

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 35 No. 1

January
1990

日本不妊学会雑誌

第35巻 第1号

平成2年1月1日

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

会 告

第 35 回日本不妊学会総会および学術講演会 (第 1 回予告)

下記により第 35 回日本不妊学会総会ならびに学術講演会を開催いたしますので、多数の方々が御参加下さいますようお願い申し上げます。

記

期 日 平成 2 年 11 月 15 日 (木) 役員会
16 日 (金) 17 日 (土) 学術講演会
会 場 幕張メッセ
〒 260 千葉市中瀬 2 - 1
Tel 0472-96-0001

なお演題募集要項，特別講演，シンポジウム，その他詳細については第 2 回予告に掲載いたします。

第 35 回日本不妊学会会長
島崎 淳

連絡先：〒 280 千葉市亥鼻 1 - 8 - 1
千葉大学医学部泌尿器科学教室
第 35 回日本不妊学会総会事務局
Tel 0472-22-7171 内線 2242

日本不妊学会誌

第35巻 第1号

平成2年1月1日

——目 次——

原 著

無月経患者における甲状腺ホルモン動態の解析—特に体重減少性無月経患者における性機能との関連性—	阿江 孝・他	1
妊娠例における無治療周期および排卵誘発周期の血中 estradiol および progesterone 値	片山隆章・他	11
GnRH agonist を用いた排卵誘発法におけるホルモン測定値の推移と経陰超音波検査の所見	武内裕之・他	17
尿中 LH 測定は不妊症の予後判定に有用か? (英文)	岡村 隆・他	24
子宮内膜における prolactin の局在に関する検討	黄 宏駿・他	31
妊娠時内分泌動態と性機能の回復に対するプロモクリプチン投与の影響 (英文)	市川喜仁・他	36
血中 Gonadotropin, Prolactin 値の数値分布の検討	辻 泰二・他	44
過食症 (Bulimia) における月経異常の分析 (第一報)	楠原浩二・他	49
体外受精胚移植術における卵巣刺激法について—clomid-HMG と HMG 単独療法と比較検討—	別所健史・他	55
排卵 Stimulation 法と Percoll Preparation 法の併用を中心とした IUI の成績	安江育代・他	60
卵管不妊に対する肉眼手術と顕微鏡手術の治療成績	西田正人・他	66
ヒト精子運動能と PENETRAK test	月川 奏・他	74
排卵障害例に対する温経湯の投与による内分泌変動について —ゴナドトロピンの律動性分泌を含めて—	後山尚久・他	80
クロミフェン無効の正プロラクチン血性排卵障害症例に対する クロミフェン—温経湯併用療法の検討	安井敏之・他	86
経口避妊薬服用時における Fibrinopeptide A, Fibrinopeptide B _{β 15-42} および凝固線溶阻害因子に関する研究	小倉久男・他	94
子宮鏡により診断し得た卵管間質部妊娠の1例	太田博孝・真木正博	102
副腎皮質ホルモン療法により生児を得た抗磷脂質抗体症候群 合併妊娠の一例	松山毅彦・他	106

当科における習慣流産の検査成績と夫リンパ球を用いた免疫療法による 治療成績	鮫島義弘・他	112
成長ホルモンのラット卵巢 DNA 合成及び somatomedin C/insulin-like growth factor 1 レベルに及ぼす影響について：下垂体摘出エストロゲン 処理ラットにおける <i>in vivo</i> での検討 (英文)	臼杵 哲・窪田早百合	120
多嚢胞性卵巢症候群の診断における経腹・経腔超音波検査の比較検討 (英文)	高橋健太郎・他	128
男子不妊症患者における加水分解曲線解析法を用いた 精子 DNA の検討 (第一報)	山本秀和・他	131
分離 Leydig 細胞の testosterone 産生に及ぼす ketoconazole の影響	風間泰蔵・他	137
片側性精索静脈瘤による両側精巣の造精機能障害—実験的研究	石津和彦	142
男子不妊症における精索静脈瘤の手術療法	吉井慎一・他	150
男子不妊症患者的内分泌動態の再評価 —乏精子症患者の血中 LH について—	馬場良和・他	156
精索静脈瘤に対するプロスタグラディン合成酵素阻害剤の効果	石井弘之・他	159
男子不妊症に対する α -Blocker, β -Stimulant 併用療法の臨床的検討	山下良孝・他	165
先天性副腎性器症候群における神経血管保存法及び逆 U 字皮弁法を用いた 外陰部形成術	磯山理一郎・他	170
特発性男子不妊症に対する内分泌療法	布施秀樹・他	175
冷蔵および凍結保存ハムスター卵使用によるハムスターテスト	星 和彦・他	182
マウス胚の発育に及ぼす Fibronectin の影響	千代倉由子	188
着床周辺期における prostaglandins の役割に関する研究	持木昭人・他	195
マストミスにおける卵巢間質腺細胞の微細構造と組織化学的特徴	新村末雄・石田一夫	203
Lysophosphatidyl choline 処理ウサギ精子の capacitation および 受精能力について (英文)	佐藤嘉兵・後藤 勤	209
地方部会講演抄録		213

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 35, No. 1, 1990)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- The Levels of Thyroid Hormones in Patients with
Menstrual Disorders *T. Ae, K. Katayama & M. Mochizuki* 1
- Serum Estradiol and Progesterone Level During Untreated
and Ovulation Induced Pregnant Cycles *T. Katayama, K. Shintani,
S. Taga, Y. Kawahara, N. Hayashi,
K. Urabe, N. Yoshida & K. Sekiba* 11
- Hormonal Assay and Transvaginal Ultrasonographic
Findings with the Use of GnRH-agonist
in Ovarian Hyperstimulation *H. Takeuchi, S. Ito,
M. Fukuda & M. Takada* 17
- Urinary hLH Surge as a Predictor of
Possible Pregnancy *T. Okamura, T. Takeuchi,
O. Nishii & T. Yaginuma* 24
- Significance of Localization of Prolactin in
Human Endometrium *H. J. Huang, S. Okamoto,
T. Ishimaru & T. Yamabe* 31
- Endocrine Function During Pregnancy Following
Bromocriptine Treatment in Infertile Women with
Hyperprolactinemia; Recovery of Sexual Functions
Following Delivery *Y. Ichikawa, S. Miyakawa & S. Usuki* 36
- What Distributions do the Sets of the
Data of Plasma Gonadotropin and Prolactin
Levels Come from? *T. Tsuji, M. Nishida,
T. Kubo & H. Iwasaki* 44
- Menstrual Disorder in Bulimia *K. Kusuhara, M. Kawakatu,
H. Motoyama, Y. Odawara, K. Ochiai,
I. Yasue & Y. Terashima* 49
- A Comparative Study of Clomid-HMG and HMG for
Follicular Stimulation in IVF-ER/GIFT Treatment *T. Bessho, Y. Koyasu,
H. Shibahara, M. Shigeta & S. Isojima* 55

A Retrospective Study of Intrauterine Insemination with Ovarian Stimulation and Percoll Separated Spermatozoa	I. Yasue, A. Okamoto, H. Motoyama, M. Kawakatsu, Y. Odawara, N. Watanabe, K. Matsumoto, K. Ochiai, K. Kusuhara & Y. Terashima	60
Comparison Between Macrosurgical and Microsurgical Treatment on Tuboplasty	M. Nishida, T. Tsuji, H. Yamanouchi, H. Iwasaki, K. Amano, H. Tatsumi & M. Arai	66
The Relationship between Human Sperm Motility and PENETRAK test	S. Tsukikawa, K. Hoshi, K. Yanagida, C. Endo & A. Sato	74
Endocrinologic Studies of Unkei-to (TJ—106) in Anovulatory Women—With an Effect on Pulsatile Secretion of Gonadotropins—	T. Ushiroyama, S. Tsubokura, H. Imoto, H. Yamashita, T. Okazaki & O. Sugimoto	80
Studies on the Combination Treatment with Unkei—to and Clomiphene Citrate	T. Yasui, T. Aono, M. Irahara, H. Takahashi, J. Yoshida, H. Ino, Y. Sakamoto, A. Ikawa, H. Takahashi, O. Naka, A. Sakaguchi, T. Yoshimoto, Y. Kishi, A. Yamashita, M. Kawano, M. Takayanagi, M. Kamada, M. Maegawa, T. Kamada, N. Nagamachi, K. Nakago, M. Ihara, S. Kuroiwa, T. Okayama, S. Takeuchi, S. Miki & K. Fujishima	86
Studies on Fibrinopeptide A, Fibrinopeptide B _{β 15-42} and Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis during Use of Oral Contraceptives	H. Ogura, Y. Katsumi, H. Nakagomi, T. Takeda, M. Kawamura, M. Yokoyama & A. Iwaki	94
Hysteroscopic Diagnosis of a Case with Interstitial Tubal Pregnancy	H. Ota & M. Maki	102
A Pregnancy with the Antiphospholipid Antibody Syndrome Treated by Prednisolone	T. Matsuyama, K. Iwasaki & A. Fujii	106
Habitual Abortion: Parental Sharing of HLA and Immunotherapy	Y. Samejima, T. Kameda, T. Kimura, Y. Tokugawa, A. Wakimoto, K. Ohashi, M. Koyama, N. Matsuzaki, C. Azuma, F. Saji & O. Tanizawa	112
Increase in Deoxyribonucleic Acid Polymerase α Activity Related to Deoxyribonucleic Acid Synthesis Due to Growth Hormone in Ovaries of Immature Hypophysectomized Estrogen-Treated Rats	S. Usuki & S. Kubota	120

Comparative Study of Transvaginal Ultrasound with Transabdominal Ultrasound for Diagnosing Polycystic Ovarian Disease	<i>K. Takahashi, A. Nishigaki, Y. Eda, M. Kusakari, K. Yoshino & M. Kitao</i>	128
A Study of Sperm DNA in Infertile Men Using an Acridine Orange Hydrolysis Curve Analysis (Preliminary Report)	<i>H. Yamamoto, K. Naito, H. Hisazumi, N. Miyoshi & M. Fukuda</i>	131
The Effects of Ketoconazole on Steroidogenesis in Purified Rat Leydig Cells	<i>T. Kazama, S. Satomi, I. Sasagawa, T. Terada & T. Katayama</i>	137
Impairment of Spermatogenesis in Bilateral Testes by Unilateral Vasectomy: Experimental Study	<i>K. Ishizu</i>	142
Operative Therapy Varicocele in Infertile Men	<i>S. Yoshii, F. Manabe, H. Tomomasa, H. Takeshima, H. Ishikawa & K. Koiso</i>	150
Re-evaluation of the Endocrinological Analysis of Male Infertility—the Serum LH in Oligozoospermic Males—	<i>Y. Baba, T. Ueno, K. Ishizu, R. Isoyama, H. Takihara & J. Sakatoku</i>	156
Effect of Prostaglandin Synthetase Inhibitor on Varicocele	<i>H. Ishii, H. Fuse, H. Sumiya, M. Takahara, Y. Shiseki & J. Simazaki</i>	159
Clinical Evaluation of Combined α -Blocker and β -Stimulant Therapy in Patients with Male Infertility	<i>Y. Yamashita, A. Nagai, T. Oheda, Y. Kohama, T. Ohashi & H. Ohmori</i>	165
Surgical Reconstruction of the External Genitalia with Preservation of the Neuro-vascular Bundle and Using an Opposite U Skin Flap in Congenital Adrenogenital Syndrome	<i>R. Isoyama, G. Yamakawa, Y. Baba, H. Takihara & J. Sakatoku</i>	170
Hormonal Treatment to Idiopathic Male Infertility	<i>H. Fuse, Y. Shiseki, M. Takahara, H. Ishii, H. Sumiya & J. Shimazaki</i>	175
Human Sperm Penetration into Refrigerated or Frozen-thawed Zona-free Hamster Oocytes	<i>K. Hoshi, K. Watanabe, H. Sasaki, S. Naruse, M. Ookoshi, C. Endo & A. Sato</i>	182
Effect of Fibronectin on the Development of Mouse Embryos	<i>Y. Chiyokura</i>	188
A Study of Uterine and Endometrial Prostaglandins Synthesis, Binding and Specific Uptake during Periimplantation Period	<i>A. Mochiki, S. Nakagawa, T. Takahashi, H. Sakamoto, K. Den & S. Takagi</i>	195

Ultrastructural and Histochemical Characteristics of
Interstitial Gland Cells in the Mastomys,
Praomys Natalensis*S. Niimura & K. Ishida*203

In Vitro Capacitation and Fertilizing
Ability of Rabbit Spermatozoa Treated with Lysophosphatidyl
Choline*K. Sato & T. Goto*209

無月経患者における甲状腺ホルモン動態の解析 —特に体重減少性無月経患者における 性機能との関連性—

The Levels of Thyroid Hormones in Patients with Menstrual Disorders

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 望月真人教授)

阿 江 孝 片 山 和 明 望 月 真 人
Takashi AE Kazuaki KATAYAMA Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University School of Medicine, Hyogo 650, Japan

排卵障害における甲状腺機能を知る目的で無月経患者 76 例を対象に血清 $t\text{-T}_3$, $t\text{-T}_4$, $\text{T}_3\text{-RSU}$ などを測定した。血清甲状腺ホルモン, 特に $t\text{-T}_3$ は体重減少性無月経患者において正常月経周期婦人に比して有意に低値であり, この傾向は「やせ」の程度の強い患者ほど著明であった。また, 活性型のホルモンである $f\text{-T}_3$, $f\text{-T}_4$ も体重減少性無月経患者あるいは神経性食思不振症の患者では有意に低値であった。

これらの症例における血清 TSH はほとんどのものが正常域にあり, TRH に対する反応性もほぼ正常であったが, 数例に高 TSH 血症がみられた。

血清 $t\text{-T}_3$, $t\text{-T}_4$ とゴナドトロピンとの関係を見ると, 特に $t\text{-T}_3$ と LH の間には正の相関があり, $t\text{-T}_3$ が 100 ng/dl 以下では LH の値が 15 mIU/ml を越えるものは稀であった。

以上の成績より, ①体重の減少に伴う無月経患者では血清甲状腺ホルモン, 特に T_3 が低値である②これらの症例における T_3 の低値は甲状腺自体の障害に基づくものは少なく, 末梢における T_4 から T_3 への転換の障害, あるいは視床下部の機能的障害に基づく③体重の減少に伴う無月経患者における性機能異常は血清甲状腺ホルモンレベルの低下に一因がある, などといった可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 1-10, 1990)

緒 言

甲状腺機能異常患者に月経異常が多発することは古くからよく知られた事実である^{1,2)}。甲状腺機能亢進症の月経異常の mechanism については Akande と Anderson³⁾が sex hormone binding globulin (SHBG) 上昇に基づくひとつの仮説を提唱しているし, Tanaka ら⁴⁾は LH-RH に対する LH の過剰反応性を指摘している。一方, 甲状腺機能低下症に関して, Akande⁵⁾は血清 LH, FSH, E_2 のいずれもが低値であり, FSH/LH 比が高いことを指摘した。

しかし, 月経異常患者の臨床分類別病態を甲状腺の機能状態との相関から詳細に検討した報告は現在のところみあたらない。そこで, 今回われわれは, 月経異常, 中でも無月経を主症状とする患者を対象に, その甲状腺機能を血清 total triiodothyronine ($t\text{-T}_3$), thyroxine ($t\text{-T}_4$), および¹³¹I-レジン・スポンジ摂取率 ($\text{T}_3\text{-RSU}$) 測定的面から検討した。また上記の測定項目に異常のみられた患者ではさらに free triiodothyronine ($f\text{-T}_3$), free thyroxine ($f\text{-T}_4$) などを測定するとともに TRH 負荷による TSH の測定をも併せ行ないその病態を探った。

対象と方法

対象

1) 無月経患者

昭和 59 年 1 月から昭和 63 年 8 月までに神戸大学医学部産科婦人科外来を受診した 16 歳から 39 歳 (25.7 ± 5.59 歳, mean $\pm$ SD) の無月経患者 76 例を対象とした。無月経患者の内訳は、第 1 度無月経 35 例 (25.7 ± 5.40 歳)、第 2 度無月経 41 例 (25.6 ± 5.69 歳) である。両者の識別は progesterone 50mg の筋注により消退性出血の認められるものを第 1 度無月経 (Am I^o)、認められないものを第 2 度無月経 (Am II^o) とした⁶⁾。

Am I^o 群はさらに、clomiphene 150mg にて排卵が起こらず、血清 LH の基礎値が 30 mIU/ml 以上、testosterone が 0.8 ng/ml 以上を示した症例⁶⁾を多嚢胞性卵巣症候群 PCO (10 例)、その他を視床下部性無月経 (25 例) として 2 群に分類した。

同様に Am II^o 群は、FSH, LH の両者が 30 mIU/ml 以上のものを卵巣性無月経 (7 例)、FSH, LH の基礎値が 10 mIU/ml 以下で LH-RH test に反応のあるものを視床下部性無月経 (27 例)、FSH, LH が 5 mIU/ml 以下で LH-RH test に無反応のものを下垂体性無月経 (2 例)、プロラクチン値が 25 ng/ml 以上のものを高プロラクチン血症 (7 例) として 4 群に分けた^{7,8)}。

視床下部性無月経群の中には、体重の減少を契機に無月経に陥った、いわゆる体重減少性無月経⁹⁾の患者は Am I^o 群に 9 例 (22.9 ± 3.48 歳)、Am II^o 群に 16 例 (25.6 ± 5.69 歳) みられた。それらの体重、比体重 (松木の標準体重表より算定した標準体重 IBW を 100% とした場合の % IBW) は、Am I^o 群で 48.0 ± 3.35 kg, 90.3 ± 9.49 , Am II^o 群で 44.2 ± 4.75 kg, 79.7 ± 8.26 であった。なお、この中には神経性食思不振症の中核群に属する症例は含まれていない。

対照は正常月経周期を有する婦人 26 例 (28.4 ± 3.10 歳) である。

2) 神経性食思不振症患者

神経性食思不振症の患者 8 名 (22.3 ± 5.57) 歳を体重減少性無月経との比較に用いた。患者の体重および比体重はそれぞれ 34.6 ± 3.98 kg, 62.1 ± 7.13 であった。なお、本症の診断は厚生省特定疾患、神経性食思不振症調査研究班による、神経性食思不振症中隔群の診断基準¹⁰⁾にしたがった。

方法

1) 甲状腺ホルモンの測定

無月経患者は外来初診時に、正常月経周期婦人で

は周期の 5~10 日目にそれぞれ肘静脈より採血した。採取した血液は血清に分離した後 -20°C で凍結保存し、甲状腺ホルモン、TSH および T_3 -RSU の測定に供した。

また TRH test は、当日朝絶食とし、午前 10 時に TRH (武田製薬) 500 μg を静注することにより行なった。

血清 t-T_3 , t-T_4 , f-T_3 , f-T_4 および TSH は radioimmunoassay (第一ラジオアイソトープ社 RIA キット) にて測定し、 T_3 -RSU は charcoal beads 法にて測定した。

2) LH, FSH の測定

甲状腺ホルモンなどを測定した同一検体を RIA (LH キット「第一」、FSH キット「第一」、第一ラジオアイソトープ社) により測定した。

3) 有意差の検定

有意差の検定は Student の t test によった。成績

血清 t-T_3 値は、正常月経周期婦人 (対照群) の 145.0 ± 18.1 ng/dl (mean $\pm$ SD) に対し、Am I^o 群では 138.3 ± 24.2 ng/dl と有意の差はなかったが、Am II^o 群では 121.1 ± 38.9 ng/dl と対照群に比し有意 ($P < 0.01$) に低値であった。

血清 t-T_4 値は、対照群の 8.61 ± 1.02 μg /dl に対し Am I^o 群では 8.39 ± 1.07 μg /dl, Am II^o 群では 7.92 ± 2.12 μg /dl で、両者共に対照群との間に有意の差を認めなかった。

Am I^o 群、Am II^o 群の T_3 -RSU の値はそれぞれ 28.3 ± 2.94 , 27.8 ± 3.48 で、対照群の 28.6 ± 3.21 に対し、有意の差は認められなかった。

Am I^o 群、Am II^o 群をそれぞれ、前者は PCO 群、視床下部性無月経群に、後者は卵巣性無月経群、下垂体性無月経群、視床下部性無月経群、高プロラクチン性無月経群に分け血清 t-T_3 の値をみたのが図 1 である。Am I^o 群についてみると、PCO 群における t-T_3 値は 148.1 ± 10.9 ng/dl で、対照群の 145.0 ± 18.1 ng/dl との間に有意の差を認めなかったが、視床下部性無月経群では 135.1 ± 26.1 ng/dl と低値の傾向にあり、このうちの体重減少性無月経群では 123.2 ± 28.3 ng/dl と明らかな ($P < 0.02$) 低値であった。

Am II^o 群では、卵巣性無月経群、高プロラクチン血症性無月経群で t-T_3 値はそれぞれ 160.6 ± 32.6 ng/dl, 142.9 ± 33.0 ng/dl で対照群との間に有意の差を認めなかったが、下垂体性無月経群、視床下部性無月経群ではそれぞれ 102.0 ± 8.49 ng/dl, 103.2 ± 28.6 ng/dl と有意に ($P < 0.005$) 低値であ

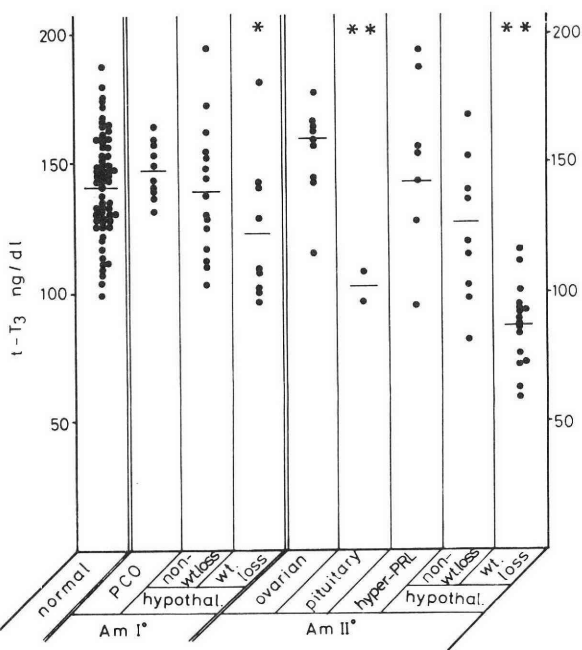


図1 無月経患者における血清t-T₃濃度
血清t-T₃濃度は、対照群に対しAm I°群では体重減少性無月経群のみで、Am II°群では下垂体性無月経群および体重減少無月経群で有意に低値であった。

* p < 0.02, ** p < 0.001

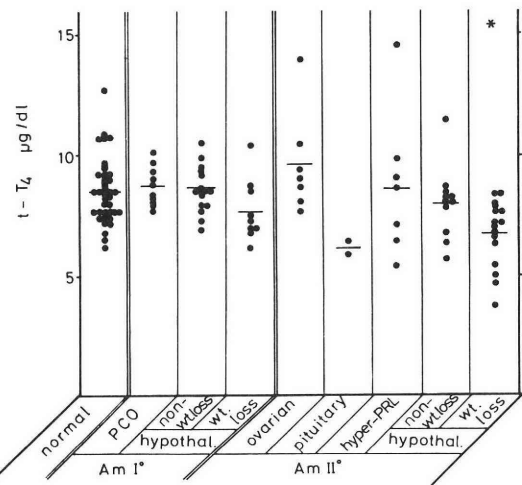


図2 無月経患者における血清t-T₄濃度
血清t-T₄濃度は、対照群に対しAm II°群の中の体重減少性無月経群のみにおいて有意に低値であった。

* p < 0.05

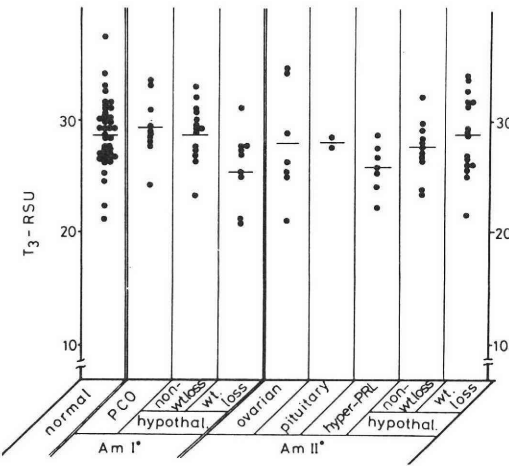


図3 無月経患者におけるT₃-RSU値
無月経のいずれの群のT₃-RSU値は対照群との間に有意の差を認めなかった。

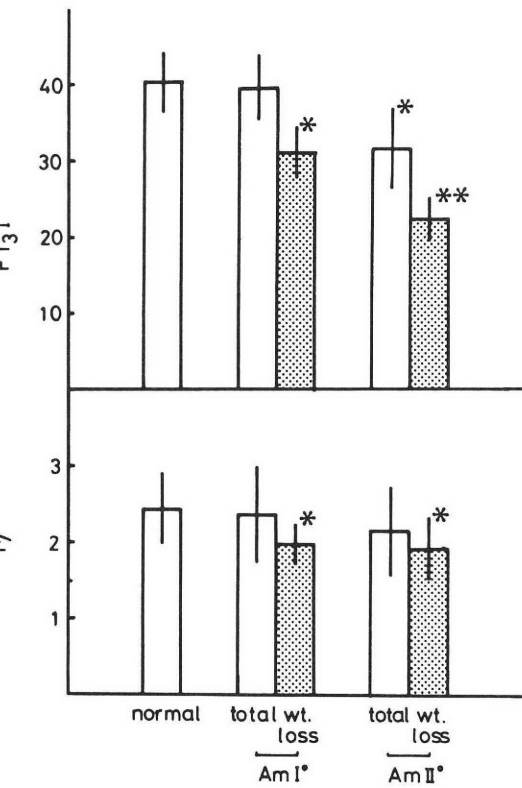


図4 無月経患者におけるFT₃IとT₇
FT₃とT₇はいずれも対照群に対しAm I°群、Am II°群の体重減少性無月経群で有意に低値であった。

* p < 0.01, ** p < 0.001

った。さらに視床下部性無月経群のうち体重減少性無月経群では 87.1 ± 16.0 ng/dl と著明 ($P < 0.001$) に低値であった。

図 2 は $t-T_4$ の成績である。Am I° 群の $t-T_4$ 値は PCO 群、視床下部性無月経群でそれぞれ 8.70 ± 0.81 μ g/dl, 8.21 ± 1.26 μ g/dl で対照群の 8.52 ± 1.14 μ g/dl との間に有意の差を認めなかった。これらの群のうち体重減少性無月経群ではその値は 7.68 ± 1.31 μ g/dl で、対照群よりやや低値ではあるものの有意の差はなかった。

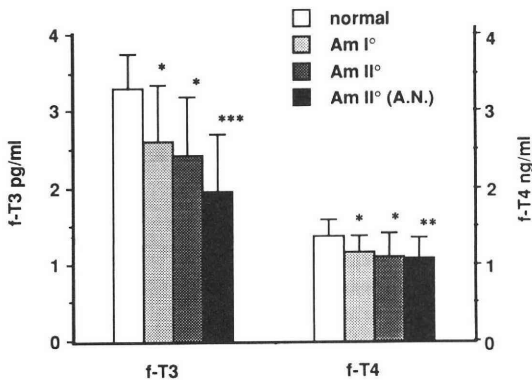


図 5 体重減少性無月経患者および神経性食思不振症患者における血清 $f-T_3$ および $f-T_4$ 濃度

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
*** $p < 0.001$

Am II° 群についてみると、卵巣性無月経群、高プロラクチン血症性無月経群では、 $t-T_4$ 値はそれぞれ 9.64 ± 2.13 μ g/dl, 8.77 ± 3.01 μ g/dl で対照群との間に有意の差はなかった。下垂体性無月経群、視床下部性無月経群ではそれぞれ 6.18 ± 9.83 μ g/dl, 7.25 ± 1.52 μ g/dl で低値の傾向にあった。視床下部性無月経群のうち体重減少性無月経群では 6.78 ± 1.38 μ g/dl と有意に ($P < 0.05$) 低値であった。

図 3 に T_3 -RSU の成績を示した。 T_3 -RSU の値は Am I° 群、Am II° 群に属するいずれの無月経群の値も対照群との間に有意の差を認めなかった。

体重減少性無月経群の血清 $t-T_3$ 値および $t-T_4$ と T_3 -RSU 値より free T_3 Index (FT_3I), free thyroxine index (T_7) を算定し、その値を対象群のそれと比較して示したのが図 4 である。

上段は FT_3I の成績を示したものである。対照群の 40.9 ± 7.23 に対し、Am I° 群全体では 39.3 ± 8.15 で有意の差はみられなかったが、Am I° 群でのなかの体重減少性無月経群では 32.4 ± 6.80 で有意 ($P < 0.01$) に低値であった。また Am II° 群全体では 33.3 ± 10.1 と有意に低値であるが、このなかの体重減少性無月経群では 25.1 ± 5.27 とさらに低値 ($P < 0.001$) であった。

下段は T_7 の成績を示したものである。Am I° 群全体、Am II° 群全体の値はそれぞれ 2.36 ± 0.40 , 2.18 ± 0.58 で対照群の 2.43 ± 0.47 に対し有意の差はみられ

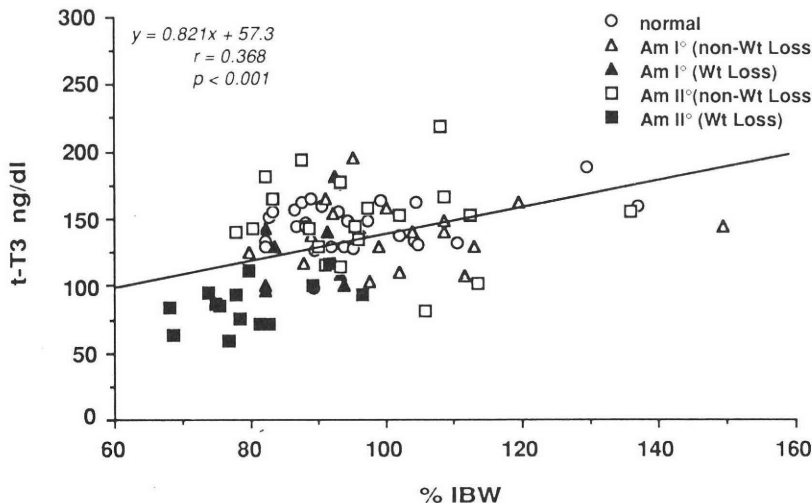


図 6 無月経患者における比体重と血清 $t-T_3$ の相関
比体重と血清 $t-T_3$ との間には有意 ($P < 0.001$) の正の相関関係が認められる。

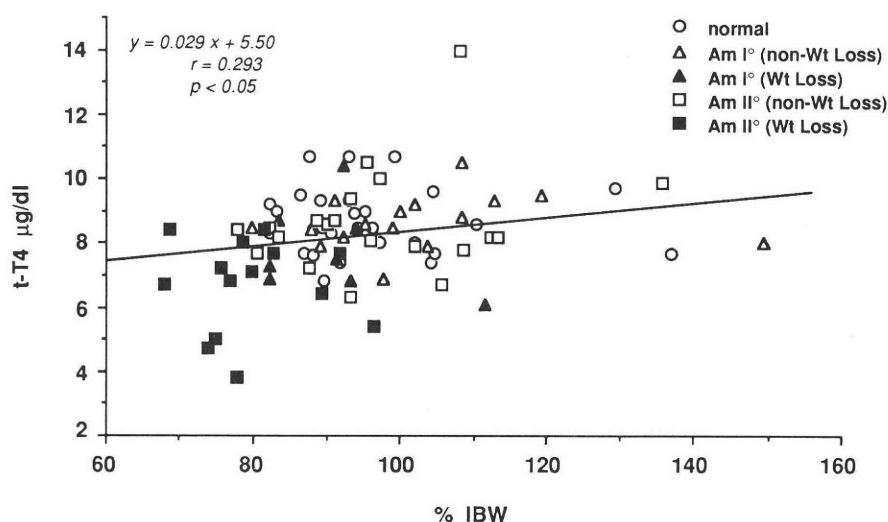


図7 無月経患者における比体重と血清 $t-T_4$ の相関
比体重と血清 $t-T_4$ との間には弱いながらも有意
($p < 0.05$) の正の相関関係が認められる。

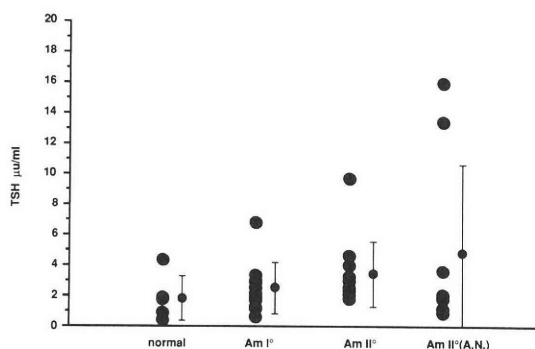


図8 体重減少性無月経患者および神経性食思不振症患者における血清 TSH
いずれの群の TSH の値も対照群との間に有意の差は認めない。

なかったが、体重減少性無月経については Am I° 群、Am II° 群でそれぞれ 1.97 ± 0.26 , 1.94 ± 0.41 と対照群に比して有意 ($p < 0.01$) に低値であった。

図5は体重減少性無月経患者における free T_3 , free T_4 の値を対照群ならびに神経性食思不振症の患者との比較において示したものである。

free T_3 値は対照群の 3.31 ± 0.48 pg/ml に対し体重減少性無月経では第1度無月経、第2度無月経でそれぞれ 2.61 ± 0.74 pg/ml, 2.44 ± 0.75 pg/ml, 神

経性食思不振症では 1.88 ± 0.62 pg/ml でいずれも有意に低値であった。

free T_4 値も対照群の 1.39 ± 0.21 ng/ml に対し体重減少性無月経では第1度無月経、第2度無月経でそれぞれ 1.17 ± 0.21 ng/ml, 1.10 ± 0.32 ng/ml, 神経性食思不振症で 1.02 ± 0.29 ng/ml であり、いずれも有意に低値であった。

図6は松木による標準体重表より算出した比体重(% IBW)を横軸に、 $t-T_3$ の血清濃度を縦軸プロットし、無月経患者および正常月経周期を有する婦人肥満率と $t-T_3$ との関係を見たものである。

比体重と $t-T_3$ との関係は $y = 0.74x + 138.4$ で表すことができ、その相関係数は 0.368 で有意 ($p < 0.001$) の正の相関を示した。Am I° の症例、Am II° の症例とも体重減少性のものは比体重、 $t-T_3$ とも低値を示す傾向にあるが、特に Am II° の体重減少性無月経患者ではその傾向がきわめて顕著であった。同じく比体重が低値であっても正常月経周期を示す婦人での $t-T_3$ は 100 ng/dl 以下を示す症例をほとんど認めなかった。

図7は比体重と $t-T_4$ の関係を示したものである。両者の間には $y = 0.023x + 8.42$ という関係式が成立し、その相関係数は 0.293 で弱いながらも有意 ($p < 0.05$) の正の相関を示した。

図8は体重減少性無月経患者および神経性食思不振症の患者の血清 TSH レベルを対照群のそれと比較し

て示したものである。TSH の値は対照群の $1.81 \pm 1.42 \mu\text{U/ml}$ に対し、体重減少性第 1 度無月経患者では $2.40 \pm 1.63 \mu\text{U/ml}$ 、体重減少性第 2 度無月経（非神経性食思不振症）、神経性食思不振症ではそれぞれ 3.30 ± 2.10 , $4.80 \pm 5.82 \mu\text{U/ml}$ である。無月経の群で高値を示すものの対照群との間に有意の差は見られなかった。しかし、第 1 度無月経群の中に 1 例 ($6.8 \mu\text{U/ml}$)、第 2 度無月経群（非神経性食思不振症）の

中に 1 例 ($9.7 \mu\text{U/ml}$)、神経性食思不振症候群の中に 2 例 ($13.5 \mu\text{U/ml}$, $16.4 \mu\text{U/ml}$) の TSH が異常高値の症例を認めた。

