

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 34 No. 4

October
1989

日本不妊学会雑誌

第34卷 第4号

平成元年10月1日

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

日本不妊学会誌

第34巻 第4号

平成元年10月1日

——目 次——

原 著

- 片側卵巣と他側の卵管を摘出したラットにおける卵子の腹腔内ならびに
子宮頸管經由移動について……………辻井弘忠 …… 1
- 屠場ブタ卵巣から採取した卵胞卵の体外成熟……………亀山祐一・石島芳郎 …… 5
- 体外受精由来マウス前核期受精卵の超急速凍結保存について……………中瀧直己 …… 11
- 家兔胎胚の *in vitro* の着床実験 (着床後期) ……立山一郎 …… 15
- Effects of Trichosanthin on Mouse Embryos and Fetus Development
In Vivo and *In Vitro* …… Y. SATO & W. E. GIBBONS …… 24
- 子宮内膜症患者における腹腔内貯留液のマウス受精卵分割に
与える影響……………五味淵秀人・他 …… 30
- Changes in Urinary Arginine Esterase Activity
During the Human Menstrual Cycle …… Y. MATSUDA et al. …… 34
- GnRH 律動投与による排卵誘発;
多嚢胞性卵巣と視床下部性無排卵症における比較……………正岡 薫・他 …… 37
- Direct Action of Bromocriptine on the Production of Progesterone
and Estradiol-17 β by the Human Corpus Luteum …… T. ENDO et al. …… 44
- 頸管粘液分泌不全における子宮頸管腺エストロゲンレセプターの
免疫組織学的検討……………水沼正弘・他 …… 49
- Hachimijiogan for the Treatment of
Hyperprolactinemia …… S. USUKI & S. KUBOTA …… 53
- 多嚢胞性卵巣に対する hMG「日研」および Pergonal の
同一症例における比較検討……………中村幸雄・他 …… 64
- バルーン・カテーテルを用いた子宮卵管造影法の試み……………酒井伸嘉・他 …… 71
- 無症状子宮外妊娠早期発見のための子宮内膜吸引細胞診……………松島弘充・他 …… 75
- 膣欠損症に対する造膣術の検討……………角田千恵子・他 …… 81
- 直腸粘膜に認められた外性子宮内膜症の1症例……………高橋健太郎・他 …… 86
- 外性子宮内膜症における各種臨床進行期分類の比較検討……………亀田 隆・他 …… 91
- 習慣流早産の原因としての子宮形態異常の分析および
その手術療法に関する検討……………中田浩一・他 …… 95
- Strassmann 手術により妊娠に至った T-shaped uterus の一例……………西田正人・他 …… 102

Conservative Treatment of Uterine Leiomyomas with Intranasal Gonadotropin Releasing Hormone Analogue (Buserelin); The Clinical Efficacy and Hormonal Change in 15 Japanese Patients	T. YAMAMOTO et al.	105
間接免疫ペルオキシダーゼ法によるクラミジア感染症の血清学的診断法の意義 —特に不妊・不育患者について—.....	楊 丙辰・他	112
攪拌密度勾配法による精子洗浄濃縮 —配偶者間人工授精における妊娠成績の検討—.....	小林俊文・他	117
体外受精・胚移植における採卵成績の検討.....	谷 啓光・他	123
精液性状よりみた IVF-ET の予後	織田和哉・他	129
ラット精巢の発育過程におけるペントースサイクル活性の推移.....	伊藤元博・他	134
ヒト精子の capacitation に要する時間と精子コレステロール/ リン脂質比の関係.....	会田都美子・他	140
精液分析方法の検討 (Semen Auto Analyzer による分析法と Makler counting chamber の特性)	柳田 薫・他	147
“Swim-up” 法による AIH 妊娠の 2 症例	天児 都	156
精細管内 Androgen 濃度の研究 第三報	入江 伸・他	162
メンフェゴール製剤 (殺精子剤) を塗布したコンドームが ヒト精子の運動性ならびに生存性に及ぼす効果について.....	押尾 茂・他	168
男子不妊症の Methylcobalamin による治療成績について	田畑行義・他	173
無精子症をともなった 46, X, del (Y) (q 11.2) の一例	馬場良和・他	176
男子不妊症の臨床的観察.....	西田秀樹・他	180
地方部会講演抄録.....		188

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 34, No. 4, 1989)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Intracellic and Transuterocervical Movement of Ova in Unilaterally
Ovariectomized and Contralaterally Salpingectomized Rats*H. Tsujii* 1
- In Vitro* Maturation of Follicular Oocytes Obtained Pig Ovaries
at a Slaughterhouse.....*Y. Kameyama & Y. Ishijima* 5
- High Survival Rate of Pronuclear Mouse Oocytes Embryos
Derived From *in Vitro* Fertilization Following Ultrarapid
Freezing and Thawing*N. Nakagata* 11
- In Vitro* Studies on the Last Stage of Rabbit
Blastocyst Implantation*I. Tateyama* 15
- Effects of Trichosanthin on Mouse Embryos and Fetus Development
In Vivo and *In Vitro**Y. Sato & W. E. Gibbons* 24
- Effect of Peritoneal Fluid with Endometriosis on *In Vitro*
Cleavage of 2-Cell Mouse Embryos*H. Gomibuchi, T. Chitani,*
T. Kuo, Y. Taketani & M. Mizuno 30
- Changes in Urinary Arginine Esterase Activity
During the Human Menstrual Cycle
.....*Y. Matsuda, Y. Fujimoto, A. Miyashita & S. Akihama* 34
- Ovulation Induction with Pulsatile Gonadotropin-Releasing
Hormone (GnRH) Administration in Patients with Polycystic
Ovarian Disease and Hypothalamic Anovulation*K. Masaoka, M. Kitazawa,*
H. Watanabe & T. Kumasaka 37
- Direct Action of Bromocriptine on the Production of Progesterone
and Estradiol-17 β by the Human Corpus Luteum*T. Endo, M. Mizunuma,*
H. Hata, S. Tanaka, M. Hashimoto & Z. D. Wang 44
- Immunohistochemical Study of Human Uterine Cervical
Estrogen-receptor on the Insufficient Cervical
Mucous Secretion*M. Mizunuma, M. Fujii,*
S. Tanaka & M. Hashimoto 49
- Hachimijiogan for the Treatment of Hyperprolactinemia*S. Usuki & S. Kubota* 53

Comparative Study on Clinical Effects of hMG Nikken and Pergonal for the Same Patients with Polycystic Ovary Syndrome	<i>Y. Nakamura, H. Yamada, K. Yoshida, T. Nanno, Y. Ubukata, K. Takahashi, M. Suzuki & Y. Yoshimura</i>	64
Hysterosalpingography Using a Balloon Foley Catheter	<i>N. Sakai, K. Nakahara, T. Hasegawa & T. Oda</i>	71
Aspiration Biopsy Cytology of the Endometrium for the Early Detection of the Ectopic Pregnancy	<i>H. Matsushima, S. Saito, K. Momose, H. Nakagomi, R. Kawamura, A. Iwaki, Y. Kanemaki & M. Endo</i>	75
Studies of Vaginal Reconstructin for the Congenital Absence of Vagina	<i>C. Kakuta, H. Hoshiai, T. Fukaya, H. Tozawa, A. Yajima & M. Natui</i>	81
A Case of External Endometriosis in the Rectum	<i>K. Takahashi, M. Kusakari, H. Nagata, A. Manabe, K. Yoshino & M. Kitao</i>	86
A Comparative Study of Systems of Classification of Endometriosis	<i>T. Kameda, Y. Samejima, T. Nobunaga, S. Takahashi, T. Kimura, Y. Tokugawa, C. Azuma, N. Matsuzaki, F. Saji & O. Tanizawa</i>	91
Analysis on Congenital Vterine Anomalies in Habitual Abortions and Evaluation of Metroplasty	<i>K. Nakada, T. Makino, T. Tabuchi & R. Iizuka</i>	95
T-shaped Uterus Associated with Sterility; A Case Report Corrected by Strassman's Operation	<i>M. Nishida, T. Tsuji, H. Yamanouchi & H. Iwasaki</i>	102
Conservative Treatment of Uterine Leiomyomas with Intranasal Gonadotropin Releasing Hormone Analogue (Buserelin); The Clinical Efficacy and Hormonal Change in 15 Japanese Patients).....	<i>T. Yamamoto, M. Tomioka, H. Honjo, J. Kitawaki, M. Urabe & H. Okada</i>	105
Significance of Serum Antibodies for Chlamydia Trachomatis in Patients with Sterility and Infertility Detected by the Immunoperoxidase Assay	<i>B. Yang, O. Arakawa, H. Tani, K. Oda, K. Shichiri & Y. Sato</i>	112
Selective Concentration of Progressively Motile Sperm by Means of Continuous-step Density Gradient Centrifugation and its Clinical Application to AIH	<i>T. Kobayashi, S. Kaneko T. Sanada, H. Sato, K. Kobanawa, T. Ohono & R. Iizuka,</i>	117

Results of Oocyte Retrieval in <i>In Vitro</i> Fertilization and Embryo Transfer	<i>H. Tani, K. Oda, O. Arakawa, K. Shichiri, Y. Sato & S. Takeuchi</i>	123
The Relationship between Semen Characteristics and the Prognosis of <i>In Vitro</i> Fertilization and Embryo Transfer	<i>K. Oda, H. Tani, O. Arakawa, K. Shichiri, Y. Sato & S. Takeuchi</i>	129
Pentose Phosphate Pathway Activity in the Rat Testis at Different Stages of Development	<i>M. Ito, I. Atobe & H. Amano</i>	134
Relationship between Capacitation Time of Human Spermatozoa and Sperm Cholesterol/Phospholipid Ratio	<i>T. Aita & K. Hoshi</i>	140
The Method of Semen Analysis (Semen Auto Analyzer and Characteristics of Makler Counting Chamber)	<i>K. Yanagida, K. Hoshi, S. Tsukikawa, H. Sasaki, C. Endo & A. Sato</i>	147
Two Cases of Pregnancy by AIH Using the Sperm Collected by the "Swim-up" Method	<i>K. Amako</i>	156
Study of Intratubular Androgen Levels; Report 3	<i>S. Irie, T. Ohashi, A. Nagai, Y. Yamashita, T. Oheda, Y. Kohama, Y. Ohashi & H. Ohmori</i>	162
Effects of Menfegol, a Spermicide, Coated Condom on Sperm Motility and Viability	<i>S. Oshio, H. Tomomasa, H. Amemiya, T. Yazaki, T. Umeda, H. Mohri, S. Ozaki, I. Ohkawa & T. Tajima</i>	168
Treatment by Methylcovalamin for Male Sterility	<i>Y. Tabata, T. Arai, K. Kaneko, T. Suzuki & E. Takasaki</i>	173
Report of a 46, X, Del (Y) (q 11.2) Male with Azospermia	<i>Y. Baba, R. Isoyama, H. Takihara, J. Sakatoku, I. Murano & M. Tsukahara</i>	176
A Clinical Study on Male Infertility	<i>H. Nishida, K. Fukuda & I. Miyagawa</i>	180

片側卵巣と他側の卵管を摘出したラットにおける 卵子の腹腔内ならびに子宮頸管経由移動について

Intraceliac and Transuterocervical Movement of Ova in Unilaterally Ovariectomized and Contralaterally Salpingectomized Rats

信州大学農学部家畜種繁殖学教室

辻 井 弘 忠

Hirotsada TSUJII

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
Faculty of Agriculture, Shinshu University, Nagano, 399-45 Japan

ラットの卵巣と卵管は卵巣嚢につつまれており、自然界では卵子の腹腔内移動はあり得ないが、人為的に卵巣嚢を除去した場合、卵子が腹腔内ならびに子宮頸管経由移動をするかどうかを試みた。

1) 片側卵巣と他側の卵管を摘出したラット 34 匹のうち 6 匹が妊娠し、各個体 1～2 個着床していた。すなわち、卵子が腹腔内移動したものと考えられた。

2) 上記の 6 匹のラットのうち 3 匹において、卵管除去側の子宮にも着床がみられた。すなわち、卵子が腹腔内移動後、さらに子宮頸管経由で他側の子宮内に移行したものと考えられた。

3) 片側卵巣摘出・卵管結紮ラット 25 匹のうち 3 例が、卵巣摘出側の子宮に 1 個ずつ胎児が着床していた。すなわち、ラットのような子宮頸管を 2 つ有するものにおいても、子宮頸管経由で卵子が移行しうることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 747-750, 1989)

緒 言

佐久間ら^{1,2)}は家兎の 1 側の卵管をそのまま残して卵巣を除去し、同時に他側の卵管を完全に除去していても、残存の卵管に反対側の卵巣から排出された卵子がとり込まれ、正常に妊娠することをあきらかにした。

一方、ラットなどの動物においては、家兎と異なって卵巣表面を卵巣嚢で完全につつまれており、卵巣表面とは卵管開口部しか接点をもたない³⁾。したがって、ラットにおいては卵子の腹腔内移行は自然界ではあり得ないことになる。

そこで著者は、人為的にラットの卵巣嚢を除去した場合、家兎のような腹腔内移行がありうるか、また、子宮頸管経由移動もありうるかについて検索す

る目的で、片側卵巣と他側の卵管を摘出ならびに片側の卵巣摘出・卵管結紮ラットを用いて実験を行った。

材料および方法

当研究室で育成繁殖している Wistar 系成熟ラット(体重 250 g 前後)を使用した。飼育条件は、室温 20 ± 1 °C、照明 12 L.D(午前 6 時点燈)。餌は市販の固形飼料を用い、餌・水は自由摂取とした。実験に使用した雌は、膣垢検査により 4 日周期を 2 回以上繰り返した未経産を用いた。手術はペントバルビタールナトリウム腹腔内投与(25 mg/kg)により麻酔下で以下の実験を行った。実験は、(1)正常妊娠群：10 匹をもちい、偽手術として開腹手術を行った。(2)片側卵巣と他側の卵管摘出群：40 匹を用い、摘出する生

殖器の側は任意とし、Fig.1-A に示すように片側の卵巣を摘出、他側の卵巣嚢を除去し、卵管の末端を結紮、卵管の大部分を除去した。交配は手術後1, 2, 3, 4 週後にそれぞれ行った。(3)片側卵巣摘出・卵管結紮群：28 匹を用い、摘出する生殖器の側は任意で、Fig.1-B に示すように片側の卵管の下部を結紮後、卵巣および大部分の卵管を摘出した。なお、手術にあたっては、卵巣の摘出が完全であり、かつ卵管采を損傷しない様に留意した。ラットは術部の回復を待って、陰垢像が発情前期を示した夕方、雄と一晩同居させ、翌朝陰栓をみつけた日を妊娠1日目とした。妊娠8~10日目に開腹して、着床数、着床部位等について調べた。なお、(1)群も上記と同様に妊娠8~10日目に開腹して調べた。

剖検の際、子宮に脹らみの見られた部位を直ちにブアン固定液に浸し、パラフィン包埋後、 8μ の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン重染色後、胚であるか否か、また、正常に発育しているか否かを検鏡した。

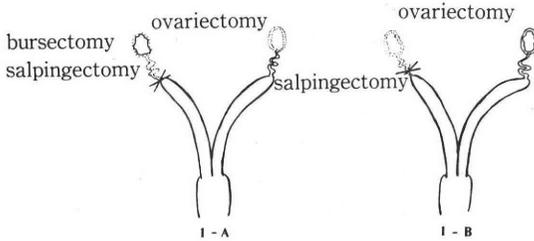


Fig. 1 Schema of the genital organ of the rat, indicating the ovariectomy, bursectomy and salpingectomy

結果

(1)正常妊娠群：結果を Table 1 に示した。妊娠率100%で1側卵巣あたり排卵数7.1, 着床数6.9であった。

(2)片側卵巣と他側の卵管摘出群：結果を Table 2 に示した。手術後2週間目以降に着床がみられた。着床個体は17.6%と、あまり高い数字でなかったが存在した。着床数は1個体あたり1~2個の着床がみられた。他の着床しなかった個体はいずれも卵管采が癒着していた。また、上記の6匹のラットのうち3匹が卵巣除去側の子宮にも着床しているのがみられた(Fig. 2)。また、排卵数ならびに卵巣重量は、手術後次第に増加するのが観察された。

(3)片側卵巣摘出群：結果を Table 3 に示した。無処理側の子宮に着床しているもの22/25匹で、そのうち3匹において、卵巣摘出側の子宮に1個ずつ胎児が着床していた (Fig. 3)。



Fig. 2 Implantation of both uterine horn in the unilaterally ovariectomized and contralaterally salpingectomized rat. One embryo migrated to the salpingectomy side.

Table 1. Number of implantation sites and weight of ovary in the sham-operation rats.

No. of females	per one ovary			
	No. of ovulation	No. of implantation	No. of living embryos	weight of ovary (mg)
10	7.1±1.3	6.9±1.4	6.9±1.4	33.7±4.3

(M±S. D)

Table 2. Number of pregnancy in the unilaterally ovariectomized and contralaterally salpingectomized rats.

After operation (weeks)	No. of female	No. of mating	No. of ovulation	N	No of pregnancy	Ovary weight (mg)
1	10	8	7.1±2.6		0	43.6±4.6
2	10	9	9.2±2.3		1	58.7±3.8
3	10	9	10.3±2.6		3	70.8±4.1
4	10	8	13.9±3.4		2	80.1±3.9
Total	40	34	—		6	—

(M±S. D)

Table 3. Number of pregnancy in the unilateral ovariectomized and salpingectomized rats.

No. of mating	No. of ovulation	No. of pregnancy		Ovary weight (mg)
		Intact side	Ovariectomized side	
25/28	10.4±2.3	22/25	3/25	70.1±8.1

(M±S. D)

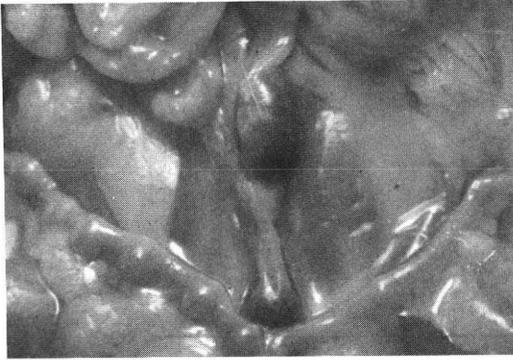


Fig. 3 Implantation of both uterine horn in the unilaterally ovariectomized rat. One embryo migrated to the opposite horn.

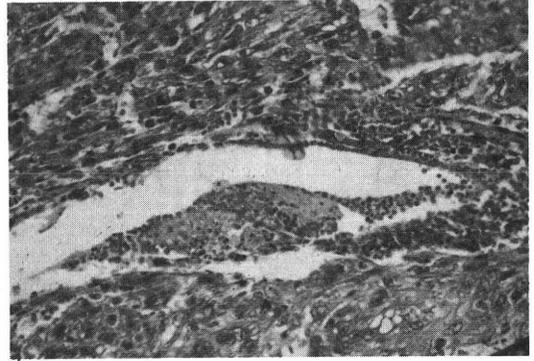


Fig. 4 Implanting rat embryo at day 10. The transuterine migration of embryo in the unilaterally ovariectomized and contralaterally salpingectomized rat.

2 群および 3 群で着床していた胎児は、やや発育が遅れていたが、正常妊娠の胎児となら変わらず、正常であった (Fig. 4)。

考 察

佐久間ら^{1,2)}は家兎を用いて、片側卵巣と他側の生殖管を摘出したところ、1 卵巣より排卵された卵子の一部がなんらかの原因によって、その側の卵管采から吸引されないで腹腔内に落ち、浮遊ならびに移動して他側の卵管采に吸引され、妊娠分娩にいたったと報告している。

本実験 2 の片側卵巣と他側の卵管摘出群において着床がみられたことは、卵子が腹腔内移動したものと考えられ、上述の家兎と同様のことがラットにも起こりうるとが推察された。このことについて Westman⁴⁾ および Austin⁵⁾ は、家兎の卵管采附近に染料や無脊椎動物の卵子などを注入したところ、それらが卵管内に吸入されたことから、卵管が卵子を吸入するのではないかと報告している。また、佐久間、石島²⁾も家兎を用いて同様なことを報告している。Blandow⁶⁾ は、ラットと家兎における卵巣から卵管への卵子の移動について、卵管采の構造的な違いがあるにもかかわらず、卵子移動のメカニズムは基本的には同じ様な形式がみられると述べている。

実験 2 において、手術後の週令によって卵巣重量が重くなること、ならびに排卵数の増加がみられた。

これは卵巣の代償作用と思われた。

本実験 2 において、卵管除去側の子宮にも着床がみられた。このことは、卵子が腹腔内移動後さらに子宮頸管經由で他側の子宮内に移行したものとされた。そこで実験 3 で片側卵巣摘出・卵管結紮群において、子宮頸管經由で卵子が移行しうるかどうかを検討した。その結果、卵巣摘出側に着床がみられた。このことから、ラットのような子宮頸管を 2 つ有するものにおいても、子宮頸管經由で卵子が移行しうることが示唆された。このラットにおける子宮頸管經由の転移については、Young⁷⁾ が 1 卵管を結紮したラットにおいて、50%が両子宮角に着床することを報告している。また McLaren and Michie⁸⁾ はマウスを用いて一方の子宮角に移植した卵子が反対側の子宮角に着床した例を報告している。石島ら⁹⁾ はラットを用いて、実験的に卵子の子宮内転移を証明し、さらに 1 側卵巣摘出と 1 側卵管結紮とでは卵子の転位は卵管結紮の方が高く、卵巣摘出と卵管結紮とでは転位の頻度が異なることを報告している。

これらのことから、ラットにおいても人為的に卵子の腹腔内移動が起せうること、また、卵子の子宮内転位が起りうると示唆された。

文 献

- 1) 佐久間勇次, 石島芳郎, 石田一夫: 片側の卵巣と他側の生殖管を摘出した家兎における卵子の腹腔

- 内移行および妊娠・分娩に関する研究, 家畜繁殖誌, 10: 69, 1964
- 2) 佐久間勇次, 石島芳郎: 片側卵巣と他側卵管摘出家兎における卵子の腹腔内移行の実験的研究, 家畜繁殖誌, 14: 17, 1968
 - 3) Nolbandov, A. V.: Comparative morphology and anatomy of the oviduct, In The mammalian oviduct, Hafez, E. S. E. and Blandau, R. J. eds., p. 47. The University of Chicago Press, Chicago, 1968
 - 4) Westman, A.: Investigations into the transport of the ovum, In Proceedings conference studies on testes and ovary, egg and sperm, Engle, E. T. ed., p. 163, Springfield, Illinois, Charles C Thomas, 1952
 - 5) Austin, R.: Fertilization and transport of the ovum, In Mechanisms concerned with conception, Hartman, C. G.: chap. 6, The Macmillan Co. New York, 1963
 - 6) Blandau, R. J.: Gamete transport-comparative aspects. In The mammalian oviduct: Hafez, E. S. E. and Blandau, R. J. eds. p. 47, The University of Chicago Press, Chicago, 1968
 - 7) Young, A.: Transuterine (internal) migration of fertilized ova in the albino rat, Proc. Roy. Soc. Edin. B, 65: 106, 1953
 - 8) McLaren, A. & Michie, D.: Transmigration of unborn mice, Nature, 174: 844, 1954
 - 9) 石島芳郎, 下村孝英, 平林忠: ラット卵子の子宮内転移に関する研究 I, 農学集報, 12:79, 1969

Intraceliac and transuterocervical movement of ova in unilaterally ovariectomized and contralaterally salpingectomized rats

Hirotada Tsujii

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
Faculty of Agriculture,
Shinshu University, Nagano, 399-45 Japan

The rat ovary and oviduct are enclosed in the ovarian bursa. This, therefore, precludes spontaneous intraperitoneal movement of an ovum. In this study, the movement of ova in the abdomen or via the uterocervical canal was investigated in artificially ovariectomized rats. The results obtained are summarized as under.

- (1) Implantation of one or two ova was noted in 6 of 34 rats ovariectomized unilaterally and salpingectomized contralaterally. This seemed to suggest the occurrence of intraceliac movement of the ova.
- (2) In 3 of the above 6 rats, implantation was also found in the uterus on the side of salpingectomy. This seemed to suggest the movement of the ova into the contralateral uterus via the uterocervical canal after the intraperitoneal movement.
- (3) In 3 of 25 rats treated by unilateral ovariectomy and tubal ligation, implantation of one fetus each was observed in the uterus on the ovariectomized side. This suggested the mobility of ova into the uterus via the uterocervical canal even in such animals as rats which have dual uterocervical canals.

(受付: 1989年10月3日)

屠場ブタ卵巣から採取した 卵胞卵の体外成熟

In Vitro Maturation of Follicular Oocytes Obtained Pig Ovaries at a Slaughterhouse

東京農業大学畜産学科家畜繁殖学研究室

亀山 祐一 石島 芳郎

Yuichi KAMEYAMA Yoshiro ISHIJIMA

Laboratory of Animal Reproduction,
Department of Zootechnical Science,

Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156, Japan

本実験では屠場ブタ卵巣からの卵胞卵の回収成績と体外成熟法について吟味した。

1) 78個の屠場卵巣から採卵を試みた結果、穿刺した卵胞2465個(1卵巣平均31.6個)から61.9%にあたる1526個(平均19.6個)の卵胞卵が回収できた。形態的にみた回収卵胞卵の内訳は、卵丘細胞が膨潤化したものが10個(0.7%)、卵丘細胞が厚く緊密に付着した正常と思われるものが932個(61.1%)、それ以外のものが584個(38.3%)であった。この正常と見なされたもののうち39個の成熟段階を検査したところ、いずれも卵核期(GV)期であった。以上から、培養に使える卵胞卵は1卵巣あたり10個程度採取できることが判明した。2) 卵丘細胞が厚く緊密に付着した正常形態卵胞卵を培養したところ、培養後32および48時間でprometaphase IIおよびmetaphase IIに成熟する割合は、HEPES緩衝TCM 199が17.3および56.0%、NaHCO₃緩衝TCM 199が51.4および57.5%、HEPES緩衝mKRBが58.8および64.1%、NaHCO₃緩衝mKRBが48.6および66.7%で、培養後32時間の時点でのHEPES緩衝TCM 199が他の培養液よりも劣っていたが、48時間の時点ではいずれの培養液においても成熟率に差がなかった。これらのことから、今回用いた2種の培地はいずれの培地でも、また緩衝にHEPESまたはNaHCO₃のいずれを用いても、GV卵胞卵の体外成熟に大きな差がなく、60%前後の卵胞卵が成熟することが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4), 751-756, 1989)

緒 言

廃棄される屠場卵巣から卵胞卵を効率的に採取し、かつ体外成熟、受精させる技術が確立すれば、研究用卵子の生産はもとより、胚移植と組み合わせれば家畜の増殖への応用も可能で益するところが大きい。

家畜卵胞卵の利用に関する研究は、1962年にEdwards³⁾がウシとブタで体外成熟を試みて以来、数多く行われてきた。とりわけウシは、その経済的有用性から活発に研究が行われ、それに関する報告は牧畜にいとまがないほどで、現在では屠場卵巣の卵

胞卵を体外で成熟、受精、培養後に移植することにより正常産子も得られている^{6,7)}。

一方、ブタ卵胞卵の体外成熟については、培地や培養条件^{9,16-18,20,21,27)}、採取する卵巣の条件や卵胞の大きさ^{9,21,27)}、卵胞卵の直径や卵丘細胞の有無²¹⁾、さらには体外における成熟分裂速度^{19,22)}など一通りの検討が行われているが、体外培養による成熟率が低い上、成熟培養の培地および培養時間が研究者によってまちまちで普遍的なものではないなど検討の余地が残されている。また、卵胞卵の体外受精は体内成熟卵では最近、生存産子が得られている^{2,28)}が、体

外成熟卵については Iritani ら¹²⁾ 以後, その可能性が示唆されているにすぎない。

したがって, ブタにおいてはいかに有効に卵胞卵を採取し, 高率に成熟卵を生産するかといった検討がもっとなされる必要があるように思われる。

そこで著者らは, 屠場ブタ卵巢からの卵胞穿刺による卵胞卵の回収成績と体外成熟法, 特に成熟分裂速度, 培養液と緩衝剤の影響について検討した。

材料および方法

1. 供試卵巢

本研究に供試したブタ卵巢は, 東京芝浦屠場よりのべ14回にわたって入手したものである。個々の卵巢を採取した個体の品種, 月齢, 体重および発情周期は不明である。卵巢は, 屠殺後30分以内に摘出し, 35°C前後に保温した滅菌生理的食塩水中に浸漬して1時間以内に実験室に持ち帰った。また, ブタ卵胞卵は卵巢の保存時間が4~5時間を越えると成熟率が低下することが知られているので²¹⁾, 摘出後4時間以内の卵巢のみを供試した。

2. 卵胞卵の回収

持ち帰った卵巢は, 採卵に先立って滅菌生理的食塩水で洗浄し, ペーパータオル上で余分な脂肪, 組織片, 血液を取り除き, 卵巢重量と卵巢の短径, 長径を測定した。卵巢卵の回収は, シャーレ上に置いた卵巢の直径2~5mmの卵胞を有柄針で破り, PBS+10%非働化ブタ血清(PS)で卵巢を洗うことにより行った。回収した卵胞卵は, 実体顕微鏡下で卵丘細胞の付着の具合および卵の大きさによって膨潤化, A, B, C, D, Sにランク分けした。この場合のA~Sの分類は, Iwasaki ら¹³⁾を参考にして行った。なお, 卵丘細胞を持たない卵胞卵は, 容易に退行過程に入る^{5,21,22)}ので, 培養には卵丘細胞が厚く緊密に付着した形態的に正常な卵胞卵(AおよびB)のみを用いた。

3. 培養方法

培養は, 微小滴培養法¹⁾を用い, 温度39°C, 炭酸ガス5%, 空気95%の条件下で行った。卵胞卵は, 培養液で2回洗浄した後に, 培養液0.1mlあたり5

~8個ずつ入れて48時間培養した。この場合, 卵巢の採取から卵胞卵の回収までに要した時間は, 培養時間に含まれていない。

培養液は, TCM 199 または修正 KRB(mKRB)²⁶⁾を基礎とし, NaHCO₃(25.07 mM), HEPES(25.0 mM)のいずれかで緩衝したもの計4種類を用いた。すべての培養液は, 10% PS, PMSG(10 IU/ml), hCG(10 IU/ml), エストラジオール 17β(E₂, 1 μg/ml)を添加し, pHを7.2~7.4に調節した。PMSGおよびhCGの添加量については湊・豊田¹⁸⁾を, E₂の添加量については Staigmilller & Moor²⁴⁾の報告を参考にした。

4. 卵胞卵の検査法

ブタ卵胞卵は良好な条件下では, 培養後24時間前後でも早いものは中期IIに達することが知られているので²²⁾, 検査は成熟分裂速度を知るために, 培養後24~48時間で段階的に行った。

卵胞卵の成熟段階の判定は, 2%クエン酸ナトリウムで卵丘細胞を除去した後にスライドグラスにマウントして酢酸エタノール(1:3)で1~2週間固定し, 固定後, 1%酢酸オルセインで染色して行った。

結 果

1. 卵胞卵の回収状況

屠場卵巢の直径2~5mmの卵胞を穿刺して卵胞卵を回収し, 回収卵胞卵を卵丘細胞の付着の具合と卵胞卵自体の大きさにより分類した結果をTable 1に示した。採卵に供試した卵巢は, 総数78個で平均卵巢重量, 平均短径, 平均長径は, 3.41±0.096g, 17.7±0.34mmおよび24.7±0.31mmであった。

上記卵巢の直径2~5mmの卵胞2465個(1卵巢平均31.6±1.14個)を穿刺したところ, 61.9%にあたる1526個(平均19.6±1.14個)の卵胞卵が回収できた。回収卵胞卵の内訳は, 膨潤化10個(平均0.1±0.05個, 0.7%), A型489個(平均6.3±0.53個, 32.0%), B型443個(平均5.7±0.44個, 29.0%), C型402個(平均5.2±0.44個, 26.3%), D型122個(平均1.6±0.17個, 8.0%), S型24個(平

Table 1 Recovery of pig follicular oocyte by puncturing ovarian follicle.

No. of ovaries	No. of oocytere-covered	Type for investment(Morphological classification)							A + B (%)
		Cumulus Expansion(%)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	S (%)	Abnormal (%)	
78	19.6	0.1	6.3	5.7	5.2	1.6	0.3	0.5	11.9
	±1.14	±0.05	±0.53	±0.44	±0.44	±0.17	±0.07	±0.09	±0.80
		(0.7)	(32.0)	(29.0)	(26.3)	(8.0)	(1.6)	(2.4)	(61.1)

±S.E.

Table 2 Maturation of pig follicular oocytes cultured in HEPES buffered TCM199.

Duration of culture (hrs)	No. of oocytes examined	Stage of maturation division						No. of degenerated oocytes	No. of oocytes maturation (%)
		G	V	Met I	Ana I	Tel I	Pro Met II		
0	39	39	0	0	0	0	0	0	0 (0)
24	33	2	27	1	0	0	0	3	0 (0)
26	54	9	31	1	3	0	3	7	3 (5.6)
28	33	5	14	3	4	2	2	3	4 (12.1)
30	34	4	13	1	2	3	4	7	7 (20.6)
32	52	12	22	2	0	3	6	7	9 (17.3)
34	25	7	11	0	0	1	5	1	6 (24.0)
36	26	5	8	0	0	3	5	5	8 (30.8)
38	53	6	12	0	0	3	15	17	18 (34.0)
40	32	1	13	0	0	2	12	4	14 (43.8)
42	62	13	21	0	0	3	18	7	21 (33.9)
44	46	7	21	0	0	5	12	1	17 (37.0)
46	46	3	19	0	0	0	18	6	18 (39.1)
48	50	10	6	0	0	3	25	6	28 (56.0)

Table 3 Effect of media and buffer on maturation of pig follicular oocytes.

Media	Buffer	Duration of culture (hrs)	No. of oocytes examined	Stage of maturation division						No. of degenerated oocytes	No. of oocytes maturation (%)
				G	V	Met I	Ana I	Tel I	Pro Met II		
TCM199	HEPES	26	54	9	31	1	3	0	3	7	3 (5.6)
		32	52	12	22	2	0	3	6	7	9 (17.3)
		38	53	6	12	0	0	3	15	17	18 (34.0)
		42	62	13	21	0	0	3	18	7	21 (33.9)
		48	50	10	6	0	0	3	25	6	28 (56.0)
	NaHCO ₃	26	33	2	20	3	1	1	2	4	3 (9.1)
		32	37	4	10	1	0	8	11	3	19 (51.4)
		38	35	4	14	0	0	8	7	2	15 (42.9)
		42	39	4	11	0	0	3	18	3	21 (53.8)
		48	40	4	10	0	0	3	20	3	23 (57.5)
mKRB	HEPES	26	35	2	18	2	0	6	3	4	9 (25.7)
		32	34	4	6	1	1	9	11	2	20 (58.8)
		38	39	2	15	0	0	5	17	0	22 (56.4)
		42	39	4	4	0	0	10	19	2	29 (74.4)
		48	39	1	9	0	0	7	18	4	25 (64.1)
	NaHCO ₃	26	35	2	18	4	6	2	2	1	4 (11.4)
		32	35	0	12	1	3	6	11	2	17 (48.6)
		38	35	0	15	0	1	6	13	0	19 (54.3)
		42	37	2	14	0	1	4	16	0	20 (54.1)
		48	39	0	12	0	0	2	24	1	26 (66.7)

均 0.3 ± 0.07 個, 1.6%), 異常 36 個 (平均 0.5 ± 0.09 個, 2.4%) であった。培養に供試できる卵胞卵 (A および B) は, 932 個 (平均 11.9 ± 0.80 個, 61.1%) 回収された。

2. 卵胞卵の体外成熟の経時的観察

卵丘細胞が厚く緊密に付着した卵胞卵を HEPES 緩衝 TCM 199 中で培養し, その成熟段階を培養後 24~48 時間まで 2 時間間隔で経時的に観察した結果を Table 2 に示した。Table に示すように, 培養 0 時間すなわち採取直後の卵胞卵は, 検査した 39 個がすべて卵核胞期 (GV 期) であった。卵核胞崩壊 (GVBD) は, 培養後 24 時間の時点ですでに終了していた。中期 I (Met I) を示す卵胞卵の割合は, 培養後 24 時間で 81.8% (27/33), 26 時間で 57.4% (31/54) と減少し, 以後は 40% 前後で安定した。後期 I (Ana I) と終期 I (Tel I) は培養後 24~32 時間においてのみ観察されたが, その個数は少ないものであった。本実験においては, 前中期 II (ProMet II) の出現に時間的相関がみられなかったため, ProMet II および中期 II (Met II) をもって成熟が完了したものと見なしたが, これらの卵胞卵は培養後 26 時間 (5.6%) で初めて観察された。以後, 成熟率は培養後 34 時間まで 12.1, 20.6, 17.3, 24.0% と上昇した。培養後 36~48 時間における成熟率は, 30.8, 34.0, 43.8, 33.9, 37.0, 39.1 および 56.0% とほぼ安定傾向を示した。同時間帯を集計した成熟率は, 39.4% (124/315) であった。

3. 卵胞卵の体外成熟に及ぼす培養液と緩衝剤の影響

卵丘細胞が厚く緊密に付着した卵胞卵を HEPES 緩衝 TCM 199, NaHCO_3 緩衝 TCM 199, HEPES 緩衝 mKRB および NaHCO_3 緩衝 mKRB のいずれかで培養し, 各培養液の成熟率を比較した結果を Table 3 に示した。検査時間は Table 2 の結果をもとに培養後 26, 32, 38, 42 および 48 時間とした。HEPES 緩衝 TCM 199 の成績は, Table 2 のものを流用した。上記時間における成熟率は, NaHCO_3 緩衝 TCM 199 が 9.1, 51.4, 42.9, 53.8 および 57.5%, HEPES 緩衝 mKRB が 25.7, 58.8, 56.4, 74.4 および 64.1%, NaHCO_3 緩衝 mKRB が 11.4, 48.6, 54.3, 54.1 および 66.7% であった。各時間における成熟率を比較すると, 培養後 32 時間の時点では HEPES 緩衝 TCM 199 が他の培養液よりも劣っていたが, 培養後 38, 42 および 48 時間の時点ではいずれの培養液においても大きな差は認められなかった。mKRB においては, 緩衝剤による成熟率の差はほとんど認められなかった。

考 察

今回の実験の結果, ブタ屠場卵巣の直径 2~5 mm の卵胞を穿刺することにより, 卵巣 1 個あたり 20 個程度の卵胞卵が採取でき, そのうち培養に使えるものは約 60% にあたる 12 個を占めた。本実験の 1 卵巣あたり 19.6 個という採卵数は, 一般に言われる 20~50 個²³⁾ に比べると少なめであったが, Homa¹¹⁾ の 5.5 個よりも多かった。回収率は 60% 前後であり, 教科書的数字⁸⁾ と一致したが, 今後より一層の向上が期待されるものである。1 回の実験あたりで考えると, 約 3 時間の実験時間内に 7~11 個程度の卵巣が処理可能であったので, 60~100 個程度の卵胞卵を成熟培養でき, 後述の成熟率を考慮すると, 40~60 個の成熟卵が得られるものと思われる。

回収卵胞卵は, 卵丘細胞の付着の程度にかなりの差が認められた。これは, 穿刺した卵胞の発育状態の差によるものであり, ある程度卵胞の直径と関係があるのではないかと推測された。また, 本実験においては, A~D 型以外にも膨潤化型と S 型の卵胞卵が, それぞれ平均 0.1 個 (0.7%) と 0.3 個 (1.6%) 回収された。膨潤化型は, 直径 5 mm 以上か, 成熟後に退行過程に入った卵胞を穿刺した結果, 採取されたものであろう。一方, S 型は卵黄の蓄積不良の卵胞卵か, 卵巣表面に突出していない原始卵胞から第 2 次卵胞への発育途中で退行した卵胞卵をかきだしてしまった結果, 採取されたものであろう。直径の小さな卵胞卵を成熟培養すると退行卵が高率に出現することはすでに確かめられているが^{11, 21)}, 採取される個数自体が少ないのであまり問題にはならないであろう。

HEPES 緩衝 TCM 199 を用いてブタ卵胞卵の成熟分裂を経時的に観察したところ, GVBD は培養後 14 時間以降に起こるとされているが²²⁾, 培養後 24 時間以前に完了するものと思われた。GV 期および Met I はすべての観察時間において観察され, とりわけ Met I を示したものは成熟が完了したと思われる時間以降も多くみうけられた。Ana I および Tel I は, 培養後 24~32 時間の間の 8 時間においてのみ観察されたが, その個数は少なかったため, この段階の移行は瞬時に完了し²²⁾, ここで発育を停止する卵胞卵は少ないものと思われた。ProMet II および Met II を示す卵胞卵の割合は培養後 36 時間以降は 30~55% 前後で安定したため, ブタ卵胞卵の成熟は培養後 36 時間前後で完了するものと思われた。

以上を総括すると, ProMet II および Met II に成熟する卵胞卵は, 培養後 24 時間の時点ではすでに

GVBDを終了してMet Iになっており、培養後32時間までの間にAna IおよびTel Iを経て、速いものでは培養後26時間に遅いものでも培養後40時間前後で、Met IIに到達するものと推測された。これは、 NaHCO_3 緩衝 mKRB を用いた佐藤ら²²⁾とおおむね一致するものであったが、約3時間程度の発育の遅れが認められた。

本実験では、39°C 培養は37°C 培養よりも成熟率が高いというEngら⁴⁾の報告に基づき、培養温度を39°Cとしたが、培養温度による成熟分裂速度の差はほとんどないように思われた。発育の速いものの成熟分裂速度の差は、Ana IおよびTel Iの段階では8時間、ProMet IIおよびMet IIの段階では10時間程度であるように見受けられ、分裂の同調性が低かった。この成熟分裂速度の差は、卵胞卵自身の能力差に起因するものであると考えられるが、卵胞卵を利用して体外受精を行っていくうえで、受精能および受精後の発育能に及ぼす影響は少ないものと予想された。

卵丘細胞の膨潤化は、培養後24時間の時点でかなりの卵胞卵に認められたが、これは培地中に含まれたPMSおよびhCGの作用と考えられた^{17,18)}。卵胞卵の個数が比較的多く、膨潤化の著しい微小滴においては若干のpHの低下が認められた。これは、卵胞卵自身もしくは卵丘細胞の代謝によるものであろうと推測されるが、その機構は不明である。しかしながら、PHの低下はエネルギー基質利用性の低下を通じて成熟率を低下させるので²⁰⁾、本実験においても成熟率に多少の影響を及ぼしたかもしれない。

本実験に使用したmKRBは、エネルギー基質としてグルコース、ピルビン酸、乳酸を含む簡単な組成の無機塩類溶液であり、TCM 199はグルタミン酸、ロイシンなどのアミノ酸、コリン、ビタミンAなどのビタミン、核酸前駆物質などを含む複雑な組成の合成培地である。しかしながら、mKRBの成熟培養成績はTCM 199に劣るものではなく、むしろ若干優れてさえいるものであった。

重炭酸塩は、ほとんどすべての哺乳類細胞が要求し、また培地に必要な成分であるとされており²⁵⁾、 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ は卵胞卵の成熟⁴⁾および受精卵の発育¹⁴⁾に重要な役割を果たすとされてきた。しかし、ブタ卵胞卵については25mMのHEPESのみで緩衝したmKRB中で成熟培養後、体外受精しても正常な受精が行われることがすでに確認されている¹⁹⁾。本実験においても、両培地ともに緩衝剤による成熟率の差はほとんど見られなかったことから、ブタ卵胞卵の成熟分裂に及ぼす $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ の影響は少ないものと思

われる。

これらのことから、今回用いたTCM 199およびmKRBの2種の培地はいずれの培地でも、また緩衝にHEPESまたは NaHCO_3 のいずれを用いても、GV卵胞卵の体外成熟に大きな差がなく、60%前後の卵胞卵が成熟することが明らかになった。

文 献

- 1) Brinster, R. L.: A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst, *Exp. Cell Res.*, 32: 205, 1963
- 2) Cheng, W. T. K., Moor, R. M. and Polge, C.: *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*, *Theriogenology*, 25: 146 (abstr.), 1986
- 3) Edwards, R. G.: Meiosis in ovarian oocytes in adult mammals, *Nature, Lond.* 196: 446, 1962
- 4) Eng, L. A., Kornegay, E. T., Huntington, J. and Wellman, T.: Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*, *J. Reprod. Fert.* 76: 657, 1986
- 5) Fukui, Y. and Sakuma, Y.: Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells, *Biol. Reprod.* 22: 669, 1980
- 6) Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K.: Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes, *J. Reprod. Fert.* 83: 753, 1988
- 7) 花田 章, 塩谷康生, 鈴木達行: 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例, 日畜学会第78回大会講演要旨, 18, 1986
- 8) 花田 章: 体外受精法; 家畜, 哺乳動物の発生工學実験法 (菅原七郎編, 佐久間勇次, 正木淳二監修), 180, 学会出版センター, 東京 1986
- 9) Hillensjo, T. and Channing, C. P.: Gonadotropin stimulation of steroidogenesis and cellular dispersion in cultured porcine cumuli oophori, *Gamete Res.* 3: 233, 1980
- 10) Homa, S. T., Racowsky, C. and Mcgaughey, R. W.: Lipid analysis of immature pig oocytes, *J. Reprod. Fert.* 77: 425, 1986
- 11) Homa, S. T., Mcgaughey, R. W. and Racowsky, C.: Isolated subpopulation of mass-harvested pig oocytes and their characterization by size, incidence of atresia and competence to mature in culture, *J. Reprod. Fert.* 82: 81, 1988
- 12) Iritani, A., Sato, E. and Nishikawa, Y.: The

- fertilization of pig follicular oocytes *in vitro* with capacitated spermatozoa, Jap. J. Fert. Ster. 20: 404, 1975
- 13) Iwasaki, S., Kono, T., Nakahara, T., Shioya, Y., Fukushima, M. and Hanada, A.: New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to *in vitro* maturation and fertilization, Jpn. J. Anim. Reprod. 33: 188, 1987
 - 14) Kane, M. T.: Bicarbonate requirements for culture of one-cell rabbit ova to blastocysts, Biol. Reprod. 12: 552, 1975
 - 15) McGaughey, R. W. and Polge, C.: Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*, J. Exp. Zool. 176: 383, 1971
 - 16) McGaughey, R. W.: The maturation of porcine oocytes in minimal defined culture media with varied macromolecular supplements and varied osmolarity, Exp. Cell Res. 109: 25, 1977
 - 17) Minato, Y. and Toyoda, Y.: Induction of cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes *in vitro*, Jpn. J. Zootech. Sci. 53: 480, 1982
 - 18) 湊 芳明, 豊田 裕: 体外培養によるブタ卵母細胞の成熟分裂誘起と卵丘細胞層の膨化に及ぼす同種血清および卵胞液の影響について, 日畜会報, 53: 515, 1982
 - 19) Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A.: *In-vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa, J. Reprod. Fert. 84: 585, 1988
 - 20) 佐藤英明, 石橋武彦: ブタ培養卵胞卵子の成熟に及ぼす pH およびステロイドの影響, 日畜会報, 48: 107, 1977
 - 21) 佐藤英明, 入谷 明, 西川義正: ブタおよびウシ卵胞卵の体外培養, とくに卵の成熟に影響する要因について, 家畜繁殖誌, 23: 12, 1977
 - 22) 佐藤英明, 入谷 明, 西川義正: ブタ卵胞卵の体外培養における成熟分裂速度について, 日畜会報, 49: 400, 1978
 - 23) 佐藤英明: 屠畜卵巣の高度利用技術, 畜産の研究, 41: 359, 1987
 - 24) Staigmiller, R. B. and Moor, R. M.: Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle, Gamete Res., 9: 221, 1984
 - 25) Swim, H. E. and Parker, R. F.: The role of carbon dioxide as an essential nutrient for six permanent strains of fibroblasts, J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 525, 1958
 - 26) Toyoda, Y. and Chang, M. C.: Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer, J. Reprod. Fert. 36: 9, 1974
 - 27) Tsafriiri, A. and Channing, C. P.: Influence of follicular maturation and culture condition on the meiosis of pig oocytes *in vitro*, J. Reprod. Fert. 43: 149, 1975
 - 28) 吉田光敏, 番場公雄, 小島義夫: 豚の体外受精卵移植による出産例, 日豚会誌, 24: 38, 1987

***In vitro* maturation of follicular oocytes obtained pig ovaries at a slaughterhouse**

Yuichi Kameyama and Yoshiro Ishijima

Laboratory of Animal Reproduction,
Department of Zootechnical Science,
Tokyo University of Agriculture,
Tokyo 156, Japan

The effect of HEPES buffer and bicarbonate buffer in culture media on maturation *in vitro* of pig follicular oocytes were investigated using ovaries obtained from the slaughterhouse.

Ovaries were obtained from sows at a local slaughterhouse and brought to the laboratory in physiological saline at 35°C within 1 hour. Follicular oocytes were collected by puncturing follicles of diameter 2-5mm with a needle and washing with PBS containing 10% heat-inactivated porcine serum (PS). The morphologically normal oocytes with cumulus cells were cultured *in vitro*. The medium used for oocytes culture was TCM 199 with 25.0mM HEPES, TCM 199 with 25.07mM NaHCO₃, modified KRB without NaHCO₃ contained 25.0mM HEPES and modified KRB (25.07mM NaHCO₃). To the each medium was added 10% PS, 10IU/ml PMSG, 10IU/ml hCG and 1μg estradiol. The pH of each medium was adjusted 7.2~7.4. Oocytes were cultured in droplets of media under paraffin oil in 35mm disposable petri dishes containing 5 to 8 oocytes/0.1ml. Incubation was for 26 to 48 hours at 39°C with a 5% CO₂-95% air atmosphere and 100% humidity.

The mean numbers of oocytes recovered was 19.6 per one ovary and 61.1% of oocytes recovered was surrounded by cumulus cells. By culture for 48 hours, percentages of oocytes that reached metaphase-II were 56.0, 57.5, 64.1 and 66.7% for HEPES buffered TCM 199, bicarbonate buffered TCM 199, HEPES buffered mKRB without NaHCO₃ and mKRB, respectively. There was no significant difference for maturation rate to metaphase-II among four using media. These results showed that both of HEPES and NaHCO₃ were suitable as a buffer for maturation of pig oocytes in culture.

(受付: 1989年1月19日)

体外受精由来マウス前核期受精卵の 超急速凍結保存について

High Survival Rate of Pronuclear Mouse Oocytes Derived From *in Vitro* Fertilization Following Ultrarapid Freezing and Thawing

順天堂大学医学部共同病理研究室

中 瀨 直 己

Naomi NAKAGATA

Central Laboratory for Medical Sciences,
Division of Pathology, School of Medicine,
Juntendo University, Tokyo 113, Japan

授精6時間後に得られた体外受精由来マウス前核期受精卵を室温にて直接、DAP 213 (2M dimethyl sulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PBI) に移し、直ちに液体窒素中に浸漬することにより卵子の超急速凍結を行なった。融解は37°Cの温水中で行ない、形態的正常卵子を受容雌へ移植、あるいは体外培養し、これら凍結-融解卵子の発生能について検討した。融解時における形態的正常卵子の割合は、90.8% (187/206) と高値であり、また、これら卵子の移植による新生仔への発生率および体外培養による胚盤胞への発生率はそれぞれ60.7% (65/107) および57.5% (46/80) であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4), 757-760, 1989)

序 論

1972年、Whittinghamら¹⁾がマウス胚の凍結保存に成功して以来、哺乳動物胚の凍結保存について、数多くの報告が成されている^{2,3)}。しかしながら、そのほとんどは2細胞期から胚盤胞期のものであり、前核期受精卵についてはあまり成されておらず、融解後の生存率も2細胞期以降の胚のそれと比べ低値であることが報告されている⁴⁾。そこで本実験では前回報告した超急速凍結保存法^{5,6)}、すなわち、室温にて高濃度の保存液に胚を移した後、直ちに液体窒素中に浸漬する超急速凍結法を用い、体外受精由来マウス前核期受精卵の凍結保存を試み、融解後の卵子の生存性について検討した。

材料および方法

1. 体外受精

体外受精は豊田ら⁷⁾の方法に従った。すなわち、精

子はICR系成熟雌(8-12週令)の精巢上体尾部より採取し、HTF培地内⁸⁾で1.5時間の前培養を行なった(37°C, 5% CO₂ in air)。一方、卵子は、PMSGとHCGにて、過排卵処理を施したF1成熟雌マウス(C3H/He×C57BL/6J: 8-10週令)の卵管より、HCG注射後15-17時間に受精用HTF培地内に導入し、直ちに精子懸濁液を受精用HTF培地内へ添加することにより、授精を行なった(精子濃度: 150精子/μl)。授精後6時間に実体顕微鏡下において卵子の観察を行ない、第2極体を放出した前核期の受精卵(1細胞期胚)のみを回収、凍結実験に供した。

2. 凍結・融解操作

凍結は、室温にて前核期受精卵を直接サンプリングチューブ(volume: 0.5ml, Sarstedt)内の20-30μlのDAP 213 (2M demethyl sulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PBI⁹⁾)に移した後(1サンプリングチューブ当たり20-25個)、10秒以内に液体窒素中に浸漬することにより行なっ

た (800°C/min). 融解は, 凍結してから2-3週間後に液体窒素保管器よりサンプリングチューブを取り出し, 37°Cの温水中で素早く加温と同時に0.3M sucroseを含む0.3mlのPB1をサンプリングチューブ内へ加えDAP 213を希釈, その内容液を時計皿に移し, さらにサンプリングチューブ内を0.3M sucroseを含む0.3mlのPB1で洗い, 卵子を回収後, 回収卵子をHTF培地にて3回洗浄, それら卵子の形態学的検査を行なった.

3. 凍結・融解卵子の発生能の検討

融解後, 形態的に正常と判定された卵子を偽妊娠第1日(膣栓確認日)のIVCS系成熟雌(10-12週令)の卵管へ移植し, 新生仔への発生について検討した. また, 一部の卵子についてはHTF培地内で90時間の体外培養を行ない, 胚盤胞への発生について検討した. なお, 授精後6時間に得られた体外受精由来前核期受精卵を単に移植あるいは体外培養したものをcontrol (unfrozen) とした.

Table 1 The survival rate of frozen-thawed pronuclear mouse oocytes fertilized *in vitro* after thawing.

No. frozen	No. recovered	No. morphologically normal
218	206(94.5)	187(90.8)

Table 2 Development to live young of frozen-thawed pronuclear mouse oocytes obtained by *in vitro* fertilization and transfer to the oviducts of recipients on day 1 of pseudopregnancy.

Treatment group	No. of recipients used	No. of oocytes transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young		
				♂	♀	total(%)
Frozen-thawed	9	107	9	29	36	65(60.7)
Control (unfrozen)	6	70	6	25	20	45(64.3)

Table 3 Preimplantation development in culture of frozen-thawed pronuclear mouse oocytes derived from *in vitro* fertilization.

Treatment group	No. of oocytes	No. and (%) of oocytes developed to:			
		2-cell (18hr)*	4-8-cell (42hr)*	morula & early blastocyst (66hr)*	blastocyst (90hr)*
Frozen-thawed	80	76(95.0)	68(85.0)	57(71.3)	46(57.5)
Control (unfrozen)	50	50(100)	48(96.0)	48(96.0)	45(90.0)

* Length of culture.

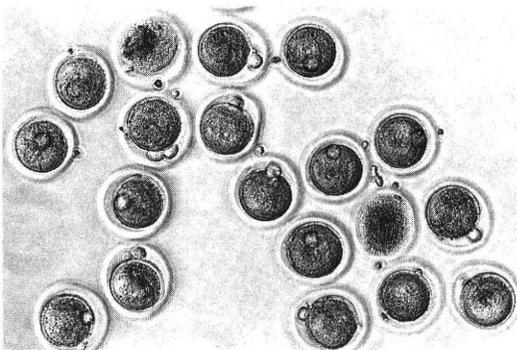


Fig. 1 Frozen-thawed pronuclear mouse oocytes derived from *in vitro* fertilization after thawing.

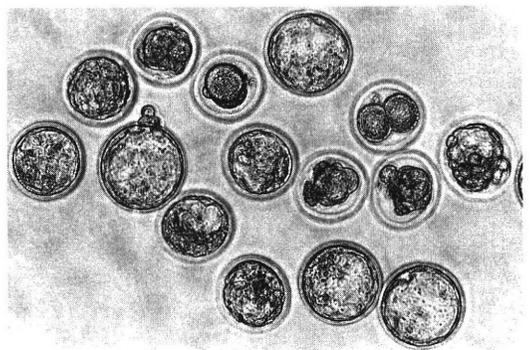


Fig. 2 Blastocysts that developed from frozen-thawed pronuclear mouse oocytes after 90 hr in culture.

結 果

1. 融解時における凍結卵子の生存率

Table 1 は、融解時における凍結卵子の生存率(形態的正常卵子の割合)をまとめたものであるが、回収卵子 206 個中その 90.8%に当たる 187 個の卵子が形態的に正常であった (Fig. 1).

2. 移植成績

Table 2 に形態的に正常と判定された凍結-融解卵子の移植成績を示す。凍結-融解卵子の移植による新生仔への発生率は、control (64.3%, 45/70) と比べやや低値を示したものの有意差を見ず ($P > 0.05$)、移植卵子の 60.7% (65/107) が新生仔へ発生した。

3. 体外培養成績

移植に用いなかった凍結-融解卵子の体外での培養成績を Table 3 に示す。凍結-融解卵子における 2 細胞期への発生率は 95.0% (76/80) と高値であったが、それ以降の各ステージへの発生率は培養時間の経過とともに漸次減少し、90 時間後における胚盤胞への発生率は 57.5% (46/80) (Fig. 2) と control のそれ (90.0%, 45/48) に比べ、有意に低い値であった ($P < 0.05$)。

考 察

1 細胞期胚の凍結保存に関し、Whittingham ら¹⁾ は緩慢凍結法を用いて、体内受精由来マウス 1 細胞期胚の凍結保存を試み、融解後、約 50% が生存し、移植により、22% が胎仔へ発生したことを報告した。また、尾川⁴⁾ は Whittingham ら¹⁾ の方法に準じ、マウスおよびウサギの体内受精由来 1 細胞期胚の凍結を行なった結果、回収胚の 28 および 24% が、それぞれ体外培養により分割したことを報告した。

体外受精由来マウス前核期受精卵を用いた本凍結成績、即ち、超急速的に凍結した卵子における形態的正常卵子の割合、体外での卵割率 (2 細胞期以降へ発生した卵子の割合) および体内での発生率 (新生仔への発生率) はそれぞれ、90.8% (187/206)、95.0% (76/80) および 60.7% (65/107) と上述の報告^{1,4)} に比べ極めて高値を示したことより (Table 1, 2 および 3)、この超急速凍結法はマウス 2 および 4 細胞期胚^{5,6)} のみならず、前核期受精卵の凍結保存においても有効な手段に成りうるものと考えられる。

凍結-融解卵子における体外および体内での発生について、体外培養による凍結-融解卵子の各ステージへの発生率は培養時間の経過とともに漸次減少し、胚盤胞への発生率 (57.5%) は control (90.0%)

と比較し有意に低値を示した (Table 3)。本実験では、融解後一定時間培養した凍結-融解卵子の移植は行なわなかったので詳細な検討はできないが、少なくとも融解直後に移植した凍結-融解卵子の新生仔への発生率は 60.7% と高く、control (64.3%) と比べ差を見なかったことから (Table 2)、本実験条件下における凍結-融解前核期受精卵の新生仔への発生率は、融解後一定時間体外培養して受容雌へ移植するより、融解後直ちに受容雌の卵管へ移植するほうが良好のように思われる。

保存液について、本実験に用いた保存液 (DAP 213: 2M dimethyl sulphoxidè, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PB1) は、基本的には前回報告した modified VS1^{5,6)} (Rall の VS1¹⁰⁾ を若干改良したもの) の組成より polyethylene glycol を除外したものである。本実験においては modified VS1 を用いた前核期受精卵の凍結は行なわなかったが、DAP 213 を用いた本凍結成績は modified VS1 を用いた 2 および 4 細胞期胚のそれら^{5,6)} と比較し、何ら差を見なかったこと、また、保存液作製時における polyethylene glycol のきわめて高い難溶性を考慮すると、本凍結法における保存液の組成として必ずしも polyethylene glycol は必須成分ではないものと考えられる。

稿を終るに臨み、御指導頂きました本学第一病理学教室の福田芳郎教授ならびに同共同病理研究室の村田彌恵子氏に深謝致します。

文 献

- 1) Whittingham, D. G., Leibo, S. P., & Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 187: 411, 1972
- 2) Leibo, S. P.: Cryobiology: Preservation of mammalian embryos, *Basic Life Sci.* 37: 251, 1986
- 3) Friedler, S. F., Giudice, L. C., & Lamb, E. J.: Cryopreservation of embryos and ova, *Fertil. Steril.* 49: 743, 1988
- 4) 尾川昭三: マウス, ラット, 家兔の桑実胚の凍結 (-196°C) 融解後の生存性, および凍結融解後のマウス, 家兔卵の体外受精について, *低温医学*, 3: 119, 1977
- 5) 中潟直己: 超急速凍結法を用いた体外受精由来マウス 2 細胞期胚の凍結保存について, *日不妊誌*, 34: 470, 1989
- 6) 中潟直己: 体外受精由来マウス 4 細胞期胚の超急速凍結保存について, *Exp. Anim.* 38: 279, 1989
- 7) 豊田 裕, 横山峯介, 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, 1971

- 8) Quinn, P. Q., Kerin, J. F., & Warnes, G. M.: Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, Fertil. Steril. 44: 493, 1985
- 9) Whittingham, D. G.: Embryo banks in the future of developmental genetics, Genetics, Princeton 78: 395, 1974
- 10) Rall, W. F., and Fahy, G. M.: Ice-free cryo-preservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, Nature, Lond. 313: 573, 1985

**High survival rate of
pronuclear mouse oocytes derived from
in vitro fertilization following
ultrarapid freezing and thawing**

Naomi Nakagata

Central Laboratory for Medical Sciences;
Division of Pathology, School of Medicine,
Juntendo University, Tokyo 113, Japan

Pronuclear mouse oocytes obtained by *in vitro* fertilization were frozen ultrarapidly by direct plunging into liquid nitrogen, immediately after one-step exposure to a highly concentrated solution (DAP 213: 2M dimethyl sulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PB1), and later thawed in a 37°C waterbath. After thawing, 187 out of 206 oocytes (90.8%) were morphologically normal. The rate of survival to normal young of the frozen-thawed pronuclear mouse oocytes following transfer, and the proportion of development to blastocyst 90 hr after culture *in vitro*, were 60.7% (65/107) and 57.5% (46/80), respectively.

(受付: 1989年1月30日)

家兎胞胚の *in vitro* の着床実験 (着床後期)

In Vitro Studies on the Last 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)

着床現象は妊卵と子宮内膜の相互関係変化の流れであり、両者の相互関係および環境の影響を観察するために家兎を使って *in vitro* 着床実験を行った。交配後6½日の胞胚を培養子宮内膜細胞上に静置し、60、72時間後に形態学的観察を行い次の成績をえた。

- 1) 60時間後の所見 胞胚と内膜細胞の局所的隆起構造との接着形式は様々で、透明帯と内膜細胞との接着や透明帯と collagen との直接の接着も存在した。
- 2) 72時間後の所見 collagen およびそれを含む内膜細胞の複数の局所的隆起構造が皆無となり、透明帯断裂部を通しての trophoblast と内膜細胞の接着の数が増し両細胞が融合してきた。

以上着床前期から着床後期までの家兎胞胚の *in vitro* 着床実験で胞胚と子宮内膜細胞の双方が着床に向かって積極的に作用し合う特徴的な変化が明らかとなった。今後この方法の応用によって着床機序の解明がさらに進展することが期待される。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4), 761-769, 1989)

緒 言

受精および着床は哺乳類における初期発生の極めて重要な一分野であり、しかも妊卵の着床は妊娠成立の出発点と考えられる。この着床の本態を解明するために家兎の着床期胞胚と培養子宮内膜細胞を用いて *in vitro* 着床実験を試み、胞胚特に trophoblast と子宮内膜細胞の interaction を経時的に追い、形態学的観察を行った。

研究方法

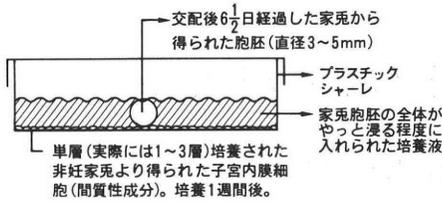
自然交尾後6½日目の雌家兎から摘出した胞胚を子宮内膜培養細胞の sheet 上に静置して培養し、60、72時間経過した時点で固定標本を作成し、光顕的電顕的観察を行った。その方法は家兎胞胚の *in vitro* 着床実験(着床前期)¹⁾とまったく同様で実験系 dish の数などは着床前期報告に記した¹⁾。文中図1とあるの

はすべて着床前期報告¹⁾と同図であり(図1)、(イ)~(ニ)は試料作成法の切除方向のことで略語も同様である。この着床後期報告においては完全静置培養後、60、72時間の所見を中心に家兎 *in vitro* 着床実験の全般にわたって説明を加える。

研究成績

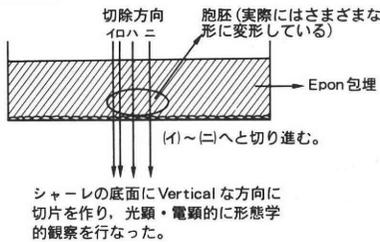
- 1) 60時間後の所見 5個のdishのうち4個に内膜細胞と胞胚の attachment が見られた。光顕所見(写真1): 1aは図1の切除方向(イ)で1b, 1c, 1dは(ロ)で1e, 1fは(ハ)(ニ)で得られたものである。1aには胞胚に向かって大きくなりつつある小さな三次元的盛り上がりが見られているが、やはり外側に内膜細胞の上皮成分を有していた。また図1の切除方向(イ)(ロ)の部分では、この他にもまだ盛んに三次元的盛り上がり多数認められており、1b, 1c, 1fのようにあたかも胞胚を迎えに行くよう

実験方法



完全な閉鎖系静置培養(1気圧, 37.0°C)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, 試料作成法及び略語

な形態で胎胚と attachment をおこしているものもあれば, まだ小さな盛り上がりのももあった。すなわち内膜細胞側はこの時点まで断続的に collagen を放出して盛り上がり胎胚に到達しようとしているものと思われる。胎胚と collagen の三次元的盛り上がりの attachment も様々で, 1b, 1c には透明帯を残しての attachment が見られ, 1d は 36 時間後の attachment と同様である²⁾。1e, 1f は trophoblast と内膜細胞の attachment を捉えているが, 内膜細胞は形態学的に上皮性成分のものも存在し, また多核のものも認められる。toluidine blue 好性物質もまだ存在している。

電顕所見 (写真3) : 3a, 3b は光顕所見 1c の切片から, 3c~3f は図1の切除方向 (ハ) (ニ) の部分から得られたものである。胎胚と三次元的盛り上がりとの attachment に関しては様々な像が見られた。すなわち, 36 時間後に見られたように trophoblast と内膜細胞が直接 attachment をきたし trophoblast が collagen fibrils の固まりの中に入り込んでいるもの²⁾、胎胚の透明帯と三次元的盛り上がりの内膜細胞とが attachment をきたしているもの (3a, 3b に相当する)、胎胚の透明帯と三次元的盛り上がりの collagen fibrils とが直接接しているものが認められた。3c~3f では内膜細胞と trophoblast の attachment 部分を捉えているが, attachment 形式は desmosome 様構築と fusion とによるものであった。しかしそれらの数が次第に増してきており, この時点ではいたる所で見られた。また 3c では embryoblast も突起を出しており, 3e では透明帯の sharp な切れ端が認めら

れた。trophoblast に関してはさらに増殖が旺盛で, 相変わらず microbody-like substance を有していた。2) 72 時間後の所見 5 個の dish のうち 4 個に内膜細胞と胎胚の attachment が見られた。光顕所見 (写真2) : 2a は図1の切除方向 (イ) の部分で, 2b は (ロ) の部分, 2c~2f は (ハ) (ニ) の部分で得られたものである。図1の切除方向 (イ) (ロ) の部分で, 今まで見られていた胎胚に向かっての三次元的盛り上がりがあった認められなくなった。trophoblast はその増殖が極めて盛んとなり, 連続線の節目となる密集点が数も大きさも増していた。特に 2b で見られるようにその増殖は antiendometrial cell region²⁾ で盛んであった。しかも trophoblast の中に 2d, 2e に見られるような明らかに多核の細胞が出現したが, 必ずしも連続線の節目の部分だけに限局存在していた訳ではなかった。また 2a, 2b, 2f で見られるように透明帯もかなり残存していた。電顕所見 (写真4) : 4a は図1の切除方向 (イ) の部分, 4b~4f は (ハ) の部分から得られた。4a では左上方に多核の trophoblast が見られ, 残存している透明帯に向かって内膜細胞からの突起が見られる。4b~4d は endometrial cell region における内膜細胞と trophoblast の attachment 部分を捉えたものである。やはり attachment 形式は desmosome 様構築および fusion によるもので, 近傍には必ず tonofilament が存在した。しかもその数がこれまでよりも多く, 時間経過に従って attachment 像も増加してくる事が分かる。この attachment 部分の内膜細胞, trophoblast は多核ではなく, 多くは単核であった。4e, 4f

は antiendometrial cell region で, embryoblast と trophoblast を捉えている. embryoblast は胞体も肥厚し細胞内小器官も豊富であるが, 以前のような分泌形態は見られなくなった. trophoblast では多核のものが見られるが, 4fに見られるようにその胞体内に極めて多数の顆粒を有するものが現われてきた. 光顕の項でも述べたが, 図1の切除方向(イ)(ロ)の部分で三次元的盛り上がり皆無となったばかりでなく, 今まで見られていた透明帯と内膜細胞の attachment 部分, trophoblast と内膜細胞の attachment 部分付近でも皆無となっていた.

以上, 家兎胞胚の *in vitro* 着床形態の変化を経時的に述べたが, これをまとめて簡単な schema(図2, 3, 4)で示す. schema中の(イ)~(ニ)もやはり図1の切除方向(イ)~(ニ)¹⁾に一致している. 図2は家兎胞胚の *in vitro* 着床実験(着床前期)¹⁾における静置培養後3~12時間の所見を示し, 子宮内膜細胞の間質性成分から胞胚に向かって出される細胞突起, 内膜細胞の有する lysosome, 内膜細胞間や内

膜細胞と透明帯間に出現してくる collagen fibrils, toluidine blue 好性物質, trophoblast 中の microbody-like substance, 6時間後より出現してくる collagen の三次元的盛り上がり, SEZ などが特徴的である. また透明帯の lysis・rupture にも特異的なものがあった. (図2)

図3は家兎胞胚の *in vitro* 着床実験(着床中期)²⁾における静置培養後24~48時間の所見を示し, 内膜細胞の形態学的変化が特異的であった. 位相差顕微鏡下で内膜細胞の間質性成分と思われる sheet 上に胞胚を置いたが, この頃から上皮性成分の出現が見られ, 時間の経過と共に多数の空胞を有し, ついには autolysis をきたすようになる. これに対して間質性成分の方は盛んな増殖形態を示し, trophoblast との attachment の主役を果たしていると考えられる. また三次元的盛り上りの外側部分はやはり内膜細胞の上皮性成分で, これらは autolysis しているものはほとんどなく, trophoblast の attachment に加わっているものも見られた. 内膜細胞と trophoblast の

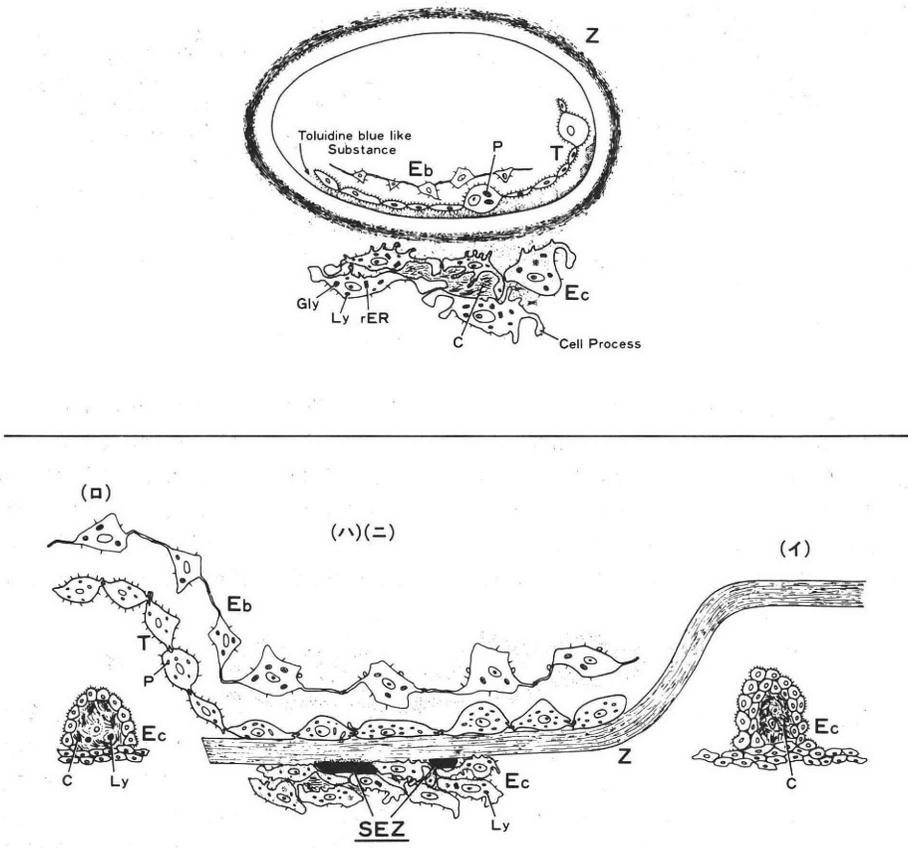


図2 静置培養後3~12時間のシェーマ

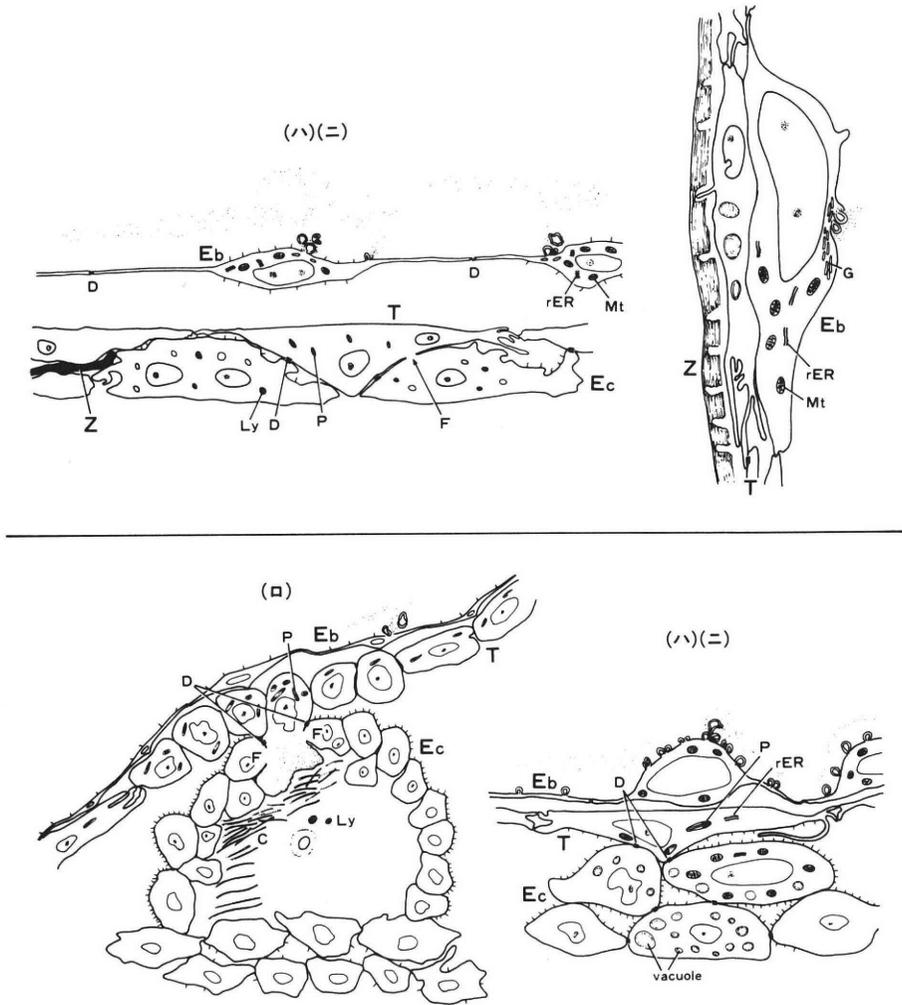


図3 静置培養後 24~48 時間のシェーマ

attachment 形式は desmosome 様構築と fusion によるもので、この時点では稀であった。また embryoblast は Golgi 装置を数多く有しており盛んな分泌形態を示した。透明帯は endometrial cell region と antiendometrial cell region とでその消失形態が異なり、前者ではある程度まで lysis していきその後 rupture をきたし、後者は最後まで lysis の形態をとる。この rupture 形態の中に SEZ の関与が示唆された。(図3)

図4は静置培養後 60~72 時間の所見を示し、trophoblast の盛んな増殖形態が目される。trophoblast と内膜細胞の attachment は時間の経過と共に増加していくが、その形式はやはり desmosome 様構築と fusion によるものであった。また trophoblast には多核の細胞の出現があり、内膜細胞にも稀に多核

のものが現われてきたが、attachment をきたしている細胞の多くは単核の細胞同志であった。60 時間後の所見では胞胚と三次元的盛り上がりの attachment で様々な形態のものが見られたが、72 時間後の所見ではこれら三次元的盛り上がりが完全に消滅し、collagen fibrils が皆無になってしまったことは大きな特徴であった。(図4)

考 案

胞胚の子宮内膜細胞への付着は培養開始後 60, 72 時間と経過するにつれ増加し、付着率はさらに上昇していった。また培養の時間経過と共に trophoblast の増殖は次第に盛んとなり、一方子宮内膜細胞には接着の最盛期頃から膨化、空胞化が出現し、やがて子宮内膜細胞由来の三次元的隆起構造と collagen

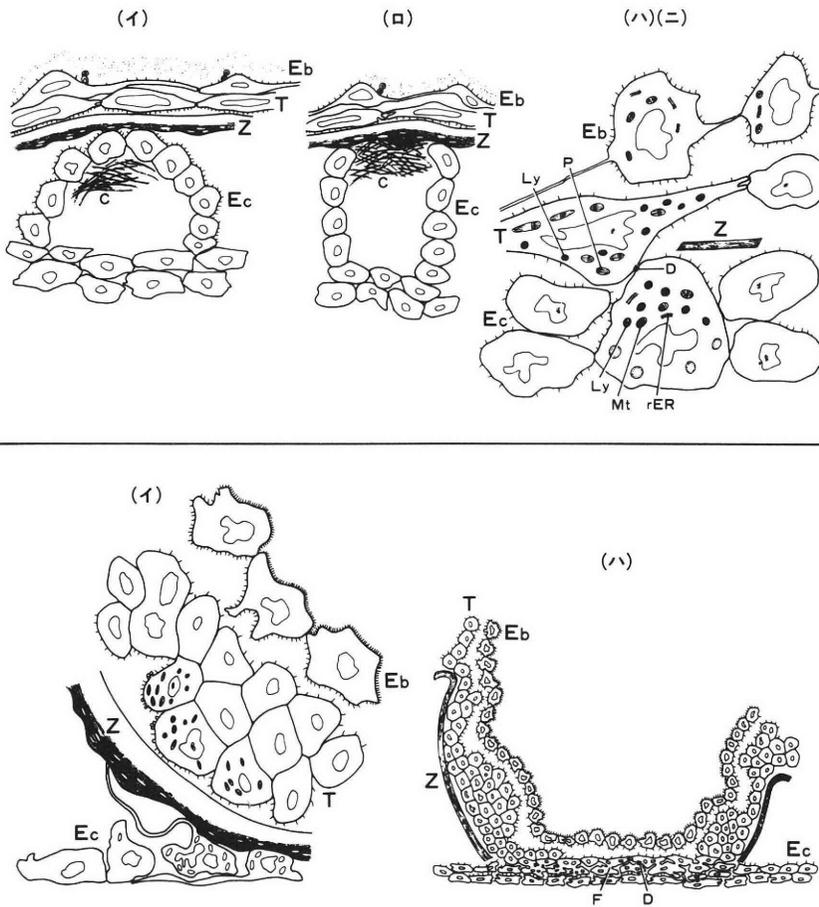


図4 静置培養後60~72時間のシエーマ

fibrilsは消失し、また embryoblast には旺盛な分泌像が見られた。これらの変化は trophoblast と子宮内膜との接着以後の着床過程を示すもので、*in vivo* の所見³⁾とよく対応しているものと考えられた。今回の *in vitro* model 実験で考慮すべきことは *in vivo* での着床との条件の相違である。胞胚の着床する子宮内膜は僅か2~3層の間質細胞層であること、*in vivo* では胞胚は子宮内膜に包まれた状態で着床するのに反し平面状の子宮内膜細胞層上に置かれること、*in vivo* では胞胚の接着部は子宮内膜毛細血管の位置と密接な関係があるが⁴⁾*in vitro* では血管が存在しないこと、胞胚の子宮内膜への固定に関する子宮筋層が存在しないこと、さらに培養液の組成が *in vivo* の子宮腔液と異なること、など様々の違いがあげられる。このような相違を考慮して *in vitro* 実験の成績を評価する必要があるが、今回の *in vitro* における胞胚と子宮内膜細胞との接着の過程は *in vivo* における現象と本質的によく似ている点が認められた。

すなわち *in vivo* の状態をよく反映しているということは、今回の研究で用いた *in vitro* model の着床機序解明における有用性を示すものといえる。今後この *in vitro* model の改良と応用によって、さらに詳細な着床機序の解明が可能と考えられる。

稿を終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衷心より感謝いたします。

文 献

- 1) 立山一郎：家兎胞胚の *in vitro* 着床実験（着床前期），日不妊会誌，34：316，1989
- 2) 立山一郎：家兎胞胚の *in vitro* 着床実験（着床中期），日不妊会誌，34：385，1989
- 3) 立山一郎，富永敏朗，紙谷尚之，松本貞夫，下山直樹，森 崇英：家兎胞胚の着床 (*in vivo* 現象を中心として)，日受着誌，4：135，1987
- 4) Denker, H. W.: Implantation, Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. 53: 5, 1977

***In vitro* studies on the last stage of rabbit blastocyst implantation**

Ichiro Tateyama

Department of Gynecology and Obstetrics,
Faculty of Medicine,
Kyoto University, Kyoto 606, Japan
(Director: Prof. T. Mori)

An *in vitro* experimental model of rabbit blastocyst implantation was carried out to study the interactions between blastocysts and endometrial cells. Blastocysts obtained 6½ days after mating were placed on endometrial cell sheets prepared prior to the addition of blastocysts. After 60 or 72 hours in culture, the blastocysts and the endometrial cells were studied morphologically and the following results were obtained.

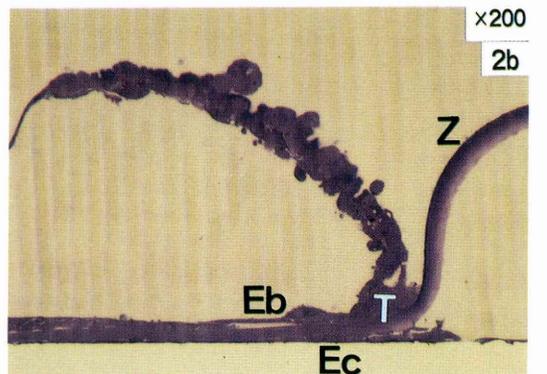
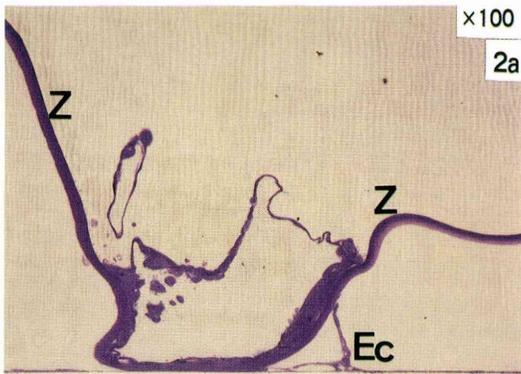
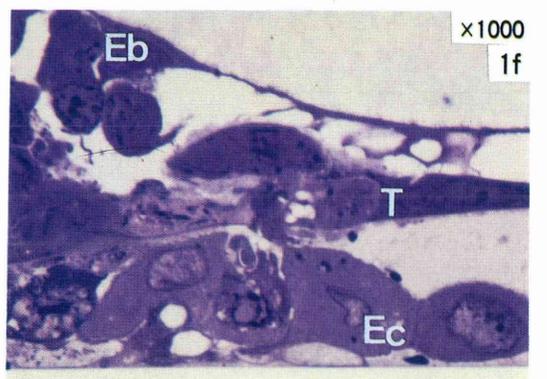
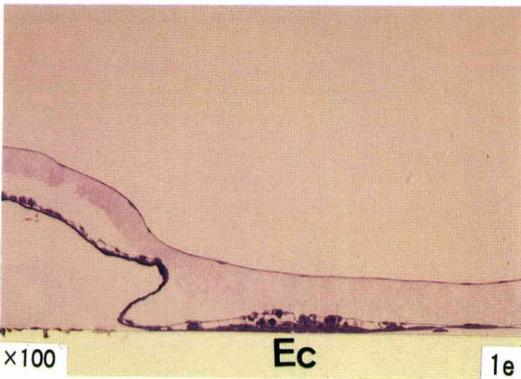
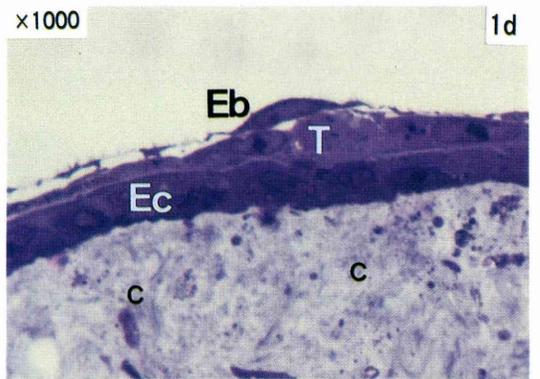
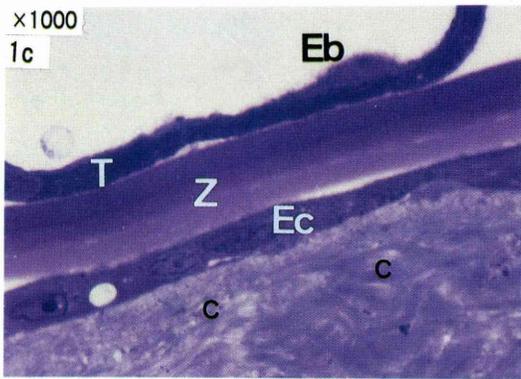
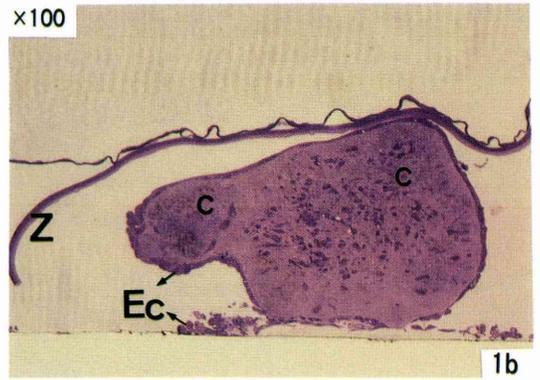
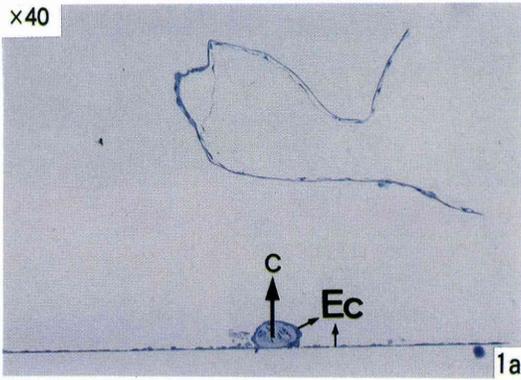
- 1) After 60 hours in culture, the zona pellucida of the blastocysts was attached firmly to the endometrial cells covering the protuberant structures at several discrete points and made direct contact with collagen fibrils in part.
- 2) After 72 hours, collagen fibrils and multiple protuberant structures consisting predominantly of collagen fibrils disappeared, and the trophoblast came into broad contact with endometrial cells through a ruptured zona pellucida, resulting in adhesion and fusion of both cells.

