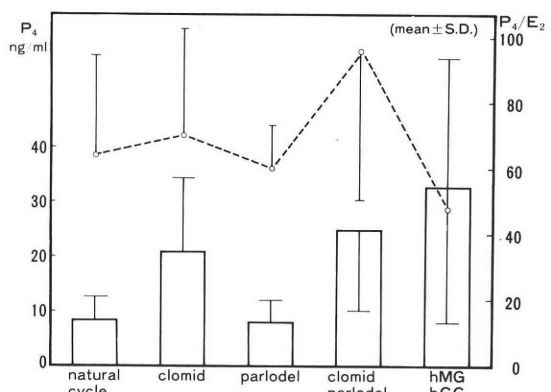


Fig. 5 Serum progesterone levels (bars) and progesterone/estradiol (open circles) in various stimulated cycles of the patients with polycystic ovary syndrome. (n=22)
P₄: progesterone
E₂: estradiol

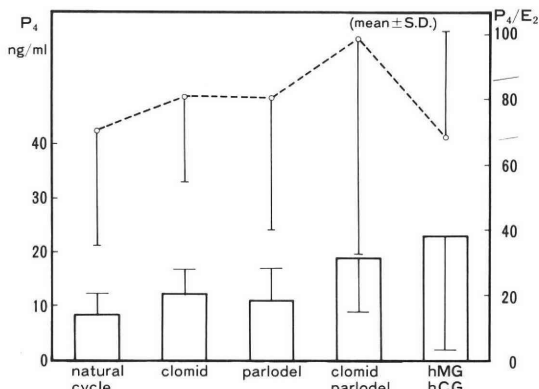


Fig. 4 Serum progesterone levels (bars) and progesterone/estradiol (open circles) in various stimulated cycles of the patients with latent hyperprolactinemia. (n=59)
P₄: progesterone
E₂: estradiol

ついて、B群（潜在性高プロラクチン血症）は、C群に比し有意に低値であった。P₄/E₂は、A群で他群より低値であったが、有意差は認められなかった。

次いで、薬剤非投与周期 92 周期の黄体中期 P₄と P₄/E₂の相関を検討すると、これらには、 $r=0.573$ の正の相関を認めた ($p<0.001$) (Fig. 1)。また、同じデータを黄体期長により分類すると、黄体期が長いほど P₄および P₄/E₂は高値をとった (Fig. 2)。

(2) 治療周期の P₄および P₄/E₂

C群 (Fig. 3) について、薬剤非投与周期 (n=78) の黄体中期 P₄は、 9.76 ± 4.02 ng/ml、P₄/E₂は 88 ± 39 (mean $\pm$ S.D.) であった。一方、クロミフェン投与周期 (n=33) では、それぞれ 22.6 ± 13.8 ng/ml、

84 ± 33 、プロモクリプチン投与周期 (n=29) では、それぞれ 11.7 ± 7.0 ng/ml、 88 ± 48 、hMG-hCG 周期 (n=15) では、それぞれ 34.3 ± 30.2 ng/ml、 60 ± 37 であった。さらに、妊娠成立周期（クロミフェン 4 例、プロモクリプチン 1 例、hMG-hCG 1 例）では、それぞれ 31.8 ± 24.2 ng/ml、 92 ± 33 であった。

B群（潜在性高プロラクチン血症）(Fig. 4) について、薬剤非投与周期 (n=23) の黄体中期 P₄は、 8.21 ± 4.13 ng/ml、P₄/E₂は 71 ± 36 であった。一方、クロミフェン投与周期 (n=6) では、それぞれ 12.5 ± 4.3 ng/ml、 81 ± 27 、プロモクリプチン投与周期 (n=12) では、それぞれ 10.9 ± 5.7 ng/ml、 81 ± 43 、クロミフェン、プロモクリプチン併用周期 (n=11) では、それぞれ 19.0 ± 8.9 ng/ml、 98 ± 69 、hMG-hCG 周期 (n=7) では、それぞれ 22.8 ± 21.8 ng/ml、 68 ± 34 であった。妊娠周期に採血のできた症例はなかった。

A群 (PCO) (Fig. 5) について、薬剤非投与周期 (n=5) の黄体中期 P₄は、 8.43 ± 3.99 ng/ml、P₄/E₂は 64 ± 30 であった。一方、クロミフェン投与周期 (n=5) では、それぞれ 20.7 ± 13.5 ng/ml、 70 ± 32 、プロモクリプチン投与周期 (n=3) では、それぞれ 6.9 ± 0.7 ng/ml、 59 ± 10 、クロミフェン、プロモクリプチン併用周期 (n=5) では、それぞれ 25.1 ± 15.9 ng/ml、 97 ± 46 、hMG-hCG 周期 (n=4) では、それぞれ 33 ± 23 ng/ml、 48 ± 36 であった。妊娠周期に採血のできた症例はなかった。

考 察

臨床的に、妊娠周期の黄体中期 P₄は、高値を取る

ことが経験されており、黄体期の P_4 補充が、一部の習慣性流産の治療¹⁰⁾や、IVF-ET後¹¹⁾に有効であることが報告されている。したがって、黄体期の P_4 値は、妊娠成立と密接な関連があることは、疑いの余地がない。さらに、in vitroの子宮内膜細胞培養系のデータの多くが、培養液中 P_4 添加によるグリコーゲン産生やプロスタグランジン産生を指標として、 P_4 の必要性を示唆している^{4,5,7,8,9)}。

Gidley-Bairdら¹²⁾は、IVF-ET後の非妊娠症例において、血中 E_2 が高値を、 P_4/E_2 が低値を取ることを報告し、 E_2 が着床を阻害する可能性を示唆したが、不妊症症例におけるさまざまな治療周期の黄体期 E_2 の意義については、未だ一致した見解は得られていない¹³⁻¹⁶⁾。今回、我々は、とくに受精卵の着床環境整備の見地から、黄体中期の P_4 、 E_2 を検討し、その不妊症治療上の意義を考察した。

P_4 と P_4/E_2 には全体として正の相関を認め、黄体期には、主に P_4 の変動が大きいことが示唆される。また、黄体期の持続期間と P_4 値に注目すると、黄体期が11日以下の時は、黄体期の長さに比例して、 P_4 が低下することが示された。すなわち、黄体機能低下例では、黄体の寿命も短縮することが確認された。

対象症例を、内分泌学的背景により、A群(PCO)、B群(潜在性高プロラクチン血症)、C群(その他)に分類すると、各種治療周期における P_4 と P_4/E_2 に、それぞれの群に特徴的な傾向が示された。すなわち、C群では、クロミフェンあるいはhMG-hCG投与周期において、 P_4 は著しく上昇するが、 P_4/E_2 は低下する傾向にある。妊娠周期において P_4 の上昇と共に、 P_4/E_2 が高値を取ることで、クロミフェンあるいはhMG-hCG周期における、排卵率に比した妊娠率の低値の原因の可能性とも考えられる。また、プロモクリプチン投与周期は、過去の報告¹⁷⁾と同様に、 P_4 の改善はわずかだが、 P_4/E_2 は上昇する。したがって、 P_4/E_2 を改善させるため、黄体期の P_4 補充や卵巣過剰刺激の防止が、妊娠率の向上につながることを示唆すると思われる。

一方、B群(潜在性高プロラクチン血症)において、特徴的なことは、クロミフェン単独による P_4 上昇作用の乏しいことで、これは、クロミフェンおよびプロモクリプチンの併用により P_4 、 P_4/E_2 の改善の得られることと対照的である。残念ながら該当周期黄体中期に採血はされていないが、調査期間中にB群のうち4例が、クロミフェン、プロモクリプチン投与により妊娠したことは、 P_4/E_2 改善の重要性を支持するものと思われる。

A群(PCO)は、症例数が少ないため断定的な

ことは述べられないが、様々な薬剤投与による排卵誘発治療に対して、 P_4/E_2 の改善の困難なことから、PCOの治療の困難性がうかがわれる。

黄体中期における血中 P_4 測定の黄体機能不全診断上の意義については、血中 P_4 に日内変動やパルス状の分泌が認められることが明らかとなり¹⁸⁾、意見が分れているのが現状である¹⁹⁻²²⁾。また、血中 P_4 が正常にもかかわらず、子宮内膜日付診に遅れの見られる症例の少なからず存在することから、レセプターレベルでの障害を推定させるpseudoluteal phase defectと呼ばれる概念が示されているが、 P_4 レセプターに関する意見も一致しているわけではない²³⁾。

しかしながら、不妊症の実地診療において、 P_4 は黄体機能の最も重要な指標のひとつであることは、広く認められているところである。今回の検討において、黄体機能不全の背景や治療により、 P_4 と P_4/E_2 比が乖離することが示された。したがって、排卵誘発ないし黄体機能不全治療を目的として、様々な薬剤の投与された周期における黄体機能の評価には、同時に E_2 を測定して、 P_4/E_2 を指標に追加することが望ましいと思われる。

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) Jones, G. S.: The luteal phase. *Fertil. Steril.* 27: 351, 1976
- 2) Sherman, B. M. and Korenman, S. G.: Measurement of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in disorder of the human menstrual cycle: The short luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 89, 1974
- 3) Rosenfeld, D. L., Chudow, S. and Brouson, R. A.: Diagnosis of luteal inadequacy. *Obstet. Gynecol.* 56: 193, 1980
- 4) Abel, M. H. and Baird, D. T.: The effect of 17 estradiol and progesterone on prostaglandin production by human endometrium maintained in organ culture. *Endocrinology* 106: 1599, 1980
- 5) Schatz, F., Markiewicz, L., Barg, P. and Gurdip, E.: In vitro effects of ovarian steroids on prostaglandin $F_{2\alpha}$ output by human endometrium and endometrial epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 361, 1985
- 6) Ayabe, T., Tsutsumi, O., Yano, T., Mitsushashi, N. and Mizuno, M.: Possible autocrine function of progesterone in the preimplantation development of mouse embryo. *J. Fertil. Implant.* (Tokyo) 5: 88, 1988 (in Japanese)
- 7) Schatz, F. and Gurdip, E.: Effects of estradiol on prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in primary

- monolayer cultures of epithelial cells from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 113: 1274, 1983
- 8) Leaver, H. A. and Richmond, D. H.: The effect of oxytocin, estrogen, calcium ionophere A23187 and hydrocortisone on prostaglandin F₂ α and 6-oxo-prostaglandin F₁ α production by cultured human endometrial and myometrial explants. *Prostaglandins Leukotriens Med.* 13: 179, 1984
 - 9) Ishihara, S., Taketani, Y. and Mizuno, M.: Stimulatory action of progesterone on the synthesis of glycogen in primary cell culture of human endometrium. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.* 14: 117, 1988
 - 10) Daya, S., Ward, S. and Burrows, E.: Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158: 225, 1988
 - 11) Jones, G. S.: The role of luteal support in a programme for in vitro fertilization. *Implantation of the human embryo: p285*, London, Academic Press Inc. 1985
 - 12) Gidley-Baird, A. A., O'Neil, C., Sinosich, M. J., Porter, R. N., Pike, I. L. and Saunders, D. M.: Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: the effects of altered progesterone/estrogen ratios in humans and mice. *Fertil. Steril.* 45: 69, 1986
 - 13) Goldstein, D., Zuckerman, H., Harpaz, S., Barkai, J., Geva, A., Gordon, S., Shalev, E. and Schwartz, M.: Correlation between estradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency. *Fertil. Steril.* 37: 348, 1982
 - 14) Cook, C. L., Rao, C. V. and Yussman, M. A.: Plasma gonadotropin and sex steroid hormone levels during early, midfollicular, and mid-luteal phase of women with luteal phase defects. *Fertil. Steril.* 40: 45, 1983
 - 15) Smith, S. K., Lenton, E. A. and Cooke, I. D.: Premenstrual levels of 17 estradiol and progesterone in plasma in cycles of short and normal luteal phase length. *Clin. Reprod. Fertil.* 2: 261, 1983
 - 16) Smith, S. K., Lenton, E. A. and Cooke, I. D.: Plasma gonadotrophin and ovarian steroid concentrations in women with menstrual cycles with a short luteal phase. *J. Reprod. Fertil.* 75: 363, 1985
 - 17) Lehtovirta, P., Arjomaa, P., Ranta, T., Laatikainen, T., Hirvonen, E. and Seppala, M.: Prolactin levels and bromocriptine treatment of short luteal phase. *Int. J. Ferti.* 24: 57, 1979
 - 18) Soules, M. R., Clifton, D. K., Steiner, R. A. and Cohen, N. L.: The corpus luteum: Determination of progesterone secretion in the normal menstrual cycle. *Obstet. Gynaecol.* 71: 659, 1988
 - 19) Wu, C. H. and Minassian, S. S.: The integrated luteal progesterone: an assessment of luteal function. *Fertil. Steril.* 48: 937, 1987
 - 20) Abraham, G. E., Maroulis, G. B. and Marshall, J. R.: Evaluation of ovulation and corpus luteum function using measurements of plasma progesterone. *Obstet. Gynecol.* 44: 522, 1974
 - 21) Wathen, N. C., Perry, L., Lilford, R. J. and Chard, T.: Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Brit. Med. J.* 288: 7, 1984
 - 22) Daya, S. and Ward, S.: Diagnostic test properties of serum progesterone in the evaluation of luteal phase defects. *Fertil. Steril.* 49: 168, 1988
 - 23) Jacobs, H. H., Balasch, J., Gonzalez-merlo, J. M., Vanrell, J. A., Wheeler, C., Strauss, J. F., Blasco, L., Wheeler, J. E. and Lyttle, C. R.: Endometrial cytosolic and nuclear progesterone receptors in the luteal phase defect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 472, 1987

Correlation of serum progesterone and estradiol levels of mid-luteal phase in infertile women

Osamu Ishihara, Satoko Ishihara,
Osamu Tsutsumi, Yuji Taketani
and Masahiko Mizuno

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, University of Tokyo,
Tokyo, 113 Japan

In order to evaluate the effects of progesterone (P₄) and estradiol (E₂) on endometrium around implantation, mid-luteal blood samples were taken from women who had various endocrinological backgrounds of infertility and were treated with some ovulation induction methods.

The non-pregnant cycles of patients treated with either clomiphene or hMG-hCG showed higher P₄ levels and lower P₄/E₂ ratios in contrast with high levels of both P₄ and P₄/E₂ in pregnant cycles. But administration of bromocriptine increased P₄/E₂ as well as P₄ in non-pregnant cycles.

The women with latent hyperprolactinemia showed poor response to clomiphene on improvement of luteal function, but combined use of bromocriptine made it possible to acquire good results not

only in P_4/E_2 ratios but also in achieving pregnancy.

In spite of various treatment, it was difficult to improve P_4/E_2 ratios in women with polycystic

ovary syndrome, that suggested the difficulties of treatment in these patients.

(受付：1988 年 9 月 2 日)

思春期の続発性無月経の予後に関与すると推定される 諸因子の解析 (follow up study)

Analysis for Factors of Possible Prognostic Significance in Secondary Amenorrhea during Puberty

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室

松本和紀 楠原浩二 渡辺直生
Kazunori MATSUMOTO Koji KUSUHARA Naoiku WATANABE
小田原靖 川勝雅彦 許山浩司
Yasushi ODAWARA Masahide KAWAKATSU Hiroshi MOTOYAMA
長尾 充 安江育代 寺島芳輝
Mitsuru NAGAO Ikuyo YASUE Yoshiteru TERASHIMA

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

思春期続発性無月経の取り扱いに際して、予後に影響する因子は何かを、18歳以下の40症例のfollow up成績にて検討した。その結果、予後良好群と不良群では初診時年齢、初経年齢には差がなかった。予後の悪いrisk factorは以下の如く考えられた。①第2度無月経、②無月経期間の長いもの、特に1年を超える無月経。③無月経の原因の明らかなもの、特に体重減少性無月経。④無月経に至るまでの月経が不順であったもの。⑤LH基礎値が極端に高値であったり、低値であるもの。⑥LH-RH testで低反応のもの。これらhigh risk groupに属するものは嚴重に経過観察を行ないながら治療することが必要である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 272-277, 1989)

緒 言

幼小児期から性成熟期への移行期である思春期における続発性無月経の取扱に関しては種々の見解があり、日常臨床においてもその取り扱いに苦慮することが少なくない。その理由の一つには予後良好で自然排卵周期を回復する例と、予後不良で将来の妊孕性に問題を残す例が混在し、容易にこれらを鑑別出来ないことが挙げられる。そこで18歳以下の続発性無月経患者40例についてfollow up studyを行ない、予後に関与する因子を検討した。

対象と方法

当院及び関連病院産婦人科一般外来、小児思春期

外来に続発性無月経を主訴に来院した受診時18歳以下の症例40例につき、初経年齢、無月経に至るまでの月経状態、無月経期間、無月経の程度、LH、FSH、Estradiol、PRLの各基礎値測定、LH-RH testなどを検討した。更に外来follow up、あるいは郵送法によるアンケート調査などで予後を追求め、予後に関与しうる病態を比較検討した。

成 績

現在までに1年から7年にわたり予後を追求めた40例のうち、現在正常周期を有するものは15例(37.5%)、稀発月経8例(20%)、依然として無月経のもの17例(42.5%)であった。

1. 無月経の程度と予後(表1)

第1度無月経 16 例では 8 例 (50 %) が現在正常月経周期に回復している。4 例 (25 %) は依然無月経である。これに対し第2度無月経では 18 例中 4 例 (22.2 %) しか正常周期を回復しておらず、無月経のままであるものは 10 例 (55.5 %) にものぼる。よって当然ながら無月経の程度が軽い方が治りやすい。しかしながら第2度無月経でも成人のそれよりは治る率がずっと高いようである。

2. 無月経期間と予後 (図1)

無月経期間が短いものに第1度無月経が多く、現在正常周期になっているものが多い。1 年を超える無月経はほとんど第2度無月経となっており、正常周期を回復したものはない。よってやはり当然ながら無月経期間が1 年を超えるものは予後が悪いと言える。

3. 無月経の原因と予後 (図2)

無月経におちいった原因が特定出来ないもの、いわば特発性のものは第1度無月経が多く、予後も良い。20 例中 10 例 (50 %) が正常周期に回復している。無月経のままのものは 5 例 (25 %) にすぎない。

表1 思春期続発性無月経の予後 (follow up study) (40例)

無月経 40例	正常周期	15例
	稀発月経	8例
	無月経	17例
第1度月経 16例	正常月経周期	8例
	稀発月経	4例
	無月経	4例
第2度無月経 18例	正常月経周期	4例
	稀発月経	4例
	無月経	10例
程度不明 6例	正常月経周期	3例
	稀発月経	0例
	無月経	3例

4. 初経後の月経状態と予後 (表2)

初経後から無月経に至るまで間、月経が正順だったもの 19 例のうち予後の良いもの、即ち現在正常月経周期を有するものは 9 例 (47.4 %) であるのに対し、無月経に至るまでの月経が不順であったもの 21 例中予後が良いもの、即ち現在正常月経周期になっているものは 6 例 (28.6 %) にすぎない。しかしながら来院時第2度無月経であったものでは差がなく、この予後の差は第1度無月経であったもので無月経

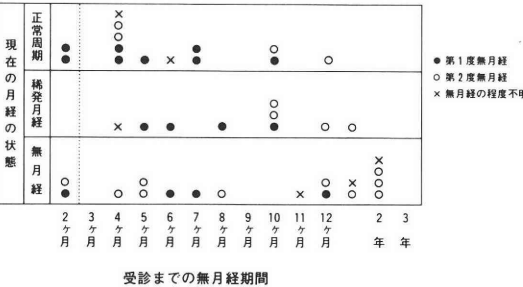


図1 無月経期間と予後との関係 (40例)

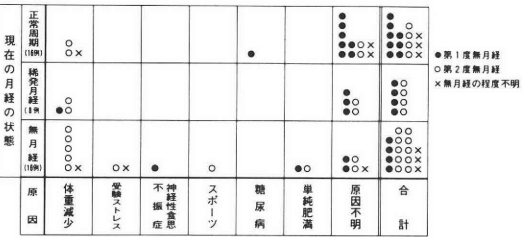


図2 無月経の原因と予後との関係 (40例)

表2 無月経の程度と初経後の月経の状態, 予後との関係 (40例)

来院時無月経の程度	初経後の月経状態	現 在 の 月 経 状 態	
		無月経・稀発月経	正 順
第1度無月経 (16例)	正 順 (7 例)	2例	5 例
	不順・稀発月経 (9 例)	6例	3 例
第2度無月経 (17例)	正 順 (8 例)	6例	2 例
	不順・稀発月経 (9 例)	7例	2 例
程 度 不 明 (7 例)	正 順 (4 例)	2例	2 例
	不順・稀発月経 (3 例)	2例	1 例
合 計 (40例)	正 順 (19例)	10例	9 例
	不順・稀発月経 (21例)	15例	6 例

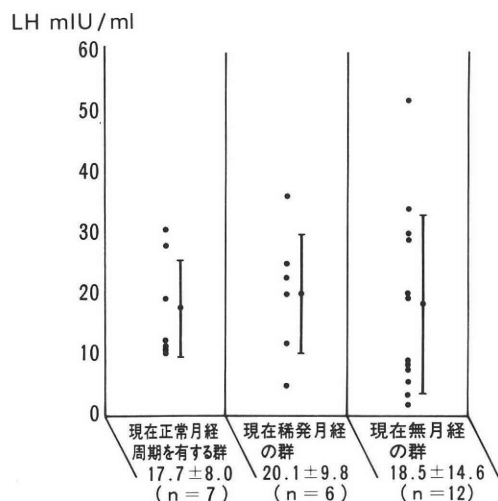


図3 初診時 LH 基礎値と予後との関係 (25例)

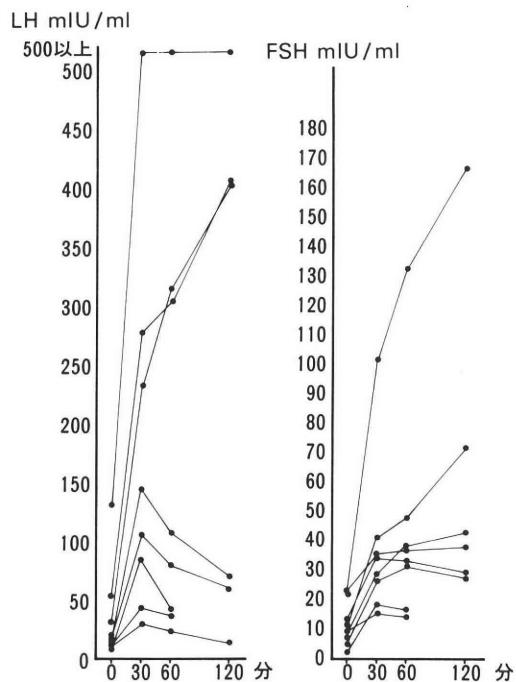


図4 LH-RH test (現在正順月経群) 予後良好群 (8例)

に至るまでの月経が正順であったもの7例中予後良好なものが5例 (71.4%) 存在することによる。

即ち、無月経に至るまでの月経が順調で、なおかつ無月経の程度の軽いものが予後が良いと言える。

5. LH基礎値と予後 (図3)

LH基礎値は予後良好のものと、不良のものとで平均に差はない。しかしながら、予後良好の群ではLH値は10~30mIU/mlの正常範囲内にあり、予後不良群では極端な hypergonadotropism や hypo-

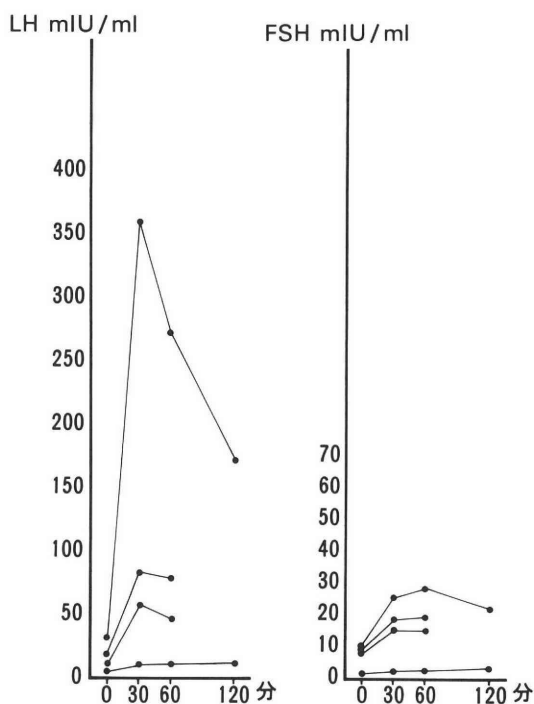


図5 LH-RH test (現在稀発月経群) (4例)

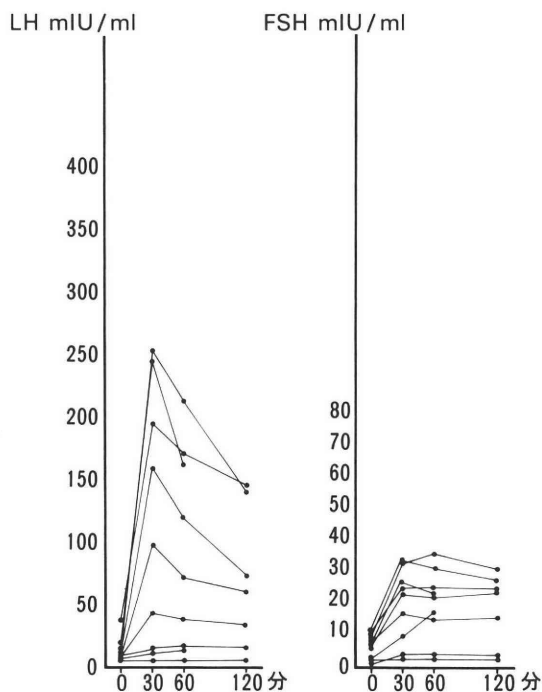


図6 LH-RH test (現在無月経群) 予後不良群 (8例)

gonadotropism を示すものが多くなっている。即ち、

表 3 思春期続発性無月経の follow up study ① 予後良好群(13例)

初診時 年 齢	初 年 齢	初 経 後 月 経	無月経 期 間	無月経 の程度	無月経の 原 因	治 療 内 容	現在の 月 経	現在の 年 齢
16歳	14歳	稀発月経	1 年	I°	不 明	clomid 100 mg → OV(+)	正 順	20歳
17歳	11歳	正 順	4 ヶ月	I°	糖 尿 病	糖尿病治療	正 順	18歳
15歳	12歳	正 順	7 ヶ月	I°	糖 尿 病	糖尿病治療	正 順	16歳
18歳	12歳	稀発月経	7 ヶ月	I°	不 明	clomid 150mg two step→OV(+)	正 順	19歳
18歳	13歳	稀発月経	10 ヶ月	I°	不 明	clomid 100 mg → OV(+)	正 順	19歳
18歳	12歳	稀発月経	4 ヶ月	I°	不 明	clomid 50 mg → OV(+)	正 順	21歳
16歳	13歳	正 順	1 年	I°	不 明	clomid 100 mg → OV(-)	正 順	18歳
18歳	14歳	稀発月経	10 ヶ月	II°	体重減少	clomid 100 mg → OV(+) 体重増加	正 順	19歳
17歳	12歳	稀発月経	6 ヶ月	II°	不 明	Kaufmann 1 × → OV(-)	正 順	21歳
18歳	13歳	稀発月経	4 ヶ月	II°	不 明	Kaufmann 4 × → OV(-) clomid 150 mg two step 4 × → OV(+)	正 順	21歳
15歳	11歳	正 順	4 ヶ月	不 明	不 明	(-)	正 順	20歳
17歳	12歳	正 順	6 ヶ月	不 明	体重減少	clomid 100 mg 2 × → OV(-)	正 順	22歳
18歳	10歳	正 順	5 ヶ月	不 明	不 明	clomid 50 mg 2 × → OV(+)	正 順	20歳

OV : ovulation

表 4 思春期続発性無月経の follow up study ② (15例)

初診時 年 齢	初 年 齢	初経後 月 経	無月経 期 間	無月経 の程度	無月経の 原 因	治 療 内 容	現在の 月 経	現在の 年 齢
16歳	12歳	稀発月経	1 年	I°	不 明	(-)	稀発月経	17歳
18歳	13歳	稀発月経	5 ヶ月	I°	不 明	clomid 100 mg → OV(-)	稀発月経	19歳
16歳	12歳	稀発月経	1 年	I°	不 明	(-)	稀発月経	17歳
18歳	12歳	稀発月経	6 ヶ月	I°	不 明	clomid 100 mg → OV(-)	稀発月経	20歳
17歳	13歳	正 順	1年3ヶ月	II°	体重減少	clomid 100 mg → OV 不明	稀発月経	20歳
17歳	12歳	正 順	10 ヶ月	II°	体重減少	clomid 100 mg × 3 → OV(-)	稀発月経	18歳
16歳	12歳	稀発月経	1 年	II°	不 明	(-)	稀発月経	17歳
17歳	12歳	正 順	10 ヶ月	II°	体重減少	(-), 体重増加	稀発月経	18歳
16歳	14歳	稀発月経	5 ヶ月	II°	不 明	(-)	稀発月経	17歳
17歳	14歳	稀発月経	2 年	II°	体重減少	E+P, clomid 100 mg, 体重増加	稀発月経	19歳
14歳	12歳	稀発月経	1年1ヶ月	II°	不 明	(-)	稀発月経	15歳
16歳	13歳	正 順	11 ヶ月	II°	体重減少	(-), 体重 増加不良	稀発月経	17歳
18歳	12歳	稀発月経	8 ヶ月	不 明	体重減少	(-)	稀発月経	22歳
18歳	11歳	正 順	4 ヶ月	不 明	不 明	(-)	稀発月経	19歳
15歳	12歳	稀発月経	1年1ヶ月	不 明	不 明	(-)	稀発月経	17歳

LH基礎値が高値にせよ低値にせよ異常値を示すものは予後不良と言える。

6. LH-RH test と予後

予後良好群の LH-RH test は正常反応型もしくは

過剰反応型である。これに対し、予後不良群の LH-RH test は正常反応型もしくは低反応型である。即ち LH-RH test において低反応のもの（下垂体機能不全型のもの）は予後不良の傾向があると言える。

表 5 思春期続発性無月経の follow up study ③ 予後不良群 (11例)

初診時 年 齢	初経 年 齢	初経後 月 経	無月経 期 間	無月経 の程度	無月経の 原 因	治 療 内 容	現在の 月 経	現在の 年 齢
16歳	13歳	正 順	7 ヶ 月	I°	神経性食思不振症	clomid 100 mg → OV(-)	無月経	18歳
17歳	12歳	稀発月経	6 ヶ 月	I°	不 明	clomid 100 mg → OV(+)	無月経	20歳
18歳	14歳	正 順	5 ヶ 月	II°	体 重 減 少	clomid 100 mg → OV(+), 体重増加	無月経	22歳
17歳	13歳	正 順	8 ヶ 月	II°	不 明	Kaufman 1 ×	無月経	18歳
15歳	11歳	正順→ 稀発	5 ヶ 月	II°	体 重 減 少	clomid 100 mg two step → OV(-) Kaufman 3 ×	無月経	18歳
14歳	11歳	稀発月経	12 ヶ 月	II°	ス ポ ー ツ	clomid 50 mg → OV(-)	無月経	16歳
18歳	12歳	正 順	11 ヶ 月	不 明	受験ストレス	clomid 100 mg → OV(+) → OV(-)	無月経	20歳
18歳	15歳	稀発月経	2 年	不 明	受験ストレス	(-)	無月経	20歳
15歳	11歳	正 順	1年1ヶ月	不 明	不 明	(-)	無月経	18歳
17歳	11歳	稀発月経	4 ヶ 月	不 明	体 重 減 少	(-)	無月経	24歳
17歳	12歳	稀発月経	2年7ヶ月	不 明	体 重 減 少	(-), 体重増加	無月経	18歳

表 6 思春期続発性無月経の予後に関与する因子は何か？

現在の月経	初診時年齢	初 経 年 齢	初経後の月経	無月経期間	無月経の程度	無月経の原因
正 順 (13例)	17.0±1.1歳	12.2±1.1歳	正順 6例(46.2%) 稀発 7例(53.8%)	7.0±2.9M	I° 7例(70%) II° 3例(30%) (不明 3例)	不 明 9例 体 重 減 少 2例 糖 尿 病 2例
稀 発 (15例)	16.6±1.1歳	12.4±0.8歳	正順 5例(33.3%) 稀発10例(66.7%)	10.7±4.8M	I° 4例(33.3%) II° 8例(66.7%) (不明 3例)	不 明 9例 体 重 減 少 6例
無月経 (11例)	16.5±1.3歳	12.3±1.3歳	正順 5例(45.5%) 稀発 6例(54.5%)	11.5±8.2M	I° 2例(33.3%) II° 4例(66.7%) (不明 5例)	不 明 3例 体 重 減 少 5例 ストレス性 2例 ス ポ ー ツ 1例

7. 治療 (表 3, 4, 5)

予後良好群では clomid に反応するものが多い, 即ち clomid で数回排卵誘発に成功した後自然排卵周期を回復している. これに対し予後不良群では clomid に反応しないものが多く, そのまま drop out してしまったものが多い.

考 察

予後良好群と不良群を比較して, 初診時年齢, 初経年齢には差を認めなかった. 予後良好群では第1度無月経, 無月経期間1年未満, 無月経の原因が特定出来ないもの, 無月経に至る前の月経が正順であったもの, LH基礎値が正常なもの, LH-RH test において正常反応あるいは過剰反応を示すもの, など

が多いことが判明した (表 6).

逆に risk factor は以下の如くまとめられる. ①第2度無月経, ②無月経期間の長いもの, 特に1年を超える無月経, ③無月経の原因の明らかなもの, 特に体重減少性無月経, ④無月経に至る前の月経が不順であったもの, ⑤LH基礎値が極端に高値あるいは低値を示すもの, ⑥LH-RH test で低反応のもの. これらの症例は high risk group として嚴重に管理治療する必要があると考えられる.

思春期患者は就学年令であり, 通院加療が長つづきしないことと, 心身共に不安定なうえに受験等のストレスもあり, 治療に苦慮することが多い. 又, 思春期の続発性無月経患者は既婚者のそのような妊娠という目標がない為, どの程度までの治療をど

のくらの期間継続すべきかは議論の多いところである¹⁻⁵⁾。しかし、逆に思春期患者では正順な自然排卵周期が回復する可能性も大きいので、それまで積極的に follow up すべきであり、その間、間欠的なホルモン療法、clomid による排卵誘発⁶⁾、漢方療法⁷⁾、心理療法等を中心に治療すべきと考えられる。また、原因の明らかな続発性無月経に対しては原因の除去がまず必要なことは論をまたない。しかしながら思春期に多く、また治療に抵抗する体重減少性無月経の治療には苦慮する場合が多い⁸⁾。何よりもまず思春期女子の“病的なまでのやせ願望”に対し警鐘を鳴らすことが重要であると考えられる。

文 献

- 1) 三宅侃, 青野敏博: 若年者, 未婚女性の無月経をいかに扱えばよいか。産婦実録, 32: 815, 1983
- 2) 小林拓郎, 柳沼恣: 月経異常のホルモン療法。産婦治療, 32: 640, 1976
- 3) 柳沼恣, 小林拓郎: ストレス性無月経の診療。日産婦誌, 30: 399, 1978
- 4) 足高善彦: 無月経—とくに若年者, 未婚女性を対象として。産婦実録, 31: 889, 1982
- 5) 足高善彦, 片山和明, 望月真人: 思春期の月経異常とその治療。産婦実録, 34: 1937, 1985
- 6) 楠原浩二, 横山敬, 松本和紀, 木村英三, 篠塚正一, 磯西成治: 未婚の排卵障害婦人の病態とその治療法の検討。産と婦, 50: 1124, 1983
- 7) 楠原浩二, 松本和紀, 横山敬, 小田原靖, 村江正始, 木村英三, 篠塚正一, 蜂屋祥一: 未婚の排卵障害婦人に対する温経湯の効果。産婦人科漢方研究のあゆみ I P 17-24, 診断と治療社, 東京, 1984
- 8) 松本和紀, 楠原浩二, 小田原靖, 渡辺直生, 川勝雅彦, 許山浩司, 寺島芳輝: 思春期における続発性無月経の病態解析。思春期学, 5: 566, 1987
- 9) 楠原浩二, 安江育代, 杉田元, 篠塚正一, 徳倉昭治, 花岡苗, 蜂屋祥一: 体重減少による無月経の

病態。日不妊会誌, 26: 7, 1981

- 10) 中村幸雄, 吉村泰典, 小田高久, 亀井清, 飯塚理八: 体重減少性無月経。日産婦誌, 36: 727, 1984

Analysis for factors of possible prognostic significance in secondary amenorrhea during puberty

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

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

Data from a follow-up study of 40 amenorrhea cases below 18 years of age were analyzed to identify factors that affect the prognosis of secondary amenorrhea during puberty. The results indicated that there were no noticeable differences between the group with a good prognosis and the group with a poor prognosis in respect of the ages at first examination and at menarche. Risk factors that were found to be associated with an unfavorable prognosis included: (1) Second degree amenorrhea, (2) long-sustained amenorrhea, especially of more than 1 year's duration, (3) amenorrhea from known causes, particularly of weight loss amenorrhea, (4) irregular menstrual cycles preceding amenorrhea, (5) an extremely high, or low, basal LH level and (6) hyporeaction to LH-RH test. Patients in these high risk groups should be treated while being carefully monitored for the subsequent progress.

(受付: 1988年4月12日)

CORTISOL RESPONSE TO METOCLOPRAMIDE IN HYPERPROLACTINEMIC WOMEN WITH PITUITARY MICROADENOMA AND WOMEN WITH HYPOTHALAMIC AMENORRHEA

Katsuyoshi SEKI and Koichi KATO

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

Abstract: Metoclopramide (MCP) can stimulate cortisol secretion in humans. It may stimulate cortisol secretion through an antidopaminergic mechanism or by a stress-mediated mechanism. In the present study, cortisol responses to MCP were evaluated in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma and women with hypothalamic amenorrhea. The intravenous administration of MCP induced no discernible change in cortisol levels in normal women during the early follicular phase. In contrast, an increase in serum cortisol levels was observed following MCP administration in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma and women with hypothalamic amenorrhea. The positive cortisol response to MCP may be related to the increased endogenous dopaminergic tone which is considered to be operative in these patients.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 278–280, 1989)

Introduction

Metoclopramide (MCP) can stimulate cortisol secretion in humans^{1,2)}. The mechanism(s) by which MCP stimulates cortisol secretion has not been established. Nishida et al. found no cortisol response to MCP in 13 tests on 8 of 9 patients with prolactinoma or acromegaly with hyperprolactinemia, whereas they observed a cortisol response to MCP in acromegalic patients without hyperprolactinemia²⁾. They interpreted the findings as indicating that MCP acts in the hypothalamus to release adrenocorticotropin (ACTH) through a dopamine (DA)-antagonist mediated mechanism. Three of the 4 patients with prolactinoma studied by Nishida et al. had serum prolactin (PRL) levels greater than 300 ng/ml²⁾. Thus, it is likely that patients with a large pituitary tumor were included in the group studied by

Nishida et al.. Endogenous DA tone may differ in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma and those with macroadenoma³⁾, and therefore the cortisol response to MCP may differ in these women. Furthermore, endogenous DA tone may be increased in some women with hypothalamic amenorrhea⁴⁾. However, cortisol responses to MCP have not heretofore been evaluated in such patients. This report describes cortisol responses to MCP in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma and women with hypothalamic amenorrhea.

Materials and Methods

The subjects of this study were 5 normal women during the early follicular phase, 5 hyperprolactinemic-amenorrheic women with pituitary microadenoma, and 6 women with hypothalamic amenorrhea (Table 1). Basal serum luteinizing

Table 1. Basal PRL and cortisol concentrations (mean $\pm$ SE) in normal women (n = 5), hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma (n = 5) and women with hypothalamic amenorrhea (n = 6)

	Normal women	Hyperprolactinemia	Hypothalamic amenorrhea
PRL (ng/ml)	13.4 $\pm$ 2.7	94.2 $\pm$ 30.5*	7.9 $\pm$ 2.2
cortisol (μ g/dl)	9.0 $\pm$ 1.4	8.3 $\pm$ 1.3	11.0 $\pm$ 2.8

* p < 0.05 vs. normal women.

hormone, follicle stimulating hormone and PRL levels in women with hypothalamic amenorrhea were similar to those in normal women. Estradiol levels were lower in women with hypothalamic amenorrhea than in normal women. The diagnosis of hypothalamic amenorrhea was by exclusion; none of these women had identifiable pituitary or ovarian abnormalities, and we assumed that the acyclic gonadotropin secretion in these women was due to functional derangement of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone^{5,6}. None of the subjects was taking any medication at the time of the studies. Starting at 0930 to 1000 h, each received 10 mg 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 and 120 min after the administration of MCP. Serum cortisol was determined by radioimmunoassay using kits obtained from Commissariat a l'Energie Atomique (Gif-sur-Yvette, France). The sensitivity of the assay was 10 ng/ml. The within- and between-assay coefficients of variation was less than 10%. Serum PRL was determined by radioimmunoassay as previously described⁷. All samples from an individual subject were analyzed at the same time. Mean basal concentrations were obtained by averaging the two baseline samples collected before the administration of MCP. Statistical analyses were performed using Student's t test.

Results

Basal serum cortisol levels in hyperprolactinemic women and women with hypothalamic amenorrhea were similar to those in normal women (Table 1). The administration of MCP induced no discernible change in cortisol levels in normal women (Fig. 1). In contrast, an increase in serum cortisol levels was observed following MCP administration in hyper-

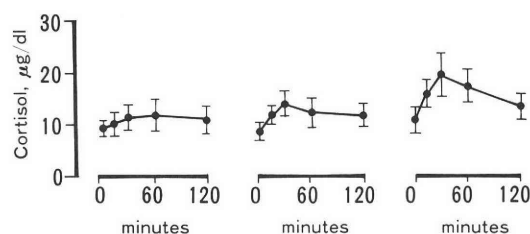


Fig. 1 Mean $\pm$ SE basal serum cortisol and its response to an iv bolus dose of 10 mg MCP in normal women (n=5) (left panel), hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma (n=5) (middle panel) and women with hypothalamic amenorrhea (n=6) (right panel).

prolactinemic women and women with hypothalamic amenorrhea (Fig. 1). Serum cortisol concentrations were significantly higher 15 min after MCP administration in these women compared to the basal values (p < 0.01, hyperprolactinemic women; p < 0.05, women with hypothalamic amenorrhea).

Discussion

The present study demonstrates that the administration of MCP results in an elevation of circulating cortisol levels in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma and women with hypothalamic amenorrhea but not in normal women during the early follicular phase. Although the administration of MCP induced no significant change in serum LH levels in normal women during the early follicular phase, it increased serum LH levels in some hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma and women with hypothalamic amenorrhea, and therefore endogenous dopaminergic tone may be increased in these women^{4,7-9}. Thus, the positive cortisol response to MCP in these women may be related to the increased dopaminergic tone, if one may assume that MCP stimulates cortisol secretion through an antidopaminergic mechanism².

However, it also cannot be ruled out that MCP may stimulate cortisol secretion by a stress-mediated mechanism¹⁾. A unique pattern of hypersecretion of cortisol with remarkable increase in the amplitude of secretory episodes occurs only during the day hours in patients with psychogenic amenorrhea¹⁰⁾. These observations indicate that an inappropriate activation of the corticotropin-releasing hormone-ACTH-cortisol system occurs. This contention is consistent with the positive cortisol response to MCP observed in women with hypothalamic amenorrhea.

References

- 1) Nishida, S., Matsui, M., Nagase, Y., Horino, M., Endoh, M., Karita, K., Tenku, A. and Oyama, H.: Stress-mediated effect of metoclopramide on cortisol secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 839, 1983
- 2) Nishida, S., Matsui, M., Adachi, N., Horino, M., Yoneda, M., Endoh, M., Oyama, H., Kikuoka, M., Otsuka, R., Ishii, R. and Andoh, C.: Pituitary-adrenocortical response to metoclopramide in patients with acromegaly and prolactinoma: a clinical examination of catecholamine mediated adrenocorticotropin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 995, 1987
- 3) Seki, K. and Kato, K.: Prolactin responses to a dopamine antagonist in hyperprolactinemic women with pituitary micro- and macroadenomas. *Jap. J. Fert. Ster.* 32: 548, 1987
- 4) 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, 1980
- 5) Lachelin, G. C. L. and Yen, S. S. C.: Hypothalamic chronic anovulation. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 130: 825, 1978
- 6) 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, 1985
- 7) Seki, K., Uesato, T. and Kato, K.: Effects of a dopamine antagonist (metoclopramide) on the

release of the adenohipophyseal hormones in amenorrhoeic patients with and without hyperprolactinaemia. *Acta Endocrinol.* 100: 177, 1982

- 8) Quigley, M. E., Judd, S. J. and Yen, S. S. C.: Effects of a dopamine antagonist on the release of gonadotropin and prolactin in normal women and women with hyperprolactinemic anovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 718, 1979
- 9) Seki, K., Kato, K. and Shima, K.: Parallelism in the luteinizing hormone responses to opioid and dopamine antagonists in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 1225, 1986
- 10) Suh, B. Y. and Liu, J. H.: Alterations in cortisol secretion in women with hypothalamic amenorrhea (HA). The Endocrine Society, 67th Annual Meeting, June 19-21, 1985, Abstract No. 549

下垂体 microadenoma を有する 高プロラクチン血症および 視床下部性無月経における メトクロプラミドに対する コルチゾールの反応

防衛医科大学校産科婦人科

関 克義 加藤 宏一

メトクロプラミド (MCP) はヒトにおいてコルチゾールの分泌を刺激することがある。その作用は抗ドーパミン機構あるいはストレスを介すると推測される。今回、下垂体 microadenoma を有する高プロラクチン血症および視床下部性無月経婦人において、MCP に対するコルチゾールの反応を検討した。MCP の投与によって、正常婦人 (卵胞期初期) の血清コルチゾールは変化しなかったが、高プロラクチン血症および視床下部性無月経婦人の血清コルチゾールは増加した。これらの患者において内因性ドーパミン活性の亢進が推測され、MCP に対するコルチゾールの反応とドーパミン活性亢進との関連性が推測される。

(受付: 1987 年 9 月 17 日)

ヒト卵成熟過程に伴う卵胞液中 prostaglandins 動態に関する検討

The Role of Prostaglandins on the Oocyte Maturation in Human Preovulatory Follicles

旭川医科大学産婦人科

菊 川 美 一 笠 茂 光 範 石川睦男
Yoshiichi KIKUKAWA Mitsunori KASAMO Mutsuo ISHIKAWA
清 水 哲 也
Tetsuya SHIMIZU

Dept. Ost. & Gynec. Asahikawa Medical College,
Asahikawa 078, Japan

prostaglandins の卵成熟過程への関与を卵胞局所レベルで検討する目的で卵巣刺激後、採取した卵胞液 143 検体を対象とし、成熟卵一採取卵胞 (follicle with mature oocyte=FM), 未成熟卵一採取卵胞 (follicle with immature oocyte=FI), 卵一未採取卵胞 (follicle with no oocyte=FO) における prostaglandins, steroids 濃度を測定し比較検討した。卵胞内 PGE 濃度においては FM が FI, FO に比し有意に高値を示し ($p<0.05$), PGF 濃度においては FM が FO に比し高値を示した ($p<0.05$)。また, sex steroids においては FM, FI, FO の間に一定の関係を認めず, prostaglandins と sex steroids 濃度の間には相関を認めなかった。以上の成績より、卵胞内 PGE, PGF が排卵直前期において, sex steroids とは別の機序で卵成熟に関与していることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 281-285, 1989)

緒 言

卵成熟の指標としての核成熟は, LH surge 前までは, 第一減数分裂前期に停止しており, LH surge 後に再び分裂を開始し, 排卵に向けて germinal vesicle breakdown (GVBD) が起こり, その後, 第一減数分裂中期・後期・終期を経て, 第一極体を放出, 第二減数分裂中期に至る。この時点で, 排卵が起こる。その卵成熟の過程に卵胞内 prostaglandins が, 関与している証拠が散見される。

すなわち幼弱マウスにおいて, Downs and Longo¹⁾ は過排卵処理後, indomethacin を投与し, 卵胞破裂の抑制とともに, 核成熟も抑制 (GVBD を抑制) すると述べ, PGE₂ 投与で, GVBD の抑制が消失すると報告している。また, 堤²⁾は rat においては, indometh-

acin の投与で, 卵成熟 (卵の極体保有率・細胞エネルギー代謝) が抑制され, これは, PGF_{2α}・PGE₂ の投与で回復した, と述べており, 卵成熟に PGF_{2α}・PGE₂ が関与していると述べている。

ヒトにおいて Seibel³⁾は卵成熟に, PGs が関与しているという知見を述べているが, その詳細は明らかでない。そこで, 卵成熟機構を探る目的で, 排卵直前期の卵胞内 prostaglandins, sex steroids を測定し, 卵成熟との関連性を検討した。

対象と方法

1) 検索対象は, 昭和 61 年 8 月より昭和 62 年 12 月までに, 不妊患者 38 人より得られた卵胞液 143 液体で, 卵一未採取卵胞 71 検体, 未成熟卵一採取卵胞は 24 検体, 成熟卵一採取卵胞は 48 検体である。年齢は

26～37 歳で不妊期間は 2 年～14 年、平均 5.9 年であった。不妊原因は卵管閉塞、乏精子症、子宮内膜症、原因不明の 4 疾患であった。卵巣刺激法は、HMG-HCG、又は clomid-HMG-HCG であり、HCG 投与 34～36 時間後⁴⁾⁵⁾に腹腔鏡下卵胞穿刺により、卵胞液を採取した。卵胞採取後、卵の有無・成熟度を確認し、卵胞液のみ -40℃ 下に保管した。卵の成熟度は Marrs⁶⁾の方法を使用し、grade 0～2 を未成熟卵、grade 3 を成熟卵とした。

2) prostaglandins 測定法⁷⁾

凍結保管した卵胞液、培養液を室温下で溶解し、1 N 塩酸にて PH 3～4 に酸性化し、回収率測定用に $^3\text{H-PGE}_2$ 、あるいは $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$ を添加し酢酸エチルにて抽出操作を行なった。一部を回収率測定用を使用し、他は再度乾固し PBSG に溶解後、RIA にて $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 を測定した。標品、抗体は小野薬品提供のものを使用し、 $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$ 、 $^3\text{H-PGE}_2$ は Amersham 社製を使用した。抗 PGE_2 抗体、抗 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 抗体は、 PGE_1 、 $\text{PGF}_{1\alpha}$ と 51.0%、41.7% の交叉率を示すため、 PGE 、 PGF と示す。回収率は PGE 、 PGF それぞれ、86.2% ($n=93$)、86.5% ($n=116$) であり、intra-assay 変動係数 ($n=7$) は、10.8%、14.8

% で、inter-assay 変動係数 ($n=3$) は、それぞれ 13.5%、29.4% であった。

3) sex steroids の測定方法

検体を室温下で解凍後、estradiol、progesterone を 2 抗体法による RIA kit (第一ラジオアイソトープ社) を使用し、測定した。esteradiol については、迅速法⁸⁾にて測定した。

結 果

1) 卵胞液中 prostaglandins 濃度

①卵胞液中 PGE 濃度は Fig. 1 のごとく、成熟卵一採取卵胞 (mean $\pm$ S.E. = 10766 ± 1276 pg/ml, $n=34$) は、卵一未採取卵胞 (7156 ± 958 pg/ml, $n=40$)、未成熟卵一採取卵胞 (6991 ± 1000 pg/ml, $n=19$) に比し有意に高値を示し ($p<0.05$)、卵成熟につれ、卵胞液中 PGE 濃度は高値を示す傾向を認めた。

②卵胞液中 PGF 濃度 (Fig. 2) については、成熟卵一採取卵胞 (1008 ± 142 pg/ml, $n=39$) は、卵一未採取卵胞 (699 ± 55 pg/ml, $n=56$) に比し有意に高値を示し ($p<0.05$)、未成熟卵一採取卵胞 (840 ± 118 pg/ml, $n=21$) は前二者と有意差はないが、両者の中間の値を示した。

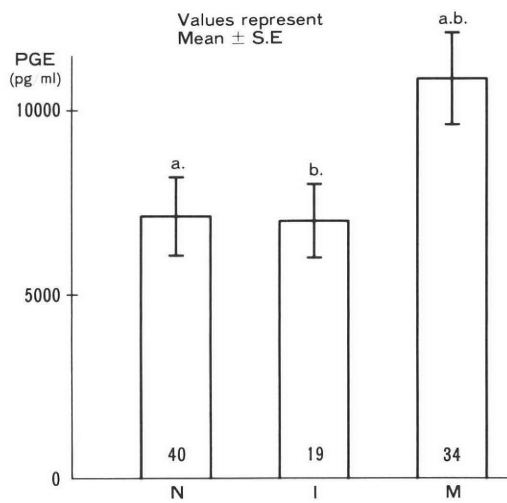


Fig. 1 Concentration of PGE in follicular fluid relative to recovery of the ovum and oocyte maturity.

There are significant differences.

a, b : $p<0.05$

The numbers within the bars represent the number of follicles

N : follicular fluid with no oocyte.

I : follicular fluid with immature oocyte.

M : follicular fluid with mature oocyte.

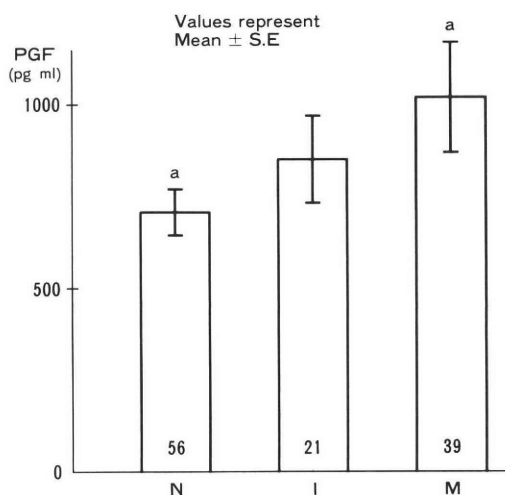


Fig. 2 Concentration of PGF in follicular fluid relative to recovery of the ovum and oocyte maturity.

There is significant difference.

a : $p<0.05$

The numbers within the bars represent the number of follicles

N : follicular fluid with no oocyte.

I : follicular fluid with immature oocyte.

M : follicular fluid with mature oocyte.

③卵胞内 PGE/PGF 濃度比は、卵一未採取卵胞、未成熟卵一採取卵胞、成熟卵一採取卵胞で、 12.6 ± 2.4 ($n=35$), 12.1 ± 1.7 ($n=18$), 15.9 ± 2.6 ($n=34$) となり、3 群間で有意差を認めなかった。

2) 卵胞内 steroids 濃度

卵胞内 estradiol, progesterone 濃度 (Fig. 3) は、卵の有無・成熟度において、相関を認めず、estradiol は卵一未採取細胞で 575 ± 52 ng/ml, 未成熟卵一採取卵胞で 611 ± 97 ng/ml, 成熟卵一採取卵胞で 538 ± 37 ng/ml であった。progesterone においては、卵成熟に伴い高値を示す傾向があり、卵一未採取卵胞で 2718 ± 377 ng/ml, 未成熟卵一採取卵胞で 3395 ± 737 ng/ml, 成熟卵一採取卵胞で 3546 ± 413 ng/ml であった。

3) 卵胞内 prostaglandins, sex steroids 濃度間の相関 (Fig. 4, Fig. 5)

prostaglandins と sex steroids との間には相関を認めなかった。

4) 卵胞液 volume と prostaglandins, sex steroids との間には相関を認めず、一定の傾向は示さなかった。

考 察

卵の成熟調節因子として、prostaglandins, sex steroids, gonadotropins, OMI (oocyte maturation inhibitor), MAS (meiotic arresting substance), Ca^{2+} などが考えられている。

ラット、ウサギ、マウス、ブタ^{9,10,11,12,13,14})に indomethacin を投与すると、dose dependent^{13,15})に、排卵は抑制される。排卵抑制されたブタ卵胞内の PG を測定すると排卵抑制とともに卵胞内 $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 の上昇は抑制¹⁴)されている。また、ラットにおいては卵成熟も indomethacin により抑制される²)。indomethacin により卵成熟・排卵が抑制されたラットに PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ を投与すると排卵・卵成熟 (核成熟と細胞質成熟で検討) は回復し、 PGI_2 投与では排卵は著名に回復するが、卵成熟は回復しなかった²)。これらより、卵成熟に PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ が関与すると考えられる。そこで、ヒトについて排卵直前期^{4,5})の prostaglandins, sex steroids と卵成熟との関連性を検討すると、我々の成績において、卵胞内 PGE 濃度では、成熟卵一採取卵胞が、未成熟卵一採取卵胞、卵一未採取卵胞より高値を示し ($p < 0.05$)、卵胞内 PGE 濃度は、卵成熟に伴い高値を示し、卵成熟に関与していると考えられる。ここで、未成熟な卵は採取しづらいという Testart の報告¹⁶)を考えた場合、一部には aspiration 時に ovum を流出した follicle や、empty follicle を

含んでいると考えられるが、卵一未採取卵胞は、卵が未熟で卵丘細胞の結合¹⁸)が強く卵が採取されなかったものと考えられる。卵胞内 PGF 濃度では、成熟卵一

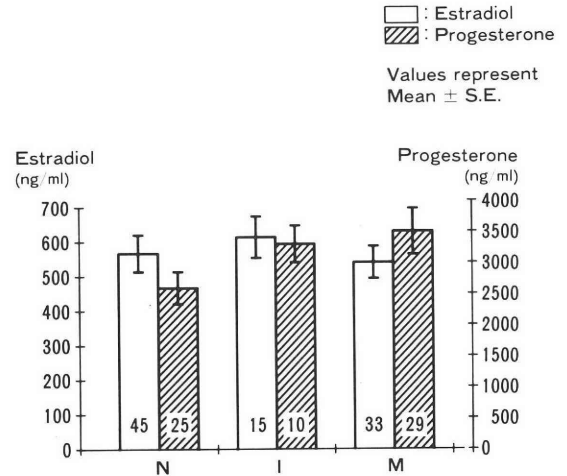


Fig. 3 Concentration of estradiol and progesterone in follicular fluid relative to recovery of the ovum and oocyte maturity.