図 9 は同対象の TRH に対する TSH の反応性をみたものである。血清の基礎値が正常域にあるものでは、大部分の症例が正常の反応を示したが、Am I° 群の 2 例、Am II° 群の 7 例、神経性食思不振症症例の 1 例において TSH の反応遅延がみられた。また、

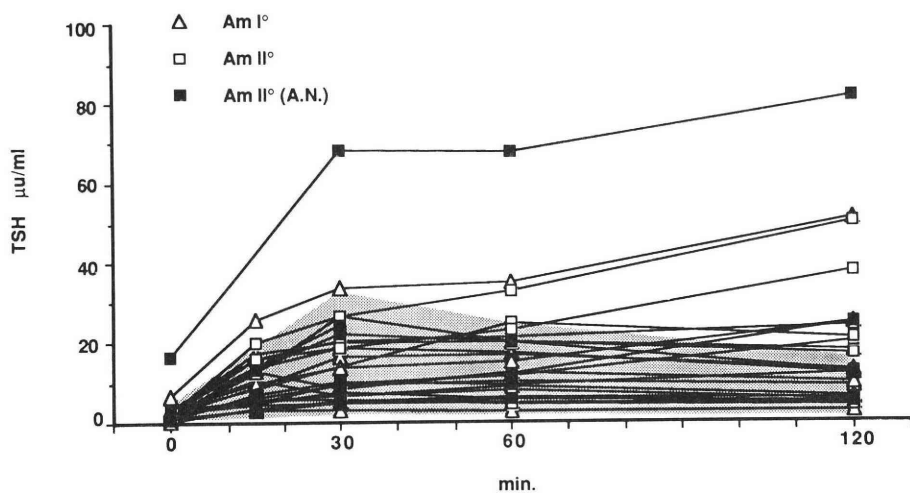


図 9 体重減少性無月経患者および神経性食思不振症患者における TRH に対する血清 TSH の反応性

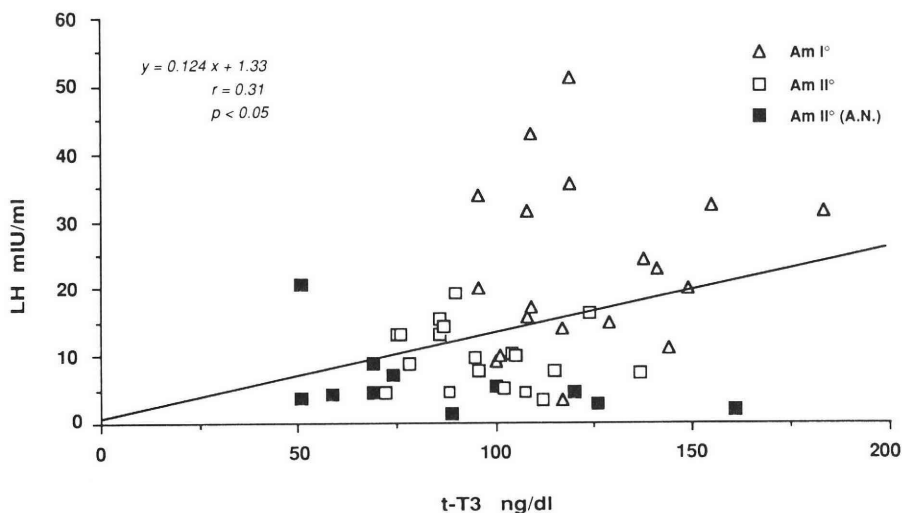


図 10 体重減少性無月経患者および神経性食思不振症患者における血清 $t\text{-T}_3$ 濃度と LH 濃度の相関
血清 $t\text{-T}_3$ 濃度と LH 濃度との間には弱いながらも有意 ($P < 0.05$) の正の相関関係が認められる。

高 TSH を示した神経性食思不振症の患者では TSH の過剰反応がみられた。

図 10 は体重減少性無月経および神経性食思不振症患者の血清 T_3 および LH の基礎値の相関をみたものである。両者の間には $r=0.31$ と弱いながらも有意 ($P<0.05$) の相関がみられた。第 1 度無月経の症例では、 T_3 値が 100 ng/dl 以上、LH 値が 20 mIU/ml 以上を示すものが多いが、第 2 度無月経の症例では両者とも低値であった。図 11 は血清 T_3 と FSH の相関をみたものである。LH の場合と同じ傾向にあるものの両者間に有意の相関関係はみられなかった。

考 察

血清 $t-T_3$ 、 $t-T_4$ および T_3 -RSU を無月経患者において測定したところ、 $t-T_4$ 、 T_3 -RSU については Am I°、Am II° 群とも対照群に比して有意の差を認めなかったが、 $t-T_3$ は Am II° 群において有意に低値であった。そこで、Am II° 群をそれを構成する疾患群に分け、 $t-T_3$ の血清濃度を検討してみた。その結果、 $t-T_3$ は下垂体性無月経患者および視床下部性無月経の中の体重減少性無月経患者の群において有意に低値であった。この成績は、Am II° 群における $t-T_3$ 値の低下が、主としてこの群に多く含まれる体重減少性無月経に起因することを示すものである。

Am I° 群についてもこれと同様の検討を行なってみると、 $t-T_3$ の濃度はやはり体重減少性無月経患者に

おいて対照群あるいは他の疾患群に比して有意に低値であることが判明した。

一方、 $t-T_4$ についても Am I° 群、Am II° 群につき疾患別にその血清濃度を検討してみたところ、 $t-T_4$ は Am II° 群の下垂体無月経患者および体重減少性無月経患者の群で、 $t-T_3$ ほど著明ではないにせよ対照群に比して有意に低値であった。

以上の成績は Miyai ら¹¹⁾、Moshang ら¹²⁾ の神経性食思不振症患者を対象とした成績とも類似しており、体重の減少した患者では血清甲状腺ホルモン濃度、特に T_3 値が低値であることを示すものといえる。

なお、下垂体性無月経患者の 2 名はいずれも Sheehan 症候群であるので、甲状腺ホルモンの低値の原因は下垂体の TSH 分泌不全に伴うものだと考えられた。また今回の対象の中には 7 例の高プロラクチン血症患者が含まれているが、1 例で $t-T_3$ が 94.0 ng/dl、 $t-T_4$ が 5.4 μ g/dl とやや低い値を示したが、いわゆる甲状腺機能低下性的高プロラクチン血症患者はみられなかった。

ところで、 $t-T_3$ あるいは $t-T_4$ はそれぞれ T_3 と T_4 の遊離型と総合型の総和を示したものであり、いずれも thyroxine binding globulin (TBG) の影響も強く受けるため、必ずしも甲状腺ホルモンのホルモン作用を正確に反映しているものとはいえない。そこで、活性型の甲状腺ホルモンである $f-T_3$ 、 $f-T_4$ をよく反映するとささる FT_3I および T_7 を、 $t-T_3$ 、 $t-T_4$ と

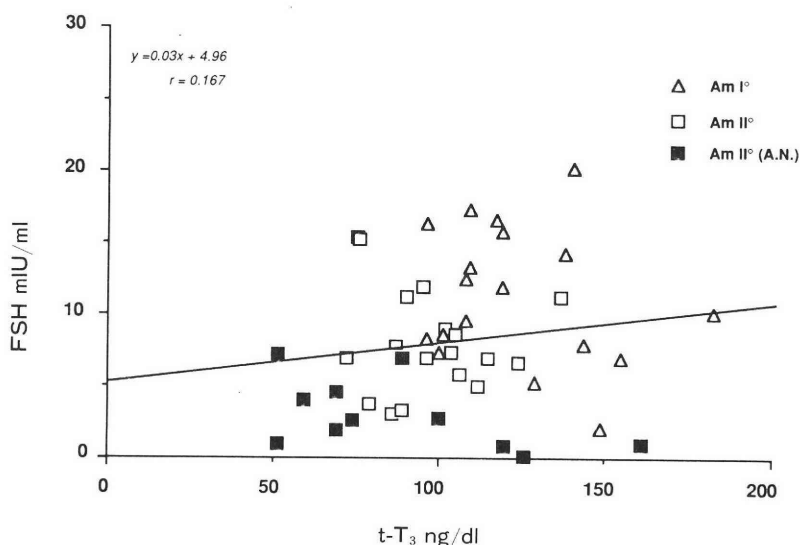


図 11 体重減少性無月経患者および神経性食思不振症患者における血清 $t-T_3$ 濃度と FSH 濃度の相関

T_3 -RSU の値より算定し、Am I 群、Am II 群につき疾患別に検討してみた。その結果は、 $t-T_3$ 、 $t-T_4$ の結果とほぼ同様で、 FT_3I 、 T_7 のいずれも体重減少性無月経患者において有意に低値であった。

さらに、最近 RIA による測定が可能となった $f-T_3$ 、 $f-T_4$ を、体重減少性無月経患者にその重症型と考えられる神経性食思不振症の患者を加えて測定してみた。その結果は図 5 に示してあるごとくで、 $f-T_3$ 、 $f-T_4$ とも体重減少性無月経患者で有意に低く、特に神経性食思不振症の患者では著明に低値であり、 FT_3I および T_7 の成績を裏付けるものであった。

つまり FT_3I 、 T_7 および $f-T_3$ 、 $f-T_4$ の成績は、これらの患者では血清甲状腺ホルモンの総量が少ないということだけでなく、活性型のホルモン量も少なく、したがって、そのホルモン作用も弱いことを示唆している。事実、体重減少性無月経の重症例あるいは神経性食思不振症患者のほとんどのものは低血圧、徐脈などの甲状腺機能低下を思わせる症状を示していた。

そこで、「やせ」の程度と血中甲状腺ホルモンとの関連性をみるため、比体重と $t-T_3$ あるいは $t-T_4$ との相関関係を調べたところ、いずれも有意の正の相関がみられた。つまり、無月経患者、特に体重減少性無月経患者では「やせ」の程度が強いほど甲状腺ホルモン値が低いという関係のあることが示された。特に $t-T_3$ はその関係が明瞭で、比体重が 80 以下では $t-T_3$ も 80 ng/ml 以下となることが多く、しかもそのほとんどが第 2 度無月経であった。

以上の成績より体重の減少に伴う無月経患者では、血清甲状腺ホルモン、特に T_3 が低値となることが明らかとなったが、次いでその障害部位がどこであるかが問題となる。

これを明らかにする目的で、体重減少性無月経および神経性食思不振症患者を対象に血清 TSH の基礎値および TRH に対する反応性を検討してみた。血清 TSH は、体重減少性無月経あるいは神経性食思不振症のいずれの患者においても正常域かやや高いレベルに位置するものが多かったが、4 例に異常高値がみられた。

血清 TSH の値が正常域にある症例に関しては、その障害部位が甲状腺にあるとは考えられず、またかかる症例に TRH を負荷してもその反応はやや遅延するもほぼ正常の反応を示すことから下垂体とも考えられない。したがって、その障害部位は視床下部と考えられるが、Miyai ら¹¹⁾や Moshang ら¹²⁾が神経性食思不振症の患者について指摘したごとく、これらの患者では T_3 の低値が著しいのに比し、 T_4 の低値は

比較的軽度である。このことからすると、やはり体重減少性無月経についても T_3 の低値は神経性食思不振症と同様末梢における T_4 より T_3 への転換の障害にその理由を求めるのが最も妥当であろう。

末梢（特に肝）での甲状腺ホルモンの代謝について Sullivan ら¹³⁾は、神経性食思不振症や飢餓状態にある患者などでは T_4 より T_3 への転換酵素である 5'-monodeiodinase の活性が抑制されるため T_3 の産性が減少するとしている。この現象は体重の減少した患者ではその原因が何であろうと一般的にみられるいわば個体の自己防衛反応であり、栄養の供給不足に対して代謝を抑制し、エネルギーの消費をできるかぎり減らそうとするもので、体重減少性無月経にもあてはまる環境適応機能のひとつと考えられる。

しかし、今回のわれわれの成績では、 T_3 のみならず T_4 の減少もわずかながらみられた。この理由としては、末梢におけるもうひとつの酵素である 5-monodeiodinase の活性が亢進したために、 T_4 から reverse T_3 ($r-T_3$) への転換が過剰となり、結果的に T_4 のレベルが下がったとみる見方と視床下部の機能低下に基づき甲状腺のホルモン産性能が低下したとする見方が考えられるが、そのいずれかは今後の検討課題である。

今回の体重減少性無月経あるいは神経性食思不振症患者の中には TSH が異常高値を示した症例が 4 例みられたが、これまでにしかかる症例はほとんど報告されていない。これらの症例では、TRH に対する TSH の反応性も過剰であり、また甲状腺剤を投与すると TSH の下降がみられたことから、高 TSH は甲状腺自体の障害によるものだと考えられる。体重の減少が甲状腺の障害に直接結びついたとは考えにくい。1 例にマイクロゾームテスト陽性のものがみられたことから、何らかの自己免疫機転が関与している可能性も考えられる。

一般に神経性食思不振症を含む体重の減少に伴う性機能の低下は、視床下部における Gn-RH の産生分泌の低下あるいはその分泌態度の変化に基づくゴナドトロピンの分泌異常によるものと考えられている^{14,15)}。しかし、体重の減少によりなぜ Gn-RH の分泌に変化が起こるかは現在のところ不明といわざるを得ない。

今回の著者らの成績では、血清 LH の濃度は血清 $t-T_3$ の濃度と弱いながらも有意の正の相関を示した。また特に $t-T_3$ が 100 ng/dl 以下では LH が 15 mIU/ml を越える症例はごくわずかであった。このことは、甲状腺ホルモンが何らかの形でゴナドトロピンの産生、分泌に影響を及ぼしていることを示唆するもの

といえる。

甲状腺ホルモンの視床下部や下垂体など中枢への直接作用は必ずしも明らかではないが、その卵巣への直接作用は教室の Maruo ら¹⁶⁾の研究により、顆粒膜細胞の機能分化やホルモン産生能に深く関わり、卵巣機能の発現に不可欠であることか明らかにされている。したがって、甲状腺ホルモンによるゴナドトロピン分泌の促進は卵巣性ステロイドを介しての作用とも推測できる。

要するに以上の臨床的事実を鑑みると、体重減少性無月経における性機能異常の一因は甲状腺ホルモンの視床下部—下垂体—卵巣系への直接的作用の低下にある可能性が想定される。

謝辞

本研究の一部は文部省化学研究費 63570780 (昭和63 年度一般B) によった。

文 献

- 1) Buxton, C. L. and Herrman, W. L.: Effect of thyroid hormone on menstrual disorders and sterility, *JAMA* 155: 1035, 1954
- 2) 植田安雄：産婦人科領域における甲状腺の意義に関する研究，第15回日産婦学会宿題報告別冊，1963
- 3) Akande, E. O. and Anderson, D. C.: Role of sex-hormone-binding globulin in hormonal changes and amenorrhea in thyrotoxic women, *Brit. J. Obstet. Gynecol.*, 82: 557, 1975
- 4) Tanaka, T., Tama, H., Kuma, K., Matsuzuka, F. and Hidaka, H.: Gonadotropin response to luteinizing hormone releasing hormone in hyperthyroid patients with menstrual disturbances, *Metabolism*, 30: 323, 1981
- 5) Akande, E. O.: Plasma concentration of gonadotrophins, oestrogen and progesterone in hypothyroid women, *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, 82: 552, 1975
- 6) 幸村信行，片山和明，望月眞人：糖代謝と無月経に関する研究—特に多嚢胞性卵巣症群における臨床的解析—，日不妊会誌，32: 268, 1987
- 7) Nakano, R., Hashiba, N., Kotsuji, F. and Tojo, S.: A schematic approach to the workup of amenorrhea, *Fertil. Steril.*, 28: 229, 1977
- 8) 望月眞人，片山和明：下垂体性続発性無月経の診断と治療，産婦人科MOOK，29: 122, 金原出版，1984
- 9) 中村幸雄，塗百寛，上野裕，春日義生，小林徹，福永友明，斉鈴媛，黒川博厚：体重減少性無月経，ホと臨，27: 748, 1979
- 10) 末松弘行，久保木富房，青木宏之，江崎正博，黒川順夫，玉井一：神経性食欲不振症の臨床象，ホ

と臨，27: 693, 1979

- 11) Miyai, K., Yamamoto, T., Azukizawa, M., Ishibashi, K. and Kumahara, Y.: Serum thyroid hormones and thyrotropin in anorexia nervosa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 334, 1975
- 12) Moshang, T. Jr., Parko, J. S., Baker, L., Vaidya, V., Uliger, R. D., Bongiovanni, A. M. and Snyder, P. J.: Low serum triiodothyronine in patients with anorexia nervosa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 470, 1975
- 13) Sullivan, P. R. C., Bollinger, J. A. and Reichlin, S., *J. Clin. Invest.*, 52: 83a, 1973 (Abstract)
- 14) 仲野良介：排卵障害の診断と治療，140，永井書店，1977
- 15) Yen, S. S. C.: Chronic anovulation due to CNS-hypothalamic-pituitary dysfunction, in *Reproductive Endocrinology*, Ed. by Yen, S. S. C. and Jaffe, R. B., 441, Saunders, 1986
- 16) Maruo, T., Hayashi, M., Matsuo, H., Yamamoto, T., Okada, H. and Mochizuki, M.: The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells, *Endocrinology*, 121: 1233, 1987

The levels of thyroid hormones in patients with menstrual disorders

Takashi Ae, Kazuaki Katayama
and Matsuto Mochizuki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University School of Medicine,
Hyogo 650, Japan

In order to investigate the thyroid function of the patients with menstrual disorders, we measured thyroid hormones ($t\text{-T}_3$, $t\text{-T}_4$) and $\text{T}_3\text{-RSU}$ in patients with amenorrhea. The levels of $t\text{-T}_3$ in patients with non-estrogenic amenorrhea, most of whom are patients with weight loss amenorrhea (16 cases) were significantly lower than those of normal women. The levels of $t\text{-T}_4$ were also lower in patients with non-estrogenic, weight loss amenorrhea. The levels of $t\text{-T}_3$ or $t\text{-T}_4$ of those patients showed significant positive correlation with their percent Ideal Body Weight (%IBW) which was calculated according to Matsuki's table of IBW.

Adding patients with anorexia nervosa (8 cases) to those weight loss amenorrhea, serum free T_3 ($f\text{-T}_3$), free T_4 ($f\text{-T}_4$) and TSH were measured. Serum $f\text{-T}_3$ and $f\text{-T}_4$ levels in patients with weight

loss amenorrhea and anorexia nervosa were also significantly lower than those of normal control women. The levels of TSH in most patients with weight loss amenorrhea and anorexia nervosa were within normal range but abnormally high in two patients with weight loss amenorrhea and two patients with anorexia nervosa respectively. The responses of TSH to TRH in patients with weight loss amenorrhea or anorexia nervosa were mostly normal with slight delay except the patients with abnormally high levels of TSH who showed higher response to TRH.

The levels of basal LH correlated significantly to the levels of $t\text{-T}_3$ but not $t\text{-T}_4$, however, FSH did not correlate with either $t\text{-T}_3$ nor $t\text{-T}_4$.

From above results, it was concluded that the levels of thyroid hormones especially T_3 are low in patients with amenorrhea who have lost their body weight and was also suggested that the lowered levels of thyroid hormones in those patients might cause decrease in LH levels resulting in amenorrhea.

(受付: 1989 年 6 月 26 日特掲)

妊娠例における無治療周期および排卵誘発周期の 血中 estradiol および progesterone 値

Serum Estradiol and Progesterone Level During Untreated and Ovulation Induced Pregnant Cycles

岡山大学医学部産科婦人科学教室

片 山 隆 章	新 谷 恵 司	多 賀 茂 樹
Takaaki KATAYAMA	Keiji SHINTANI	Shigeki TAGA
河 原 義 文	林 伸 旨	占 部 清
Yoshifumi KAWAHARA	Nobuyoshi HAYASHI	Kiyoshi URABE
吉 田 信 隆	関 場 香	
Nobutaka YOSHIDA	Kaoru SEKIBA	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

当科不妊外来において昭和61年1月より昭和63年6月までに妊娠した症例につき、妊娠周期の治療法により無治療群 (61例), sexovid 群 (23例), clomid 群 (76例), hMG 群 (11例) に分け、妊娠周期の血中 estradiol 値 (E_2) および progesterone 値 (P) を検討した。その結果、無治療群の排卵期 E_2 は 169 ± 79 pg/ml, 黄体期中期 E_2 , P はそれぞれ 138 ± 44 pg/ml, 11.8 ± 4.4 ng/ml であった。また、排卵誘発周期と無治療周期を比べると、排卵期 E_2 , 黄体期中期 E_2 , P 共に, sexovid 群は無治療群と差はなく, clomid 群は無治療群よりも高値を示し, hMG 群は clomid 群よりもさらに高値を示した。また、排卵期 E_2 と妊娠に至った治療法との関係を検討したところ、無治療で排卵を認める症例のうち、排卵期 E_2 が 160 pg/ml 以下の症例には clomid 投与が有効であり、また clomid 投与により排卵を認める症例のうち、排卵期 E_2 が 500 pg/ml 以下の症例は hMG 投与が有効であることが示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 11—16, 1990)

緒 言

不妊外来において、基礎体温上排卵を認めない症例に対しては、clomiphene citrate (clomid), cyclofenil (sexovid) 等の経口排卵誘発剤の投与、あるいは human menopausal gonadotropin (hMG) 投与による gonadotropin 療法等は広く行われている。一方、基礎体温上排卵は認めるものの妊娠成立をみない症例、あるいは黄体機能不全等の症例に対しては clomid 等排卵誘発剤の投与が行われ、我々もこれらの症例に対して排卵誘発剤を投与し、良好な成績

を収めてきた。¹⁾しかし一般に、排卵誘発剤使用時の内分泌動態は無治療周期における内分泌動態とは異なることが知られているが、妊娠成立周期の内分泌動態について検討した例は少なく、この点に関しては未だ不明の点が多い。そこで今回我々は、不妊治療後に妊娠した症例につき、排卵誘発剤の投与と妊娠成立に対する内分泌動態との関係について考察を加え、さらに血中ホルモン値によって治療法の選択が可能か否かにつき検討した。

表 1 対 象

妊娠周期治療	例数	年齢 (平均±標準偏差)	原発不妊	続発不妊
無治療群	61	29.8±3.8	34	27
sexovid 群	23	30.4±3.3	17	6
clomid 群	76	29.2±4.0	42	34
hMG 群	11	29.7±3.3	10	1
その他	7			
合 計	178	29.7±3.8	107	71

対象および方法

対象は、当科不妊外来にて昭和 61 年 1 月より昭和 63 年 6 月までに妊娠した症例のうち、基礎体温が判定可能であり、排卵期または黄体期に血中 estradiol (E_2), progesterone (P) を測定し、高プロラクチン血症等合併症のない 178 例とした。このうち、一般検査期間中に無治療で妊娠した群を無治療群, sexovid を投与して妊娠した群を sexovid 群, clomid を投与して妊娠群を clomid 群, hMG-hCG を投与して

妊娠した群を hMG 群とした。排卵日の推定は基礎体温により行い、基礎体温が上昇する前日の低温日を排卵日とし、排卵日を day 0、排卵前の日数をマイナス (−) で表し、排卵後の日数をプラス (+) で表した。検体は採血後血清を遠心分離し、測定まで -20°C にて凍結保存し、血中ステロイドホルモンは RIA 法にて測定した。結果は平均±標準偏差で表し、検定は Student's t-test にて行った。

結 果

1. 無治療群, sexovid 群, clomid 群, hMG 群の背景 (表 1)

全対象例 178 例の平均年齢は 29.7 ± 3.8 歳であり、各群の間に差はなかった。原発不妊は 107 例に認めたが、hMG 群には 11 例中 10 例と高率に認めた。

2. 各群におけるホルモン値

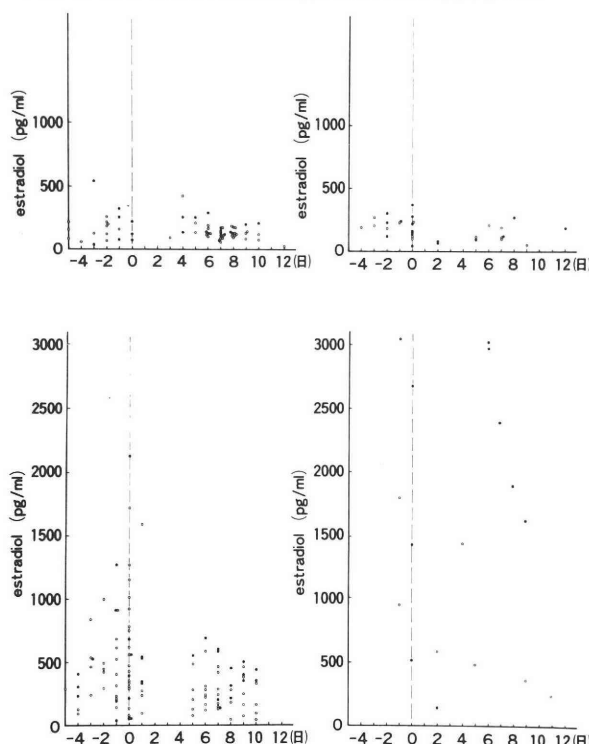
妊娠周期に測定した E_2 値および P 値と、妊娠周期に行った治療と同一の治療を行った別の周期に測定した E_2 値および P 値の関係を検討した結果、各群とも day + 8 まではその値に差は見られなかった。そこでその両者をあわせて 1 つの群として検討を行った。

1) 各群における E_2 値 (図 1)

無治療群の排卵期 (day - 2 ~ + 1) E_2 は 100~300 pg/ml、黄体期中期 (day + 6 ~ + 8) E_2 は 100~200 pg/ml であった。sexovid 群の排卵期 E_2 は 100~300 pg/ml、黄体期中期 E_2 は 100~200 pg/ml と、無治療群と差は認められなかったが、clomid 群では排卵期 E_2 は 100~2000 pg/ml、黄体期中期 E_2 は 100~700 pg/ml、hMG 群では排卵期 E_2 は 500~3000 pg/ml、黄体期中期 E_2 は 400~3000 pg/ml と、clomid 群、hMG 群共に無治療群よりも排卵期、黄体期 E_2 とも高値を示し、特に clomid 群は大きなバラツキを示した。

2) 各群における P 値 (図 2)

無治療群の黄体期中期 P は 5~20 ng/ml であった。sexovid 群のそれは 5~20 ng/ml と、無治療群と差は認められなかったが、clomid 群は 5~50 ng/ml、hMG 群は 10~90 ng/ml と、clomid 群、hMG

図 1 各群における E_2 値

左上：無治療群 右上：sexovid 群

左下：clomid 群 右下：hMG 群

●：妊娠周期と検査周期は同一周期

○：妊娠周期と検査周期は別周期

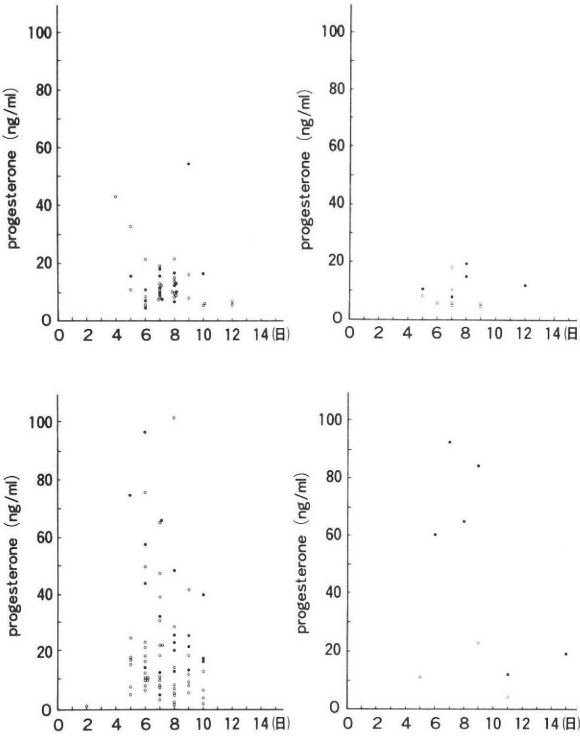


図 2 各群における P 値
左上：無治療群 右上：sexovid 群
左下：clomid 群 右下：hMG 群
●：妊娠周期と検査周期は同一周期
○：妊娠周期と検査周期は別周期

群とも無治療群よりも高値を示し、同時に clomid 群は大きなバラツキを示した。

3) 各群の平均値 (図 3)

排卵期 E_2 は、無治療群, sexovid 群, clomid 群, hMG 群でそれぞれ, 169 ± 79 pg/ml, 200 ± 81 , 564 ± 442 , 1738 ± 897 であり, clomid 群は無治療群, sexovid 群よりも有意 ($P < 0.01$) に高値を示し, さらに hMG 群は clomid 群よりも有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。黄体期中期 E_2 はそれぞれ, 138 ± 44 pg/ml, 173 ± 63 , 302 ± 171 , 2578 ± 463 であり, clomid 群は無治療群よりも有意 ($P < 0.01$) に高値を示し, hMG 群は他の 3 群よりも有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。黄体期中期 P はそれぞれ, 11.8 ± 4.4 ng/ml, 11.2 ± 5.4 , 25.7 ± 24 , 106 ± 59 であり, clomid 群は無治療群, sexovid 群よりも有意 ($P < 0.01$) に高値を示し, hMG 群は他の 3 群よりも高値を示す傾向がみられた。

3. 無治療周期の E_2 , P と妊娠成立に要した治療との関係 (図 4)

無治療で排卵を認める症例のうち、無治療のまま妊娠する症例と、排卵誘発剤を使用して初めて妊娠する症例とがある。そこで、無治療周期に測定した排卵期 E_2 および黄体期中期 E_2 , P を無治療のまま妊娠成立した群, sexovid 投与により妊娠成立した群, clomid 投与により妊娠成立した群に分け、各群の内分泌動態を検討した。その結果、各群の排卵期 E_2 はそれぞれ, 169 ± 79 pg/ml, 182 ± 119 , 108 ± 53

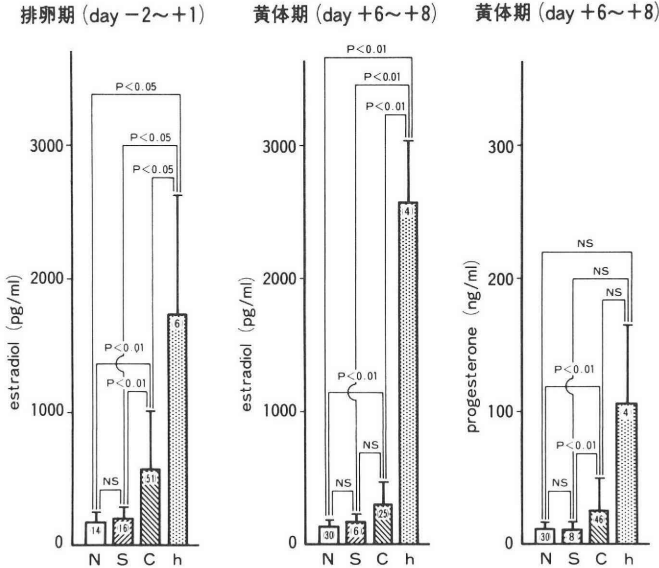


図 3 各群の平均値
N：無治療群 S：sexovid 群 C：clomid 群
h：hMG 群 () 内は例数

であり, clomid により妊娠した群は無治療で妊娠した群よりも有意 ($P < 0.05$) に低値を示した. 次に, clomid により妊娠した群の平均±標準偏差は 160 pg/ml となり, この値を基準に治療法を検討してみると, 排卵期 E_2 が 160 pg/ml 以上であった 11 例中, 無治療で妊娠した症例は 7 例, sexovid により妊娠し

た症例は 3 例, clomid により妊娠した症例は 1 例のみであった. また, 排卵期 E_2 が 160 pg/ml 以下であった 19 例中, 無治療で妊娠した症例は 7 例, sexovid により妊娠した症例は 2 例, clomid により妊娠した症例は 10 例であり, 160 pg/ml 以下では clomid により妊娠した症例が有意 ($P < 0.05$) に多かった. ま

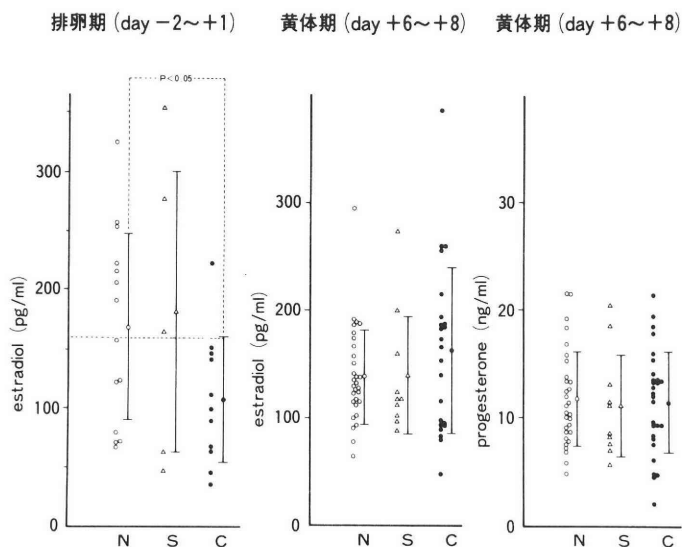


図4 無治療周期の E_2 値および P 値

N: 無治療により妊娠成立した群

S: sexovid により妊娠成立した群

C: clomid により妊娠成立した群

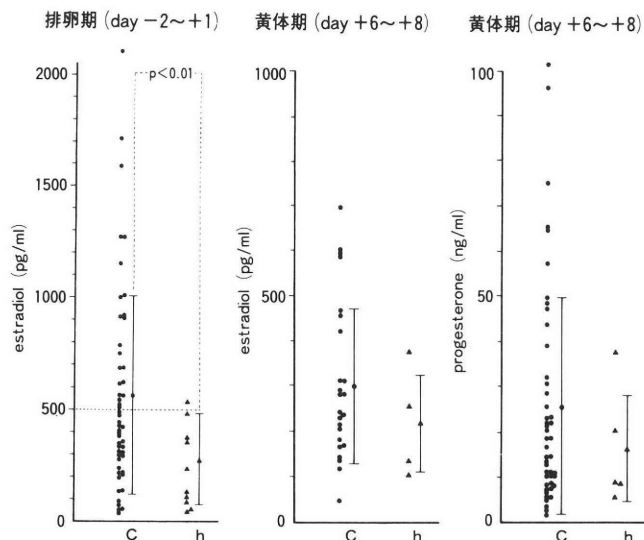


図5 clomid 投与周期の E_2 値および P 値

C: clomid 投与により妊娠成立した群

h: hMG 投与により妊娠成立した群

た黄体期中期の E_2 は、無治療で妊娠した群、sexovidにより妊娠した群、clomidにより妊娠した群でそれぞれ、 138 ± 44 pg/ml, 140 ± 55 , 163 ± 77 であり、各群に有意差を認めなかった。黄体期中期のPはそれぞれ、 11.8 ± 4.4 ng/ml, 11.2 ± 4.7 , 11.5 ± 4.7 であり、これも各群の間に有意差を認めなかった。

4. clomid投与周期の E_2 、Pと妊娠成立に要した治療との関係 (図5)

clomid投与により排卵を認める症例のうち、clomid投与のままで妊娠する症例と、hMG-hCG療法に切り替えて初めて妊娠する症例がある。そこで、clomid投与周期に測定した排卵期 E_2 および黄体中期 E_2 、Pを、clomid投与のままで妊娠した群と、hMG-hCG療法に切り替えて妊娠した群と分け検討した。その結果、排卵期 E_2 はそれぞれ、 564 ± 442 pg/ml, 279 ± 203 pg/mlであり、hMGにより妊娠した群で有意($P < 0.01$)に低値を示した。また、hMGにより妊娠した群の平均 $\pm$ 標準偏差は500 pg/mlとなり、この値を基準として検討してみると、排卵期 E_2 が500 pg/ml以上の23例中、clomidにより妊娠した症例は22例であり、hMGにより妊娠した症例は1例のみであった。ところが、排卵期 E_2 が500 pg/ml以下であった38例中、clomidにより妊娠した症例は29例であり、残りの9例は妊娠するためにhMG投与を必要とした。黄体期中期 E_2 は両群それぞれ、 302 ± 171 pg/mlであり、 220 ± 106 pg/mlであり、Pはそれぞれ、 25.7 ± 24 ng/ml, 16.4 ± 11.8 ng/mlであり、黄体期中期 E_2 、P共に、hMGにより妊娠した群で低値を示す傾向が見られた。