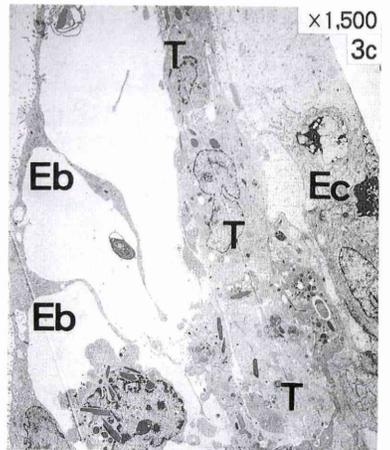
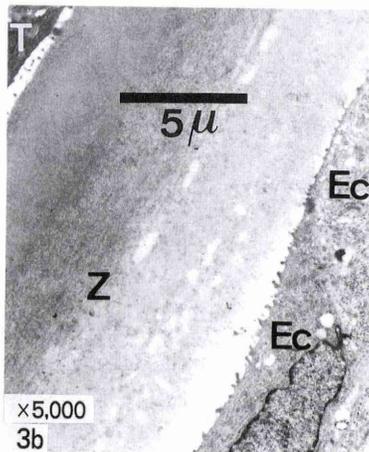
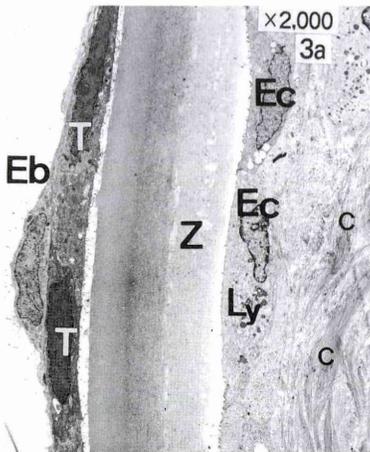
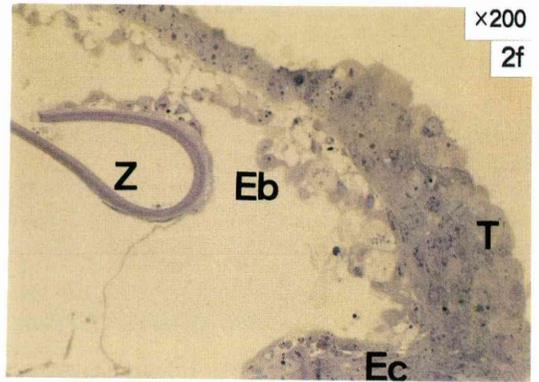
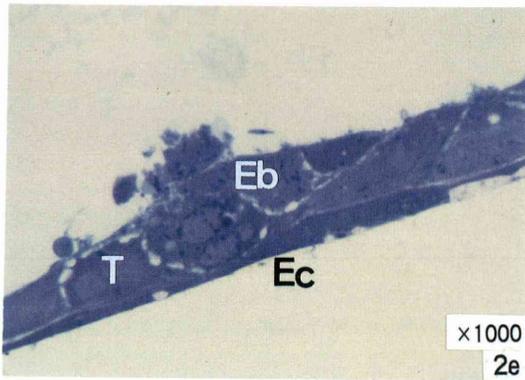
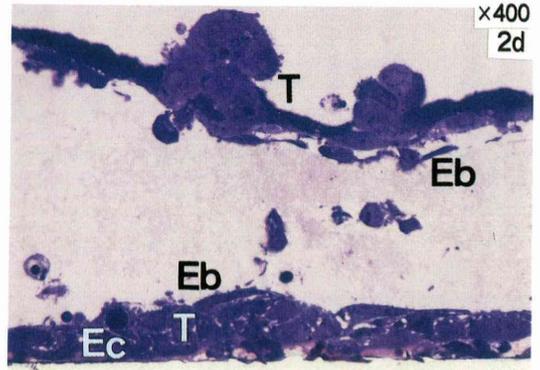
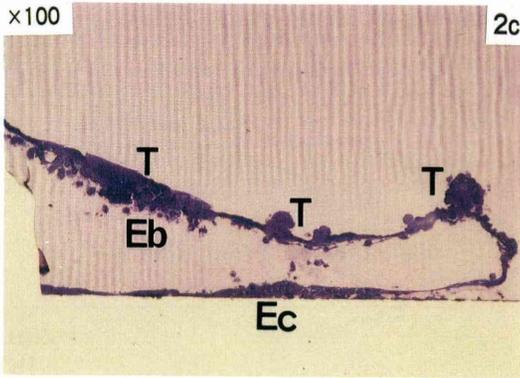
The results of these three *in vitro* studies of rabbit blastocyst implantation demonstrate the intimate mutual relationship and interaction between the blastocyst and endometrial cells during implantation.

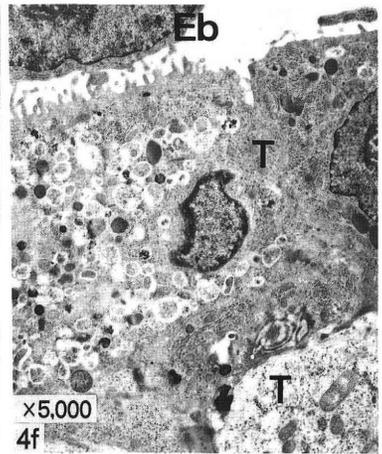
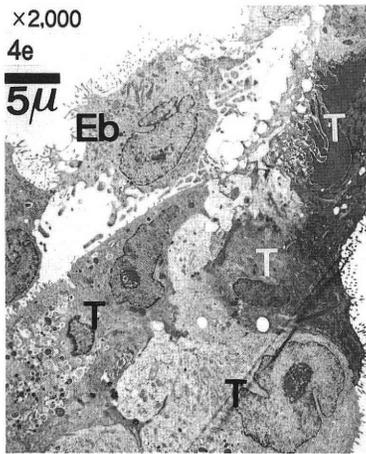
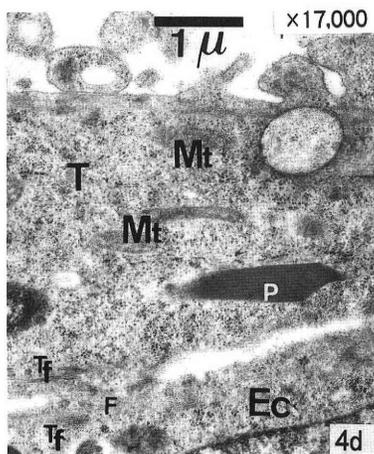
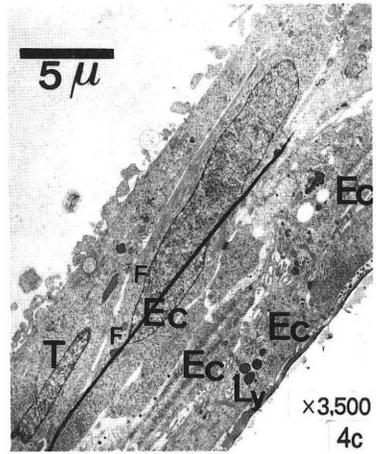
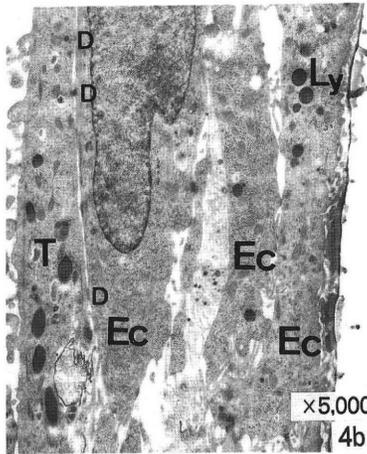
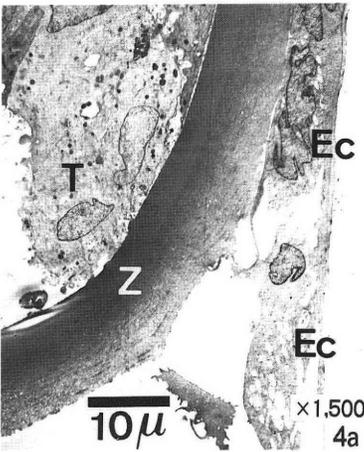
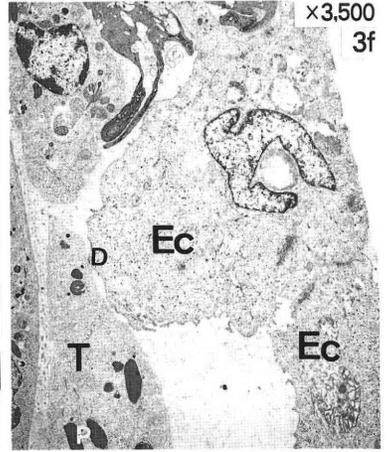
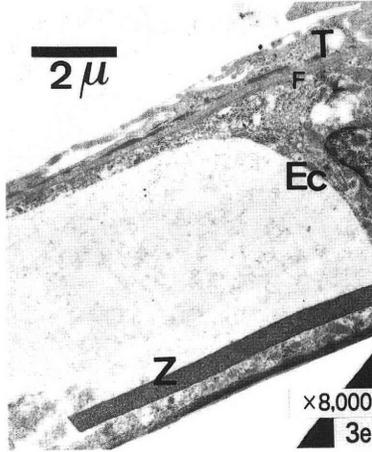
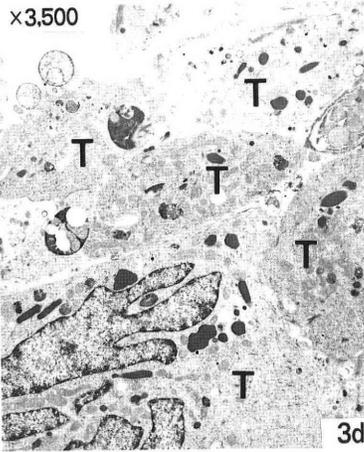
(受付: 1988 年 7 月 8 日)

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 60 時間の光顕所見
写真 2 a~2 f: 静置培養後 72 時間の光顕所見
写真 3 a~3 f: 静置培養後 60 時間の電顕所見
写真 4 a~4 f: 静置培養後 72 時間の電顕所見







EFFECTS OF TRICHOSANTHIN ON MOUSE EMBRYOS AND FETUS DEVELOPMENT *IN VIVO AND IN VITRO*

Yoshiaki SATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine, Niigata 951, Japan
and Baylor College of Medicine,

W. E. GIBBONS

Baylor College of Medicine

Abstract: Purified Trichosanthin extracted from the root of the tuber of *Trichosanthes kirilowii japonica* was administered to mice in order to determine its effect on early mouse embryo and fetus development.

A single i.p. injection of 100 μg Trichosanthin given to mice on Day 4 of pregnancy mice produced no abortifacient effect except some vaginal bleeding, but, 80% of the mice aborted when the same dose Trichosanthin was given on day 11 of pregnancy. An *in vitro* experiment was done to clarify the effect on the early mouse embryonic development.

Retardation of embryonic development during *in vitro* culture was clearly demonstrated with a dose of 5 μg or more of Trichosanthin.

The growth-retarding effect of Trichosanthin was not alleviated by the administration of 20nM progesterone.

Retarded embryo growth recovered when the embryos were washed and cultured in new Trichosanthin-free medium.

A sister chromatid exchange experiment showed that the Trichosanthin treatment to early mouse embryo did not damage DNA.

These findings indicate that Trichosanthin may function as a contraceptive in addition to its use to induce abortion in pregnancy and inhibit trophoblastic disease.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4), 770-775, 1989)

Introduction

Trichosanthin (TCS) is a plant protein extracted from the root tuber of *Trichosanthes kirilowii japonica*.

This protein kills the trophoblastic syncytial layer and is used clinically to terminate pregnancy and inhibit trophoblastic disease³⁾.

But, it is not known whether the agent acts

directly on the early embryo development or not.

We studied the effects of various TCS concentrations on preimplantation and postimplantation embryonic development in mice *in vivo* and *in vitro*.

Materials and Methods

(1) Effects on pregnancy

Mature BALB C/6 \times C3H mice (22-25g) were

bred during estrus and injected with hCG. The day of mating was regarded as Day 1 of pregnancy. The pregnant female mice were given a single intraperitoneal injection of TCS on Day 4 or 12 of pregnancy.

Animals were autopsied on Day 5 and Day 14 of pregnancy. The embryos were examined for the degree of genital bleeding, biological activity and macroscopic and microscopic conditions.

The abortaficient effect of TCS was expressed as the biological activity (B.A) shown in Fig. 1.

(2) Embryo collection and *in vitro* experiment

BALB C/6×C3H mice were given intraperitoneally 10 i.u. of pregnant mare serum gonadotropin (Gestyl, Organon), followed 48 h later by 10 i.u. of human chorionic gonadotropin (Pregnyl, Organon), to synchronize superovulation. For the fertilization *in vivo*, the females were mated with BALB males after the second injection and on the following morning the presense of a vaginal plug was checked as a sign of mating.

Two-cell-stage embryos were flushed from the oviducts 44 h after the hCG treatment and placed in the embryo culture medium Ham F-10.

Purified TCS was added to the medium at a concentration of 0.5, 1, 5, 10 or 20 $\mu\text{g/ml}$ on the day of culture.

A minimum of 25 embryos were placed in culture dishes and incubated at 37°C in 5% CO₂ in humidified air. Embryonic development was assessed by light microscopy after 24 and 48 h of culture to observe their development. Some embryos were observed for more than 96 h.

(3) Trichosanthin

The agent which we used for the experiments was extracted and purified from the root tuber of *Trichosanthes kirilowii japonica* by the methods of Jin-shan-wei¹⁾.

(4) Progesterone administration experiment

To test whether TCS in combination with progesterone affected development, 10 or 20 nM/ml progesterone was added to the culture media.

Control cultures contained the same amount of ethanol (5 $\mu\text{l/ml}$) as those treated with progesterone.

(5) Sister chromatid exchange (SCE)

SCE²⁾ was done to determine whether the em-

bryo DNA was damaged in the experiment with TCS.

Embryos were treated with 5-bromodeoxyuridine (β UDR, 10⁻¹⁵, Sigma Taufkirchen, West Germany) for 24 h to ensure that two rounds of DNA replication occurred prior to fixation. Colecemid (in 2×10⁻⁷M final concentration) was added for the last 2 h of culture to stop the DNA replication.

The embryos were treated for 6 min. with 0.075 M KCl to spread the chromosomes which were then fixed in methanol/acetic acid (3:1, v/v).

Individual embryos were placed in squares scored onto an acid-cleaned glass microscope slide. Excess medium was removed and the embryos were allowed to dry air.

After drying, the slides were stained with Hoechst 33258, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, for 15 minutes, rinsed in distilled water, mounted with butter (PH 7.0:6.5 parts of 0.1 M sodium citrate, 43.6 parts of 0.2 M distilled water), and sealed with mounting medium (Histoclad, Parsippany, NJ). The slides were exposed to ultraviolet light for 40 minutes and again rinsed and mounted. Finally, the SCE was observed.

The pH and osmolarity of media were strictly checked in each experiments before and after adding TCS and progesterone.

(6) Statistics

The percentage of the total embryos in each condition at the various stages was calculated at the indicated times. Student's t-test was used to determine whether the TCS affected the percentages at each development stage of embryonic development.

Results

(1) Effects of TCS on early pregnancy *in vivo*.

TCS given intraperitoneally to mice on Day 4 of pregnancy did not inhibit pregnancy in the tested mice, but there was severe or slight vaginal bleeding shown in Table 1. Whereas 100 μg of TCS/mouse give i.p on pregnancy Day 12 induced termination of pregnancy in 62.3% of the treated female mice.

(2) Effects of TCS on embryos *in vitro*.

The comparative cleavage rate of embryos

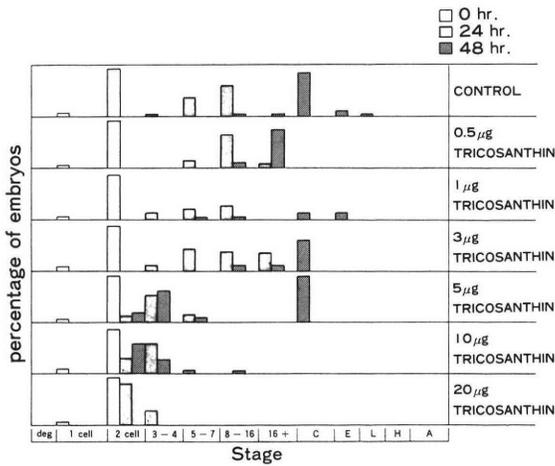


Fig. 1 Distribution of various stages-of embryos

Table. 1 Effect of abortion induced by TCS on pregnancy in mouse.

Animal number	TCS injection on Day of pregnancy ²⁾	Status of pregnancy		Genital bleeding ²⁾	B·A (%) ³⁾
		total fetuses	dead fetuses		
1	Day 4th	10	0	—	0
2		18	0	—	0
3		14	0	+	0
4		13	0	±	0
5		13	0	+	0
		68	0	60%	0%
6	Day 12th	15	4	++	26.6
7		13	8	++	61.5
8		13	10	++	76.9
9		13	9	+	69.2
10		15	12	++	80.0
		69	43	100%	62.3

- 1) 100µg of TCS/mouse, intraperitoneal
- 2) Grade of genital bleeding
 -: none ±: slight bleeding
 +: moderate bleeding
 ++: heavy bleeding
- 3) B·A(Biological activity) = $X/Y \times 100\%$
 X = total absorptive point
 + total dead fetuses
 Y = total fetuses(X + living fetuses)

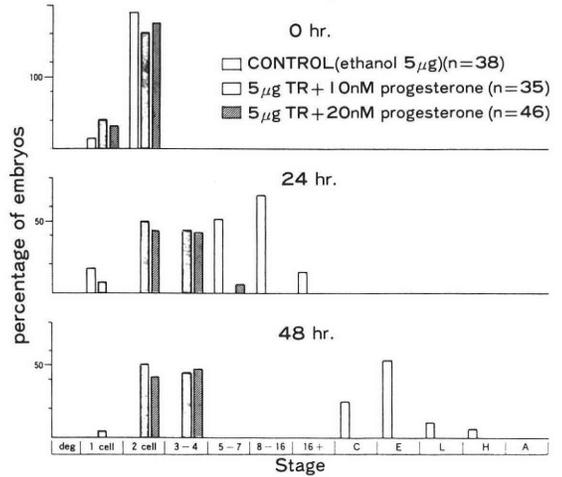


Fig. 2 Effect of progesterone on embryos cultured with Trichosanthin.

developed *in vitro* at 0, 24 and 48 h of development is shown in Fig. 1.

In the control group, more than 90% of the embryos reached the late blastocyst stage after 72 hours of culture. The addition of up to 5µg of purified TCS did not significantly reduce the number of embryos that reached the blastocyst stage.

But, in the media with TCS concentrations of 5µg or more, growth was clearly retarded. The number of growth-retarded embryos was directly related to the TCS concentrations.

Table 2 shows that when embryos were washed twice and placed in new TCS-free media at the 48 h of culture time, they started to grow again. Seventy-four percent of these embryos finally reached the blastocyst stage. But, only 11% of embryos, that were left in the media containing TCS reached that stage. The difference is statistically significant.

(3) Effect of progesterone

The embryos pretreated with 10µg of TCS were treated with 10 or 20 nM progesterone and observed for 24 h. The progesterone did not help the embryonic development at the stages before cavitation (Fig. 2).

Table 2 shows that when embryos were washed twice and placed in new TCS-free media at the 48th h of culture time, they started to grow again. Seventy-four percent of these embryos finally

Table 2 Effect of washing embryos treated with Tri-chosanthin.

	0 hr		24 hr					48 hr	
	1 cell	2 cell	Deg.	2 cell	3-4 cell	5-7 cell	8-16cell	16+ \geq	BIASTOCYSTS (C, E, L, H)
CONTROL 1 (n = 88) ¹⁾	15%	85%	—	—	1%	71%	28%	1%	99%
CONTROL 2 (n = 90) ²⁾	9%	91%	—	25%	57%	13%	—	89%	11%
washed embryo (n = 39) ³⁾	10%	90%	—	14%	66%	20%	—	26%	74%

1) cultured with normal media

2) cultured continuously with 10 μ g of Trichosanthin media

3) First cultured with 10 μ g media for 24 hr, then washed twice with normal media. Second, cultured with normal media for 24 hr.

Table 3 Effect of various concentrations of Trichosanthin on SCE.

Trichosanthin concentrations (μ g/ml)	NO. of embryos	NO. of blastomeres	SCE
1	58	50	8.7 \pm 1.1
3	62	60	12.1 \pm 0.8
5	48	42	10.1 \pm 0.7
10	20	19	10.1 \pm 0.9

reached the blastocyst stage. But, only 11% of embryos that were left in the media containing TCS reached the blastocyst stage. The difference is statistically significant.

(4) Sister chromatid exchange

The mean prevalence of SCE per embryo cell was 10.1 in the TCS medium and 8.4 in the control medium. The difference is not significant. This showed that no DNA damage occurred in embryos cultured in TCS medium (Table 3).

Discussion

The mechanism of TCS-induced abortion in animals is attributed to the direct action of the drug on the placental trophoblast causing necrosis of the placental villi. Thus, in China³⁾, this drug has been reported to be an effective *in vivo* abortifacient agent in mice, rabbits, monkeys and humans.

In comparison to the present study, treating pregnant mice with 100 μ g of TCS at the D₄ stage of pregnancy did not inhibit pregnancy. This

agrees with Chang et al. (1979)⁷⁾, but is in contrast to the results of Zho and Law⁸⁾.

The cause of this discrepancy is not known, but it is possible that the purified TCS used for the experiments was not the same in extraction methods, potency and purity. Generally speaking, TCS may induce abortion, when it is administered at mid-term pregnancy as in the pregnant mice at Days 9 to 14 reported in this experiment. And it seems likely though paradoxical, that the inhibition of pregnancy *in vivo* is an all-or-none effect^{3,4)}. But inhibition of early preimplant embryo development *in vitro* is a continuously variable response.

In an *in vivo* study, Law et al⁸⁾, showed that TCS given intraperitoneally inhibited implantation in mice, but they did not find any *in vitro* effect on the transformation of morulae to blastocysts. Thus, they concluded that the effect on implantation *in vivo* may be a consequence of the deleterious effect of TCS on the trophoblast. But, in our experiment, using an *in vitro* culture

system, the growth-retardation of fetuses occurred within 24h after the administration of TCS.

The mechanism of TCS-induced growth retardation of embryos *in vitro* is less clear.

The extend of retardation depends on the TCS concentration. Besides, developmental delay after short-term culture with TCS seems to be reversible. Delay was significantly more pronounced on Days 2 and 3. It is well known that the cell cycles in preimplantation embryos are characterized by a near lack of a G₁-phase and by a 6-7 h S-phase⁶⁾. The mouse zygote also has the capacity to repair DNA damages induced chemically or by irradiation⁶⁾. Some kinds of proteinaceous plant toxins are known to kill normal and tumor cells *in vivo*. Those plant toxins first bind to cell surface receptors and then are internalized. After the toxin is internalized in molecules, the cytotoxic effect appears as the result of suppression of protein synthesis resulting from the damaging of DNA.

In the present study, complete compensation of developmental retardation caused by 24 h culture in TCS media was not accomplished when the culture was continued in new TCS free media after washing the embryos several times. And no variation in the degree of exposure to the mutagens. As shown in Table 2, there was no significant difference in the rate of sister chromatid exchange (SCE) in embryos cultured with the medium containing Trichosanthin. So, higher concentrations of Trichosanthin did not cause any toxic DNA damage in the early embryos, but it did retard growth or development. In an experiment with rabbits to test the effect of adding progesterone to culture medium, Saksena⁵⁾ showed that exogenous progesterone alone in combination with human chorionic gonadotropin given twice daily failed to prevent termination of pregnancy induced by TCS. He and Heap⁴⁾ reported decreased circulation of progesterone in the TCS-induced termination of pregnancy.

So, they concluded that the first TCS effect in abortion is related to the rate of production of progesterone. There has been no report on the counteractive effect of progesterone in embryos of the pre-treated with TCS *in vitro*. Our experiment

showed that progesterone did not affect on the embryos and it also did not counteract the retardation of embryos caused by TCS, at least in the early stage of cleavage *in vitro*.

In conclusion, the present study shows that TCS blocks early embryo cleavage by arresting embryo development without causing DNA damage.

And these phenomena are reversible. No counteraction was seen when exogenous progesterone was given at the same time as the TCS treatment.

Acknowledgements

We thank Dr. M. Nishimura, M.D. (Niigata University) and Dr. W.E. Findley, Ph.D. (Baylor College of Medicine) for technical advice and TUMURA Juntendo CO. Japan for financial assistance.

The Trichosanthin was extracted and purified by Prof. S. Ogiwara, Nagoya City University, Department of Pharmacology.

References

- 1) Jin-shan-wei, Sun Xiao-xian, Wang Shao-fu, Tian Geng-yuan, Gu Zi-wei, Qian Wei-Wei, Liu Yin-zeng, She Wei-yang, Qian Rui-qing and Wang Yu: Chemistry of Trichosanthin, Acta Chimica Sinica, 39: 917, 1981
- 2) Perry, P., Evans, H. J.: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, Nature, 258: 121, 1975
- 3) The Second Laboratory, Shanghai Institute of Experimental Biology: Studies of the mechanism of abortion induced by Trichosanthin, Scientia, Sinica, 19: 811, 1976
- 4) Heap, R. B.: Role of hormones in pregnancy In: Hormones in reproduction, Ed. C. R. Austin and R. V. Short, Cambridge University Press. London: p73, 1972
- 5) Saksena, S. K., Chag, M. C. and Lau, I. F.: Termination of pregnancy in rabbit and mouse by trichosanthin, Contraception 20: 367, 1979
- 6) Brachet, J. and Alexandre, H.: Introduction to Molecular Embryology, Springer-Verlag (N. Y.), 1986
- 7) Chang, N. C., Saksena, S. K., Lav, I. F. and Sang, W. H.: Induction of midterm abortion by Trichosanthin in laboratory animals, Contraception, 19: 175, 1979
- 8) Law, I. F., Saksena, S. K. and Chang, M. C.: Further studies on the Trichosanthin-induced

termination of pregnancy, Contraception, 21:
77, 1980

**Tricosanthin がマウスの胎児
および胎芽に及ぼす *in vivo*
および *in vitro* の影響**

新潟大学医学部産科婦人科学教室
Baylor Colledge of Medicine

佐藤芳昭
Baylor College of Medicine
W.E. Gibbons

純化された tricosanthin (以下T)を妊娠マウスの胎芽および胎児に与えて、以下のような成績を得た。

1) 100 μg のTを腹腔内に投与して妊娠4日で性器出血のみで、流産効果は見る事が出来なかった。しかし、11日目では80%が流産をした。

2) Tの *in vitro* での、添加において5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では明らかな embryo の発育阻止効果が見られた。これは progesterone では救済出来なかった。

3) 洗浄で、再びこの embryo は正常な発育を始めた。

4) sister chromatid exchange ではDNAの損傷は見られなかった。

以上より、Tは流産惹起作用のほかに、避妊薬として妊娠のきわめて早期に使用できる可能性がある。

(受付: 1988年12月5日)

子宮内膜症患者における腹腔内貯留液の マウス受精卵分割に与える影響

Effect of Peritoneal Fluid with Endometriosis on *in vitro* Cleavage of 2-Cell Mouse Embryos

東京大学医学部産婦人科学教室

五味淵秀人 千谷東海 郭宗明
Hideto GOMIBUCHI Tokai CHITANI Tsong-Ming KUO
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

子宮内膜症を有する不妊症患者 (E) における腹腔内貯留液 (PF) のマウス2細胞期卵体外発生に与える影響について検討した。過排卵誘起後に交配させた ICR 雌マウスの卵管より2細胞期卵を採取し、5%濃度になるよう PF を添加した培養液中で24時間培養した後、分割の状態を位相差顕微鏡下で観察した。PF を添加しない対照群では5-8細胞期であったものが36.8% (123/334) と最も多かったが、E-PF を添加した群では18.5% (25/135) に過ぎず、40.7% (55/135) の卵は3-4細胞期に留まっていた。E-PF 添加により5-8細胞期の卵の出現頻度は有意に低下した。しかし、子宮内膜症を認めない不妊症患者 (NE) のPF を同濃度添加した群においても3-4細胞期は36.0% (58/161)、5-8細胞期は23.0% (37/161) とE-PF 群に比べ有意差はなかった。よって、E-PF はマウス2細胞期卵の体外発生を障害するものの、この作用は子宮内膜症に特異的なものとは断定しがたいと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4) 776-779, 1989)

子宮内膜症、とくに外性子宮内膜症は妊孕性に影響を与えることが知られている。しかし、卵巣に腫瘤を形成しているような進行例が妊娠にいたり、腹膜表面の小病変以外に不妊原因がみられない症例などもあり必ずしも内膜症の重症度と生殖能力とは一致しない。卵管周囲癒着を形成し卵の pick up が障害されているような症例では妊孕性が低下するであろうことは容易に推測されるが、軽症の子宮内膜症と思われる症例でなぜ妊孕性が妨げられるのかについて未だ解明されていない。われわれは子宮内膜症患者の腹腔内貯留液に着目し、これが妊孕性に与える影響について報告してきた¹⁾⁻³⁾。今回、この腹腔内貯留液のマウス受精卵分割に与える影響について

検討したので報告する。

方 法

腹腔内貯留液は当科不妊外来受診中の患者で、卵胞期中期から後期において施行した腹腔鏡検査または開腹術施行時に採取した。採取後すみやかに遠沈 (125 g, 10 分) し上澄を実験まで凍結保存した。実験に供した腹腔内貯留液は15例で、そのうち子宮内膜症患者の腹腔内貯留液 (以下 E-PF と略す) は10例、子宮内膜症を認めなかった不妊症患者の腹腔内貯留液 (以下 NE-PF と略す) は5例である。

成熟雌 ICR マウスを PMS-HCG にて過排卵誘起し、同種雄マウスと交配させた。陰栓の確認された

マウスを HCG 投与より 48~50 時間目に頸椎脱臼法にて屠殺し卵管を灌流することにより 2 細胞期卵を採取した。これらの卵を以下の 3 群に分け培養した。すなわち培養液 (BWW) に、a) E-PF を 5% 加えた群、b) NE-PF を 5% 加えた群、c) 培養液のみのコントロール群、の 3 群である。培養は 37°C, 5% CO₂-95% air 下で行い、24 時間後に位相差顕微鏡下に卵割の状態を観察した。なお、有意差の検定にはカイ自乗検定を用いた。

結 果

- a) E-PF 群：培養より 24 時間後には図 1 のごとく 3-4 細胞期に分割していたものは 40.7% (55/135) あり、5-8 細胞期に 18.5% (25/135) になっており、桑実期にまで分割していたものは 1.5% (2/135) であった。2 細胞期のままであったものは 11.9% (16/135) あり、明らかに変性卵と思われる卵は 27.4% (37/135) であった。
- b) NE-PF 群：図 2 のごとく 3-4 細胞期にまで分割

していたものは 36.0% (58/161)、5-8 細胞期は 23.0% (37/161)、桑実期にまで分割したものは 0.6% (1/161) であった。2 細胞期のままであった卵は 16.1% (26/161)、明らかな変性卵は 24.2% (39/161) であった。

c) コントロール群：図 3 のように 3-4 細胞期は 28.4% (95/334)、5-8 細胞期は 36.8% (123/334) あり、これ以上分割していたものが 3.3% (11/334) であった。2 細胞期のままであったものは 8.7% (29/334) と他の群に比べて少なかった。明らかな変性卵は 22.8% (76/334) であった。

E-PF 群はコントロール群に比べ 2 細胞期卵および変性卵割合には差はなかったが、3-4 細胞期卵の出現頻度は有意に高く、逆に 5-8 細胞期卵の出現頻度は有意に低かった。一方、同様のことが NE-PF 群とコントロール群の間にもいえ、E-PF 群と NE-PF 群の間には有意な差は認められなかった。

考 察

子宮内膜症が妊孕性に影響を及ぼす原因としていくつかのものが報告されている。内分泌学的には子宮内膜症患者では高プロラクチン血症の頻度が高いとの報告⁴⁾や黄体機能不全を起こす頻度が高いとの報告⁵⁾もある。子宮内膜症患者では腹腔内貯留液が多いことはしばしば経験するところであり、この腹腔内貯留液の妊孕性への影響についてもいくつかの報告がある。この腹腔内貯留液中のマクロファージが正常の場合より多いため精子が貪食されるという報告⁶⁾⁻⁷⁾があり、子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中の細胞性因子についても検討がなされている⁸⁾⁻⁹⁾。

われわれは腹腔内貯留液中の液性因子に着目し、これが精子および受精に与える影響について検討してきた¹⁾⁻³⁾。これらの結果より子宮内膜症患者の腹腔

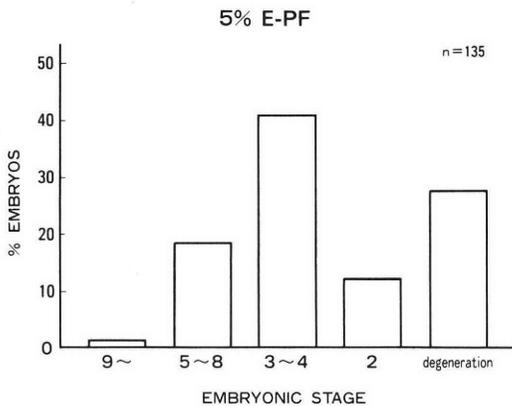


図 1 5% E-PF 群における卵分割

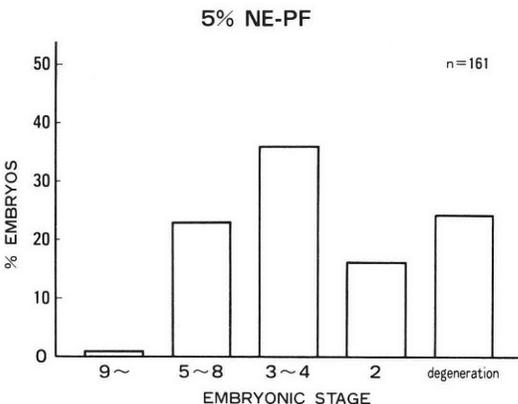


図 2 5% NE-PF 群における卵分割

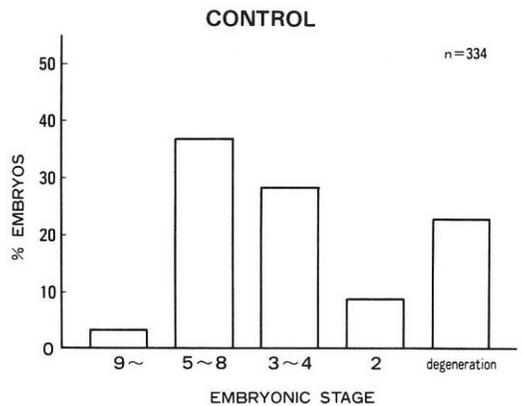


図 3 コントロール群における卵分割

内貯留液中には、ヒト精子の受精能獲得の判定のひとつと考えられているハムスターテストを障害する因子が含まれていることが推定された。さらに、この因子はマウス体外受精をも障害することがわかった。この因子は非働化 (56°C, 30 分) で失活する分子量 10,000 以上のものであることも判明した。今回子宮内膜症における腹腔内貯留液の妊孕性に与える影響を解明する検討の一環として、マウス受精卵の分割に与える影響について実験を行った。

子宮内膜症のある不妊患者の腹腔内貯留液を培養液に添加した群では、コントロール群に比べて培養 24 時間後 5-8 細胞期の卵の出現頻度は低かった。子宮内膜症のない不妊患者から得られた腹腔内貯留液でも同様の結果であった。腹腔内貯留液を 5% 濃度で添加することによる培養液の変化によって卵が障害されたことも考えられたが、変性卵および分割しなかった卵の割合はコントロール群と有意差がなかった。このことより添加した腹腔内貯留液中に卵の分割に影響を与えるなんらかの因子が存在することが推測されたが、これは子宮内膜症の有無とは関連がなかった。Morcos ら¹⁰⁾は非働化した腹腔内貯留液を 5% 濃度になるように添加した培養液でマウス 2 細胞期卵を 72 時間培養し、子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中に分割抑制物質が存在している可能性を示唆した。この検討においても培養開始 24 時間目には卵分割が抑制されており、腹腔内貯留液中の抑制物質の効果は早期より発現することを示している。今回のわれわれの検討においても腹腔内貯留液が抑制的に働く可能性があるという点では同じであったが、子宮内膜症の有無には関係がなかった。よって、この作用が子宮内膜症に特異的なものとは断定しなかった。

子宮内膜症患者における卵管内マクロファージは腹腔内マクロファージと同じであったとの報告⁶⁾より考えれば、腹腔内貯留液は卵管膨大部の遠位側には進入する可能性は高く、受精および受精卵分割の早期には影響を与えることが考えられる。現段階でわれわれのマウスにおける実験結果をヒトについて当てはめることは性急なことではあるが、腹腔内貯留液は受精後の卵の発生に軽度の影響を与えるものの子宮内膜症患者に特異的なことであるとはいえないと考えられた。臨床的にみても井上ら¹¹⁾は子宮内膜症が不妊の原因と考えられる症例に対して、GIFT では 19.6% (9/46) と妊娠率が低かったにもかかわらず、IVF-ETR では 34.5% (10/29) と妊娠率は向上しており子宮内膜症患者における卵管内受精障害の存在を推測している。このことは、われわれの基

礎実験の結果でも精子の受精能獲得や受精前後の段階において腹腔内貯留液は阻害作用を示していることに一致するものであると考えられた。

おわりに

不妊症を主訴とし他に不妊原因の見いだせない子宮内膜症患者の腹腔内貯留液を用いてマウス初期受精卵の分割に与える影響について検討した。腹腔内貯留液を 5% 濃度で添加することにより卵分割は障害された。しかし、これは子宮内膜症の有無とは関係がみられなかった。

文 献

- 1) 五味淵秀人, 国府田きよ子, 武谷雄二, 水野正彦: 子宮内膜症患者腹水のマウス体外受精に与える影響, 日本受精着床学会雑誌, 5: 134, 1988
- 2) 五味淵秀人, 国府田きよ子, 武谷雄二, 水野正彦: 子宮内膜症における腹腔内貯留液の受精に及ぼす影響, 日産婦誌, 40: S-149, 1988
- 3) 五味淵秀人, 郭宗明, 武谷雄二, 水野正彦: 子宮内膜症における腹腔内貯留液中の抗精子抗体について, 日本受精着床学会雑誌, 6: 63, 1989
- 4) Hirschowitz, J. S.: The galactorrhoea-endometriosis syndrome, Lancet. 1: 896, 1978
- 5) 武谷雄二, 林直樹, 水野正彦, 子宮内膜症と黄体機能不全, 産科と婦人科, 54: 1445, 1987
- 6) Haney, A. F., Misukonis, M. A. and Weinberg, J. B.: Macrophages and infertility: oviductal macrophages as potential mediators of infertility, Fertil. Steril. 39: 310, 1983
- 7) Mscato, J. J., Haney, A. F. and Weinberg, J. B.: Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: A possible cause of infertility in endometriosis, Am. J. Obstet. Gynecol. 144: 503, 1982
- 8) Haney, A. F., Mscato, J. J. and Weinberg, J. B.: Peritoneal fluid cell populations in infertility patients, Fertil. Steril. 35: 696, 1981
- 9) Hill, J. A., Faris, H. M. P., Sciff, I. and Anderson, D. J.: Characterization of leucocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis, Fertil. Steril. 50: 216, 1988
- 10) Morcos, R. N., Gibbons, W. E. and Findley, W. E.: Effect of peritoneal fluid on *in vitro* cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis, Fertil. Steril. 44: 678, 1985
- 11) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 淡路英雄, 津田朋男, 松山毅彦, 藤井明和: 体外受精卵卵管内移植の成績, 日本受精着床学会雑誌, 5: 6, 1988

**Effect of peritoneal fluid with
endometriosis on *in vitro*
cleavage of 2-cell
mouse embryos**

Hideto Gomibuchi, Tokai Chitani,
Tsong-Ming Kuo, Yuji Taketani
and Masahiko Mizuno

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

The effect of peritoneal fluid on *in vitro* cleavage of mouse embryos was evaluated. Peritoneal fluid was aspirated at laparoscopy or laparotomy from 15 infertile patients including 10 with endometriosis and 5 without endometrisis.

2-cell embryos were cultured for 24 hours with 5% cell-free supernatant of peritoneal fluid in BWB. For comparison, embryos were cultured in parallel with culture media only.

At 24 hours, cultured embryos were assessed for developmental stage such as, 2-cell, 3-to 4-cell, 5-to 8-cell, morula and degenerating. The highest rate of stage was 3-to 4-cell in both E-PF group (40.7%) and NE-PF (36.0%). But in control group, 5-to 8-cell stage was the highest (36.8%). The embryonic development in the PF groups were significantly delayed than those of in the control group ($p < 0.01$). But there was no statistically different distribution of embryos between E-PF group and NE-PF group. These results suggest the peritoneal fluid from infertile patients contains something to inhibit the development of 2-cell embryos. However the inhibitory activity is not specific to endometriosis.

(受付: 1988 年 12 月 12 日)

CHANGES IN URINARY ARGININE ESTERASE ACTIVITY DURING THE HUMAN MENSTRUAL CYCLE

Yoshifumi MATSUDA^{a)}, Yukio FUJIMOTO^{b)},
Atushi MIYASHITA^{c)} and Sumiyuki AKIHAMA^{a)}

First Department of Biochemistry, Meiji College of Pharmacy^{a)},
Tokyo 154, Japan,
Department of Clinical Biochemistry,
Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences^{b)},
Hokkaido 047-02, Japan and
Department of Urology, Sanraku Hospital^{c)},
Tokyo 101, Japan

Abstract: To investigate the variation in human female urine of the activity of newly found arginine esterase, that is, human urinary arginine esterase (HUAE), we examined of the urine collected on three separate occasions, i, e, postmenses, midcycle and premenses, during the course of the normal menstrual cycle. Midcycle elevation of HUAE activity in woman was found. Day-to-day study on the one cycle showed some elevation of the activity in the premenstrual period, in addition to the midcycle elevation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4), 780—782, 1989)

Introduction

Recently we reported¹⁾ two forms of new arginine esterases which were named human urinary arginine esterase-1 (HUAE-1) and -2 (HUAE-2), in the human urine, and we also illustrated the purification and some properties of HUAE-2²⁾. It has found that the HUAE activity was significantly elevated in the urine of the patients with primary aldosteronism, although the patients with hypertension and chronic nephritis did not show significantly increase in the enzyme activity³⁾. These results suggested that the urinary arginine esterases were aldosterone dependent enzyme.

On the other hand, McPartland et al.⁴⁾ reported that the excretion of the arginine esterase A-1, which exists only in the male rat urine and adsorbs by cation exchangers, was stimulated by administration of testosterone. We are interested

in the menstrual cycle-related changes of HUAE activity in human female.

In the present paper we report on the changes of urinary arginine esterases (HUAE) during the menstrual cycle of human female.

Materials and methods

Human female urine

The study population consisted of the six individual healthy women aged 28 to 45 years, who had regular menstrual cycles of 28 to 32 day duration in the previous two years, and urine was collected on three separate occasions, i, e, postmenses, midcycle and premenses. None of the women was taking any medications, had been pregnant within recent two years, or had any evidence of renal disease. Day-to-day study during the menstrual cycle was based on a careful menstrual history and confirmed by determination of urinary luteinizing hormone (LH) and estradiol.

Separation of human urinary arginine esterases (HUAE)

The separation of human urinary arginine esterases (HUAE) and urinary kallikrein was carried out at room temperature by the method previously reported^{2,3)} which is briefly illustrated below.

An individual human urine sample was dialyzed against tap water overnight. The dialyzed urine, of which conductivity is 1 mS/cm or under, was adjusted to pH 7.5, and then was applied to a DEAE-cellulose column, pre-equilibrated with 0.02 M Tris-HCl buffer at pH 7.5 (buffer A). The column was washed with buffer A and HUAE activity was eluted with buffer A containing 0.15 M NaCl.

Assay of human urinary arginine esterases (HUAE) activity

The HUAE activity was assayed by the modified colorimetric method³⁾ of Moriwaki et al.⁵⁾ with chromotropic acid using N-tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-Me) as substrate, at pH 8.0 30°C. One unit of Tos-Arg-Me esterolytic activity was presented that catalyzes the hydrolysis of 1 n mol of substrate per minute (n mol/min).

Assay of hormones

The luteinizing hormone (LH) and estradiol in the female urine were determined by the method of radioimmunoassays, and were entrusting the assays to the Special Reference Laboratories Inc. (Tokyo, Japan).

Results and discussion

The HUAE activity in the six normal subject is summarized in Table 1. The HUAE activity in midcycle was 1.4 to 2.1 times higher (mean value is 1.7 times higher) than those in postmenses.

The results of a typical day-to-day study are shown in Fig. 1, and Table 2 shows the creatinin factor and LH activity during menstrual cycle. For the day-to-day study, the urine volume was 1.8 l/day, except for the value of 2.2 l/day at 14th day after menses. The creatinine factor was estimated to be 1.13 to 1.18 g/day, except for at the postmenses (0.47 g/day) and at the premenses (3.45 g/day). The big changes of the creatinine

Table 1 Variation of HUAE activity during the menstrual cycle.

Subject number	Age (years)	HUAE activity		
		Postmenses	midcycle (unit/ml)	pre-menses
1	28	0.48	1.01	0.60
2	31	0.64	0.74	0.55
3	36	0.58	0.81	0.55
4	29	0.42	0.68	0.55
5	45	0.76	1.40	1.40
6	43	0.06	1.10	0.84

factor observed at the pre and post menstrual periods might suggest that the renal function is influenced at that those times in one periodic time of menstrual cycle. Mishell *et al.*⁶⁾, and Iizuka and Kobayashi⁷⁾ reported previously the relation among the blood LH, follicle stimulating hormone (FSH) and estradiol activities in the human menstrual cycle, and showed that the peaks of the activities of LH and FSH were found at the time of ovulation. The present results for hormones in the urine were in good agreement with those results. However, the observation of the high urinary LH activity in the premenstrual period, as shown in Table 2, differed from in the case of blood⁶⁻⁷⁾. Two peaks of estradiol activity of human female urine were observed in one menstrual cycle by Brown *et al.*⁸⁾ The present result of estradiol activity in the urine was agreed well with his results⁹⁾. The daily variation of total urinary Tos-Arg-Me esterolytic activity in the one periodic time of human female menstrual cycle was from 1.8 to 3.0 n mol/min/ml of urine, and the total excretion of Tos-Arg-Me esterolytic activity with the ovulation was only 1.2 times higher than that at the time of postmenses. However, as to HUAE excretion, the enzyme activity in one menstrual cycle varied from 0.42 to 1.01 n mol/min/ml of urine, and the excretion of HUAE activity at the periods of the midcycle and the premenses were 2.1 and 1.3 times higher than that at the period of the postmenses, respectively. Furthermore, the esterase activity ratio (HUAE/whole activity) was also markedly elevated at midcycle and somewhat at the time of permenses (Table 2).

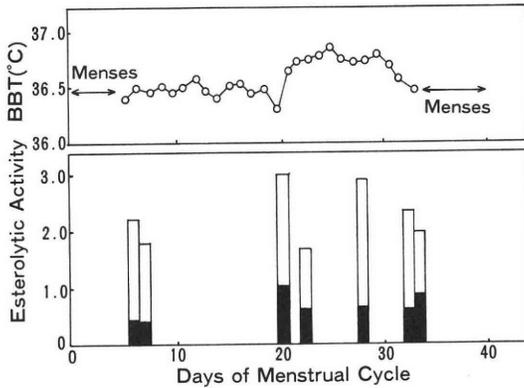


Fig. 1. HUAE and Total Urinary Tos-Arg-Me Esterolytic Activities in One Periodic Time of Human Female Menstrual Cycle. Esterolytic activity of Tos-Arg-Me was expressed as unit/ml. ■, HUAE activity; □, whole activity; ○, BBT (basic body temperature).

These results suggested HUAE is the enzyme under the endocrine control. McPartland et al.⁴⁾ reported the esterase A-1, which is only found in the male urine of rat, is stimulated by testosterone. In addition our recent report³⁾ showed that the urine of the patient with primary aldosteronism exhibited markedly increased HUAE activity. It is assumed that the HUAE have some relations not only to renal function but also with sexual function, through the hormonal control.

References

- 1) Matsuda, Y., Akihama, S., Fujimoto, Y., Moriya, H. and Miyashita, A.: Studies on human urinary arginine esterase, *Yakugaku-Zasshi*, 103: 198, 1983
- 2) Matsuda, Y., Fujimoto, Y., Akihama, S. and Miyashita, A.: Studies on acidic arginine esterase excreted in urine. 2. Purification and some properties of human urinary arginine esterase-2, *Chem. Pharm. Bull.* 34: 235, 1986
- 3) Matsuda, Y., Miyashita, A., Akihama, S. and Fujimoto, Y.: Arginine esterase activity in the patient with hypertension, chronic nephritis and primary aldosteronism, *Jap. J. Clin. Chem.* 15: 105, 1986
- 4) McPartland, P. P., Sustarsic, D. L. and Rapp, J. P.: Evidence for an androgen-dependent urinary arginine esterase in the rat: Separation from other urinary arginine esterase including kallikrein, *Endocrinol.* 108: 1634, 1981

Table 2 Arginine Esterase and Hormonal Excretion in Urine during a Menstrual Cycle.

Days of menstrual cycle	Esterase activity ratio (HUAE/whole activity)	Creatinine factor (g/day)	Hormonal excretion in urine	
			LH ^{a)} (mIU/ml)	E ₂ ^{b)} (μg/ml)
5	0.19	0.47	9.6	7.2
20	0.33	1.13	41	16.3
22	0.41	1.18	18	18.3
27	0.17	1.14	13	17.5
33	0.28	3.45	64	27.0

a) LH : Luteinizing hormone.

b) E₂ : Estradiol.

- 5) Moriwaki, C., Hojima, Y. and Moriya, H.: A proposal-Use of combined assay of kallikrein activity measurement, *Chem. Pharm. Bull.* 22: 975, 1974
- 6) Mishell, B. R., Makamura, R. M., Crosignani, P. G., Stoon, S., Kharama, K., Nagata, Y. and Thorneycroft, I. H.: Serum gonadotropin and steroid patterns during the normal menstrual cycle, *Am. J. Obst.* 111: 60, 1974
- 7) Iizuka, R. and Kobayashi, T.: Female infertility and endocrinology, in *endocrinology*, eds by Yoshire F. et al., p 788, Nanzandou, Tokyo, Japan: 1978
- 8) Brown, J. B.: Cited from *Reproductive and gynecologic endocrinology*: ed by M. Igarashi, p 123, Nanzandou, Tokyo, 1981

尿中アルギニンエステラーゼと女性性周期との関連について

明治薬科大学^{a)}, 北海道薬科大学^{b)}, 三楽病院^{c)}

松田兆史^{a)} 藤本幸男^{b)}

宮下 厚^{c)} 秋浜修行^{a)}

ヒト雌尿中の酸性アルギニンエステラーゼ活性と性周期との関連性について検討を行なった。28歳から45歳の健康な女性6例について、尿を月経直後期、排卵期および月経直前期の3期に分けて採取した。その結果、尿中の酸性アルギニンエステラーゼ活性は排卵期に最も高い活性が認められた。また1例について日差変動(day-to-day study)を検討したところ、同様に排卵日に最も高いアルギニンエステラーゼ活性が認められた。この結果本酵素はホルモン支配を受けている可能性が示唆された。

(受付: 1988年12月3日)

緒 言

GnRH の律動性 (pulsatile) 分泌のもつ生殖生理学的意義が解明されて以来¹⁾, この視床下部ホルモンの律動投与による排卵誘発法の有効性はすでに視床下部性無排卵症 (hypothalamic anovulation; HA) に対して確立された感がある³⁾⁴⁾¹²⁾¹⁶⁾¹⁹⁾. しかしながら多嚢胞性卵巣 (polycystic ovarian disease; PCO) に対する本法の有効性については諸家の報告にみる如く一定の見解は得られておらず, はなはだ controversial な状況と言える¹⁾⁷⁾⁸⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾.

そこで今回, 我々は HA 群と PCO 群における GnRH 律動投与中の内分泌環境を詳細に比較検討し, 興味ある知見を得たので報告する.

対象と方法

HA 群として年齢 18~32 歳の婦人 11 名を対象とした. 内訳は体重減少性無月経 3 名, 視床下部性無月経 6 名, 無排卵性稀発月経 2 名であった. PCO 群は年齢 21~34 歳の 8 名で, 全例に多毛, 肥満の傾向を認め, 超音波断層法で両側卵巣に polycystic なエコー像がみられた. このうち無月経は 3 名, 無排卵性の稀発月経 5 名であり, 過去に clomid (150 mg 5 日間) 3 周期以上投与するも排卵しなかった例を対象とした. 両群の治療前の血中ホルモン値及び GnRH の投与量, LH surge と排卵の有無を表 1 に示した. 両群の criteria についてはすでに報告³⁾した通りで, HA 群では LH, FSH の基礎値及び GnRH テストの反応が正~低, PCO 群では LH/FSH 比 > 3.0 で

表 1 HA 群と PCO 群の治療前の血中ホルモン値, GnRH 投与量, LH surge 及び排卵の有無

Subject	Pretreatment levels				GnRH dose (μ g/pulse)	Day of LH surge	Levels at LH surge			Ovulation
	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	E ₂ (pg/ml)	L ₄ -A (ng/ml)			LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	E ₂ (pg/ml)	
HA group (n=11)										
N.M.	10	6	75	0.8	5	5	170	23	1361	+
M.M.	25	11	68	1.2	5	6	160	35	1066	+
H.N.	17	10	56	1.0	5	9	94	16	620	+
Y.F.	5	3	23	0.6	10	10	170	23	340	+
Ch.I.	13	9	40	1.3	5	10	73	10	405	+
K.S.	8	9	11	0.9	5	12	50	17	359	+
Ch.M.	24	10	28	1.7	5	11	75	22	463	+
K.K.	25	12	15	1.2	5	6	140	26	1121	+
M.S.	11	12	65	1.5	5	7	42	11	457	+
E.O.	18	12	70	1.4	5	9	130	15	520	+
Y.I.	16	18	34	1.8	5	8	45	17	605	+
Mean	15.6	10.1	44.1	1.2		8.5	104.5	19.5	665.2	
\pm SE	\pm 2.1	\pm 1.1	\pm 7.1	\pm 0.1		\pm 0.7	\pm 15.3	\pm 2.2	\pm 105.7	
PCO group (n=8)										
H.H.	54	12	66	5.7	20	11	80	12	391	+
S.M.	53	13	124	2.9	5	8	80	8	683	+
M.K.	61	14	107	3.9	7.5	8	180	8	544	+
S.I.	36	11	107	4.2	7.5	10	92	12	411	+
Y.M.	62	17	65	3.9	5					-
N.F.	46	13	58	5.3	5					-
S.S.	48	10	94	4.9	5					-
A.S.	39	12	72	2.8	5					-
Mean	49.9**	12.8	86.6*	4.2		9.3	108.0	10.0**	507.3	
\pm SE	\pm 3.4	\pm 0.8	\pm 8.7	\pm 0.4**		\pm 0.8	\pm 24.2	\pm 1.2	\pm 67.7	

*P<0.05, **<0.001 vs. HA group

GnRH テストで LH の過剰反応 (>200 mIU/ml), 血中 androstenedione の高値を示すものとした。また両群とも血中 prolactin (PRL) 値 25 ng/ml 以下の正 PRL 血性の者に限った。GnRH は携帯用自動輸液ポンプ (Zyklomat) を用い 90 分間隔で 5~20 μ g を静脈カテーテルを通して律動投与した。治療効果の判定は 2~3 週間投与してもエコー像で卵胞の発育傾向がみられず、尿中エストロゲンの増加しない場合を無効とした。

血中 LH, FSH, PRL, estradiol (E_2), progesterone (P) は第一ラジオアイソトープ社の RIA kit を用いて行った。血中 androstenedione (Δ^4 -A) は Wien Laboratories (USA) の RIA kit にて測定した。各 assay 系の intraassay CV は 5~10%, interassay CV は 8~13% であった。排卵の確認は血中 P > 5 ng/ml, エコー像で卵胞の消失をもって判定した。有意差の検定は Student's *t* test を用いた。

結 果

前述したように HA 群と PCO 群のホルモンの特徴は表 1 の如くであり、後者の LH, E_2 , Δ^4 -A 値は前者と比べ有意に高値であった。HA 群では平均 8.5 ± 0.7 (mean \pm SE) 日後に 11 例に LH surge が起こり排卵したが、PCO 群では 8 例中 4 例が 9.3 ± 0.8 日後に LH surge を起こし排卵したのみであり、排卵率は 50% であった。挙児希望の HA 群 7 例中 3 例 (H. N., K. K., M. S.) と PCO 群 6 例中 1 例 (H. H.) が単胎妊娠した。LH surge 時の LH のピーク値及び E_2 値は両群間で差がなかったが、FSH 値は PCO 群で有意に低かった。すなわち PCO 群で排卵する例では LH surge 時に FSH surge を伴わない傾向にあると

言える。

図 1 に本法にて排卵した HA 群と PCO 群各 1 例の典型的なホルモンパターンを示す。HA 患者ではほぼ正常周期にみられるのと同様な LH, FSH の分泌パターンと LH surge の発現がみられた。PCO 患者では律動投与開始直後より急激な LH の上昇が 2~3 日続き、その後漸減した後再び LH surge で上昇するという非生理的パターンを示した。ここで重要なことは、両群において LH のパターンは異なっているものの、FSH は投与開始初期にほぼ同程度の一過性増加を示す点である。血中 E_2 は投与初期と排卵期に急増する 2 峰性のパターンが PCO 例でみられた。なお PCO 例では排卵後は GnRH 投与を中止し、hCG によって黄体機能を維持した。図 2 は排卵誘発に成功した PCO 2 例を示す。左の症例 (M. K.) は前症例と同じく初期の LH の急増と LH surge という 2 峰性パターンを示した。右の症例 (S. M.) では明確な LH surge を示さず、day 8 でわずかに LH 80 mIU/ml と上昇した後、低下したが、その後の P の上昇と卵胞の消失から排卵の起こったことが推定された。血中 PRL は左の症例のように投与中に上昇する例があり、LH surge と一致した PRL surge がみられた。 Δ^4 -A は 2 例とも投与期間中、高値を維持し、わずかに E_2 の増減と平行する傾向があった。図 3 は PCO 患者 M. K. の GnRH 投与前と投与中 (day 7) の LH, PRL のパルスを示す。パルスの criteria は以前報告⁶⁾したように前値に対して 2 CV 以上増加した場合とした。投与前には 4 時間中 LH パルス 6 回と高頻度であり、PRL パルスは 1 回出現した。律動投与中は 90 分間隔の GnRH パルスと完全に同調した LH パルスがみられ、これに PRL パルスが付随して発生していた。すなわち本症例の LH pulse interval は律動投与によって 90 分間隔に是正されてはいるが

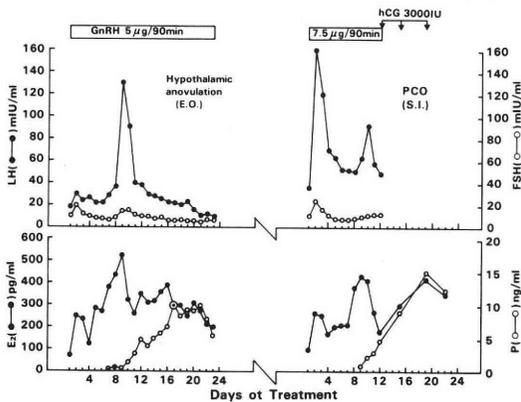


図 1 GnRH 律動投与にて排卵した HA 患者と PCO 患者の典型的なホルモンパターン。この PCO 患者では hCG で黄体機能を維持している

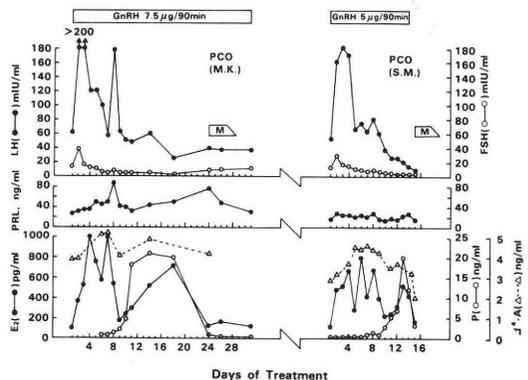


図 2 GnRH 律動投与にて排卵した PCO 2 例のホルモン動態

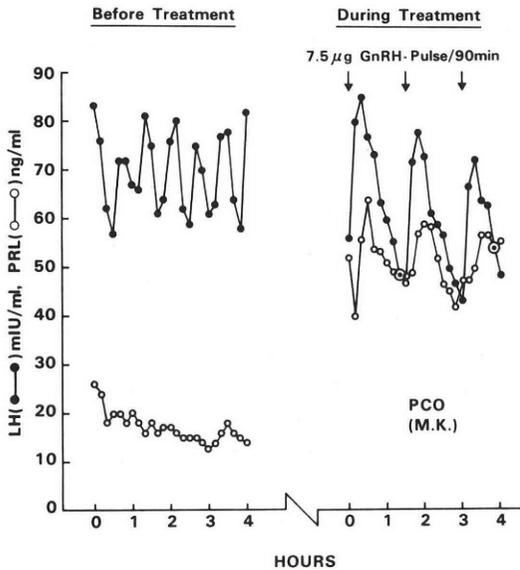


図3 PCO患者M. K.のGnRH律動投与前と投与中(day 7)のLH, PRLパルス

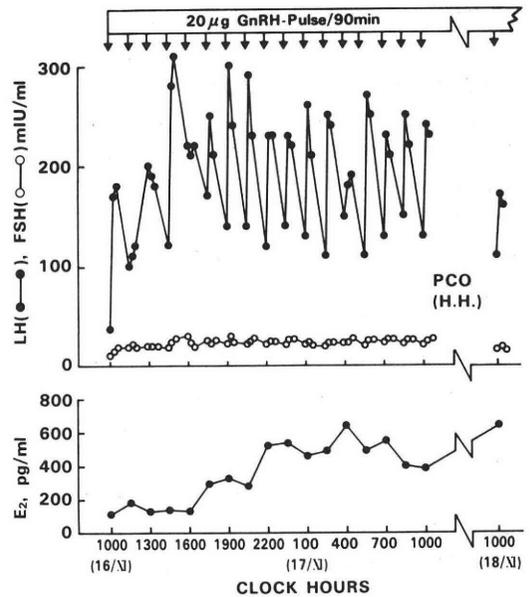


図4 排卵誘発, 妊娠に成功したPCO患者のGnRH律動投与開始後24時間のホルモン動態

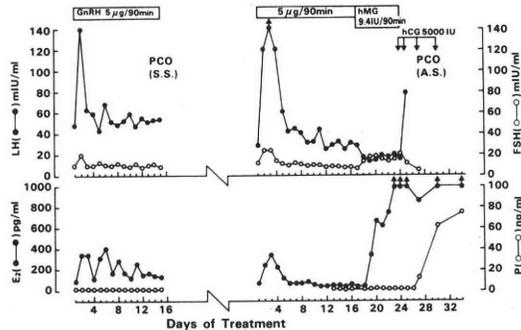


図5 GnRH律動投与にて排卵しなかったPCO 2例のホルモン動態. 患者A. S.はday17よりhMG律動投与に変更し排卵, 妊娠した

pulse amplitude はかえって増大する結果, LH レベルは高値のままであり, 従って LH/FSH 比は低下しなかった.

図4のPCO患者は排卵誘発, 妊娠に成功した例であるが, 投与開始直後より24時間にわたりGnRHの各パルスに対するLH, FSHの反応を追ってみた. 本例では20 µg/pulseで投与しているがこれは至適投与量を模索している段階での症例のため特別な理由はない. 24時間中GnRHパルス17回に対しLHは15回パルスを形成した. FSHも小さいamplitudeながらパルス状に分泌され, 徐々に血中レベルが上昇した. E₂は投与開始6時間後より増加し始めた. このように投与初期では下垂体のGnRHパルスに対する反応性はPCO特有の著明な亢進を呈しており,

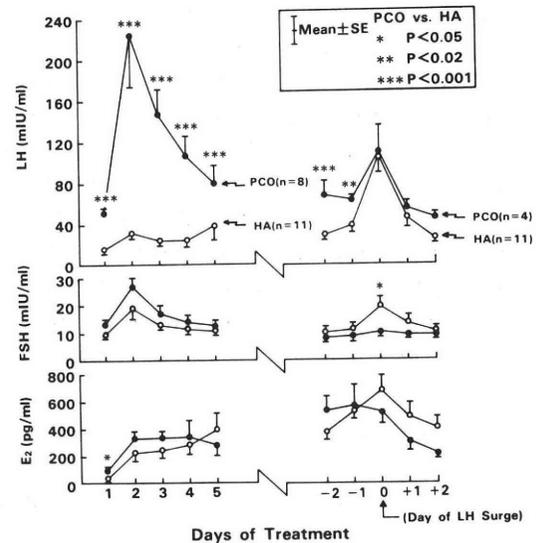


図6 HA群とPCO群のGnRH律動投与初期とLH surge期におけるホルモン動態の比較

このためLHの非生理的なinitial riseが起こるわけである. 図5は本法により排卵しなかったPCO 2例を示す. 2例でも投与初期のホルモン・パターンは成功例と比べ大きな違いはなかったが, E₂の増加は一過性に終わった. 右の症例(A.S.)では17日目からGnRH投与を中止しhMG 9.4 IU/90 minの律動的静注を開始したところ, 以前報告⁵⁾したような持続的なFSHの上昇とLHの低下がみられ, これに伴ない

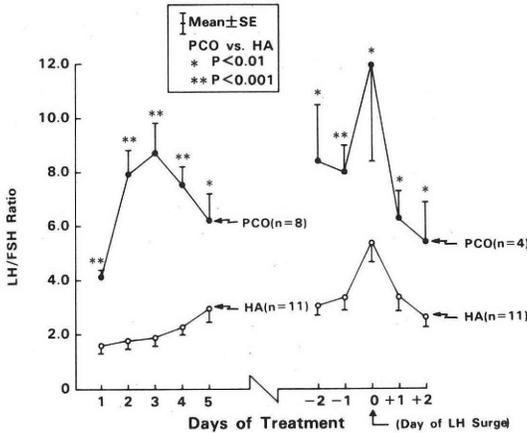


図7 HA群とPCO群のGnRH律動投与初期とLH surge期におけるLH/FSH比の比較

E₂は急増した、hCGの投与で排卵し、単胎妊娠した。興味ある点はこの症例の初期のFSHの増加と後半のhMG投与中のFSHの増加とがそれぞれE₂の上昇とよく平行していたが、LH/FSH比が高く、かつFSH上昇が短期間に終わった前者では持続的な卵胞発育を促し得なかったことである。

次にHA群とPCO群の投与開始初期と排卵期(PCO群では4例排卵)を中心とした各ホルモンの変動をまとめてみた(図6)。今まで述べてきたようにPCO群のLHレベルは排卵期までHA群より有意に高いが、LH surgeの大きさは両群で差はなかった。FSHは両群とも投与初期に同程度の上昇がみられ、有意差はなかった。HA群ではLH surgeに一致したFSHの上昇があったが、PCO群ではこれが欠如していた。排卵期のE₂のピークは両群間で有意差はなかった。一方、LH/FSH比についてみると(図7)、HA群では投与初期4日間のLH/FSH比は1.6~2.5と生理的範囲にあるのに対し、PCO群では4.1~8.7と上昇していた。LH surgeを中心とした比較でもPCO群ではこの比が有意に亢進していた。

考 察

GnRHの律動的投与による排卵誘発法がLeyendecker et al¹²⁾により最初に報告されて以来、多くの施設で追試され、視床下部性の無排卵症に対して高い排卵、妊娠率が報告されている^{3,4,16,19)}。しかしながらPCOに対しては有効^{8,13)}、約半数に有効^{7,15)}、無効^{1,10,14)}など報告されている成績はまちまちである。今回、我々は8名のPCO患者を対象として検討した結果、4名(50%)排卵し、1名が妊娠した。対照としたHA群の100%排卵、3名妊娠と比べるとそ

の有効性は明らかに低かった。また投与中のホルモン動態もHA群とは異なり、非生理的パターンを示した。

そもそもPCOに対してGnRHの律動投与を試みようとする動きは、本症が高いLH/FSH比を示し、視床下部一下垂体系のhyperfunctionを有するという概念から生じている。この概念は最近Crowley et al¹⁷⁾のグループにより実証され、LHのパルス頻度は約60分に1回であり、正常婦人の卵胞期初期の90分と比べて亢進していることが明らかとなった。この亢進したLHパルスはGnRHパルス頻度の亢進を反映したものであり⁹⁾、Knobil¹¹⁾の提唱するようにLH/FSH比を上昇させることになり、ひいては卵胞発育を阻害する¹⁸⁾。従って、卵胞期初期のような90~120分間隔のGnRH律動投与を行えばLH/FSH比の低下ならびに卵胞成熟を促し得るのではないかという発想に結び付いている。しかしながら我々のデータではLHパルスは確かにGnRHパルスと同調し90分間隔となったが、パルス振幅はむしろ増大し(図3)、結果としてLHレベルは低下せず、LH/FSH比も是正されなかった。また、排卵誘発に成功した例でも本症に特有な高androgen血症は改善されないまま排卵した。投与中に一過性の高PRL血症を呈する例もみられ、このような症例ではLHパルスとsynchronizeしたPRLパルス^{2,6)}が観察された。

律動投与の間隔を60分から120分へ延長してもLH/FSH比は低下しなかったという報告はこれまでにいくつかみられている¹⁷⁾⁸⁾¹⁵⁾。Burger et al⁹⁾はPCOに対して80%以上の排卵率を得ているが、誘発時のホルモン動態は投与量(5~40 μg/pulse)、投与間隔(60~120分)に関わらずPCO特有の非生理的なものであったとしている。黒田¹¹⁾も6例のPCOにおいて90分から120分へ投与間隔を延長したが、LH/FSH比は低下せず、全例排卵しなかったと述べている。興味ある報告として、Hurwitz et al¹⁰⁾は投与間隔を180~240分と大幅に延長し、LH/FSH比を正常化させることに成功したが、排卵したのは4例12周期中2周期のみであった。我々は以前、GnRHの投与間隔を45~180分の間で種々に変化させてLH、FSHレベルへの影響を検討したことがあるが⁴⁾、LHは確かに投与間隔の延長で低下したが、FSHは投与間隔よりもE₂の増減により鋭敏で、E₂が増加し始めると速やかに低下した。従って内因性E₂の存在下では、Knobil¹¹⁾が去勢サルで証明したような持続的なFSHの上昇は起こり得ないと考えられ、この点が投与間隔を延長しても不成功に終わっている大きな原因と著者らは考えている。

このようにみてくると、PCO における律動投与法の意義ははなはだ薄弱なようであるが、それでも今回、半数の患者が排卵した。排卵した例とそうでない例で投与初期のホルモン動態に明らかな違いは認められなかった。排卵機序として、我々は投与初期の一過性のFSH上昇を非常に重視している。PCOに特有なandrogen含有の高い、いわゆる不健康な小卵胞は相対的なFSH不足¹⁸⁾によるものである。従ってLH/FSH比の非生理的亢進下にあっても、この初期のFSH上昇により卵胞発育機転がある程度まで進行し得る例が排卵に至るのではないかと考えている。この点からすると、本法は内因性FSHの補充療法的一面においてある程度PCOに有効と言えるかもしれない。排卵しなかった例にFSHの持続的高値を現出させる目的でhMGの律動投与⁵⁾を行うと、速やかな卵胞発育がみられた(図5)ことからこの事実が裏付けられる。要するに、本法がPCOにあまり有効でない理由はLH/FSH比の是正が得られないことその他に、low E₂ phaseでみられるFSHの増加がPCO患者の卵胞発育にとって不十分なことが多いことも大きな要因と考える。

本論文の要旨は第39回日本産婦人科学会総会(1987, 東京)で発表した。

文 献

- 1) 黒田譲治: 多嚢胞性卵巣 (polycystic ovarian disease: PCO) に対するGnRH律動投与ならびにhMG連続投与による排卵誘発, 日内分泌会誌, 63: 247, 1987
- 2) 黒田譲治, 富岡尚徳, 杉並洋, 松岡俊平: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 律動投与による排卵誘発時の一過性高プロラクチン血症について, 日産婦誌, 39: 785, 1987
- 3) 正岡 薫, 熊坂高弘: LHRH の Pulsatile な投与による排卵誘発, 日産婦誌, 36: 937, 1984
- 4) 正岡 薫, 北沢正文, 熊坂高弘: GnRH の律動的投与による排卵誘発—投与間隔と投与量についての検討—, 産婦の世界, 37: 1105, 1985
- 5) 正岡 薫, 北沢正文, 新部哲雄, 熊坂高弘: hMG の律動的および持続的投与による排卵誘発の内分泌的検討, 日産婦誌, 38: 73, 1986
- 6) 正岡 薫, 北沢正文, 新部哲雄, 熊坂高弘: 月経周期におけるプロラクチンのパルス状分泌とその調節因子, ホと臨床, 34: 185, 1986
- 7) Bringer, J., Cristol, P., Hedon, B., Orsetti, A., Jaffiol, C., Viala, J., Nicolau, S., Mirouze, J. and Gibert, F: Influence of the frequency of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) administration on ovulatory responses in women with anovulation, Fertil. Steril. 44: 42, 1985

- 8) Burger, C. W., Korsen, T. J., Hompes, P. G. A., Kessel, H. V. and Schoemaker, J.: Ovulation induction with pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary-like disease: clinical results, Fertil. Steril. 46: 1045, 1986
- 9) Clarke, I. J., and Cummins, J. T.: The temporal relationship between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) in ovariectomized ewes, Endocrinology, 111: 1737, 1982
- 10) Hurwitz, A., Rosenn, B. Palti, Z. Ebstein, B. Har-Nir, R. and Ron, M.: The hormonal response of patients with polycystic ovarian disease to subcutaneous low frequency pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone, Fertil. Steril. 46: 378, 1986.
- 11) Knobil, E.: The neuroendocrine control of the menstrual cycle, Recent Prog. Horm. Res. 36: 53, 1980
- 12) Leyendecker, G., Wildt, L., and Hansmann, M.: Pregnancies following chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH by means of a portable pump (Zyklomat) -A new approach to the treatment of infertility in hypothalamic amenorrhea, J. Clin. Endocrinol. Metab. 51: 1214, 1980
- 13) Ory, S. J., London, S. N., Tyrey, L. and Hammond, C. B.: Ovulation induction with pulsatile gonadotropin-releasing hormone administration in patients with polycystic ovarian syndrome, Fertil. Steril. 43: 20, 1985
- 14) Phansey, S. A., Toffle, R., Curtin, J., Nagel, T. C., Tagatz, G. E., Barnes, M. A. and Nair, R.: Alternative indications for pulsatile gonadotropin-releasing hormone therapy in infertile women, Fertil. Steril. 44: 589, 1985
- 15) Saffan, D. and Seibel, M. M.: Ovulation induction with subcutaneous pulsatile gonadotropin-releasing hormone in various ovulatory disorders, Fertil. Steril. 45: 475, 1986
- 16) Santoro, N., Wierman, M. E., Filicori, M., Waldstreicher, J. and Crowley, W. F. Jr.: Intravenous administration of pulsatile gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic amenorrhea: Effects of dosage, J. Clin. Endocrinol. Metab. 62: 109, 1986
- 17) Waldstreicher, J., Santoro, N., Hall, J. E., Filicori, M. and Crowley, W. F. Jr.: Hyperfunction of hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: Indirect evidence for partial gonadotroph desensitization, J. Clin. Endocrinol. Metab. 66: 165, 1988
- 18) Yen, S. S. C.: The polycystic ovary syndrome, Clin. Endocrinol. 12: 177, 1980
- 19) Zacur, H. A.: Ovulation induction with

gonadotropin-releasing hormone, Fertil. Steril.
44: 435, 1985

**Ovulation induction with pulsatile
gonadotropin-releasing
hormone (GnRH)
administration in patients
with polycystic ovarian disease
and hypothalamic anovulation.**

Kaoru Masaoka, Masafumi Kitazawa,
Hideya Watanabe and Takahiro Kumasaka

Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan

This study was designed to evaluate the hormonal dynamics in patients with polycystic ovarian disease (PCO) during pulsatile administration of

gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and to compare the ovulation-inducing efficacy of this treatment with that in patients with hypothalamic anovulation (HA). Eleven patients with HA and eight patients with PCO received 5 to 20 μ g of GnRH intravenously every 90 min, using a portable auto-infusion pump. Endocrine assessment for daily measurements of serum hormones levels and frequent pelvic ultrasound examinations were performed. All of eleven patients with HA ovulated and three of them became pregnant. Among the eight PCO patients, ovulation occurred in four women and pregnancy was achieved in one woman. In the PCO group, an abnormal initial rise of LH and a sustained elevation of LH/FSH ratio with high androgen levels were observed during the treatment. These results indicate that pulsatile GnRH administration seems substantially less effective in PCO patients than in HA patients, because this treatment cannot correct the hormonal abnormalities, such as elevated LH levels and LH/FSH ratios that are inherent in PCO.

(受付: 1988 年 12 月 20 日)

DIRECT ACTION OF
BROMOCRIPTINE ON THE PRODUCTION
OF PROGESTERONE AND
ESTRADIOL-17 β BY THE HUMAN
CORPUS LUTEUM

Toshiaki ENDO, Masahiro MIZUNUMA, Hiroshi HATA,
Shoichi TANAKA and Masayoshi HASHIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Sapporo Medical College, Sapporo 060, Japan

Zhan Dong WANG

Department of Obstetrics and Gynecology,
Norman Bethune University of Medical Sciences, Chongchun, China

Abstract: To confirm the usefulness of bromocriptine (Br) in cases of inadequate luteal phase with normoprolactinemia, monolayer cell cultures of human corpora lutea of menstrual cycle were created and experiments with Br added to the culture medium were carried out. Progesterone (P) was increased significantly by 1 and 10ng/ml of Br. The effects of Br were stronger at a dose of 1ng/ml on the corpus luteum in a low P production group than in a high p production group.

The production of estradiol-17 β was not significantly different after the addition of Br. These results indicate that Br increased P production by direct stimulation of the corpus luteum, and that the administration of Br is useful in the treatment of an inadequate luteal phase.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 790—794, 1989)

Introduction

An inadequate luteal phase (ILP), in which progesterone (P) levels are low, is one cause of infertility in woman¹⁾.

Treatment of ILP includes administration of progesterone suppositories to supplement P in the blood²⁾, the administration of hCG in the luteal phase to activate the corpus luteum³⁾ and the administration of clomiphene citrate in cases of inadequate ovarian follicular development⁴⁾. In recent years, bromocriptone (Br) has been used

effectively to treat ILP due to hyperprolactinemia and transient hyperprolactinemia^{5,6,7)}. The main mechanism of action of Br appears to be central. However, since Br also is clinically effective in some cases of ILP with normoprolactinemia, we have found that the rise in plasma P levels by Br administration is not necessarily regulated only via prolactin (PRL). Therefore, in the present study, we performed experiments using monolayer cultures of luteal cells to determine whether or not Br has a direct effect on the corpus luteum.

Materials and Methods

Subjects

Corpora lutea were collected from 12 women aged from 33 to 44 with a normal menstrual cycle, who had undergone total hysterectomies for indications other than ovarian diseases, such as uterine fibroma or uterine intraepithelial cancer. These corpora lutea were collected during the mid-luteal phase, when it was easy to obtain the luteal cells. The stage of the cycle was determined on the basis of endometrial histology, menstrual history and basal body temperature.

Chemicals

following chemicals were used in the experiments: Eagle's MEM (Nissui, Tokyo, Japan), penicillin-streptomycin (GIBCO, New York, U. S. A.), fetal calf serum (FCS) (GIBCO, New York, U. S. A.), HEPES (Sigma, ST. Louis, U. S. A.), type 1 dispase (Godo Shusei, Tokyo, Japan) and type 1 collagenase (Sigma, ST. Louis, U. S. A.). hCG were supplied by Teikoku Hormone MFG (Tokyo, Japan) and bromocriptine (Br) by Sandoz Pharmaceutical (Basel, Switzerland).

Culture medium

The culture medium was Eagle's MEM with $100\mu\text{g/ml}$ of penicillin, $100\mu\text{g/ml}$ of streptomycin and FCS at a concentration of 20% added. The pH of the medium was adjusted to 7.2 to 7.4 by NaHCO_3 and NaOH in combination. The concentration of FCS was based on the report of Higuchi et al.⁸⁾ The amount of P and E in the culture medium was 40pg/ml or less, and 50pg/ml or less, respectively.

Culture procedure

Corpora lutes were collected aseptically and were minced into pieces about 1mm^3 or smaller in the culture medium. They were incubated in culture medium containing $1,000\text{PU/ml}$ of dispase and 200IU/ml of collagenase at 37°C for 40 min. Thereafter, the mixture was filtered through a double layer of gauze to remove the pieces of tissue. The filtered cell suspension was centrifuged at 600 rpm for 3 min and after removal of the supernatant, the culture medium was again added to the cell pellet by pipetting. The above procedure was repeated 3 to 5 times to

remove any red blood cells. The cell suspension, adjusted to 1×10^5 cells/ml, was transferred into 35 mm culture dishes (Corning, Tokyo, Japan), 1.5 ml in each dish. The culture conditions were 5% CO_2 , 95% air 37°C ⁹⁾.

The culture medium was replaced completely 24h after the start to the culture when the cultured luteal cells adhered to the dish. Thereafter, control cells with no drug added and cells with different concentrations of Br suspended in methanol added were incubated for following 24h. The concentration of methanol in the culture medium at that time was 0.01% or less. Because of differences in the amount of hormone production by different corpora lutea, comparisons with the control were performed among cells obtained from the same corpus luteum at each drug concentration in the subsequent experiments.

Measurement of P and E_2

Measurement of P and E_2 in the culture medium was performed using an RIA kit manufactured by Daiichi Radioisotope Laboratory (Tokyo, Japan) using the same procedures as used for plasma determination. The coefficients of variation for P and E_2 were 5.8% and 8.2%, respectively in intraassay and 7.2% and 12.6%, respectively in interassay studies.

Statistical evaluation of data

Results are expressed as the mean \pm SE. The data were analysed statistically by paired comparison Student's t test: P values greater than 0.05 were not considered significant.

Results

Concentrations of P and E_2 secreted in the culture medium and the effects of the addition of hCG

The concentrations of P and E_2 secreted in the culture medium were 204.1 ± 63.3 and $2.97 \pm 1.25\text{ng/ml}/1 \times 10^5$ cells/day, respectively (Table 1). When 10U/ml of hCG was added, P production

Table 1 Progesterone, estradiol- 17β production by human cultured luteal cells

n	progesterone	estradiol- 17β
12	204.1 ± 63.3	2.97 ± 1.25

(ng/ml/ 1×10^5 cells/day)

All values represent the mean \pm SE.

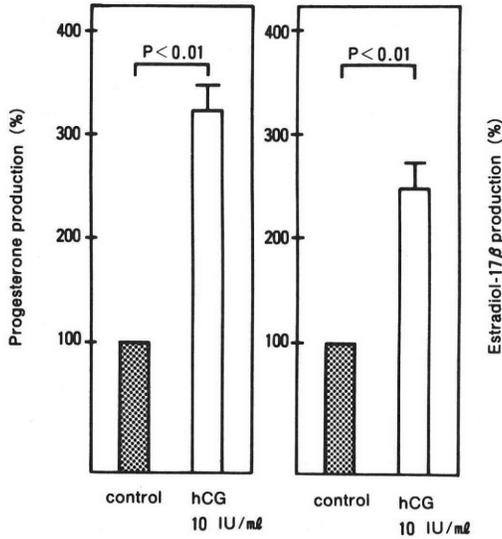


Fig. 1 Effect of hCG on progesterone, estradiol-17β production by human cultured luteal cells. All values represent the mean ± SE.

Table 2 Comparison effects of bromocriptine on progesterone production by amount of progesterone produced by cultured human luteal cells

group	n	progesterone production (ng/ml/1 × 10 ⁵ cells/day)	effect of bromocriptine (1.0ng/ml) on progesterone production(% of control)
A	7	64.4 ± 15.2	139.8 ± 14.6*
B	5	448.4 ± 68.4	105.7 ± 7.2*

1. All values represent mean ± SE.
2. The amount of progesterone produced by cultured human menstrual luteal cells was divided into group A with 200ng/ml/1 × 10⁵ cells/day or less and group B with higher values, and the effect of bromocriptine on progesterone production were compared by group.
3. *;The stimulatory action of bromocriptine on progesterone production was stronger in group A than in group B (p=0.05)

increased by 325.4 ± 10.0% compared to when no drug was added (p < 0.01), while E₂ production increased to 230.5 ± 12.3% of the control (p < 0.01) (Fig. 1).

Changes in P and E₂ production by Br addition

When P and E₂ production without the addition of Br was taken as the control, the production of

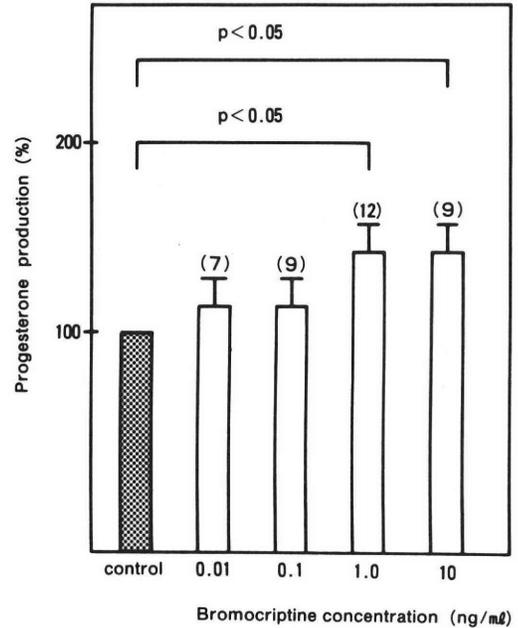


Fig. 2 Effect of bromocriptine on progesterone production by human cultured luteal cells. Numbers in parentheses indicate the number of experiments.

P when 0.01 and 0.1ng/ml of Br were added was 112.0 ± 10.2% and 115.4 ± 10.6% of control, respectively, and the difference was not significant. When 1.0 and 10ng/ml of Br was added, P production increased significantly to 128.4 ± 10.2% and 127.2 ± 8.4% of the controls (p > 0.05) (Fig. 2).

When the 1.0ng/ml Br added group was divided into those with P production of more than 200ng/ml/1 × 10⁵ cells/day (P = 448.4 ± 68.4ng/ml/1 × 10⁵ cells/day) and those with less (P = 64.4 ± 15.2ng/ml/1 × 10⁵ cells/day), there were increased of 105.7 ± 7.2% in high P production group and 139.8 ± 14.6% in low P production group of the controls, respectively. The low P production group showed a significantly higher increase in P production by the addition of Br (p > 0.05) (Table 2).

E₂ production was 115.0 ± 7.0, 95.2 ± 4.0, 107.6 ± 9.5 and 102.1 ± 5.2% of control when 0.01, 0.1, 1.0 and 10ng/ml of Br, respectively, was added; these differences were not significant (Fig. 3).

Discussion

In a series of *in vitro* experiments on human

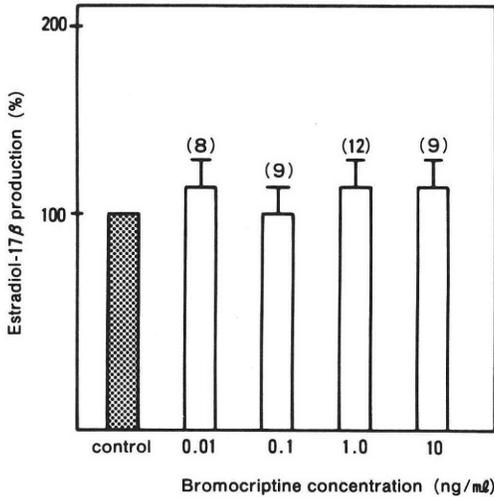


Fig. 3 Effect of bromocriptine on estradiol-17 β production by human cultured luteal cells. Numbers in parenthesis indicate the number of experiments.

luteal function, we used a monolayer cell culture of human corpora lutea to assure strict uniformity among the specimens with respect to the total cell count and the viable cell rate and to observe the long-term effects of the addition of chemicals.

The cultured luteal cells produced P and E, and the addition of hCG significantly increased P and E.

From these results our experimental system is considered to maintain luteal function.

Luteal phase defect has been reported in 3.5% of cases of infertility and in 35% of early abortions¹⁰. In recent years, Br has been administered therapeutically. The indications have been expanded to include not only hyperprolactinemia, but also nocturnal hyperprolactinemia and transient hyperprolactinemia^{5,6,11}. Br also is administered in cases of ILP with normoprolactinemia¹². Therefore, we studied the usefulness of Br in patients with ILP with normoprolactinemia. With respect to the mechanism of action of Br in the case of an ovulatory disorder with normoprolactinemia, Seppala et al.¹³ suggested that direct action of Br on the ovaries, stimulation of gonadotropin secretion in the hypophysis, stimulation of LH-RH secretion in the hypothalamus, and inhibition of PRL secretion might be involved.

Tolis et al.¹¹ reported the recovery of rhythmic LH secretion by Br as a central action. Tamura et al.¹⁴ and Mori et al.¹⁵ reported that Br improved the positive feedback of estrogen. However, Del Pozo et al. found that Br increased the direct effect of steroidogenesis in the ovaries. Although there have been various reports on the mechanism of action of Br on the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis in cases of normoprolactinemia, it is not yet completely understood.

We used a monolayer cell culture of human corpora lutea to investigate the direct action of Br on steroidogenesis of the corpus luteum and compared P and E₂ production with and without the addition of Br.

The concentrations of Br selected (0.01, 0.1, 1.0 and 10ng/ml) were based on reports that the maximum concentration of Br in the blood with the administration of Br 3mg was 2.15ng/ml after 1.4h and the half-life was 6.2h¹⁷. E₂ production of the corpora lutea showed no significant difference between each of the concentrations of Br and control, and no clear direct action of Br on the corpus luteum was seen with respect to E₂. However, P production increased significantly in comparison with the control when Br was added at concentrations of 1.0 and 10ng/ml, and it was clear that Br directly stimulated the corpora lutea. When Br was added at 1.0ng/ml, close to the concentration in the blood, and the P production was divided into one group with 200ng/ml/1 x 10⁵ cells/day or higher and another with lower values, the ability of Br to increase P production was significantly greater in the low P production group.