There is no significant difference.

The numbers within the bars represent the number of follicles.

N : follicular fluid with no oocyte.

I : follicular fluid with immature oocyte.

M : follicular fluid with mature oocyte.

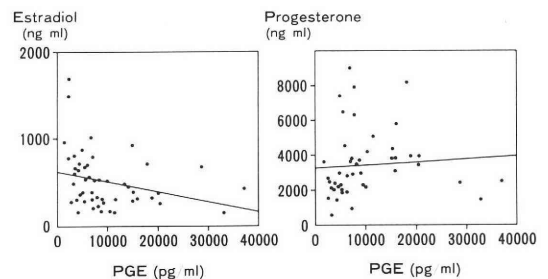


Fig. 4 Correlation between the concentration of PGE and the concentration of steroids in follicular fluid.

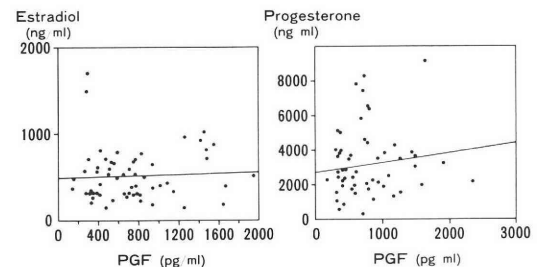


Fig. 5 Correlation between the concentration of PGF and the concentration of steroids in follicular fluid.

採取卵胞は、卵一未採取卵胞より高値を示し ($p < 0.05$), PGF も同様に卵成熟に関与していると考えられる。

Darling¹⁷⁾らはヒト自然排卵の性周期で月経周期 14 日目に卵胞液中 PGF_{2α} が peak を示したことを報告、さらに HCG injection 後、排卵が近づくと、卵胞内 PGF_{2α} は上昇するが、卵胞内 PGE₂ では一定の傾向を示さないことを Lumsden¹⁸⁾が報告、同様に Seibel¹³⁾は LH surge 後、卵胞内 PGF_{2α} が卵成熟につれ増加し、卵胞内 PGE₂、6-keto PGF_{1α} では一定の傾向を示さないことを述べている。一方、Tsafriri は rat で PGF_{2α} が、LH 同様に卵を成熟させると報告¹⁹⁾、また直接 PGF_{2α} をウサギ卵胞内に注入した際には 90% の卵子に GVBD が起こると、Armstrong は報告している²⁰⁾。これらの点と、我々の成績を考えれば、排卵が近づくにつれ卵胞内に PGE、PGF が高濃度に含まれてきて、その高濃度の PGE、PGF が排卵直前期の卵、および卵胞の成熟に促進的に働いている可能性が示唆される。

sex steroids の排卵への関与は森ら^{21,22)}が報告している。estrogen は、それ自体が顆粒膜細胞を増殖・分化させ、FSH の反応性を高め、卵胞を成熟させる²³⁾と言われており、rat では estrogen が gonadotropin 受容体、cAMP 誘導作用を示すことが報告²⁴⁾されている。また、Moor ら²⁵⁾は、卵胞培養実験により雄性前核形成に sex steroids が必要であることを示しており、sex steroids が卵成熟に関与していることが示されている。しかし、排卵直前期における我々の成績において、estradiol、progesterone は、卵の成熟度間に相関を認めず、また、prostaglandins との間にも相関を示さなかった。このことは、排卵直前期には prostaglandins が sex steroids より卵成熟に重要な役割を果たしている可能性を示唆しているものと思われる。また、indomethacin にて卵成熟、排卵を抑制しても黄体形成・血中 progesterone 値・steroidogenesis には変化を及ぼさないこと^{2,10,26,27)}をも考え併せると、prostaglandins は sex steroids とは、別の作用機点によって、卵成熟に関与していることが考えられる。

参考文献

- 1) Downs, S. M. and Longo, F. J.: Effects of indomethacin on preovulatory follicles in immature, superovulated mice. *Am. J. Anat.* 164: 265, 1982
- 2) 堤 治他: 受精着床過程における卵の物質代謝およびその microenvironment 形成の生化学的解析. *日産雑誌* vol 36 No 9 pp 1377-1386, 1984

- 3) Machel M. Seibel, M. D., Stephen L. Swartz, M. D., Dianne Smith, Ph. D., Linda Levesque, B. S., Melvin L. Taymor, M. D.: *In vitro* prostaglandin concentration in human preovulatory follicles. *Ferti. & Steri.* vol 42 No 3: 482-485, 1984
- 4) Edwards, R. G. and Steptoe, P. C.: Induction of follicular growth, ovulation and lutenization in the human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 52: 339, 1975
- 5) Lopata, A., McMaster, R., McBain, J. C. and Johnston, I. W. H.: *In vitro* fertilization of preovulatory human eggs. *J. Reprod. Fertil.* 52, 339, 1978
- 6) Richard P Marrs, M. D., Hidekazu Saito, M. D., Billy Yee, M. D., Fumihiko Sato, M. D., Joanne Brown: Effect of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human *in vitro* fertilization procedures. *Fert. & Steril.* Vol 41. No 4 April: 519-523, 1984
- 7) Olavi Ylikorkala, M. D., Anssi Tenhunen: Follicular fluid prostaglandins in endometriosis and ovarian hyperstimulation. *Fert. & Steril.* vol 41. No 1. Jan: 66-69, 1984
- 8) 小田高久, 杉村和男, 斎藤和明, 高橋茂雄, 中村雄, 飯塚理八: ¹²⁵I-Estradiol Radioimmuno assay Kit 迅速簡便測定法の基礎的・臨床的検討, ホルモンと臨床, 29: 1441 (1981)
- 9) David T. Armstrong and Daniel L. Grinwich: Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins.* 1: 21-28 1972
- 10) Daniel L. Grinwich, Thomas G. Kennedy, and David T. Armstrong: Dissociation of ovulatory and steroidogenic actions of lutenizing hormone in rabbits with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins.* 1: 89-96, 1972
- 11) J. Patrick O'Grady, Burton V. Caldwell, Frederick J. Auletta, and Leon Speroff: The effect of an inhibitor of prostaglandin synthesis (indomethacin) on ovulation, pregnancy, and pseudopregnancy in the rabbit. *Prostaglandins* 1: 97-106, 1972
- 12) Gayle P. Orczyk and Harold R. Behrman: Ovulation blockade by aspirin or indomethacin: *in vitro* evidence for a role of prostaglandin in gonadotropin secretion. *Prostaglandins* 1: 3-20, 1972
- 13) 林 清士, 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: インドメサシンのマウス卵胞破裂, 卵胞卵子に及ぼす影響. *日本不妊学会誌*, 第 32 巻第 2 号: 49-56 1987
- 14) L. Ainsworth. et al: Effect of Indomethacin on Ovulation and Luteal Function in Gilts. *Biol.*

- Reprod. 21: 401-411, (1979)
- 15) 佐藤和雄, 木下勝之, 榊原賢一郎, 堤 治, 北川浩明, 坂本正一: 排卵とPG, 生殖生理とプロスタグランジン: p 13-p 44 現代医療社 1985
 - 16) Testart: J. Final development of the oocyte and follicle following the ovulatory stimulus. In human in vitro fertilization, pp17-31 Eds. J. Testart & R. Frydmann. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), Amsterdam. (1985)
 - 17) M. R. N. Darling, M. Jogee, M. G. Elder: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in the human ovarian follicle. Prostaglandins. vol 23. NO 4: p551-556. 1982
 - 18) M. A. Lumsden., R. W. Kelly., A. A. Temleton., P. F. A. Van Look., I. A. Swanston and D. T. Baird.: Changes in the concentration of prostaglandins in preovulatory human follicles after administration of HCG. J. Reprod. Fertil. 77: 119-124 (1986)
 - 19) A. Tsafiriri, H. R. Lindner, V. Zor and S. A. Lamprecht: In vitro induction of meiotic division in follicle enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E_2 . J. Reprod. Fertil. 31: 39, 1972
 - 20) Armstrong, D. T.: Role of prostaglandins in ovarian responses to lutenizing hormone. in Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research vol.2 : p934, Raven Press, 1976
 - 21) T. mori, A. Suzuki, T. Nishimura and A. Kambegawa: Inhibition of ovulation in immature rats by anti-progesterone antiserum. J. Endocr. 73: 185-186, 1977
 - 22) Takahide Mori, Akira Suzuki, Toshio Nishimura and Akira Kambegawa: Evidence for androgen participation in induced ovulation in immature rats. Endocr. 101: 623-626, 1977
 - 23) 荒木重雄, 赤堀彰夫, 玉田太郎: 排卵の内分泌調節. 産婦人科MOOK. No.13 : p1-9. 1980
 - 24) Michael Knecht, Jean Marie Darbon, Tapio Ranta, Albert J. Bankal and Kevin J. Catt: Estrogenes enhance the adenosine 3', 5' monophosphate mediated induction of follicle stimulating hormone and lutenizing hormone receptors in rat granulosa cells. Endoc. 115: 41. 1984
 - 25) R. M. Moor, C. Polge and S. M. Willadsen: Effect of follicular steroids on maturation and fertilization of mammalian oocytes. J. Embryol. Exp. Morphol. 56: 319, 1980
 - 26) Earl R. Plunkett, M. D., Young S. Moon, Ph. D., Jiri Zamecnik, Ph. D., David T. Armstrong, Ph. D.: Preliminary evidence of a role for prostaglandin F in human follicular function. Am. J. Ob. Gyn. 123: 391-397. 1975
 - 27) 河合康夫ほか: Prostaglandin と排卵, 日内分泌会誌 56 : 1559-1573. 1980

The role of prostaglandins on the oocyte maturation in human preovulatory follicles.

Yoshiichi Kikukawa, Mitsunori Kasamo,
Mutsuo Ishikawa and Tetsuya Simizu

Dept. Ost. & Gynec.
Asahikawa medical college,
Asahikawa 078, Japan

Prostaglandin and steroid levels in follicular fluid were measured by RIA to investigate the role of prostaglandins on oocyte maturation. Follicular fluid and oocytes were obtained from 143 follicles. Follicular development was induced by HMG-HCG or clomid-HMG-HCG.

Follicular fluid obtained from follicles with mature oocyte contained significantly higher concentrations of PGE than those with immature oocyte and no oocyte ($p < 0.05$). Likewise follicular fluid obtained from follicles with mature oocyte contained significantly higher concentrations of PGF than those with no oocyte ($p < 0.05$). There were no significant differences between the maturity of the oocyte and the follicular fluid concentrations of sex steroids. There were no significant correlations between the concentrations of prostaglandins and those of steroids.

These results suggest that PGE may play a role in human oocyte maturation in the different mechanism of sex steroids.

(受付: 1988 年 6 月 2 日)

ヒト脱落膜の免疫学的意義に関する研究

Study on Immunological Significance of Human Decidua

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室 (主任: 寺島芳輝教授)

渡 辺 直 生

Naoiku WATANABE

Department of Obstetrics and Gynecology,
Jikei University School of Medicine, Tokyo 105, Japan.
(Director: Prof. Y. Terashima)

脱落膜組織が、妊娠における免疫寛容機構の中で、いかなる役割を果たしているか検討した。

方法は非妊婦および各 trimester の妊婦より得た mononuclear cell (MNC) を用いた mitogen 刺激リンパ球幼若化系に、脱落膜組織の homogenate 上清 (D.S.) を添加し、そのリンパ球幼若化抑制効果を ^3H -Thymidine uptake により判定した。

その結果、D.S. はこの mitogen 刺激リンパ球幼若化系を強く抑制し、しかも妊娠の進行とともにその抑制率が增大する傾向を認めた。つまり妊娠の経過に伴い、脱落膜の持つ免疫抑制活性に対する MNC の sensitivity が増強することが判明した。次に脱落膜の持つ免疫抑制機能の機序解明の目的で、MNC 培養系に recombinant Interleukin 2 (rIL-2) を添加し、rIL-2 のリンパ球増殖能に及ぼす D.S. の影響を検討した。その結果 D.S. はリンパ球の幼若化を 39.8%抑制した。このことより脱落膜組織の持つ免疫抑制機能の少なくとも一部は、IL-2 を介したリンパ球の増殖を抑制するところに存在すると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 286-291, 1989)

緒 言

妊卵の着床およびその維持における免疫寛容機構に関する研究は近年飛躍的に進み、数多くの免疫抑制因子が発見されつつある。しかし、これらの因子が複雑に絡み合っているために、その機序の解明は困難を極めている。この免疫寛容機構成立の場として、免疫学的に非自己である妊卵および絨毛膜が直接接合している母体側組織である脱落膜が重要であることは容易に推測される。また、実際、諸家の報告^{1,2)}によると、脱落膜に免疫抑制活性が存在することは疑う余地のないところであるが、その詳細に関しては不明な点が多い。そこで今回、著者は特にこの脱落膜に注目し、ここに免疫抑制活性が存在するか否かをまず確認せんとした。さらに妊娠の進行に伴う児の増大にもかかわらず、児が非自己として拒絶されない事実より、母体の免疫寛容機構も次第に

増強されることが推測される。そこで妊娠の各 trimester における免疫能に脱落膜がいかなる影響を及ぼすかを検討した。さらに脱落膜の免疫抑制効果の機序解明の目的で、リンパ球の活性化あるいは増殖等に関与するとされている Interleukin 2 を介したリンパ球の培養系に、脱落膜がいかなる影響を及ぼすかを追求した。

方 法

1. 脱落膜、絨毛膜および非妊子宮内膜各組織の homogenate 上清の作製

正常妊娠 7~10 週時に人工妊娠中絶術によって得られた脱落膜および絨毛膜組織と、開腹手術時に得られた非妊子宮内膜組織に、それぞれ組織湿重量等量の PBS を加えて homogenate し、さらに 4℃で 10,500 g, 30 分間冷却遠沈した後、その上清を採取した(以下それぞれ D.S., C.S., E.S. と略す)。これ

らの上清を $0.45 \mu\text{m}$ のミリポアフィルター (日本ミリポア社製) 通過にて除菌し、 -20°C で凍結保存した (方法 1)。

2. 各組織 homogenate 上清の mitogen 刺激リンパ球幼若化系への添加

Fig. 1 に方法の概要を示した。すなわち、正常月経周期を有する非妊婦人の末梢静脈血をヘパリン加採血し、Ficoll-Hypaque 液 (SEPARATE-L: MUTO PURE CHEMICALS) を用いた比重遠沈法 ($1,700 \text{ rpm}$, 15 分間) で MNC を分離した。この MNC を RPMI-1640 medium (GIBCO) にて 2 回洗浄 ($1,200 \text{ rpm}$, 7 分間) した後、RPMI-1640-6% Fetal Calf Serum (FCS) を用いて $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ の濃度の MNC 浮遊液を作製した。この MNC 浮遊液 0.2 ml に mitogen 刺激として、Phytohemagglutinin (PHA) (終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$)、あるいは Concanavalin A (Con A) (終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$) を添加し、 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ の条件下で 72 時間 培養した。さらに ^3H -Thymidine $0.20 \mu\text{Ci}$ を添加し、 24 時間 培養した後 ^3H -Thymidine uptake を液体シンチレーションカウンターにて測定し、control とした。また、このリンパ球幼若化系で mitogen 添加時に同時に antigen として前述の D.S., C.S., E.S. を添加し、それらのリンパ球幼若化系に及ぼす影響を以下の如き % Inhibition で比較した (方法 2, Fig. 1)。

% Inhibition =

$$\left[1 - \frac{(\text{TdR} \cdot \text{antigen} - \text{background}) \text{cpm}}{(\text{TdR} \cdot \text{control} - \text{background}) \text{cpm}} \right] \times 100$$

3. 非妊時および妊娠時各 trimester における細胞性免疫に及ぼす脱落膜の影響

1) まず非妊時および各 trimester の妊婦の末梢血より MNC を採取した。これらを用いた mitogen 刺激リンパ球幼若化率を stimulation index (S.I.) で示し、妊娠中の MNC (特に T cell) の機能を比較した。

2) 次にこれらの mitogen 刺激リンパ球幼若化系に方法 2 (Fig. 1) と同様の手順で D.S. を添加し、その抑制率を比較した。

4. MNC 培養系への rIL-2, D.S., E.S. の添加

方法の概要を Fig. 2 に示した。すなわち方法 2 で述べた方法にて得られた $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ の MNC 浮遊液 0.2 ml を、 37°C ・ $5\% \text{ CO}_2$ の条件下で 72 時間 培養したものを A 群とした。同浮遊液中に rIL-2 (Biogen 社製、塩野義製薬提供) を添加 (終濃度 20 IU/ml) して、同時間培養したものを B 群とした。さらに A, B 群両群に ^3H -Thymidine を加え、 24 時間 培養した。また ^3H -Thymidine 添加時に、他に何も

Heparin-added peripheral blood is collected.

↓
Mononuclear cells (MNC) are isolated by a specific gravity centrifugation method (1700 rpm , for 15 min) using Ficoll-Paque solution.

↓
MNC are washed twice with RPMI-1640.

↓
MNC suspension ($5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$) is prepared using RPMI-1640-6% FCS.

↓
This suspension (0.2 ml) is cultured in CO_2 incubator at 37°C for 72 hours , adding to it mitogen (PHA : $10 \mu\text{g/ml}$, ConA : $50 \mu\text{g/ml}$) and antigen.

↓
It is cultured for a further period of 24 hours , adding to it $0.20 \mu\text{Ci}$ of ^3H -Thymidine and various supernatants.

↓
 ^3H -Thymidine uptake is measured with a liquid scintillation counter.

Fig. 1 Procedure of MNC culture adding mitogen and various supernatants.

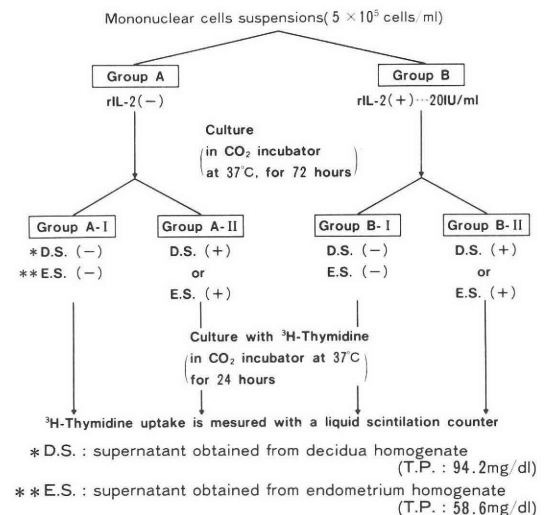


Fig. 2 Procedure of MNC culture adding rIL-2 and various supernatants.

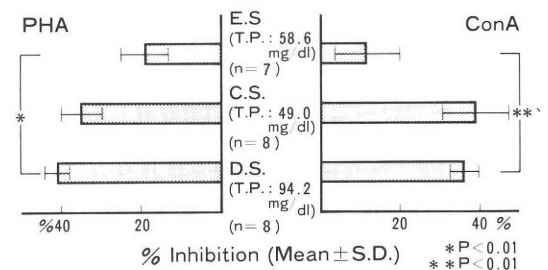


Fig. 3 Effect of various tissues on the T cell reactivity to PHA or ConA

添加しない群を I 群, D.S. あるいは E.S. を添加した群を II 群とし, A-I, A-II, B-I, B-II の計 4 群の ^3H -Thymidine uptake を測定し, rIL-2 添加 MNC 培養系に及ぼす E.S., D.S. の影響を検討した。

研究成績

1. E.S., C.S. および D.S. が mitogen 刺激リンパ球幼若化系に及ぼす影響

E.S., C.S., D.S. いずれの添加系も ^3H -Thymidine uptake は, 無添加の control に比し低値であり, その抑制率を Fig. 3 に示した. PHA および ConA 刺激リンパ球幼若化系に及ぼす各 antigen の % Inhibition (Mean $\pm$ S.D.) は, E.S. 添加群ではそれぞれ $18.4 \pm 5.1\%$, $11.2 \pm 8.0\%$, C.S. 添加群では $35.2 \pm 4.8\%$, $38.3 \pm 7.1\%$, D.S. 添加群では $40.8 \pm 2.5\%$, $37.6 \pm 3.0\%$ であり, 3 者ともに抑制的に働くが, その程度は E.S. 添加系に比し C.S., D.S. 添加系で強い結果で

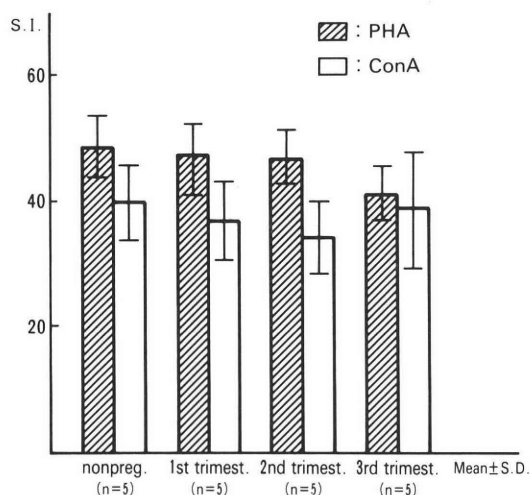


Fig. 4 Lymphocyte transformation rate by PHA and ConA

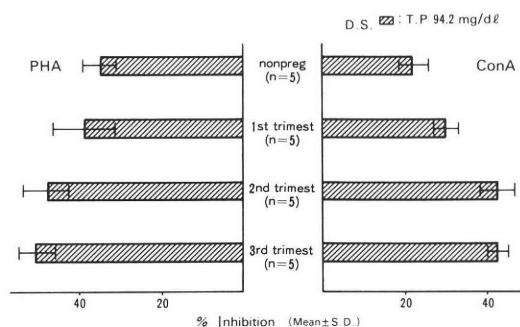


Fig. 5 Effect of decidual tissue on the T cell reactivity to PHA or ConA.

あった. E.S. と D.S. 添加系の抑制率を比較してみると, D.S. 添加系は E.S. 添加系に比し有意 ($P < 0.01$) に高値であり, 妊娠によって子宮内膜が mitogen 刺激リンパ球幼若化を抑制する方向へ変化することがわかる. また PHA, Con A は T cell を特異的に活性化させるので, 脱着膜には絨毛膜と同様に T cell の幼若化抑制, つまり細胞性免疫抑制活性が存在することが確認された。

2. 非妊時および妊娠時 MNC を用いた mitogen 刺激リンパ球幼若化率

Fig. 4 に示したごとく, リンパ球幼若化率 (S.I.) は妊娠の進行に伴い僅かに低下する傾向はあるものの, 非妊時に比し有意差を認めず, 従って妊娠時全般を通じて比較的安定しているとの結果を得た。

3. 非妊時および妊娠時 MNC を用いた mitogen 刺激リンパ球幼若化系に及ぼす脱着膜の影響

リンパ球幼若化系に D.S. を添加した場合の幼若化抑制率 (% Inhibition) は, Fig. 5 に示すごとく非妊婦 MNC より妊婦 MNC を用いた場合に高値を示し, かつ妊娠の進行と共に抑制率が增大する傾向を認めた. 非妊婦 MNC と 3rd trimester の妊婦 MNC に対する抑制率は mitogen として PHA, Con A を用いた場合に, それぞれ 5%, 1% の危険率で有意に高値であった。

4. 脱着膜が rIL-2 の持つリンパ球増殖作用に及ぼす影響

Fig. 2 の実験系で, MNC のみの培養系 A-I 群と, これに rIL-2 のみを添加した B-I 群の ^3H -Thymidine uptake (Mean $\pm$ S.D.) は 100.1 ± 6.1 cpm および 340.5 ± 48.6 cpm であり, B-I 群は A-I 群の約 3.4 倍

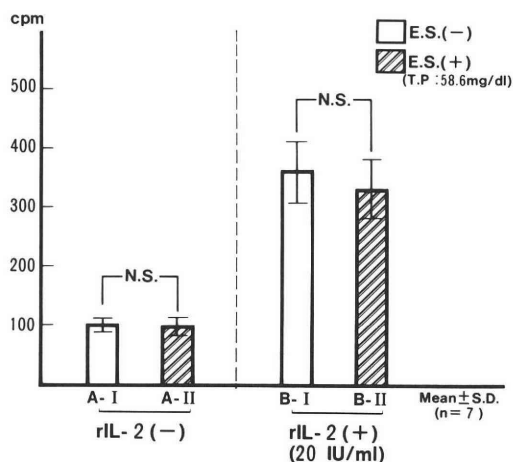


Fig. 6 Suppressive effect in endometrium on proliferation of mononuclear cells by rIL-2.

に増加し、rIL-2 が MNC の増殖を高めることがわかる。

control として、この培養系に及ぼす E.S. の影響を検索した。その結果は Fig. 6 に示すように、E.S. 無添加の A-I 群と E.S. 添加の A-II 群の ^3H -Thymidine uptake (Mean $\pm$ S.D.) は、それぞれ 100.1 ± 6.1 cpm, 98.7 ± 12.3 cpm, また rIL-2 のみ添加の B-I 群と rIL-2 および E.S. 添加の B-II 群のそれは、 340.5 ± 48.6 cpm, 325.4 ± 47.7 cpm であり、両群に有意差を認めなかった。従って E.S. は rIL-2 による MNC の増殖には、ほとんど影響を及ぼさないことがわかる。次にこの MNC 培養系に E.S. の代わりに D.S. を添加し、同培養系に及ぼす影響を検索し、Fig. 7 に示した。すなわち rIL-2 無添加の A-I, A-II 群の ^3H -Thymidine uptake はそれぞれ 100.1 ± 6.1 cpm, 97.5 ± 10.3 cpm で、両群間に有意差を認めなかった。一方 rIL-2 のみ添加の B-I 群と rIL-2 および D.S. 添加の B-II 群のそれは 340.5 ± 48.6 cpm, 244.7 ± 45.5 cpm で、B-I 群に比し B-II 群が低値の傾向 ($P < 0.05$) であり、その % Inhibition は 39.8% であった。以上の結果より、脱落膜組織 homogenate の上清は rIL-2 による MNC の増殖を抑制する事が判明した。

考 察

妊卵の着床および発育は一種の semiallograft であるにもかかわらず、非自己として拒絶されずに維持される事実は従来より大きな謎であった。そこで、まず妊娠時における全身的な免疫寛容機構に関する研究がなされた。妊婦末梢血中のリンパ球の数に関しては、絶体数の上では大きな変動がないにもかかわらず、T・B cell 比率に変動を認めるという³⁾。あるいはリンパ球の機能に関しては、mitogen 刺激リンパ球幼若化試験で、非妊婦末梢血に比し、軽度幼若化が抑制されるとの報告がある⁴⁻⁶⁾。さらに T cell subset の変化、suppressor T cell の機能的活性の上昇、natural killer cell の機能低下、macrophage、多核白血球の機能低下等も報告⁷⁻⁹⁾されており、妊娠の維持に向けて免疫能が複雑に変化する様子がうかがえる。しかしながら、これらの全身的な免疫能の変化は、妊娠の成立・維持を完全に説明し得る程の免疫能低下にはつながらない。従って、妊娠における免疫寛容機構の中心は、妊卵およびそれを取り巻く脱落膜等の局所に存在する可能性が推測される。

従来 hCG には免疫抑制活性が存在する¹⁰⁾とされており、Mühlenstedt¹¹⁾、Hammerström¹²⁾は hCG の lymphocyte blastogenesis の抑制効果が用量反的に増強すると報告している。しかしながらその後

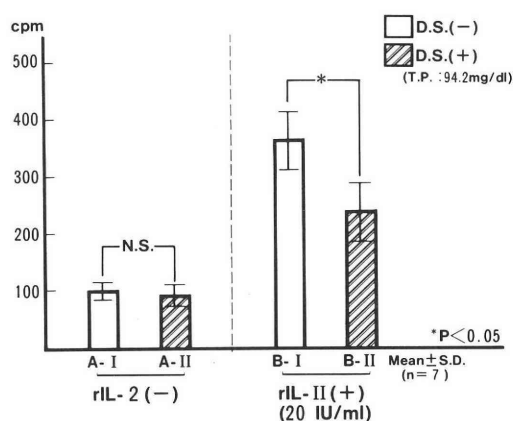


Fig. 7 Suppressive effect in decidua on proliferation of mononuclear cells by rIL-2.

purified hCG には in vitro において単独では免疫抑制活性はなく、Merz¹³⁾、楢原¹⁴⁾らは crude hCG を純化、精製する過程の中で、免疫抑制活性を有する蛋白分画を分離したと報告しており、現在では hCG 自体には免疫抑制活性はなく、それに付随した蛋白自体に、あるいは hCG と他の因子が共存した時に免疫抑制活性が発現するとされている。

今回の著者の実験では、C.S. は mitogen 刺激リンパ球幼若化系を強く抑制したが、抑制活性の最も高い濃度における C.S. (T.P 49 mg/dl) が含有する hCG- β は 7400 ng/ml と高値であった。著者の作製した C.S. 中の hCG は crude hCG であり、これが強い免疫抑制活性を示したことは諸家の報告と一致するところである。しかし、D.S. も T.P 94.2 mg/dl の濃度で C.S. に匹敵する免疫抑制活性を示しており、この D.S. 中の hCG- β は 400 ng/ml と C.S. 中のそれよりはるかに少量であった。このことより脱落膜組織の中に crude hCG 以外の何らかの免疫抑制活性が存在することが示唆された。また梅咲¹⁵⁾、J.S. Goodwin¹⁶⁾等は、mononuclear cell の PHA 反応系あるいは one way mixed lymphocyte reaction (MLR) 系に Prostaglandin (PG) が抑制的に働くことを報告しており、PG が脱落膜中の免疫抑制因子の一つとして重要であるとしている。われわれの作製した D.S., C.S. 中の PGE は免疫抑制活性最高濃度で、それぞれ 450 pg/ml, 25 pg/ml であり、D.S. 中に高濃度の PG の存在を認めた。このことは梅咲¹⁵⁾等の報告を裏付けるものである。しかし脱落膜には、その他にも免疫抑制活性を持つ蛋白の存在が報告されており²⁾、今後さらに検討を要するところである。

さて今回、著者は、各 trimester の妊婦末梢血 MNC を用いた mitogen 刺激リンパ球幼若化系に

D.S. を添加した場合の各 MNC の反応態度を検索した。従来より妊娠の進行と共に T cell mitogen 刺激リンパ球幼若化率は軽度あるいは有意に低下するとの報告がある¹⁷⁾。今回の著者の実験でも、これらの報告とはほぼ同様の結果を得た。しかしその程度は弱く、非妊婦 MNC を用いた場合との間に有意差を認めなかった。このことより妊娠中における T・B cell 比率や T cell subset, あるいはその他の T cell の増殖に関係した因子の変動が軽度であることが示唆された。しかしながら各 trimester の妊婦の MNC を用いた mitogen 刺激リンパ球幼若化系に及ぼす D.S. の抑制率は、妊娠の進行と共に有意に増大した。つまり、妊娠中は MNC の D.S. に対する sensitivity が増大していくものと考えられる。この機序としては、T cell の lymphokine を介した増殖系の脱落膜組織に対する感受性が、妊娠の時期によって異なることが推測されるが、その詳細は不明である。

次に D.S. の持つ免疫抑制機序を解明する目的で、rIL-2 を用いた MNC の培養系に関して検討を加えた。rIL-2 receptor は抗原やレクチンによる stimulation がないと T cell 上に発現しづらいという¹⁸⁾。今回の実験では MNC の培養系に rIL-2 を添加したのみであるので、TdR uptake は少量であった。しかし、TdR uptake は control である E.S. 添加系より、D.S. 添加系が有意に低値であった。よって rIL-2 による T cell 増殖能が D.S. によって抑制されるのは明らかである。T cell の増殖には少なくともマクロファージ、IL-2 産生 T cell および IL-2 反応 T cell の 3 種類の細胞が関与しているとされている¹⁸⁾。今回の実験では IL-2 を外部より添加しているので、T cell の増殖抑制は MNC 中のマクロファージ、あるいは IL-2 反応 T cell つまり IL-2 receptor を、D.S. が何らかの形で障害することによると推測される。

以上のように脱落膜組織の持つ免疫抑制機構の一部が IL-2 を介した反応系に存在することが判明したが、それらを修飾する因子が数多くあるため、今後さらに多方面からの解析が必要であると考えられた。

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師、寺島芳輝教授に深謝致します。また、終始御指導を頂いた楠原浩二講師ならびに直接御指導いただいた松本和紀博士に深謝致します。また rIL-2 を提供下さった塩野義製薬(株)に感謝致します。

文 献

1) 川端政實, 梅咲直彦, 朝田拓治, 大鹿幸信, 迫 久

- 男, 須川 信: 妊娠維持における脱落膜の役割, 産婦の進歩, 37: 345, 1985
- 2) Badet, M. T.: Partial characterization of immunosuppressive factors from short-term cultures of murine decidual tissue. *Ann. Immunol. C1.34*: 321, 1983
- 3) 近藤泰正, 妊娠中の免疫機構, 産婦の世界, 増刊号, 37: 30, 1985
- 4) 植田勝間: 生殖免疫と母体適応, 臨産, 32: 552, 1978
- 5) Fujisaki, S., Mori, N., Sasaki, T.: Cell mediated immunity in human pregnancy: Changes in lymphocyte reactivity during pregnancy and postpartum. *Microbiol. Immunol.* 28: 899, 1979
- 6) 仲野良介: 妊娠中の免疫機構, 産婦の世界, 増刊号, 37: 31, 1976
- 7) Knoblock, V., Jouja, V. and Pospisil, M.: Fetomaternal relationship in normal pregnancy in mixed lymphocyte cultures. *Arch. Gynäk.* 220: 249, 1975
- 8) 柿原歌子: 妊娠中における免疫グロブリン産生細胞の helper 細胞の機能変動について, 産婦の世界, 29: 69, 1977
- 9) Persellin, R. H., Thoi, L. L.: Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis in pregnancy, development of inhibition during gestation and recovery in the postpartum period. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 25: 250, 1979
- 10) Morse, J. H., Steams, G., Agosto, G. M. and Canfield, R. E.: The effects of crude and purified human gonadotropin on *in vitro* stimulated human lymphocyte cultures. *Cellular Immunology.* 25: 178, 1976
- 11) Mühlenstedt, D. and Kim, M. A.: The influence of highly purified hCG on the immunocompetence of human lymphocytes and DNA repair system. *Z. Geburtsh. Perinat.* 183: 189, 1979
- 12) Hammarstrom, L., Fuchs, T. and Smith, I. E.: The immunodepressive effect of human glycoproteins and their possible role in the nonrejection process during pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 58: 417, 1979
- 13) Merz, W. E., Schmidt, W. and Lenhard, V.: Separation of the gonadotropic activity of crude choriogonadotropin from the inhibitory effect on lymphocyte transformation. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 360: 1433, 1979
- 14) 橋原久司, 森 宏之, 木川源則: crude hCG に存在する免疫抑制因子, 第 37 回日産婦学会学術講演会抄録集: 158, 1985
- 15) 梅咲直彦, 川端政実, 須川 信: 脱落膜細胞含有分画培養上清の細胞性免疫抑制活性についての検討, 日産婦誌, 40: 841, 1988
- 16) Goodwin, J. S., Messner, R. P. and Peake, G. T.: Prostaglandin suppression of mitogen stimulat-

ed lymphocytes *in vitro*. J. Clin. Invest. 62: 753, 1978

- 17) 真野紀雄, 後藤節子, 可世木成明, 友田 豊: 絨毛性疾患患者の免疫能に関する研究, 日産婦誌, 36: 303, 1984
- 18) 勅使河原計介, 多賀谷温, 淀井淳司: IL-2 とリンパ球の自己増殖, 臨床免疫, 18: 33, 1986

Study on immunological significance of human decidua

Naoiku Watanabe

Department of Obstetrics and Gynecology,
Jikei University School of Medicine,
Tokyo 105, Japan
(Director: Prof. Y. Terashima)

We examined the role played by decidual tissue in immunotolerance mechanism involved in pregnancy.

Mononuclear cells (MNC) obtained from non-pregnant women and pregnant women in each

trimester of gestation. Lymphocyte blastogenic systems were created using these MNC with stimulation by PHA and Con A. The supernatant of the decidual homogenate (D. S.) was added, and its suppressive activity in blastogenic system was judged by ^3H -Thymidine uptake.

The D. S. strongly suppressed the proliferation of MNC as induced by PHA or Con A. Furthermore, the suppressive activity changed with the periods, in order of the non-pregnancy, early pregnancy and late pregnancy from low to high.

This is likely to be attributable to different sensitivities of MNC to the decidua in the different periods mentioned.

Next, studies were made on the effects of D. S. in the proliferation of MNC by Interleukin 2 (IL-2) in order to unravel the mechanism of immunosuppressive activity in the decidua. D. S. suppressed the proliferative rate of MNC at 39.8%. The result suggested that the suppression of MNC proliferation by IL-2 play a role in the immunosuppressive activity in the decidua.

(受付: 1988 年 9 月 16 日特掲)

PUTATIVE STIMULATION BY ESTROGEN OF THE INDUCTION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID POLYMERASE α IN THE ENDOMETRIUM OF THE HUMAN UTERUS DURING THE MENSTRUAL CYCLE

Satoshi USUKI, Sayuri KUBOTA, Yoshito ICHIKAWA,
Akemi HOSOKAWA and Masato OKANE

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

Abstract; To provide some insight how deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis occurs in the endometrium of the human uterus during the menstrual cycle, the DNA polymerase activities (α and β) in endometrial samples taken from normal cycling women, and the concentration of estradiol-17 β (E_2) and progesterone in the serum were measured. DNA polymerase α activity increased gradually from the beginning of the menstrual cycle, reaching a peak 2-3 days prior to ovulation and then showing a decrease. Increase in the activity occurred in parallel with that of the concentration of E_2 , but not progesterone, in the serum sample at the proliferative phase. DNA polymerase β activity showed no significant change during the menstrual cycle. These results suggest that estrogen seems to cause the induction of DNA polymerase α activity during cell proliferation in the endometrium of the human uterus.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 292-296, 1989)

Introduction

The endometrium of the human uterus proliferates and differentiates cyclically during the menstrual cycle, as regulated by hormones¹⁾. While it is well known that estrogen stimulates endometrial cell proliferation¹⁻³⁾, the related mechanisms are not well understood.

Three species of DNA polymerase (α , β and γ) have been classified in mammals (Table I). DNA polymerase α participates in nuclear DNA replication, whereas DNA polymerases β and γ are related to DNA repair and the mitochondrial DNA replication, respectively⁴⁾. DNA polymerase

α also seems to be related to cell proliferation since inhibition of the enzyme activity leads to a cessation of DNA replication and cell proliferation¹⁾.

DNA polymerase α activity changes with the concentration of estrogen in immature rat uteri²⁾ and ovaries^{5,6)}, suggesting that the regulation of the enzyme activity may be involved in the processes of estrogen-related cell proliferation.

We hypothesized the relationship between DNA polymerase α , DNA replication and cell proliferation in the endometrium of the human uterus in Fig. 1, and examined changes in DNA polymerase α activity in the endometrium during the men-

Table. 1 Deoxyribonucleic acid (DNA) polymerases in mammals.

	Function	Activity during cell proliferation or cell cycle
α	nuclear DNA replication	changes with DNA replication
β	DNA repair	not change
γ	mitochondrial DNA replication	not change

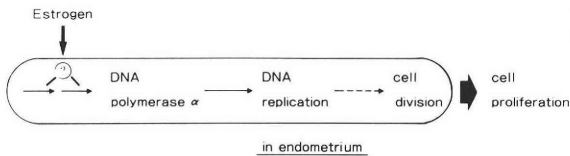


Fig. 1 Hypothetic relationship between DNA polymerase α , DNA replication and cell proliferation in the endometrium of the human uterus.

strual cycle and obtained evidence that the enzyme activity may be regulated by estrogen.

Materials and Methods

Endometrial biopsies were performed without anaesthesia from 12 normally cycling women (mean age, 26 years; range 24 to 29 years) and on different days of the cycle. Informed consent was obtained from each woman. The biopsies were taken with a Novak curette from the fundus, 2 cm down on the anterior wall of the uterus. These endometrial tissues (5-17 mg wet weight) were cut into small pieces with scissors and left to stand at 0°C in a solution (20 μ l/mg wet weight of tissue) containing 1.0% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.9), 1.0 M NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol and 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA), followed by homogenization with a Teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 15,000 $\times$ g for 30 min at 4°C. The supernatant and the precipitate were assayed for DNA polymerase α and β activities, and for DNA content, respectively, as described previously⁵⁾ (Figs. 2 and 3).

Endometrial tissue was treated and centrifuged as described for the measurement of DNA polymerase activities. After centrifugation, the

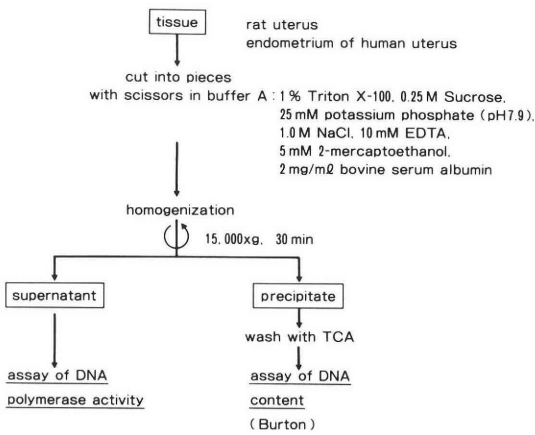
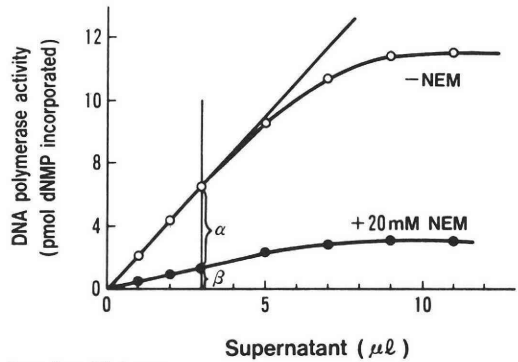


Fig. 2 Measurement of DNA polymerase and DNA.



Reaction Mixture :

50 mM Tris-HCl (pH 7.5),
50 μ M dATP, dCTP, and dGTP,
10 μ M dTTP containing 0.4 μ Ci [³H] dTTP,
7 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol,
100 μ g/ml activated DNA,
200 μ g/ml bovine serum albumin,
10% glycerol.

+Sup (1~5 μ l)
±20 mM N-ethylmaleimide (NEM)

final 25 μ l at 37°C, for 20 min

Fig. 3 Measurement of DNA polymerase activity.

precipitate, suspended in 100 μ l Tris-HCl buffer (25 mmol/l; pH 7.5), was re-precipitated by addition of 10% (w/v) perchloric acid (900 μ l), followed by centrifugation at 2,000 $\times$ g for 5 min. The precipitate was washed three times with 5% perchloric acid by centrifugation at 2,000 $\times$ g for 5 min. The washed precipitate was assayed for DNA according to the method of Burton⁷⁾.

Blood samples were obtained concomitantly with the biopsies and were centrifuged at 3,000 r.p.m. for 10 min at 4°C. The sera were assayed for

E₂ and progesterone by radioimmunoassay. The rabbit antiserum to 6-oxoestradiol-17 β -6-oxime-BSA was used for the assay of E₂, and progesterone-3-oxime-BSA for progesterone.

The cross-reactivities of the E₂-antiserum with progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, testosterone and androst-4-ene-3,17-dione were <0.08, <0.08, 0.29 and 0.44%, respectively. The cross-reactivities of the progesterone-antiserum with E₂, 17 α -hydroxyprogesterone, 20 α -hydroxyprogesterone, testosterone and androst-4-ene-3,17-dione were <0.06, 0.89, 6.73, 0.17 and 0.15%, respectively.

[2, 4, 6, 7-³H(N)]-E₂ (sp. act. 130 Ci/mmol: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.) or [1, 2, 6, 7-³H(N)]-progesterone (sp. act. 115 Ci/mmol: New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.) was used for assay and recovery reagent. The medium was extracted with 8 ml of ethyl ether and evaporated under N₂ and air in a heating block at 40°C.

After evaporation of the ethyl ether, the residue was chromatographed on a Sephadex LH-20 (0.5 gm) column in benzene and methanol (85: 15, v/v). The E₂ or progesterone antiserum was added to the separated fractions. The E₂ and progesterone antisera were diluted 1:50,000 and 1:10,000 respectively in borate buffer (0.05 M; pH 8.0) containing BSA (0.06%), human gamma-globulin (0.05%) and 1.8x10⁻⁷ Ci [2, 4, 6, 7-³H(N)]-E₂ or [1, 2, 6, 7-³H(N)]-progesterone.

The samples were incubated for 30 min at 20°C. Blanks and standard samples of E₂ or progesterone (0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 and 1,000 pg) were assayed in duplicate together with the experimental samples. Bound and free hormone were separated by incubation for 10 min with 0.5 ml saturated ammonium sulphate and centrifugation for 10 min at 3,000 r.p.m. at 4°C.

The supernatant fractions were collected, and then liquid scintillation counting was carried out by using scintillation fluid (a mixture of 0.3% PPO and 0.03% dimethyl POPOP in toluene and Insta-Gel; Packard Instruments, Downers Grove, Illinois, U.S.A.; 1: 1, v/v, 10 ml). Water blanks were close to zero for E₂ or progesterone. Accuracy was assessed by adding known quantities of

E₂ or progesterone (0, 20, 50, 100, 200, 500 pg/ml) to the medium and assaying the extracts. Interassay coefficients of E₂ and progesterone were 7.6 and 8.5%, respectively. Intraassay coefficients of E₂ and progesterone were 12.6 and 16.7%, respectively. The linear regression analysis of the results gave the equation $y=1.03x+0.5$ ($r=0.99$, $p<0.01$) for E₂ and $y=0.90x+11.9$ ($r=0.93$, $p<0.01$) for progesterone, where y =amount recovered and x =amount added.

The mean extraction efficiencies of E₂ and progesterone were 84.3 $\pm$ 8.3 and 88.7 $\pm$ 7.8%, respectively.

The assay sensitivities of E₂ and progesterone were 10 and 20 pg/ml, respectively.

Protein content was determined by the method of Lowry et al.⁸⁾, using BSA as a standard. Student's t-test was used for the statistical analysis. All chemical reagents were of analytical grade and organic solvents were distilled prior to use.

Results

In Fig. 4A, DNA polymerase α activity per DNA content (specific activity) was 20.2 $\pm$ 2.8 (mean $\pm$ S. D.) nmol/mg DNA at the proliferative phase. This value was significantly ($p<0.001$) higher than that, 5.8 $\pm$ 1.6 nmol/mg DNA, at the secretory phase.

At 1 and 14 days of menstruation, the activities were 9.0 and 16.9 nmol/mg DNA, respectively. Thus, the activity changes cyclically during the menstruation cycle: it began to increase at the early proliferative phase, reached the highest level a few days before ovulation, then began to decrease and remained at a low level throughout the secretory phase (Fig. 4A). The activity began to decrease when the concentration of progesterone in the serum began to increase. On the other hand, DNA polymerase β activity, determined as a control, showed no statistically significant changes during the menstrual cycle (Fig. 4A).

To elucidate the relationship between DNA polymerase α activity and estrogen, the concentration of E₂ in the serum was determined (Fig. 4B). Two peaks appeared increase of the proliferative and secretory phases, reached maximum levels at a few days before ovulation and at 20-23

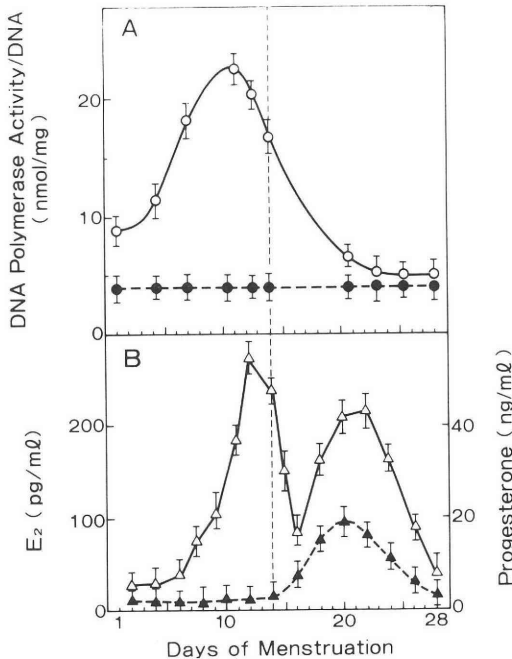


Fig. 4 Changes in DNA polymerase activities in endometrium (A) and hormone concentrations in serum (B) during the menstrual cycle. DNA polymerase α ($\circ$) and β ($\bullet$) activities were determined in the endometrium obtained from individual women on the indicated days of the cycle (mean $\pm$ SD, $n=3$). Concentrations of estradiol-17 β (E₂, $\triangle$) and progesterone ($\blacktriangle$) in serum (mean $\pm$ SD, $n=6$) were assayed as described in the text, and E₂ and progesterone are normal for follicular and luteal phases as shown in Figure.

days of the cycle, respectively. On the other hand, the concentration of progesterone in the serum was low at the proliferative phase, showed an increase at the secretory phase, and reached a maximum level at about 20 days of the cycle (Fig. 4B). These hormone concentrations were essentially the same as reported by other investigators¹¹. DNA polymerase α activity per DNA content in the endometrium changed in parallel with the concentration of E₂ in the serum ($p<0.001$), at the proliferative phase, but not the concentration of E₂ at the secretory phase or that of progesterone throughout the menstrual cycle.

Discussion

Cyclic changes in the activity of DNA polymer-

ase α , but not that of DNA polymerase β , suggest that the enzyme activity is specifically under control of the menstrual cycle. The timing of increase in the activity coincided with that of the concentration of E₂, but not progesterone, LH¹¹ or FSH¹¹, at the proliferative phase. This would suggest that this enzyme activity is regulated by estrogen, however, the enzyme activity was low at the secretory phase while the concentration of E₂ was relatively high. This is consistent with actions of estrogen because estrogen primes cell differentiation rather than cell proliferation in the presence of progesterone, in the secretory phase¹¹. In E₂-treated rats, the specific activity of DNA polymerase α in the myometrium increased, however, subsequent administration of progesterone decreased the activity stimulated by E₂ (data not shown), suggesting that estrogen stimulates induction of DNA polymerase α but that progesterone suppresses that of the enzyme.

The increase of DNA polymerase α activity at the proliferative phase seems to be due to induction of the enzyme, i. e., an increase of the number of the enzyme molecules but not due to activators of the enzyme, since the enzyme activities were additive and no significant stimulation was detected, when the endometrial extracts with different specific activities were mixed and assayed for the activity (unpublished data).

We propose that estrogen stimulates the induction of DNA polymerase α to promote DNA replication and cell proliferation in the endometrium of the human uterus at the proliferative phase (Fig. 5). Whether the action of estrogen is direct or indirect remains to be determined.

Acknowledgements

The authors wish to thank Miss Y. Hayasaka and Mrs. M. Kusumi for the technical assistance. The skillful typing of Miss N. Morohashi is also gratefully acknowledged.

This work was supported in part by Tsukuba University Project Research and the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

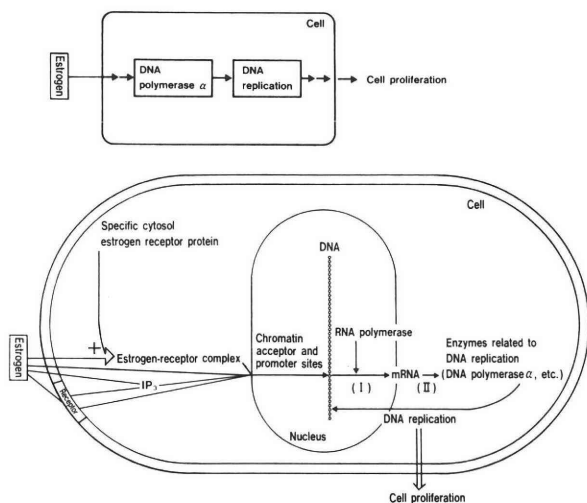


Fig. 5 Postulated mechanism of estrogen-dependent cell proliferation in the endometrium of the human uterus. I, gene transcription; II, gene translation; IP₃, inositol 1, 4, 5-triphosphate.

References

- 1) Rritchard, JA and McDonald, PC: Williams Obstetrics, 16th edition. p75, New York: Appleton-Century-Crofts, Inc., 1980
- 2) Harris, J and Gorski, J: Evidence for a discontinuous requirement for estrogen in stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat uterus. *Endocrinology* 103: 240, 1978
- 3) 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 *Proceedings of the 6th International Congress on Placental and Endometrial Proteins—Basic and Clinical Aspects—*, p. 177 VNU Science Press, 1988
- 4) Hübscher, U: DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: mode of action and biological implications. *Experientia* 39: 1, 1983
- 5) 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. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 155: 447, 1986
- 6) Usuki, S: Stimulatory action of estradiol-17 β on deoxyribonucleic acid α -nucleotidyltransferase activity in immature hypophysectomized rat ovaries. In *Tubo-ovarian Function*, pp.

295-313. Eds. K. Ichinoe, S. Segal and L. Mastrojanni. New York: Raven Press, 1987

- 7) Burton, K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. Res.* 62: 315, 1956
- 8) Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL and Randall, RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951

ヒト子宮内膜における estrogen と DNA polymerase α 活性について

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 愼 窪田早百合 市川喜仁
細川明美 岡根真人

ヒト子宮内膜の増殖は estrogen 依存性であり, estrogen が子宮内膜の DNA 合成を促進させることはよく知られているが, その機序は不明の点が多い. 今回は, その機序を解明する目的で月経周期における血中 estrogen および progesterone 濃度と子宮内膜中の DNA polymerase 活性および DNA 量の関係について検討を加えた.

研究の目的を十分に了解した規則的に排卵のある正常月経周期の婦人の子宮内膜を経時的に採取 (卵胞期 1 回, 黄体期 1 回 / I 婦人) すると同時に採血した.

採取した子宮内膜をホモジネートし, 遠沈 (3,000 rpm, 10 分) の後, 上清中の DNA polymerase α (DNA 複製酵素) および DNA polymerase β (DNA 修復酵素) 活性, および沈澱細胞中の DNA を Usuki and Shioda (1986) ないし Burton (1956) の方法で測定した. 卵胞期の子宮内膜中の DNA polymerase α 活性および DNA 量は血中 estrogen 濃度によく相関 ($p < 0.01$) して変化した, 黄体期では低レベルを保った. また DNA polymerase α 活性の増加は子宮内膜細胞レベルでの DNA polymerase α 分子の増加によった. 一方, DNA polymerase α 活性は黄体期の血中 estrogen ないし月経周期中の血中 progesterone 濃度とは相関しなかった. 子宮内膜中 DNA polymerase β 活性は月経周期中有意味な変化を示さなかった.

以上の結果は, 子宮内膜の増殖は estrogen が, 子宮内膜中の DNA polymerase α 活性を増加させ, DNA が複製されることによっておこることが示唆された.

同時に, DNA polymerase β 系の活性化は認められないとともに, DNA polymerase α 活性は progesterone で抑制されることも示唆された.