考 察

不妊治療を進めていく上で、不妊患者の内分泌状態を把握することは大変重要なことであるが、そのためには基準となる正常値を知ることは必須のことである。今まで血中ホルモンの正常値は、規則的な月経周期を有する性成熟婦人のデータをもとに決められてきたが、不妊治療を進めていく上での正常値とは本来妊娠周期での測定値をもとに決められるべきである。今回我々は、無治療で妊娠した症例の E_2 およびPを検討し、排卵期(day-2~+1)の E_2 は 169 ± 79 pg/ml、黄体期中期(day+6~+8)の E_2 、Pはそれぞれ 138 ± 44 pg/ml, 11.8 ± 4.4 ng/mlであることを示した。これは今まで言われてきた正常値^{2,3)}よりも若干低い値であると思われる。この理由は、一方は不妊とは無関係な性成熟婦人、他方は無治療で妊娠した婦人という違いによるものと考えられる。sexovid投与周期の内分泌動態に関してはほ

とんど報告がないが、今回の検討では、排卵期 E_2 および黄体中期 E_2 、Pはsexovidと無治療群との間に差は認めず、sexovidは内分泌動態にほとんど影響を与えないことが示された。次に、clomid投与周期の内分泌動態に関する報告は、非妊娠周期で検討したものが多く、そのほとんどは排卵期 E_2 、黄体期 E_2 、P共に無治療周期に比べて高値をとるとされている^{4,5)}。Bohnet⁶⁾らは妊娠周期の黄体期での検討で、 E_2 に関しては、clomid群と無治療群で差はなく、Pはclomid群の方が高値をとると報告した。今回の我々の検討では、clomid群の排卵期 E_2 、黄体期中期 E_2 、P共に無治療群に比べて有意に高値を示し、同時に大きなバラツキを示した。これはclomidに対する卵巣の反応性の違い、つまり発育する卵胞の数の違いによるものと思われる。即ちclomidにより卵胞が1個のみ発育するものは E_2 、Pの値は無治療群と大きな差はなく、複数の卵胞が発育するものは無治療群に比べて高値をとり、その結果clomid群全体としては高値をとり、またバラツキも大きくなるものと思われる。hMG投与により妊娠した周期の E_2 、Pに関しては多くの報告^{6,7)}があるが、いずれも無治療周期に比べて高値をとると言われている。今回の我々の検討でも、排卵期 E_2 および黄体期中期 E_2 、P共に、無治療群、sexovid群およびclomid群よりも高値を示した。その理由としては、排卵前の成熟卵胞数と、卵胞期 E_2 、黄体期 E_2 、Pとの間に相関があると言う報告^{6,8)}が数々あり、hMG群の高い E_2 、Pは、複数個の成熟卵胞および複数個の黄体の存在によるものと思われる。また黄体期中期の E_2 /P比を比較すると、無治療群、sexovid群、clomid群、hMG群でそれぞれ 13.5 ± 7.1 , 17.9 ± 8.8 , 17.8 ± 11 , 29.9 ± 13 、とclomid群は無治療群およびsexovid群と差がなかったが、hMG群は他の3群よりも高い傾向を認めた。つまり、clomid群は黄体期のPの増加と E_2 の増加は、無治療群およびsexovid群と平行に動くが、hMG群では、黄体期のPの増加よりも E_2 の増加の方が大きい傾向があることを示された。これはclomidにより発育する複数の卵胞は成熟度が一定であり、排卵から黄体形成までの過程が無治療あるいはsexovid周期と同じように行われるのに対し、hMGにより発育する複数の卵胞は成熟度が一定ではなく、HCG投与時に未熟であった卵胞はそのまま E_2 の産生を継続する可能性や、黄体への移行がうまく行われず、Pの産生が十分でない可能性等が考えられる。

次に、もともと排卵を認める症例のうち、無治療で妊娠する症例と、clomid投与によりはじめて妊娠する症例があるが、これらの無治療周期での血中ホ

ルモン値を比較すると, clomid により妊娠した群の排卵期 E_2 は有意に低値を示していた。また排卵期 E_2 が 160 pg/ml 以上では, 無治療あるいは内分泌学的影響の少ない sexovid により妊娠した症例がほとんどであったが, 160 pg/ml 以下では clomid により妊娠した症例が多く, 有意差を認めた。このことにより, 排卵期 E_2 が 160 pg/ml 以下の症例には clomid 投与が有効であることを示した。この理由として, clomid 投与により未熟卵胞の成熟がうながされること, E_2 の増加により子宮内膜の増殖が促進されること等が考えられる。

また, clomid により排卵する症例のうち, そのまま clomid 投与により妊娠した群と, hMG 投与により妊娠した群とを, clomid 投与周期のホルモン値で比較すると, 排卵期 E_2 は hMG により妊娠した群で有意に低値を示し, また排卵期 E_2 が 500 pg/ml 以上ではそのほとんどが clomid のみで妊娠したのに対して, 500 pg/ml 以下では hMG により妊娠した症例も多く認めた。これより, 排卵期 E_2 が 500 pg/ml 以上であれば clomid 投与を続けることで妊娠成立が期待できるが, 500 pg/ml 以下であれば hMG 投与に切り替えても良いのではないかと思われた。また諸家の報告^{6,8)}のとおり排卵期 E_2 は, 成熟細胞の数を反映したものとすると, clomid 投与周期に多数の卵胞が成熟する症例は clomid 投与を続けることで妊娠が期待できるが, 少数しか卵胞が成熟してこない症例は hMG 投与が有効であると考えられる。これが何を意味するのか, 複数の卵胞を成熟させ過排卵を起こし, 複数の受精卵を生み出すことが妊娠率の向上に結び付くのか, あるいは E_2 の増加による子宮内膜の増殖が重要なのか, 今後さらに検討が必要と思われる。

文 献

- 1) 白川尚子, 吉田信隆, 鈴木康之, 占部 清, 林 伸旨, 早田幸司, 鎌田常子, 林 泰堂, 清水健治, 小林俊三, 秋本昶久, 関場 香: 不妊治療における排卵誘発剤使用の臨床的検討, 日不妊会誌, 29: 30, 1984
- 2) Mishell, D. R. Jr, Nakamura, R. M., Crosignani, P. G., Stone, S., Kharma, K., Nagata, Y. and Thorneycroft, I. H.: Serum gonadotropin and steroid patterns during the normal menstrual cycle, Am. J. Obstet. Gynecol., 3: 60, 1971
- 3) 門田 徹, 宇津宮隆史, 立山浩道, 梶原健伯: 着床時のホルモン動態—とくに黄体機能との関連—, 産婦人科 MOOK 19 着床, 坂元正一ら編, 85, 金原出版, 1982
- 4) Bergquist, C., Nillius, S. J. and Wide, L.: Human gonadotropin therapy II, Serum estradiol and

progesterone patterns during nonconceptual cycles, Fertil. Steril., 39: 766, 1983

- 5) 千石一雄: ヒト卵胞発育, 排卵現象に関する臨床的研究, 日不妊会誌, 29: 35, 1984
- 6) Bohnet, H. G., Kato, K., Trapp, M., Weise, H. C. and Leidenberger, F. A.: Different hormonal patterns in human menopausal gonadotropin-treated, clomiphene citrate-treated, and untreated conception cycles, Fertil. Steril., 45: 469, 1986
- 7) Bergquist, C., Nillius, S. J. and Wide, L.: Human gonadotropin therapy I, Serum estradiol and progesterone patterns during conceptual cycles, Fertil. Steril., 39: 761, 1983
- 8) 小林俊文, 小田高久, 吉村慎一, 大野虎之進: 採取卵と受精率との関係について, 受精・着床'85, 飯塚理八ら編, 13, 学会誌刊行センター, 1985

Serum estradiol and progesterone level during untreated and ovulation induced pregnant cycles

Takaaki Katayama, Keiji Shintani,
Shigeki Taga, Yoshifumi Kawahara,
Nobuyoshi Hayashi, Kiyoshi Urabe,
Nobutaka Yoshida and Kaoru Sekiba

Department of Obstetrics and Gynecology,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan

Patients, who got pregnant after treatment at our clinic from Jan. 1986 to June 1988, were analyzed. They were divided into four groups (untreated group, sexovid group, clomid group and hMG group) by the treatment of the pregnant cycle. estradiol (E_2) level at the late follicular phase of untreated group was 169 ± 79 pg/ml, E_2 and progesterone (P) level at the mid luteal phase of untreated group were 138 ± 44 pg/ml and 11.8 ± 4.4 ng/ml. E_2 and P level of sexovid group had no difference from those of untreated group. On the other hand clomid group demonstrated higher E_2 and P level than those of untreated group, and hMG group demonstrated the highest E_2 and P level.

Co-relationship between E_2 level at the late follicular phase and the treatment of the pregnant cycle was analyzed. We concluded that clomid should be used in case of low E_2 level (under 160 pg/ml) at the late follicular phase of untreated cycle, hMG should be used in case of low E_2 level (under 500 pg/ml) at the late follicular phase of clomid treated cycle.

(受付: 1989 年 3 月 20 日)

GnRH agonist を用いた排卵誘発法における ホルモン測定値の推移と経腔超音波検査の所見

Hormonal Assay and Transvaginal Ultrasonographic Findings with the Use of GnRH-agonist in Ovarian Hyperstimulation

順天堂大学医学部産婦人科学教室

武内 裕之 伊藤 哲 福田 勝
Hiroyuki TAKEUCHI Satoshi ITOU Masaru FUKUDA
高田 道夫
Michio TAKADA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Juntendo University School of Medicine,
Tokyo 113, Japan

GnRH agonist (GnRHa) を用いて、17 症例、19 周期に排卵誘発を行ない、HMG 投与に至るまでの経過を、血中 LH、FSH、 E_2 の測定ならびに経腔超音波検査を用いて追跡検討し、以下のような結果を得た。

1. GnRHa 投与後 13 日以内に E_2 が 50 pg/ml 以下となった I 群では、FSH は投与前の 3 倍の値を示し、有効な排卵誘発が得られた。経腔超音波検査において、子宮内膜は菲薄化し線状パターンを示し、子宮断面積は減少した。

2. GnRHa 投与後 13 日目の E_2 が 50 pg/ml 以上であった II 群では、 E_2 の平均値は 675 pg/ml であり、FSH は投与前値以下で、良好な卵巣刺激は得られなかった。経腔超音波検査において、子宮内膜は肥厚し子宮断面積も投与前より増大した。

3. 経腔超音波検査は、GnRHa を用いた卵巣刺激の成否の判定に有用であると思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 17-23, 1990)

緒 言

IVF-ET、GIFT の普及に伴い、不妊症の治療に COH (Controlled ovarian hyperstimulation) が行なわれるようになり¹⁻³⁾、AIH (artificial insemination with husband's semen) においても、精子洗浄濃縮法に COH を併用することにより、妊娠率の向上が得られるようになってきた⁴⁾。また、COH には colomiphene や HMG-hCG 療法が使用されてきたが、最近、GnRH-agonist (GnRHa) を用い、良好な排卵誘発が期待できるようになった⁵⁻⁸⁾。GnRHa を用いることにより、HMG-hCG 療法でみられる premature luteinization や low response を予防し、synchron-

ize した卵胞発育が得られるといわれている。

今回、AIH 施行予定の患者 19 例に GnRHa を投与し、HMG 投与に至るまでの過程を血中ホルモンの測定、経腔超音波検査による子宮断面積の測定ならびに子宮内膜の観察により追跡したので報告する。

対象と方法

当教室の不妊外来で、AIH 施行予定患者のうち HMG-hCG 療法による COH を施行したが、premature luteinization が認められた 7 症例 8 周期、low responder であった 10 症例 11 周期の計 17 症例、19 周期を対象とした。premature luteinization とは HMG 投与中に血中 LH が基礎値の 2 倍以上に

表 1. GnRHa+HMGによる排卵誘発のプロトコール

cycle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
LH	○		○		○		○		○		○		○		
FSH	○		○		○		○		○		○		○		
E ₂	○		○		○		○		○		○		○		
U.S.	○		○		○		○		○		○		○		
GnRHa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
hMG															—

上昇したもので、low responder とは発育卵胞が2個以下、または血中 estradiol 値が 500 pg/ml 以上に上昇しないものとした。

月経第1日目より GnRHa として Buserelin (Suprecur®, Hoechst Japan) 900 µg/day を nasal spray にて14日間投与し、月経第1, 3, 5, 7, 9, 11, 13日目に来院させ、採血してホルモン測定を行ない、併せて経腔超音波検査を施行し、HMG は第15日目から投与した(表1)。経腔超音波検査は Aloka SSD620 を使用し、同一検者によって行なわれた。子宮断面積は、矢状断面における内子宮口から子宮底部までの最大径を長径とし、それに直交する最大径を短径とする楕円形として計算した。子宮内膜の厚さは、断面積を計測した同一平面上で計測し、同時にその形態も観察した。採血された血液サンプル中の LH, FSH, estradiol (E₂) は第一ラジオアイソトープ社の RIA kit で測定した。また、推計学的処理は、Student's t 検定により行なった。

結 果

1. 血中ホルモン測定成績

月経第13日目の E₂ 値が 50 pg/ml 未満の者を I 群とし、50 pg/ml 以上のものを II 群とした。I 群と II 群の GnRHa の投与前のパラメータを比較したものが表2である。血中 LH, FSH, E₂ 値、子宮断面積については両群間に有意差は認めず、患者の平均年

表 2. Group I と Group II のパラメータの比較

	Group I (n=15)	Group II (n=4)
age*	31.2±1.2	37.8±1.9
LH (mIU/ml)	7.13±2.3	8.20±2.4
FSH (mIU/ml)	4.33±0.7	5.48±1.2
E ₂ (pg/ml)	47.0±7.8	69.6±19.4
area of uterus(mm²)	1388±79.6	1439±192.1

齢においてのみ II 群で高い傾向が認められた (p<0.05)。

図1は、GnRHa 投与に伴う血中 LH, FSH, E₂ の推移を示したものである。各データは投与前値に対する各測定値の比で表示した。LH は図1Aのように I 群、II 群ともに3日目に flare up による peak を形成した後、漸減し、13日目にはほぼ前値に回復した。FSH は図1Bのように、両群とも3日目に peak を作った後、I 群ではゆるやかな減少傾向は認めら

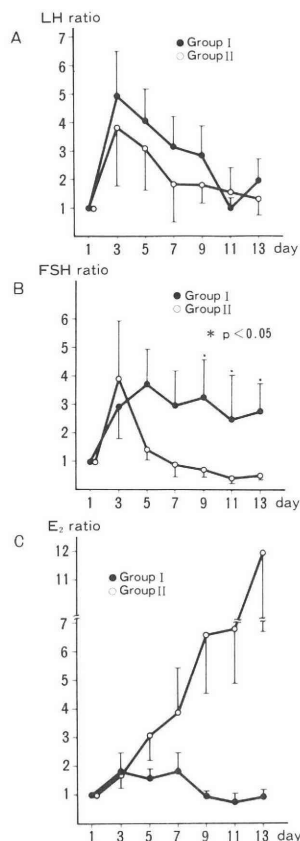


図1 血中 LH, FSH, estradiol 比の時間的推移

れたが、13 日目に至っても投与前の 3 倍という高値を示した。II 群では急減し 13 日目には投与前値以下まで低下した。また E_2 は図 1 C のように、I 群では 7 日目までやや上昇した後、9 日目以降低下し 13 日

目には投与前値以下はなったが、II 群では、日毎に増加し、13 日目には投与前の 10 倍以上の値を示した。

2. 経腔超音波検査成績

1) 経腔超音波法による子宮内膜所見の基準パターン

図 2 は経腔超音波検査によって認められた子宮内膜パターンである。pattern I は子宮内膜が hyperechoic な塊状に認められるもので、黄体期の内膜像に一致し、GnRHa 投与後 1, 2 日目にみられる。

pattern II は、pattern I の辺縁がくずれ、線状を示す中心 echo に hyperechoic な縁取りがみえ、月経中期から末期にみられる内膜像である。

pattern III は子宮内膜が萎縮し線状となったもので、I 群の 9 日目以降に認められる。

pattern IV は子宮内膜が肥厚し、中心に hyperechoic な境界面がみられ、全体として木の葉状を示し、通常は卵胞期の中期から排卵期に認められるもので、II 群の 9 日目頃からみられる。

pattern V は線状を示す子宮内膜の中に血液と思われる echo free space がみられ、pattern III の亜型と考えられる。

2) 経腔超音波法による子宮断面積、子宮内膜所見の推移

図 3 は、GnRHa 投与中にみられる子宮内膜 pattern の推移を示したもので、1, 3 日目には I 群、II 群ともに pattern I, II が大部分を占めた。I 群では、5 日目頃から pattern III を示すものがみられ始め、13 日目にはほとんどの症例が pattern III を示した。II 群では、9 日目以降全例が pattern IV を示した。子宮内

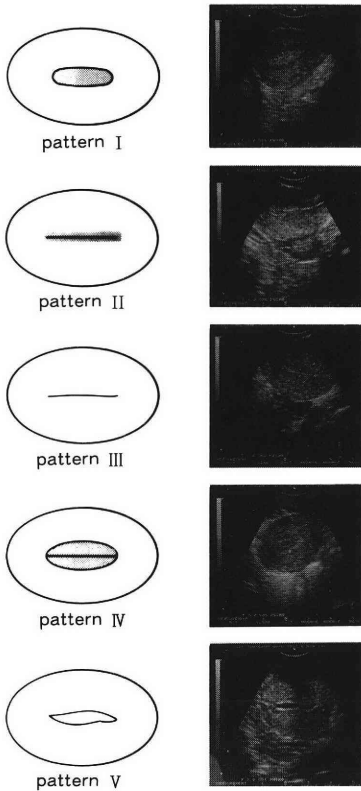


図 2 経腔超音波でみた子宮内膜パターン

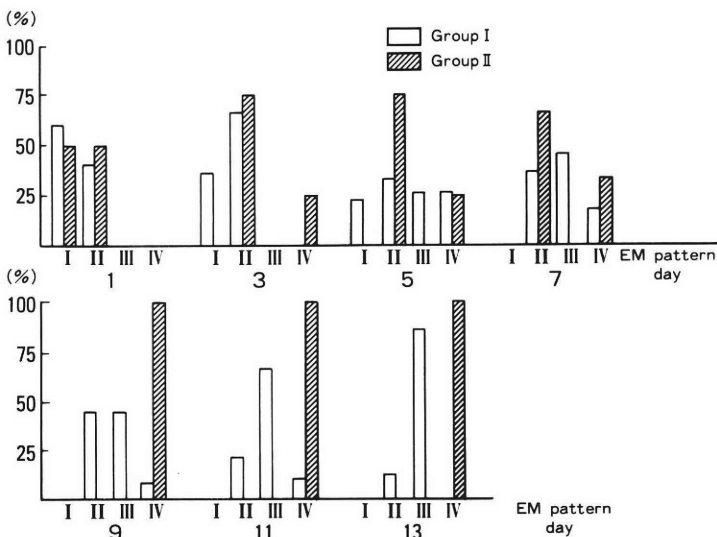


図 3 周期別にみた各内膜パターンの出現頻度

膜パターンと子宮内膜の厚さの関係は、図4のように、pattern IIIでは他のものに比べ有意に薄い傾向がみられた。

矢状面でみた子宮断面積の変化を、GnRHa 投与前値に対する比で表したものが図5である。I群では、子宮断面積は漸減し、13日目には0.7まで減少した。一方、II群では、次第に増大し13日目には1.2となった。9日目以降、両群間には有意差を認めた。

3. 経膈超音波法と血中ホルモン測定値との関連

図6のように、子宮内膜パターンと血中 E_2 値との比較では、pattern IIIの E_2 値は他に比べ有意に低く、pattern IVでは有意な高値を示した。血中 E_2 値と子宮断面積の GnRHa 投与前値に対する比の相関関係を見たのが図7である。両者は $y=0.051x+0.75$ の回

帰式で表され、0.5%以下の危険率で正の相関 ($r=0.55$) を示し、血中 E_2 比が高くなるにつれて、子宮断面積比が大きくなる傾向が認められた。

4. 排卵誘発成績

HMG 併用後の卵胞発育の状況を見てみると、I群では hCG 投与時、平均 8.7 個の発育卵胞が認められた。一方、II群では、HMG 投与当日 1 ないし 2 個の

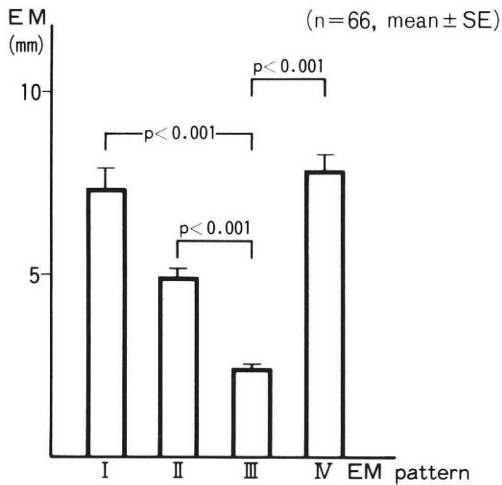


図4 子宮内膜パターンと子宮内膜の厚さ

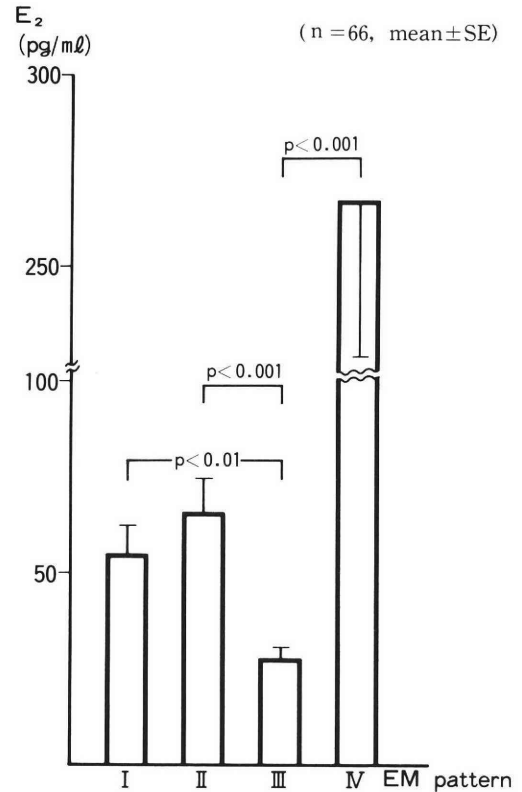


図6 子宮内膜パターンと血中 estradiol

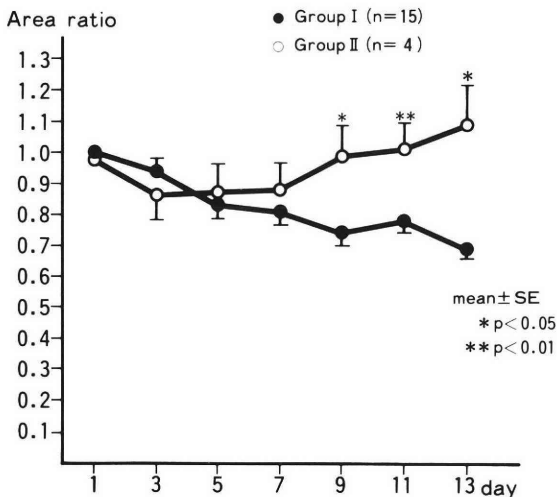


図5 子宮断面積比の時間的推移

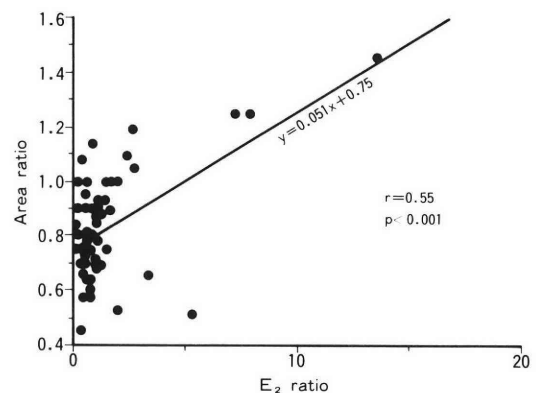


図7 血中 estradiol 比と子宮断面積比の相関

発育卵胞が見られ HMG の投与を断念したものが2例, HMG を投与しても low responder であったものが2例で, 結局4周期すべてが hCG 投与までには至らなかった。

考 察

GnRHa と HMG の併用投与により良好な排卵誘発成績が報告されている。GnRHa 投与の方法としては, 下垂体の down regulation を目的とする long protocol, 下垂体の flare up を利用する short protocol がある。前者には, GnRHa を前周期の黄体期から投与する方法⁹⁾とその周期の卵胞期初期から投与する方法があり⁹⁾, いずれも下垂体の down regulation を得るため, GnRHa を単独で一定期間投与する必要がある。後者は, 卵胞期初期から GnRHa と HMG をほぼ同時に投与する方法⁹⁾で, 投与初期に認められる FSH の flare up を卵胞刺激に利用しつつ, 投与経過とともに起こる LH の低下により premature luteinization を予防しようとするものである。われわれのプロトコールでは, I 群においては, GnRHa 投与13日目で E_2 以下, LH の前値への回復は認められたが, FSH は投与前の3倍にまで増加していた。II群においては, E_2 は GnRHa の投与とともに, 著増し, 13日目には投与前値の10倍以上の値を示したが, LH, FSH は投与前値にまで低下していた。

当初の予想に反し, われわれの投与方法では下垂体の完全な down regulation は得られなかった。これは, GnRHa の投与方法, 投与開始時期の違いによるものと思われる。Rene ら⁹⁾の卵胞期初期から GnRHa を投与する方法では, 皮下投与方法が用いられており, 投与14日目にはほとんどの症例で下垂体の down regulation が起こっている。

GnRHa の経鼻投与では, 皮下投与に比べ1~2%の血中濃度しか得られない¹⁰⁾ため, 下垂体の抑制が不十分であるものと考えられる。また, Robert ら⁵⁾の報告によれば, 黄体期から $600 \mu/\text{day}$ の GnRHa を経鼻投与することにより, 投与7日目で有名な down regulation が得られたという。これは, 卵胞期にはすでに recruit された卵胞が存在するため, 黄体期に比べ下垂体の down regulation に必要な GnRHa の量が増加するためと思われる。卵胞期からの GnRHa 投与により下垂体の完全な down regulation を得るには, GnRHa の投与方法を皮下投与に変更するか, 経鼻投与によるのであれば投与期間を延長する必要がある。

I 群においてみられた E_2 と FSH の解離という現象は, GnRHa による卵巣機能の抑制が下垂体の

down regulation のみによってもたらされるという従来からの解釈では説明が困難である。正岡ら¹¹⁾は, 子宮内膜症の患者に GnRHa を持続皮下注したところ, $10 \mu\text{g}/\text{day}$ 投与群では, FSH の不十分な抑制にもかかわらず, E_2 の抑制が得られたと述べている。これらの結果は, ヒト卵巣における GnRH レセプターの存在の可能性を示唆するものと思われる¹²⁾。

II群において, GnRHa は下垂体の down regulation に働くというよりはむしろ stimulation に作用し, E_2 の上昇が起こり, その negative feedback 作用により LH, FSH が低下したものと思われる。これは, 経鼻投与で得られる GnRHa の血中濃度が低いこと, また, 鼻腔内吸収の個体差により, 症例によっては GnRHa が下垂体を stimulate することによって考えられる。

われわれのプロトコールでは, 下垂体の down regulation は完全には起こらなかった。しかし, I 群では良好な排卵誘発を得ることができた。これは, HMG 投与の時点で, 発育卵胞がなく, E_2 が抑制された状態で, FSH 高値の環境が以後の HMG による卵巣刺激に有利に働くためと思われた。本投与方法は, 下垂体の down regulation を目的とした long protocol, FSH の flare up を利用する short protocol の中間に位置するものと考えられるが, 排卵誘発の成功率が79%と完全ではなく, 更なる検討が必要と考えられる。

I 群, II群における E_2 値の変化は, 経腔超音波検査によって予測可能であった。子宮内膜は E_2 の最大の target organ であり, E_2 の変化に応じてその形態および厚さを変化させる¹³⁾。子宮内膜症の患者に GnRHa を投与した場合, 血中 E_2 の減少とともに子宮内膜は菲薄化し, 組織学的にも萎縮像を示す^{14,15)}。また, 子宮筋腫の患者に GnRHa を投与すると筋腫核は縮小し, 子宮自体の大きさも減少する¹⁶⁾。われわれの成績において, I 群では E_2 の低下とともに子宮内膜は線状となり, 子宮断面積は減少した。一方, II群では, 子宮内膜は次第に肥厚し, 13日目には卵胞期後期を思わせる木の葉状を示し, 子宮断面積も増大した。

一般に, 血中 E_2 値の測定には RIA 法が用いられ, 短時間で結果を得るのは困難である。経腔超音波検査による子宮断面積の計測, 子宮内膜の観察結果は, 血中 E_2 値と良く相関し, E_2 の変化を real time に判定することが可能である。われわれのプロトコールにおける HMG 投与の目安は, 子宮内膜パターンが I → II → III の順に変化し, 子宮断面積が70%以下に減少することである。また, 子宮内膜パターンが I

→II→IVと変化し、子宮断面積の増大が起こったものでは、有効な排卵誘発は得られない。

GnRHa を COH に用いる場合、投与時期、投与方法により、様々な作用が考えられ、効果の判定には、血中ホルモン値の測定のみでなく、経腔超音波検査も含めた総合的な検索が必要と思われる。

文 献

- Garcia, J. E., Jones, G. S., Acosta, A. A. and Wright, G. Jr.: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase I, 1981. *Fertil. Steril.*, 39: 174, 1983
- Bernardus R. E., Jones, G.S., Acosta, A. A., Garcia, J. E., Liu, C. H., Jones, D. L. and Rosenwaks, Z.: The significance of the ratio in follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in induction of multiple follicular growth, *Fertil. Steril.*, 43: 373, 1985
- Vagias, J. M., Morente, C., Shangold, G. and Marrs, R. P.: The effect of different methods of ovarian stimulation for human in vitro fertilization and embryo replacement, *Fertil. Steril.*, 42: 745, 1984
- Paul, F., Maurice, K., Valerie, L. and Helen, W.: Unexplained infertility the value of Pergonal superovulation combined with intrauterine insemination, *Fertil. Steril.*, 49: 602, 1988
- Roberto, P., Zev, R., Gaspere, A., Ettore, C. and Danier, N.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple follicles, *Fertil. Steril.*, 49: 290, 1988
- Pauro, S., Jouel, B., Bronte, S., Patrick, Q., John, K. and Richard, P.: An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responders": pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog, *Fertil. Steril.*, 49: 90, 1988
- Fleming, R., Haxton, M. J., Hamilton, M. P. R., Mccune, G. S. and Coutts, J. R.: Successful treatment of infertile women with oligomenorrhea using a LHRH agonist exogenous gonadotropins, *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 92: 396, 1985
- Fleming, R. and Coutts, J. R. T.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women endogenous gonadotropin suppression, *Fertil. Steril.*, 45: 226, 1986
- Rene, F., Robert, F., Joelle, B., Andre, H., Isabelle, P. and Jacques, T.: Comparison between flare up and down regulation effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists in an *in vitro* fertilization program, *Fertil. Steril.*, 50: 471, 1988
- Saito, S., Saito, H., Yamasaki, R. and Hosoi, E.: Radioimmunoassay of an analog of LHRH, [D-Ser (tBu)]⁶ des-Gly-NH₂ ¹⁰ethylamide (Buserelin), *J. Immunol. Meth.*, 79: 173, 1985
- 正岡 薫, 北沢正文, 渡部秀哉, 熊坂高弘: GnRH Agonist の持続皮下注法: 子宮内膜症に対する有効投与量ならびに hMG 併用時の卵巣の反応性について, *日産婦誌*, 41: 729, 1989
- Jean, P., Gerard, V., Alain, B., Georges, P. and Eliane, B.: Effect of luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells, *Fertil. Steril.*, 50: 597, 1988
- Judith, M. A., David, V. M., Seang, L. T., Howard, S. J., Michael, J. W. and Stephan, F.: Uterine growth in the follicular phase of spontaneous ovulatory cycles and during luteinizing hormone-releasing hormone-induced cycles in women with normal or polycystic ovaries, *Fertil. Steril.*, 49: 52, 1988
- Jens, A. G., Anders, L., Orjan, L., Sven, J. N. and Christer, B.: Endometrial morphology after 6 months of continuous treatment with a new gonadotropin-releasing hormone superagonist for contraception, *Fertil. Steril.*, 48: 52, 1987
- 高見澤裕吉, 田巻勇次, 内藤正文, 松本玲子, 高野 昇, 上杉健哲, 加藤喜市, 山賀明弘: 子宮内膜症に対する酢酸ブセレリンの臨床効果および子宮内膜組織像に関する検討, *産婦世界*, 39: 793, 1987
- Rondolphe, N., Andre, L. and Patrick, M.: Use of intranasal luteinizing hormone-releasing hormone agonist in uterine leiomyomas, *Fertil. Steril.*, 47: 229, 1987

Hormonal assay and transvaginal ultrasonographic findings with the use of a GnRH agonist in ovarian hyperstimulation

Hiroyuki Takeuchi, Satoshi Itou,
Masaru Fukuda and Michio Takada

Department of Obstetrics and Gynecology,
Juntendo University School of Medicine,
Tokyo 113, Japan

19 cycles in 17 patients were treated with a GnRH agonist (GnRHa) in ovarian hyperstimulation, and the process until the beginning of HMG injection was studied by measuring blood levels of LH, FSH and transvaginal ultrasonography. The results were as follows.

1. The group I that showed 50pg/ml or less estra-

diol level was successful in ovarian hyperstimulation: the FSH level was approximately 3-fold of the baseline after 13 days of GnRHa administration: transvaginal ultrasonography showed linear and atrophic endometrium, and cross-sectional area of the uterus became smaller.

2. The group II that estradiol level was above 50pg/ml was unsuccessful in ovarian hyperstimulation: the mean value of estradiol was 675pg/ml and the

FSH level was lower than the baseline: transvaginal ultrasonography showed hypertrophic endometrium and an increase in the cross-sectional area of the uterus in comparison to the condition before the administration.