At 10ng/ml of Br, the number of samples was few, and the difference in Br action according to P production group was not investigated.

From the results of the present study, it is clear that Br directly stimulates the corpus luteum, causing increased P production and this effect is greater when P production is low, suggesting that administration of Br is useful in cases of inadequate luteal phase with normoprolactinemia.

References

- 1) Moszkowski, E., Woodruff, J. D. and Jones, G.

- S.: The inadequate luteal phase, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 83:363, 1962
- 2) Jones CS: In progress in infertility: Edited by Behrman SJ, Kistner RW. Boston, p.229 Little, Brown, 1975
 - 3) Runnebaum, B., Holzmann, K., Munstermann, A. M. B. and Zander. J.: Effect of HCG on plasma progesterone during the luteal phase of the menstrual cycle and during pregnancy, *Acta endocr.* 69:739, 1972
 - 4) Garcia, J., Jones, G. S. and Wentz AC: The use of clomiphene citrate, *Fertil. Steril.* 28:707, 1977
 - 5) Del Pozo, E., Wyss, H., Tolis G., Alcaniz, J., Camoana, A. and Naftolin, F.: Prolactin and deficient luteal function, *Obstet. Gynecol.* 53:282, 1979
 - 6) Seppala, M., Hirronen, E., Ranta, T.: Hyperprolactinemia and luteal insufficiency, *Lancet* 31:229, 1976
 - 7) Tyson, J., Khojandi, M., Huth, J., Smith B. and Thomas, P: Inhibition of cyclic gonadotropin secretion by endogenous human prolactin, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121:374, 1975
 - 8) Higuchi, Y.: Effect of low density lipoprotein on intracellular cholesterol and progesterone production by monolayer cultured human luteal cells, *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.* 38:229, 1986
 - 9) Endo, T., Yamamoto, H. and Tanaka, S.: Production of prostaglandins by human luteal cells and their effects on luteal function, *Folia. Endocrinol. Jap.* 64:687, 1988
 - 10) Jones, G. S.: The luteal phase defect, *Fertil. Steril.* 27:351, 1976
 - 11) Tolis, G. and Naftolin, F.: Induction of menstruation with bromocriptine in patients with euprolactinemic amenorrhea, *Am J Obstet Gynecol.* 126:426, 1976
 - 12) Steeg, H. J. and Bennink, H. J. T. C.: Bromocriptine for induction of ovulation in normoprolactinemic post-pill anovulation, *Lancet* 5:502, 1977
 - 13) Seppala, M., Hirvonen, E. and Ranta, A.: Bromocriptine treatment of secondary amenorrhoea, *Lancet* 1:1154, 1976
 - 14) Tamura, T., and Minakami, H.: The ovulation-inducing effect of CB-154 on normoprolactinemic anovulatory subjects, *Folia Endocrinol. Jap.* 58:49, 1982
 - 15) Mori, H., Aisaka, K., Kitagawa, T., Minakuchi, H. and Sakamoto, S.: Effects of bromocriptine on FSH and LH secretion in women with euprolactinemic anovulation, *Acta, Obstet. Gynaec. Jpn.* 33:1741, 1981
 - 16) Del Pozo, E. and Wolf, A.: Bromocriptine: effect on the gonadostat and on luteal function, in *triangolo, International Symposium on Bromocriptine: p48 Milano Sandoz, 1978*
 - 17) Aellig, W. H., and Nuesch, E.: Comparative pharmacokinetic investigations with tritium-labelled ergot alkaloids after oral and intravenous administration in man, *Int. J. Clin. Pharmacol.* 15:106, 1977

ヒト月経黄体の
progesterone, estradiol-17 β
産生に対する
Bromocriptine の
直接作用について

札幌医科大学産婦人科学講座

遠藤俊明 水沼正弘 幡 洋
田中昭一 橋本正淑

白求恩医科大学産婦人科講座

王 占東

normoprolactinemia の黄体機能不全症における bromocriptine (Br) 治療の有用性, またその作用機序を検討する目的でヒト月経黄体を単層細胞培養し Br の添加実験を施行した。

progesterone (P) 産生は 1 ならびに 10 ng/ml の Br 添加を有意に増加した。しかも、2.5 mg の Br を経口摂取した時の血液中濃度に近似する 1 ng/ml の Br 添加では低い P 産生グループの黄体の場合の方が高 P 産生グループの黄体の場合よりも P 産生促進効果が有意に強かった。

一方黄体の estradiol-17 β 産生は Br 添加で有意の変化は示さなかった。

以上より Br は直接黄体細胞を刺激し P 産生を促進させることが明らかになり, normoprolactinemia の黄体機能不全に対して Br 投与が有用である事が示された。

(受付: 1988 年 12 月 5 日)

頸管粘液分泌不全における子宮頸管腺 エストロゲンレセプターの免疫組織学的検討

Immunohistochemical Study of Human Uterine Cervical Estrogen-receptor on the Insufficient Cervical Mucous Secretion

札幌医科大学産婦人科学講座 (主任: 橋本正淑教授)

水 沼 正 弘 藤 井 美 穂 田 中 昭 一
Masahiro MIZUNUMA Miho FUJII Shoichi TANAKA
橋 本 正 淑
Masayoshi HASHIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology
Sapporo Medical College, Sapporo 060, Japan

頸管粘液不全症例 10 例, および正常頸管粘液症例 25 例における頸管腺組織のエストロゲンレセプター (ER) の検索を免疫組織学的手法を用いて行った。ER は核にのみ染まり, カラー画像解析装置により頸管腺組織のみの ER 陽性核と ER 陰性核との比率を求め検討した。

正常頸管粘液症例では, 頸管腺組織の ER の月経周期による変動は, 子宮内膜での変動と類似し, 黄体期に低く, 卵胞期に高い傾向を示した。

頸管粘液分泌不全症例の ER は, まったく ER の認められない 1 例を除いては必ずしも低くはなく, 逆に正常頸管粘液症例よりも高い症例が多かった。これらの症例では, 頸管粘液改善のためのエストロゲン補充療法を受けているものが多く, このため ER が誘導されている可能性があった。しかし, ER 陽性核の比率が高くても, 頸管粘液が改善されるとは限らず, 頸管粘液分泌不全の病態解明にはさらなる検討が必要であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34 (4), 795-798, 1989)

諸 言

不妊症の原因に占める頸管因子の割合は報告者により, 5~30%^{1,2)}と幅があるが, 一般に 10~15%³⁾と考えられている。子宮頸管は受精現象における第一の関門として重要な意義を持っている。それは, 単に精子の通過経路であるという受動的な機能のみならず, ①頸管粘液が排卵期周辺に性状を変化させ, 精子通過を容易にし, かつ至適な精子を選別する, ②精子にエネルギーや栄養を供給してその成熟を助ける (capacitation), ③精子を腺窩 (cervical crypt) 内に貯蔵, 持続放出する, ④頸管粘液中に種々の免

疫グロブリンが認められ, 精子に対する免疫応答の場となっているなど, 積極的な機能をもはたしている。

頸管粘液分泌不全 (以下 CM 不全と略す) は日常臨床上しばしば経験するが, 治療抵抗性であることも多い。CM 不全の病態解明は形態学的, 内分泌学的に試みられているが, いまだ不明の部分が多く残されている。

頸管粘液を分泌する頸管腺はホルモンの標的組織であり, エストロゲンが分泌を促進し, プロゲステロンがこれを抑制することが知られている。このためエストロゲンレセプター (以下 ER と略す) が CM

不全にたいし何らかの関与をしているのではないかと疑われてきた。今回我々は、ER に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的手法により、頸管腺の ER と CM 不全の関係の解析を行ったので報告する。

実験方法

1. 対象

対象は、当科不妊症外来を受診した、CM 正常患者 25 症例と CM 不全患者 10 症例の計 35 症例である。なお、CM 不全症例とは 2 周期以上の月経周期において、引き続き排卵期の頸管粘液の結晶形成が II 度以下であるものとした。

2. ER 検索方法

各症例は CM を吸引後、頸管を細いキューレットを用いて搔爬して頸管組織を採取した。組織の採取時期により各症例を卵胞前期、卵胞後期、排卵期、黄体前期、黄体後期に分類した。なお、各期は基礎体温表による排卵推定日の前後 1 日を排卵期とし、低温期と高温期の半期ずつをそれぞれ前期、後期とした。

組織は直ちに PLP 固定を行い、染色するまでヘキササン中に -80°C で保存した。

組織中の ER の検索は、アボット社の ER-ICA モノクローナルキットを用いて行った。ER は PAP 法により diaminobenzidine (DAB) にて発色させ、対照の核染色には methylgreen を用いた。

頸管腺組織中での ER 量の指標として、酵素抗体法により ER が染まった細胞を ER 陽性細胞、染まらなかったものを ER 陰性細胞とし、両者の細胞数の合計に対する ER 陽性細胞の比率を用いた。ER は核にのみ染まるので(図 1)、オリンパス社製カラー画像解析システム (CIA-102) を用いて ER 陽性および陰性細胞の核の面積を計算し、これを両細胞の核の代

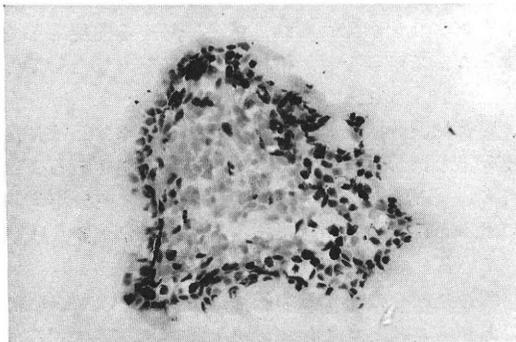


図 1 頸管腺組織の ER に対する免疫組織染色 (400×)

わりとした。すなわち、1 症例につき 400 倍で 4 視野を入力し、DAB により褐色に染まった ER 陽性核を青色、薄緑色の ER 陰性核を赤色に変換した後、全視野の内、頸管腺に相当する部分のみをカーソルで指定して間質部分などを削除し、この中の青色と赤色の面積を計算させた。(図 2)

結果

1. 月経周期における ER 陽性細胞の割合

月経周期各期の ER 陽性細胞の割合を図 3 に示した。棒グラフは CM 正常患者の平均を示している。

CM 正常患者では排卵期に 42.7% と最も ER 陽性細胞の割合が少なく、以後黄体期に 48.0, 55.1% と上昇し、さらに、62.5, 71.9% と卵胞後期にいたるまで増加する傾向を示した。一方、CM 不全患者では CM 正常患者より ER 陽性細胞の比率が高い傾向を示した。ER 陽性細胞がまったくないものを (-)、30% 未満を (1+)、30% 以上 70% 未満を (2+)、70% 以上を (3+) とすると、CM 不全患者 10 例中 8 例までもが (3+) であり、CM 正常患者では (3+) がほとんどない排卵期、黄体期でさえ CM 不全患者の全例が (3+) であった。(図 3)

2. CM 不全症例とエストロゲン補充療法

CM 不全患者 10 例中 8 例がエストロゲン補充療法を受けており、このため ER が誘導された可能性がある。ER がまったくない症例は CM 不全症例中に 1 例認められた。治療を受けて CM が改善した症例はすべて ER 陽性細胞が (3+) だが、改善しなかった症例にも (3+) が多く見られた。(図 4)

考 案

昭和 57 年から 61 年までの 5 年間に当科不妊症外

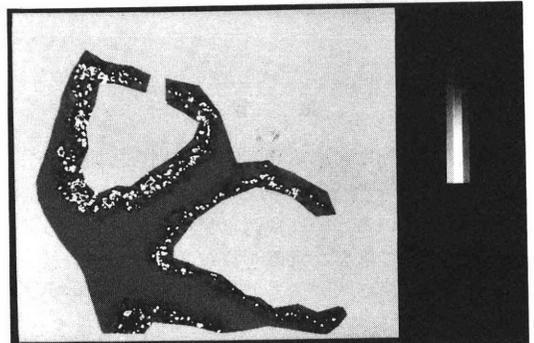


図 2 画像処理後のディスプレイ表示像。ER 陽性核は青く(写真上では白)、陰性核は赤く(写真上では黒)表されている。

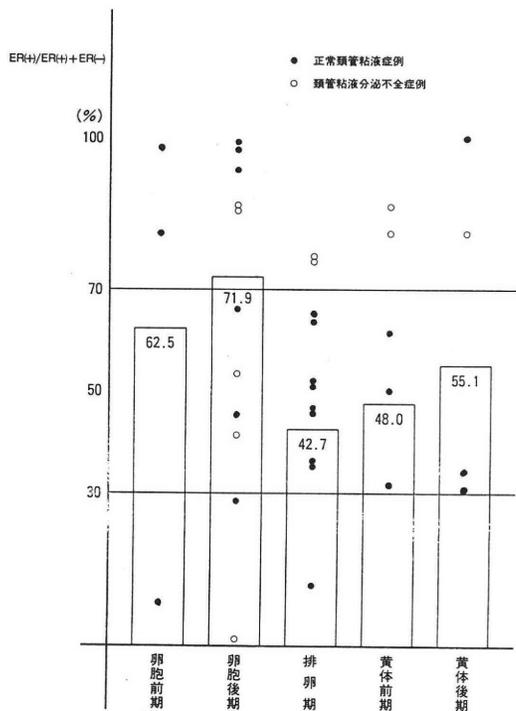


図3 月経周期におけるER陽性細胞の割合

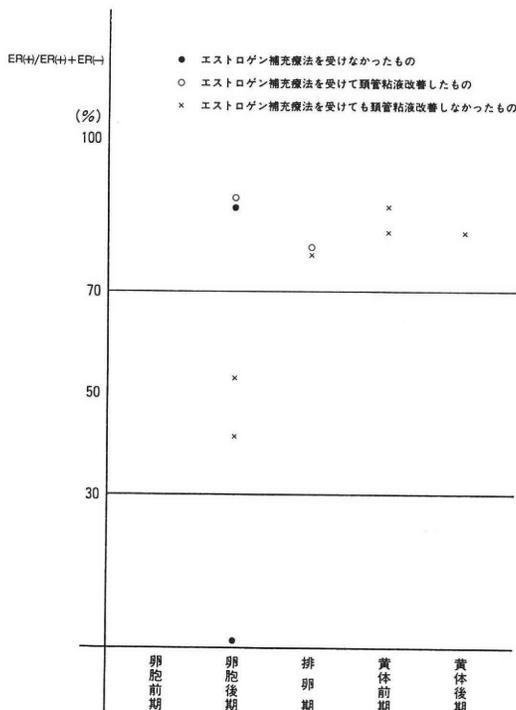


図4 CM不全症例とエストロゲン補充療法

来を受診した不妊症患者は1093名で、基本的な不妊症に関する検査を終了した患者は622名であった。このうち、不妊原因に頸管因子を持つものは55名で、検査終了者の8.8%を占め、諸家の報告^{1,2,3)}とほぼ一致した。

CMは、月経周期に伴って量的、質的にダイナミックな変動を示すが、これは主に卵泡より分泌されるエストロゲンに基づくと考えられている⁵⁾。CM不全と血中エストロゲン値の関係については、杉田⁶⁾はCM正常例と不全例との間に血中エストロゲン値に有意差はないとし、CM不全を頸管腺の形態異常に基づくものと頸管腺のエストロゲンに対する反応性の異常に基づくものとに分類している。一方、桧垣⁷⁾はCM量と血中エストロゲン値とは正の相関があるとし、血中エストロゲン値や、外来性に投与したエストロゲンやHMGに対するCMや頸管腺の形態学的変化から、①エストロゲン不足群、および、頸管腺のエストロゲンに対する②感受性低下群、③反応性低下群の3群に分類した。杉田⁶⁾、桧垣⁷⁾ともに、外来性のエストロゲン投与などにより血中エストロゲン値を高めてもCM分泌が改善しない症例の存在を認めている。そして、この理由のひとつとしてERの関与を想定している。

月経周期各期の子宮内膜のERは、当科でも以前報

告したように⁸⁾、増殖期に高く、分泌期に低い周期的変動を示すことが知られている。今回の我々の検討では、ER陽性細胞の比率は排卵期にも最も低く、以後は黄体期には次第に上昇して、排卵期に最も高くなる、子宮内膜のER量⁸⁾と類似した傾向を示した。

本来、免疫組織学的手法によっては、抗原の量的差異を求めることはできないとされている。しかし、McCartyら⁹⁾は乳癌組織のERをモノクロナル抗体で染め、その染色強度と分布を勘案してscoringすると、生化学的に求めたER量とかなりよく相関すると報告している。従って、今回の我々の結果も実際の頸管腺のER量を反映しているのではないかと考えている。

しかし、子宮頸部組織については月経周期におけるER量の周期的変動を認めないとする報告が多い。Abuzeidら¹⁰⁾は子宮頸部は扁平上皮、円柱上皮および間質組織の混在する組織であり、このため、子宮内膜と比べてかなり低いER量しか測定されず、周期的変動を識別できないのではないかと考えている。また、生化学的な頸管組織のER量の測定では、今回の我々のように頸管腺のみに焦点を絞って測定することは極めて困難であり、このため異なった傾向が現れたのかもしれない。

我々の結果では、CM不全患者でもCM正常患者

を上回る ER の染色を認めており、もしこれが頸管腺の ER 量を忠実に反映しているとするならば、ER 量が正常でも CM 不全は起こり得ると考えねばならない。確かに、ER がまったく染まらない CM 不全症例も 1 例あり、ER が CM 不全に関与する場合があることを示唆している。その他の症例では、ER の量的大小以外の要因、例えば、エストロゲンがレセプターに結合した後、クロマチンへの結合障害、あるいはその後の径路の異常なども考えられる。この問題の解決には症例の追加による検討の他、ステロイドホルモンの作用機序の解明が待たれる。

本論文の要旨は第 32 回日本不妊学会総会（金沢）で発表した。

文 献

- 1) Speroff, L., Glass, R. H. and Kase, J. G.: Clinical gynecologic endocrinology and infertility: p173, Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1973
- 2) Moghissi, K. S.: Postcoital test: Physiologic basis, technique, and interpretation, Fertil. Steril. 27: 117, 1976
- 3) 元島正信：頸管粘液異常と不妊，産婦人科 Mook No5: p113, 金原, 1979
- 4) Greene, G. L., Nolan, C., Engler, J. P. and Jensen, E. V.: Monoclonal Antibodies to human estrogen receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 5115, 1980
- 5) Flynn, A. M. and Lynch, S. S.: Cervical mucus and identification of the fertile phase of the menstrual cycle, Brit. J. Obstet. Gynaec. 83: 656, 1976
- 6) 杉田 元：不妊における頸管粘液分泌不全の機序に関する研究，日不妊会誌，26：36, 1981
- 7) 桧垣敬二：頸管粘液分泌不全に関する内分泌及び組織学的研究，日不妊会誌，28：116, 1983
- 8) 東口篤司，田中昭一：ヒト子宮内膜細胞質・核における Estrosradiol Occupied および Unoccuid Receptor に関する研究—正常月経周期・経口避妊薬投与時における Steroid Receptor の変動—，日産婦誌，33：951, 1981
- 9) McCarty, K. S. Jr., Miller, L. S., Cox, E. B., Konrath, J. and McCarty, K. S. Sr.: Estrogen Receptor Analysis: Correlation of Biochemical and Immunological Methods Using Mono-

clonal Antireceptor Antibodies, Arch. Pathol. Lab. Med. 109: 716, 1985

- 10) Abuzeid, M. I., Wiebe, R. H., Aksel, S., Shepherd, J. and Yeoman, R. R.: Evidence for a possible cytosol estrogen receptor deficiency in endocervical gland of infertile women with poor cervical mucus, Fertil. Steril. 47: 101, 1987

An immnohistochemical study of human uterine cervical estrogen-receptor and insufficient cervical mucous secretion

Masahiro Mizunuma, Miho Fujii,
Shoichi Tanaka and Masayoshi Hashimoto

Department of Obstetrics and Gynecology,
Sapporo Medical College,
Sapporo, 060, Japan

We investigated the estrogen-receptor (ER) of the cervical epithelium in 10 case with insufficient cervical mucous secretion and 25 cases with normal secretion using immunohistochemical staining.

The ER was only stained on the nucleus, so that the ratio of ER-positive nucleus in the cervical epithelium could be indentified by the automatic color image analyzing system.

In the normal patients, the change of the ER positive ratio in the menstrual cycle was similar to the change of the endometrial ER content; that is, lower in the luteal phase and higher in the follicular phase. The ER positive ratio was not so low in the insufficient cases, except for one negative ER case. On the contrary, the ratio was higher than normal cases. Most of these patients had previously been administered estrogen, so that may have induced the high ER ratio. However, the high ER ratio did not produce an equivalent improvement of the cervical mucous secretion.

These findings suggest that some other mechanisms other than ER are involved in producing insufficient cervical mucous secretion.

(受付：1988年11月4日)

HACHIMIJIogan FOR THE TREATMENT OF HYPERPROLACTINEMIA

Satoshi USUKI and Sayuri KUBOTA

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

Abstract: Twenty-seven women with hyperprolactinemia (prolactin level in serum: more than 30 ng/ml) (20 with idiopathic hyperprolactinemia, 2 with Chiari-Frommel syndrome, 1 with Argonz-del Castillo syndrome and 4 with pituitary microadenomas) were treated with Hachimijiogan, a traditional oriental herbal medicine.

Five g of Hachimijiogan (HZ) was given orally daily for more than 3 months. When necessary, the HZ dose was increased to the maximal dose of 10g HZ per day.

Eighteen of the women (10, 5, 1 and 2 with levels of 30-50 ng/ml, 50-100 ng/ml, 100-200 ng/ml and 200-300 ng/ml, respectively) were treated with HZ for up to 3 months, which led to a decrease in the prolactin level. In 15 of them the prolactin level dropped to 19.4 ± 10.5 ng/ml during the HZ-treatment. In the 2 patients with levels of 200-300 ng/ml the level did not drop to below 30 ng/ml, ranging from 35 to 45 ng/ml (82.40-84.09% decrease). In the patient with the level of 100-200 ng/ml, the prolactin level ranged from 25 to 50 ng/ml during the HZ-treatment. Nine patients showed no prolactin-decrease after 6 months. Four of 6 patients with amenorrhea (2 with Chiari-Frommel syndrome, 1 with Argonz-del Castillo syndrome and 3 with pituitary microadenomas), in whom the prolactin level dropped during the HZ-treatment, ovulated. The pregnancy rate was 44.44% (8, 2 and 2 with levels of 30-50 ng/ml, 50-100 ng/ml and 200-300 ng/ml, respectively) and 11 gave birth to normal babies. There were no side-effects during the HZ-treatment. In 8 out of the 15 patients whose prolactin levels dropped to below 30 ng/ml, the level remained essentially the same at 6 months after cessation of the HZ-treatment.

These results indicate that HZ is a new medication available for infertile women with hyperprolactinemia.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 799—809, 1989)

Introduction

It is well known that hyperprolactinemia is one of the main causes of infertility in women. Hyperprolactinemia has been best treated by dopamine agonist ergot drugs, especially bromocriptine^{2,4,6,9,10}. However, in the case of treatment of patients with hyperprolactinemia with bromocriptine there is often an insufficient effect and side effects such as nausea, vomiting and faint-

ness. We have searched a more effective medicine with less side effects. Although CV 205-502 (octahydroxybenzo [g] quinoline), a new, non-ergot, long-acting dopamine-agonist with less side effects, has been investigated¹¹, it is not used clinically at present. The administration of Chinese herbal medicines was recently shown to stimulate or to suppress hormonal circumstances in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis^{11-14, 16-20}. Hachimijiogan, a Chinese herbal medi-

cine, is closely related to gonadal steroids and gonadotropins^{11-14,18,19} and, on the treatment of oligozoospermic and hyperprolactinemic men with Hachimijiogan, it was found that Hachimijiogan effectively decreases the serum prolactin level¹¹.

There have been very few reports on the administration of Chinese herbal medicines to patients with hyperprolactinemia. In the present study, we examined the clinical availability and efficacy of Hachimijiogan in infertile women with hyperprolactinemia with or without obvious pituitary adenomas.

Materials and Methods

Twenty-seven women (mean age, 29 years; range 24 to 38 years) with hyperprolactinemia (prolactin level in serum: more than 30 ng/ml), who visited our infertile outpatient clinic, were given Hachimijiogan (Tsumura Co., Ltd., Tokyo) at a dose of 5.0 to 10.0 g/day for more than 3 months. All the patients had no clinically organic disease of the internal genitalia and were healthy. The patients were divided into two groups: group 1, 15 patients who had not become pregnant during 6 to 24 months' treatment with bromocriptine, and group 2, 12 patients who received Hachimi-

jiogan alone from the beginning of treatment. All the patients except 7 (2 with Chiari-Frommel syndrome, 1 with Argonz-del Castillo syndrome and 4 with pituitary microadenomas) were idiopathic (Table 1). Furthermore, the patients were divided into four groups according to the basal serum prolactin level (15 patients in group 1, basal prolactin ≥ 30 and < 50 ng/ml; 9 in group 2, basal prolactin ≥ 50 and < 100 ; 1 in group 3, basal prolactin ≥ 100 and < 200 ; and 2 in group 4, basal prolactin ≥ 200 and < 300) (Table 1).

Before, during and after the administration of Hachimijiogan, blood samples were collected and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C, and the sera were stored at -20°C in the dark until assayed for prolactin. The intraassay variability was 3.83 to 12.33% (mean, 6.6%) and the interassay variability was 3.71 to 12.58% (mean, 7.4%).

When the high phase of a patient's basal body temperature continued for more than 21 days or pregnancy was confirmed, the Hachimijiogan treatment was stopped. In the case of patients with pituitary adenomas, high-resolution coronal computerized tomographic (CT) scanning (CT/T 8800; G. E., WA, U. S. A.) of the sella turcica was performed to detect obvious morphological changes of the adenomas before, during and/or after

Table 1 Serum prolactin levels before and after Hachimijiogan treatment.

Serum prolactin (ng/ml)	No. of patients	Treatment					
		Br→HZ	HZ	HZ→Br	HZ→SK	Br→HZ→Br→HZ	Br→HZ→SK→HZ
30~50	15 10(2)	9 ^{a)} (1) 6(1)	5 ^{b)} (1) 4(1)			1	
50~100	9 5(1)	3 ^{c)} 2	3 3	2 (1) (1)	1		
100~200	1 1						1 1
200~300	2 2	1 ^{c)} 1	1 ^{b)} 1				

- a). one patient treated with Hachimijiogan following bromocriptine and ergoloid (bromocriptine→ergoloid→Hachimijiogan);
 - b). one patient after transsphenoidal surgery for a pituitary microadenoma⁷⁾;
 - c). one patient with a pituitary microadenoma without transsphenoidal surgery;
 - (). Chiari-Frommel syndrome;
 - (). Argonz-del Castillo syndrome;
 - . numbers of patients showing a serum prolactin-decrease after Hachimijiogan treatment.
- HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine; SK, Shakuyakuzansoto.

Table 2 Herbal components of Hachimijiogan

English	Latin	Chinese	Plants or Herbs	Amount (g)
Rehmannia root	Rehmannia Radix	dihuang	Rehmannia glutinosa LIBOSCH. var. purpurea MAKINO	6.0
Hoelen	Hoelen	fuling	Poria cocos Wolf (Polyporaceal)	3.0
Alisma rhizome	Alismatis Rhizoma	zexie	Alisma oriental Juzep.	3.0
Cornus fruit	Corni Fructus	shanzhuyu	Cornus officinalis SIEB. et. ZUCC.	3.0
Dioscorea rhizome	Dioscoreae Rhizoma	shanyao	Dioscorea batatas DECNE.	3.0
Moutan bark	Moutan Cortex	mudanpi	Paeonia moutan SIMS	2.5
Cassia bark	Cinnamomi Cortex	rougui	Cinnamomum cassia BLUME	1.0
Aconite root	Aconiti Tuber	caowu	Aconitum carmichaeli DEBX.	0.5

the Hachimijiogan treatment. The Cornell Medical Index³⁾ and various laboratory findings were compared before, during and after the administration of Hachimijiogan.

Hachimijiogan

The main components of Hachimijiogan are shown in Table 2. These eight component herbs are extracted and powdered, and 2.0 g of the extracted powder is contained in 5.0 g of Hachimijiogan.

Other Methods

All chemical reagents were of analytical grade and organic solvents were distilled prior to use.

Results

1. Serum prolactin levels in patients with Hachimijiogan treatment

The patients' prolactin levels before and after the administration of Hachimijiogan are summarized in Table 1. The serum concentration of prolactin after the administration of Hachimijiogan was decreased in 10 patients in group 1 (66.67%), 5 in group 2 (55.56%), 1 in group 3 and 2 in group 4. Out of these, the 10 in group 1 (66.67%) and the 5 in group 2 (55.56%) showed serum prolactin levels of below 30 ng/ml (mean \pm SD, 19.4 \pm 10.5 ng/ml; there was no significant difference between groups 1 and 2), the levels remaining essentially unchanged during the Hachimijiogan treatment. The serum prolactin levels in the 2 patients in group 4 with pituitary microadenomas were remarkably decreased after the administra-

tion of Hachimijiogan (range, 35 to 45 ng/ml), but the level did not decrease to within the normal range even when the dose of Hachimijiogan was gradually increased to a final daily dose of 10.0g. However, both patients conceived.

Four patients with pituitary microadenomas [1 patient in group 1 (after transsphenoidal microsurgical treatment⁷⁾), 1 in group 2 and 2 in group 4 (1 after transsphenoidal microsurgical treatment⁷⁾)] had no symptoms indicating enlargement or reduction of the pituitary tumors before, during or after the Hachimijiogan treatment or during pregnancy, as judged on CT. As for reversibility of the serum prolactin level following cessation of the administration of Hachimijiogan, 6 patients, whose prolactin levels decreased to within the normal range, remained low for 4 months after the cessation. Nine patients (5 in group 1 and 4 in group 2) showed an insufficient effect of Hachimijiogan as to a decrease in the serum prolactin level (Table 1). Because of side effects such as nausea and vomiting, and despite the sufficient effect of bromocriptine in 1 patient in group 1, subsequent therapy with Hachimijiogan (5.0 to 7.5 g/day) was started and a sufficient effect was obtained.

Because of an insufficient effect of Hachimijiogan alone as to a decrease in the serum prolactin level, 2 patients in group 2 were successively given bromocriptine at a dose of 2.5 to 5.0 mg/day, and 1 of them, with Argonz-del Castillo syndrome, ovulated and conceived. Another

Table 3 Ovulation, pregnancy, delivery and babies following Hachimijiogan treatment.

Serum prolactin (ng/ml)	Patients	Ovulation before treatment	Treatment	Pregnancy	Delivery	Baby
30~50	M.A.	+	HZ	normal	normal	normal
	K.A.	+	HZ	normal	normal	normal
	N.I.	+	HZ	normal	normal	normal
	K.E. ^{a)}	+	HZ	normal	normal	normal
	K.K.	+	Br→HZ	normal	normal	normal
	K.S.	-	Br→Erg→HZ	Abortion ^{d)}		
	K.S.	+	HZ	normal	normal	normal
50~100	C.I.	+	HZ	normal	normal	normal
	F.T.	+	HZ	normal	normal	normal
	A.Y. ^{b)}	-	HZ→Br	normal	normal	normal
200~300	M.M. ^{c)}	-	HZ	normal	normal	normal
	F.Y. ^{c)}	-	Br→HZ	normal	normal	normal
	F.K. ^{a)}	-	HZ	normal	normal	normal

a), transsphenoidal surgery for a pituitary microadenoma⁷⁾;

b), did not ovulate with Hachimijiogan, but ovulated with bromocriptine;

c), without transsphenoidal surgery for a pituitary microadenoma;

d), miscarriage after three months of pregnancy.

HZ, Hachimijiogan; Br; bromocriptine; Erg, ergoloid.

patient in group 2 was given Shakuyakukanzoto, a Chinese herbal medicine which was also reported to suppress the serum prolactin level⁵⁾, at a dose of 7.5 g/day, but a sufficient effect was not obtained. In one patient with galactorrhea in group 3, whose serum prolactin level remarkably increased after cessation of bromocriptine treatment, Hachimijiogan treatment (5.0 to 7.5 g/day) decreased the serum prolactin level, but it did not normalize it. Because of the insufficient effect of subsequent treatment with Shakuyakukanzoto, bromocriptine was given again at a dose of 2.5 mg/day, which resulted in an effective decrease in the patient's serum prolactin level.

2. Ovulation, pregnancy, delivery and babies after administration of Hachimijiogan

Four of 6 patients had hyperprolactinemia with amenorrhea (2 patients with Chiari-Frommel syndrome, 1 with Argonz-del Castillo syndrome and 3 with pituitary microadenomas) resumed normal menstrual cycles after the administration of Hachimijiogan and ovulated, but in 2 patients anovulatory menstrual cycles continued even though the treatment was continued. In 2 patients

who showed an insufficient effect of Hachimijiogan, normal menstrual cycles were restored after subsequent bromocriptine treatment, and they ovulated (Table 3). As shown in Table 3, 8 patients in group 1 (53.33%), 2 in group 2 (22.22%) and 2 in group 3 (100%) conceived after the administration of Hachimijiogan. Out of these, 1 in group 1, 1 in group 2 and 2 in group 4 had pituitary microadenomas (2 patients after transsphenoidal surgery) (Table 1), and high-resolution coronal CT scans showed no symptoms indicating enlargement or reduction of the pituitary tumors after delivery. One patient in group 2, who did not ovulate after the Hachimijiogan treatment, ovulated and conceived after bromocriptine treatment. All of the 12 patients who conceived after the Hachimijiogan treatment, except 1 who had a miscarriage after 3 months of pregnancy, showed no complications during pregnancy, and they gave birth to healthy appropriate-for-date infants.

All the courses and results of pregnancies and deliveries, and all babies were normal. In addition, the recovery of sexual functions after delivery in patients treated with Hachimijiogan

was not different from that in patients treated with bromocriptine.

3. Case reports

The infertile women with hyperprolactinemia who were given Hachimijiogan were as follows.

Patients with Hachimijiogan treatment only

Patients 1 (K. A., aged 25), 2 (N. I., aged 29), 3 (C. I., aged 29) and 4 (F. T., aged 28) had hyperprolactinemia unaccompanied by a pituitary tumor or galactorrhea/amenorrhea. Their serum prolactin levels before Hachimijiogan treatment were 75 ng/ml, 38, 85 and 47, respectively. Each serum prolactin level became normalized with the Hachimijiogan treatment and in case 4 the prolactin level remained within normal range after cessation of the treatment. All 4 patients

became pregnant and gave birth to healthy appropriate-for-date infants (Figs. 1-4).

Bromocriptine- or ergoloid-resistant patients with Hachimijiogan treatment

Patients 5 (K. K., aged 30) and 6 (K. S., aged 33) were bromocriptine-resistant and bromocriptine-ergoloid-resistant, respectively. Both patients had hyperprolactinemia without a pituitary tumor or galactorrhea/amenorrhea. The former had a serum prolactin level ranging from 30 to 50 ng/ml, and bromocriptine treatment for 4 years and 6 months did not improve the patient's infertility. Hachimijiogan was subsequently given and the patient conceived after 2 months' treatment, although the prolactin level was not normalized. The latter patient had had primary infertility for 7

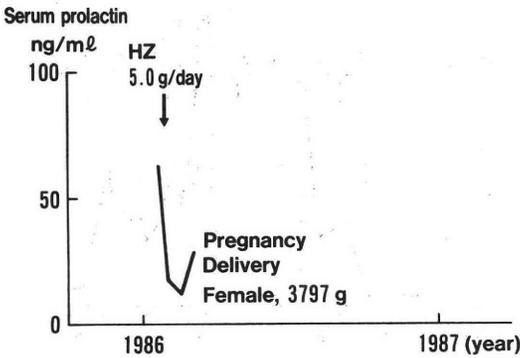


Fig. 1 Clinical course and serum prolactin level during Hachimijiogan treatment in patient 1 (K. A., aged 25). HZ, Hachimijiogan.

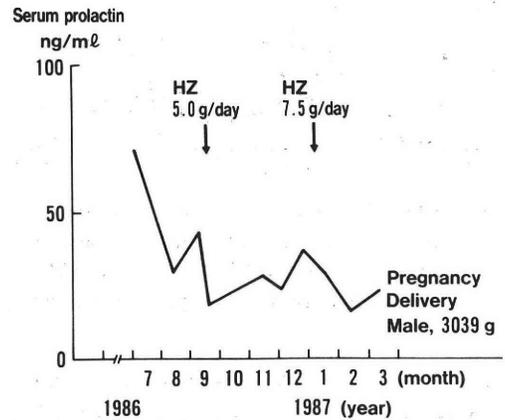


Fig. 3 Clinical course and serum prolactin levels before and during Hachimijiogan treatment in patient 3 (C. I., aged 29). HZ, Hachimijiogan.

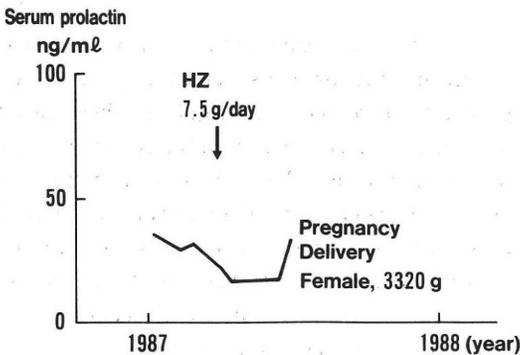


Fig. 2 Clinical course and serum prolactin level during Hachimijiogan treatment in patient 2 (N. I., aged 29). HZ, Hachimijiogan.

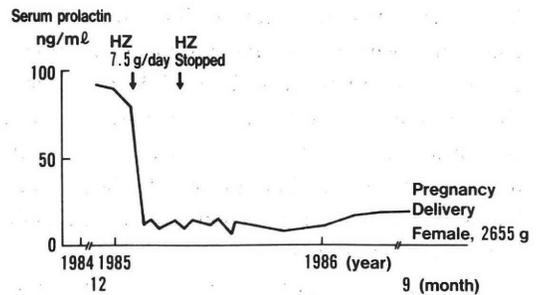


Fig. 4 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 4 (F. T., aged 28). HZ, Hachimijiogan.

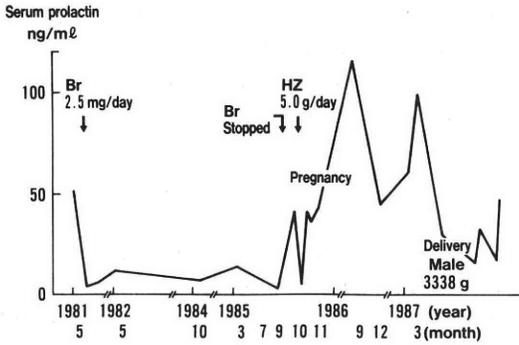


Fig. 5 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 5 (K. K., aged 30). HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine.

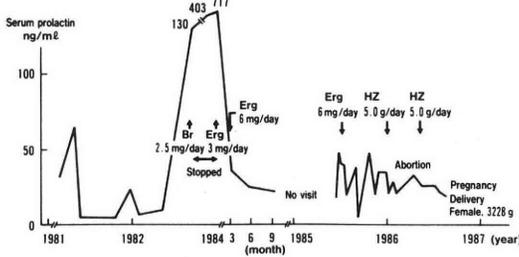


Fig. 6 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 6 (K. S., aged 33). HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine; Erg, ergoloid.

years. Because of side effects of bromocriptine such as nausea and vomiting on some occasions, the patient was subsequently given ergoloid (Hydergin[®]), a dopamine agonist ergot drug, at doses of 3 to 6 mg/day. However, medication with ergoloid was insufficient and therefore Hachimijiogan treatment was started. Two weeks after commencement of the Hachimijiogan treatment the patient's serum prolactin level decreased and she became pregnant on two occasions. Both patients gave birth to normal healthy appropriate-for-date infants, but the latter case had a miscarriage after 3 months (Figs. 5 and 6).

Patient with a pituitary tumor

Patient 7 (F. Y., aged 33) had a pituitary microprolactinoma (7 mm in diameter) and had had 11 years of primary infertility (Fig. 7). Because of the insufficient effect of bromocriptine, Hachimijiogan treatment was subsequently started. One

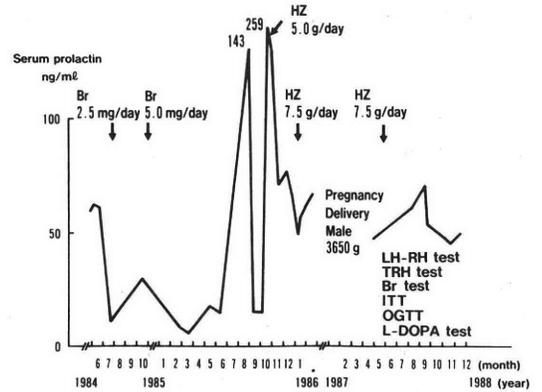


Fig. 7 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 7 (F. Y., aged 33) with a pituitary microprolactinoma. HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine.

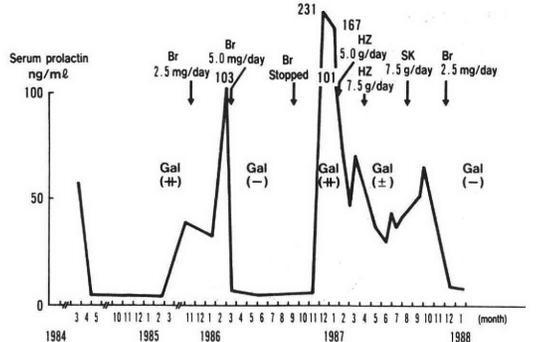


Fig. 8 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 8 (R. M., aged 34). HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine; SK, Shakuyakukanzoto; Gal, galactorrhea.

month after commencement of the Hachimijiogan treatment, the patient's serum prolactin level gradually decreased and the galactorrhea ceased, and she conceived 3 months after commencement of the treatment. The patient gave birth to a healthy appropriate-for-date infant, but showed no symptoms indicating a change in the pituitary microadenoma (Fig. 7). The results of various hormone-tolerance tests after delivery were within the normal range (data not shown).

Patients with galactorrhea or anovulatory cycles

Patient 8 (R. M., aged 34) had hyperprolactinemia with remarkable galactorrhea,

unaccompanied by amenorrhea or a pituitary tumor (Fig. 8). The patient's serum prolactin level ranged from 100 to 200 ng/ml, and medication with bromocriptine decreased the prolactin level and the galactorrhea ceased. However, the serum prolactin level increased again after cessation of the bromocriptine treatment. Subsequent Hachimijiogan treatment decreased the serum prolactin level to around 30 ng/ml with relative success in decreasing the galactorrhea, but the

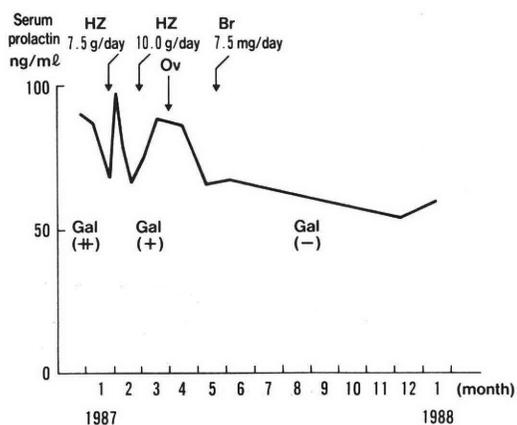


Fig. 9 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 9 (K. M., aged 29). HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine; Ov, ovulation; Gal, galactorrhea.

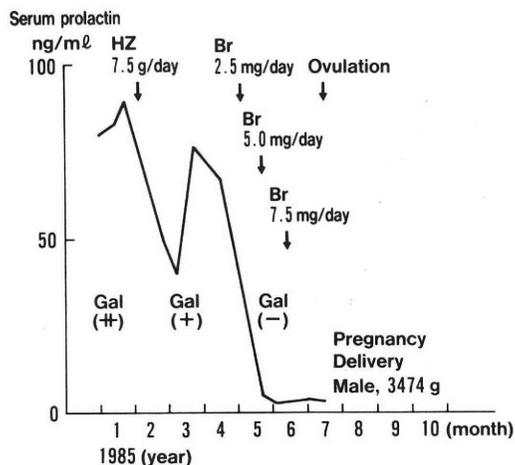


Fig. 10 Clinical course and serum prolactin levels before, during and after Hachimijiogan treatment in patient 10 (A. Y., aged 31). HZ, Hachimijiogan; Br, bromocriptine; Gal, galactorrhea.

prolactin level was not normalized. Shakuyaku-kanzoto, which was also reported to decrease the serum prolactin level⁵⁾, was then given to the patient without success. Therefore, bromocriptine treatment was started again, and the prolactin level became normalized and galactorrhea ceased completely.

Patient 9 (K. M., aged 29) had hyperprolactinemia (30-50 ng/ml) with an anovulatory cycle and galactorrhea. Hachimijiogan treatment induced ovulation and decreased the galactorrhea moderately, but bromocriptine treatment cured this symptom completely. However, neither treatment normalized the serum prolactin level (Fig. 9).

Patient 10 (A. Y., aged 31) had hyperprolactinemia (50-100 ng/ml) due to Argonz-del Castillo syndrome without a pituitary tumor. This case was resistant to Hachimijiogan. Hachimijiogan treatment did not improve the hyperprolactinemia, galactorrhea or anovulatory cycle, and so bromocriptine treatment was started. The patient's prolactin level became normalized, ovulation was induced and the galactorrhea ceased with the bromocriptine treatment. The

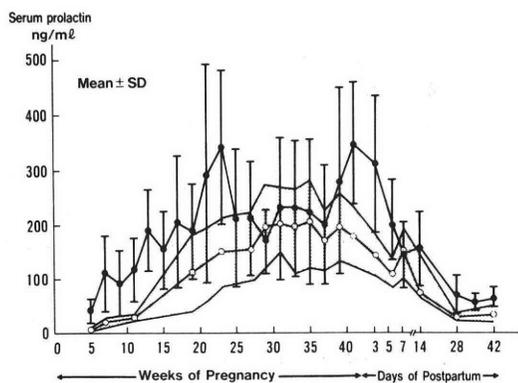


Fig. 11 Serum prolactin levels during and after pregnancy in normoprolactinemic or hyperprolactinemic women.

Shaded area, range of normal prolactin levels; ○—○, mean of normal prolactin levels; ●—●, hyperprolactinemia.

The serum prolactin level in women with hyperprolactinemia is higher during the first trimester of pregnancy than that in normal women, but it tends to become normalized later, with variations.

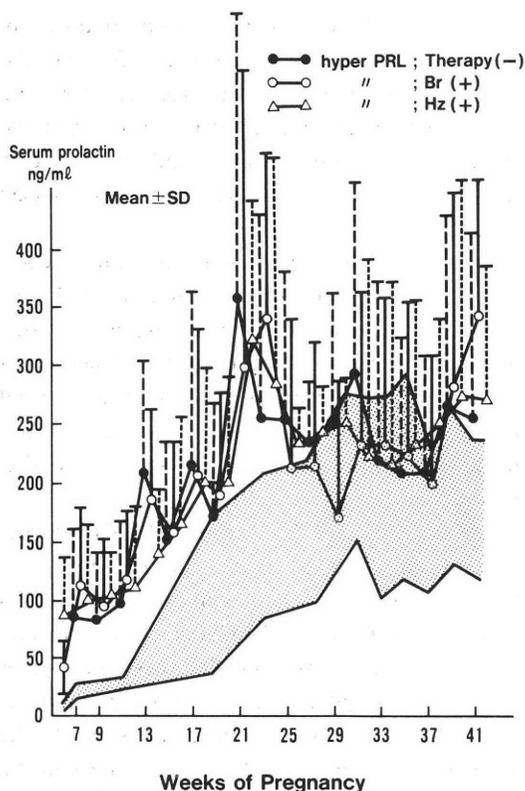


Fig. 12 Serum prolactin levels during pregnancy in women with hyperprolactinemia with or without Hachimijiogan or bromocriptine treatment.

Shaded area, range of normal prolactin levels; ●—●, hyperprolactinemia without treatment; △—△, Hachimijiogan treatment; ○—○, bromocriptine treatment.

The serum prolactin level in women with hyperprolactinemia is higher during the first half of pregnancy than in normal women, irrespective of prior medication.

patient conceived and gave birth to a healthy appropriate-for-date infant (Fig. 10).

4. Hormonal profiles during pregnancy and on the postpartum day

The serum prolactin levels during pregnancy in patients with hyperprolactinemia were higher during the first half of pregnancy, the values being variable (Fig. 11). There was no difference in the prolactin level between Hachimijiogan- and bromocriptine-treated patients (Fig. 12). The hormonal levels on the postpartum day in patients with hyperprolactinemia treated with Hachimi-

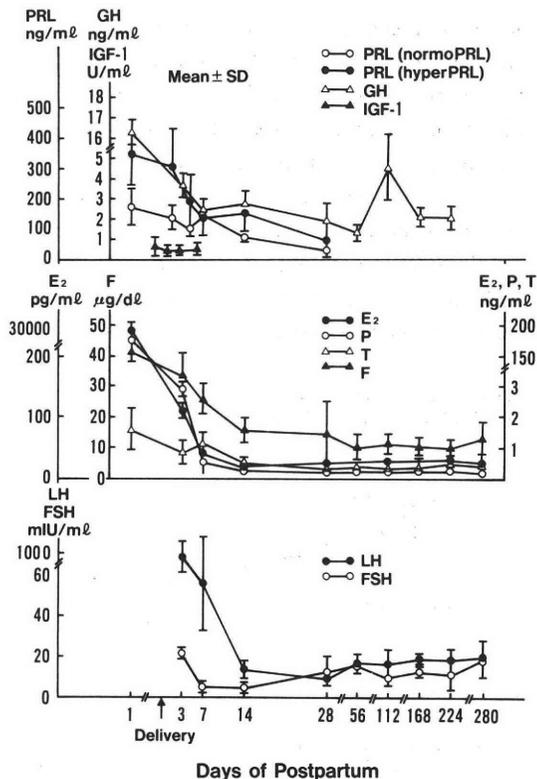


Fig. 13 Serum levels of prolactin (PRL), growth hormone (GH), luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), estradiol-17 β (E₂), cortisol (F), progesterone (P) and testosterone (T) after delivery.

Each hormone was measured by radioimmunoassaying as reported previously¹⁵.

jioogan or bromocriptine were not significantly different from those in normal patients (Fig. 13).

5. Side effects

Only one patient developed mild nausea during the Hachimijiogan treatment, but this side effect disappeared with the progress of the treatment. The clinical physical state and laboratory findings in all the Hachimijiogan-treated patients were found to be normal and the grade of neurosis, as to the Cornell Medical Index, showed no change.

Discussion

Bromocriptine (2-Br- α -ergocryptine), a dopamine agonist ergot alkaloid drug, has been widely used for the treatment of patients with

hyperprolactinemia with or without galactorrhea or pituitary adenomas. However, we are sometimes at a loss how to deal with patients with hyperprolactinemia in the case of an insufficient effect of bromocriptine and/or side effects such as nausea, vomiting and faintness. Recently, Usuki¹¹⁾ reported that Hachimijiogan decreases the serum prolactin level in oligozoospermic men with hyperprolactinemia.

In this study, Hachimijiogan treatment decreased, but only mildly, the serum prolactin level in 18 patients (66.67%); 10 in group 1, 5 in group 2, 1 in group 3 and 2 in group 4. In 15 out of these (10 in group 1 and 5 in group 2), the serum prolactin level dropped to 19.4 ± 10.5 ng/ml (mean \pm SD). In one patient in group 3 the serum prolactin level ranged from 25 to 50 ng/ml during the Hachimijiogan treatment and the serum prolactin level in 2 patients in group 4 did not decrease to within the normal range, the level ranging from 35 to 45 ng/ml even though the treatment was continued over a period in excess of 12 months. It is very interesting that the patients' prolactin levels, which were decreased by the Hachimijiogan treatment to levels of below 30 ng/ml, remained relatively high (mean, 19.4 ng/ml) throughout the Hachimijiogan treatment and that the serum levels in only 3 patients dropped to levels of below 10 ng/ml. This is quite different from the rapid serum prolactin-decrease caused by bromocriptine. These results suggest that Hachimijiogan only mildly improves the patients' hyperprolactinemia and that the serum prolactin level, but after being decreased by Hachimijiogan, remains relatively high within the normal range.

In 9 patients who showed no prolactin-decrease during the Hachimijiogan treatment, bromocriptine or Shakyakukanzoto treatment was subsequently started, the former being effective, but the latter showing no effect. This indicates that combined treatment with Hachimijiogan and bromocriptine is also effective for the treatment of patients with hyperprolactinemia. As for the induction of ovulation or resumption of a normal menstrual cycle in amenorrheic patients, 4 of 6 amenorrheic patients ovulated and became pregnant. In addition, the patients' prolactin

levels after cessation of the Hachimijiogan treatment remained unchanged for 6 months, which was quite different from the action of bromocriptine. However, in only 1 of 7 patients with galactorrhea, for which bromocriptine is usually effective, the symptom of galactorrhea disappeared completely with the Hachimijiogan treatment. This suggests an insufficient effect of Hachimijiogan on galactorrhea, although the mechanism involved is not known at present. The rate of pregnancy during the Hachimijiogan treatment in the patients with hyperprolactinemia (44.44%) was relatively higher than that during bromocriptine treatment (40.9%). The reason for this higher pregnancy rate might be not only the mild prolactin-decrease with the Hachimijiogan treatment but also the general action peculiar to the blended effects of herbal medicines. Recently, Kauppila et al.⁸⁾ reported that hypoprolactinemia caused by bromocriptine interferes with the ovarian function. This might also be a reason.

The patients who conceived after the Hachimijiogan treatment had no complications during pregnancy and gave birth to healthy appropriate-for-date infants, and the babies were all normal. Furthermore, there were no significant changes in the hormonal levels during or after pregnancy in patients treated with Hachimijiogan or bromocriptine or neither. Basic fetoplacental functions were also within the normal range²¹⁾. This indicates that Hachimijiogan may also be safe during pregnancy. Since high resolution CT scanning showed no evidence of a change in the pituitary prolactinomas, the reducing effect of Hachimijiogan as to the size of pituitary prolactinomas is questionable at present, and its efficacy awaits further detailed study because of the relatively short-term follow-up. All patients showed no physical or psychiatric change, or abnormal laboratory data during or after the Hachimijiogan treatment.

From these results, it is concluded that Hachimijiogan treatment is effective for patients with hyperprolactinemia with or without pituitary adenomas, and that it can replace bromocriptine treatment in the management of bromocriptine-resistant hyperprolactinemic patients or patients

with side effects due to bromocriptine.

Acknowledgements

We wish to thank Miss Y. Hayasaka, Mrs. M. Kusumi, Mrs. S. Kawamura, Mrs. Nakamura and Miss S. Kanzaki for their skilful technical assistance, and Mrs. H. Yuzawa for typing the manuscript.

This work was supported in part by grants from the Japan-China Medical Association, the Ministry of Science and Technology of Japan, and the University of Tsukuba Project Research.

References

- 1) Bergh, T., C. Rasmussen, L. Wide and J. Brownell: CV 205-502, long-term treatment with a now long-acting dopamine-agonist in hyperprolactinaemic women. Proceedings of Vth International Congress on Prolactin, 1988 Kyoto, Japan. Abst. No. 105, p156.
- 2) Besser, G. M., L. Parkes, C. R. W. Edwards, I. A. Forsyth and A. S. McNeilly: Galactorrhea: successful treatment with reduction of plasma prolactin levels by brom-ergocriptine, *Br. Med. J.* 3: 669, 1972
- 3) Brodman K., A. J. Erdman Jr., and H. G. Wolff: Cornell Medical Index-health questionnaire manual (revised 1955) from the New York hospital and the departments of medicine (neurology) and psychiatry, Cornell University Medical College
- 4) Del Pozo E., L. Varga, H. Wyss, G. Tolis, H. Friesen, R. Wenner, L. Vetter and A. Uettwiler: Clinical and hormonal response to bromocriptine (CB-154) in the galactorrhea syndromes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 18, 1974
- 5) Fukushima, M., Narita, A., Ichizeki, K., Oota, H. and S. Igarashi: Effects of Shakuyakukanzoto on drug-induced hyperprolactinemia. In: *Advances in Chinese Herbal Medicine*, (ed. by S. Takeuchi and S. Sakamoto). Tokyo: Diagnosis and Therapy (Jpn Ed): p 47, 1988
- 6) Gomez F., F. I. Reyes and C. Faiman: Nonpuerperal galactorrhea and hyperprolactinemia. Clinical findings, endocrine features and therapeutic responses in 56 cases. *Am. J. Med.* 62: 648, 1977
- 7) Hardy, J., H. Beauregard and F. Robert: In: *Progress in Prolactin Physiology and Pathology* (ed. by Robyn, C. and M. Harter). Prolactin-secreting pituitary adenomas: transphenoidal microsurgical treatment. New York: Elsevier/North Holland, p361, 1978
- 8) Kauppila, A., M. Reinilä, H. Martikainen, L. Rönberg and U. Puistola: Hypoprolactinemia and ovarian function, *Fertil. Steril.* 49: 437, 1988
- 9) Thorner, M. O. and G. M. Besser: Bromocriptine treatment of hyperprolactinaemic hypogonadism, *Acta Endocrinol.* [Suppl] (Copenh) 216: 131, 1978
- 10) Thorner, M. O., W. H. Martin, A. D. Rogol, J. L. Morris, R. L. Perryman, B. P. Conway, S. S. Howards, M. G. Wolfman and R. M. Macleod: Rapid regression of pituitary prolactinomas during bromocriptine treatment, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 438, 1980
- 11) Usuki, S.: Hachimijiogan changes serum hormonal circumstance and improves spermatogenesis in oligozoospermic men, *Am. J. Chin. Med.* XIV: 37, 1986
- 12) Usuki, S.: Effects of Hachimijiogan, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on estrogen and progesterone secretions by rat preovulatory follicles, *Am. J. Chin. Med.* XIV: 161, 1986
- 13) Usuki, S.: Effects of Hachimijiogan, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on the corpus luteum function and weights of various organs in vivo, *Am. J. Chin. Med.* XV: 99, 1987
- 14) Usuki, S.: Effects of Hachimijiogana, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on progesterone secretion by corpus luteum, *Am. J. Chin. Med.* XV: 109, 1987
- 15) Usuki, S.: Dynamics and kinetics of various steroid and protein hormones, somatomedin A, cystine-aminopeptidase and carcinoembryonic antigen in maternal blood during pregnancy and their mutual relationships, *Jpn. J. Fert. Ster.* 32: 404, 1987
- 16) Usuki, S.: Effects of Tokishakuyakusan and its components on rat corpus luteum function in vitro, *Am. J. Chin. Med.* XVI: 1, 1988
- 17) Usuki, S.: Tokishakuyakusan stimulates cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate accumulation and progesterin production by corpora lutea, *Am. J. Chin. Med.* XVI: 21, 1988
- 18) Usuki, S.: Hachimijiogan and Tokishakuyakusan enhance deoxyribonucleic α -nucleotidyltransferase activity in relationship to DNA synthesis by ovarian follicles via a cyclic AMP system, *Am. J. Chin. Med.* XVI: 37, 1988
- 19) Usuki, S.: Hachimijiogan produces testosterone in adult rat testes, *Am. J. Chin. Med.*, XVI: 51, 1988
- 20) Usuki, S.: Blended effects of herbal components of Tokishakuyakusan on rat corpus luteum function in vivo, *Am. J. Chin. Med.* XVI: 71, 1988
- 21) Usuki, S.: Hachimijiogan treatment is effective in the management of infertile women with

hyperprolactinemia or bromocriptine-resistant hyperprolactinemia, Am. J. Chin. Med. XVII: 11, 1989

八味地黄丸の高プロラクチン血症への応用

筑波大学臨床医学系産婦人科

白杵 愨 窪田早百合

近年漢方方剤の西洋医学領域に於ける応用には著しいものがあるが、それらによる高プロラクチン血症の治療は極めて少ない。

我々は、八味地黄丸の高プロラクチン血症への応用性の可能性について示唆し (Usuki, S., JAFES 3: 139-143, 1983), その臨床応用について検討してきた。今回はその結果について報告する。

昭和 57 年から昭和 63 年の間に筑波大学を受診した

血中プロラクチン値 30ng/ml 以上の女性不妊患者 27 名 (idiopathic hyperprolactinemia 20 名, Chiari-Frommel 症候群 2 名, Argonz-del Castillo 症候群 1 名, 下垂体腺腫 4 名) に八味地黄丸 2.5-10.0 g/日を 3 カ月以上投与した。

18 名の患者で血中プロラクチン値は減少し、そのうち 15 名は 30 ng/ml 未満の値を示した (19.4 ± 10.5 ng/ml; mean \pm SD, n=124)。血中プロラクチンの基礎値 200-300 ng/ml 群の 2 名でも血中プロラクチン値は減少したが (35-45 ng/ml), 八味地黄丸の投与の持続にも拘らず 30 ng/ml 未満には到らなかった。

八味地黄丸の投与中止後の血中プロラクチン値については、8 名が 6 カ月以上 30 ng/ml 未満の値を示したままである。

また、無月経患者 6 名中 4 名に排卵が認められた。妊娠例は 12 例で、妊娠、分娩、児等に異常は認められなかった。Cornell Medical Index, 血液生化学的検査などにも異常は認められなかった。

以上の事実は、八味地黄丸が高プロラクチン血症の治療にも有効であることを示唆している。

(受付: 1988 年 11 月 4 日)

多嚢胞性卵巣に対する hMG 「日研」 および Pergonal の同一症例における比較検討

Comparative Study on Clinical Effects of hMG Nikken and Pergonal for the Same Patients with Polycystic Ovary Syndrome

杏林大産婦人科学教室

中村 幸雄 山田 春彦 吉田 圭子
Yukio NAKAMURA Haruhiko YAMADA Keiko YOSHIDA
南野 智徳 生方 良延 高橋 康一
Tomonori NANNO Yoshinobu UBUKATA Koichi TAKAHASHI
鈴木 正彦
Masahiko SUZUKI

Obstetrics and Gynecology,
Kyorin University School of Medicine, Tokyo 181, Japan

藤田学園保健衛生大産婦人科学教室

吉村 泰典
Yasunori YOSHIMURA

Obstetrics and Gynecology,
Hujita Gakuen Health University School of Medicine, Aichi 480-11, Japan

Pergonal にて妊娠しなかった PCO 5 例に対し、低 LH の hMG 「日研」(日研) を律動的に皮下投与し、両者を比較し、以下の成績を得た。

(1) 排卵率は日研 17/19 (89.5%), Pergonal 22/24 (91.7%), OHSS 発生率は、日研 4/19 (31.6%), Pergonal 5/24 (20.8%) であった。

(2) 日研により 5 例中 4 例が妊娠し、多胎はみられなかった。

(3) 排卵までに要する hMG は、日研 ($M \pm SE$) 1862 ± 156 , Pergonal 2454 ± 210 IU で、日研が有意に少なかった。

(4) hMG 投与後、日研、Pergonal とともに LH 低下、FSH 上昇を示し、結果として LH/FSH は正常化した。

(5) hMG 投与後、日研は、Pergonal より着床期 E_2 低値、P 値を示した。

以上 hMG 「日研」は Pergonal に比べ、妊娠率、多胎発生率、使用 hMG 量で優り、OHSS 発生率はやや高値であったが、ホルモン動態は Pergonal より着床にふさわしい環境を示し、排卵誘発剤として有用であることが示された。

緒 言

従来より PCO (Polycystic Ovary Syndrome, 多嚢胞性卵巣症候群) に対する hMG-hCG 療法は、卵巣過剰刺激症候群 (Ovarian Hyperstimulation Syndrome, OHSS) 発生率が高く、むしろ禁忌とされてきたが、我々はポンプを用いて律動的に皮下投与することによって、PCO に対しても重篤な OHSS 発生を起すことなく、しかも多胎発生なく使用できることを発表してきた¹⁻⁴⁾。また LHRH analog を前もって投与し、下垂体の LH, FSH 放出を抑制後、hMG を律動的に皮下投与し、OHSS 発生を低下せしめることにも成功している⁵⁾。

近年に至り、低 LH の hMG を用いて排卵誘発を行なうと、OHSS 発生が少ないとの報告がみられるようになった^{6,7)}。我々も低 LH で、ほぼ pure FSH に近い hMG「日研」を使用する機会を得たので、同一 PCO 症例に対し、従来の hMG (Pergonal) と比較投与し、検討を行なった。

対象ならびに方法

1. 対象症例

我々の提唱する PCO criteria⁸⁾を満たし、腹腔鏡または開腹下に PCO と確認された PCO のうち、Pergonal の律動的皮下投与によって排卵するも妊娠しなかった 5 例を対象とした。この 5 例の PCO のホルモン動態を表 1 に示す。

LHRH test は、いずれも典型的な PCO パターンを示し、PRL および消退出血 2 週以降の血中 Estradiol (E_2) は、正常卵胞期の値 (49.1 ± 3.2 pg/ml, $M \pm SE$) と差はみられなかった。Testosterone 値はやや高値を示すも、1 ng/ml 以上の高値を示す例は存在しなかった。

2. 排卵誘発法

すでに我々の報告した方法にしたがった¹⁻⁴⁾。すな

わち消退出血直後より hMG (Pergonal: 帝臓 LH: FSH=75:75 または hMG「日研」: 日研化学 LH: FSH=75:2~4) を 1 日当り 150~225 IU, 律動ポンプ (ニプロ SP-3 I, ニプロ) を用いて 90 分毎に下腹部皮下に翼状針をもって律動的に投与した。

hMG は 1 日当り 0.8 ml の注射用生食水にて溶解し、90 分毎に 50 μ g づつ (1 回当り 9.375 IU~14.0625 IU) 律動的に注入されるようポンプを調節した。薬液は 2~3 日毎に新しく充填し、日常生活は通常通り行なわせ、入浴その他、止むをえない時にはポンプを止め、翼状針を抜き、その後再び本人に針を刺入させポンプを駆動させた。hMG 投与は排卵確認までとした。経陰プローブによる発育卵胞観察によって最大卵胞径 20 mm 以上になった時点で、hCG 5000~10000 IU を投与し、排卵誘発した。排卵後は hCG 5000 IU を隔日に黄体中期まで投与し、黄体機能を賦活化した。

3. 血中ホルモン測定

血中 LH, FSH, Prolactin (PRL), Testosterone (T), Estrodiol (E_2), Progesterone (P) はすでに発表した RIA 法によった²⁾。

4. OHSS の定義

内診上驚卵大以上の卵巣の触知または、超音波断層法にて 5 cm 以上の卵巣腫大のあるものとした。

5. 統計的処理

Student's t test, X^2 test にて $P < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

表 2 は対象症例 5 例の Pergonal, 日研 hMG 別にみた各症例の排卵, OHSS 発生, 妊娠周期数を示している。症例 4, 5 は全周期排卵, 症例 1, 2, 3 は Pergonal, 日研 hMG のどちらか 1 周期が排卵不成功に終わっている。OHSS 発生は、症例 1, 2, 3 が 4, 5 に比較してやや高く、OHSS 発生のしや

表 1 対象症例のホルモン動態

	年齢	LHRH test				
		LH(mIU/ml) 前値→ピーク	FSH(mIU/ml) 前値→ピーク	PRL (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	T (ng/ml)
症例 1	29	47.0→250.0	9.6→18.0	12.0	33	0.53
2	32	32.0→230.0	11.0→27.0	13.3	38	0.62
3	34	34.2→211.7	7.0→26.5	24.6	113	0.72
4	28	33.3→118.0	8.7→16.0	8.9	67	0.69
5	28	20.2→184.0	9.5→15.0	4.1	90	0.73

表2 症例別にみた成績

	治療周期	排卵周期	OHSS 発生周期	妊娠周期	
症例 1	hMG「日研」	5	5	2	0
	Pergonal	11	10	0	0
症例 2	hMG「日研」	3	2	1	1
	Pergonal	10	9	4	0
症例 3	hMG「日研」	5	4	2	1
	Pergonal	1	1	1	0
症例 4	hMG「日研」	5	5	1	1
	Pergonal	1	1	0	0
症例 5	hMG「日研」	1	1	0	1
	Pergonal	1	1	0	0
合計	hMG「日研」	19	17	6	4
	Pergonal	24	22	5	0

表3 hMG「日研」、Pergonal 投与別にみた成績

	hMG「日研」	Pergonal
治療症例	5	5
治療周期	19	24
排卵症例	5(100%)	5(100%)
排卵周期	17(89.5%)	22(91.7%)
OHSS 発生例	4(80%)	2(40%)
OHSS 発生周期	6(31.6%)	5(20.8%)
妊娠症例	4(80%)	0(0%)
妊娠周期	4(21.1%)	0(0%)
排卵迄の hMG 使用量 (IU, M±SE)	1,862±156	2,454±210
	P < 0.05	
BBT 高温日数(日)	15.2±0.4	13.8±0.7

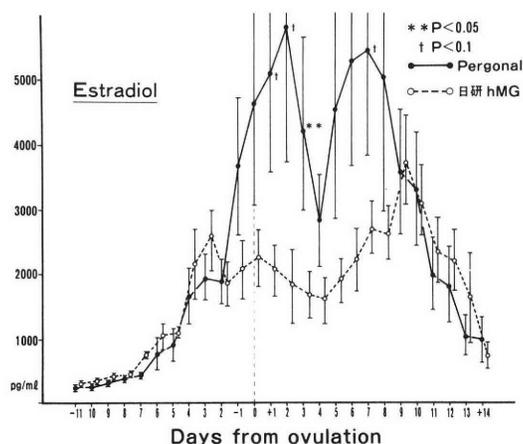


図1 hMG「日研」、Pergonal 投与時の血中 Estradiol の経日変動 (日研 : N=13, Pergonal : N=17)

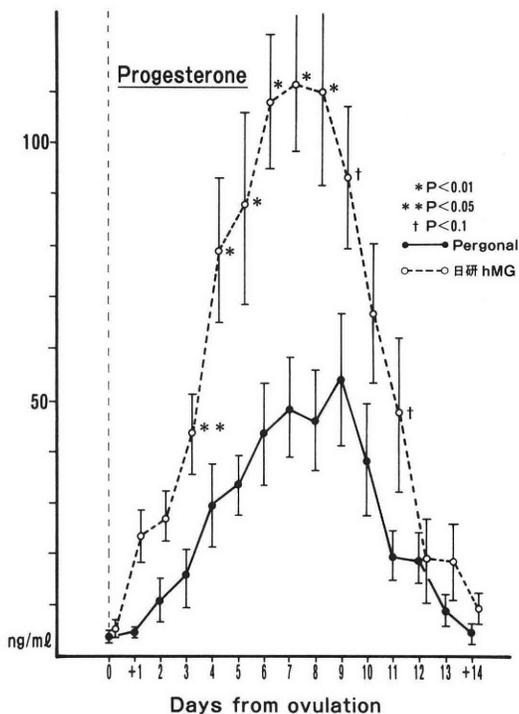


図2 hMG「日研」、Pergonal 投与時の血中 Progesterone の経日変動 (日研 : N=13, Pergonal : N=17)

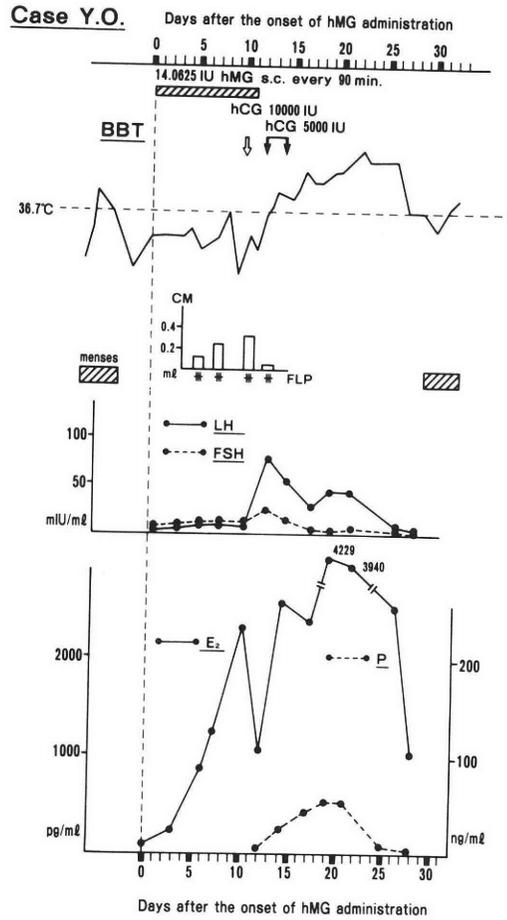
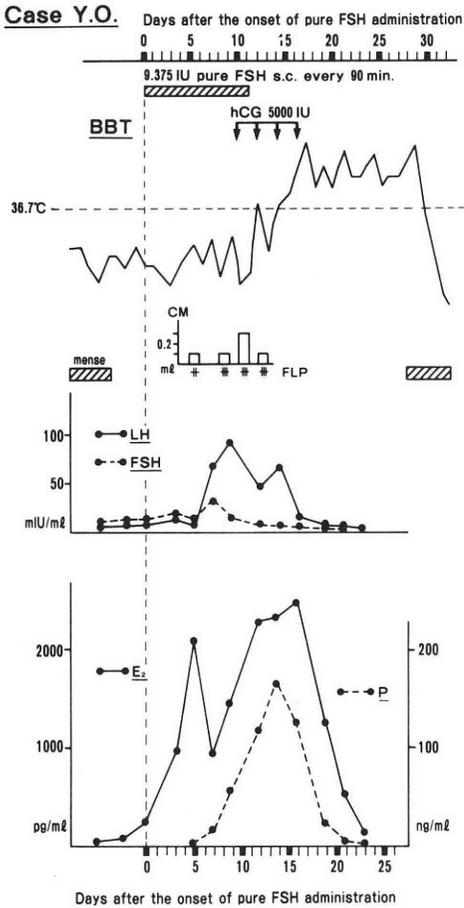


図3 同一症例(症例1)に対するhMG「日研」(左), Pergonal(右)投与時の血中ホルモンの経日変動

すい症例の存在が考えられる。OHSS 発生周期は全周期安静、経過観察にて、自然軽快している。妊娠例は、Pergonalにて妊娠しなかった5例中4例が妊娠、すべて単胎の生児を得ている。妊娠周期中 OHSS 発生例は症例3の1周期のみであった。

表3はhMG「日研」、Pergonal療法剤にみた成績を示す。排卵率はhMG「日研」5例中5例(100%)、19周期中17周期(89.5%)、Pergonalは5例中5例(100%)24周期中22周期(91.7%)で両者に差はない。

OHSS 発生率は日研4例(80%)6周期(31.6%)、Pergonal2例(40%)5周期(20.8%)で、日研の方がやや高いが有意差はない。妊娠例はPergonalになく、日研は5例中4例(80%)4周期(21.1%)妊娠し、有意差(P<0.05)を認めた。排卵までに要したhMG使用量は、日研1862±156 IU(M±SE)、Pergonal2454±210 IUで、日研の方が有意に(P<0.05)hMG使用量が少なかった。非妊娠周期のBBT

高温日数は日研15.2±0.4日、Pergonal13.8±0.7日で日研の方が長い傾向(P<0.2)を認めた。

hMG投与前後のLH、FSHの変動をみると、LHでは、hMG「日研」投与前22.2±2.2 mIU/mlが投与12日目までに11.8±1.0~14.5±2.2 mIU/ml(60.6±2.3~75.7±5.8%)と有意に低下、Pergonal投与前22.2±1.8 mIU/mlが12.9±1.3~15.8±1.4 mIU/ml(67.0±13.4~79.4±5.8%)と同じく有意に低下した。FSHではhMG「日研」投与前8.1±1.1 mIU/mlが9.8±0.8~12.2±0.9 mIU/ml(121.7±9.5~158.9±20.6%)と有意に増加、Pergonalは投与前8.0±0.5 mIU/mlから11.9±0.5~13.9±1.4 mIU/ml(135.4±10.4~164.0±7.5%)へと有意に増加した。

図1はhMG「日研」、Pergonal投与別にみたhMG投与前後の血中 Estradiol (E₂)、図2は同じく血中 Progesterone (P) の経日変動をみたものである。E₂は排卵前までhMG「日研」、Pergonal投与時とも

表4 文献上にみられる pure FSH, 従来の hMG の成績の比較

	排卵率(周期別)		OHSS 発生(周期別)		妊娠(症例別)		排卵までのhMG量(IU, M±SE)	
	pure FSH	hMG	pure FSH	hMG	pure FSH	hMG	pure FSH	hMG
Venturolis (Metrodin) ⁶⁾	4/5 (80%)	5/5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	1,170±113	1,183±124
Seibel (Metrodin) ⁷⁾	5/11 (45.5%)	7/11 (63.6%)	0/11 (0%)	4/11 (36.4%)	1/10 (10%)	1/7 (14.3%)	—	—
苛原 (hMG「日研」) ⁹⁾	9/12 (66.7%)	2/5 (40%)	2/12 (16.7%)	2/5 (40%)	2/7 (28.6%)	0/5 (0%)	2,775	—
楠原 (hMG「日研」) ¹⁰⁾	9/11 (81.8%)	28/36 (77.8%)	1/8 (12.5%)	7/14 (50%)	4/8 (50%)	9/14 (64.3%)	1,572±391	1,411±605
伊吹 (Fertinorm) ¹¹⁾	7/8 (87.5%)	5/5 (100%)	—	—	—	—	2,625±300	—
中村 (hMG「日研」)	17/19 (89.5%)	22/24 (91.7%)	4/19 (31.6%)	5/24 (28.8%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	—	—

Case Y.T.

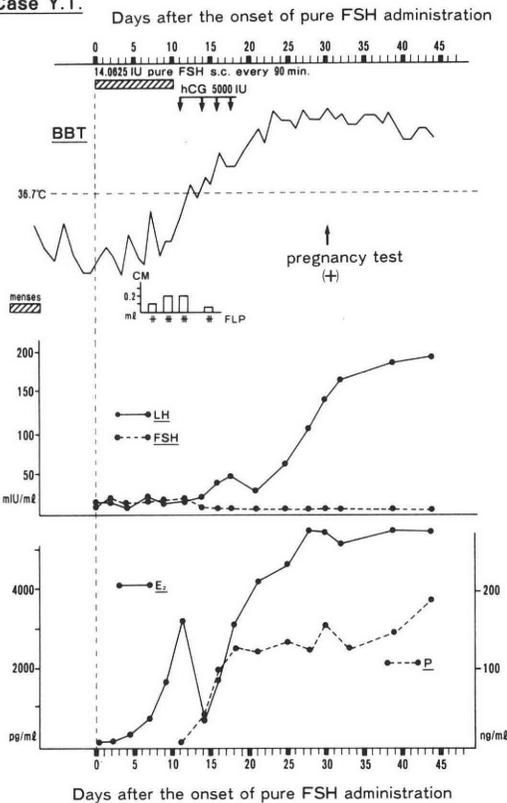


図4 hMG「日研」投与による妊娠例(症例3)の血中ホルモンの経日変動

差はないが、排卵後は Pergonal 投与時の方が全般に高く、+3日では有意に ($P < 0.05$) 高値を示し、+1, +2, +7日では高値傾向 ($P < 0.1$) を示した。一方PはE₂と逆にhMG「日研」投与時の方が高値を示し、+3日 ($P < 0.05$), +4日~8日 ($P < 0.01$)

に有意に高値を示し、+9日 ($P < 0.1$), +11日 ($P < 0.1$) に高値傾向を示した。

図3は同一人(症例1)のhMG「日研」投与時、Pergonal 投与時の血中ホルモン動態を示す。排卵までに要するhMG量は、日研150IU×10日=1500IU、Pergonal: 225IU×10日=2250IUとPergonalの方が多く必要とした。LH, FSHは両者間に差はなく、着床期E₂peak値は日研2558pg/ml、Pergonal 4229pg/mlとPergonalが高く、P peak値はhMG「日研」159pg/ml、Pergonal 51.9ng/mlと日研の方が高値を示した。BBT高温日数は日研17日、Pergonal 18日と差はなかった。

図4は症例3の妊娠時の血中ホルモン動態を示す。hMG「日研」225IUを10日投与し、2.4cmの卵巣2個、2.2cmの卵巣1個を認め、hCG 5000IU投与にて排卵した。排卵後19日に妊娠反応(Test Pack)陽性、着床期(+7日)のE₂: 3051pg/ml、P: 128ng/mlと非妊娠周期の平均と同一であった。

考案

PCOに対する排卵誘発法としては、以前は卵巣楔状切除が広く用いられてきたが、最近では我々は、排卵率が良く、多胎発生がなく、OHSS発生はあっても重篤になりにくいhMGの律動的皮下投与法をPCOに対する排卵誘発法として、もっぱら用いている⁸⁾。近年に至りLH含有の極めて少ないhMG(以下便宜上pure FSHと記載する)をPCOに用いると、有効であるとの報告がみられるようになった^{6,7)}。

表4はこれらの報告のうち、従来のhMG(LH: FSH=1:1)とpure FSHをPCOに用い、両者を比較したものをまとめたものである。これらの報

告のうち、pure FSH と hMG を同一の PCO 症例に行ない比較したのは、著者の報告と苛原の報告のみで、他は対象の症例がすべて一致しているわけではない。また著者は律動的皮下投与方法、他はすべて従来の連日筋注法である。

排卵率に関しては、Seibel⁷⁾、苛原⁹⁾の報告を除いて、他はいずれも 80~90% 近くの高い排卵率を得ており、pure FSH, hMG 間にも差はない。

OHSS 発生率は、著者の報告を除いて、他はいずれも pure FSH の方が OHSS 発生率が低く、しかも発生例はいずれも軽症であったと報告している。しかし OHSS 発生は、症例によって発生しやすい例が存在することは、表 2 で明らかであり、厳密には、著者らの如く同一例で比較すべきであろう。また OHSS の定義が報告者によって一定しないことも問題となる。著者らは OHSS は内診上、鷲卵大以上の卵巢腫大または超音波診断上 5 cm 以上の腫大としたため、かなりの軽症例も含まれたため OHSS 発生率は高率になったものと思われる。藤田ら¹²⁾は、無排卵症全般にわたって hMG「日研」を用い、必ずしも OHSS 発生率は減少しないと述べており、著者らのデータと合わせてみても、OHSS 発生に関しては差はなく、従来の hMG と同様の注意が必要であろう。

PCO に対し hMG (pure FSH, 従来の hMG を問わず) を用いる場合、OHSS は程度の差こそあれ必発と考えてよく、逆に言えば多少とも OHSS 発生しないものは排卵しないと思われる。したがって、最初から OHSS 発生を予想して嚴重に注意しつつ排卵誘発を行なえば、OHSS は副作用と言うべきものではない。

妊娠率に関しては、いずれの報告もまた症例が少なく厳密な比較は困難であるが、著者ら、苛原⁹⁾は、同一例で比較し、従来の hMG で妊娠しなかった例が hMG「日研」で妊娠していることを報告しており、hMG「日研」投与時の E₂、P 動態と考え合わせ注目すべきと思われる。

多胎発生は、楠原ら¹⁰⁾hMG「日研」1例、従来の hMG 2例の多胎を認める他はみられない。従来の hMG による多胎発生率は 20~30%^{13,14)}と極めて高率であるのに対し、pure FSH は極めて低いと考えられる。しかし著者らは Pergonal を律動的皮下投与し、現在まで妊娠例 16 例すべて単胎の成績を得ており^{4,9)}、hMG の種類を問わず律動的皮下投与を行なえば多胎発生は防止できると考えている。

排卵までに必要とする hMG 量は、著者の報告以外は従来の hMG の方がやや少なめであるが有意差はなく、同一人に比較した著者の例では pure FSH の方

が有意に少ない使用量で排卵している。

hMG の投与後の LH, FSH 動態についてはすでに著者らが²⁾、PCO に hMG を律動的に皮下投与すると、LH 低下、FSH 上昇を来し、結果として LH/FSH が正常化することを発表しているが、hMG「日研」でも同様であった。PCO 症例では一般的に LH が比較的高値を示すが、これが hMG 投与によって是正されることが、PCO に対する hMG 療法の高排卵率の原因と考えられる。

pure FSH, hMG 投与時の E₂、P の経日変動をみた報告は著者の他はまだない。hMG「日研」では、Pergonal に比較し E₂ は低く、P は逆に高い。着床期の E₂ 高値についてはすでに著者らが、clomiphene 排卵例において、着床期周辺の E₂ 高値を指摘し¹⁵⁾、これが着床不全の要因になると報告しているが、hMG「日研」にて E₂ 低下、P 上昇の状態は着床にとって極めて良い環境をなすものと推定され、これが hMG「日研」の高妊娠率に結びついたと考えられる。

以上、同一症例において hMG「日研」と Pergonal を比較し、hMG「日研」は排卵率は同等、妊娠率、多胎発生率、排卵までに要する hMG 量、BBT 高温日数において優れたが、OHSS 発生率は低下しなかった。

文 献

- 1) 中村幸雄, 田辺清男, 井合澄子, 吉尾敬徳, 服部政博, 筒 邦彦, 飯塚理八: hMG (Pergonal) の律動的皮下投与による排卵誘発, 産婦の世界, 36: 981, 1984
- 2) Nakamura, Y., Yoshimura, Y., Tanabe, K. and Iizuka, R.: Induction of ovulation with pulsatile subcutaneous administration of human menopausal gonadotropin in anovulatory infertile women, *Fertil. Steril.* 46: 46, 1986
- 3) Nakamura, Y., Yoshimura, Y., Yamada, H., Ubukata, Y., Yoshida, K., Tamaoka, Y. and Suzuki, M.: Clinical experience in the induction of ovulation and pregnancy with pulsatile subcutaneous administration of human menopausal gonadotropin: a low incidence of multiple pregnancy, *Fertil. Steril.* 51: 423, 1989
- 4) 中村幸雄, 山田春彦, 吉田圭子, 生方良延, 南野智徳: hMG の律動的皮下投与方法による排卵誘発—多胎発生の可能性の少ない排卵誘発法, 一臨婦産, 43: 7, 1989
- 5) Nakamura, Y., Yoshimura, Y., Tamaoka, Y., Ubukata, Y., Yoshida, K., Yamada, H., Iizuka, R. and Suzuki, M.: Treatment of polycystic ovarian disease by inducing ovulation with pulsatile subcutaneous administration of human menopausal gonadotropin associated

- with luteinizing hormone-releasing hormone analogue, *Clin. Endocrinol.* 29: 395, 1988
- 6) Venturoli, S., Paradisi, R., Fabbri, R., Magrini, O., Porcu, E. and Flamigni, C.: Comparison between human urinary follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropin treatment in polycystic ovary, *Obstet, Gynecol.* 63: 6, 1984
 - 7) Seibel, M. M., McArdle, C., Smith, D. and Taymor, M. L.: Ovulation induction in polycystic ovary syndrome with urinary follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin, *Fertil. Steril.* 43: 703, 1985
 - 8) 中村幸雄, 吉田圭子, 生方良延, 山田春彦, 南野智徳: 生涯研修セミナー, PCO 治療法, 臨婦産, 42: 851, 1988
 - 9) 苛原 稔: pure FSH 製剤を用いた排卵誘発, *Scope*, 27: 4, 1988
 - 10) 楠原浩二, 渡辺直生, 川勝雅秀, 許山浩司, 松本和紀, 小田原靖, 落合和彦, 岡本愛光, 寺島芳輝: 多嚢胞性卵巣 (PCOD) に対する異なる hMG 製剤の排卵誘発効果の比較, 日不妊会誌, 34: 80, 1989
 - 11) 伊吹令人, 水沼英樹, 田中宏中, 安藤一道, 本庄滋一郎, 五十嵐正雄: 排卵誘発の新しい試み—pure FSH による排卵誘発—, 産婦の実際, 38: 503, 1989
 - 12) 藤田善子, 田坂慶一, 三宅 侃, 谷沃 修: LH 含有の異なる hMG 製剤を用いた排卵誘発成績の比較検討, 日不妊会誌, 34: 68, 1989
 - 13) 倉智敬一, 他 35 名: hMG (Humegon), hCG 療法による排卵誘発効果と妊娠の転帰 (5 年間累計), 産と婦, 50: 2749, 1983
 - 14) Shenker, J. G., Yarkoni, S. and Granat, M.: Multiple pregnancies following induction of ovulation, *Fertil. Steril.* 35: 105, 1981
 - 15) 中村幸雄: シンポジウム, 初期流産管理の基礎, 黄体機能よりみた着床不全—初期流産の研究, 日産婦誌, 29: 1216, 1977

Yukio Nakamura, Haruhiko Yamada,
Keiko Yoshida, Yoshinobu Ubukata,
Tomonori Nanno, Koichi Takahashi
and Masahiko Suzuki

Obstetrics and Gynecology,
Kyorin University School of Medicine,
Tokyo 181, Japan

Yasunori Yoshimura

Obstetrics and Gynecology,
Hujita Gakuen Health University
School of Medicine,
Aichi 480-11, Japan

Five patients with polycystic ovary syndrome (PCO) who failed to conceive in response to pulsatile subcutaneous administration of Pergonal also received pulsatile administration of hMG Nikken. The ovulation rate (91.7%) in the Pergonal regimen did not differ significantly from that in the hMG Nikken regimen (89.5%). Ovarian hyperstimulation syndrome occurred in 20.8% of Pergonal treatment cycles and 31.6% of hMG Nikken. A significant reduction in the average dose of FSH required for achieving ovulation was observed with pulsatile administration of hMG Nikken. Both treatments in patients with PCO were followed by a normalization of luteinizing hormone/follicle stimulating hormone ratio. In the mid-luteal phase, the levels of serum estradiol were significantly lower in the hMG Nikken regimen than those found in the Pergonal regimen, whereas the levels of serum progesterone were greater. Four of 5 patients with PCO became pregnant in response to pulsatile administration of hMG Nikken, and all fetuses were singleton conceptions. The present data indicates that pulsatile subcutaneous administration of hMG Nikken is effective in induction of successful ovulation and establishment of pregnancy in patients with PCO.