(受付: 1988 年 1 月 27 日)

早期流産 early abortion に関する用語について

Words and Definition of Early Abortion

東北大学医学部産科婦人科学教室

高 浜 一 宏 星 合 昊 矢 嶋 聰
Kazuhiro TAKAHAMA Hiroshi HOSHIAI Akira YAJIMA

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

妊娠 12 週未満の流産と定義された早期流産についても、体外受精-胚移植 (IVF-ET) や配偶子卵管内移植 (GIFT) をはじめとする妊娠初期に関する研究の進歩に伴い、さらに細分類定義の必要性が感じられるようになってきた。そこで国内外の文献における用語の使用状況を検討し、さらに妊娠週数により定義されてきた日本産科婦人科学会の流産の定義の流れを考慮し、早期流産をさらに 5 週未満の超早期流産 Ultra early abortion, 5 週以後で 8 週未満の極早期流産 very early abortion, 8 週以後で 12 週未満の早期流産の 3 段階に細分類定義することの必要性について検討を試みた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 297-301, 1989)

1. はじめに

日本産科婦人科学会により、12 週未満の流産と定義された早期流産¹⁾では胎芽の異常によるものが多いといわれている。超音波医学の進歩やさまざまな生化学的妊娠マーカーの検出法の進歩により、より早期に妊娠の診断が可能となるとともに、臨床的に胎芽の異常もより早期に検出できるようになりつつある。妊娠診断法の早期化により従来の診断法による流産の管理にも大きな変化がみられ、流産に関する用語にもさまざまなものが使用されるようになってきている。流産とは Dorland の医学辞典によれば “The expulsion of the product of conception, or of the fetus before it is viable” と定義されている。流産というためにはその前段階である妊娠の証明が必要であるが、極初期に証明することは困難であった。従来、妊娠の診断は予定月経の遅延により気付かれ胎児成分の証明により行なわれてきた。体外受精-胚移植 (IVF-ET) や配偶子卵管内移植 (GIFT) の開発と普及により予定月経以前の妊娠診断の重要性が増し、さらに妊娠時の受精卵の淘汰や運命に関する研究も盛んに行なわれるようになってきた。IVF-ET や GIFT においては妊娠率を比較検討するために予

定月経前からさまざまな方法で妊娠の証明が試みられ、biochemical pregnancy, subclinical pregnancy, clinical pregnancy 等の、さらに細かな妊娠段階を設定し、それに対応する流産について検討されている。受精卵の転機に関する研究では occult pregnancy, menstrual abortion, β -HCG pregnancy, preimplantation pregnancy, postimplantation pregnancy 等の用語が使用され、用語の統一がなされていない。このために極初期の流産の研究にあたり、用語使用上、多少の困難を感じるようになった。そこでこれらの用語について検討を加えた一部の論文を紹介するとともに問題点の整理を試みた。

2. 日本産科婦人科学会の定義

1986 年、日本産科婦人科学会の用語問題委員会は流産を早期と後期に分類し、狭義の流産と未熟産の分類ならびに名称を廃止した¹⁾。これに先立ち、流産と早産の定義が行なわれており²⁾、妊娠の終了に関する用語はすべて最終月経第 1 日を 0 日として規定された妊娠期間により分類、定義された。その定義によれば現在使用されるべき用語は以下の通りである。

早期流産 early abortion: 妊娠 12 週未満の流産

後期流産 late abortion: 妊娠 12 週以後, 24 週未満の流産

早産: 妊娠 24 週以後から 37 週未満の分娩

正期産: 妊娠 37 週以後から 42 週未満の分娩

過期産: 妊娠 42 週以後の分娩

流産と分娩の定義は, 児の体外での生存の可能性を指標に, また早期流産と後期流産はその病因と臨床像の相違を指標に分類定義されたようである. この定義は簡潔で臨床的には非常に有用であるが, 早期流産に関するさらに詳細な分類はなされていない. この分類にいたる経緯については松山が総説で詳しく解説している³⁾.

3. 国際的な現況

1952 年の Hertig et al. による受精率および着床前後における受精卵の運命に関する研究以来⁴⁾, 予定月経日以前にも多くの受精卵が妊娠の証明に至らないままに失われていることがわかり, 高感度の生化学的妊娠マーカーを用いた妊娠の証明法に関する研究が行われてきた⁵⁻¹²⁾. これらの研究でもはっきりした受精の時点を検出することは困難であり, 妊娠の開始時期についての定義を記載したものはほとんどない. 一方, IVF-ET では受精卵を体内に戻し, 着床あるいはそれ以後まで成育することを目標とするために着床以後のマーカーの検出により妊娠の成立あるいは成功とする論文が多いようである^{13,14,17)}. このように妊娠の開始時期に関する定義が曖昧なためと従来の妊娠の診断法との相違により, 初期の妊娠に関して流産 abortion は使用されず, pregnancy loss が好んで使用されてきた^{8,10,11,12)}.

Dorland の医学辞典によれば, 妊娠とは “The condition of having a developing embryo or fetus in the body, after union of an ovum and spermatozoon” と定義されている. この定義によれば妊娠の開始時期は受精であることになる. この定義に従えば IVF-ET においては受精を確認し developing embryo を子宮内に戻す ET により「妊娠が開始した」とも解釈し得ることになる. IVF-ET の領域では β -HCG を始めとする妊娠マーカーが検出され妊娠の継続に至らないものを biochemical pregnancy^{14,17)}, β -HCG pregnancy^{15,16)} と呼ぶことがある. また一方では予定月経の数日の遅延以外に臨床的に妊娠と疑われること無く流産に至るものが occult pregnancy⁶⁾ と呼ばれている. 本来は妊娠 pregnancy という用語は継続状態に使用されるべきであるにもかかわらず, occult pregnancy のように妊娠の中断を表わすためにも使われていることが用語使用上の混乱を来す原

因のひとつと考えられる. さらに biochemical pregnancy, chemical pregnancy, β -HCG pregnancy のように検査法による用語, preimplantation pregnancy, postimplantation pregnancy^{8,16)} のように生物学的な用語, menstrual abortion^{7,16)}, occult pregnancy^{6,16)} のように予定月経日を意識した時間的な用語, さらには subclinical-, preclinical-, clinical-, early clinical-, established clinical pregnancy^{9,13,15,16-19)} 等の従来の診断法による妊娠との相違を意識した用語が混在して使用されていることが混乱の度合いを深めさせているのではないかとされる. このような状況に対して 1983 年に Jones et al. は IVF-ET の成功率に関する論文の表題として “What is pregnancy?” という疑問を投げ掛けた¹⁵⁾. 彼らは IVF-ET における排卵誘発に際して HCG の注射を使用しているために β -HCG の検出による妊娠の早期診断が他の施設に比べて困難であった. そこで妊娠の中断, すなわち流産 abortion について pregnancy という用語が使用されていることを指摘し, 妊娠の開始時期の定義には触れないまま, 妊娠の終結をすべて preclinical abortion, clinical abortion, viable delivery の 3 段階に分類することを提唱した. 彼らは採卵日を基準に 28 日, すなわち 4 週未満の流産を preclinical abortion, 4 週以後から児の体外成育の可能になるまでの流産を clinical abortion, それ以降は viable delivery と定めた. ここでは preclinical abortion と clinical abortion は妊娠週数 gestational age の妊娠 6 週に相当する期間で定義されている一方で clinical abortion と viable delivery は児の体外成育という別な要素によって定義されている. 1985 年には Grudzinskas et al. が着床後の流産率に関する文献的研究のなかで詳しく用語についても検討を行なっている¹⁶⁾. 彼らは早期妊娠因子 early pregnancy factor (EPF), pregnancy-specific β 1 glycoprotein (SP 1), β -HCG 等の生化学的妊娠マーカーや超音波診断法についての検討から超音波による胎児心拍動の証明以後を clinical pregnancy, それ以前で超音波診断法または HCG の検出により妊娠と診断されたものを subclinical pregnancy, 胚移植も含め無月経等それ以前に妊娠が臨床的に疑われるものを suspected pregnancy と呼ぶことを提唱した. また pregnancy と abortion の用語の誤使用を防ぐため, 同時に abortion の定義も pregnancy の定義に対応させる形で設定した. 超音波診断法または HCG の検出前に流産に至ったものを abortion of suspected pregnancy, それ以後で胎児心拍動の証明以前に流産に至ったものを subclinical abortion, それ以後の流

産を clinical abortion と定義した。suspected pregnancy と表現する利点として妊娠が問題となる胚移植または無月経が妊娠診断手段なしにもすでに妊娠に含まれていることをあげ、胚移植の時点から妊娠が開始すると考えていることを示唆している。

4. 日本における状況

鈴木 et al. は“体外受精・胚移植”の中で用語に対する解説をしている¹⁸⁾。そこでは妊娠を biochemical pregnancy, early clinical pregnancy, established clinical pregnancy の3段階に分類して以下のように解説している。

biochemical pregnancy = 生化学的妊娠：胚移植後の黄体期に測定された血中 β -HCG 値が黄体賦活のために hCG 投与がなされない患者で基準以上になった場合をいう。

early clinical pregnancy：GS (Gestational sac) の存在が超音波断層法によって確認されたが、いまだ胎児心拍動の確認ができない場合をいう。

established clinical pregnancy：超音波断層法により胎児心拍動が確認できた場合より以後をいう。

流産に関しては、以下のように2段階に分類している。

subclinical abortion (menstrual abortion)：生化学妊娠にいたったもののうち、ある一定の比率で fetal wastage が起こる結果、臨床的流産までいならず、月経と同様の形で流産にいたるもの。

clinical abortion：臨床的に妊娠の徴候を認めた後、流産にいたるもので、多くは missed abortion (超音波上 blighted ovum を示す) の形をとる。

この領域の進歩に対する関心は高く、1987年の「産婦人科の実際」は妊娠初期の胎芽・胎児の管理という特集を行ない、その巻頭の「企画者のことば」のなかで以下のような分類を紹介している¹⁹⁾。

biochemical pregnancy：妊娠マーカー出現期

early clinical pregnancy：超音波診断による GS 出現期

established clinical pregnancy：超音波診断による胎児心拍動確認期

これらの分類は検査を指標としているため、簡潔で使用しやすい反面、検査法の発達により時間的に変化する可能性を有している。さらにこのような妊娠の時期に対応する形で流産を分類定義することが

望ましいと思われる。

5. 早期流産 early abortion の細分類の必要性

妊娠12週未満の流産と定義された早期流産も、すでにさらに詳細な分類定義が必要な時期にきていると思われる。日本産科婦人科学会は現在まで流産を最終月経第1日を0日として規定された妊娠期間により分類している。この中の早期流産の分類に関しては、欧米では期間による分類と検査法による分類が混在して用いられ、本邦では検査法による分類が提唱されているのが現況である。時期による分類は臨床上簡潔であり使用しやすいが、どの時点で区切りを付けて分類するか、かなりの検討を要するであろうし、検査法による分類は検査法の進歩や感度の相違よりかなりのばらつきが予想される。本邦で行なわれている検査法による分類を参考に、時期による分類を試みるためには超音波診断法によるGSと胎児心拍動の確認可能時期がポイントとなる。

GSは早いもので4週の始めに確認できるものもあるが、最大径が10mmを超えるのは5週であり、すべてに検出可能になるのは6週とされている²⁰⁾。さらに従来の1000 IU/l感度のHCG検査法では、6週でほぼ全例に陽性反応がみられていたが、同様の操作で検査が可能でかなり一般化されている200 IU/l感度のHCG検査法では5週でほぼ全例に陽性反応がみられるようになった²¹⁾。胎児心拍動に関しては胎生学的には胎生第4週で開始するとみられ、超音波診断上は早くて5週末にしか現時点では検出できず、8週で全例に検出可能となる²¹⁾。

私達は長期の不妊症治療にもかかわらず妊娠成立をみなかったと思われた症例の一部に、予定月経ごろに出血が開始することを繰り返したために流産とは気づかれなかった症例を見いだした。また他にも occult pregnancy や menstrual abortion と呼ばれる範疇の流産の報告があるため、この時期の流産を区別する必要があると考えられる。さらに胎児心拍動を確認した後の流産についても病因的に異なるものが推定されることから、区別分類することが妥当と思われる。

biochemical pregnancy の時期に対応させた流産を4-6週未満のいずれかに決定することは今後とも検討を重ねる必要があると思われるし、early clinical pregnancy の時期に対応させる時期にしても胎児心拍動の認められはじめる6週以降にするか、またはすべてに認められる8週以降にするかも問題がある。しかし、いずれにしても一部に批判のみられる occult pregnancy のような表現を避け、5週未満の

流産を超早期流産 ultra early abortion, 5 週以後で 8 週未満の流産を極早期流産 very early abortion とでもするような早期流産の細分類定義が必要であろうと考えられる。

文 献

- 1) 日産婦：委員会報告のうち統一見解とした事項, 日産婦誌, 38 (7) : 会告, 1986
- 2) 日産婦：流産および早産の定義について, 日産婦誌, 32 (8) : 会告, 1980
- 3) 松山栄吉：流産の定義の変遷, 産と婦, 54 : 1758, 1987
- 4) Hertig, A. T., Rock, J., Adams, E. C., and Menkin, M. C.: Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recorded from 210 women of known fertility. *Pediatrics* 23: 202, 1952
- 5) Rosal, T. P., Saxena, B. B. and Landesman, R.: Application of a radioreceptorassay of human chorionic gonadotropin in the diagnosis of early abortion. *Fertil. Steril.* 26: 1105, 1975
- 6) Bloch, S. K.: Occult pregnancy. A pilot study. *Obstet, Gynecol.* 48: 365, 1976
- 7) Chartier, M., Roger, M., Barrat, J. and Michelon, B.: Measurement of plasma human chorionic gonadotropin (hCG) and β -hCG activities in the late luteal phase: Evidence of the occurrence of spontaneous menstrual abortion in infertile women: *Fertil. Steril.* 31: 134, 1979
- 8) Miller, J. F., Williamson, E., Glue, J., Gordon, Y. B., Grudzinskas, J. G., and Sykes, A.: Fetal-loss after implantation. A prospective study: *Lancet* 2: 554, 1980
- 9) Edmonds, D. K., Lindsay, K. S., Miller, J. F., Williamson, E. and Wood, P. J.: Early embryonic mortality in women: *Fertil. Steril.* 38: 447, 1982
- 10) Whittaker, P. G., Taylor, A. and Lind, T.: Unsuspected pregnancy loss in healthy women: *Lancet* 1: 1126P 1983
- 11) Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., Wehmann, R. E., Armstrong, E. G., Canfield, R. E. and Nisula, B. C.: Measuring early pregnancy loss: laboratory and field methods: *Fertil. Steril.* 44: 366, 1985
- 12) Ellish, N. J., Chen, H., Jason, C. and Janerich, D. T.: Pilot study to detect early pregnancy and early fetal loss: *J. Occupational Med.* 28: 1069, 1986
- 13) Edwards, R. G. and Steptoe, P. C.: Current status of in-vitro fertilization and implantation of human embryos: *Lancet* 2: 1265, 1983
- 14) Fishel, S. B., Edwards, R. G., Purdy, J. M., Steptoe, P. C., Webster, J., Walters, E., Cohen, J., Fehilly, C., Hewitt, J. and Rowland, G.: Implantation, abortion, and birth after in vitro

fertilization using the natural menstrual cycles or follicular stimulation with Clomiphen Citrate and human menopausal gonadotropin.: *J. in vitro fertil, embryo transfer* 2: 123, 1985

- 15) Jones, H. W., McDowell, J., Acosta, A. A., Sandow, B. A., Andrews, M. C., Veeck, L., Garcia, J. E., Whibley, T. W., Jones, G. S., Wilkes, C. A., Mantzavinos, T. and Wright, G. L.: What is a pregnancy? A question for programs of in vitro fertilization: *Fertil. Steril.* 40: 728P 1983
- 16) Grudzinskas, J. G. and Nysenbaum, A. M.: Failure of human pregnancy after implantation.: *Ann. New York Acad. Science* 442: 38, 1985
- 17) Lancaster, P. A. L., Johnston, W. I. H., Wood, C., Saunders, D. M., Jones, W. R., Kerin, J. F., Yovich, J. L., Hennessey, J. F. and Corry, J. F.: High incidence of preterm births and early losses in pregnancy after in vitro fertilization.: *British Med. J.* 291: 1160, 1985
- 18) 鈴木雅洲：体外受精・胚移植：71, 金原出版, 1985
- 19) 寺尾俊彦：企画者のことば：産婦の実際 36 : 716, 1987
- 20) 石川睦男, 浅川竹仁, 山下幸紀, 清水哲也：正常 GS と blighted ovum : 産婦の実際 36 : 757, 1987
- 21) 小林隆夫：妊娠初期胎芽・胎児像とその異常 : 産婦の実際 36 : 769, 1987
- 22) 松山栄吉：妊娠診断薬の現況 : 産婦の実際 36 : 725, 1987

Words and definition of early abortion

Kazuhiro Takahama, Hiroshi Hoshiai
and Akira Yajima

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

Early Abortion is defined as the abortion in less than 12 weeks of gestational age by Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG). But the further detailed definition relating to the early abortion has not exist in the society. According to the progress of investigation for the early abortion in the field of IVF-ET, GIFT and reproduction, many kind of newly defined words appear in the papers. The definitions are based on the physiological mechanism, gestational age, method of examination and clinical standpoint. They are sometimes used simultaneously and confusedly in the same paper. These problems are pointed out by Jones et al. and Grudzinskas et al. Grudzinskas et al. tried to

divide early abortion to abortion of suspected pregnancy, subclinical abortion and clinical abortion.

We found it difficult to select the proper words in the study for the phenomena that the pregnancy ends to abortion before the time of expected menstrual day, so called "occult pregnancy" or "menstrual abortion" in Japan. So we tried to determine the proper classification and definition for the early

abortion according to the former principle of JSOC. We make a proposal that the early abortion should be divided three classes, namely ultra early abortion in less than 5 weeks of gestational age, very early abortion in less than 8 weeks and early abortion in less than 12 weeks.

(受付：1988 年 7 月 22 日)

R-AFS III・IV期子宮内膜症の治療後2年間の妊孕性の検討 (付属器の左右別評価の有用性)

Study on Fertilizability in R-AFS III and IV Endometriosis at 2 Years after Completion of Therapy (Value of Side-to-Side Separate Evaluation of Adnexae)

釜石市民病院産婦人科

中谷 一夫 木村 芳孝
Kazuo NAKATANI Yositaka KIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kamaishi City Hospital, Iwate 026, Japan

東北大学医学部産科婦人科学教室

星 合 晃
Hiroshi HOSHIAI

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

Revised AFS 分類III・IV期子宮内膜症における妊孕性について、治療後2年を経過した挙児希望例11例(III期5例, IV期6例)を対象として検討した。

全例ダナゾール投与をうけ、必要に応じて手術も併行された。

- (1) III期の5例全例, IV期の6例中3例, 計11例中8例に、延べ9回の妊娠が成立した。
- (2) 妊娠群では治療前の左右付属器病変の程度に差が認められ、所見がより軽度な側の付属器の状態が、治療後の妊孕性と関連を有した。
- (3) 病変のより重い側の付属器の主たる所見は chocolate cyst であり、ダナゾール投与と手術の併用は、その後の妊孕性を高めた。
- (4) 妊娠の成立は8カ月以内に多いが、治療後4カ月以降に成立した妊娠例が良好な経過を示した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 302-307, 1989)

緒 言

子宮内膜症の進行期と妊孕性の予後については、関連を認めるとする報告^{1,2)}と、関連がなかったとする報告^{3,4)}がある。著者ら⁵⁾は以前にいくつかの進行期分類(Beecham, Acosta 杉本, R-AFS)と、治療後1年を経過した例での妊娠率の検討を行ったが、進行期と妊娠率に有意の相関を認めたのは、内診所見に基づく Beecham 分類のみであった(表1)。すな

わち、妊娠率の平均は 1.50 ± 0.71 期、非妊娠群では 2.40 ± 0.80 期であり、Beecham III期以後の妊娠率の低下を示した。Beecham III期の基準は一側卵巣の2倍以上の腫大とダグラス窩の癒着、閉塞性変化であり、これを1cm以上の Endometriosis/Ovary/Deep に16点を配分し、かつ16点以上をIII期とする R-AFS 分類にあてはめると、片側の殆どの chocolate cyst の存在のみで Beecham III期は R-AFS 分類では III期以上に編入されることになる。したがって R-

表 1 Stage by initial laparoscopy in relation to pregnancy outcome

	No.	Beecham	Acosta	Sugimoto	AFS
Pregnancy	16	1.50±0.17	2.00±0.71	1.56±0.37	2.13±0.86
Non-Pregnancy	10	2.10±0.80	2.20±0.87	1.90±0.83	2.90±1.33
P-value		0.01	—	—	—

中谷他 各進行期分類とその後の妊娠成立との関連性の検討 (日産婦誌39巻6号より転用)

表 2 Cases of R-AFS III and IV, having elapsed 2 years after completion of therapy

Stage	Case	Age	At initial visit	
			Primary or Secondary	Duration of infertility (month)
III	Y.Y.	26	P	21
	N.T.	29	S	24
	R.O.	25	S	40
	R.N.	29	P	61
	S.Ko.	26	S	14
			27.0±1.7*	32.0±16.8**
IV	Y.S.	30	P	35
	H.F.	24	P	24
	H.S.	28	S	90
	R.M.	33	P	84
	W.C.	36	S	38
	S.Ki.	31	S	53
			30.3±3.7*	54.0±24.9**

* n.s. ** n.s.

A F S 分類 III, IV 期例についての検討は, 子宮内膜症と不妊との関係の検索において意義のあることと考えられる。

対 象

Revised AFS (R-AFS) 分類 III, IV 期の子宮内膜症に対する治療後, 2 年を経過した挙児希望例 11 例 (III 期 5 例, IV 期 6 例) を対象としてその妊孕性を検討した。IV 期例は III 期例より高年齢で, 不妊期間も長い傾向が見られたが, 有意な差ではなかった (表 2)。

全例, 治療開始に先立って腹腔鏡による診断と R-AFS 分類による staging が行なわれた。全例に 16-22 週にわたるダナゾールが投与されたが, 9 例には手術も施行された。手術 (付属器切除, 癒着剥離, chocolate cyst 内容除去, または摘除) は 5 例がダナゾール投与前に, 2 例が投与の中間に, 他の 2 例では投与終了後に行なわれた。全例, 治療の終了後

に再度腹腔鏡により治療の効果が判定され, 必要に応じてダナゾール投与が追加された。

なお, 腹腔鏡を含めたルチーン不妊症検査において, 子宮内膜症以外に不妊の有力な要因の存在する例は除外した。

方 法

所見は R-AFS 分類によって採点した。IV 期例では全例に (Posterior cul-de-sac obliteration) があった。また, 左右付属器のスコアに極端な差を有する例が多いため, 付属器関連の項目 (Endometriosis/Ovary), (Adhesions/Ovary-Tube) のみを左右別を集計し, それぞれの「付属器スコア (adnex score)」としたうえで, スコアの少ない側を「良側」, 多い側を「不良側」とした。

前記の対象について, (1) 子宮内膜症の所見と治療後の妊孕性-妊孕性の予測因子の検討, (2) 治療様式と治療後の妊孕性, (3) 治療後の妊娠成立 (妊娠成立までの期間は BBT 上昇までとしたので, 仮定の最終月経はその約 2 週間前) とその経過, を検討した。

結 果

[1] 子宮内膜症の所見と治療後の妊孕性 (表 3, 表 4)

(a) 付属器スコアと妊孕性 (表 5, 表 6)

①治療前には妊娠群では III 期 ($p < 0.003$), IV 期 ($p < 0.05$) とともに左右差が存在したが, 非妊娠群では左右差はなく, 良側のスコアでも 32 以上であった。

②妊娠群における治療前の良側のスコアは, 非妊娠群のスコアより少なく ($P_1/nP_1: p < 0.003$) 8 以下であった。しかし不良側スコアと非妊娠群のスコアとの差はなかった (b_1' or P_1'/nP_1' : n.s.)。

③妊娠群における III, IV 期の良側スコアには治療前後とも差はなかった ($a_1/b_1, a_2/b_2$: n.s.)。

④妊娠群の良側スコアに治療前後の差はなかったが (P_1/P_2 : n.s.), 非妊娠群では改善が認められた ($nP_1/nP_2: p < 0.05$)。しかし, 治療後の非妊娠群のスコアと妊娠群の良側スコアとの間には依然として有意な差が存在した ($P_2/nP_2: p < 0.003$)。不良側のスコア

表3 Details of cases of endometriosis (R-AFS III・IV stage) having elapsed 2 years after the last treatment

Pre-treatment stage	Case	R-AFS scores (better side/worse side)					Adnex score	Therapy			Outcome	Elapsed time until BBT rise in pregnancy cycle : months (days)
		Endomet- riosis		Posterior cul-de-sac obliteration	Adhesions			Duration of Danazol (week)	sequence	Mode of operation		
		Peritoneum	Ovary		Ovary	Tube						
III	Y.Y.	6	0/4*	4	0/4	0/8	0/16	18			Delivery	8 (124)
	N.T.	2	0/20	0	0/4	0/4	0/28	17	←	Adnexectomy	Delivery	4 (28)
	R.O.	0	0/20*	4	4/4	4/1	8/25	26	←	Evacuation	Abortion	1 (166)
	R.N.	0	1/0*	4	0/8	0/8	1/16	20			Delivery	6 (69)
	S.K.	0	0/20*	0	0/0	4/0	4/20	21	→	Resection	Abortion	2 (100)
IV	Y.S.	—	0/0*	40	8/8	0/0	8/8	62	↔	Adhesiolysys × 2	Delivery	21
	H.F.	—	2/20*	40	0/4	0/4	2/28	24	←	Adnexectomy	Delivery	7
	H.S.	—	0/20*	40	0/16	0/16	0/56	16	←	Adnexectomy	Abortion	2 (55)
	R.M.	—	0/20*	40	16/4	16/8	32/44	24	←	Adnexectomy	Sterility	—
	K.C.	—	16/16*	40	4/16	16/16	36/36	28	↔	adhesiolysis	Sterility	—
	S.K.	—	0/0	40	16/	16/16	32/32	16	→	Adhesiolysis	Sterility	—

* chocolate cyst (> 1 cm)

表4 Post-treatment R-AFS scores and outcome

Pre-treatment stage	Case	Post-treatment R-AFS scores (better side/worse side)						Adnex score	Post-treatment tubal patency	Outcome
		Endometriosis		Posterior ul-de-sac obliteration	Adhesions		Stage			
		Peritoneum	Ovary		Ovary	Tube				
III	Y.Y.	1	0/0	0	0/0	0/0	I	0/0	+/+	Delivery
	N.T.	1	0/0	0	0/0	0/0	I	0/0	+/-	Delivery
	R.O.	1	0/0	0	0/4	4/0	II	4/4	+/+	Abortion
	R.N.	0	0/0	0	0/4	0/4	II	0/8	+/+	Abortion
	S.K.	0	0/0	0	0/0	4/0	II	4/0	+/+	Abortion
IV	Y.S.	—	0/0	40	8/8	0/0	IV	8/8	+/+	Delivery
	H.F.	2	0/0	0	0/0	0/0	I	0/0	+/-	Delivery
	H.S.	—	0/0	40	0/16	0/16	IV	0/32	+/-	Abortion
	R.M.	—	0/0	40	8/8	8/8	IV	16/16	+/-	Sterility
	K.C.	—	4/4	4	4/4	16/16	IV	24/24	+/-	Sterility
	S.K.	—	0/0	40	16/16	16/16	IV	32/32	+/+	Sterility

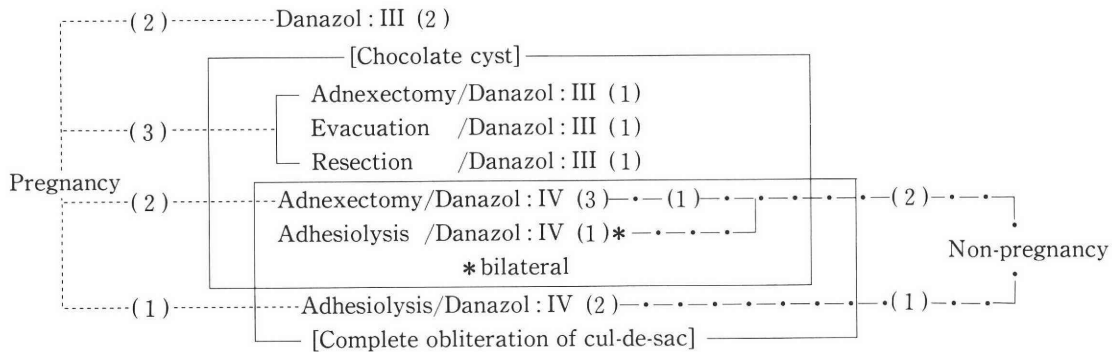
表 5 Side to side comparison of adnex scores before onset of therapy (better side/worse side)

Stage	Pregnancy (n = 8)		Non-pregnancy (n = 3)	
	a ₁	a ₁ '		
III	2.6±3.2/21.0±4.8			
	p < 0.003			
	(n = 5)			
	b ₁	b ₁ '	nP ₁	nP ₁ '
IV	3.3±3.4/30.7±19.4		33.3±1.9/37.3±5.0	
	p < 0.05		n.s.	
	(n = 3)		(n = 3)	
	P ₁	P ₁ '	nP ₁	nP ₁ '
	2.9±3.2/24.6±13.5		33.3±1.9/37.3±5.0	
	p < 0.003		n.s.	
	(n = 8)		(n = 3)	
[Significance] a ₁ /b ₁ : n.s. P ₁ /nP ₁ : 0.003				
b ₁ ' or P ₁ '/nP ₁ or nP ₁ ' : n.s.				

表 6 Side to side comparison of adnex scores after treatment (better side/worse side)

Stage	Pregnancy (n = 8)		Non-pregnancy (n = 3)	
	a ₂	a ₂ '		
III	1.6±3.2/2.4±3.2			
	n.s.			
	(n = 5)			
	b ₂	b ₂ '	nP ₂	nP ₂ '
IV	2.7±3.8/13.3±13.6		24.0±6.5/24.0±6.5	
	n.s.		n.s.	
	(n = 3)		(n = 3)	
	P ₂	P ₂ '	nP ₂	nP ₂ '
	2.0±2.8/6.5±10.3		24.0±6.5/24.0±6.5	
	n.s.		n.s.	
	(n = 8)		(n = 3)	
[Significance]	P ₁ /P ₂ : n.s.		P ₁ '/P ₂ ' : 0.003	
	P ₂ /nP ₂ : 0.003			
	nP ₁ /nP ₂ : 0.05		nP ₁ '/nP ₂ ' : 0.01	

表 7 Combination of therapy and outcome



は両群とも改善を示した(P₁'/P₂': p<0.003, nP₁'/nP₂': p<0.01).

(b) ダグラス窩所見と妊孕性

IV期の全例が治療前にダグラス窩の完全閉塞を有していた。また治療後においても、妊娠、非妊娠群間にダグラス窩所見の差はなかった。

(c) 片側卵管の治療による損失と妊孕性

治療前はIV期の1例を除く全てに両側の卵管の通過性が認められたが、治療後にはIII期5例中1例、IV期6例中4例の片側卵管通過性は失われていた。その後、両側卵管通過例6例中5例(III期4例中4例、IV期2例中1例)、片側卵管通過例5例中3例(III期1例中1例、IV期4例中2例)に妊娠が成立した(n.s.)

[2]治療様式と治療後の妊孕性および所見の改善(表

7)

(a) 治療様式と妊孕性

[chocolate cyst(-)
complete cul-de-sac obliteration(-)]

III期の2例が該当し、いずれも良側の附属器スコアは軽微(0.1)であった。2例ともダナゾールのみの治療後8カ月、2カ月(69日)後のBBT上昇をもって妊娠した。

[chocolate cyst(+)
complete cul-de-sac obliteration(-)]

III期の3例が該当した。chocolate cystはいずれも片側性であり、対側のスコアは0・4・8であった。それぞれに附属器切除、chocolate cyst内容除去、同切除が行なわれ、いずれも治療後4カ月(116日)、1カ月(28日)、3カ月(100日)で妊娠した。

[chocolate cyst(-)
complete cul-de-sac obliteration(+)]

IV期の2例が該当した。左右付属器スコアは8/8・32/32と左右差はなく、いずれも癒着剥離術を受け、8/8の例は治療後21カ月目に妊娠したが、他の1例は不妊を持続している。

[chocolate cyst(+)
complete cul-de-sac obliteration(+)]

IV期の4例が該当した。片側のchocolate cystを合併した3例はいずれも付属器切除術を受けた。うち2例では良側の付属器スコアは軽微(2.0)であり、それぞれ7カ月、2カ月(55日)後に妊娠し、他の1例は良側のスコアも32であり、不妊を継続している。両側のchocolate cystを合併した1例では癒着剥離術後、ダグラス窩の閉塞は部分剥離に転じたが、付属器スコアに著しい改善はなく(24/24)不妊のままである。

[3] 治療後の期間と妊娠経過。

- (a) 妊娠例における妊娠成立までの期間は1~21ヶ月であったが、9例中8例(89%)の妊娠は8ヶ月以内に成立した。
- (b) 治療後3ヶ月以内の妊娠(100日以内の基礎体温上昇)4例はすべて流産した。また流産4例中1例は4ヶ月後に再妊娠し分娩に至ったが、3例ではその後再び24ヶ月以上の不妊が継続している。
- (c) 分娩例5例の妊娠までの期間はすべて4(118日目基礎体温上昇)~21ヶ月の間であり、逆に治療後4ヶ月から2年の間に成立した妊娠5例は全て分娩に至った。

考 察

子宮内膜症における両側付属器の所見は必ずしも同時進行ではないが、現在用いられている進行期分類では左右別に評価する分類はない。R-AFS分類でも採点の段階では左右別に評価するが、stagingのための集計操作によりその特性は失われ、さらにstagingが加算法であるため、不良側の所見に基づく進行期に組み入れられる傾向にあり、それが進行期分類と妊孕性の予後の関連を希薄にする一因と考えられる。そこで当報告ではR-AFS分類の付属器関連項目のスコアのみを用いて左右別付属器スコアを作成し、そのうえで妊孕性との関連を検討した。その結果、妊娠成立の予後と関連を有するのは進行期ではなく良側付属器の所見であり、かつ良側のスコアには治療による変化が認められなかったことから、治療開始前の良側の付属器の状態が治療後の妊孕性と関連を有する、との結果を得た。そして以上の左右の所見

差をもたらしながら、かつ全体としての進行期をIII、IV期に押しあげている主な原因は、当報告例に関する限りでは、片側のchocolate cystの存在とそれに起因する付属器周囲癒着であると考えられた。

一方、IV期例ではダグラス窩の閉塞も特徴的な所見であった。しかし、少なくとも当報告に関する限り、ダグラス窩の所見は治療後2年間の妊娠成立との間に関連を認めるに至らなかった。

治療手段として、手術的に不良側の子宮内膜症組織を縮小、あるいは除去できた6例中5例は妊娠に成功しているが、癒着剥離のみの3例では1例が21カ月目に妊娠しただけの、低い妊孕性に留まっている。しかも妊孕性の予後を左右すると思われる良側の付属器スコアが、治療前後で差を示さないことから、治療の意義は手術的、薬物的手段による不良側の子宮内膜症組織のvolume reductionにあり、その結果の子宮内症組織からのプロスタグランジン、マクロファージの産生減少などが、良側付属器の機能(黄体機能、卵管内輸送機能)や、精子機能へ好影響を与えられられる。なお非妊娠群においても両側の改善効果が見られるが、妊娠群の治療後の両側スコアとの差はいずれも有意であり、治療後も非妊娠群では妊娠可能な程度への回復が得られなかったためと考えられる。

子宮内膜症を保存的に治療した場合、その再発は殆ど6ヶ月以内に始まるが⁶⁾、ダナゾール中止後の排卵の回復は早く、1カ月前後ではほぼ100%の排卵が見られることから、一般的に治療終了後なるべく速やかな妊娠が勧められている。一方、子宮内膜症と自然流産の相関については、平野ら⁷⁾は自験例および文献的考察から否定的結論を出しているが、妊娠成立の時期との関連については言及していない。しかし福島らは⁸⁾、ダナゾールは通常の400mg/日投与ではantigonadotropicな作用よりも、むしろ局所作用が強く、8週以上の投与では全例子宮内膜の著明な萎縮性変化をもたらしたと報告しており、排卵の早期再開と内膜の回復遅延のギャップによる着床不全が、治療後早期に成立した妊娠を流産せしめる可能性は否定できない。さらにダナゾールにより排卵過程を停止された、老化した排卵予定期による受精も流産の一因となり得ると考えられる⁹⁾。当報告でも、治療後3カ月(100日)以内のBBT上昇をもって妊娠した4例全ては、胎児像、胎児心拍を認め得ない時期に流産したが、上記の諸理由による流産であった可能性も否定できない。また、流産3例はその後再び長期の不妊を継続しているが、これは当報告の症例がいずれもIII、IV期の進行例であることから、

子宮内膜症の早期の再活動によるものと考えられる。以上から、子宮内膜症治療後は再発の可能性の面からは出来るだけ早期に妊娠を試みるべきであるが、治療後最初の妊娠成立の時期については、さらに検討の余地が残されていると考えられた。

おわりに

これまでの種々の子宮内膜症に関する分類が考案、発表されており、R-AFS 分類も含めてそれらは子宮内膜症の病巣の内診、あるいは視覚上の severity を示してはいるが、全体として算出されたスコアと妊孕性との関連はさほど緊密なものではない、今回私達は R-AFS 分類Ⅲ、Ⅳ期例の検討から、治療前の「より良側」の付属器の所見が妊孕性の予後と関連を有するとの結果を得た。また、「より不良側」の付属器に対しては volume reductive な処置とダナゾールの併用がその後の妊孕性の改善に寄与し、さらにダナゾール治療を行った場合は、終了後 3 カ月を過ぎてから成立した妊娠の経過が良好であるとの結論を得た。

文 献

- 1) 伊藤 潔, 田村みどり, 古橋信之, 渡辺英子, 星合 晃, 平野睦男, 矢嶋 聡: 子宮内膜症における妊娠率及び流産率について. エンドメトリオーシス研究会誌, 9: 180, 1988
- 2) Rantara, M. L., Kahanpaa, K. V., Koskimies, A. I. and Widholm, O.: Fertility prognosis after surgical treatment of pelvic endometriosis. Acta obst. Gynec. Scand., 62: 11, 1983
- 3) Guzick, D. S., Bross, D. S., and Rock J. A.: Assessing the efficacy of the American Fertility Society's classification of endometriosis: Application of a dose-response methodology. Fertil. Steril. 38: 171, 1982
- 4) 永田行博, 中村元一, 楠田雅彦: 子宮内膜症の臨床進行期分類に関する検討. 日産婦誌, 34: 1496, 1982
- 5) 中谷一夫, 星合 晃: 子宮内膜症における私案を含めた各進行期分類と、その後の妊娠成立との関連性の検討. 日産婦誌, 39: 940, 1987
- 6) 永田行博, 中村元一, 楠田雅彦: 子宮内膜症に対する DANAZOL の効果と副作用. 日不妊誌, 26: 169, 1981
- 7) 平野睦男, 古橋信之: 期子宮内症と妊娠. 産婦治,

55: 520, 1987

- 8) 福島峰子, 太田博孝, 児玉英也: Danazol 療法と LH-RH analog 療法後のヒステロスコピー所見の比較. エンドメトリオーシス研究会誌, 8: 129, 1987
- 9) 増田恵一, 増田芳松, 蔵本博行, 下田隆夫, 新井正夫: 子宮内膜症に対する Danazol 療法. エンドメトリオーシス研究会誌, 7: 121, 1986

Study on fertilizability in R-AFS III and IV endometriosis at 2 years after completion of therapy (Value of side-to-side separate evaluation of adnexae)

Kazuo Nakatani and Yoshitaka Kimura

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kamaishi City Hospital,
Iwate 026, Japan

Hiroshi Hoshiai

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

The fertilizability of R-AFS 3 and 4 endometriosis was evaluated on 11 cases desiring to bear children when 2 years elapsed after completion of therapy. Subsequent to preliminary staging by laparoscopy, Danazol was given to all cases accompanied with some surgery if necessary. (1) All of 5 cases in 3 stage, and 3 of 6 cases in 4 stage, succeeded in achieving conception. (2) In pregnancy group, discrepancy was noted between the degree of bilateral adnexal pathology, and the condition of less-involved side by preliminary staging, well predicted the future fertilizability following the therapy. (3) The principal finding of more-involved side was chocolate cyst, and surgery followed by danazol increased the chance of pregnancy. (4) The occurrence of pregnancy was significantly frequent within 8 months, but the prognosis was preferable when pregnancy took place 4 months or later after treatment.

(受付: 1988 年 8 月 2 日)

Danazol による子宮筋腫の治療 —細胞培養法による *in-vitro* の基礎実験—

Treatment of Uterine Leiomyoma with Danazol —Basal *in Vitro* Experiment by Cell Culture—

産業医科大学婦人科 (主任: 岡村 靖教授)

大塚 治 夫 草 野 秀 一 吉 田 耕 治
Haruo OTSUKA Shuichi KUSANO Kohji YOSIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health,
Fukuoka 807, Japan
(Director: Prof. Y. Okamura)

担子宮筋腫患者 8 名の摘出子宮を用いて子宮筋腫由来培養細胞に対する danazol の影響を症例毎に観察した。

danazol 濃度 10^{-5} mol/l では 8 例共, 10^{-6} mol/l では 8 例中 6 例, 10^{-7} mol/l では 8 例中 4 例, 10^{-8} mol/l では 8 例中 2 例, 10^{-9} mol/l では 8 例中 1 例が有意に細胞増殖抑制が存在した。全体としては, 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/l において細胞増殖抑制の傾向があったが, 10^{-5} mol/l のみ有意細胞増殖抑制が存在した。

個々の年齢, 月経周期, 血中 estradiol- 17β (E_2) 値, 筋腫の場所, 大きさと, 筋腫由来培養細胞に対する danazol の増殖抑制との関係では特徴的なものを見出し得なかった。

以上より, *in-vitro* では, dose-dependent に細胞増殖抑制効果が存在し, *in-vitro* での子宮筋腫に対する danazol の増殖抑制は, 高濃度の danazol の必要性を示唆した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 308-311, 1989)

緒 言

子宮筋腫は, 婦人科腫瘍中最も一般的な腫瘍である。一般に治療は, 子宮摘出あるいは筋腫核出術といった外科的処置が行われ, 非観血的治療は確立されていない。しかし, 子宮筋腫は良性腫瘍であり, 内科的治療の可能性を今後探究されるべきと思われる。

子宮筋腫は臨床的に, エストロゲン依存性腫瘍と言われてきている。danazol は 17α -ethnyltestosterone の誘導体であり, 天然の活性ステロイドのうちで最も近いのは, テストステロンである。本剤はゴナドトロピン分泌を抑制しその結果卵巣からのエストロゲン分泌を低下させ, アンドロゲン作用も存

在する¹⁾。したがって子宮筋腫に対する薬物療法で本剤を使用することは理にかなっている。

今回, 我々は内科的治療を探究すべく, 子宮筋腫由来培養細胞を用いて, *in vitro* で danazol の影響を観察したのでここに報告する。

対象と方法

1. 対象

1) 実験材料

産業医大産婦人科で子宮筋腫と診断され, 単純子宮全摘術を施行された 37 歳~46 歳にいたる日本婦人 8 例の摘出子宮より得られた。これらの患者は正常な月経周期を有し, 手術前には何らステロイドを投与されていなかった。子宮筋腫の最終診断は組織学

的に確認した。表1にその内訳を掲げた。

2. 研究方法

1) 子宮筋腫由来細胞の培養

一般に行われている分散培養法による単層培養であり、その培養の実際は、すでに報告した^{2,3,4)}。簡単に要約すると、筋腫組織を細切し、トリプシンとコラゲナーゼで1時間消化処理した浮遊細胞を、低面積 25cm² の tissue culture flask (Corning Glass Works, Corning, N.Y., U.S.A.) にて培養したものである。培養気相は、5% CO₂, 95% air, 37°C 下で、培養液に McCoy 5 A 液+10%牛胎児血清を用い、週2回の交換をした。

2) 観察方法

培養細胞は位相差顕微鏡による観察と共にコロニーは、10%中性ホルマリン固定後、クリスタルバイオレット染色による肉眼のおよび光顕の観察を行った。

3) 酵素抗体染色によるデスミン染色

培養細胞が子宮筋腫由来培養細胞であることの証明の一手段として、筋腫組織および培養細胞のデスミン染色をした。詳細はすでに報告^{2,5)}している。簡単に要約すると、アルコール固定した組織および培養細胞を peroxidase-anti-peroxidase 法により、モノクローナル抗体としてのデスミンを用いて染色した。

3) 子宮筋腫由来培養細胞に対する danazol の影響

子宮筋腫由来細胞の初代培養細胞が confluent になった時、継代し、継代2代目を用い0.25%トリプシン液を作用させ、浮遊細胞にした1×10⁵/mlになる様に培養液で希釈調整した。Falconの24-multiwell tissue culture plate (Becton Dickinson)を用い、各々のwellに希釈浮遊細胞液0.1mlずつを植え込んだ。培地は、10%牛胎児血清加 McCoy 5 A 培地とし、継代24時間後に danazol (Tokyo Tanabe Co., Tokyo, Japan) を10⁻⁵~10⁻⁹mol/lになる様に各々調製して培地に混入した。培養液、danazolは週2回交換し、各々tripletにて観察した。7日後、confluent 近くになった時、実験を中止し、0.25%トリプシン液を作用させて浮遊細胞にし、細胞数を測定した。細胞数の測定は、自動血球計算機⁶⁾ (CC-108, Tokyo, Japan)を用いた。尚、danazolを溶解する際、PBSにエタノールを加えたが、細胞増殖に対するエタノール濃度との関係では、0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0%と影響を観察したところ、1.0%より細胞増殖の抑制が出てきた(図1)。10⁻⁵mol/lのdanazolを溶解する際、0.3%エタノールで可能であったため、すべてエタノール濃度は、0.3%にした。controlの

表1 子宮筋腫由来細胞培養の内訳

Patient	Age	Day	E ₂ 濃度(pg/ml)	筋腫の場所	筋腫の直径(cm)
1	37	10	30	漿膜下	5.5
2	42	17	60	筋層内	6.0
3	43	12	50	筋層内	10.2
4	40	13	45	漿膜下	7.0
5	41	15	60	筋層内	8.0
6	46	20	70	筋層内	5.0
7	39	27	62	漿膜下	6.5
8	42	20	72	筋層内	8.0

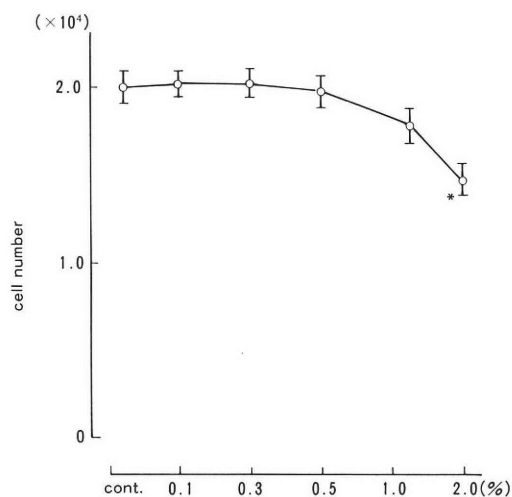


図1 子宮筋腫由来培養細胞に対する ethanol の影響 (n=3, mean±SE, * = p<0.05)

とり方としては、エタノールをPBSに溶かし、調製してエタノール濃度0.3%にしたものを培地に混入して用いた。

研究成績

○子宮筋腫由来培養細胞に対する danazol の影響

図2は、症例1~8の各々、及びトータルの danazol の影響を示したものである。症例1~5は、同じ様な danazol の影響を示し、danazolの濃度10⁻⁵mol/lに主として強い細胞増殖の抑制がみられた。また、症例6~8は、danazolの濃度が増すにつれ、細胞増殖の抑制傾向を示した。これらをトータルすると、濃度が増すにつれ、細胞増殖抑制傾向がみられるが、有意差は存在しなかった。只、10⁻⁵mol/lのみP<0.01の有意差をもって細胞増殖抑制効果がみられた。表1と見比べると、年齢、月経周期、estradiol-17β(E₂)濃度、筋腫の場所及び多さに関し、特徴的な傾向を見いだせなかった。

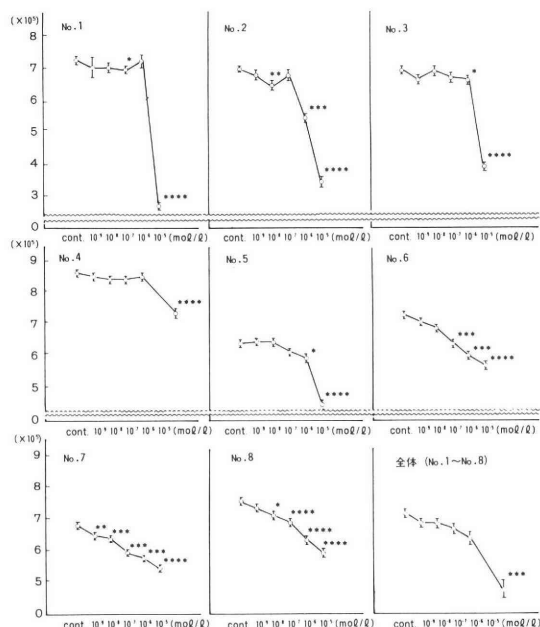


図2 子宮筋腫由来培養細胞に対する danazol の影響 (=8). means±S.D. (症例 1~8), means±S.E. (全体) * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.02$, *** = $P < 0.01$, **** = $P < 0.001$.

考 察

子宮筋腫に対する薬物療法に対して一定の見解はない。子宮筋腫がエストロゲン依存性腫瘍と考えられている為、直接または間接的に低エストロゲン状態をつくり、筋腫の縮小効果があったとする報告が散見される^{7,8,9)}。danazol は、中枢に作用し、低エストロゲン状態をつくりだすのが主たる薬理であり、他に弱い黄体ホルモン作用¹⁰⁾やアンドロゲン作用¹¹⁾をもつとされている。この為、子宮筋腫に対して danazol を投与する事は合目的である。しかし、実地臨床上の効果は一定していない^{7,11)}。今回、*in-vivo* 上での効果を推測する為、*in-vitro* で種々の danazol 濃度のもを添加して、筋腫由来培養細胞の増殖を観察した。結果は 10^{-8} mol/L 添加時のみ、すべての症例において有意に細胞増殖抑制が存在した。ここで、*in-vivo* 上、danazol 200~400 mg/day における血中 danazol 濃度は 10^{-7} mol/L 程度であり^{12,13)}、この濃度における、*in-vitro* での増殖抑制効果を観察すると、症例 1, 6, 7, 8 の 8 例中 4 例が有意に細胞増殖抑制がみられたものの、トータルとしては有意差は存在しなかった。 10^{-6} mol/L になると、症例が 2, 3, 5, 6, 7, 8 の 8 例中 6 例において有意に細胞増殖抑制が存在したが、トータルでは有意差が存在しなかった。 10^{-8} mol/L 以下ではほとんど抑制効果を示さなかった。従

って今回の結論として、濃度が増すにつれ、抑制効果があらわれ、 10^{-7} , 10^{-6} mol/L での、効果にバラツキが存在したのは、年令、月経周期、E₂ 濃度、筋腫の場所大きさのいずれに対しても、症例が少ない事も関係するが特徴的なものを見出し得ず、danazol に対する筋腫細胞の感受性なのか、現在の所言及できない。また、*in-vitro* の結果を *in-vivo* におきかえる際には、あくまでも慎重でなければならない。なぜなら、今回の培養では、1) cell-to-cell contact が失われた状態であり、正常組織構造ではない。2) 培養細胞は insulin や cortisol の様な growth factor および他の Hormone 作用が *in-vivo* とは違った影響をするかもしれない。3) 今回の実験は、danazol の直接作用をみている。4) 数種の構成細胞からなる培養細胞は、そのうちの一部分が目的とする薬剤や Hormone に影響をうけるにすぎないからである¹⁴⁾。著者自身、手術を希望しない担子宮筋腫患者に対し、danazol 400~600 mg/day 13 週以上服用してもらい、内診を超音波診断法をもって、効果の判定をした所、縮小 2 例、不変 4 例、増大 2 例の報告をした¹⁵⁾。この報告他の文献及び今回の *in-vitro* との結果を加味して結論すると、1) 筋腫の縮小または増大を阻止できる症例は存在するが、効果を期待できる筋腫の示標はない、2) 時に danazol により出血が増加する(特に粘膜下筋腫) 場合があるので、その時は投与の中止をする、3) 症状のつよいものは、外科的処置が優先されるべきであるが、挙児希望、手術を希望しないもの、閉経間期の患者に対しては、現在の所、筋腫に対して有効な薬物が存在しない為、投与される合目的薬剤である、4) 投与量は、できれば高濃度の血中 danazol を必要とするため 400~600 mg/day あるいは症例により 800 mg/day 投与する必要がある、12 週間投与して、その効果をみて、継続をきめるのがよいのではないかと考えている。

子宮筋腫は良性腫瘍である。この事は子宮と共存できるという事を意味している。手術をしないで、子宮筋腫と共存できればこれ以上の喜びは、担子宮筋腫患者にとってはないと思われる。今後さらに検討を加えてゆきたい。

文 献

- 1) Chamness, G. C., Asch, R. H. and Pauerstein, C. J.: Danazol binding and translocation of steroid receptors. Am. J. Obstet. Gynecol., 136: 426, 1980
- 2) 大塚治夫, 吉田耕治, 草野秀一, 岡村 靖: 子宮筋腫由来細胞の初代培養の確立. 日産婦誌, 39: 271, 1987

- 3) 大塚治夫, 吉田耕治, 岡村 靖: 子宮腺筋症由来細胞の培養—子宮膜および子宮筋層由来培養細胞との比較—, 日不妊誌, 32: 602, 1987
- 4) Otsuka, H., Yoshida, K., Kusano, S. and Okamura, Y.: Primary Culture of cells derived from human myometrium: Both myometrium and cultured cells stained with desmin by the enzyme-labeled antibody method. Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol. 13: 121, 1987
- 5) 大塚治夫, 吉田耕治, 草野秀一, 柏村正道, 岡村靖: 子宮筋腫, 子宮筋腫由来培養細胞の酵素抗体染色—desmin, vimentin, fibronectin をつかって—, 日産婦誌, 39: 746, 1978
- 6) 野沢志郎, 多田和代: 自動白血球装置 (CC-108) による培養細胞の測定に関する基礎的検討 (第 1 報). Sysmex J., 2: 46, 1983
- 7) Decherney, A. H.: medical treatment for myoma uteri. Fertil. Steril., 39: 429, 1983
- 8) Coutinho, E. M.: Conservative treatment of uterine leiomyoma with the antiestrogen anti-progesterone R-2323. Int. J. Gynecol. Obstet. 19: 357, 1981
- 9) Healy, D. L. and Frassr, H. M.: Shrinkage of a uterine fibroid after subcutaneous infusion of a LH-RH agonist. Brit. med. J., 289: 1267, 1984
- 10) Wentz, A. C., Jones, G. S., Sapp, K. C. and king, T. M.: Progestational activity of danazol in the femal subject. Am. J. Obotet. Gynecol. 126: 378, 1976
- 11) Yuen, B. H.: Danazol and uterine leiomyoma, 124: 963, 1981
- 12) 岡田弘二: ダナゾールの化学と薬理作用, 杉本修二編, 子宮内膜症—その診断と治療—, 47, 医薬ジャーナル, 東京, 1983
- 13) Davidson, C. Banks. W, and Fritz, A.: The absorption, distribution and metabolic rate of danazol in rats, monkeys and human Volunteers. Arch. Int. Pharmacodyn. 221: 294, 1976
- 14) Chen, L., Linder, H. R. and Lancet, M.: Mitogenic action of oestradiol-17 β on human myometrial and endometrial cells in long-term tissue cultures. J. Endocr. 59: 87, 1973
- 15) 大塚治夫, 中村元一: 子宮筋腫へのボンゾール投

与について—レセプターに対する検討—, 第 2 回九州エンドメトリオーシス研究会抄録集, 福岡, 1985

Treatment of uterine leiomyoma with danazol —Basal *in vitro* experiment by cell culture—

Haruo Otsuka, Shuichi Kusano,
Kohji Yoshida and Yasushi Okamura

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine,
University of Occupational and
Environmental Health,
Fukuoka 807, Japan

The effects of danazol on cultured cells derived from uterine leiomyoma were studied for each of 8 patients with uterine leiomyoma by using their resected uteruses.