3. Transvaginal ultrasonography was effective to determine the result of ovarian hyperstimulation with GnRHa.

(受付: 1989年8月15日特掲)

URINARY hLH SURGE AS A PREDICTOR OF POSSIBLE PREGNANCY

Takashi OKAMURA, Toru TAKEUCHI, Osamu NISHII
and Tsutomu YAGINUMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,
University of Tokyo at Mejirodai, Tokyo 112, Japan

Abstract: The midcycle urinary human luteinizing hormone (hLH) surge in 40 infertile women was measured by a new semiquantitative immunoassay method (D86002 EIKEN CHEMICAL Co., Ltd. Japan) and the effects of this surge were carefully evaluated. The subjects were divided into two groups according to the peak level and/or duration of hLH surge. The patient-1 (P-1) group (10 women) had a peak level above 80 mIU/ml and/or had a duration which fit the criteria in the previous report. The patient-2 (P-2) group (30 women) had a peak level of 40 mIU/ml or less and/or a duration of less than those in the P-1 group. The mean ($\pm$ SD) peak levels in the P-1 and the P-2 groups were 67.7 ± 35.6 mIU/ml and 21.6 ± 26.2 mIU/ml, respectively. Of the ten women in the P-1 group eight women were pregnant. In one of the two who were not pregnant, it was revealed that oligospermia led to the infertility. With the exception of the above case, the pregnancy rate in the P-1 group was 88.9% (8/9). Meanwhile, only two of the 30 women in the P-2 group were pregnant. The pregnancy rate in the P-2 group was 7.1% (2/27) disregarding three women due to male infertility. This difference was highly significant ($p < 0.001$). Therefore, the women in the P-1 group, with a peak hLH level of greater than 80 mIU/ml, had a high probability of conception.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 24-30, 1990)

Introduction

An improved semiquantitative immunoassay method for urinary human luteinizing hormone (hLH) was recently introduced¹⁾. We previously reported in this publication the hLH levels in 12 infertile women divided into two groups according to the hLH peak levels in daily 3-hour urine samples while awake during the periovulatory phase: Patient-1 (P-1) group (5 women) had a peak level above 80 mIU/ml, and the patient 2 (P-2) group (7 women) had a level of 40 mIU/ml or less; the midcycle urinary hLH surge in the P-2 group had a shorter duration than that in the P-1 group. The hLH surge duration in the P-1 group was also shorter than that of eight normal women in the

control (C) group. Thus we proposed that the infertility might be explained, at least in part, on the level and duration of urinary hLH in midcycle surge. Furthermore, three of the five women in the P-1 group were pregnant within one year of the completion of the study. None P-2 group women, however, became pregnant. Therefore further study appeared necessary to clarify the clinical implications of this study. Taking this into consideration, the present study, therefore, extended the previous work on the duration and the peak of hLH midcycle surge, and was designed to determine the prospective expectation as to whether or not the infertile women could conceive on the basis of the result of the hLH surge measurement.

Materials and methods

Forty infertile women and 3 women with anovulatory menstrual cycle participated in this study. The clinical profile is shown in Table 1. The basal body temperature (BBT) was recorded and a biphasic shift in the curve was noted in all 40 women. The following treatment were used for infertility or anovulation. Clomiphene citrate (clomid) therapy, clomid was given on day 5 of the menstrual cycle at a dose of 100mg or 150mg per day for 5 days. In human menopausal gonadotropin-human chorionic gonadotropin (hMG-hCG) therapy, hMG administration was started within the 5th day of the menstrual cycle at a dose of 75 IU or 150 IU per day until the follicle diameter by ultrasonography was greater than 18cm or the urinary estrogen level reached 80 ng/ml by Hi-Estrotec. Then 5,000 IU of hCG was administered.

The urine specimens were collected at least once a day from the 11th day of the menstrual cycle to the termination of hLH surge. Urinary hLH surge was determined by a new semi-quantitative immunoassay kit (D86002 EIKEN CHEMICAL Co., Ltd. Japan) on all such occasions. This kit, utilizing monoclonal antibodies, can reliably detect urinary hLH levels from 2.5 mIU/ml to 640 mIU/ml in approximately 2 hours. For the details of this method, please refer to the above-mentioned papers^{1,2)}.

As previously mentioned, the infertile women were divided into two groups according to the hLH peak levels: Patient-1 (P-1) group had a peak level of above 80 mIU/ml and patient-2 (P-2) group had a level of 40 mIU/ml or less. The subdivided cumulative durations of hLH secretion in the periovulatory phase of more than 40, 20, 10 and 5 mIU/ml were 15.6 ± 8.5 hours, 25.2 ± 5.9 hours, 35.2 ± 4.2 hours and 41.1 ± 3.6 hours in the P-1 group, and 3.1 ± 3.8 hours, 11.4 ± 5.8 hours, 19.4 ± 11.0 hours and 25.7 ± 9.6 hours in the P-2 group, respectively. The overall results of the urinary hLH surge in 40 infertile women, the subdivided durations and peak levels were used to determine the P-1 and P-2 groups classification.

The hLH surge duration was defined as the

time of hLH secretion of above 5 mIU/ml, and the luteal phase was defined as the length from one day after of the nadir on the BBT chart nearest the urinary hLH surge to the day before the period.

The day with the highest urinary hLH value was used as the reference point (Day 0) for each cycle; days prior to this were indicated by a minus sign

Student's *t* test and the χ^2 test were used for statistical comparisons.

Results

The urinary hLH syрге of 63 cycles in 40 women were evaluated. According to the results, ten (25.0%) of the 40 women were in the P-1 group and the remaining 30 (75.0%) women were in the P-2 group (Table 1).

P-1 group

All of the urinary hLH surge durations of the 14 cycles in the P-1 group fit the criteria of the classification. Namely, hLH surges extending over 2 days were noticed in all 14 cycles. Peak hLH surge levels of above 80 mIU/ml, however, were not detected in 4 cycles of 3 women. The urine specimens of these 4 cycles were collected only once a day. The mean ($\pm$ SD) peak level of hLH surge was 67.7 ± 35.6 mIU/ml (range from 20 to 160 mIU/ml).

The infertile durations at the first visit were from 2.5 to 4 years. Eight of the 10 women in the P-1 group were pregnant, and thus the pregnancy rate was 80.0%. Two women were not pregnant during the period of this study; both of these women were primary infertility. In one woman, it was revealed, as a result of her husband's semen analysis, that oligospermia was a factor in the infertility. However, the ultimate cause of infertility in the other woman is not clear, although luteal insufficiency and obesity were factors. This male infertility case was excluded from the statistical analyses. Consequently, the revised pregnancy rate was 88.9% (8/9). The outcome of pregnancy was as follows: one delivered at term, one was miscarried and the others were uneventful. The case of miscarried may have been due to an

autoimmune disorder because of a high titer of antinuclear antibodies; three previous pregnancies also resulted in miscarriages.

Laparoscopic findings revealed that two women had a complication of endometriosis. One woman was given danazol at a dose of 400mg per day for 4 months; the other woman, however, was not given medication. Both women became pregnant. Hysterosalpingography confirmed bilateral patent tubes and a normal uterus shape in all women.

Concerning the hormonal treatment, 2 were

given hMG-hCG, 4 were given clomid and 5 did not receive medication. One of the two women who were not pregnant was given clomid and the other (male infertility) was given hMG-hCG. Nine women, including the two women failed to conceive, were instructed to have intercourse and one woman underwent artificial insemination with husband's semen (AIH) at the day of hLH surge.

In the BBT charts, eight women showed normal findings but two women showed luteal insufficiency. One of the two women with luteal insufficiency was pregnant. The thermal nadirs were seen

Table 1. Clinical profile of the 40 infertile patients studied

	P-1 (n=10)	P-2 (n=30)
Age (years)	32.9±3.8	33.2±2.6
(range)	29-40	25-43
Peak level of hLH surge (mIU/ml)	67.7±35.6*	21.6±26.8
Duration of hLH surge (days)	2.4±0.7*	1.0±0.7
Shift in BBT chart		
Normal biphasic	8	6
Luteal insufficiency	2	24
Luteal phase (days)	13.3±2.3	12.0±2.6
Classification of infertility		
Primary infertility	8	24
Secondary infertility	2	6
Gravidity (1, ≥ 2)	1, 1	6, 0
Parity (1, ≥ 2)	0, 0	0, 0
Duration of infertility (years)	3.0±0.6**	5.2±3.1
(range)	2.5-4.0	2.0-13.0
Cause of infertility		
Male	1	3
Female		
Hemilateral tubal occlusion	0	4
Endometriosis	2	3
Other	1	5
Unknown/Luteal insufficiency	6	25
Treatment		
Clomid	4	18
hMG-hCG	2	11
Other	0	5
None	5	6
Pregnancy rate (%)	88.9*	7.1

Values are mean±SD.

*p<0.001 when compared with P-2 group.

**p<0.05 when compared with P-2 group.

from Day -3 to Day 2. The correspondance of thermal nadir and hLH surge occurred in only three cycles (21.4%).

P-2 group

In the P-2 group, the urinary surge was not detectable in four women, even with repeat studies. All of the P-2 group women, except two cases, had a duration of a day or a few hours and a peak level ranging from 5 to 40 mIU/ml. The two cases had a peak level of 160 mIU/ml and 80 mIU/ml in one cycle but 10 mIU/ml studied in another cycle. The mean ($\pm$ SD) hLH surge level in the 49 cycles was 21.6 ± 26.8 mIU/ml.

The infertile durations at the first visit were from 2 years to 13 years. Six of the 30 women were secondary infertility and the remaining 24 women were primary infertility. All of the previous pregnancies, excluding one woman who underwent an induced abortion, were spontaneously terminated at the first trimester. Two of the 30 women were pregnant during this study. The overall pregnancy rate was 6.7%. Three women were excluded due to male infertility and the revised pregnancy rate was 7.1%. One of the two women who were pregnant was 26 years old, secondary amenorrheic (grade I) and had primary infertility for three years at the first visit. The urinary hLH surge, of course, was not detected. For the induction of ovulation, clomid was administered but there was still failure to ovulate. Successive hMG-hCG administration in addition to AIH resulted in pregnancy. The other woman was 31 years old and secondary infertility. Her previous pregnancy of three years ago terminated spontaneously at the first trimester. The peak level of urinary hLH surge was 20 mIU/ml but its duration lasted for only one day. This woman was placed on clomid and administered hCG after AIH. The prenatal courses of these two women were uneventful to the present time.

The factors regarding the cause of infertility or anovulation were as follows: oligospermia (3 cases), endometriosis (3 cases), luteal insufficiency (24 cases), unilateral tubal occlusion (4 cases), uterus myoma (1 case), hyperandrogenism (2 cases) and hyperprolactinemia (2 cases). The

three women with endometriosis were given danazol at a dose of 400mg per day for 4 months after microsurgical adhesiotomy. Clomid and/or hMG were administered for the treatment of luteal insufficiency, traditional herbal medicine (SHAKUYAKU-KANZO-TO) for hyperandrogenism and parlodel for hyperprolactinemia.

In the BBT charts, six of 30 women showed normal findings but the remaining 24 women showed luteal insufficiency. The duration of the luteal phase ranged from 6 days to 17 days. The thermal nadirs were seen from Day-2 to Day 3. In only 12 (24.5%) of 49 cycles, the thermal nadirs were on Day 0.

Amenorrheic patients

The urinary hLH surge of three women with secondary amenorrhea was examined. Two women (18 and 19 years old) were administered hMG-hCG and one woman (25 years old) was administered clomid. The urinary hLH surge was not detectable and the BBT chart was monophasic in these three women. In one of the two women administered hMG, the level of urinary hLH usually ranged from 5 to 10 mIU/ml during and after hMG administration. The levels of urinary hLH in the others, however, were usually below the level of sensitivity.

Discussion

To predict the accurate ovulatory day, it is critical to determine the midcycle hLH surge. Furthermore, this surge has many types of effects on the environment in periovulatory phase, such as luteinization of granulosa cells and the synthesis of prostaglandins, essential for follicle rupture, and also effects on the microenvironment within the oocyte itself, such as meiosis. In our previous study, we suggested that the midcycle hLH surge in infertile women was short in duration and had a low peak level, and this inadequate hLH secretion in the midcycle may lead to infertility. The purpose of this study was to determine from the results of the hLH surge measurement whether or not the infertile women could conceive.

As shown in Table 1, the peak level and dura-

tion in the P-1 group were significantly high and long compared with those in the P-2 group. The duration of hLH surge in both groups in Table 1 are a length of hLH secretion of more than 5 mIU/ml. Therefore, the hLH surge in the P-1 group close to that of normal woman, was consistently detected in the urine sampling at least once a day. In the P-2 group, however, it was necessary to use 2 or 3 samples of urine each day for analyses of the identification of the surge.

The rates of pregnancy in the P-1 and P-2 groups were 88.9% and 7.1%, respectively. When analyzed by the χ^2 -test procedure, this difference was highly significant ($p < 0.001$). Women with luteal insufficiency, as determined by the BBT charts, were numerous in the P-2 group. Although the luteal phase duration in the P-1 group tended to be longer than that in the P-2 group, the difference of this duration between both groups was not significant. This result agreed with our previous report. Additionally, however, in that report the differences between the high and low phase on the BBT chart in the P-2 group were small, and the mean value of estradiol (E_2) surge in the P-2 group was significantly high compared with that in the C group but there was no significant differences between the P-1 and the P-2 groups.¹⁾ This variation in E_2 values might be due to ovulatory induction. Likewise, urinary pregnanediol values in the P-2 group tended to be high compared with the other groups.²⁾ Balasch et al.³⁾ reported that an endometrial luteal phase deficiency in infertile patients presenting spontaneous cycles with long follicle phases (≥ 20 days) was detected in 39.4%, although in 77% of them the progesterone levels were normal, and therefore, a prolonged follicle phase might reduce fertility. The rate of pregnancy in the P-2 group was low regardless of the high E_2 values and almost normal BBT charts. It seemed that the marked hormonal differences which led to the discrepancy in the pregnancy rate between both groups were the peak value and the duration of hLH surge. Then 100 μ g of LH-RH was administered intramuscularly at the initiation of hLH surge in the 13 cycles of seven women in the P-2 group. Urinary hLH responded well to the LH-RH administration in all seven women but

none was pregnant. Hence the differences in hLH surge duration and peak value might not be the "cause" but rather the "effect" of infertility for unknown reasons. Lewinthal et al.⁴⁾ pointed out that luteinized unruptured follicle (LUF) syndrome occurs statistically more frequently in women with unexplained infertility than in the fertile population. This defective follicle growth might result from changes of intrafollicular androgen due to an excess of hLH in the early phases of follicle growth. The LUF syndrome may be, at least in part, a causative factor, but the presurge or surge of hLH in the P-2 group was smaller or shorter compared to the C group as shown in this study and the previous study.¹⁾

There is no distributive disparity in the classification of infertility. Collins et al.⁵⁾ reported that secondary infertility is associated with a better prognosis for infertile couples, and this might be related to the higher proportion of couples with ovulation disorders, who had a shorter duration of infertility. In our study, the possible pregnancy was uninfluenced by the existence of a previous pregnancy. However, it appeared that the duration of infertility may have an effect on the consequence.

Endometriosis also plays a key role in infertility. A diagnosis of endometriosis, confirmed by laparoscopy, was made in five women. However, if there were more laparoscopic examinations, more cases of endometriosis might be found. It was previously thought that endometriosis caused infertility through dense adhesions and subsequent tubal dysfunction. Recently many other factors have been noted in the cause of infertility in endometriosis, such as prostaglandin, macrophage, fibronectin or autoimmune factor, and these have been disputed.^{6,7,8)} The sample size of endometriosis in this study was too small to achieve statistical significance, and thus it was not clear whether or not endometriosis leads to the difference in the pregnancy rate.

All of the women who participated in this study were instructed to have intercourse or underwent AIH at the day of urinary hLH surge. Kossoy et al.⁹⁾ reported that patients in one group utilized urinary hLH testing in addition to BBT and

cervical mucus (CM) examinations to time their insemination, and in the other group insemination was timed with only BBT and CM examinations, but there were no significant differences in the monthly fecundability between the two groups. In our study, however, the correspondance of thermal nadir and hLH surge was noticed in only one fourth of the cycles and it was difficult to precisely predict the ovulation time by CM examination. Furthermore, many authors have suggested that the detection of the hLH surge is useful to predict the ovulation time.^{10,11,12)} Considering the effects of hLH surge and BBT charts retrospectively, the most of the women who became pregnant underwent AIH or had intercourse on the day of hLH peak.

Of the two cycles studied in the two women in the P-2 group, one peak level was 160 mIU/ml and the other was 80 mIU/ml. Both of their durations, however, were less than 24 hours and their subsequent levels were 10 mIU/ml. High peak levels of hLH surge were occasionally noticed or might alterna with low peak levels in the P-2 group. Therefore, it seemed there was a little possibility for pregnancy in the P-2 group. On the other hand, the peak levels and durations of the hLH surge in samples in which more than two cycles were examined in the P-1 group were consistently satisfied the criteria.

In amenorrheic women, there were 2 patterns of urinary hLH secretion. In one pattern, a low level of hLH, less than 10 mIU/ml, was continuously secreted and in the other, the level was consistently below the sensitivity level. The previous report showed that the urinary hLH levels were unaffected during hMG administrations, such that the continuous secretions of hLH were derived from intrinsic hLH.

In conclusion, the infertile woman could have a high conception probability if she had a high peak level of hLH surge of more than 80 mIU/ml in a once-a-day urine sampling and/or had a level of more than 20 mIU/ml lasting for 2 days or more. Acknowledgement: We wish to thank Miss K. Kigasawa for analysis assistance and Eiken Chemical Co., Ltd. for the kit preparation.

References

- 1) Okamura, T., Nishii, O., Takeuchi, T. and Yaginuma, T.: Urinary hLH surge in infertile women results in low and short, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 34: 258, 1989
- 2) Okamura, T., Kigasawa, K., Nishii, O., Takeuchi, T. and Yaginuma, T.: Urinary hLH surge in infertile women, *Int. J. Gynecol. Obstet.* (submitted)
- 3) Balasch, J., Creus, M. and Vanrell, J. A.: Luteal function after delayed ovulation, *Fertil. Steril.*, 45: 342, 1986
- 4) Lewinthal, D., Furman, A., Blankstein, J., Corenblum, B., Shalev, J. and Lunenfeld, B.: Subtle abnormalities in follicular development and hormonal profile in women with unexplained infertility, *Fertil. Steril.*, 46: 833, 1986
- 5) Collins, J. A., Rand, C. A., Wilson, E. H., Wrixon, W. and Casper, R. F.: The better prognosis in secondary infertility is associated with a higher proportion of ovulation disorders, *Fertil. Steril.*, 45: 611, 1986
- 6) Syrop, C. H. and Halme, J.: A comparison of peritoneal fluid parameters of infertile patients and the subsequent occurrence of pregnancy, *Fertil. Steril.*, 46: 631, 1986
- 7) Kauma, S., Clark, M. R., While, C. and Halme, J.: Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with or without endometriosis, *Obstet. Gynecol.*, 72: 13, 1988
- 8) Meek, S. C., Hodge, D. D. and Musich, J. R.: Autoimmunity in infertile patients with endometriosis, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 1365, 1988
- 9) Kossy, L. R., Dalglisch, C. S., Hill, G. A., Dupont, W. D., Herbert, C. M., Wentz, A. C. and Brodie, B. L.: Therapeutic donor insemination: the impact of insemination timing with the aid of a urinary luteinizing hormone assay, *Fertil. Steril.*, 49: 1026, 1988
- 10) Quagliarello, J. and Arny, M.: Inaccuracy of basal body temperature charts in predicting urinary luteinizing hormone, surge, *Fertil. Steril.*, 45: 334, 1986
- 11) Knee, G. R., Feinman, M. A., Strauss III, J. F., Blasco, L. and Goodman, D. B. P.: Detection of the ovulatory luteinizing hormone (LH) surge with a semiquantitative urinary LH assay, *Fertil. Steril.*, 44: 707, 1985
- 12) Hirsch, K. E., Goldzieher, J. W., Gibbons, W. E. and Besch, P. K.: Evaluation of the ovustick urinary luteinizing hormone kit in normal and stimulated menstrual cycles, *Obstet. Gynecol.*,

67: 450, 1986

尿中 LH 測定は不妊症の 予後判定に有用か?

東京大学医学部附属病院分院産婦人科

岡村 隆 武内 亨 西井 修
柳沼 恣

不妊婦人 40 例の尿中 LH サージを新キットにて測定し、詳細に検討した。LH サージのピーク値 (P) と持続時間 (D) によりこれら不妊婦人は 2 群 (P-1 群: $P \geq 80$ mIU/ml, $D > 24$ 時間; P-2 群: $P \leq 40$ mIU/ml, $D \leq 24$ 時間) に分類された。これら 2 群の P 値 (平均 $\pm$ SD) はそれぞれ 67.7 ± 35.6 mIU/ml および 21.6 ± 26.2 mIU/ml であり、有意差 ($P < 0.001$) を認めた。P-1 群 10 例中 8 例が、また P-2 群 30 例中 2 例が妊娠した。両群には計 4 例の乏精子症が含まれていたため、これらを除外すると両群の妊娠率はそれぞれ 88.9% (8/9) および 7.1% (2/27) であり、有意差 ($P < 0.001$) を認めた。これらのことは、原因不明の不妊症患者のうち $P \geq 80$ mIU/ml, $D > 24$ 時間の不妊婦人はその 8 割以上が妊娠する可能性があることを示唆するものと思われた。

(受付: 1989 年 5 月 23 日)

子宮内膜における prolactin の 局在に関する検討

Significance of Localization of Prolactin in Human Endometrium

長崎大学医学部産婦人科教室

黄 宏 駿 岡 本 純 英 石 丸 忠 之
Hung June HUANG Sumihide OKAMOTO Tadayuki ISHIMARU
山 辺 徹
Tooru YAMABE

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan

子宮内膜における PRL の局在について免疫組織化学的に検索した。Formalin 固定, paraffin 包埋による薄切組織切片に抗ヒト PRL 抗体を添加し, ABC 法による酵素抗体染色法を用いて PRL の呈色を行った。分泌初期の腺上皮, また分泌中期, 後期および妊娠初期内膜の腺上皮と脱落膜化間質細胞に PRL の存在が証明されたが, 増殖後期の子宮内膜では PRL の存在は認められなかった。一方, 卵巣における嚢胞性子宮内膜症の異所性内膜は増殖期内膜に類似した像を呈するが, その腺上皮に PRL の局在がみられた。上記の成績から, 子宮内膜における PRL 分泌に progesterone の作用が関与していることが示唆された。また分泌中期および後期の子宮内膜に PRL が存在することは妊卵着床の完成に関与するものと思われる。しかし子宮内膜症においても PRL が存在し, 妊卵の着床障害の一因をなすものと考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 31-35, 1990)

はじめに

ヒト性周期における末梢血 prolactin (PRL) 値の推移は, 卵胞期に低く, 排卵期では estrogen surge に一致して一過性に増加し, 黄体期には初期より中期および後期になるにつれて, 順次上昇し, 妊娠に移行するとさらに高値となる傾向を有する¹⁾。このような変動とくに排卵期における PRL 高値には estrogen が関与し, 黄体期では脱落膜化間質細胞からも PRL が産生分泌されるものと考えられている²⁾。一方, 子宮内膜症に高 PRL 血症や乳漏症がそれぞれ 22% および 50~89% の頻度で合併するとの報告もある^{3,4)}。そこで, 私どもは正常子宮内膜および異所性子宮内膜における PRL の局在について免疫組織化学

的に検討した。

対象と方法

対象は 20~32 歳の婦人で, 子宮内膜試験搔爬により得られた増殖後期 4 例, 分泌初期 10 例, 分泌中期 4 例, 分泌後期 9 例, 卵巣の子宮内膜症 4 例および妊娠初期 (不全流産を含む) 5 例, 合計 36 例である (表 1)。採取された内膜組織は formalin 固定, paraffin 包埋後, 4 μ m の薄切標本を作製し, HE 染色と同時に, 隣接切片に酵素抗体染色を施した。すなわち, 抗ヒト PRL の monoclonal 抗体 (IMT, USA, x200) を用いて, avidin biotin-peroxidase complex (ABC) 法による PRL の呈色反応を行った (表 2)。なお妊娠 6 週の絨毛を positive control とし, 抗ヒト

PRL の monoclonal 抗体を省略したものを negative control とした。

結 果

1. 妊娠初期の胎盤絨毛

妊娠 6 週の絨毛では、酵素抗体法により syncytium 細胞が黄褐色に呈色されていたのに対して、Langhans 細胞および間質は弱陽性または陰性であった。

2. 増殖期内膜

正常月経周期の増殖後期内膜においては、内膜腺は著しく延長屈曲し、核は大きく偽重層化がみられた。間質は緻密で豊富であり、間質細胞は細胞質に乏しく核は卵円形を呈していた。免疫組織化学的には、全例において、腺上皮および間質細胞はともに呈色されず、PRL の局在は認められなかった(表 3)。

3. 分泌期内膜

分泌初期の内膜では、腺上皮細胞は立方状を呈し、核下空胞が出現し、核上部の細胞質は淡黄色に呈色され、PRL は少量ながら存在していた(図 1)。間質の一部は浮腫状を呈し、陽性反応は認められなかつ

た。
分泌中期では、腺は迂曲拡張し、腺上皮細胞は高立方状を呈し、核は基底に近く位置し、細胞質は豊富で核下空胞は殆んど消失していた。間質の浮腫は分泌初期に比べて増強し、螺旋動脈壁の肥厚がみられるようになった。免疫組織化学的には、4 例とも



図 1 分泌初期内膜。内膜腺の核上部細胞質は淡黄色に呈色され、間質細胞は陰性である。

表 1. 対 象

妊娠初期絨毛	1
増殖後期内膜	4
分泌初期内膜	10
分泌中期内膜	4
分泌後期内膜	9
妊 娠 内 膜	5
子宮内膜症	4

表 3. 子宮内膜組織における prolactin 陽性部位

	腺上皮細胞	間質細胞
増 殖 期 (n= 4)	0	0
分 泌 初 期 (n=10)	2	0
分 泌 中 期 (n= 4)	4	1
分 泌 後 期 (n= 9)	9	6
妊 娠 初 期 (n= 5)	5	5
卵巣子宮内膜症 (n= 4)	3	0

表 2. The Avidin-Biotin Peroxidase Complex Method
(for monoclonal antibody against human prolactin)

1. Deparaffinize sections in xylene
2. Rehydrate through graded ethanol series
3. Abolish endogenous peroxidase activity with 0.6% hydrogen peroxide in methanol.
4. Wash in three changes of PBS
5. Suppress nonspecific background staining with 10% normal goat serum
6. Apply monoclonal antibody to tissue section for 30 minutes at room temperature
7. Wash in three changes of PBS
8. Apply biotinylated goat-anti-rabbit IgG antiserum (1:200) for 30 minutes
9. Wash in three changes of PBS
10. Apply avidin-biotin peroxidase complex for 40 minutes
11. Wash in three changes of PBS
12. Incubate with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide in TRIS buffer
13. Wash well in distilled water
14. Counterstain with Hematoxylin
15. Dehydrate through graded ethanol series, clear in xylene, and coverslip with Permount

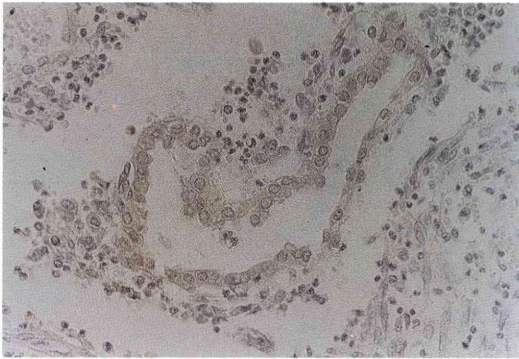


図 2 分泌中期内膜, 腺上皮細胞における PRL の呈色性は分泌初期に比べて増強しているが, 間質はおな陰性である。

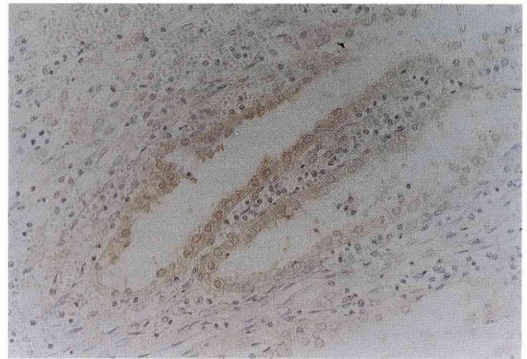
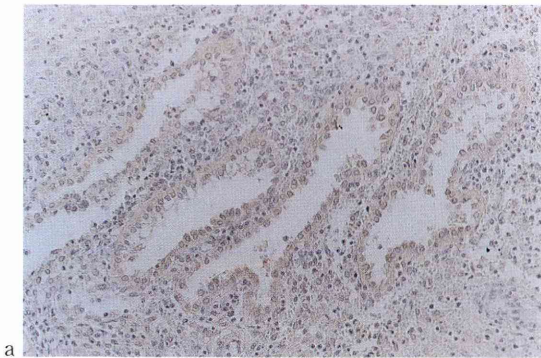


図 4 黄体機能不全症の内膜, 内膜腺上皮細胞における PRL の呈色性は低下するとともに, 呈色性の差がみられる。



a

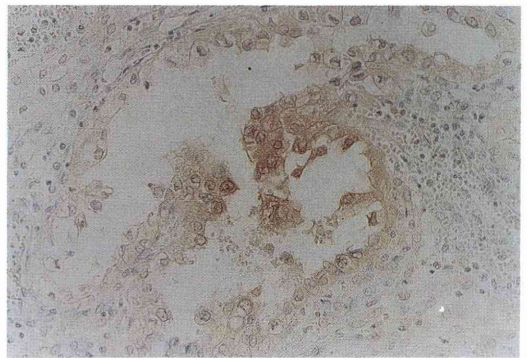
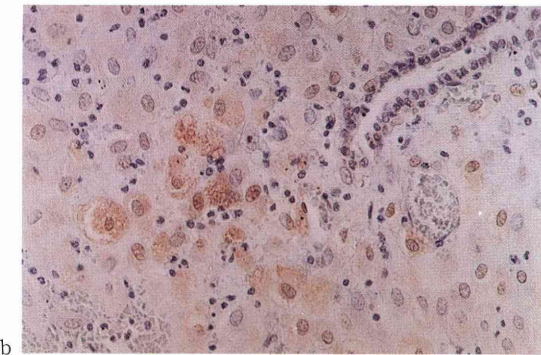


図 5 妊娠内膜, 腺上皮および脱落膜細胞はともに PRL 陽性である。



b

図 3 分泌後期内膜, 腺上皮における PRL の呈色性は均一であり, 腺上皮細胞には呈色性の相違はみられない(a). 螺旋動脈周囲の脱落膜化細胞では陽性と陰性の細胞が混在し, 陽性細胞の間にも呈色性の差がみられる(b).

低立方状を呈し, 核は基底に位置していた。螺旋動脈周囲の間質細胞は肥大して脱落膜化を呈していた。免疫組織化学的には, 腺上皮細胞の呈色性は均一であり, その程度は分泌中期に類似し, また個々の腺上皮細胞には呈色性の相違はみられなかった(図 3 a)。一方, 螺旋動脈周囲の脱落膜化細胞は概して陽性であったが, 陰性の細胞が混在するとともに, 陽性細胞の間にも呈色性の差がみられた(図 3 b)。これに対して, 黄体機能不全症の内膜では, それぞれの腺上皮細胞染色性の差がみられ, 全般的に PRL の呈色性は減弱していた(図 4)。一方, 間質の脱落膜化細胞は比較的小型で, 陽性細胞が減少するとともに呈色性も低下していた。

4. 妊娠初期の内膜

正常妊娠および不全流産における子宮内膜の腺上皮細胞はやや大型で, 腺は著明に拡大し迂曲蛇行して腺腔内への分泌物が増量し, 間質脱落膜細胞の ballooning 現象が著明であった。免疫組織化学的には, 腺上皮および脱落膜細胞はともに陽性反応が認められたが, 正常妊娠と不全流産の間における PRL

に腺上皮細胞の細胞質に陽性反応がみられ, その程度は分泌初期よりも著明であり, そのうちの 1 例においては間質細胞にも陽性反応がみられた(図 2)。

分泌後期内膜では, 腺は著しく迂曲蛇行し, 著明に拡大した腺腔内に分泌物がみられ, 腺上皮細胞は

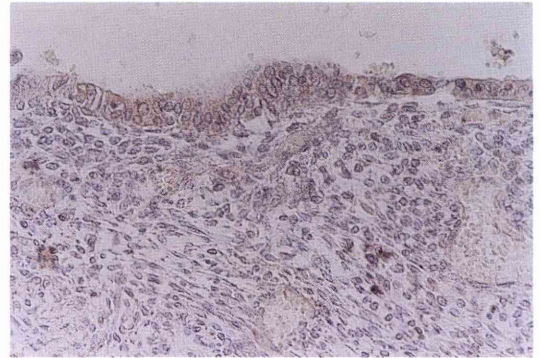
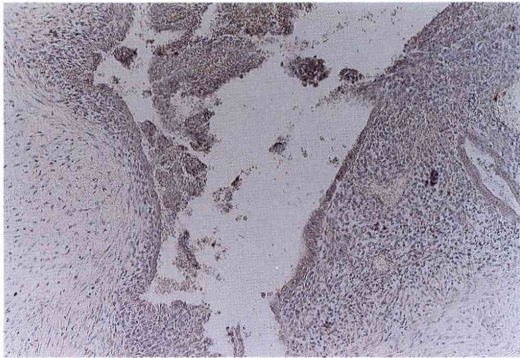


図6 卵巣子宮内膜症. 腺上皮細胞のみがPRL陽性を呈し, 間質は陰性である (a: $\times 40$, b: $\times 100$).

の呈色性に差は認められなかった (図5).

5. 卵巣子宮内膜症

卵巣が嚢腫性に腫大した子宮内膜症では, 低密度の内膜腺とその周囲に間質組織がみられ, 腺腔内や間質の所々に小出血や hemosiderin の沈着がみられた. 免疫組織化学的には, 4例のうち3例に陽性反応がみられたが, ともに腺上皮に局限していた (図6).

考 察

抗ヒト PRL monoclonal 抗体を用いた酵素抗体染色法により, 分泌期および妊娠初期の子宮内膜に PRL の局在が証明された. すなわち, 分泌初期では腺上皮細胞に, また分泌中期, 分泌後期および妊娠初期の内膜では腺上皮のみでなく間質細胞にも PRL の局在が認められた. しかし増殖期内膜には PRL の局在が認められなかったことから, 子宮内膜における PRL の存在には progesterone が関与しているものと思われる.

また黄体中期から後期における子宮内膜の呈色性が強い点から, この時期には PRL の局所濃度はかなり高いことが予想され, PRL の存在が妊卵の着床に何らかの影響を与えているのかもしれない. 一方, 子宮内膜症においても PRL が証明され, このような異所性内膜からも PRL が分泌されるものと考えられる. それによって妊卵の着床を障害する可能性も否定できない. また黄体機能不全症の子宮内膜では, 呈色性が弱く, PRL 分泌が少ないものと思われる. この点について, Levy ら⁵⁾は細胞質および核における progesterone receptor の減少または質的変化が生じ, progesterone に対する反応性が低下した結果, 内膜の PRL 分泌機構に異常を生じるものと論じている. このような例に対して, hCG または progesterone を投与し黄体を賦活させることにより, 内膜の反応

遅延を正常化させることができるという⁶⁾.

一方, 増殖期内膜に progesterone を添加し培養することにより子宮内膜から PRL が分泌され⁷⁾, また分泌後期の内膜は progesterone の添加培養により, PRL 分泌が亢進することから⁸⁾, 分泌内膜は PRL 産生能を有することが考えられる. また妊娠初期の壁脱膜より PRL の mRNA が抽出されたことから⁹⁾, 妊娠時の脱膜細胞においても PRL 分泌能を有するものと思われる. しかし PRL に対する polyclonal 抗体による酵素抗体染色で, Kauma-Shapiro は脱膜細胞にのみ PRL が局在するとし¹⁰⁾, Meuris らは PRL は腺上皮および脱膜化間質細胞の両方に存在するという¹¹⁾. これに対して, McRae らは PRL の monoclonal 抗体を用いて検討し, 私どもの成績と同様に, 分泌初期の内膜では腺上皮にのみ, また分泌後期では腺上皮および脱膜化間質細胞の両方に局在することを指摘した¹²⁾. このように, 使用する抗体の種類により結果が異なることは, 抗体の特異性に相違があるほか, 組織固定液による PRL 抗原性の破壊など原因として考えられる. したがって, ABC 法などの検出精度の高い酵素抗体染色法を使用することが望ましく, また非妊時の子宮内膜よりの PRL mRNA の検出が期待される.

分泌期内膜からは PRL のほか, PP14¹³⁾, AUP¹⁴⁾, α_2 -PEG¹⁵⁾ および PEP¹⁶⁾ などの蛋白が分泌されることが知られている. とくに α_2 -PEG は腺分泌能の旺盛な分泌中期には少なく, 分泌後期に大量に出現し, PRL の月経周期における変化と類似しており, PRL とともに妊卵の着床に関わるものと考えられる.