(受付: 1989 年 5 月 25 日特掲)

**Comparative study on
clinical effects of hMG
Nikken and Pergonal
for the same patients
with polycystic
ovary syndrome**

バルーン・カテーテルを用いた 子宮卵管造影法の試み

Hysterosalpingography Using a Balloon Foley Catheter

山形県立河北病院産婦人科

酒井伸嘉 中原健次 長谷川剛志
Nobuyoshi SAKAI Kenji NAKAHARA Takeshi HASEGAWA
小田隆晴
Takahare ODA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kahoku Hospital, Yamagata 999-35, Japan

昭和63年1月から10月まで当科外来を訪れた58例の不妊症患者(平均年齢:29.1歳)に対して、新たな注入器具として小児用バルーン・カテーテル(8F)を用いた子宮卵管造影法を試みた。

その結果、本法で検査不能なものは2例(3.4%)しかなく、残りの56例すべてで有用な所見が得られ、さらに、本検査後7例(12.5%)が妊娠した。

本法は、他の注入器具を使用した子宮卵管造影法と比較して、①器具の接着が容易で、検査が短時間にできる。②接着時の疼痛がない。③造影剤の腔への漏出が少ない。④検査後、子宮頸部からの出血がない。⑤より強い加圧が可能である。などの長所があり、不妊症のように卵管の通過性を調べる目的で使用するならば、充分有力な方法であることがわかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 817-820, 1989)

緒 言

子宮卵管造影法は、1914年Rubinによって創案された方法である。その後、注入器具・造影剤・X線装置の三者の進歩改良によって、現在では極めて優れた影像が得られるようになり、婦人科疾患の診断には欠かすことのできない検査法となっている。このうち、注入器具としては、ゴム球式(NTK式)注入器、ねじ込み式注入器、外子宮口鉗圧型(吉田式)注入器などが一般には使用されている。従来、われわれの病院も、子宮卵管造影法の注入器具として鉗圧型注入器を使用していたが、腹腔鏡検査において卵管通過性を確認したり、大量通水を行なう際、バルーン・カテーテルを用いると、色素等の子宮内腔への注入が容易で、強い圧もかけられる印象があっ

たため、この注入方法を子宮卵管造影法に応用してみた。

方 法

注入器具として新たに用いたものは、小児用バルーン・カテーテル(8F)(図1)である。まず、クスコ腔鏡をかけ、腔内を消毒後、長ピンセットでこのカテーテルを外子宮口より子宮内腔に挿入した。通常は抵抗なく挿入可能であるが、挿入困難の場合は、塚原鉗子で子宮腔部を前方に引きながら挿入すると容易に入ることが多い。カテーテル挿入後、1.5~2.0mlの滅菌食塩水でバルーンをふくらませて固定し(図2)、カテーテルを手前に引きながら内子宮口を閉鎖しつつ造影剤を注入した。造影剤は従来どおりヨード38w/w%のリピオドール・ウルトラ

フルイドを用いた。また、卵管の通過が確認されたものでは、24 時間後撮影を行ない、造影剤の腹腔内への拡散状態を調べた。

症 例

患 者：30 歳，女性

主 訴：挙児希望

既往歴・家族歴：特記すべきことなし

月経歴：初経は 13 歳で，その後の月経は順調(28 日型，持続 5 日間，中等量)，最終月経は昭和 63 年 1 月 23 日より 4 日間

妊娠・分娩歴：1 妊 1 産

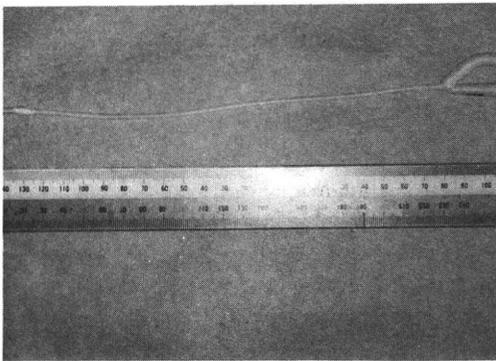


図 1 小児用バルーン・カテーテル (8 F)

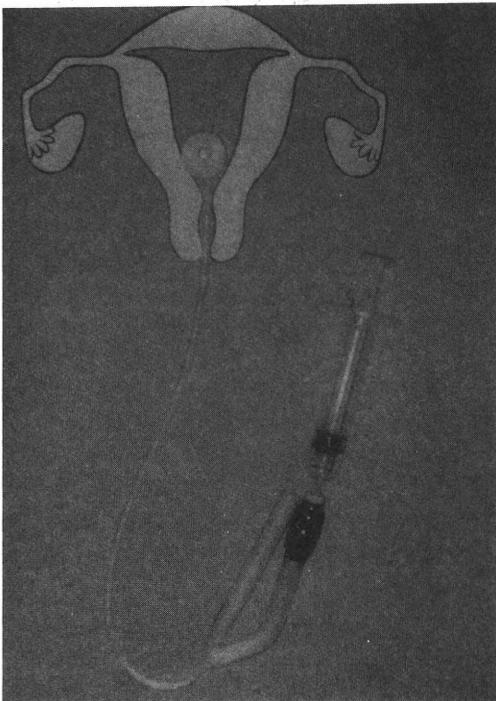


図 2 バルーン・カテーテルの固定

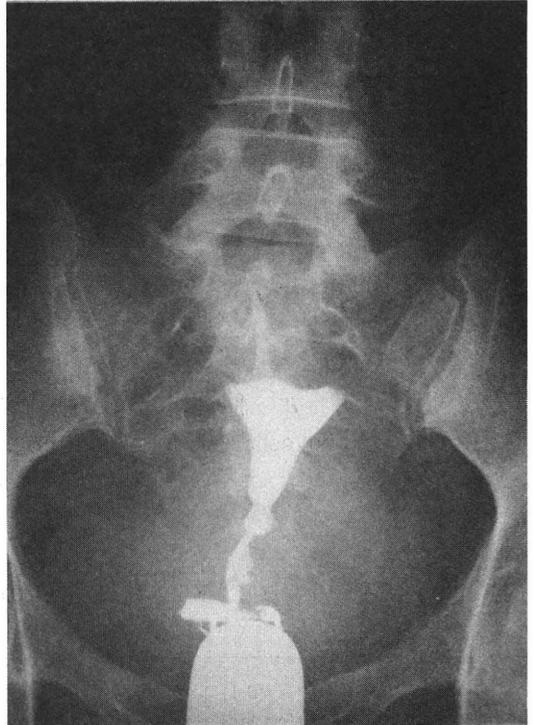


図 3 鉗圧型注入器による子宮卵管造影図

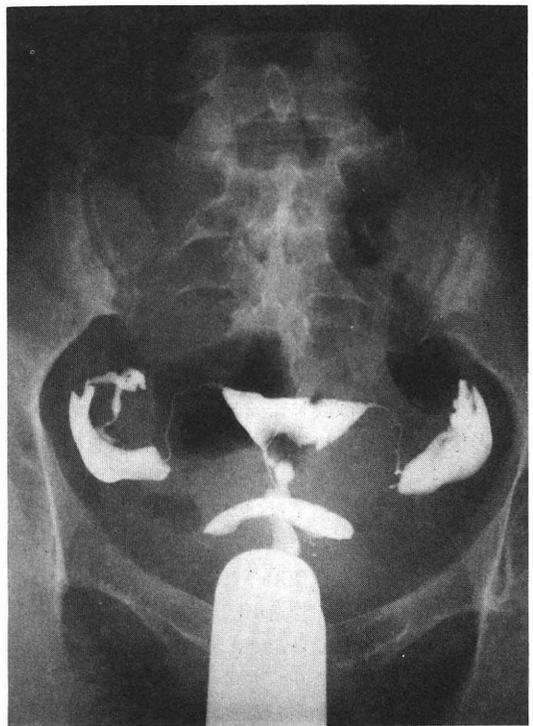


図 4 バルーン・カテーテルによる子宮卵管造影図

現病歴：昭和 59 年 4 月 (27 歳) に結婚。昭和 60 年 1 月 3 日に妊娠 34 週にて胎児仮死のため緊急帝王切開となり、男児、2,330 g を早期産した。産後経過は良好で、月経も順調に発来するようになったが、その後 2 年半あまり妊娠しないため、昭和 62 年 7 月 20 日当科受診した。BBT は 2 相性であるが、ホルモン検査で血中プロラクチン値は、15 ng/ml とやや高く、正プロラクチン血性不妊症の診断のもと、パーロテル内服治療を開始した。

検査所見：昭和 63 年 1 月 7 日、卵管通過性を調べる目的で子宮卵管造影法検査を従来の鉗圧型注入器を用いて施行した。このとき、卵管は両側とも起始部からなかなか造影されず、さらに加圧すると造影剤は腔内のみ漏出した (図 3)。翌日の 24 時間後撮影でも腹腔内への造影剤の拡散はまったく認められず、両側卵管閉塞ならびに頸管無力症を強く疑った。

昭和 63 年 1 月 28 日、新たにバルーン・カテーテルを用いて子宮卵管造影法検査を再度施行した。造影剤を 3 ml 注入した時点で抵抗強くなるも、さらに加圧し両側の卵管とも通過性を確認した (図 4)。翌日の 24 時間後撮影で、腹腔内への造影剤の拡散は良好であった。

なお、当患者は 2 回目の検査直前の 1 月 23 日より 4 日間を最終月経とし、その後、無月経となり、一時切迫早産のため入院加療も行なったが、10 月 10 日に妊娠 37 週にて男児、2,718 g を自然分娩した。

成 績

以上のような症例を含めて、昭和 63 年 1 月から 10 月までの期間中にバルーン・カテーテルを用いた子宮卵管造影法検査を 58 例に試みた。対象はすべて不妊症患者であり、卵管の通過性の有無を調べるために行なわれた。患者の平均年齢は 29.1 歳 (22~40 歳) であった。58 例中 2 例 (3.4%) が検査不能であったが、そのうち 1 例は子宮口の極度の拡大によりカテーテルが自然抜去したためであり、もう 1 例は子宮口狭窄によりカテーテルの挿入ができなかったためであった。これら 2 例は、すぐに鉗圧型注入器に変更して再度検査を試み、所見を得ている。検査が可能であった 56 例の検査所見をみると、正常所見の得られたものが 24 例 (42.9%)、一側または両側の卵管が狭窄しているものが 18 例 (32.1%)、一側または両側の卵管が閉塞しているものが 12 例 (21.4%)、子宮内腔の拡大、欠損、弓状子宮など子宮内腔に異常を認めるものが 12 例 (21.4%)、24 時間後撮影で造影剤の腹腔内拡散が不良なものが 12 例 (21.4%)

であった。また、本症例のように検査後妊娠したものが 7 例 (12.5%) あった。

考 察

バルーン・カテーテルを用いた子宮卵管造影法は、1959 年、Calandra ら¹⁾によって初めて施行されて以来、海外ではその有用性が多く報告されており、また、より操作し易いように独自で改良し広く臨床応用しているところもある²⁻⁵⁾。本邦においても、バルーン・カテーテルを使用して本検査を行なっている施設が存在することは推測されるが、その経験例や他の注入器具との比較などについて報告したものは少ない^{6,7)}。

今回のわれわれの経験より、バルーン・カテーテルを用いた子宮卵管造影法は、他の注入器具を使用した場合と比較して、次のような長所および短所があるように思われる。すなわち、長所としては、①器具の接着が容易なため、検査が短時間にできる。カテーテルの挿入だけなら外来でも可能なため、そのあと検査室では即座に造影剤の注入および撮影が行なえる。②他の注入器具のように子宮口にねじ込んだり、子宮頸部を挟んで固定する必要がなく、したがって、器具の接着時の疼痛が極めて少ない。③造影剤注入時の加圧によりバルーンは内子宮口に押されてさらに強く固定するため、造影剤の腔への漏出が少ない。④より強く加圧できる。なお、②~④の点ではバルーンに注入する生食水の量が重要となるが、バルーンのふくらませ方が足りないとかテーテルが腔内に脱出したり、造影剤が漏出して加圧できなくなり、逆にふくらませ過ぎると疼痛を訴えるようになることを考慮すれば、われわれの経験からその量を 1.5~2.0 ml にするのが最良であるとの結論に達した。⑤ゴム球式や鉗圧式注入器のように子宮頸部に固定することで組織を損傷したり、検査後、固定部から出血したりすることがない。本法を施行した例では、24 時間後撮影のため再来したときに出血を認めるものはまったくなかった。反面、短所としては、①バルーン自体の存在により、子宮下部および頸管の所見が不明瞭となる。この点で、頸管無力症や粘膜下筋腫の検査に不適である。②子宮口の狭窄や変形した例ではカテーテルの挿入が困難である。③子宮口の開大した例ではカテーテルが自然脱出してしまふ、などがあげられる。

しかしながら、対象を不妊症患者に限り、卵管の通過性の有無を調べる目的で本法を施行するならば、子宮下部や頸管の詳細な所見は必ずしも必要ではなく、また、実際、他の短所が存在していたため検査

不能となった症例は 58 例中わずか 2 例 (2.3%) に過ぎず、これらの短所以上に充分意義のある検査方法であるといえよう。むしろ、先に述べた症例のように、従来の鉗圧型注入器で造影されなかったものが本法にて造影可能となった例も他に何例か経験でき、多くの長所を考慮すれば、本法に対して良い印象を得られた。また、本検査後に妊娠に至った例が 7 例 (12.5%) もあったが、これはより加圧できることで軽度の卵管狭窄など改善されたことが一因をなしているためかもしれない。

現在、われわれは、このような有用性を加味して、通水法の際にもバルーン・カテーテルを使用するようになったが、本法は今後の不妊症患者の診断および治療に有力な手技となることが考えられる。

結 語

バルーン・カテーテルを用いた子宮卵管造影法を試みたので、その経験を報告した。(なお、本論文の要旨は第 33 回日本不妊学会学術講演会(京都)1988 年 11 月 16 日において発表した。)

文 献

- 1) Calandra, D., Gluck, J. C. and Calandra, N.: Hysterosalpingography and colpohysterosalpingography: New technics and modifications, *Obstet. Gynecol.* 13: 563, 1959
- 2) Cameron, D. D., Stirna, M. J. and Henry, S.: Hysterosalpingography using a Foley catheter, *Radiology*, 131: 542, 1979
- 3) Spring, D. B., Wilson, R. E. and Arronet, G. H.: Foley catheter hysterosalpingography: A simplified technique for investigating infertility, *Radiology*, 131: 543, 1979
- 4) Austin, R. M., Sacks, B. A., Nowell, M. and Feital, C.: Catheter hysterosalpingography, *Radiology*, 151: 249, 1984
- 5) Sholkoff, S. D.: Ballon hysterosalpingography

catheter, *A. J. R.* 149: 995, 1987

- 6) 中村幸雄: バルーン式子宮卵管通気, 造影法. 日不妊会誌(第 97 回日本不妊学会関東地方部会講演抄録), 33: 210, 1988
- 7) 和田和孝: HSG, 卵管通水用バルーンカテーテルの試作. 日不妊会誌(第 106 回日本不妊学会関西地方部会講演抄録), 33: 133, 1988

Hysterosalpingography using a balloon Foley catheter

Nobuyoshi Sakai, Kenji Nakahara,
Takasi Hasegawa and Takahare Oda

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kahoku Hospital, Yamagata 999-35, Japan

A pediatric balloon Foley catheter (8-French) was used for hysterosalpingography (HSG) in 58 women, who visited our infertile clinic during the period of January to October in 1988.

As a result, in all cases except two (3.4%), we could perform this examination without any troubles and obtain favorable images, and 7 patients had been pregnant (12.5%) after the examination.

The balloon Foley catheter offers several advantages over the other metallic cannulas as follows:

1. Simplicity and rapidity because special instruments are not necessary.
2. Only slight discomfort from distention of balloon, but no pain.
3. Little contrast medium leaks into the vagina.
4. No cervical trauma that may cause bleeding.
5. With higher pressure, contrast medium can be introduced into the uterus.

For these reasons we think that this method is available for HSG, especially in the cases of infertile women.

(受付: 1988 年 12 月 16 日)

無症状子宮外妊娠早期発見のための 子宮内膜吸引細胞診

Aspiration Biopsy Cytology of the Endometrium for the Early Detection of the Ectopic Pregnancy

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

松島 弘 充 齊 藤 真 一 百 瀬 和 夫
Hiromitsu MATSUSHIMA Shinichi SAITO Kazuo MOMOSE

1st Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

東邦大学医学部第2産科婦人科学教室

中 込 才 川 村 良 岩 城 章
Hitoshi NAKAGOMI Ryo KAWAMURA Akira IWAKI

2nd Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

カーネギ産婦人科

印 牧 義 孝 遠 藤 誠
Yoshitaka KANEMAKI Makoto ENDO

Obstetrics and Gynecology,
Clinic Kanegi Hospital, Numazu, Shizuoka 410, Japan

昭和61年9月から63年8月までの2年間の不妊症患者のうちから、子宮外妊娠17例、流産50例に、子宮内膜吸引細胞診を施行し、細胞像を検討した。

1. 流産例における子宮内膜吸引細胞診の trophoblast の陽性率は92.0% (46/50)であった。
2. 流産例における完全流産は8.0% (4/50)で、子宮内膜吸引細胞診の trophoblast は全て陰性で、細胞像は増殖期であった。
3. 流産例で肉眼的に絨毛成分を認識できない場合に、子宮内膜吸引細胞診は絨毛の確認に有用であった。
4. 外妊例の子宮内膜吸引細胞診では trophoblast は全例に認められず、細胞像は分泌期であった。
5. 子宮内膜吸引細胞診は外妊例、とくに未破裂無症状子宮外妊娠の早期診断に極めて有用であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 821—826, 1989)

緒 言

子宮外妊娠は、ごくありふれた疾患であり、さら

に一側の卵管妊娠の後に、他側卵管妊娠を反復し易いことがよく知られている。

従来は、母体の生命を救うため卵管切除、時には

患側付属器切除も止むを得ないこととされていた。もし、未産婦の反復外妊で、残存する患側卵管切除を行えば、体外受精の適応にならざるをえない。また外妊時、腹腔内出血が多量の場合、患側のみならず健側卵管にも癒着や閉塞が生じ、健側卵管に対してもマイクロ手術を要することも少なくない。

当教室における昭和 56 年から 62 年までの 7 年間の子宮外妊娠数は 116 例であった。このうち、未産婦の外妊は 53 例(45.7%)、1 回経産の外妊は 34 例(29.3%)で、この 2 つで全体の 75% を占めた(表 1)。

このようなことから、未産はもちろん、例え 1 児があっても、挙児希望ならば、卵管破裂に対してマイクロ保存手術を施行している。ショック状態下の卵管破裂例の端々吻合術は、手技的にかんりの困難を伴う。しかし未破壊の卵管妊娠ならば、保存的手術が比較的容易である。そこで増潤式ポリチューブ管による子宮内膜吸引細胞診を行ない、その細胞像より流産および子宮外妊娠の診断への有用性が確認されたので、若干の考察を加え報告する。

対象および方法

対象は昭和 61 年 9 月から 63 年 8 月まで 2 年間に於ける不妊外来患者で、基礎体温、尿中または血中ホルモン検査、超音波断層法による卵胞計測などにより、排卵日が予測されている症例とした。流産は 50 例で、稽留流産、進行流産および不全流産を対象とし、人工妊娠中絶は除外した。子宮外妊娠は 17 例

表 1 子宮外妊娠の挙児数別発生頻度

年度	0	1	2	3	計
1981	6	6	4	1	17
2	5	5	4	2	16
3	9	2	3	0	14
4	11	6	3	0	20
5	6	9	3	0	18
6	6	4	1	1	12
7	10	2	6	1	19
計	53	34	24	5	116
%	45.7	29.3	20.7	4.3	

表 2 子宮内膜吸引細胞診の適応

1. BBT で高温相が 21 日間以上持続
2. 尿妊娠反応陽性
3. 経腔超音波断層法にて子宮内 GS 陰性
4. Douglas 窩穿刺陰性または不確定

であり、全例に子宮内膜吸引細胞診を行ない、その細胞像を比較検討した。

不正出血、腹痛などの症状が無い場合、子宮外妊娠の早期診断のために、子宮内膜吸引細胞診の適応を表 2 のように決めた。

1. 基礎体温で高温相が 21 日間以上持続、
2. 尿妊娠反応陽性(尿中 hCG 50 iu/ml 以上)、
3. 経腔超音波断層法で子宮内 GS 陰性、(陰性の場合 3 日後に必ず再検を行なう)、
4. Douglas 窩穿刺陰性または不確定。

以上の場合、外妊を疑い、増潤式ポリチューブ管で子宮内膜を吸引し、直ちに Papanicolaou 染色を施して、60 分以内に鏡検し、細胞像を判定した。

結果

1. 流産における子宮内膜細胞診

子宮外妊娠例を除いた流産例は 50 例で、子宮内膜吸引細胞診による trophoblast の陽性率は 92.0% (46/50) であった。妊娠 7 週以後の流産例では全例に trophoblast が確認された。陰性例は 4 例で、妊娠週数は 6 週が 1 例、5 週が 2 例、4 週が 1 例であり、いずれも子宮内に超音波断層法で GS は確認できず、尿中 hCG は 200 iu/ml 以下であった。陰性例の細胞像は分泌期より増殖期を呈していた(表 3)。

2. 子宮外妊娠における子宮内膜細胞診

過去 2 年間の不妊症からの子宮外妊娠は 17 例で、全例が子宮内膜吸引細胞診で trophoblast 陰性であった。外妊診断後の開腹手術では外妊部位の touch smear で全例に trophoblast が確認された(表 4)。

卵管破裂は 5 例で、8 週以後の症例に認められ、部位は 4 例が卵管膨大部、1 例が卵管峽部であった。17 例中、卵管マイクロ手術の既往のある症例は 4 例(23.5%)であったが、いずれも破壊に至らなかった。

表 3 自然流産における子宮内膜吸引細胞診

妊娠週数	症例数	trophoblast 陽性	%
4	2	1	50
5	4	2	50
6	9	8	89
7	7	7	100
8	9	9	100
9	8	8	100
10	4	4	100
11	4	4	100
12	3	3	100
計	50	46(92.0%)	

表4 不妊患者における子宮外妊娠17例(1986.9~88.8)

	症例数	子宮内膜 trophoblast 陰 性	術中外妊部 trophoblast 陽 性	診 断 妊 娠 週 数
破 裂 例	5	5	5	8
未破裂例	12	12	12	6

今回 17 例の外妊中 16 例にマイクロ保存手術を施行した。マイクロ保存手術を行なわなかった 1 例は 1 回経産婦で、妊娠 8 週の破壊例であり、全身状態が悪かったので、患側卵管切除を行なった。

外妊 17 例中、不正出血や腹痛が共に認められず、さらにダグラス窩穿刺陰性等、全く無症状の子宮外妊娠が表 5 のように 3 例あった。この無症状子宮外妊娠 3 例を略述する。

症 例

症例 1. 33 歳, 1 妊, 未産婦, 昭和 50 年, 某外科で外妊のため右付属器切除術を施行した。その後、不妊症で当院受診, 左卵管閉塞の診断にて昭和 62 年 6 月, 左卵管開口術を行なった。術後, 人工授精 3 回目で妊娠したが, 妊娠 6 週に至るも子宮内に GS が認められないので, Douglas 窩穿刺を行なったところ, 陰性であったが, 外妊が強く疑われ, 子宮内膜吸引細胞診を行なった。その細胞像は分泌期で, trophoblast は認められなかった。開腹所見は未破壊の左卵管膨大部妊娠であった。

症例 2. 24 歳, 1 妊, 未産婦, 昭和 60 年, 右卵管膨大部妊娠で右卵管開口術を施行した。不正出血や腹痛などの症状はなかったが, 妊娠 6 週で子宮内に GS が認められなかった。Douglas 窩穿刺を行なったところ陰性であったが, 外妊の可能性が強かったので, 子宮内膜吸引細胞診を行なった。その細胞像は分泌期で trophoblast は認められなかった。開腹所見は未破壊の左卵管膨大部妊娠であった。

症例 3. 34 歳, 1 妊 1 産婦, 昭和 58 年両側卵管閉塞の診断にて, 両側卵管端々吻合術を施行した。昭和 60 年 9 月に帝王切開術で第 1 児を出産した。今回, 妊娠 6 週に至るも子宮内に GS がなく, 左卵管に GS 様所見が認められた。Douglas 窩穿刺は陰性で, 不正出血や腹痛などの症状も認められなかったが, 外妊の疑いにて子宮内膜吸引細胞診を行なった。細胞像は分泌期で trophoblast は認められなかった。開腹所見は未破壊の左卵管峡部妊娠であった。

3 症例とも, 外妊の診断にて開腹した。各々の卵管は直径 20~25 mm に腫脹していたが, 未破壊の状態だったので, マイクロ下に保存手術を施行すること

表 5 無症状子宮外妊娠

症例	既往分娩	診 断 妊 娠 週 数	子宮内 GS	Douglas 穿 刺	子宮内膜 trophoblast
1	0	6	(-)	陰性	(-)分泌期
2	0	6	(-)	陰性	(-)分泌期
3	1	6	(-)	陰性	(-)分泌期

ができた。また術中の外妊部位 touch smear では、3 症例とも trophoblast を確認できた。

外妊例の吸引細胞診における子宮内膜細胞像は、写真 1 のように、いずれも分泌期を呈しており、増殖期と比較して蜂巢状で、グロマチンは淡染性で微細顆粒状となっている。

外妊部位の touch smear では、写真 2 の如く syncytiotrophoblast の核は類円形でほぼ均等な大きさで、核縁は淡く均一、クロマチンは淡く細網状、おたまじゃくし型の末端部分では顆粒状として見られ、核小体は中型、円型赤色のものが 1 個見られた。また写真 3 のように一部に胞体内空洞が見られた。

cytotrophoblast の細胞質は、写真 4 のように中等度の好塩基性を呈し、核はほぼ類円形で時々大小不同が見られる。核縁は均一、クロマチンは淡く、細網状で一部糸状部が強調され、シワ状に見られた。核小体は小型~中型、円形が 1 個で赤色が優勢であった。

考 察

子宮内容清掃術は、稽留流産、進行流産または人工妊娠中絶の処置として行なわれている。その際、絨毛成分の確認は、子宮内妊娠の判定に非常に重要となってくる。Lindhahl¹⁾によると、自然流産で絨毛成分と肉眼的に確認できた症例は 272 例中 135 例 (49.6%) であり、絨毛を肉眼的に確認できず、後に組織学的に絨毛成分を確認した症例は 84 例 (30.9%) と述べている。海野²⁾は人工妊娠中絶 162 例中 161 例 (99.4%) に中絶術後の細胞診 (Papanicolaou 染色) で、syncytiotrophoblast を確認し、流産例においても 91 例中 88 例 (96.7%) に trophoblast を確認している。今回われわれは流産例に増殖式ポリチューブ管による子宮内膜吸引細胞診を行なったが、50 例中 46 例 (92.0%) に trophoblast を確認した。自然流産とくに絨毛成分がほとんど排出された流産や、絨毛成分の変性、壊死などが起こっている場合、肉眼的には絨毛成分の判定が極めて困難になってくる^{1,3)}ので、子宮内膜細胞診による trophoblast の確認が非常に重要である。

子宮内容膜除去術時の内容物の touch smear で

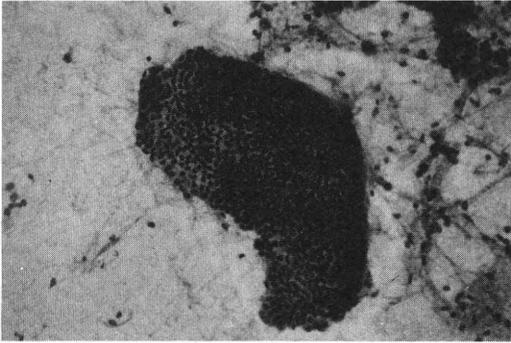


写真1 外妊例の子宮内膜細胞
(分泌期像)
〔Papanicolaou 染色 ×100〕

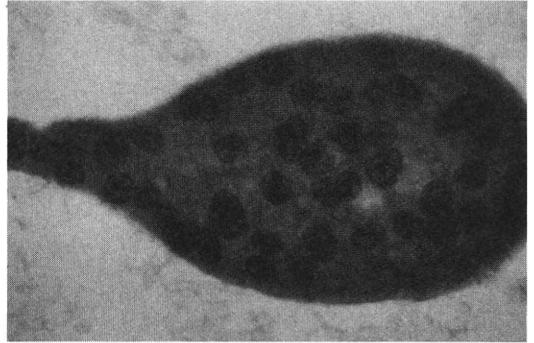


写真2 外妊部の擦過細胞
(syncytiotrophoblast)
〔Papanicolaou 染色 ×400〕

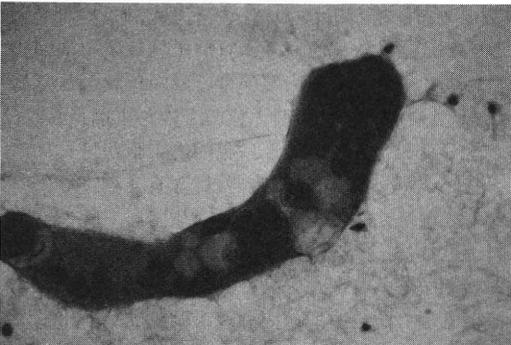


写真3 syncytiotrophoblast の胞体内空隙形成
〔Papanicolaou 染色 ×400〕

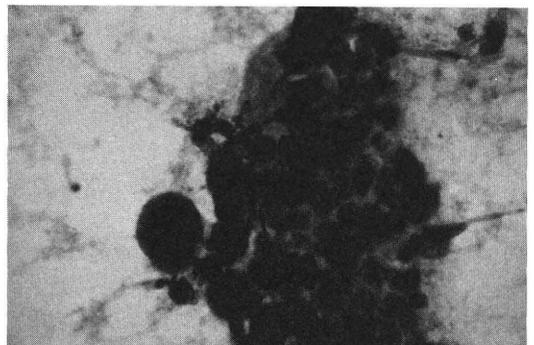


写真4 外妊部の擦過細胞
(cytotrophoblast)
〔Papanicolaou 染色 ×400〕

は、必ずしも正確に絨毛成分を touch しているとは限らないので、子宮内腔の全周から細胞を吸引採取する目的で、増測式ポリチューブ管を用い子宮内膜を採取している。

子宮内膜吸引細胞診で trophoblast が陰性の場合には外妊を疑い、入院して2～3日後に細胞診を再検した。不全流産例の中には、細胞診の再検で trophoblast が陽性となった症例も数例認められているので、手技的な問題や子宮の位置・大きさ、子宮奇形の有無などへの細い注意が必要である。また採取細胞数としては子宮内膜ブラシの方が数多く取れるため、細胞の重積性などを考慮し、今後検討していきたいと考えている。

今回の対象は不妊症患者で治療後、妊娠に至った症例であり、基礎体温、ホルモン検査、および経膈超音波断層法などで排卵日が予測できるものとした。経膈プローブによる超音波断層法では、妊娠5周で子宮内にGSがほぼ確認できるため⁴⁾妊娠6周までにGSを確認できず、外妊の疑いが強い場合は子宮内膜

吸引細胞診を施行した。子宮外妊娠は妊娠8週以後になると、卵管の破壊を多く認める^{5,6)}ので、より良い条件下で外妊のマイクロ保存手術を行なうためには、できるだけ早期の発見が必要であり、それによって術後の卵管の疎通性のみならず、機能面でもより良好な再構築が期待できる。

子宮外妊娠の17例では、子宮内膜吸引細胞診の trophoblast は全例に認められず、細胞像は分泌期像であった。子宮内妊娠後、完全流産の経過をたどったと思われる症例は50例中4例(8.0%)であったが、trophoblast は認められず、細胞像は増殖期に強く傾いていた。これらの事実からも、外妊や完全流産を診断する上で1つの補助診断となり得る。蜂屋ら⁷⁾は外妊の子宮内膜では、外妊中絶後に新生内膜の発見が認められるが、子宮内妊娠の完全流産時の内膜診と比較すると、発現率は低く、かつ遅延していると報告している。また外妊中絶後に発現する新生内膜には、残存する progesterone 活性のため、腺の分泌性変化が認められ、時には核下空隙の発現もあ

り、極めて特徴的であると述べている。またより正確な補助診断法の確立のためには、頸管妊娠、卵管間質部妊娠や双角子宮の片側子宮内妊娠などの子宮奇形の症例における子宮内膜吸引細胞診を検討していく必要がある。

子宮外妊娠の診断、治療としては、現在、腹腔鏡検査が広く行なわれており、内視鏡的操作による外妊部の摘出、あるいは外妊部への MTX の局注または全身投与方法などが行なわれている。しかし小中規模の病院などでは、設備面や人員面などから、開腹手術がなお主流となっている。子宮外妊娠に子宮筋腫や卵巣嚢腫などの腹腔内腫瘤を合併した場合や、腹腔内癒着が強度の場合、内視鏡的操作が難しい症例もある。また外妊部の卵管の腫脹が直径 15 mm 以下の場合では、内視鏡的に診断が難しいこともあり、ここに外妊早期発見の補助診断法として、子宮内膜吸引細胞診の意義がある。

不妊症の原因として卵管因子は高い割合を占めており、卵管閉塞に対してはマイクロ手術が積極的に行なわれている。しかし術後の外妊の発生率が高いため、外妊の早期発見が重要となってくる。今回の無症状子宮外妊娠の 3 症例は、いずれも卵管に対するマイクロ手術の既往があり、その中でも 2 例は外妊の既往があった。しかし患者の理解もあり、妊娠診断後、度々外来受診し、慎重に経過を観察することができ、子宮内膜細胞診も行ない、外妊を極めて早期に発見しえた。

蜂屋ら⁷⁾は、子宮外妊娠時の子宮内膜組織診で絨毛成分の存在のみならず、外妊子宮内膜の示す多彩な病像を病理組織学的に分析し、その診断的意義を報告している。また斉藤ら⁸⁾は子宮内膜間質細胞に注目し、その形態学的変化や PAS 染色による細胞像から、月経周期、妊娠やホルモン異常の推察の可能性を述べている。今回われわれが施行した増潤式ポリチューブ管による子宮内膜吸引細胞診は、迅速病理組織検査と比較して手技的に簡単で、低価格であり、結果も 1 時間以内で判定できる点などから、流産例の絨毛成分の確認あるいは子宮外妊娠の補助診断法として極めて有用と考えられる。

結 語

不妊外来患者のうちから、子宮外妊娠 17 例、流産 50 例に、子宮内膜吸引細胞診を施行し、その細胞像を検討した。内膜細胞診は肉眼的に絨毛成分を認識できない流産例や、外妊とくに未破裂無症状卵管妊娠の早期診断に極めて有用と考えられた。

(本論文の要旨は第 33 回日本不妊学会総会において

発表した。)

文 献

- 1) Lindahl, B. and Ahlgren, M.: Identification of chorion villi in abortion specimens, *Obstet. Gynecol.* 67:79, 1986
- 2) 海野 均, 小川英之: 子宮内容除去術における細胞診を用いた絨毛成分の確認, *産婦の実際*, 37: 1087, 1988
- 3) Jacobson, S. E.: Cytologic identification of trophoblastic epithelium in products of first-trimester abortion, *Obstet. Gynecol.* 66:124, 1985
- 4) 穂垣正暢: 超音波電子スキャンによる子宮外妊娠の診断, *産婦の実際*, 28: 235, 1979
- 5) 島 功, 池野暢子: 子宮外妊娠の統計的考察, *医療*, 39: 961, 1985
- 6) 島 功, 池野暢子: 子宮外妊娠の超音波断層所見とその臨床的意義, *医療*, 39: 954, 1985
- 7) 蜂屋祥位置, 中島敏男: 子宮内膜診による子宮外妊娠の診断, *産婦の実際*, 28: 245, 1979
- 8) 斉藤多紀子, 池田栄雄: PAS 染色の性周期ならびに妊娠時における内膜間質細胞の細胞学的研究, *臨床病理*, XXVI: 967, 1978
- 9) Beckmann, C. R. B.: Ultrasonographic diagnosis of interstitial ectopic pregnancy, *J. Clin. Ultrasound.* 12:304, 1984

Aspiration biopsy cytology of the endometrium for the early detection of the ectopic pregnancy

Hiromitsu Matsushima, Shinichi Saito and Kazuo Momose

1st Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

Hitoshi Nakagomi, Ryo Kawamura and Akira Iwaki

2nd Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

Yoshitaka Kanemaki and Makoto Endo

Obstetrics and Gynecology Clinic Kanegae Hospital, Numazu, Shizuoka 410, Japan

We performed aspiration biopsy cytology of the endometrium in fifty spontaneous abortion cases

and in seventeen ectopic pregnancy cases among our sterility patients during the two-year period from September, 1986 to August, 1988.

1) Spontaneous abortion cases accounted for 92.0% (46/50). These cases showed positive reaction of trophoblastic cells by aspiration biopsy cytology of the endometrium.

2) Complete abortion cases accounted for 8.0% (4/50). These cases showed negative reaction of trophoblastic cells by aspiration biopsy cytology of the endometrium. Endometrial cells in these cases were found to be in the proliferative phase.

3) All 17 ectopic pregnancy cases showed negative

reaction of trophoblastic cells by aspiration biopsy cytology. Endometrial cells in these cases were found to be in the secretory phase.

4) Aspiration biopsy cytology of the endometrium was found to be useful for diagnosis of ectopic pregnancy and more useful in unruptured symptomless cases. Moreover, it was very useful for diagnosis of villi, especially in cases with macroscopically unclear villi.

(受付: 1989年1月10日)

膣欠損症に対する造膣術の検討

Studies of Vaginal Reconstructin for the Congenital Absence of Vagina

東北大学医学部産婦人科学教室

角田千恵子 星合 昊 深谷孝夫
Chieko KAKUTA Hiroshi HOSHIAI Takao FUKAYA
戸沢秀夫 矢嶋 聡
Hideo TOZAWA Akira YAJIMA

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

東北大学医学部形成外科学教室

夏井 睦
Makoto NATUI

Department of Plastic and Reconstructive Surgery
Tohoku University School of Medicine, Miyagi 980, Japan

先天性膣欠損症に対する治療法としての造膣術には、現在まで多くの術式が報告されている。われわれは、昨年1年間に、Mayer-Rokitansky-Küster 症候群4例、真性膣欠損1例、子宮溜血腫を伴った膣横隔膜1例に対して、遊離植皮を用いた McIndoe 変法、持続圧迫法、大腿薄筋皮弁による有茎植皮法、膣横隔膜切開および、膣、頸管形成術などを施行し、その優劣を検討した。われわれの施行した全層植皮による McIndoe 変法は、瘢痕狭窄、浅在化を起さぬようプロテーゼ装着を指導し、根気強い術後管理を行なえば、有用な術式であると思われる。また、機能性子宮を有する場合は、将来の妊孕性の回復を期待し、造膣術をも兼行する方法を基本的にとっている。先天性膣欠損症の患者の管理に関しては、患者が思春期の精神的に不安定な時期にあり、第1に病名を告げる時期と方法、第2に手術の時期に関して慎重に判断し、患者の円滑な社会復帰を助けると共に、よりよい患者の管理方法を求めてゆきたいと考えている。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 827—831, 1989)

緒 言

膣欠損は、Müller 管ならびに泌尿生殖洞と Müller 管の接合部の形成異常のために生じ、頻度は4000¹⁾~5000 人²⁾に1人とされている。そのうち大部分は正常の卵巢機能を持ちながら、子宮は痕跡的である Mayer-Rokitansky-Küster 症候群 (以下 M-R-K と略す) が占め、約5%に機能性子宮を伴う群がある。また、膣横隔膜は、膣の上1/3と中1/3の境界で閉

鎖がみられ、Miiller 管と泌尿器生殖洞の癒合障害により発生する。われわれは、昭和62年1月より昭和62年12月までの1年間にMRK 4例、機能性子宮を有する真性膣欠損1例を経験し、造膣術を施行した。また子宮溜血症を伴った膣横隔膜1例には、膣横隔膜切開および膣頸管形成術を施行し、その後、配偶子卵管内移植術 (GIFT) により妊娠した例を経験したので、文献的考察を加えて報告する。

表1 症例1～4—Mayer-Rokitasky-Küsten Syndrome

M-R-K	腹腔鏡施行日	手術日 術式	術後性交
症例 1 46XX	S61年9月(21歳) 子宮(-) 卵巣卵管正常	S62年6月 McIndoe 全層植皮	6か月
症例 2 46XX	S62年1月(19歳) 子宮(-) 卵巣卵管正常	S62年6月 McIndoe 全層植皮	7か月
症例 3 46XX	S62年8月(16歳) 子宮(-) 卵巣卵管正常	腹腔鏡施行時示指 圧迫→狭窄	パートナーなし
症例 4 46XX	S62年12月(18歳) 子宮(-) 卵巣卵管正常	腹腔鏡施行時示指 圧迫→狭窄 造腔術予定	パートナーなし

表2 Mayer-Rokitansky-Küster Syndrome

1. 先天性腔欠損。
2. 両側性芽状痕跡子宮 (bilateral rudimentary buds)。
3. 正常の卵管, 卵巣を有する。
4. 正常の二次性徴を有する。
5. 正常の内分泌機能を有し、染色体分析では46XXの正常女型を示す。

表3 症例5—機能性子宮をとまなう真性腔欠損症

症例5 46XX S45年5月19日生
 S61年3月 子宮溜血症にて血腫除去術
 S61年4月 腹腔鏡施行
 腔欠損, 重複子宮 (左側高度萎縮, 右側溜血症)
 右卵管血腫, 両側卵巣正常, 右腎無形成
 ダナゾール400mg服用
 S62年3月 大腿薄筋皮弁による有茎植皮
 4月 皮弁表面皮膚壊死
 7月 足底部からの分層植皮
 8月 下腹部からの全層植皮
 S63年1月 レーザーによる子宮口開通
 3月 プロテーゼ装着せず 月経痛なし

症 例

1) 症例1～4 (表1)

症例1～4は、いずれも原発無月経を主訴に来院した。4症例とも、腔欠損, 第二性徴, 内分泌機能, 腹腔鏡所見全てにおいてM-R-Kの定義を満していた(表2)。

症例1および症例2は、下腹部より採皮し、全層植皮による腔再建を施行した(図1)。すなわち、腔入口部の拘縮を防ぐため、Ortiz-Monasterio³⁾に従って、逆Y字型の切開を加えた。尿道、膀胱と直腸間の粗な結合織を示指にて鈍的に剝離し、直径3cm、長さ8cmの腔を作った。この時、尿道には、金属カ

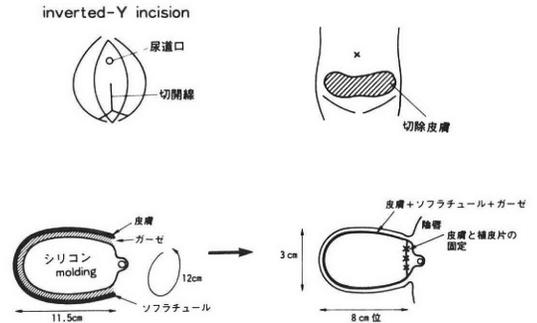


図1 遊離植皮法

テーテルを挿入し、直腸には助手が指を挿入し、正しい方向へ剝離を進めた。次いで、下腹部皮膚を切除し、皮下脂肪を除去した。ガーゼ、ソフラチュールを巻いたシリコン筒に皮膚を巻きつけ縫合し、人工腔に挿入し、腔入口部の皮膚と、皮膚片を縫合した。術後7日目プロテーゼを抜去し、裸のままのプロテーゼを再挿入した。術後3週間目頃より本人にあったプラスチック製のプロテーゼを用意し、自己管理を指導した。術後4か月目までは、1日中装着、以後は夜間のみ装着として外来で経過観察している。

症例3および症例4は、腹腔鏡施行時指圧により腔入口部粘膜が4～5cm陥入したため、外来にて圧迫法を試みたが、患者の協力が得られず、現在腔は2cmの盲端になり狭窄している。症例4は、本人の強い希望もあり、遊離植皮による造腔術を予定している。

2) 症例5 (表3)

症例5は、12歳頃より周期的な下腹痛があり、昭和61年3月、子宮溜血症のため緊急入院、他医にて血腫除去術をうけた。4月、当科で腹腔鏡施行し、機能性子宮を有する真性腔欠損の診断にて、根治手術までDanazol 400mg/dayを服用した。62年3月将来の妊娠を期待し、大腿薄筋筋皮弁にて腔と子宮

表4 症例6—子宮溜血腫をともなった腔横隔膜症
 症例6 46XX S39年1.26生
 14歳より、月1回下腹痛あり。
 S59.1 急性腹症にて開腹、腔横隔膜の診断
 S61.11 結婚
 S61.12 経腔ドレナージするも症状軽減せず子宮摘出予定
 当科受診
 S62.1 腔横隔膜切開、腔頸管形成術施行
 S63.2 GIFT→妊娠
 S63.8 30W0d PROM
 30W6d C/S 1488g Ap 4/6

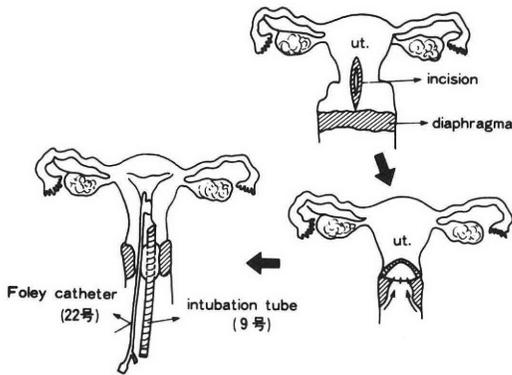


図2 腔横隔膜切開、頸管形成術

頸管の再建を行なった。皮弁を子宮頸管に縫合するため、筋肉の栄養血管に過度の緊張が加わり、術後、皮弁表面の皮膚が壊死に陥り3ヵ月後、植皮術を追加した。すなわち、足底部からの分層植皮を行なったが、生着せず、テプリードマンを行なった後、症例1、2と同様に、腹部から採取した全層の皮膚を植皮した。その後、良好なドレナージが得られるように、多孔性のシリコンプロテーゼを装着した。63年1月には、月経血が、頸管と腔盲端部の間に貯留したため、レーザーにて子宮口を開通させ、月経血を排出、以後、月経痛なく、現在に至っている。

3) 症例6 (表4)

症例6は、14歳の頃より月1回の下腹痛あり、20歳の時、急性腹症にて、開腹術を施行し、子宮溜血腫を伴った腔横隔膜の診断をうけた。61年11月(21歳)結婚、他医にて腔横隔膜にドレイン挿入し、月経血排出をはかった。しかし、下腹痛継続し、子宮摘出を勧められ、入院するも本人の強い希望にて当科を受診した。腔長は6~7cmあった。62年4月腔横隔膜切開、腔、頸管形成術を施行した(図2)。すなわち、経腔的に腔横隔膜を切開し、開腹のうえ、腔切開遊離端を子宮頸部に縫合、頸管の狭窄を防ぐ

表5 腔の形態異常、形成不全を示す疾患
 先天性の腔形態異常及び形成不全

1. 性腺分化異常
 性腺形成不全症
 真性半陰陽
2. 女性仮性半陰陽
 先天性副腎性器症候群
 経胎盤性 Androgen 作用
3. 男性仮性半陰陽
 Testosterone 生合成異常
 精巣性(睾丸性)女性化症
4. 処女膜閉鎖
5. 腔閉鎖
 腔横中隔
 処女膜後閉鎖
6. 腔欠損症
 Rokitansky-Küster-Hauser 症候群
 真性腔欠損症
7. 腔中隔、重複腔
8. 片側腔

後天性腔狭窄症、腔閉鎖

1. 炎症(ジフテリア、麻疹などによる腔炎、腔内異物による腔炎、老人性腔炎によるもの)
2. 外傷、分娩損傷によるもの
3. 手術や放射線治療の合併症
4. 火傷、腐蝕によるもの

ためフォーレおよび気管内挿入チューブを挿入した。術後、フォーレおよび気管内挿管チューブは自然脱出し、時々pyometraを起こしたが、抗生剤、ドレナージにて軽快した。頸管はpin-hole大であったが、月経痛もなく、63年2月8日GIFTにて、妊娠した。胎児発育は順調であったが、腹脹が出現し、8月1日(妊娠27週)より、安静、加療目的でS病院に入院、8月10日、当科に転送となった。8月24日(妊娠30週)自然破水し、抗生剤点滴するも、子宮内感染が疑われ、8月30日(妊娠30週6日)帝王切開にて男児1488g、Apgar 4/6出生。子宮腔内にdrainを留置し、悪露の排出を促した。術後の経過は順調にて、10月9日母児ともに退院した。

考 察

腔の形態異常、形成不全を示す疾患は、表5のようにまとめられる。このうち正常な子宮を持ち、将来妊娠や出産の可能性が期待できる腔欠損や、腔閉鎖症では、思春期に至って無月経の主訴に加えて、周期的下腹痛や下腹部腫瘍を伴うので、治療医学的立場から造腔術の絶対的適応となる。先天性欠損の95%近くを占めるM-R-Kの場合は、性生活のための機能回復を目的として、造腔術が施行される。造腔

表6 各種人工造腔術

- I. 非観血的方法
 プロテーゼ持続圧迫法: Frank (1938), 山田(1948)
- II. 観血的方法
1. 腸管利用法
 - i) 回腸: Baldwin (1904), 森 (1907)
 - ii) S 状結腸: Ruge (1914), Schmidt (1952), 秦 (1958)
 2. 単純切開法: Kanter & Wells (1935)
 3. 前庭粘膜利用法: Wharton (1938), Falls (1940), 小石 (1955), Sheares (1960), 眞柄 (1950)
 4. ヘルニア嚢科用: Dreyfus (1912)
 5. 卵膜移植法: Brindeau (1934), Bürger (1937), Lafargue & Rivière (1937), 八木 (1940)
 6. 胎脂利用法: Kleitsman & Poska-Teiss (1935)
 7. 腹膜利用法: Ksido (1933), Glowinski (1937), Davydov (1969)
 8. 同種腔粘膜移植法: Mackenrodt (1911), Beritsch (1969)
 同種腔移植法: Papanicolaou²⁴⁾ (1954)
 9. 有茎植皮法
 - i) 局所皮弁: Graves (1921)
 - ii) 管状皮弁: Frank & Geist (1927)
 10. 遊離植皮法: Heppner (1872), Abbé (1898), Kirschner & Wagner (1930), Israel (1935), McIndoe (1937)

術は表6のように、術式の種類が多彩であり、各々、長所、短所があり、一概にどの術式がよいとはいえない。しかし、形成手術であるだけに、一度失敗すると再手術は更に困難となるため、疾患の種類、欠損の程度、患者の年齢、疾患や治療に対する患者の理解度を十分に把握し、術式を選択する事が重要である。

われわれの教室では、昭和61年まで、腔欠損に対して、腸管利用法が行なわれてきた。術後、早期に腔腔が確保でき、術後管理も容易であるが、手術時の侵襲が大きく、開腹してS状結腸の可動性が悪かったり、A. Sigmoideaの走行異常があつて閉腹した症例や、腸管脱出壊死、新腔の狭窄等の症例、悪臭、分泌物に悩まされる症例等があり、満足な成績が得られていない。

McIndoeは、1973年、腔欠損にinlay graftingを初めて応用し、その後、22年間に105例に本法を行ない、成功率が高く、満足すべき結果を得たと報告した⁵⁾。その後、種々の改良が行なわれ、遊離植皮法であるMcIndoe法は、アメリカ、イギリスでは最も普遍的な手術法とされている。妊娠、分娩⁶⁻⁷⁾、さらには、経腔分娩の報告⁸⁾もある。植皮には、表皮と真皮の一部を含む分層植皮と、真皮の全層を含む全層

植皮に分けられる。分層植皮は、移植する皮膚が薄いため、生着が容易であるが収縮が起こりやすく、また採皮部は広い癍痕になるという欠点がある。一方全層植皮では生着率は劣るが、移植皮膚の収縮は少ないという長所がある。採皮部は縫合するため、線状の傷跡になる。分層植皮の場合に比し、移植した皮膚の汗腺からの分泌物や、発毛、dermoid cystの発生がある。植皮による腔再建では、一般に分層植皮が行なわれ、採皮部は臀部が好まれるが、肥厚性癍痕になり易く、腔再建が将来の性行為を前提とするものであり限り、日常の生活で目に触れないということだてでは、すまされない状況がある。そこで、われわれは、M-R-K 2症例に、下腹部から採皮し、全層植皮による腔再建を行なった。脂肪は完全に除去し、毛根も可能な限り除去した。いずれの症例も、術後の拘縮なく、採皮部の傷跡も目立たず、パートナーを得、約6カ月後には、支障を来す事なく性交を行なっている。

Whitacreは、移植された皮膚は、6カ月以内に、細胞構造、酸性度、bacterial floraは、正常の腔とほとんど同一になったと述べている⁹⁾。われわれも、造腔された腔のsmeerおよび生検を定期的に行なっている。腔壁は、柔軟さを有し、湿潤であるが、約1年経過した現在、角化している表層細胞が多数出現し、卵巣機能が正常に働いている腔smeerとは異なっており、経過観察が必要と思われる。

有茎皮弁や筋皮弁は、再建した腔の術後の拘縮が少なく、末梢神経の感覚枝を含むので、良好な感覚が得られる。また、子宮頸管の確実な維持が得られるので、症例5に第一選択として用いた。しかし両側大腿内側に走る傷跡が大きく、結果的に不成功に終わった。症例5、症例6のように機能性子宮を有する症例では、強い下腹痛を主訴に来院する事が多く、緊急手術の対象とされ、開腹し、子宮全摘術をうける例が多い。しかし、性に対して極めて過敏な思春期での手術であり、将来の妊孕性の回復を期待し、むやみに子宮摘出術を行なうべきでないと思われる。

症例6は、長い間、強い下腹痛に悩まされ、最終的に子宮全摘術をうけるために入院したが、妊娠をあきらめきれず、当科を受診し、GIFTにて妊娠に至った幸運な症例であった。

人工造腔術は、患者の精神的苦痛とその人権を考える時、その意義は大きく、積極的に取りくむべきであると思われる。患者が女性とは、結婚とは、性行為とはの意味を理解し、患者自身が、造腔を強く希望するのであれば、結婚の有無にかかわらず、早

期に手術を行ない、術後も長期にわたって根気強く follow すべきと思われる。

文 献

- 1) Stark, R. B.: Congenital Absence of the Vagina and other Abnormalities of the External Female Genitalia, Converse's Reconstructive Plastic Surgery, Vol. V. 2075, W. B. Saunders Co, Philadelphia and London, 1967
- 2) Whitely, J. M., et al.: Split-thickness skin graft technique in the correctim of congenital or acquired vaginal atresia, Am. J. Obst. Gynec. 89: 377, 1964
- 3) Ortiz-Monasterio, F., et al.: Congenital absence of the vagina; Long-term follow up in 21 patients treated with skin grafts, Plastand Reconst Surg. 49: 165, 1972
- 4) 伊藤治英, 宮崎敬子: 膣奇形の手術, 産婦の実際, 36, (13) 1987
- 5) McIndoe, A.: Discussion on treatment of congenital absence of vagina with emphasis on long-term results, Proc. R. Soc. Med., 52: 952, 1957
- 6) Simmons, C. A.: Vaginoplasties at Chelsea Hospital for women, Proe, R. Soc. Med. 52: 33, 1957
- 7) Jeffcoate, T. N. A.: Advancement of the upper vagina in the treatment of haemstocolpos and haematometra caused by vaginal aplasia. Pregnancy following the construction of artsficial vagina, J. Obst. Gyneod. Brit Commnwealth, 76: 961, 1969
- 8) Moore, F. T. and Simonis, A. A.: Pervia naturalis following reconstruction fo the vagina, Brit. J. plast. Surg. 22: 387, 1969
- 9) Whitacre, F. E. and Wang, Y. Y.: Biological changes in squamous epithelium transplanted to the pelvic connective tissue, Surg. Gynec and Obstet. 99: 192, 1944

Studies of vaginal reconstruction for the congenital absence of vagina

Chieko Kakuta, Hiroshi Hoshiai,
Takao Fukaya, Hideo Tozawa
and Akira Yajima

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

Makoto Natui

Department of Plastic
and Reconstructive Surgery
Tohoku University School of Medicine,
Miyagi 980, Japan

As effective treatment for the congenital absence and obstruction of vagina, many operative methods are reported.

Last year, we have experienced 4 cases of Mayer-Rokitansky-Küster syndrome, 1 case of true congenital absence of vagina, 1 case of transverse sepetum of vagina with hematometra. We have treated and discussed these methods-repeated pressure by Frank methods, modified McIndoe's method using full-thickness skin graft, vaginal reconstruction with gracilis myocutaneous flaps and colpoplasty with dissected of septum.

Utilising principles of inlay grafting and continuous dilatation by a mold until the contractile phase is over, modified McIndoe's method using full-thickness skin graft is satisfactory reconstruction.

In case associated with a functional uterus, we expected pregnancy and treat vaginal reconstruction.

We believe the operation should be performed as soon as the patient reaches physical maturity, when she is able to understand the method of operation and the need to use a mold.

(受付: 1989年1月19日)

直腸粘膜に認められた外性子宮内膜症の1症例

A Case of External Endometriosis in the Rectum

島根医科大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 北尾 学教授)

高橋 健太郎 草刈 万寿夫 永田 裕子
Kentaro TAKAHASHI Masuo KUSAKARI Hiroko NAGATA
真鍋 敦 吉野 和男 北尾 学
Atsushi MANABE Kazuo YOSHINO Manabu KITAO

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

子宮内膜症の病巣の多くは子宮、卵巣、骨盤腹膜が主であり、腸管子宮内膜症の報告例は以外と少ない。今回、手術療法施行後のダナゾール反復投与例において、直腸粘膜まで及んだ腸管子宮内膜症を経験したので、その診断、発生病理について若干の考察を加えて報告する。

症例は38歳、看護婦。昭和59年9月に不妊を主訴に来院。腹腔鏡検査により外性子宮内膜症 Huffmann 分類IV期の診断で手術療法及びダナゾール療法を施行した。その後、CA 125、超音波断層装置、腹腔鏡等で follow-up 中に再発が認められ2回のダナゾール再投与を施行した。その後、昭和62年9月頃より月経時に一致して粘血便が認められ、大腸ファイバースコピーによるねらい生検の結果、直腸粘膜に異所性子宮内膜が認められ、腸管子宮内膜症と診断し、現在5度目のダナゾール療法中である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 832—836, 1989)

緒 言

子宮内膜症は近年の診断学の発展とともに発見される症例が増加しており、また、不妊との関連から子宮内膜症の臨床的意義も増大してきている。治療法としては、保存的に、ダナゾール療法^{1,2)}、ゲストリノン療法³⁾、プセリリン療法⁴⁾等が行われているが、現在の主流はダナゾール療法である。しかし、ダナゾールにより症状の軽減、妊娠率の向上は認められているが、再発率も高く、難治性の症例も少なくないのも事実である。

外性子宮内膜症の病巣の多くは、卵巣、子宮漿膜面、腹膜などの骨盤腔内を主体としているが、骨や気管などに認められることもある。また、子宮内膜症の開腹症例の約5%に認められると報告されている⁵⁾腸管子宮内膜症は本邦では比較的まれな疾患である。

今回、ダナゾール反復投与例において、直腸粘膜にまで及んだ腸管子宮内膜症例を経験したので若干の文献的考察を加え報告する。

症 例

患者: 34歳、看護婦
主訴: 月経過多、月経困難症、挙児希望
月経歴: 初経12歳、周期28日型、持続6日、多量、経時障害; 下腹痛、腰痛
結婚: 27歳
妊娠・分娩歴: 0妊0産(初診時不妊期間6年5か月)
家族歴: 特記すべきことなし
既往歴: 特記すべきことなし
現病歴: 昭和58年12月頃より左下腹部の鈍痛を自覚するようになり、これが月経時に増強するため、昭和59年7月に某病院産婦人科を受診し、左卵巣囊

腫を伴う外性子宮内膜症と診断され、ダナゾール 400 mg/日の投与をうけた。その後、ダナゾール投与中に月経様出血が認められたため9月より 600 mg/日にダナゾールを増量されたが、卵巣嚢腫の縮小が認められないため、9月26日に精査目的で当科を紹介された。

初診時所見：身長 161 cm, 体重 58 kg. 子宮は超鶏卵大で強度の後屈。左卵巣は鶏卵大で嚢腫様、右卵巣には異常は認められなかった。このため、腹腔鏡検査予定とし、ダナゾール 600 mg/日の投与を継続した。

腹腔鏡所見(図1)：左卵巣には鶏卵大のチョコレート嚢腫が認められ、右卵巣はほぼ正常であった。

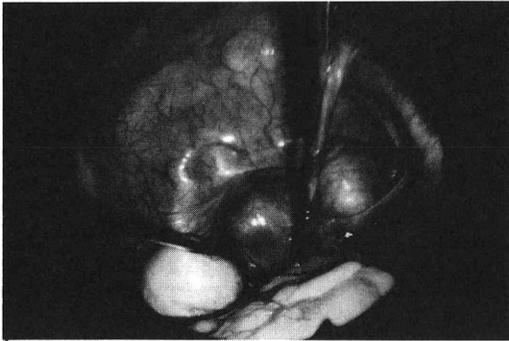


図1 腹腔鏡所見

左卵巣に鶏卵大のチョコレート嚢腫, 右卵管水腫, 子宮底部前壁に漿膜下筋腫が認められる。

ダグラス窩は癒着により閉鎖しており、右卵管は水腫様で卵巣と癒着していた。インジゴカルシンを用いた卵管疎通検査では右卵管は完全閉塞、左卵管は正常な通過性が認められた。また、子宮底部前壁に 10×20 mm の漿膜下筋腫が認められた。

以上の所見より、左卵巣チョコレート嚢腫を伴う外性子宮内膜症 Huffmann IV期, 右卵管水腫, 右卵管閉塞, 子宮筋腫と診断し、手術予定とし、同時に GOT, GPT の上昇が認められたのでダナゾール投与も中止とし、昭和 60 年 1 月 10 日に開腹した。

手術所見：骨盤内は腹腔鏡所見と一致しており、子宮は鶏卵大で高度後屈, 底部前壁に 10×20 mm の漿膜下筋腫が認められた。左卵巣には超鶏卵大, 右卵巣には超鳩卵大のチョコレート嚢腫が認められ、ダグラス窩は閉鎖していた。左, 右卵巣嚢腫摘出術を行い、同時に、ダグラス窩開放術, 骨盤腔内の癒着剝離術, 筋腫核出術を施行した。右卵管水腫を切開し、卵管の通過性を確認したが、間質部で完全に閉塞していた。

術後経過：以後の経過を図2に示す。昭和 60 年 1 月 13 日よりダナゾール 400 mg の投与を開始し、血清 CA 125 の値を見ながら、16 週間投与を行った。この間、卵巣嚢腫は超音波装置で認められなかった。休薬中 2 回の月経があり、月経痛は軽減していたが、6 月中旬より、再び左卵巣の腫大が認められ、7 月中旬には右卵巣の腫大も認められるようになったので 7 月末よりダナゾール 400 mg/日投与を再開した。

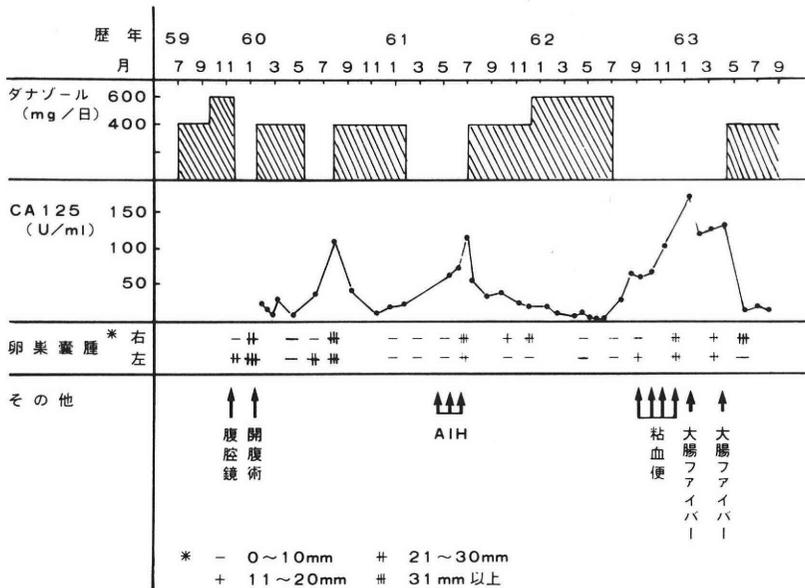


図2 症例の臨床経過図

6カ月間投与したところ、卵巢嚢腫は完全に消失し、血清 CA 125 の値も 20 U/ml 前後まで低下したので、ダナゾール投与を中止した。その後、夫の精液検査で乏精子症 ($12 \times 10^6/\text{ml}$) が認められたため、AIH を3回行ったが妊娠には至らなかった。しかし、ダナゾール投与中止後4カ月で、再び卵巢嚢腫が認められるようになり、CA 125 も再度上昇してきたため、6月末より4度目のダナゾール療法を開始した。4カ月間投与しても卵巢嚢腫の縮小が認められないため、600 mg/日に増量し、total 1年間のダナゾール投与を行った結果、卵巢嚢腫も消失し、CA 125 の値も 10 U/ml 前後で一定値となったためダナゾール投与を中止し、再び不妊症に対する治療を開始し、AIH 等を行ったが妊娠には至らなかった。

その後、昭和62年9月にはCA 125 値が50 U/ml を越えるようになり卵巢も腫大してきた。この頃より、月経時に一致して粘血便を認めるようになり、某外科医院を受診し、直腸鏡検査の結果、直腸の肛

門より10~15 cmの0時方向に圧排像、炎症像が認められたため、当院放射線科を紹介受診し、昭和63年1月20日(月経周期9日目)に大腸ファイバースコピーを施行した。

大腸ファイバースコピー(1回目)の所見: 肛門から15~20 cmの部位に境界不明瞭な、半球状ないし、帯状の隆起、壁肥厚が認められ、血管網は不明瞭であった。この部位の生検組織所見は、一部分の粘膜に出血性変化があるのみで、子宮内膜症組織は認められなかった。

CT所見: 2月5日に施行したCT所見を図3に示す。右卵巢には40×30 mmの嚢腫が認められ、左卵巢にも小さな嚢腫が認められた。直腸の前壁から左側壁にかけて壁の肥厚が認められ、直腸と子宮の境界は不明瞭であった。

大腸ファイバースコピー(2回目)の所見: 4月8日、月経開始4日前に施行した大腸ファイバースコピーの所見は、肛門から20~25 cmの所に、正常な血管網の認められない隆起が認められた(図4)。その近影では、一部に陥凹があり、この部を中心に行ない生検を行った(図5)。

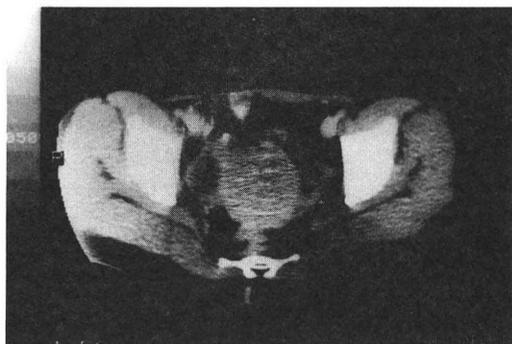


図3 本症例のCT scan 像

左、右卵巢嚢腫が認められ、直腸前壁~左側壁の肥厚が認められ、直腸と子宮の境界は不明瞭である。

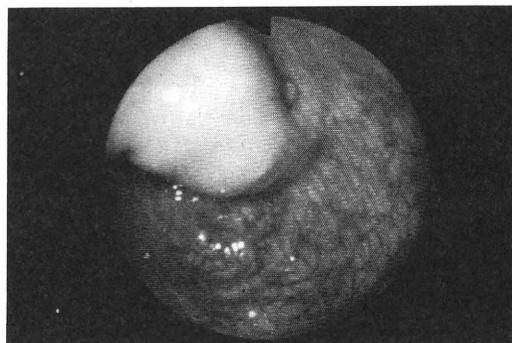


図5 図4の近影

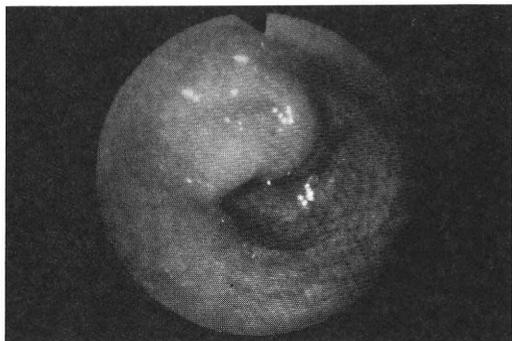


図4 月経開始4日前に施行した大腸ファイバースコピー像
正常な血管網の認められない隆起が存在

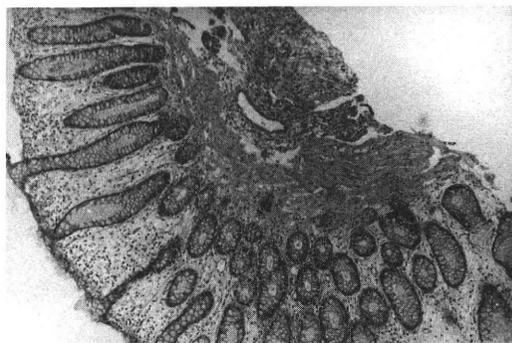


図6 直腸生検組織像(H. E.染色, ×20)
正常な直腸粘膜下層、間質部に直腸粘膜とは異った腺上皮を有する腺腔が認められる。

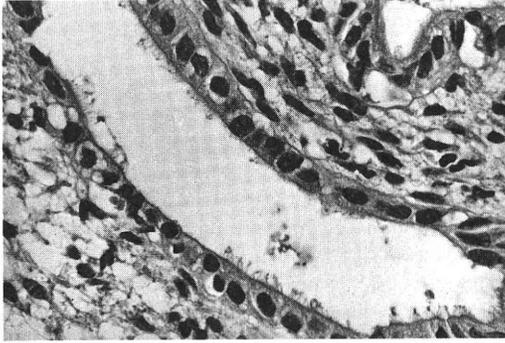


図7 図6の強拡大像 (H. E.染色, ×200)
内腔面に腺毛を伴った低い円柱上皮が認められる。

生検組織所見：生検組織では正常な直腸粘膜が認められるが、粘膜下層、間質に直腸粘膜とは異った腺上皮を有した腺腔が認められ(図6)、同部を強拡大すると(図7)、たけの低い円柱上皮で内腔面には腺毛を伴っており、endometrial epitheliumと診断された。

その後、4月末より5度目のダナゾール療法を開始しており、現在、CA 125は低値であるが、右卵巢嚢腫は存続している。

考 察

診断技術の向上とともに、子宮内膜症の発見率は高まって来ているが、術前に子宮内膜症と診断されて手術を受けたものは56.5%に過ぎないと報告されており⁹⁾、このことは子宮内膜症の術前診断の難かしさを物語っている。その子宮内膜症の中で、腸管内膜症は子宮内膜症の開腹症例の約5%に認められると報告されており⁹⁾、イレウス症状⁷⁾や腸管狭窄⁸⁾等により外科的治療を行った時に発見される場合もある。しかし、開腹手術前に確定診断されることは非常に稀である。その理由として、1つは、腸管の粘膜面にまで浸潤して、月経時に血便などを呈する重症例は非常に稀であるため、内視鏡検査を行っても粘膜上皮は intact であり、endoscopic biopsyで診断することは困難である⁹⁾ことがあげられる。しかし、本症例は、内視鏡的にも粘膜面の異常が観察され、endoscopic biopsyで腸管子宮内膜症と診断できたのであるが、たとえ月経時に一致して下血を呈した症例でも endoscopic biopsyで組織学的に内膜症を診断できなかった症例¹⁰⁾もあり、その診断の難かしさがうかがえる。腸管子宮内膜症の endoscopic biopsyで採取された組織片は、出血性変化、壊死性変化、線維組織の増殖のため、腺及び間質組織を識別できない場合の多い¹¹⁾ことが、第2の理由と考えられる。第3

の理由としては、組織採取時期があげられる。清水ら¹⁰⁾の症例と同様、我々の症例でも第1回目の組織採取は月経終了後であり、この組織片からは、子宮内膜症の確定はできなかった。しかし、2回目の生検では、子宮内膜症が確定でき、この採取時期は月経前であった。以上の3つの問題点をふまえたうえで、腸管子宮内膜症の術前診断はなされるべきと思われる。

子宮内膜症の発生機序は①胎生上皮遺残説、②直接深部増殖説、③経卵管移植説、④転移移植説、⑤腹膜上皮化生説、⑥直接移植説等が考えられている。本症例の発生機序を考えてみると、昭和60年1月10日の手術による転移移植説と直腸漿膜面に残存した子宮内膜症組織が、粘膜面へ向って増殖した事が考えられる。いずれにせよ、本症例の発生要因に子宮内膜症の手術操作が関与していると推察されるので、frozen pelvisであるような重症の外性子宮内膜症の手術には、腸管子宮内膜症の2次的な発生も考慮して、十分な注意が必要であると思われる。また、本症例のように再発をくり返す症例には、早期の治療方法の変更も必要であり、今後、プセリリン療法や手術療法の検討を要する段階になっている。

本論文の要旨は第26回日本不妊学会中国・四国支部総会(岡山, 1988年)において発表した。

文 献

- 1) Friedlander, R.L.: The treatment of endometriosis with Danazol, *J. Reproduct Med.* 10:197, 1973
- 2) Dmowski, W. P. and Cohen, M. R.: Antigonadotropin (Danazol) in the treatment of endometriosis, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130: 41, 1978
- 3) Coutinho, E. M.: Treatment of endometriosis with gestrinone (R-2323), a synthetic antiestrogen, antiprogesteron, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144:895, 1982
- 4) Lemay, A. and Qensnel, G.: Potential new treatment of endometriosis: reversible inhibition of pituitary-ovarian function by chronic intranasal endometriosis of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist, *Fertil. Steril.* 38:376, 1982
- 5) Weed, J. C. and Ray, J. E.: Endometriosis of the bowel, *Obstet. Gynecol.* 68:727, 1987
- 6) 稲本 裕：子宮内膜症に関する数的観察，産婦人科 MOOK 26：p 11, 金原出版, 1983
- 7) 江上りか, 中村元一, 中野仁雄, 石川 剛, 飯田三雄, 萱島孝二, 伊藤英明：イレウス症状を呈した小腸子宮内膜症の1例, エンドメトリオージス研究会会誌, 9:286, 1988

- 8) 森川眞一, 池田和則, 大川玲子, 武田祥子, 加藤喜市, 橘川征夫: 腸管狭窄を伴った Bowel Endometriosis の1例, エンドメトリオーシス研究会誌, 9:290, 1988
- 9) Meyers, W. C., Kelvin, F. M. and Jones, R. S.: Diagnosis and surgical treatment of clonic endometriosis, Arch. Surg. 114:169, 1979
- 10) 清水正彦, 平井ひろみ, 田中哲夫, 井上哲朗, 薬師寺道明, 加藤 俊, 佐々木英: 月経時に下血のみられたS字状結腸子宮内膜症の1例, エンドメトリオーシス研究会誌, 9:295, 1988
- 11) 西谷 巖, 布川茂樹: 子宮内膜症の組織学, 産婦人科 MOOK 26: P 62, 金原出版, 1983

A case of external endometriosis in the rectum

Kentaro Takahashi, Masuo Kusakari,
Hiroko Nagata, Atsushi Manabe,
Kazuo Yoshino and Manabu Kitao

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

A case of external endometriosis of bowel, a clinically rare entity, in a 38-year-old woman is reported. The patient presented to our clinic for the evaluation of her infertility in September 1984. At laparoscopy she was diagnosed as stage IV external endometriosis according to Huffmann's classification. The patient was operated on and started on danazol therapy. She was followed up by CA 125, ultrasound and laparoscopy, and after discontinuing her treatment a relapse was noted which necessitated retreatment with another 2 courses of danazol. As of September 1987, the patient started complaining of melena during menstruation. Colon fiberoscopy was performed and a punch biopsy revealed glandular epithelium localized under the mucosa of the rectum.

(受付: 1989年1月13日)

外性子宮内膜症における 各種臨床進行期分類の比較検討

A Comparative Study of Systems of Classification of Endometriosis

大阪大学医学部産科婦人科学教室

亀田 隆	鮫島 義弘	信永 敏克
Takashi KAMEDA	Yoshihiro SAMEJIMA	Toshikatsu NOBUNAGA
高橋 俊一	木村 正	徳川 吉弘
Syunichi TAKAHASHI	Tadashi KIMURA	Yoshihiro TOKUGAWA
東 千尋	松崎 昇	佐治 文隆
Chihiro AZUMA	Noboru MATSUZAKI	Fumitaka SAJI
	谷澤 修	
	Osamu TANIZAWA	

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

腹腔鏡検査によって外性子宮内膜症を認めた42例について、各種子宮内膜症臨床進行期分類を行い、revised classification of endometriosis (R-AFS分類と略)と他の分類のstageの対応程度を比較し、以下の結果を得た。

- 1) Acosta分類はR-AFS分類とほぼ対応していたが、Beecham分類や杉本分類はstageが対応せず、同じ症例でも軽いstageに分類される傾向を認めた。
- 2) Beecham分類がR-AFS分類との対応に乏しかった原因として、内診所見において、false negativeが多く、中でも卵巣腫大を見逃す頻度が、false negative全体の半数を占めていた。
- 3) 杉本分類がR-AFS分類との対応に乏しかった原因として、卵巣病巣に対する基準の設定が2つの分類間で異なり、特にR-AFS分類では、卵巣病巣に対する得点配分が高いためstageが重くなると考えられた。

従って、各種臨床進行期分類によるstageをR-AFS分類で理解する場合、分類間の相違点を考慮して理解する必要がある。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 837—840, 1989)

緒 言

子宮内膜症は不妊症の原因疾患の1つと考えられている。子宮内膜症に対する治療方針の決定、治療効果の判定または、予後の推測のためには、本疾患の進行度あるいは蔓延度を臨床的に分類基準化して

おく必要がある¹⁾。子宮内膜症の臨床進行期は、従来はBeecham分類やAcosta分類が広く用いられ、次いで不妊症を中心として、腹腔鏡が普及するに従って杉本分類、さらに現在ではR-AFS分類が最も多く利用されている。しかし、種々の臨床進行期分類はあるものの、統一した基準とはなっておらず、各種

表1 各種臨床進行期分類の比較

	R-AFS	Beecham	Acosta	杉本	
I	15(36)	19(45)	16(38)	15(36)	I
II	4(9)	7(17)	13(31)	24(57)	II
III	8(19)	12(28)			
IV	15(36)	4(10)	13(31)	3(7)	III
計	42(100)				

()は%

表2 R-AFS 分類と Beecham 分類の比較

Beecham R-AFS	I	II	III	IV	計
I	11	5(12%)			15
II	1				4
III	20(48%)		4		8
IV	17(40%)			4	15
計	19	7	12	4	42

臨床進行期分類相互の stage 毎の対応も異なっている。

今回、138 例の腹腔鏡施行例のうち、外性子宮内膜症を認めた 42 例を対象に、従来から用いられてきた種々の臨床進行期分類について、分類相互の stage 毎の比較を行い、その相違点について検討を加えた。

対 象

昭和 60 年 10 月より昭和 63 年 3 月までに腹腔鏡を施行した 138 例のうち、外性子宮内膜症を認めた 42 例を対象とした。42 例のうち不妊症患者は 35 例、その平均年齢は 33±4 歳、平均不妊期間は 6.2±3.1 年であり、不妊症以外の患者は 7 例、その平均年齢は 36±6 歳であった。また 42 例全例の平均年齢は 33±4 歳であった。

方 法

腹腔鏡は open type を使用し²⁾、小型カメラを用いてモニターテレビで観察を行った。臨床進行期分類としては、revised classification of endometriosis (R-AFS 分類と略)³⁾、Beecham 分類⁴⁾、Acosta 分類⁵⁾および杉本分類⁶⁾を用い、R-AFS 分類の stage と他の分類の stage との比較を行った。R-AFS 分類や Beecham 分類は 4 つの stage に分かれており、Acosta 分類や杉本分類は 3 つの stage に分かれ stage 数が異なるため、比較に際し R-AFS 分類と Beecham 分類の II 期と III 期は、Acosta 分類や杉本分類の II 期に対応させた。また R-AFS 分類と Beecham 分類の

表3 術前内診所見と腹腔鏡所見の比較

	n=17 R-AFS		n=20 R-FAS		n=5 R-FAS		n=42 計	
	∨		∥		∧			
	Beecham FN	FP	Beecham FN	FP	Beecham FN	FP	FN	FP
限局性硬結	3	1	1	3	0	1	4	5
卵巣腫大	7*	0	4	1	0	0	11	1
子宮可動性制限	2	0	0	2	1	1	3	3
ダグラス窩閉塞	2	0	0	1	0	0	2	1
計	14	1	5	7	1	2	20	10

FN : false negative, FP : false positive

* 3 例は他の FN 所見も合併

I 期や IV 期は、Acosta 分類や杉本分類の I 期と III 期に各々対応させてそれぞれ比較を行なった。

結 果

42 例の外性子宮内膜症例を各種臨床進行期分類に従って、分類を行った(表1)。さらに、これら分類のうち R-AFS 分類を基本として、他の分類と stage 毎の比較を行った。その結果、Acosta 分類の症例分布は、他の 3 つの分類の中でも、R-AFS 分類と良く対応していた。すなわち、R-AFS 分類と Acosta 分類の各 stage の例数は、1 または 2 例の相違しか認めなかった。一方 Beecham 分類や杉本分類は、R-AFS 分類との相関に乏しく、いずれも R-AFS 分類に比べて、軽い stage に分類される傾向を認め、R-AFS 分類では IV 期 15 例であるが、Beecham 分類では IV 期 4 例、杉本分類では III 期 3 例を認めるのみであった。

Beecham 分類に関して、42 例のうち 20 例(48%) は、R-AFS 分類と stage が一致していたが、17 例(40%) は R-AFS 分類より軽症の stage に分類され、5 例(12%) は重症の stage に分類された(表2)。さらに、腹腔鏡施行前に行った Beecham 分類の主たる内診所見項目である限局性硬結、卵巣腫大、子宮可動性の制限およびダグラス窩閉塞が、腹腔鏡所見と一致して正しかったかどうかを検討した。その結果、R-AFS 分類より軽症の stage に分類された 17 例の群では、false negative の内診所見が、14 所見(82%) に認められた(表3)。これは R-AFS 分類と stage が一致した 20 例の群の 5 所見(25%) や R-AFS 分類より重症に分類された 5 例の群の 1 所見(20%) に、比較して多かった。中でも、false negative 14 所見のうち 7 所見に卵巣腫大が認められた。また、この 17 例では、false positive の所見が、他の群に比較して少なかった。従って、このような所見の見誤りが、17 例の群を R-AFS 分類に比較して、軽症の stage に

表4 R-AFS 分類と杉本分類の比較

R-AFS 杉本	I	II	III	計
I	15	0	0	15
II	0	4	0	4
III	0	8	0	8
IV	0	12	3	15
計	15	24	3	42

表6 R-AFS 分類IV 期かつ杉本分類II 期12例の R-AFS 分類における主要得点項目

	n	%
病 巢 腹膜	0	0
病 巢 卵巣	9*	65
ダグラス窩閉塞	3	21
癒着(卵巣または卵管)	2	14
合 計	14	100

* 2例はダグラス窩閉塞または卵巣癒着と重複

分類させた原因の1つと考えられた。

杉本分類では、42例中30例(71%)はR-AFS分類とstageが一致していたが、残る12例(29%)はR-AFS分類とstageが対応していなかった(表4)。12例は、いずれもR-AFS分類でIV期、杉本分類でII期と診断された例である。さらに、12例のR-AFS分類における、項目別得点を検討した。その結果、No.2の1例を除いた11例の主たる得点項目は、卵巣の病巣またはダグラス窩閉塞の項目であった(表5)。特に、卵巣病巣の得点の高い症例が多く、12例中10例は、卵巣病巣の得点が20点以上であった。ダグラス窩閉塞の得点は、12例中3例が40点であったが、残る9例はすべて4点以下であった。また、卵管もしくは卵巣の癒着が、20点以上を示したのは、12例中2例にすぎなかった。さらに、この12例のR-AFS分類における得点分布を最も高い得点項目である主要得点項目別に分けた場合、卵巣病巣は重複した2例を加えても、14例中9例(65%)において最も高い得点項目であった(表6)。

考 察

我々は、R-AFS分類とBeecham分類、Acosta分類および杉本分類のstage毎の比較を行ない、その結果Acosta分類はR-AFS分類とstageがよく対応していたが、Beecham分類や杉本分類では対応に乏しいことを見いだした。

Beecham分類に関しては内診所見のみで判断するために、腹腔鏡所見に比較してその正確さに欠ける

表5 R-AFS 分類IV 期かつ杉本分類II 期の12症例の R-AFS 分類における項目別得点表

No.	病 巢		ダグラス窩 閉塞	癒 着		総計 (点)
	腹膜	卵巣		卵巣	卵管	
1	0	40	0	0	0	40
2	6	0	4	16	16	42
3	1	20	4	16	2	43
4	4	40	0	0	0	44
5	0	40	4	0	0	44
6	0	8	40	0	0	48
7	0	20	0	16	16	52
8	2	40	0	8	8	58
9	0	32	4	16	20	72
10	2	32	4	32	16	86
11	0	36	40	20	22	118
12	0	40	40	8	32	120

ことが十分に考えられる。しかし、実際の臨床上では、病巣の広がり、治療効果の推測には有用な分類である。Beecham分類の内診所見のうちでもfalse negativeが多いこと、さらに卵巣の腫大を見逃すことが多いことが判明した。このため、卵巣腫大を考慮した場合、超音波検査等を併用して評価する方がより正確であると考えられる。事実、超音波検査を腹腔鏡施行前に行ない、内診所見でfalse negativeであった11例のうち8例(73%)に、卵巣腫大を予め見出している。

杉本分類は、腹腔鏡による子宮内膜症の診断に、その簡便性から広く用いられている⁷⁾。しかし、R-AFS分類とはその分類基準のなかで、特に卵巣腫大の取り扱い方において相違点のあることが判明した。R-AFS分類では、片側の1cmから3cmの卵巣病変でも16点、3cm以上の卵巣病変では20点の配点があるため、他の所見が加わると容易に40点を越えIV期となる。一方、杉本分類では卵巣腫大があっても、III期の分類基準である「内性器上方全体が膜様癒着で被われ子宮後壁や付属器の状態が表面からわからないもの」以外はII期に分類され、このためR-AFS分類と相違が生じたと考えられた。

このように、杉本分類とR-AFS分類との間では、卵巣の子宮内膜症病巣に対する考え方が大きく異なっている。R-AFS分類が卵巣病巣に対して高得点を配した理由としては、統計的に卵巣病巣が妊娠率と深い関連があるためと考えられる。Rock et al.は卵巣病巣が3cm以上になると、著しく妊娠率が低下す

ると報告し⁸⁾, Weed et al.は卵巣病巣の存在で妊娠率が10%低下すると述べている⁹⁾. 永田らも同様の報告をおこなっている¹⁰⁾.

各種臨床進行期分類のなかでも R-AFS 分類は部位別に得点を配し, その総得点から子宮内膜症の進行度を判定するため, 他の分類法に比較して客観的分類方法と言える. しかし, 逆にこの分類方式の欠点は, 左右の各部位毎に得点を配したにもかかわらず, 最終的に左右得点の合計によって stage の分類を決定していることにある. このため付属器所見に左右差が存在しても, stage 分類にはその差は反映されず, 子宮内膜症の進行度と妊娠率の間に解離が生じると考えられる¹¹⁾. 以上のことから, R-AFS 分類が左右差を考慮しない子宮内膜症の進行度や蔓延度だけを示す stage 分類では, 不妊症の予後の推測には不十分であり, 逆に残された妊孕能力から考えた所見も加味することによって, 予後の推測がより正確になると考えられる.

Beecham 分類, Acosta 分類および杉本分類によってつけられた子宮内膜症患者の stage を R-AFS 分類と比較して理解する場合, それぞれの分類のもつ特徴を考慮する必要がある.

文 献

- 1) 杉本 修: ラパロスコピーによる子宮内膜症の診断, 産婦の実際, 29: 1147, 1980
- 2) Hasson, H. M.: A modified instrument and method for laparoscopy, Am. J. Obstet. Gynecol. 110: 886, 1971
- 3) American Fertility Society: Revised classification of endometriosis, Fertil. Steril. 43: 351, 1985
- 4) Beecham, C. T.: Classification of endometriosis, Obstet. Gynecol. 28: 437, 1966
- 5) Acosta, A. A., Buttram, V. C., Besch, P. K., Malinak, L. R., Franklin, R. R. and Vanderheyden, J. D.: A proposed classification of pelvic endometriosis, Obstet. Gynecol. 42: 19, 1973
- 6) 杉本 修: 外性子宮内膜症, 子宮内膜症のすべて(滝 一郎編), P 67, 南江堂, 東京, 1976
- 7) 星合 昊: 子宮内膜症, 産と婦, 54: 970, 1987
- 8) Rock, J. A., Guzick, D. S., Sengos, C., Schweditsch, M., Sapp, K. C. and Jones, H. W.: The conservative surgical treatment of endometriosis: Evaluation of pregnancy success with respect to the extent of disease as categorized using contemporary classification systems, Fertil. Steril. 35: 131, 1981
- 9) Weed, J. C. and Holland, J. B.: Endometriosis

and infertility: An enigma, Fertil. Steril. 28: 135, 1977

- 10) 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
- 11) 中谷一夫, 星合 昊: 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

A comparative study of systems of classification of endometriosis

Takashi Kameda, Yoshihiro Samejima, Toshikatsu Nobunaga, Syunichi Takahashi, Tadashi Kimura, Yoshihiro Tokugawa, Chihiro Azuma, Noboru Matsuzaki, Fumitaka Saji and Osamu Tanizawa

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

Three contemporary systems of classification of endometriosis proposed by Acosta, Beecham and Sugimoto were compared with the revised classification of the American Fertility Society (R-AFS) in 42 patients who were diagnosed as endometriosis by laparoscopy. In regard to the distribution of the number of patients in each stage, the classification of Acosta was well correlated to that of R-AFS, while the classification of either Beecham or Sugimoto was not. The difference of Beecham's staging from R-AFS could be due to the method for diagnosis because Beecham utilized vaginal examination in spite of laparoscopy that is used in R-AFS. Remarkable false negative diagnosis by vaginal examination especially the missjudgements of ovarian enlargement were found in the classification of Beecham. The estimation of ovarian enlargement also affected on the difference of classifications between Sugimoto and R-AFS. The point-scoring system of R-AFS attached much importance to ovarian enlargement, although the severity of the disease was not so much influenced by ovarian findings in the classification of Sugimoto. It should be necessary to understand the characteristics of the staging systems of various classifications of endometriosis when determining the severity and the management of the disease.