The cell growth was significantly suppressed in all 8 patients by danazol at a concentration of 10^{-5} mol/l, in 6 at 10^{-6} mol/l, in 4 at 10^{-7} mol/l, in 2 at 10^{-8} mol/l and in 1 at 10^{-9} mol/l. In general, the cultured cells showed a tendency toward suppressed growth at 10^{-9} to 10^{-6} mol/l, but significant suppression of the cell growth was observed at 10^{-5} mol/l.

Investigation of the relationships between the individual age, menstrual cycle, blood estradiol-17 β level and site/size of the myoma and the inhibitory effect of danazol on the myoma-derived culture cells provided no characteristic findings.

Thus, the *in-vitro* experiment revealed an inhibitory effect of the drug on the cell growth, which was dose dependent, suggesting that danazol at high concentration is required for the drug to exert an inhibitory effect on uterine leiomyoma *in vivo*.

(受付: 1988 年 9 月 19 日)

不妊症患者における子宮腔部びらんに対する CO₂レーザー蒸散法の効果について

Study on the Treatment of Vaporization for Uterine Cervical Erosion by CO₂ Laser in Infertile Women

島根医科大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 北尾 学)

草刈 万寿夫 高橋 健太郎 吉野 和男
Masuo KUSAKARI Kentaro TAKAHASHI Kazuo YOSHINO
北尾 学
Manabu KITAO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University, Shimane 693, Japan
(Director: Prof. M. Kitao)

帯下の増加や子宮腔部びらの慢性炎症を呈する不妊症例で他に不妊原因の認められない6症例についてCO₂レーザーによる腔部びらの蒸散を行った。全例が5週から8週の間で正常なピランとなり帯下の減少が認められた。4症例(66.7%)が治療後1周期目から7周期めまでに妊娠が成立した。CO₂レーザーによる腔部びらの蒸散は、びらんが不妊の原因と考えられる症例においても有効であると思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 312-315, 1989)

緒 言

子宮腔部びらん(びらん)は性成熟期の女性においては普通に観察されるものであり、これ自体は異常とは言えない。しかし、びらん面より多量で粘稠な分泌物が認められる場合、患者は帯下の増加による不快感を覚える事が多い。また、分泌物の増加は認めないものの常に炎症所見が認められる易出血性のびらんでしょうばしばしば経験する事がある。帯下の増加や炎症が細菌などの感染を伴う場合には、原疾患の治療を行う事を第1義とするが、感染の認められない場合でも前述の症状を呈する症例は腔洗浄や抗炎症剤の投与を行うが、難治の場合には電気凝固法、高周波凝固法、凍結療法あるいは手術によりピラン面の縮小を行わねばならない。

最近、レーザー光線の医療への応用が進むとともに、びらの蒸散法にも使用されるようになってきた^{1,2)}。一方びらんが帯下の増加や慢性の炎症などを

伴って不妊の原因となっている場合もあり、この治療には現在抗炎症剤の投与、灼熱法、冷凍療法及び配偶者間人工受精(AIH)が行われているが、このような症例に対してもレーザー光線によるびらの蒸散が有効ではないかと推察された。

そこで、他に原因がなく子宮腔部びらんが不妊原因と考えられた6症例にCO₂レーザー光線によるびらの蒸散を行ったところ6例中4例に妊娠の成立を認めたので若干の文献的考察を加えて報告する。

研究対象

島根医科大学医学部産科婦人科不妊・内分泌外来を受診し、不妊症に関するルーチンの検査によりびらん面の異常を除いて他に異常を認めない者のうち6例を対象とした。これらの対象症例はいずれも、月経周期に関係なく常にびらん面が粘稠な不透明な粘液で被われて、炎症像を呈しており、これらの異常が不妊原因ではないかと推察された。各症例は表

表 1 症 例

症 例	初診時年齢(歳)	不 妊 期 間(月)	妊娠歴	CO ₂ レーザー蒸散以前にピランに対して行った治療
1	33	28	P.0 G.0	抗炎症剤, 腔洗浄
2	28	24	P.1 G.1	抗炎症剤
3	29	34	P.0 G.0	な し
4	31	12	P.0 G.0	な し
5	28	54	P.0 G.0	な し
6	35	38	P.0 G.0	抗炎症剤, 凍結療法
Mean±S.D.	30.7±2.6	33.2±13.7	———	———

表 2 治 療 成 績

症 例	治療に要した週数	妊娠までの周期数
1	6	3
2	8	1
3	5	7
4	6	2
5	8	———
6	7	———
Mean±S.D.	6.7±1.1	3.3±2.3(n=4)

1 に示すように初診時平均年齢は 30.7 歳, 平均不妊期間は 33.2 カ月で, 6 例中 3 例は今回の CO₂ レーザーによるびらの蒸散の前に抗炎症剤の投与, 腔洗浄, 冷凍療法などを受けていた。

治療方法

まず, 腔部擦過細胞診及びコルポ診にて悪性病変を否定し, 基礎体温の低温期に CO₂ レーザー光線によりびらの蒸散を行った。使用したレーザーメスは Medilaser Mic Model MEL 445C (持田製薬) で, 出力は 20W に設定し defocused beam にて 3mm から 5mm の陥凹が生じるまでびらん面全体の蒸散を行った。蒸散の翌日に出血の有無を確認し, 以後 1 週毎にコルポ診にて検査し, ピラン面の縮小と粘液量の減少が明らかに認められ, 炎症所見が消失するまでを治療に要した週数とした。1 度の蒸散により治療しなかった例については再度蒸散を行った。

結 果

6 例中 5 例が 1 度の蒸散で治療したが, 1 例については 2 度の蒸散を必要とした。表 2 に示すように治療までに要した週数は 5 週から 8 週までで平均すると約 7 週であった。そして 6 例中 4 例に妊娠が成立した。術後から妊娠成立までの周期数は 1 周期から 7 周期までで, 平均 3.3 周期であった。

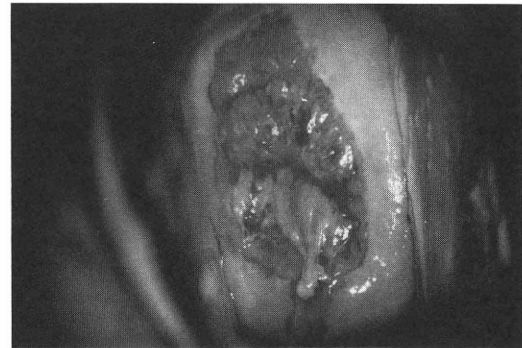


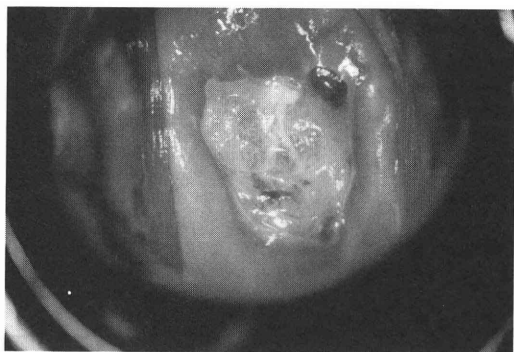
図 1 CO₂ レーザー治療前



図 2 CO₂ レーザー治療後 2 週目

症 例

次に 1 症例の CO₂ レーザーによる蒸散前後の経過を示す。症例は 33 歳, 主婦, 原発性不妊, 不妊期間 28 カ月, 初診時より多量の帯下とびらん面の炎症所見が認められたが, その他に異常が認められなかった。腔洗浄, 抗炎症剤の投与を行ったが, 難治で, 再発を繰り返した。そこで, CO₂ レーザーによるびらの蒸散を行った。図 1 に示すように, CO₂ レーザーによる蒸散前のびらん面は炎症所見が認められ易出血性である。図 2 は蒸散後 2 週目で一部に炭化した組織の遺残が認められ, 蒸散術のためによる炎症も消失しておらず, ごく軽度の出血が認められた。図

図3 CO₂レーザー治療後4週目図4 CO₂レーザー治療後6週目

3は蒸散後4週目で炭化組織は完全に消失しているが、S-C junctionの外側に炎症像が認められる。図4は蒸散後6週目で炎症像も完全に消失し、びらん面もさらに縮小している。またびらん面を被う粘液も透明で量も減少している。この時点で治癒と判定した。以後もびらはん面の炎症や病的分泌物は認められず、患者の自覚症状も消失し、蒸散後3周期目に妊娠が成立した。

考 察

子宮腔部びらん、それ自体は病的なものではなく、性成熟期の正常女性においてはしばしば観察されるものである。しかし、時としてびらん面より多量な分泌物による帯下の増加や広範で易出血性なびらんが原因である接触性出血のために婦人科を受診する患者もある。この様な場合、慢性炎症の所見を認める事はあっても細菌や真菌などの感染を証明できないものや、炎症の所見すら認められないものもある。したがって治療としては抗炎症剤の腔内投与、腔洗浄、電気焼灼や凍結療法を行う事が多いようである。しばしば難治である事が経験される。最近ではCO₂レーザーを用いてびらん面を蒸散する方法も用いられるようになり好成績を挙げている^{1,2,3)}。一方、帯下や接触性出血という問題の他にびらんが不妊の原因となっている事が推察される。びらんそのものと不妊の関与について言及している報告は少ないが、Davajan & Nakamura⁴⁾は、粘稠で細胞成分の多い頸管粘液を分泌するものが不妊症例で多く認められ、この原因はlow-lying columnar epitheliumであることを指摘している。また、西田らは⁵⁾、びらんが不妊原因と考えられる症例に対して凍結療法を試み、高い妊娠率を経験している。また、治療対象例には頸管因子不全が高頻度に認められたが、凍結療法後に頸管因子が改善しなくても高い妊娠率となったのは、この様な症例では頸管因子よりも、びらん面を

覆う分泌物の方が不妊原因として重要であると述べている。今回の症例でもHühner testの結果がCO₂レーザーによる蒸散の前後で変化しないにもかかわらず妊娠した症例があり、頸管因子よりもびらん面の異常の方がより大きく影響しているのではないかと推察される。

今回、CO₂レーザーによるびらんの蒸散を行い、平均7週で治療効果を認め、6例中4例に妊娠が成立した。また治療による重篤な合併症は皆無で、治療中に軽度の灼熱感を感じたものが2例あったのみであり、症例5については、びらん面が腔部全体を被いS-C junctionが不可視なほど広範であったため1度目の蒸散では治癒できなかったが、2度目には成功している。また、西田⁵⁾らは子宮腔部表面に血管が浮き出て易出血性な例においては凍結療法は効果的ではなかったと述べているが、CO₂レーザーではこの様な例に対しても十分に効果的であった。

今回、びらん面の異常が不妊の原因と思われた症例に対して、びらん面の縮小、異常な粘液の産生低下を画ってCO₂レーザーによるびらんの蒸散法を試み、その有要性が確認できた。しかし、びらん及び分泌物が不妊原因としてどのような作用をしているかについては検討を行っておらず、今後症例を増し検討を加える予定である。

文 献

- 1) 大橋浩文, 山本幸彦: 子宮腔部びらんのレーザー治療に関する研究, 日産婦誌, 32: 1839, 1980
- 2) 蔵本博行, 脇田邦夫, 佐々木紀充, 牛木信之, 新井正夫: 産婦人科医のための医学入門Ⅲ, 良性疾患に対するレーザー療法, 産婦治療, 55: 92, 1987
- 3) 植木 実, 木附公介, 飯藤容弘, 岡村信介, 佐野隆, 杉本 修, 黒川彰夫: 子宮腔部仮性びらんに対するCO₂レーザー, 電気焼灼ならびに冷凍療法の治癒機転に関する研究, 日産婦誌, 35: 629, 1983
- 4) Davajan V. and Nakamura R. M.: The Cervical

Factor. Progress in Infertility, ed 2: p15, Boston, Little and Brown Co. 1975

- 5) 西田正人, 山内 宏, 笠原国武, 岩崎寛和: 不妊原因としての子宮腔部ピラン, 日不妊会誌, 30: 439, 1985

**Study on the treatment
of vaporization for uterine
cervical erosion by CO₂ laser
in infertile women**

Masuo Kusakari, Kentaro Takahashi,
Kazuo Yoshino and Manabu Kitao

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

We performed vaporization for uterine cervical erosion by CO₂ laser in six infertile women. These patients had chronic cervicitis, broad cervical erosion and large quantity of thick cervical mucus at anytime of menstrual cycle, and had no other demonstrable cause of infertility except the cervical factor. All patients cured within 5 to 8 weeks, and 4 patients (66.7%) became pregnant within 1 to 7 menstrual cycle after the treatment. The vaporization by CO₂ laser was useful for uterine cervical erosion of infertile women.

(受付: 1988年9月12日)

家兎胞胚の *in vitro* 着床実験 (着床前期)

In Vitro Studies on the Early Stage of Rabbit Blastocyst Implantation

京都大学医学部婦人科学産科学教室 (主任: 森 崇英教授)

立 山 一 郎
Ichiro TATEYAMA

Department of Gynecology and Obstetrics,
Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606, Japan
(Director: Prof. T. Mori)

妊卵着床機序の解明を目的とし、家兎を使って *in vitro* 着床実験を行った。交配後 6 ½ 日の胞胚を培養子宮内膜細胞上に静置し、3, 6, 12 時間後に光顕ならびに電顕標本を作成、観察し次の成績をえた。

- 1) 3 時間後の所見 内膜細胞からの細胞質突起が透明帯に侵入し、胞胚内には toluidine blue 好性物質が認められた。
- 2) 6 時間後の所見 内膜細胞は 6 時間後より胞胚に近接する部に著明な collagen 産生を伴う複数の局所的隆起構造 (三次元的盛り上がり) を形成し、また胞体内に豊富な lysosome と glycogen 顆粒を有していた。
- 3) 12 時間後の所見 透明帯は菲薄で目が荒くなった濃染緻密帯のみを残していたが、内膜細胞透明帯間物質 (SEZ) の存在が特徴的であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 316-323, 1989)

緒 言

着床とは哺乳動物の初期発生において極めて基本的で重要な過程の一つであり、胞胚と母体生殖器との複雑かつ繊細な一連の相互関係変化の流れといえることができる。さらに妊卵の子宮内膜への着床は妊娠成立の出発点ということもでき、臨床的に不妊や避妊などと直接関わりがある現象であるが不明の点が多い。本研究は *in vitro* 着床 model 実験により妊卵 trophoblast と子宮内膜細胞との interaction を形態学的に観察し、妊卵着床機序を明らかにすることを目的とした。

研究方法

使用した家兎はすべて SPF 飼育下の雌の New Zealand White Rabbit (Keari 3.0kg) である。実験は二つの段階に分かれる。まず前もって非妊家兎

より無菌的に子宮を摘出し、この中から子宮内膜組織のみを採取し 1mm³ 以下の fragments に細切した。これを 0.25% トリプシン液 (Difco) で約 10 分間処理し、ほぼ 1 個ずつの子宮内膜細胞に分離し、培養液 2 ml と共に Corning tissue culture dish (35mm × 10mm) に入れ、開放系 (空気 95%, CO₂ 5%) で 37.0°C のもと培養を始めた。1 個の dish には約 10⁶ 個の子宮内膜細胞が入るように調整し、2 羽の家兎より 57 個の dish を作成した。培養液は Waymouth MB 752/1 液 90%, ウシ胎児血清 10%, これに抗生物質を添加したものを用いた。以下今回の実験の培養液はすべてこの組成とした。培養液は 2 ~ 3 日毎に交換し、培養 4 ~ 5 日目には dish の底面に子宮内膜細胞が完全に confluent な状態となった。このようにして 1 週間経過した時点で次の実験段階に入った。この第 2 段階で使用した家兎は交配後 6 ½ 日経過したものの 5 羽であった。同様に無菌的に子宮を摘出し、

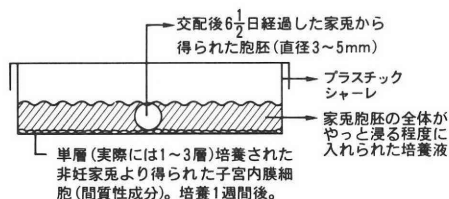
注意深く子宮腔内の胞胚を採取した。1羽の家兎より直径3～5mmのintactな胞胚を約12個、5羽で62個の胞胚を採取できた。得られた胞胚は無処理のままできるだけ素早く前述の培養子宮内膜細胞のsheetの上に置いた。培養子宮内膜細胞は、位相差顕微鏡下で内膜上皮性成分と内膜間質性成分とに明確に区別でき、それぞれが細胞集落を形成していた。そこで、胞胚を内膜間質性成分の上に静かに置き、培養液を胞胚の全体がやっと浸る程度に加え、37.0℃、閉鎖系(空気100%)のもと静置培養した。1個のdishには1個の胞胚を入れ全部で57個の内膜細胞—胞胚の実験系dishを作成した(図1)。これらを3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72時間完全静置培養後、試料を作成した。各時間用のdishはそれぞれ9, 9, 8, 8, 7, 6, 5, 5個とした。設定時間を経過したdishではまず、pasteur capillary pipetteで静かに培養液を除き、4% sucrose入り4% paraformaldehyde, 5% glutaraldehyde等量混合液にて2回洗浄後、前固定を約4時間行なった。次に0.1 M sucrose入りcacodylate bufferにて2回洗浄後6時間放置、その後2% osmium tetroxideにて3時間後固定した。次にethanol seriesにて脱水、さらにepon包埋を行なった。absolute ethanol:eponの比を2:1→1:1→1:2とし、さらにeponのみを数回くり返し交換注入したのち熱重合を行なった。dishを破壊してepon blockを取り出し、トリミングしたのち子宮内膜細胞が存在している面にverticalな方向に薄切片、超薄切片を作成した(図1)。なおこの着床前期報告にお

いては静置培養後3, 6, 12時間の所見を中心にのべる。

研究成績

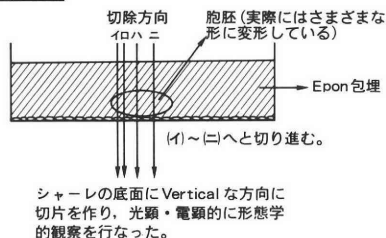
1) 3時間後の所見 9個のdishのうち2個に内膜細胞と胞胚のattachmentが見られ試料が作成できた。(固定の段階でattachmentがはずれたものは除外した。これは以下も同じである。) 光顕所見(写真1): 1aに全体像を示す。これは図1の切除方向(ハ)の部分に相当し、以下1b～1fまで1aの部分的拡大像である。胞胚側では、透明帯, trophoblast, embryoblastが明確に同定でき、透明帯とtrophoblast(一部にembryoblastの周り)の間には、toluidine blue好性物質が存在した。また子宮内膜細胞側は2～3層の間質性成分から成り、透明帯はtoluidine blueの染色の度合いから三部分に区別できた。1fにおいて透明帯の最外層の部分と内膜細胞とのattachmentが認められる。電顕所見(写真4): 4a, 4b, 4cは胞胚内部を示し、4dは透明帯、4e, 4fは透明帯と内膜細胞のattachment部を捉えている。4aではtrophoblastとembryoblastが明確に区別でき、またtoluidine blue好性物質の存在も認められる。4bはtrophoblastの胞胚内を示しているが、microbody-like substanceが同定でき、4cでは透明帯とtrophoblast間のtoluidine blue好性物質を強拡大で捉えている。この4b, 4cではtoluidine blue好性物質が小さな紐状の分子として観察され、trophoblastより分泌されたものと推測される。4dは透明帯で、

実験方法



完全な閉鎖系静置培養(1気圧, 37.0℃)後、3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72時間経過した時点でそれぞれ試料を作成する。

試料作成法



注

- 1) 光顕用標本はすべてトルイジンブルー染色とした
- 2) 電顕用標本はすべてウラン・鉛の二重染色とした
- 3) 略語

Ec → Endometrial cell	G → Golgi apparatus
Z → Zona pellucida	Tf → Tonofilament
T → Trophoblast	Mt → Mitochondria
Eb → Embryoblast	P → Microbody
C → Collagen fibrils	Ly → Lysosome
D → Desmosome like structure	Gly → Glycogen
F → Fusion	rER → rough-surfaced endoplasmic reticulum

図1 実験方法、試料作成法および略語

その厚さは約 20 μ , 胞胚の内側より濃染緻密帯 (約 5 μ), 疎性帯 (約 9 μ), 淡染帯 (約 7 μ) の三部分に区別された。4e, 4f では内膜細胞に極めて豊富な lysosome と粗面小胞体が認められ、また内膜細胞は透明帯の淡染帯の部分に向かって細胞突起を出している。内膜細胞間や内膜細胞と透明帯との間には collagen fibrils と透明帯の溶解物が多く見られる。

2) 6 時間後の所見 9 個の dish のうち 3 個に内膜細胞と胞胚の attachment が見られ、試料が作成できた。光顕所見 (写真 2) : 2a, 2b, 2c は図 1 の切除方向 (ロ) の部分、2d, 2e, 2f は (ハ) の部分である。2a, 2b は胞胚に向かっての collagen の小さな盛り上がりを示し、trophoblast, embryoblast は単核の細胞として明確に同定でき、toluidine blue 好性物質も認められた。2d, 2e では透明帯の厚さに不均一な部分が見られた。特に 2e では、透明帯の淡染帯の部分が増殖状に盛り上がって厚く、また 2f では透明帯と内膜細胞との attachment が認められる。電顕所見 (写真 5) : 5a に全体像を示すが、これは図 1 の切除方向 (ハ) の部分に相当する。5b では trophoblast と透明帯との間に toluidine 好性物質が存在し、透明帯側に凝集し移動している。5c は trophoblast の胞体内を示し、microbody-like substance のもつ緻密多管状ヌクレオイド構造が顕著に認められた。5d, 5e, 5f では透明帯と内膜細胞の attachment 部分で、内膜細胞には豊富な lysosome と粗面小胞体に加えて 5e で見られるような glycogen 顆粒がしばしば認められ、また 5f では内膜細胞の出す細胞突起がさらに伸びて透明帯の中に食い込んでいた。内膜細胞間の collagen fibrils もさらに多く存在した。

3) 12 時間後の所見 8 個の dish のうち 2 個に内膜細胞と胞胚の attachment が見られた。光顕所見 (写真 3) : 3a に全体像を示し、以下はすべてその部分拡大像である。これは図 1 の切除方向 (ハ) (ニ) の部分に相当する。これらの像の中では透明帯が菲薄となり、濃染緻密帯と疎性帯の一部を残しているにすぎない。しかも 3b, 3c に見られるように透明帯の切れ端が極めて sharp で、rupture をおこしたと推測される。最も特徴的なことは 3e, 3f に見られるような透明帯と内膜細胞間に toluidine blue に極めて濃染する物質が不連続的に存在したことである。以下この未知の物質を仮りに内膜細胞透明帯間物質 (substances layed between endometrial cells and zona pellucida : 以下 SEZ と略す) と呼ぶこととする。電顕所見 (写真 6) : すべて図 1 の切除方向 (ハ) (ニ) の部分より試料を作成しているが、6a, 6b, 6c に SEZ の像を示す。SEZ は数 μ のものから 15 μ

程の大きさのものまであり、電子密度の高い極めて小さな粒子の集まりとして認められる。しかも 6c において見られるように、その一部が透明帯の方に溶解しつつあり、内膜細胞から出された透明帯の lysis, rupture に関係のある物質と推測される。6f は、内膜細胞中高倍率で粒子の集まりを捉えたものである。粗面小胞帯や遊離 ribosome の存在の中に限界膜ははっきりしないが lysosome-like substance で高電子密度の物質が認められ (この他にも多数見られる)、これが SEZ 前駆物質の可能性が示唆されるが、その exocytosis の形態などは捉えることができなかった。6d, 6e では透明帯が極めて菲薄となり、目の荒くなった最内層あるいは中間層の一部を残しているにすぎない。また trophoblast 内の microbody-like substance も相変わらず存在し、peroxisome の分類では III 型に属するものと思われた。

考 案

以上静置培養後 3, 6, 12 時間の所見を経時的に述べたが、胞胚の子宮内膜細胞への付着は培養開始 3 時間後にすでに認められた。しかし培養開始後 12 時間までは低率であった。これは用いた胞胚の viability に問題があったか、培養方法が自然の付着に不適当であったか、あるいは胞胚が着床時の子宮内膜との生理的位置関係に固定するまでに *in vitro* 条件下で長時間を要したかなどの因子によるものと考えられる。培養方法に改良を加えより *in vivo* に近似した方法を用いれば、早期から付着率は高まる可能性がある。

家兎では本来の透明帯の外側に卵管および子宮由来の分泌物が付着して形成される蛋白質層が存在するといわれ¹⁾、透明帯と呼ぶよりも blastocyst covering と称するのが適切であるが本稿では便宜上透明帯とした。透明帯の消失は着床の必須条件であるが、今回の *in vitro* 実験では透明帯の菲薄化、断裂が胞胚 trophoblast と子宮内膜細胞の双方の作用によって起こることが示された。すなわち、trophoblast から透明帯に向う微細顆粒状物質の分泌、子宮内膜細胞の細胞質突起の透明帯内進入、子宮内膜細胞の細胞質内および子宮内膜細胞と透明帯との間に認められた顕著な物質産生は、いずれも透明帯に作用するものと推察される。子宮内膜細胞に由来し透明帯に接して存在する物質 (内膜細胞透明帯間物質, SEZ) は、形態学的にきわめて顕著で印象的な像として認められ、その生化学的性質の検討を進めている。さらに今回の実験で子宮内膜細胞は 6 時間後より胞胚に近接する部に著明な collagen 産生を伴う複数の局所的

隆起構造（三次元的盛り上がり）を形成していったが、これらは時間の経過とともに著明となっていた。

稿を終わるにあたり福井医科大学産科婦人科学教室富永敏朗教授の御指導に深謝いたします。

文 献

- 1) Boving, B. G. and Larsen, J. F.: Implantation. In Human Reproduction, Conception and Contraception, (eds. Hafez, E. S. E. and Evans, T. N.), 133, Harper and Row, Hagerstown (Maryland), 1973

In vitro studies on the early stage of rabbit blastocyst implantation

Ichiro Tateyama

Department of Gynecology and Obstetrics,
Faculty of Medicine,
Kyoto University, Kyoto 606, Japan
(Director: Prof. T. Mori)

To elucidate the mechanism of implantation, an *in vitro* experimental model was carried out using rabbits. Blastocysts obtained 6 ½ days after mating were placed on cultured endometrial cells and cultured for 3, 6, and 12 hours. The blastocysts and the endometrial cells were studied by light and electron microscopy and the following results were obtained.

- 1) After 3 hours in culture, cytoplasmic projections from the endometrial cells had thrust through the zona pellucida, and particles of toluidine blue stain were observed in the blastocysts.
- 2) After 6 hours, the protuberances of the endometrial cell layer, which contained large amounts of collagen fibrils, were observed around the blastocyst attachment, and large numbers of lysosomes and glycogen granules were present in the endometrial cells.
- 3) After 12 hours, the zona pellucida had become very thin and coarse. The most characteristic finding was the existence of a layer of substance between the endometrial cells and the zona pellucida (SEZ).

(受付: 1988年7月8日)

〈写真説明〉

文中の写真番号は、すべて写真の中の番号に相当する。

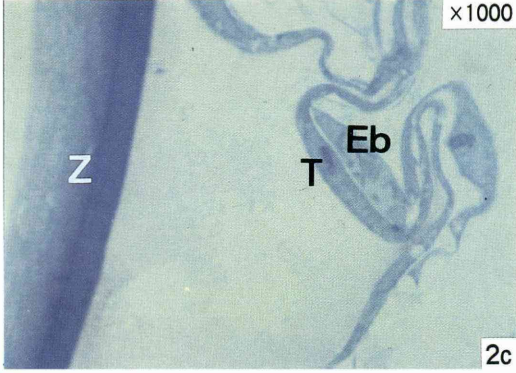
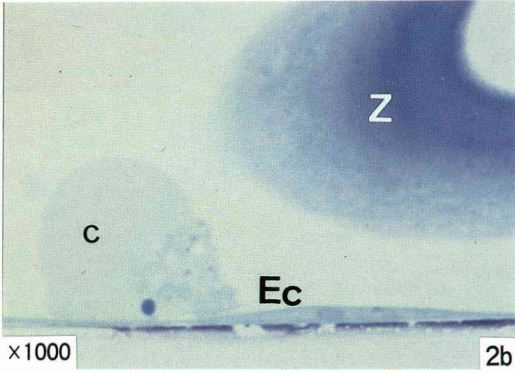
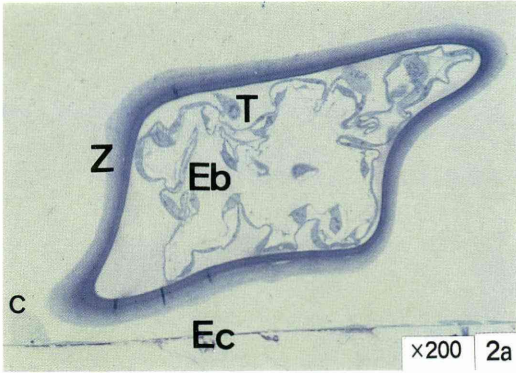
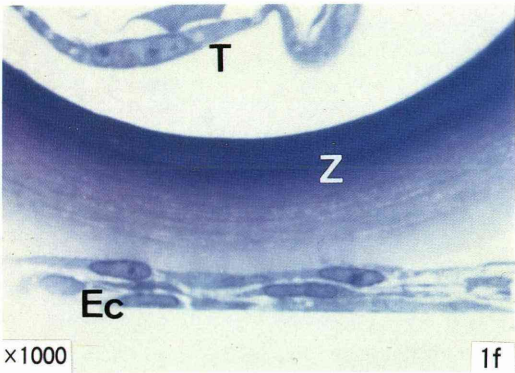
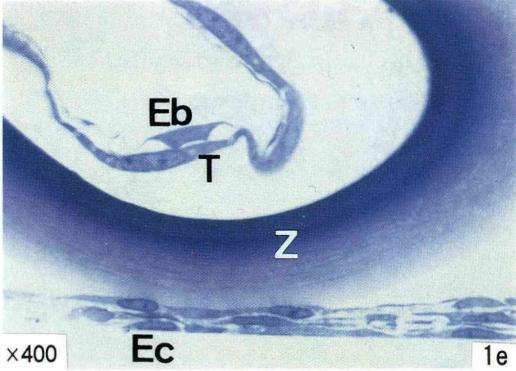
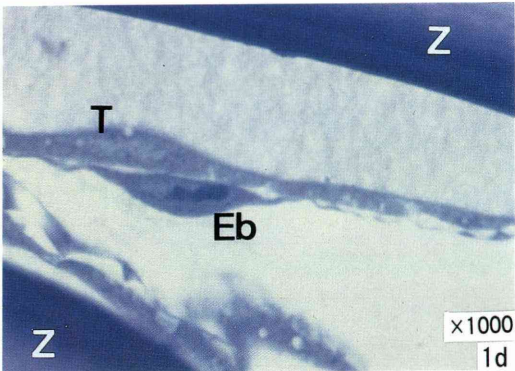
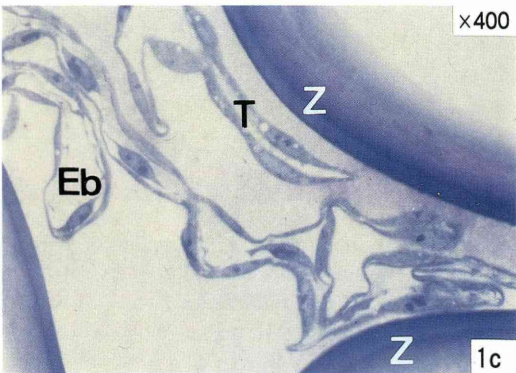
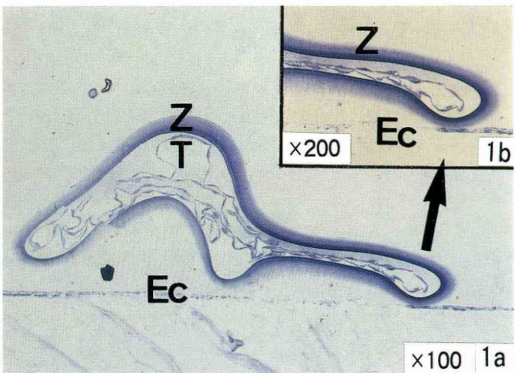


写真 1 a~1 f: 静置培養後 3 時間の電顕所見

写真 2 a~2 c: 静置培養後 6 時間の光顕所見

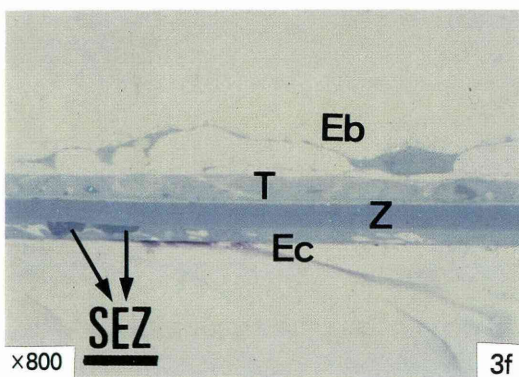
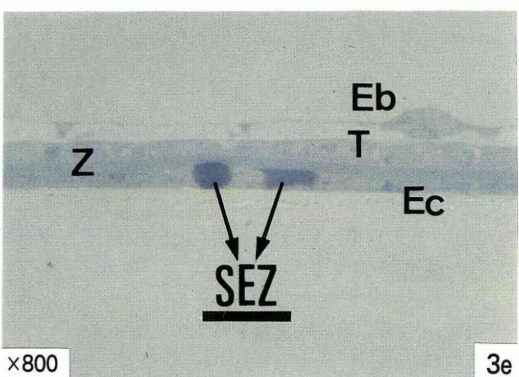
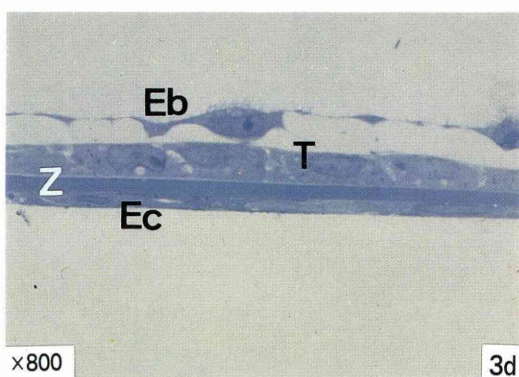
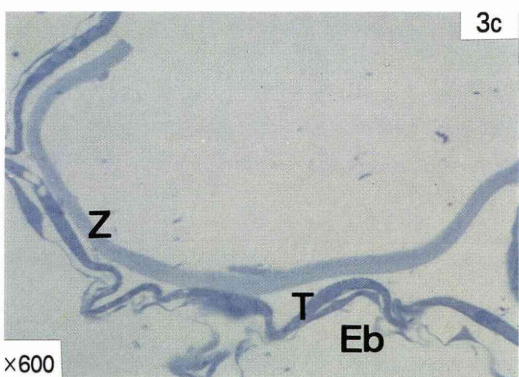
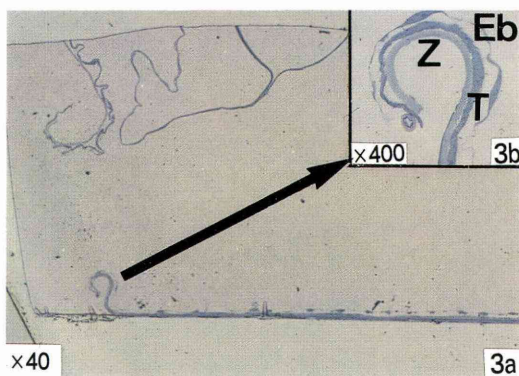
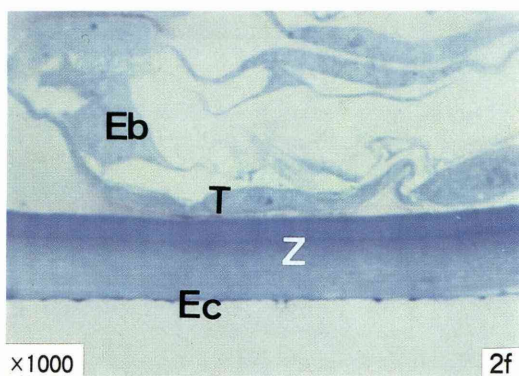
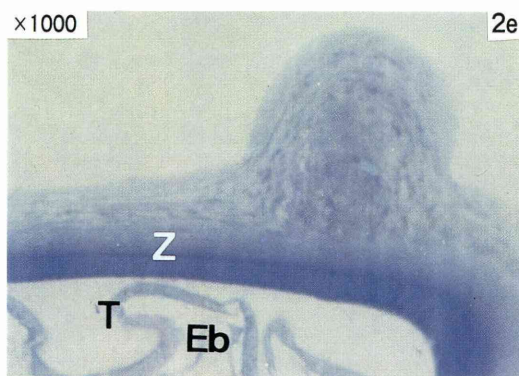
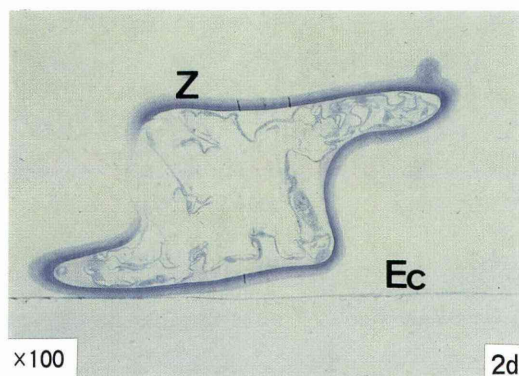


写真 2d ~ 2f: 静置培養後 6 時間の光顕所見

写真 3a ~ 3f: 静置培養後 12 時間の光顕所見

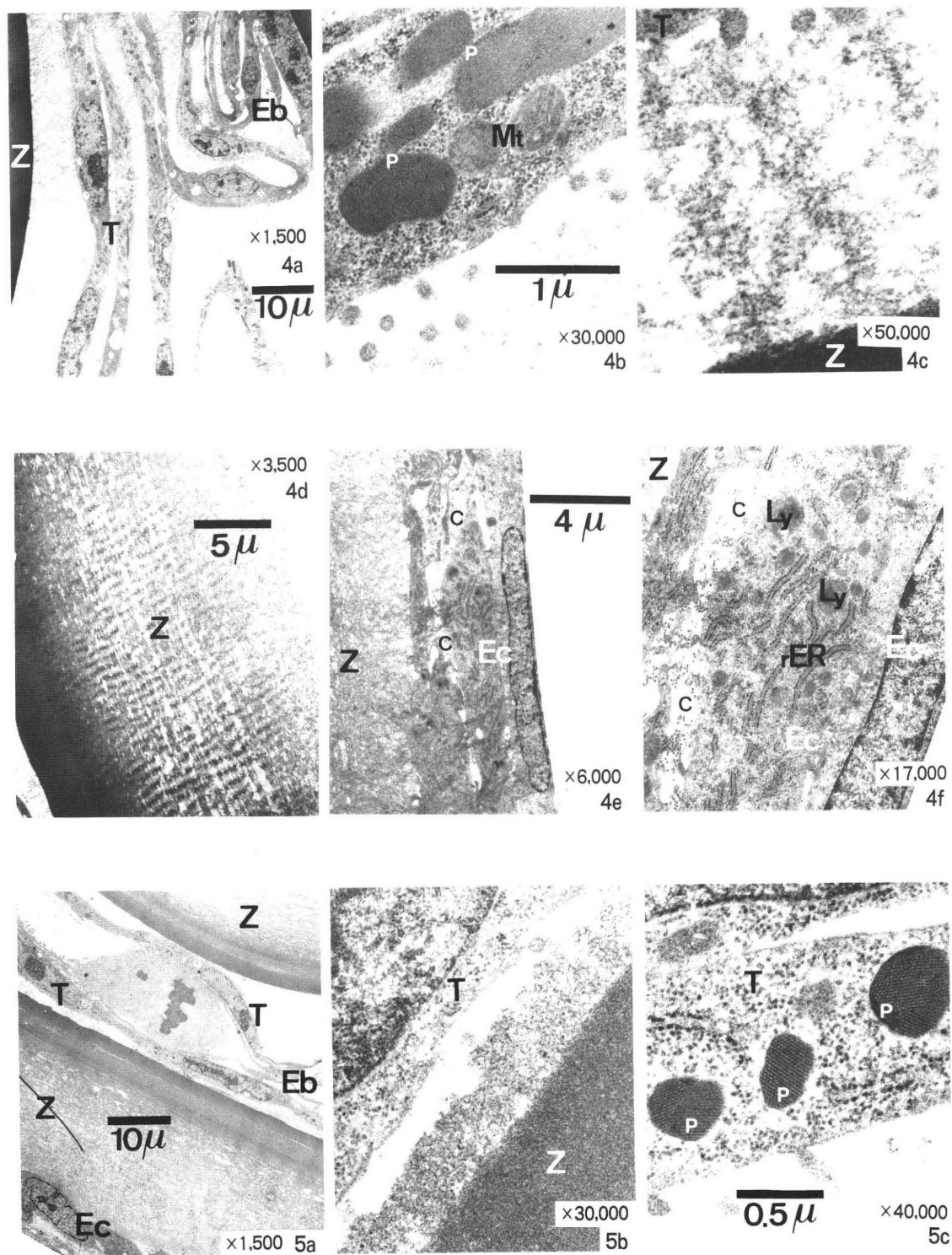


写真 4 a~4 f: 静置培養後 3 時間の電顕所見

写真 5 a~5 c: 静置培養後 6 時間の電顕所見

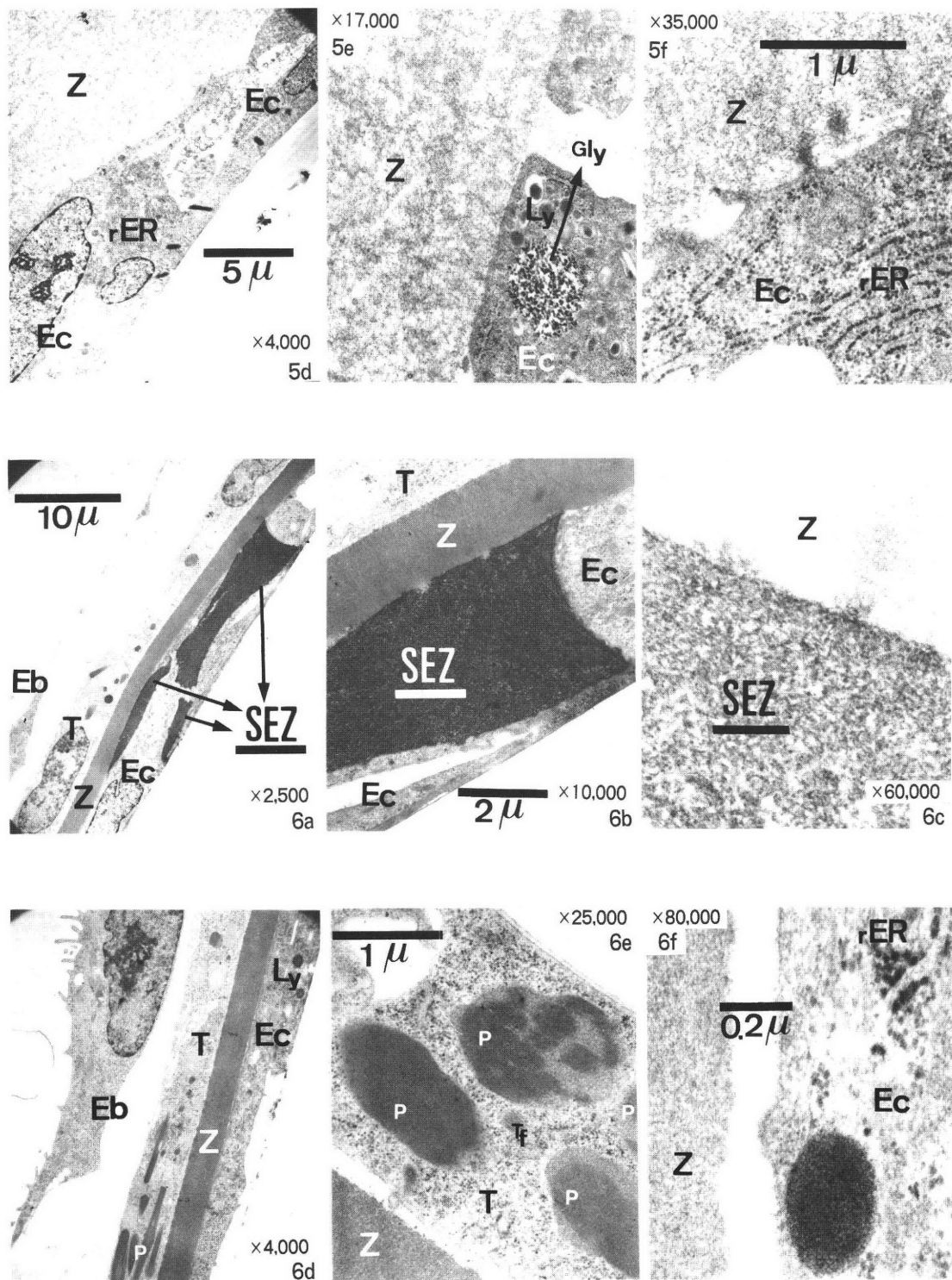


写真 5d ~ 5f: 静置培養後 6 時間の電顕所見

写真 6a ~ 6f: 静置培養後 12 時間の電顕所見

Hyaluronidase 処理により分類した 排卵直前マウス卵胞卵の 成熟度, 受精能および新生仔への発生能について

Relationship between the Degree of Cumulus Cell Detachment
Caused by Treatment with Hyaluronidase and Maturation Division,
Fertilization Capability, and Ability for Development of
Preovulatory Oocytes to Normal Young in Mice

順天堂大学医学部共同病理研究室

中 潟 直 己

Naomi NAKAGATA

Central Laboratory for Medical Sciences:
Division of Pathology, School of Medicine,
Juntendo University, Tokyo 113, Japan.

過排卵処理を施した C57 BL/6 J 系成熟雌マウスの卵胞より, HCG 注射後 10 時間に採取し, 2 時間の前培養後, hyaluronidase 処理を行ない, ほぼ完全に卵丘細胞が除去された卵子 (裸化卵子) とされなかった卵子 (非裸化卵子) について JCL:ICR 系成熟雄の精巢上体尾部精子を用いて体外受精を行った。さらに授精後 29 時間に 2 細胞期へ発生した胚を受容雌へ移植し, 新生仔への発生について検討した。また授精時, それぞれの卵子の一部について成熟分裂の段階を検索した。授精時における非裸化卵子の成熟分裂の段階は metaphase I から metaphase II の範囲であったが, metaphase II を呈する卵子の割合は, わずか 14.4% (15/104) であり, 体外受精成績および新生仔への発生率も低値であった。一方, 裸化卵子の 85.1% (80/94) は, 授精時, metaphase II の分裂像を呈しており, それら卵子の体外受精成績および新生仔への発生率は, 非裸化卵子のそれぞれの値に比べ, 有意に高値を示した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 324-330, 1989)

序 論

現在, ヒトの GIFT¹⁾においてその成功率を高めるため, 数個の卵子の移植が一般に行なわれている。しかしながら, 数個の卵子の移植は妊娠率の向上と同時に, 複数の受精卵が着床し, 多胎を高頻度に引き起こす要因となるのもまた事実のように思われる^{2,3)}。従って, 妊娠率が高く, かつ多胎の頻度を少なくするためには, 採取した卵子の内, より成熟度の高い卵子を最少個数移植することが最も重要なことと考えられる。

従来, ヒトの IVF & ET あるいは GIFT において, 得られた卵子の成熟度の判定は卵子およびそれを取り巻く卵丘の状態を外観的に観察し, その卵子の成熟度を推定することにより行なっているが, 必ずしも容易かつ正確な判定法とはいえないように思われる^{4,5,6,7,8)}。そこで本研究では排卵直前の卵胞卵において, 成熟度の高い卵子は一般に卵丘の基質がヒアルロン酸に富み, 十分に expanding した卵丘を有することに着目^{9,10,11,12,13)}, 採取したヒト卵胞卵の成熟度を容易かつ正確に判定する方法のモデルとして, 排卵直前のマウス卵胞卵を一定の条件下で hyalur-

onidase 処理し、卵丘細胞の離散の度合いとそれら卵子の成熟度、受精および発生能との相関について比較検討した。

方 法

1. 卵胞卵の採取および hyaluronidase 処理

卵胞卵の採取はすべて前報に従った^{14,15,16)}。即ち、5 iu PMSG と 5 iu HCG を 48 時間間隔で腹腔内投与し、過排卵処理を施した 3～4 ケ月齢の C 57 BL/6 J 系成熟雌マウスの卵胞より、HCG 注射後 10 時間に卵丘細胞に包まれた排卵直前の卵胞卵のみを採取した(図 1-a)。続いてこれら卵胞卵を 37°C、5% CO₂、95% air の気相下にシャーレ内の被流動パラフィン HTF 培地内¹⁷⁾で 2 時間の前培養を行なった。hyaluronidase 処理はこれら卵胞卵を 0.05% hyaluronidase 溶液内で 2 分間静置することにより行ない、HTF 培地にて 3 回洗浄、実体顕微鏡下にはほぼ完全に卵丘細胞が除去されたもの(裸化卵子、図 1-c)とされなかったもの(非裸化卵子、図 1-b)に分類し、それぞれの卵子の一部について卵子の成熟分裂の段階を検索した¹⁸⁾。また対照区としては hyaluronidase 処理を行なわなかった無処理の卵胞卵、即ち、HCG 投与後 10 時間に卵胞より採取し、2 時間の前培養を行なった卵胞卵を用いた。

2. 体外受精

体外受精は JCL:ICR 系成熟雄の精巣上体より採取し、HTF 培地内で 1.5 時間前培養した精子を最終精子濃度が 150 精子/ μ l となるように、それぞれの卵子を含む培地へ添加することにより行ない、精子添加後 5 時間にそれら卵子の一部についてホールマウント標本作製し、受精の有無について検索を行なった。尚、卵子の観察にあたり、透明帯の内側に精子が存在する卵子はすべて精子侵入卵とし、受精卵はその発生段階により stage I と stage II に区別した¹⁹⁾。また、卵細胞質内に不完全に膨化した精子頭部と尾部、あるいは尾部のみを認めるものの、卵子の染色体は付活化されず、prometaphase II から metaphase II にとどまっている卵子はすべて異常受精卵と判定した¹⁵⁾。

3. 体外培養および胚の移植

一方、授精後 5 時間にホールマウント標本に用いなかった卵子については 24 時間追加培養し、2 細胞期への発生について観察を行なった。さらに 2 細胞期へ発生した卵子については精管結紮雄と交配し偽妊娠を誘起した偽妊娠第 1 日(陰栓確認日)の受容雌の卵管への移植を行なった。また、2 細胞期へ至らなかった卵子についてはホールマウント標本作

製、受精の有無について観察を行なった。

結 果

1. 授精時における卵胞卵の成熟分裂像について

表 1 は、授精時における卵子の成熟分裂の段階を示したものである。非裸化卵子 (C+) において metaphase I から metaphase II まで種々の段階の成熟分裂像が観察されたが、完全な metaphase II を呈する卵子の割合は、14.4% (15/104) と低値であった。一方、裸化卵子 (C-) において metaphase II を呈する卵子の割合は 85.1% (80/94) と、非裸化卵子のそれと比べ、明らかに高値を示し、chromatin mass stage 以前の分裂像を呈する卵子の割合は僅かであった (1.1～3.2%)。

2. 体外受精成績

授精後 5 時間における体外受精成績を表 2 に示す。非裸化卵子 (C+) および裸化卵子 (C-) の精子侵入率はそれぞれ 83.4% (146/175) および 89.2% (190/213) と非裸化卵子において僅かに低値を示したが、両者間に有意差は認められず、また対照区 (89.9%, 142/158) と比較しても差は認められなかった。膨大精子頭を有し、卵子の染色体が anaphase II から telophase II を示す stage I の受精卵の割合は非裸化卵子および裸化卵子においてそれぞれ 27.3% (38/139) および 22.3% (42/188) と両者間に差は認められなかったが、雌雄の前核を有する stage II の受精卵の割合は、裸化卵子で 62.2% (117/188) と非裸化卵子のそれ (7.2%, 10/139) に比べ有意に高値を示した ($p > 0.01$)。一方、異常受精卵、即ち、卵細胞質内に不完全に膨化した精子頭部と尾部、あるいは尾部のみを認めるものの、卵子の染色体は付活化されず、prometaphase II から metaphase II にとどまっている卵子の割合は、非裸化卵子および裸化卵子でそれぞれ 65.5% (91/139) および 15.4% (29/188) と、非裸化卵子において異常受精卵が高頻度に観察された ($p > 0.01$)。また多精子受精卵の割合は両者ともほぼ 10% 前後と対照区のそれ (12.4%) と比較し、差は認められなかった。実験区、即ち、hyaluronidase 処理を受けた非裸化卵子と裸化卵子をまとめた体外受精成績 ((C+) + (C-)) は、hyaluronidase 処理を受けなかった対照区の無処理卵子のそれとはほぼ同様の傾向を示し、両者間に顕著な差は認めなかった。

3. 2 細胞期への発生および移植成績

授精後 29 時間における卵子の 2 細胞期への発生率を表 3 に示す。非裸化卵子 (C+) においてそのほとんどが規則性を持たず広範囲に分散した染色体を有する異常受精卵であり (83.3%, 110/132)、2 細胞

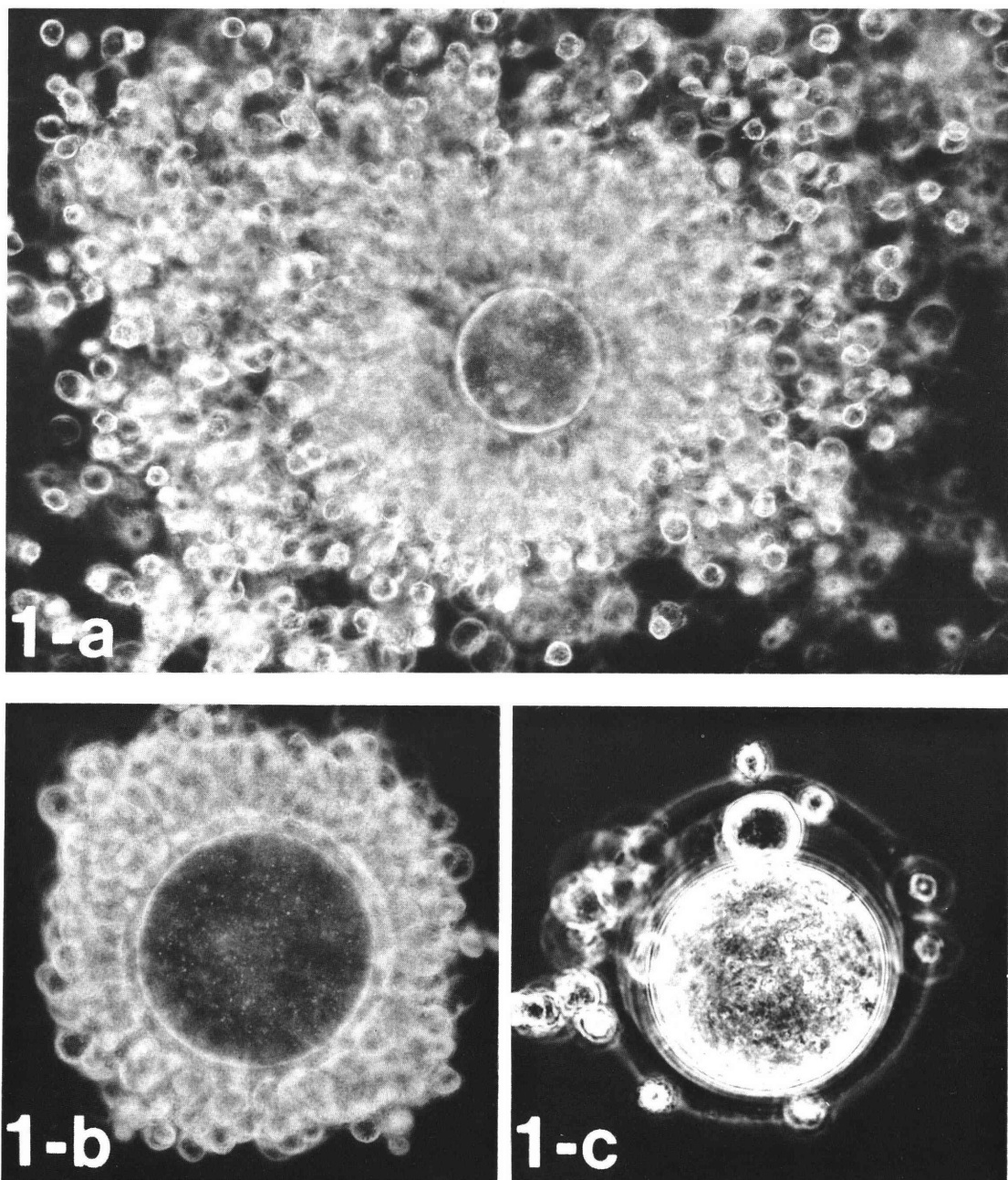


図1 Phase-contrast microphotographs of an intact pre-ovulatory oocyte surrounded by a large number of cumulus cells(1-a), a preovulatory oocyte with moderately detached cumulus cells ("++") (1-b), and a preovulatory oocyte with completely detached cumulus cells ("--") (1-c) after treatment with hyaluronidase.