文 献

- 1) Robyn, C., Delvoye, P., Nakin, J., Vakemans, M., Badowi, M., Perez-Lopez, FR. and L'Hermite, M.: Prolactin and human reproduction. In

- Human Prolactin, Edited by J.L. Postels, C. Robyn, 167, Excerpta Medica/American Elsevier, 1973
- 2) Maslar, L. A. and Riddick, D. H.: Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle, *AM. J. Obstet. Gynecol.*, 135: 751, 1979
 - 3) Hirschowitz, J. S., Soler, N. G. and Wortsman, J.: The galactorrhea endometriosis syndrome, *Lancet*, 1: 896, 1978
 - 4) Hargrove, J. T. and Abraham, G. E.: Abnormal luteal function in endometriosis, *Fertil. Steril.*, 34: 302, 1980
 - 5) Levy, C., Robel, P., Gautray, J. P., de Brux, J., Verma, U., Descomps, B. and Baulieu, E. E.: Estradiol and progesterone receptors in human endometrium-normal and abnormal menstrual cycles and early pregnancy, *AM. J. Obstet. Gynecol.*, 136: 646, 1980
 - 6) Ying, Y., Walters, C. A., Kuslis, S., Lin, J., Daly, D. C. and Riddick, D. H.: Prolactin production by explants of normal, luteal phase defective and corrected luteal phase defective late secretory endometrium, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 151: 801, 1985
 - 7) Daly, D. C., Maslar, I. A. and Riddick, D. H.: Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145: 672, 1983
 - 8) Ila, A., Maslar, Patti, Powers-Craddock and Rudi, Ansbacher: Decidual Prolactin Production by Organ Cultures of Human Endometrium: Effects of Continuous and Intermittent Progesterone Treatment, *Biology of Reproduction*, 34: 741, 1986
 - 9) Clements, J., Whitfield, P., Cooke, N., Healy, D., Matheson, B., Shine, J. and Funder, J.: Expression of the prolactin gene in human decidua-chorion, *Endocrinol.*, 112: 1133, 1983
 - 10) Scott Kauma, and Sander S. Shapiro: Immunoperoxidase localization of prolactin in endometrium during normal menstrual, luteal phase defect, and corrected luteal phase defect cycles, *Fertil. Steril.*, 46: 37, 1986
 - 11) Meuris, S., Sounmenkoff, G., Malengreau, A. and Robyn, C.: Immunoenzymatic localization of prolactin-like immunoreactivity in decidual cells of the endometrium from pregnant and nonpregnant women, *J. Histochem. Cytochem.*, 18: 315, 1980
 - 12) Mary Ann, McRae, Geoff, R. N., Sheila, M. F. R. C. O. G., Bharat Jasani, M. B., Ch. B.: Immunohistochemical identification of prolactin and 24K protein in secretory endometrium, *Fertil. Steril.*, 45: 643, 1986
 - 13) Julkunen, M., Koistinen, R., Sjöberg, J., Rutanen, E. M., Wahlstrom, T. E. and Seppala, M.: Secretory endometrium synthesizes placental protein 14, *Endocrinol.*, 118: 1782, 1986
 - 14) Horne, C. H. W., Paterson, W. F. and Sutcliffe, R. G.: Localization of alpha uterine protein in human endometrium, *J. Reprod. Fert.*, 65: 447, 1982
 - 15) Waites, G. T., Wood, P. L., Walker R. A. and Bell, S. C.: Immunohistological localization of human endometrial secretory protein, 'pregnancy-associated endometrial $\alpha 2$ -globulin' ($\alpha 2$ -PEG), during the menstrual cycle, *J. Reprod. Fert.*, 82: 665, 1988
 - 16) Mazurkiewicz, J. E., Bank, J. F. and Joshi, S. G.: Immunocytochemical localization of a progestagen-associated protein in the human decidua, *J. clin. Endocr. Metab.*, 52: 1006, 1981

Significance of localization of prolactin in human endometrium

Hung June Huang, Sumihide Okamoto,
Tadayuki Ishimaru and Tooru Yamabe

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Nagasaki University,
Nagasaki 852, Japan

To investigate the production site of endometrial prolactin in nonpregnant and pregnant women, 4 proliferative endometria, 10 early secretory endometria, 4 midsecretory endometria, 9 late secretory endometria, 5 pregnant endometria and 4 ovarian endometrial cysts were examined with avidin-biotin complex immunoperoxidase technique using monoclonal antibody against human prolactin. Only glandular epithelial cells stained for human prolactin in 2 early secretory endometria and in 3 endometria of endometrial cyst. However, both glandular cells and decidual cells exhibited positive staining in 4 mid-secretory and 9 late secretory and 3 pregnant endometria, whilst, no endometrial prolactin can be detected in proliferative endometrium.

These results suggest that glandular cells and/or decidual cells may be the site of prolactin production and the production from these cells could be induced by progesterone. Moreover, the prolactin production from ovarian endometriosis may interfere the implantation of fertilized ovum.

(受付: 1989年5月19日)

ENDOCRINE FUNCTION DURING PREGNANCY FOLLOWING BROMOCRIPTINE TREATMENT IN INFERTILE WOMEN WITH HYPERPROLACTINEMIA; RECOVERY OF SEXUAL FUNCTIONS FOLLOWING DELIVERY

Yoshihito ICHIKAWA, Souhei MIYAKAWA and Satoshi USUKI

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

Abstract: One hundred and twenty women were treated with bromocriptine, a dopamine agonist ergot alkaloid drug. Thirty-eight of them had hyperprolactinemia (serum prolactin level ≥ 30 ng/ml, group 1) and 82 had normoprolactinemia (serum prolactin level < 30 ng/ml, group 2). Bromocriptine was given orally at a dose of 2.5 to 7.5 mg per day. This treatment was terminated on confirmation of pregnancy.

The rates of pregnancy were 71.1 and 34.1% in groups 1 and 2, respectively. The rate in the former group exceeded the average rate of infertility at our clinic (about 40%). The abortion rate was almost the same in both groups (about 7-10%). There were no external malformations in any babies born.

Only 2 patients in group 1 indicated abnormal levels of serum prolactin during pregnancy. Bromocriptine treatment, however, failed to have any effect on these levels, human placental lactogen, cystine-aminopeptidase, estradiol-17 β , estriol, progesterone or cortisol during pregnancy.

No significant difference was noted in the recovery of sexual functions following delivery in the two groups.

Based on these findings, bromocriptine administration before pregnancy was concluded to have no effect on the course of pregnancy, delivery, endocrine function, baby findings or sexual function recovery following delivery.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 36-43, 1990)

Introduction

Bromocriptine (2-Br- α -ergocriptine) is a dopamine agonist ergot alkaloid drug developed as an inhibitor of prolactin (PRL) secretion. It was initially used to treat non-puerperal galactorrhea and prevent puerperal lactation. It is presently

used widely to facilitate pregnancy in hyperprolactinemic and normoprolactinemic women¹⁻³). Bromocriptine has been reported to have no effect on the course and results of pregnancy, fetal growth, babies and follow-up of children⁴⁻⁷). A few reports, however, are available on the effects of this drug on endocrine function

during pregnancy.

The present study was conducted to examine endocrine function during pregnancy and recovery of sexual functions in hyperprolactinemic and normoprolactinemic women following treatment with bromocriptine.

Materials and methods

One hundred and twenty women coming to our infertile outpatient clinic were treated with bromocriptine. They ranged in age from 26 to 36 (mean age, 31 years). Thirty-eight of these cases had hyperprolactinemia (serum PRL level ≥ 30 ng/ml; group 1), and 82, normoprolactinemia (serum PRL level < 30 ng/ml; group 2). Except for 2 pituitary microprolactinoma cases and 2 apparent microprolactinoma cases diagnosed by high-resolution coronal computerized tomographic (CT) scanning (CT/T 8800; G. E., WA, U. S. A.) of the sella turcica, all the patients were healthy without any record of clinically organic disease.

Fifty-five cases became pregnant and 27 of whom belonged to group 1 (71.1%) and 28, to group 2 (34.1%).

All the patients were orally administered bromocriptine (Parlodel[®], Sandoz Co., Ltd., Basel, Switzerland) at a dose of 2.5 to 7.5 mg/day. This treatment was discontinued with confirmation of pregnancy. The mean period from the start of treatment to the time of this confirmation was 29.3 weeks and the mean pregnancy period was 42.4 days.

Blood samples were obtained serially from each patient from the 5th to 41th week of gestation and centrifuged at 3,000 r. p. m. for 10 minutes at 4°C. The sera were stored at -20°C until assayed for hormones and enzymes. Serum PRL was assayed

by the Prolactin-Radioimmunoassay kit (Daiichi-Radioisotope Laboratories Co., Ltd., Tokyo, Japan). Serum human placental lactogen (hPL) and cystine-aminopeptidase (CAP) were assayed by the Testopack method (Sankyōseiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) and various serum steroids such as estradiol-17 β (E₂), estriol (E₃), progesterone (P₄) and cortisol (F) were assayed by radioimmunoassay⁹⁾.

Recovery of sexual functions after delivery was examined following the start of pregnancy.

The term "weeks of gestation" in this study is defined as the weeks following the onset of the last menstrual period.

The Student's t-test was used to conduct various analyses.

Results

1) Course and results of bromocriptine-facilitated pregnancy

There were fifty-five cases of pregnancy following bromocriptine treatment, comprised of 27 cases in group 1 and 28 in group 2. Their courses are summarized in Table 1. In all cases, the first pregnancy occurred after bromocriptine treatment. In group 1 there were 2 hydatidiform moles, 2 intrauterine fetal deaths (IUFD) and 1 intrauterine growth retardation (IUGR). Three missed abortions were noted in group 2. Thus, the abortion rates of groups 1 and 2 were 7.4 and 10.7%, respectively.

Two patients had pituitary microprolactinoma. One (M. M.) was treated with only bromocriptine (7.5mg/day, p. o.) while the other (F. K.) was subjected to selective transsphenoidal partial hypophysectomy⁸⁾ followed by bromocriptine administration due to the continually high serum

Table 1. The courses of pregnancy of patients administered bromocriptine

Serum prolactin ^a (ng/ml)	No. of cases	Hydatidiform mole	Abortion	IUFD	IUGR	Normal course
≥ 30	27	2	0	2	1	22
< 30	28	0	3 ^b	0	0	25

^a, values before bromocriptine treatment;

^b, all miscarriages;

IUFD, intrauterine fetal death;

IUGR, intrauterine growth retardation.

Table 2. Delivery results for patients treated with bromocriptine

Serum prolactin ^a (ng/ml)	No. of cases	Preterm delivery	Forceps delivery	C/S	Normal delivery
≥ 30	22	1 ^b	0	3 ^c	18
< 30	21	0	1	0	20

^a, values before bromocriptine treatment;

^b, 34 weeks and 5 days;

^c, one patient (F.K.) on whom selective transsphenoidal partial hypophysectomy was performed for pituitary microprolactinoma⁸⁾;

C/S, abdominal cesarean section.

PRL level which did not resume the normal range. However, both these women became pregnant twice. In patients with microprolactinomas or apparent microprolactinomas, there was no indication of pituitary tumor enlargement during pregnancy or on postpartum days, according to the sella turcica CT after delivery.

The results of 43 deliveries (excluding hydatidiform moles, IUFD, abortions and deliveries at other hospitals) are summarized in Table 2. In group 1, there were 3 abdominal cesarean sections (C/S) at term due to fetal distress and one of which with microprolactinoma (F. K.) under-

went selective transsphenoidal partial hypophysectomy⁸⁾. In group 2, there was one forceps delivery at term owing to fetal distress. All babies born by C/S and forceps delivery showed good Apgar scores with no abnormal findings. Group 1 had one preterm delivery with a period of 34 weeks and 5 days without abnormal findings.

2) Baby findings

Of 50 babies, 48 were live births and 2, IUFD. All were single. Two were light-for date (LFD) babies and one of which (K. K.) was a particularly severe LFD infant (birth weight, 1545g; height, 41cm). The placenta of this case was small (weight, 380g) but with other fetal appendages being normal. In no live baby were there noted external malformations. Autopsy of the IUFD babies indicated the absence of internal malformations.

In the 2 LFD babies, the mean periods from the start of bromocriptine treatment to pregnancy confirmation were 72 weeks and 8 weeks, respectively, with the mean pregnancy periods after which bromocriptine administration stopped, being 46 days and 47 days, respectively.

3) Endocrine function during pregnancy

a) Serum prolactin levels

The serum PRL levels during pregnancy and on postpartum days in both groups are shown in Fig. 1. This parameter during pregnancy in women with hyperprolactinemia was higher and showed greater variation during the first half of pregnancy, but during the last, tended to resume the normal range. On postpartum days, high levels were noted again. In Fig. 2 are shown the PRL levels in 4 hyperprolactinemic patients (7 cases), who became pregnant following the start of bromocriptine administration. The levels were

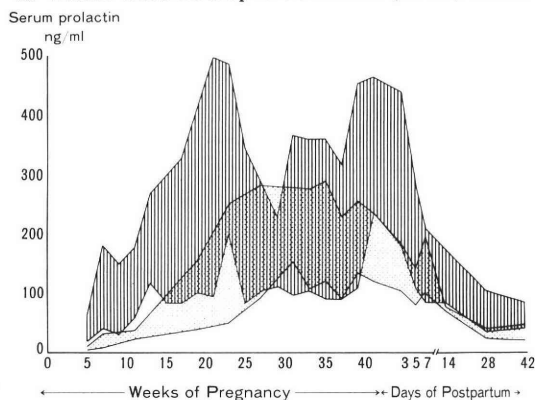


Fig. 1 Serum prolactin levels during and after pregnancy in women with hyperprolactinemia or normoprolactinemia before pregnancy. Lined area, range of hyperprolactinemia (serum prolactin level ≥ 30 ng/ml); Shaded area, range of normoprolactinemia. Serum prolactin levels in women with hyperprolactinemia are higher for the first half of pregnancy than those in women with normoprolactinemia, but tend to become normalized later, to varying degrees. On postpartum days, they have become higher again.

Table 3. Profiles of 4 hyperprolactinemic patients (7 cases) who became pregnant following bromocriptine treatment

Name	Age	Serum prolactin ^a (ng/ml)	Pituitary microprolactinoma	Am.	Galac.	Delivery results	Gestational age (weeks-days)	Baby sex weight (g)	Apgar (1→5min.)
1 F.K.-1	29	975-162	+ ^b	+	+	C/S	40-2	M 2682 (LFD)	8→10
2 F.K.-2	31	"	+ ^b	+	+	normal	40-0	M 3485	8→9
3 K.E.-1	28	34	- ^c	-	-	normal	40-4	M 3145	7→9
4 K.E.-2	31	"	- ^c	-	-	normal	40-1	F 3205	8→10
5 M.M.-1	32	87	+	+	+	normal	40-5	M 3639	9→9
6 M.M.-2	35	"	+	+	+	normal	39-4	M 3705	10→10
7 K.K.	29	31	-	-	-	C/S	38-0	M 1545 (LFD)	9→9

^a, values before bromocriptine treatment;
^b, the selective transsphenoidal partial hypophysectomy⁸⁾;
^c, apparent microprolactinoma;
C/S, abdominal cesarean section; M, male;
LFD, light-for-date. F, female;

Am., amenorrhea;
Galac., galactorrhea;

measured throughout gestation and found to be higher in the second than first pregnancy. The profiles of these 4 hyperprolactinemic patients (7 cases) are summarized in Table 3.

b) Serum human placental lactogen levels

Serum hPL levels during pregnancy with bromocriptine treatment are shown in Fig. 3. The concentrations of hPL increased gradually throughout gestation. In all cases, they were within the normal range except for 3 patients whose levels continued to remain low (F. K. -1, F. K. -2 and K. K.).

c) Serum cystine-aminopeptidase levels

These levels during pregnancy after bromocriptine treatment are shown in Fig. 4. The concentrations of CAP in most cases showed gradual increase throughout gestation but were within the normal range. Only 1 case (K. K.), however, showed low levels continuously throughout pregnancy and the weight of whose baby was 1545g and the placenta, 380g.

d) Serum estradiol-17 β , estriol, progesterone and cortisol levels

Serum E₂, E₃, P₄ and F levels during pregnancy with bromocriptine treatment are shown in Figs. 5, 6, 7 and 8, respectively, and were always substantially within the normal range.

4) Sexual function recovery

This parameter, following delivery of bromocriptine-facilitated pregnancy, is summarized in Table 4. Re-pregnancy rates were 33% (9/27) and 29% (8/28) in groups 1 and 2, respectively, not being significantly different. In patients treated with bromocriptine on postpartum only, the re-pregnancy rate was 50% (14/28), exceeding that in either group. That these cases did not belong to an infertile group may possibly be the

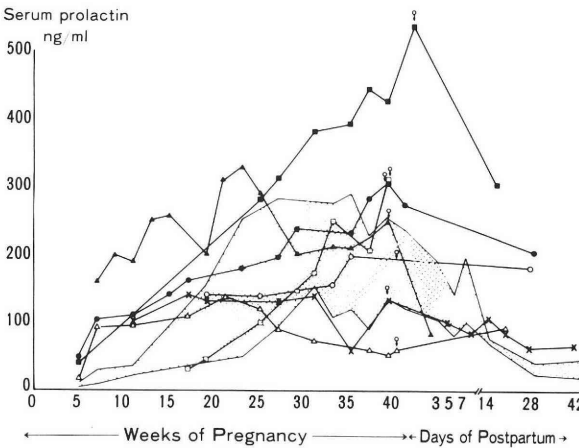


Fig. 2 Serum Prolactin levels during and after pregnancy in 4 hyperprolactinemic women (7 cases) administered bromocriptine. Shaded area, range of normoprolactinemia; ♀, time of delivery; $\triangle$, F. K. -1; $\blacktriangle$, F. K. -2; $\square$ K. E. -1; $\blacksquare$, K. E. -2; $\circ$, M. M. -1; $\bullet$, M. M. -2; $\times$, K. K.. The profile of each patient is presented in Table 3.

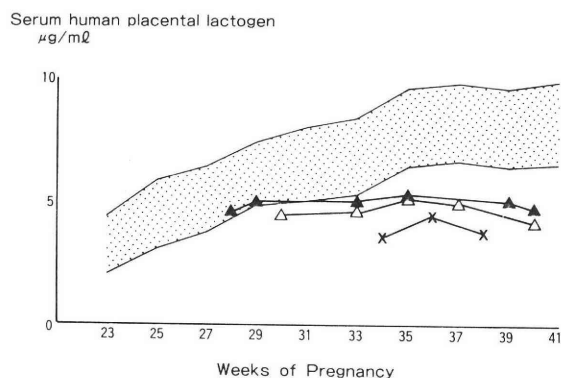


Fig. 3 Serum human placental lactogen levels during pregnancy following bromocriptine treatment.

Shaded area, ranges of normal human placental lactogen levels; $\triangle$, F. K. -1; $\blacktriangle$, F. K. -2; $\times$, K. K.. The profile of each patient is shown in Table 3.

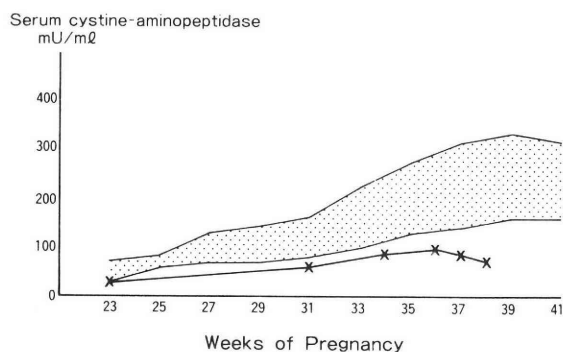


Fig. 4 Serum cystine-aminopeptidase levels during pregnancy following bromocriptine treatment.

Shaded area, ranges of normal cystine-aminopeptidase levels; $\times$, K. K.. The profile of patient is given in Table 3.

reason for this.

Discussion

Bromocriptine is widely used to facilitate pregnancy in both hyperprolactinemic and normoprolactinemic patients and thus many reports are available on the effects of this drug on the course and results of pregnancy. Kurachi et al.⁴⁾ found 56 spontaneous abortions (12.5%), 8 artificial abortions (1.8%), 32 preterm deliveries (7.1%), 346 fullterm deliveries (77.2%) and 6 postterm deliver-

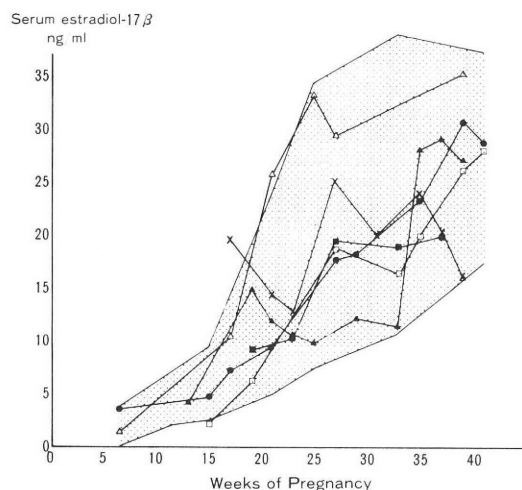


Fig. 5 Serum estradiol-17 β levels during pregnancy after bromocriptine treatment.

Shaded area, ranges of normal estradiol-17 β levels; $\triangle$, F. K. -1; $\blacktriangle$, F. K. -2; $\square$, K. E. -1; $\blacksquare$, K. E. -2; $\bullet$, M. M.; $\times$, K. K.. The profile of each patient is given in Table 3.

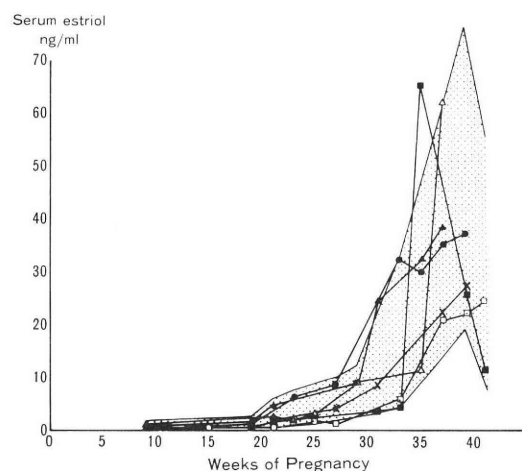


Fig. 6 Serum estriol levels during pregnancy after bromocriptine treatment.

Shaded area, ranges of normal estriol levels; $\triangle$, F. K. -1; $\blacktriangle$, F. K. -2; $\square$, K. E. -1; $\blacksquare$, K. E. -2; $\bullet$, M. M.; $\times$, K. K.. The profile of each patient is given in Table 3.

ies (1.3%) from among 448 pregnant cases, and that bromocriptine therapy did not lead to increase in the rate of abortion. In our patients, this rate in the hyperprolactinemic and normoprolactinemic groups was 7.4% and 10.7%, respectively and essentially the same as those in-

Table 4. Sexual function recovery following delivery of bromocriptine-facilitated pregnancy

Serum prolactin ^a (ng/ml)	No. of cases	No. of pregnancies	No. of re-pregnancies (one time)	No. of re-pregnancies (≥ two times)
≥30	38	27	7	2
<30	82	28	7	1
control ^b	51	28	14	0

^a, values before bromocriptine treatment;
^b, women treated with bromocriptine on postpartum only and having no history of hyperprolactinemia prior to pregnancy.

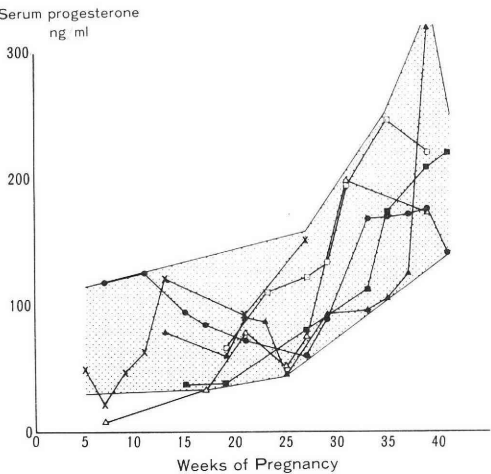


Fig. 7 Serum progesterone levels during pregnancy following bromocriptine treatment. Shaded area, ranges of normal progesterone levels; $\triangle$, F. K. -1; $\blacktriangle$, F. K. -2; $\square$, K. E. -1; $\blacksquare$, K. E. -2; $\bullet$, M. M.; $\times$, K. K.. The profile of each patient is presented in Table 3.

indicated in previous reports of other authors¹⁻⁴). According to Turkalj et al.⁶), the rate of spontaneous abortions was 11.1% in 1410 pregnant cases. It is thus evident that the course and results of pregnancy in the bromocriptine-treated and -untreated groups do not differ significantly.

Due to the teratogenic effects of bromocriptine, its use is generally discontinued at the time pregnancy is confirmed. Kurachi et al.⁵) noted that external malformations to result from this drug at the time of birth of 8 (1.8%) out of 448 live babies. Turkalj et al.⁶) also found congenital abnormalities at the birth of 43 (3.5%) out of 1241 babies. These reports, however, fail to show any differences in the bromocriptine-treated and -untreated groups with respect to the rate of

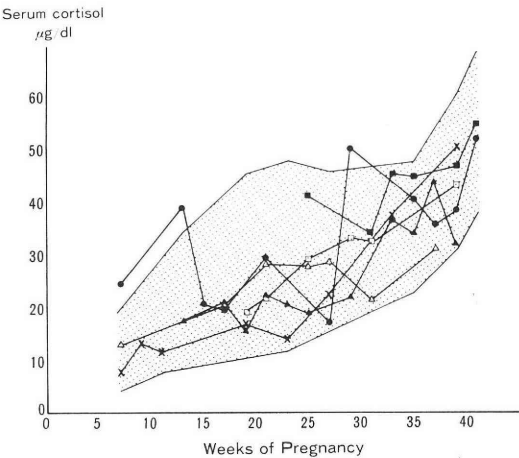


Fig. 8 Serum cortisol levels during pregnancy following bromocriptine treatment. Shaded area, ranges of normal cortisol levels; $\triangle$, F. K. -1; $\blacktriangle$, F. K. -2; $\square$, K. E. -1; $\blacksquare$, K. E. -2; $\bullet$, M. M.; $\times$, K. K.. The profile of each patient is shown in Table 3.

malformation. The present authors could detect no external malformations in this study.

As indicated in previous reports^{2,3,7,10,12}), bromocriptine has been established as a safe drug for administration to pregnant women. Few reports, however, are available on its effects on endocrine functions during pregnancy. In the present study, serum PRL, hPL, CAP, E₂, E₃, P₄ and F levels were measured during pregnancy in hyperprolactinemic and normoprolactinemic groups administered bromocriptine to determine whether the secretion pattern of any of these substances would be affected by bromocriptine. Figs. 2, 3 and 4 show some instances of abnormal levels of serum PRL, hPL and CAP. PRL in 2 cases was outside the normal range though in the 3rd trimester of pregnancy, its level was normal in nearly all

patients.

Serum hPL and CAP levels were low in some cases which gave birth to LFD babies or babies with small placentas. The reasons for this are not clear. The levels of other substances including E_2 , E_3 , P_4 and F were substantially within the normal range. Recently, Del Pozo¹³⁾ noted bromocriptine to have no effect on maternal serum PRL, E_2 , dehydroepiandrosterone, growth hormone or human chorionic gonadotropin during pregnancy. Kubota et al.¹⁴⁾, however, found this drug to significantly influence only PRL secretion in the first and second trimesters of pregnancy. Ibuki et al.¹⁵⁾ found the drug to cause crossing of the placenta and inhibit PRL secretion from the fetal pituitary gland. Minaguchi¹⁶⁾ considers it responsible for increase in the rate of abortion in the rhesus monkey. The present authors thus conclude that use of this drug should be discontinued immediately on confirmation of pregnancy. Sexual function recovery in the two groups was not significantly different and the course and results of the first pregnancy could not be shown related to those of the second or any other, as also indicated by Seki et al.¹⁷⁾.

Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. Hirokazu Iwasaki of the Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, for his valuable suggestions.

Thanks are also due to Mrs. H. Yuzawa for typing the manuscript.

The technical assistance of Miss Y. Hayasaka, Mrs. M. Kusumi, Mrs. S. Kawamura, Mrs. H. Nakamura and Miss S. Kanzaki is gratefully acknowledged.

References

- 1) Weil, C.: The safety of bromocriptine in hyperprolactinaemic female infertility: a literature review, *Curr. Med. Res. Opin.*, 10: 172, 1986
- 2) Corenblum, B. and Taylor, P. J.: Pregnancy in the hyperprolactinaemic patient, *Clin. Reprod. Fertil.*, 4: 1, 1986
- 3) Ben-David, M. and David, S. S.: Bromocriptine treatment during pregnancy; Efficacy and outcome, Forty-fourth annual meeting of the

- American fertility society, Abst. No. P-225, 1988
- 4) Kurachi, K., Aono, T., Hashimoto, M., et al.: *Sanka-Fujinka* (Japanese press), 53: 1875, 1986
- 5) Kurachi, K., Aono, T., Hashimoto, M., et al.: *Sanka-Fujinka* (Japanese press), 53: 1758, 1986
- 6) Turkalj, I., Brann, P. and Krupp, P.: Surveillance of bromocriptine in pregnancy, *JAMA*, 247: 1589, 1982
- 7) Roymond, J. P., Goldstein E., Konopka, P., et al.: Follow-up of children born of bromocriptine-treated mothers, *Horm. Res.*, 22: 239, 1985
- 8) Hardy, J., Beauregard, H. and Robert, F.: In *Progress in prolactin physiology and pathology* (ed. by Robyn, C. and Harter, M.) Prolactin-secreting pituitary adenomas: transsphenoidal microsurgical treatment: Elsevier/, 361, 1978
- 9) 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. Fertil. Steril.*, 32: 404, 1987
- 10) Mornex, R. C., Orgiazzi, J., Hugues, B., et al.: Normal pregnancies after treatment of hyperprolactinemia with bromocriptine, despite suspected pituitary tumors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 290, 1978
- 11) Yasui, T., Ueda, T., Shitsukawa, K., et al.: Outcome of pregnancy and findings of newborn infant in pregnant women with pituitary adenoma treated with bromocriptine through pregnancy, Vth International Congress on Prolactin, Abst. No. P-108, 1988
- 12) Konopka, P., Raymond, J. P., Merceron, R. E., et al.: Continuous administration of bromocriptine in the prevention of neurological complications in pregnant women with prolactinomas, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 146: 935, 1983
- 13) Del Pozo, E.: New aspects in endocrinological studies of bromocriptine, Tokyo Conference on Prolactin, 1983
- 14) Kubota, T., Yaoi, Y., Suzuki, A., et al.: Effect of bromocriptine on the endocrine profile during pregnancy, *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.*, 34: 1675, 1982
- 15) Ibuki, Y., Taguchi, H., Yoshida, M., et al.: Long term bromocriptine treatment during pregnancy in 5 patients with macroprolactinoma, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 31: 379, 1986
- 16) Minaguchi, H.: Prolactin secretion in fetus, Tokyo Conference on Prolactin, 1983
- 17) Seki, K. and Kato, K.: Decrease in serum prolactin during bromocriptine induced pregnancy and subsequent restoration of re-

productive function in some hyperprolactinemic women, Endocrinol. Jpn., 34: 701, 1987

妊娠時内分泌動態と 性機能の回復に対する ブロモクリプチン投与の影響

筑波大学臨床医学系産科婦人科

市川喜仁 宮川創平 白杵 愼

不妊症患者におけるブロモクリプチン療法は、高プロラクチン血症だけでなく正常プロラクチン血症にも広く用いられ、妊娠率を著しく向上させている。しかし、実際にこの薬剤を投与した妊娠例における妊娠時

内分泌動態や性機能の回復についての報告は少ない。我々は、38名の高プロラクチン血症患者（血中プロラクチン値30 ng/ml以上）と82名の正常プロラクチン血症患者について、ブロモクリプチン2.5～7.5 mg/日を妊娠の確診にいたるまで連続投与した。妊娠率は、前者では71.1%，後者では34.1%であった。これらについて、妊娠の転帰、分娩経過や新生児所見だけでなく、妊娠中の内分泌動態や分娩後の性機能の回復について検討した。高プロラクチン血症の2例において、血中プロラクチン値に異常を認めたが、その他の妊娠時内分泌動態にはブロモクリプチンの影響は認められなかった。外表奇形は1例も認めなかった。分娩後の性機能の回復は、両血症患者の間に有意差は認めなかった。以上の事実は、ブロモクリプチンがプロラクチンの値に関係なく不妊症患者に有効であり、かつ内分泌動態や性機能の回復にも影響を与えないことを示している。

（受付：1989年2月20日）

血中 Gonadotropin, Prolactin 値の 数値分布の検討

What Distributions do the Sets
of the Data of Plasma Gonadotropin
and Prolactin Levels Come from?