(受付: 1989年1月23日)

習慣流早産の原因としての子宮形態 異常の分析およびその手術療法に関する検討

Analysis on Congenital Uterine Anomalies in Habitual Abortions and Evaluation of Metroplasty

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

中田 浩一 牧野 恒久 田 渕 土 志 夫
Koichi NAKADA Tsunehisa MAKINO Toshio TABUCHI
飯塚 理八
Rihachi IIZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University, Tokyo 160, Japan

習慣流早産を主訴とする患者 405 名に子宮卵管造影法を施行し、先天性子宮奇形が発見された 56 名 (約 14%) について検討を加えた。

(1) われわれの考案した X/M ratio に基づき 56 名の子宮奇形患者を arcuate uterus ($0 < X/M < 1/3$) 34 名, partial septate uterus ($1/3 \leq X/M < 1$) 18 名, complete septate uterus ($X/M = 1$) 2 名および unicornuate uterus 2 名に分類した。

(2) 子宮形成術前の生児獲得率は, arcuate uterus が 129 妊娠中 8 例 (6%), partial septate uterus が 67 妊娠中 0 例 (0%), complete septate uterus が 9 妊娠中 1 例 (11%), unicornuate uterus が 7 妊娠中 1 例 (14%) であった。

(3) 子宮形成術後の生児獲得率は, arcuate uterus が 9 妊娠中 8 例 (89%), partial septate uterus が 6 妊娠中 5 例 (83%) であった。

(4) 術後は, 術前に比べ著明な予後改善が認められ, 流早産を繰り返す先天性子宮奇形に対しては積極的な手術療法を行うべきであると考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 841—847, 1989)

はじめに

先天性子宮形態異常の有病率は, 文献的には分娩 4000 例に対して 1 例という報告や, 分娩 500~700 例に対して 1 例という報告があり, その率に, はっきりした結論を出すことはできない¹⁾。しかし対象を習慣流早産の患者 (流早産 3 回以上) とした場合の子宮形態異常の有病率は, かなり高率になることが予想されるが, 具体的な報告は極めて少ない。

先天性子宮形態異常は, 不妊症因子の 1 つと考

えられるが, われわれの日常臨床における経験では子宮形態異常が原発性不妊症の原因となっている場合よりも, むしろ妊娠前期, 中期の流早産の原因となっている場合の方が, 多いようである。われわれは, 昭和 62 年 7 月現在, 当科に習慣流早産を主訴として来院した患者 550 名のうち先天性のものによると考えられる子宮形態異常が発見された 56 名を対象として以下の点に関して検討を加えた。

① 習慣流早産を主訴とする患者の子宮形態異常の有病率

- ②われわれが独自に考案した指標に基づく子宮形態の異常度の分類
- ③子宮形態の異常度による、子宮形成術前および術後の妊娠予後についての分析

対象および方法

昭和 62 年 7 月現在、慶応病院産婦人科には習慣流早産を主訴とする患者が約 550 名登録されているが、このうち子宮卵管造影法 (HSG) が施行された 405 名のなかで、先天性の子宮形態異常が発見された 56 名 (約 14%) を対象とした。これら 56 名については、当科における習慣流早産に関するルチーン検査²⁾を施行し、他に流早産の原因となるような疾患のないことを確認し、子宮形態異常が現在のところ唯一の原因と考えられる患者群である。

ところで、飯塚らによれば、子宮形態異常を以下のように分類している³⁾。

- ①子宮奇形群；子宮腔および子宮頸管の奇形、および子宮底が 95°以上弯曲している。
- ②辺縁不整群；子宮腔輪廓に 2 mm以上の凸凹を示す。
- ③陰影欠損群；子宮腔内に約 4 mm以上の陰影欠損を認める。

- ④内腔癒着群；辺縁の一部に不規則な凸凹があり、内腔に輪廓の鮮鋭な不定形の陰影欠損を認める。
- ⑤頸管無力症群；内子宮口が 5 mm以上開大している。

われわれは、とくに①に注目し子宮底部の先天性奇形、いわゆる双角子宮、中隔子宮等に分類される疾患群を認める患者 56 名について分析、検討を加えた。以下、本文中で子宮形態異常あるいは子宮奇形という場合には、飯塚らの分類による①、このうちとくに子宮底部の異常を意味することとする。

子宮奇形に関する論文は、いくつか散見されるが、これらは形態異常の分類を子宮の外見上の形、中隔の形に基づいて双角子宮、中隔子宮等に分類しているが、いずれも形態学的分類を重視し、子宮腔内への中隔の突出程度を考慮した分類は見あたらない。

子宮中隔がなぜ流産を誘起するかについては文献的には、中隔による機械的な圧迫、あるいは、中隔は血流に乏しく中隔に着床した場合に胎盤への血液供給が不十分となる等の考察がなされている⁴⁾。これらの点を考慮した場合、われわれは、妊娠予後と相関するのは、子宮の外見上の形や中隔の形ではなく、子宮腔内への中隔の突出程度ではないかと考え以下の方法に従って 56 名の患者の分類を行った。(図 1)

HSG フィルム上において、両側子宮卵管角を結ぶ線 AB の中点と内子宮口を結ぶ結合線を M とする。次に子宮腔内に突出した中隔部分の頂点から M に平行に AB に引いた結合線を X とし、X と M との比、すなわち X/M ratio により X/M ratio が 1/3 より小さい場合を「arcuate uterus」、1/3 以上で 1 より小さい場合を「partial septate uterus」、ほぼ 1 に等しい場合を complete septate uterus と定義した。

以上の定義に従うと、たとえば図 2 に示した症例

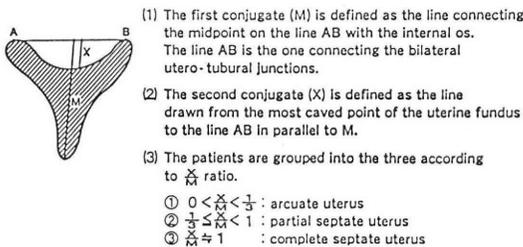


図 1 X/M ratio の算出方法

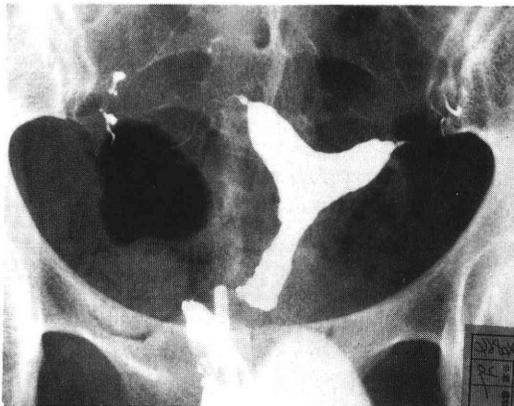


図 2 この症例は X/M ratio に従うと arcuate uterus に定義される

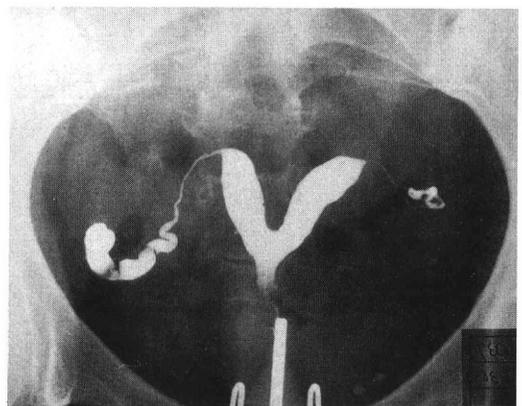


図 3 この症例は X/M ratio に従うと partial septate uterus に定義される

表 1 子宮奇形患者における子宮形成術前の妊娠予後

	Patients	Total Conceptions	Wastage	Success
			No. (%)	No. (%)
Arcuate ($0 < \frac{X}{M} < \frac{1}{3}$)	34	129	121 (94)	8 (6)
Partial Septate ($\frac{1}{3} \leq \frac{X}{M} < 1$)	18	67	67 (100)	0 (0)
Complete Septate ($\frac{X}{M} \doteq 1$)	2	9	8 (89)	1 (11)
Unicornuate	2	7	6 (86)	1 (14)
Total	56	212	202 (95)	10 (5)

表 2 子宮奇形患者における妊娠各期における流早産率 (子宮形成術前)

	Total Wastage	1st.	2nd.	3rd.
		Trimester	Trimester	Trimester
		No. (%)	No. (%)	No. (%)
Arcuate ($0 < \frac{X}{M} < \frac{1}{3}$)	121	111 (92)	10 (8)	0 (0)
Partial Septate ($\frac{1}{3} \leq \frac{X}{M} < 1$)	67	67 (100)	0 (0)	0 (0)
Complete Septate ($\frac{X}{M} \doteq 1$)	8	7 (88)	0 (0)	1 (12)
Unicornuate	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)
Total	202	191 (94.5)	10 (5)	1 (0.5)

は、 X/M ratio が $1/3$ より小さく arcuate uterus と定義される。また図 3 に示した症例は、 X/M ratio が $1/3$ より大きく 1 より小さいので partial septate uterus と定義される。

結 果

①習慣流早産を主訴とする患者における子宮奇形の有病率：

HSG を施行した 405 名のうち先天性の子宮奇形が認められたのは 56 名 (約 14%) であった。

②子宮奇形の程度による流早産率および生児獲得率：

56 名の患者を上述した方法に従って分類した結果を表 1 に示す。56 名のうち arcuate uterus ($0 < X/M < 1/3$) は 34 名 (約 61%)、partial septate uterus ($1/3 \leq X/M < 1$) は 18 名 (約 32%)、complete septate uterus ($X/M \doteq 1$) は 2 名 (約 3%) および unicornuate uterus が 2 名 (約 3%) であった。

それぞれにつき流早産率をみると arcuate uterus が 129 妊娠中 111 例 (約 94%)、partial septate uterus が 67 妊娠中 67 例 (100%)、complete septate uterus が 9 妊娠中 8 例 (約 89%)、unicornuate

uterus が 7 妊娠中 6 例 (約 86%) であった。

さらに、これらの流早産を各妊娠期別に検討した結果を表 2 に示した。arcuate uterus で 10 例の 2 nd. trimester での流早産が、complete septate uterus で 1 例の 3 rd. trimester での早産が認められたが partial septate uterus では、すべての妊娠が 1 st. trimester の流産に終わっている。

なお、生児獲得例の 10 例は、2 例の帝王切開例を含めすべて満期産分娩であった。

③子宮形成術後の流早産率および生児獲得率：

上記 56 名のうち、arcuate uterus 19 名、partial septate uterus 14 名に対し子宮形成術を施行した。これら 33 名について術後の流早産率および生児獲得率を表 3 に示す。

昭和 62 年 10 月現在、arcuate uterus 術後患者では、妊娠例が 9 例あり 8 例 (約 89%) が満期産に至り (1 例は流産)、partial septate uterus 術後患者では、6 例の妊娠例のうち 5 例 (約 83%) が満期産に至っている (1 例は流産)。

arcuate uterus 患者より出生した新生児 8 名の性比は、男 4 名、女 4 名、平均体重 3000 ± 152 g (Mean \pm S. E.) であり、partial septate uterus 患

表3 子宮奇形患者における子宮形成術後の妊娠予後

	Patients	Total Conceptions	Wastage No. (%)	Success No. (%)
Arcuate ($0 < \frac{X}{M} < \frac{1}{3}$)	19	9	1(11)	8(89)
Partial Septate ($\frac{1}{3} \leq \frac{X}{M} < 1$)	14	6	1(17)	5(83)
Complete Septate ($\frac{X}{M} \div 1$)	0	0	0(0)	0(0)
Unicornuate	0	0	0(0)	0(0)
Total	33	15	2(13)	13(87)

表4 子宮形成術を施行した34名の手術前後における妊娠予後

Patients (No. = 34)	Before	After
No. pregnant	34(100%)	15(44%)
No. with living children	0(0%)	13(87%)
Total pregnancies	113	15
Term	0(0%)	13(87%)
Preterm	5(4%)	0(0%)
Abortion	108(96%)	2(13%)
Living children	0(0%)	13(87%)

者より出生した新生児5名の性比は、男4名、女1名、平均体重は2949±210g (Mean±S.E.)であった。両群の平均体重に有意差はなく、周産期における重大な合併症は認められなかった。また、すべての症例が帝王切開による分娩であった。

子宮奇形患者34名の術前、術後の妊娠予後をより正確に比較検討するために、Case-Control Studyを行った結果を表4に示す。術前は、113の妊娠例があるが、すべて妊娠前期、中期の流早産に終わっており生児獲得率は0%であった。一方、術後の妊娠例は集計時で15例で、その中で13例(約87%)が満期産に至り、流産例は2例(約13%)のみであった。

考 案

習慣流早産患者における先天性子宮奇形の有病率について検討すると本研究では、HSGを施行した405名のうち56名(約14%)に何らかの先天性子宮奇形が認められたが、この率はわれわれが予想していたものより高率であった。ただし $0 < X/M < 1/3$ に分類された arcuate uterus 患者の中には、程度の軽い奇形も含まれており、それらを除くと有病率はもう少し低下するのではないかと考えられる。これらの軽度子宮奇形が流産の原因となっているかどうか

の判断は困難であり、これらの症例について子宮形成術を行なった後の妊娠予後を検討しないかぎり明確な結論は出せないと考えている。軽度子宮奇形と流産との関係については今後さらに症例を重ね検討する必要があると思われる。

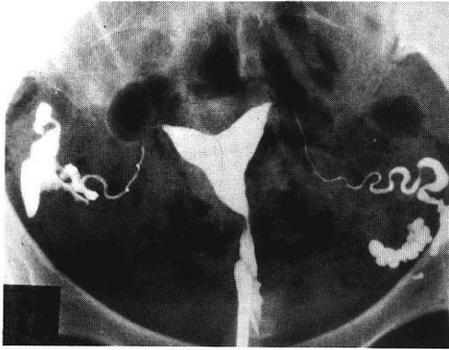
子宮奇形の分類指標(X/M ratio)について検討すると前述したように、今までに報告されている子宮奇形の分類は、子宮の外見上の形、子宮中隔の形を重視したものである。

本研究では、子宮中隔での子宮腔内への突出程度が妊娠予後に相関するのではないかと考え子宮の外見上の形や中隔の形にとらわれず、1つの試みとして、X/M ratio に基づいた重症度分類を行なってみた。ただし、この分類法に関しては、いくつかの不十分な点があると考えている。第一に、子宮の投影図であるHSGフィルムからX/M ratioを算出するため子宮の弯曲(子宮の前後屈)が無視されている点である。われわれは、この弯曲は軽微なもので無視し得ると考えた。

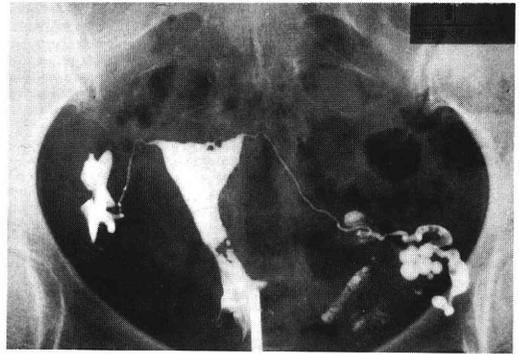
第2に、X/M ratio で正確に中隔の腔内への突出程度を表現するためには、Xは中隔の、Mは子宮腔内の容積であることが理想的であると考えられる。しかし、これを求めることは临床上不可能であり、本研究では、HSGフィルム上で子宮腔および中隔を底辺(子宮底)を共有する二等辺三角形とみなし、この2つの三角形の高さ(あるいは、三角形の面積)で代用した。

子宮形成術前後における妊娠予後の比較検討を行うと、まず形成術前の妊娠予後では、arcuate uterus と partial septate uterus とを比較した場合、奇形程度の軽い arcuate uterus で8例の生児獲得例を認め、arcuate uterus の方が予後良好である。

一方、さらに奇形の程度が強く、中隔により子宮腔内が、ほぼ2分割されている complete septate uterus では、症例数は少ないものの1例の生児獲得

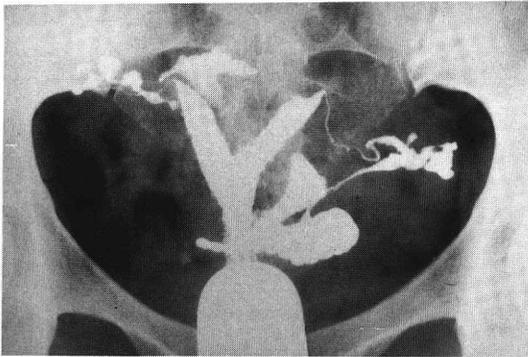


(a)

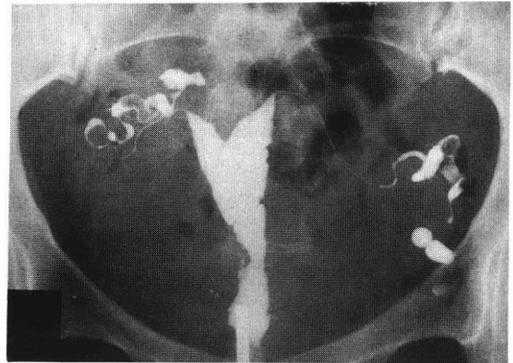


(b)

図 4

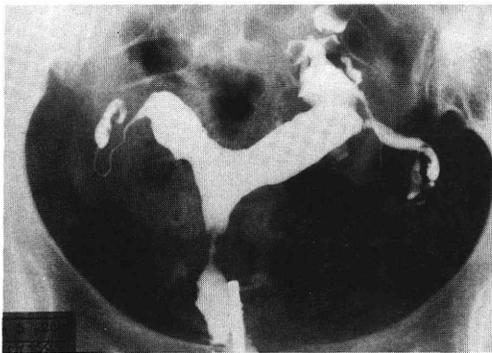


(a)

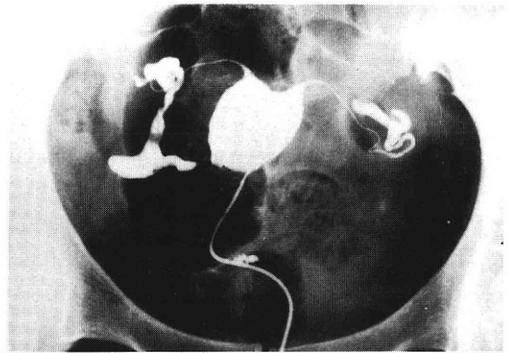


(b)

図 5



(a)



(b)

図 6

いずれも(a)が術前、(b)が術後の HSG 所見である

例がある。子宮腔の数に違いは、あるものの、形態的には、ほぼ同等の子宮腔を持った unicornuate uterus でも 1 例の生児獲得例が認められた。以上の結果から、中隔が大きい (X/M ratio が大きい) ほど妊娠予後は不良となるが、中隔の程度がさらに強くなり子宮腔が 2 分割されるような場合には、逆に

予後は改善する傾向が明らかとなった。中隔が中程度で子宮腔が非常に不規則な形になった場合より完全に分割され比較的スムーズな内腔面をもった子宮の方が胎児発育には適しているであろう。

次に形成術後の妊娠予後についてみると、妊娠例は本稿脱稿時点で 15 例であるが、arcuate uterus で

9 妊娠中 8 例 (89%), partial septate uterus で 6 妊娠中 5 例 (83%) で生児が得られている。また、形成術後の妊娠予後の改善をより明らかにするために、手術を行なった 34 名についてみると術前は 113 の妊娠がすべて流早産に終わっており、術後は、15 妊娠中 13 例が満期産となっている。以上の結果から、術後の妊娠予後の改善は明らかである。

また、arcuate uterus と partial septate uterus の術後予後は、ほぼ同等で子宮奇形の程度による術後予後の違いは認められなかった。したがって、X/M ratio が 1 より小さい症例では、子宮奇形の程度に関係なく、ほぼ同等の良好な予後が得られ、手術療法を積極的に行なうべきであると考えられる。

以下に、3 症例の術前・術後の HSG フィムを提示した図 4, 5, 6 はいずれも、術後に妊娠し生児を得た症例である。

これらの症例の術後の子宮形態をみると、中隔は、ほとんど消失し子宮底が、ほぼ平坦に修復され正常子宮腔に近いもの(図 4)、子宮底の中央が軽度突出しているもの(図 5)子宮腔が、まるく拡張したようになり、つり鐘型になっているもの(図 6)などさまざまである。すでに述べたように、子宮中隔が流産を誘起する原因として、機械的圧迫、中隔の血流不全などが推定されているが、術後の子宮腔が正常の子宮腔とは、かなり様子を異にした形態であっても妊娠継続可能であることを考えると、形成術を行う際に、子宮中隔を完全に取り除かないまでも、ある程度小さくし、子宮内腔を凸凹の少ないスムーズな形にすること、できるだけ中隔を取り除いて血流が十分でない中隔に着床する可能性をなるべく小さくすることを手術療法の主眼とすべきであろう。

術式は、Jones and Jones 法あるいは、Strassmann 法のいずれかに基づいた。それぞれの術式の詳細に関しては、成書に譲るが、われわれは、術式の選択にあたり、奇形の程度が中等度以上のものは Jones and Jones 法、軽度のものは Strassmann 法とし、だいたい選択基準として X/M が 1/2 以上の場合には Jones and Jones 法、1/2 以下の場合には Strassmann 法とした。

子宮形成術後の妊娠の経過については、子宮中隔が存在する場合、とくにその程度が強い場合には、頸管無力症を合併することが多いとの報告があるが⁵⁾、われわれの経験した術後の妊娠例 13 人のうち頸管縫縮術をしなければならない症例はなかった。

また、妊娠例の中には、その術後の子宮腔が変形、縮小しているものもあり早産例があるのではないかと予想されたが、すべて満期まで妊娠を継続できた

のは予想外であった。

術後の妊娠例が 15 例と少ないので、今後もさらに妊娠例を増やし経過を観察していく必要があるが、習慣流早産を主訴とする軽度および中等度の子宮奇形に対しては手術療法がきわめて有効であると考えられる。

本論文では、1 つの試みとして X/M ratio を用いた子宮奇形の分類法を提示したが、いくつかの改良を加え、今後、検討することとする。

文 献

- 1) John, R. M., et al.: Obstetric outcome before and after metroplasty in woman with uterine anomalies, *Obstet. Gynecol.* 52: 63, 1978
- 2) 牧野恒久, 飯塚理八, : 不育症の総合的検査・治療法, *日産婦誌* 39 : 1159, 1987
- 3) 飯塚理八, 他, : 産婦の実際, 20 : 833-841, 1971
- 4) Veasy, C. B., et al.: Müllerian anomalies: a proposed classification (an analysis of 144 cases), *Fertil. Steril.* 32: 40, 1979
- 5) Kessler, M. et al.: Indications and results of metroplasty in uterine malformations, *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 24: 137, 1986

Analysis on congenital uterine anomalies in habitual abortions and evaluation of metroplasty

Koichi Nakada, Tsunehisa Makino,
Toshio Tabuchi and Rihachi Iizuka

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University,
Tokyo 160, Japan

As one of the routine tests for habitual abortion, hysterosalpingography (HSG) was carried out in 405 registered patients in our clinic.

(1) Congenital uterine malformations were detected in 56 patients (14%) out of 405 repeatedly aborted patients.

(2) By introducing our new index of X/M ratio (longitudinal length of uterine cavity vs dent of uterine fundus) to evaluate anomalies on HSG, 56 patients were divided into 34 arcuate ($0 < X/M < 1/3$), 18 partial septate ($1/3 \leq X/M < 1$), 2 complete septate ($X/M \approx 1$) and 2 unicornuate uteri.

(3) Before metroplasty, the live birth rate in the arcuate was 6% (8 cases of 129 pregnancies), 0% in the partial septate (none of 67 pregnancies), 11% in the complete septate (one of 9 pregnancies) and

14% in the unicornuate (one of 7 pregnancies), respectively.

These clinical data revealed that the larger the X/M ratio was, the more frequently spontaneous abortion was occurred. Exceptionally, in the case of the complete septate uterus which is morphologically resemble to unicornuate uterus, the prognosis was expectable than that in the arcuate or the partial septate uterus.

(4) After metroplasty, the live birth rate in the

arcuate group was improved to 89% (8 cases in 9 pregnancies) and 83% in the partial septate (5 cases in 6 pregnancies).

These data suggest that the incidence of spontaneous abortions in congenital uterine anomaly is related to the size and shape of the intrauterine septum and the prognosis for pregnancies was significantly improved by metroplasty.

(受付：1988 年 12 月 20 日)

Strassmann 手術により妊娠に至った T-shaped uterus の一例

T-shaped Uterus Associated with
Sterility; A Case Report Corrected
by Strassmann's Operation

筑波大学臨床医学系産婦人科

西田 正人 辻 泰二 山内 宏
Masato NISHIDA Taiji TSUJI Hiroshi YAMANOUCHI
岩崎 寛和
Hirokazu IWASAKI

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

2年4ヵ月間の原発不妊を主訴として来院した33歳のT-shaped uterus症例に対し、Strassmann手術による子宮形成術を行い、妊娠、分娩に成功した。T-shaped uterusが胎生期のdiethylstilbestrol-exposureにより発生することは知られているが、本症例にはその既往はなかった。本症例の経験によりT-shaped uterusが不妊原因となり得ること、また子宮形成術により妊孕性を回復することが示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 848—850, 1989)

はじめに

T-shaped uterusは子宮奇形の分類上単頸双角子宮に近い奇形と考えられるが、頻度がきわめて低いためその妊孕性に与える影響は明らかでない。今回、我々は原発不妊を主訴として来院し、子宮卵管造影にてT-shaped uterusと診断された症例に対し、Strassmann手術を施行して妊娠、分娩に成功したので報告する。

症 例

症例は33歳の主婦、結婚後1年4ヵ月の原発不妊を主訴として某病院を受診した。不妊症ルーチン検査では精液検査を含めて他に異常所見は無く、子宮卵管造影にて子宮奇形の診断を受けたが、直ぐに治療の必要はなく、外来管理下にもうしばらく様子を

みるという指示を受けた。その後、約1年経過するも妊娠しないため当院を受診した。

当院において子宮卵管造影を再検したところ、子宮内腔は図2に示すように左右対称のT字型を呈し、両側卵管の疎通性は良好であった。この他に不妊原因が発見されなかったため、この子宮奇形が不妊原因である可能性が高いと判断、子宮形成術を施行することにした。

術 式

開腹所見では、図1に示すように子宮は小鶏卵大で、底部がやや陥凹した双角子宮に似た形をとっていた。左右の卵巣、卵管に異常は認めず、腹腔内癒着、子宮内膜症等の不妊原因となり得る所見も認めなかった。

術式はStrassmannの術式を選択した。子宮卵管角



図1 手術時の子宮の形態

底部にやや陥凹が見られ、外見上は双角子宮に似る

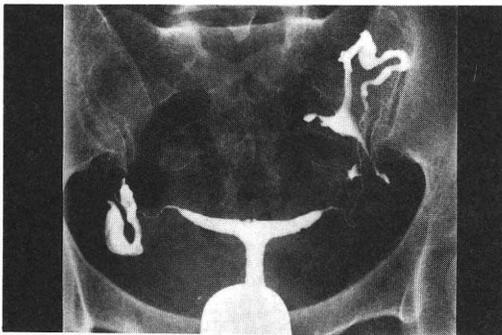


図2 術前の子宮卵管造影像

子宮腔はきれいなT字型を呈し、T-shaped uterusと診断した

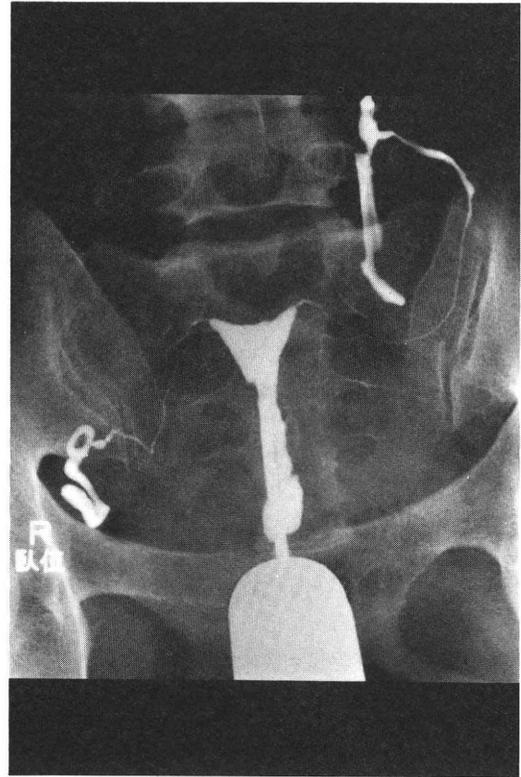


図3 Strassmann手術後の子宮卵管造影像

子宮は正常に近い形に形成されている

部の損傷を避けるため、両側円靭帯起始部を結ぶ子宮前壁線上に横切開を加え、子宮腔を充分に開放した後、Strassmann縫合を行った。筋層の縫合は2-0バイクリル糸を用いて2層に縫合し、1層目は結節縫合、2層目は連続縫合とした。その後、腹腔内を温生食2000mlで洗浄し、癒着防止の目的で32%デキストラン70を200ml腹腔内に注入して閉腹した。

術後経過

術後3ヵ月間の避妊を指導した後、子宮卵管造影を施行した。図3に見られるように子宮腔はほぼ正常に近い形態に復しており、両側卵管の疎通性も良好であったため妊娠を許可した。

その後、3周期目に自然妊娠し、妊娠経過に異常なく、妊娠38週0日、3420gの男児を他医にて帝王切開分娩した。

考 察

T-shaped uterus とはその名の通り、子宮卵管造影によって造影された子宮腔の形がT字型を呈する子

宮奇形である。その形態的特徴は、子宮の上部の狭窄にあると言われている²⁾。即ち、T字型の縦と横の線の交点では子宮腔が左右から絞られた形になっているため正常に比較して子宮上部が著しく狭窄をきたすことになる。この点が他の子宮奇形と T-shaped uterus を鑑別するポイントとされており、このような形態の異常は中隔子宮や双角子宮では見られない。

正常でも子宮内腔がややT字型をとることは10%程度であると報告³⁾されているが、本症例のように子宮上部の狭窄が著しく、T-shaped uterus と呼ばれ、しかも妊孕性に影響を与える子宮奇形となるとその頻度は低く、筑波大学付属病院においては開院以来の子宮卵管造影1500例中ただ一例であった。

この様に、本邦における T-shaped uterus の頻度は極めて低いものであるが、胎内において diethylstilbestrol (DES) にさらされた女兒に T-shaped uterus を含めた子宮奇形が多数発生することが知られている。Rennell⁵⁾は4例の T-shaped uterus 症例を報告し、そのうち3例は DES-exposure 症例、他の一例は、この様な既往の無い症例であったと述べている。一方、Nunley ら⁴⁾は DES-exposure 症例11例中5

例 (45%) に T-shaped uterus が発見されたと述べており、11 例中 6 例が未妊婦であり、T-shaped uterus と不妊との関連を指摘している。このように T-shaped uterus の大部分は DES によって誘発されたものであり、自然発生した T-shaped uterus の報告例は極めて少ない。ちなみに、本症例の母親は妊娠中にホルモン剤等の投与を受けたことはなく、本症例の T-shaped uterus は自然発生したものと考えられた。

T-shaped uterus の治療法として Rennell⁵⁾ は黄体ホルモンによる黄体期の維持によって 4 例中 1 例が妊娠に至った事を報告している。一方、Muasher ら³⁾ は流産歴のある T-shaped uterus の 2 症例に Jones の術式を施行し、2 例共その後妊娠、分娩に成功したという。

我々は本症例に対して Jones の術式ではなく Strassmann の術式を採用した。これは、Jones の術式は本来中隔を切除して子宮を単一化する術式であり、T-shaped uterus や双角子宮のように切除すべき中隔が存在しない子宮奇形に応用すると、いたずらに術後の子宮内腔を狭小化させてしまう結果になると考えられたためである。ただでさえ、本症例の子宮腔は狭く、有効な子宮内膜面は少ないのであるから、術式は子宮内膜面を出来るだけ有効に利用できる術式を選択すべきであり、このためには、理論的に子宮内膜面積を狭くしない Strassmann の術式の方が優れていると考えられる。また、T-shaped uterus においては前述の様に子宮上部の狭窄がその特徴であり、この狭窄の解除にも Strassmann の術式の方が有効と考えられる。結果的に子宮はきれいに形成され、ほぼ正常の形態に近い形となった。この形は Muasher らの報告に見られる形成後の写真に比較して、より正常に近い形をとっている。

T-shaped uterus は DES-exposure 症例で見られるように、不妊となったり、あるいは習慣性流産の原因となったりする。DES-exposure 症例ではその他の子宮の部位にも、子宮腔部や頸管の形成不全や子宮腔の憩室などの異常が存在するため、どの程度 T-shaped uterus そのものが不妊の原因となっているかは明らかでない。しかしながら、今回の症例では子宮腔部や頸管に全く異常は認められず、子宮腔内にも憩室様の像は存在しなかった。にもかかわらず形成術により術後早期に妊娠に至り、また子宮奇形の他に不妊原因となるべき検査所見も認められなかった。従って、本症例においては T-shaped uterus そのものが不妊原因となっていたと考えられる。

子宮奇形が何故不妊や習慣性流産の原因となるかは明らかにされていない。何故なら、同じ形の子宮

奇形であっても、正常の妊娠経過を辿る症例もあれば、習慣性流産や不妊となる症例もあり、これらの症例の子宮卵管造影像を retrospective に比較しても予後による相違が発見されないからである。この様に T-shaped uterus が何故不妊原因となったかは不明であるが、今回の我々の経験によってこの種の子宮奇形が不妊原因となり得るものであり、また Strassmann 手術によって妊孕性を回復できることが示された。

文 献

- 1) 中村正彦, 堂地勉, 野崎雅裕, 吉満陽孝, 大塚治夫, 永田行博, 子宮卵管造影法で見た子宮形態と月経異常の関連性に関する検討, 日産婦誌, 35: 953, 1983
- 2) Kaufman, R. H., Adam, E., Noller, K., Irwin, J. F., and Gray, M.: Upper genital tract changes and infertility in diethylstilbestrol-exposed women, Am. J. Obstet. Gynecol. 154: 1312, 1986
- 3) Muasher, S. J., Acosta, A. A., Garcia, J. E., Rosenwaks, Z., and Jones, H. W. Jr.: Wedge metroplasty for the septate uterus: an update, Fertil. Steril. 42: 515, 1984
- 4) Nunley, W. C. Jr., Pope, T. L. Jr. and Bateman, B. G.: Upper reproductive tract radiographic findings in DES-exposed female offspring, AJR 142: 337, 1984
- 5) Rennell, C. L.: T-shaped uterus in diethylstilbestrol (DES) exposure, AJR 132: 979, 1979

T-shaped uterus associated with sterility; A case report corrected by Strassmann's operation.

Masato Nishida, Taiji Tsuji, Hiroshi Yamanouchi and Hirokazu Iwasaki

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

A 33-year-old woman in good general health was referred for hysterosalpingography with a diagnosis of primary infertility. Radiography revealed a T-shaped uterus. There was no history of diethylstilbestrol exposure. With the Strassmann operation, she delivered a normal boy of term development by elective Caesarean section.

(受付: 1989年2月3日)

CONSERVATIVE TREATMENT OF UTERINE LEIOMYOMAS WITH INTRANASAL GONADOTROPIN RELEASING HORMONE ANALOGUE (BUSERELIN); THE CLINICAL EFFICACY AND HORMONAL CHANGE IN 15 JAPANESE PATIENTS

Takara YAMAMOTO, Megumi TOMIOKA, Hideo HONJO,
Jo KITAWAKI, Mamoru URABE and Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602, Japan

Abstract: 15 patients with uterine leiomyoma were treated with intranasal gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue (buserelin) for 24 weeks. The size of the whole uterus and myoma node was significantly reduced (17.1-64.0%) during therapy. Serum concentrations of pituitary gonadotropins (FSH and LH) and estrogens (E_1 , E_2 and E_1 -S) were also decreased. No bone loss was observed either on the basis of patients' complaints or hand X-rays using the MD (microdensitometry) method.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 851-857, 1989)

Introduction

Uterine leiomyoma is a benign form of estrogen dependent tumor which occurs in women from the late 30s'. After onset of menstruation, the tumor grows until menopause, from which time its size tends to decrease. Patients with uterine leiomyoma complain mainly of hypermenorrhea and menorrhagia, but the cessation of ovarian function causes the disappearance of these symptoms. Uterine leiomyoma is extremely rare towards malignancy. However, until recent years, the therapy has been surgery such as hysterectomy or myomectomy, even in cases of unmarried women, because of the unavailability of an effective alternative treatment.

Recently, the use of gonadotropin releasing

hormone agonist has been proposed as a new approach for a conservative therapy for uterine leiomyomas¹⁻³⁾. Thus, in our clinic, an intranasal gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue, buserelin, was administered to 15 Japanese patients with uterine leiomyoma, after which myoma size was monitored using ultrasonography with measurements of various serum hormonal levels.

Patients and Therapy

In the outpatient clinic of our department, GnRH analogue (buserelin, Hoechst) was administered daily as an intranasal spray for 24 weeks at a dose of 600 to 1200 μ g per day. The patients' ages were within the range of 28 to 48 years; 2 were in the 20-30 year age group, 2 were

in the 30-40 year group and 11 were in the 40-50 year group. The criteria for patients selection was included both symptoms and myoma size. All patients gave their informed consent to the treatment regimen prior to therapy.

The size of the whole uterus as well as the myoma was ultrasonographically measured from three directions (L; length, AP; anteroposterior, T; transverse of uterus). The uterine volume (cm³) was estimated as maximum L (cm) × AP (cm) × T (cm). In addition, serum levels of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hor-

none (LH), testosterone (T), estrone (E₁), estradiol-17β (E₂), and estrone sulfate (E₁-S) were determined using the corresponding RIA kits; an FSH RIA Kit (Daiichi Radioisotope Laboratories, Ltd., Tokyo, Japan), an LH RIA Kit (Daiichi Radioisotope Laboratories, Ltd., Tokyo Japan), an E₁ test set (Travenol, Tokyo, Japan), an E₂ RIA Kit (CEA IRE Sorin, Saclay, France) and an Direct E₁-S RIA⁴⁾. Whole blood cell tests, liver function tests, and assays of serum electrolytes, total cholesterol and HDL cholesterol were also carried out at one month intervals throughout the

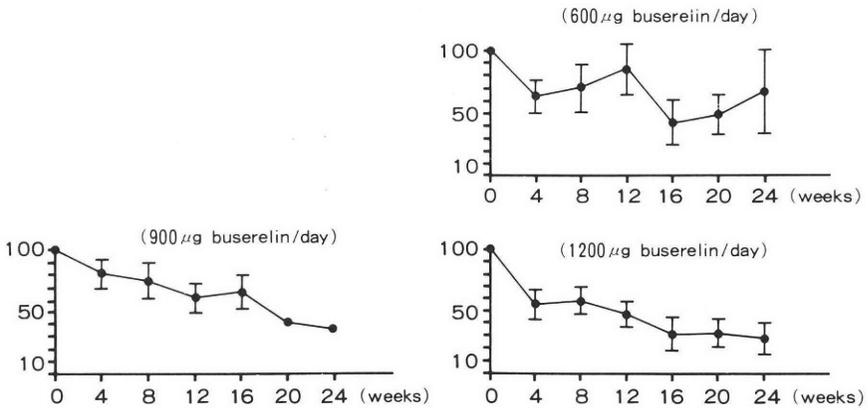


Fig. 1 The reduction rate of whole uterine volume during buserelin therapy. The data plotted are percentages (mean ± SEM) calculated relative to the whole uterine volume prior to the initiation of therapy.

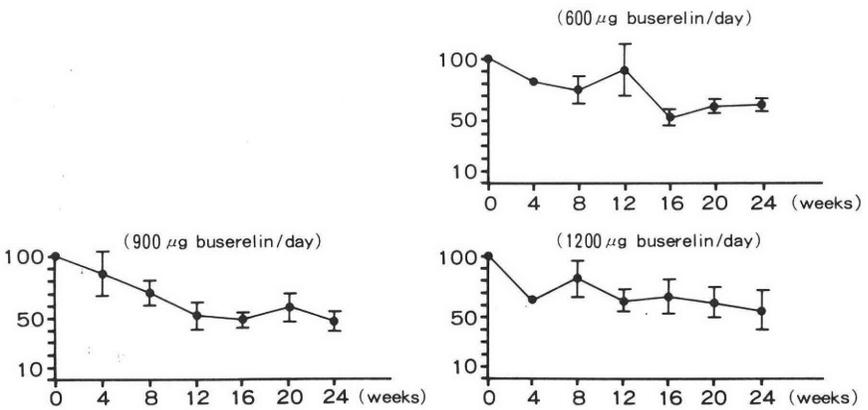


Fig. 2 The reduction rate of myoma node volume during buserelin therapy. The data plotted are percentages (mean ± SEM) calculated relative to the myoma node volume prior to the initiation of therapy.

treatment course. X-ray checks of both hands (employing the MD (microdensitometry) method⁵⁾ for finger bones) were administered at the initiation and termination of therapy.

For all patients, the intranasal administration of buserelin as a GnRH analogue was started on the 2nd-4th day of menstruation. The subjects were advised to record their BBT, complaints, and times at which this drug was taken in personal notebooks.

Results

Fifteen patients with uterine leiomyoma were randomized into 3 groups on the basis of buserelin (a GnRH agonist) dosage as follows:

- A group 600 μ g (300 μ g \times 2) per day of buserelin spray
(5 cases; nos. 5,6,11,13 and 15);
B group 900 μ g (300 μ g \times 3) per day of buserelin spray
(5 cases; nos. 1,3,7,10 and 14);

Table 1 Whole uterine volumes, myoma node volume, and serum gonadotropin and serum estrogen concentrations before and during buserelin therapy. The above values are expressed as mean \pm SEM. (* ; p value < 0.01 compared to prebuserelin data in T-test)

(A). 600 μ g of buserelin per day, (B). 900 μ g of buserelin per day, (C). 1200 μ g of buserelin per day.

(A)

600 μ g of buserelin per day (n = 5)		pre-buserelin	after 12 weeks of buserelin	after 24 weeks of buserelin
	whole uterine volume (cm ³)	542 \pm 74	447 \pm 58	332 \pm 45*
myoma node volume (cm ³)	110 \pm 41	41 \pm 12	29 \pm 10	
FSH (IU/I)	12.5 \pm 3.4	7.2 \pm 1.3	11.9 \pm 2.1	
LH (IU/I)	16.8 \pm 4.5	11.6 \pm 1.3	17.0 \pm 2.8	
E ₁ (pmol/I)	759 \pm 333	352 \pm 37	192 \pm 33*	
E ₂ (pmol/I)	568 \pm 222	302 \pm 121	137 \pm 52	
E ₁ -S (pmol/I)	465	<100	<100	

(B)

900 μ g of buserelin per day (n = 5)		pre-buserelin	after 12 weeks of buserelin	after 24 weeks of buserelin
	whole uterine volume (cm ³)	470 \pm 58	254 \pm 73*	224 \pm 62*
myoma node volume (cm ³)	177 \pm 53	112 \pm 32	96 \pm 13	
FSH (IU/I)	16.1 \pm 2.9	9.1 \pm 1.6	12.7 \pm 33	
LH (IU/I)	15.0 \pm 2.2	15.9 \pm 2.6	13.6 \pm 48	
E ₁ (pmol/I)	537 \pm 93	270 \pm 59*	204 \pm 33*	
E ₂ (pmol/I)	258 \pm 85	278 \pm 109	89 \pm 16	
E ₁ -S (pmol/I)	425	<100	<100	

(C)

1200 μ g of buserelin per day (n = 5)		pre-buserelin	after 12 weeks of buserelin	after 24 weeks of buserelin
	whole uterine volume (cm ³)	469 \pm 23	271 \pm 45	193 \pm 40*
myoma node volume (cm ³)	70 \pm 41	34 \pm 22	9 \pm 6*	
FSH (IU/I)	13.6 \pm 5.0	10.2 \pm 1.0	27.9 \pm 20	
LH (IU/I)	13.5 \pm 2.2	12.4 \pm 1.0	7.8 \pm 0.6*	
E ₁ (pmol/I)	496 \pm 78	340 \pm 44	241 \pm 41*	
E ₂ (pmol/I)	218 \pm 44	145 \pm 48	117 \pm 40	
E ₁ -S (pmol/I)	503	<100	<100	

C group 1200 μ g (300 μ g \times 4) per day of buserelin spray
(5 cases; nos. 2,4,8,9 and 12);

Dosages prior to the start of therapy; 600, 900 or 1200 μ g per day of buserelin was administered to subjects chosen randomly by case no.

1. Volume of whole uterus and leiomyoma, and hormone levels during treatment

Before treatment, the uterine volume varied from 293 to 794cm³ as determined by ultrasonography. Following a drug administration period of 24 weeks, uterine leiomyoma size was diminished in all patients.

Figure 1 and 2 shows the volume changes of the whole uterus, including the myoma nodes, during buserelin treatment. At 4 weeks after therapy was started, a rapid decrease in size was noted in 9 cases of uterine leiomyoma. However, 2 tumors showed a slight enlargement at 4 weeks and, thereafter, a gradual shrinkage. After 8 weeks of buserelin administration, a reduction in uterine leiomyoma size was observed for any dosage of GnRH agonist. However, the tumors reduction showed especially a tendency to be effective from 900 μ g buserelin per day up.

Uterine leiomyomas volume was reduced by range of 17.1-64.8% at the termination of therapy. No correlation was found between initial tumor size and the subsequent regression rate, or between the rate of decrease in size of the whole uterus and the regression rate of an individual myoma node. The reduction rate of the whole uterus seemed to be related to the buserelin dosage (Fig. 1 and 2). However, just after the start of buserelin treatment, a slight re-enlargement of the leiomyoma was noticed in a few cases.

Twelve weeks after treatment began, serum FSH levels appeared to be slightly suppressed, whereas LH levels were also slightly decreased. In most of the patients, E₂ levels in serum samples were slightly elevated at 4-8 weeks, however, these progressively decreased and stabilized at 24 weeks after treatment course. Serum E₁ level changed in parallel with E₂ levels, showing a general decline during the period of drug administration, but E₁-S levels decreased and remained under 100 pmol/l in all subjects (Table 1).

Pretreatment testosterone levels were low in all patients and did not change significantly during treatment. Serum CA-125 concentrations with an CA-125 Kit (CIS) were greater than 35 U/ml in 9 out of 15 patients.

2. Vaginal bleeding and menorrhagia

With the exception of 2 patients (nos. 1 and 2), none (13 cases) complained of vaginal bleeding during the treatment period. In patient no. 1, both the whole uterus and myoma node volumes decreased dramatically, as did serum estrogen levels (E₁ and E₂), however, irregular vaginal bleeding was experienced, and the reduction in serum LH concentration was not so marked (Fig. 3). The LH level in case no. 9 remained low and E₁ and E₂ levels changed little while buserelin was administered. Serum CA-125 concentration (362 U/ml) diminished remarkably in this case. Generally, elevated serum CA-125 levels may indicate that adenomyosis accompanies leiomyoma.

Most symptoms of menorrhagia noted prior to treatment disappeared during course of drug therapy.

3. Other symptoms and blood test

Several patients in the over 40-year-old age bracket experienced temporal climacteric like disturbances (hot flush and mild shoulder stiffness) at 2-3 weeks after the initiation of treat-

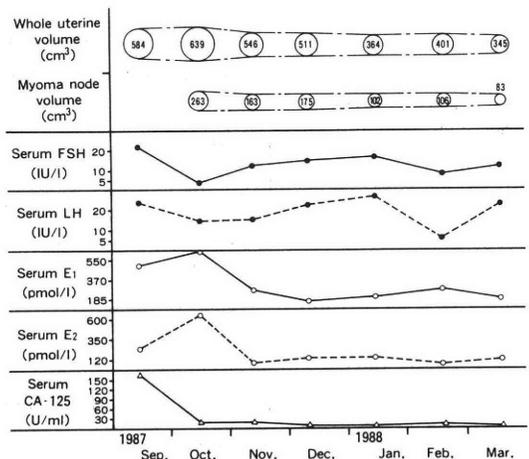


Fig. 3 The reduction of uterine leiomyoma and the levels of serum gonadotropins and serum estrogens during the intranasal administration of buserelin (900 μ g per day) in patient no. 1 (41 years old).

ment, but such symptoms disappeared after a few days. In all the subjects in this study, liver function, electrolytes and whole blood cell count were within the normal range throughout the treatment period. Serum Ca and P levels were also within the normal range, and no bone loss was observed by the single bone densitometry using the MD method.

Discussion

We treated Japanese patients with uterine leiomyoma by administering an intranasal spray of GnRH analogue (buserelin) at a clinic attached to our hospital. The administration period began in September, 1987, and lasted for 24 weeks depending on the wishes of each patient. Subsequent reductions in uterine volume, as compared with values before treatment, ranged from 17.1 to 64.0%; myoma nodes also decreased in size, but the rates of reduction differed between individual nodes within the same uterus. Pituitary gonadotropin levels became significantly lower following the administration of buserelin. The sizes of the uterus and the myoma nodes were reduced significantly in all patients but in no instance did the myoma disappear completely.

In 5 of 15 cases, the volume of the uterus increased slightly at times during the study. This seemed to almost match the temporal elevation of serum E_2 concentration noticed at 4-8 weeks in 8 cases. Thereafter, however, E_2 levels in sera decreased in close accordance with falling E_1 levels.

The initial value of serum CA-125 was over 35 U/ml in 9 of 15 patients and the concentration decreased in synchronization with E_2 levels. Thus, uterine adenomyosis or endometriosis might also have been present. Serum E_1 -S level was not a valuable parameter for monitoring shrinkage of uterine leiomyomas during buserelin treatment.

There have been some reports concerning the treatment of uterine leiomyoma by GnRH agonist. Maheux et al¹⁹ found that, in 10 of 11 patients, uterine leiomyomas exhibited over 90% regression by volume at 6 months after first administration of buserelin; regression was most rapid in the first 2 months of therapy.

Buserelin was first administered on day 2, 3 or 4 of the menstrual cycle at our clinic. However, Healy et al¹¹ chose day 21 of the menstrual cycle for the commencement of buserelin therapy in patients with uterine myoma. Clinical opinion as to the most efficacious day for the commencement of GnRH agonist treatment are divided; when rapid suppression of E_2 production is desired in patients with estrogen-dependent diseases, drugs are administered from the luteal phase. On the other hand, commencement in the follicular phase incurs unwanted elevation of E_2 concentration but seems to bring about a smaller degree of climacteric disorder than that begun in the luteal phase.

As far as the effects of different daily doses of buserelin are concerned, our results suggest that there were a slight differences between 600 μ g and 900 μ g up per day in terms of the amount of shrinkage of uterine myoma caused. Subsequently, it is necessary to determine whether or not the reduction in uterine leiomyoma size persists after the termination of treatment; in this study, 4 of the 15 patients exhibited rapid growth of the uterus and resumed their previous complaints within 3 months of the cessation of therapy. Afterwards, these patients had to undergo hysterectomy, pathological findings being all submucous leiomyoma of uterus. The submucous myoma may be ineffective to buserelin. Thus, the effects of buserelin cannot be relied upon to persist for a long period. However, Rolland et al²⁰ has suggested that, even if the effect of a GnRH agonist is only temporary, women approaching menopause should be able to gain from treatment involving this agent since the symptomatology resulting from a uterine leiomyoma will disappear after menopause anyway.

From our results, low serum estrogen levels seemed not to be necessary for leiomyoma shrinkage. Maheux et al¹⁹ have reported cases of substantial leiomyoma reduction despite serum concentrations of estradiol remaining in the early follicular range of the menstrual cycle.

Longstanding depletion of estrogen during GnRH analogue therapy may lead to some bone loss. However, in this study, almost no changes

were observed in bones of the hand when these were checked by the MD method before and after the treatment program. Spinal and other bone assessment may be more important. Van Leusden⁶⁾ has reported that when 4 mg of GnRH analogue Decapeptyl was injected in every 4 weeks for a total of 24 weeks osteocalcin increased from 6.2 ± 1.4 to 9.5 ± 1.1 $\mu\text{g/l}$. In another investigation, Eckstein et al⁷⁾ found that, during GnRH analogue treatment, all patients displayed an increase in urinary secretion of calcium as well as an increase in the urine/creatinine ratio. Thus, although these findings are within the normal range, GnRH agonist should be administered for as short a time as possible to minimize any chance of increased bone loss.

It has previously been reported that patients under 35 years of age with uterine leiomyoma show a greater degree of shrinkage of the fibroid mass compared with older women, and that intranasal or subcutaneous GnRH agonist treatment seems to be effective in bringing about a reduction in uterine fibroids⁸⁾. From our own experience, results from 2 28-year-old patients examined here appear to support these findings. However, Collins⁹⁾ recently found that, despite successful reduction in tumor size in 21 patients during GnRH agonist therapy, uterus size increased until, 12 weeks after treatment, volumes were the same as those seen initially. This treatment regimen may, therefore, make imminent surgery easier; specifically three months preoperative buserelin treatment may be a good means of correcting anemia and other symptoms of leiomyoma. In addition, such therapy may be useful when surgery is contraindicated.

Acknowledgements: We wish to thank Miss Etsuko Murata for typing the manuscript. This research was presented at the 8th International Congress of Endocrinology, July 22, 1988, Kyoto, Japan.

References

- 1) Healy, D. L., Lawson, S. R., Abbott, M., Baird, D. T. and Fraser, H. M.: Toward removing uterine fibroids without surgery: Subcutaneous

- infusion of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist commencing in the luteal phase, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 619, 1986
- 2) Rolland, R., Franssen, A. M. H. W., Willemsen, W. N. P. and Corbey, R. S.: Uterine leiomyoma and LH-RH agonist treatment a preliminary report, *Gonadotropin Down-Regulation in Gynecological Practice*: 313, 1986
- 3) Maheux, R., Lemay, A. and Merat, P.: Use of intranasal luteinizing hormone-releasing hormone agonist in uterine leiomyomas, *Fertil. Steril.* 47: 229, 1987
- 4) Honjo, H., Kitawaki, J., Itoh, M., Yasuda, J., Iwasaku, K., Urabe, M., Naitoh, K., Yamamoto, T., Okada, H. and Ohkubo, T.: Serum and urinary estrone sulfate during the menstrual cycle, measured by a direct radioimmunoassay, and fate of exogenously injected estrone sulfate, *Hormone Res.* 27: 61, 1987
- 5) Ohta, H. and Nemoto, K.: Evaluation of osteoporosis associated with menopause and oophorectomy by microdensitometry, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 40: 415, 1988
- 6) Van Leusden, H. A. I. M.: Rapid reduction of uterine fibroids with monthly injections of D-Trp⁶-GnRH (Abstr 85), Presented at the International Symposium on GnRH analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva, Swiss, Feb. 1988
- 7) Eckstein, N., Hetman-Peri, Yedwab, G., Vagman, I., Abramowicz, J. and Ayalon, D.: Results of long term treatment of patients with uterine leiomyoma with GnRH agonists (Abstr 150), Presented at the International Symposium on GnRH analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva, Swiss, Feb. 1988
- 8) Healy, D. L.: The use of LH-RH agonists in treating uterine fibroids (Abstr 16), Presented at the International Symposium on GnRH analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva, Swiss, Feb. 1988
- 9) Collins, R. L.: Treatments of symptomatic leiomyoma uterine with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist: Long term follow-up (Abstr 79), Presented at the International Symposium on GnRH analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva, Swiss, Feb. 1988

GnRH アナログ (ブセレリン) による

子宮筋腫の薬物治療——

臨床的効果と血中ホルモン値の 推移について

京都府立医科大学産婦人科学教室

山本 宝 富岡 恵 本庄英雄
北脇 城 卜部 諭 岡田弘二

子宮筋腫患者 15 人を無作為に 3 群に分け、各群 5 人に対して、GnRH アナログ(ブセレリン)を 600 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、900 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、1200 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、24 週間投与し、臨床的效果(症状の改善・消失と筋腫の縮小)並びに血中ホルモン値の推移を検討した。

その結果、子宮の大きさ及び筋腫の大きさはいずれ

も投与前に比べ有意に縮小し、その縮小度合は 17.1~64%であった。また筋腫の縮小は 900 μg 以上/日投与群で強くあらわれた。

ブセレリンの投与期間中、血中 FSH, LH, E_1 , E_2 , E_1-S 値は有意に下降したが、肝機能、腎機能、造血機能には異常は認められなかった。また MD 法による骨量の変化も認められなかった。

以上のことより、子宮筋腫に対して GnRH アナログ(ブセレリン)は有効であることが示唆された。

(受付: 1989 年 6 月 2 日特掲)

間接免疫ペルオキシダーゼ法による
クラミジア感染症の血清学的診断法の意義
—特に不妊・不育患者について—

Significance of Serum Antibodies for Chlamydia
Trachomatis in Patients with Sterility and
Infertility Detected by the Immunoperoxidase Assay

新潟大学医学部産科婦人科学教室

楊 丙 辰	荒 川 修	谷 啓 光
Bingchin YANG	Osamu ARAKAWA	Hiromitsu TANI
織 田 和 哉	七 里 和 良	佐 藤 芳 昭
Kazuya ODA	Kazuyosi SHICHIRI	Yoshiaki SATO

Department of Obstetrics and Gynecology
Niigata University School of Medicine, Niigata 951, Japan

不妊・不育外来を受診した患者 183 例に対し、血清中の抗クラミジア抗体を測定して、次の結果を得た。

1. 抗クラミジア抗体陽性率と活動性感染率を、対照である正常妊婦 16.7%, 13.3%と比較すると、卵管不妊患者で 47.6%, 42.9%, と有意に高値であった。原発性不妊症患者では 30.0%, 24.3%, 続発性不妊症患者についても 28.0%, 28.0%と、その抗体保有率は高値を示した。しかし習慣性流産患者 13.3%, 13.3%, 新患男性患者 10.8%, 10.8%では正常妊婦と同程度であった。

2. 陽性者の平均年齢は 31.2 歳 (23~39 歳) であり、31/51 例 (59%) が 31~35 歳であった。

3. 新患男性患者では、尿道よりの抗原検査では陰性の 28 例中 3 例 (10.7%) に抗体陽性 (活動性感染) が認められた。

4. 精液所見による分類では、症例数が少なく、乏精子症・精子無力症に特に多く存在すると言う傾向は見られなかった。

以上より血清中の抗クラミジア IgA 抗体と IgG 抗体の測定は、不妊・不育外来において、クラミジア感染症患者のスクリーニング的役割が期待できると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 858—862, 1989)

緒 言

米国では、20~24 歳の若い夫婦でのみ不妊症が有意に増加し、他の年齢での増加は見られない。この原因の一つに性行為感染症 (sexually transmitted diseases: STD) の増加が考えられる¹⁾。STD 患者の中で Chlamydia trachomatis (以下 C. trachomatis)

感染症の占める割合は 12~37%程度と報告されており、ヒト生殖機能に及ぼす影響は少なくない²⁾。すなわち STD の重要な病原体である C. trachomatis は、不妊や流早産の大きな原因の一つになるとも推測される。

この C. trachomatis の検査法には直接同定法と抗体測定法がある。最近、抗 C. trachomatis IgA 抗体

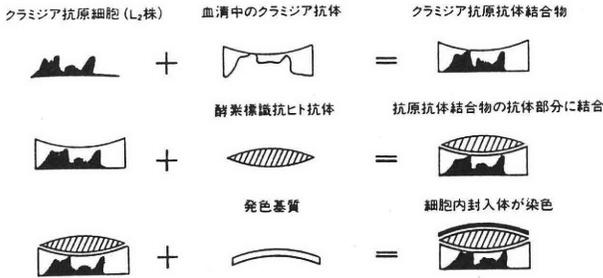


図1 抗クラミジア抗体測定用キット測定原理

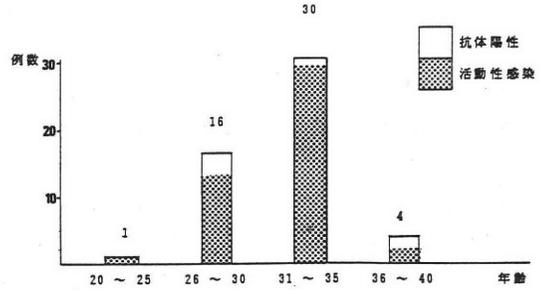


図2 抗クラミジア抗体陽性者年齢分析 (n=51)

が *C. trachomatis* 感染患者に高率に検出され、またその治療効果の判定にも使えると言う報告がある³⁾。

今回、我々は不妊・不育外来患者の血清を対象に間接免疫ペルオキシダーゼ法 (IPA 法: Indirect immunoperoxidase assay) により、血清中の抗 *C. trachomatis* IgA 抗体と IgG 抗体を測定し、不妊・不育外来患者における *C. trachomatis* 感染状況について比較検討し、その意義について考察を加えた。

対象および方法

1. 対象

昭和 63 年 1 月から平成元年 2 月までに新潟大学附属病院産婦人科不妊・不育外来を受診した患者 183 例とした。その内訳は

- | | |
|--------------|------|
| 1. 原発性不妊症患者 | 70 例 |
| 2. 続発性不妊症患者 | 25 例 |
| 3. 新患男性患者 | 37 例 |
| 4. 習慣性流産患者 | 30 例 |
| 5. 卵管因子不妊症患者 | 21 例 |

合 計 183 例

対照として当科産科外来を受診した正常妊婦 30 例を選び、計 213 例について測定、分析した。

新患男性患者の精液所見の分類法は精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下を乏精子症とした。精子運動率 50% 以下を精子無力症とした。また精子数、精子運動率ともに上記以下の症例は乏精子・無力症とし、ともに上記以上の症例を正常とした。

2. 方法

1) 抗 *C. trachomatis* 抗体測定法

外来受診時採血、血清を分離し、直ちに測定、または測定まで -20°C でストックし、3 カ月以内に測定した。測定時には患者血清を 16 倍、64 倍、128 倍に希釈した。

今回使用した抗クラミジア IgA 抗体、IgG 抗体測定用キット (イバザイム クラミジア AG: サビオン・

ダイアグノステック社、イスラエル) の感染細胞固定スライドのウエルには *C. trachomatis* の L 2 株 (抗原) が塗布されている。抗 *C. trachomatis* IgA 抗体ないしは IgG 抗体が血清中に存在する場合、抗原抗体反応により、*C. trachomatis* 抗原抗体結合物が生じる。次に、洗浄により血清中の未反応液を除去し、酵素標識抗ヒト IgA 抗体および IgG 抗体をそれぞれのウエルに加えて反応させる。酵素標識抗体は *C. trachomatis* 抗原抗体結合物の抗体部分に結合する。洗浄後、発色基質を添加すると、細胞内封入体が濃青色から黒褐色に染色される。血清中に抗 *C. trachomatis* 抗体が存在しない場合、抗原と抗体が結合せず、洗浄により血清が除去された。反応が生じないため封入体は染色されない (図 1、参照)。この細胞内封入体を光学顕微鏡 (200 倍) でブルーフィルターを使用し検鏡した。

判定は Piura ら⁴⁾の成績にしたがって、IgG 64 倍陽性のもは、感染陽性、さらに IgG 128 倍陽性または IgA 16 倍陽性のもは、活動性感染とし、すべて陰性のもは感染陰性とした。この方法の特徴として、IgA、IgG の抗体価を組み合わせることにより、活動性感染および抗体陽性に分けて判定できることである。

2) 抗原検出法

外来受診した男性患者の尿道口に綿棒を 2 ~ 4 cm 挿入し、上皮細胞を採取した。酵素免疫法 (EIA 法) による比色定量法の Chlamydiazyme (Abbott 社) により測定した。

成 績

1) *C. trachomatis* の各群における陽性率

各対象群での抗体陽性率と活動性感染を正常妊婦 (16.7%, 13.3%) と比較すると、卵管因子不妊症患者 (47.6%, 42.9%) で有意に高値であった。原発性不妊症患者 (30.0%, 24.3%)、続発性不妊症患者 (28.0%, 28.9%) でも高値であった。しかし習

表1 C. trachomatis の血清抗体価

対 象	n	IgG 64×	IgG 128×	IgA 16×	抗体陽性率	活動性感染
原発性不妊症患者	70	21/70(30.0%)	16/70(22.9%)	7/70(10.0%)	21/70(30.0%)	17/70(24.3%)
続発性不妊症患者	25	7/25(28.0%)	7/25(28.0%)	1/25(4.0%)	7/25(28.0%)	7/25(28.0%)
新患男性患者	37	4/37(10.8%)	4/37(10.8%)	0/37(0 %)	4/37(10.8%)	4/37(10.8%)
卵管因子不妊患者	21	10/21(47.6%)	8/21(38.1%)	4/21(19.0%)	10/21(47.6%)*	9/21(42.9%)*
習慣性流産患者	30	4/30(13.3%)	4/30(13.3%)	2/30(6.7%)	4/30(13.3%)	4/30(13.3%)
正常妊婦	30	5/30(16.7%)	4/30(13.3%)	1/30(3.3%)	5/30(16.7%)*	4/30(13.3%)*
合 計	213	51/213(24%)	43/213 (20%)	15/213 (7%)	15/213 (24%)	45/213 (21%)

* P < 0.05

表2 新患男性患者における C. trachomatis 抗原と抗体陽性率

症 例	n	抗 原 陽 性	抗 体 陽 性	活 動 性 感 染
	28	0/28(0%)	3/28(10.7%)	3/28(10.7%)

表3 新患男性患者における精液所見別 C. trachomatis 抗体陽性率

精 液 所 見	n	抗体陽性率
正 常	9	1/ 9(11%)
乏精子症	6	1/ 6(16%)
精子無力症	15	2/15(13%)
乏精子・無力症	7	0/ 7(0%)

性流産患者(13.3%, 13.3%), 新患男子患者(10.8%, 10.8%)は正常妊婦と同程度であった(表1)。

2) 陽性者年齢分布

陽性者の平均年齢は31.2歳で31~35歳は35/51例(59%)を占めた(図2)。

3) 新患男性患者における C. trachomatis 抗原と抗体陽性率

新患男性患者のうち抗原検査を実施した28症例において、抗原は全て陰性であったが3例に抗体陽性が認められた(表2)。

4) 新患男性患者における精液所見別陽性率

正常精液例9例中1例11%が陽性であった。乏精子症例6例中1例16%が陽性であった。精子無力症例15例中2例13%が陽性であった。乏精子・無力症例7例は全て陰性であった(表3)。

考 察

米国での統計分析をみると、1965年に3.6%であった不妊症の頻度が、1982年には10.6%へと、20~24歳の若い夫婦でのみその率が有意に増加している。しかし他の年齢での増加は見られない。この原因の一つに結婚前におけるSTDの増加が考えられる¹⁾。

STD患者の中で非淋菌性尿道炎の主因である C. trachomatis 感染症の占める割合は12~37%程度と報告されている²⁾。特に若年STD患者では75%の高率に C. trachomatis が陽性であると言う報告もあり³⁾、最近是不妊との関係が大きな注目をあびている。すなわち、このSTDの重要な病原体である C. trachomatis は、男性において尿道炎、前立腺炎、副睾丸炎などを起こすことが知られており、後者の2つは妊孕能に影響する。女性においては、子宮頸管炎、子宮付属器炎、腹膜炎などを起こし、その後遺症として卵管性不妊症、子宮外妊娠など不妊や不育症の原因になるとも言われている。

現在臨床的な C. trachomatis の主な検査法には、直接同定法と抗体測定法があり、前者には、細胞培養法と抗原検出法がある。実際的な測定法としては抗原検出法である蛍光抗体法を用いた直接塗染染色法の Micro Trak と EIA による比色定量法の chlamydiazyme がある。抗体測定法には Micro IF、ELISA 法がある。最近抗 C. trachomatis IgA 抗体が C. trachomatis 感染患者に高率に検出され、またその治療効果の判定にも使えることが、Piura ら⁴⁾により報告された。

そこで我々はこの間接免疫ペルオキシダーゼ法(IPA法: Indirect immunoperoxidase assay)により、血清中の抗 C. trachomatis IgA 抗体と Ig G 抗体を特に不妊・不育患者血清を中心に測定した。吉沢によると、IgM 抗体は感染後1週目より検出され、7週以降は検出されなかった。一方 IgG、IgA 抗体は2週目より検出され、8週目以降も抗体価の低下を認めず、再感染後では IgG、IgA の再上昇が認められた。しかし IgM の再上昇は認められなかった。これらの

ことより抗体価測定による *C. trachomatis* の診断を行なう場合、本測定法の場合、IgA 抗体 16 倍以上、IgG 抗体 64 倍以上を活動性感染の指標とするのが妥当であると、Sarov と同じような報告している⁶⁾。我々もそこでこの判定のクライテリアを採用したが、これにより陽性率についてみると、対照とした正常妊婦の陽性率は 16.7% であった。この値は Chlamydiazyme での陽性率は 9.5%⁷⁾、IgG 抗体陽性率 35.9%、IgA 抗体陽性率 16.0%⁸⁾ という報告とほぼ同じであり、一般的には妥当な値であると考えられる。

不妊症患者での陽性率が高いことは、すでに幾つかの報告をみるが、今回の成績では続発性不妊症患者 28%、原発性不妊症患者 30%、卵管因子不妊患者 47.6% であった。高田は不妊症患者で Ipazyme で抗体陽性率 31.5%⁹⁾、Quinn は IgA 抗体陽性 44.2%¹⁰⁾ と報告している。

今回は正常妊婦を対照として比較すると、卵管因子不妊患者のみ 47.6% と有意に高値を示した。卵管因子患者における抗体陽性率については Sellors は IgM または IgG 抗体陽性は 79.1%¹¹⁾、Sarov は IgG 抗体陽性 64%、IgA 抗体陽性 48% の成績を報告した¹²⁾。さらに Piura らは⁴⁾ 54 例の卵管炎患者を対照と比較し、IgA が 16 倍以上のものが患者で 37% であり、対照の 4% より明らかに高かった。また、IgG 抗体価が 128 倍をとると、患者で 57% (対照で 8%) と、ほぼ同じ傾向を報告している。今回の我々の成績を加えて考えてみると、これらの事実は不妊症、とくに卵管因子不妊症の原因として *C. trachomatis* 感染症による STD が結果として関与していることが強く示唆される。

習慣性流産患者の抗体陽性率は今回の成績では 13.3% であり、対照との差を認めていない。しかし Quinn は反復流産で 57.6% と高率な値を報告している。この違いについては不明であるが、当科の成績では感染陽性者でも妊娠成立し、かつ流産傾向もなく経過している例も少なくないので、習慣性流産と *C. trachomatis* 感染の相互関係は今回の成績からは不明である。

陽性者年齢分布については、20~24 歳代にピークがあると言われている¹³⁾。今回の結果では 30~34 歳が多く半数を占めたが、不妊外来を受診している患者の多くが 30 代のためと考えられた。

男性患者尿道口よりの抗原検査 (Chlamydiazyme) では陽性例が見られず、抗体検査で 3 例陽性となっている。この解釈については尿道上皮細胞中に抗原が見られない状態、つまり *C. trachomatis* が elementary body の状態ではなく reticulate body の状

態で静止していた場合や、前立腺炎、副睾丸炎などで尿道局所に抗原が見られないものや、直接的証明がなかなか難しい症例の多いことが考えられる。

精液所見による分類では症例数が少ないが、乏精子症・精子無力症に特に多くみられると言う傾向は存在しないようである。

今回は治療によって抗体価がどのように変化するかについては検討しなかったが、笠松ら³⁾は、頸部より *C. trachomatis* が分離培養された 6 例について、治療前の IgA は全て 64~128 倍を示したが、治療後 40~100 日後には 8 倍以下となったと述べ、治療効果の判定にはかなりの日数を要するようであるが、この点についてはこれから更に検討されるべきところであろう。

稿を終えるに臨み、ご懇篤な御指導、御校閲を賜りました竹内正七名譽教授に深謝しますとともに、イバザイムクラミジア AG の提供をうけた明治乳業 KK に感謝いたします。

文 献

- 1) Mosher, W. D. and Aral, S. O.: Factors related to infertility in the United States, 1965-1976, Sexually Transmitted Diseases 12: 117, 1985
- 2) Westrom, L. and Mardh, P.: Genital Chlamydial infection in the female, Elsevier Biomedical, press Amsterdam, p121, 1982
- 3) 笠松高広, 横田治重, 水野正彦, 川名 尚: Chlamydia trachomatis 女性性器感染症における IgA 抗体価による治療効果の評価, 日産婦誌, 39: 1649, 1987
- 4) Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.: Serum IgG and IgA antibodies specific for chlamydia trachomatis in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay, Eer. J. Epidermiol. 1: 110, 1985
- 5) 保田仁介, 岩破一博, 初田和勝, 鈴木秀文, 山本貴雄, 岡田弘二: 若年未婚婦人における STD の現状とその問題点, 産と婦, 55: 1381, 1988
- 6) 吉沢花子, 原尻麻里, 橋爪 壯: *C. trachomatis* 感染症の血清学的診断における I g A の意義, 感染症雑学誌, 61: 893, 1987
- 7) 椎名義雄, 飯島淳子, 沢田好明, 岩倉理雄, 宮沢博, 武田 敏: EIA (Chlamydiazyme) による女性性器における chlamydia trachomatis 感染の診断的意義, 感染症学雑誌, 62: 1002, 1988
- 8) 原尻麻里, 吉沢花子, 橋爪 壯, 板橋光司郎, 尾崎陽子, 若山曜子: Chlamydia trachomatis 感染が妊娠・分娩ならびに出生児に及ぼす影響, 感染症学雑誌, 62: 8, 1988
- 9) 高田道夫, 石川克美: 産婦人科におけるクラミジア検査法の評価とコツ, 産科の実際, 37: 321, 1988

- 10) Quinn, P. A., Petric, M., Barkin, M., Butany, J., Derzko, C., Gysler, M., Lie, K. I., Shewchuck, A. B., Shuber, J., RYAN, E. and Chipman, M. A.: Prevalence of antibody to Chlamydia trachomatis in spontaneous abortion and infertility, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156: 291, 1987
- 11) Sellors, J. W., Mahony, J. B., Chernesky, M. A. and Rath, D. J.: Tubal factor infertility: an association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis, *Fertil. Steril.* 49: 451, 1988
- 12) Sarov, I., Lunenfeld, E., Sarvo, B., Hanuka, N., Rosenzweig, R., Potashnik, G., Chaim, W. and Insler, V.: Chlamydia specific IgG and IgA antibodies in women with obstructive infertility as determined by immunoblotting and immunoperoxidase assays, *Eur. J. Epidemiol.* 4: 216, 1988
- 13) 国立予防衛生研究所編: 病原微生物検出情報, 8 : 9, 1987

**Significance of serum
antibodies for chlamydia
trachomatis in patients
with sterility and
infertility detected by the
immunoperoxidase assay**

Bingchin Yang, Osamu Arakawa,
Hiromitsu Tani, Kazuya Oda,
Kazuyosi Shichiri and Yoshiaki Sato

Department of Obstetrics and Gynecology
Niigata University School of Medicine
Niigata 951, Japan

A higher prevalence of Chlamydia trachomatis antibodies was seen in 47.6% of women with tubal factor infertility compared to 16.7% of normal pregnant women. But there is no significant prevalence in patients with habitual abortion and male sterility.

The average ages of women who had positive results distributed 23 ys to 39 ys (mean 31.2.)

The correlation between the data of semen analysis and chlamydia infection was not confirmed in this study.

As a conclusion, an increased prevalence or detectable Chlamydial antibodies was observed in patients with a history of tubal factor infertility compared to normal pregnant women.

It is therefore important that Chlamydial antibodies assay should be done in the sterility patients.

(受付: 1989年3月27日特掲)

攪拌密度勾配法による精子洗淨濃縮 —配偶者間人工授精における妊娠成績の検討—

Selective Concentration of Progressively Motile Sperm by Means of Continuous-step Density Gradient Centrifugation and its Clinical Application to AIH

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

*東京歯科大学附属市川総合病院産婦人科

小林 俊文 兼子 智* 真田 利男
Toshifumi KOBAYASHI Satoru KANEKO Toshio SANADA
佐藤 博久 小埜 清 大野 虎之進*
Hirohisa SATO Kiyoshi KOBANAWA Toranoshin OHONO
飯塚 理八
Rihachi IIZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University, Tokyo 160, Japan

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

攪拌密度勾配法により調製した洗淨濃縮精子を精子減少症、精子運動不良例等の配偶者間人工授精(AIH)に臨床応用した。152症例に延べ971周期施行した結果、47例に妊娠が成立し、妊娠率は31%であった。1回の施行で15例が妊娠し、60%の妊娠例が施行3周期以内に得られた。妊娠、非妊娠群の不妊因子を比較した結果、不妊原因が精液性状不良、頸管因子のみであれば、精子洗淨濃縮が直ちに妊娠率向上に寄与するが、他に女性側不妊因子が共存する場合には、その検索と治療が不可欠であり、さらに排卵時期推定の精密化、症例によっては排卵誘発が必要であることが示唆された。

妊娠した47例のうち22例は経腔的に、9例は帝王切開により分娩した。13例が妊娠前期に、2例が子宮筋腫、頸管無力症により妊娠中期に流産した。出生した児に外表奇形等の異常を認めなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 863—868, 1989)

緒 言

配偶者間人工授精(AIH)は男子不妊症、特に精子減少症、精子運動不良症例などに広く施行されている¹⁾²⁾。AIHの主目的は、できるだけ多数の精子を子宮腔内に導入することにあるが、多量の精液を注入すると感染³⁾、精漿による腹膜刺激、子宮痛等の副作用を生ずることがあるため、通常は射精精液の一部、約0.5 mlを緩徐に注入する方法が採られている。

これまで著者らは射精精液の有効利用の観点からFicoll, Percollを用いた密度勾配遠心分離法による精子洗淨濃縮法を確立し、AIHに供する精子の調製に応用してきた⁴⁻¹⁰⁾。前報¹¹⁾において運動精子の選択的濃縮を簡易かつ迅速に行ない得る攪拌密度勾配法を新たに開発したので、これをAIHに臨床応用した結果、47例の妊娠例を得ることができた。

方 法

精液性状の評価

精液は4日間禁欲後、手動的に採取して30分間液化させた。精子数、精子運動率は顕鏡法により測定した。

攪拌密度勾配法

80%等張化 Percoll (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Sweden)の調製は前報¹¹⁾に従った。Percollはその8容に等張化液Iおよび等張化液II各1容を加えて80%等張化Percollを作成し、さらにヒト血清アルブミン(1 mg/ml)、抗生物質(ABPC, LMOX, 各10 ug/ml)を添加した。ミリポアフィルター(0.45 um)で濾過滅菌し、6.0 ml づつ滅菌スピッツに分注して4℃で保存した。用時、微温湯にて約30℃に加温して使用した。

攪拌密度勾配法による精子洗浄濃縮は精液全量を80% Percoll, 6.0 ml に層積し、L型攪拌棒で精液層とPercoll層の上半分を数回攪拌して密度勾配を作成した後、シングアウトローターを用いて400 Xg, 30分間遠心分離した。精漿、Percoll層を駒込ビベットで吸引、除去し、沈澱を0.5 ml となるようにHanks'

液で再懸濁した。

精液液化が不十分である場合には、等量のHanks'液を加え、5 ml シリンジでpumpingし、粘度を低下させて層積した。またゲル状物質が混在する時は希釈後、試験管中で約5分間静置して沈澱除去した。排卵時期の推定および人工授精

排卵日の推定は基礎体温表、子宮頸管粘液、膣スメアーにより行ない、さらに尿中エストロゲン、LH測定、超音波卵胞計測を併用した。無排卵症に対してはクロミフェン、hMG-hCGを用いて排卵誘発を行なった。洗浄濃縮精子(0.4 ml)は飯塚式授精針を装着したシリンジに装填して緩徐に子宮内腔に注入し、授精後30分間仰臥位にて安静を保たせた。

妊娠の判定は、授精後高温期21日間以上が持続すると共に尿中hCGによる妊娠反応を指標とした。さらに妊娠6週に超音波により胎嚢を確認した。

結 果

不妊を主訴として慶応義塾大学医学部産婦人科家族計画相談所を受診し、精子減少症、精子運動不良、頸管因子、機能性不妊等でAIHの対象となった症例のうち152症例に攪拌密度勾配法を延べ971周期施

表1 攪拌密度勾配法を施行した152症例の患者背景および精液検査値

	症例数	妊 娠	非妊娠
例 数	152	47	105
年 齢	32.4±3.9 (25~42)	33.2±4.6 (26~42)	32.0±3.3 (25~38)
不妊期間(月)	48.7±30 (12~168)	44.6±30 (12~168)	53.6±29 (15~144)
原発性不妊	72%	70%	72%
続発性不妊	28%	30%	28%
精液量(ml)	3.2±1.1 (0.8~4.2)	3.0±1.1 (0.8~4.2)	3.5±1.1 (1.0~6.0)
精子数(×10 ⁷ /ml)	2.8±1.6 (0.2~7.0)	2.8±1.3 (0.2~6.0)	3.0±1.9 (0.2~6.0)
運動率(%)	55.8±16.5 (10~80)	52.9±17.8 (10~80)	52.9±17.8 (10~80)

表2 攪拌密度勾配法施行前後における精子性状の変化

	原 精 液			洗浄濃縮精子	
	精液量 (ml)	精子数 (×10 ⁷ /ml)	運動率 (%)	精子数 (×10 ⁷ /ml)	運動率 (%)
全 症 例 (152例)	3.1±1.1	2.8±1.5	53.6±13.0	3.7±1.6	75.4±15.2
妊 娠 例 (47例)	2.7±1.2	2.9±1.2	54.7±11.4	3.4±1.6	81.3± 9.4
非妊娠例 (105例)	3.3±1.1	2.7±1.6	51.6±16.3	3.8±1.5	74.9±14.6

表 3 不妊原因別妊娠率

不妊因子	症例数	妊 娠	
		CSDG	自然
男性因子	47	17(36%)	2(4%)
男性因子+女性因子	51	15(29%)	2(4%)
頸管因子	20	9(45%)	0
頸管因子+他の女性因子	16	4(25%)	1(6%)
機能性不妊	18	2(11%)	0
計	152	47(31%)	5(3%)

CSDG：攪拌密度勾配法

表 4 47 妊娠例における流産、分娩結果

分娩	31	経膈分娩 帝王切開	22 9	} 31
流産	15		13 2	
不明	1			1
計				47

行した。その結果、47 例の妊娠例が得られ、妊娠率は 31% であった。

患者年齢は 32.4 ± 3.9 歳、不妊期間 38.7 ± 30 ヶ月、精液検査結果は精子数 $2.8 \pm 1.6 \times 10^7/\text{ml}$ 、運動率 $55.8 \pm 16.5\%$ であった (表 1)。攪拌密度勾配法による精子洗浄濃縮を施行することにより $2.8 \pm 1.5 \times 10^7/\text{ml}$ 、 $53.6 \pm 13.0\%$ であった原精液は $3.7 \pm 1.6 \times 10^7/\text{ml}$ 、 $75.4 \pm 15.2\%$ に改善されていた (表 2)。図 1 は妊娠に成功した 47 例について、攪拌密度勾配法による人工授精施行周期数を示したもので、1 回の施行で 15 例が妊娠し、60% 以上の妊娠例が施行 3 回以内に得られた。

表 1 に示した患者背景を妊娠群と非妊娠群間で比較すると、妊娠群では不妊期間がやや短く、精子運動率がやや高い傾向がみられたが、いずれも有意差はなかった。また洗浄濃縮前後の精子性状を妊娠、非妊娠群で比較した場合にも両群間に有意差を認めなかった (表 2)。そこで AIH 妊娠率への不妊因子の影響を表 3 にまとめたところ、精液性状不良、頸管因子を主訴とする症例では各々 36.45% と高い妊娠率が得られた。一方、女性側不妊因子が共存する場合、機能性不妊では各々 25.11% と比較的 low かった。さらに女性側不妊因子を妊娠、非妊娠群別に比較した結果、黄体機能不全、遅発排卵等で妊娠例が多く、反対に卵管因子 (卵管狭窄、卵管采癒着等) を有する症例では妊娠例が少ない傾向を認めた (図 2)。

表 4 は妊娠、分娩経過をまとめたものであり、表 5 は個々の分娩結果を示している。47 妊娠例のうち 22 例は経膈的に、9 例は帝王切開により分娩した。13 例 (27.7%) が妊娠前期に、2 例が子宮筋腫、頸管無力症により妊娠中期に流産した。早期産となった 3 例のうち症例 10、17 は前置胎盤、症例 24 は子癰前症であった。他の分娩例はいずれも妊娠経過に特記すべき事項はなく正期産であった。出生児の在胎週数は 38.8 ± 2.5 週、出生時体重 3107 ± 530 g であった。Apgar スコアも 9.4 ± 1.1 と良好であり、出

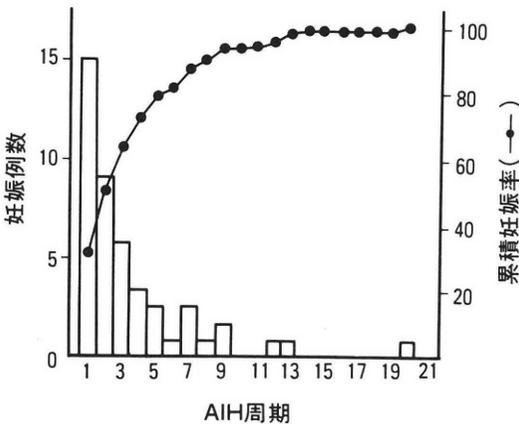


図 1 47 妊娠例における攪拌密度勾配法の施行回数とその累積妊娠率

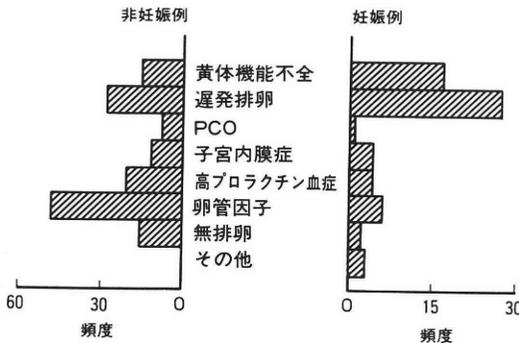


図 2 女性側不妊因子別妊娠率

表 5 分娩結果一覧表

No.	週数	分娩様式	出生時体重	アプガールスコア	奇形
1	40	V	3590	9	—
2	39	V	2745	8	—
3	39	V	3390	9	—
4	38	C	3760	10	—
5	40	V	2850	9	—
6	39	V	3400	10	—
7	40	V	3415	10	—
8	41	V	2940	9	—
9	38	V	2890	9	—
10	28	C	1180	4	—
11	39	C	3300	10	—
12	39	V	3435	10	—
13	39	V	3245	9	—
14	39	V	3275	10	—
15	38	V	3449	8	—
16	39	C	3000	9	—
17	35	C	2600	9	—
18	41	V	4006	9	—
19	40	V	2975	10	—
20	40	V	3042	9	—
21	41	V	3550	9	—
22	38	V	3512	10	—
23	38	V	3040	8	—
24	35	C	2020	9	—
25	39	V	2760	10	—
26	41	C	3085	9	—
27	39	V	3510	10	—
28	40	C	3435	10	—
29	39	V	2865	10	—
30	42	V	2805	9	—
31	41	C	3260	10	—
平均	38.8±2.8		3107.3±529.7	9.35±1.1	

V：経膈分娩 C：帝王切開

生した児に外表奇形等を認めなかった。性比は男：女 (17:14) であった。なお症例 10 は在胎 28 週、出生時体重 1180 g、Apgar スコア 4 であった。小児科で経過観察したが、現在退院し、発育良好である。

考 察

男性不妊の多くは精子形成障害によるものであり、その程度は症例により著しく異なる。造精機能賦活の改善を目的として種々の薬物療法が試みられてきたが、これらは長期間の治療を要すると共に一部に無効例も存在する。著者らは射精精液の有効利用と

いう観点から密度勾配遠心分離法による精子洗浄濃縮法を AIH に供する精子の調製に応用し、本法が精子妊孕性向上に有用であることを報告してきた⁴⁻¹⁰⁾。AIH に供する精子の調製法が具備すべき条件としては、1. 精子濃縮 (可能ならば受精に直接関与すると考えられる運動精子の選択的濃縮)、2. 精漿の除去、3. 非運動精子、精液中の他細胞、細菌等の除去、4. 方法の簡便性などが挙げられる。攪拌密度勾配法は操作の簡便化を目的として、80% Percoll に直接精液を層積して両者を攪拌することにより連続密度勾配を形成させて精子分離を行ない、沈澱中に

濃縮された運動精子の回収は Percoll 層を駒込ピペットで吸引除去することにより行なった。

教室において原精液を用いた AIH 1475 症例の妊娠率は 16.4% であった¹²⁾。本研究において攪拌密度勾配法により調製した洗浄濃縮精子を用いた結果、31% と高い妊娠率が得られ、精子洗浄濃縮が AIH の妊娠率向上に有用であることが示唆された。妊娠群、非妊娠群間で患者背景、精液性状等を比較したところ、両群に有意な差を認めなかった。(表 1, 2, 3)。そこで不妊原因別妊娠率を検討した結果、精液性状不良症例、頸管因子のみの症例では精子洗浄濃縮による精子性状改善が直接妊娠率の向上に寄与するのに対し、他の女性側不妊因子が共存する場合にはそれらの治療が不可欠であることが示された。これらの知見は AIH における妊娠率向上には精子妊孕性の改善(精子洗浄濃縮)のみならず、当然のことながら女性側不妊因子の検索とその治療、排卵時期推定の精密化など総合的になされることが重要であることが改めて明らかになった。

Pardo らも多層 Percoll 法を AIH に応用した結果、原精液を用いた場合の約 3 倍、21% の妊娠率を得たと報告した¹³⁾。これらの成績は、Percoll を用いた精子洗浄濃縮法が AIH の妊娠率向上に有効な方策であることを示唆している。

精液から運動精子の分離には本研究で用いた遠心分離法の他に精液静置法¹⁴⁾、アルブミン密度勾配法¹⁵⁾、などが報告されている。これらは精液または低速で遠心分離して濃縮した精子に培養液を層積して静置し、培養液中に移行した運動精子を回収するものである。Honig ら¹⁶⁾は精液静置法を AIH に応用して 17% の妊娠率を得、その有用性を強調したが、Allen ら¹⁾は否定的な見解を述べている。また Lalich¹⁷⁾は精液静置法と Percoll 密度勾配遠心法を比較したところ、Percoll 密度勾配遠心法の方が高い妊娠率が得られたと報告している。

一般にヒトにおける自然流産率は 10~15% とされており、その原因は黄体機能不全、感染、子宮奇形、子宮筋腫、免疫不適合等、多岐にわたる¹⁸⁾。教室における不妊症患者の流産率は 17% であるが¹⁹⁾、本研究では 27.7% と比較的高かった。症例数が充分でないため、流産率が比較的高かった原因について明確な結論を出すことはできないが、排卵誘発剤の使用がその一因である可能性も考えられる。今後さらに症例を重ねて検討する必要があると考えられる。

文 献

1) Allen, N. C., Herbert, III C. M., Maxson, W. S.,

Rogers, B. J., Diamon, M. P. and Wentz, A. C.: Intrauterine insemination; A critical review, *Fertil. Steril.* 44:569, 1985

- 2) 小林俊文, 中野真佐男, 真田利男, 小埜 清: 不妊症の男性因子, 産婦の実際, 31: 779, 1982
- 3) Swenson, C. E., Toth, A., Toth, C. and Wolfgrubel, L.: A symptomatic bacteriospermia in infertile men, *Andrologia*, 12:7, 1980
- 4) 兼子 智, 森脇千秋, 佐藤博久, 小林俊文, 飯塚理八: ヒト精子の客観的運動能解析法の開発—特に Ficoll を用いた洗滌精子について, 日不妊会誌, 25: 491, 1980
- 5) 真田利男, 小林俊文, 兼子 智, 小埜 清, 飯塚理八: 密度勾配用蔗糖重合体を用いた精子洗浄濃縮法の AIH への応用, 日不妊誌, 28: 267, 1983
- 7) 小埜 清: 人工授精, 体外授精に供する精子調製法に関する研究, 慶応医学 62: 351, 1985
- 8) 兼子 智, 小埜 清, 小林俊文, 飯塚理八: 体外受精に供する精子の調製について, 受精, 着床 83' (飯塚理八, 坂元正一, 鈴木雅洲) 学会出版センター, p 51, 1983
- 9) Iizuka, R., Kaneko, S. and Kobayashi, T.: Washing and concentration of human sperm by Percoll density gradients and its clinical application, *Arch. Androl.* 20:117, 1987
- 10) 飯塚理八, 兼子 智, 小埜 清, 小林俊文: 配偶者間人工授精への Percoll 精子洗浄濃縮法の応用, およびその分娩例検討, 産婦の世界, 39: 993, 1987
- 11) Kaneko, S., Sato, H., Kobanawa, K., Kobayashi, T. and Iizuka, R.: Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen, *Arch. Androl.* 19: 75, 1987
- 12) Sato, H., Kobayashi, T., Mochmaru, F. and Iizuka, R.: Results of AIH in 1475 patients. in *Human artificial insemination and semen cryopreservation* (Ed. by David, C., Price, W. S.) p521, Plenum Press, 1980
- 13) Pardo, M., Barri, P. N., Bancells, N. and Coroleu, B.: Spermatozoa selection in discontinuous Percoll density gradients of use in artificial insemination, *Fertil. Steril.* 49:505, 1988
- 14) Lopata, A., Patullo, M. J., Chang, A. and James, B.: A method for collecting motile spermatozoa from human semen, *Fertil. Steril.* 27:677, 1976
- 15) Domowski, W. P., Gaynor, L., Lawrence, M., Rao, R. and Scommegna, A.: Artificial insemination homologous with oligospermic semen separated on albumin columns, *Fertil. Steril.* 31:58, 1979
- 16) Honig, L. M., Devroey, P. and Steirteghem, A. C.: Treatment of infertility because of oligoasthenozoospermia by transcervical intrauterine insemination of motile spermatozoa, *Fertil.*

- Steril. 45:388, 1986
- 17) Lalich, R. A.: Life table analyses of intrauterine insemination pregnancy rates, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158:980, 1988
- 18) 余語郁夫: 初期の流産の原因, 産と婦, 48:125, 1981
- 19) Mochmaru, F.: Artificial insemination with frozen donor semen; its current status and follow up studies, *Keio J. Med.* 28:33, 1979
- 20) 小林俊文, 田中秀美: Clomiphene 療法と妊娠, 産婦世界, 29:1333, 1977
- 21) 倉地敬一, 鈴木雅洲, 小林拓郎, 田中俊誠: hMG (Humegon)-hCG 療法による排卵誘発効果と妊娠の転帰—全国集計による 1367 例の成績, 産と婦, 47:1146, 1980
- 22) Thompson, C. R., Laura, M. and Hansen, L. M.: Pergonal (Menotropins), A summary of clinical experience in the induction of ovulation and pregnancy, *Fertil. Steril.* 21:844, 1970

**Selective concentration of
progressively motile sperm
by means of continuous-step
density gradient centrifugation
and its clinical
application to AIH**

Toshifumi Kobayashi, Satoru Kaneko*,
Hirohisa Sato, Toshio Sanada,
Kiyoshi Kobanawa, Toranoshin Ohono*
and Rihachi Iizuka

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University,
Tokyo 160, Japan

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokyo Dental College Ichikawa
General Hospital

A group of infertile couples whose diagnoses involved oligo-asthenozoospermia, cervical factor and unexplained infertility were selected for treatment with intrauterine artificial insemination. It is effective to concentrate progressively motile sperm from whole ejaculate, therefore, a continuous-step density gradient was employed for the selective concentration of progressively motile sperm.