期へ発生した卵子の割合はわずか 12.9% (17/132) と低値であった。一方、裸化卵子 (C-) においては異常受精卵が全体の 28.1% (54/192) に認められたものの、2 細胞期へ発生した卵子の割合は 68.2% (131/192) と非裸化卵子のそれと比べ有意に高値を示した ($p>0.01$)。

表 4 は 2 細胞期胚の移植成績を示したものである。

非裸化卵子 (C+) において 3 例の受容雌に計 17 個の 2 細胞期胚を移植し、そのうちの 1 例から雄 1、雌 2、計 3 匹 (17.2%) の産子が得られた。一方、裸化卵子 (C-) においては、受容雌 12 例に計 131 個の胚を移植したところ、そのうちの 10 例から移植総数の 33.6% に当たる 44 匹 (雄 19、雌 25) の産子が得られ、2 細胞期胚の移植による新生仔の発生率に

表 1 Stages of maturation division of preovulatory oocytes with moderately (" + ") and completely detached cumulus cells (" - ") after treatment with hyaluronidase.

	No. of oocytes examined	stages of maturation division*					
		Met-I	Ana-I	Tel-I	C.M.	Promet-II	Met-II
C +	104	20 (19.2)	23 (22.1)	21 (20.2)	11 (10.6)	14 (13.5)	15 (14.4)
C -	94	1 (1.1)	1 (1.1)	3 (3.2)	1 (1.1)	8 (8.5)	80 (85.1)
(C+) + (C-)	198	21 (10.6)	24 (12.1)	24 (12.1)	12 (6.1)	22 (11.1)	92 (46.5)

* Met-I : Metaphase I, Ana-I : Anaphase I, Tel-I : Telphase , C.M. : Chromatin mass stage, Promet-II : Prometaphase II, Met-II : Metaphase II.

表 2 The results of in vitro fertilization of preovulatory oocytes with moderately (" + ") and completely detached cumulus cells (" - ") by treatment with hyaluronidase.

	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated (%)	No. of oocytes undergoing fertilization				
			total	stage-I (%)	stage-II (%)	abnormal (%)	polyspermic (%)
C +	175	146 (83.4)	139	38 (27.3)	10 (7.2)	91 (65.5)	15 (10.8)
C -	213	190 (89.2)	188	42 (22.3)	117 (62.2)	29 (15.4)	18 (9.6)
(C+) + (C-)	388	336 (86.6)	327	80 (24.5)	127 (38.8)	120 (36.7)	33 (10.1)
control*	158	142 (89.9)	137	37 (27.0)	55 (40.1)	45 (32.8)	17 (12.4)

* Oocytes not treated with hyaluronidase

表 3 Development to 2-cell stage of preovulatory oocytes with moderately (" + ") and completely detached cumulus cells (" - ") by treatment with hyaluronidase fertilized in vitro.

	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized	No. and (%) of oocytes at stage of				
			Pronucleous	Syngamy	1-cleavage	2-cell	Abnormal
C +	151	132 (87.4)	3 (2.3)	1 (0.8)	2 (1.5)	17 (12.9)	110 (83.3)
C -	225	192 (85.3)	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (1.6)	131 (68.2)	54 (28.1)
(C+) + (C-)	376	324 (86.2)	5 (1.5)	3 (0.9)	5 (1.5)	148 (45.7)	164 (50.6)
control	191	161 (84.3)	1 (0.6)	2 (1.2)	2 (1.2)	75 (46.6)	81 (50.3)

表 4 Results of transplantation of 2-cell embryos derived from preovulatory oocytes with moderately (" + ") and completely detached cumulus cells (" - ") after treatment with hyaluronidase.

	No. of recipients used ^{a)}	No. of 2-cells transferred ^{b)}	No. of pregnant animals ^{c)} (c/a, %)	No. of animals which delivered live young ^{d)} (d/a, %)	No. of live young		
					♂	♀	total ^{e)} (e/d, %)
C +	3	17	1 (33.3)	1 (33.3)	1	2	3 (17.6)
C -	12	131	10 (83.3)	10 (83.3)	19	25	44 (33.6)
(C+) + (C-)	15	148	11 (73.3)	11 (73.3)	20	27	47 (31.8)
control	7	75	5 (71.4)	5 (71.4)	8	13	21 (28.0)

においても、非裸化卵子のそれに比べ有意に高い値であった。(p>0.01).

考 察

0.05% hyaluronidase で 2 分間処理後、卵丘細胞の離散の状態で分類した排卵直前のマウス卵胞卵において、①卵丘細胞が完全に除去されなかった卵子は、そのほとんどが prometaphase II 以前の分裂像を呈し、授精後 5 時間に前期を呈する卵子の割合、2 細胞期への発生、および新生仔への発生率は低値であったこと。②一方、ほぼ完全に卵丘細胞が除去された卵子のほとんどが prometaphase II あるいは metaphase II であり、これら裸化卵子の体外受精成績および新生仔への発生率は非裸化卵子のそれらに比べ有意に高値を示すことが知られた。

卵子の成熟と卵丘細胞層の膨化に関し、Eppig¹¹⁾は HCG 投与後のマウス卵胞卵を経時的に検索し、排卵直前、即ち、卵子の成熟が近づくにつれて急速な卵丘の膨化を認めた。Dekel¹²⁾はラット卵胞卵を用いて同様な観察を行ない、卵丘細胞層の膨化が卵丘の周辺(外側)より始まることを報告した。また、卵丘細胞層の膨化に伴い、卵丘細胞間に酸性ムコ多糖類、特にヒアルロン酸が増加することがマウス⁹⁾および牛¹³⁾の卵胞卵において観察されている。さらに Bavister et al²⁰⁾は排卵直前の卵胞卵を用いたアカゲザルの体外受精において corona radiata を含む卵丘細胞層が、より膨化している卵子ほど、授精後の各ステージ(4-cell ~ molura) への発生率が高いことを報告した。同様に排卵直前の卵胞卵を用いるヒトの IVF & ET においても、十分に膨化し、牽糸性が高い卵丘を有する卵子は、その成熟度が高い傾向にあることが Testart et al^{3,4)}により報告されている。排卵直前のマウス卵胞卵において一定条件の hyaluronidase 処理により、ほぼ完全に卵丘細胞が除去された卵子のほとんどが prometaphase II あるいは metaphase II の分裂像を呈したと、さらにこれら卵子の体外受精成績および新生仔への発生率が非裸化卵子のそれらに比べ有意に高い値を示した本実験結果(表 1, 2, 3, 4)は、これら報告を十分に裏付けられるものと思われる。即ち、排卵直前の卵子において卵子の成熟に伴い、卵丘細胞層にヒアルロン酸が増加し、卵丘細胞間の結合もゆるみ、さらには卵丘の膨化が卵丘の周辺より起こるのであれば、一定の条件下で hyaluronidase 処理した卵子において、成熟のほぼ完了した卵子は、卵丘の周辺より卵丘細胞が速やかに離散し、ほとんどが裸化されるものと考えられる。

Hyaluronidase 処理による卵子への影響について、

Mahadevan et al²¹⁾はヒトの IVF & ET において、採取された卵子を hyaluronidase 処理により裸化しても授精後の受精および発生能には影響を与えないことを報告した。マウス卵子においても多数の報告が成されており、hyaluronidase 処理による卵子の受精能は低下するとも²²⁾、しないとも報じられている^{23,24)}。しかしながら、本実験において hyaluronidase 処理区((C+)+(C-))の体外受精成績および新生仔への発生率は対照区、即ち、hyaluronidase 処理を行なわなかった無処理卵子のそれらと比較し、何ら差を認めなかったことより(表 2, 3, 4)、本実験条件下において hyaluronidase 処理による卵子の受精能および発生能への影響はなかったものと思われる。

現在、採取したヒト卵子を hyaluronidase 処理し、それら卵子の成熟度を卵丘細胞の離散の程度により判定した報告(仮に hyaluronidase test と呼称)は無く、hyaluronidase 処理による卵丘細胞の離散の度合いとそれら卵子の成熟度との相関については不明であるが、ヒト卵子においても本実験結果と同様な傾向が認められるならば、hyaluronidase test は、ヒトの IVF & ET あるいは GIFT において採取された卵子の成熟度を判定する上で有効な手段となるものと思われる。

本研究の一部は昭和 63 年度文部省科学研究費補助金(No.63780061)によるものである。

文 献

- 1) Asch, R. H. Ellsworth, L. R., Balmaceda, J. P. and Wong, P. C.: Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet*, 2: 1034, 1984
- 2) 田中 温, 戸枝通保, 長沢 敦, 山本 勉, 中瀧直己: 前培養卵子を用いた配偶子卵管内移植法(New GIFT)の開発とその臨床成績の検討. *日産婦誌*, 40: 1859, 1988
- 3) Guastella, G., Comparetto, G., Gullo, D., Palermo, R., Venezia, R., Cefalu, E., Ciriminna, R., Salerno, p., and Cittadini, E.: Gameteintrafallopian transfer (GIFT): A new technique for the treatment of unexplained infertility. *Acta Europia Fertilis*. 16: 311, 1985
- 4) Testert, J., Frydman, R., Demouzon, J., Lassalle, B., and Belaisch, J. C.: A study of factors affecting the success of human fertilization *in vitro*. I. Influence of ovarian stimulation upon the number and condition of oocytes collected. *Biol. Reprod.* 28: 415, 1983
- 5) Testert, J., Frydman, R., Lassalle, B., and Belaisch, J. C.: II. Influence of semen quality and oocyte maturity fertilization and cleavage.

- Biol. Reprod. 28: 425, 1983
- 6) 星 和彦, 星合 昊, 斉藤 晃, 桃野耕太郎, 京野広一, 村木 章, 鈴木雅洲: ヒト卵子の成熟度に関する grade 分類の試み. 日産婦誌, 35: 2300, 1983
 - 7) Marrs, R. P., Saito, H., Yee, B., and Brown, J.: Effect of variation of *in vitro* culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human *in vitro* fertilization procedures. Fertil. Steril. 41: 519, 1984
 - 8) Rafael, Z. B., Kopf, G. S., Blasco, L., Flickinger, G. L., Tureck, R. W., Strauss, J. F., and Mastroianni, L.: Follicular maturation parameters associated with the failure of oocyte retrieval, fertilization, and cleavage *in vitro*. Fertil. Steril. 45: 51, 1986
 - 9) Eppig, J. J.: FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. Nature. 281: 483, 1979
 - 10) Eppig, J. J.: Gonadotropin Stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: General conditions for expansion *in vitro*. J. Exp. Zool. 208: 111, 1979
 - 11) Eppig, J. J.: The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. Develop. Biol. 89: 268, 1982
 - 12) Dekel, N., Hirsch, T., and Kraicer, P. F.: Maturation effects gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. Biol. Reprod. 20: 191, 1979
 - 13) Ball, G. D., Bellin, M. E., Ax, R. L., and First, N. L.: Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. Mol Cell Endocrinol. 28: 113, 1982
 - 14) Nakagata, N., and Tanaka, A.: Birth of normal young following intrafallopian transfer of preovulatory oocytes and epididymal spermatozoa in mice. Jap. J. Fert. Steril. 31: 404, 1986
 - 15) 中潟直己, 田中 温: 排卵直前マウス卵胞卵の受精能および初期発生能に及ぼす卵子前培養の効果について. 日不妊会誌, 33: 160, 1988
 - 16) 中潟直己, 田中 温: 排卵直前マウス卵胞卵の新生仔への発生能に及ぼす卵子前培養の効果について. 日不妊会誌, 33: 416, 1988
 - 17) Quinn, P. Q., Kerin, J. F. and Warnes, G. W.: Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fert. and Steril. 44: 493, 1985
 - 18) Donafue, R. P.: Maturation of the mouse oocytes *in vitro*. I. Sequence and timing of nuclear progression. J. Exp. Zool. 169: 237, 1968
 - 19) 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. 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌, 16: 147, 1972.
 - 20) Bavister, B. D., Boatman, D. E., Leibfried, L., Loose, M., and Vernon, M. W.: Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes *in vitro*. Biol. Reprod. 28: 983, 1983
 - 21) Mahadevan, M., and Trouson, A.: Removal of cumulus cells around the human oocyte using bovine hyaluronidase. Fertil. Steril. 43: 263, 1985
 - 22) Cross, P. C., and Brinster, R. L.: *In vitro* development of mouse oocytes. Biol. Reprod. 3: 298, 1970
 - 23) Iwamatsu, T., and Chang, M. C. Further investigation of capacitation of sperm and fertilization of mouse eggs *in vitro*. J. Exp. Zool. 175: 271, 1970
 - 24) 福田芳詔, 岡田 修, 豊田 裕: マウス卵子の体外受精に関する研究 III. 裸化卵子の受精成績について. 家畜繁殖誌, 18: 73, 1972

**Relationship between the degree
of cumulus cell detachment
caused by treatment with
hyaluronidase and maturation
division, fertilization capability,
and ability for development of
preovulatory oocytes to
normal young in mice.**

Naomi Nakagata

Central Laboratory for Medical Sciences:
Division of Pathology, School of Medicine,
Juntendo University, Tokyo 113 Japan.

Preovulatory oocytes were obtained 10 hr after injection of HCG from the ovaries of C57BL/6J superovulated mice. The oocytes were treated with hyaluronidase after 2 hr incubation *in vitro*. After treatment with hyaluronidase for about 2 min, the oocytes were transferred through three changes of the medium and were classified as either moderately detached (“+”) or completely detached (“-”) according to the degree of cumulus cell detachment. These oocytes were inseminated *in vitro* with epididymal spermatozoa obtained from JCL: ICR mature mice, and the oocytes developed to a 2-cell from 29 hr after insemination were transferred to recipient mice. The oocytes not used for insemination were examined for the stage of maturation division. For oocytes classified as moderately detached (“+”), the proportion of oocytes with

metaphase II at the time of insemination was only 14.4% (15/104), and the incidence of development of oocytes to normal young was low. For oocytes classified as completely detached ("—"), the proportion of oocytes with metaphase II at the time of insemination was significantly higher at 85.1% (80/94) and the rate of development of oocytes to

normal young was higher than that of oocytes classified "+". The degree of cumulus cell detachment caused by treatment with hyaluronidase seems to represent a criterion of maturity of the preovulatory oocytes in mice.

(受付: 1988 年 9 月 7 日)

マウス 2cell 胚を用いた培養液の検討

Study of Preserved Media Used for Mouse Embryo

島根医科大学医学部産科婦人科学教室（主任：北尾 学教授）

内 田 昭 弘	高 橋 健 太 郎	吉 野 和 男
Akihiro UCHIDA	Kentaro TAKAHASHI	Kazuo YOSHINO
草 刈 万 寿 夫	山 崎 裕 行	北 尾 学
Masuo KUSAKARI	Hiroyuki YAMASAKI	Manabu KITAO

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

マウス 2cell 胚培養により代表的な培養液に関して、その保存方法、保存期間について検討した。検討した培養液は Ham's F-10, Whittingham's T₆, 及び mBWW の 3 種類であり、保存方法は冷蔵と冷凍に分け、冷蔵は 3 日、7 日、10 日、20 日、30 日で、冷凍は 7 日、10 日、30 日、60 日の保存期間とした。結果は、各種培養液間で Blastocyst の発生率を比較してみると Ham's F-10 では Whittingham's T₆ 及び mBWW に比べ有意に低い発生率であった。保存方法・期間では、冷蔵保存の場合 20 日までは非保存液とあまり差がなく良好な発生率であったが、30 日では発生率は有意に低率となった。冷凍保存では、Ham's F-10 を除き、60 日までほとんど同様な発生率であった。

以上のことより、着床前マウス胚培養では、培養液は Whittingham's T₆, mBWW が良好な発生率を示しており、保存方法では 20 日までは冷蔵保存が良いと思われるが、それ以上の期間の場合は冷凍保存が望ましいと思われた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 331-335, 1989)

緒 言

ヒト体外受精・胚移植において、その成否には種々の因子が関与している。その中でも卵子や受精卵の培養条件はとりわけ大きい影響をもつと推定される。しかしながら、体外受精・胚移植施行時に用いられる培養液は施設により異なり、その保存方法も異っているのが現状である。そこで今回、代表的な培養液に関して従来より培養液の quality test として行われているマウス 2cell 胚培養^{1,2)}によりその保存方法及び保存期間について検討したので若干の文献的考察を加えて報告する。

研究方法

1) 培養液の種類

研究に使用した培養液は表 1 に示すように現在体外受精・胚移植に主に使用されている³⁻⁷⁾Ham's F-10, Whittingham's T₆ 及び mBWW の 3 種類の培養液とした。

2) 保存方法及び期間

保存方法は、4℃の冷蔵保存、-30℃の冷凍保存とし、冷蔵保存では 3 日、7 日、10 日、20 日、30 日、冷凍保存では、7 日、10 日、30 日、60 日とした。

3) 培養液の調整

培養液は、培養開始時には、臍帯血清 10% を加え、pH を 7.4~7.6、浸透圧 285~295mosmol/kg に調整し使用した。

4) マウスの過排卵処理法及び実験方法

図 1 にマウスの過排卵処理法を示す。8 週齡の ICR 系雌マウスに 5~7IU の PMS を皮下投与し、次いで

表 1 培養液組成

Components (mM)	Ham's F-10	Whitting- ham's T6	mBWW
NaCl	126.60	99.40	88.00
KCl	3.82	1.42	4.78
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.2	—	1.19
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	0.47	—
KH ₂ PO ₄	—	—	1.19
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	—	0.36	—
Na ₂ HPO ₄	1.10	—	—
NaHCO ₃	14.29	25.00	22.60
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.30	1.78	—
Ca lactate	—	—	2.41
Na lactate	—	24.90	21.60
Na pyruvate	0.99	0.47	0.25
Glucose	6.10	5.56	5.56
Penicilline	100U/ml	100U/ml	100U/ml
Streptomycin SO ₄	50pg/ml	50pg/ml	50pg/ml
Phenol red	0.001% (w/v)	0.001% (w/v)	0.001% (w/v)

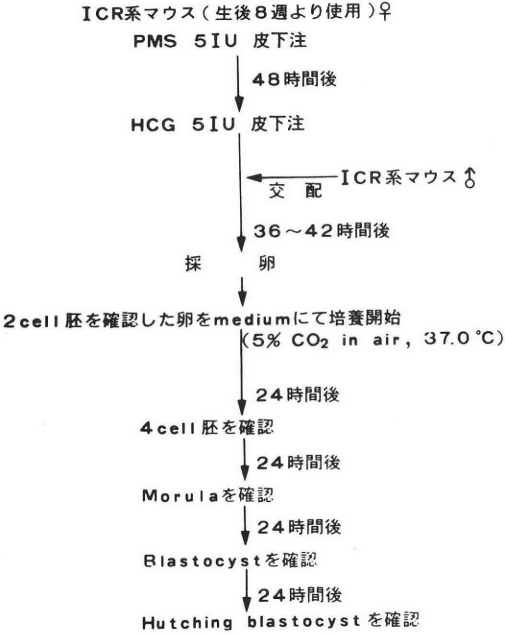


図 1 実験方法

48時間後に5~7IUのhCGを皮下投与した.hCG投与直後,ICR系雄マウスと交配させ,翌朝腔栓形成の確認できたものをhCG投与36~42時間後に頸椎脱

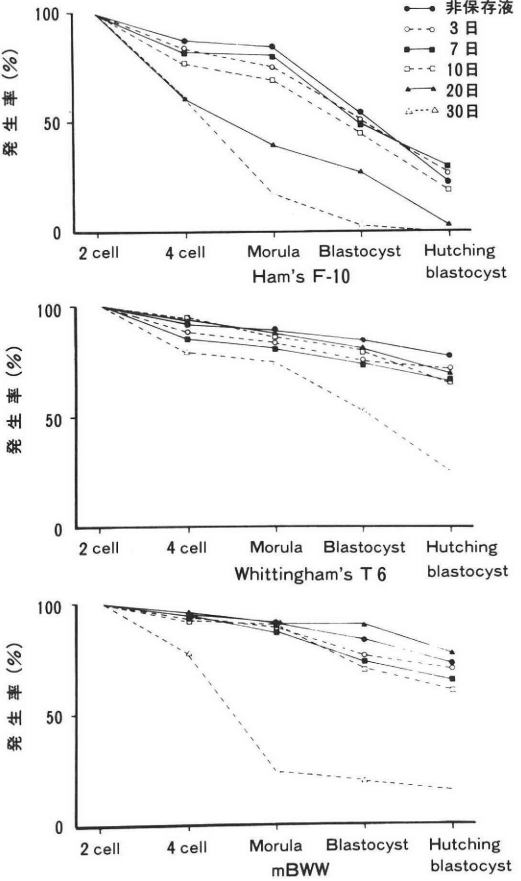


図 2 各種冷蔵保存培養液における2 cell 胚培養の推移

臼にて屠殺し,摘出した卵管を培養液で灌流すること
で2cell胚を採取した.2cell胚をdishに入れた培養
液にうつし,mineral oilで被い,37.0℃,5% CO₂ in
air下で培養を開始した.そして24時間毎に倒立顕
微鏡下で観察し,4cell胚,Morula,Blastocyst及び
Hutching Blastocystを確認し,それぞれの発生率(発
生数/培養に供した2cell胚数)を求めた.

結 果

1)各種冷蔵保存培養液における2cell胚培養の推移
各種冷蔵保存培養液における2cell胚培養の推移を
図2に示す.非保存培養液と各冷蔵保存液の発生率
を比較してみると,Ham's F-10においては,冷蔵保
存20日間及び30日間培養液で発生率が有意に低率
を示した.しかし,Whittingham's T₆及びmBWW
においては冷蔵保存30日間培養液においてだけ発生
率の低下を認めた.

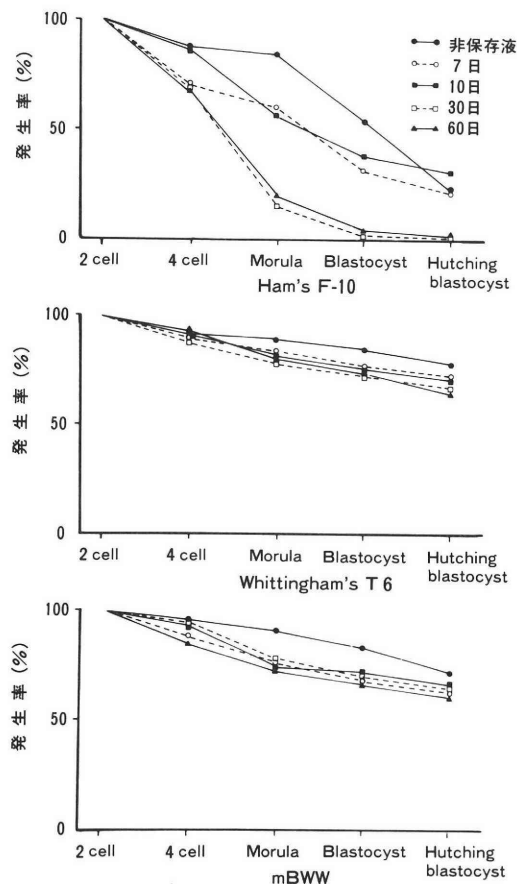


図3 各種冷凍保存培養液における 2 cell 培養の推移

2) 各種冷凍保存培養液における 2cell 胚培養の推移

図3に示すように冷凍保存培養液においては, Whittingham's T₆及びmBWWでは, 保存期間の違いにより発生率に有意差を認めなかったが, Ham's F-10においては, 全体的に発生率が低く, 特に冷凍保存30日間及び60日間では有意に低い発生率を示した。

3) 各種冷蔵保存培養液における Blastocyst 発生率の比較

各種冷蔵保存培養液における Blastocyst 発生率の比較を図4に示す。保存期間に関係なく Ham's F-10における Blastocyst 発生率は Whittingham's T₆及びmBWWに比べて有意に低値を示した。また, 冷蔵保存30日間培養液においては, Whittingham's T₆はmBWWに比べて有意に高い発生率を示した。

4) 各種冷凍保存培養液における Blastocyst 発生率の比較

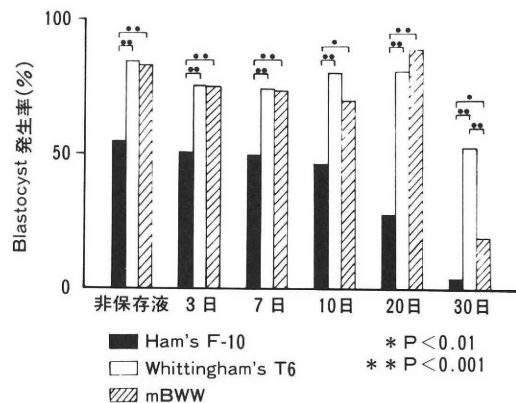


図4 各種冷蔵保存培養液における Blastocyst 発生率の比較

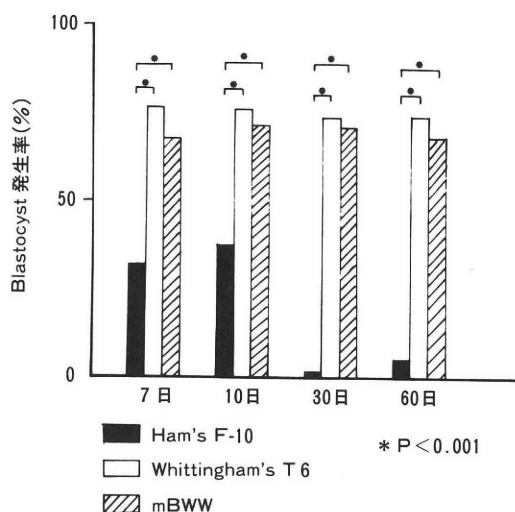


図5 各種冷凍保存培養液における Blastocyst 発生率の比較

各種冷凍保存培養液においての Blastocyst 発生率の比較は図5に示すように, 冷蔵保存の場合と同様に Ham's F-10の発生率は, Whittingham's T₆及びmBWWに比べて有意に低値を示した。

5) 各種培養液保存方法による Blastocyst 発生率の比較

保存方法の違いによる Blastocyst 発生率を検討してみると図6に示すように, Ham's F-10では冷蔵保存, 冷凍保存共に全体的に低い発生率であり, 保存期間7日間において冷凍保存の方が冷蔵保存に比べて有意に低い発生率を示した。Whittingham's T₆, mBWWにおいて, 保存期間7日間, 10日間では, 冷蔵保存及び冷凍保存ともに同様な発生率を示したが, 保存期間30日間においては, 冷蔵保存の発生率

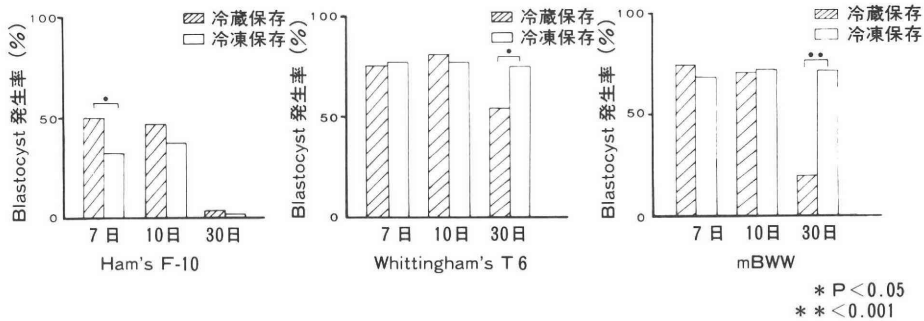


図6 各種培養保存方法による Blastocyst 発生率の比較

が冷凍保存に比べて有意に低値を示した。

考 察

ヒト体外受精、胚移植法は1978年に、その第1号の誕生が報告され⁸⁾、以来、成功例が各国で報告されている。そしてヒト体外受精・胚移植は不妊症の治療として定着してきた。しかしながら、その成功率は現在もお決して満足のいくものではなく、その原因は、体外受精・胚移植が種々の問題点を含んでいるためである⁹⁾。この中でも、特に卵子及び受精卵の培養は、体外受精・胚移植に大きな影響をもつ操作の1つといえる。この培養には、培養液の種類、培養液浸透圧及びpH、培養液中血清濃度、培養気相中酸素分圧、培養温度などさまざまな因子が関係しており¹⁰⁾、これらの因子を最もよい条件にととのえることが体外受精・胚移植の成功率の向上につながると思われる。これらの因子の1つである培養液の種類は施設により異なり、その保存方法も異なっているのが現状である。培養液の適性検査として、精子の運動性が最低24時間完全に維持されていることが報告されている¹¹⁾が、今回、培養液の適性検査として従来より行われているマウス2cell胚培養^{1,2)}を利用することにより、ヒト体外受精・胚移植に使用されている代表的な培養液に関して、その保存方法及び保存期間について検討を加えた。今回行ったマウス2cell胚培養による培養液の適性検査は、マウス卵が90%以上の率でHatching blastocystまで達すること¹²⁾を条件としており、基本的な培養条件^{10,13)}はヒト体外受精・胚移植と同じである。そこで我々も今回の実験では、現在広く用いられている培養条件に基づいて行った。その結果、Whittingham's T₆及びmBWWが、保存方法及び保存期間に関係なく良好な発生率を示したが、ヒト体外受精・胚移植においてもっとも利用度の高いHam's F-10では発生率が低く、保

存後使用する場合には注意が必要と思われた。そして保存方法、保存期間に関しては20日間までの保存期間で使用する場合には冷蔵保存が望ましく、長期間培養液を保存する場合には冷凍保存が望ましいと思われた。上原ら¹⁰⁾は、培養液に関してHam's F-10とWhittingham's T₆を比較するとHam's F-10はWhittingham's T₆に比べて有意に低い胞胚形成率であると報告している。またAckerman et al.¹⁴⁾は雑種のマウス(CD-1)を用いた場合はm-KRB(modified Krebs-Ringer-Buffer)とHam's F-10で卵割率は同様であったが、純系のhybridを用いた場合にはm-KRBよりHam's F-10で低率であったと報告している。

今回、培養液の適性検査として、マウス2cell胚培養を行ったが、実験により得られた発生率はこの検査の基準90%より低率であった。これは、実験中のincubatorの開閉、そして24時間ごとの倒立顕微鏡での観察による温度及び気相の変化などの培養条件の変動が原因として考えられ、ヒト体外受精・胚移植を行う際にも十分な注意が必要であると思われた。

おわりに

マウス2cell胚培養を利用することにより、ヒト体外受精・胚移植に使用されている3種類の代表的な培養液について、保存方法、保存期間を検討したので報告した。

文 献

- 1) Trounson, A. and Conti, A.: Research in human in vitro fertilization and embryo transfer. Br. Med. J. 285: 244, 1982
- 2) Jones, H. W., Jr., Jones, G. S., Andrews, M. C., Acosta, A., Bundren, C., Garcia, J., Sandow, B., Veeck, L., Wilkes, C., Witmyer J., Wortham, J. E., and Wright, G.: The program for in vitro

- fertilization at Norfolk. Fertil. Steril. 38: 14, 1982
- 3) 星 和彦：授精法と受精卵培養法，臨婦産，39：781，1985
 - 4) 野田洋一，矢野樹里，森崇英：今後の医学的問題，臨婦産，39：817，1985
 - 5) Lopata, A., Johnson, I. W. H., Hoult, I. and Speirs, A. I.: Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by *in vitro* fertilization of a preovulatory egg. Fertil. Steril. 33: 117, 1980
 - 6) 森 崇英，松下光彦：体外受精の現況，産婦治療，47：191，1983
 - 7) Hoppe, P. C. and Pitts, S.: Fertilization in vitro and development of mouse ova, Biol. Reprod. 8: 420, 1973
 - 8) Steptoe, P. C. and Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 2: 336, 1978
 - 9) 鈴木秋悦，遠藤芳広，倉沢滋明：体外受精と受精卵の培養法，産と婦，50：2033，1983
 - 10) 上原茂樹，対木 章，干田 智，今泉英明，星合晃，鈴木雅洲：体外受精・胚移植における培養諸条件についての検討，受精着床'84：69，1984
 - 11) Edwards, R. G.: The growth of human preimplantation embryos in vitro, Am. J. Obstet. Gynecol. 141: 408, 1981
 - 12) Trouson, A. O.: Extracorporeal fertilization and embryo transfer, Clin. Obstet. Gynaecol. 8: 681, 1981
 - 13) 鈴木雅洲：体外受精・胚移植〈基礎と臨床〉：P183，金原出版，1985
 - 14) Ackerman, S. B., Swanson, R. J., Adams, P. J., and Wortham, J. W. E., Jr.: Comparison of stains and culture media used for mouse *in vitro* fertilization. Ganete Res. 7: 103, 1983

Study of preserved media used for mouse embryo

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

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

In procedures related to human *in vitro* fertilization and embryo transfer, the culture media and methods of preservation differ with the hospital. We observed the culture media and the period of preservation, as related to mouse embryo development. The Ham's F-10, Whittingham's T₆ and mBWW culture media were compared with findings in case of cold storage (4°C) and refrigeration (-30°C). The preservation period was for 3, 7, 10, 20 and 30 days in case of cold storage and for 7, 10, 30 and 60 days refrigeration. The rates of blastocyst in Ham's F-10 were significantly lower than those in Whittingham's T₆ and mBWW. With the cold storage, the same rates of blastocyst were seen with preserved and non-preserved media, for up to 20 days. With refrigeration, the rates of blastocyst in Whittingham's T₆ and mBWW did not relate with the preserved period.

Thus with Whittingham's T₆ and mBWW media, the rates of blastocyst were higher, and up to 20 days with cold storage was better than findings with refrigeration, however, the latter was better for long term effects.

(受付：1988年9月7日)

THE EFFECTS OF ANTI-LH SERUM AND SODIUM PENTOBARBITAL ON SUPEROVULATION IN RAT

Satosi KAGABU and Kouichi MAMBA

Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture,
Yamaguchi University, Yamaguchi 753, Japan

Abstract: The effects of LH on follicular atresia and ovulation in superovulation were investigated. There are 2 patterns in LH secretion, pulstile secretion and ovulatory surge. When remove the LH with anti-LH serum, there is no ovulation. However, treatment with sodium pentobarbital, blockade the ovulatory surge, resulted large number of ova shed about 100 per rat.

The results of this study suggested that low levels of LH are needed for follicular development and maturation even in PMSG-primed cycling rats.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 336–339, 1989)

Introduction

The method of superovulation was established by Cole¹⁾ who was able to induce the ovulation of up to 55 ova with a single injection pregnant mares' serum. Several investigators have studied the increase of the number of ova shed in superovulation treated adult rats. But the average number did not rise more than 50 ova per rat. It has been previously reported by Kagabu²⁾ that the number of ova shed increased about 100 ova using sodium pentobarbital, and that sodium pentobarbital is effective to maintain the ability of antral follicles to ovulated at least until the day of hCG injection. In the report it has been suggested sodium pentobarbital is effective by blockade the lutenizing hormone (LH) surge in PMSG treated rats.

The purpose of the present investigation was to determined the effect of LH on ovulation by blockade with anti-LH serum or sodium pentobarbital.

Materials and Methods

Animals;

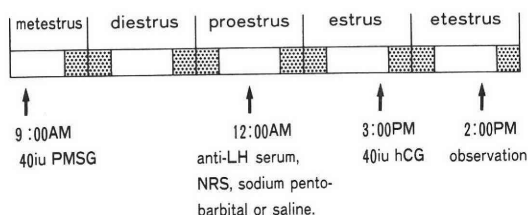
Twelve weeks of age virgin female rats of the Wistar-Imamichi strain were maintained under of light schedule of 14h light and 10h dark (lights of 7:00AM). The midpoint of dark period is considered as "midnight, colony time" and all times are reported in relation to that. Food and water were supplied *ad libitum*. Vaginal smear were taken daily before 9:00AM for at least 2 consecutive cycles before any treatment was administered. Only animals showing regular 4-day cycles were used in the experiment.

Preparation and characterization of anti-LH serum;

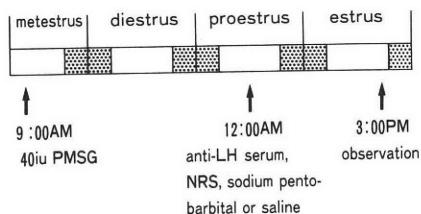
Anti ovine LH serum was prepared by immunizing the rabbit with ovine LH (NIAMDD-oLH-22) emulsified in Freund's complete adjuvant. The binding capacity of the anti ovine LH serum with rat LH was determined by using ¹³¹I-labelled rat LH (NIAMDD-Rat LH-I-5). Eighty percent of rat LH (9ng) was bound to 200μl of diluted anti-serum (1:50). The percent binding of ¹³¹I-labelled rat LH with this anti-serum was reduced to 27.7% and slightly reduced to 92.5% by 10ng of rat LH (NIAMDD-Rat LH-I-5) and rat FSH (NIAMDD-Rat FSH-I-5), respectively, when the final antiser-

um dilution was 1:10000. Rat prolactin (NIAMDD-Rat PRL-I-5) did not reduce the percent binding of 125 I-labelled rat LH with the antiserum. The minimum amount of antiserum required to block ovulation in cycling proestrus animals were 0.2ml when injected i.v.³⁾

experiment 1.



experiment 2.



Experimental schedules;

experiment 1. Effect of anti-LH serum on the number of ova shed in superovulation adult rat

Rats were divided into 4 groups:

Group 1: Anti-LH serum treatment.

The rats were injected first, with 40iu PMSG (Serotropin, Teizo) at 9:00AM on the day of metestrus, second after 51h with 0.2ml anti-LH serum. On the next day females were injected 40iu hCG (Gonotropin, Teizo) i. m., and after 23h killed and number of ova shed in oviduct were counted.

Group 2: Normal rabbit serum treatment.

Forty iu PMSG-primed rats were injected 0.2ml of normal rabbit serum (NRS) i. v. Rats which were treated in the same manner as group 1.

Group 3: Pentobarbital treatment.

PMSG-primed rats were injected 4mg/100gB. W. of sodium pentobarbital (Nembutal, Abbot) i. p. at 12:00AM on the day of proestrus, "critical period" in the laboratory. Rats which were treated in the same manner as group 1.

Group 4: Controls.

PMSG-primed rats were given an i. p. injection of 0.2ml saline instead of sodium pentobarbital at 12:00AM on the day of proestrus. They were given an i. m. injection of 40iu hCG and killed after 23h.

experiment 2; Effect of anti-LH serum on the number of non-atretic follicles expected to ovulation and early atretic follicles.

Rats were divided 4 groups:

Group 1: Anti-LH serum treatment.

The rats were injected first, with 40iu PMSG at 9:00AM on the day of metestrus second, after 51h with 0.2ml anti-LH serum. Animals were killed at the time corresponding to hCG injection time in experiment 1. Ovaries removed, fixed, embedded in paraffin, serially sectioned at 15 μ m and stained with Meyer's haematoxylin and eosin. The largest diameter of a follicle appearing in serial sections and another one at right angles to it were measured by micrometer; the mean of the two values was taken as the average diameter. The non-atretic follicles $\geq 550\mu$ m in diameter was measured from the basement membrane to the basement membrane. Follicles, classified as non-atretic and early atretic with reference to criterion of Braw & Tsafiriri⁴⁾, were recorded.

Group 2: Normal rabbit serum treatment.

PMSG-primed animals were injected 0.2ml of NRS i. v. Rats were treated same procedures as described above.

Group 3: Sodium pentobarbital treatment.

PMSG-primed females were injected 4mg/100gB. W. of sodium pentobarbital i. p. at "critical period"⁵⁾. Rats were treated in the same manner as group 1.

Group 4: Controls.

Rats which were treated in the same manner as described above, exclusive of injection of 0.2ml saline i. p. instead of sodium pentobarbital injection (Fig. 1).

Results

Ovulation

All the superovulation animals given anti-LH serum did not ovulated. Rats, received NRS instead of anti-LH serum, ovulation occurred in

Table 1 Effect of LH on the number of ova shed in superovulation cycling rats eliminated several manners.

Treatment	Rats ovulating/ rats examined	No. of ova (Mean $\pm$ SEM)
PMSG 40 iu + Anti-LH serum 0.2 ml + hCG 40 iu	0/5	—
PMSG 40 iu + Normal rabbit serum 0.2 ml + hCG 40 iu	5/5	25.1 $\pm$ 7.6
PMSG 40 iu + sodium pentobarbital 4mg/100gB.W. + hCG 40 iu	5/5	100.1 $\pm$ 9.8
PMSG 40 iu + saline 0.2 ml + hCG 40 iu	5/5	23.5 $\pm$ 6.9

PMSG were injected i.m. at 9:00 AM on the day of metestrus and after 51h with 0.2 ml anti-LH serum. Next day rats were injected 40 iu hCG at 3:00 PM, and killed 23h after hCG injection.

Table 2 Effect of LH on the number of follicles morphometrically.

Treatment	No. of follicles $\geq 550\mu\text{m}$ (Mean $\pm$ SEM)	
	non-atretic	early atretic
PMSG 40 iu + Anti-LH serum 0.2 ml	16.5 $\pm$ 6.6	81.1 $\pm$ 7.2
PMSG 40 iu + Normal rabbit serum 0.2 ml	22.7 $\pm$ 8.2	79.2 $\pm$ 6.9
PMSG 40 iu + sodium pentobarbital 4mg/100gB.W.	102.6 $\pm$ 9.8	5.9 $\pm$ 4.0
PMSG 40 iu + saline 0.2 ml	22.5 $\pm$ 7.1	77.8 $\pm$ 5.9

PMSG, anti-LH serum, sodium pentobarbital and saline are administered by same manner as footnote of Table 1. One group consists 5 rats.

100% of animals. In the rats injected with sodium pentobarbital occurred ovulation about 100 ova shed per rat. Saline-injected control rats had ovulated 20.6ova per rat (Table 1).

Non-atretic and early atretic follicles

The effects of anti-LH serum on the number of the non-atretic follicles is shown in Table 2. The rats recieved anti-LH serum, NRS or saline control had the follicles less than the rats administered with sodium pentobarbital ($P < 0.05$). In the rats given anti-LH serum, NRS or saline, there were a great number of early atretic follicles than the rats injected sodium pentobarbital.

Discussion

In rats, follicles of over $550\mu\text{m}$ in diameter at early estrus destine to ovulate⁶⁻⁹). Thus, it has been considered that these follilcles $\geq 550\mu\text{m}$ are Graffian follicles. On the other hand, the development of greater than normal number of Graffian follicles has been stimulated in cycling rat by the administration of PMSG. In this way a single injection of 40iu PMSG induced an acceleration of the number of follicles of over $550\mu\text{m}$ up to about 110 per animal 78h after administration. However, the injection of 40iu hCG to increase the number of ovulations; resulted in a number of ovulations that was much smaller than the number of large follicles²).

As mentioned earlier, LH leads a follicular lutenization, which looks like atresia on large follicles. While, the existence of LH ovulatory surge in PMSG-primed rats as well as cycling rats were confirmed¹⁰). Therefore, this suggests the possibility that large number of ovulation occur to remove the LH with anti-LH serum. However, there is no ovulation using anti-LH serum. Schwartz & Ely¹¹), Schwartz¹²) described that pituitary hormones, probably both FSH and LH, are needed continously at low levels through the next stage all the way to maturity; in the even temporary absence of low levels of LH, atresia begin and responsitivity to gonadotrophins surge is lost. In this present study, elimination of the LH on proestrus by mean of an anti-LH serum, prevented the follicular development and mor-

phological sign, karyo pycnosis in granulosa cell, of follicular atresia appeared on the day of estrus.

There are two patterns in LH secretion, one of them are pulstile secretions and the other are ovulatory secretions. Clearly, sodium pentobarbital can block only ovulatory release of LH¹³⁾. In recent study¹⁰⁾, made certain of the truth of matter that ovulatory surge are blocked by sodium pentobarbital only administration at "critical period" by radioimmunoassay.

Therefore, treatment with sodium pentobarbital resulted large number of ova shed about 100 per rat. The number of ova shed increases to amount 100% of Graffian follicles expected to ovulation. This study supports the suggestion of Schwartz & Ely¹¹⁾, Schwartz¹²⁾ that lack of low levels of LH, atresia begins. In conclusion, the results of this study in conjunction with the results of previous report strongly suggest that low levels of LH are needed for follicular development and maturation even in PMSG-primed cycling rats.

Acknowledgement

The authors wish to thank to Dr. Honda, Dr. Umezu, Dr. Sugawara and Dr. Masaki for providing the anti-LH serum.

References

- 1) Cole, H. H.: On the biological properties of mare gonadotropic hormone. *Am. J. Anat.* 59, 299, 1936
- 2) Kagabu, S.: Follicular response of adult rats to PMSG and effect of sodium pentobarbital on number of ova shed in superovulation treated rats. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 29, 20, 1983
- 3) Honda, K., Umezu, M., Sugawara, S. and Masaki, J.: Blockade of post-partum ovulation by anti-luteinizing hormone serum in lactating rats. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 29, 63, 1983
- 4) Braw, R. H. and Tsafiriri, A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fert.* 59, 267, 1980
- 5) Everett, J. W. and Sawyer, C. H.: A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 47: 198, 1950
- 6) Mandl, A. and Zuckerman, S.: Cyclical changes in the number of medium and large follicles in

the adult rat ovary. *J. Endocrin.* 8: 341, 1952

- 7) Hashizume, K., Sugawara, S. and Takeuchi, S.: The follicular development and oocyte maturation with special reference to the release of ovulating hormone in post-partum rats. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 21: 28, 1975
- 8) Hashizume, K., Sugawara, S., Takeuchi, S. and Masaki, J.: Follicular development and oocyte maturation in rats just before and after parturition induced by prostaglandin F2 α . *Jpn. J. Anim. Reprod.* 23: 148, 1977
- 9) Kagabu, S. and Ishibashi, I.: Effect of PMSG injection on follicular development in adult rats. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 28: 1, 1982
- 10) Kagabu, S. and Umezu, M.: The inhibition of LH discharge by pentobarbital administration in adult rats priming with PMSG. *Jpn. J. Fert. Ster.* 29, 279, 1984
- 11) Schwartz, N. B. and Ely, C. A.: Comparison of effects of hypophysectomy, antiserum to ovine LH, and ovariectomy on estrogen secretion during the rat estrus cycle. *Endocrinology*, 86: 1420, 1970
- 12) Schwartz, N. B.: The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol. Reprod.* 10: 236, 1974
- 13) Nakai, Y., Kou, T. and Kinoshita, F., "Mammalian Reproductive Physiology", p 143, Softscience Press, Tokyo, 1982

過剰排卵誘起処理ラットにおよぼす 抗 LH 血清および ペントバルビタール塩の影響

山口大学農学部獣医学科

利部 聡 萬場光一

過剰排卵処理ラットにおよぼす LH の機能を解明するために、抗 LH 血清を投与して卵胞の閉鎖ならびに排卵を観察した。抗 LH 血清投与により排卵はまったく認められなくなった。一方、排卵に至ると考えられるグラーフ卵胞は、同血清投与により大部分が閉鎖した。LH 分泌には、持続性分泌と排卵性分泌が知られているが、ペントバルビタール塩を投与して後者のみを除去したばあい、初期閉鎖卵胞が減少し排卵数が増加した。以上の結果から卵胞の発育および排卵には、LH が必要でありその量は持続性分泌量に相当するものと考えられた。

(受付: 1988 年 8 月 18 日)

APPEARANCE OF UNFERTILIZED OVA CLEAVING IN THE AMPULLA OF THE UTERINE TUBE AFTER REPEATED OVULATION INDUCEMENT

Kiichi KANAYAMA, Tadashi SANKAI, Tuyoshi ENDO
and Yuzi SAKUMA

Department of Veterinary Physiology,
College of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252, Japan

Abstract: By repeating superovulation or induced ovulation on mice, cleavage occurred at a high percentage in unfertilized ova in the ampulla of the uterine tube. In the present investigation, we studied the relation between the frequency of treatment repetition and the incidence of cleaved unfertilized ova.

The superovulation group received 5iu of PMSG—5iu of hCG, and the two induced ovulation groups received either 5iu of hCG or 10iu of PMSG. The treatment was unrepeated or repeated 2 to 5 times at intervals of 5 days, and the ovulated ova in the ampulla of the uterine tube were examined 24 hours after the hormone administration. In each of the three experimental groups, the first treatment brought about cleaved unfertilized ova in the ampulla in 1.5% or less. With the repetition of the treatment, the ovulatory responses reduced. On the other hand, the ratio of cleaved ova to the total ovulated ova increased in any of the experimental groups, especially at the third treatment and thereafter. Morphologically, most of the unfertilized ova already cleaving in the ampulla had developed further than the 8-cell stage, some looking like morulae. Their cleavage was ununiform for the most part.

It has been found that unfertilized ova can begin cleaving as degeneration progresses with the lapse of sufficient time. The present study demonstrated that, when superovulation or induced ovulation was repeated on the same animal, the ova produced began to degenerate sooner than normally ovulated ova.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 340~344, 1989)

Introduction

It is known that most of the ova obtained by superovulation or induced ovulation are morphologically normal, as confirmed by the embryo transfer¹⁾. However, there are reports on occasional abnormalities in some of such ova²⁾.

It has been demonstrated, on the other hand, that spontaneously ovulated, unfertilized mammal ova can begin cleaving, though on rare

occasions, within the ovary or oviduct³⁻⁵⁾. Ishibashi⁶⁾ showed that ovulated and unfertilized ova of the rat began to cleave as time lapsed. This type of cleavage is regarded as a process of fragmentation of unfertilized ova⁵⁾, though it may be very rarely attributed to parthenogenesis⁷⁾.

We had experienced that, when mice which were not mated were repeatedly treated with superovulation or induced ovulation, cleavage of ova occurred in the oviduct at a high percentage.

No normal fertilization could be expected of such ova, which had already begun cleaving in the ampulla of the uterine tube. In the present investigation, we studied on mice the incidence and morphology of the unfertilized but cleaved ova.

Materials and Methods

The animals used were nulliparous mice of ddY strain aged 8 weeks at the start of the experiments. They were kept under artificial illumination, i. e., lamps were lighted for 14 hours a day, between 6:00 a. m. to 8:00 p. m., with free access to feed and water.

The superovulation group was given, with no regard to the animal's estrous cycle, 5iu of PMSG at 5:00 p. m. and then 5iu of hCG 48 hours later. The two groups of induced ovulation received, irrespective of their estrous cycle, either 5iu of hCG or 10iu of PMCG. All these gonadotropins were administered by means of subcutaneous injection. Each of the three experimental groups was subdivided into five subgroups receiving the superovulation or ovulation inducement treatment 1, 2, 3, 4, and 5 times. The intervals between the treatments were 5 days throughout the experiments, and each of the subgroups consisted of 10 animals.

Ovulation was confirmed by laparotomizing the animals 24 hours after the hCG injection to the superovulation group and 24 hours after the hCG or PMSG injection to the induced ovulation groups. The ova in the ampulla of the uterine tube were microscopically counted to yield the number of ovulated ova. They were also subjected to morphological observation.

Results

Superovulation can be induced in the mouse by injecting 5iu of PMSG and 5iu of hCG at an interval of 48 hours. Table 1 shows the incidences of ovulation and the unfertilized but cleaved ova resulting from the repeated superovulation treatment. Our present procedure for superovulation yielded at the first trial approximately 3 times as many ova as are obtained by physiological ovulation. That is, 338 ova were obtained from the 10 animals, of which 5 were cleaved unfertilized ova.

Table 1 Cleavage rate of unfertilized ova in repeated superovulation treatment with 5iu of PMSG and 5iu of hCG

	Treatment times				
	1	2	3	4	5
No. of mice examined	10	10	10	10	10
No. of mice ovulated	10	10	6	5	2
No. of ova examined	338	131	85	36	10
No. of ova cleaved	5	9	8	12	5
% cleaved	1.5	6.9	9.4	33.3	50.0

When the superovulation treatment was repeated, the ovulatory responses (ovulation positivity and average number of ovulated ova) were remarkably reduced. That is, the ovulation positivity was kept at 100% up to the second treatment; then it fell to 60% at the third, 50% at the fourth, and 20% at the fifth treatment. With the reduction in the ovulation positivity, the number of ova examined reduced, too; the second treatment yielded 131, the third 85, the fourth 36, and the fifth 10 ova. On the other hand, the ratio of cleaved ova sharply increased; 6.9% at the second, 9.4% at the third, 33.3% at the fourth, and 50% at the fifth treatment.

When ovulation is artificially induced, the number of the resulting ova is comparable to that from spontaneous ovulation. The results of repeated ovulation inducement are given in Table 2 (with hCG) and Table 3 (with PMSG). In these two experimental groups, the ratio of cleaved unfertilized ova was less than 1% at the first treatment. As the treatment was repeated, however, the ratio rose remarkably. As seen on Fig. 1, the increase in the incidence of abnormal cleaved

Table 2 Cleavage rate of unfertilized ova in repeated induced ovulation treatment with 5iu of hCG

	Treatment times				
	1	2	3	4	5
No. of mice examined	10	10	10	10	10
No. of mice ovulated	10	10	7	5	4
No. of ova examined	113	121	61	43	20
No. of ova cleaved	1	7	9	9	8
% cleaved	0.9	5.8	14.8	20.9	40.0

ova followed a similar pattern among the super-ovulation group and the two induced ovulation groups.

The incidence of abnormal cleaved ova at the first treatment was very low in all the three experimental groups. At the third treatment and thereafter, however, the ratio rose rapidly in any of the groups. Thus, as either superovulation or induced ovulation was repeated, the number of ovulated ova reduced and abnormal cleaved ova increased.

Fig. 2 shows the unfertilized ova with abnormal cleavage we obtained in the present experiments. Morphologically, most of these ova were at a more advanced stage than the 8-cell stage. No morphological difference was detected among such abnormal ova from the three experimental groups. The cleavage in the unfertilized ova was usually found to be more uneven compared to the normal cleavage.

Table 3 Cleavage rate of unfertilized ova in repeated induced ovulation treatment with 10iu of PMSG

	Treatment times				
	1	2	3	4	5
No. of mice examined	10	10	10	10	10
No. of mice ovulated	10	10	10	5	2
No. of ova examined	124	129	115	27	10
No. of ova cleaved	0	6	10	15	6
% cleaved	0	4.7	8.7	55.6	60.0

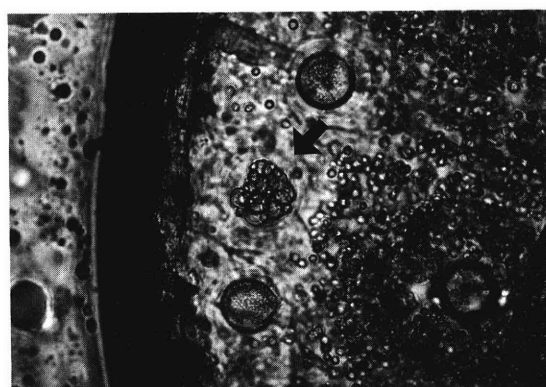


Fig. 2 Unfertilized ovum cleaving in the ampulla of the uterine tube after repeated ovulation induction in mouse

Discussion

No morphological abnormality is demonstrated in the ova obtained by superovulation or induced ovulation. Most of the ova resulting from such an artificial treatment with hormones are considered normal, as the results of incubation, chromosome

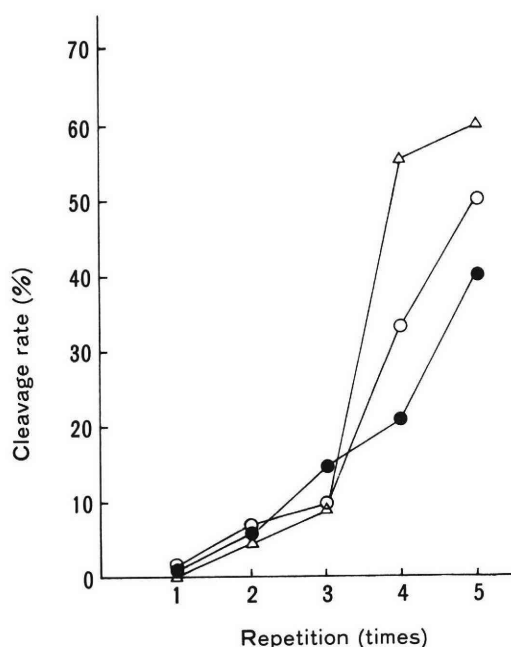
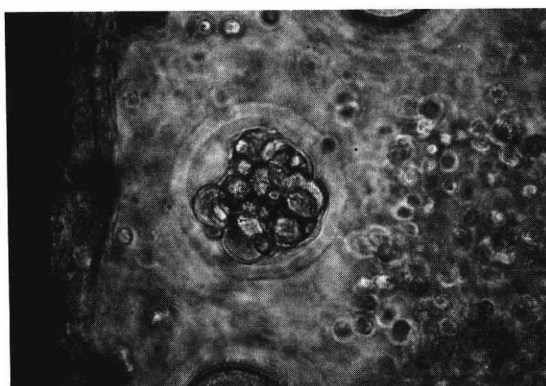


Fig. 1 Cleavage rate of unfertilized ova in the ampulla of the uterine tube in mice. —○— indicates cleavage rate in repeated superovulation treatment with 5iu of PMSG and 5iu of hCG; —●—, that in induced ovulation treatment with 5iu of hCG; —△—, that in induced ovulation treatment with 10iu of PMSG



test, as well as embryo transfer and fetus development indicate.