筑波大学臨床医学系産婦人科（主任：岩崎寛和教授）

辻 泰 二 西 田 正 人 久 保 武 士
Taiji TSUJI Masato NISHIDA Takeshi KUBO
岩 崎 寛 和
Hirokazu IWASAKI

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

筑波大学付属病院産婦人科外来を受診した 381 症例（22～39 歳，平均 29.9 歳）の低温相中期の血中 LH・FSH・PRL 値が標準正規分布ではなく，対数正規分布することを推定した。検定は， χ^2 適合度検定・Smirnov-Grubbs 異常値棄却検定・歪度尖度の検定により実施した。

過去の報告の多くにおいては，これらのホルモン値が標準正規分布することを前提として解析が行われてきたように見受けられたが，現在普遍的に利用されているパラメトリックな統計手技では標本の分布特性を把握することが要求される。この検定を通じ，データ解析における標本の分布特性の検証の重要性が明らかになると共に，今後これらのホルモン値の統計処理に際しては，データを対数変換して解析する必要があると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 44-48, 1990)

緒 言

近年，RIA の導入など各種測定法の開発により，産婦人科領域に限らず，診断・治療面での臨床検査成績の解析は，より重要なものとなっている。

データの解析に当たっては，当該測定値集団における数値分布の特性から導かれる統計学的手技が適切であることが前提となる。ところが，その適切性に関する検討は必ずしも正確になされているとは言えない。

今回，著者らは，下垂体前葉ホルモンである，luteinizing hormone (LH)・follicle stimulating hormone (FSH)・prolactin (PRL) の血中濃度の分布特性の

解析を行ない，若干の知見を得たので報告する。

対 象

筑波大学付属病院産婦人科外来を受診した患者のうち，luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) 負荷試験と thyrotropin-releasing hormone (TRH) 負荷試験を施行した 381 症例（22 歳から 39 歳に分布し，平均 29.9 歳）の血中 LH, FSH および PRL 値を対象とした。

LH-RH 負荷試験は，月経周期低温相 7～10 日目に LH-RH100 μ g を筋注負荷し，負荷前と負荷後 30 分の血中 LH, FSH 値を 2 抗体法 RIA（第一 RI 社製キット）により測定した。今回のデータには，負荷

前の基礎値を用いた。

また、TRH 負荷試験は、月経周期低温相 7～10 日に TRH500 μ g を筋注負荷し、負荷前と負荷後 15 分、30 分、60 分の血中 PRL 値を RIA (第一 RI 社製キット) により測定した。今回のデータには、LH、FSH と同様に負荷前の基礎値を用いた。なお、甲状腺機能は、あらかじめ正常であることを確認している。

検定方法

以下に示すアルゴリズムで対象としたデータ群の分布特性を検定した。

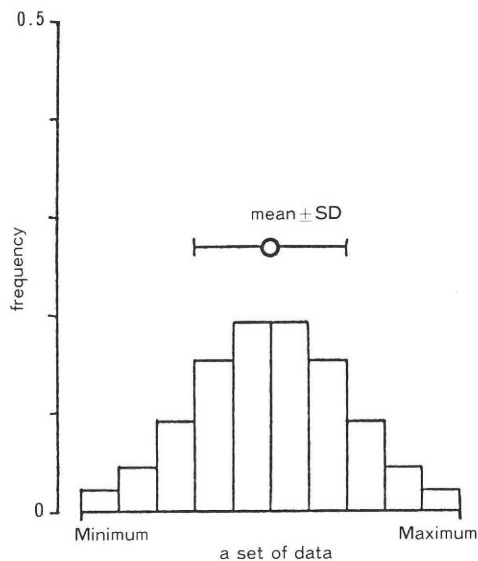


図1 標準正規分布モデル (標本数500と仮定して)

すなわち、得られたデータを、Sturges の経験公式により定めた階級数、

$$[\text{階級数}] = 1 + \log_2 (\text{データ数})$$

のヒストグラムとして図示し、分布の仮説を立てた。標準正規分布であれば、モデル (図1) に示したような、左右対称で平均値が中央にくる形を取る。正規分布でない、偏りの強い分布を取る場合、標準正規分布に近づくようにデータを変換した後、再度ヒストグラムを作り直した。

次に、完成したヒストグラムにおける各階級毎の観測度数と、標準正規分布した場合の各階級毎の理論度数間の適合度を χ^2 検定により検定¹⁾した。それにより、正規性が棄却された場合は、Smirnov-Grubbs 検定^{2,3)}により異常値を確認削除した上で再度ヒストグラムを作り直し、適合度検定を再検する。

正規性が棄却されない場合は、更に、歪度 (skewness) 尖度 (kurtosis) の検定¹⁾を行ない、正規性を満足することを確認した。

結 果

①血中 LH 値

無処理で作成したヒストグラムを図2Aに示した。明らかに偏りがあり、正規分布を想定できない。そこで、データを対数変換したヒストグラムを作り直すと、図2Bのように正規分布を想定しえた。しかし適合度検定では正規性を棄却されたため Smirnov-Grubbs 検定を行なった上で再度ヒストグラムを作り直したところ、正規性は棄却されなかった。(図2C)

そこで、歪度と尖度の検定を行なったところ、正規性を満足するという結果を得た (表1)。

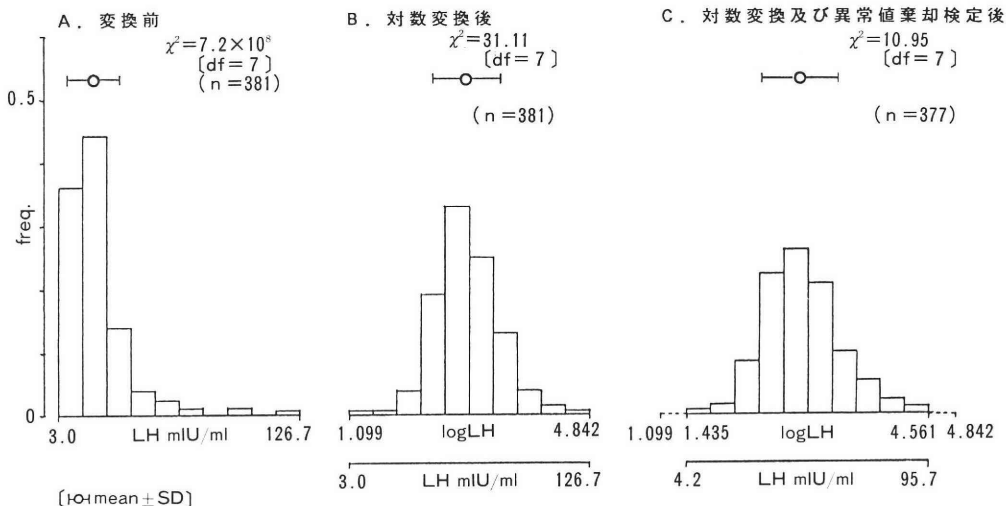


図2 血中 LH 基礎値の分布

表1 各対象の統計量

	LH	FSH	PRL
平均値	18.70[mIU/ml]	12.62[mIU/ml]	16.25[ng/ml]
Range*	11.57~30.21	9.53~16.71	10.60~24.90
標本数**	377	365	377
尖度(skewness)	0.285	-0.250	0.173
歪度(kurtosis)	3.36	3.11	3.44

* Mean-SD~Mean+SD

** Smirnov-Grubbs 異常値棄却検定後

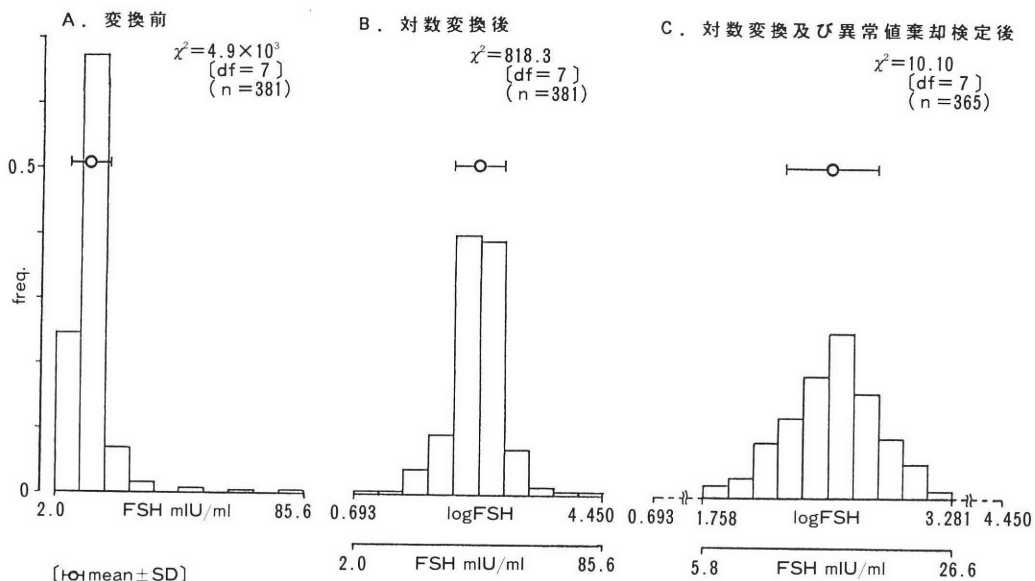


図3 血中FSH基礎値の分布

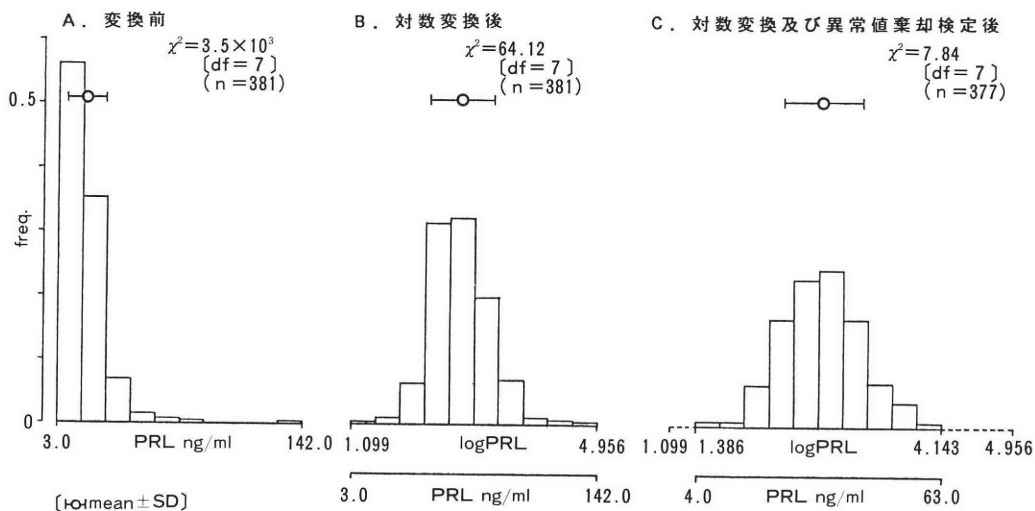


図4 血中PRL基礎値の分布

表2 諸文献のデータ解析実態

	日産婦誌	不妊学会誌
検討対象	Vol. 39~40	Vol. 32~33
対象文献数	18	38
標本の分布特性の検証		
あり	1	0
なし	17	38
汎用される統計学的手技と検討文献中の使用頻度 (延べ数)		
Student's t test	10	15
Welch-t test	1	0
Wilcoxonの順位和検定	0	0
paired t test	1	1
Wilcoxonの符号付順位和検定	0	0
χ^2 検定	1	3
分散分析	1	2
使用した統計学的手技の表記がなかったもの	7	21

以上より、今回対象とした血中 LH 値は、対数正規分布を仮定できると言える。

②血中 FSH 値

無処理で作成したヒストグラムを図3Aに示した。明らかに偏りがあり、正規分布を想定できない。そこで、データを対数変換しヒストグラムを作り直すと、図3Bのように正規分布を想定しえた。しかし、適合度検定では正規性を棄却されたため Smirnov-Grubbs 検定を行なった上で再度ヒストグラムを作り直したところ、正規性は棄却されなかった(図3C)。

そこで、歪度と尖度の検定を行なったところ、正規性を満足するという結果を得た(表1)。

以上より、今回対象とした血中 FSH 値は、対数正規分布を仮定できると言える。

③血中 PRL 値

無処理で作成したヒストグラムを図4Aに示した。明らかに偏りがあり、正規分布を想定できない。そこで、データを対数変換しヒストグラムを作り直すと図4Bのように正規分布を想定しえた。しかし適合度検定では正規性を棄却されたため Smirnov-Grubbs 検定を行なった上で再度ヒストグラムを作り直したところ、正規性は棄却されなかった(図4C)。

そこで、歪度と尖度の検定を行なったところ、正規性を満足するという結果を得た(表1)。

以上より、今回対象とした血中 PRL 値は、対数正規分布を仮定できると言える。

考 察

不妊症、特に排卵障害の臨床統計を出す場合、

Gonadotropin や prolactin のデータ解析は不可欠である。この数年来、筆者らも幾つかの解析を行ってきたが、その度に問題になったのが、得られたデータの数値分布、即ち、LH・FSH や PRL の標本分布の特性であった。2群間のデータの比較を試みる場合、Student's t 検定を用いることが多いが、このようなパラメトリックな統計手技では、前提条件として、各対象標本群が正規分布に従うことを要求されるからである。

そこで、最近の日本産婦人科学会誌ならびに日本不妊学会雑誌で発表されている下垂体ホルモン関係の文献を調べてみたところ、標本分布の検定を行っていたものは1篇あったものの、その後の解析に生かされておらず、その他の文献においては、図表から類推すると、得られた標本が標準正規分布するものとして取り扱われていたようである(表2)。

ところが、著者らが得たデータの分布は標準正規分布を仮定するには程遠く、そのまま解析することは不可能であった。そこで対数正規分布を想定して解析を行なったところ、今回示したように、その分布特性に対数正規分布が仮定できることが証明された。

下垂体の各種ホルモンの分布特性に関する文献を検索したところ、血中 TSH 値および血中 LH, FSH 値が対数正規分布することを仮定した報告は、少数ながら^{4,5)}認められた。血中 PRL 値でも標本が対数正規分布することを述べている文献はあるが⁶⁾、他のホルモンを含めて、分布特性に関する定説は未だにないと言ってもよさそうである。

一般に標準正規分布するデータの例としては、身長、体重、血糖値などが知られており対数正規分布するデータの例として、血清 GOT, GPT, LDH 値などの酵素濃度が知られている。ホルモンの血中濃度についてはこのような定説が未だにない理由としては、微量な定量法が確立されたのが最近であること、測定キット間のばらつきが大きいことにより適切な正常値が定められないことなどが挙げられよう。

しかしながら、臨床データに基づく研究においては、得られた標本の分布特性を知ることが解析のもっとも大切な第一歩である。何故ならば、分布特性の異なる集団は比較しようがないか、或いは、比較に際して特殊な操作を要するからである。その上で統計学的な解析を行なわなければ、解析は全く意味の無いものになってしまう。

今回筆者らは、得られた標本集団の血中 LH, FSH, PRL 値がそれぞれ対数正規分布を仮定できることを導いた。このことは、これらのホルモンの測定値の平均値の比較には、データの対数変換が前提になることを意味し、また、集団を表現するのに単純に[平均値±標準偏差(誤差)]を用いることはできないことも示している。丹後は過去の医学論文において標本の正規性の検証が少ないことを報告⁷⁾しているが、今後これらのホルモン値のデータ解析に当たって、留意されるべき点であろう。

文 献

- 1) Snedecor, G. W. and Cochran, W. G.: Statistical Method, ed. 6, 84, The Iowa University Press, 1967
- 2) Smirnov, N. V.: On the estimation of the maximum term in a series of observations, Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 33: 346, 1941
- 3) Grubbs, F. E.: Sample criteria for testing outlying observations, Ann. Math. Stat., 21: 27, 1950
- 4) 小豆沢瑞夫, 市原清志, 宮井 潔: 血清TSH・TRH テスト, 総合臨床, 27: 2275, 1978
- 5) 守殿貞夫, 岡 伸俊, 羽間 稔, 濱見 学, 松本修: FSH・LH・LH-RH テスト, 総合臨床, 34: 1756, 1985

- 6) 麻生武志: 高プロラクチン状態におけるヒトおよび baboon(ヒヒ)の卵巣機能, 日産婦誌, 32: 1239, 1980
- 7) 丹後俊郎: 正規分布か対数正規分布か?, 臨床病理, 27: 1151, 1979

What distributions do the sets of the data of plasma gonadotropin and prolactin levels come from?

Taiji Tsuji, Masato Nishida,
Takeshi Kubo and Hirokazu Iwasaki

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

The authors demonstrated that each set of data from plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and prolactin levels obeyed a logarithmic normal distribution and not a Gaussian distribution. Blood in the middle low phase of the menstrual cycles was drawn from three hundred and eighty one patients ranging in age from 22-39 years old, with a mean of 29.9, who were treated at the outpatient gynecology department at the University of Tsukuba Hospital. To judge the normality of the sample data, the chi-square goodness of fit test, Smirnov-Grubbs test, and tests of skewness and kurtosis were used. The majority of previous researchers did not judge the normality of the hormone levels they collected, and assumed that the data came from a Gaussian distribution. Because the standard parametric statistical techniques are based on the assumption of normality, it is important to judge the normality of a set of data. This conclusion suggests that the data from these plasma hormone levels have to be transformed into logarithmic form for statistical analysis.

(受付: 1989 年 2 月 28 日)

過食症 (Bulimia) における 月経異常の分析 (第一報)

Menstrual Disorder in Bulimia

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室

楠 原 浩 二 川 勝 雅 秀 許 山 浩 司
Koji KUSUHARA Masahide KAWAKATU Hiroshi MOTOYAMA
小 田 原 靖 落 合 和 彦 安 江 育 代
Yasushi ODAWARA Kazuhiko OCHIAI Ikuyo YASUE
寺 島 芳 輝
Yoshiteru TERASHIMA

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

7例の過食症 (Bulimia) の月経を中心とした性機能につき分析し、以下の結果を得た。

1. 7例の Bulimia のうち、正常月経周期を有する例は2例のみで、4例は続発性無月経、一例は無排卵性周期による頻発性月経であった。
 2. 7例は normo~hypogonadotropic hypogonadism を、一部は高 LH 分泌を示した。
 3. LH-RH test より本症の下垂体予備能は、正常である事、および一部 PCOD 類似の過剰反応を示す例が存在した。
 4. 以上より Bulimia に伴う無月経の障害部位は視床下部にある事が推定された。
- しかし、いかなる機序にて本症において排卵が障害されるか今後さらに検討する必要があると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 49-54, 1990)

緒 言

拒食などの極端な食行動異常と体重減少に相前後して発症する続発性無月経は神経性食思不振症 anorexia nervosa(以下 A・N と略) としてよく知られている^{1,2)}。A・N に伴う続発性無月経の原因は、単に拒食による体重減少の結果生じるのではなく、間脳の摂食中枢と性中枢が同時に障害されるためと考えられている^{1,3)}。

一方、最近同じ食行動異常症 Eating disorder でも、A・N とは逆の食行動異常、すなわち過食症 Bulimia nervosa (以下 Bulimia と略) が増加しているといわれ^{4,5)}、精神医学的観点より注目されてい

る。そして本症にも A・N と同様、無月経を中心とした排卵障害が伴う事が指摘されている^{6,7,9)}。さらに興味ある点は、本症の多くの例がその体重が正常範囲内に保たれているにもかかわらず無月経にいたる事⁶⁾であり、その発症機序の面などから我々産婦人科医にとっても大変関心が持たれる疾患である。

今回、我々は Bulimia の7例を経験したので、患者背景の調査といささかの内分泌学的検索を行なったので報告したい。

対象および方法

対象は当科産婦人科外来を受診した患者のうち DSM-III⁸⁾の診断基準を満たした Bulimia の7例であ

る。

表 1, 2 に今回検討した本症 7 例のプロフィールを示した。まず主訴であるが, 7 例中 4 例は続発性無月経を主訴として来院し, 残り 3 例は過食の治療を主訴に来院した (なお当大産婦人科外来には思春期外来があり, その中で特に体重減少性無月経などを重点的に取り扱っているためそれを聞きおよんで来院したものである)。

初診時年齢は 18 歳から 27 歳, 平均 23.4 歳であり, 全員未婚婦人であった。これら 7 例の Bulimia の発症年齢は 19 歳から 27 歳, 平均 21.7 歳であった。

7 例のうち定型的な A・N に罹患の既往がある例は症例 1, 4, 7 の 3 例であり, 残りの 4 例は特にそのような既往をみとめず初めから Bulimia が発症している。

体型は身長 150 cm から 163 cm, 平均 154.6 cm と特に短軀, 長身の例はなく, またその体重も 38 kg から 61 kg, 平均 47.2 kg であり, これを Broca 指数より求めた標準体重比であらわすと, 最低 84.4 % から最高 116.8 %, 平均 96.1 % と, 特にやせ, あるいは肥満に該当する例はなかった。

表 2 にこれら 7 例の食行動等の患者背景を示した。初経年齢はいずれも 12 または 13 歳で特に異常は認めない。問題となる食行動では過食と拒食をくり返す例が 3 例 (症例 1, 6, 7), 過食のみの例が 4 例 (症例 2, 3, 4, 5) であった。また Bulimia にいたる以前に定型的な A・N と診断された既往のある例は 3 例 (症例 1, 4, 7) 存在し, 他の 4 例 (症例 2, 3, 5, 6) は過食のみであり, A・N を思わせる既往はなかった。

表 1 Bulimia 7 例のプロフィール (I)

症 例	主訴	初診年齢 (歳)	初発年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	標準体重との比率 (%)
1.	無月経	22	22	150	43	95.6
2.	無月経	23	23	153	44	92.2
3.	無月経	18	19	155	43	86.9
4.	無月経	20	19	153	46	96.4
5.	過食	27	25	150	38	84.4
6.	過食	27	17	163	57	101.0
7.	過食	27	27	158	61	116.8
平 均		23.4	21.7	154.6	47.2	96.1

表 2 Bulimia 7 例のプロフィール (II)

症 例	初経年齢 (歳)	月 経	食 行 動	神経性食思 不振症の既往	性 格	病識の有無	学歴	その他
1.	13	第 1 度無月経	拒食と過食のくり返し	(+)	暗い 神経質	有	大卒	下剤の使用
2.	13	第 2 度無月経	過 食	(-)	ヒステリー 内向的	有	高卒	・自己誘発的嘔吐 ・下剤の使用
3.	13	第 1 度無月経	夜間の過食 ジャンク・フードを好む	(-)	几帳面	有	短大生	—
4.	12	第 1 度無月経	拒食の既往 かくれ食い ジャンク・フードを好む	(+)	神経質 几帳面	有	大卒	—
5.	13	整 順	夜間の過食	(-)	対人関係正常	有	大卒	自己誘発的嘔吐
6.	13	整 順	減食と過食のくり返し	(-)	自己防衛強い わがまま	有	短大生	自己誘発的嘔吐
7.	13	頻発月経	減食と過食のくり返し	(+)	感受性強い	有	高卒	・自己誘発的嘔吐 ・下剤の使用

またこれら 7 例の性格は神経質、内向的、あるいはヒステリー、几帳面などの多少問題のある性格を有する例が多かった。

つぎに病識の有無を見ると、7 例全例が明らかに病識の有無では、全員過食を治療したいという願望をもって来院した。

また学歴では 7 例中 3 例が大学卒、2 例が短大卒、2 例が高卒であり、比較的高い学歴といえた。その他、殆んどの例で過食とは裏はらに、7 例中 5 例が下剤を常用したり、あるいは自分の指などで自己誘発的嘔吐を繰り返し、過食する一方で肥満にならないよう体重をコントロールしていた。

方法はこれら 7 例に対し、ホルモン負荷試験を行なう以前に、血中 LH、FSH、estradiol (E₂)、prolactin (PRL) を RIA にて定量した。その後 gestagen test (プロゲステロン 30 mg 筋注)、および estrogen+gestagen test (ワレリアン酸エストラジオール(“プロギノンデポー”) 10 mg およびカブロン酸ヒドロキシプロゲステロン) (“プロルトンデポー”) 125 mg) の同時筋注を行ない、消退出血の有無よりその障害の程度を判定した。さらに消退出血の開始 2 週間後に合成 LH-RH 100 μ g 一回静注法により LH-RH test を行ない、下垂体予備能を検した。このような内分泌検索に平行して、MMPI、ロールシャッハテスト、Y-G テストによる性格テストを行なった。

また治療には当科と精神科との共同にてカウンセリングあるいは minor tranquilizaer 等の向精神薬を投与し、また無月経例には clomid 50 mg ないし 100 mg を投与し排卵の誘発を試みた。

結 果

1. 月経状態

Bulimia 7 例の来院時月経は、7 例中 4 例が続発性無月経、1 例は頻発月経、残り 2 例のみ整順な月経周期を有していた。続発性無月経の 4 例中 3 例は 1 度無月経であり、残り 1 例は第 2 度無月経であった。

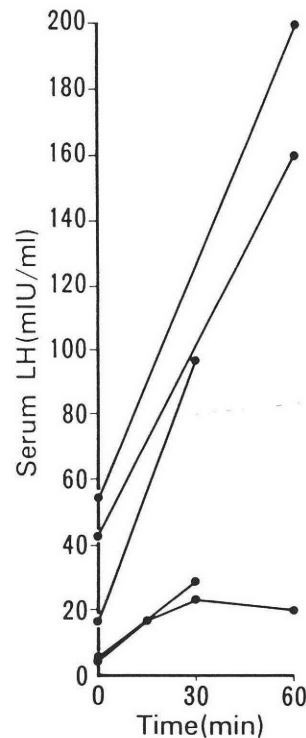


図1 Bulimia の LH-RH test

表 3 Bulimia 7 例の月経とホルモン基礎値

症 例	月 経	LH (miu/ml)	FSH (miu/ml)	E ₂ (pg/ml)	PRL (ng/ml)
1.	第 1 度無月経	5	5	—	7
2.	第 2 度無月経	16 25	15 17	— 25	26 36
3.	第 1 度無月経	43 8	9 5	31 100	20 31
4.	第 1 度無月経	55	16	—	17
5.	整 順				
6.	整 順				
7.	頻発月経	6.9	8.2	55.9	4.8

2. ホルモン基礎値, LH-RH test

続発性無月経の 4 例および頻発月経の 1 例のホルモン基礎値を表 3 に示した. LH は低 LH の 2 例 (症例 1, 7), 高 LH をしめす 2 例 (症例 3, 4) に別れた. FSH は全例ほぼ正常範囲内であった.

E₂を測定し得たのはわづか 3 例のみであるが, いずれも低値であった. PRL は軽度の高 PRL 血症 (症例 2, 3) を示した例が 2 例存在した.

次に無月経の 4 例と頻発月経の 1 例に行なった LH-RH test の結果を図 1 に示した. 投与前の LH が高値を示した症例 3, 4 は過剰反応を示し, 他の 3 例 (症例 1, 2, 7) はほぼ正常反応を示した.

3. 治療

治療の結果を表 4 に示した. 大別するとカウンセリングを中心とした精神療法 (向精神薬投与も含む) と clomid による排卵誘発法である. clomid を投与した 4 例 (症例 1, 2, 3, 4) のうち, 第 1 度無月経の 3 例 (症例 1, 3, 4) はいずれも排卵にいたった. しかし第 2 度無月経の症例 2 は clomid にて排卵にいたらなかった. 症例 5, 6, 7 は主に精神療法を行なうも, いずれも過食が寛改と増悪をくり返し現在に至っている.

考 察

神経性食思不振症 anorexia nervosa は発症の前後に無月経を中心とした性器障害がおこる事は知られている^{1,2)}.

しかし最近, anorexia nervosa とは逆の摂食障害, すなわち過食症 Bulimia (あるいは Bulimia nervosa) が増加しているといわれている^{4,5)}. わが国における

専門学校生および大学生を対象に Bulimia の頻度を調査した切池⁹⁾の報告では, DSM-III⁸⁾の診断基準を満たしている Bulimia の割合は全学生の 2.9% であるといひ, わが国のその他の報告⁴⁾もほぼ同様の頻度である. このように本症は 20 代の未婚婦人の中では決して稀なものではなく, かつ近年増加傾向にあるといわれる⁹⁾.

本症と我々産婦人科医との接点は, このような Bulimia の多くが, 体重が正常範囲内であり, 痩せていないにもかかわらず, 無月経を中心とした排卵障害を合併する事である^{10,11,12)}. 切池⁹⁾によれば anorexia nervosa の既往のない Bulimia 14 例中 9 例・64.3% が月経不順, 5 例・35.7% が無月経であり, 月経整順例は実に一例も見られなかったという. また, 笠原⁷⁾の報告でも, Bulimia 18 例中, 初診時に無月経であったものは 14 例で, 全体の 77.8% に達するという. 今回, 我々の成績でも 7 例中 4 例・57.1% は無月経であり, 無排卵周期が背景にある頻発月経の一例を含めれば, 7 例中 5 例・71.4% に排卵障害を認めた. さて本症になぜこのように無月経が合併するのか大変興味ある問題である. そこでまず Bulimia 発症の時期と無月経の発症時期との関係を検討した. 症例 1 は過食になる以前に拒食が先行したため体重が減少, その直後より無月経に至っている. 症例 2 は無月経が先行し, その約 1 年後より過食に至った. また症例 3 は過食にいたる約 1 年前より月経不整であった. また症例 4 は過食にいたる前に拒食症状があり, その時月経不整になり, さらに過食の後無月経に至った. このように Bulimia に合併する無月経は必ずしも過食の発症の後に出現するのではなく, 無月経が先行する例も稀ではない. 切池⁹⁾によれば, Bulimia 9 例のうち体重が減少する以前に無月経にいたった例は 3 例・33% であり, 体重が減少した後, 無月経にいたった例は 2 例・22%, 残りの 4 例は両者の関係が不明であったという.

このように Bulimia に併発する無月経の約 1/3 は体重が減少する以前に既に無月経であり, 単に過食とそれに引き続いた嘔吐の結果おこる一時的な体重減少のために続発性無月経にいたったのでない事が推定される.

さて次にその無月経の程度についてであるが, 今回の無月経の 4 例中 3 例が第 1 度無月経であり, この意味では Bulimia に伴う無月経は比較的軽症であるといえよう. しかし本症の無月経の程度を判定するにあたっては検査を行なう時期もかなり影響することも否定できない. つまり, 拒食期にあたった例が過食に転じ, 体重が回復しつつある時期には, 無

表 4 Bulimia 7 例の治療

症 例	月 経	精神科的治療	婦人科的治療
1.	第 1 度無月経	精神療法	clomid にて 排卵あり
2.	第 2 度無月経	精神療法	clomid にて 排卵なし
3.	第 1 度無月経	———	clomid にて 排卵あり
4.	第 1 度無月経	———	clomid にて 排卵あり
5.	整 順	向精神薬投与	———
6.	整 順	精神療法 向精神薬投与	———
7.	頻発月経	精神療法 向精神薬投与	———

月経が軽症となる可能性があるからである。またその逆も同様である。しかし Cooper¹³⁾らは月経状態は体重や過食行動に左右されるのではなく、精神状態と関連するものであるとも主張している。

さて本症の排卵障害の障害部位について検討してみたい。今回我々の検討した7例の gonadotropin 基礎値をみると、LH は低値の症例とむしろやや高値の症例に別れ、また FSH のそれはおおむね正常範囲内であった。Pirke¹⁴⁾は同様の対象で E₂ 低値な事より卵胞の成熟がないと思われる群について LH を測定した。その結果、排卵を有する同年齢の女性の LH をコントロールとすると、Bulimia 例の LH はコントロールに比し有意に低値であるが E₂ がある程度 (444pmol/l) 以上の例ではその LH は、コントロールと有意差がなかったという。このように本症の gonadotropin レベルは、正常ないしやや低値とする報告¹⁵⁾が多いがその値のバラツキには多分に卵胞成熟の程度、すなわち estradiol による negative feedback mechanism も関与しているものと思われる。今回、著者らの症例の一部に高 LH 値の例が混在したが、Cantopher¹⁶⁾らも報告しているように一部 polycystic ovary 様の例が存在するためかも知れない。

一方、今回卵胞成熟の指標にもなる E₂ を測定し得た症例はわずか3例のみであるが、いずれも 100pg/ml 以下と低値であり、卵胞の成熟が不良である事がうかがえる。

しかし全ての例がこのように卵胞成熟が不良なわけではない。経日的に E₂ を測定した Pirke¹⁴⁾の例では排卵には至らないものの、一時的に E₂ が上昇する例や、卵胞期が延長しながらも E₂ surge 後の progesterone が上昇する事より排卵の存在を推定し得る例も存在するという。

このように本症の無月経例の多くが hypo~normogonadotropic hypogonadism である事より、その排卵障害部位は、下垂体よりさらに上の上位中枢であることがうかがえる。そこでさらに LH-RH test を行ない、本症の下垂体予備能を検討した。その結果、LH-RH test を施行した5例中2例は基礎値が高値であり、かつ過剰反応を示し、あたかも PCO のそれと類似したパターンを示した。残り3例は良好反応を示した。この事より本症下垂体予備能は正常に保たれている事がうかがえる。したがって本症の排卵の障害部位は下垂体より上位中枢すなわち視床下部の障害が推定される。

事実、Pirke¹⁴⁾は本症の LH のパルス状分泌を分析した結果、frequency は変化しないものの、LH の amplitude が減少していたという。

以上の事を総合すると本症に伴う排卵障害の障害部位は anorexia nervosa と同様、視床下部であると推察し得る。しかし、過食のどのような因子が視床下部を障害するのであろうか。本症は過食の一方、下剤や自己誘発的嘔吐により一時的にも体重が減少する事がある。このような体重の変動が視床下部に抑制的に作用する事は体重減少性無月経^{17,18)}と同様、充分に考えられる事である。しかし、体重の変動だけが排卵障害の原因の本能でない事も確かである。切池⁵⁾の指摘するように心理的なストレスなども大いに関連しているものと思われる。今後本症の間脳一下垂体—卵巣系をさらに詳細に分析するとともに、本症の背景にある心理的ストレス等が内分泌系におよぼす影響等についても検討する予定である。

文 献

- 1) Mecklenburg, R. S., Lorianx, O. L., Thompson, R. H., Andersen, A. E. and Lipsett, M. B.: Hypothalamic dysfunction in patients with anorexia nervosa. *Medicine*, 53: 147, 1974
- 2) Vigersky, R. A., Lorianx D. L., Andersen A. E. and Lipsett M. B.: Anorexia nervosa, Behavioural and hypothalamic aspects. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 5: 517, 1976
- 3) Hudson, J. I. and Hudson, M. S.: Endocrine dysfunction in anorexia nervosa and bulimia, Comparison with abnormalities in other psychiatric disorders and disturbances due to metabolic factors. *Psychiatric Developments*, 4: 237, 1984
- 4) 野上芳美, 門馬康二, 鎌田康太郎: 女子学生層における異常食行動の調査, *精神医学*, 29: 155, 1987
- 5) 切池信夫, 永田利彦, 田中美死, 西脇新一, 武内伸江, 川北幸男: 青年期女性における Bulimia の実態調査, *精神医学*, 30: 61, 1988
- 6) 切池信夫, 西脇新一, 永田利彦, 前田泰久, 川北幸男: Bulimia の視床下部—下垂体—性腺系について, *精神医学*, 30: 739, 1988
- 7) 笠原敏彦, 安田素次, 木村忠行, 小山 司, 深津亮, 山内俊雄: 過食症 (Bulimia) の臨床的検討—症候学的特徴について, *精神経誌*, 87: 521, 1985
- 8) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd. ed, APA, 1980
- 9) Fairburn, C. G. and Cooper, P. J.: Binge-eating, self-induced vomiting and laxative abuse, a community study, *Psychol. Med.*, 14: 401, 1984
- 10) Abraham, S. F. and Beumont, P. J. V.: How patients describe bulimia or binge eating, *Psychol. Med.*, 12: 625, 1982
- 11) Russell, G.: Bulimia nervosa. An ominous variation of anorexia nervosa., *Psychol. Med.*, 9: 429, 1979

- 12) Pyle, R. L., Mitchell, J. E. and Eckart, E. D.: Bulimia.: A report of 34 cases, *J. Clin. Psychiat.*, 42: 60, 1981
- 13) Cooper, P. J. and Fairborn, C. G.: Binge-eating and self-induced vomiting in the community, A preliminary study, *Br. J. Psychiatry*, 142: 139, 1983
- 14) Pirke, K. M., Fichter, M. M., Chloud, C., Schweiger, U., Laessle, R. G., Schwingenschloegel, M. and Hoehl, C.: Disturbances of the menstrual cycle in bulimia nervosa, *Clin. Endocrinol.*, 27: 245, 1987
- 15) Khoury, S. A., Reame, N. E., Kelch, R. P. and Marshall, J. C.: Diurnal patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion in hypothalamic amenorrhea, Reproductibility and responses to opiate blockade and an alpha2-adrenergic agonist, *J. of Clinic. Endocrinol.*, 64: 755, 1987
- 16) Cantopher, T., Evans, C., Lacy, J. H. and Pearce J. M.: Menstrual and ovulatory disturbance in bulimia, *Brit. Med. J.*, 297: 836, 1988
- 17) 楠原浩二, 安江育代, 杉田 元, 篠塚正一, 徳倉昭治, 花岡 茜, 蜂屋祥一, : 体重減少による無月経の病態, *日不妊会誌*, 27: 7, 1981
- 18) 楠原浩二, 横山 敬, 松本和紀, : 肥満とやせによる月経異常, *産婦の実際*, 30: 1515, 1981

Menstrual disorder in Bulimia

Koji Kusuvara, Masahide Kawakatu,
Hiroshi Motoyama, Yasushi Odawara,
Kazuhiko Ochiai, Ikuyo Yasue
and Yoshiteru Terashima

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

Seven patients with Bulimia (DSM-III) were evaluated its endocrinological profiles, Two patients of them had normal menstrual cycle, four had secondary amenorrhea and one had polymenorrhea caused by anovulation.

These 7 cases showed normogonadotropic hypogonadism or hypogonadotropic hypogonadism. LH-RH test showed normal response in 3 cases, and 2 cases showed hyperresponse like polycystic ovarian disease.

These results suggested that patients with bulimia had hypothalamic disorders.