After 971 insemination cycles, successful 47 pregnancies were obtained with over all pregnancy rate of 31% in the program. The comparisons of the pregnant and non-pregnant groups revealed that the cases sole diagnosis of oligo-asthenozoospermia or cervical factor yielded higher pregnancy rates of 36 and 45%, respectively. However those with other female infertile factors and unexplained infertility gave relatively low pregnancy rates.

(受付: 1989 年 5 月 31 日特掲)

体外受精・胚移植における採卵成績の検討

Results of Oocyte Retrieval in *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任教授: 竹内正七)

谷 啓 光	織 田 和 哉	荒 川 修
Hiromitsu TANI	Kazuya ODA	Osamu ARAKAWA
七 里 和 良	佐 藤 芳 昭	竹 内 正 七
Kazuyoshi SHICHIRI	Yoshiaki SATO	Shoshichi TAKEUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology
School of Medicine, Niigata University, Niigata 951, Japan
(Director: Prof. S. Takeuchi)

- 体外受精・胚移植における採卵術 (63 症例, 71 周期) の成績を検討し, 次の結果を得た.
- (1) 採卵術当りの採卵数は 4.25 個, 採卵術当りの採卵率は 94.4%, 卵胞当りの採卵率は 61.5% であった. この結果, 42 周期に胚移植を行い, 10 例の妊娠を得た.
 - (2) 卵胞数 2 個および 3 個の周期は 5 個以上の周期に比較し採卵術当りおよび卵胞当りの採卵率に差はなかったが, 採卵術当りの採卵数および胚移植当りの移植胚数が有意に少なかった.
 - (3) LH サージ陽性群の採卵成績は LH サージ陰性群より有意に低かった.
 - (4) 経膈プローブを用いた超音波ガイド下経膈的採卵法は, 簡便性低侵襲性であり, 加えて, 腹腔鏡下採取法と同程度の採卵成績を得ることができ, きわめて有用な採卵方法であると考えられた.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 869—874, 1989)

はじめに

体外受精・胚移植の過程中, 患者に対する侵襲性の最も高い処置は採卵術である. 体外受精・胚移植の妊娠率が決して高くはない現在, ひとりの患者に対して採卵術を反復して施行しなければならないことが多いのが現状である. したがって, 患者に低侵襲性であり, なおかつ, 簡便で有効な採卵方法の選択が重要である.

また, 採卵術前に, 効率的な採卵術の期待できる症例と出来ない症例とをある程度ふり分け出来れば, 後者で採卵術を中止し, 改めて卵胞刺激からやり直すことにより, 患者に期待性の少ない侵襲性を与えることを避けることができる. このような観点から, 有効な採卵術を施行するために, 1. 卵胞数の少ない場合の採卵成績, 2. LH サージの有無と

採卵成績, 3. 近年注目されている経膈プローブを用いた超音波ガイド下経膈採卵法¹⁾と, 従来から行われている腹腔鏡下採卵法の採卵成績の 3 項目について比較検討し, 若干の知見を得たので報告する.

方 法

1. 対象

1988 年 2 月 1 日から 11 月 30 日までの間に新潟大学医学部付属病院で体外受精・胚移植を行った症例を対象とした. この期間, 63 症例 97 周期に卵巣刺激を行い, 71 周期に採卵術を施行した.

2. 卵胞刺激法とモニタリング

月経周期 3 日目より HMG 150 単位を連日投与した. 月経周期 8 日目より連日 1 回経膈的超音波断層診断法による卵胞径計測, 血中 LH 値測定 (持田, IMULABOT SA101) を行った. 主席卵胞 18 mm 以上,

または LH サージ開始をもって HMG の投与を中止した。LH サージは前日値の 1.8 倍以上の上昇により診断した²⁾。LH サージを認めない場合は HCG 10000 単位投与 36 時間後、LH サージを認めた場合は直ちに HCG 10000 単位を投与して採血 24~30 時間後に採卵術を施行した。

3. 採卵術

採卵方法は原則として経膈プローブを用いた超音波ガイド下経膈的採卵法(以下、経膈採卵法と略す)を第一選択とした。ただし、経膈プローブによる観察で、卵巣が挙上しているため経膈採卵が不可能であると判断された症例に腹腔鏡下採卵法を行った。

経膈採卵法では、超音波断層法診断装置(Bruel & Kjaer 社, Type 1846)に経膈プローブ(同, 7 MHz, Type 8538)を接続し、これに穿刺針用アダプターを装着した。採卵針として超音波対応臓器穿刺針(クリエート社, 18 G, 35 cm, 特注)を用いた。患者を砕石位とし、麻酔のため、ペンタゾジン 30 mg, セルシン 10 mg の静脈投与と膈下蓋部の穿刺部に局所浸潤麻酔(1%リドカイン 10 ml)を施行した。その後、超音波ガイド下に直径 12 mm 以上の卵胞を穿刺吸引して卵胞液を採取後、培養液にて卵胞内を洗浄した。これら卵胞液、洗浄液から実体顕微鏡下に卵の回収を行った。

腹腔鏡下採卵法では、気管内挿管による全身麻酔下に骨盤高位とし、笑気ガスで気腹し、腹腔鏡下に卵胞穿刺を施行、同様にして卵を採取した。

4. 媒精, 培養および胚移植

培養液として HTF を用い、媒精用には 10%, 卵割培養用には 15% の血清を加えた。媒精および培養はすべて 37°C, CO₂ 5%, O₂ 5%, N₂ 90% の環境下で行った。

回収した卵はその成熟度に応じて 3~12 時間の成熟培養を行った後、Swim up 法で調整された夫精子を最終濃度 50×10⁴/ml にて媒精した。14~20 時間後、2 前核の存在により正常受精の確認を行った。さらに 24 時間培養後、2~8 細胞期に達した胚を 15 μl の培養液とともに経頸管的に子宮腔内へ移植した。

黄体機能支持としてプロゲステロンを採卵日に 50 mg, その後 13 日間 30 mg を筋注投与した。採卵後 9 日目と 13 日目に血清 βHCG を測定し(バクスター社, Stratus), その上昇をもって妊娠の診断を行った。

なお、すべての値は平均値±標準偏差で表し、統計学的有意差検定には Student T 検定あるいはカイ自乗検定を用いた。また、卵胞数は採卵の対象とした直径 12 mm 以上の卵胞の数である。

結 果

1. 対象患者

対象患者 63 症例の年齢は 33.7±3.40 歳(25~41 歳), 不妊期間は 7.87±3.32 年(2~17 年)であった。これらのうち、原発性不妊症は 46 例, 続発性不妊症は 17 例であった。不妊原因別では卵管性不妊症 23 例(36.5%), 乏精子症や精子無力症などの男性側要因による不妊症 17 例(27.0%), 外性子宮内膜症 4 例(6.3%), 免疫性不妊症 2 例(3.2%), 原因不明不妊症 15 例(23.8%) その他 2 例(3.2%) であった(表 1)。

2. 採卵術全体の成績

表 1 体外受精・胚移植の不妊原因別症例数

不妊原因	症例数
卵管性不妊症	23 (36.5%)
男性不妊症	17 (27.0%)
子宮内膜症	4 (6.3%)
免疫性不妊症	2 (3.2%)
原因不明不妊症	15 (23.8%)
その他	2 (3.2%)
合 計	63 (100%)

63 症例 97 周期に卵胞刺激を行い、後述のように 26 周期(26.8%)で採卵術を中止し、71 周期(73.2%)から採卵術を施行した。これらの採卵術当りの卵胞数は 6.67±3.43 個(2~16 個)であった。71 周期中 67 周期(94.4%)から最低 1 個以上の卵を得、4 周期(5.6%)から卵を得られなかった。採卵術当りの採卵数は 4.25±3.19 個(0~13 個), 1 回の採卵術における卵胞当りの採卵率は 61.5±26.7%(0~100%)であった。

正常受精卵の得られた 42 周期に胚移植し、10 例の妊娠を得た(表 2)。

3. 採卵術中止周期の内訳

採卵術を中止した 26 周期(26.8%)の原因は、卵胞数 1 個 10 周期, 卵胞数 2 個 7 周期, LH サージ開始 7 周期, その他 2 周期であった。これに対して、これらの状況でも採卵術を施行した周期数は、卵胞数 2 個 6 周期, LH サージ開始 13 周期であった。

4. 卵胞数 4 個以下の周期における採卵成績

卵胞数が 2 個, 3 個, 4 個および 5 個以上の場合の採卵術当りの採卵数は、1.50±0.84 個, 1.14±1.07 個, 2.42±1.27 個, 5.32±3.18 個, 採卵周期中最低 1 個以上の卵の得られた周期の率はそれぞれ 83.3%, 71.4%, 100%, 98%, 1 回の採卵術における卵胞

当りの採卵率はそれぞれ $75.0 \pm 41.8\%$, $38.1 \pm 35.6\%$, $59.4 \pm 29.7\%$, $63.5 \pm 26.3\%$, 各群の妊娠数はそれぞれ, 1 例, 0 例, 1 例, 8 例, 採卵術当りの妊娠率はそれぞれ, 16.7% , 0% , 14.3% , 16.0% であった. 卵胞数 2 個および 3 個の群は卵胞数 5 個以上の群に比較して採卵術当りの採卵数および胚移植術当りの移植胚数 (男性不妊症例を除く) が有意に少なかった ($P < 0.01$). 症例が少ない妊娠成績の比較検討は行わなかった (表 3).

表 2 採卵術の成績

症例数	63
刺激周期数	97
採卵術数	71
採卵中止数	26
卵胞数/採卵術	6.67 ± 3.43
採卵数/採卵術	4.25 ± 3.19
採卵率/採卵術 ^a	94.4%
採卵率/卵胞 ^b	$61.5 \pm 26.7\%$
受精率 ^c	$62.2 \pm 38.1\%$
胚移植術	42
妊娠数	10

- a: 1 個以上の卵を得た採卵術数/全採卵術数 (%)
- b: 採卵術 1 回における卵胞あたりの採卵率 (%)
- c: 男性不妊症例を除く

5. LH サージの有無と採卵成績

卵胞刺激を行った 97 周期中 20 周期 (20.6%) に自然の LH サージを認め, このうち採卵術を 13 周期に施行, 7 周期に中止した. 採卵術を行った 13 周期 (LH サージ陽性群) と LH サージの開始を認めなかった 58 周期 (LH サージ陰性群) の成績を比較した. LH サージ陽性群および LH サージ陰性群の採卵術当りの卵胞数はそれぞれ, 4.23 ± 1.62 個, 7.16 ± 3.47 個, 採卵術当りの採卵数はそれぞれ, 1.15 ± 0.90 個, 4.65 ± 3.11 個, 1 回の採卵術における卵胞当りの採卵率はそれぞれ, $33.8 \pm 34.0\%$, $67.6 \pm 25.0\%$, 移植術当りの胚移植数はそれぞれ, 1.25 ± 0.50 個, 2.84 ± 1.35 個であった. 各成績すべてにおいて LH サージ開始群が有意に低値を示した. 各群の妊娠数 (採卵術当りの妊娠率) はそれぞれ, 0 例 (0%), 10 例 (17.2%) で, 有意差はないものの, LH サージ陽性群では妊娠例を得られなかった (表 4).

7. 経陰採卵法と腹腔鏡下採卵法

採卵 71 周期中 67 周期 (94.4%) に経陰採卵法を行った. 残りの 4 周期 (5.6%) では卵巣挙上のため, 経陰採卵不可能と判断し, 腹腔鏡下採卵法を施行した.

経陰採卵群および腹腔鏡下採卵群における患者年齢はそれぞれ, 33.4 ± 3.35 歳, 35.8 ± 4.50 歳, 採卵術当りの卵胞数はそれぞれ, 6.69 ± 3.51 個, $5.50 \pm$

表 3 卵胞数 4 個以下と 5 個以上の周期の採卵成績

卵胞数	2 個	3 個	4 個	5 個以上
採卵術数	6	7	8	50
採卵数/採卵術	1.50 ± 0.84	1.14 ± 1.07	2.38 ± 1.19	5.32 ± 3.18
採卵率/採卵術 ^a	83.3%	71.4%	100%	98%
採卵率/卵胞 ^b	$75.0 \pm 41.8\%$	$38.1 \pm 35.6\%$	$59.4 \pm 29.7\%$	$63.5 \pm 26.3\%$
受精率 ^c	$60.0 \pm 41.8\%$	$43.3 \pm 43.5\%$	$95.0 \pm 11.2\%$	$72.0 \pm 26.7\%$
胚移植術数	3	3	5	31
移植胚数/移植術 ^c	1.33 ± 0.58	1.33 ± 0.58	2.20 ± 1.30	3.21 ± 1.29
妊娠数	1	0	1	8
妊娠率/採卵術	16.7%	0%	12.5%	16.0%
妊娠率/胚移植術	33.3%	0%	20.0%	25.8%

- a: 1 個以上の卵を得た採卵術数/全採卵術数 (%)
- b: 採卵術 1 回における卵胞あたりの採卵率 (%)
- c: 男性不妊症例を除く
- *: $P < 0.01$

表4 LH サージの有無と採卵成績

	LH サージ陽性群	LH サージ陰性群
採卵術数	13	58
卵胞数/採卵術*	4.23±1.62	7.16±3.47
採卵数/採卵術*	1.15±0.90	4.65±3.11
採卵率/採卵術 ^{a**}	76.9%	98.3%
採卵率/卵胞 ^{b*}	33.8±34.0%	67.6±25.0%
受精率 ^c	69.5±40.0%	62.5±36.4%
胚移植術数	4	38
移植胚数/移植術 ^{**}	1.25±0.50	2.84±1.35
妊娠数	0	10
妊娠率/採卵術	0%	17.2%
妊娠率/胚移植術	0%	26.3%

a: 1個以上の卵を得た採卵術数/全採卵術数(%)

b: 採卵術1回における卵胞あたりの採卵率(率)

c: 男性不妊症例を除く

* P<0.01

** P<0.05

1.00個であり、両群の対象背景に有意差を認めなかった。両群の採卵術当りの採卵数はそれぞれ、4.30±3.27個(0~13個)、3.50±1.29個(2~5個)、1回の採卵術における卵胞当りの採卵率はそれぞれ、61.9±30.2%(0~100%)、62.5±15.9%(50~83.3%)と同様の採卵成績を得た。また、1回の採卵術に要した時間はそれぞれ、32.2±12.4分、57.5±5.00分で、経腔採卵群で有意に短時間であった(P<0.01)。これらの結果、経腔採卵群では正常受精卵の得られた41周期に胚移植を行い、10例の妊娠を得た。これに対して腹腔鏡下採卵群では4周期中3周期が重症の男性因子による不妊症のため受精卵を得られなかった。1周期だけに正常受精卵を得られ、これを胚移植したが、妊娠には至らなかった。両方法間の妊娠率の比較は、不妊原因別の患者分布に差があるため、行えなかった(表5)。

両群とも重篤な合併症はみられなかった。経腔採卵群4例に腔壁穿刺部の出血を認めたが、圧迫だけで容易に止血された。

考 察

今回我々は胚移植当り24.4%という比較的高い妊娠率を得ることが出来た。これらの成績から今回、1.卵胞数4個以下の周期における採卵成績、2.LH サージの有無と採卵成績、3.経腔採卵法と腹腔鏡下採卵法の採卵成績の比較の3項目について検討を行った。

1. 卵胞数4個以下の周期における採卵成績

表5 経腔採卵法と腹腔鏡採卵法の採卵成績

	経腔採卵法	腹腔鏡下採卵法
採卵術数	67	4
卵胞数/採卵術	6.67±3.51	5.50±1.00
採卵数/採卵術	4.30±3.27	3.50±1.29
採卵率/採卵術 ^a	94.0%	100%
採卵率/卵胞 ^b	61.9±30.2%	62.5±15.9%
受精率 ^c	62.6±36.5%	100%(n=1)
胚移植術数	41	1
移植胚数/移植術 ^c	2.64±1.38	3(n=1)
妊娠数	10	0
妊娠率/採卵術	14.9%	0
妊娠率/胚移植術	24.4%	0

a: 1個以上の卵を得た採卵術数/全採卵術数(%)

b: 採卵術1回における卵胞あたりの採卵率(率)

c: 男性不妊症例を除く

Quigley ら³⁾は、发育卵胞が1個しかない場合は2個以上ある場合に比較して、採卵術を施行しても胚移植に至る確立が低いので、採卵術を中止するべきであると述べている。現在、ほとんどの施設では卵胞が1個だけしか发育しない周期には採卵術を中止している。今回、发育卵胞が2~4個という比較的少ない数の場合について検討を行った。

卵胞数が2個、3個の群は卵胞数が5個以上の群に比較して、採卵術当りの採卵率や卵胞当りの採卵率に有意差を認めなかったものの、採卵術当りの採卵数が少なく、この結果、胚移植術当りの移植胚数も少数であった(P<0.01)。症例数が少ないため、妊娠率の比較検討は今回行えなかった。多数の胚移植が体外受精・胚移植の妊娠率向上にきわめて重要⁴⁾ではあるが、逆に多数の卵胞が发育した場合、高エストロゲン血症が卵、子宮内膜や黄体機能に悪影響を与える可能性も示唆されており⁵⁾、今後の検討を要する。

2. LH サージの有無と採卵成績

体外受精・胚移植において、LH サージ陽性群とLH サージ陰性群の採卵成績や妊娠成績を比較した場合、前者は後者より低成績であるという報告⁶⁾と全くこれと反対の報告⁷⁾とがある。

我々の成績では、LH サージ陽性群はLH サージ陰性群に比較して採卵術当りの卵胞数、採卵術当りの採卵数、採卵術当りの採卵率および1回の採卵術における卵胞当りの採卵率に有意に低値であった。その結果、胚移植術当りの移植胚数(男性不妊症例を除く)も有意に少なかった。そして、有意ではないものの、LH サージ陰性群では胚移植当り26.3%の

妊娠を得たが、LH サージ陽性群では1例の妊娠も得られなかった。

この差は各施設の卵胞刺激法の違いによるところが大きいと考えられる。クロミッドで卵胞刺激を行った場合 LH サージの頻度が高いのに対し⁹⁾、HMG-HCG で卵胞刺激を行った場合、血中エストロゲンの上昇にもかかわらず LH サージの認められないことが多い⁹⁾。これは発育卵胞より LH サージ抑制因子が産生されるためであるといわれている¹⁰⁾。Eibschitz ら⁹⁾は、クロミッド-HMG-HCG で卵胞刺激を行った場合、LH サージが陽性で卵胞数が3個以下の場合、採卵成績の低いことから採卵術を中止するべきであると述べている。我々の成績から、HMG-HCG で刺激した場合にも、自然の LH サージを認めた周期には採卵術を中止した方がよいと考えられた。また、このような患者に同じ方法で再刺激した場合、再びサージの起こる可能性が高いので、次回はゴナドトロピン放出ホルモンアナログを併用¹¹⁾することにより LH サージを抑制するべきである。

3. 経膈採卵法と腹腔鏡下採卵法の採卵成績

Feichtinger ら¹⁾が初めて報告した経膈プローブを用いた超音波ガイド下経膈的採卵法はその簡便性低侵襲性有効性から近年注目されている。従来からの採卵方法である腹腔鏡下採卵法では全身麻酔や気腹を要する上に、腹部に数カ所トトラカールを穿刺しなければならず、侵襲性が無視できない。これにひきかえ、経膈採卵法では軽麻酔で可能であり、その成績も腹腔鏡下採卵法と同様であるという。厳密なコントロールスタディではないが、我々の成績も Feichtinger らと同様、腹腔鏡下採卵法と経膈採卵法の採卵成績に差を認めなかった。加えて、経膈採卵法は腹腔鏡下採卵法の約半分の時間で施行することができた。麻酔に関しても、ジアゼパムとペンタゾシンの投与および局所麻酔で充分疼痛を除去できるなど患者への負担が非常に軽微であった。また、経膈採卵 67 周期中に特記すべき合併症もみられなかった。

採卵 71 周期中、4 例が卵巣挙上のため経膈採卵不可能と判断された。しかし、多数の採卵術を経験した結果、経膈プローブの挿入角度や深度を調整することによって卵巣の位置の高い症例でも経膈採卵可能となり、6 月 11 日の症例を最後に 11 月 30 日までの間、腹腔鏡下採卵術を必要とした症例はなかった。したがって、採卵術のほとんど全ての症例は経膈採卵法で可能であると考えられる。

以上より、今後腹腔鏡下採卵法は捨て去られ、経膈採卵法が採卵法の主流になるものと思われる。また、その低侵襲性より、採卵術を外来で行うことも

可能と思われる。

まとめ

新潟大学医学部付属病院で行った体外受精・胚移植の採卵術 (63 症例, 71 周期) の成績を検討し、次の結果を得た。

(1) 採卵術当りの採卵数は 4.25 ± 3.19 個、採卵術当りの採卵率は 94.4%、1 回の採卵術における卵胞当りの採卵率は $61.5 \pm 26.7\%$ であった。その結果、正常受精卵の得られた 42 周期に胚移植を行い、10 例の妊娠を得た。

(2) 卵胞数 2 個および 3 個の周期は 5 個以上の周期に比較すると、採卵術当りの採卵率、卵胞当りの採卵率に差はみられなかったものの、採卵術当りの採卵数、胚移植当りの移植胚数が有意に少なかった。このことが妊娠成績にどのような影響を与えるか、今後の検討を要する。

(3) 採卵前に LH サージの開始した群は、LH サージのない群に比較して採卵成績が有意に低かった。その結果、LH サージ陽性群では LH サージ陰性群より妊娠率が低い傾向にあった。したがって、LH サージ陽性群では採卵術を中止し、患者に期待性の少ない侵襲を与えるべきではないと考えられた。

(4) 経膈プローブを用いた超音波ガイド下経膈採卵法は従来から行われていた腹腔鏡下採卵法と同等の採卵成績が得られた。加えて、簡便性低侵襲性からきわめて有用な採卵方法であり、今後採卵法の主流となり、また、外来レベルの体外受精・胚移植も可能であると考えられた。

本論文の要旨は第 10 回新潟不妊内分泌代謝研究会において発表した。

文 献

- 1) Feichtinger, W. and Kemeter, P.: Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research, *Fertil. Steril.* 45 (5):722, 1986
- 2) Testart, J., Frydman, R., Feinstein, M. C., Thebault, A., Roger, M. and Scholler, R.: Interpretation of plasma luteinizing hormone assay for the collection of mature oocytes from women: definition of a luteinizing hormone surge-initiating rise, *Fertil. Steril.* 36 (1): 50, 1981
- 3) Quigley, M. M., Wolf, D. P., Maklad, N. F., Dandekar, P. V. and Sokolaski, J.E.: Follicular size and number *in vitro* fertilization, *Fertil.*

Steril. 38 (1): 678, 1982

- 4) Speirs, A. L., Lopata, A., Gronow, M. J., Kellow, G. N. and Johnston, W. H.: Analysis of the benefits and risks of multiple embryo transfer, *Fertil. Steril.* 39 (4): 468, 1983
- 5) Jones, G. S.: Up date on *in vitro* fertilization, *Endocr. Rev.* 5: 62, 1984
- 6) Eibschitz, I., Belaisch-Allart, J. C. and Frydman R.: *In vitro* fertilization management and results in stimulated cycles with spontaneous luteinizing hormone discharge, *Fertil. Steril.* 45 (2): 231, 1986
- 7) Punnonen, R., Heinonen, P.K., Ashorn, R., Kujansuu, E., Vilja, P. and Tuohimaa, P.: Spontaneous luteinizing hormone surge and cleavage of *in vitro* fertilized embryos, *Fertil. Steril.* 49 (3): 479, 1988
- 8) Trounson, A. and Wood, C.: Extracorporeal fertilization and embryo transfer, *Clin. Obstet. Gynecol.* 8: 681, 1988
- 9) Ferraretti, A.P., Garcia, J.E., Acosta, A.A. and Jones, G.S.: serum luteinizing hormone during ovulation induction with human menopausal gonadotropin *in vitro* fertilization in normally menstruating women, *Fertil. Steril.* 40: 742, 1983
- 10) Littman, B.A. and Hodgen, G. D.: Human menopausal gonadotropin stimulation in monkeys: blockade of the luteinizing hormone surge by a highly transient factor, *Fertil. Steril.* 41 (3): 440, 1984
- 11) Palermo, R., Rosenwaks, Z., Amodeo, G., Cittadini, E. and Navot D.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple follicles, *Fertil. Steril.* 49 (2): 290, 1988

Results of oocyte retrieval in *in vitro* fertilization and embryo transfer

Hiromitsu Tani, Kazuya Oda,
Osamu Arakawa, Kazuyoshi Shichiri,
Yoshiaki Sato and Shoshichi Takeuchi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata 951, Japan

Results of oocyte retrieval in *in vitro* fertilization and embryo transfer in Niigata university (63 patients, 71 cycles) were analyzed.

(1) An average of oocytes recovered was 4.25/oocyte retrieval. Recovery-rate per procedure was 94.4% and recovery-rate per follicle was 61.5%.

(2) Though an average of oocytes recovered per procedure in cycles with two or three follicles was smaller than in cycles with more than five follicles, recovery-rate was similar in both cycles.

(3) Results of oocyte retrieval in cycles with LH surge was significantly lower than that in cycles without LH surge. This observation suggests that oocyte retrieval should be cancelled to minimize the risk and expense for the patient.

(4) Results of oocyte retrieval with transvaginal ultrasound guided follicle aspiration with vaginal transducers was similar to those with laparoscopic follicle aspiration, and transvaginal procedure was easy technique, and no severe complication occurred in these procedures. The results indicate that this technique is very usefull for IVF-ET.

(受付: 1989年1月17日)

精液性状よりみた IVF-ET の予後

The Relationship between Semen Characteristics and the Prognosis of *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer

新潟大学医学部産婦人科学教室 (主任: 竹内正七教授)

織田 和哉	谷 啓光	荒川 修
Kazuya ODA	Hiromitsu TANI	Osamu ARAKAWA
七里 和良	佐藤 芳昭	竹内 正七
Kazuyoshi SHICHIRI	Yoshiaki SATO	Shoshichi TAKEUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Niigata University, Niigata 950, Japan
(Director: Prof. S. Takeuchi)

昭和63年1月より同11月までに新潟大学医学部付属病院にて体外授精胚移植 (IVF-ET) をおこなった症例のうち卵管性不妊および男性不妊 40 症例 53 周期に対して精液性状よりその予後について検討を行った。精子性状を検討する際のパラメーターとして、精子数、運動率、Grade を用いた。全体で 247 個の卵 (4.6 個/患者) が採取され、全症例の受精率は 49.7%, 卵の分割率は 38.8%, ET は平均 1.58/周期であった。精子数 1500 万/ml 以下では受精例はみられず、受精例、分割例、妊娠例共 1600 万/ml が最低であった。精子運動率では 30% 以下で受精率が低下し、受精例では 16%, 分割例で 19.5%, 妊娠例で 37.5% が最低であった。Grade では、受精率でみると 3 以上で差がみられる。全症例中妊娠例は、8 例みられた。精子の回収率の向上と同時に、Grade の良い精子をいかに集めるかが今後の課題であり、予後を良好にするものと考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 875—879, 1989)

緒 言

当初、高度卵管性不妊など女性因子に対する治療法として開発された体外受精胚移植法 (IVF-ET) は最近、男性因子をも含む不妊症夫婦においてもその適応が拡大されている。精子濃度、運動率が正常範囲に達しない症例に対して、IVF-ET では媒精時、*in vitro* での低濃度で受精が可能であるためである。しかし、同時に女性因子の影響もあるためか、男性因子症例の治療としてはいまだ不十分の感がある。男性因子症例で IVF-ET が適当であるか否かがガイドがあれば有用と考える。今回我々は IVF-ET に際し、精液の性状、特に精子数、運動率、運動の質がどの様に受精、予後に影響するか検討してみた。

方 法

対象は昭和63年1月より同11月までに新潟大学医学部付属病院にて IVF-ET をおこなった症例のうち卵管性不妊及び男性不妊 40 症例 53 周期に対して検討を行った。精子性状を検討する際のパラメーターとして、精子数、運動率、Grade を用いた。検討予後として、受精率、分割率、胚数/ET、妊娠数/ET、妊娠数/ET を用いた。ここで Grade に関しては表 1¹⁾ に示した。すなわち、運動精子の大多数を占める精子の直進運動の速度、言い替えると精子の運動の質について評価をしている。これは、0 より 4 まで区分されるが、今回の症例では、2 より 4 まで認められた。IVF-ET の方法についてはすでに別に報告した

が、簡単に以下に示す。

1. 排卵刺激法, モニタリング

HMG (日研) 150 単位を月経 3 日目より連日投与し, 同 8 日目よりモニタリングを開始する。その方法は, 経膈プローベ (B&K 7MHZ) による超音波卵胞計測, 血中 LH 測定 (持田 Elmotoc, Baxter 社 Stratus Fluorometric Enzyme Immunoassay), 尿中 E₂ (持田 Hi-Estrotec Slide Test) 測定等である。主席卵胞 18 mm 以上または LH サージを認めたら HMG を中止し, その 30 から 54 時間後に HCG (持田) 1 万単位を投与し, 36 時間後に経膈的に採卵 (超音波ガイド下, 採卵針 18 G 35 cm, 洗浄用 Medium; PBI[®]使用) した。

2. 培養法, 媒精法

卵胞より採取された卵は素早く実体顕微鏡下で, その成熟度を確認し, 3 から 12 時間の前培養 (HTF; Quinn et al.³⁾, 臍帯血あるいは患者血清 10% 添加

を行った。その途中で, 用手法にて, 配偶者より精液を採取してもらい, 室温で液化後, 精液量, 精子濃度, 運動率, Grade 等計測の上, HTF (前述血清 5%) をつかい Swim-up 法を用いて運動精子を集めた。媒精時は 50 万運動精子/ml で行った。培養環境はいずれも 37°C, CO₂ 5%, O₂ 5%, N₂ 90% である。

3. 胚移植法

媒精後, ほぼ 18 時間後, 2 前核をもって受精を確認し, 卵割用 Medium (HTF 血清 15%) に移し採卵後ほぼ 48 時間後分割を確認し胚移植を行った。

採卵後 10 日目, 並びに 14 日目に, テストパック (Abbot 社), 血中 hCG (Stratus, RIA) 尿中 hCG (Hitwinclon hCG 栄研) で妊娠を確認した。

統計法

有意差検定において, ChiSquare, Student-t test を使用した。

結果

検討するための精液所見のパラメータはすでに示した。精子数, 運動率の正常値には AFS で, 各々 2000 万/ml, 50% となっているため, これを参考とした。全体で 247 個の卵 (4.6 個/患者) が採取された。全症例の受精率は 49.7%, 卵の分割率は 38.8%, ET は平均 1.58/周期であった。

精子濃度 (表 2)

精子数では, 表 2 に示す様に 1500 万/ml 以下の症例では残念ながら受精例は見られなかった。最低症例で 200 万/ml, 受精例, 分割例共に, 1600 万/ml, 妊娠例でも, 同じく 1600 万/ml が最低であった。妊娠数は, 1500-2000 万/ml が 1 例, 2000 万/ml 以上で 8 例あった。

表 1 The grade of sperm progression¹⁾

0	no movement
1	extremely weak movement that generally results in no forward motion. Sperm moving in place.
2	poor to moderate movement that is often seen as spermatozoa simply "fish-tailing" in place. There may be only slight forward gain. Erratic movement; movement in circles.
3	normal or average progression; these cells display determined, purposeful forward movement.
4	excellent progression; these cells are actively swimming in what appears to be almost a frenetic fashion. Tail movements are blurred due to increased velocity.

表 2 精子濃度よりみた IVF-ET の子後

精子液 (10 ⁶)	周期	採卵数	受精数 (率)	分割数 (率)	胚数 /ET	妊娠 /ET (%)	妊娠 /周期 (%)
0-1	—	—	—	—	—	—	—
1-5	2	2	0	0	—	—	—
5-10	2	12	0	0	—	—	—
10-15	3	6	0	0	—	—	—
15-20	3	10	7 (70)	7 (70)	3.0 ±1.4	50	33.3
20-	43	216	101 (46.8)	88 (40.7)	2.8 ±1.2	28.6	18.6

表 3 精子運動率よりみた IVF-ET の予後

運動率 (%)	周期	採卵数	受精数 (率)	分割数 (率)	胚数 /ET	妊娠 /ET (%)	妊娠 /周期 (%)
—10	—	—	—	—	—	—	—
10—20	3	9	4 (44.4)	3 (33.3)	3.0	0	0
20—30	11	41	5 (12.1)	5 (12.1)	2.5 ±2.1	0	0
30—40	7	35	21 (60.0)	17 (48.6)	3.2 ±1.6	60	42.9
40—50	6	29	19 (65.5)	10 (34.4)	2.5 ±1.7	50	33.3
50—	26	129	72 (54.5)	59 (44.7)	2.8 ±1.0	22.2	15.3

表 4 Grade よりみた IVF-ET の予後

Grade	周期	採卵数	受精数 (率)	分割数 (率)	胚数 /ET	妊娠 /ET (%)	妊娠 /周期 (%)
G 0	—	—	—	—	—	—	—
G 1	—	—	—	—	—	—	—
G 2	15	59	20 (33.8)	17 (28.8)	3.75 ±1.25	50	13.3
G 3	30	154	83 (53.8)	64 (41.6)	2.54 ±1.10	27.2	20.0
G 4	8	33	20 (60.6)	14 (42.4)	3.25 ±1.50	25	12.5

精子運動率 (表 3)

精子運動率では、表 3 に示す様に 30 % 以下で明らかに受精率が低下している。最低症例をみると、受精例では 16 %、分割例では 19.5 %、妊娠例では 37.5 % が最低であった。妊娠例では、30—40 % で 2 例、40—50 % で 2 例、50 % 以上で 4 例であった。

Grade (表 4)

Grade でみると、表 4 に示す様に最低症例で G 2 であった。受精率でみると、G 3 以上で明らかに差 ($P < 0.05$) がみられる。妊娠例では、G 2 で 2 例、G 3 で 6 例、G 4 で 1 例であった。

全症例のうち、男性因子グループをみると、19 例 24 周期あり、人工授精の回数は最多 25 回にも及び、妊娠例が 3 例認められた。内訳は、8 回が 1 例、16 回が 1 例、22 回が 1 例であった。この中で、8 例が受精し、同じく 8 例分割し ET 可能であった。不良例でも ET 可能症例が認められる。卵管因子グループと男性因子グループを比較してみると、受精率は 56.4 % 対 42.2 %、また妊娠率をみてみると 16 % 対

17 % である。

考 察

従来男性不妊に対する治療法としては、AIH が主として行われている。さらに、ホルモン剤を含む種々の薬剤投与を併用し、あるいは改善後これを行っている。しかし、著効を示すものがなく洗浄、濃縮を行って実行しているのが現状である。女性側に原因が認められず男性側原因のみの不妊症夫婦では、受精に成功すれば妊娠の機会が得られることになる。それゆえ、IVF-ET が男性因子不妊症夫婦に対して適応拡大されている。ここで、男性因子グループをみると、受精が認められ ET 可能症例が、42.2 % にも達する。しかし、実際の妊娠率では 17 % 程度である。Irvin⁴⁾らは、彼らの IVF プログラムにおいて男性因子不妊夫婦では、受精率が 50 % であるのに対して正常な夫の夫婦では 77 % であるとしている。ここに他の要因の介在と現時点での IVF-ET の限界が認められる。さらに採卵時に判定する卵の Grade によって

も左右される。我々は前培養を追加して卵の成熟度を良好化する試みを行っている。今回の検討では未熟卵以下は11%であり、卵の quality の影響が考えられる。

男性因子グループでは受精例が42.2%認められ分割例が31.1%あり妊娠率も遜色ないため、現段階として長期AIH症例では試みて良いと考える。Mahadevan⁵⁾らは精子運動率が低く奇形率の高い例ではIVF-ETは効果があるが、他の精液性状が正常の例と比べて妊娠率は低いと述べている。ここで受精を認めた例はGradeでいえば3以上の症例が多く結局のところ精子の質の向上、すなわち直進運動を示す精子の増加が必要である。精液性状を示すパラメーターで、Alper⁶⁾らは新鮮射精精子濃度と運動率は精子の受精能と直接関連があり、精子濃度は、精子の質と関連があるとしている。しかし、他の報告では、精子濃度より他のパラメーターである運動率、特に精子の直進運動率が重要であるとしている。Mahadevan⁷⁾らは20%以下の運動率では受精を見ず、奇形精子症は受精率を下げるとしている。我々の今回の検討では精子運動率が30%以下であると受精を認めなかった。また、Cohen⁸⁾らは精子無力症や精液中の炎症細胞の存在がIVF-ETにとって不良であるとしている。Jeulin⁹⁾らは直進精子の質が受精にとっていちばん重要な因子であるとしている。さらにHamster egg penetration assay (HEPA)について、多くは体外受精において関連性が高いとしているが、Luther¹⁰⁾らはIVF-ETにおいて受精能を予測するにはその信頼性に疑問を示している。さらにForeman¹¹⁾らはHEPAで低い値であればヒト卵への受精率の低下がみられるが、逆にHEPAで良好であっても十分な信頼できる受精率を期待しえないとしているNorfolk groupはIVFプログラムで次のようなクライテリアを決めている¹²⁾。すなわち、

1. swim up で 1.5×10^5 以上の運動精子
2. HEPA で 10% 以上で、かつ
3. HEPA がコントロールで同等か 50% 以上
4. 精子の acrosin が正常レベル

を満たすものをIVFの適応としている。

すでに述べたようにHEPAの有用性や、acrosin levelの有用性はまだ証明されておらず、当科でもHEPAとの相関を検討しているが、今のところ有意とは認められないので、この利用を行っていない。

このようなことを勘案すると、現状で最も重要なのは、Gradeの良い運動精子濃度であろう。

前述したように我々は媒精時、精子濃度は50万/mlとしている。回収に際して、運動精子数が充分そ

れに満たない場合、Dishの培養液の量を減少させている。IVF-ETにおいて重要なことはまず、受精率を向上させることである。これについてより良好な精子を回収する必要がある。現在当科ではSwim-up法を用いている。Swim-up法では回収時原精液の性状を反映するため運動率の低い場合、Gradeの低い場合苦慮する。当科の場合回収率を計算してみると平均8-9%程度である。統計的な有意差は見られないがやはり、精子の運動率、とくにGradeに影響される傾向がある。Grade4では最高33.6%にも達し、Grade3では最高22.3%、Grade2では最高17%であった。報告¹³⁾では、同法を用いて受精が得られなかった症例で、Percoll法(薬剤添加等)で受精を得たというため検討の余地はある。

今後、精子回収率の向上はもちろんのこと、それのみではなく、いかにGradeの良い運動精子を集めるかが男性因子でのIVF-ETにおける課題である。

なお、本論文の要旨は昭和63年度新潟大学医学部産科婦人科学教室同窓会集談会にて発表した。

文 献

- 1) Don, P. W.: *In vitro* fertilization and embryo transfer: 89, Plenumpress, 1988
- 2) Quinn, P. and Wales, R. G.: Growth and metabolism of preimplantation mouse embryos cultured in phosphate-buffered medium, *J. Reprod. Fert.* 35: 289, 1973
- 3) Quinn, P., John, F. K. and Graham, M. W.: Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, *Fertil. Steril.* 44: 493, 1985
- 4) Irvin, H., Ronald, L. Y., William, E. G., Alfred, N. P., Larry, I. L. and Melvin, G. D., Kvar, K. R., Willima, E. F.: *In vitro* fertilization in couples with male factor infertility, *Fertil. Steril.* 45: 659, 1986
- 5) Mahadevan, M. M., Trounson, A. O. and Leeton, J. F.: The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility, and endometriosis to success of *in vitro* fertilization and embryo transfer, *Fertil. Steril.* 40: 755, 1983
- 6) Alper, M. M., Lee, G. S., Seibel, M. M., Smith, D., Oskowitz, S. P., Ransil, B. J. and Taymor, M. L.: The relationship of semen parameters to fertilization in patients participating in a program *in vitro* fertilization, *J. Vitro. Fert. Embryo Transfer* 2: 217, 1985
- 7) Mahadevan, M. M. and Trounson, A. O.: The

influence of seminal characteristics on the success rate of human *in vitro* fertilization, *Fertil. Steril.* 42: 400, 1984

- 8) Cohen, J., Edwards, R., Fehilly, C., Fishel, S., Hewitt, J., Purdy, J., Rowland, G., Steptoe, P. and Webster, J.: *In vitro* fertilization: a treatment for male infertility, *Fertil. Steril.* 43:422, 1985
- 9) Jeulin, C., Feneux, D., Serres, C., Jouannet, P., Guillet-Rosso, F., Balaisch-Allart, J., Frydman, R., Testart, J.: Sperm factors related to failure of human *in vitro* fertilization, *J. Reprod. Fertil.* 76: 735, 1986
- 10) Luther, M. T., Michael O'Rand, Mary, G. H., Jhon, G. F., Jouko, H. and R David, E.: Sperm parameters and fertilization of human oocyte *in vitro*; a multivariable analysis, *Fertil. Steril.* 48: 270, 1987
- 11) Foreman, R., Cohen, J., Fehilly, C. B., Fishel, S. B. and Edwards, R. G.: The application of the zona-free hamster egg test for prognosis in human *in vitro* fertilization, *J. Vitro. Fert. Embryo Transfer*, 1: 166, 1984
- 12) Acosta, A. A., Chillik, C. F., Brugo, S., Ackerman, S., Swanson, R. J., Pleban, P., Yuan, J. and Haque, D.: *In vitro* fertilization and the male factor, *Urology* 28: 1, 1986
- 13) 吉村慎一, 小田高久, 河野八朗, 原 利夫, 原 澄子, 泉 康史, 松本千秋, 矢作みき, 大野虎之進, 小林俊文, 飯塚理八: 体外受精, 胚移植における精子調製法の検討, 日本授精着床学会学術講演会抄録集: 43, 1988

**The relationship between
sperm characteristics
and the prognosis of
in vitro fertilization
and embryo transfer**

Kazuya Oda, Hiromitsu Tani,
Osamu Arakawa, Kazuyoshi Shichiri,
Yoshiaki Sato and Shoshichi Takeuchi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata 950, Japan
(Director; Prof. Shoshichi Takeuchi)

The relationship of semen characteristics and the pregnancy-rate *in vitro* fertilization were analyzed from the data for the period of 11 months (January-November 1988) in our clinic. In this study, data were analyzed for 53 cycles of 40 couples with tubal and male factors. We used in this study the semen parameters of sperm motility, sperm concentration and sperm grade. Two hundred forty seven oocytes were collected from the patients and a mean oocyte-recovery was 4.6. The fertilization rate of oocytes was 49.7% and the cleavage rate of oocytes was 38.8%. The number of the transferred embryos were 1.58 per patient as a mean. The fertilization was failed if the initial sperm motility was <30% and sperm concentration was <1500×10⁴/ml. The minimum of fertilization was 1600×10⁴/ml and 16%. The minimum of the cleavage was 1600×10⁴/ml and 19.5%. As to the sperm grade, the fertilization rate was furthermore reduced in samples with initial grade of sperm was <3. A total of 8 pregnancies were obtained. To make an effort on the recovery of high graded spermatozoa from initial samples seems to be the most important object in IVF-ET procedure.

(受付: 1989年2月1日)

ラット精巢の発育過程における ペントースサイクル活性の推移

Pentose Phosphate Pathway Activity in the Rat Testis at Different Stages of Development

東邦大学第1産科婦人科学教室

伊藤元博 跡部一郎
Motohiro ITO Ichiro ATOBE

1st department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

東邦大学生化学教室

天野久夫
Hisao AMANO

Department of Biochemistry,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan.

ラット精巢の発育過程においてペントースサイクル活性がどのような変化を示すかを検索し、同時に精巢発育に対する同経路の機能的意義について考察した。

Wistar系ラットの6日齢、14日齢、20日齢、45日齢、60日齢の精巢を使用し、ペントースサイクルの鍵酵素である Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) を NADP 依存酵素を特異的に吸着する 2', 5'ADP-Sepharose 4B を用いた affinity chromatography により分離、精製し、各精巢のペントースサイクル活性を比較検討した。

本経路活性は6日齢精巢で 333.1 ± 16.9 mu/ml/g、以下14日齢 294.3 ± 15.0 mu/ml/g、20日齢 182.6 ± 19.6 mu/ml/g、45日齢 178.0 ± 8.7 mu/ml/g、60日齢 132.1 ± 12.6 mu/ml/g と変化した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 880—885, 1989)

緒言

精巢は精子の発達、維持、調節をつかさどる臓器であり、またその機構にはテストステロンが関与するといわれている。一方、ペントースサイクルの生理的機能は、組織で生成される脂肪酸、ステロイド合成系に NADPH を供給することであり、この系の活性の高い諸組織では、その特異機能を高めるために NADPH の必要度が増す場合に、その必要に応じて本経路活性が高まる。またリボースの供給は核酸の合成、ひいては核酸の働きにもとづく蛋白質の合

成に欠くことはできない。この核酸と蛋白質の合成増加は、細胞の増殖、肥大、固体の成長などに結びついている。このような機能を持つ本経路が精子形成の発現と維持をつかさどり、ホルモン標的臓器と考えられている精巢に他組織と比べより高い活性を有することは容易に推測され、すでにわれわれはブタ精巢において本経路の存在を酵素学的に証明¹⁾し、さらに組織化学的手法を用いてその作用部位を明らかにした²⁾。この組織化学的検索においては、ペントースサイクル活性部位は間質組織および精細管内壁より内腔に認められ、精子形成およびその維持に本

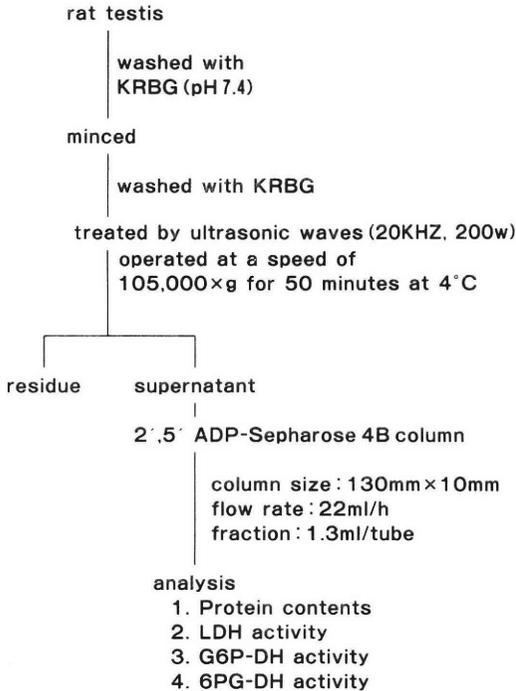


Fig. 1 Experimental Procedure

経路が関与していることが示唆された。

今回の実験は、ラット精巣を用いて、その发育過程、すなわち精子形成過程のどの段階でペントースサイクルが最も関与しているかを知り、同時に本経路の精子形成における機能的意義を検索する目的で行った。

実験方法

1) 精巣

Wistar系ラット6日齢、14日齢、20日齢、45日齢、60日齢の精巣を実験に供した(写真1)。1回の実験に6日齢ラット30匹、14日齢ラット17~20匹、20日齢ラット10~12匹、45日齢ラット1~3匹、60日齢ラット1~3匹を使用した。精巣は塩酸ケタミンの麻酔下で摘出した。摘出後直ちにその各重量を測定し、45、60日齢はカプセルを除去し使用した。

2) 各精巣の粗抽出液の作製(図1)

精巣はKRBG (PH 7.4) 中で充分洗浄し、付着した血液を取り除き、同KRBG中で細片した。細片後10mMメルカプトエタノール、5mMEDTA 3Naを含む0.1M Tris-HCL buffer PH7.6を精巣細片洗滌物に対し等量加え、発振周波数20KHz、200Wの出力で1分間づつ3回超音波処理をした。この際、熱の発生を抑えるため、冷水中で操作し、1分間の

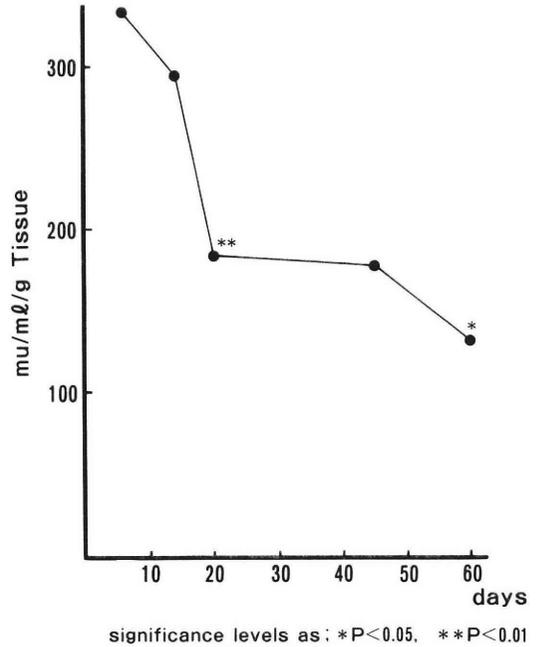


Fig. 2 G6P-DH activity in rat testis from 6 days of age to sexual maturation

インターバルをおいて行なった。超音波処理後、 $4^\circ C$ 、 $105,000 g$ 、50分間冷却遠心し、得られた上清を東洋濾紙No.7で濾過した。この濾液を精巣の粗抽出液とした。

3) 2', 5'ADP-Sepharose 4B³⁾による精製(図1)

方法は本誌既報⁴⁾に準じた。

4) 蛋白量および各酵素活性の測定法

(1)蛋白量

Marison⁵⁾の方法にもとづき測定した。

(2)LDH活性

Hill変法^{6,7)}にもとづき測定した。

(3)G6P-DH活性

Löhr-Wallerの方法⁸⁾にもとづき測定した。

活性値の表わし方

$1 \mu M/ml$ NADPHの340nmにおけるミリ分子吸光係数は6.22であるから $X \times AOD / 6.22$ (X :キュベット内液量-ml)より生成NADPHの μM が求められる。この値を使用した各精巣の総重量(g)当たりで表わした。

実験結果

1) 各精巣の組織所見

Photo 2, 3, 4, 5, 6は6日齢、14日齢、20日齢、45日齢、60日齢の各精巣組織所見である。6

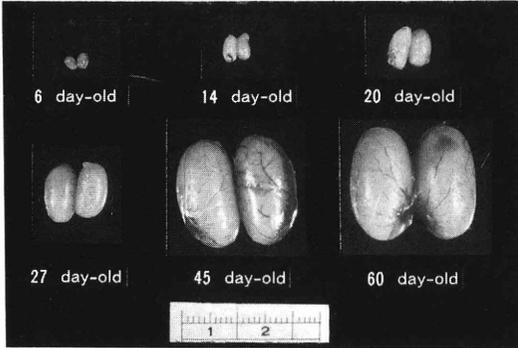


Photo 1 Testicular development in maturing rats

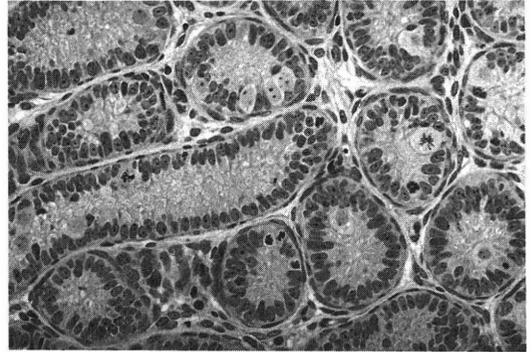


Photo 2 Testis of the age of 6 days. Stained according to H.E. technique. ×200

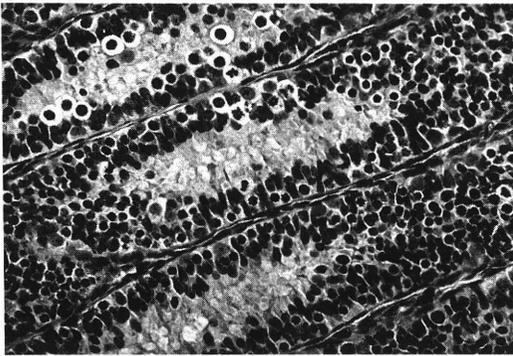


Photo 3 Testis of the age of 14 days. Stained according to H.E. technique. ×200

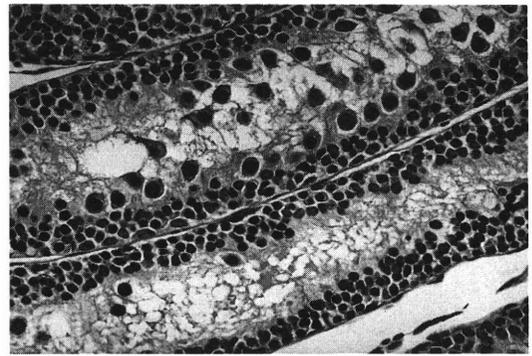


Photo 4 Testis of the age of 20 days. Stained according to H.E. technique. ×200

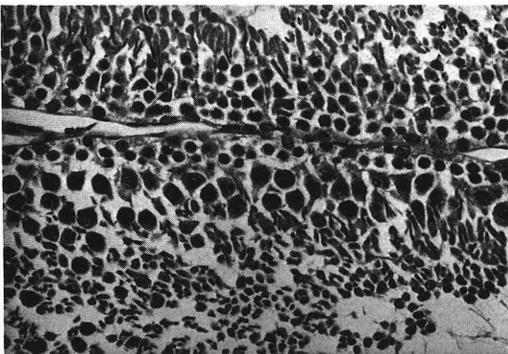


Photo 5 Testis of the age of 45 days. Stained according to H.E. technique. ×200

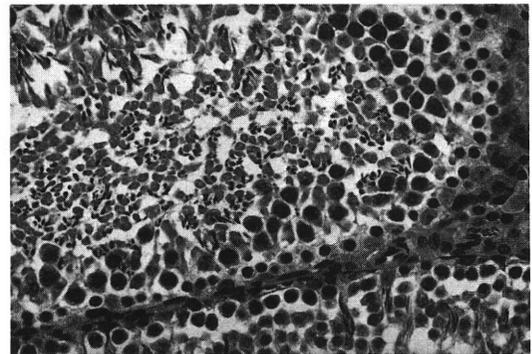


Photo 6 Testis of the age of 60 days. Stained according to H.E. technique. ×200

日齢の精細管には精原細胞のみがみられ、14日齢の組織では leptotene 精母細胞の増加がみられる。20日齢精巣の組織所見は late pachytene 精母細胞を欠くが、減数分裂が質的にも量的にもよく発達している。精子の出現は45日齢精細管腔内に認められ、精子形成が殆ど完成している。60日齢精細管腔内に精子の

充満が認められる。

2) 各精巣の G6P-DH 活性

Table 1 に各日齢ラットの体重、精巣重量、体重に対する精巣重量比(精巣重量を mg、体重を g で対比した) および G6P-DH 活性を示した。Fig 2 に G6P-DH 活性を示した。

Table 1. G6P-DH activity in rat testis from 6 days of age to sexual maturation

	B. wt (g)	T. wt (mg)	T. wt/B. wt (mg) (g)	G6P-DH (mu/ml/g)
6 days old	n = 4 14.0±0.5	n = 7 9.91±0.7	n = 4 0.7±0.09	n = 4 333.1±16.9
14 days old	n = 7 28.3±0.6**	n = 14 38.9±1.2**	n = 7 1.37±0.07**	n = 4 294.3±15.0
20 days old	n = 22 32.5±0.5**	n = 24 87.5±2.6**	n = 22 2.69±0.09**	n = 4 182.6±19.6**
45 days old	n = 12 210.8±1.7***	n = 24 1013.6±14.6***	n = 12 4.81±0.09**	n = 5 178.0±8.7
60 days old	n = 6 286.2±4.0**	n = 11 1390.0±20.0**	n = 6 4.86±0.13 N.S.	n = 3 132.1±12.6*

The results represent the Mean±S.E.M, a significant difference between adjacent groups in the table is indicated by asterisks, (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. N.S.: no significant difference).

B. wt; body weight (g), T. wt; testis wet weight (mg), G6P-DH; glucose-6-phosphate dehydrogenase.

G6P-DH 活性は 6 日齢精巣で 333 mu/ml/g と最高値を示し、14 日齢で 294 mu/ml/g とやや減少した有意差は認めない、20 日齢で体重比精巣は 14 日齢と比べ有意に増加しているにもかかわらず、G6P-DH 活性は 183 mu/ml/g と有意に減少した。45 日齢の体重比精巣重量は 20 日齢のそれと比べ有意に増加しているが、G6P-DH 活性は 178 ml/ml/g とほぼ平衡に推移した。60 日齢精巣の体重比重量は 45 日齢のそれと有意差はないが、G6P-DH 活性は 132 mu/ml/g と有意に減少している。

考 案

成熟ラットの胚上皮は、細胞増殖を持続的に行なっており、精原細胞から精子への分化は有糸分裂と減数分裂による。精原細胞が精子の段階まで成熟するにはラットで約 7 週間、ヒトでは 9 週を要する。従ってヒトでは胚上皮の不活性時期が長く、幼時と小児期には精原細胞のみが細精管にみられ、胚上皮の成熟過程は思春期のある時期に始まる。一方ラットでは 45 日齢で細精管に精子の出現が認められ、出生直後よりすでに精子の発達過程が開始していると考えられる。

われわれは Wistar 系ラットの 6 日齢、14 日齢、20 日齢、45 日齢、60 日齢の精巣を使用し、その精子形成過程とペントースサイクル活性の推移を検索し、精子形成に本経路がどのように関与しているかを知る目的で実験を行なった。精巣組織所見は写真に示す通り、6 日齢精巣では精原細胞のみであるが、14 日齢では leptotene 精母細胞の増加がみられ、20 日齢精巣は late pachytene 精母細胞を欠く以外は、減数分裂は質、量ともよく発達している。45 日齢では

管腔内に精子の存在が認められ、精子形成が殆ど完了していることを示しており、60 日齢では管腔内に精子が充満している。

また各日齢における精巣のペントースサイクル活性は 6 日齢で 330 mu/ml/g と最も高く、14 日齢では 294 mu/ml/g とやや減少傾向にあるが有意差は認めなかった。20 日齢になると 183 mu/ml/g と有意に減少し、この値は 45 日齢迄ほぼ平衡を保ち、60 日齢で 132 mu/ml/g と再度有意な減少を示した。6 日齢精巣にみられる精原細胞および 14 日齢で出現する leptotene 精母細胞はいずれも DNA 合成の盛んな細胞であり、また出生後 10 日目以降のラット精細管は細胞分化と増殖が非常に活発で、減数分裂の開始を示す最初の変化も 10 日から 12 日齢ラットにみられるといわれている⁹⁾。この観点から 6 日齢、14 日齢で高活性を示したペントースサイクルの機能的意義を考察すると、本経路は組織に核酸合成のためのリボースを供給し、この核酸の動きにもつき蛋白質の合成が行なわれ、この両者の合成増加により細胞の増殖、肥大を促すものと推測でき、同時に最初の減数分裂の開始を刺激する役割を演じている可能性を示唆する。またこの期間のペントースサイクルのステロイド合成に関しては、テストステロンおよびその還元生成物は 10 日齢まで極めて低値であり、20 日齢で上昇するとする Marco ら⁹⁾の報告から推察し殆ど関与していないと思われる。

14 日齢から 20 日齢迄の精巣では減数分裂が progressive に発達しているにもかかわらず、ペントースサイクル活性が 20 日齢で有意に減少したことは、16 日齢で出現する zygotene 精母細胞以降の細胞がすでに DNA 合成を行なわない¹⁰⁾ことから十分理解で

きる。またステロイドが酵素阻害によってペントースサイクル活性を抑制¹¹⁾している可能性も考えられる。Marco⁹⁾らは減数分裂の完了は26日齢前後の精巣で見られると報告しており、われわれは27日齢精巣のペントースサイクル活性を測定し(未記述)、20日齢、45日齢精巣の活性と比較したが有意差は認められなかった。従って減数分裂の進行過程には本経路は直接関与していないと思われる。しかし45日齢までは平衡に推移した本活性が60日齢で再度有意な減少を示した事実は、この20日から45日齢の精巣が精子形成の成熟段階を示していることと考えあわせると、本経路が精子成熟過程を維持しているのかも知れない。

精子形成の完了が60日齢迄に達成されるとすると、60日齢精巣のペントースサイクル活性が最低値を示したとはいえ、次の精細胞の分化を維持してゆくのに必要な活性なのであろう。しかしその活性は最初の減数分裂の開始がみられる時期の活性の1/4で、明らかに低値であるが、これは生後最初に起こる精細胞分化と成熟個体で常に起こっている精細胞分化との違いと考えられる。

いずれにしても精子形成過程とペントースサイクルとの関連を報告した論文は皆無で、今後成熟ラットのペントースサイクル活性およびアンドロジェンとの関連について検索する必要がある。

(本論文の要旨は第32回日本不妊学会で報告した。)

文 献

- 1) 伊藤元博, 中岡義明, 渡辺 仁, 江川恵基, 天野久夫: フタ精巣におけるペントースサイクルと解糖, 日不妊会誌, 31: 22, 1986
- 2) 伊藤元博, 中岡義明, 渡辺 仁, 天野久夫: フタ精子, 精巣におけるペントースサイクルの脱水素酵素の局在について, 日産婦誌, 39: 195, 1987
- 3) Brodelius, P., Larsson, P.-O. and Mosbach, K.: The synthesis of three AMP-analogues: N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 2', 5'-bisphosphate, and N⁶-(6-aminohexyl)-adenosine 3', 5'-bisphosphate and their applications as general ligands in biospecific affinity chromatography, Eur. J. Biochem. 47: 81, 1974
- 4) 有沢克夫, 中岡義明, 渡辺 仁: アフィニティークロマトグラフィーによるフタ精子のグルコース-6-リン酸脱水素酵素, 6-ホスフォグルコン酸脱水素酵素の分離, 日不妊会誌, 42: 30, 1985
- 5) Marison, M. B.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72: 284, 1976

- 6) Hill, B. R. and Levi, C.: Elevation of a serum component in neoplastic disease, Cancer Res. 14: 513, 1954
- 7) Hill, B. R.: Some properties of serum lactic dehydrogenase, Cancer Res. 16: 460, 1956
- 8) Löhr, G. W. and Waller, H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In methods of enzymatic analysis, vol. 2. Bergmeyer, H. U. ed., 636, Academic press, New York, 1974
- 9) Rivarola, M. A., Podestà, E. J., Chemes, H. E. and Calandra, R. S.: Androgen metabolism and concentration in the seminiferous tubules at different stages of development, J. Steroid Biochem. 365: 6, 1975
- 10) 西宗義武: 精原細胞の分化に影響を及ぼす因子, ホルモンと臨床, 113: 34, 1986
- 11) Johnson, A. D. and Turner, P. C.: Epididymal carbohydrate metabolism-I. Glucose-1-¹⁴C and glucose-6-¹⁴C metabolism by mouse, rat and rabbit tissues, Comp. Biochem. Physiol. 599: 39A, 1971

Pentose phosphate pathway activity in the rat testis at different stages of development

Motohiro Ito and Ichiro Atobe

1st Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine,
Tokyo 143, Japan

Hisao Amano

Department of Biochemistry,
Toho University School of Medicine,
Tokyo 143, Japan

The testes are bifunctional organs that produce testosterone and spermatozoa. The germinal epithelium goes through a continuing process of cellular proliferation and differentiation from spermatogonium to spermatozoon including a mitotic and a meiotic cellular division. It is generally accepted that androgens are involved in the stimulation of the germinal epithelium.

Major functions of the pentose phosphate pathway are to provide NADPH for reductive syntheses outside the mitochondria and to provide ribose for nucleotide and nucleic acid synthesis.

Our previous study have revealed the presence of the two dehydrogenases of the pentose phosphate pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in extracts of

boar testis. And histochemical localization of the two pentose phosphate pathway dehydrogenases was achieved by the use of Nitro BT. Both glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase was present in the Leydig cells and seminiferous tubules.

The present studies relate pentose phosphate pathway dehydrogenase enzyme activity to maturation in the rat testes.

Maturation changes in pentose phosphate enzyme have been observed in the present study.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity had higher levels between 6 and 14 days of age, but an abrupt decrease occurred between 14 and 20 days, to remain approximately equal to 45 days and fell at 60 days again.

(受付：1988 年 12 月 12 日)

ヒト精子の capacitation に要する時間と 精子コレステロール/リン脂質比の関係

Relationship between Capacitation Time of Human Spermatozoa and Sperm Cholesterol/Phospholipid Ratio

福島県立医科大学産科婦人科学教室 (主任: 佐藤 章教授)

会田 都美子 星 和彦
Tomiko AITA Kazuhiko HOSHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College, Fukushima 960, Japan
(Director: Prof. A. Sato)

ヒト精子の受精能獲得時間 (capacitation time) には個人差の存在することが知られている。今回われわれは、この個人差と精子のコレステロール/リン脂質モル比 (C/PL 比) の関連性およびコレステロールがヒト精子の受精能獲得 (capacitation)・先体反応 (acrosome reaction) に与える影響について検討し以下の様な成績を得た。

- (1) 10人の健康成人男子から得られた精子を用いてハムスターテストを行ない、透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子の侵入開始時間および精子侵入率の増加パターンに大きな個人差を認めた。
- (2) capacitation time とヒト精子 C/PL 比の間には極めて高い正の相関が得られた ($r=0.956$)。
- (3) 培養液にコレステロール 1 mg/ml が加えられた時のハムスターテストの精子侵入率は 28% で、コントロールの 55% に比べ有意な低下を認めた。

以上の結果は、ヒト精子の capacitation time には大きな個人差が存在し、その時間は精子の C/PL 比に依存していること、またコレステロールは capacitation と acrosome reaction を抑制することを示唆している。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 886—892, 1989)

緒 言

生体膜は基本的にタンパク質と脂質から構成され、脂質二重層の中にタンパク質が浮遊した構造になっている。脂質のうちリン脂質は二重層構造構築のための素材であるが、ステロールは膜の流動性を調節しているといわれる。コレステロールは生体膜ステロールの主成分をなし、膜を安定化させその透過性を低下させる働きがある。

哺乳動物の受精が成立するための精子側の条件としては受精能獲得 capacitation と先体反応 acrosome reaction が挙げられるが、これらの現象は細胞膜の変化であり当然コレステロールの関与が

考えられる。capacitation に要する時間は動物の種類によって異なっているが、Davis はこの違いが精子膜コレステロール/リン脂質モル比に関連していることを示唆している¹⁾。ヒト精子の capacitation time に個人差が有ることが報告されているが²⁾、今回われわれはその個人差にもコレステロールが関与しているかどうかを検討したので報告する。

研究方法・材料

ヒト精子の capacitation, acrosome reaction については“透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入テスト (ハムスター・テスト)”を用いて検討した。すなわち個々のケースについてハムスター・テスト

における精子侵入率を経時的に調べ、個人差を求めた。精子のコレステロールはガスクロマトグラフィー法により、リン脂質は酵素法によって定量した。またコレステロールやリン脂質のハムスター・テストに与える影響についても検討した。

1. ハムスター・テスト

(1) 卵子の準備(透明帯除去ハムスターの卵の作製)

体重 90~150 g の成熟雌ゴールデンハムスターを用いた、pregnant mare serum gonadotropin (PMS) 30 i. u. を腹腔に投与し、48~56 時間後 human chorionic gonadotropin (hCG) 30 i. u. を投与することで過排卵を起こさせ、hCG 投与 17 時間後に開腹し、卵管中より実体顕微鏡下に卵丘細胞に包まれた卵子を採取した。これを 0.1% hyaluronidase で 15 分間処理して卵丘細胞を分散させて卵子を分離、培養液で 3 回洗浄後 0.1% trypsin で 3 分間処理して透明帯を溶解除去した。その後 3 回培養液で洗浄して出来た透明帯除去ハムスター卵を実験に供した。

(2) 精子の準備

精液は 10 人の健康男子から用手法によって採取した。室温に約 20 分静置して十分に液化させた後培養液 2 ml を入れた試験管 (15×50 mm) の底に 0.5 ml づつに等しく分注した。試験管口をシールし、精液・培養液境界が広がるよう 30°に傾け 37°C 5% CO₂ 大気中に 1 時間静置した。この方法は“精液静置法”と呼ばれるが、この方法により運動率が高く奇形率が低い良好精子が上方の培養液に移動 (swim up) してくる。試験管底の残余精液が混入しないよう注意して集められた培養液内の精子は遠心分離 (230×g 5 分間) して 2 度洗浄後、2 ml の培養液で希釈した。

準備された精子浮遊液は、予備実験の成績に従いそれぞれ 1.5~27 時間 37°C 5% CO₂ 大気中で前培養しておいた。

(3) 使用する培養液

基本となる培養液は Biggers, Whitten and Whittingham³⁾ 溶液を修正した modified Biggers, Whitten and Whittingham 液 (mBWW)⁴⁾ である。

(4) 受精ならびに培養の方法

3.5% human serum albumin (HSA) を含む mBWW 0.3 ml をプラスチック製ペトリ皿に入れ、その上をミネラルオイルにて覆い、この培養液中に透明帯除去ハムスター卵と前培養されていた精子を遠心 (230×g 5 分間) 濃縮して加え、37°C 5% CO₂ 大気中で培養を行なった。精子の最終濃度は 1~2×10⁷/ml になるように調節した。

(5) 検査・判定

培養後経時的に卵を取り出し、位相差顕微鏡下に精子侵入の有無を観察した。1 個以上の膨化精子頭部もしくは雄性前核が尾部を伴っている場合侵入があったと判定した。

2. 精子コレステロール・リン脂質の定量

ハムスター・テストを行なった 10 例のうち 8 例の精子についてコレステロールとリン脂質を定量した。

(1) 精子サンプルの作製

用手法にて採取した精液を液化後試験管にとり 230×g で 5 分間遠心分離し上精を除去した後沈澱した精子を回収した。生理的食塩水 8 ml を加え攪拌後 1200×g 5 分間遠心分離して上清を捨て、残渣に生理的食塩水を 1 ml を加え精子浮遊液を作製、このサンプルを -20°C で凍結保存した。

(2) コレステロール分析法

融解した精子浮遊液 0.1 ml を 25 ml 容の共栓遠沈管に取り、1N-NaOH・エタノール (1:9, V/V) 5 ml を加え 60 分間還流し直ちに室温まで冷却した。けん化冷却後、蒸留水 4 ml および 5 α-コレスタン 2.5 ul, それにヘキサン 10 ml を加えて 10 分間振とうし遠心分離後 (700×g 5 分間)、ヘキサン層をメスピペットで 8 ml 取り、それを 10 ml 容スピッツ試験管へ移し 50°C 窒素を吹きつけ乾固した。このよく乾固したスピッツ管へ N, O-Bis (Trimethylsilyl)acetamide 0.1 ml を加えてよく振とうし、115°C 30 分間シラン処理した後窒素吹きつけ乾固、それを酢酸エチル 0.1 ml に溶かして試料とし、ガスクロマトグラフィーによって分析した。

(3) リン脂質定量法

融解した精子サンプル 0.4 ml に Folch 液 (メタノール:クロロホルム, 1:2, V/V) 8 ml を加え、10 分間振とうして脂質を抽出する。蒸留水 1.5 ml を加えよく振とうした後 700×g 5 分間遠心分離した。しばらく放置した後、上層を吸引除去し、下層をろ過した。窒素にて吹きつけ乾固させ、残渣を水・メタノール (1:1, V/V) 0.4 ml に溶解し酵素法にて定量した。すなわち溶解液にホスホリパーゼ D を作用させてリン脂質からコリンを遊離させた後、コリンオキシダーゼで過酸化水素を生じさせる。この過酸化水素はパーオキシダーゼの存在下で、4-アミノアンチピリンとフェノールを酸化縮合させることで赤色色素を生成する。この色素を波長 500 nm の吸光度で測定することによりリン脂質を定量した。

3. コレステロールおよびリン脂質添加培養液によるハムスター・テスト

コレステロール 1mg/ml, dipalmytoil phosphatidylcholine (DPPC) 1mg/ml, そしてコレステ

表1 10人の健康成人男子の精子によるハムスター・テストの成績

Case	Preincubation time (hrs)	Incubation time from insemination (hrs)	Total incubation time (hrs)	No. of eggs inseminated	No. (%) of eggs penetrated	Mean no. of sperm penetrated in one egg
1	2	1	3	11	0(0)	0
	2	3	5	20	15(75)	1.4
	2	5	7	14	12(86)	3.9
2	2	1	3	13	0(0)	0
	2	3	5	10	5(50)	0.7
	4.25	1.50	5.75	7	6(86)	1.7
	2	4.12	6.12	11	10(91)	3.9
	4.25	3.50	7.75	5	5(100)	2.6
	4.25	5.50	9.75	7	7(100)	2.7
3	1.50	1.50	3	8	0(0)	0
	3	2	5	15	8(53)	0.6
	3	4	7	15	15(100)	5.9
4	2.33	1.42	3.75	9	2(22)	0.4
	2.33	2.17	4.50	8	2(25)	0.3
	2.33	3.67	6	12	10(83)	1.4
5	2	1	3	11	0(0)	0
	2	2	4	7	0(0)	0
	3	2	5	18	6(33)	0.3
	2	4	6	8	3(38)	0.5
	3	4	7	17	8(47)	0.6
	3	6	9	12	8(67)	1.0
6	2.33	1.67	4	15	1(6)	0.06
	2.33	3.67	6	18	6(33)	0.5
	2.33	5.67	8	17	10(59)	1.0
	2.33	7.67	10	16	11(69)	1.5
7	3	2	5	8	1(13)	0.1
	3	4	7	14	5(36)	0.6
	3	6	9	13	6(46)	0.6
	3	8	11	8	6(75)	1.0
8	2.50	6.50	9	7	1(14)	0.1
	9	1.75	10.75	24	13(54)	0.6
	9	2.25	11.25	18	16(89)	1.3
	9	2.75	11.75	24	22(92)	1.5
9	15	2	17	18	3(17)	0.2
	15	4	19	18	5(28)	0.3
	15	6	21	14	4(29)	0.4
10	3	21	24	14	0(0)	0
	27	2	29	17	4(24)	0.5
	27	4	31	13	5(39)	0.5
	27	6	33	13	6(46)	0.5

表 2 ヒト精子の cholesterol・phospholipid 量および cholesterol/phospholipid mole ratio.

Case	Sperm cholesterol ($\mu\text{mol}/10^9$ cells)	Sperm phospholipid ($\mu\text{mol}/10^9$ cells)	Cholesterol/phospholipid mole ratio
1	0.811	12.39	0.065
2	3.652	64.07	0.057
3	1.868	19.15	0.098
5	0.517	5.06	0.102
6	0.500	3.25	0.154
7	0.711	5.26	0.147
9	1.308	5.00	0.262
10	0.439	1.29	0.340

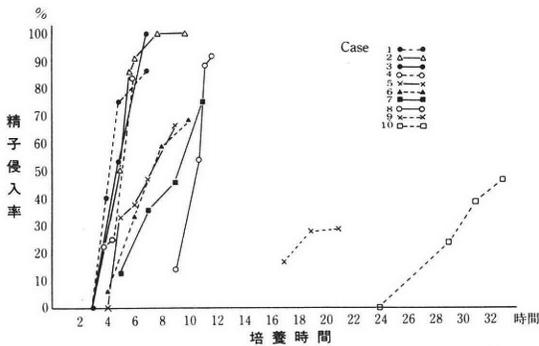


図 1 透明帯除去ハムスター卵への経時的ヒト精子侵入率

ロール 0.4 mg/ml+DPPC 0.6mg/ml が加えられた懸濁 mBWW 溶液を作製し、この培養液を用いてハムスター・テストを行ない対照と比較検討した。精液は 3 人の健康成人男子から求め、精子の前培養時間は 3 時間、受精後の卵子の培養時間は 4 時間とした。

結 果

10 人の男性から得られた精子を用いて行なったハムスター・テストの成績は表 1 にまとめた。全てのケースにおいて、精子の前培養の時間に受精から検鏡までの培養時間を加えた全培養時間が長くなれば長くなるほど精子の侵入率と侵入精子数は増加する。しかし、侵入開始の時期と侵入率の増加パターンは個々のケースで大きく異なっている。図 1 は横軸に全培養時間、縦軸に精子侵入率を示し、個々のケースの精子侵入の状況を経時的に表したものである。ヒト精子の透明帯除去ハムスター卵への正確な侵入開始の時期を特定することは無理であるが、全てのケースで計測可能な侵入開始から間もない時間すなわち侵入率が 20% を示す時間で比較すると、ケース 1 で 3.6 時間、最も遅いケース 10 で 28.3 時間とかなり個人差を認めることが出来る。

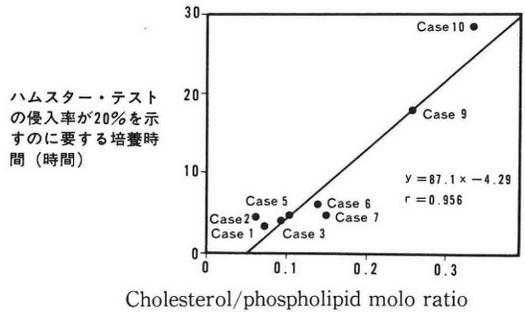


図 2 capacitation time と cholesterol/phospholipid mole ratio との関係

10 例のうち 8 例について精子のコレステロールとリン脂質を定量することが出来た。それぞれの量を ($\mu\text{mol}/10^9$ 精子) で、またコレステロール/リン脂質モル比 (C/PL 比) を計算して表 2 に表示した。侵入率カーブが右にシフトしているケースほど C/PL 比が高い。

前述したように卵への正確な精子侵入開始時間は不明であるが、グラフ上から得られる侵入率 20% を示す時間と C/PL 比との相関を求めると、相関係数 0.956 と極めて高い正の相関が得られた (図 2)。

コレステロールおよびリン脂質を培養液に添加してハムスター・テストを行なうと、精子侵入率はコントロール 55%・コレステロール 1 mg/ml 添加群 28%・DPPC 1mg/ml 添加群 42%・コレステロール 0.4mg/ml+DPPC 0.6 mg/ml 添加群 44% となり、コントロールに比べコレステロール添加群では有意 ($P < 0.05$) に低値を示した (表 3)。

考 察

哺乳動物の精子は海産無脊椎動物や下等脊椎動物の精子と異なり雄の体から放出された時点では運動はするが、卵子に受精出来る状態にない。精子が卵子に侵入できるようになるためには、ある生理的変

表3 cholesterol および dipalmytoil phosphatidylcholine (DPPC) のハムスター・テストに与える影響

Media	No. of eggs inseminated	No. (%) of eggs penetrated	Mean no. of sperm penetrated in one egg
mBWW added cholesterol (1 mg/ml)	75	21 (28)*	0.5
mBWW added DPPC (1 mg/ml)	81	34 (42)	0.6
mBWW added cholesterol (0.4 mg/ml)+DPPC (0.6 mg/ml)	75	33 (44)	0.9
mBWW (control)	92	51 (55)*	0.9

*P < 0.05

化を経ねばならずこれが精子の受精能獲得 (capacitation) とよばれている。capacitation の概念は 1951 年にほとんど時を同じくして Austin⁹⁾ と Chang⁶⁾ によって提唱されたものであるが、先体反応 (acrosome reaction) や運動性の活発化 (hyperactivation) とともに精子の受精能を左右する大きな因子である。capacitation から acrosome reaction に到る過程のメカニズムについてはいくつかの仮説が唱えられているが、Davis は精子細胞膜の脂質に注目して以下の様に述べている⁷⁾。すなわち、細胞膜を構成している脂質の一成分であるコレステロールによって膜は安定性を保たれているが、コレステロールは雌性生殖管や培養液の中で次第に周囲にあるアルブミンなどに取込まれ、その結果膜の安定性は失われていく。この過程が capacitation である。安定性を失った細胞膜のリン脂質に Ca^{++} が附着し、これによって精子の最外層の plasma membrane と outer acrosomal membrane の融合が生じ、acrosome reaction が起こるといふものである。すなわち capacitation はコレステロールによってコントロールされており、動物種によって異なる capacitation に要する時間 (capacitation time) は精子細胞膜コレステロール/リン脂質モル比 (cholesterol/phospholipid mole ratio: C/PL 比) と見事に相関することも示して報告している⁷⁾。精子に存在するコレステロールの分布を検討した Langlais は、コレステロールが精子の頭部と中片部、特に先体の plasma membrane に局在することを確認し、capacitation にコレステロールが関与しているとの説を支持している⁸⁾。

ヒトの受精についても急ピッチでそのメカニズムが解明されつつあるが、ヒトの場合は研究材料としての卵子の使用に制限のあることが研究を困難なものにしている。しかし、capacitation と acrosome reaction に関しては透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入テスト (ハムスター・テスト) の導入に

より多くの知見が得られている。斎藤らは 12 名から得られた精子を用いて同一条件でハムスター・テストを施行し、従来はほとんど同じと考えられていた capacitation time に実際は大きな個人差のあることを指摘している²⁾。われわれの行なった健康成人男子 10 例のハムスター・テストでも精子侵入率の推移にかなりの個人差をみる事が出来た。精子がハムスター卵に侵入を開始する時間、すなわち acrosome reaction の開始する時間、ここまでの経過時間が capacitation time を意味するが、これをハムスター・テストで調べることは不可能である。そこで今回調べ得た 8 例全てにおいて求めることが出来る精子侵入率 20% を示すまでに要する培養時間を capacitation time と仮定して、これと C/PL 比との関連を調べると極めて高い正の相関が得られ、ヒト精子の場合にも Davis の仮説が当てはまり capacitation time の個人差にコレステロールが関与していることが認められた。

Darin-Bennett によれば、ヒト精子細胞膜のコレステロール量は $1.438\mu\text{mol}/10^9$ 精子またリン脂質は $1.447\mu\text{mol}/10^9$ 精子であり、C/PL 比は赤血球のそれに等しく約 1 といわれる⁹⁾。われわれの測定ではコレステロールが平均 $1.233\mu\text{mol}/10^9$ 精子、リン脂質は平均 $14.43\mu\text{mol}/10^9$ 精子を示し、リン脂質の測定量に違いがみられる。この違いは、われわれの方法は精子の細胞膜のみの測定ではなく細胞全体の量を測定しているためと考えられる。

培養液に加えたコレステロールの受精に与える影響については、ウサギの capacitated sperm¹⁰⁾ やウシの精子¹¹⁾ を用いた実験で抑制効果のあることが報告されている。今回のハムスター・テストでも培養液内のコレステロールはハムスター卵への精子侵入を抑制しており、ヒトの場合でも同様の阻害効果があると考えられる。精子の周囲に存在するコレステロールが受精に影響を及ぼすとすれば、当然 *in vivo* では

精漿中のコレステロールも受精能に関与していることが予想され、ウサギ¹²⁾やマウス¹³⁾ではその阻害効果が証明されている。ヒト精子のコレステロール量は46.8mg/dl¹⁴⁾、80mg/dl¹⁵⁾、4mg/dl¹⁶⁾など様々に報告されているが、精漿をはじめ精巣上体分泌液、前立腺液、頸管粘液、子宮内腔液、卵管液など精子にコレステロールを供給すると考えられる体液の影響は無視できず、今後それぞれの関連を検討しなければならない。コレステロール以外の脂質すなわち脂肪酸や lysophosphatidyl-choline については capacitation や acrosome reaction の促進効果が認められているが¹⁷⁾、同様の細胞膜 softening factor といわれる DPPC は今回の検討で受精能促進効果を示さなかった。しかし、DPPC をコレステロールと同時に作用させた時は、コレステロールの受精能阻害効果を中和していた。

文 献

- 1) Davis, B. K.: Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7560, 1981
- 2) 斎藤 晃, 星 和彦, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: ヒト精子の受精能獲得時間の個人差, 日不妊会誌, 29: 90, 1984
- 3) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos *in vitro*. In Methods in mammalian embryology, (ed. J. C. Daniel), 86. Freeman, San Francisco, 1971
- 4) Overstreet, J. W., Yanagimachi, R., Katz, D. F., Hayashi, K. and Hanson, F. W.: Penetration of human spermatozoa into the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients, Fertil. Steril. 33: 534, 1980
- 5) Austin, C. R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg, Aust. J. Sci. Res. Ser. B, 4: 581, 1951
- 6) Chang, M. C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes, Nature (London), 168: 697, 1951
- 7) Davis, B. K.: Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. In symposium on the Pharmacological Effects of Lipid, AOCs Monogr, No. 5, 145, 1978
- 8) Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G. and Roberts, K. D.: Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7266, 1981
- 9) Darin-Bennett, A. and White, I. G.: Influence of

the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock, Cryobiology, 14: 466, 1977

- 10) Davis, B. K.: Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability rabbit spermatozoa (39374), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152: 257, 1976
- 11) Ehrenwald, E., Parks, J. E. and Foote, R. H.: Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and *in vitro* matured bovine ova, Gamate Res. 20: 413, 1988
- 12) Davis, B. K.: Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol, Arch. Androl. 5: 249, 1980
- 13) Go, K. J. and Wolf, D. P.: Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation, Biol. Reprod., 32: 145, 1985
- 14) Eliasson, R.: Cholesterol in human semen, Biochem. J. 98: 242, 1966
- 15) Goldblatt, M. W.: Constituents of human seminal plasma, Biochem. J., 29: 1346, 1935
- 16) Mann, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract, 2nd ed., 108. Methuen & Co., London, 1964
- 17) 京野広一, 星 和彦, 斎藤 晃, 村木 章, 桃野耕太郎, 星合 晃, 鈴木雅洲: ヒト精子 Acrosome reaction における Lysophospholipid および Fatty acid の関与, 日産婦誌, 29: 441, 1984

Relationship between capacitation time of human spermatozoa and sperm cholesterol/phospholipid ratio

Tomiko Aita and Kazuhiko Hoshi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College,
Fukushima 960, Japan

We performed zona-free hamster egg penetration test (hamster test) using spermatozoa obtained from 10 males. There was marked individual variation in the initiation time and pattern of sperm penetration. Sperm cholesterol and phospholipid were determined in 8 of the 10 subjects. The incubation time required to achieve a sperm penetration rate of 20% in the hamster test positively correlated very well with the sperm cholesterol/phospholipid mole ratio. These results suggest that the

time required for capacitation of human spermatozoa varies greatly among individuals and depends on the sperm cholesterol/phospholipid mole ratio.