Sakuma and Ishijima¹⁾ transferred superovulated ova of the rabbit to recipients and obtained many normal young. Kasai et al.⁸⁾ fertilized superovulated ova of the mouse *in vitro* and confirmed the development of those ova into fetuses. They further showed the fertility of such offsprings.

There have been reports, on the other hand, that a few abnormal ones are included among ova obtained from rats, mice, rabbits, and sheep subjected to superovulation or induced ovulation^{9,10)}. Those abnormal ova are known to be mostly gigantic or immature.

Ishibashi⁶⁾ further revealed that unfertilized ova of the rat began to cleave in the oviduct as time passed. He stated that, though all the unfertilized ova had remained in the single-cell stage up to 17 hours after the ovulation, many of them showed cleavage in post-ovulatory 50 hours. Charlton¹¹⁾ maintained that unfertilized ova of the mouse became fragmenting ova with two or more nuclei in the uterus or oviduct, until they were decomposed and absorbed by phagocytes. Thus, it has been fairly long established knowledge that ova obtained by induced ovulation include a few abnormal ones and that unfertilized ova develop cleavage in the oviduct.

In mice, superovulation with PMSG and hCG is believed to cause ovulation 12-14 hours after the administration of hCG¹²⁾. Our observation of the ova 24 hours after the hCG injection means, therefore, that we observed them 10-12 hours after the ovulation. By this time they were in the ampulla of the uterine tube where fertilization is to take place. Degenerative cleavage was observed while unfertilized ova were descending the oviduct^{6,11)}. Our present study demonstrated that repeated superovulation or ovulation inducement increased cleavage of unfertilized ova in shorter time after the ovulation. It was speculated that such cleavage of unfertilized ova, already existing when they reached the ampulla of the uterine tube, would prevent them from normal fertilization.

In the present study, the cleaved unfertilized ova constituted 1.5% or less at the first treatment; as the treatment was repeated, their ratio sharply

increased. It was thus indicated that, when superovulation or induced ovulation was repeated on the same animal, the resulting ova began to degenerate sooner than normally ovulated ones. It might be possible that these ova had already cleaved even at the time of ovulation. That is, there must have been some ova which had already in the process of retroplasia in ovarian follicles and were ovulated by virtue of the hormone treatment.

Most of the abnormal ova we observed were more advanced than at the 8-cell stage. As mentioned before, we observed them 10-12 hours after the ovulation. If we studied them at an earlier time, we could have found ova at an earlier stage of cleavage as Ishibashi had observed^{5,6)}.

It has been reported that, in embryo transfer practiced on domestic animals, especially on cows, repetition of superovulation on the same donor results in an increasingly smaller number of ovulated ova¹³⁾. In such cases, the recovery rate of normal fertilized ova can also be affected, as the results of the present study strongly suggested. If an ovulation inductive agent is repeatedly given to a woman with no ovulatory function and then ovulation is induced, the produced ova may well have no fertilizing ability.

It is our belief that repeated superovulation or ovulation inducement at short intervals is one of the factors for the development of unfertilized ova with abnormal cleavage. Our concern is now focused on the relationship between the hormone treatment interval and the incidence of abnormal ova. We hope to report on it in the near future.

References

- 1) Sakuma, Y. and Ishijima, Y.: Studies on the transfer of superovulated ova in the rabbit. Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ. 20: 53, 1965
- 2) Sekiya, Y.: Study on the normality of ova ovulated by induction with gonadotropin—with special reference to their ability for fertilization and development—J. Nihon Univ. Med. Ass. 41: 707, 1982
- 3) Spalding, J. F., Berry, R. O. and Moffit, J. G.: The maturation process of the ovum of swine during normal and induced ovulations. J. Anim. Sci. 14: 609, 1955
- 4) Austin, C. R.: Activation of eggs by hypother-

- mia in rats and hamsters. J. Exp. Biol. 33: 338, 1956
- 5) Ishibashi, I.: Cytological observations on cleavage of the unfertilized ovum of rat. Jpn. J. Zootech. Sci. 32: 291, 1961
 - 6) Ishibashi, I.: On cleavage of the unfertilized ovum of rat. Jpn. J. Zootech. Sci. 30: 212, 1959
 - 7) Smith, S. C.: Degenerative changes in the unfertilized uterine eggs of the opossum, with remarks on the so-called parthenogenesis in mammals. The American Journal of Anatomy, 35: 81, 1925
 - 8) Kasai, K., Sugimoto, M. and Toyoda, Y.: Normal progeny produced by parents derived from mouse eggs fertilized *in vitro*. Jap. J. Zootech. Sci., 50: 885, 1979
 - 9) Austin, C. R. and Braden, W. H.: Anomalities in rat, mouse, and rabbit eggs. Aust. J. Biol. Sci. 7: 537, 1954
 - 10) Averill, R. L. W.: The production of living sheep eggs. J. Agric. Sci. 50: 17, 1958
 - 11) Charlton, H. H.: The fate of the unfertilized egg in the white mouse. Biol. Bull. 33: 321, 1917
 - 12) Edward, R. G. and Gates, A. H.: Timing of the stages of the maturation division, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. J. Endocrin. 18: 292, 1959
 - 13) Jainudeen, M. R., Hefez, E. S. E., Gollnick, P. D. and Moustafa, L. A.: Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. Am. J. Vet. Res. 27: 669, 1966

排卵誘起の反復後に卵管膨大部内で 分割像を示す未受精卵子の出現について

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

金山喜一, 山海 直, 遠藤 克
佐久間勇次

マウスに過排卵誘起処理または誘起排卵処理を反復した場合に、未受精卵子であるにもかかわらず卵管膨大部内で分割像を呈している卵子を高率に認めた。そこで、過排卵誘起処理および誘起排卵処理の反復回数と異常分割像を示す未受精卵子の出現頻度との関連性について検討を加えた。

PMSG5iu-hCG5iu による過排卵誘起試験群、hCG5iu または PMSG10iu による誘起排卵試験群について、それぞれの処理を5日間隔で1～5回まで反復し、ホルモン投与後24時間目に卵管膨大部内の排卵卵子について検索した。

過排卵誘起試験区および2つの誘起排卵試験群は、いずれも1回目の処理においては卵管膨大部内で分割像を示す未受精卵子の出現率は1.5%以下であった。また、過排卵誘起処理または誘起排卵処理を反復すると排卵反応（排卵陽性率および平均排卵数）は減少した。一方、排卵卵子に占める分割像を示す卵子の割合は増加し、いずれの試験群においても3回目以降の反復処理において急激に増加した。卵管膨大部においてすでに分割像を呈している未受精卵子の形態は、多くのものが8分割期より多くの割球を有し、morula 様を呈しているものもあった。これらの卵子の割球は不均等分割を呈しているものが大部分であった。

未受精卵子においても排卵後、長時間が経過すると退行・変性に伴ない分割を開始することが知られている。同一個体に過排卵処理あるいは誘起排卵処理を反復して行くと、得られた排卵卵子は正常排卵卵子に比べて、より早く退行・変性を開始することが本研究によって示された。

(受付: 1988年7月20日)

マウス初期胚の体外発育に及ぼす EDTA および BSA の影響

Effect of EDTA and BSA on Development of Mouse Zygotes *In Vitro*

ヤクルト本社中央研究所動物実験施設

金 純 高橋 徳太郎
Jun KIM Tokutarou TAKAHASHI

Department of Laboratory Animal Sciences,
Yakult Central Institute for Microbiological Research, Tokyo 186, Japan.

本実験では、ICR, C57BL/6N, B6C3F1 (C57BL/6N×C3H/He) および BALB/c 系マウスを対象に、1細胞期卵から胚盤胞までの発育に、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) およびウシ血清アルブミン (BSA) 添加の効果があるかどうかを知るため、各系統の成熟雌に過排卵処理後、同系統の雄を交配して得た1細胞期卵および2細胞期胚を用い、BSAを除去した修正 Whitten 培地に EDTA (100 μ M) のみ、BSA (2.4mg/ml) のみ、または EDTA+BSA を添加し、無添加の場合と比較した。

その結果、本実験に供試した系統の1細胞期卵は、EDTA と BSA 無添加では胚盤胞期には全く発育しない (ICR, C57BL/6N, BALB/c) か、してもわずか 9.9% と低率 (B6C3F1) であったが、EDTA の添加により胚盤胞への発生率が ICR および BALB/c で約 50%, B6C3F1 で約 80 % へと改善された。しかし、C57BL/6N ではあまり改善されなかった。一方、BSA のみの添加では、B6C3F1 (76 %) を除いてはほとんど改善されなかった。EDTA と BSA の両方を添加した場合、ICR, B6C3F1 および BALB/c では EDTA 添加のみと同程度か、若干改善された程度であったが、EDTA および BSA 単独では発生率の低かった C57BL/6N は両方の添加で初めて約 50 % に向上した。なお、2細胞期からの培養では、いずれの系統も EDTA および BSA の添加と無関係に高率に胚盤胞へ発育した。

以上のことから、EDTA は明らかにマウス胚の *in vitro* 2-cell block の解除に役立っていること、また系統によってはその効果発現に BSA が必須であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 345-348, 1989)

緒 言

現在、マウス初期胚の体外培養には、主に Krebs-Ringer 重炭酸塩 (KRB) の改良されたものが使用され、2細胞期胚からは高率に胚盤胞まで発育させられることが周知の事実となっている。しかしながら、1細胞期の受精卵からの培養の場合は、ある種の近交系または近交系間の交雑種で高率に胚盤胞期まで発育することが知られている以外¹⁻⁵⁾、いわゆる *in vitro* 2-cell block が生じるため2細胞期で発生を停止する系統が多く、かりに発生が進んでも胚盤胞

を形成する割合は極めて低い^{1,2)}。そのため、この改善策が種々検討され、現在2-cell blockを生じる系統の1細胞期からの培養にはEDTA添加が有効なことが知られるようになった⁶⁻⁹⁾。また近年、培養液に不可欠とされたBSAは2細胞期胚から胚盤胞期への発育には必要ないこと¹⁰⁾、さらに体外受精卵の胚盤胞期への発育にもEDTA存在下では必要ないことが示唆されている¹¹⁾。

本実験では、マウスにおいて2-cell blockを生じる系統の1細胞期卵から胚盤胞期までの体外発育に、はたしてEDTAの効果があるかどうか、また、EDTA

存在下ではたしてBSAが必要かどうかを再検討した。

材料および方法

本実験には、ICR, C57BL/6N, B6C3F1 (C57BL/6N×C3H/He) および BALB/c 系の成熟マウスを用いた。各系統の雌に、妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG), ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (HCG) 各 5 IU を 48 時間間隔で腹腔内注射し排卵を誘起した。HCG 投与後、雌マウスは同系統の雄と同居させ翌朝腔栓を確認したものを実験に供試した。胚の回収は、1 細胞期卵は HCG 投与後 17~18 時間に、また 2 細胞期胚は HCG 投与後 41~42 時間に、各々動物を屠殺し卵管を灌流することにより行なった。胚の培養には、BSA を除去した修正 Whitten 培地¹²⁾を用い EDTA, BSA 添加の組み合わせは、共に無添加, EDTA のみ, BSA のみ, および EDTA+BSA の 4 通りとした。なお, EDTA の添加量は 100 μ M とし, BSA の添加量は 2.4mg/ml とした。また、培養法は、微小滴法¹³⁾に準じて行ない、培養時間は 72~96 時間とした。培養結果の判定は胚盤胞への発生率によった。

結 果

BSA 除去した修正 Whitten 培地に、EDTA のみ, BSA のみ, または EDTA+BSA を添加してマウス 1 細胞期卵の胚盤胞への発生率を比較し、表 1 に示す成績が得られた。

表 1 から明らかなように、本実験に供試した系統の 1 細胞期卵は、EDTA と BSA 無添加では胚盤胞期には全く発育しない (ICR, C57BL/6N, BALB/c) か、してもわずか 9.9% と低率 (B6C3F1) であったのが、EDTA の添加により胚盤胞への発生率が ICR および BALB/c で約 50%, B6C3F1 で約 80 % へと改善された。しかし、C57BL/6N ではあまり改善されなかった。一方、BSA のみの添加では、B6C3F1 (76.2 %) を除いてはほとんど改善されなかった。EDTA と BSA の両方を添加した場合、ICR, B6C3F1 および BALB/c では EDTA のみ添加で改善されたと同程度または若干高い成績 (BALB/c) を示したが、EDTA および BSA 単独では発生率の低かった C57BL/6N は両方の添加で初めて約 50 % に向上した。

次に、同様の方法で、BALB/c を除く 3 系統の 2 細胞期胚を培養した結果、表 2 の通り、いずれの系統も EDTA および BSA の添加と無関係に高率に胚盤胞へ発育した。

考 察

マウス初期胚の培養において、1 細胞期の受精卵から胚盤胞期への発育は特定の近交系または近交系間の交雑種以外ではいわゆる in vitro 2-cell block が生じるため困難とされており¹⁻⁵⁾、この改善策として EDTA の添加が有効なことが知られている⁶⁻⁹⁾。また近年、マウス初期胚培養用の化学合成培地に不可欠とされていた BSA は、マウス 2 細胞期胚からの胚盤胞期への発育に必要なことなく¹⁰⁾、1 細胞期からの培養でも EDTA 存在下では不必要なことが報告されている¹¹⁾。

本実験では、こうした点から 2-cell block を生じるマウスの系統の 1 細胞期から胚盤胞期への体外発育に、EDTA 添加の効果が普遍的なものかどうか再検討するとともに、BSA の有無の効果も検討した。

本実験で、ICR, C57BL/6N, B6C3F1 および BALB/c の 4 系統のマウスを供試して検討した結果、BSA が欠如していても EDTA の添加さえあれば、胚盤胞へ発生する系統 (ICR, B6C3F1 および BALB/c), EDTA も BSA も単独では発生率が低いのに両者を伴用すれば改善される系統 (C57BL/6N), さらに EDTA および BSA のどちらかが添加されていれば高率に発生する系統 (B6C3F1) の 3 通りのタイプがみられた。このことは、EDTA は明らかに in vitro 2-cell block を解除していること、また、系統によってはその効果発現に BSA が必須であることを示唆していた。いずれにしても今回の実験からも、1 細胞期の受精卵からの培養に EDTA が有効であるという従来の報告⁶⁻⁹⁾を裏付けることができた。また、EDTA 存在下で BSA なしに体外受精卵が胚盤胞へ発育するという後藤ら¹¹⁾の報告は、系統によって普遍的でないと思われた。

この実験に用いた B6C3F1 は、EDTA がなくても BSA が存在すれば高率に胚盤胞へ発生した。この交雑 F1 は、通常の BSA 添加培地 (修正 Whitten 培地) では 2-cell block のない系統と知られているので当然の結果といえる⁵⁾。

同時に検討した各系統の 2 細胞期胚は、EDTA, BSA の添加と無関係に高率に胚盤胞へ発育した。このことは、2 細胞期胚からの培養には BSA の添加を必要としないという高木ら¹⁰⁾の報告を裏付けていた。

本研究の機会を与えられたヤクルト本社中央研究所務台方彦所長ならびに本研究のご指導を賜り有益なご助言をいただいた東京農業大学石島芳郎教授に深謝いたします。

Table 1. Effect of EDTA and BSA on development of mouse zygotes in vitro.

EDTA	BSA	% of embryo developed to 2-cell or blastocyst							
		ICR		C57BL/6N		B6C3F1		BALB/c	
		2-cell	Blast.	2-cell	Blast.	2-cell	Blast.	2-cell	Blast.
—	—	77.8 (42/54) *	0.0 (0/54)	67.1 (57/85)	0.0 (0/85)	80.7 (146/181)	9.9 (18/181)	90.0 (36/40)	0.0 (0/40)
+	—	84.4 (76/90)	50.0 (45/90)	76.6 (95/124)	25.0 (31/124)	87.3 (62/71)	81.7 (58/71)	83.5 (106/127)	51.9 (66/127)
—	+	81.4 (162/199)	2.5 (5/199)	69.5 (107/154)	9.7 (15/154)	94.8 (163/172)	76.2 (131/172)	96.7 (29/30)	23.3 (7/30)
+	+	75.6 (124/164)	55.5 (91/164)	68.4 (39/57)	54.4 (31/57)	85.2 (75/88)	81.8 (72/88)	79.4 (27/34)	67.6 (23/34)

* : No. of embryos developed/No. of zygotes cultured

Table 2. Effect of EDTA and BSA on development of mouse 2-cell embryos in vitro.

EDTA	BSA	% of embryo developed to blastocyst		
		ICR	C57BL/6N	B6C3F1
—	—	84.8 (39/46) *	92.5 (62/67)	86.4 (51/59)
+	—	91.9 (91/99)	92.8 (64/69)	92.3 (24/26)
—	+	89.5 (102/114)	95.1 (39/41)	100.0 (24/24)
+	+	87.5 (105/120)	97.0 (65/67)	100.0 (73/73)

* : No. of embryos developed/No. of embryos cultured

文 献

- Whetten, W. K. and Biggers, J. D. : Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemical defined media. J. Reprod. Fert., 17: 399, 1968
- Kasai, K., Minato, Y. and Toyoda, Y.: Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred strain and F1 hybrids. Japan J. Animal Sci., 24: 19, 1978
- Tunoda, Y., Wakasu, M. and Sugie, T.: Viability of blastocyst and morula culture from I cell stage and transfer to recipient in the mouse. Jpn. J. Zootech. Sci., 56: 417, 1985
- 塩田ゆみ, 角田幸生: 長期間低温保存した培養液 (M 16) によるマウス前核期受精卵の培養並びに移植試験, 哺乳卵研誌, 3 : 91, 1986
- 鈴木宏志, 富樫 守, 宮井達也, 岡本道生: 体外受精に由来する透明帯除去マウス胚の培養および移植成績について, 哺乳卵研誌, 4 : 55, 1987
- Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H.: The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev. Biol., 61: 378, 1977
- 星 雅樹, 豊田 裕: 体外受精に由来するマウス胚発生におよぼす EDTA の効果, 日畜会報, 56 : 931, 1985
- 木村資重利, 小島博子, 横山峯介, 勝木元也: マウス受精卵の体外培養法の検討, 哺乳卵研誌, 2 : 43, 1985
- Suzuki, H. and Toyoda Y.: Normal young from in vitro fertilized mouse embryos developed in a medium supplemented with EDTA and transferred to pseudopregnant recipients. J. Mamm. Ova. Res., 3: 78, 1986
- 高木優二, 菅原七郎, 正木淳二: B S A 無添加培地におけるマウス胚の培養および移植成績, 哺乳卵研誌, 5 : 38, 1988
- 後藤和文, 高木優二, 中西喜彦, 小川清彦: 蛋白質無添加培地におけるマウス卵子の体外受精および胚発生, 家畜繁殖誌, 32 : 1, 1986
- 勝木元也: マウス初期胚の培養と顕微操作, 生体の科学, 35 (2) : 90, 1984

Effect of EDTA and BSA on development of mouse early embryos *in vitro*

Jun Kim and Tokutarou Takahashi

Department of Laboratory Animal Sciences,
Yakult Central Institute for
Microbiological Research,
Tokyo, 186 Japan.

This study examined the effect of EDTA or BSA on development of mouse early embryos in vitro using the strain of ICR, C57BL/6N, B6C3F1 (C57BL/6N×C3H/He) and BALB/c.

Zygotes or 2-cell embryos were collected from superovulated and mated female mice of each strain.

One-cell Zygotes or 2-cell embryos were cultured in modified Whitten's medium supplemented with EDTA (100 μ M), BSA (2.4 mg/ml) or EDTA (100 μ M) plus BSA (2.4 mg/ml) at 37°C in a CO₂ incubator. The modified Whitten's medium without EDTA and BSA was used as a control.

Zygotes in the medium without EDTA and BSA failed to develop to blastocyst, but 9.9 % of zygotes of B6C3F1 developed into blastocyst. In the medium

supplemented with EDTA, the rate of development of zygotes to the blastocyst was 50.0 % for ICR, 25.0 % for C57BL/6N, 81.7 % for B6C3F1, and 51.5 % for BALB/c. The development of zygotes to the blastocyst in the medium containing BSA was lower (2.5~23.3 %) except 76.2 % of B6C3F1. In the medium supplemented with EDTA and BSA, the rate of development of zygotes to the blastocyst was 55.5 % for ICR, 54.4 % for C57BL/6N, 81.8 % for B6C3F1 and 67.6 % for BALB/c. Development of C57BL/6N zygotes to the blastocyst was enhanced in the medium supplemented with EDTA and BSA than in the medium containing EDTA alone. More than 84 % of 2-cell embryos developed into blastocysts in the medium supplemented with or without EDTA and BSA.

The results suggest that the development of the zygotes of ICR, C57BL/6N and BALB/c to the blastocysts require EDTA, and further development of C57BL/6N zygotes require BSA in addition to EDTA.

(受付：1988年8月31日)

ヒツジ切断2分離胚の自家移植

Auto-transplantation of Bisected Embryos in the Sheep

農林水産省畜産試験場繁殖部

角 田 幸 生

Yukio TSUNODA

Department of Reproduction, National Institute of Animal Industry,
Ibaraki 305, Japan.

自然交配後7～8日目に開腹手術によって子宮灌流を実施し、黄体数と同数の卵子が回収され1個以上の正常胚を有していた15頭(44%)のヒツジについて、切断胚の自家移植試験を行なった。回収された胚の発育ステージは胚盤胞及び脱出胚盤胞であり、ガラス針あるいは金属性微小刃で均等に切断2分離後、胚を回収したと同じ動物に切断胚を1個ずつ1組となるように両側子宮角へ移植した。その結果、2頭が一卵性双子を、5頭が単子を分娩した(分娩率、47%)。生時体重、妊娠期間はいずれも正常値内であり、奇形などの異常は観察されなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 349-352, 1989)

緒 言

顕微操作技術の進展にともない、1個の初期胚を2個に分離あるいは切断し、それぞれを受卵雌に移植して一卵性産子を得ることがマウス、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマなどの多くの哺乳動物種で可能になってきている^{1,2)}。一卵性双子作出技術は、同一の遺伝形質をもつ個体を作出できる、貴重な胚を有効に利用できる、異性の複数胚を移植したときに生じるフリーマーチン(雌が不妊になる現象)を阻止できる、2分離胚の一方の性染色体を検査することにより残りの胚の性を予知できる、凍結保存技術を併用することによって年齢の異なる同一遺伝形質をもつ個体を作出できるなどの多くの理由から畜産分野においては要望が強い。そのため、1979年³⁾以来多くの試験研究が実施されてきており、現在ではウシにおいては実用的な技術として利用できるまでになってきている⁴⁾。この技術には、優れた遺伝形質を有する供卵雌に対する過剰排卵誘起処置、胚の切断、切断胚の保存ならびに受卵雌への移植などの一連の技術が含まれる。しかしながら、胚を採取した

供卵雌は異常な内分泌環境下にあるため、一定の期間受卵雌として供試することはできない。一方、野生動物や個体数の限られている動物種に胚の切断技術を応用して産子数の増加をはかる場合、胚を採取したと同一の供卵雌にも移植(自家移植)できることが望まれる。Willadsen and Godke⁵⁾は、交配後6～8日目に採取したヒツジ胚を切断2分離後、供卵雌に移植して一卵性双子の作出に成功しているが、それ以外には切断胚の自家移植に関する報告はみられない。本実験は、同氏ら⁵⁾の報告を追試することを目的に実施した。

材料および方法

供試雌は当场飼養のコリデール種およびコリデール種×サフォーク種の雑種成熟雌延34頭であり、いずれも1～2度開腹手術による採卵あるいは移植を行なったものである。実験は、1984年10月13日～12月7日および1985年11月12日～1986年1月7日のそれぞれ繁殖季節中に実施した。

供試雌は雄を用いて毎朝発情の有無を検査し、発情のみられたものは雄と交配するか、あるいは性周

期の7~10日目にプロスタグランジン $F_2\alpha$ 6mg を2日間筋肉注射して発情を誘起したのち交配した。なお交配は、雄を許容する間(2日間)1日2回行ない、最終交配日を0日として7~8日目に胚を回収した。採卵は、塩酸ケタラルによる全身麻酔下で下腹部開腹手術によって実施し、左右の黄体数を確認後卵管および子宮を露出させた。ついで、子宮角の基部から約5mlの灌流液を同量の空気とともに卵管采へ向ってゆっくりと注入し、卵管采に注入したポリエチレン管(外径2.3mm)を通して灌流液を試験管に回収した。灌流液は直ちに検卵し、黄体数と同数の卵子が回収され1個以上の胚盤胞あるいは脱出胚盤胞が存在した場合のみ胚の切断ならびに切断胚の移植を実施した。胚盤胞は、マイクロマニプレーターにとりつけた毛細ガラス針で透明帯を除去したのち切断に供した。胚の切断は、ガラス針あるいは微小金属刃(フェザー製)を用いて内細胞塊が均等となるように上方より垂直に行ない(図1, 2),

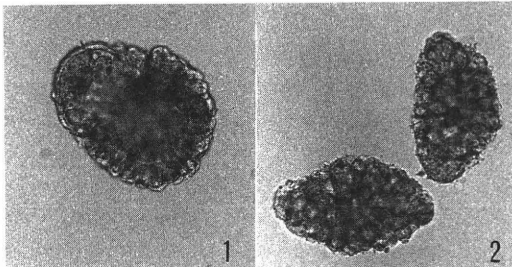


図1 交配後8日目に採取したヒツジ脱出胚盤胞、切断前。

図2 図1の胚をガラス針で切断直後の2分離胚。

胚盤胞を用いた場合はあらかじめ準備した空のウシ透明帯へ切断胚を挿入した。なお、透明帯の除去、胚の切断、切断胚の透明帯への挿入など胚のマイクロマニプレーション操作は既法⁶⁾に従って実施した。切断胚は、1個ずつ両側子宮角へ移植したが、採卵から移植までに要した時間は1時間以内であった。また、採卵、胚のマニプレーションおよび移植などの一連の操作には、20%不活化ヒツジ血清を添加したPBI液⁷⁾を用いた。

結 果

第1表に示すように延34頭を供試したが黄体数と同数の卵子が回収されたのは25頭(74%)であり、残りの10頭では全く採卵できなかった(4頭)り、あるいは黄体数より少ない数の卵子しか回収されなかった(5頭)。これら25頭のうち1個以上の正常胚が回収された15頭(44%)を切断胚の自家移植試

験に用いた。切断に用いた胚の発育ステージは、胚盤胞(6個)および脱出胚盤胞(9個)であった。切断に用いた器具あるいは胚の発育ステージの違いにかかわらず、写真に示すように全例でほとんど損傷なく均等に切断することができた。

第2表に、切断2分離胚の自家移植成績を示した。供試した15頭のうち、産子を分娩したのは7頭(47%)であり、残りの8頭では妊娠が成立しなかった。産子を分娩した7頭のうち、双子を分娩したのは2頭のみであり、残り5頭の産子はいずれも単子であった。得られた産子の体重は2.9~4.3kgといずれも正常に発育しており、奇形などの異常は全く観察されなかった。また、妊娠期間は141~148日であり、通常の範囲⁸⁾内であった。

考 察

一卵性双子の作出は通常、性腺刺激ホルモンを投与して過剰排卵処置を施した供卵雌より多数の胚を採取し、切断後、別に用意した受卵雌群に移植することによって実施されている。このような方法で、これまでマウス、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマなど多くの動物種で一卵性双子の作出に成功している。ウシにおいては、優れた遺伝形質を有する雌畜の子孫を多数作ることを第1の目的に開始された受精卵移植技術のなかにとり入れられ、産子数を増加させる目的で実用化されている⁴⁾。一方、Willadsen and Godke⁵⁾は、ホルモン処置を施さずに自然交配後採取した胚を切断2分離し、胚を採取したと同一の雌ヒツジに移植(自家移植)することによって、きわめて高い妊娠率(16/18, 89%)ならびに一卵性双子生産率(8/18, 44%)を得ている。本実験における妊娠率(7/15, 47%)および一卵性双子生産率(2/15, 13%)はWilladsen and Godke⁵⁾の成績にくらべて低いものであったが、切断胚の自家移植による一卵性双子作出の追試に成功した。胚の自家移植では、灌流液を回収後短時間内に再度移植することから、胚の回収時における子宮への刺激ならびに子宮腔内に残存する灌流液をできる限り少なくする必要がある。これらの実験手技の違いが妊娠率および一卵性双子作出率に反映したものと考えられる。

ウシ胚の切断には、胚の採取の容易さや凍結保存処置に対する耐凍性の強さから、後期桑実胚~初期胚盤胞期の胚が一般に用いられている⁹⁾。胚の発育ステージが進むにつれて細胞数が増加し、個々の細胞の大きさが小さくなることから、より発育ステージの進んだ胚を用いた場合切断時に損傷をうける細胞の割合が相対的に少なくなることが知られている^{6,10)}。

Table. 1 Results of embryo recovery from naturally ovulated and mated sheep

Sheep No.	Day of pregnancy	No. of ovulations	No. of eggs recovered	No. of normal embryos recovered	Stage of embryos used for bisection
84	7	3	2	2	—
69	7	2	2	0	—
61	7	2	2	1	hatched blastocyst
76	7	2	2	0	—
73	7	2	2	0	—
79	7	1	1	0	—
69	7	3	3	0	—
61	7	4	4	0	—
76	7	1	0	—	—
74	7	1	1	1	blastocyst
75	7	1	1	1	blastocyst
65	7	3	3	3	hatched blastocyst
62	7	3	3	0	—
86	7	1	1	0	—
82	7	2	2	1	blastocyst
85	7	2	2	2	blastocyst
70	8	3	3	3	blastocyst
84	7	2	2	1	hatched blastocyst
88	7	1	1	1	hatched blastocyst
73	7	1	0	—	—
50	7	1	0	—	—
70	7	4	4	0	—
82	7	3	1	1	—
83	7	2	1	1	—
66	7	1	1	1	hatched blastocyst
85	8	2	1	1	—
80	7	1	1	0	—
54	7	2	2	1	blastocyst
86	8	2	2	1	hatched blastocyst
109	8	3	3	0	—
87	7	1	1	1	hatched blastocyst
64	7	2	2	1	hatched blastocyst
108	8	3	3	2	hatched blastocyst
67	8	3	0	—	—

本実験においては、交配後 7～8 日目に採取した胚盤胞を用いた場合と脱出胚盤胞を用いた場合とでは妊娠率に大差がみられなかったが(3/6, 50 %および 4/9, 44 %), 9 日目以降の脱出胚盤胞を用いればさらに成績が向上するものと推察される。

最後に本研究を実施するに当たり御協力頂いた徳永智之氏(現, 日本全薬)ならびに志賀一穂氏(大分県畜産試験場)に深謝する。また, 本報告を御校閲頂いた当場繁殖部長花田章博士に感謝の意を表する。

Table. 2 Detailed results following auto-transplantation of pair of bisected sheep embryos

Sheep No.	Pregnancy	Duration of pregnancy (days)	No. of young born	Body weight of young(kg)
61	No	—	—	—
74	Yes	148	2 ♀	3.1,3.4
75	No	—	—	—
65	Yes	144	1 ♀	4.0
82	Yes	143	1 ♂	2.9
85	No	—	—	—
70	Yes	141	1 ♂	3.6
84	No	—	—	—
88	Yes	148	1 ♀	4.3
66	No	—	—	—
54	No	—	—	—
86	No	—	—	—
87	Yes	148	1 ♂	3.5
64	Yes	146	2 ♂	3.1, 3.4
108	No	—	—	—

文 献

- 1) 角田幸生：哺乳動物卵子のマイクロマニプレーション，特に一卵性双子の作出について，畜試年報，24：109，1984
- 2) Yang, X. and Foote, R. H.: Production of identical twin rabbits by micromanipulation of embryos. Biol. Reprod. 37: 1007, 1987
- 3) Willadsen, S. M.: A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 277: 298, 1979
- 4) Leibo, S. P. and Rall, W. F.: Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. Theriogenology, 27: 245, 1987
- 5) Willadsen, S. M. and Godke, R. A.: A simple

procedure for the production of identical sheep twins. Vet. Rec., 114: 240, 1984

- 6) Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Sugie, T. and Katsumata, M.: Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goat. Theriogenology, 24: 337, 1985
- 7) Whittingham, D. G.: Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature, 233: 125, 1971
- 8) Terrill, C. E.: Reproductive cycles-sheep. In: Reproduction in Farm Animals, Third edition (ed. Hafez, E. S. E.): p 265, Lea & Febiger, 1974
- 9) Baker, R. D. and Shea, B. F.: Commercial splitting of bovine embryos. Theriogenology, 23: 3, 1985
- 10) Chesne, p., Colas, G., Cognie, Y., Guerin, Y. and Sevellec, C.: Lamb production using super-ovulation, embryo bisection and transfer. Theriogenology, 27: 751, 1987

Auto-transplantation of bisected embryos in the sheep

Yukio Tsunoda

Department of Reproduction,
National Institute of Animal Industry,
Ibaraki 305, Japan.

Embryos at the blastocyst and hatched blastocyst stage were recovered on day 7 or 8 from naturally ovulated and mated sheep. When the all ovulated eggs were collected and at least more than one normally developing embryos were recovered, one embryo was bisected into halves with a glass needle or metal blade and then retransferred to the embryo donor. Seven of 15 sheep went to term. Two of them produced monozygotic twins and the remaining 5 produced singles.

(受付：1988年8月20日)

AGING CHANGES OF MICE IN THE SIZE OF OOCYTES, NUCLEI AND NUCLEOLI

Akira NARITA and Kazuo ISHIDA

Graduate School of Science and Technology,
Niigata University, Niigata 950-21, Japan

Abstract: The size of oocytes, nuclei and nucleoli showed following changes with the aging of mice. The oocytes stocked in primordial follicles were significantly smaller in size, while growing ones in such follicles were larger; those in secondary follicles smaller, and those in antral follicles larger, compared to those of younger animals. The same tendency was seen in nuclei and nucleoli. The nuclei of stocked oocytes in primordial follicles tended to be smaller in size, those of growing ones in such follicles were significantly larger, those in secondary follicles smaller, and those in antral follicles larger. Oocytes generally contained one nucleolus but occasionally two. Compared with younger mice, mature and senescent ones had significantly smaller number of oocytes in secondary and antral follicles that had two nucleoli. As for the size of nucleoli, the diameters of such in the oocytes in primordial follicles could not be measured because of their markedly small sizes. In secondary follicles the nucleoli in the oocytes were significantly smaller in size with age of mice, but those in antral follicles larger. Thus, the sizes of nuclei and nucleoli fluctuated parallel with that of oocytes.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 353-360, 1989)

Introduction

Increase or decrease of cell volume has been mentioned as one of aging phenomena of the cell. The volume of cells participating directly in the maintenance of life, such as nerve cells, hepatic cells, urinary tubule cells, pancreatic acinar cells and endocrine gland cells increases with age, whereas the volume of those that do not participate in the maintenance of life, such as uterine gland cells and epithelial cells of oviducts decreases¹⁾.

Aging fluctuation in the sizes of nuclei and nucleoli has also been studied: the size of nuclei becomes smaller in uterine gland cells and epithelial cells of oviducts, while nuclei in hepatic cells tend to be larger and some cells come to have two nuclei¹⁾, and the size of nucleoli becomes

smaller in nerve cells²⁾. Studies on aging of eggs, however, have not been done, that deal with the fluctuation in sizes of cells, nuclei and nucleoli.

The present investigation deals with the comparison in the sizes of oocytes, nuclei and nucleoli among infant, young, mature and senescent mice.

Materials and Methods

Forty-eight female mice of the ICR strain were kept and fed normally in a chamber (Koitetron, EA-8HW) at 24°C and lit 14 hours a day, 4 a. m. through 6 p. m. Some animals were killed at 2 days of age (infant), some others 20 days (young), 60-90 days (mature) and 360-390 days (senescent). One of the ovaries of each mouse was immediately taken, fixed in Rossman fluid, embedded in paraffin, serially sectioned at a thickness of 7 μ m, and stained by the periodic acid-Schiff method³⁾.

The sizes of oocytes, nuclei and nucleoli were measured by application of the method for erythrocytes;⁴⁾ the size was indicated by the value obtained when the long and short diameters were added and then the answers were divided by two. A statistical analysis was performed using a χ^2 test.

Results

1. The size of oocytes

The numbers of stocked oocytes of different sizes in primordial follicles composed of one layer of flattened granulosa cells (Fig. 1, arrow) are shown in Table 1, and percentages of oocytes in different sizes in such follicles are given in Fig. 2. In mice of every age, the curves obtained from the percentages of oocytes in different sizes roughly showed normal distributions: in 2 day-old animals, the oocytes of 14 μ m in diameter were the most in number; in 20 day-old ones, those of 12 μ m; in 60-90 day-olds, those of 12 μ m; and in 360-390 day-olds, those of 10 μ m. There were statistically significant differences among the age groups of the animals ($P<0.001$). Thus, the size of oocytes tended to become smaller with age.

Table. 1 The number of different sized stocked oocytes in primordial follicles

Sizes(μ m)	Days after birth			
	2	20	60-90	360-390
7	0	0	0	16
8	0	0	6	35
9	0	2	22	32
10	1	28	49	55
11	10	94	61	33
12	48	138	84	20
13	71	85	55	7
14	74	32	30	3
15	71	25	12	0
16	34	6	1	0
17	20	1	1	0
18	10	0	0	0
Total numbers	339	411	321	201

The numbers and percentages of growing oocytes of different sizes in primordial follicles composed of one layer of cuboidal granulosa cells (Fig. 1, arrowhead) are shown in Table 2 and Fig. 3. In mice of every age, the oocytes indicating



Fig. 1 $\times 1,000$

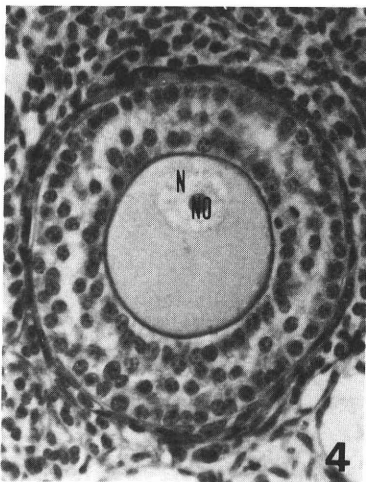


Fig. 4 $\times 400$

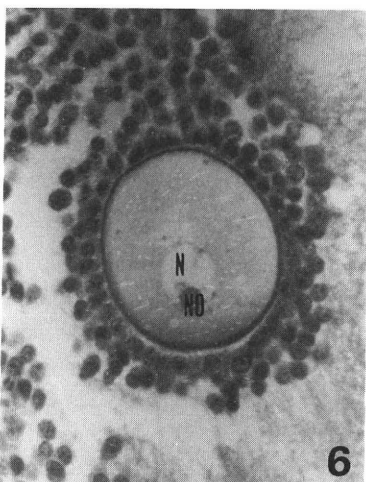


Fig. 6 $\times 250$

Explanation of Figures

All microphotographs show mouse oocytes in follicles at various stages. Nuclei are indicated by N, and nucleoli NO. Periodic acid-Schiff method.

Fig. 1 Stocked (arrow) and growing (arrowhead) oocytes in primordial follicles taken from a 380 day-old mouse.

Fig. 4 An oocyte in a secondary follicle from a 70 day-old mouse.

Fig. 6 An oocyte in an antral follicle from a 390 day-old mouse.

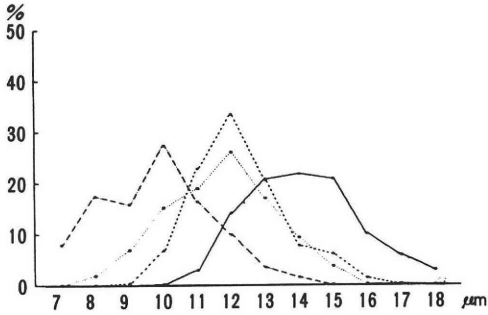


Fig. 2 Percentages of different sized stocked oocytes in primordial follicles — 2 days of age, 20 days, 60-90 days, — 360-390 days.

Table 2 The number of different sized growing oocytes in primordial follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
10-19	3774	9483	2433
20-29	161	757	974
30-39	27	39	70
40-49	6	0	1
Total numbers	3968	10279	3478

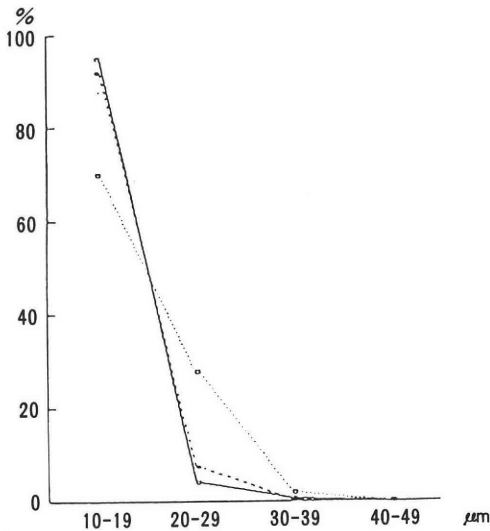


Fig. 3 Percentages of different sized growing oocytes in primordial follicles — 20 days of age, 60-90 days, 360-390 days.

10-19 μm in diameter were the most in number, and the older the animals were, the larger the oocytes tended to be. There were statistically

Table 3 The number of different sized oocytes in secondary follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
10-19	27	46	43
20-29	203	410	178
30-39	385	506	193
40-49	493	439	140
50-59	329	241	114
60-69	77	60	22
70-79	2	5	2
Total numbers	1516	1707	692

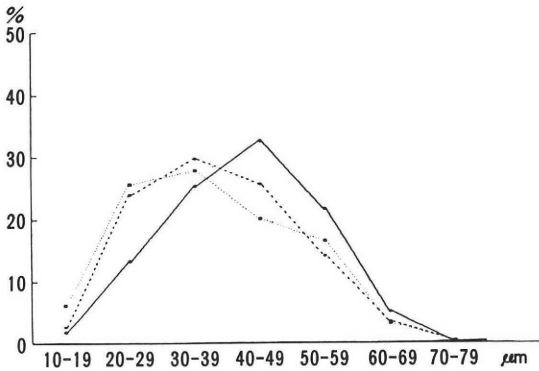


Fig. 5 Percentages of different sized oocytes in secondary follicles — 20 days of age, 60-90 days, 360-390 days.

significant differences among the age groups of the animals ($P < 0.001$).

The numbers and percentages of different sized oocytes in secondary follicles (Fig. 4) are given in Table 3 and Fig. 5. The curves obtained from the percentages of different sized oocytes roughly showed normal distributions as well as those of stocked oocytes in primordial follicles did: in 20 day-old animals, oocytes of 40-49 μm in diameter were the most in number; in 60-90 day- and 360-390 day-old animals, those of 30-39 μm . There were statistically significant differences among the age groups of the animals ($P < 0.001$). Thus, the oocytes of senescent animals were smaller than those of younger ones.

The numbers and percentages of different sized oocytes in antral follicles (Fig. 6) are shown in Table 4 and Fig. 7. The curves from the percent-

Table 4 The number of different sized oocytes in antral follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
20-29	10	18	2
30-39	45	75	15
40-49	152	233	45
50-59	174	352	108
60-69	48	211	93
70-79	1	30	32
80-89	0	0	1
Total numbers	430	919	296

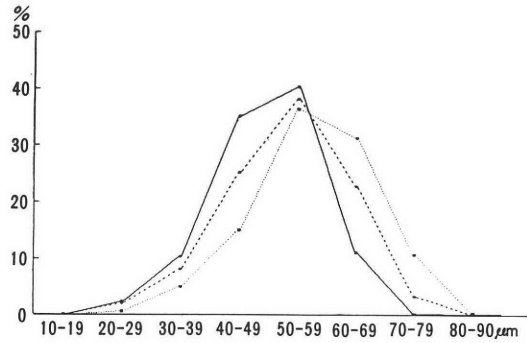


Fig. 7 Percentages of different sized oocytes in antral follicles — 20 days of age, 60-90 days, 360-390 days.

ages of different sized oocytes roughly showed normal distributions. In animals of every age, the oocytes of 50-59 μm in diameter were the most in number. The older the animals were, the larger the oocytes became. There were statistically significant differences among the age groups of the animals ($P<0.001$).

2. The size of nuclei

The numbers and percentages of different sized nuclei of stocked oocytes in primordial follicles (Fig. 1) are given in Table 5 and Fig. 8. In animals of every age, the curves indicating the percentages of different sized nuclei roughly showed normal distributions. In 2 day-old animals, the nuclei of 10 μm in diameter were the most in number; while in 20 day-, 60-90 day- and 360-390 day-old animals, those of 8 μm . Statistically sig-

Table 5 The number of different sized nuclei in stocked oocytes in primordial follicles

Sizes(μm)	Days after birth			
	2	20	60-90	360-390
5	3	5	6	8
6	19	20	37	39
7	38	61	68	65
8	51	92	78	73
9	66	47	34	26
10	70	16	17	6
11	34	10	0	0
12	20	1	0	0
13	2	0	0	0
Total numbers	303	252	240	217

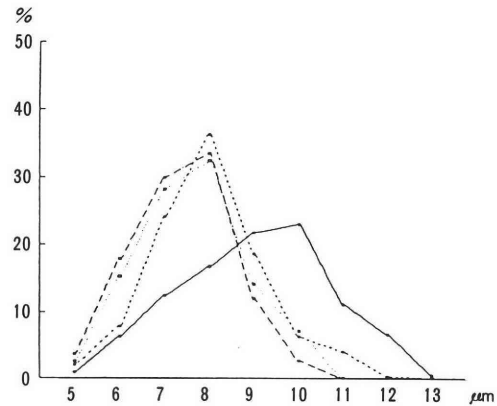


Fig. 8 Percentages of different sized nuclei in stocked oocytes in primordial follicles — 2 days of age, 20 days, 60-90 days, 360-390 days.

nificant differences were found between 2 day-old animals and 20 day-, 60-90 day-or 360-390 day-old ones ($P<0.01$), between 20 day- and 60-90 day-old animals ($P<0.001$), and between 20 day- and 360-390 day-old animals ($P<0.001$), while no difference was found between 60-90 day-and 360-390 day-old animals.

The numbers and percentages of different sized nuclei of growing oocytes in primordial follicles (Fig. 1) are shown in Table 6 and Fig. 9. In animals of every age, the nuclei of 10 μm in diameter were the most in number. The older the animals were, the larger the nuclei were. There were significant differences among the age groups of

Table 6 The number of different sized nuclei in growing oocytes in primordial follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
8	56	11	12
9	84	88	43
10	113	149	137
11	57	114	128
12	43	59	95
13	21	24	86
14	0	0	29
15	0	0	17
Total numbers	374	445	547

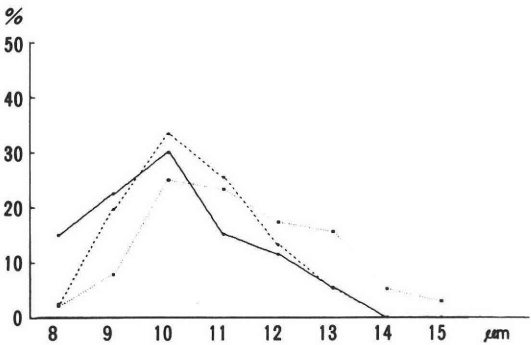


Fig. 9 Percentages of different sized nuclei in growing oocytes in primordial follicles — 20 days of age, ----- 60-90 days, 360-390 days.

the animals ($P<0.001$).

The numbers and percentages of different sized nuclei of oocytes in secondary follicles (Fig. 4) are given in Table 7 and Fig. 10. The nuclei of 15 μm in diameter were the most in number in 20 day-old animals, those of 12 μm in 60-90 day-old ones, and those of 13 μm in 360-390 day-old ones. Thus the nuclei in the oocytes of older animals were smaller than those of younger ones. Significant differences were found among the age groups of the animals ($P<0.001$).

The numbers and percentages of different sized nuclei of oocytes in antral follicles (Fig. 6) are shown in Table 8 and Fig. 11. The nuclei of 18 μm in diameter were the most in number in 20 day-old animals, while those of 20 μm in 60-90 day- and 360-390 day-old animals. The older the animals

Table 7 The number of different sized nuclei in oocytes in secondary follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
5	1	0	0
6	2	0	2
7	4	2	0
8	7	6	4
9	10	7	17
10	28	53	55
11	66	112	67
12	76	211	64
13	105	181	78
14	86	122	38
15	164	181	44
16	139	119	32
17	144	113	40
18	146	98	38
19	81	47	26
20	111	67	25
21	47	24	17
22	36	22	18
23	16	13	4
24	2	7	1
25	5	3	1
26	2	2	0
27	1	0	0
28	1	0	1
Total numbers	1280	1390	572

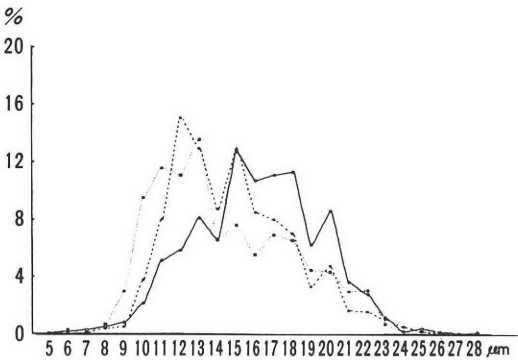


Fig. 10 Percentages of different sized nuclei in oocytes in secondary follicles — 20 days of age, ----- 60-90 days, 360-390 days.

were, the larger the nuclei were. There were significant differences among the age groups of the animals ($P<0.001$).

Table 8 The number of different sized nuclei in oocytes in antral follicles

Sizes(μ m)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
6	1	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	4	0	0
11	4	4	0
12	6	19	2
13	15	20	3
14	17	18	0
15	34	57	3
16	38	61	3
17	54	66	4
18	57	113	17
19	41	66	17
20	49	129	58
21	27	90	34
22	15	60	37
23	4	29	19
24	1	12	9
25	1	14	12
26	0	1	5
27	0	2	2
28	0	1	3
29	1	1	1
30	0	0	1
Total numbers	369	763	230

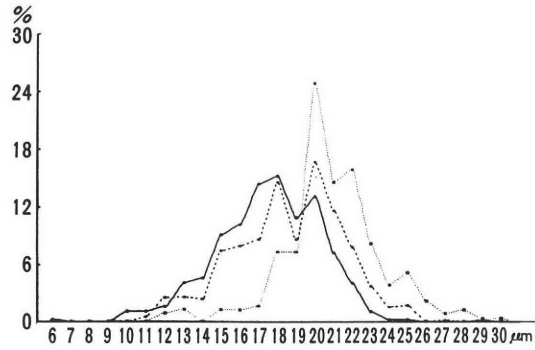


Fig. 11 Percentages of different sized nuclei in oocytes in antral follicles — 20 days of age, 60-90 days, 360-390 days.

3. The number of nucleoli

Oocytes generally contained one nucleolus but occasionally two. The diameters of the nucleoli of

Table 9 The number (%) of nucleoli in oocytes in secondary follicles

No. of nucleoli in an oocyte	Days after birth		
	20	60-90	360-390
1	463(92.4)	606(95.9)	245(97.2)
2	38(7.4)	26(4.1)	7(2.8)
Total numbers	501(100.0)	632(100.0)	252(100.0)

Table 10 The number (%) of nucleoli in oocytes in antral follicles

No. of nucleoli in an oocyte	Days after birth		
	20	60-90	360-390
1	228(92.7)	533(95.0)	194(97.5)
2	18(7.3)	28(5.0)	5(2.5)
Total numbers	246(100.0)	561(100.0)	199(100.0)

oocytes in primordial follicles could not be measured because of their markedly small sizes. The numbers and percentages of oocytes containing one or two nucleoli in secondary and antral follicles (Figs. 4 and 6) are given in Tables 9 and 10. The number of oocytes in secondary follicles that contained two nucleoli tended to decrease with age of animals. Statistically significant differences were found between 20 day- and 60-90 day-old animals ($P<0.05$), and between 20 day- and 360-390 day-old animals ($P<0.01$), while no difference was found between 60-90 day- and 360-390 day-old animals. Oocytes in antral follicles that contained two nucleoli also tended to decrease with age. A significant difference was found between 20 day- and 360-390 day-old animals ($P<0.05$), while no difference was found between 20 day- and 60-90 day-old animals, and between 60-90 day- and 360-390 day-old ones.

4. The size of nucleoli

The numbers and percentages of different sized nucleoli (Fig. 4) of oocytes in secondary follicles are given in Table 11 and Fig. 12. The nucleoli of 6 μ m in diameter were the most in number in 20 day-old animals, while those of 3 μ m in 60-90 day- and 360-390 day-old ones. There were significant differences among the age groups of the animals ($P<0.001$), and the nucleoli of senescent animals

Table 11 The number of different sized nucleoli in oocytes in secondary follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
2	0	24	35
3	18	167	61
4	31	136	39
5	75	131	38
6	187	96	45
7	173	71	29
8	14	7	5
9	3	0	0
Total numbers	501	632	252

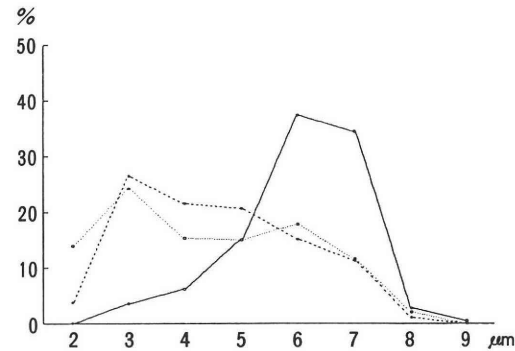


Fig. 12 Percentages of different sized nucleoli in oocytes in secondary follicles — 20 days of age, 60-90 days, 360-390 days.

were smaller than those of younger ones.

The numbers and percentages of different sized nucleoli (Fig. 6) of oocytes in antral follicles are given in Table 12 and Fig. 13. The nucleoli of 6 μm were the most in number in 20 day-old animals, while those of 7 μm in 60-90 day- and 360-390 day-old ones. There were significant differences between 20 day- and 60-90 day-old animals ($P<0.01$), between 20 day- and 360-390 day-old ones ($P<0.001$), and between 60-90 day- and 360-390 day-old ones ($P<0.001$). Thus, nucleoli of senescent animals were larger than those of younger ones.

Discussion

It was clarified from the present investigation that stocked oocytes in primordial follicles

Table 12 The number of different sized nucleoli in oocytes in antral follicles

Sizes(μm)	Days after birth		
	20	60-90	360-390
2	1	4	0
3	3	16	0
4	16	29	2
5	28	59	11
6	97	158	59
7	90	263	101
8	8	31	24
9	3	1	2
Total numbers	246	561	199

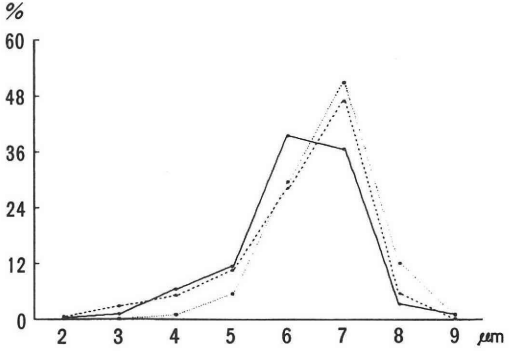


Fig. 13 Percentages of different sized nucleoli in oocytes in antral follicles — 20 days of age, 60-90 days, 360-390 days.

became smaller in size with age of mice. This decrease in the sizes of oocytes was assumed to be caused from the fall of their metabolism. While stocked oocytes became smaller in aged animals, growing oocytes in primordial follicles larger. It is considered especially about aged mice, then, that among the oocytes ranging 7 to 14 μm in diameter, the biggest ones preferentially start growing. Oocytes in secondary follicles became smaller in size with age of animals, and this fact seems to suggest that the growing speed of oocytes during such period becomes slower with age. The size of the oocytes in antral follicles (the late stage of growth) was observed to be bigger in senescent mice than in younger ones.