(受付: 1989 年 3 月 18 日)

体外受精胚移植術における卵巣刺激法について —clomid-HMG と HMG 単独療法の比較検討—

A Comparative Study of Clomid-HMG and HMG for Follicular Stimulation in IVF-ER/GIFT Treatment

兵庫医科大学産婦人科学教室

別 所 健 史 子 安 保 喜 柴 原 浩 章
Takefumi BESSHO Yasuki KOYASU Hiroaki SHIBAHARA
繁 田 実 磯 島 晋 三
Minoru SHIGETA Shinzo ISOJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hyogo Medical College, Hyogo 663, Japan

体外受精・GIFT法における卵巣の過排卵刺激法は、採卵より受精、分割、着床にいたるまでの過程において、妊娠成立の成否を決定づける重要な因子の一つと考えられる。今回、我々はclomid-HMG併用療法（A群）、HMG単独療法（B群）の刺激法につき、種々のパラメーターに関する比較検討を加えた。A群はclomid 100mgを月経周期4日目より5日間、および、HMG150～300IUを6～8日目より投与し、B群はhMG150～300IUを月経周期3日目より投与した。その結果1周期あたりの採卵数はA群：3.7個（成熟卵2.6個）、B群：4.9個（成熟卵3.7個）であり、採卵後14日目の尿中妊娠反応陽性率はA群：3/36（8.3%）、B群：6/35（17.1%）であった。試験周期における子宮内膜日付診でもB群の方がより良い着床環境であることが判明し、より多くの成熟卵子の回収も可能である事より、HMG単独療法による卵巣刺激法によって妊娠率の向上が期待される。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 55—59, 1990)

はじめに

体外受精—胚移植（以下、IVF-ERと略す）およびGIFT法における卵巣の過排卵刺激法は、採卵より受精、分割、着床にいたるまでの過程において、妊娠成立の成否を決定づける重要な因子の一つと考えられる。今回、我々はclomid-HMG併用療法（以下A群と略す）、HMG単独療法（B群と略す）の刺激法につき、採卵率、受精率、分割率、妊娠率に関する比較検討を加えたので報告する。また、IVF施行以前に試験的に行なった卵巣刺激周期において、黄体中期の血中エストラジオール（以下E₂と略す）、プロゲステロン値を測定し、同時に子宮内膜診も施行し、

子宮内の着床環境に関する内分泌学的、組織学的検討も加えた。

対象と方法

兵庫医科大学産婦人科不妊外来に通院中で、従来の治療法で妊娠に至らなかった患者のうち、昭和62年10月より63年6月までの期間にIVF-ERおよびGIFTを行なった71例を対象とした。表1の如くclomid-HMG併用のA群はIVF 29例およびGIFT 7例の計36例、平均年齢34.2±2.8歳、原因別には、卵管因子13例、抗精子抗体を保有する免疫因子7例、子宮内膜症3例、男性因子3例、原因不明10例であった。一方、HMG単独投与のB群は、IVF 28

例及び GIFT 7 例の計 35 例で、平均年齢 33.8 ± 2.1 歳、原因別には卵管因子 14 例、免疫因子 5 例、子宮内膜症 4 例、男性因子 3 例、原因不明 9 例であった。卵巣刺激方法は、A 群では、clomid 100mg を月経周期 4 日目より 5 日間、および、HMG150-300IU を 6-8 日目より連日投与した。一方、B 群においては、HMG150-300IU を月経周期 3 日目より連日投与した。IVF-ER の手技については、既に詳細に報告したので概略をのべるにとどめる^{1,2)}。卵胞期の monitoring は、月経周期 3 日目より radioimmunoassay (ミドリ十字社、エストラジオール I-125 キット法) により連日血中 E_2 の測定を行ない、8 日目より超音波断層法 (東芝 SAL-77B) による卵胞径を計測し、卵胞の最大径が 18 mm を越え、血中 E_2 が 600 pg/ml 以上となった場合に、hCG 5000 単位を投与し、その 36-38 時間後に腹腔鏡または超音波ガイド下に採卵した (表 2)。採取された卵は実体顕微鏡下で、corona, cumulus, size, granulosa cell の 4 項目により形態的卵成熟度を判定し³⁾、培養液には Ham's F10 に各種添加物を加えたものを使用した。抗精子抗体保有患者の場合は卵胞液中にも抗体が存在するので、針による cumulus cell の除去や培養液の交換過程を追加するなどして抗体除去操作を徹底した。

採卵後 48 時間後に分割した胚を経腔的に子宮腔内に移植し、黄体期中は全例に黄体ホルモン (プロルトン 12.5 mg) を投与した。採卵当日、1、3 および

7 日目に血中 E_2 およびプロゲステロンを測定し、採卵 14 日目に、hCG の測定感度 50 IU/l の hCG TEST PACK (シオノギ製薬) にて尿の妊娠反応を行ない、陽性例を妊娠成立と判定した。

また当科では、IVF-ER や GIFT を施行する前に、薬剤投与方法や投与量決定のために、試験的に卵巣を刺激する周期を設けている。A 群 10 例、B 群 13 例に対して実際の採卵周期と同様の基準、方法で卵巣を刺激し、hCG 投与後 7 日目の黄体中期に子宮における着床環境を示す子宮内膜の組織学的検索、子宮内膜日付診を行ない、また同時に血中 E_2 およびプロゲステロンを測定し、両群の刺激法による差異について比較検討した。子宮内膜の生検組織は子宮底部より採取し、ホルマリンで固定後 H&E 染色を施し、Noyes らの基準^{10,11)}により子宮内膜日付診を行った。

結 果

図 1 は、卵胞期における血中 E_2 の変化を示しているが、hCG 投与時に A 群では 1542 pg/ml に対して、B 群では 1645 pg/ml と、両群の間には有意差は認められなかった。卵巣の反応性が不良で卵胞発育が悪

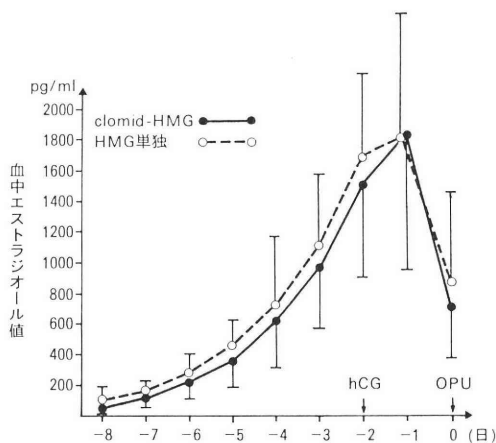


図 1 卵胞期の血中エストラジオール値の比較

表 1 対 象

		clomid-HMG	HMG単独
平均年齢		34.2 ± 2.8	33.8 ± 2.1
患者数		36 (7)	35 (7)
原因	卵管因子	13	14
	免疫因子	7	5
	子宮内膜症	3	4
	男性因子	3	3
	原因不明	10	9

() : GIFT

表 2

○卵巣刺激方法

A 群 : clomid 100mg を月経周期 4 日目より 5 日間、及び HMG 150-300 IU を 6-8 日目より筋注。

B 群 : HMG 150-300 IU を 3 日目より筋注。

○モニタリング

卵胞期 : 血中エストラジオールを 3 日目より毎日測定。

卵胞径を 8 日目より毎日計測。

黄体期 : 血中エストラジオール及びプロゲステロンを採卵 0 日目、1 日目、3 日目、7 日目に測定。

い場合や、血中E₂が低い場合には採卵を中止するが、そのキャンセル率はA群は28%であったのに対し、B群では11%に減少した。表3は、採卵以後の経過を示しているが、まず症例あたりの卵回収率は、A群、B群ともに100%、1回の穿刺あたりの卵回収率は、58.8%に対し55.6%と、両群に差は認められなかった。

平均回収卵数は、A群が3.7±1.2個であるのに対し、B群では4.9±1.3個、平均成熟卵数はA群が2.6±1.1個に対し、B群では3.7個±1.3個と、B群において、有意に多くの成熟卵が回収された(P<0.05)。IVF-ERを行なった症例の受精率および分割

率は、A群が67.3%、91.9%であるのに足し、B群では64.9%、97.0%と共に有意差は認められなかった。

受精卵の子宮における着床環境を示す内分泌学的マーカーとして、採卵当日、1、3および7日目の黄体期血中プロゲステロンと血中E₂の比、すなわちP/E比を検討したが、A群がそれぞれ4.8±1.5、40.1±7.4、47.6±16.3、45.0±22.4で、B群は4.9±2.0、35.2±9.8、44.3±21.4、39.1±24.3と、採卵後のどの時期においても、両群の間に有意差は認められなかった(表4)。A群のうち3例が妊娠にいたり、症例あたりの妊娠率は8.3%であったが、B群

表3 採卵率、受精率、分割率、妊娠率の比較

	A 群	B 群
hCG投与時の血中E ₂ (pg/ml)	1542±385	1645±452
採卵月経周期 (日)	13.3±1.1	12.1±0.9
症例あたりの卵回収率 (%)	100	100
穿刺あたりの卵回収率 (%)	58.8	55.6
平均回収卵数	3.7±1.2	4.9±1.3
平均成熟卵数	2.6	3.7
平均未成熟卵数	1.1	1.2
受精率 (%)	67.3	64.9
分割率 (%)	91.9	97.0
妊娠例	3	6
症例あたりの妊娠率 (%)	8.3	17.1

A群：clomid-HMG
B群：HMG単独

表4 P/E比

	0日目	1日目	3日目	7日目
A 群	4.8±1.5	40.1±7.4	47.6±16.3	45.0±22.4
B 群	4.9±2.0	35.2±9.8	44.3±21.4	39.1±24.3
t-test	NS	NS	NS	NS

NS：not significant

A群：clomid-HMG
B群：HMG単独

表5 黄体機能の比較

	A 群	B 群
平均年齢	34.2±2.5	33.8±2.1
hCG投与時の血中E ₂ (pg/ml)	1495±369	1563±492
黄体中期血中E ₂ (pg/ml)	556±185	496±174
黄体中期血中Prog (ng/ml)	25.4±6.9	20.1±174
子宮内膜診	-1.1±0.4	+1.2±0.5

A群：clomid-HMG
B群：HMG単独

においては6例が妊娠にいたり、妊娠率は17.1%に向上した。

次に、これらのホルモンのtarget organとしての子宮内膜の組織学的検索、すなわち、試験的に卵巣を刺激する周期に行なった黄体中期の子宮内膜日付診について検討した。表5はその周期における黄体中期の血中 E_2 、プロゲステロンおよび、子宮内膜日付診について比較検討したものである。平均年齢、hCG投与時の血中 E_2 、黄体中期の血中 E_2 、プロゲステロンおよびP/E比には有意差は認められなかったが、子宮内膜日付診において、A群では平均1.1日の遅延が、B群では、逆に1.2日の促進像が見られた。

考 察

IVF-ER, GIFT法における妊娠成立に至る過程には数多くの因子が関与し、これを改善すべく種々の努力が重ねられている。なかでも重要な因子の一つに卵巣の刺激法が挙げられる。妊娠率向上のために、過排卵処理法にclomidが応用され、clomid単独療法やclomid-HMG併用療法が一般的となり、自然排卵周期に比較して良好な結果が報告されているが^{4,5)}、著明な妊娠率の改善をもたらすまでには至っていない。

一方IVF-ERにおけるclomidの使用に対する消極的な意見も見られる。Dlugiらは、IVE-ER programにおいて、clomid単独療法とHMG単独療法の内分泌学的比較検討を報告しているが⁶⁾、これによるとclomid使用の場合、黄体期初期および中期には有意に E_2 値が低く、また、黄体期後期において、 E_2 のsecond peakの発来が遅延したと述べている。また、卵胞液中の E_2 とandrosteroneは、HMG使用時の方が有意に高値を示したとして、clomidが卵胞のsteriodogenesisに直接阻害作用のある事を示唆している。またclomidのもつ抗エストロゲン作用が子宮内膜に及ぼす悪影響も報告されている^{7,8)}。このため、Rombergら⁹⁾はIVF-ER時のclomid-HMG療法において、使用量を最少限に抑える事が可能か否かを検討すべく、clomid 50mgと150mg使用時の E_2 の反応と卵胞径を比較した結果、両者の間には有意差は認められなかったため、50mgで十分であるとしている。

今回の我々の結果によれば、HMG単独療法がclomid-HMG療法よりも優れている点として、(1)卵巣刺激中におけるキャンセル率が減少したこと、(2)より多くの成熟卵子が回収され、その結果、より多くの胚移植を行なうことができたこと、(3)黄体期中期の子宮内膜診において、clomid使用時にみ

られた遅延像を示す例が少なく、むしろ促進傾向を示した事などがあげられる。

IVF-ERによる妊娠率は移植胚数に比例することは周知の事実であるが、今回HMG療法において、より多くの成熟卵子が得られた事は、この可能性を高めると同時に、凍結受精卵の臨床応用が可能となった今日、その治療への可能性を拡げることの出来る治療法として注目すべきであろう。

自然妊娠の場合、受精卵が、子宮内に達して、implantationを行なう時期は、排卵後7日前後であるが、IVFでは、より早い時期の2日目にERを行なう。従って、HMG単独使用時のような促進環境の方が、clomid-HMG併用時のときよりも、より自然環境に近いと、移植胚のimplantationにとって好都合であろうと考える。両群ともに内分泌学的比較において、hCG投与時の血中 E_2 や、黄体各期の E_2 、プロゲステロン値およびP/E比に有意差は認められなかったが、子宮内膜診においては差異が見られ、内分泌学的所見と組織学的所見の間にdiscrepancyが見られた。この事は前述の如く、clomidのもつ抗エストロゲン作用による可能性も考えられ、今後、子宮内膜の E_2 やプロゲステロンのreceptor levelでの検索が望まれるところである。

結 語

HMG単独使用群における妊娠率向上の要因として、(1)より多くの成熟卵の回収による移植胚数の増加、(2)子宮内膜における、より良い着床環境の形成、などが考えられた。

(本論文の要旨は昭和63年11月第33回日本不妊学会学術集会において発表した)

文 献

- 1) 杉本幸美、長谷川昭子、横山一海、池田義和、別所健史、繁田 実、伊能健一郎、平 省三、香山浩二、磯島晋三：精子不動化抗体保有不妊婦人への体外受精-胚移植療法の応用、産婦誌、39：1533、1987
- 2) 別所健史、子安保喜、繁田 実、平 省三、香山浩二、磯島晋三：体外受精-胚移植法における各種採卵法の比較検討、産婦進歩、in press、1989
- 3) 繁田 実：自然排卵を有する不妊婦人に過排卵処理を行った場合の卵成熟について、産婦進歩、40：101、1988
- 4) Lopata, A: Conceptus in human in vitro fertilization and embryo replacement, Fertil. Steril., 40: 289, 1983
- 5) Quingley, M. M., Schmidt, C. L., Beauchamp, P. J. et al.: Enhanced follicular recruitment in an

in vitro fertilization program, clomiphene alone versus a clomiphene/human menopausal gonadotropin combination, *Fertil. Steril.*, 42: 25, 1984

- 6) Dlugi, A. M., Laufer, N., Botero-Ruiz, W., et al.: Altered follicular development in clomiphene citrate versus human menopausal gonadotropin-stimulated cycles for *in vitro* fertilization, *Fertil. Steril.*, 43: 40, 1985
- 7) Quingley, M. M., Maklad, N. F., Wolf, D. P.: Comparison of two clomiphene citrate dosage regimens for follicular recruitment in an *in vitro* fertilization program, *Fertil. Steril.*, 40: 178, 1983
- 8) Romberg, L., Isotalo, H., Kauppila, A. et al.: Clomiphene-induced changes in endometrial receptor kinetics on the day of ovum collection after ovarian stimulation: a study on cytosol and nuclear estrogen and progesterone receptors and 17 β -h-ydroxysteroid dehydrogenase, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 442: 558, 1985
- 9) Romberg, L., Markitainen, H. and Kirkinen, R.: Effect of the mode of clomiphene citrate administration on ovarian response in an *in vitro* fertilization program, *Int. J. Fertil.*, 33: 334, 1988
- 10) Noyes, R. W., Hertig, A. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy, *Fertil. Steril.*, 1: 3, 1950
- 11) Noyes, R. W.: The underdeveloped secretory endometrium, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 77: 929, 1959

**A comparative study of
clomid-HMG and HMG
for follicular stimulation
in IVF-ER/GIFT treatment**

Takefumi Bessho, Yasuki Koyasu,
Hiroaki Shibahara, Minoru Shigeta
and Shinzo Isojima

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hyogo Medical College, Hyogo 663, Japan

In vitro fertilization and embryo replacement (IVF-ER) and Gamete intra-fallopian tube transfer (GIFT) have widely accepted as the method for treating infertility. The procedures for follicular aspiration was improved and the recovery rates of oocytes became satisfactory, but subsequent pregnancy rates are still low. One of the most important factors to increase the pregnancy rates is to establish the optimum stimulation protocol for follicular maturation. In this study, we compared the results of two stimulation protocols: a combination of clomid and HMG (protocol A) and HMG alone (protocol B). The mean number of mature follicles and retrieved oocytes were 6.3 and 3.7 in protocol A, whereas 8.8 and 4.9 in protocol B. Thus the recovery rate of oocytes were 58.8% and 55.6% respectively. Fertilization rates and cleavage rates of mature oocytes were similar in two groups but the pregnancy rates were significantly different, 8.3% in protocol A and 17.1% in protocol B. The endometrial biopsy in the mid-luteal phase of test cycle showed a delay of maturation in protocol A, whereas protocol B showed an advanced pattern. These results suggested that protocol B is superior to protocol A for method follicle stimulation in IVF-ER and GIFT program. This might be derived from increased number of mature oocytes retrieved and the embryos replaced, and the better condition of endometrium for implantation.

(受付: 1989年5月10日)

排卵 Stimulation 法と Percoll Preparation 法の 併用を中心とした IUI の成績

A Retrospective Study of Intrauterine Insemination with Ovarian Stimulation and Percoll Separated Spermatozoa

東京慈恵会医科大学産婦人科

安 江 育 代	岡 本 愛 光	許 山 浩 司
Ikuyo YASUE	Aiko OKAMOTO	Hiroshi MOTOYAMA
川 勝 雅 秀	小 田 原 靖	渡 辺 直 生
Masahide KAWAKATSU	Yasushi ODAWARA	Naoiku WATANABE
松 本 和 紀	落 合 和 彦	楠 原 浩 二
Kazunori MATSUMOTO	Kazuhiko OCHIAI	Koji KUSUHARH
	寺 島 芳 輝	
	Yoshiteru TERASHIMA	

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

237 症例, 1421 周期に IUI を施行し, その方法を 3 群に分類し検討した。即ち, I 群; 自然周期に通常の IUI (non-separated semen による IUI) を組み合わせた群, 134 例, 822 周期。II 群; 排卵 stimulated 周期に通常の IUI を組み合わせた群, 62 例, 460 周期。III 群; 排卵 stimulated 周期に 80 % Percoll による精子洗浄濃縮法を用いた separated IUI を組み合わせた群, 41 例, 139 周期の 3 群である。全症例中 71 例に妊娠が成立し, その妊娠率は症例あたり 30.0 %, 周期あたり 5.0 % であった。I 群, II 群, III 群各群の周期あたりの妊娠率は, それぞれ, 3.4 %, 6.7 %, 8.6 %, で I 群に比し, II 群, III 群はそれぞれ, $P > 0.05$, $P < 0.01$ で有意差を認めた。III 群の妊娠例のすべてが 5 回以内の IUI 治療周期で妊娠に至った。多胎妊娠の発現頻度は I 群, II 群には認めず, II 群に 4 例認め, 全例双胎であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 60—65, 1990)

緒 言

IUI は日常の外來診療において, 極めて一般的な不妊治療の一つである。しかし, その成績は必ずしも満足し得るものではない。従来 IUI は男性不妊に対する治療として実施されていたが, 最近の傾向としては, その適応の範囲も広がり, またさまざまな試みも工夫され, その報告は枚挙にいとまがない。Glass wool filtration 法¹⁾Swim up 法²⁾, Ficoll 法^{3,4)}, al-

bumin columns 法^{5,6)}及び, Percoll 法^{4,7,8)}など精液に前処置を加え, より良好な精子を選別し, 濃縮するという男性側からのアプローチに加え, 排卵誘発による過排卵を促し, より多くの受精, 着床を期待するという女性側からのアプローチもさかんに行なわれている。

今回, これらの方法の中から 80 % Percoll による精子洗浄濃縮法に注目し, その処理前後における精子濃度及び運動率の変化について検討した。さらに

IUI の方法として clomid 単独, clomid+hMG/ (hCG), clomid+hCG, 及び hMG/hCG 等による排卵誘発法と, 80 % Percoll による精子洗浄濃縮法を組み合わせ, 対象を 3 つのグループに分類し, いずれの方法が妊娠率の向上に有用であるのか検討した。

研究方法

1. 80 % Percoll による精液性状の変化

1) 対象

対象は不妊症にて慈恵医大産婦人科を受診した婦人の夫の精液 42 例である。精液を精子濃度及び運動率によって 4 群に分類した (表 1)。

2) 方法

精液は 3 日間以上禁欲後用手的に採取し, 約 30 分間液化した後精子数はマクラー精子分析カウントチェンバーを用い, 運動率は鏡検法により主観的に判定した。80 % Percoll 溶液 5 ~ 6 ml に液化した精液全量を静かに積層し, L 型攪拌棒にて攪拌し連続密度勾配を作成する。1600 ~ 2000 rpm で 25 ~ 30 分間遠心分離し, 上層に残存した精漿を除去し, 沈澱した pellet を全量として約 0.5 ml になるよう再懸濁し,

表 1 精子濃度および運動率による精液性状の分類

	N	精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	運動率 (%)
Normozoospermia	16	≥ 40	≥ 50
Oligozoospermia	7	< 40	≥ 50
Asthenozoospermia	11	≥ 40	< 50
Oligoasthenozoospermia	8	< 40	< 50

表 2 適 応

適 応	症 例	%
精液性状不良	118	47.6
unexplained infertility	43	17.3
性交後試験陰性	39	15.7
頸管粘液分泌不全症	22	8.9
排卵障害	19	7.7
その他	7	2.8
	248例	100%

表 3 対 象

[I 群]	nonstimulated cycle + 通常 IUI	134例	822周期
[II 群]	stimulated cycle + 通常 IUI	62例	460周期
[III 群]	stimulated cycle + prepared IUI	41例	139周期
計		237例	1421周期

処理前と同様の方法で精子数及び運動率を判定した。(図 1)

2. Intrauterin insemination (IUI)

1) 対象

1983 年 4 月から 1989 年 3 月までに IUI を施行しその予後が明らかな不妊 couple 237 例, 1421 周期である。

基礎体温, 内分泌学的検索, 子宮卵管造影, 頸管粘液測定, 子宮内膜組織診, 精液検査, 性交後試験等ルーチンの不妊検査を行ない不妊因子の決定を試みた。

適応は精液性状不良 118 例 (47.6 %), unexplained infertility 43 例 (17.3 %), 性交後試験陰性 39 例 (15.7 %), 頸管粘液分泌不全症 22 例 (8.9 %) 排卵障害 19 例 (7.7 %), 性交不能例, 子宮奇形などを含むその他の 7 例 (2.8 %) である。重複した不妊因子をもつ症例を 11 例含み, 延べ症例数は 248 例であった。(表 2)

2) 方法

対象を IUI の方法により 3 群に分類した。即ち, I 群; non-stimulated cycle に通常の IUI を併用した群 134 例, 822 周期, II 群; stimulated cycle と通常の IUI を組み合わせた群 62 例, 460 周期, および III 群; stimulated cycle と 80 % Percoll を用いた精子洗浄濃縮法による IUI を併用した群 41 例, 139 周期である。(表 3) 即ち I 群とは排卵誘発を行わず自然の排卵周期に前処理をしない精液を使用する方法

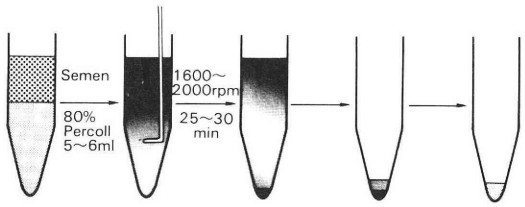


図 1 80 % Percoll を用いた精子洗浄濃縮法

- 1 80 % Percoll 液 5 ~ 6 ml に液化した精液を全量積層する。
- 2 L 型攪拌棒を用い連続密度勾配を作成する。
- 3 1600 ~ 2000 rpm で 25 ~ 30 分間遠心する。
- 4 上清を除去。
- 5 全量を約 0.5 ml とし再懸濁する。

であり、II群とは何らかの排卵誘発を行なった周期に前処理をしない精液を使用する方法である。さらにIII群とは排卵誘発周期に80% Percollにて前処理した濃縮精液を使用する方法である。I群、II群、およびIII群の最少年齢はそれぞれ、23歳、23歳、21歳、で最高年齢はそれぞれ38歳、36歳、42歳であり、平均年齢はそれぞれ 31.2 ± 4.6 歳、 30.3 ± 3.4 歳、 30.9 ± 4.0 歳であった。(表4)

II群及びIII群で施行した排卵誘発法は、clomid単独法がそれぞれ235周期、51周期、clomid+hMG/(hCG)療法が144周期、62周期、clomid+hCG療法が35周期、1周期、hMG/hCG療法が28周期、

表4 各群の年齢

	N	最少年齢 (歳)	最高年齢 (歳)	mean $\pm$ SD (歳)
I群	134	23	38	31.2 ± 4.6
II群	62	23	36	30.3 ± 3.4
III群	41	21	42	30.9 ± 4.0

表5 排卵 Stimulation 法

	II 群 (周期)	III 群 (周期)
clomid 単独法	235	51
clomid + hMG/(hCG)	144	62
clomid + hCG	35	1
hMG/hCG	28	25
その他	18	0
計	460	139

25周期、パーロデル投与等を含むその他が18周期、0周期であった。(表5)

結 果

1. 80% Percoll による精液性状の変化

1) 精子濃度

80% Percoll による処理前後の精子濃度は、Normozoospermia 群で $72.3 \pm 34.1/\text{ml}$ から $90.1 \pm 29.7/\text{ml}$ へOligozoospermia 群で $20.9 \pm 10.3/\text{ml}$ から $25.9 \pm 13.9/\text{ml}$ へ増加し、Asthenozoospermia 群で $62.0 \pm 28.6/\text{ml}$ から $59.3 \pm 41.5/\text{ml}$ へ変化し、Oligoasthenozoospermia 群では、 $17.3 \pm 10.2/\text{ml}$ から $30.6 \pm 9.2/\text{ml}$ へ増加し、結果としてOligoasthenozoospermia 群のみが有意に改善し($P < 0.05$)、他は有意差がなかった。(図2)

2) 精子運動率

80% Percoll による処理前後の精子運動率はNormozoospermia 群では $62.5 \pm 9.3\%$ から $82.5 \pm 12.8\%$ に、Oligozoospermia 群では $57.1 \pm 9.5\%$ から $69.3 \pm 10.2\%$ に、Asthenozoospermia 群では $25.9 \pm 12.8\%$ から $55.9 \pm 28.2\%$ に、Oligoasthenozoospermia 群では $28.8 \pm 9.9\%$ から $65.6 \pm 24.7\%$ に増加し、全ての群に改善を認めた。即ちOligozoospermia 群及びOligoasthenozoospermia 群は有意に改善を示し($P < 0.01$)、Normozoospermia 群及びAsthenozoospermia 群においては著明に改善した($P < 0.001$)。(図2)

このことより、80% Percoll による精子洗浄濃縮法は特に精子運動率の改善に有効であるという結果が得られた。

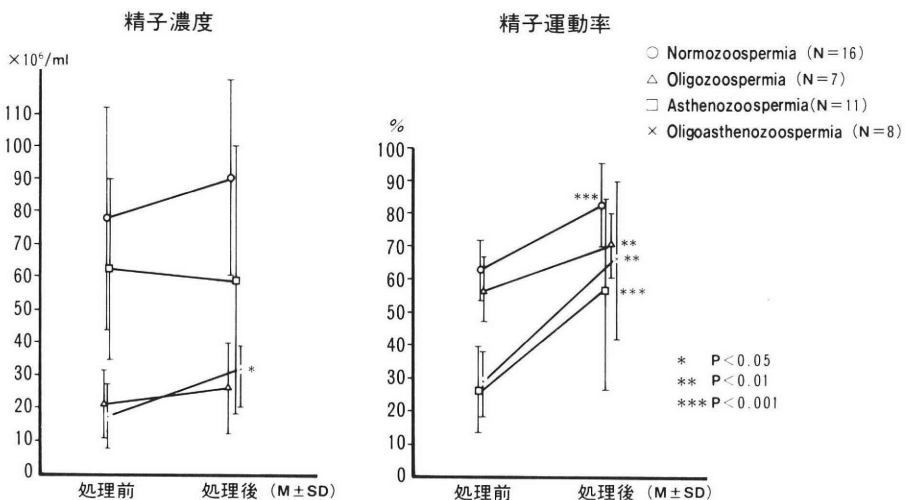


図2 Percoll 処理による精子濃度および精子運動率の変化

2. IUI の成績

1) 妊娠率

症例数あたりでは、全症例 237 例中 71 例に妊娠を認め、その妊娠率は、30.0 % であった。I 群では 20.9 %、II 群では 50.0 %、III 群では 29.3 % の妊娠率を得、II 群は I 群に比較し有意に高かった ($P < 0.01$)。周期数あたりの妊娠率では、全体として 5.0 % であり、I 群では 3.4 % II 群では 6.7 %、III 群では 8.6 % となり、II 群、III 群は I 群に比し、それぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ で有意にその妊娠率は高かった。(表 6)

累積妊娠率に関しては I 群、II 群では特に差は認められず両者とも妊娠例の 70 % が 5 回以内の IUI で妊娠に至っている。一方 III 群では全妊娠例が 5 回以内の IUI で妊娠しており、III 群が最も良好であった。(図 3)

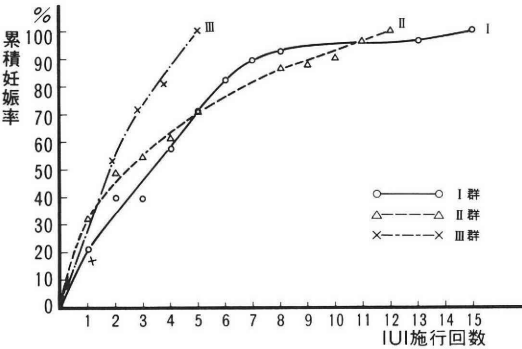


図 3 IUI 妊娠例の累積妊娠率

2) 妊娠例の予後

正期産及び妊娠中の症例はそれぞれ I 群で 23 例 (82.1 %)、0 例、II 群で 23 例 (74.2 %) 3 例 (9.7 %) そして III 群で 1 例 (8.3 %)、8 例 (66.7 %) であった。流産例は I 群 2 例 (7.2 %)、II 群で 1 例 (3.2 %)、III 群で 3 例 (25.0 %) であり、各群に有意差は認められなかった。子宮外妊娠は II 群に 1 例 (3.2 %) 認められたのみで I 群、III 群には認められなかった。

多胎妊娠は II 群で正期産に 3 例、流産に 1 例の計 4 例が認められ、すべての双胎であった。I 群、III 群には多胎妊娠は認められなかった。(表 7)

考 察

最近では、排卵障害例のみならず排卵のある症例に対しても、IUI 周期に排卵誘発を併用する方法が次第に一般化している。IVF-ET 症例の増加に伴い、その排卵誘発プログラムをそのまま IUI に応用する方法も試みられている。多くの報告は排卵誘発による super-ovulation は IUI の妊娠率向上に有用であるとしているが^{9,10)}、一方排卵誘発を行なった群と自然周期群の妊娠率に差がなかったとする報告¹¹⁾や、排卵誘発群の方が妊娠率が低かったという報告¹²⁾も散見する。我々の成績では自然周期群である I 群の周期あたりの妊娠率が 3.4 % であるのに対し、排卵誘発群である II 群の妊娠率が 6.7 % と有意に ($P < 0.05$) 高い妊娠率を得た。これは排卵誘発で、より多くの卵を排卵させることにより、受精・着床の機会を増やし、結果として妊娠の成立を増加させた為と考えられる。

表 6 各群における妊娠率

	症例 (例)	周期	妊娠 (例)	妊娠率 (/症例) (%)	妊娠率 (/周期) (%)
[I 群]	134	822	28	20.9	3.4
[II 群]	62	460	31	50.0**	6.7*
[III 群]	41	139	12	29.3	8.6**
	237	1421	71	30.0	5.0

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ (I 群との比較)

表 7 妊娠例の予後

	正期産	妊娠中	流産	子宮外妊娠	不明	計 (%)
[I 群]	23 (82.1)	0 (0)	2 (7.2)	0 (0)	3 (10.7)	28 (100)
[II 群]	23 (74.2)	3 (9.7)	1 (3.2)	1 (3.2)	3 (9.7)	31 (100)
	(* 3)		(* 1)			
[III 群]	1 (8.3)	8 (66.7)	3 (25.0)	0 (0)	0 (0)	12 (100)
計 (%)	47 (66.2)	11 (15.5)	6 (8.5)	1 (1.4)	6 (8.5)	71 (100)

(*) は双胎妊娠例

排卵誘発を施行する際に留意すべき点の一つに多胎の発生がある。我々の成績では4例の多胎(4例とも双胎)を認めたが全例がII群の排卵誘発群に認められ、自然周期群であるI群に比し有意差はなかった。多胎の発生は排卵誘発法によりかなりの差があると考えられるが、我々の対象では、排卵障害例は全体の7.7%と少なく、ほとんどが排卵のある症例に対するstimulationである為、排卵誘発法もclomidを中心とした症例が多く、過排卵の症例が少なかったと考える。Dodson等¹³⁾は48例の妊娠例を単胎34例と多胎14例(双胎8例、品胎6例)に分類し、それぞれのparameterによって多胎の発生が予知できるかを検討しているが両者に特徴的なparameterを認めていない。我々も今後は排卵誘発に際して単に妊娠率からの評価のみならず多胎の発生防止という面からの検討も必要と考えている。

一方精液のpreparation法に関しては良好な運動精子を数多く得るのが第一の目的である。Pardo等¹²⁾はPercollを用い、特に男性因子による不妊症例に有用であったと報告している。また洗浄精子によるIUIにおいてVelde等¹⁴⁾は性交後試験陰性例に有効であるとし、Confino等¹⁵⁾は頸管粘液分泌不全症に特に有用であったと報告している。我々の成績では、80% Percollによる精子洗浄濃縮法で、処理前後の精液の比較から、精子濃度の改善より精子運動率の向上に、より有用であるという結果を得た。これは小林等⁸⁾やChiu等¹⁶⁾の成績と一致している。また児玉等¹⁷⁾はPercollにより少なくとも 30×10^6 内1656 ml以上の運動精子が妊娠成立には必要であるとしている。洗浄法におけるいま一つのメリットは精漿中の細菌、prostaglandin等の除去によりIUIの合併症とされている腹痛、骨盤内感染の防止が期待できることである。これはConfino等¹⁵⁾や飯塚等⁷⁾も指摘している利点である。

また我々の成績によるとIII群の累積妊娠率は5回で100%、即ち、全妊娠例は5回以内のIUIで成立している。換言すれば、比較的早い時期に予後の見通しがある程度可能となり、徒にIUIに固執することなく次の段階の治療であるIVF-ETやGIFT等の適応について検討でき、この点からも評価される。

結論として排卵stimulationにて過排卵を促し妊娠の機会を増加させるという女性側からのアプローチと、良好精子を得ることが可能な80% Percoll精子洗浄濃縮法という男性側からのアプローチを併用する方法は、妊娠率の向上をはじめとし、いくつかの点で有用であると考ええる。

(本論文の要旨は、第33回日本不妊学会総会及び第

41回日本産科婦人科学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Paulson, J. D. and Polakoski, K. I.: The removal of extraneous material from the ejaculate. *Int. J. Androl. (Suppl.)*, 1: 163, 1978
- 2) 久保春海, 田宮 親: 開業医におけるAIH・GIFT・IVF-ETの実際, 産婦の実際, 36: 1903, 1987
- 3) 真田利男, 小林俊文, 兼子 智, 小埜 潔, 飯塚理八: 密度勾配遠心用蔗糖重合体を用いた精子洗滌濃縮法のAIHへの応用, 日不妊会誌, 28: 267, 1983
- 4) 飯塚理八, 小林俊文, 小埜 潔: 精子洗滌法を用いた配偶者間人工受精, ホルモンと臨床, 34: 193, 1986
- 5) Ericsson, R. J.: Isolation and storage of progressively motile human sperm, *Andrologia*, 9: 111, 1977
- 6) Dmowski, W. P., Gaynor, L., Lawrence, Rao, R. and Scomegna, A.: Artificial insemination homologous with oligospermic semen separated on albumin columns, *Fertil. Steril.*, 31: 58, 1979
- 7) 飯塚理八, 兼子 智, 小埜 清, 小林俊文: 配偶者間人工受精へのPercoll精子洗滌濃縮法の応用およびその分娩例の検討, 産婦の世界, 39: 33, 1987
- 8) 小林俊文, 兼子 智, 翁文開, 李顕銑, 青木 類: 凍結精子による人工受精の妊娠率向上のポイント, 産婦の実際, 36: 1987
- 9) Melis, G. B., Paoletti, A. M., Strigini, F., Fabris, F. M., Canale, D. and Fioretti, P.: Pharmacologic induction of multiple follicular development improves the success rate of artificial insemination with husband's semen in couples with male related or unexplained infertility, *Fertil. Steril.*, 47: 441, 1987
- 10) Dodson, W. C., Easley, H. A., Whitesides, D. B., Haney, A. F. and Hughes, C. L. Jr.: Superovulation with intrauterine insemination in the treatment of infertility: a possible alternative to gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 48: 441, 1987
- 11) Lalich, R. A., Marut, E. L., Prins, G. S. and scomegna, A.: Life table analysis of intrauterine insemination pregnancy rates, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 980, 1988
- 12) Pardo, M., Buxaderas, C., Barri, P. N., Pomerol, J. M., Bancells, N., Sabater, J. and Coroleu, B.: Spermatozoa selection in discontinuous Percoll gradients for use in artificial insemination, *Fertil. Steril.*, 49: 505, 1988
- 13) Dodson, W. C., Hughes, C. L. and Haney, A. F.: Multiple pregnancies conceived with intrauterine insemination during superovulation: An

evaluation of clinical characteristics and monitored parameters of conception cycles, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159: 382, 1988

- 14) Velde, E. R., Kooy, R. J. and Waterreus, J. J.: Intrauterine insemination of washed husband's spermatozoa: a controlled study, *Fertil. Steril.*, 51: 182, 1989
- 15) Confino, E., Friberg, J., Dudkiewicz, A. B. and Gleicher, N.: Intrauterine inseminations with washed human spermatozoa, *Fertil. Steril.*, 46: 55, 1986
- 16) Chiu, T. T. Y., Tam, P. P. L. and Mao, K. R.: Pregnancies Established by Intrauterine Insemination with Washed Spermatozoa, *Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol.*, 13: 467, 1987
- 17) 児玉英也, 加藤充弘, 福田 淳, 一関和子, 福島峰子, 真木正博, 太田博孝: Clomiphene-hMG 刺激周期を利用した Percoll 洗浄精子による AIH, *日不妊会誌*, 34: 246, 1989

**A retrospective study of
intrauterine insemination with
ovarian stimulation and
percoll separated spermatozoa**

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

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

The success of intrauterine inseminations (IUI) was evaluated in three groups of 237 couples. This population underwent a total of 1421 treatment cycles. Group 1 included the patients with natural cycles and receiving the ordinary IUI (by non-separated semen). Group 2 consisted of the couples who underwent ovarian stimulation and received the ordinary IUI. Group 3 presented the couples undergoing ovarian stimulation and sperm separation by 80% Percoll gradients. 71 pregnancies resulted from IUI, for a 30% pregnancy rate per couple. An overall 5.0% pregnancy rate per cycle was achieved. Respective pregnancy rates per cycle in Group 1, Group 2 and Group 3 were 3.4%, 6.7% and 8.6%. The pregnancy rate per cycle in Group 3 is significantly ($P < 0.01$) higher than in Group 1. All of the successful cases in Group 3 resulted within five treatment cycles. Four of the pregnancies in Group 2 (12.9%) were twins. All of the pregnancies in Group 1 and Group 3 were singleton. Ovarian stimulation and sperm separation in 80% Percoll gradients is a useful technique for IUI.