In addition, the effects of cholesterol on the hamster test were evaluated. After addition of cholesterol to the culture medium, the human sperm penetration rate in the hamster test significantly

decreased compared with the control. Cholesterol seems to inhibit human sperm capacitation and the acrosome reaction.

(受付：1989年2月6日)

精液分析方法の検討 (Semen Auto Analyzer による分析法と Makler counting chamber の特性)

The Method of Semen Analysis (Semen Auto Analyzer and Characteristics of Makler Counting Chamber)

福島県立医科大学産科婦人科学教室

柳 田 薫	星 和 彦	月 川 奏
Kaoru YANAGIDA	Kazuhiko HOSHI	Susumu TSUKIKAWA
佐々木宏子	遠 藤 力	佐 藤 章
Hiroko SASAKI	Chikara ENDO	Akira SATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan

客観的評価が可能な Semen auto analyzer である CellSoft シリーズ 3000 (以下 CS と略す) は Makler counting chamber (M. chamber) を用いるが、我々は検体の解析中にモニター画像の精子数が3分後から著明に増加することを発見した。本研究では CS の信頼性と M. chamber を使用した時の分析値の経時的変動について検討した。1) CS による精子濃度・運動率は鏡検で算定した値によく相関した。精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満または運動率が 30% 未満ではバラツキが大きいが、それらの値以上では十分信頼できると思われた。2) M. chamber による精子濃度・運動率は検体をセットしたままの状態では経時的に増加し、3～5分後の早期でも精子濃度で +19～+169%、運動率で -12～+61% の増加であるので、3分以内の分析が必要である。3) M. chamber に滴下する検体量が $5 \mu\text{l}$ では経時的増加はないが、それ以上では増加する。信頼し得る分析には $5 \mu\text{l}$ 以下であることが必要である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 893—901, 1989)

はじめに

現在、精子濃度や精子運動率を求める精液分析には、その簡便性から Makler counting chamber (以後 M. chamber と略す) が多用されつつあるのが現状と思われる^{1,2)}。

M. chamber は正確な $10 \mu\text{m}$ の深さを作ることで適度に精子を拡散させ、カバーガラス上の 1mm^2 の格子内に刻まれた $0.1 \times 0.1 \text{mm}^2$ の 100 区画中の 10 区画分の精子 (A) を数えることで精子濃度が算出

($A \times 10^6/\text{ml}$) でき、器具の良好な操作性と迅速性により当教室でも臨床及び研究に使用している。

検査結果の安定性はどのような検査でも最重要点であるが、M. chamber から得られる精子濃度には、検体の量に依存する経時的変動が存在することが判明した。このことは M. chamber の特性と言うことができるが、M. chamber を使用する際には十分留意すべきことなので、その特性について報告する。

研究対象及び方法

精液分析は、通常 M. chamber に精液の 1 滴をパスツールピペットで滴下し、位相差顕微鏡 (×200) で鏡検しているが、当科では精液自動分析装置 (CRYO Resources 社製、CellSoft シリーズ 3000; 以下 CS と略す) での分析も行っており、本研究では CS を用いて検討した。CS は位相差顕微鏡 (OLYMPUS BH-2) にセットされた M. chamber の像をビデオカメラを介してコンピューターにより画像解析を行ない精子濃度、運動率、平均精子速度、精子直進性、精子頭部振幅および精子頭部振動数を出力する。

本研究では精液分析について人為的に、M. chamber 内の精子を算定した (以後 manual counting, MC と略す) ときの結果と CS による分析結果の相関性について検討を行ない、次に CS を用いて M. chamber に精子を滴下した時から分析開始迄に用いた時間の分析結果に及ぼす影響を調べた。さらに、検体の量による分析結果の差異についても検討を加えた。

1) MC と CS の分析結果の比較

当科の不妊外来を受診した 104 名の男性から用手法で精液を採取し液化のため室温で 30 分間放置し、パスツールピペットで M. chamber に 1 滴の精液を滴下し直ちに鏡検した。引き続き同検体の 1 滴で CS による分析を行ない、それぞれの精子濃度、運動率について比較した。

2) M. chamber による精子濃度値の経時的変動

対象は 8 人の男性 (検体数は 9) から得られた精液でその精子濃度は $5.59 \sim 92.2 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率は $36.66 \sim 88.61\%$ であった。検体の 1 滴をパスツールピペットで M. chamber に滴下するが、その時を 0 分としその後 60 分迄経時的に M. chamber を移動することなく精液分析を繰り返し、精子濃度・運動率の変動を検討した。なお、症例 3 と 4 は同一例であるが症例 3 は他の例と同様に位相差顕微鏡の光源を常に入れていたが、症例 4 は分析時以外は光源を切り M. chamber を暗く保った。

3) 検体量による精子濃度の変動

パスツールピペットの 1 滴は $24 \mu\text{l}$ であるが、M. chamber に滴下する検体の量を $5 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{l}$ 、 $20 \mu\text{l}$ にして 0 ~ 20 分の間で CS による分析を行ない、検体量による影響を検討した。対象は 3 例である。

結果

1) MC と CS の分析結果の比較

人為的鏡検による 104 例の精子濃度は

$0.6 \sim 238.0 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率は $0 \sim 83\%$ であった。MC と CS の精子濃度の相関を図 1 に示した。回帰直線は $y = 6.574 + 0.909 X$ また相関係数は $r = 0.969$ ($P < 0.01$) で強い正の相関を認め両値はよく一致していた。MC に対する CS による精子濃度値の偏位を百分率で求めて表したのが図 2 である。これによると精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満ではその偏位の幅は $-787 \sim +49\%$ と大きい、 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上では平均偏位 $-5.4 \pm 24.9\%$ (mean \pm SD) と小さかった。精子運動率の両測定法の相関を図 3 に、MC に対する CS による運動率の偏位を図 4 に示した。これによれば回帰直線は $y = 8.801 + 0.841 X$ また相関係数は $r = 0.786$ ($P < 0.01$) であった。運動率が 30% 未満ではその偏位の幅は $-579\% \sim +58\%$ で、 30% 以上では平均偏位 $+1.3 \pm 26.3\%$ (mean \pm SD) であった。

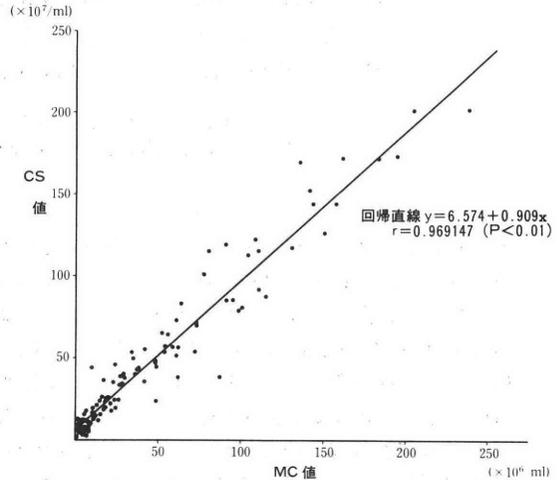


図 1 精子濃度値の相関

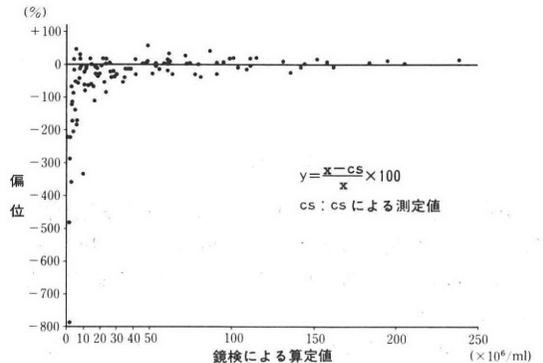


図 2 鏡検に対する CS による精子濃度値の偏位率

表1 同一検体の繰り返し測定の結果

症例		1回	2回	3回	4回	平均	標準偏差
1	精子濃度(×10 ⁶ /ml)	41.9	46.1	44.7	40.8	43.38	2.12
	運動率(%)	25.7	17.6	19.1	19.8	20.55	3.08
2	精子濃度(×10 ⁶ /ml)	41.5	48.9	41.1	43.9	43.85	3.11
	運動率(%)	34.1	31.6	31.9	35.4	33.25	1.57
3	精子濃度(×10 ⁶ /ml)	67.2	69.9	69.6	58.5	66.30	4.62
	運動率(%)	17.2	21.4	21.6	20.5	20.18	1.77
4	精子濃度(×10 ⁶ /ml)	12.7	12.3	11.9	12.7	12.40	0.33
	運動率(%)	71.2	67.7	78.9	77.8	73.90	4.64

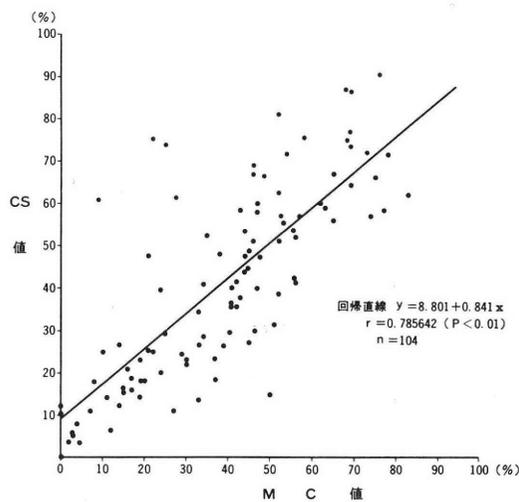


図3 精子運動率の相関

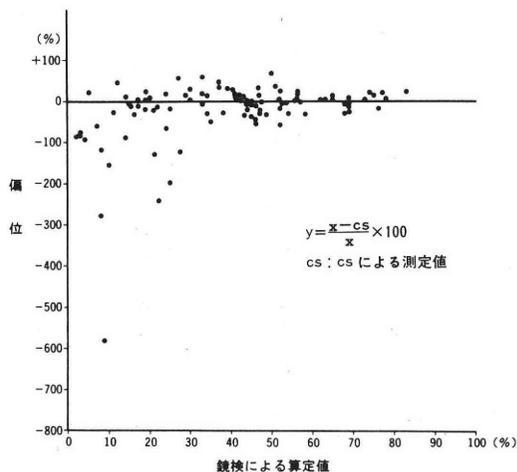


図4 鏡検に対するCSによる精子運動率値の偏位率

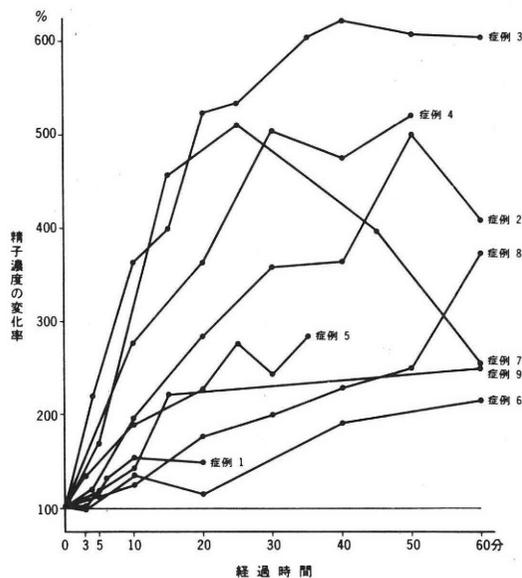


図5 精子濃度の経時的変化
(0分での精子濃度を100とした)

次にCSによる測定のバラツキをみるために4症例について、それぞれ4回づつ測定を繰り返した。検体は1回毎に精液を十分攪拌したうえで改めてセットした。その結果は表1に示した。精子濃度の標準偏差は±0.33~±4.62(平均値を100とすると±2.5~±7.2)、運動率は±1.57~±4.64(平均値を100とすると±4.6~±14.9)であり、バラツキは軽微と考えられた。

2) M. chamber による精子濃度値の経時的変動

9症例のCSでの分析結果を表2に示した。検体をM. chamberにセットしたままでの経時的変動(0~60分)に注目すると精子濃度と運動率は増加するが、精子速度・直進性・精子頭部の振幅・精子頭部の振動数はほぼ一定で変動がないことが判明した。

精子濃度について、検体をM. chamberに滴下した時すなわち0分の値を100とした場合の各症例の測定値を図示したのが図5である。これによると全症例に経時的増加を認めたが、最大増加率は+54~+521%で10分~60分後に生じた。増加の著明な症例

表2 CSによる分析結果

症例	経過時間 (分)	検査 精子数 (n =)	精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	運動率 (%)	精子速度 ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	直進性*	精子頭部振幅 (μm)	精子頭部振動数 (c/sec)
1	0	171	35.95	23.39	51.36	4.38	3.27	11.32
	3	154	36.38	37.66	50.54	4.89	3.12	10.59
	6	233	47.16	50.21	58.89	4.88	3.74	10.92
	10	205	55.28	52.68	54.47	4.75	3.22	12.06
	20	166	53.44	51.2	53.87	4.92	3.14	11.23
2	0	158	12.42	88.61	72.19	5.4	4.0	17.34
	4	150	14.74	92.0	70.0	5.42	3.7	17.13
	10	154	24.36	94.16	68.22	5.75	3.58	17.75
	20	202	35.28	96.04	68.54	5.5	3.95	16.46
	30	198	44.46	96.97	74.28	5.19	4.19	16.17
	40	173	45.32	96.53	71.7	5.45	3.98	16.38
	50	158	62.09	97.47	69.51	5.42	3.76	15.84
60	161	50.62	98.14	71.55	5.19	4.01	14.61	
3	0	161	12.65	78.88	67.79	7.46	2.67	18.53
	4	177	27.82	91.53	68.71	6.73	3.13	18.17
	10	175	46.11	97.71	68.62	6.33	3.25	16.27
	15	193	50.56	95.34	67.8	6.62	2.88	17.84
	20	210	66.33	97.62	63.82	5.99	3.23	16.63
	25	215	67.59	98.14	67.85	5.83	3.58	16.79
	35	193	76.24	98.45	62.63	6.66	2.94	16.89
	40	199	78.6	99.5	63.8	6.28	3.19	15.7
	50	195	76.63	95.38	62.71	6.16	3.11	16.04
	60	194	76.24	98.97	64.34	6.2	3.4	15.77
4	0	164	12.28	67.68	59.27	5.97	2.91	17.03
	10	194	33.88	86.08	63.22	6.24	3.21	16.96
	20	198	44.69	91.92	65.86	5.71	3.63	15.95
	30	196	61.93	92.35	65.61	5.96	3.38	16.27
	40	260	58.34	94.6	65.64	5.35	3.66	15.86
	50	244	63.92	94.26	63.72	5.69	3.42	16.07
	(110)	162	23.44	79.63	53.91	4.3	3.54	13.95
5	0	161	36.83	64.6	54.62	6.36	2.36	19.18
	3	153	49.04	75.82	62.56	6.64	2.6	19.84
	10	177	69.95	83.05	59.39	6.73	2.3	19.06
	20	212	83.31	87.74	61.16	6.69	2.41	19.41
	25	194	101.65	89.69	60.93	6.21	2.74	17.35
	30	228	89.6	84.21	58.04	6.39	2.59	18.83
	35	265	104.92	86.42	62.39	6.61	2.55	18.37
6	0	168	92.22	57.14	36.66	6.2	1.89	14.46
	3	160	91.69	50.0	37.87	6.1	1.89	13.49
	10	223	125.75	69.51	39.67	5.53	2.04	13.22
	20	189	103.75	77.25	38.89	5.97	1.75	13.18
	40	214	176.84	81.31	38.19	6.2	1.83	12.72
	60	245	198.85	82.45	41.09	5.67	1.95	13.42
7	0	159	5.59	86.16	62.24	5.79	3.48	14.9
	5	153	15.03	94.12	66.02	5.93	3.55	16.59
	15	162	25.47	95.68	65.92	6.09	3.52	15.65
	25	200	28.58	96.5	62.97	6.27	3.4	15.07
	45	155	22.15	90.32	60.4	6.77	2.92	16.04
	60	152	14.15	73.03	60.56	6.32	3.09	16.61
8	0	152	47.16	56.34	53.34	4.36	3.15	14.27
	5	159	52.19	60.38	54.67	5.02	3.12	15.47
	10	156	58.95	70.55	55.65	5.11	3.01	14.61
	20	155	77.02	75.86	55.18	5.61	2.81	14.24
	30	174	93.27	82.76	56.64	5.71	2.89	15.27
	40	206	107.94	87.86	51.2	6.01	2.51	14.96
	50	223	117.89	82.96	53.89	6.09	2.67	14.91
60	222	176.05	92.79	48.87	6.07	2.37	15.3	
9	0	176	69.95	28.98	37.11	4.67	2.11	11.05
	5	262	83.31	45.04	37.92	5.24	2.17	11.4
	10	184	97.98	48.37	34.85	4.84	1.95	10.28
	15	193	154.05	54.92	35.67	4.9	1.97	10.79
	60	220	174.48	56.36	31.7	4.55	1.7	11.79

* 直進性：0～10の数字で表現し、数値が大きい程直進性が高い

表 3 加温不働化精液の精子濃度

症例*	経過時間 分	分析精子数 n =	精子濃度 × 10 ⁶ /ml
5	0	150	34.58
	5	158	33.46
	10	154	30.46
	20	151	34.8
8	0	151	49.67
	5	170	55.33
	10	151	48.73
	20	159	48.41

*表 2 の症例

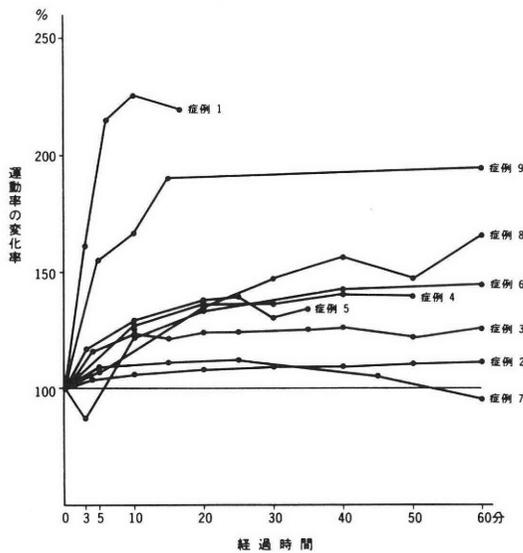


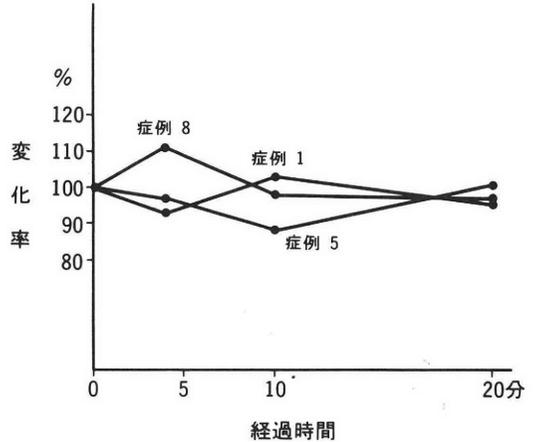
図 6 精子運動率の経時的変化
(0 分での精子運動率を 100 とした)

(症例 2, 3, 5, 7) では 3 ~ 5 分という早い時に +19 ~ +169% の増加を認めた。

精子運動率の経時的変化を同様に図示したのが図 6 である。運動率もまた全症例に経時的増加を認め、最大増加率は +11 ~ +125% で 10 ~ 60 分後に認められた。3 ~ 5 分後の早期での増加率は -12 ~ +61% であった。

次に、不働化した精液でもこのような変化がおこるか否かを検討するために症例 5, 7 の液化後の精液を加温 (56°C 10 分間) にて不働化して分析した。その時の経時的 (0 ~ 20 分) な精子濃度の測定値を表 3・図 7 に示したが、これでは精子濃度の変動は認められなかった。

分析以外の時に光源を入れていたか切っていたかの違いによる症例 3 と 4 を比較すると、明るくして



(症例は表 2 の症例である)

図 7 加温不働化精液の精子濃度の経時の変化

いた症例 3 が増加率が大きい傾向にあった。

3) 検体量による精子濃度の変動

パスツールピペットの 1 滴を計測したところ 24 μl であった。そこで検体量を 5, 10, 20 μl と設定し 3 症例で精子濃度・運動率について、その経時の変化 (0 ~ 20 分) を調べ、その測定値を表 4 に示した。さらに、精子濃度について 0 分の値を 100 と計算したものを図 8 に示した。症例 2, 3 では 5 μl の場合にはその変動がほとんどないが、10, 20 μl と検体量が増えるにつれ増加率が著しく増した。症例 1 は検体量にかかわらず 5 分以内の増加は認められなかったが、以後は検体量が 10 μl 以上でそれらの値が増加する傾向を示した。従って、検体量が 5 μl では精子濃度値の経時的変動がないことが判明した。運動率についても同様で検体量が 5 μl では変動がなかった (図 9)。

考 察

精液検査に用いられる検査器具は従来からトーマの血球計算盤であったが、最近では M. chamber がよく用いられているようである。現在の型の M. chamber は A. Makler が 1980 年に開発したもので、その特徴は均一な 10 μm の深さの counting chamber を設定したことである。ヒト精子頭部の大きさが 5 × 2.5 μm、全長が 50 μm であることを考えると、精子の算定にその深さ (10 μm) は適していると思われる。実際トーマの血球計算盤では、chamber の深さは 100 μm あり精子が重積し精子の計算が容易でないことがある。

CS は精子濃度・運動率以外に精子速度・直進性・頭部の振幅・頭部の振動数を算出でき、われわれは

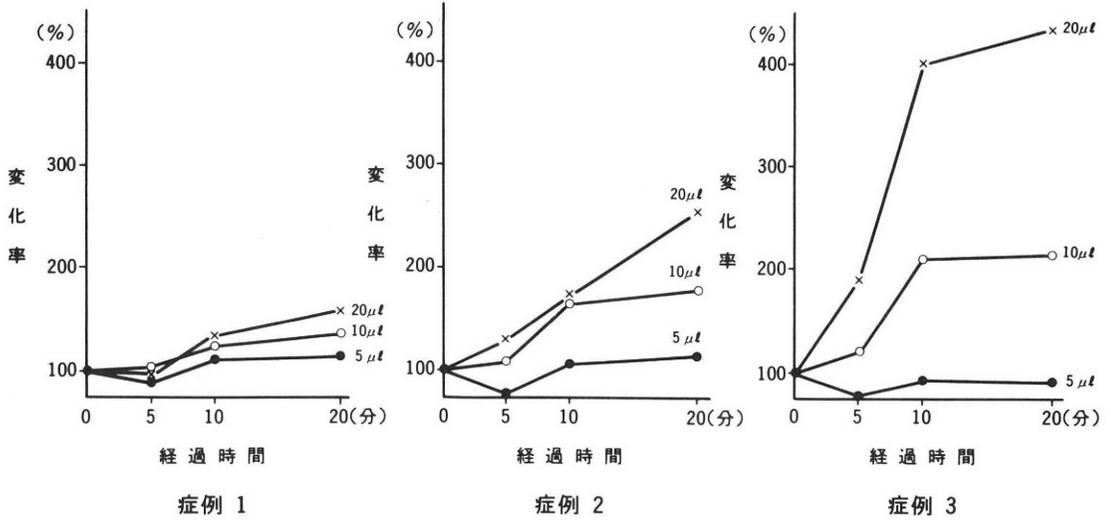


図 8 精子濃度の経時的変動に及ぼす検体量の影響

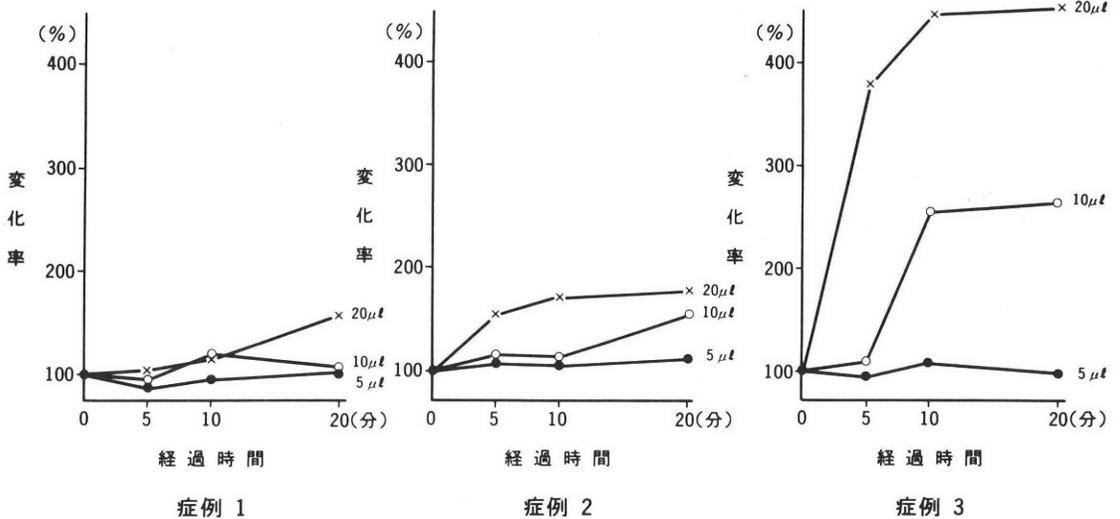


図 9 運動率の経時的変動に及ぼす検体量の影響

精子の運動性の解析を目的として導入している。しかし、最近、ある検体の解析中にモニター画像の精子の数が数分後に著明に増加することを認めた。M. chamber の特性としてその分析値が経時的変化を示すとの報告はなく、これは検査結果の判定に多大な影響を及ぼすと思われるので検討を加えてみた。

1) MC と CS の分析結果の比較

M. chamber を使用して鏡検から算定された精子濃度・運動率と CS によるそれらとを比較すると極めて良く相関した。精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満または運動率が 30% 未満では、CS による分析値の鏡検値に対してのバラツキが大きくなる傾向がある。しかし、CS をスクリーニングの機器として用いるのなら

ば男性因子の有無を判定することは十分可能である。同一検体の繰り返し測定による測定値のバラツキは精子濃度では最大 $\pm 7.2\%$ 、運動率では最大 $\pm 14.9\%$ であったが、これがこの機器の誤差範囲と考えられた。もっとも精子の感度を調整することで測定値が増減するが、我々は精子濃度・運動率ともに鏡検による算定値を上回らぬように設定している。今回の一連の分析操作では、この感度調整を同一値に設定して行なった。以上のことより、CS による精液分析(精子濃度・運動率)結果は十分信頼し得ると思われた。

2) M. chamber による精子濃度値の経時的変動

図 5 に示した 9 例について行なった CS による経

時的分析では、精子濃度値はいずれも増加傾向を示しており、運動率もまた増加している。(図 5)。CS 分析の再現性、つまり測定値のバラツキは精子濃度で 9% 以下、運動率で 17% 以下であったので(表 1)、それらの値より大きな変動は増加と考えるとよい。増加傾向の強い症例(症例 2, 3, 4, 7)では 3~5 分後に +19~+169% の増加を認めたと、注目すべきことはそれらでは平均精子速度が 60 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上と速いことである。いずれにしても、濃度値で 3 分後に +33% (症例 5)、5 分後に +169% (症例 7) 増加、運動率で 3 分後に +61% (症例 1)、5 分後に +55% (症例 9) 増加する症例が存在することから、M. chamber を使用しての精液分析は 3 分以内に行なわなければいけないことになる。

精子速度・精子直進性・精子頭部の振幅および振動数については経時的変動が認められていない。このことは 60 分の観察時間内では、精子の運動能力自体には変化がないと考えられ、精子濃度値の上昇の原因は精子の運動能力の変化によるものではないと思われた。

時間の経過につれて chamber 内の水分が蒸発したため精子が濃縮されたとも考えられたが、不動化精子の検討(図 7)によると 60 分以内での濃度値は一定の値を示し上昇は無く、濃縮が原因とは考えにくい。

M. chamber の操作手引書によれば少々の検体の余剰は分析に影響がないとされている。我々が調べたところでは counting chamber からはみださない検体の量は 5 μl 以下であった(図 10 b)。検体が 5

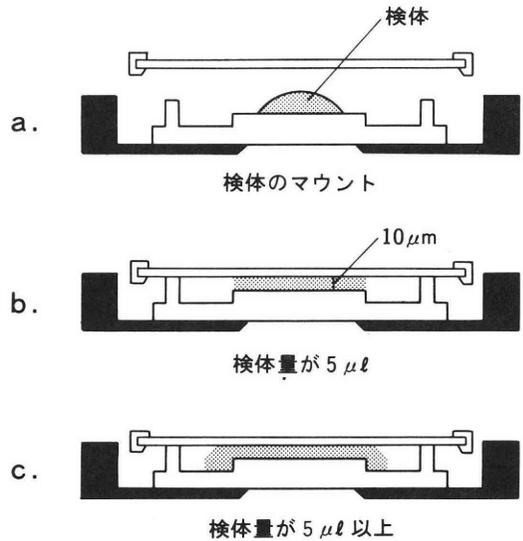


図 10 Makler counting chamber の断面図

μl 以上の場合(図 10 c)には counting chamber 内から周囲への運動精子の移動もあるが、それ以上に周囲にはみだした精液中から運動精子が counting chamber 内に侵入してくることが考えられる。そしてそのために精子濃度・運動率の、経時的増加が起こるのではないかと我々は考えている。counting chamber 内の不動精子の数は経時的に不変(表 3)であるので、0 分で精子濃度が $A \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率が $B\%$ であったのが、その後 $a \times 10^6/\text{ml}$ 、 $b\%$ に変動したとすると、上述の機序で chamber 内に運動精子が増加したのであれば $b = 100 - A/a(100 - B)$ な

表 4 検体量による分析値の経時的変化に及ぼす影響

症例	時間 (分)	5 μl		10 μl		20 μl	
		精子濃度 $\times 10^6/\text{ml}$	運動率 %	精子濃度 $\times 10^6/\text{ml}$	運動率 %	精子濃度 $\times 10^6/\text{ml}$	運動率 %
1	0	48.10	56.16	49.36	45.51	34.80	30.07
	5	43.49	49.69	49.99	43.31	32.62	31.06
	10	52.81	53.46	61.30	54.61	46.37	34.88
	20	53.76	57.40	65.63	46.67	54.70	46.82
2	0	37.73	45.73	30.46	48.68	23.86	39.75
	5	30.04	54.44	33.01	58.22	31.05	61.78
	10	40.08	53.02	49.99	55.84	41.39	69.43
	20	42.70	57.41	54.39	77.46	60.62	71.71
3	0	35.96	22.41	19.59	24.68	6.29	18.97
	5	27.04	21.36	23.64	27.31	11.86	72.00
	10	33.54	24.60	41.39	64.10	25.11	85.15
	20	32.04	22.46	41.92	65.82	27.25	86.36

表5 推定運動率値

経過時間 分	精子濃度 ×10 ⁶ /ml	運動率 %	推定運動率 %
0	12.42	88.61	—
4	14.74	92.00	90.40
10	24.36	94.16	94.19
20	35.28	96.04	95.99
30	44.46	96.97	96.82
40	45.32	96.53	96.88
50	62.09	97.47	97.72
60	50.62	98.14	97.21

※症例は表2の症例2である。

る関係式が成立することになる。表2の症例2でこのbを求めたのが表5で、これによると実測値と計算値はほぼ一致した。したがって、counting chamber外にはみだした精液中から運動精子が侵入するために濃度が増加するのはまちがいのないと思われた。しかし、なぜ運動精子がchamberの中央に集まってくるのかその原因は不明である。位相差顕微鏡の光源による光・加温による影響、counting chamberの10μmの狭い間隙の影響等が考えられる。表2の症例3と4の比較によると、明るくしていた症例3の経時的増加は大きい、暗くしていた症例4の増加も小さいとは言えず、光の関与は考えにくい。また、光源を入れてchamber内の温度を熱電対を用いて計測したが(Chino EB-2P00を使用)、60分以内の温度の上昇はまったく認められなかったので、温度の影響もないと思われる。

ハムスター精子では卵管内側に精子が接触すると直進性が増す³⁾、また牛の精子ではガラス毛细管内の管壁により近いところの精子の直進速度が増すと報告がある⁴⁾。また、家兎の精子でも同様の報告があり⁵⁾、ヒト精子にも卵管内膜やガラス壁のようなsolid surfaceに精子が接触することで変化する運動因子があるのかも知れない。今回測定した精子速度、精子直進性・精子頭部の振幅および振動数については変動がないが、solid surfaceに挟まれているcounting chamberの10μmの間隙が精子の運動性に影響を及ぼし、運動精子が集まるのではないかとと思われる。

3) 検体量による精子濃度の変動

精子濃度の経時的増加は5μlでは認められず、それ以上では量に依存して増加する。10μlの場合、5分値はCSのバラツキを考えると増加しているとは言えないが、10分以後では増加(+24~+333%)する。20μlでは5分後でも2例が増加している。運動率についても同様で、これらのことより、M. chamber

を使用したCSによる分析で安定した結果を得るためには、検体量を5μl以下にすることが絶対必要と思われた。それが無理であれば検体をM. chamberに滴下後少なくとも3分以内に分析を終了しなければならない。

文 献

- 1) Makler, A.: A new chamber for rapid sperm count and motility estimation, *Fertil. Steril.* 30: 313, 1978
- 2) Makler, A.: The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation, *Fertil. Steril.* 33: 337, 1980
- 3) Katz, D. F. and Yanagimachi, R.: Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct, *Biol. Reprod.* 22: 759, 1980
- 4) Katz, D. F., Bloom, T. D. and BonDurant, R. H.: Movement of bull spermatozoa in cervical mucus, *Biol. Reprod.* 25: 931, 1981
- 5) Suarez, S. S., Katz, D. F. and Overstreet, J. W.: Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization, *Biol. Reprod.* 29: 1277, 1983

The method of semen analysis (Semen auto analyzer and characteristics of makler counting chamber)

Kaoru Yanagida, Kazuhiko Hoshi,
Susumu Tsukikawa, Hiroko Sasaki,
Chikara Endo and Akira Sato

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College,
Fukushima 960-12, Japan
(Director: Prof. A. Sato)

CellSoft series 3000 (CS), a semen auto analyzer, with which objective assessment is possible, uses Makler counting chamber (M. chamber), and we have observed that the number of sperm on the monitor image increased remarkably in several minutes during analysis of sample. We have made assessment in this study of the reliability of CS and change with time in analytical value when M. chamber is used.

1) The sperm concentration and its motility measured by CS correlated well with the values determined manual counting. Variance was large when sperm concentration is less than $20 \times 10^6/\text{ml}$

and motility less than 30%, but it was considered that CS is fully reliable with the values above these.

2)The sperm concentration and motility measured by M. chamber increases with time under the condition that sample is set as it is, showing increases of +19~+169% in sperm concentration and -12~+61% in motility even in as early stage as 3~5 minutes, for which analysis within 3

minutes is required.

3)If the amount of sample dripped is $5\mu\text{l}$, no increase with time in analytical value occurs, but increase occurs in amounts more than that, for which it is necessary that the amount is kept less than $5\mu\text{l}$ for reliable analysis.

(受付: 1988年11月24日)

“Swim-up”法による AIH 妊娠の 2 症例

Two Cases of Pregnancy by AIH Using the Sperm Collected by the “Swim-up” Method

天神クリニック産婦人科

天 児 都

Kuni AMAKO

Dept. of Gynecology

Tenjin Clinic, Fukuoka 810, Japan

AIH のための良好精子を得るために静置法を行った。

その方法は精液を 30 分静置し液化射精精液とし、3 ml ディスポシリンジにハム F10 1.5ml をとり液化精液 0.5 ml を静かに吸引し、37°C 恒温器内に 15°位の傾斜角に 1 時間保存し、精液相より培養液相へ運動良好精子を Swim up させた。シリンジを垂直にして精液相をピストンにより排出し、運動良好精子を子宮腔内に注入した。

この“Swim-up”法による AIH で原精子の運動率 48% で異常率 40% と運動率 47% で異常率 25% の 2 症例に妊娠が成立した。

この方法は精子に機械的損傷を与えず簡単に行える。又精漿を除去するために行っていた過度の洗浄が避けられる。

今迄に用いられて来た他の方法よりもより簡単に安全に外来診療に用いられると思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 902—907, 1989)

緒 言

近年、精液状態不良による男性不妊の症例に多く接するようになり、その妊孕性を高めるため各種の工夫がなされている。

一方、IVF・ET の技術の精子・精漿分離法の改良応用が種々試みられているが、“Swim-up”法は精子を傷つけずに簡単な操作で行えるので一般臨床に用いやすい方法である。

今回“Swim-up”法を行い運動良好精子を回収して AIH を行った結果、原精液の量が少量で、運動率が低く、形態異常率の高い症例に妊娠成立をみた 2 症例を経験したので報告する。

加えて AIH 施行日を決めるための卵胞最大径測定と尿中 E₂測定との効率的な方法を検討した。

方 法

方法は、久保ら¹⁾の洗浄精子による人工授精を参考にした。

私共が行った方法は (図 1)

1. 精液を 30 分静置し液化射精精液とする
2. ディスポシリンジ (3 ml) にハム F10 1.5ml を吸引し液化精液 0.5 ml を静かに吸引。
3. 37°C 恒温器内に 15°位の傾斜角に 1 時間保存し精液相より培養液相に運動良好精子を Swim up させる。
4. シリンジを垂直に保持し精液相をピストンにより圧出する。
5. AIH は人工授精針が内子宮口をこえた点まで挿入し 2 分かけて注入する。
ハム F10 (表 1) は 500 ml の冷凍のものを 2 日か

け冷蔵庫内で解凍し 10 ml ずつ滅菌試験管に分注して冷凍保存し、解凍して使用した。

結 果

症例 1 26 歳 妊 0 産 0 (図 2)

月経歴：初経 12 歳 31 日型より 2, 3 か月と不順になる 持続 5 日 中等量

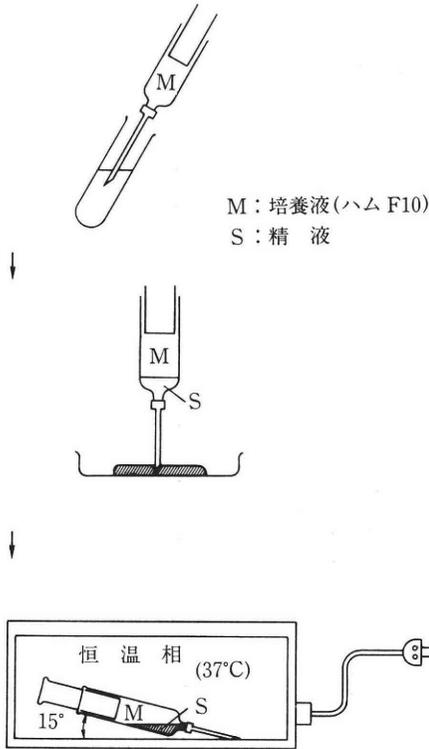


図 1 洗浄精子による人工授精手技

現病歴：結婚 23 歳, 避妊 1 年 2 か月 不妊期間 7 か月目に受診。避妊をといた頃より月経不順となり 2, 3 か月後より高血圧(162-92 mmHg)と肥満(身長 156 cm 体重 80 kg- 2 年間に 17 kg 増)のため内科受診。

経過：昭和 61 年 2 月 28 日初診時血中 FSH 11.1 mIU/ml LH 51.1 mIU/ml PRL 15.0 ng/ml で食餌の指導とクロミッド 50 mg 5 日投与を開始した。Huhner test (土) のため精液検査を行ない乏精子症を認めた。前述の方法で洗浄精子注入を行った結果、3 回目に妊娠に成功した。妊娠に至った周期は 5 日目よりクロミッド 100 mg 5 日服用し、15 日目に頸管粘液 0.2 ml, 索糸性 15 cm, 最大卵胞径 21 mm 尿中 E₂ 40 ng/ml 以上に上昇した体温陥落日に AIH を行った。原精液は、精子濃度 $90 \times 10^6 / \text{mm}^3$, 量 3.3 ml,

表 1 ハム F-10 液の組成

Dextrose	1, 100. 0mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44. 1
CuSO ₄	0. 002
FeSO ₄	0. 46
MgSO ₄ ·7H ₂ O	152. 7
KCl	285. 0
NaCl	7, 400. 0
KH ₂ PO ₄	83. 0
Na ₂ HPO ₄	156. 2
Na Pyruvate	110. 0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0. 03
Lipoic Acid	0. 21
NaHCO ₃	1, 200. 0
Phenol Red, Na	1. 24

表 2 AIH 時の精液所見

症例 1 AIH 時精液所見

日付	濃度	量	異常率	形態	運動率	pH
(1) 61.10.27	$60 \times 10^6 / \text{mm}^3$	2.6ml	55%	小頭・頭肥大	74%	7.6
(2) 61.11.28	$114 \times 10^6 / \text{mm}^3$	2.1ml	20%	小頭・頸部肥大・全体に尾が長い	62%	7.4
(3) 62.2.27*	$90 \times 10^6 / \text{mm}^3$	3.3ml	40%	小頭	48%	7.5

* 妊娠成立周期

症例 2 AIH 時精液所見

日付	濃度	量	異常率	形態	運動率	pH
(1) 61.12.5	$46 \times 10^6 / \text{mm}^3$	3.7ml	11%	小頭	65%	7.4
(2) 62.1.26	$29 \times 10^6 / \text{mm}^3$	4.1ml	23%	双頭・小頭	62%	7.6
(3) 62.2.20	$34 \times 10^6 / \text{mm}^3$	3.7ml	21%	頭部肥大・頸部肥大	85%	7.6
(4) 62.3.25*	$78 \times 10^6 / \text{mm}^3$	4.5ml	25%	頭部肥大・小頭・尖頭	47%	7.5

* 妊娠成立周期

症例 1

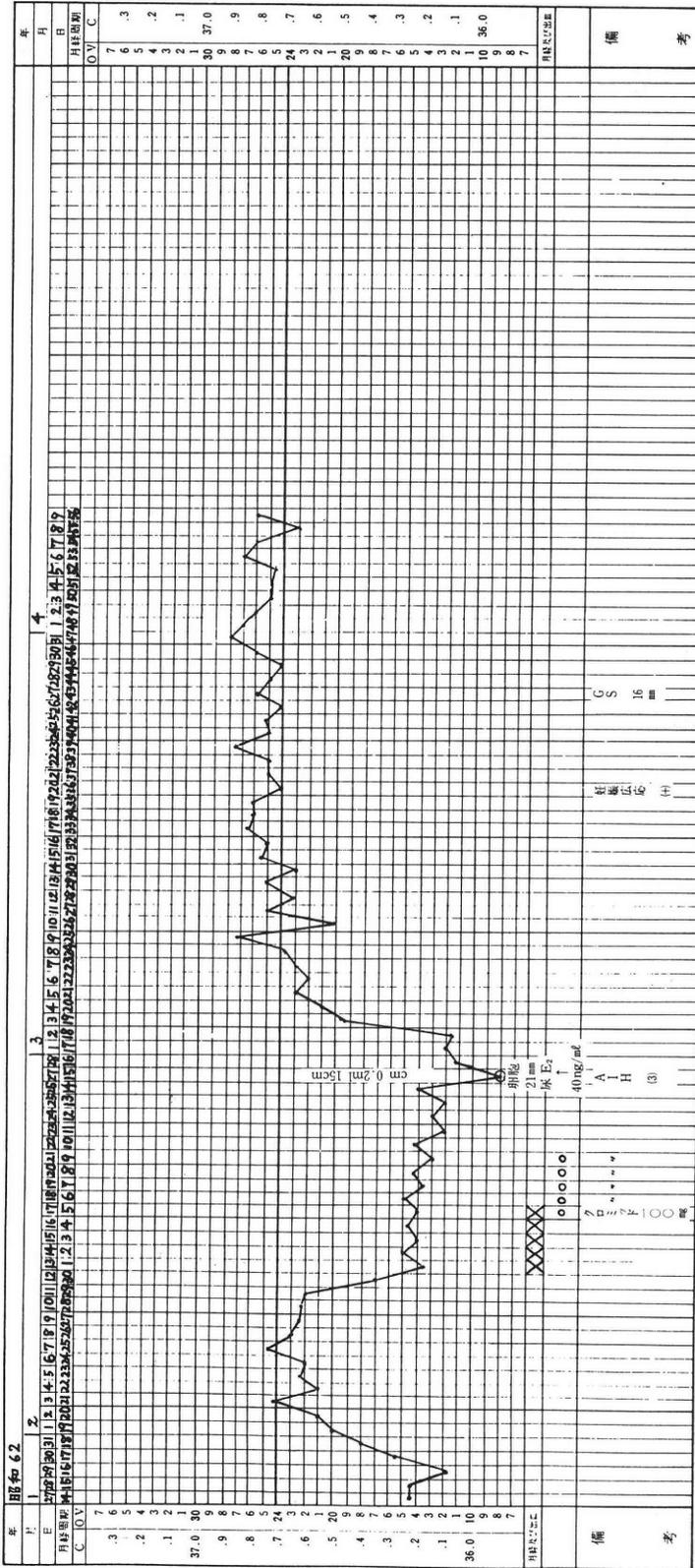


図 2 症例 1 基礎体温表

異常率40%で形態は小頭、運動率は48% pH 7.4であった。(表2 症例1, 2の精液所見)

夫の方はATP 6錠 ノイキノン3錠/日, 4か月間の治療を行っていた。

症例2 24歳 妊0 産0 (図3)

月経歴: 初経12歳 25~29日型 持続6日 中等量

現病歴: 結婚23歳 避妊3か月 不妊期間1年6か月

経過: Huhner test (土) 昭和61年12月より洗浄精子によるAIHをはじめ4回目に妊娠したが、流産に終わった。妊娠成立周期は13日目に頸管粘液1.6 ml, 索糸性15 cm, 卵胞最大径は11 mmで排卵直後と思われた。尿中E₂40 ng/ml以上に上昇した体温陥落日にAIHを行っている。原精液は、精子濃度79×10⁶/mm³, 量4.5 ml, 異常率25%で形態は頭部肥大, 小頭・尖頭, 運動率47%, pH 7.5であった。夫の方はATP 6錠ノイキノン3錠/日, 2か月間の治療を行った。

排卵日を知るために超音波断層法による卵胞径の測定と尿中ホルモン測定²⁾と頸管粘液測定を行い総合的に判定している。当院では他科と機械を併用しているため膀胱充滿状態で患者を来院させ卵胞径の測定を腹壁よりの超音波で行っている。超音波計測後に尿中ホルモン測定を行うと尿比重が1.010以下に低下するので正確な計測値を得られない。そこで来院時(10時尿)のかわりに早朝尿の使用が可能かどうかを検討した。

尿中E₂の早朝尿と10時尿の比較(表3)

早朝尿と10時尿を比べると24例で16/24=66.7%が同値, 4/24=16.7%が上昇, 4/24=16.7%が下

表3 尿中E₂の早朝尿と10時尿の比較

	早朝尿	10時尿	例数	割合
低下	10	<10ng/ml	1	4/24=16.7%
	20	<10	1	
	30	<30	1	
	60	30	1	
同値	<10	<10	6	16/24=66.7%
	10	10	1	
	20	20	5	
	40	40	2	
	60	60	2	
上昇	<10	10	1	4/24=16.7%
	20	40	2	
	30	60	1	

降を示した。最適は10時尿の測定であるが早朝尿の測定でもE₂の増加を知り得るのでこれを用いることとした。なお尿中E₂測定には特田製薬のハイエストロテックスライトの10・20・40 ng/ml, 30・60・120 ng/mlの三濃度測定を使用した。

考 察

AIHを原精液によって行くと、感染や処置後子宮痛などを起す恐れがあり、精漿は受精阻害物質を含んでいると報告されている。遠流法では精子を傷めたり、性比が片寄ったりするので、これを行わぬ精子回収法が今注目されている。IVF・ETの技術の発達により精子の回収方法に様々な改良が試みられて来た。今回はLayering法を改良して久保ら¹⁾が報告された方法を参考に行った。私共の方法では混合ガスと5%自己血清は使用せず精液層より培養液相に運動良好精子をSwim upさせた。静置法の一つでMigration Gravity Sedimentation Methodを使用した運動精子回収法を辰己ら³⁾が行っているが、これには特殊な回収器を要する。これに比較してSwim up法は一般臨床で使える簡単で、効果の高い方法に少し近づいた方法と思える。

精液静置法“Layering method”による良好精子の分離に星ら⁴⁾はTyrodes液を用いた4症例の所見で精子濃度は精液中に比べ1/10ぐらいに減少し運動率はほとんどが90%以上を示し、形態学的に正常精子も90%前後と運動率・正常性とも上昇している。久保ら¹⁾は20例の所見で平均運動率56±20%が74±15%に上昇し4症例(20.0%)の妊娠例を報告している。私共が行ったHam F10による4症例の追試ではSwim up後の精子濃度は原精液の0.5~0.1倍で、運動率50%以下では運動率は2.0~1.5倍に増加した。

洗浄精子AIHの成功例をみると二例共基礎体温陥落日に当り、尿中E₂が40 ng/ml以上と最も妊娠率の高い日に当たっていて、この日に合わせてAIHを行うことが大切であることを改めて知らされた。原精子運動率が48%, 47%という50%以下であり、異常率が40%, 25%と高いので健常精子濃度は差引いて考えなければならない。異常率の高いものにウレアプラブマ症がみられるという報告⁵⁾でエリスロマイシン1200 mg 7日投与で著変はみられなかったが14日間服用後異常率55%から9%に減少しその後徐々に上昇している間に妊娠に至った一症例を経験している。

AIH症例の原精子の状態は症例1では4回の計測で精子濃度41~114×10⁶/mm³, 精液量2.1~3.5

ml, 異常率 20~55%, 運動率 31~74%, pH 7.4~7.6 症例 2 では 6 回の計測で精子濃度 $24\sim 80\times 10^6/\text{mm}^3$, 精液量 2.9~5.0 ml, 異常率 11~35%, 運動率 45~85%, pH 7.4~8.4, ぐらゐの変動があるので, 精液が可能な限り良い状態にあり, AIH の時期が適切な時期に当り, 女性側の条件が整っている時に妊娠に結びついて行くことをこれらの症例は示した.

結 語

洗浄精子による AIH により原精子運動率 48%, 異常率 40% と運動率 47%, 異常率 25% の二例の妊娠成立を報告し, "Swim-up" 法は簡単な方法で一般臨床で行えることを報告した.

この稿をまとめるに当り宮崎県立宮崎病院産婦人科立山浩道先生の御校閲を頂きました. 心より感謝いたします.

文 献

- 1) 久保春海・安部裕司・林鴻程・片山進・島田美津江: 改良精液静置法による人工授精 (AIH) の成績について, 日不妊会誌, 31: 3, 1986
- 2) 水野正彦ら: TZR-311 (ハイモニター E) による臨床試験成績, 産婦人科の世界, 39: 6, 1987
- 3) 辰己賢一・野田洋一・松本央・馬岡陽・矢野樹理・福田愛作・江見信之・高井一郎・泰井俊造・神崎秀陽・森崇英: Migration-Gravity Sedimentation Method を利用した運動精子回収法, 及び同法の AIH への応用, 日不妊会誌, 33: 3, 1988
- 4) 星和彦・長池文康・桃野耕太郎・京野広一・村木章・斉藤晃・鈴木雅洲・林恵子・柳町隆造: われわれの行っている精液静置法 "layering method" による精液中からの良好精子の分離, 日不妊会誌,

28: 1, 1983

5) 河村信夫: STD について, 日母医報 36: 12, 1984

Two cases of pregnancy by AIH using the sperm collected by the "Swim-up" method

Kuni Amako

Dept. of Gynecology
Tenjin Clinic, Fukuoka 810, Japan

A semen sample was obtained from a husband on the day of the patient's ovulation. After the sample was liquified for thirty minutes, the semen layer was overlaid with Ham's F 10 medium, incubated at 37°C for one hour, and the syringe was inclined at an angle of 15°. The seminal plasma was discharged from the syringe. Then, the motile sperm suspension was inseminated into the uterine cavity.

It has been found that, in the two cases of pregnancy by AIH using the sperm collected by the "Swim-up" method, the sperm have the motility rates of 47% and 48% with the abnormality rate of formation at 25% and 40%.

This method has been found to be easy to use and causes no mechanical damage to spermatogoa. In addition, the method has also been found to avoid the excessive washing procedures that have previously been necessary to remove seminal plasma.

I propose that this method be used to treat outpatients because it's simpler and safer than any other method known or used so far.

(受付: 1988 年 12 月 27 日)

精細管内 Androgen 濃度の研究 第三報

Study of Intratubular Androgen Levels Report 3

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

入江 伸 大橋 輝久 永井 敦
Shin IRIE Teruhisa OHASHI Atsushi NAGAI
山下 良孝 大枝 忠史 小浜 吉照
Yoshitaka YAMASHITA Tadashi OHEDA Yoshiteru KOHAMA
大橋 洋三 大森 弘之
Yozo OHASHI Hiroyuki OHMORI

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

精細管内における androgen の役割を解明するため、精索静脈瘤患者 14 例を testosterone (T) 投与群 (手術 3 日前に testosterone enanthate 250 mg 筋注)、human chorionic gonadotropin (hCG) 投与群 (手術前 3 日間 human chorionic gonadotropin 4000 IU 筋注)、control (C) 群 (術前投与なし) に分類し、その投与後における精巣内、精細管内 androgen 濃度および血中ホルモン値を検討した。

また、不妊症以外の患者より得られた精巣を用い、精細管内 E_2 濃度、精細管内 testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) を測定した。

1. 精巣内 T は、T 群が他の 2 群に比し、また、精巣内 DHT は、T 群が hCG 群に比し有意に低値であった。
2. 精細管内 T は、hCG 群が他の 2 群に比し、また、精細管内 DHT は、hCG 群が T 群に比し有意に高値であった。
3. 精細管内 TeBG は、精細管内 androgen level が低値の状態でも 3.1~36.5 fmol/mg. protein 認められた。
4. 精細管内 E_2 は、0.83~1.92ng/g. t. w. 認められたが、精巣内、精細管内 androgen 濃度との関連性は認められなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 908—913, 1989)

緒 言

精巣における spermatogenesis およびその maturation については、lutening hormone (LH) を介しての testosterone および follicle stimulating hor-

mone (FSH) などのホルモンにより調節されることが知られている¹⁾。その機序については解明されているものではないが、精巣内 testosterone が外因性 testosterone により低下した状態では spermatogenesis が障害されることより、spermatogenesis の維持には

精巣内 testosterone が高濃度であることを強調した報告もみられる²⁾。

われわれは、精細管内 androgen 濃度の検討：第1報³⁾、第2報⁴⁾において、精細管内 testosterone, 5 α -dihydrotestosterone (DHT) の測定方法の確立、臨床例での測定結果、LH-RH analogue 投与の影響、および androgen binding protein (ABP) について言及した。第1報³⁾、第2報⁴⁾で述べた精細管内 androgen 濃度は、LH-RH analogue 以外、なんら負荷を行っていない状態での結果である。今回は、精巣内、精細管内 androgen 濃度に影響を与えらるる human chorionic gonadotropin (hCG), testosterone を体外投与し、その投与後における精巣内、精細管内 testosterone, DHT 濃度および血中 testosterone, lutenizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) 濃度の変化を検討した。また、不妊症以外の患者より得られた精巣を用いて、精細管内 estradiol (E₂), 精細管内 TeBG を測定したのでその結果もあわせて報告する。

対象ならびに方法

1. 精索静脈瘤患者に対する hCG, testosterone 投与
当教室において精索静脈瘤根治術を行った左精索静脈瘤患者 14 例を対象とした。hCG 投与群は、手術3日前より hCG 4000 単位を連日筋注し、手術当日 LH, FSH, testosterone の採血を行った。testosterone 投与群は、手術3日前に testosterone (Enarmon depot. 250mg)筋注を行い、control 群は、無処置で、手術当日に同様の採血を行った。hCG 群 4 例、testosterone 群 5 例、control 群 5 例であり、3 群とも内精静脈高位結紮術の後、両側精巣生検を施行した。

精巣生検により得られた組織を一部はプアン液に

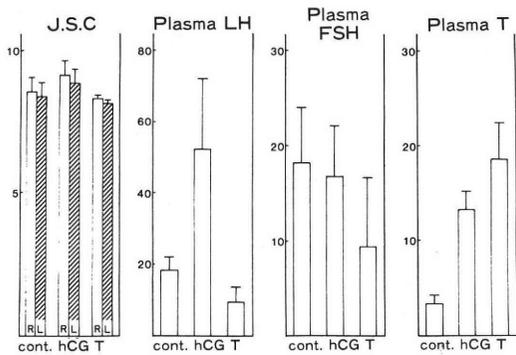


Fig. 1 Effect of hCG or testosterone administration on J. S. C., plasma LH, FSH, and plasma T levels
T: testosterone

て固定し mean germinal epithelial count of Johnsen (JSC)⁵⁾を測定し、残りの組織を、精巣内、精細管内 testosterone, DHT 濃度の測定に供した。精細管分離法およびその androgen 濃度測定法については、第1報³⁾にて詳述したので省略する。

2. 精細管内 TeBG 測定

前立腺癌患者 13 例の除精巣術より得られた精巣を用いて精細管内 TeBG の測定を行った。測定に関しては、Farmos Diagnostica 社製 hTeBG immunoradiometric assay (IRMA) キットを用いて TeBG を測定した。すなわち、約 30~50 mg の精細管組織に蒸留水を加え 1000 μ l として sonication を行い、その内それぞれ 100 μ l を duplicate で kit に示す方法に従い測定した⁶⁾。また、sonication を行ったうちの 200 μ l を 10 倍希釈し Lowry 法により蛋白濃度測定を行った⁷⁾。

3. 精細管内 E₂ 濃度測定

停留精巣患者 3 例、前立腺癌患者 2 例の除精巣術より得られた精巣を用いて精細管分離を行い、chromatography 不要の radioimmunoassay にて測定を行った⁸⁾。

成 績

1. 精索静脈瘤患者に対する hCG, testosterone 投与

各群の JSC, 血中 LH, FSH, testosterone 値を Fig. 1 に、精巣内、精細管内 testosterone, DHT 濃度を Fig. 2 に示す。

JSC では hCG 群の左側が、hCG 群の右側および testosterone 群の両側に比し 5% 以下の危険率で低値であった。しかし、いずれの群も、JSC は平均値が 8.4~8.9 のあいだにあり、今回の測定に用いられ

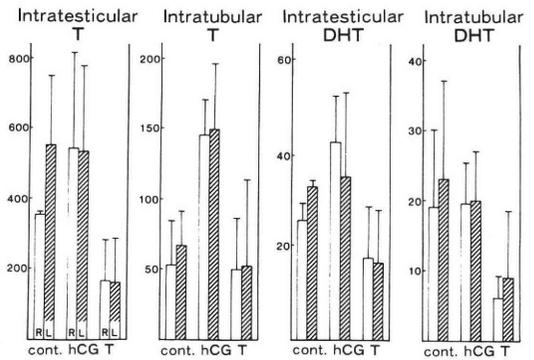


Fig. 2 Effect of hCG or testosterone administration on intratesticular and intratubular androgen levels
T: testosterone

たそれぞれの精巣のあいだの精子形成能については、差はないものと考えられた。

血中 LH については、hCG 群が mean ± S. D. 52.2 ± 22.5 mIU/ml と control 群の 18.3 ± 3.9 および testosterone 群の 9.2 ± 4.5 に比して 5% 以下の危険率で高値をとり、また control 群も testosterone 群に比して 5% 以下の危険率で高値であった。

血中 FSH については 3 群間で有意差は認められなかった。

血中 testosterone は testosterone 群が hCG 群、control 群に比し、おのおの 1% 以下、0.1% 以下の危険率で高値を示した。また hCG 群が control 群に比し、0.5% 以下の危険率で有意に高値を示した。

また、精巣内 testosterone は、左右とも testosterone 群が control 群、hCG 群に比し 5% 以下の危険率で、精巣内 DHT では、testosterone 群が hCG 群に比し 5% 以下の危険率で有意に低値であった。

精細管内 testosterone は、hCG 群が 5% 以下の危険率で testosterone 群、control 群に比し有意に高値であった。精細管内 DHT は、hCG 群が testosterone 群に比し 5% 以下の危険率で有意に高値であった。

2. 精細管 TeBG 濃度測定

前立腺癌患者より得られた精巣において TeBG 測定キットを用いて測定した精細管内 TeBG を Fig. 3 に示す。TeBG と精細管内 testosterone、DHT との間には密接な関係はなく、さらに LH-RH analogue 投与例では、精細管内 testosterone、DHT が非常に微量であるにもかかわらず、TeBG は 3.1~36.5 fmol/mg. protein と認められた。

3. 精細管内 E₂ 濃度測定

前立腺癌および停留精巣患者より得られた精巣における JSC、精巣内、精細管内 testosterone、DHT

濃度および精細管内 E₂ 濃度を Fig. 4 に示す。精細管内 E₂ 濃度は、0.83~1.92 ng/g. t. w. と男性の血中 E₂ 濃度の約 30~60 倍高濃度に認められた。しかしながら、精巣内 testosterone、DHT あるいは精細管内 testosterone、DHT 濃度と密接な関連性は認められなかった。

考 察

ラットにおける検討で、精子形成の step VII-VIII は最も androgen が強く作用するといわれ、同じ時期に ABP の分泌も著明になるといわれている⁹⁾。

今回、著者らは、精子形成に重要な働きをなすと考えられる精細管内 androgen、すなわち testosterone および DHT 濃度に対する hCG あるいは外因性 testosterone 投与の影響について検討した。まず hCG 負荷に関しては、Leydig 細胞予備能検査に通常用いる hCG 4000 IU、3 日間連続筋注を行った。その結果、血中 testosterone、精巣内 testosterone とともに精細管内 testosterone の有意な上昇を認めた。このことより、精細管内 testosterone の増加は、Leydig 細胞より分泌される内因性 testosterone の精細管内への移行によることが判明した。hCG の精巣に対する作用は testosterone 分泌刺激以外に、細静脈透過性亢進による間質液の増加および高分子物質の供給により、精子形成に関与するもの¹⁰⁾といわれている。ただ、今回の検討結果からは、精細管 testosterone を増加させるためには、かなり多量の hCG 負荷が必要と考えられた。

逆に、外因性 testosterone 負荷を行うと、当然のことながら血中 testosterone が上昇するが、精巣内 testosterone は有意な減少を示し、外因性 testosterone が精巣内 testosterone に対し抑制的に働くことが判明した。しかし、精細管内 testosterone は低下傾向を示すも、対照群と比較して有意な減少ではなく、testosterone enanthate 250mg の単回投与では、

Case	Side	J.S.C.	T (ng/g.t.w.)	DHT	TeBG (fmol/mg.p.)
1	L	2.0	6.2	0.9	7.6
2 *	R	6.5	0.1	0.2	20.0
	L	6.4	0.1	0.2	23.9
3	R	9.0	19.1	2.8	3.1
	L	9.3	16.3	1.5	N.D.
4 *	R	5.6	0.1	N.D.	36.5
5	R	9.0	116.7	6.6	14.3
6	R	8.9	33.7	2.5	17.7
	L	8.7	176.3	12.6	15.5
7	L	9.1	49.5	11.6	6.5

* LH-RH analogue treatment

Fig. 3 Values of intratubular T, DHT and TeBG levels

T: testosterone

Case	Age	J.S.C.	Intratesticular		Intratubular		E ₂
			T (ng/g.t.w.)	DHT	T (ng/g.t.w.)	DHT	
1	76	7.6	380.5	6.1	84.3	4.4	1.55
2	69	8.1	523.7	23.7	123.1	7.8	1.92
3	36	8.5	662.4	45.3	238.5	19.6	0.83
4	34	8.4	537.5	30.0	124.6	17.5	1.13
5	19	9.6	429.4	29.1	145.0	8.1	1.12

Fig. 4 Values of intratubular T, DHT and intratubular T, DHT and intratubular E₂ levels

T: testosterone

間質より精細管内への testosterone の移行を抑制するには不十分であることが考えられた。さらに、精細管内 testosterone 濃度を維持する機構の存在も推察された。また男子不妊症に対する治療の一つである反跳現象を応用した testosterone 療法¹¹⁾の際に、精子形成を抑えるために 8 回以上の testosterone 投与が必要であることも、今回の結果からよくうかがえる。

一方、精巢内 DHT に関してであるが、hCG 負荷により上昇を、testosterone 負荷により低下を認めることにより、大部分が Leydig 細胞依存性であると考えられる。しかし、精細管内 DHT は hCG 負荷で上昇を認めなかったが、testosterone 負荷で有意な低下を認め、DHT の一部は精細管内で testosterone より convert されるが、その比率はわずかであることが示唆された。これは、穂坂ら¹²⁾の老人精細管を用いた 5 α -reductase の検討と同様な結果である。しかし、前立腺他の androgen 標的臓器では、細胞内で DHT が androgen receptor (AR) と結合して重要な働きをなし、さらに AR と密接な関連性を有する¹³⁾ことより、今後は Sertoli 細胞および精細管内 DHT 濃度の詳細な検討が必要である。

ABP はヒト、サル、ウサギにおいて、血流中の androgen 結合蛋白である TeBG と非常に類似した精細管内蛋白である。それゆえ、ABP と TeBG とは免疫学的に交叉反応を示し¹⁴⁾、共通抗原決定基を有していると考えられる。Waheed ら¹⁵⁾は hTeBG 系の assay で ABP の測定の報告を行っているが、著者らもヒト血清 TeBG IRMA kit を用いて TeBG を測定した。ここで、この測定された TeBG がそのまま ABP としておきかえてよいか否かについては、一番問題となるのは精細管壁に分布する血管内 TeBG の contamination である。このことについては、すでに第 1 報でも述べたごとく、immunohistochemical staining で contamination はみられておらず、精細管内壁における TeBG は wash out されているものと考えられる。さらに ABP と TeBG が免疫学的に交叉反応を示し、共通抗原決定基を有していることから今回測定した TeBG は、精細管内 ABP を測定しているものと考えられた。今回の測定においても第 2 報における DHT-BP と同様、LH-RH analogue 投与により内因性 testosterone、DHT が著明に低下した状態でも ABP は検出可能であった。このことより、ABP は血流中の TeBG と同様、精細管内における androgen の carrier 蛋白であるとともに、その分泌には微量の FSH と androgen が存在すればよいことが推察される。

しかし、雄不妊ラットにおける検討で¹⁶⁾、弱 androgen 作用を有する pregnenolone を投与すると、精巢上体内 ABP 濃度ならびに精子受精能は維持されることより、微量の androgen により維持された ABP が精子の成熟に重要な役割を果たすともいわれている。これは前述した ABP が carrier 蛋白であることとは相反し、精子形成および成熟に androgen と ABP のどちらが主体であるのかは、未だ解決されていないのが現況である。

男性における estrogen の役割については、肝硬変あるいは女性化乳房の患者で血中 estrogen が増加を示すといわれているが^{8,17)}、いまだ判然とはしていない。精巢性 estrogen の主体は E₂ であり、正常人では hCG 連続負荷後 2 日目に peak を示す¹⁸⁾。しかし、hCG 単回投与では、血中 E₂ は dose dependent に上昇し、24 時間目に peak を示すが、一方、血中 testosterone は 2 時間目と 48 時間目におのおの peak を示し、二相性の反応を呈するといわれている¹⁹⁾。また E₂ は Leydig 細胞において 17 α -hydroxylase、C-17, 20-lyase を抑制することにより Leydig 細胞の desensitization をおこすことが報告されている²⁰⁾。

以上のことを考えあわせると、E₂ は精巢内において、Leydig 細胞における testosterone 合成の調節に一役かっていることが推察される。さらに今回の検討では、少数例ではあるが、精細管内にも E₂ が存在し、精子形成あるいは精細管内 testosterone 濃度になんらかの調節を行っていることが推察されるが、血中と同様、testosterone の約 1/50 と微量であり、精細管内 testosterone、DHT 濃度とも密接な関連性は認められなかった。しかし、最近、hCG 単回負荷 24 時間後の E₂/testosterone 比が投与前に比較して、3.5 倍以上を示す不妊症例では治療に反応しがたいとの報告²¹⁾もあり、E₂ 上昇が、精子形成になんらかの抑制をかけていることは否定できず、今後の検討が必要と考える。

稿を終えるにあたり、御協力頂いた岡山大学泌尿器科湯川厚己技官に深謝致します。なお、本論文の要旨は、第 6 回日本アンドロロジー学会において報告した。また、本研究の一部は、文部省科学研究費、昭和 62 年度 (62570726) の援助により行われたものである。

文 献

- 1) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis, published by American Physiological Society, Physiological Reviews, 51: 1, 1971

- 2) Howard, C. M., Neil, H., Mavis, S. R. and Carl, G. H.: Testosterone concentration in testes of normal man; Effects of testosterone propionate administration, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37: 882, 1973
- 3) 入江 伸, 大橋輝久, 大橋洋三, 古川雅人, 永井敦, 山下良孝, 大森弘之: 精細管内 Androgen 濃度の研究 第1報, 日不妊会誌, 33: 236, 1988
- 4) 大橋輝久, 入江 伸, 大橋洋三, 古川雅人, 山下良孝, 永井 敦, 大森弘之: 精細管内 Androgen 濃度の研究 第2報, 日不妊会誌, 33: 651, 1988
- 5) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males, *Hormones*, 1: 2, 1970
- 6) Nicholas, J. B.: Sex hormone binding globulin—a new dimension in the evaluation of disorders of androgen action, *Farmos Diagnostica Newsletters*. 6: 1, 1984
- 7) Lowry, O. H., Roebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951
- 8) 大橋輝久, 齊藤利興, 森岡政明, 赤枝輝明, 光畑直喜, 武田克治, 高本 均, 大森弘之: 男子性腺疾患における内分泌学的検討第3報 血漿 Estradiol 測定の意義について, 西日泌尿, 42, 945, 1980
- 9) 大橋輝久, 大森弘之: 内分泌学の新しい動向 精子形成機構, 日本臨床, 45: 2623, 1987
- 10) Bergh, A., Widmark, A., Rooth, R., Damber, J. and Smedjegard, G.: Leukocytes mediate the hCG-induced in venular permeability in the rat testis. *Molecular and cellular endocrinology of the testis* edited by Stefanini, M., Conti, M., Geremia, R. and Ziparo, E., p. 273, Excerpta Media, Amsterdam, New-York, Oxford, 1986
- 11) 瀧原博史: 特発性男子不妊症に対する testosterone-clomiphene 療法, 日不妊会誌, 25: 101, 1980
- 12) 穂坂正彦, 西村隆一, 高井修道, 原田昌興: ヒト分離精細管内における testosterone の代謝, 日不妊会誌, 28: 143, 1983
- 13) 森岡政明, 大橋洋三, 藤田幸利, 武田克治, 東條俊司, 大橋輝久, 大森弘之: ヒト前立腺組織内 DHT 濃度並びに Cytosol, Crude Nuclear Extract 分画中の DHT 濃度と R 1881 Receptor assay の相関について, 日泌尿会誌, 75: 96, 1984
- 14) Cheng, C. Y., Frick, J., Gunsalus, G. L., Musta, N. A. and Bardin, C. W.: Human testicular androgen-binding protein shares immunodeterminants with serum testosterone-estradiol-binding globulin, *Endocrinology*, 114: 1395, 1984
- 15) Waheed, A., Winters, S. J., Farrow, G. M., Oshima, H. and Troen, P.: Studies of the human testis. X I X Preparation of an antibody to human testosterone-oestradiol-binding globulin and its application to the study of testicular androgen-binding protein, *Acta Endocrinol.* 108: 284-288, 1985
- 16) Ansony, C. T., Danso, B. J., and Orgebin-Crist, M.: Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the hypophysectomized, pregnenolone injected rat, *Endocrinology*, 114: 1419, 1984
- 17) 大橋輝久: 男子における Estrogen の研究 第1報 正常人男子, 除辜術者, 肝, 腎不全患者における血中 Estrogen 動態, 日泌尿会誌, 70: 904, 1979
- 18) 大橋輝久: 男子における Estrogen の研究 第2報 正常人男子および性腺疾患患者における合成 ACTH, hCG 刺激に対する血中 Estrogen 動態, 日泌尿会誌, 70: 915, 1979
- 19) Padron, R. S., Wischusen, J., Hudson, B., Burger, H. G. and Kretser, D. M.: Prolonged biphasic response of plasma testosterone to single intramuscular injections of human chorionic gonadotropin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50: 1100, 1980
- 20) Onoda, M. and Hall, P. F.: Inhibition of testicular microsomal cytochrome p-450 (17 α -hydroxylase/C-17, 20-lyase) by estrogens, *Endocrinology*, 109: 763, 1981
- 21) 熊本悦明: 男女性腺をめぐる最近の進歩, ワークショップの司会の序として, ホと臨 34: 1105, 1986

Study of intratubular androgen levels Report 3

Shin Irie, Teruhisa Ohashi,
Atsushi Nagai, Yoshitaka Yamashita,
Tadashi Oheda, Yoshiteru Kohama,
Yozo Ohashi and Hiroyuki Ohmori

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

In order to elucidate the role of androgen in human spermatogenesis, testicular, tubular androgen levels and plasma hormone levels were investigated in 14 patients with varicocele. Five of 14 patients were administered testosterone (T) enanthate intramuscularly at doses of 250mg 3 days before the operation (T group), another 4 were administered human chorionic gonadotropin (hCG) intramuscularly at doses of 4000 IU daily for 3 days before the operation (hCG group), and the remaining 5, a control (C) group, were given no treatment before the operation. And, we measured tubular

estradiol (E_2) and testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) in the testes obtained by orchiectomy from patients with prostatic carcinoma or undescended testis.

The results were as follows.

1. Intratesticular T level in T group was lower than another 2 groups ($p < 0.05$) and intratesticular DHT level in T group was lower than hCG group ($p < 0.05$).

2. Intratubular T level in hCG group was higher than another 2 groups ($p < 0.05$) and intratubular

DHT level in hCG group was higher than T group ($p < 0.05$).

3. TeBG was exist 3.1-36.5 fmol/mg. protein in the seminiferous tubules although intratesticular and intratubular androgen levels were significantly decreased after administration of LH-RH analogue.

4. The intratubular E_2 level was 0.83-1.92 ng/g. t. w., but there was no significant correlation of that level E_2 with the intratubular or intratesticular androgen levels.

(受付: 1989 年 1 月 30 日)

メンフェゴール製剤（殺精子剤）を塗布した
コンドームがヒト精子の運動性ならびに
生存性に及ぼす効果について

Effects of Menfegol, a Spermicide, Coated
Condom on Sperm Motility and Viability

帝京大学医学部泌尿器科学教室

押尾 茂 友政 宏 雨宮 裕
Shigeru OSHIO Hiroshi TOMOMASA Hiroshi AMEMIYA
矢崎 恒忠 梅田 隆
Tsunetada YAZAKI Takashi UMEDA

Department of Urology,
Teikyo University School of Medicine, Tokyo 173, Japan

東京大学教養学部生物学教室

毛利 秀雄
Hideo MOHRI

Department of Biology, College of Arts and Sciences,
University of Tokyo, Tokyo 153, Japan

エーザイ(株)東京研究所

尾崎 覚 大川 功 田島 鉄弥
Satoru OZAKI Isao OHKAWA Tetsuya TAJIMA

Department of Pharmacology, Tokyo Research Laboratories,
Eisai Co. Ltd., Tokyo 112, Japan

メンフェゴール製剤をコンドームに塗布した新しい殺精子剤付きコンドームについて検討を加えた。メンフェゴールは単独で濃度 0.5 mg/ml 以上で精子運動を完全に停止させると同時に、精子を死滅させ、強い殺精子作用を持つことが確認された。さらにメンフェゴール製剤を塗布したコンドームで採取した精液について検討を加えたところ、精子の運動は完全に停止しており、生存精子も認められなかった。

従って本品は強い殺精子力を有し、避妊効果を増強する新しい避妊法と考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 914—918, 1989)

序 論

現在、人類の人口増加率は上昇しており、出生率

をコントロールすることは人類全体の保健衛生上重要な課題である¹⁾。そこで従来より、世界保健機構 (World Health Organization: WHO) を中心とし

ていろいろな受胎調節法が応用されてきた。女性側では排卵を制御する黄体ホルモン（ビル）の服用や避妊リング（Intra Uterine Device: IUD）、あるいは殺精子作用を持つ界面活性剤の挿入などが行なわれ、男性側ではコンドーム法や精管結紮術などが用いられており、それぞれ有効な受胎調整法と考えられている¹⁾。

しかしながら、近年、後天的免疫不全症候群（Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS）の発見およびその感染が広がるにつれて、精液中には Human Immunodeficiency Virus (HIV) が高濃度に濃縮されており、性交渉が一般人の感染機会としては最も多いのではないかと考えられるようになった²⁾。そこで、避妊法としてのみならず AIDS 予防法としてのコンドーム法が再認識されつつある²⁾。

我が国において開発され、殺精子効果を持つ避妊薬として腔内発泡剤として汎用されている非イオン性界面活性剤 p-menthanylphenyl polyoxyethylene (8, 8) ether (メンフェゴール) は最近 HIV を不活性化作用を有することが発表され³⁾、AIDS 感染予防薬としての可能性が考えられている。

今回、我々はメンフェゴールのヒト精子に及ぼす効果を精子の運動停止および生体染色法を用いた精子生存率判定という二つの観点から再検討を加えると同時に、メンフェゴール製剤を塗布したコンドームを使用し、直後に精子を回収して本製品の殺精子作用について検討を加えた。

方 法

対象：24-33 歳の健康な男性ボランティア、12 名（平均 29 歳、既婚者 7 名、未婚者 5 名）を対象とし、5 日以上の禁欲期間（6~8 日間、平均 6 日間）の後に、4 名はプラスチック容器内に用手法にて精液を採取し、室温にて十分液化させた。これらの精液の精子数、精子奇形率、精子運動率を測定後実験に供した。精液をメンフェゴールの最終濃度 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml となるように 1 : 1 で被検液に加え、その直後の精子運動率および精子生存率

を測定した。また、8 名は実際にコンドームを装着したまま用手法にて精液を採取し、その直後の試料について精子運動率および精子生存率を測定した。さらに実験に供した精液の精液量、精子奇形率の測定を行なった。

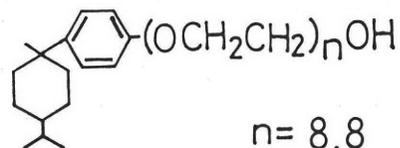
精子運動性の測定：射精精液または被検体をマイクロウォームプレート（北里サプライ社製、DC-MP10DM）にて 37°C に保温したマクラーチャンバー（Sefi-Medical Inc., Israel）内に入れ位相差顕微鏡下にビデオテープに録画し、精子運動数および精子運動率を測定した。なお、精子運動率は以下の式に従って、200 以上の精子を数えて算出した。精子運動率 = 総運動精子数（直進及び非直進運動精子数）÷ 総精子数 × 100。

精子奇形率測定：精液をスライドガラス上にとり、位相差顕微鏡にて WHO の分類⁴⁾に従って、判定した。

精子の生体染色法：スライドガラス上に 0.25 % エオジン-生理食塩水に被検体を 1 : 1 となるように混和し、顕微鏡下に 100 以上の精子を測定し、精子の生存、非生存を判定した⁵⁾。本法において生存精子は無染色であり、非生存精子は紅赤色またはピンク色を呈する。

試薬：使用した界面活性剤メンフェゴールの構造式を図 1 に示した。精子に及ぼす影響を検討する際には、メンフェゴールを 20mM-HEPES-NaHCO₃, pH 7.4 で緩衝化した生理食塩水にて希釈した。また、メンフェゴール製剤を塗布したコンドーム（以下、

Menfegol



n = 8.8

Mol. wt. 620

図 1 メンフェゴールの構造

表 1 メンフェゴールの殺精子作用の検討に用いた精液の一般性状

	精液量 (ml)	精子数 (×10 ⁶ /ml)	運動率 (%)	生存率 (%)	奇形率 (%)
A	3.6	152.5	94.0	82.3	24.0
B	4.0	42.1	88.0	96.5	18.1
C	4.2	126.5	93.5	96.0	17.1
D	2.6	29.3	62.5	88.8	33.8
mean ± SD	3.6 ± 0.7	87.6 ± 61.1	84.5 ± 14.9	90.9 ± 6.7	23.3 ± 7.7

表2 メンフェゴールの精子運動率に及ぼす効果

		メンフェゴール濃度 (mg/ml)						
		0	0.25	0.5	1	2	4	8
精子運動率 (%)	A	85.0	4.0	0	0	0	0	0
	B	85.5	0	0	0	0	0	0
	C	94.5	10.5	0	0	0	0	0
	D	66.0	0	0	0	0	0	0
mean±SD		82.8±12.0	3.6±5.0	0	0	0	0	0

表3 メンフェゴールの精子生存率に及ぼす効果

		メンフェゴール濃度 (mg/ml)						
		0	0.25	0.5	1	2	4	8
精子生存率 (%)	A	78.9	4.4	0	0	0	0	0
	B	98.6	0	0	0	0	0	0
	C	85.7	5.1	0	0	0	0	0
	D	81.7	0	0	0	0	0	0
mean±SD		86.2±8.7	2.4±2.8	0	0	0	0	0

表4 メンフェゴール塗布コンドームの殺精子力

	メンフェゴール	プラセボ
精子量 (ml)	2.0	2.5
	4.4	1.6
	2.8	2.5
	2.6	3.8
mean±SD	2.95±1.02	2.60±0.91
精子数 (×10 ⁶ /ml)	59.2	112.4
	36.2	65.7
	71.4	45.0
	69.2	48.4
mean±SD	59.0±16.1	67.9±31.0
運動率 (%)	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
mean	0	0
生存率 (%)	0	49.6
	0	97.5
	0	88.8
	0	78.2
mean±SD	0	78.5±20.8

メンフェゴール塗布コンドーム)には1個当たり20mgのメンフェゴールが含まれ、基剤としてはポリエチレングリコール等を含んでいる。また、プラセボにはメンフェゴールのみを除いたものを用いた。

結 果

メンフェゴールの殺精子力

用手法にて採取した精子を室温にて液化後、一般精液性状を測定した(表1)。被験者の精液性状は、精液量3.6 ml, 精子数 87.6×10^6 /ml, 精子運動率84.5%, 精子生存率90.9% (各平均値)であった。次に、メンフェゴールと精液を混合し、直後に精子運動率、精子生存率について検討を加えた。精子運動率はメンフェゴール濃度0.25 mg/mlで顕著な抑制を受け(平均3.6%)これ以上の濃度では完全に運動が停止した(表2)。また、精子生存率も同様にメンフェゴール濃度0.25 mg/mlで著明に低下し(平均2.4%)、これ以上の濃度では生存精子は認められなかった(表3)。このようにメンフェゴールは0.5 mg/ml以上の濃度で精子の運動を完全に停止させると同時に精子を死滅させた。

メンフェゴール塗布コンドームの殺精子力

メンフェゴール塗布コンドーム内およびプラセボ塗布コンドーム内に射精された精液各4検体について、精液量、精子数、精子運動率を測定した(表4)。精液量、精子数ともに両グループ間に有意差はなかった。精子生存率はメンフェゴール群ではすべてゼロであり、運動精子も全く認められなかった。一方、

プラセボ群では精子運動率は認められなかったものの精子生存率は平均 78.5% であった。そこでプラセボについて精子に対する影響を検討すると、精子の運動は停止したが、精子生存率には殆ど影響を与えなかった。プラセボに用いられている薬剤を検討してみると、高浸透圧になっている可能性が考えられたので、その浸透圧を測定した。その結果、プラセボにおいて 600 mOsm/kg 以上あることが確認された。また、プラセボと混合して一度運動を停止させた精子を生理食塩水にて希釈すると精子運動性が回復することも認められた。以上の結果より、今回プラセボで認められた精子運動抑制効果は主としてその高浸透圧によるものと考えられた。

考 案

界面活性剤による殺精子避妊薬に関する研究は 1930 年代に始まり、ヒトを始め各種動物精子に及ぼす影響が報告されている⁶⁾。本研究において用いたメンフェゴールは、我が国においてテレピン油より見出された非イオン型界面活性剤であり、殺精子作用による避妊薬として開発された。本薬物は従来より避妊用腔内発泡錠として汎用されており、国内はもとより⁷⁾海外においてもその有効性は高く評価されている^{8,9)}。現在、国際的に殺精子剤として用いられている界面活性剤にはメンフェゴールの他に、同じく陰イオン性界面活性剤である Polyethylene nonylphenyl ether (nonoxyl 9) が知られている。この界面活性剤について、スポンジ状、フィルム状などの剤形が使用されており、一部は我が国でも市販されている¹⁰⁾。メンフェゴールと nonoxyl 9 を比較すると、その殺精子効果は同等であり、Döderlein 桿菌に対する作用が前者では認められなかったのに対して、後者はやや抑制効果を認めたという¹¹⁾。なお、メンフェゴールと nonoxynol 9 との臨床上的同等性も確かめられている⁹⁾。

メンフェゴールの精子に対する作用機序としては、低濃度では精子先体の崩壊を引き起こし¹²⁾、さらに高濃度では細胞膜の脂質 2 重層に直接作用してその構造を破壊することが示されている¹³⁾。本薬剤のヒト精子に対する作用について古くから報告があるが¹¹⁾、精子の運動停止を指標としたもののみであった。今回の研究において我々は、精子の生存性の立場からも検討を加え、メンフェゴールが精子運動の停止と同時に精子を完全に死滅させていることを認めた。

従来より避妊のみならず Sexually Transmitted Disease (STD) 予防の観点からもコンドームの使用が勧められきた¹⁴⁾。近年、AIDS の広がりにより、各

種治療薬の開発が急がれているが、それはまだ端緒についたばかりである。AIDS が一般の人に感染する可能性が最も高いのは性交渉時であり、感染の危険を伴う交渉を持たないことが第 1 であるが、そればかりでは感染を防ぐことにはならない。より積極的な方法としてコンドームの使用が勧められている²⁾。しかしながら、コンドームには製品に不良品の混入していることも報告されており¹⁵⁾、単独使用では危険が伴う。そこで考えられるのがコンドームにさらに抗 HIV 作用のある薬剤を塗布する方法である。最近、宮本らはメンフェゴールと HIV を混合しその後のウィルス活性を測定すると、0.25 mM 以上ではほぼ完全に HIV 活性を不活化させる事を報告した³⁾。この濃度は 0.0155 mg/ml に相当し、今回殺精子効果の認められた濃度 (0.5 mg/ml) の約 1/32 の低濃度であり、メンフェゴールの殺精子効果を持つ濃度でほぼ完全に HIV を不活性化できることになる。

市販されているコンドームには今回のプラセボと同様な処方ゼリーが塗布されていると考えられる。しかし、今回のプラセボでの実験のごとく、プラセボ (ゼリー) にさらされると精子は運動を停止するものの細胞としては生存しており、希釈することにより運動を再開することが認められた。このことは、コンドームが腔内で離脱した場合には避妊効果が低下する可能性を示唆しており、本薬剤のように殺精子剤を予め塗布しておくことは避妊の観点からも重要であると考えられる。

以上の結果より、メンフェゴール塗布コンドームはメンフェゴールによる強い殺精子力を付加した新しい避妊法と考えられる。

文 献

- 1) World Health Organization: Research in Human Reproduction, Biennial Report 1986-1987.; WHO 編, Geneva 1988
- 2) Koop, C. E.: Surgeon general's report on acquired immunodeficiency syndrome, JAMA 256: 2784, 1986
- 3) 宮本 勉, 杉山秀徳, 五十嵐久永: Menfegol による HIV-1 の不活化, 第 36 回日本ウイルス学会総会講演要旨集, P 121, 1988
- 4) World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, WHO 編, P 11, Cambridge University Press, London, 1987
- 5) Eliasson, R.: Supravital staining of human spermatozoa, Fertil. Steril. 28: 1257, 1977
- 6) Berberian, D. A., Gorman, W. G., Drobeck, H.