It has been said, as is already mentioned, that the volume of somatic cells participating directly

in the maintenance of life increases with age of animals, and it has been explained to be a compensatory hypertrophy resulted from the decrease in the number of cells¹⁾. The phenomenon about the size of growing mouse oocytes in primordial and antral follicles does resemble that of somatic cells. However, because this phenomenon could not support the compensatory hypertrophy theory, it may be considered rather as the result of metabolic changes in granulosa cells closely surrounding the oocytes.

As for nuclei, also, the influence of aging upon their size has been studied, and human uterine gland cells and epithelial cells of oviducts were reported to become smaller in size with age, while, concerning human liver cells, some of them come to have larger nuclei whereas others keep those of ordinary sizes¹⁾. In the present investigation, the nuclei of stocked mouse oocytes were found to become smaller with age, and those of the oocytes at the earliest stage of growth (primordial follicle) and the last stage (antral follicle) larger with age, whereas the nuclei at the middle stage (secondary follicle) smaller. These facts may suggest the difference of speed in nuclear growth between young and senescent animals, as well as the difference in growing speed of oocytes.

The present investigation showed that the size of nucleoli in mouse oocytes at the middle stage of growth became smaller with age, whereas that at the late stage larger. From these results, it is assumed that the ability of protein synthesis in oocytes at the middle stage of growth is lower in senescent animals than in younger ones, but that at the late stage is higher in senescent animals than in younger ones.

From the present investigation, it is clarified that the sizes of nuclei and nucleoli fluctuate

parallel with that of oocytes with age of animals.

References

- 1) Tauchi, H.: Roka no Keitaigaku: p 99, Tokyo, Rikogakusha. 1980 (in Japanese)
- 2) Shefer, V. F.: Volumes of nerve cell bodies, nuclei and nucleoli with normal and pathologic ageing of the brain. Arkh. Anat. Histol. Embryol. 60: 42, 1971
- 3) McManus, J. F. A.: Histological and histochemical use of periodic acid. Stain Technol. 23: 99, 1948
- 4) Komiya, M.: Zusetsu. Kekkyu no Mikata: p 39, Tokyo, Nanzando. 1962 (in Japanese)

マウスの加齢に伴う卵母細胞、核および核小体の大きさの変化

新潟大学大学院自然科学研究科

成田 成 石田一夫

貯蔵型の卵母細胞は、マウスの加齢に伴って有意に小型化した。発育型の卵母細胞は、原始卵胞期では高齢動物のものほど有意に大型化し、二次卵胞期では有意に小型化し、胞状卵胞期では有意に大型化した。貯蔵型の卵母細胞の核は、動物の加齢に伴って小型化する傾向を示した。発育型の卵母細胞の核は、原始卵胞期では高齢動物のものほど有意に大型化し、二次卵胞期では有意に小型化し、胞状卵胞期では有意に大型化した。卵母細胞の核小体は、通常1個、まれに2個含まれているが、原始卵胞期では小型のため計測できなかった。二次卵母胞期と胞状卵胞期では、核小体が2個みられる卵母細胞は、成熟動物と老齢動物では幼若動物より有意に少なかった。卵母細胞の核小体の大きさは、二次卵胞期では加齢に伴って有意に小型化した。胞状卵胞期では有意に大型化した。卵母細胞、核および核小体の大きさは、動物の加齢に伴って平行して変動することが明らかとなった。

(受付: 1988年8月22日)

レセルピン投与ラットにおける脱落膜反応について

Deciduomal Response in Reserpine-Induced Pseudopregnant Rats

信州大学農学部家畜育種繁殖学教室

辻 井 弘 忠
Hirotada TSUJII

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
Faculty of Agriculture, Shinshu University, Nagano 399-45 Japan

レセルピン投与による偽妊娠ラットと精管結紮雄による偽妊娠ラットの脱落膜反応について比較検討を行った。

レセルピン群は、発情後期にレセルピンを体重1kgあたり1mg皮下注射を行った。精管結紮雄群は、発情前期の夕刻より精管結紮雄と同居させた。両群とも発情期を偽妊娠第1日とし、偽妊娠3日17時から6日11時の間を6時間ごとに、左子宮角を針金でひっかけて脱落膜反応を誘起し、100時間後にスコア、子宮重量を検査した。両群の偽妊娠誘起率、偽妊娠期間(14.1, 14.4日)と差はなかった。脱落膜反応は、両群とも偽妊娠5日5時に最高となり、6日11時には消失した。両群を比較すると、偽妊娠4日11時には、スコアおよび比体重値において、レセルピン群の方が精管結紮雄群より有意に大であった。また、最高値を示した後、レセルピン群の方が早く減少し、偽妊娠5日11時にはスコアで、5日17時と23時には、スコア、子宮重量、比体重値において、精管結紮雄群の方が有意に大であった。これらの差は、偽妊娠誘起機序の違いにより生じたホルモン分泌など初期偽妊娠状態の差によると思われた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 361-365, 1989)

緒 言

ラット、マウス等は、黄体相を欠落する不完全性周期で、交尾に類する子宮頸部の刺激により黄体相を獲得する。人為的に黄体相を獲得させる偽妊娠誘起方法としては、子宮頸部の刺激の他に、エストロジェン、プロジェステロンなどのホルモン投与、乳頭部の刺激、脳内の一定部位の電気刺激などの方法が知られているが¹⁻⁵⁾、Barraclough and Sawyer⁶⁾は、ラットにアルカロイドの一種であるレセルピンを投与することによって、偽妊娠を誘起しうると報告した。さらにKisch⁷⁾は、このレセルピンによる偽妊娠について、子宮頸部の電気刺激による偽妊娠と比較を行い、発情休止期がレセルピン投与量によって段階的に変化すること、また、脱落膜の反応

性にも差異があることを報告している。しかし、このレセルピンによって偽妊娠を誘起した場合の子宮内膜の感受性および脱落膜の形成については不明である。

そこで、本実験はレセルピンによって誘起された偽妊娠ラットの脱落膜反応誘起刺激に対する子宮の反応性の経時的変化を、精管結紮した雄との交尾による偽妊娠ラットのものと比較検討を行なった。

材料および方法

当研究室において、系統維持しているウィスター系雌ラット、4日周期を2回以上示した90~150日齢(体重210~370g)のものをを用いた。飼育条件は、12時間明/暗(午前6時点燈)、20±1℃、市販の固形飼料ならびに水は、自由摂取とした。膣垢検査は、

実験期間を通して行った。

レセルピンによる偽妊娠誘起は、レセルピン（半井化学）を Bennett and Kendle⁸⁾による方法で調整し、発情後期の午前 9～10 時に体重 1kg あたり 1ml 皮下注射を行なった。レセルピン投与前日の発情期を偽妊娠第 1 日とした。

精管結紮雄による偽妊娠誘起は、発情前期像を示した雌を同系統の精管結紮雄と一晚同居させ、翌日陰腔を確認し、確認した日（発情期）を偽妊娠第 1 日とした。

偽妊娠期間は、偽妊娠第 1 日より陰垢中に白血球の見られた最後の日までとした。

脱着膜反応の誘起は、精管結紮雄による偽妊娠群（以後、精管結紮雄群とする）では、偽妊娠第 3 日 23 時、第 4 日 5 時、11 時、17 時、23 時、第 5 日 5 時、11 時、17 時、23 時、第 6 日 5 時、11 時の計 11 区、レセルピン投与による偽妊娠群（以後、レセルピン群とする）では、上記以外に偽妊娠第 3 日 17 時を加え、計 12 区を設けた。各々の時刻にエーテル麻酔下で開腹し、左子宮角のみ子宮頸のやや上部に針で穴をあけ、釣付針金を挿入し反子宮間膜側をひっかい脱着膜反応を誘起した。

剖検は、各手術後 100 時間目に頸椎切断後、子宮、卵巣を取り出し、脂肪などを除去し、ろ紙上で軽く水分を除いた後、左右子宮および卵巣の重量をトーションバランスで測定した。左子宮角については、Shlesnyak and Kraicer⁹⁾によるスコアの判定を行い、さらにブアン固定、パラフィン埋後 8 μ m に薄切、ヘマトキリン・エオジン染色後検鏡し、脱着膜腫の形成を確認した。

左右卵巣の黄体数は、大きく突出した黄体を数え、さらに 2 枚のスライドガラス間で押しつぶし、透光下で確認した。

結 果

—偽妊娠誘起率および偽妊娠期間—

レセルピン群および精管結紮雄群の偽妊娠誘起率および偽妊娠期間を表 1 に示した。偽妊娠誘起率は、レセルピン群 83.3%，精管結紮雄群 88.8% と、両群間に有意な差はみられなかった（ χ^2 検定）。また、偽妊娠期間も、レセルピン群 14.1 日、精管結紮雄群 14.4 日と両群間に有意な差はみられなかった（ t 検定）。

レセルピン群における各時刻における脱着膜反応のスコア、子宮重量、比体重値を表 2 に、同じく精管結紮雄群については、表 3 に示した。レセルピン群および精管結紮雄群の各時刻において、子宮重量、

比体重値ともに左子宮角（ひっかいの方）は、右子宮角（ひっかかなかった方）より有意に大きかった。（ t 検定 $P < 0.05$ ）。

右子宮角の子宮重量の平均を表 4 に示した。レセルピン群で 160mg、精管結紮雄群で 152mg、また、右子宮角の比体重値の平均は、レセルピン群で 56×10^{-5} 、精管結紮雄群で 53×10^{-5} 、両群のそれぞれにおいて有意な差はなかった（ t 検定）。

左子宮角の脱着膜誘起刺激に対する子宮の反応性をスコアでみると、両群とも偽妊娠第 3 日 23 時にすでに反応を開始し、第 5 日 5 時に最高値となり、第 6 日 11 時には反応はみられなかった。子宮重量、比体重値（図 1）ともスコアと同様の変化を示した。両群のスコア、子宮重量、比体重値において、レセルピン群では、第 3 日 23 時～第 4 日 5 時、第 4 日 5 時～11 時に有意な増加がみられなかったのに対し、精管結紮雄群では、第 4 日 11 時～17 時、第 4 日 23 時～第 5 日 5 時に有意な増加がみられた。また、両群を比較すると偽妊娠 4 日 11 時のスコア、比体重値はレセルピン群の方が精管結紮雄群より有意に大きかった（スコア：U 検定，比体重値： t 検定， $P < 0.05$ ）。

偽妊娠第 5 日以降は、スコア、子宮重量、比体重値において、レセルピン群では第 5 日 5 時～11 時、第 5 日 17 時～23 時に有意な減少がみられたのに対し、精管結紮雄群では第 5 日 23 時までは有意な減少はみられず、第 5 日 23 時～第 6 日 5 時の子宮重量および比体重値において有意な減少がみられた。また、両群を比較すると、偽妊娠第 5 日 11 時のスコアにおいて、第 5 日 17 時と 23 時のスコア、子宮重量および比体重値において、精管結紮雄群は、レセルピン群

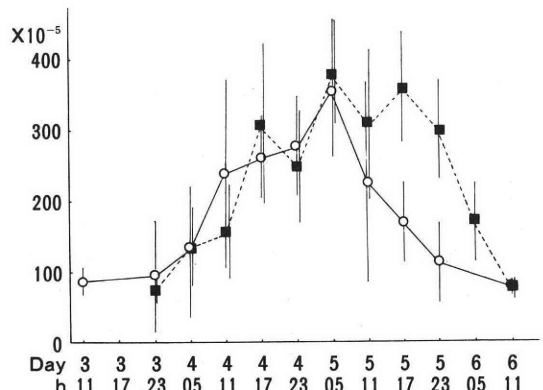


図 1 Time course of the uterine weight ratio in the Reserpine Group (○—○) and Vasectomy-pseudopregnancy Group (■-----■).

表 1 The rate of pseudopregnancy induction and duration of pseudopregnancy in the Reserpin- and Vasectomy-Pseudopregnancy Group.

	The rate of pseudopregnancy (%)		Duration of pseudopregnancy (day)
Reserpine-Pseudopregnancy Group	10/12	83.3	14.1±1.4
Vasectomy-Pseudopregnancy Group	8/9	88.8	14.4±0.7
Mean±S.D.			

表 2 The decidual induction score, uterine weight and uterine weight ratio in the Reserpine-pseudopregnancy. (The left uterine horn) Mean±S.D.

Time of traumatized	n	Decidual induction score	Uterine weight (mg)	Uterine weight ratio ($\times 10^{-5}$)
day 3 17:00 h	4	0	208±30	75±17
23:00	9	0.6±0.5	276±80	95±23
4 5:00	8	1.4±0.5 ^c	369±93 ^c	130±24 ^c
11:00	9	2.6±1.0 ^{ad}	687±304 ^c	240±97 ^{ad}
17:00	8	2.5±0.8	686±160	262±59
23:00	8	3.2±0.7	732±189	275±72
5 5:00	8	3.6±0.5	1039±267 ^c	357±96
11:00	8	2.2±1.0 ^{ad}	621±439 ^c	224±142 ^c
17:00	8	1.8±0.5 ^b	567±161 ^b	198±56 ^b
23:00	8	0.8±0.9 ^{bc}	339±150 ^{bc}	114±56 ^{bd}
6 5:00	4	0.8±0.5	340±71	114±29
11:00	4	0	236±16	78±34

a $P<0.05$, b $P<0.01$, versus corresponding the vasectomy-pseudopregnancy group.c $P<0.05$, d $P<0.01$, versus corresponding group of the preceding time of traumatized.

表 3 The decidual induction score, uterine weight and uterine weight ratio in the vasectomy-pseudopregnancy group. (The left uterine horn) Mean±S.D.

Time of traumatized	n	Decidual induction score	Uterine weight (mg)	Uterine weight ratio ($\times 10^{-5}$)
day 3 17:00 h	—	—	—	—
23:00	8	0.4±0.5	262±72	86±21
4 5:00	8	1.4±0.7 ^a	390±159	136±56
11:00	9	1.6±0.9	437±183	157±65
17:00	8	2.9±0.8 ^a	844±330 ^b	307±113 ^b
23:00	8	2.4±0.7	771±224	248±78
5 5:00	8	3.8±0.5 ^b	1127±245 ^b	379±72 ^b
11:00	8	3.2±0.7	866±259	307±106
17:00	8	2.9±0.6	989±182	361±80
23:00	8	2.5±0.5	860±224	298±69
6 5:00	4	1.8±0.5	515±197 ^a	167±57 ^b
11:00	4	0	203±30	76±15

a $P<0.05$, b $P<0.01$, versus corresponding group of the preceding time of traumatized.

表 4 The decidual induction score, uterine weight and uterine weight ratio in the vasectomy-pseudopregnancy. (The right uterine horn) Mean $\pm$ S.D.

Time of traumatized	The reserpine-pseudopregnancy			The vasectomy-pseudopregnancy		
	n	Uterine weight (mg)	Uterine weight ratio ($\times 10^{-5}$)	n	Uterine weight (mg)	Uterine weight ratio ($\times 10^{-5}$)
day 3 17:00h	4	160 $\pm$ 11	58 $\pm$ 9	-	-	-
23:00	9	165 $\pm$ 40	57 $\pm$ 10	8	163 $\pm$ 32	56 $\pm$ 8
4 5:00	8	158 $\pm$ 19	56 $\pm$ 6	8	155 $\pm$ 24	54 $\pm$ 8
11:00	9	161 $\pm$ 28	58 $\pm$ 11	9	157 $\pm$ 65	55 $\pm$ 6
17:00	8	128 $\pm$ 16 ^d	49 $\pm$ 6	8	135 $\pm$ 16 ^c	49 $\pm$ 5 ^c
23:00	8	162 $\pm$ 26 ^d	56 $\pm$ 9 ^a	8	151 $\pm$ 13 ^c	48 $\pm$ 3
5 5:00	8	166 $\pm$ 28	57 $\pm$ 10	8	158 $\pm$ 32	53 $\pm$ 6
11:00	8	164 $\pm$ 36	57 $\pm$ 11	8	179 $\pm$ 41	63 $\pm$ 16
17:00	8	164 $\pm$ 23	57 $\pm$ 11	8	146 $\pm$ 13	53 $\pm$ 6
23:00	8	169 $\pm$ 23 ^b	56 $\pm$ 7 ^a	8	136 $\pm$ 20	47 $\pm$ 6
6 5:00	4	160 $\pm$ 30	53 $\pm$ 7	4	170 $\pm$ 15 ^c	56 $\pm$ 3
11:00	4	166 $\pm$ 7 ^a	54 $\pm$ 5	4	128 $\pm$ 20 ^c	48 $\pm$ 12
Mean		160 $\pm$ 11	56 $\pm$ 3		152 $\pm$ 16	53 $\pm$ 5

a $P < 0.05$ b $P < 0.01$, versus corresponding the vasectomy-pseudopregnancy group.c $P < 0.05$, d $P < 0.01$, versus corresponding group of the preceding time of traumatized.

より有意に大きかった(スコア: U検定, 子宮重量, 比体重値: t検定, $P < 0.05$).

レセルピン群および精管結紮雄群の各時刻における卵巣重量, 卵巣の比体重値, 黄体数は, 左右の有意差はなかった. また, レセルピン群の卵巣重量 33mg, 卵巣の比体重値 11.3×10^{-5} , 黄体数 8.5 個, 精管結紮雄群の卵巣重量 34mg, 卵巣比体重値 11.6×10^{-5} , 黄体数 9.2 個で, 両群間に有意な差はなかった (t検定).

考 察

Barraclough and Sawyer⁶⁾は, ラットの性周期の各日に体重 1kg あたり 1mg のレセルピンを皮下注射し, 発情後期の投与において 100% の偽妊娠誘起率を得ている. Kisch⁷⁾は, 発情後期ラットに体重 1kg あたり 0.1, 0.5, 0.75, 1.5mg のレセルピンを皮下投与し, 特に 0.75mg, 1.5mg の投与量において各々 23/24, 11/12 という偽妊娠誘起率を得た. また, その偽妊娠期間の平均は 12.6 日, 13.7 日であると報告している. 本実験においては, 偽妊娠誘起率は 20/22 (90.9%), 偽妊娠期間の平均は 14.1 日であった. Kisch⁷⁾は, 膈垢中に白血球がみられる期間を偽妊娠期間としている. したがって, 本実験の結果を上記の様に表現すると 13.1 日となり, 本実験の結果とほぼ一致した.

偽妊娠誘起率ならびに偽妊娠期間は, レセルピン

群, 精管結紮雄群とも有意な差は認められなかった. これらのことから, 黄体相獲得以降の偽妊娠の終了は, 偽妊娠誘起方法に影響されない独立した機序をもって行われることが推察された. このことについて, Smith and Neill¹⁰⁾が, ラットの子宮頸管刺激後 LH, FSH, エストラジオール, プロラクチンのうちプロラクチンのみが diurnal surge および nocturnal surge の律動的サージを示すようになることを認め, プロラクチンが偽妊娠誘起の上で第一義的な黄体刺激の役割を果たすと報告している. また, ラットの性周期黄体は排卵後 36~60 時間はプロラクチン+LH に対する反応性を保有し, ラットが黄体相を獲得するか, 性周期を回帰するかは, この時期に十分量のプロラクチンが存在するか否かにかかわるものと考えられる. 一方, ラットにレセルピンを投与するとプロラクチンの放出が促進することが知られている¹¹⁾. したがって, レセルピン投与による偽妊娠誘起もレセルピンによって放出されたプロラクチンが黄体を機能化させたためと考えられた.

レセルピンおよび精管結紮による偽妊娠誘起ラットの子宮をひかくことによって形成された脱落膜腫は, 組織学的に差異はみられなかった. しかし, 脱落膜反応誘起刺激に対する子宮の反応性に差異がみられた. このことについて, Kisch⁷⁾は, レセルピンを投与して偽妊娠誘起したラットと電気刺激で偽

妊娠誘起したラットにピラチアジンを投与し、4日後の脱落膜反応を比較したところ両者間に差異がみられたと報告していることと一致した。

子宮内膜の感受状態は、ラット・マウスにおいては、エストロゲンとプロジェステロンの相互作用による子宮内膜の準備期細胞増殖の結果を生ずることが知られている^{1,2,12)}また、Fajer and Barraclough¹³⁾、本実験と同じ方法で誘起されたレセルピン偽妊娠ラットの偽妊娠初期の卵巣からのプロジェステロンの分泌量に差があると報告している。

本実験で認められたレセルピン群と精管結紮雄群の子宮内膜の感受状態の差異は、偽妊娠誘起機序の違いによるプロジェステロン分泌およびその他のホルモン分泌状態などによるものと考えられた。

文 献

- 1) 館 澄江, 館 鄰: 卵着床の細胞生物学的機構, ホルモンと生殖II, 学会出版センター, 173, 1979
- 2) 館 澄江, 館 鄰: ネズミの卵着床におけるプロジェステロンの作用機序, 代謝, 16: 臨時増刊号「性」1321, 1979
- 3) 館 澄江, 館 鄰: 着床と胎盤形成, 代謝, 16: 臨時増刊号「性」1313, 1979
- 4) 川上正澄, 貴邑富久子: 偽妊娠, 内分泌生理学, 南山堂, 188, 1978
- 5) 鈴木善祐: 排卵機構と黄体相の調節, ホルモンと生殖II, 学会出版センター, 65, 1979
- 6) Barraclough, C. A. and Sawyer, C. H.: Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine. *Endocrinology*, 65: 563, 1959
- 7) Kisch, E. S.: Disparity between the states of pseudopregnancy induced by reserpine and by cervical stimulation in the rat. *Acta Endocrinologica*, 67: 203, 1971
- 8) Bennett, J. P. and Kendle, K. E.: The effect of reserpine upon the rate of egg transport in the fallopian tube of the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 13: 345, 1967
- 9) Shelesnyak, M. C. and Kraicer, P. F.: A physiological method for inducing experimental decidualization of the rat uterus. *J. Reprod. Fert.*, 2: 438, 1961
- 10) Smith, M. S. and Neill, J. D.: Termination at midpregnancy of the two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. *Endocrinology*, 98: 696, 1974
- 11) Lu, K. H., Amenomori, Y. chen, C. L. and Meites, J.: Effects of central acting drugs on serum and pituitary prolactin levels in rats. *Endocrinology*, 87: 667, 1970
- 12) O'Grady, J. E. and Bell, S. C.: The role of the endometrium in blastocyst implantation. *Devel-*

opment in mammals. Edited by Johnson, M. H. P. 165. North-Holland Publishing Company, 1977

- 13) Fajer, A. B. and Barraclough C. A.: Ovarian secretion of progesterone and 20α -hydroxypregn-4-en-3-one during pseudopregnancy and pregnancy in rats. *Endocrinology*, 81: 617, 1967

Deciduomal response in reserpine-induced pseudopregnant rats

Hirotsada Tsujii

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
Faculty of Agriculture, Shinshu University,
Nagano 399-45, Japan

The uterine susceptibility to decidualization was comparatively examined in rats with pseudopregnancy induced by injection of reserpine and by mating with vasectomized male rats. Wistar rats with at least 2 regular 4-day sexual cycles were used.

As a Reserpine-group, 1mg/kg of reserpine was subcutaneously injected at the metestrous stage. Vasectomy-pseudopregnancy was induced by mating with vasectomized male rats from the evening of the proestrous stage. Rats confirmed to have a vaginal plug the following morning were used. In both the groups, the estrous stage was defined as Day 1 of pseudopregnancy. The left uterine horn was traumatized with a needle-knife from 17:00 of Day 3 of pseudopregnancy until 11:00 of Day 6 at intervals of 6 hours. The decidualization induction score and uterine weight were measured after 100 hours.

No differences in the rates of pseudopregnancy induction and the durations of pseudopregnancy were found between the two groups. In both the groups, the uterine response to decidualization increased to the peak at 5:00 of Day 5 of pseudopregnancy and disappeared at 11:00 of Day 6. At 11:00 of Day 4 of pseudopregnancy, the decidualization induction score and uterine weight ratio were significantly higher in the Reserpine group. After reaching the maximum levels, the score and uterine weight ratio were diminished more rapidly in the Reserpine group. On Day 5 of pseudopregnancy, the score was significantly higher at 11:00, and the score, uterine weight and uterine weight ratio were significantly higher at 17:00 and 23:00, in the Vasectomy-pseudopregnancy group. These differences seemed to be due to the difference in the mechanism of pseudopregnancy induction.

(受付 1988 年 9 月 17 日)

THE EFFECT OF INTRAUTERINE BACTERIAL INFECTION ON IMPLANTATION OF FERTILIZED OVA IN RATS

Makoto AKAIKE, Tsuguaki FUKUYASU and Kiyomi ASHIDA

Department of Animal Health II, School of Veterinary Medicine,
Azabu University, Kanagawa 229, Japan

Abstract: Fertilized ova (blastocysts) and bacteria were infused simultaneously into uterine-hornes of the recipient rats, in which pseudopregnancy was induced by electro-stimulus of cervix-uteri. The blastocysts were collected from the donor rats on the 5th day of pregnancy. *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) were used. On the examining of behavior of the bacteria in the uterus of pseudopregnant rats, *Staphylococcus* and *E. coli* were isolated until 3rd and 10th days respectively after the infusion.

Successful implantation of blastocysts was observed in 10/10 (100%) rats, in which only blastocysts were transplanted into the uterin-horns on the 4th day of pseudopregnancy. Also, the implantation rate of the total transplanted blastocysts was 51/85 (60%). In the group of simultaneous infusion of blastocysts and the *staphylococcus* suspension into the uterinehorns on the 4th day of pseudopregnancy, implantation was observed in 8/10 (80%) of the recipient rats. In the group of blastocysts and *E. coli*, same result was obtained.

However, the implantation rate of blastocysts was 17/83 (20.5%) in the group of *Staphylococcus* and 28/94 (29.8%) in the group of *E. coli*. Successful implantation rate of blastocysts in both of the groups of simultaneous transplantation of blastocysts and bacteria infusion was significantly low compared to the rate in the group of only blastocysts infusion.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(2), 366-373, 1989)

Introduction

Many factors are involved in disturbance of the implantation of fertilized ovum of animal. Imbalance of hormonal control in reproductive organs is one of them. Infection of the uterus by indigenous bacterial flora existing in reproductive organs such as the vulva and vagina is another. Such infection is mostly caused by non-pathogenic bacteria. Intrauterine infection is transvaginal and occurs by accidental invasion of bacteria in most cases¹⁾. Intrauterine infection by non-pathogenic bacteria is more frequent during the luteal phase rather than the estrous stage²⁾. Earlier studies including the above have shown that

the hormonal control is closely associated with the development of endometritis³⁻⁵⁾. Artificial insemination in the cow is carried out in the estrous stage which is hormonally estrogen-dominant. Transplantation of fertilized ovum is carried out in the early luteal phase which is progesterone-dominant. The uterus ready for transplantation of fertilized ovum during the early luteal phase is susceptible to bacterial infection and intrauterine bacterial infection may exert an adverse effect on implantation of fertilized ovum.

An experiment was carried out in this study to investigate how implantaion of fertilized ovum is affected by non-pathogenic bacteria, especially

Staphylococcus and *Escherichia coli*, that exist indigenously in the vulva and vagina.

Materials and Methods

Experimental animals: Non-parous matured femal Jcl-Wister rats (10-15 weeks old, weighing 180-220g) were used. Forty-eight rats with regular sexual cycles of 4 days were chosen by the vaginal smear method. Seven male Jcl-Wister rats (approximately 4-5 months old, weighing 260-300g) were also used.

Bacteria and infusion of bacterial suspension: *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from the vagina of the female rats and the rifampicin resistant mutants were used. Also, the enzymatic activities of the bacteria were examined⁶⁾. After culture of these bacteria in a heart infusion agar medium, 1 mg of the bacterial culture was suspended in 1 ml (approximately 10^7 /ml) of sterilized physiological saline solution immediately before use as a bacterial suspension to be used for infusion into the uterus of rats. The reproductive organs were pulled out to confirm the presence of corpora lutea in the ovaries after the incision at dorsiventral parts of the anesthetized rats. Two microliters of the *Staphylococcus* and *E. coli* suspension were then injected into the bilateral uterine cavities near the uterotubal-junction using a sterilized microsyringe⁷⁾.

Preparation of recipient rats for the transplantation of fertilized ova (blastocysts): The estrous cycle of the rat was confirmed by the vaginal smear method for more than 2 sexual cycles at 4:00 pm daily. Pseudopregnancy was induced by electric-stimulus (10 volt, 60 seconds) of the cervix-uteri of proestrous rats at 5:00 pm and at the same time of the following day. The day of the 2nd stimulation was defined as the 1st day of pseudopregnancy. Rats on the 4th day of pseudopregnancy were used as recipients^{7,8)}.

Preparation of donor rats and collection of blastocysts: Female rats, which were found to be proestrous by the vaginal smear method at 4:00 pm, were allowed to cohabit with male rats overnight from 5:00 pm of the same day. At 9:00 am on the following morning, copulation was judged by

confirming the presence of a vaginal plug and sperm in the vaginal smear. The day on which copulation had been confirmed was defined as the 1st day of pregnancy. Blastocysts were collected from the rats of 5-day-pregnancy by uterine flushing⁷⁾.

Infusion of blastocysts and bacterial suspension into the uterine-horns: For the transplantation only of the blastocysts, the recipient rats were incised dorsally under anesthesia to pull out the ovaries and uterine-horns. After the confirmation of the presence of the corpora lutea, blastocysts were infused with $3\mu\text{l}$ of flushing fluid using a microsyringe into the bilateral uterine cavities near the uterotubal junction.

For simultaneous infusion of the blastocysts with the *staphylococcus* or *E. coli* suspension, 3-6 blastocysts were first aspirated into $1\mu\text{l}$ of flushing fluid using a microsyringe and $2\mu\text{l}$ of the bacterial suspension were also aspirated. The blastocysts and the bacterial suspension were then infused.

Autopsy and examination of bacterial infection: The uterin-horns of each rat were examined macroscopically at 0.5, 12 hours, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 10 days after infusion of the bacteria suspension. In the transplantation only of the blastocysts, and simultaneous infusion of the blastocysts and the bacterial suspension, implantation of the blastocysts in the bilateral uterine-horns was confirmed by the presence of fetus and placenta.

In examination of bacterial infection, one loopful uterine mucus or secretion was collected and diluted in 1 ml of sterilized physiological saline solution. These bacterial sample were inoculated on a heart infusion agar medium containing rifampicin ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) for the quantitative analysis. Furthermore, the bacterial growth was examined by tryptosoy bouillon culture of one loopful uterin-mucus for the qualitative analysis.

Results

Intrauterine behavior of *Staphylococcus* and *E. coli* in pseudopregnant rats: The *Staphylococcus* and *E. coli* suspension were infused into the bilateral uterine cavities in each rats on the 4th day of pseudopregnancy to examine the intrauterine

Table 1 Intrauterine infection of *Staphylococcus* and macroscopical findings in pseudopregnant rats

Days after infusion of <i>Staphylococcus</i> into uterus	Bacteria/ml	Isolation of bacteria				Macroscopical findings of uterine-horns		No. of corpora lutea	
		Quantitative analysis		Qualitative analysis					
		L ¹⁾	R	L	R	L	R	L	R
0.5 hrs.	3.4×10 ⁷	3.0×10 ³	2.7×10 ³	+ ²⁾	+	No remarkable changes		7	6
12.0 hrs.	3.4×10 ⁷	4.5×10 ²	4.8×10 ²	+	+	No remarkable changes		8	8
1 day	9.0×10 ⁹	1.2×10 ⁴	2.8×10 ³	+	+	Swelling	Swelling	7	7
2 days	9.0×10 ⁶	4.0×10 ²	6.2×10 ⁴	+	+	Swelling	Swelling	8	9
3 days	3.0×10 ⁷	2.6×10 ³	7.3×10 ³	+	+	Deciduoma	Swelling	7	8
4 days	5.5×10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹	—	—	No remarkable changes		7	6
6 days	5.5×10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹	—	—	No remarkable changes		8	6
8 days	3.0×10 ⁷	2.0×10 ¹	<10 ¹	+	—	Swelling Secretion	Swelling Deciduoma	6	7
10 days	5.0×10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	—	—	No remarkable changes		6	5

1) L : Left uterine-horn, R : Right uterine-horn

2) + : Positive isolation of *Staphylococcus*, - : Negative isolation

behavior of these bacteria. In quantitative analysis of the *Staphylococcus* growth, 10^2 – 10^4 /ml of the bacterium were detected from the bilateral uterine-horns of rats until the 3rd day after the infusion. However, after the 4th day, only 2.0×10^1 /ml were detected from only the left uterine-horn on the 8th day (Table 1). Qualitative analysis showed the results corresponding to those of

quantitative analysis.

Macroscopical examination of the uterine-horns revealed no remarkable changes until 12 hours after infusion of the *Staphylococcus* suspension. However, all the rats developed a swelling in the bilateral uterine-horns from the 1st to the 3rd day. On the 3rd day, 2 deciduums of a rice-grain size appearay near the site of infusion in the left

Table 2 Intrauterine infection of *E.coli* and macroscopical findings in pseudopregnant rats

Days after infusion of <i>E.coli</i> into uterus	Bacteria/ml	Isolation of bacteria				Macroscopical findings of uterine-horns	No. of corpora lutea		
		Quantitative analysis		Qualitative analysis					
		L ¹⁾	R	L	R	L	R	L	R
0.5 hrs.	1.2×10 ⁷	3.4×10 ²	4.1×10 ²	+	+	No remarkable changes		9	8
12.0 hrs.	2.3×10 ⁷	1.0×10 ¹	3.0×10 ¹	+	+	No remarkable changes		8	6
1 day	2.3×10 ⁷	<10 ¹	2.0×10 ¹	+	+	No remarkable changes		7	8
2 days	3.9×10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	—	—	No remarkable changes		7	6
3 days	2.9×10 ⁷	4.2×10 ²	<10 ¹	+	—	Swelling	Swelling	8	9
4 days	2.9×10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	+	—	No remarkable changes		7	7
6 days	4.0×10 ⁷	<10 ¹	1.0×10 ¹	—	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	8	8
8 days	4.0×10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	+	+	Swelling Secretion Deciduoma	Swelling Secretion Deciduoma	7	6
10 days	4.0×10 ⁷	1.0×10 ¹	<10 ¹	+	+	Swelling Secretion Deciduoma	Swelling Secretion	6	5

1) L : Left uterine-horn, R : Right uterine-horn

2) + : Positive isolation of *E.coli*, - : Negative isolation

Table. 3 Effects of intrauterine infection by *Staphylococcus* and *E.coli* on blastocysts implantation

No. of rats	No. of transplanted blastocysts			No. of implanted blastocysts			Rate of implantation (%) ²⁾	Impantation in each rat	Macroscopical findings of uterine-horns		No. of corpora lutea		Isolation ³⁾ of bacteria	
	L ¹⁾	R	Total	L	R	Total			L	R	L	R		
<i>Blastocyst group</i>											7	6		
1	4	4	8	0	2	2	25.0	+	No changes	No changes	7	6	—	—
2	3	3	6	3	2	5	83.3	+	No changes	No changes	7	7	—	—
3	5	5	10	3	5	8	80.0	+	No changes	No changes	5	6	—	—
4	7	5	12	2	2	4	33.3	+	No changes	Deciduoma	7	5	—	—
5	5	5	10	2	0	2	20.0	+	No changes	Deciduoma	8	6	—	—
6	3	3	6	1	1	2	33.3	+	No changes	No changes	5	7	—	—
7	4	3	7	4	3	7	100.0	+	No changes	No changes	6	7	—	—
8	4	4	8	4	2	6	75.0	+	No changes	No changes	8	8	—	—
9	4	4	8	4	3	7	87.5	+	No changes	No changes	8	7	—	—
10	5	5	10	3	5	8	80.0	+	Deciduoma	No changes	7	7	—	—
Total			85			51	60.0	10/10(100%)						
<i>Staphylococcus group</i>														
11	3	3	6	0	0	0	0	—	No changes	Deciduoma	7	7	—	—
12	5	4	9	0	1	1	11.1	+	No changes	No changes	6	4	—	—
13	4	6	10	1	0	1	10.0	+	No changes	Swelling	6	4	—	—
14	5	6	11	0	4	4	36.4	+	Swelling	Secretion	6	8	+	+
15	4	4	8	1	0	1	12.5	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	7	8	+	+
16	3	3	6	2	0	2	33.3	+	No changes	Swelling	5	7	—	—
17	5	6	11	0	4	4	36.4	+	Swelling Secretion	No changes	8	8	—	—
18	3	4	7	1	1	2	28.6	+	No changes	No changes	6	7	—	—
19	4	4	8	0	2	2	25.0	+	Swelling Secretion	Swelling	6	7	—	—
20	3	4	7	0	0	0	0	—	No changes	No changes	7	8	—	—
Total			83			17	20.5	8/10(80%)						
<i>E.coli group</i>														
21	5	5	10	4	2	6	60.0	+	No changes	No changes	9	8	+	+
22	6	6	12	0	6	6	50.0	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	7	6	+	+
23	5	5	10	3	2	5	50.0	+	No changes	Swelling Secretion	7	5	+	+
24	4	3	7	0	1	1	14.3	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	8	5	+	+
25	5	5	10	0	3	3	30.0	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	6	8	—	+
26	5	4	9	0	0	0	0	—	No changes	No changes	7	6	—	—
27	5	5	10	3	2	5	50.0	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	6	7	+	+
28	5	5	10	1	0	1	10.0	+	No changes	No changes	6	5	—	—
29	5	5	10	0	0	0	0	—	No changes	No changes	9	8	—	—
30	3	3	6	0	1	1	16.7	+	Swelling Secretion	Swelling Secretion	7	7	+	+
Total			94			28	29.8	8/10(80%)						

1) L : Left uterine-horn, R : Right uterine-horn

2) Rate of implantation = No. of implanted blastocysts/No. of transplanted blastocysts × 100

3) Isolation of bacteria by quantitative analysis (+ : positive isolation, — : negative isolation)

uterine-horn. A marked swelling and retention of the uterine secretion were observed in the left uterine-horn on the 8th day in rats from whom *Staphylococcus* was isolated. A remarkable swelling and 2 deciuomas were also found in the right uterine-horn. However, no remarkable changes were present macroscopically in the uterine-horns of other 3 rats autopsied on the 4th 6th, and 10th day respectively after infusion.

In quantitative analysis of the intrauterine growth of *E. coli*, 10^1 – 10^2 /ml of *E. coli* were isolated from the bilateral uterine-horns until 12 hours after infusion (Table 2). The bacterial growth was 2.0×10^1 /ml in the right uterine-horn on the 1st day, 4.2×10^2 /ml in the left uterine-horn on the 3rd day, 1.0×10^1 /ml in the right uterine-horn on the 6th day and 1.0×10^1 /ml in the left uterine-horn on the 10th day. In qualitative analysis, *E. coli* was not isolated from the bilateral uterine-horns on the 2nd day, from the right uterine-horn on the 3rd day and 4th days and from the left uterine-horn on the 6th day. *E. coli* was isolated from the opposite sides on the 3rd, 4th and 6th days. Though the growth was low, *E. coli* persisted for a relatively long period in the bilateral uterine-horn. After infusion of *E. coli*, macroscopical examination of the uterine-horns revealed no remarkable changes, except for a mild swelling in the bilateral uterine-horns on the 3rd day. However, after the 6th day, a swelling and retention of the uterine secretion were found in the bilateral uterine-horns of all the rats. Furthermore, a few deciduomas of a ricegrain size were detected in the bilateral uterine-horns on the 8th day and in the left uterine-horn on the 10th day.

Simultaneous infusion of blastocysts and staphylococcus or E. coli suspension: Table 3 shows the results in the group of recipient rats treated by the transplantation of blastocysts alone into the bilateral uterine-horns on the 4th day of pseudopregnancy (Blastocyst group), the group treated by simultaneous infusion of the blastocysts and the *Staphylococcus* suspension (*Staphylococcus* group) and the group treated by simultaneous infusion of the blastocysts and the *E. coli* suspension (*E. coli* group).

The successful implantation of blastocysts was 10/10 rats (100%) in the blastocyst group, and each 8/10 rats (80%) in both the *Staphylococcus* and *E. coli* groups. In individual rats, the highest rate of implantation amounted to 100% in the blastocyst group (rat No. 7) but was 36.4% in the *Staphylococcus* group (rat No. 14 and 17) and 60% in the *E. coli* group (rat No. 21). The lowest rate was 20% in the blastocyst group (rat No. 5), while implantation was not achieved in 2 rats each of the *Staphylococcus* group (rat Nos. 11 and 20) and the *E. coli* group (rat Nos. 26 and 29).

The group ratio of implanted blastocysts to the total number of transplanted blastocysts was 51/85 (60%) in the blastocyst group, 17/83 (20.5%) in the *Staphylococcus* group and 28/94 (29.8%) in the *E. coli* group. As a result of one-way analysis of variance of the implantation ratios of blastocysts in the 3 groups, significant differences were observed among the groups ($p < 0.001$). The implantation ratios in the *Staphylococcus* and *E. coli* groups were significantly low than the blastocyst group by method of least squares ($p < 0.01$). However, no significant difference was observed between the *Staphylococcus* and *E. coli* groups.

Macroscopical examination of the uterine horns disclosed no remarkable changes except the development of a few deciduomas in the uterine cavities near the site of blastocyst infusion in 3 rats of the blastocyst group. In the *Staphylococcus* group, no abnormalities were found except the formation of 1 deciduoma in the uterus near the site of infusion in 1 rat (No. 11) of the 2 rats in which the implantation of blastocysts were not observed. A swelling and retention of the uterine secretion were observed in 6 rats (Nos. 13, 14, 15, 17 and 19) of the 8 rats in which the implantation of blastocysts were confirmed. In 2 rats (Nos. 14 and 15) of them, retention of the uterine secretion was found in the ipsilateral uterine-horn simultaneously with the implantation of the blastocysts. In the *E. coli* group, no remarkable changes were found in the 2 rats (Nos. 26 and 29) in which the implantation of blastocysts were not observed and in 2 rats (Nos. 21 and 28) of the 8 rats in which the implantation of the blastocysts were observed. In the remaining 6 rats (Nos. 22, 23, 24, 25, 27 and

30), however, a swelling and retention of the uterine secretion were found in the ipsilateral uterine-horn simultaneously with the implantation of the blastocysts.

The bacteria were not isolated altogether from the uterine-horns of all the rats in the blastocyst group. In the *Staphylococcus* group, the bacterium was isolated from the bilateral uterine-horns of 2 rats (Nos. 14 and 15) but not from 8 other rats (Nos. 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19 and 20). In the *E. coli* group, the bacterium was isolated from 7 rats (Nos. 21, 22, 23, 24, 25, 27 and 30) but not from 3 rats (Nos. 26, 28 and 29).

Enzymatic activities of *Staphylococcus* and *E. coli*: In the examination of the activities of 19 enzymes on *Staphylococcus* and *E. coli*, activities of 8 kinds of enzymes including phosphatase, esterase and amidase were observed in both the bacteria (Table 4). Of the 8 enzymes, activities of acid and alkaline phosphatase were higher degrees than the other enzymes. The activities of

leucine arylamidase in *Staphylococcus* and *E. coli* were more than 40 nmol and 5 nmol respectively, demonstrating a higher degree of activity in *Staphylococcus*. Conversely, the activities of esterase and esterase lipase were higher in *E. coli*. Trypsin and β -Galactosidase in *Staphylococcus*, and cystine arylamidase and α -Glucosidase in *E. coli* showed activities of approximately 5 nmol respectively. The patterns of enzymatic activities thus differed between the two bacteria used.

Discussion

The condition of uterus for the implantation of fertilized ovum is progestational proliferation in the endometrium under the influence of progesterone. Intrauterine bacterial growth is more easily inducible under the influence of progesterone^{4,5,7}. Furthermore, immature development of the uterine artery does not allow enough exudation of blood phagocytes in the early luteal phase².

The uterus at the time of blastocyst transplantation is considered to have a reduced resistance to bacteria. When the *staphylococcus* suspension was infused into the uterine cavities of the rats on the 4th day of pseudopregnancy which corresponds to the time of transplantation of fertilized ova, a relatively large amount of the bacteria were continuously detected in the uterus until the 3rd day in this study. However, the bacteria reduced subsequently and detected in only one rat on the 8th day. In the case of *E. coli*, a small amount of the bacteria was continuously detected until the 10th day. The differences in behavior between *Staphylococcus* and *E. coli* in the uterus seems due to the difference in phagocytosis of the bacteria by macrophages and neutrophils exuded into the endometrium approximately on the 4th or 5th day of pseudopregnancy.

Extrication from the zona pellucida is first required for blastocyst to implant. It is known that the zona pellucida is lysed by proteolytic enzymes such as pronase and trypsin. Since the hatching mechanism of blastocysts or some lytic mechanism on the endometrium or both of them are involved in denudation of the zona pellucida⁹,

Table 4 Enzymatic activities of *Staphylococcus* and *E. coli*

Enzyme	<i>Staphylococcus</i>	<i>E. coli</i>
Phosphatase alkaline	++1)	++
Esterase (C4)	±	++
Esterase Lipase (C8)	+	++
Lipase (C14)	±	+
Leucine arylamidase	+++	+
Valine arylamidase	+	±
Cystine arylamidase	—	±
Trypsin	+	—
Chymotrypsin	—	—
Phosphatase acid	+++	+++
Phosphoamidase	+	+
α -Galactosidase	—	—
β -Galactosidase	+	—
β -Glucuronidase	—	—
α -Glucosidase	—	+
β -Glucosidase	—	—
N-acetyl- β -Glucosaminidase	—	—
α -Mannosidase	—	—
α -Fucosidase	—	—

1) ± : 1—4 nmol, + : 5 nmol<, ++ : 20 nmol<
+++ : 40 nmol<

it seems that proteolytic enzymes are secreted in the uterus at the time of blastocyst Implantation. Therefore, it was considered that *Staphylococcus*, which contains proteolytic enzyme such as leucine arylamidase, valine arylamidase and trypsin, achieves easier growth in the uterus than *E. coli*.

The functional life of corpora lutea of pseudo-pregnant rat is about 14 days. The glycogen content increases in the early stage of progestational proliferation in comparison with the follicular stage¹⁰⁾. Glycogen is dissociated into α -D-glucose-1-phosphatase by phosphorylase¹¹⁾. Such an intrauterine condition during pseudopregnancy when α -glucosidase exists in the endometrium seems to be better suited for growth of *E. coli* than that of *Staphylococcus*.

In the blastocyst group in which only the blastocysts were transplanted, the rates of implantation ranged from 20% to 100% for the mean of 60%, which approximately agreed with those reported earlier⁷⁾. The mean implantation rate was 20.5% in the *Staphylococcus* group and 29.8% in the *E. coli* group. These were considerably lower compared to the rate in the blastocyst group. When the blastocyst are simultaneously infused together with *Staphylococcus* or *E. coli*, these bacteria largely influence the implantation of the blastocysts, but both the bacteria failed to completely inhibit the implantation. In all the individual rats in which *Staphylococcus* and *E. coli* were isolated from the uterus, the implantation of the blastocysta was observed. Furthermore, the difference in the rates of implantation between the *Staphylococcus* and *E. coli* groups seems to have resulted from the overall effect of factors such as the difference in the responses of intrauterine macrophages or neutrophils to *Staphylococcus* and *E. coli* and the difference in the activities of uterine mucous components and bacterial enzymes. At any rate, the uterus on the 4th day of pseudopregnancy offers an indispensable condition for implantation and development of fertilized ova, but at the same time is an environment suited for bacterial growth.

References

- 1) Hafez, E. S. E.: Reproduction in Farm Animals, ed 2: p367, Lea & Febiger Co. USA, 1968
- 2) Watanabe, M.: Endometritis caused by non-pathogenic bacteria and abortion. Chikusan no Kenkyu, 7: 1057, 1953
- 3) Lamming, G. E. and Rowson, L. E. A.: Ovarian hormones and uterine infection in cattle. R. Soc. Med., 46: 387, 1953
- 4) Yamauchi, M., Ashida, K., Mifune, R., and Nakahara, T.: Studies of the development of endometritis I. Jap. J. Animal Reprod., 1: 45, 1955
- 5) Yamauchi, M., Ochi, T., Nakahara, T. Inui, S., and Maruyama, Y.: Studies on the development of endometritis II. Jap. J. Animal Reprod., 2: 107, 1957
- 6) Laughon, B. E., Syed, S. A., and Loesche, W. J.: API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and *Spirochetes* of oral origin. J. Clin. Microbiol., 15: 97, 1982
- 7) Uchiyama, Y., Fukuyasu, T., and Ashida, K.: Effects of the infection of non-pathogenic bacteria in the uterus on successful implantation of blastocysts in rats. Jpn. J. Fertil. Steril., 33: 425, 1988
- 8) Noyes, R. W. and Dickmann, Z.: Survival of ova transferred into the oviduct of rat. Fertility & Sterility, 12: 67, 1961
- 9) Guraya, S. S.: Biology of ovarian follicles in Mammals. p51, Springer-Verlag Berlin, 1985
- 10) Ashida, K.: On the glycogen of the uterine endometrium during sexual cycle and under the effect of sexual hormones. Jap. J. Animal Reprod., 5: 53, 1959
- 11) Conn, E. E. and Stumpf, P. K.: Outline of biochemistry, ed 2: p167 (translated by Tamiya and Yagi) Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1971

ラットにおける子宮内細菌感染が 受精卵の着床に及ぼす影響

麻布大学獣医学部

赤池 誠 福安嗣昭 芦田浄美

偽妊娠 4 日目のラット子宮内にブドウ球菌と大腸菌をそれぞれ注入し経日的にその消長を調べ、さらに受精卵とブドウ球菌および大腸菌を同時注入し受精卵の着床にどのように影響するかを試験した。

ラット子宮内においてブドウ球菌は 3 日目まで、大腸菌は 10 日目まで検出された。ラット 10 例の左右子宮内にそれぞれ 3 ～ 7 個の胚盤胞のみを移植した胚盤胞群では、10 例全てに着床が認められ、移植した胚盤胞 85 個中 51 個が着床し、卵の着床率は 60 % であった。一方、胚盤胞とブドウ球菌あるいは大腸菌を同時に左右子宮内に注入した細菌注入群では、いずれも 10 例中

8 例 (80 %) に着床が認められた。これら試験群の卵着床率はブドウ球菌群では 17 個/83 個 (20.5 %)、大腸菌群では 28 個/94 個 (29.8 %) であり、これら細菌注入群の個体別および卵別の着床率は胚盤胞のみの移植に比べ明らかに低かった。

(受付：1988 年 8 月 18 日)

地方部会講演抄録

昭和 63 年度日本不妊学会東北支部総会・学術講演会

日 時：昭和 63 年 10 月 1 日（土）

場 所：精養軒（新仙台ビル 7 階）

1. 不妊症患者における腹腔鏡所見の検討

吉田享子・田中良則・森良一郎

森 滋・鈴木雅州

（スズキ病院産婦）

不妊症の検査ならびに治療において腹腔鏡の意義は高く評価されている。今回、われわれは当院において、この 1 年間に腹腔鏡検査施行した 268 例の不妊患者の腹腔鏡所見を検討したので報告する。年齢は 23～43 歳で、原発性不妊 181 例、続発性不妊 87 例であり、不妊期間は 1～21 年で、平均 6.2 年であった。

1. 腹腔鏡実施不能だった症例は 1 例（0.37 %）のみであった。
2. 全体の 26 % の 69 例に異常を認めなかった。
3. 37 例（14 %）に内膜症を認めた。
4. 112 例（42 %）に何らかの癒着をみた。
5. 卵管の通過性と子宮内膜症の有無の間に関係を認めなかった。
6. HSG と腹腔鏡所見の一致率は 31～87 % であった。
7. 腹腔鏡検査において術中術後に障害を起こした症例は 1 例もなかった。

以上より腹腔鏡は安全かつ有用な検査と思われた。

2. 当院における内視鏡診断の現況

岡村けい子・菅野孝子・永井 宏

（向仁会 永井病院）

内視鏡診断は現在一般化されつつあり、近年ますます重要視されてきている。当院では、昭和 54 年より腹腔鏡、昭和 58 年より子宮鏡を導入し診断に用いている。今回は、昭和 61 年 4 月より昭和 63 年 3 月までに腹腔鏡検査を施行した 283 例について臨床的検討を行なったので報告する。

麻酔は、腰椎麻酔を主体としており、その割合は 283 例中 244 例（86 %）であった。

腹腔鏡診の適応は、不妊症 88 例（31.1 %）子宮内膜症 62 例（21.9 %）、骨盤腹膜炎 53 例（18.7 %）

であった。不妊症症例の腹腔鏡所見では、子宮内膜症 35 例（39.8 %）と約 4 割に子宮内膜症を認め、特に従来機能性不妊として扱われていた例における子宮内膜症の存在が注目される。

腹腔鏡前後の診断の一致率で最も低い骨盤腹膜炎（56.6 %）では、不一致例のほとんどに子宮内膜症を認めた。近年、腹腔鏡下手術をはじめとする治療処置が増加しつつあるが、今後は腹腔鏡による診断のみならず、治療への応用も検討して行きたい。

3. 当科における最近の AIH に関する検討

中谷一夫・木村芳孝

（釜石市民病院）

AIH にも GIFT の場合と同様な卵胞成熟のモニタリングを行ない、より正確な A I H のタイミングの設定を試みた。自然・刺激いずれの周期の場合も、卵胞成熟の徴候がそろった時点で画一的に HCG を投与して排卵時期の一定化を試み、その 24 時間後に A I H を行なった。

16 周期（13 例）から高度不良精液、過去 10 回以上の A I H の既往を有する例を除いた 11 周期では、7 周期が排卵周期であり、うち 3 周期が妊娠した。この 7 周期において HCG 投与時の尿中エストロゲン、卵胞径、精液所見のうち、妊娠、非妊娠両群間に差を認めたのは、非妊娠群での処理後精子運動率の軽度低下のみであった。しかし、HCG 投与（A I H）時の BBT は、低温最終日を 0 日として、妊娠群で +1（+2）日、非妊娠群では -1（0 日）であった。頸管粘液の性状は必ずしも、HCG 投与、A I H のタイミングの指標にはならなかった。

4. AIH 時の子宮頸管および精液細菌叢に関する検討

立崎達夫・鍵谷昭文・斎藤良治

（弘前大産婦）

A I H に伴う副作用としては、出血・疼痛・感染の 3 つが問題になってくる。そこで、われわれは A I H 時の子宮頸管と精液細菌叢の実態について検討した。

19 組の不妊カップルに計 55 回の A I H を施行し、子宮頸管内から *Lactobacillus*（68.4%）、*Streptococcus fecalis*（42.1%）、*E. Coli*（31.6%）などが検出さ

れた。精液では、Lactobacillus (57.9%), Staphylococcus (47.4%), E. Coli (21.1%) などが検出された。調査期間中 1 例に P I D が発症し、子宮頸管および精液より E. Coli が検出された。調査期間中 3 名 (15.8%) が妊娠した。妊娠した周期の子宮頸管および精液にも各種細菌が検出されたが、E. Coli は検出されなかった。

E. Coli は子宮頸管で約 30%, 精液で約 20% に検出されたが、A I H 後に生ずる P I D の病原菌として、最も重要なことが確認された。

5. 当科不妊外来における抗精子抗体の

スクリーニングとその臨床的意義

加藤充弘・児玉英也・福田 淳

武田志保・福島峰子・真木正博

(秋田大産婦)

目的：当科不妊外来における抗精子抗体に関連した免疫学的不妊症の現状の検討。

方法：昭和 63 年 4 月より 63 年 8 月までの期間に、当科不妊外来において性交後試験の成績から抗精子抗体の存在が予測された女性、および諸検査を施行しても原因の認められない女性を中心に 161 名を対象とした。抗精子抗体の検出法は、磯島らの報告に基づく微量精子不動化試験と、Friberg の報告に基づく微量精子凝集試験を用いた。

結果：1) 全体の 16.1% に抗精子抗体が認められた (精子不動化抗体 11.2% 精子凝集抗体 8.1%)。

2) 抗精子抗体を有する患者の中で、精子不動化抗体と精子凝集抗体を有する患者は、19.2% であった。

3) 精子不動化抗体と性交後試験との間には関連性が認められた (χ^2 検定: $P < 0.05$)。

4) 抗精子抗体陽性患者の A I H での妊娠率は低率であった。

結論：外来治療に抵抗を示す抗精子抗体陽性患者には、対外受精による治療が必要である。

6. 当科不妊外来 4 年間の妊娠成功例の検討

牧野浩充・山内隆治

(白河厚生総合病院産婦)

大井嗣和・平野睦男

(東北大産婦)