- P., Coulston, F., Slighter, Jr. R. G.: The toxicology and biological properties of Laureth 9 (a polyoxyethylene lauryl ether), a new spermicidal agent, *Toxicol, Applied Pharm.* 7: 206, 1965
- 7) Ishihama, A., Inoue, T.: Clinical field test of a new contraceptive vaginal foam tablet, *Contraception* 6: 401, 1972
- 8) Begum, S. F., Liao, W. C., McCann, M. F. and Ahmad, N.: A clinical trial of neo sampoon vaginal contraceptive tablets. *Contraception* 22: 573, 1980
- 9) Borko, E., McIntyre, S. L. and Feldblum, P. J.: A comparative clinical trial of the contraceptive sponge and neo sampoon tablets, *Obstet. Gynecol.* 65: 511, 1985
- 10) 飯塚理八ら: Polyoxyethylene nonylphenyl ether を殺精子剤とした Film 状避妊薬の使用経験, *日本不妊誌* 25: 164, 1980
- 11) 岩原繁雄, 石関忠一, 古瀬一麿: 殺精子剤としての界面活性剤の研究, *日本公衛誌* 12: 1, 1970
- 12) 古瀬一麿: テレピン油から誘導した p-メンタニルフェノールのエチレンオキサイド付加化合物の殺精子作用に関する研究, *静岡薬科大学学位論文*, P 126, 1984
- 13) Sunamoto, J., Iwamoto, K., Uesugi, T., Kojima, K., and Furuse, K.: Liposomal membrane XIX: interaction between spermicidal agents and liposomes reconstituted with boar spermatozoa lipids. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 2891, 1984
- 14) Barlow, D.: The condom and gonorrhoea, *Lancet* 2: 811, 1977
- 15) Consumer Council of Hong Kong: Comparative test results on condoms, *Consumer Council News* 142: 8, 1988

**Effects of menfegol, a spermicide,
coated condom on sperm
motility and viability**

Shigeru Oshio, Hiroshi Tomomasa,
Hiroshi Amemiya, Tsunetada Yazaki,
Takashi Umeda

Department of Urology,
Teikyo University School of Medicine,
Tokyo 173, Japan

Hideo Mohri

Department of Biology,
College of Arts and Sciences,
University of Tokyo, Tokyo 153, Japan

Satoru Ozaki, Isao Ohkawa
and Tetsuya Tajima

Department of Pharmacology,
Tokyo Research Laboratories,
Eisai Co. Ltd., Tokyo 112, Japan

The effects of menfegol-coated condom on sperm motility and viability were investigated. At 0.5 mg/ml and higher concentrations, menfegol, a spermicidal agent, was found not only to suppress sperm motility but also to kill the sperm completely, indicating that it has strong spermicidal potency. Normal semen samples were ejaculated directly into Menfegol-coated or uncoated condoms. The sperm motility and viability were examined immediately after ejaculation. In the menfegol-coated condom, sperm motility was completely suppressed and no viable sperm were observed, whereas in the uncoated condom, most of sperm were still alive, although their motility was virtually or completely suppressed. These results indicate that the menfegol-coated condom provides a new birth control method which enhances contraceptive efficacy with added spermicidal activity.

(受付: 1989 年 3 月 30 日特掲)

男子不妊症の Methylcobalamin による 治療成績について

Treatment by Methylcobalamin for Male Sterility

獨協医科大学泌尿器科

田畑行義 荒井哲也 金子克美
Yukiyoshi TABATA Tetsuya ARAI Katsumi KANEKO
鈴木徹 高崎悦司
Toru SUZUKI Etsuji TAKASAKI

Department of Urology,
Dokkyo University School of Medicine, Tochigi 321-02, Japan

男子不妊症に対し Methylcobalamin による治療を行ったので報告する。対象は 22 例で、初診時精液所見のうち精子濃度でこの 22 例を A～F 群に分類し、更にこの 22 例を Methylcobalamin 投与量で I 群 (1500 μ g/day), II 群 (3000 μ g/day) に分類した。結果は、寺田らの治療効果判定基準に従うと I 群において精子濃度で 11.1%, 精子運動率で 22.2% の有効率を示した。また、II 群では精子濃度 46.2%, 精子運動率 30.8% の有効率を得た。更に、初診時精子濃度の高い群に有効症例が多く認められた。なお、観察期間中妊娠成立例はみられなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 919—921, 1989)

緒言

Vitamin B₁₂ の 4 種の誘導体のなかで Methylcobalamin (以下 CH₃-B₁₂ と略す) は最も生体内活性が高く、メチル基転移反応を介して DNA, RNA 代謝に関与することが知られており、この知見から造精機能賦活作用を有する可能性が示唆される^{1,2)}。

今回われわれは男子不妊症に対し CH₃-B₁₂ による治療を行ったので報告する。

対象及び方法

対象は 22 例、平均年齢 29.8 \pm 3.8 歳、平均不妊期間 3.9 \pm 2.1 年であった。初診時精液所見で精子濃度にて表 1 のごとく A～F 群に分類した。

CH₃-B₁₂ 投与量は 1 日 1500 μ g もしくは 3000 μ g として投与期間は 6 週～48 週とした。平均投与期間は 14.3 \pm 11.1 週であった。1500 μ g 投与群を I 群 (9 例) とし 3000 μ g 投与群を II 群 (13 例) と分類した。

表 1 精子濃度による分類

	精子濃度 (10 ⁶ /ml)	症例数	%
A	40～	8	36.4
B	20～40	6	27.4
C	10～20	1	4.5
D	1～10	3	13.6
E	0～1	1	4.5
F	0	3	13.6
計		22	100.0

結果

寺田ら³⁾の治療効果判定基準 (表 2) に従うと I 群で精子濃度で 11.1%, 精子運動率で 22.2% の有効率を示し、II 群にて精子濃度で 46.2%, 精子運動率で 30.8% の有効率を得た。しかし、統計学的に精子濃度及び精子運動率で I, II 群間の有効差は認められなかった (表 3 a, 3 b)。

精子濃度別分類では、I, II 群ともに F 群だけに

表 2 治療効果判定基準

判定	精子濃度		運動率
	20×10 ⁶ /ml 以下	20×10 ⁶ /ml 以上	
有効	10×10 ⁶ /ml 以上増加	20×10 ⁶ /ml 以上増加	20%以上増加
不変	10×10 ⁶ /ml 未満増減	20×10 ⁶ /ml 未満増減	20%未満増加
悪化	10×10 ⁶ /ml 以上減少	20×10 ⁶ /ml 以上減少	20%以上減少

* 寺田他 1985

表 3a 精子濃度有効率

(実測値)	有効	無効	計
I 群	1	8	9
II 群	6	7	13
計	7	15	22

表 4a I 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効数	精子運動率有効数
A	4	1	1
B	1	0	0
C	0	0	0
D	1	0	0
E	1	0	1
F	2	0	0
計	9	1	2

精子濃度、運動率に有効症例を認めなかった(表 4 a, 4 b)。また、投与前後の LH, FSH, testosterone 値に変動を認めた症例はなく、観察期間中妊娠成立例はみられなかった。

考 察

CH₃-B₁₂の男子不妊症への臨床応用は、Sharp ら⁴⁾が悪性貧血患者の治療に Vitamin B₁₂を投与したところ精液所見の改善も認められたと報告したことに始まる。その作用機序は、LH, FSH, testosterone 値に変動がみられなかったことより、奥山ら⁵⁾の報告のごとく直接精細胞系に作用するものと思われる。

CH₃-B₁₂の有効性に関して、磯山ら⁶⁾は 1500μg の 4~24 週投与で精子濃度で 19.2%、運動率で 34.6%、奥山ら⁵⁾は 3000μg の 14 週以上の投与でそれぞれ 44%、43%の有効率を得たとの報告があり、諸家ら^{7,8,9,10)}の報告も加えて比較した場合、当施設では有

表 2b II 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効数	精子運動率有効数
A	4	2	1
B	5	3	2
C	1	1	0
D	2	0	1
E	0	0	0
F	1	0	0
計	13	6	4

表 3b 精子運動率有効率

(実測値)	有効	無効	計
I 群	2	7	9
II 群	4	9	13
計	6	16	22

表 4b II 群における治療成績

精子濃度分類	例数	精子濃度有効数	精子運動率有効数
A	4	2	1
B	5	3	2
C	1	1	0
D	2	0	1
E	0	0	0
F	1	0	0
計	13	6	4

効率が低い。その一因として各施設により治療効果判定基準に若干ながら差が認められることが考えられる。しかしながら、当施設における同一効果判定基準による他の非ホルモン療法の効果と比較した場合¹¹⁾、CH₃-B₁₂の効率は高く、CH₃-B₁₂が男子不妊症に対し有効な一治療薬であると思われる。

また、治療前精子濃度では 20×10⁶/ml 以上の症例に対してより高い有効性を示す印象を受けた。

なお、本論文の要旨は、第 33 回日本不妊学会総会(京都, 1988)で発表した。

文 献

- 1) Buchanan, J. M., Elford, H. L., Loughlin, R. E., McDougall, B. M., Rosenthal, S.: The role of vitamin B in methyl transfer to homocysteins, Ann. N. Y. Acad. Sci. 112: 756, 1976
- 2) 田中信夫, 山崎泰範, 山田 尚, 鈴木英史, 佐野

- 茂頭, 永野 允, 木下健策: ビタミン B₁₂ の生体内運命, 神経系とメチル B₁₂, p 5 協和企画通信, 1981
- 3) 寺田為義, 里見定信, 風間泰蔵, 石川成明, 片山喬: 男子不妊症の治療成績, 日不妊会誌, 30: 481, 1985
 - 4) Sharp, A. A. and Witts, L. J.: Seminal Vitamin B₁₂ and sterility.
 - 5) 奥山明彦, 園田孝夫: 男子不妊症に対するメチコバル^R (Methylcobalamin) 投与の経験, 基礎と臨床, 17: 227, 1983
 - 6) 磯山理一郎, 川井修一, 清水芳幸, 原田宏行, 瀧原博史, 馬場良和, 酒徳治三郎: 男子不妊症に対する Methylcobalamin (CH₃-B₁₂) の使用経験, 泌尿紀要, 30: 581, 1984
 - 7) 飯塚理八, 小林俊文, 末岡 浩, 小埜 清, 兼子智, 藤井明和, 井上正人, 小林善宗, 広井正彦, 小田隆晴, 平山寿雄, 新井正夫, 中居光生, 巽 秀樹, 浜田 宏, 林 方也, 玉田太郎, 小沼誠一: Methylcobalamin (CH₃-B₁₂) の男子不妊症に対する投与成績-附. 多施設共同研究による検討- 産婦人科の世界, 38: 69, 1986
 - 8) 木村正一, 光川史郎, 松田尚太郎, 石川博夫, 折笠精一: 乏精子症の精子数, 精子運動率に対する methylcobalamin の効果, 日不妊会誌, 26: 50, 1981
 - 9) 岡田 弘, 藤沢正人, 岡本恭行, 岡 伸俊, 浜田毅樹, 羽間 稔, 松本 修, 守殿貞夫, 石神襄次: 乏精子症患者に対するメチルコバラミン (CH₃-B₁₂) の臨床的検討, 日泌尿会誌, 77: 701, 1986
 - 10) 磯山理一郎, 馬場良和, 原田宏行, 川井修一, 清水芳幸, 藤井光正, 藤澤章二, 瀧原博史, 越戸克和, 酒徳治三郎: 男子不妊症に対する Methylcobalamin (CH₃-B₁₂) と Clomiphene citrate の併用療法の経験, 泌尿紀要, 32: 1177, 1986
 - 11) 金子克美, 田畑行義, 迎圭一郎, 荒井哲也, 本田幹彦, 鈴木 徹, 村橋 勲, 高崎悦司: 男子不妊症の臨床統計的観察, 日不妊会誌, 34: 229, 1989

Treatment by methylcobalamin for male sterility

Yukiyoshi Tabata, Tetsuya Arai,
Katsumi Kaneko, Toru Suzuki
and Etsuji Takasaki

Department of Urology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan

The results of treatment for male sterility by Methylcobalamin were reported. Twenty-two patients were subjected to this study. These patients were divided into six groups (A to F) by the concentration of spermatozoa in semen, and were also divided into two groups by the dose of Methylcobalamin (group I: 1500 μg/day, group II: 3000 μg/day).

The effective rates of Methylcobalamin medication were 11.1% on the concentration of spermatozoa and 22.2% on the motility of spermatozoa in group I, according to the criteria for judgement of effectiveness by Terada et al. Moreover, their efficacies were 46.2% on the concentration of spermatozoa and 30.8% on the motility of spermatozoa in group II.

The patients with high concentration of spermatozoa at the first examination, seemed to be more effective on Methylcobalamin therapy.

Although, there was no case resulting to pregnancy in this study.

(受付: 1989年1月9日)

無精子症をともなった 46, X, del (Y) (q 11.2) の一例

Report of a 46, X, Del (Y)(q11.2) Male with Azospermia

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

馬場良和 磯山理一郎 瀧原博史
Yoshikazu BABA Riichiro ISOYAMA Hiroshi TAKIHARA
酒徳治三郎
Jisaburo SAKATOKU

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

山口大学医学部小児科学教室 (主任: 梶井 正教授)

村野一郎 塚原正人
Ichiro MURANO Masato TSUKAHARA

Department of Pediatrics,
Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755, Japan
(Director: Prof. T. Kajii)

男子不妊症を主訴としたY染色体長腕欠失の1例を報告した。症例は30歳男性で、身長156 cm、外表奇形はないが精巣は小さく、精液検査では無精子症を示した。血中LH、FSHは異常高値をとり、LH-RH負荷試験では低反応を示した。血中testosteroneは低値であり、HCG負荷試験でも低反応であった。精巣生検では、Germ-cell aplasiaとTubular and peritubular sclerosisが混在していた。末梢血リンパ球培養による染色体検査ではY染色体長腕のうちQ-バンド法で強い蛍光を発する部分が欠失しており、核型は46, X, del (Y) (q 11.2) だった。治療についてはtestosterone補充療法を施行した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 922—925, 1989)

緒言

46, X, del (Y) (q 11.2) は稀な核型で、本邦では原田らの報告以来8例が報告されているにすぎない^{1)~7)}。今回著者らは低身長と男子不妊症を伴った46, X, del (Y) (q 11.2) の一例を経験したので報告する。

症例

患者 30歳。男性。会社員。

主訴 不妊症

既往歴 特記事項なし。

家族歴 両親の血族結婚はない。

現病歴 昭和56年3月結婚したが配偶者の妊娠がなく、昭和58年11月12日山口大学医学部付属病院泌尿器科不妊外来を受診した。勃起、射精は正常であったが、性欲はやや乏しく夫婦生活は月に1回程度であった。学歴は高卒で成績は中等度であった。

現症 身長156 cm。体重49 kg。髭剃週1回。胸部・腹部異常なし。女性化乳房なし。恥毛は女性型であ

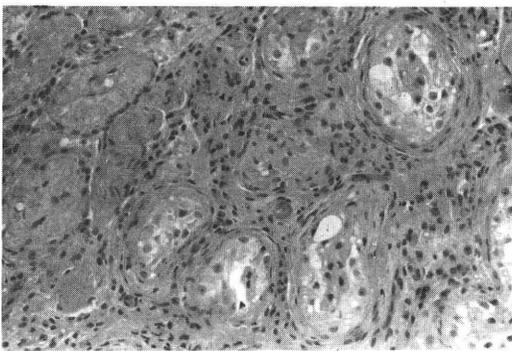
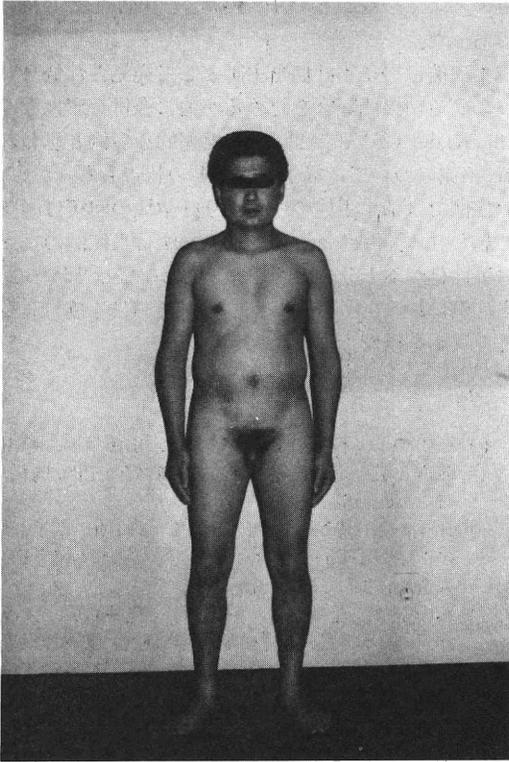


Fig. 3 精巣生検所見

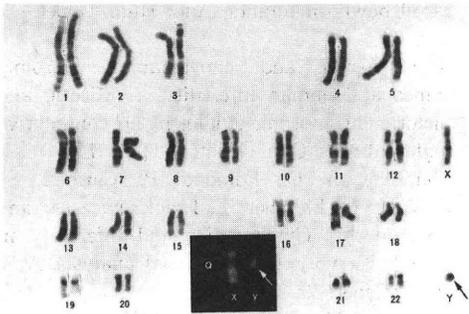


Fig.4 染色体核型 (Gバンド法)
中央下部はX, Y染色体 (Qバンド法)

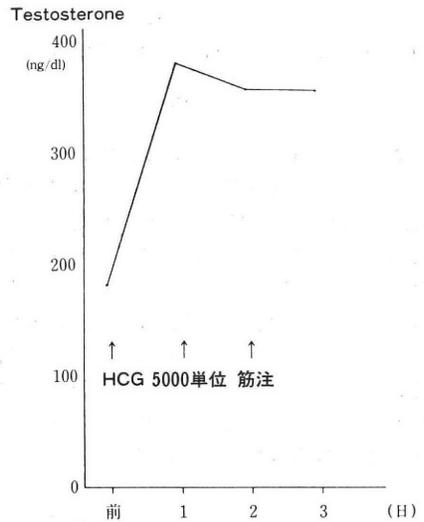
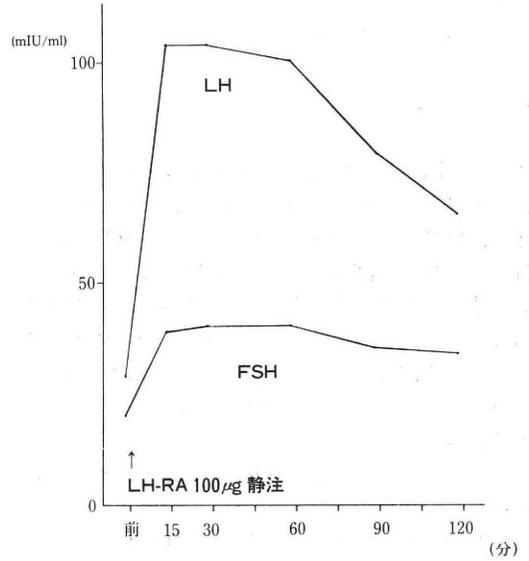


Fig. 2 上: LH-RH負荷試験 下: HCG負荷試験

った。陰茎は正常大であり包莖は認めなかった。精巣は両側とも3 mlと小さく硬度は弾性軟、精巣上体、精索には異常を認めなかった (Fig. 1)。

検査所見

1) 精液検査 3回施行したが、いずれも無精子症であった。精液量は0.3-0.8 mlであった。

2) 内分泌学的検査 LH 51.0mIU/ml, FSH 47.8mIU/ml, Prolactine 18.2ng/ml, Testosterone 253ng/dl. LH-RH 負荷試験では LH, FSH とも前値は高値を示したが負荷後の反応は低く原発性精巣機能障害を疑わせた。HCG 負荷試験では HCG 5000 IU 連日負荷により Testosterone は軽度上昇したが正常

下限にとどまった (Fig. 2).

3) 精巢生検 両側精巢とも精細管内に精細胞を認めず, Germ-cell aplasia と Tubular and peritubular scleroses が混在していた. Leydig 細胞の増生も認められた (Fig. 3).

4) X線検査 精嚢造影では右精嚢は造影されたが, 發育不良であった. 左精管よりの造影剤の注入はできず近位での精管の閉塞が疑われた. 骨盤部 CT では両側精嚢とも確認されたが, 両側とも小さかった.

5) 染色体検査 末梢血リンパ球培養による染色体検査では Y 染色体長腕のうち Q-バンド法で強い蛍光を発する部分が欠失しており, 核型は 46, X, del (Y) (q 11.2) だった. (Fig. 4).

治療経過

性欲が乏しく, Testosterone の低下を認めたため, 昭和 58 年 12 月より Clomifene citrate 50 mg/日の投与を開始した. しかしながら 6 ヶ月間治療後も自覚症状は改善せず, Testosterone の上昇も認められなかった. このため Testosterone enanthate による補充療法を 6 ヶ月間行ない自覚症状の改善をみた.

考 察

46, XYq- は非常にまれな染色体異常であり, Jacobs は 6 施設の男子出生児に対する染色体検査成績を集計しているが, 28,582 例中 1 例を認めているにすぎない⁸⁾. 一方, 男子不妊症患者を対象とした報告では 46, XYq- の出現頻度が若干高くなり, Koulischer らは 202 例中 2 例⁹⁾, Chandrey らは 1599 例中 small Y として 5 例¹⁰⁾, Fraccaro らは 5988 例中 5 例をそれぞれ報告している¹¹⁾. しかしながら, Faed ら¹²⁾ Retief らは¹³⁾ それぞれ 300 例以上の男子不妊症患者に対して染色体検査を施行しているが 1 例も認めていない.

Y 染色体長腕には, 精巢の成熟と造精機能に関係した因子, 身長に関係した因子と歯の大きさに関係した因子があると考えられる^{14,15)}. Fryns らは Y 染色体の長腕欠損を集計しているが, その中でモザイクのない 46, X, del (Y) (q 11) を 7 例集計しており, 多くの症例で比較的矮身長であり, 性器の發育は正常であるが精巢は小さく未成熟であり精細管が萎縮しているという特徴を認めている¹⁶⁾. この他にも 46, XYq- に知能障害, 口蓋裂, 短指趾症, 外生殖器異常等を合併したとの報告があるが原因となる遺伝子については定説はない¹⁶⁾. 本邦では原田らの報告以来自験例も含めて 9 例が報告されている¹⁻⁷⁾. このうち 6 例は不妊症を主訴として発見されている. また身長は低いものが多い⁷⁾. 本症例は q 11 を切断点とする

ものとよく一致しており, 本症例も切断点は q 11.2 であった.

本症例は男子不妊症を主訴として発見され矮身長および造精機能障害を認めるが他に合併奇形はなく 46, X, del (Y) (q 11.2) の典型的な症例と思われる. 治療については精子を得たとの報告もあるが²⁾ この症例では精巢生検の所見より妊孕性の回復は困難と思われる. Testosterone 補充療法は当症例のように男性化が不十分な症例では適応になるとと思われる. 当症例においても Testosterone 補充療法を施行し良好な反応を得た.

文 献

- 1) 原田禮子, 石飛和幸, 二宮哲博, 山藤靖展, 原田義道: 微小 Y 染色体を伴った単軀症の 1 例, 内科, 41: 348, 1978
- 2) 山田清美, 長谷川知子, 岩動孝一郎: 46, XYq- の 1 症例: Yq-ヘテロマチンの意義について考察, 人遺誌, 24: 177, 1979
- 3) 藤田幸利, 近藤捷嘉, 平野 学, 亀井義広, 大橋洋三, 松本 茂, 寺尾尚民, 住吉義光, 白石行正: Y 染色体長腕部分欠損を認めた尿道下裂兼陰莖陰囊不完全位置異常症の 1 例, 日泌尿会誌, 74: 2154, 1983
- 4) 広川 信, 岩崎 皓, 松下和彦, 朝倉茂夫: 男子不妊外来で診断された 46, XYq- の症例について, 日不妊会誌, 28: 578, 1983
- 5) 笹川五十次, 寺田為義, 片山 喬: 不妊を主訴とした 46, XYq- の 1 例, 日不妊会誌, 30: 114, 1985
- 6) 掘 夏樹, 山本逸夫, 林 宣男, 杉村芳樹, 鈴木泉, 桜井正樹, 荒木富雄, 塚本勝己, 山川兼輔, 川村寿一: 無精子症における染色体異常の検討, 泌尿紀要, 32: 187, 1987
- 7) 羽間 稔, 中野正則, 篠崎雅史, 藤澤正人, 岡本恭行, 岡 伸俊, 浜口毅樹, 岡田 弘, 荒川創一, 浜見 学, 松本 修, 守殿貞夫, 梅津敬一, 石神喪次: 染色体異常をともなう男性不妊 第 3 報: 46, XYq-, 泌尿紀要, 34: 1063, 1983
- 8) Jacobs, P. A., Melville, M., Ratcliffe, S., Keay, A. J. and Syme, J.: A cytogenetic survey of 11680 newborn infants, Ann. Hum. Genet. 37: 359, 1974
- 9) Koulischer, L. and Schoysman, R.: Chromosomes and human infertility. 1. Mitotic and meiotic chromosome studies in 202 consecutive male patients, Clin. Genet. 5: 116, 1974
- 10) Chandley, A. C., Edmond, P., Christie, S., Gowans, L., Fletcher, J., Frackiewicz, A. and Newton, M.: Cytogenetics and infertility in man 1. Karyotype and seminal analysis, Ann. Hum. Genet. 39: 231, 1975
- 11) Fraccaro, M., Tiepolo, L., Zuffardi, O. and Giarola, A.: Cytogenetic aspects of human male

- infertility, *Cytogenet. Cell. Genet.* 27: 205, 1980
- 12) Faed, M. J. W., Robertson, J., Lamount, M. A., MacIntosh, W., Grieve, J., Baxby, K., James, G. B. and Crowder, A. M.: A cytogenetic survey of men being investigated for subfertility, *J. Reprod. Fert.* 56: 209, 1979
 - 13) Retief, A. E., Van Zyl, J. A., Menkveld, R., Fox, M. F., Kotze, G. M. and Brusnick, J.: Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml, *Hum. Genet.* 66: 162, 1984
 - 14) Buhler, E. M.: A synopsis of the human Y chromosome, *Hum. Genet.* 55: 145, 1980
 - 15) Daiger, S. P. and Chakraborty, R.: Mapping the human Y chromosome. in *The Y chromosome, part A: Basic characteristics of the Y chromosome: p93*, Alan R. Liss, Inc. 1985
 - 16) Fryns, J. P., Kleczkowska, A. and Van den Berghe, H.: Clinical manifestations of Y chromosome deletions in man. in *The Y chromosome, part B: clinical aspects of Y chromosome abnormalities: p151*, Alan R. Liss, Inc. 1985

**Report of a 46, X, del
(Y)(q11.2) male with azospermia**

Yoshikazu Baba, Riichiro Isoyama,
Hirosi Takihara and Jisaburo Sakatoku

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine,
Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

Ichiro Murano and Masato Tsukahara

Department of Pediatrics,
Yamaguchi University School of Medicine,
Ube 755, Japan
(Director: Prof. T. Kajii)

A 30-years-old patient with a deletion of the distal portion of the long arm of chromosome Y was reported. The patient showed phenotypically normal except short stature (156 cm), small testes and azospermia. The serum LH and FSH levels were markedly elevated and the serum testosterone level was below the normal range. The testicular biopsy specimens showed germ-cell aplasia and tubular-peritubular sclerosis. The androgen replacement therapy was done for virilization successfully.

(受付: 1989年2月6日)

男子不妊症の臨床的観察

A Clinical Study on Male Infertility

鳥取大学医学部泌尿器科

西田 秀樹
Hideki NISHIDA

福田 和夫
Kazuo FUKUDA

宮川 征男
Ikuo MIYAGAWA

Department of Urology,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

1978年1月より1987年12月までの10年間の男子不妊主訴新来患者184例について、臨床統計学的検討を行った。

- 1) 受診頻度は男子15歳以上新来患者の3.9%を占めた。来院時年齢は30~34歳、不妊期間は結婚後1年以上6年未満にpeakを認めた。
- 2) 精液所見では、無精子症と高度乏精子症が70.2%を占めた。
- 3) 睾丸生検では、精液所見の悪いものほど造精機能低下が高度な傾向であった。
- 4) FSHは無精子症で高値を示した。LHは精液所見の悪いものほど高値を示す傾向であったが、testosteroneと精子濃度の間には明らかな関係はなかった。
- 5) 精嚢腺造影では、精嚢腺の発育形態に関連して精液量が増減していた。
- 6) 病因分類では、造精機能障害が96.9%を占めた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 34(4), 926—933, 1989)

緒 言

近年、不妊症の病因検索、治療に際し、不妊夫婦間における男性側因子によるものが重要視され、泌尿器科外来の男子不妊症患者は増加の傾向にあるといわれている。今回、我々は1978年1月より1987年12月までの10年間における、鳥取大学医学部泌尿器科外来の不妊主訴新来患者の臨床統計を行ったので、その成績を報告する。

成 績

1) 患者数

1978年1月より1987年12月までの10年間に来院した不妊主訴新来患者数は184例で、外来新来患者総数の1.9%、男子新来患者数の3.2%、15歳以上男子新来患者数の3.9%を占めていた(表1)。なお、184例中、検査項目が不十分な20例は除外し、164例について以下の臨床的な検討を行った。

2) 来院時年齢と不妊期間

来院時の年齢分布は、30~34歳がもっとも多く全体の38%を占め、25~29歳(30%)、35~39歳(23%)の順であった(表2)。

結婚より来院までの不妊期間は、結婚後3年以上4年未満と5年以上6年未満が最も多く、結婚後1年以上から6年未満までで、全体の58%を占めていた(表2)。

3) 既往歴

既往歴を有するものは164例中69例(42.1%)であった。流行性耳下腺炎が最多で17例あり、次いで虫垂切除術やヘルニア根治術などの精路周囲手術が多かった(表3)。

4) 妻の婦人科的異常

不妊主訴患者の妻の婦人科的異常の有無については164例中56例が明確で、56例中35例は異常なく、21例(38%)に排卵障害などの異常を認めた(表4)。

5) 精液検査

原則として、4日間以上の禁欲ののち、用手法にて採取し、室温で30分間放置後に、検査を施行した。

表1 不妊主訴患者数と男子外来患者の比率(外来新来患者)

年度	外 来 新 来 者 総 数	男子患者数	15歳以上男子患者数	不妊主訴患者数	対15歳以上男子患者数比率(%)
1978	921	564	466	16	3.4
1979	1,044	630	504	13	2.6
1980	987	558	450	14	3.1
1981	949	585	503	21	4.2
1982	701	426	340	24	7.1
1983	1,064	660	534	25	4.7
1984	979	614	506	21	4.2
1985	814	484	397	14	3.5
1986	996	584	501	14	2.8
1987	1,058	650	543	22	4.1
計	9,513	5,755	4,744	184	3.9

表2 不妊主訴患者来院時年齢と来院までの不妊期間

来院時年齢	患者数	不妊期間	患者数
15~19	3	1年未満	4
		1~2年	16
20~24	8	2~3	21
		3~4	23
25~29	49	4~5	11
		5~6	24
30~34	62	6~7	9
		7~8	10
35~39	37	8~9	3
		9~10	4
40~	5	10年以上	12
		不明	27
計		164	

表3 既 往 歴

疾 患 名	患 者 数
高 熱 疾 患	4
流 行 性 耳 下 腺 炎	17
(辜 丸 炎 を 合 併)	(1)
虫 垂 切 除 術	14
鼠 径 ヘル ニ ア 根 治 術	8
辜 丸 固 定 術	2
会 陰 部 外 傷	4
痔 核 手 術	1
淋 疾	3
肺 結 核	6
糖 尿 病	5
そ の 他	5
計	69(42.1%)

表4 妻の婦人科的異常

疾 患 名	患 者 数
子 宮 後 屈	2
生 理 不 順	3
子 宮 発 育 不 全	3
原 発 性 不 妊	1
着 床 不 全	1
排 卵 障 害	4
下 垂 体 性 無 排 卵	1
ホルモン分泌不全	2
卵 管 狭 窄	1
多 囊 胞 卵 巢	2
子 宮 筋 腫 術 後	1
計	21

精子数より、精子数0の無精子症、1000万/ml以下の高度乏精子症、1000万~2000万/mlの中等度乏精子症、2000万~4000万/mlの軽度乏精子症と分類した。無精子症が67例(40.9%)、高度乏精子症が48例(29.3%)で、両者で164例中115例(70.2%)を占めていた。精液量と精子濃度の間には明らかな関係はなかった。運動率は、高度乏精子症が有意に不良であった(表5)。

6) 辜丸組織所見

切除法により、81例に辜丸生検を施行した。Bouin氏固定液にて固定後、H-E染色を施して鏡検を行った。辜丸組織像の分類は、宍戸・白井の分類¹⁾に準じて行った(表6)。無精子症や高度乏精子症では、高度の造精機能低下もしくは造精機能を認めない症例が多く、中等度乏精子症や軽度乏精子症では、造精

表5 不妊主訴患者精液所見

精子濃度 ($\times 10^6/ml$)	例数 (%)	精液量 (ml)			精子運動率 (%)				
		<2.0	2.0~5.0	5.0<	0	1~25	26~50	51~75	76~100
無精子症 (0)	67 (40.9)	25	37	5					
高度乏精子症 (0~10)	48 (29.3)	14	30	4	10	13	8	10	7
中等度乏精子症 (10~20)	11 (6.7)	6	3	2	3	1	2	4	1
軽度乏精子症 (20~40)	26 (15.8)	11	13	2	0	5	3	15	3
正常 (40<)	12 (7.3)	5	6	1	0	1	2	6	3
計	164	61	89	14	13	20	15	35	14

表6 辜丸組織所見と精子濃度

辜丸組織所見 \ 精子濃度	無精子症	高度乏精子症	中等度乏精子症	軽度乏精子症	計
軽度造精機能低下	2	3	0	4	9
中等度造精機能低下	8	7	1	2	18
高度造精機能低下	14	17	2	0	33
造精機能なし	21	0	0	0	21
計	45	27	3	6	81

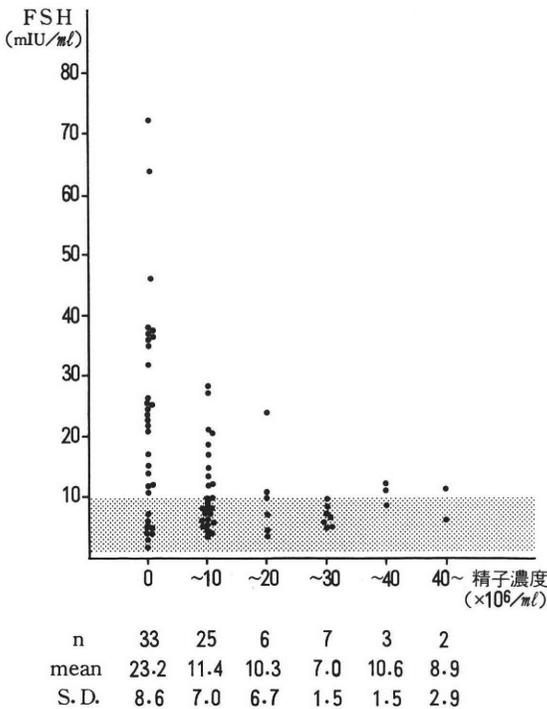


図1 精子濃度とFSHとの関係

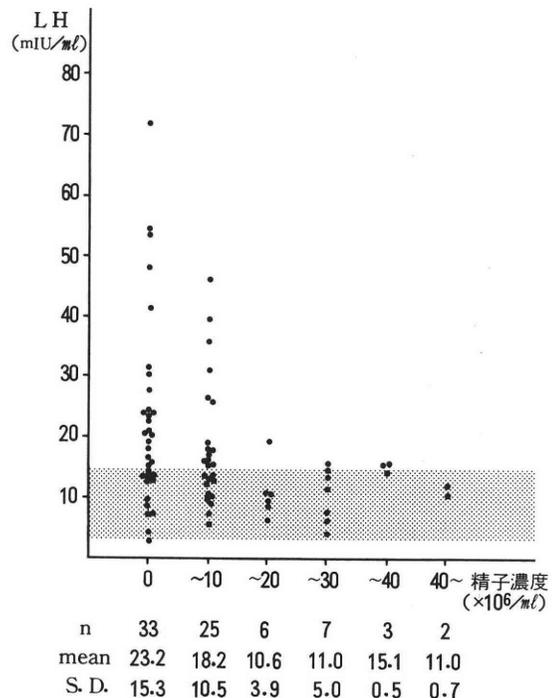


図2 精子濃度とLHとの関係

機能低下が比較的軽度な傾向であった。

7) 血中ホルモン値

76 例に対し、FSH, LH, testosterone を測定し、精子数との関係を検討した。FSH (図 1) は無精子症で有意に高値を示した。LH (図 2) は精子濃度の低いものほど高値を示す傾向であった。testosterone (図 3) と精子濃度の間には、明らかな関係は認められなかった。

8) 精囊腺 X 線像

原則として局麻下に、辜丸生検と同時に施行した。81 例中、精路に異常を認めたものは精管閉塞症 1 例と精囊腺拡張症 2 例の計 3 例 (3.7%) であった。

両側の精囊腺の形態学的評価が可能な 55 例について

表 7 精囊腺 X 線像の発育形態と精子濃度

精子濃度 分類型	無精子症		乏精子症	
	例数	%	例数	%
I	11	37.9	10	38.5
II	6	20.7	11	42.3
III	9	31.0	2	7.7
IV	3	10.4	3	11.5
計	29	100	26	100

て、下記の検討を加えた。

石神・森の分類²⁾に基づき発育形態を分類すると(表 7)、無精子症・乏精子症ともに成人型の I 型と幼弱型の IV 型に差はないが、無精子症では III 型、乏精子症では II 型が多い傾向であった。

石神・山本の分類³⁾に基づき年齢角度を検討してみ

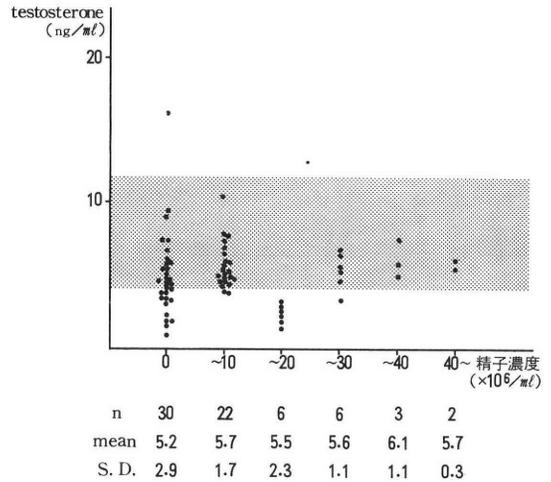


図 3 精子濃度と Testosterone との関係

表 8 精囊腺 X 線像の発育形態と年齢角度

年齢角度	分類型	I		II		III		IV	
		例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
+ (<85°)	例数 %	1	4.8	2	11.8	7	63.6	1	16.7
	平均角度	65.0		83.0		79.0		80.0	
++ (85°~115°)	例数 %	10	47.6	5	29.4	3	27.3	2	33.3
	平均角度	107.2		108.4		107.3		106.5	
+++ (115°<)	例数 %	10	47.6	10	58.8	1	9.1	3	50.0
	平均角度	120.9		126.5		120.0		116.3	
計		21	100	17	100	11	100	6	100
		111.7±13.5		116.1±15.6		90.5±15.9		107.0±12.9	

表 9 精囊腺 X 線像の発育形態と精液量

分類型		精液量 (ml)			計
		<2.0	2.0~5.0	5.0<	
I	例数 %	4 19.1	13 61.8	4 19.1	21 100
	平均量	1.7	3.5	5.9	3.6±1.5
II	例数 %	6 35.3	11 61.9	0 0	17 100
	平均量	1.3	3.4	—	2.7±1.4
III	例数 %	7 63.7	4 36.3	0 0	11 100
	平均量	1.6	2.9	—	2.1±0.8
IV	例数 %	4 66.7	2 33.3	0 0	6 100
	平均量	1.0	2.9	—	1.6±1.0

ると(表8), 115°以上の老人型はI型・II型に多く, 85°以下の幼弱型はIII型に多い傾向であった。発育形態別では, II型が116°と最も広角であった。

精囊腺の発育形態と精液量との関係を観察すると(表9), I型3.6ml, II型2.7ml, III型2.1ml, IV型1.6mlで, 精囊腺の発育形態に関連して, 精液量が増減していた。

9) 男子不妊症の病因分類

不妊主訴患者164例中, 上述した検査より正常と判定した10例を除く154例について検討した(表10)。造精機能障害が149例で, 全体の96.9%を占めていた。

10) 不妊夫婦間の責任率

表10 不妊主訴患者の病因分類

病 因	臨 床 診 断	例数	計(%)
造精機能障害	特発性男子不妊症	140	149 (96.9)
	{ 無精子症 乏精子症	61	
		79	
	クラインフェルター症候群	4	
	下垂体性低ゴナドトロピン血症	5	
精路通過障害	精管閉塞症	1	1(0.6)
副性器障害	精囊腺拡張症	2	3(1.9)
	精囊腺炎	1	
性交不全	インポテンス	1	1(0.6)
	計	154	100

女性側の異常の有無が明らかな56例を, 男性側の異常の有無で検討した(表11)。男性側に異常がある症例群ほど, 女性側の正常が多かった。

11) 治療効果

治療効果判定は, 同一薬剤を最低3カ月間使用した症例について, 飯塚ら⁴⁾及び中村ら⁵⁾の判定基準に準じて行った。内分泌物質療法は原則として正・低ゴナドトロピン症例に使用した。

1978年から1982年までの5年間は, 表12に示すように治療薬剤が多彩であった。大別すると, 非内分泌物質療法は5例中4例(80%)に有効で, 内分泌物質療法は9例中1例(11%)に有効であった。

1983年から1987年までの5年間は, 表13に示すように使用薬剤を一定とした。Kallikrein・Vitamin E療法は6例中2例(33%)に有効で, HGC・HMG療法は10例中2例(20%)に有効であった。

考 案

不妊主訴患者が, 泌尿器科外来男子患者数に占める割合は, 西村ら⁶⁾2.5%(1973~1977), 白井¹⁾5.9%(1959~1971), 布施ら⁷⁾9.7%(1975~1980)(対新来

表11 不妊夫婦における生殖異常の有無

不 妊 夫 婦		
夫, 異常	妻, 正常	34人(60.7%)
	妻, 異常	19人(33.9%)
夫, 正常	妻, 正常	1人(1.8%)
	妻, 異常	2人(3.6%)

表12 治療薬と治療効果 (1978~1982)

治 療 薬	精子濃度* (×10 ⁶ /ml)	効果判定
Vitamedin® 3 Cap, Coenzyme Q ₁₀ 30 mg	3 → 20	著 効
	2 → 20	著 効
ATP 120 mg, Vitamin B ₁₂ 1500 mg, Vitamin E 300 mg	4 → 10	有 効
	0 → 0	不 変
ATP 60 mg, Vitamedin® 3 Cap, Tocopherol Nicotinate 300 mg	4 → 11	有 効
HCG 1000 u**	0 → 0	不 変
HCG 1000 u, HMG 150 u,** Vitamin E 300 mg, ATP 60 mg	20 → 5	悪 化
HCG 1000 u, Testosterone 100 mg*** Vitamin E 300 mg	4 → 1	不 変
HCG 1000 u, Testosterone 125 mg, ATP 60 mg, Tocopherol Nicotinate 600 mg	0 → 0	不 変
HMG 75 u, Testosterone 125 mg, Vitamin E 300 mg	2 → 4	不 変
HMG 150 u, Testosterone 125 mg, Vitamin E 300 mg, Vitamedin® 3 Cap	5 → 1	不 変
HCG 1000 u, HMG 75 u, Testosterone 125 mg, ATP 120 mg, Vitamin E 300 mg	0 → 0	不 変
Clomifene Citrate 50 mg****	5 → 30	著 効
	0 → 0	不 変

*治療前→治療後, **週2回筋注, ***4週に1回筋注, ****25日間内服し, 5日間休薬

患者比)であり、自験例は対新来患者比3.2%で、諸家の報告より若干少ない傾向であった。

来院時年齢は諸家の報告^{6~8)}と同様に、30歳~34歳が最も多く、次いで25歳~29歳の順であった。

不妊期間に関しては、諸家の報告^{6,7)}では、3年以内が最も多く、2~5年以内で全体の70%となっている。自験例では、結婚後3年以上4年未満と5年以上6年未満に多く、結婚後1年以上から6年未満までで全体の58%であり、平野ら⁹⁾の報告に近い。当教室では、一般外来と別個に不妊外来を独立していなかったため、啓蒙活動が不十分だったことも原因の一つとして考えられる。この事に関しては、表11で示すように、婦人科で女性側が正常と診断され、その後、男性側の精査を行う事例が数多く見られることより推察される。

既往歴については、諸家の報告^{1,7)}と同様に流行性耳下腺炎が最も多かった。しかし、流行性耳下腺炎17例中、睾丸炎を併発したものは1例のみであり、既に言われているように、既往歴と不妊症との関係は定かではない。

精液所見については種々の報告⁹⁾があり、特に精子濃度に関しては、施設により正常が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上⁸⁾、 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以上⁷⁾、 $60 \times 10^6/\text{ml}$ 以上⁹⁾などと設定されているが、我々は表5のごとく、正常精子濃度を $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上とした。自験例では、無精子症と $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の高度乏精子症が全体の約70%

を占め、将来的にも妊孕可能性の少ない症例が多かった。施設により分類が異なるため、比較的検討が困難であり、今後、精液所見に対する統一見解が強く望まれる。

睾丸生検は、不妊症の診断と予後判定に有用で、広く行われており、適応について稲井ら¹⁰⁾は、造精機能障害と精路通過障害との鑑別、絶対不妊と相対不妊との鑑別、精索静脈瘤患者での造精機能の評価を目的とする場合としている。睾丸組織所見に関しても、精液所見と同様に数多くの分類があるが、今回は、造精機能の有無とその程度で分類した白井の分類¹⁾を用いて検討した。表6のように、精液所見の悪いものほど造精機能障害が強い傾向であったが、三宅¹¹⁾の指摘するように、病態生理の解明には役立っていない。今後、睾丸生検の適応や評価の方法などについての進展が期待される。

不妊患者における血中ホルモンレベルについても、既に数多くの報告が見られ、精子濃度との関係^{9,12,13)}、睾丸組織像との関係^{10,14)}について、検討されている。FSHは精子濃度の減少とともに上昇し^{11,12)}、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下で著明に増加する^{9,15)}といわれている。一方、LHは、無精子症のみ上昇するか¹³⁾、または、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下で増加を示す¹⁵⁾となっている。我々の成績では、FSH、LHは精子濃度の減少に従い上昇傾向を示したが、FSHが無精子症でのみ有意に増加を示したのみで、諸家の報告とは若干異なっており、今後、

表13 治療薬と治療効果 (1983~1987)

治 療 薬	精子濃度* ($\times 10^6/\text{ml}$)	効果判定
Kallikrein 30 u, Vitamin E 150 mg	3 → 16	著 効
	20 → 25	有 効
	32 → 34	不 変
	3 → 6	不 変
	1 → 0	不 変
	0 → 0	不 変
HCG 3000 u, HMG 150 u**	6 → 25	著 効
	27 → 35	有 効
	32 → 28	不 変
	5 → 8	不 変
	0 → 0	不 変
	0 → 0	不 変
	0 → 0	不 変
	0 → 0	不 変
HCG 1000 u, HMG 150 u**	37 → 27	悪 化
	0 → 0	不 変

* 治療前→治療後, ** 週2回筋注

総運動精子数との関係¹²⁾や睾丸組織所見との関係についても、検討を加えていく必要があると思われる。

精管・精囊腺造影は、精路の通過障害を疑うときは必須の検査であるが、我々は、睾丸生検施行時に、併せて当検査を行った。81例中、精路に異常を認めたものは、精管閉塞症1例と精囊腺拡張症2例の計3例(3.7%)で、諸家の報告^{16,17)}より少なかった。評価可能な55例に対し、石神・森・山本の分類^{2,3)}に基づき、発育形態、年齢角度、精液量を検討したが、自験例でも精囊腺の発育形態に関連して、精液量が増減していた³⁾。

不妊症の原因については、造精機能障害、精子輸送路の通過障害、副性器の障害、性交障害などがあり、このうち造精機能障害が多く、特に特発性男子不妊症が最多で、全体の71%⁷⁾~94%¹⁸⁾を占めている。我々の成績では、造精機能障害が149例(97%)で、このうち特発性男子不妊症は140例(91%)であった。

治療に関しては、1982年までは多彩であり、1983年以降の評価可能な症例も数少ないため、検討は差し引かえたい。今後、治療薬剤の一部を変更し、新たな検討を加えていきたい。

結 語

1978年1月より1987年12月までの10年間の男子不妊症統計を行い、下記の結果を得た。

1) 男子外来患者中、不妊主訴患者の占める割合は3.2%であった。

2) 来院時年齢は30~34歳が最も多く、全体の38%を占めた。

3) 不妊期間は、結婚後1年以上から6年未満までが、全体の58%を占めた。

4) 既往歴では、流行性耳下腺炎が最も多く、17例であった。

5) 精液所見では、無精子症と $10 \times 10^6/m^1$ 以下の高度乏精子症が全体の70%を占めた。高度乏精子症では、運動率が不良な症例が多かった。

6) 睾丸組織所見では、精子濃度の低いものほど造精機能障害が強い傾向であった。

7) FSH・LHは精子濃度の低下にともない上昇傾向を示し、FSHは無精子症で高値を示した。testosteroneと精子濃度の間には、明らかな関係はなかった。

8) 精管・精囊腺造影を施行した81例中3例(3.7%)に精路の異常を認めた。精囊腺の発育形態に関連して、精液量が増減していた。

9) 病因分類では、特発性男子不妊症が140例(91

%)と最多であった。

(本論文の要旨は、1988年8月20日、第26回日本不妊学会中国・四国支部総会(岡山)において口演した。)

文 献

- 1) 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
- 2) 森 昭: 男子性腺機能失調症の研究 第I編 精囊腺×線像の考察, 泌尿紀要, 3: 543, 1957
- 3) 山本 治: 男性不妊の研究 第三編 精囊腺×線像の観察, 泌尿紀要, 9: 481, 1693
- 4) 飯塚理八, 己斐秀豊, 高橋輝雄, 仁科進弘: 男性不妊に対するCyanocobalaminの効果臨婦産, 20: 488, 1966
- 5) 中村幸雄, 浅岡 健, 黒川博厚, 飯塚理八: 男性不妊に対するミオアクチンC注の効果, 日不妊会誌, 18: 61, 1973
- 6) 西村隆一, 岩崎 皓, 木下裕三, 野口和美, 高井修道: 男子不妊症の臨床的観察, 日不妊会誌, 24: 205, 1979
- 7) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴夫, 島崎 淳: 男子不妊症の臨床的観察, 日不妊会誌, 28: 197, 1983
- 8) 平野章治, 沢木 勝, 大川光央, 黒田恭一: 男子不妊症の臨床的検討, 日不妊会誌, 20: 11, 1975
- 9) 福谷恵子: 睾丸機能検査法, 臨泌, 33: 1045, 1979
- 10) 稲井 徹, 香川 征, 横関秀明, 黒川一男: 男子不妊症の臨床研究 I. 精巢の組織学的検討, 西日泌尿, 49: 1439, 1987
- 11) 三宅弘治: 特発性不妊精巢の病態生理, 臨泌, 42: 105, 1988
- 12) 伊藤晴夫, 川村健二, 片海善吾, 角谷秀典, 布施秀樹, 皆川秀夫, 島崎 淳: 男子不妊症の内分泌学的研究 I. 精子数と血中ホルモンとの関係, 日不妊会誌, 29: 294, 1984
- 13) 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
- 14) 大矢 晃, 鈴木隆志, 和田郁生, 木暮輝明, 西沢理: 睾丸生検を行った男子不妊症例に対する臨床的検討, 西日泌尿, 48: 1849, 1986
- 15) 細井康男: 男子不妊症の内分泌学的研究, 日泌尿会誌, 72: 544, 1981
- 16) 平野章治, 沢木 勝, 大川光央, 黒田恭一: 男子不妊症患者の精囊X線像について, 日不妊会誌, 21: 416, 1976
- 17) 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, 日不妊会誌, 27: 161, 1982
- 18) 木内弘道, 大田修平, 田中啓幹: 男子不妊症の臨床的観察, 日不妊会誌, 27: 170, 1982

A clinical study on male infertility

Hideki Nishida, Kazuo Fukuda
and Ikuo Miyagawa

Department of Urology,
Tottori University School of Medicine,
Yonago 683, Japan
(Director: Prof.I.Miyagawa)

A statistical analysis was performed on patients with male infertility who had visited our hospital from January 1978 to December 1987.

1) The incidence was 3.9 per cent as compared to the over fifteen years old male out-patients. The peak of age distribution was from 30 to 34 years old

and the peak of infertile period was from 2 to 6 years after their marriage.

2) In semen analysis, total case of azoospermia and severe oligospermia (less than 10×10^6 /ml) corresponded to 70.2 per cent of all infertile male.

3) On testicular biopsy, fairly relationship was found between the sperm count and spermatogenesis.

4) FSH levels were increased significantly in the azoospermic cases.

5) On seminal vesiculographies, the amount of semen was in proportion to the size of the seminal vesicles.

6) The disturbance of spermatogenesis was found to 96.9 per cent of all infertile male.

(受付: 1988 年 11 月 4 日)

地方部会講演抄録

第 107 回関西不妊集談会

日 時：平成元年 3 月 18 日(土)午後 2 時より
場 所：京都タワーホテル 9 階「八閣の間」

1. 体重減少性無月経に対する甲状腺剤療法 および Kaufmann 療法の意識

猶原まゆみ・片山和明・山辺晋吾
阿江 孝・望月真人(神戸大産婦)

目的と方法：外来通院中の体重減少性無月経患者を対象に、甲状腺剤療法ならびに Kaufmann 療法を施行し、その治療効果を体重の増減、排卵の有無、血清 E_2 , LH, FSH および T_3 , T_4 の動態および LH-RH に対する下垂体の反応性の面から検討した。

成績：①甲状腺剤単独で治療を行なった症例では、9 例中 8 例に体重の増加がみられ、治療開始後 6 か月の増加量は約 5 kg であった。Kaufmann 療法単独あるいは両者を併用した症例でもこれとほぼ同様な体重増加がみられた。②治療法の如何によらず体重の増加がみられた症例では、約 70 % が clomiphene に対して反応性を示し排卵が認められた。③血清 T_3 は、甲状腺剤療法を行なった症例のみならず Kaufmann 療法のみを行なった症例でも上昇した。④体重が回復した症例では血清 E_2 , LH, FSH が上昇し、LH-RH に対する反応性が回復した。

結論：体重減少性無月経の体重増加および性機能の回復に及ぼす甲状腺剤療法および Kaufmann 療法の有効性が示唆された。

2. 卵巣嚢腫牛の下垂体前葉中 GnRH レセプター および血中 LH 濃度について

川手憲俊・稲葉俊夫・森 純一
(大阪府立大農学部獣医学科)

ウシ卵巣嚢腫の発生原因の一つとして視床下部—下垂体軸における LH 放出機構の異常が考えられる。今回の報告では卵巣嚢腫牛の血中 LH 濃度および下垂体前葉中 GnRH レセプターの親和性と濃度について検討した。

食肉処理場において解体直後の雌ウシ 55 頭から卵巣、下垂体および血液を採取し、卵巣の形態から発情周期を推定し、I 期(排卵後 0～3 日)、II 期(同 4～9 日)、III 期(同 10～16 日)、IV 期(同 17～19 日)

および卵巣嚢腫に分類した。下垂体前葉中 GnRH レセプターの結合定数(K_2)および濃度は 3H -GnRH を用いた Scatchard analysis 法により測定した。血中 LH 濃度は RIA 法により測定した。

この結果、血中 LH 濃度は I～III 期では低値を示したが、IV 期では高くなる傾向を示した。卵巣嚢腫牛の LH 濃度は IV 期のそれと同程度の値を示した。GnRH レセプターに対する 3H -GnRH の K_2 は I, II 期においてやや高く、III, IV 期では低くなる傾向が見られたが、有意差は認められなかった。卵巣嚢腫牛の同 K_2 は IV 期のそれと同程度の値を示した。GnRH レセプター濃度は I, II 期では低値を示していたが、III 期では有意に増加し、IV 期ではやや減少する傾向が見られた。卵巣嚢腫牛の同レセプター濃度は IV 期のそれと同程度の値を示した。

以上の結果より、卵巣嚢腫牛の血中 LH 濃度および下垂体前葉中 GnRH レセプターの親和性と濃度は、卵胞期のウシと比較して著しい差は認められないことが示唆された。

3. LH-RH, TRH ダブル負荷テストによる 黄体機能不全症の解析

林 道治・小笹 宏・泰井俊造
森 崇英 (京都大産婦)
田内園彦・中島 襄
(天理よろず相談所産婦)
越田光伸 (北野病院産婦)

目的：不妊症や習慣性流産の重要な原因である黄体機能不全症は、その定義、原因、診断等について未だ議論されていてその一致をみていない。今回我々は、LH-RH と TRH を用いたダブル負荷テストによってこの病態の解明を試みた。

方法：不妊症患者の黄体中期に LH-RH 100 μ g・TRH 250 μ g 静注負荷を行ない、-15 分から 15 分間隔に 120 分まで経時的に採血し LH, FSH, PRL, Progesteron (P), Estradiol (E_2) についての変動を検討した。なお負荷の P が 10 ng/ml 以下で、かつ B. B. T. で松本の 3-6 型または子宮内膜日付診で 3 日以上の上昇を満たすものを黄体機能不全症と診断した。そのまま妊娠へ移行したり、P が 10 ng/ml 以上で他の 2 項目ともに正常の症例を黄体機能正常群とした。

結果：先ず黄体機能不全症は PRL の反応を卵胞期の診断基準を準用することによって PRL 反応正常群と PRL 反応亢進群に分類された。黄体機能正常群は PRL の反応も正常例のみを対照群として処理した。LH, FSH, PRL は全群ですみやかな反応性増加を認め、LH と PRL はすみやかに減少し、FSH はなだらかな減少傾向を示した。次に P は対照群では反応性増加を認めたが黄体機能不全群においては PRL 反応正常群では P の増加を認めず、一方、PRL 反応亢進群では対照群と同様に P の反応性増加を認めた。E₂ は全群で反応性増加を認めたものの増加減少ともにならなかつた。

結論：黄体機能不全症には黄体期の LH-RH 負荷により P の増加しない群と増加する群の 2 種類の病態が存在する事が初めて明らかとなった。P の増加しない群は黄体の LH への応答性が欠如しており、黄体そのものの機能不全と考えられ、いわば末梢性黄体機能不全症と称すべきである。一方、P の増加する群は黄体の LH への応答性は保たれ、黄体そのものの機能はほぼ健全であり、中枢性黄体機能不全症と称すべきである。更に後者には潜在性高 PRL 血症が合併している可能性が示された。

4. 男性副生殖器におけるヒト型精子不活化モノクローナル抗体 (H6-3C4) 対応抗原産生部位の光顕・電顕的観察

石崎浩之・亀田 絹・武田守弘
 繁田 実・辻 芳之・香山浩二
 磯島晋三 (兵庫医大産婦)

目的：抗精子抗体保有不妊婦人の末梢血リンパ球と、マウスミエローマ細胞との細胞融合により樹立したヒト型精子不活化モノクローナル抗体 (H6-3C4) の対応抗原産生部位に関しては、従来抗体吸収実験により副睾丸と精囊腺が指摘されていたが、今回、免疫組織化学的手法により男性生殖器における抗原の産生部位を、光顕ならびに電顕的に観察した。

方法：実験材料として、造精機能を有する男性生殖器すなわち睾丸、副睾丸、精囊腺、前立腺を用いた。各々の組織を細切後パラホルムアルデヒドで固定、凍結切片を作製し、ベクタスティン ABC 法による免疫化学的染色を行ない、まず光学顕微鏡にて抗原の局在を観察した。次いで免疫電顕法に従って凍結組織切片の ABC 染色標本を、洗浄後オスミウム酸にて固定し、脱水後エポキシ樹脂包埋、超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。

結果：光顕レベルでは、副睾丸尾部の管腔内面および精囊腺上皮細胞に強い染色が見られたが、睾丸、

副睾丸頭部および前立腺には染色性は観察されなかつた。光顕で最も染色性の強かつた副睾丸尾部の電顕的観察では、主細胞の微絨毛が強く染色されたが、細胞内小器官においては、有意な染色は見出せなかつた。

考察：ヒト型精子不活化抗体 (H6-3C4) が認識する対応抗原はすでに smalli 抗原に類似した糖鎖構造である事が判明しているが、今回の光顕的および電顕的観察では、その対応抗原は、副睾丸尾部および精囊腺上皮に局在し、特に前者では、主細胞の微絨部に抗原が局在し、細胞内小器官よりもむしろ主細胞微絨毛において glycosylation が起こっている事を示唆する所見であつた。

5. 当科不妊外来を受診した男性不妊患者における染色体異常について

奥田喜啓・今西 治・篠崎雅史
 藤澤正人・岡田 弘・松本 修
 守殿貞夫 (神戸大泌尿器)

1984 年より 1988 年までの 5 年間に、神戸大学医学部泌尿器科不妊外来を受診した患者のうち、末梢リンパ球培養による染色体検査で異常を認めた 45 例について検討した。

これらの症例は 1 例を除きすべて無精子症を呈し、45 例中 41 例は Klinefelter 症候群であり、うち 37 例が核型 47, XXY であつた。これらはほとんど高ゴナドトロピン低ゴナディズムを示し、矮小精巣、高身長などが見られたが、比較的低身長症例もいくつか見られた。精巣組織所見では、精細管硝子化変性、Leidig 細胞の増殖をみ、精子形成を認めなかつた。

その他興味ある症例をいくつか経験したので報告する。症例 1 は核型 46, XYq⁻ で、Y 染色体長腕が欠失した核型である。無精子症を呈し、高ゴナドトロピン血症を認めたがテストステロン値は正常であつた。本例は本邦 9 例目と思われる。症例 2 は核型 46 XYt (Yq⁻, 15 q⁺) で、Y 染色体長腕部が No. 15 に付着した相互転座である。この症例では強度の乏精子症を示し、また高プロラクチン血症を示した。CT, MRI 上、脳下垂体部に異常は認められなかつた。症例 3 は核型 47, XXY/47, XYY/48, XYY 型で、三重モザイク症例である。本例はインポテンツと不妊を主訴として来院し、無精子症で高 LH, FSH, 低テストステロン血症を呈した。三重モザイク症例は非常にまれであり、本症例の核型の既報告はないものと思われる。

6. 体外受精・胚移植法における GnRH Agonist の使用経験

辰巳賢一・野田洋一・神崎秀陽
馬岡 陽・松本 央・岸 淳二
江見信之・森 崇英
(京都大産婦)

教室における体外受精・胚移植プログラムにおいて HMG-hCG による卵巣刺激を行なった症例のうち hCG 投与前に内因性 LH サージを生じた症例の妊娠率は 14% であったのに対し、内因性 LH サージを生じない症例の妊娠率は 61% であった。この結果より内因性 LH サージを抑制する事により、妊娠率の向上が期待できると考え、HMG-hCG に GnRH-Agonist を併用し内因性 LH サージを抑制しながら卵巣刺激を行なった周期で体外受精・胚移植法を行なった。方法：昭和 63 年 9 月より平成元年 1 月の間に当科にて体外受精・胚移植法を受けた 27 例を対象とした。月経周期 (CD) 1 より Buserelin nasal spray 300 μ g を 8 時間毎に噴霧し、CD 3 より HMG 225iu を連日筋注、CD 8 より毎日超音波による卵胞径の計測および 12 時間毎の血中 LH 値を測定した。主席卵胞径が 18 mm を越えた日に HMG 投与を中止、最終 HMG の 52 時間後に hCG 5000 単位筋注、その 36 時間後に超音波ガイド下経膈採卵を行なった。Buserelin 投与は最終 HMG の 20 時間後または hCG 投与直前までとした。採卵の 2-8 時間後に媒精を行ない媒精の 40-50 時間後に胚移植を行なった。黄体補充療法として胚移植の日より 14 日間連日プロゲホルモン 25 mg 筋注を行なった。胚移植後 14 日目の尿テストバック陽性例を妊娠とした。結果：27 例のうち、25 例に採卵を行ない 22 例に胚移植を行なった。hCG 投与前に LH サージを起こした例は認めなかったが、Buserelin を投与中の LH の基礎値は Buserelin 使用しない症例よりむしろ高い値をとった。妊娠例は 4 例であり、刺激周期あたり 15%、胚周期あたり 18% であった。しかし、36 歳未満の症例に限れば妊娠率は 30% (3/10) であった。結論：HMG-hCG 周期に Buserelin を併用することにより内因性 LH サージを抑制できたが、その妊娠率は HMG-hCG 周期で Buserelin を使用しないにもかかわらず LH サージが起こらなかった場合の妊娠率に比べれば低い値にとどまった。Buserelin の投与法に、なお工夫が必要であると考えられた。

7. スプレキュア-HMG-HCG 療法による IVF-ET と妊娠例

田坂慶一・倉智博久・三宅 侃
亀田 隆・佐治文隆・谷澤 修
(大阪大産婦)
緒方正美 (緒方病院)

我々はスプレキュア-HMG-HCG 療法による排卵誘発の後 IVF-ET を行ない、この療法の有用性を内分泌データとともに検討した。

対象：IVF-ET を治療目的とした不妊症患者 13 人 14 周期である。患者平均年齢は 35.8 歳、平均不妊期間は 7.5 年であった。不妊原因の内訳は卵管因子 11 例、男性因子 5 例、その他 2 例である。

方法：月経の 2 日目よりスプレキュア 900 μ g を 2 週間投与し卵胞が発育していないことを確認し HMG-HCG 療法を行なった。卵胞発育は経膈超音波検査および尿中エストロゲン測定にて行ない、長径 18 mm 以上の卵胞が複数個になった時点で HCG を注射し、36 時間後に採卵を行なった。スプレキュア投与前後、HCG 注射時および黄体期に採血し、種々のホルモン測定を行なった。

成績：スプレキュア投与前 LH、FSG、 E_2 値は平均 26.5、12.5 mIU/ml、82.3 pg/ml、2 週間投与後の値は 25.8、9.7 mIU/ml、77.5 pg/ml とさほどの変動を示さなかった。HCG 投与時、血中 E_2 値は平均 1413 pg/ml、P 値は 0.6 ng/ml、黄体期 P 値は 50.1 ng/ml であった。本療法中に採卵のキャンセルはなく、平均採卵数は 4.0 個であった。本療法中 2 例妊娠に至ったが 1 例は初期流産に終わった。

本療法は IVF-ET を行なう際、有用と思われ、今後投与薬剤、投与方法につき検討を加えたい。

8. Superoxide Dismutase による マウス 2-cell ブロックの解除について

松本 央・野田洋一・馬岡 陽
岸 淳二・辰巳賢一・森 崇英
(京都大産婦)

哺乳類初期胚培養において stage specific な胚発生の停止があることが知られている。in vivo では問題なく進行する胚発生が in vitro ではうまく進行しない原因やその機序の詳細については不明であるが、in vitro における胚培養法改善を試みる一つのモデルとしてこの現象を捉えることができる。そこで、in vivo、in vitro における胚を取りまく因子の中で最も異なる因子である O_2 分圧に着目し、 O_2 の不均化反応を触媒することが知られている Superoxide Dis-

mutase (SOD) を培養液に加え、マウス胚発生に及ぼす影響を検討した。

方法：ICR 成熟雌マウスに過排卵処置を行ない、同系雄マウスと交配、翌朝陰栓の認められた雌マウスより胚を HCG 投与 18 時間後に回収し、形態正常な前核期胚のみ培養実験に供した。SOD はウシ赤血球由来の SOD (CuZn 型) を基本培養液の BWW に溶解し、各濃度 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml) の SOD spot を作成、総蛋白量 6 mg/ml となるように BSA を添加した。培養は 37°C, 5% CO₂ in air 下で行ない、24 時間毎に観察し胚盤胞までの分割率をもって 2-cell ブロックの解除効果を検討した。

結果：SOD 無添加では 5.4% の胚盤胞率であった。SOD 添加群では 0.5 mg/ml の濃度より有意差を示し高くなり、2.0 mg/ml の濃度での 62.3% をピークに減少傾向が認められた。次に、SOD 添加培養液に抗 SOD 抗体を添加しその 2-cell ブロック解除効果を検討した。用いた抗体は、r-hSOD をウサギに免疫し、得られた抗血清 (日本化薬より提供) をプロテイン A カラムにかけ IgG を抽出し、透析後凍結乾燥したもので、対照には正常ウサギ血清 (NRS) に同様の処理を行ない、得られた IgG を用いた。0.5 mg/ml SOD 添加培養液に抗血清由来 IgG 1.25 mg/ml を添加した場合、17.6% の胚盤胞率が得られたのに対し、NRS 由来 IgG の添加では 63.8% で、0.5 mg/ml SOD 単独では 62.1% であった。

結論：r-hSOD を培養液に添加すると 2-cell ブロック解除効果あり、その効果が抗 SOD 抗体により低下することから、2-cell ブロックの解除は SOD 分子による直接効果であることが示唆された。

9. 低酸素濃度培養系における

マウス 2-cell ブロック解除について

馬岡 陽・野田洋一・松本 央
岸 淳二・辰巳賢一・森 崇英
(京都大婦産)

目的：マウスの系統の中でも 2-cell ブロックが著しい TUCK (outbred) を用いて、低酸素濃度下で採卵と胚培養を行ない、酸素が胚発生に及ぼす影響を検討した。

方法：TUCK 系幼若雌マウスに過排卵処理 (PMSG 5 単位, hCG 5 単位 48 時間間隔) を加えた後、同系雄マウスと交配させて hCG 投与 18 時間後に得た前核期胚を本実験に供した。培養液は 0.3% BSA 添加 BWW, 培養 dish は 4-well chamber (Nunc) を用いた。外気を遮断し、混合ガス (5% O₂ 5% CO₂ 90% N₂) を注入して可及的に 5% 酸素濃度に保てる

閉鎖系を作製し、胚の回収を行なった。さらに同混合ガスを連続的に注入し、37°C, 5% O₂ 5% CO₂ 90% N₂ の気相下で 96 時間の培養を行なった後に胚の発育を観察し、これを低酸素濃度培養群とした。なお同系の前核期胚を、大気中で採卵し、37°C 5% CO₂ 95% Air の気相下で 96 時間培養したコントロール群と比較検討した。統計処理は、両群の胚盤胞数を算出し胚盤胞率を χ^2 乗検定で比較検討した。

結果：低酸素濃度培養群の胚盤胞率は 28.4% (57/201) で、コントロール群の 1.3% (3/231) に比較して有意に高値であった。(P < 0.01)

考察：以上の結果から、胚の初期発生において、酸素濃度が重要な役割を果していることが明らかとなった。すなわち 2-cell ブロックに酸素毒性が関与している可能性が示唆され、現在、更なる検討を加えている。

10. 顆粒膜細胞との共培養による牛体外受精卵の発育性に関する研究

中澤由美・細井美彦・三宅正史
内海恭三・入谷 明
(京都大農学部畜産)

ウシ受精卵は通常体外培養系において 8 細胞期でその発生が停止する。そのためウシ体外成熟・体外受精卵を子宮内移植に供する事が可能な胚期まで発生させるために、卵管細胞などの種々の細胞との共培養が試みられ一定の成果が得られている。本実験では、ウシ未成熟卵子の体外成熟・体外受精を常法に準じて行ない、授精 48 時間後に 3-8 細胞に発育した胚を顆粒膜細胞と共培養し、細胞の濃度・共培養開始時の細胞の日齢・発生培地中の血中濃度が体外授精後の胚発生に及ぼす影響について検討した。

その結果、8 細胞期以上に発育したものは細胞無添加区では 43.9% (36/82), 1×10^4 cell/ml 添加区では 33.8% (26/77), 1×10^6 cell/ml 添加区では 29.9% (38/127) であり、胚盤胞まで発育したものはそれぞれ 0% (0/82), 7.8% (6/77), 7.9% (10/127) であった。また、顆粒膜細胞を予め 1 日間前培養した後添加した区では 33.3% (7/21), 3 日間前培養した区では 35.7% (10/28), 6 日間培養した区では 42.9% (6/14), 9 日間培養した区では 15.8% (6/38) が 8 細胞期以上に達した。更に培養し、胚盤胞期まで達したものは、それぞれ 14.3% (3/21), 21.4% (6/28), 0% (0/14), 7.9% (3/38) であった。発生培地中の血清濃度が 1% の区では 61% (19/31) が 8 細胞以上に発育し 12.9% (4/31) の胚盤胞期胚が得られたが、10% の区ではそれぞれ 23.2

% (10/43), 0% (0/43) であった。

以上の結果から顆粒膜細胞は一定の条件下で体外成熟・体外受精卵の発育を促すことが示された。

11. 子宮内膜症患者血清による NK 活性の抑制作用について

王 輝生・刈谷方俊・神崎秀陽
吉田益美・森 崇英

(京都大婦産)

内田温士

(京大放射線生物研究センター)

子宮内膜症は異所性の子宮内膜の増殖であり、その周辺組織への浸潤増殖などの腫瘍としての性格を持つ。これに対し、個体の免疫学的監視機構が応答し、その発症や進展に関与している可能性が考えられる。NK 細胞は生体内において、腫瘍の発生、初期の増殖を抑制していること、あるいは造血組織、末梢リンパ球などの正常体細胞の一部を認識し、その分化・増殖を調節していることが示唆されている。

そこで我々は子宮内膜症患者 (30 名) と対照として健康な性成熟期婦人 (13 名) および正常成人男子 (10 名) の末梢血清が第三者リンパ球の NK 活性に与える影響を比較検討した。血清は第三者 (4 名) より得たリンパ球浮遊液に各種の比率で添加して一定時間 (2-48 時間) 培養し、このリンパ球を⁵¹Cr で標識した NK 感受性の K-562 細胞と 4 時間混合培養してその細胞障害活性 (NK 活性) を測定した。

子宮内膜症患者血清で処理された群では、対照群血清処理群に比べ有意に NK 活性の低下が認められ、この抑制効果は血清による処理時間の延長や添加血清量の増加によって増強していた。また Danazol 投与による治療の前後で比較し得た症例では、治療後患者血清による NK 活性抑制作用の軽減傾向が認められた。これらの結果は、子宮内膜症患者血清中には NK 活性を抑制する物質が存在している可能性を示唆しており、子宮内膜症病変の進展と宿主の免疫防御機構を考える上で興味深い所見である。

12. 続発性習慣流産におけるツムラ小柴胡湯の使用治験について

井出哲正 (折野病院)

ツムラ小柴胡湯は各種免疫作用が広く知られており、大量投与において、その免疫増強作用が言われているが、今回続発性習慣流産にツムラ小柴胡湯の大量投与が有効で、生児を得たので、ここに報告する。

患者 O. M. 昭和 34 年 12 月 15 日生れ

昭和 59 年 10 月 9 日 3000 g の女兒を正常産。

昭和 60 年 10 月 25 日 HCG, グクチル療法するも流産した。

昭和 61 年 3 月 7 日 HCG, ツムラ当帰芍薬散, グクチル療法するも流産した。

昭和 62 年 2 月 4 日 ツムラ桂枝茯苓丸 投与中に妊娠し漢方脱感作療法施行するも流産した。

昭和 62 年 4 月 20 日 HLAD/DR の検索を行なった。

昭和 62 年 5 月 6 日を最終月経として 6 月 4 日入院しテストバック (+) を認め、ツムラ小柴胡湯のみを 1 日 10 グラム投与した。その後ツムラ小柴胡湯を 1 日 7.5 グラム, 1 日 5.0 グラム, 1 日 2.5 グラムと漢方脱感作療法施行した。

昭和 63 年 2 月 13 日 4795 グラムの女兒を経膣分娩した。

昭和 63 年 8 月 16 日 6 か月検診時に児に異常は認められなかった。

ツムラ小柴胡湯が続発性習慣性流産に有効な症例について報告した。

13. 性ステロイドホルモン投与とヨード剤子宮同時注入による卵巣静止牛の治療

西村和彦・松永 寛・藤谷泰裕
森 達摩

(大阪府農林技術センター)

内海恭三・入谷 明

(京都大農学部)

目的：卵巣静止牛の治療には現在、性腺刺激ホルモンや性腺刺激ホルモン放出ホルモンが用いられている。Progesterone と GTH の組合わせ投与で、ほとんどの卵巣静止牛を排卵させることができるが、受胎率が低く、これらの長期不受胎牛の受胎率向上には子宮環境改善の工夫が必要であると報告されている。本研究は卵巣静止牛にポピドンヨード剤を子宮腔内注入と Progesterone または Progesterone と Estradiol の同時 1 回投与による治療効果を検討した。

材料および方法：63 日以上発情が観察されず、直腸検査で子宮に異常がなく、卵巣にも明瞭な黄体と卵胞が触診されなかった牛を供試した。直検後、供試牛はヨード剤 (明治製菓のイソジン液) 子宮腔内注入のみ、あるいはヨード剤子宮腔内注入と同時に油性 Progesterone 20mg または 200mg もしくは Progesterone 200mg と Estradiol 20mg を筋肉内投与した。処理後の発情で供試牛に人工授精した。

結果と考察：ヨード剤子宮腔内注入のみ対照区に比べ、Progesteroneの投与量の増加にともなって発情回帰率、排卵率、受胎率が向上した。処理後30日までに発情回帰した牛の発情強度はヨード剤子宮腔内注入と同時にProgesterone 200mgとEstradiolを筋肉内投与したもので強まる傾向がうかがえた。

14. 当教室における男性不妊患者の統計的観察

平井 景・砺波博一・清水 篤
上野信之・高崎 登・宮崎 重
(大阪医大泌尿器)

1985年1月から1988年12月までの4年間に大阪医科大学泌尿器科外来を受診した男性不妊新患者数は207例で、これは外来男性新患者数の4.7%にあたる。初診時年齢は30~34歳、不妊期間は2~4年が多かった。11.1%の患者に流行性耳下腺炎、精路や精路周辺の手術などの既往を認めた。精子数による分類では、 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上は54例(26%)であり、 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満は110例(53.1%)で、しかも、このうち $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満は78例(71%)であった。無精子症は43例(20.9%)であった。これらの207例のうち、睾丸生検を施行したものは30例(14.5%)で、精のう腺造影を施行したものは22例(10.6%)で、それぞれの28例と9例に異常が認められた。内分泌学的検査としては、血清FSH、LH、テストステロン、プロラクチンを測定した。

その結果、無精子症症例では、血清FSH、LHとも高値を示す傾向が認められた。テストステロンと精子濃度との間には一定の相関関係はなかった。207例中外科的治療(内精静脈高位結紮術・精路再建術・人工精液嚙造設術)を施行したものは約10%であった。

15. 当科不妊外来の現況

都倉 隆・中村隆一
(国立京都病院産婦)
井田憲司 (京都専売病院産婦)

昭和63年4月より平成元年1月までの期間に、当科不妊外来を受診した原発性不妊患者39例のうち12例、続発性不妊患者46例のうち13例が妊娠し、これらの妊娠率はそれぞれ30.8%、28.3%であり、全体では29.4%であった。当科における不妊外来の現況を把握し新たな指針を模索すべく、この期間の妊娠例につき臨床的に検討を加えたので報告する。

患者の初診時平均年齢は、原発性が29.9歳、続発性が29.7歳であった。初診時における不妊期間は、原発、続発性ともに2年目にピークがあり3年以内

の不妊が67%を占めた。妊娠例では、妊娠時の年齢は23歳~34歳であり、35歳以上の妊娠例は認めなかった。妊娠に至る不妊期間は、3年未満が72%を占め最高は5年であった。妊娠に至る治療期間は、1年未満が68%、2年未満が88%を占めた。主な不妊原因の内訳は、排卵障害29例(36.3%)、卵管因子8例(10.0%)、男性因子7例(8.8%)、子宮内膜症6例(7.5%)、黄体機能不全5例(6.3%)、原因不明25例(31.3%)であった。妊娠率では、排卵障害、黄体機能不全等の内分泌因子を持つ例では、妊娠率が高かった。妊娠例の転帰では、満期出産4例、妊娠継続中17例、外妊はなく流産は4例(流産率16%)であった。clomid妊娠の1例に双胎を認めた。

卵管因子、子宮内膜症、原因不明不妊の妊娠率が低く、かつ2年以上通院患者で妊娠成立したものが12%と低率であったことから、これら難治性不妊患者に対する治療方針の検討、および新しい治療法(IVF、GIFT等)を行ない得る施設との緊密な協働体制作りが必要と思われた。

【特別講演 1】

習慣流産の病態と治療

名古屋市立大学医学部産科婦人科教室
八 神 喜 昭

妊娠が繰返し流産に終わるものを反復流産といい、連続3回以上流産を繰返すものを習慣流産とよんでいる。

従来、流産を反復すればするほど次の妊娠におけるの生児獲得率は低くなることが知られ、古くは、3回連続流産後の次回妊娠においては、70%~80%が流産するといわれて来た。その後、反復流産に対する関心の深まりによる、治療成績の向上にもよるであろうが、多くの臨床統計は、必ずしもそのような高い流産率を示していない。

最近の多くの報告では3回の反復流産後の次回妊娠の流産率は、20~60%であり、決して高いものではなく、我々の調査成績でも約50%の流産率である。

しかしこのような患者の挙児希望は切実なものがあり、その適切な管理が望まれる。

そのためには反復流産患者に対しては系統的な検索を行ない、原因を把握し、それに対し適切な処置をする事が必要である。

この原因検索の結果、1)子宮の異常(子宮奇形、子宮筋腫、子宮内膜症、頸管無力症)2)内分泌異常(黄体機能不全、等)3)感染症、等の異常によるものは、治療対象とされ、その治療効果が期待されるようになって来ているが、検索対象としたうち、これら原因を有するものは40%位と考えられる。

その他、反復流産夫婦の4~8%に染色体異常が認められているが、治療対象とはなり得ない。

このように従来、の諸検査では半数以上が原因不明であり、この原因不明習慣流産に対して夫リンパ球による免疫療法が行なわれるようになり、良好な成績がみられるようになったが、その機序については充分解明されてはいない。

更に、近年、抗リン脂質抗体と胎児死亡の問題が注目されてきている。

このように習慣流産の病態は未解明の点が多く、今後の課題として残されている。

【特別講演 2】

動物の繁殖分野における新技術

京都大学農学部畜産学教室
入 谷 明

産業動物の改良、増殖を効率的にすすめるために、家畜の人工授精、未受精卵や胚の凍結保存、胚移植、クローン動物の生産、産子の性制御、体外受精ならびに形質転換動物の生産などの新しい技術の応用に期待することが大きい。今回は、これらのうち2、3の項目について現状と将来展望についてのべる。

1. 胚移植：胚の移植技術は、人工授精にみられるような雄畜の優良遺伝形質のみならず、優良雌動物の効率利用も期待できる。特にウシのような単胎家畜では、生涯に10頭前後の子孫を残しうるにすぎないが、過排卵処理によって供胚牛から年間20個程度の移植可能胚を得ることができる。したがって生涯に100頭程度の子孫を残すことができる。

2. 胚の凍結保存：中・大型動物では、胚の凍結保存は、胚移植とのかかわりで重要な技術であり、また実験動物ではgene bankとして広く活用されている。近年ヒトIVF-ET計画の中にも組みこまれるようになってきた。

3. 中・大型動物でのクローニング：クローン動物の生産は、(a)、その遺伝的斉一性によって実験動物としての価値が高く、(b)、遺伝形質のすぐれた胚であれば、その割球の分離や胚の分断により、優良個体を急速に増数する手段として有用である。

4. 体外受精：中・大型動物ことに最近ではウシで体外受精が活発に行なわれるようになってきているが、一連の技術のうち未成熟卵胞卵の体外成熟培養法の改良、体外受精後の胚の体外培養法の改善などが注目されている。

5. 形質転換動物の生産：医学分野で発ガン遺伝子を組み込んで病態モデル動物を生産したり、特定の生理活性物質を本来は生産していない動物の特定の臓器で生産させる試みがなされている。また畜産分野でも効率的な乳、肉、毛の生産を期待して、形質転換動物の生産が活発になってきている。

関連学会開催のお知らせ

Tokyo International Symposium on the Recent Advances in Obstetrics and Gynecology

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

President : Professor Rihachi Iizuka

Date : November 26, 1989 (Sunday)

Site : The Kitasato Memorial Hall, School of Medicine, Keio University
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, JAPAN

Tel. 03-353-1211 Ex. 2313, 2393 Fax. 03-226-1667

		【Speaker】		【Chairman】
9:15~9:20	Opening Remarks	R. Iizuka	JAPAN	
9:20~ 9:50	Lecture 1	R. Iizuka	JAPAN	Prof. Iritani
	[Artificial Insemination]			
9:50~10:20	Lecture 2	T. Mori	JAPAN	Prof. Tanizawa
	[Endocrine and Immune Function of the Human Endometrium during Decidualization]			
10:20~10:50	Lecture 3	E. Wallach	U. S. A.	Prof. Tominaga
	[Prostaglandins as Intermediaries in the Ovulatory Process]			
	Coffee Break (10:50~11:10)			
11:10~11:40	Lecture 4	Y. Chang	KOREA	Prof. Sugawa
	[(New) Advance in IVF-ET Program at SNUH]			
11:40~12:10	Lecture 5	L. Mastroianni, Jr.	U. S. A.	Prof. Fujimoto
	[Ectopic Pregnancy-A Reappraisal]			
	Lunch Time (12:10~13:40)			
13:40~14:10	Lecture 6	M. Mizuno	JAPAN	Prof. Okada
	[The Role of Growth Factors in Reproductive Function]			
14:10~14:40	Lecture 7	T. Lee	R. O. C.	Prof. Sekiba
	[Immunogenetic Studies in the Primary and Secondary Recurrent Spontaneous Aborters]			
14:40~15:10	Lecture 8	M. Seppala	FINLAND	Prof. Takamizawa
	[Human Endometrial Proteins: Basic and Clinical Studies]			
	Coffee Break (15:10~15:30)			
15:30~16:00	Lecture 9	L. Mettler	F. R. G.	Prof. Shimizu
	[Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Genital Endometriosis]			
16:00~16:30	Lecture 10	K. Semm	F. R. G.	Prof. Sakamoto
	[The change from Laparotomy to organ-preserving Gynecologic Surgery by Pelviscopy]			

登録料：5000円（昼食含む）

登録申込先：東京新宿区信濃町35 慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

インターナショナルシンポジウム係（お葉書にて申込下さい。なお登録料は当日申し受けます）
日英同時通訳あり。

第8回日本受精着床学会・学術講演会

会 期：平成2年9月13日(木)、14日(金)
会 場：東京ベイ ヒルトン インターナショナル
会 長：大野 虎之進
東京歯科大学 市川総合病院 産婦人科教授

*尚、日本受精着床学会事務局は、平成元年8月1日をもちまして日本大学
医学部産婦人科教室より下記へ移転致しました。

移転先：株式会社 コンベックス内
〒106 東京都港区麻布台1-9-14 A・H-1ビル
TEL：03(589)3460 FAX：03(589)3974

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, 日不妊会誌, 4: 13, 1956
 - b. 単行本の場合
著者名: 著書名, 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: p68, 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、別刷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は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 加高ビル(株)アイシーエス企画内 社団法人 日本不妊学会 事務所とする。

編集会議からのお知らせ

原稿用紙はB5判横書き400字詰のものを使用し、組版に差支えないよう清書して下さい。ワープロを使用しても結構です。(昭和62年9月)

ランニング・タイトル(和文で25字以内、英文では40 letters以内)を記載してください。(昭和63年1月)

編集委員

百瀬和夫(委員長)

味香勝也	石島芳郎	遠藤克
小林俊文	佐久間勇次	白井将文
平川舜	穂坂正彦	

EDITORIAL BOARD

Kazuo MOMOSE (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Yoshiro ISHIJIMA	Tuyoshi ENDO
Toshiumi 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4号

1989年9月25日印刷
1989年10月1日発行

編集兼発行者	百瀬和夫
印刷者	安永修
印刷所	東京都文京区関口1-43-5 有限会社ループ社
発行所	東京都文京区関口1-43-5 社団法人 日本不妊学会 東京都中央区日本橋二丁目14-9 加商ビル (株)アイシーエス企画内 Tel (03) 272-7077 振替口座番号 東京 7-93207