最近 4 年間に当科不妊外来を受診した挙児希望の不妊婦人 166 例を対象として、妊娠に成功した 76 例について検討し以下の結果が得られた。

1. 年齢別分布：25 歳から 29 歳までが最も多かった。

2. 不妊期間：1 年から 2 年までが最も多いが続発不妊では期間の長いものも多い。

3. 治療期間：1 年未満が大部分であるが、原発不妊では、長期間を要するものも多かった。

4. 不妊因子別分類：全体として内分泌因子、卵管腹膜因子、男性因子の順に多いが、原発不妊では男性因子が、続発不妊では卵管腹膜因子が多かった。

5. 妊娠成立に関与した検査、治療方法：内分泌療法、H S G、A I H の順に多く、これは不妊因子の結果を反映しており、原発不妊では、A I H、続発不妊では、H S G による妊娠が多い。

6. 転帰：帝切分娩がやや高率を占めているが、流産率は、自然妊娠と大差なかった。

7. 当院不妊外来の検討

小菅周一・倉本雅規・中山千冬

中野盛夫 (八戸市民病院産婦)

昭和 59 年 6 月から 63 年 9 月までの期間の当科不妊外来の臨床統計について報告する。この間、当科不妊外来で治療した不妊症患者は 658 例で、うち 299 例が妊娠成功し、妊娠率は 45.5% であった。妊娠率は原発性・続発性とも大差なかった。流産率は 16.1% であった。不妊期間別の妊娠率では、不妊期間が短いほど妊娠率が高く、5 年を境として有意に低くなった。妊娠成功例の 9 割は治療期間 2 年以内の妊娠であった。

不妊原因では、卵管腹膜因子・排卵因子が多かった。原因別の妊娠率では、黄体機能不全・排卵因子で高く、子宮内膜症・頸管因子で低かった。

治療法では、クロミフェン・卵管通水・当帰芍薬散が多く用いられていた。

治療法別の妊娠率では、クロミフェン・HMG + HCG・プロモクリプチン等が高く、手術・A I H・グナゾール等で低かった。総じて、内分泌的な原因を持つものの方が物理的な原因を持つものより良好な成績であった。

8. 当科における卵管性不妊診断の現状

武田志保・加藤充弘・福田 淳

児玉英也・針生峰子・真木正博

(秋田大産婦)

昭和 62 年 1 月から 63 年 9 月までに当科において施行されたラパロスコピー症例 72 例について、既往歴、臨床所見、H S G 所見、血中クラミジア抗体価等を retrospective に検索し、これらの卵管性不妊における診断的意義を検討した。その結果、

1. 何らかの既往歴を有する患者の 50% に骨盤内癒着が認められたが、全く既往歴のない者の 13% にも癒着が認められた。

2. 子宮内膜症のⅢ期以上の症例でなければ、臨床所見やHSG所見での確定診断は困難と考えられた。
3. HSGの異常所見では、卵管閉塞、卵管内遺残、拡散不良と骨盤内癒着に関連が認められ、特に前2者の診断的意義が高かった。
4. クラミジア・トラコマティス血中IgG抗体価は、骨盤内癒着のスクリーニングとして有用である可能性が示された。

9. 妊娠に成功した染色体異常の1例

毛利裕之・菊池順子・岸 東彦
斎藤 潔・渡辺正昭・遠藤 紘
島 功・森塚威次郎・高橋克幸
(国立仙台病院産婦)

不育症とは、習慣的な妊娠の中絶のために生児を得られぬものをいう。現在、不育症の原因としては、染色体異常、母体側異常、母児間の免疫学的不均衡などに大別されている。特に染色体異常による不育症は現段階では治療の対象となり得ず、挙児を断念する場合が多い。なかでも相互転座は習慣性流産夫婦で発見される代表的な染色体異常の1つである。

今回われわれは転座型染色体の母体より生児を得た症例を報告した。相互転座を有する患者の生児獲得率は、飯塚らの報告にすると12.1%と確率的予想値以下である。しかし、個々の症例でその取扱いは十分に慎重でなければならない。このような患者に対しては、統計的確率的予想値に基づいた、児獲得の可能性を十分に説明すること、および児獲得の可能性があれば辛抱強い治療が必要であると考えられる。

10. 精子運動能分析装置(HTM-2030)の使用経験

—Routine Semen Analysis との比較検討—

前原郁夫・佐藤和宏・佐藤滋彰
平松正義・高橋 勝・折笠精一
(東北大泌尿器)

不妊患者の精液246検体を用いて、通常精液検査と運動能分析装置(HTM-2030)による測定を同時に行ない、その結果について比較検討した。運動能分析装置での測定には、Makler 算定盤を用いた。精子濃度は相関係数0.88($P < 0.001$)と良い相関を示したが、分析装置の結果が、高値をとる傾向にあった。運動率については、相関係数0.59($P < 0.001$)と有意の相関を示したが、全般的に、通常検査での値が高かった。また、特に運動率の高い検体で、分析装置が高値をとるものがあった。精子運動能指数(Sperm Motile Efficiency Index)は、分析装置に

より測定した(運動率 $\times$ mean path velocity)の値と、比較的良好な相関($r = 0.70$, $P < 0.001$)を示し、妊孕性評価において重要とされる運動率、運動速度と相関する指数であることが示された。運動能分析装置は、精子運動性を客観的に、かつ迅速に評価するのに有用であると思われる。

11. 膿精液症(leucospermia)における

精漿中顆粒球 elastase の意義

佐藤滋彰・佐藤和宏・前原郁夫
平松正義・高橋 勝・折笠精一
(東北大泌尿器)

男子不妊症において、精子運動性に対する精液中白血球の影響に関しては不明な点が多い。われわれは昨年の本学会において膿精液症の臨床的事項について報告した(日不妊会誌, 33, 465)。今回、われわれは精液中顆粒球 elastase が精子運動性に如何なる影響を与えているかを、実験的に検討したので報告する。

精液に①末梢血白血球, ②末梢血赤血球, Latex 粒子, ③破壊白血球濾液をそれぞれ添加した結果で、WBCのSMEIに対する影響は化学的要因によるものと推定された。

そこで顆粒球 elastase について、以下の検討を加えた。①臨床例より算定し、正常値を400 mcg/L以下とした。②臨床例をSMEI値、WBC値より3群に分け、顆粒球 elastase 値と比較するとSMEIが低く、WBCの多いものほど高値を示した。③精液に各種濃度の elastase を添加すると、5分後に濃度順に急激に低下することから、明らかに elastase は SMEI に影響を及ぼすことが分かった。

12. 精子アクロシン活性に及ぼすカリクレインの影響について

長谷川剛志・酒井伸嘉・中原健次
小田隆晴

(山形県立河北病院産婦)

目的: Kallikrein が受精現象にいかなる影響を及ぼすかを検討する手始めとして、in vivo および in vitro における Kallikrein の acrosin proteolytic activity (APA) に対する影響を、われわれが開発した gelatin substrate slide test (GSST) を使用し検討した。

方法: ①男性不妊患者20名に Kallikrein 300 IU/日、3ヵ月間投与し、投与前後の APA を GSST で測定した。②男性不妊患者($n = 24$)の精液を洗浄後2群に分け、一方は Ham's F-10 液単独で、もう一方は Kallikrein (0.5 IU/ml) 添加 Ham's F-10 液

で精子浮遊液を作製した。これらを 37°C, 5%CO₂ 大気中で 2 時間培養し、各々の培養前後の精子の APA を GSST で測定し比較検討した。

成績：① Kallikrein 投与前後の APA は、投与後の方が投与前に比し有意に高値を示した。② 2 時間培養後の APA では、Kallikrein 添加群の方が Ham's F-10 単独群より有意に高値を示した。

結論：Kallikrein には in vivo および in vitro の両方において精子妊孕能の指標の 1 つである APA を有意に増加させる動きがあることが示唆された。

13. ヒト精子 capacitation に対する コレステロールの影響

会田都美子・吉松宣弘・柳田 薫
星 和彦・佐藤 章

(福島医大産婦)

ヒト精子の受精能獲得時間には個人差があるが、われわれは、この個人差とヒト精子コレステロール／リン脂質比 (C/PL 比) との関連について検討し、また、コレステロールの受精能獲得阻害効果について調べた。

8 例において、20%精子侵入率を示す時間は 3.6～28.3 時間、C/PL 比は 0.057～0.340 となり、両者に相関係数 0.956 の正の相関を得た。mBWW、および mBWW にコレステロール、dipalmitoyl phosphatidyl-choine (DPPC)、DPPC+コレステロールを添加した 4 つの培養液において、ハムスターテストを行なうと、コントロール群 55.4%、コレステロール群 28%、DPPC 群 42%、DPPC+コレステロール群 44%、となり、コレステロール群では有意に低値を示した。

以上より、ヒト精子受精能獲得時間の個人差には精子 C/PL 比が関与しており、コレステロールは、受精能獲得を抑制すると思われる。

14. ハムスターテストにおけるヒト血清アルブミンの影響と動物細胞培養用無血清培地の使用

渡辺清彦・柳田 薫・遠藤 力
星 和彦・佐藤 章

(福島県立医大産婦)

体外受精や初期胚の培養液に添加される血清や血清アルブミンの質は個々で大きく異なる。一定の培養条件が得られる新しい動物培養用無血清培地 ASF101 を用い、受精研究に使用可能か否かを検討した。

ハムスターテストでは精子侵入率は従来の mBWW 液では 58%、ASF101 では 44%、平均精子侵入数は

mBWW では 1.02、ASF101 では 0.60 で有意差を認めた。マウス受精卵の 2 cell stage の胞胚への発育実験では mBWW では正常発育卵数は 81%、ASF101 では 76% で有意差は無かった。

以上、今回使用した ASF101 培地は、マウス 2 細胞期胚の培養液として有効であり、ハムスターテストの成績は劣るが、品質の安定性、調整の簡便性、保存安定性の良さを考えるとき、今後、体外受精用培養液として検討してゆく価値があるものと考えられた。

15. 精子評価法としてのウシ頸管粘液貫通試験 (Penetrak)の意義

月川 奏・柳田 薫・佐々木宏子
星 和彦・佐藤 章

(福島県立医大産婦)

ヒト精子のウシ頸管粘液貫通テストである Penetrak を用いて、精子濃度、精子運動率、精子運動の活性化である hyperactivation (タイプ D) との関連性について比較検討した。

精液分析を行なった後、被験精液中に Penetrak をたて、90 分後、先頭精子の進行距離を求め、同時に同一精液に精置法を行ない、swim up してきた精子の 300 分後の hyperactivation の状態を顕微鏡ハイスピードビデオを用いて観察し、Penetrak との相関を求めた。

その結果、Penetrak と精子濃度、精子運動率との間には、それぞれ正の相関が得られた (相関係数 0.664, 0.610)。タイプ D の割合と Penetrak には、0.862 という上記よりさらに強い相関が得られた。Penetrak が直接 hyperactivation をみているわけではないが、正の強い相関を認めたことにより、精子妊孕能のスクリーニングに、Penetrak は有用と思われる。

16. 同種および異種動物の尿による雄ヤギの フレーメン誘起について

福岡俊文・佐々田比呂志・康珉秀
正木淳二 (東北大農)
鹿股幸喜 (仙台市八木山動物公園)

フレーメンは、動物が上唇を曲げた特異な表情を示す行動で、雄が雌の尿や陰部を嗅いだ直後によくみられることから、雌の発情と関連があると考えられてきた。しかし、非発情個体の尿を嗅いだ時や雌および幼獣でも出現することがわかってきており、本反応の出現機構や意義の再検討が必要となっている。

本研究は、ヤギを用い、様々な動物種の尿を鼻先に噴霧することにより、ヤギの個体・性および供試

尿間の反応差を調べた。その結果、すべての供試尿は、いずれかの個体に反応を誘起させることが可能であったが、尿の種類による差は明確ではなかった。雄に比べ雌の反応は明らかに微弱で、去勢雄の反応は雄型または雌型に近い中間型であった。また雄間でも個体差がみられ、うち2頭はいずれの尿に対しても強い反応を示した。抗アンドロジェン投与により性徴発現が弱まった雄は、フレーメン反応も抑制された。以上フレーメンは、発情個体からの性フェロモンに限定されるものでなく、またアンドロジェンが関与している可能性が示唆された。

17. 哺乳動物の精巣重量に関する考察

須藤淳一・正木淳二
(東北大農)

鹿股幸喜
(仙台市八木山動物公園)

哺乳動物の精巣重量については、動物種間に明らかな差が見られるだけでなく、体重に対する割合においても多様なデータが示されている。特に、霊長目動物ではその交尾形式との興味ある考察がなされている。そこで本調査では広範な哺乳動物について、精巣重量/体重の値(以下、Tw/Bw)を調べ、動物種または繁殖性に伴う特徴が見られるかどうかを検討した。

動物の体重、精巣重量等の資料は、主に全国の動物園および農水省畜産試験場より提供された測定値に基づき、成熟個体についてのみ Tw/Bw 値を算出した。予め動物を目・科 程度に分類した後に考察を行なった。

多くの動物は目・科内で均一な Tw/Bw 値を示したが、幾つかの目・科内では相当のバラツキが見られた。ここではそれらの原因が動物種間の繁殖性の差によると思われる霊長目、食肉目ネコ科、および偶蹄目動物について検討した。また、偶蹄目動物中には家畜であるウシとブタが含まれており、それらが野性動物から家畜化されて来た間に生じたと思われる変化についても考察した。

18. 早発卵巣不全に関する臨床的検討

伊藤 潔・田村みどり・河野秀昭
渡辺英子・古橋信之

(太田総合病院産婦)

星合 昊・平野睦男

(東北大産婦)

当科における早発卵巣不全(POF)患者12名に対し、免疫学的検査を含む諸検査を施行し、うち1

例がLH-RH analogue(Buserelin)にて排卵誘発に成功したのでここに報告する。

免疫学的検査としては、5例に対し抗核抗体、抗サイログロブリン抗体、抗胃壁細胞抗体、抗副腎皮質抗体を測定し、3例では抗核抗体のみを測定した。抗体陽性例は2例に認められた。1例は医原性のPOFと考えられる症例で、抗体検出との関連は不明であるが、もう1例はカンジダ肺炎の再発など何らかの自己免疫疾患との関連が疑われた。

排卵誘発に成功した1例は、33歳の原発不妊患者で、Buserelin-HMG-HCG療法にて排卵を来した。この症例は腹腔鏡および生検にては卵胞の確認できなかった症例であり、このような症例に対しても、Buserelinは試みる価値のある治療法であると思われる。

19. 潜在性甲状腺機能低下症と黄体機能

児玉英也・加藤充弘・福田 淳
武田志保・福島峰子・真木正博
(秋田大産婦)

当科外来で不妊原因検討中の正常月経周期を有する婦人42名を対象とし、血中T₃、T₄値TRH testによる血中PRL、TSHの反応により潜在性高PRL血症(高P)、潜在性甲状腺機能低下症(低T)のスクリーニングを行なった。同時にこれら婦人の黄体機能を評価し、これら内分泌異常の黄体機能に及ぼす影響を検討した。TRH testでの15分値のTSHが30μU/ml以上の例を低下とすると、12/42例(33%)の婦人がこれに相当した。低下患者の半数に、高Pの合併が認められた。子宮内膜日付診の遅延は、正常婦人2/21例(10%)、高Pのみ1/7例(14%)、低Tのみ3/7例(43%)、高Pと低Tの合併例4/7例(57%)と、低Tの認められた患者に高率であった。

潜在性甲状腺機能低下症は卵巣機能に影響を与えることが示唆され、一般臨床においても重要な問題であると考えられた。

20. 卵巣におけるステロイド産生に及ぼす

プロラクチンの影響

川越慎之助・広井正彦
(山形大産婦)

培養ヒト顆粒膜細胞のステロイド産生に対するプロラクチン(ovine PRL)の影響を検討した。E₂の基礎分泌に対し、あるいはアンドロステンダイオン添加によるaromataseに対し、PRL 1000ng/mlは抑制作用を示したが400ng/ml以下では影響なく、培養期間6日間以内でも影響をみなかった。プロゲステ

ロン分泌に対しても同様の所見がえられ、hCG 添加によるプロゲステロン分泌亢進も、PRL400~1000ng/ml で6~8日間培養の際に抑制がみられた。

Cytodex beads に接着した細胞の superfusion では、8-brom CAMP (1mg/ml) の添加は、progesterone 分泌を促進したが、PRL 1000ng/ml で細胞を前培養すると、5日間培養の際は、CAMP の作用を減弱させた。このような成績から、PRL は卵巣にも直接作用してその機能を低下させるが、そのためには大量で、ある程度の期間作用する必要があると思われる。また、障害部位は post CAMP にもあると推定される。

21. ヒト腹水のマウス初期胚の発育に及ぼす影響

阿部利明・柳田 薫・菅野 薫
星 和彦・佐藤 章

(福島県立医大産婦)

原因不明の不妊症には、卵管閉塞等、機械的障害のない軽症から中等症の子宮内膜症患者が多く存在することが、最近わかってきている。その原因の一つとして、内膜症による腹水の変化に伴う精子運動性、卵・精子相互作用、初期胚発育に対する影響等が報告されている。

今回われわれは、子宮内膜症患者および非子宮内膜症患者より得られた腹水を非働化後、培養液中に加え、マウス2細胞期胚の分割に及ぼす影響について検討した。

子宮内膜症腹水を加えた群では、濃度依存性に卵発育が抑制される傾向が見られ、また非内膜症群に比べ、受精卵はより早い分割の時期に発育が抑えられ、変性に陥るものと思われた。しかし、非内膜症腹水の中にも発育を抑制する例があり、内膜症腹水にのみ見られる特異的な影響か否かは、今後検討して行かなければならないものと考えている。

22. 精子無力症例に対する

マイクロマニピュレーションの応用

斎藤英和・佐藤文彦・斎藤隆和
広井正彦 (山形大産婦)

精子無力症症例では、体外受精の成功率は低く、体外での受精の方法に改善が必要であった。最近マイクロマニピュレーションを用いて Zona Opening や精子細胞腔注入法が開発され、われわれもこの方法を用いて精子無力症症例の媒精を施行し、この方法の有用性を検討した。

以前通常の体外受精の媒精法を用いても受精を認めなかった10症例より33個の卵を採取し、通常の

媒精法(10個)、Zona Opening (5個)、精子細胞腔注入法(18個)を用いて媒精し、18時間後に2前核の有無にて受精を判定した。通常の媒精法、Zona Opening では受精を認めず、精子細胞腔注入法では2個の卵に2前核を認めた(11%)。また、Zona Opening では、細胞腔への精子進入を認めなかった。

以上より、精子無力症症例で通常の体外受精媒精法で受精しない症例でも、精子を細胞腔まで注入すれば受精能力を示す症例もあり、精子細胞腔注入法の有用性が示唆された。

23. 初期受精卵凍結での凍結保存剤の検討

佐藤文彦・斎藤英和・広井正彦
(山形大産婦)

卵割前の接合子の段階での凍結保存法で好成绩が報告されている。われわれはマウスの1細胞期胚を用い、凍結保護剤、受精後の時間の違いによる凍結成績を検討した。

B6C3F1 マウスに hMG-hCG を投与、hCG 投与後24時間後に1細胞期胚に1.5M dimethylsulfoxide (DMSO) + 0.2M sucrose, 1.5M propandiol (PROH) + 0.2M sucrose, または glycerol を加え、1°C/min で-7°C まで冷却した後、植氷し、0.33°C/min で-35°C に冷却し、保存した。また hCG 投与後27時間、30時間で PROH を用いて凍結した群を設けた。hCG 後24時間群では PROH 群が融解時64.3%が正常、42.3%が融解後に卵割を開始したが、DMSO 群、glycerol 群では融解後の発育は低下した。また hCG 投与27時間群30時間群では融解時、72.7, 52.1%が正常、69.7, 37.5%が卵割し、hCG 投与後30時間以降は凍結の成績が落ちた。1細胞期での凍結保存は前核期から第1分裂前に PROH を用いれば成績も良く、有用であると思われる。

24. 山形大学における体外受精による

妊娠36例の分析

田中栄一・斎藤英和・佐藤文彦
平山寿雄・斎藤隆和・川越慎之助
広井正彦 (山形大産婦)

体外受精・胚移植(以下、IVF-ET と略す)は不妊症の治療法として臨床に広く応用されている。しかし、その妊娠率は低く、多くの点で改善されなければならない。今回、われわれは当科にて IVF-ET を施行し、妊娠に至った38症例をその予後によって流産群(A群)と正常群(N群)に分け、各パラメーターについて検討を加えた。その結果、症例の予後は、年齢、採卵数、精子濃度、精子運動率、胚移植

数によって影響を受ける可能性があるが、特に今回の結果では、年齢、採卵数、成熟卵数によって影響を受け、女性側因子が、妊娠の予後に大きく影響を及ぼしていた。

すなわち、年齢が高くなるに従い、妊娠にしても流産する率が高くなり、採卵数や成熟卵数の少ない症例ほど流産する可能性を高める傾向がみられた。

特別講演

不妊症診療雑感

鈴木雅洲

(東北大学名誉教授、スズキ病院理事長)

第 33 回日本不妊学会九州支部総会

(第 88 回九州医師会医学会第 7 分科会)

日 時：昭和 63 年 11 月 27 日 (日)

会 場：宮崎県医師会館

1. 当科における習慣流産の治療成績の検討

濱田政雄・佐野正敏・中村元一

久永幸生・中野仁雄 (九大婦産)

目的：習慣流産の原因は多岐にわたり、内分泌異常、子宮形態異常などに加えて、近年免疫学的の不均衡も強く提唱されている。今回、当科における習慣流産の治療成績を解析し、治療の有効性について検討を加えたので報告する。

対象および結果：当科不妊外来を受診した連続 2 回以上の流産歴を有する 64 症例を対象とした。流産原因としては何らかの黄体機能異常を示す症例が 43 例と最も多く、その 65 % に有意に高い HLA の夫婦間共有を認めた。ついで子宮因子、染色体異常、膠原病などであった。治療後の妊娠症例は 37 例で、それぞれ 28 例、8 例、1 例であった。黄体機能異常治療後の妊娠のうち 3 例は胎児染色体異常、2 例が原因不明で流産した。子宮因子での妊娠 8 症例のうち形成術後の 6 例はすべてが分娩に至り、子宮腔内癒着、巨大子宮筋腫の 2 例が流産した。

結論：習慣流産の原因として黄体機能異常は考えられるよりも多くまた治療効果も強く認められた。

2. 当科における習慣性流産の免疫・遺伝学的検索

竹迫俊二・塩川宏信・白男川邦彦

岩元一朗・吉永光裕・堂地 勉

藤野敏則・永田行博・

(鹿児島大産婦)

当科外来において、これまで原因不明とされてき

た習慣性流産夫婦 18 組について、染色体検査、HLA タイピングおよび ELISA 法による血中抗リン脂質抗体の有無など、免疫・遺伝学的検索を行なった。

染色体検査異常例は 12 組中 4 例にみられたが、うち 2 例はその後妊娠し、無治療で妊娠を継続し、生児を得た。夫婦間 HLA 適合性は、HLA-A, B, C 抗原で 2 つ以上適合例が 9 組中 6 組、DR 抗原適合例は 9 組中 2 組であった。リン脂質依存性の凝固試験である活性部分トロンボプラスチン時間異常は 1 例にみられた。その症例は以前より SLE と診断されており、子宮内胎児死亡の際の胎盤には梗塞がみられ、自己免疫的な機序の関与が示唆された。

以上のことより、習慣性流産には幾つかのタイプがあり、諸検査によりタイプ分けしたうえで、治療の適否、治療の種類を決めることが必要と思われる。

3. 子宮奇形における超音波検査の診断性に

関する検討

吉満陽幸・中村元一・濱田政雄

中野仁雄 (九大婦産)

目的：子宮奇形の症例 16 例を対象に超音波検査を行ない、その診断性を検討した。

方法：対象は重複子宮 2 例、双角子宮 1 例、中隔子宮 5 例、不完全中隔子宮または弓状子宮 6 例、単角子宮 2 例であった。2 例は妊娠中に、他は卵胞期および黄体期において、充分な膀胱充満下にセクタ型電子スキャンを用いて子宮像を観察した。

成績：卵胞期では子宮内腔の形態診断が困難であったが、黄体期では echogenic な子宮内膜が観察され、子宮横断像における内膜像とそれを囲む子宮筋層の輪郭の観察により、その子宮奇形のタイプ診断が可能であった。その超音波診断は、腹腔鏡検査または開腹手術を行なった 9 例において、それらの所見が一致していた。

結論：子宮奇形における超音波診断は、黄体期における echogenic な子宮内膜を観察することにより容易となり、その臨床的な有用性が示唆された。

4. 46, XY gonadal dysgenesis と考えられた症例

家村和千代・池田俊一・竹内一浩

堂地 勉・永田行博

(鹿児島大産婦)

原発性無月経を主訴とし、46, XY で子宮も卵巣も保有しているものと考えられた症例を経験したので報告する。

症例は 19 歳の事務員。同胞は 3 人で姉に月経異常は認めない。昭和 63. 5 月無月経を主訴として近医

受診し、ホルモン剤注射を受けるも出血はみられず、同年7月2日上記主訴にて当科受診す。

身長160cm、体重50kg、乳房未発達、恥毛(一)、外陰部小児様。内診にて子宮体部は鳩卵大。両側付属器は触知せず。USTでは子宮とその左側に卵巣らしきものを確認できた。内分泌学的には、LH135mIU/ml、FSH124mIU/ml、PRL8.7ng/ml、テストステロン33.5ng/ml、プロゲステロン0.3ng/ml、 E_2 7.4pg/ml、DHEA-S505ng/mlでhypergonadotropic hypogonadismを示した。Kaufmann療法を試みたところ、少量の出血を認めた。染色体は46, -XYであった。

以上より、46, -XYで表現型は女性型を示す性分化異常症の46, -XY gonadal dysgenesisと診断した。

5. 卵管通過障害に対するウロキナーゼ通水(第2報) ——卵管通水診断治療器(TOITUKH-700)の 圧力波型表示プログラムによる評価——

高柳茂生・吉田耕治・大塚治夫
及川和郎・岡村 靖

(産業医大産婦)

卵管疎通性の診断と疎通障害の治療としての通水法の評価は現在でも確定したものとはいえない。通水液中には通常、副腎皮質ホルモン製剤と抗生物質を混入するが、ウロキナーゼも使用する価値があると思われる。

ウロキナーゼの効果としては、フィブリン沈着の除去、病的組織の融解剝離、卵管蠕動運動の活性化などが想定されている。

今回は、昭和63年3月に福岡市で開催された第5回生殖内分泌懇話会で報告したように、トーイツの卵管通水診断治療器KH-700の出力波型をNECのパソコンPC9801UVを用いて分析し、平均通水圧、圧力波型等を描記するシステムを用いて分析したので報告する。

Urokinaseにはミドリ十字製薬KKのウロキナーゼミドリ6,000IUを用いた。

6. 低圧ストレス環境下におけるCRF-ACTH 系の変動とゴナドトロピン分泌に及ぼす影響

有馬隆博 (国立別府病院産婦)

宇津宮隆史・角沖久夫・宮本新吾

(九大生医研産婦)

生体はストレスに対して防御反応を示すが、なかでも下垂体—副腎系の反応が中心をなす。また性ホルモンに関しても、ストレスの程度により様々な影

響がみられ、ストレスが過剰であれば、性機能障害を来す。

今回われわれは、一過性の身体負荷として、低圧タンク(人口気象室)による急性低圧環境を、また持続的負荷として、2週間にわたる高度7,000mの登山を設定し、各種ホルモン(ACTH, FSH, LH, Prol)の変化およびその干渉作用、さらにCRF負荷試験に対する反応を調べた。その結果、低圧ストレスでACTH、コルチゾールの副腎系ホルモンの上昇がみられ、同時期にプロラクチンも上昇した。しかし、FSH, LHについては有意な変動を示さなかった。

7. プロモクリプチン長期投与における ホルモン変化について

澄井敬成 (松山赤十字病院産婦)

宇津宮隆史・角沖久夫・宮本新吾

(九大生医研産婦)

近年、Dopamine agonistであるBromocriptineが排卵機能回復へ影響を与えると言われている。今回、われわれは、基礎体温上、正常と思われる患者6例、腹腔鏡検査で多嚢胞性卵巣症候群(PCO)と診断した8例について、Bromocriptine 5mg/dayを12ヵ月間投与し、投与前、3ヵ月後、12ヵ月後のLH, FSH, PRL, E_2 分泌に与える影響を調べた。正常群、PCO群は、LH分泌は、3ヵ月後には抑制されていた。しかしながら、12ヵ月後には投与前に比較して抑制されているものの、3ヵ月後に比較してLH分泌は増加していた。FSH, E_2 分泌は変化は認められなかった。

今回の研究により正常群、PCO群の両群において、Bromocriptineの長期投与により、LH分泌はむしろ増加する。このことは、LH分泌を抑制されている生体側の反応として、少しでもゴナドトロピンを分泌しようとする機能回復の一端を表しているのではないかと考えられる。

8. 下垂体ホルモン分泌に対する新しい dopamine 受容体作動薬の作用

松本信一郎・松尾直裕・古川達雄

白川光一 (福岡大産婦)

山田勝士・堂前真理子 (同薬理)

Prolactin分泌はdopamine性神経活動によって調節され、bromocriptineなどのdopamine D-2受容体作動薬がhyperprolactinemiaの治療薬として使用されている。今回われわれは新しいdopamine受容体作動薬であるB-HT 920 (talipexole)とSND 919のprolactin分泌に対する作用を検討した。

方法: Wistar 系雄性ラットを用い, prolactin 値は断頭採血後 radioimmunoassay により測定した。摘出下垂体での灌流実験も行なった。

結果: 血清 prolactin 値は, B-HT 920 (5~100 μ g/kg s.c.), 3-PPP (5~10mg/kg s.c.) あるいは SND 919 (5~250 μ g/kg s.c.) 投与により用量依存的に減少した。また prolactin 値は α -methyl-p-tyrosine (300mg/kg i.p.) や estradiol (35mg/kg x3days s.c.) 処置により増加し, この増加も B-HT 920 あるいは SND 919 投与により著明に抑制された。一方, B-HT920 は 10^{-8} ~ 10^{-6} M 濃度において摘出下垂体前葉組織からの prolactin 分泌も抑制した。

結論: B-HT 920 および SND 919 は, 下垂体 dopamine D-2 受容体の刺激効果を介して prolactin 分泌を抑制することが示唆された。

9. 酵素免疫測定法を用いた, 尿中 hCG

検出試薬ゴナクローム 50 の検討

森下哲哉・中村元一・松口博之
石 明寛・吉満陽孝・濱田政雄
中野仁雄 (九大産産)
井村陸規 (福岡通信病院産婦)

妊娠および絨毛性疾患の管理における尿中 hCG の測定系として hCG の β サブユニットの C 末端に対する 2 つの単クローン抗体を用いた hCG に特異的に反応する免疫酵素法であるゴナクローム 50 の検討を行なった。

標準 hCG 溶液を用いた基礎実験では測定感度は 31 mIU/ml で 1×10^7 mIU/ml までプロゾーン現象を認めなかった。また細菌尿, 糖尿などにおいても測定感度は変化せず, さらに LH, FSH および TSH とも各々 5000 mIU/ml まで交叉反応を認めなかった。不妊治療中に妊娠に至った患者 8 例では最も早いもので 3 週 5 日, 4 週以降は全例で陽性を示した。流産 2 例, 子宮外妊娠 1 例, 絨毛性疾患 5 例では, いずれもその経過に伴い本試薬は陰性化した。妊娠を含む性成熟期婦人 57 例では偽陽性, 偽陰性は認めなかった。ただし閉経後で絨毛性疾患以外の腫瘍性疾患では 25 例中 52% に偽陽性を認めた。

以上によりその特性を充分理解して使用すれば手軽で有用な測定系と考えられた。

10. 経腔的超音波断層法および簡易尿中エストロゲン測定法による卵胞成熟診断法

小池弘幸・金子政時・野田俊一
宮川勇生・森 憲正
(宮崎医大産婦)

卵胞成熟の診断には, 主として estrogen の測定と超音波断層法が用いられている。しかし, 血中 estrogen の測定は操作が複雑で時間を要し, また経腹的超音波断層法では, 膀胱充満の苦痛を伴い, その解像力も必ずしも満足できるものではなかった。今回, われわれは簡便かつ迅速に外来で実地可能な簡易尿中エストロゲン測定法 (ハイモニター E) と経腔的超音波断層法を用いて, 卵胞成熟の診断を検討したので報告する。

対象: 27 歳から 39 歳までの 16 例の不妊症患者 (原発不妊 12 例, 続発不妊 4 例) で, その内訳は自然排卵群 5 例, Clomid-HCG 療法群 9 例, HMG-HCG 療法群 2 例。

方法: Clomid 療法は clomid 50-150mg/日を 5 日間, HMG 療法は月経周期 5 日より HMG 150IU/日を連日投与した後, HCG 9,000IU を投与して排卵を誘発し, 月経周期 10 日より排卵まで観察した。

結果: 尿中エストロゲン測定と経腔的超音波断層法による卵胞計測は卵胞成熟と排卵の予知に有効であった。

11. 経腔的超音波断層法および尿中 LH 簡易測定法 (Discretetest) の併用による排卵予知について

梶村秀雄・布施正樹・山辺 徹
(長崎大産婦)

経腔的超音波断層法による卵胞発育の観察と尿中 LH 簡易測定法 (Discretetest) による LH surge の検出を組み合わせることにより排卵時期の予測を行ない, 本法の排卵予知法としての臨床的価値を検討した。

対象と方法: 当科不妊外来で人工授精を施行した 30 例 (62 周期) を対象とした。自然排卵は 32 周期 (A 群) および clomiphene による排卵誘発は 30 周期 (B 群) であった。月経周期 10 日目より連日経腔的超音波断層法により卵胞発育を観察し, 同時に Discretetest による尿中 LH の測定を行なった。

成績: 少なくとも前日に排卵の予知が可能であったのは 51/62 周期 (82.3%) であり, A 群では 26/32 周期 (81.3%), B 群では 25/30 周期 (83.3%) であった。また, 排卵時期の卵胞径の平均値は A 群では 22.6 ± 3.0 mm, B 群では 25.8 ± 4.8 mm であった。

結論：以上の成績より、本法は排卵の予知に対して臨床的価値の高い方法であると考えられる。

12. 体外受精・胚移植法(IVF-ET)における血中 LH の Enzyme immunoassay(EIA)の有用性

前浜俊之・佐久川政男・新崎盛雄

佐久本哲郎・東 政弘・中山道男

(琉球大産婦)

IVF-ET においては、採卵の時期決定を行なうために卵胞発育のモニタリングが極めて重要である。卵胞のモニタリングにあたっては従来、USGによる卵胞径の計測、尿中LH、E₂を測定してきたが、尿中LHの測定値は採尿時期、尿比重等により影響を受けやすいため、LH surge のより正確な把握に困難を来すことがある。今回われわれは血中LH測定に近年開発されたモノクローナル抗体を用いたEIA(MS-8001)を導入した。

尿中LHを指標にした8例中2例において穿刺卵胞液中に卵を見出せなかった。この2例はretrospectiveに行なった血中LH測定値からすれば、すでにLH surgeが起こっている例であった。一方血中LHを指標にした7例では全例でLH surgeの有無を知ることができ、すべて採卵ができた。

以上により血中LHの迅速測定は卵胞発育モニタリングにおいて有用であると思われる。

13. LH含有量の少ないhMGを使用した hMG-hCG療法の成績

井村睦親・石川治英

(福岡通信病院産婦)

中村元一・中野仁雄(九大産産)

LH含有量の少ないHMG「日研」®(「日研」)を使用したhMG-hCG療法を行ない、その成績を検討した。

対象は挙児希望を主訴として来院した排卵障害を有する27例で、うち15例では、パーゴナル®による排卵誘発も行なった。卵胞成熟のモニタリングは、主としてセクタ型電子スキャンを使用し、頸管粘液、尿中エストロゲン(E)値を参考にした。

パーゴナルを投与した15例50周期では、13例(86%)、41周期(82%)が排卵し、3例が妊娠した。一方「日研」では、23例(85%)、40周期(86%)が排卵し、6例が妊娠した。卵巢過剰刺激症候群(OHSS)はパーゴナルで10周期(20%)、「日研」では9周期(19%)に認められた。hCG切りかえ時の尿中E値を「日研」を使用した23周期で測定したが、尿中E値が200ng/ml以上の症例にOHSSが認

められた。

以上より「日研」の排卵誘発成績はパーゴナルと比較してほとんど差はなく、またOHSSの発生率も変わらないことが示唆された。

14. ヒト卵管上皮細胞培養の確立

(卵管の受精卵発育に及ぼす影響について)

竹内一浩・山元慎一・堂地 勉

永田行博 (鹿児島大産婦)

丸山征郎 (同第3内科)

体外受精・胚移植(IVF-ET)は、配偶子卵管内移植(GIFT)に比べて妊娠率が低い。そこで、われわれはIVF-ETの着床妊娠率が低いのは卵管因子が大いに関与していると考えている。以前よりわれわれは体内胚に比して体外培養胚でglycoprotein(fibronectin)の局在が消失している事実を報告してきた。今回、このことと卵管因子との関連性を解明するために、ヒト卵管上皮細胞の培養系を確立し、種々検討した。

手術により得られた有経婦人の卵管を無菌的に採取し、collagenase処理後、遠心したのち、卵管上皮細胞をmedium-199(10%NCS)にて培養した。培養上清は、コントロールとともにELISA法にてfibronectinを測定し、比較検討した。

さらにヒト卵管上皮monolayer cell culture系にマウス初期胚のembryo-assay系を導入しco-cultureを行なった。

15. 現在までのGIFT施行成績

西村宏祐・本田賀裕・山本勢津子

河野哲郎・古木義弘・松浦講平

藤崎俊一・岡村 均

(熊本大産婦)

当科では、昭和62年8月よりGIFT: Gamete Intrafallopian tube transfer(配偶子卵管内移植、以下GIFTと略す)を行なっており、現在までのGIFTの成績を検討し報告する。

当科不妊外来で昭和62年8月以降に、GIFTの適応とした27例を対象とした。過排卵刺激の方法としてhMG-hCG療法を用い、月経周期3日目よりhMGを2アンプル連日投与し、以後適宜増量した。周期6日目より卵胞モニタリングを開始し(経腔超音波断層法による卵胞径その他の計測および尿中エストロゲン測定等)、平均径16mm以上の卵胞を2個以上、かつ尿中E値100ng/ml以上に達した時点でhCG5000iuを投与し、34から36時間後に採卵を実施した。腹腔鏡下に採卵を行ない、1から4個の成熟卵

を片側の卵管に運動精子 10 万とともに移植した。27 周期に hMG-hCG 療法を施行し、5 周期に採卵を中止し (18.5 %), 22 周期に GIFT を施行し (81.5 %), 1 周期に chemical pregnancy (4.5%), 1 周期には妊娠継続例 (4.5%) が認められた。

16. Swim up 精子を用いた AIH の有用性

布施正樹・岡本純英・中村恒一
重松 潤・石丸忠之・山辺 徹
(長崎大産婦)

目的：私どもは、最近、精液静置法で swim up 精子を回収し AIH を施行している (A 群)。それは以前、無処理精液、2 分画射精法および Ficoll 液による洗浄濃縮法で AIH を行なっていた (B 群)。今回、A 群と B 群の A I H の成績を比較検討した。

対象・成績：A 群 (27 例) の A I H の適応は、乏精子症 16 例、精子無力症 3 例、機能性不妊 4 例、頸管粘液不良 3 例および逆行性射精 1 例であり、B 群 (20 例) は、乏精子症 12 例、機能性不妊 4 例および頸管粘液不良 4 例である。

妊娠率は、症例あたり A 群 25.9 % (7/27), B 群 5 % (1/20), 周期あたり A 群 10.1 % (7/69) B 群 1.0 % (1/97) であった。妊娠例の A I H 施行回数は、A 群では 7 例とも 3 回以内、B 群の 1 例は 3 回であった。妊娠経過は、A 群は 1 例が流産、B 群の 1 例も流産であった。swim up 精子を用いた AIH は、他法と比較すると著しい妊娠率の向上がみられた。A I H の精液調整法として、swim up 精子回収法は、有用であると考えられる。

訂正とお詫び

本誌第34巻第1号135(135)頁から140(140)頁の、左上・右上の、1988年1月1日・33巻5号は、それぞれ1989年1月1日・34巻1号の誤りです。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7回日本受精着床学会学術講演会

第7回日本受精着床学術講演会について、下記のごとくご案内申し上げます。多数のご出題ならびにご参加をお願い申し上げます。

会期：平成元年7月15日（土）・16日（日）

会場：フェニックス・プラザ

〒910 福井市田原1丁目13番6号

電話（0776）20-5060

特別講演：

1. Alexander Lopata (Australia)

The early human embryo: Its potential for growth, blastulation, hatching and hCG production in culture

2. Hans-Werner Denker (West Germany)

Biology of implantation

3. Jean Cohen (France)

Cryopreservation of pre-embryo in IVF/ET and related reproductive techniques

ワークショップ：着床をめぐる最近の知見

一般演題応募締め切り：平成元年4月20日

連絡先：〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23

福井医科大学産婦人科学教室内

第7回日本受精着床学会事務局

電話（0776）61-3111 内線2374

Fax（0776）61-3069

第7回日本受精着床学会

会長 富永 敏朗

第Ⅰ回 Microfertilization Seminar 御案内

第1回の seminar を下記の通り行いますので多数の方々の御出席をお待ち申しています。

日時 平成元年 4月22日(土) 午後2時より

場所 東京都千代田区霞ヶ関3-2-5 霞ヶ関ビル33階
東海大学校友会館 (Tel. 03-581-0121)

参加費 3,000円

連絡先

〒990-23 山形市飯田西2丁目2番2号
山形大学医学部産婦人科学教室
Microfertilization Seminar 広井 正彦宛
Tel. 0236-33-1122 内線 2261, 2263
Fax. 0236-32-2019 産婦・MFS

日本アンドロロジー学会 第8回学術大会

主題 “マクロのアンドロロジー”

会長 熊本悦明 (札幌医科大学泌尿器科学教授)

会期: 1989年7月28日(金), 29日(土)

場所: 札幌医科大学大講堂

主要プログラム:

1) 特別講演

“性行動の脳内機序” 大村 裕 (九州大学名誉教授)

2) シンポジウム (I) “男子の性役割と性行動”

司会 新井康允 (順天堂大学解剖学教授)

シンポジスト 福富 護 (東京学芸大学教育心理学教授)

熊本悦明 (札幌医科大学泌尿器科学教授)

新井康允 (順天堂大学解剖学教授)

特別発言者 大村 裕 (九州大学名誉教授)

3) シンポジウム (II) “男子更年期”

司会 井村裕夫 (京都大学内科学教授)

シンポジスト 名和田 新 (九州大学内科学教授)

大迫文麿 (島根医科大学内科学助教授)

笠原 嘉 (名古屋大学精神神経科学教授)

中野弘一 (東邦大学心療内科学講師)

玉田太朗 (自治医科大学産婦人科学教授)

丸田 浩 (札幌医科大学泌尿器科学助教授)

4) シンポジウム (III) “高齢者における性差”

司会 折茂 肇 (東京大学老年病学教授)

シンポジスト 中込弥男 (国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部部長)

川島誠一郎 (東京大学動物学教授)

朝長正徳 (東京大学脳病理学教授)

大内尉義 (東京大学老年病学講師)

大沢伸昭 (大阪医科大学内科学教授)

広井正彦 (山形大学産婦人科学教授)

丹田 均 (札幌三樹会病院院長)

5) 教育講演

“薬剤による性機能障害” 今川章夫 (高松赤十字病院泌尿器科部長)

“薬剤による spermatogenesis 障害”

塚本泰司 (札幌医科大学泌尿器科学助教授)

演題募集: 1989年2月中旬 (学会会員へは演題申込書を郵送致します。会員以外の方は下記へ御請求下さい。)

演題申込み締切: 1989年4月末日

事務局: 〒060 札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学泌尿器科学教室

TEL (011) 611-2111 内線 3472, 3473 (塚本泰司)

第 34 回日本不妊学会学術講演会・総会

宿泊・航空券・観光旅行のご案内

第34回日本不妊学会総会が、平成元年9月2日(土)～3日(日)の2日間、自然都市、旭川市にて開催されるにあたり、全国各地より多くの皆様方が来旭されますことを、心より歓迎申し上げます。

さて、本総会にご参加されます皆様方の宿泊、航空券および総会終了後の観光旅行のお世話を、日本交通公社旭川支店にて取り扱わせていただくこととなりました。つきましては、詳細を下記の通りご案内申し上げます。なおこの時期は、観光シーズンでもありますので、お早めにお申し込み賜りますようお願い申し上げます。

1. 宿泊のご案内

(1)宿泊地 旭川市

(2)宿泊期日 平成元年8月31日(木)～9月3日(日)

(3)宿泊料金(お一人様の料金：1泊1朝食付、税・サービス料込み)

ホテルタイプ	ホ テ ル 名	客室タイプ	1泊朝食付 1名の料金	申込 記号
A (都市ホテル)	旭 川 パ レ ス ホ テ ル	シングル、バス付(1人用)	8,000円	A
	ニ ュ ー 北 海 ホ テ ル			
	旭 川 東 急 イ ン	ツイン、バス付(2人用)	7,500円	B
B (都市ホテル)	旭川ターミナルホテル	シングル、バス付(1人用)	7,300円	C
	ト ー ヨ ー ホ テ ル	ツイン、バス付(2人用)	6,500円	D
C (ビジネスホテル)	旭川ワシントンホテル	シングル、バス付(1人用)	6,500円	E
	旭川プリンスホテル			
	旭川グリーンホテル(本館)	ツイン、バス付(2人用)	6,000円	F
D (ビジネスホテル)	ホ テ ル メ イ ツ	シングル、バス付(1人用)	6,000円	G
		ツイン、バス付(2人用)	5,600円	H

※宿泊取扱期間以外でもお申し込みがありましたら申込用紙備考欄にご記入下さい。

※宿泊ホテルのご希望については、お申し込みの順に予約致しますが、ご希望通りにならない場合もございますのでご了承下さい。

※旭川市内のホテルの宿泊可能人員の関係上ツインルームは、できるだけお二人でのお申し込みをお願い申し上げます。又、(シングルルームが満員で) ツインルームをお一人で利用することになった場合、次の通り追加料金をいただきます。

●A(都市ホテル)の場合……追加料金 3,000円

●B(都市ホテル)の場合……追加料金 2,000円

※予約金として、1泊1名につき5,000円を添えてお申し込み下さい。

2. 航空券のご案内

学会の日程に合わせて一覧表の通り設定便を設け、あらかじめご予約頂いた場合、下記の特別料金をご用意致しました。航空券ご予約の場合は、予約金として片道1名につき5,000円を添えてお申し込み下さい。

●往路設定便一覧表

申込 記号	搭乗月日	区 間	時 間 帯	15名以上の特別割引運賃	学会特別割引運賃
1	8月31日	東京～旭川	11:15～12:50	21,500円	29,340円
2	8月31日	東京～旭川	12:30～14:05	21,500円	29,340円
3	8月31日	東京～旭川	14:55～15:40	21,500円	29,340円
4	8月31日	東京～旭川	17:10～18:45	21,500円	29,340円
5	8月31日	東京～千歳	12:00～13:25	16,900円	23,000円
6	8月31日	東京～千歳	13:25～14:50	16,900円	23,000円
7	8月31日	大阪～千歳	14:20～16:05	24,400円	33,400円
8	8月31日	名古屋～千歳	14:10～15:45	28,300円	29,970円
9	8月31日	仙台～千歳	15:45～16:55	17,700円	18,630円
10	9月1日	東京～旭川	07:50～09:25	21,500円	29,340円
11	9月1日	東京～旭川	11:15～12:50	21,500円	29,340円
12	9月1日	東京～旭川	12:30～14:05	21,500円	29,340円
13	9月1日	東京～旭川	14:55～15:40	21,500円	29,340円
14	9月1日	東京～旭川	17:10～18:45	21,500円	29,340円
15	9月1日	東京～千歳	10:30～11:55	16,900円	23,000円
16	9月1日	大阪～千歳	10:50～12:35	24,400円	33,400円
17	9月1日	名古屋～千歳	10:30～12:05	28,300円	29,970円
18	9月1日	仙台～千歳	10:45～11:55	17,700円	18,630円
19	9月2日	東京～旭川	07:50～09:25	21,500円	29,340円
20	9月3日	東京～旭川	11:15～12:50	21,500円	29,340円

●復路設定便一覧表

申込 記号	搭乗月日	区 間	時 間 帯	15名以上の特別割引運賃	学会特別割引運賃
ア	9月2日	旭川～東京	19:20～21:05	21,500円	29,340円
イ	9月2日	旭川～東京	17:30～19:15	21,500円	29,340円
ウ	9月3日	旭川～東京	17:30～19:15	21,500円	29,340円
エ	9月3日	旭川～東京	19:20～21:05	21,500円	29,340円
オ	9月3日	旭川～東京	14:40～16:25	21,500円	29,340円
カ	9月3日	千歳～東京	17:20～18:50	16,900円	23,000円
キ	9月3日	千歳～東京	19:20～20:50	16,900円	23,000円
ク	9月3日	千歳～大阪	17:15～19:05	24,400円	33,400円
ケ	9月3日	千歳～仙台	18:00～19:05	17,700円	18,630円
コ	9月3日	千歳～名古屋	18:45～20:20	28,300円	29,970円
サ	9月4日	旭川～東京	10:00～11:45	21,500円	29,340円
シ	9月4日	旭川～東京	13:40～15:25	21,500円	29,340円
ス	9月4日	旭川～東京	14:40～16:25	21,500円	29,340円
セ	9月4日	千歳～東京	19:20～20:50	16,900円	23,000円
ソ	9月4日	千歳～大阪	17:15～19:05	24,400円	33,400円
タ	9月4日	千歳～仙台	18:00～19:05	17,700円	18,630円
チ	9月4日	千歳～名古屋	18:45～20:20	28,300円	29,970円

※時間帯は、平成元年2月現在の航空ダイヤによります。

※航空運賃値下げの場合は、各割引運賃は変更となります。

※札幌～旭川間につきましては、JRの特急L特急、急行列車が30分毎に運行していますのでご利用下さい。所要時間は、1時間30分程です。

3. 観光のご案内

Aコース(市内半日)

旅行代金お一人 3,500円

日程	期日	行	程
1	$\frac{1}{2}$ (土)	午前コース 文化会館	9:00 旭川市立郷土博物館・アイヌ記念館・嵐山展望台・優佳良織工芸館 文化会館 13:00
	$\frac{1}{3}$ (日)	午後コース 文化会館	13:00 旭川市立郷土博物館・アイヌ記念館・嵐山展望台・優佳良織工芸館 文化会館 17:00

Bコース(道東)

旅行代金お一人55,000円

日程	期日	行	程	宿泊地
1	$\frac{1}{3}$ (日)		14:00 旭川 層雲峡 15:30	層雲峡
2	$\frac{1}{4}$ (月)	8:30 層雲峡 大函 石北峠 温根湯 網走 原生花園 ウトロ 17:30		ウトロ
3	$\frac{1}{5}$ (火)	8:15 ウトロ 斜里 川湯 摩周湖 弟子屈 阿寒 17:00 ※知床半島めぐり 9:45		阿寒
4	$\frac{1}{6}$ (水)	8:30 阿寒 鶴公園 釧路(和商市場) 釧路空港 14:00		

Cコース(札幌・洞爺)

旅行代金お一人40,000円

日程	期日	行	程	宿泊地
1	$\frac{1}{3}$ (日)		14:00 旭川 高速経由 札幌 17:00	札幌
2	$\frac{1}{4}$ (月)	9:00 札幌 札幌市内観光 札幌 中山峠 昭和新山 洞爺湖 17:00 時計台・大倉山ジャンプタワー・羊ヶ丘他		洞爺湖
3	$\frac{1}{5}$ (火)	8:00 洞爺湖 オロフレ峠 登別 白老 千歳空港 13:00		

(※1日目の夕食は自由食となります)

Dコース(旭岳)

旅行代金お一人 3,500円

日程	期日	行	程
1	$\frac{1}{3}$ (日)	13:00 文化会館 旭岳温泉ロープウェイ 塩見の池 (旭川空港) 文化会館 17:00	

Eコース(富良野)

旅行代金お一人14,000円

日程	期日	行	程	宿泊地
1	$\frac{1}{3}$ (日)	13:00 文化会館 十勝岳 富良野 16:30		富良野
2	$\frac{1}{4}$ (月)	9:00 富良野 富良野六郷の村 旭川空港 12:00		

※各コースとも最少催行人員は25名以上とし、25名に満たない場合は催行を中止することもあります。

※各コースともお部屋は4～5名の相部屋となります。

※各コースとも、個室ご希望の方は、お一人2,000円の差額料金が掛ります。

※各コースとも航空便(いずれも東京行)に接続しております。なお、航空料金は特別料金です。

※Aコースに参加されるお客様はお申込書にご希望の日付と午前か午後ということを記入して下さい。

※交通公社添乗員が同行し、お世話をさせていただきます。

●宿泊・交通機関のご案内窓口

学会期間中、会場内にJTBコーナーを設置致しますので是非ご利用下さい。

4. お申し込み方法・手続きのご案内

- (1) 宿泊・航空券・エクスカッションとも下記申込書にご記入のうえ、予納金を添えて現金書留で弊社支店宛お送り下さい。(全額をご送金いただいても結構です)
- (2) 申込予納金について
- 宿 泊……………お一人 5,000円
 - 航 空 便……………お一人片道につき 5,000円
 - 観光旅行……………お一人 5,000円
- (3) 変更・取消について
- 宿泊日又は出発日の13日前以降の変更・取消の場合、下記の取消料を申し受けます。

お申し出日／種別	宿泊(連泊の場合1泊目のみ)	航 空 便	観 光
宿泊日・出発日の 13日前以降 4日目迄	30%	3,000円	10%
宿泊日・出発日の 3日前以降	50%	6,000円	30%

※ご返金は所定の取消料および郵送実費500円を差し引いて後日現金書留にてお返しいたします。

- (4) 精算について
- 締切後、宿泊券・観光旅行券・航空引換証と残高請求書を出発の1週間前までに送付させていただきますので、残金をご送金下さい。
- (5) 申込締切 平成元年8月7日必着
- (6) 通信料について
- 通信郵便料として、1件につき500円をいただいておりますのでご了承下さい。
- (7) お申込みおよびお問合せ先(申込み書お送り先)
- 〒070 旭川市宮下7丁目 明治屋ビル

JTB日本交通公社旭川支店 TEL. 0166(24)2176 FAX. 0166(25)7399
第34回日本不妊学会総会係 担当：徳永・高崎・重松

(切り取り線)

第34回日本不妊学会総会 宿泊・航空券・観光申込書

予約券 送付先	代表者名								TEL			
	住 所	〒										
(ふりがな) 氏 名	性 別	年 齢	タ ホ イ テ ル	宿泊日および室タイプ				航 空 便		観 光	J R	備 考
				8/31(木)	9/1(金)	9/2(土)	9/3(日)	往路	復路			
記 例 あきひかわ 旭川 太郎	男	40	A	S	S	S	×	3	オ	B		
											予納金	¥
											通信費	¥ 500
											合 計	¥

●室タイプ欄はシングルS、ツインTの記号で記入して下さい。

●同室者は} 印を付して下さい。

●必要欄に申込記号で観光はコース名を記入して下さい。

●JR申込の方は、列車名と指定席か自由席かを記入して下さい。

投稿規定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある原著、総説、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、原則として未発表のものに限る。
3. 1 論文は、原則として刷り上り 6 ページ以内とし、超過は 4 ページ(計 10 ページ)までを認める。超過ページならびに特に費用を要する図、表、写真は実費を著者負担とする。
4. 原著、総説、論説、臨床報告などは必ず、400 字以内の和文抄録ならびに、ダブルスペース 2 枚以内の欧文抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付する。
5. 図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。
6. 記述は和文または欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。

a. 雑誌の場合

著者名：題名、誌名、巻数：ページ数、年次
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。誌名は規定または慣用の略名に従うこと。特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に括弧で囲む、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 B 5 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
小林俊文
平川舜

石島芳郎
佐久間勇次
穂坂正彦

遠藤克
白井将文

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 (株)アイシーエス企画内

(Tel. 03-272-7077)

日本不妊学会雑誌 34 巻 2 号

1989 年 3 月 25 日 印刷

1989 年 4 月 1 日 発行

編集兼発行者
印刷者

百瀬和夫
安永修

印刷所

東京都文京区関口1-43-5
有限会社ループ社
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 (株)アイシーエス企画内
Tel (03) 272-7077
振替口座番号 東京 7-93207