(受付: 1989年6月9日)

卵管不妊に対する肉眼手術と 顕微鏡手術の治療成績

Comparison Between Macrosurgical and Microsurgical Treatment on Tuboplasty

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

北里大学医学部産婦人科

天 野 完	巽 英 樹	新 井 正 夫
Kan AMANO	Hideki TATSUMI	Masao ARAI

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Kitasato University,
Kanagawa 228, Japan

昭和49年から昭和63年の14年間に52例の卵管形成手術をおこなった。38例を肉眼的に、14例をmicrosurgicalに手術した。

術式は癒着剥離術5例、吻合術9例、開口術24例、移植術10例、複合手術4例であった。

肉眼手術をおこなった38例中13例(34%)が妊娠したが、4例は卵管妊娠であった。microsurgeryをおこなった14例中8例(57%)が妊娠したが、4例が自然流産に終わった。従って、全52例中生児を得たのは13例(25%)であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 66-73, 1990)

はじめに

10年以上前には、卵管手術は労多くして実りの少ない手術であった。そこにmicrosurgeryが登場し、術後妊娠率を飛躍的に向上させることに成功した。近年、microsurgeryの普及はめざましく、形成外科や眼科同様、婦人科医のルーチントレーニングにmicrosurgeryが取り入れられる日も遠くないように思われる。著者らも15年前から卵管手術を開始し、

肉眼手術からmicrosurgeryへと術式を改変しながら、各種術式を時代と共に施行してきた。今回その手術成績をまとめ若干の考察を加えて報告する。

対象および方法

昭和49年8月から昭和53年11月までの間に北里大学病院において、また昭和55年5月から昭和63年1月までの間に筑波大学付属病院において経験した卵管手術症例のうち、外性子宮内膜症例、対側卵管

正常例、未婚症例、卵管が全長にわたって閉鎖し手術不能であった症例を除外し、術後1年以上を経過した52例を対象として、術式、術後妊娠率等について調査した。

1. 既往歴

年齢は23歳から39歳に分布して、平均30.5歳、原発不妊28例、続発不妊24例であった。妊娠歴としては表1に示すように、人工妊娠中絶術の既往を持つ者が14例と続発不妊の過半数を占め、次いで卵管妊娠の7例であった。今回の症例中には自然流産のみを経験している症例は1例も無く、自然流産は卵管不妊の原因にはなりにくいと考えられた。過去に生児を有する症例は3例あり、これらのうち2例は卵管結紮後の症例であった。

既往手術歴としては虫垂炎が最も多く14例であり、卵巣嚢腫のため片側の付属器切除後の症例が2例、卵管結紮術が2例であった(表1)。

このように人工妊娠中絶、虫垂炎、子宮外妊娠の三者が卵管性不妊の原因となっていることが多く、これ等の疾患の既往を持つ症例が22例と全体の42.3%を占めていた。

2. 術前検査

不妊症々例では外来にて精液検査を含めた不妊症ルーチン検査をおこない、原則として他に不妊原因の無い症例を対象とした。しかし、他に不妊原因があった場合でも、それが治療可能である場合には積極的に手術をおこなった。最終的な手術適応は外来での子宮卵管造影、通気、通水検査に加えて、開腹直前に腹腔鏡を施行して決定した。腹腔鏡は52例中49例94.2%におこなった。

3. 手術適応

手術適応となった卵管の疾患をまず卵管妊娠とそれ以外の場合に分けた。後者のうち最も多いのは采部閉鎖の21例であり、ついで間質部閉鎖の10例であった。卵管の閉鎖部位と既往歴との関係では、卵管間質部閉鎖例に人工妊娠中絶の既往を持つ者が10

例中7例70%と多く、人工妊娠中絶術が間質部閉鎖の主要原因になっていることが示された。一方、卵管周囲癒着5例中2例に虫垂炎手術の既往があった。

卵管閉鎖症例においては、多かれ少なかれ卵管周囲癒着を伴っていることが多く、手術に当たっては癒着を剥離してから主たる卵管の手術に移るが、このような症例は卵管閉鎖に分類した。

4. 術式

卵管妊娠時の保存手術は必ずしも全例におこなった訳ではないが、反復外妊等で卵管切除後の症例は必ず保存的に手術し、また腹腔鏡で初めて診断可能であった妊娠初期症例の場合には対側卵管が正常であっても保存的手術を試みた。

卵管因子は、卵管周囲癒着、卵管采閉鎖、峡部閉鎖、間質部閉鎖に分類し、術式はIFFSの分類¹⁾に準じて癒着剥離術、卵管開口術、卵管吻合術、卵管移植術および複合手術に分類した。

手術は、肉眼手術とmicrosurgeryの両方でおこなった。microsurgeryを導入したのは、昭和56年からであり、それ以前の手術はすべて肉眼的におこなった。しかしながら、microsurgery導入後も全ての手術をmicrosurgicalにおこなった訳ではなく、原則として剥離術、開口術は肉眼的に、吻合術、移植術はmicrosurgicalに手術した。また、吻合術、移植術に関しても卵管の剥離、切断までは肉眼的におこない、吻合時のみに顕微鏡を用いることが多かった。縫合糸は肉眼手術では5-0 vicryl糸を、microsurgeryでは8-0 dextron糸を用いた。卵管の吻合は初期には6針縫合で、現在はすべて3針ないし4針縫合でおこなっている。

手術の時期は月経直後の卵胞期とした。手術はなるべく出血させないように慎重におこない、終了時に止血を確認し、凝血を除去した後、温生食2000mlで腹腔内を洗浄した。昭和56年以後は癒着防止の目的で32%デキストラン70(キセラン;塩野義製薬)を初期には100ml、現在は200ml腹腔内に注入し、

表1 妊娠・分娩歴と既往手術歴

	妊娠・分娩歴					
	未妊婦	人工妊娠中絶	子宮外妊娠	胎児死亡	生児あり	計
既往手術						
なし	19	8	6	1	0	34
虫垂炎	8	4	1	0	1	14
卵巣嚢腫	1	1	0	0	0	2
卵管結紮	0	0	0	0	2	2
計	28	13	7	1	3	52

注) 人工妊娠中絶と外妊の両方の既応のある1例は外妊に分類

ドレーンを置かずに閉腹している。

開口術、癒着剥離術では術後入院中に必ず通水をおこなった。microsurgery による吻合術、移植術の場合には、通水はおこなっていない。術後約 2 週間で退院し、外来では原則として 1～3 ヶ月後に子宮卵管造影をおこない、卵管の疎通性を確認した。その後、1～2 周期ごとに通水をおこないながら外来管理とし、52 例全例少なくとも術後 1 年以上にわたって follow up し得た。

a. 卵管妊娠時の保存的術式

卵管妊娠時の保存手術は原則として、患部を切除し、健常な部分の端々吻合をおこなった。しかし卵管妊娠時の着床部は大部分卵管膨大部でありこの部分を切除すると吻合すべき卵管の両端の太さが大きく異なることになる。そこで端々挿入法、端側挿入法という術式⁵⁾を考案し、これを応用して数例の卵管妊娠例を肉眼的に手術した。この術式は術後卵管の疎通性が高く保たれるという長所は持っていたものの、反面妊娠した場合に再度卵管妊娠になる危険性が高いという欠点を持っていた。従って、現在ではこの術式はおこなっておらず、このような場合は microsurgical に子宮側の卵管を縦切開して卵管の断面積を大きくした上、創を合わせて端々吻合術をおこなっている。

b. 卵管周囲癒着剥離術

癒着剥離術は術野全体を見渡しながらかこなわなければならないので、microsurgery よりも肉眼手術の方が優れていると考え、現在でも肉眼手術でおこなっている。

癒着剥離の手技に関しては、卵管周囲癒着が無秩序におこっているものではなく、その中にある程度の規則性がある事を見い出してからは、先ず腸管の癒着を剥離した上で、子宮・膀胱間、円靭帯・広間膜前葉間、円靭帯・卵管間、卵管・卵巢間、卵巢・広間膜後葉間の順序に従って癒着の有無を確認、剥離してゆき、癒着剥離術を順序だった手術としておこなうように心がけた。剥離術中、最も神経を使ったのは卵巢・卵管間の剥離である。卵管間膜部の癒着剥離は容易であるが、卵管間膜より先の本来自由であるべき卵管膨大部、采部が卵巢にベッタリと癒着していると、この間の癒着と本来の卵管間膜との境界が分らず、卵管間膜まで癒着と思って剥離切断する危険があり、この部に細心の注意を払った。また卵巢・広間膜後葉間すなわち卵巢の裏側は術者が直接見ることでできない位置になるので、盲目的、用手的に剥離しなければならないことがあり、剥離後腹膜の欠損をきたしやすい。この時には卵管に対

する操作終了後にこの腹膜欠損部をきちんと修復した。

c. 卵管開口術

卵管手術をおこなう場合には、腹腔鏡終了後、開腹が決定した時点で、必ず小児用バルーンカテーテルを経腔的に子宮腔内へ挿入し、その端を術野に出しておき、いつでも自由に術野から通水ができるようにした。開口術も原則的には切開は肉眼的におこなった。卵管周囲の癒着を剥離した後、通水を前述のようにおこない、閉鎖部を緊張させた後に一気に尖刃で切開を入れた。切開は采部先端の凹みを中心にして卵管間膜の対側へ一直線に入れ、十字切開はおこなわなかった。切開の長さは短ければ短い程良いが、損傷の少ない卵管内膜が翻転するまでは必要であり、1～1.5 cm であることが多かった。止血はできるかぎり圧迫止血を心掛けた。従来はその後 5-0 dextron 糸にて断端を外反するように固定していたが、現在では断端の漿膜と内膜の間にできる筋層断端部を露出させないように microsurgical に縫合固定している。

d. 卵管移植術

i) 肉眼手術

著者らは 10 例の間質部閉鎖症例中 3 例を肉眼的に手術した。これらはいずれも初期の症例である。この時には子宮底部を開放して直視下に卵管を子宮内腔に吻合して移植し、卵管内にはスプリントカテーテルを留置し、これを子宮内に置いた太田リングに結び付けておき、数日後に太田リングとともに経腔的にカテーテルを抜去した。

ii) microsurgery

子宮卵管角部閉鎖に対する卵管移植術は閉鎖部位を切除する際に子宮筋層を掘って行かなければならず、後の吻合は、すり鉢の底でおこなうような形になる。これを避け、しかもなるべく筋層の欠損を少なくするために最近は以下のような術式でおこなっている。

子宮から 1 cm 位の部位で卵管を切断し、逆行性に采部から通水をおこない、末梢側の疎通性を確認する。疎通性がない場合には切除範囲を広げ、勢いよく水が流出するまで卵管を切除する。次に子宮側から通水をおこない、間質部に疎通性の無い事を確認した上で、子宮側に残った卵管を挙上し、卵管間膜側から漿膜を切開し、卵管周囲に円周切開を加える。卵管間膜対側の子宮筋層に縦切開を入れ、これを卵管から剥ぐようにして筋層内卵管を周囲の子宮筋層から剥離する。この剥離を進めて子宮に近づくとも卵管が太くなり、裾が広がってくるようになる。ここ

で卵管を眼科用尖刀で切断すると子宮内が開放される。この時、子宮内に通水の圧をかけておき、切断と同時に勢いよく水が流出すれば子宮腔に入った事がわかる。この術式では筋層内の卵管が周囲筋層から剥離されているため、吻合術がおこないやすい。また閉鎖している卵管筋層のみを切除しているので、子宮筋の欠損が起こらない。更に切除した卵管のあった部位に疎通性ある卵管を埋め込むので、子宮筋層を縫合閉鎖した時に卵管に圧力がかからない、などの利点があると考えられた。

結 果

1. 卵管妊娠時の保存的手術

卵管妊娠時の保存手術は全部で14例おこなった。9例を肉眼的に、5例を microsurgical に手術した。このうち対側卵管が正常であった7例、未婚の1例、術後1年未満の2例の計10例は今回の対象には入っていない。残された4例中2例は前回の子宮外妊娠時に対側卵管の切除術を受けている(表2)。他の2例は手術時に対側卵管周囲癒着と対側卵管采閉鎖が

表2 肉眼手術の適応と術式

適 応	術 式						妊娠例数 ():外妊	妊娠率(%)
	吻合	開口	移植	剥離	複合	計		
卵管妊娠	2					2	1	50
峡部閉鎖	2	1				3	1 (1)	33
膨大部閉鎖		2				2	0	0
采部閉鎖		21				21	6 (1)	29
間質部閉鎖			3			3	1	33
周囲癒着				5		5	3 (1)	60
複合					2	2	1 (1)	50
	4	24	3	5	2	38	13 (4)	34

表3 microsurgery の適応と術式

適 応	術 式						妊娠例数 ():流産	妊娠率(%)
	吻合	開口	移植	剥離	複合	計		
卵管妊娠								
峡部閉鎖	4					4	3 (2)	75
膨大部閉鎖								
采部閉鎖								
間質部閉鎖			7			7	3 (1)	43
周囲癒着								
複合	1				2	3	2 (1)	67
	5		7		2	14	8 (4)	57

表4 卵管手術成績 (肉眼手術と microsurgery の合計)

適 応	術 式						妊娠例数 []:外妊 ():流産	妊娠率(%)
	吻合	開口	移植	剥離	複合	計		
卵管妊娠	2					2	1	50
峡部閉鎖	6	1				7	4 [1] (2)	57
膨大部閉鎖		2				2	0	0
采部閉鎖		21				21	6 [1]	29
間質部閉鎖			10			10	4	40
周囲癒着				5		5	3 [1] (1)	60
複合	1				4	5	3 [1] (1)	60
	9	24	10	5	4	52	21 [4] (4)	40

発見され、それぞれ卵管妊娠の保存手術と同時に卵管周囲癒着剥離術、卵管開口術を行ったため、この 2 例は複合として分類した。

前者のうち 1 例が妊娠し、分娩に至った (表 5, 症例 1)。この症例は肉眼手術で端側挿入術をおこなった症例であったが、その後もう 1 度妊娠し、外妊に終わった。後者 (表 5, 症例 13, 20) は 2 例とも妊娠したが、1 例は外妊であった。

2. 吻合術

表 2 に見られる肉眼手術の吻合術は 4 例とも、端々

挿入術あるいは端側挿入術をおこなったものである。峡部閉鎖の 2 例は卵管結紮術後と卵管結核であった。卵管結核症例 (表 5, 症例 3) には妊娠が成立したが卵管妊娠であり、手術時に再度保存的手術をおこなったがその後妊娠には至らなかった。

microsurgical におこなった吻合術は峡部 4 例、複合 1 例であり (表 3)、前者 4 例中 3 例 (表 5, 症例 14, 15, 16) が妊娠した。また複合は片側が峡部で対側が間質部で吻合をおこなったものであるが、この症例も妊娠に至った (表 5, 症例 19)。従って、

表 5 術後妊娠例の詳細

症例 番号	年 齢	適 応	既往歴	術 式	妊娠迄 の期間	転帰
肉眼手術						
1	25	右卵管妊娠	外妊にて左側卵管切除後	吻合術 (端側卵管挿入術)	6 ヶ月	分娩 卵管妊娠
2	26	両側間質部閉鎖	人工妊娠中絶 2 回	両側移植術	3 年 8 ヶ月	分娩 2 回
3	27	両側峡部閉鎖 (卵管結核)	ナ シ	吻合術 (端側卵管挿入術)	1 年 4 ヶ月	卵管妊娠
4	24	右采部閉鎖	外妊にて左側卵管切除後	開口術	5 ヶ月	分娩
5	29	両側采部閉鎖	ナ シ	開口術	4 ヶ月	分娩
6	29	両側采部閉鎖	ナ シ	開口術	6 ヶ月	分娩
7	30	両側采部閉鎖	ナ シ	開口術	1 年 6 ヶ月	分娩
8	31	両側采部閉鎖	虫垂炎	開口術	2 年 7 ヶ月	分娩
9	31	卵管周囲癒着	虫垂炎	剥離術	1 年 5 ヶ月	卵管妊娠
10	33	卵管周囲癒着	ナ シ	剥離術	2 年 8 ヶ月	分娩
11	33	卵管周囲癒着	ナ シ	剥離術	8 ヶ月	分娩
12	27	右采部閉鎖 左峡部閉鎖	虫垂炎	右開口術 左開口術	2 ヶ月	卵管妊娠
13	28	右采部閉鎖 左卵管妊娠	ナ シ	右開口術 左吻合術	1 年 5 ヶ月	卵管妊娠
microsurgery						
14	31	両側峡部閉鎖	虫垂炎	左 inope 右吻合術	1 年	分娩 2 回
15	28	右峡部閉鎖	外妊にて左側卵管切除後	吻合術	2 年 9 ヶ月	流産
16	34	両側峡部閉鎖	卵管結紮術後	吻合術	9 ヶ月	流産 2 回
17	33	両側間質部閉鎖	ナ シ	両側移植術	6 ヶ月	流産 分娩
18	31	両側間質部閉鎖	人工妊娠中絶 2 回 虫垂炎	両側移植術	2 ヶ月	分娩
19	27	右峡部閉鎖 左間質部閉鎖	人工妊娠中絶 虫垂炎	右峡部-峡部吻合術 左間質部-峡部吻合術	2 年 8 ヶ月	流産 2 回
20	25	右卵管妊娠 左卵管周囲癒着	人工妊娠中絶	右吻合術 左剥離術	3 ヶ月	分娩
21	26	両側間質部および 采部閉鎖	人工妊娠中絶 虫垂炎	両側移植開口術	8 ヶ月	流産

microsurgical に吻合術がおこなった症例では5例中4例80%が妊娠に至った。

3. 卵管周囲癒着剥離術

卵管周囲癒着剥離術はその大部分を肉眼的手術で行っており、その妊娠率は5例中3例60%であった(表2)(表5, 症例9, 10, 11)。

4. 卵管開口術

表2に示すように開口術は全部で24例おこなった。峡部閉鎖の1例は単に峡部で開口した。この症例は前2回外妊で対側卵管切除後であり、また手術した側も峡部途中までしか存在しなかったため、峡部を開口したものである。膨大部閉鎖2例は膨大部での開口術をおこなった。この3例はいずれも妊娠に至らなかった。采部の閉鎖症例は21例であり、すべて肉眼的に手術をおこない、6例(表5, 症例4, 5, 6, 7, 8, 12)が妊娠し、うち1例は卵管妊娠であった。開口術全体の妊娠率は24例中6例25%と低値であった。

5. 卵管移植術

肉眼手術をおこなった3例中1例(表5, 症例2)が術後3年8ヵ月で妊娠した。この症例はその後すぐに再妊娠し2児を得た。

microsurgically に手術した症例のうち1例は両側の間質部閉鎖が術前のHSGで診断されており、腹腔鏡で采部閉鎖でもあることが診断された。当然卵管全長にわたって閉鎖している可能性が高く手術を断念しようと考えたが、患者の強い要望があったため峡部の閉鎖を確認するため開腹し采部閉鎖を開口したところ峡部に疎通性があったので両側の開口術と移植術を同時におこなった。この症例は妊娠したが流産であった(表5, 症例21)。この症例を含めて7例をmicrosurgery で移植し、3例(表5, 症例17, 18, 21)42.8%が妊娠した。

6. 肉眼手術とmicrosurgery との比較

術後妊娠率を術式別に示すと、吻合術が最も妊娠率が高く、9例中6例66.7%の妊娠率であった。次いで剥離術が5例中3例60%、移植術10例中4例40%、開口術は24例中6例25%と最も低い妊娠率であった(表4)。

一方、肉眼手術とmicrosurgery を比較すると、肉眼手術は38例中13例34%の妊娠率(表2)であるのに対し、microsurgery は14例中8例57%と高い妊娠率を示した(表3)。しかしながら、肉眼手術における13例中4例30.8%が卵管妊娠であり(表2)、microsurgery による8妊娠中4例50%が自然流産に終わり(表3)、生児を得た症例は52例中13例25%であった(表4)。なお、流産は全て超音波でGS

が確認され、組織学的に絨毛が確認されたもので、いわゆるchemical abortion は無かった。

妊娠までの期間は術後2ヵ月から3年8ヵ月に分布して、平均14.8ヵ月であり、1年以内に12例57%、1年半以内に16例76%が妊娠した。逆に2年以上経ってから妊娠した症例も5例23.8%あった。肉眼手術とmicrosurgery の妊娠までの期間はそれぞれ15ヵ月、13.1ヵ月であり有意差は無かった。

北里大学病院において手術した12例の妊娠率は5例41.7%であり、筑波大学付属病院で手術した40例の妊娠率は16例40%と両者に有意差は無く、また32%デキストラン70使用前の15例の妊娠率6例40%と使用例37例中15例40.5%の間にも有意差は無かった。

考 察

著者らは昭和49年から卵管の手術を始めた。しかもその場が北里大学病院、筑波大学付属病院と新設大学であったこともあって、全く伝統や予備知識の無い環境での試行錯誤の連続であった。従って、今回の成績は一定の目的を持ったり適応症例を集めておこなわれた計画的臨床研究ではなく、目の前に現れた症例ごとに文献を探し、術式を考え、それを練習しておこなわれた手術治療の集積である。

最初におこなわれた手術は片側卵管切除後の反復外妊時の卵管保存手術(表5, 症例1)であった。たまたまこの症例に対し前述した端側挿入法⁵⁾をおこなったところ子宮内妊娠が成立し、分娩に成功するに至って、この端側挿入法あるいは端々挿入法が卵管手術術式として有効なのではないかと考え、その後この術式を数例試みるようになった。しかし、この術式は術後疎通率は高いものの、子宮外妊娠率が高く、最終的には断念せざるを得なかった。

このように卵管の端側挿入術を肉眼的におこなったのは、卵管妊娠時の窮余の一策であったが、その成功に味をしめ、峡部閉鎖に対する吻合術式としてもこの術式を応用したのは誤りであった。特に、卵管結紮後の再疎通手術に関してはmicrosurgery の力を借りるまでもなく、肉眼的に端々吻合術をおこなうことによって、高い妊娠率が得られる事が当時既に指摘されていた^{1,2)}。現在では吻合術に関してはmicrosurgical に手術しており高い妊娠率を得ている。

間質部閉鎖に対する肉眼的卵管移植術は、代表的な術式が数種あった¹⁵⁾。我々は摘出子宮を用いて卵管の移植練習をおこない、初心者が最も確実に卵管を移植できるのは、子宮底部を切開、開放し、直視下に卵管を子宮壁に縫合固定する方法であるという結

論に達した。昭和 51 年にこの方法で移植術をおこない、生児を得る事に成功した(表 5, 症例 2)。このように、肉眼手術の時代には多分に幸運にも恵まれ、妊娠する症例があったため、卵管手術に対する悲観的な考え方はせずに手術に臨むことができた。

microsurgery を導入してからは、間質部閉鎖はすべて microsurgical に移植をおこなうようになった。子宮卵管造影で間質部閉鎖と診断されても実際には cornual block であり、間質部と峽部、あるいは膨大部の吻合術ができることがあると報告^{9,16)}されているが、われわれの経験では 1 例(表 5, 症例 19)を除いてすべて移植を必要とした。また切除組織を病理学的に検討すると、卵管内にわずかに疎通性が認められる場合もあったが、術中の通水では水の流出が認められず、疎通性ありと判定することはできなかった。間質部閉鎖に対して長田ら⁴⁾は子宮角部を大きく切除して卵管を移植し、高い妊娠率を得ている。この術式では子宮筋の大きな欠損を伴うため、分娩様式は帝切となる。著者らはこれに対して前述のような筋層の欠損が少なく、かつ卵管の疎通性と妊娠率を高くできる術式の開発を目指している。この術式に関しては更に症例を重ねてからその可否を判定したい。

開口術は 25%の妊娠率と各種術式の中で最も低い妊娠率であった。開口術の予後は症例毎に卵管損傷の程度に大きく左右され、他の術式ほど肉眼手術と microsurgery との間に妊娠率の差はなく、Gomel¹⁰⁾は妊娠率 29%と今回の著者らの成績と余り変わらない microsurgery の成績を示している。しかし、Larsson¹⁴⁾による妊娠率 39%との報告もあり、少しでも妊娠率を高めるために、今後は著者らも microsurgically に手術しようと考えている。

剥離術に関しては、著者らは現在も肉眼的に手術している。この理由は癒着剥離術では術野全体を見渡しながらおこなう操作が多く、とても microsurgery の視野には入らないためである。また、術後の再癒着率が肉眼手術と microsurgery との間で変わらなかったとする実験結果¹³⁾もある。従って、fimbrioplasty や salpingostomy を伴わない癒着剥離術は今後とも肉眼手術で良いと考えている。それよりも術後成績により影響を与えるのは術後の再癒着防止策であろう。32%デキストラン 70⁶⁾を始め数多くの薬剤が試みられてはいるが、確実な癒着防止効果を期待出来るものはまだ存在しない。従って、個々の操作を atraumatic におこない、腹膜欠損部を接着剤⁹⁾を利用して確実に修復することは大切な操作である。

癒着剥離術のポイントが卵巣・卵管間の剥離にあ

ることは Winston¹⁶⁾も、Gomel¹²⁾も既に述べている。この部の剥離術は手技的に難しい上、卵管閉鎖症例の多くがこの部分に癒着を有しており、単に剥離術のみならず開口術の成否もこの部の癒着剥離の上手、下手にかかっているといっても過言ではない。従って、この部分に対する手術操作はまだ十分に改良の余地があると考えられる。

microsurgery 後の妊娠率は確かに高率であり、また卵管妊娠も少ないことから、明らかに肉眼手術に勝っている。しかしながら子宮内妊娠が成立したにもかかわらず、流産例が多いことも事実であり、これは 20 妊娠中 10 例が流産に終わったとする野口らの報告⁷⁾と同率であった。これは肉眼手術に比較して microsurgery では妊娠率が高く、流産率は低いとする Favez らの報告⁸⁾と我々の成績の大きく異なる点である。しかしながら、たとえ流産に終わっても子宮内妊娠であればその後の正常妊娠を期待することができ(表 5, 症例 17)、待つことも大切な事であろうと考えている。

卵管手術は体外受精胚移植や GIFT の妊娠率が向上すれば、それらに道を譲ることになる。しかし、卵管手術によって回復された妊孕性は生理的なものであり、何回でもその後自然に妊娠、分娩を繰返すことができる点は捨てがたい魅力である。従って、確実に妊娠率が高く術後経膈分娩可能な卵管手術術式の開発は当然なされなければならない研究課題であり、今後その開発に努力したいと考えている。

文 献

- 1) 明石勝英, 足立 昇, 佐々木誠, 小関章夫, 川瀬哲彦, 水元修治, 小前由雄, 山口 斌, 鈴木敏道: 産婦治療, 10:102, 1965
- 2) 岡田俊次: 卵管復元手術の症例, 産と婦, 38:288, 1971
- 3) 長田尚夫, 高木繁夫: 手術の一工夫, 接着剤, 産と婦, 52:1891, 1985
- 4) 長田尚夫, 大塩達弥, 山田祐士, 赤嶺和成, 高木繁夫: 卵管子宮内膜症の診断・治療, 産婦人科マイクロサージェリー学会誌, 1:70, 1988
- 5) 西田正人: 生殖現象における卵管の役割と機能, 周産期医学, 10:73, 1980
- 6) 西田正人, 岩崎寛和: 手術の一工夫, 32%デキストラン 70 を用いた術後癒着防止, 産と婦, 53:188, 1986
- 7) 野口昌良, 俣田茂雄, 秋田敏行, 山崎 健, 浅井光興, 石原 実: マイクロサージェリーによる卵管形成術の成績と流産例の検討, 日不妊会誌, 33:369, 1988
- 8) Favez, J. A. and Suliman, S. O.: Infertility surgery of the oviduct: comparison between

- macrosurgery and microsurgery, *Fertil. Steril.*, 37: 73, 1982
- 9) Gomel, V.: Tubal reanastomosis by microsurgery, *Fertil. Steril.*, 28: 59, 1977
 - 10) Gomel, V.: Salpingostomy by microsurgery, *Fertil. Steril.*, 29: 380, 1978
 - 11) Gomel, V.: Classification of operations for tubal and peritoneal factors causing infertility, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 23: 1259, 1980
 - 12) Gomel, V.: An odyssey through the oviduct, *Fertil. Steril.*, 39: 144, 1983
 - 13) Holtz, G. and Kling, O. R.: Effect of surgical technique on peritoneal adhesion reformation after lysis, *Fertil. Steril.*, 37: 494, 1982
 - 14) Larsson, B.: Late results of salpingostomy combined with salpingolysis and ovariolysis by electromicrosurgery in 54 women, *Fertil. Steril.*, 37: 156, 1982
 - 15) Siegler, A. M.: Tubal plastic surgery, the past, the present, and the future, *Obstet. Gynecol. Survey*, 15: 680, 1960
 - 16) Winston, R. M. L.: Progress in tubal surgery, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 8: 653, 1981

Comparison between macrosurgical and microsurgical treatment on tuboplasty

Masato Nishida, Taiji Tsuji,
Hiroshi Yamanouchi and Hirokazu Iwasaki

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

Kan Amano, Hideki Tatsumi
and Masao Arai

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Kitasato University,
Kanagawa 228, Japan

During a 14-year period from August 1974 through January 1988, 52 patients underwent tuboplasty. Thirty-eight cases were macrosurgically and 14 cases were microsurgically operated.

Performed surgical procedures were adhesiolysis of 5 cases, tubal anastomosis of 9 cases, salpingostomy of 24 cases, tubouterine implantation of 10 cases and combined procedures of 4 cases.

Out of 38 patients underwent macrosurgery, 13 (34%) gave pregnant, while 4 of 13 patients had tubal gestations. Out of 14 patients underwent microsurgery, 8 (57%) gave pregnant, while in 4 of 8 patients spontaneous abortion occurred.

Of the 52 patients who had tuboplasty, 13 (25%) successfully delivered at term.

(受付: 1989 年 3 月 17 日)

ヒト精子運動能と PENETRAK test

The Relationship between Human Sperm Motility and PENETRAK test

福島県立医科大学産科婦人科学教室

月 川 奏 星 和 彦 柳 田 薫
Susumu TSUKIKAWA Kazuhiko Hoshi Kaoru Yanagida
遠 藤 力 佐 藤 章
Chikara ENDO Akira SATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College,
Fukushima 960-12, Japan

ウシの頸管粘液を用いた新しいヒト精子の頸管粘液貫通テストである PENETRAK を 33 症例について行ない、その結果と精液分析および hyperactivation との関連性を調べ、以下の様な成績を得た。

1. PENETRAK 値と精子濃度・精子運動率・運動精子総数の間にはそれぞれ有意な正の相関が得られた (相関係数; $r=0.664$, $r=0.610$, $r=0.601$, $p<0.01$).

精液分析正常群・異常群の平均 PENETRAK 値 (mean $\pm$ S.D.) は 50.9 ± 12.6 mm ($n=19$), 24.6 ± 17.9 mm ($n=14$) で両者間に有意差が認められた ($p<0.001$).

2. PENETRAK 値と培養 5 時間時における hyperactivated sperm の割合との間には上記 1 よりも強い正の相関が認められた (相関係数 $r=0.862$, $p<0.01$). hyperactivated sperm の割合が 30% 以上と 30% 未満の群の平均 PENETRAK 値は 52.4 ± 11.5 mm ($n=21$), 17.6 ± 9.4 mm ($n=12$) で両者間に有意差が認められた ($p<0.001$).

PENETRAK test は妊孕性を強く反映する hyperactivation と極めて高い相関性を有し、ヒト精子の機能評価法として有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 74—79, 1990)

緒 言

精子と頸管粘液の適合性を検索することは不妊の原因を追及する上で極めて重要であり、この検査法としては、*in vivo* の性交後検査 (post coital test, Huhner test) と *in vitro* での Kremer test, Miller-Kurzrock test が知られている。

近年、ウシの頸管粘液の性状がヒトのそれと物理学および生化学的に極めて類似しているばかりでなく、ヒト精子の運動性・通過性に対しても同様の性質を有することが明らかにされ、比較的大量に収集できるこのウシ頸管粘液を用いてヒト精子の機能

をスクリーニングする方法が PENETRAK として開発された。今回われわれは PENETRAK を用い、ヒト精子の運動能と頸管粘液通過能の関連を検討したので報告する。

対象および方法

すでに妊孕性が確かめられている健康成人男子 5 例、体外受精・胚移植 (IVF-ET) を受けている患者 17 例、配偶子卵管内移植術 (GIFT) を受けている患者 11 例の合計 33 例から得られた精子を対象とした。

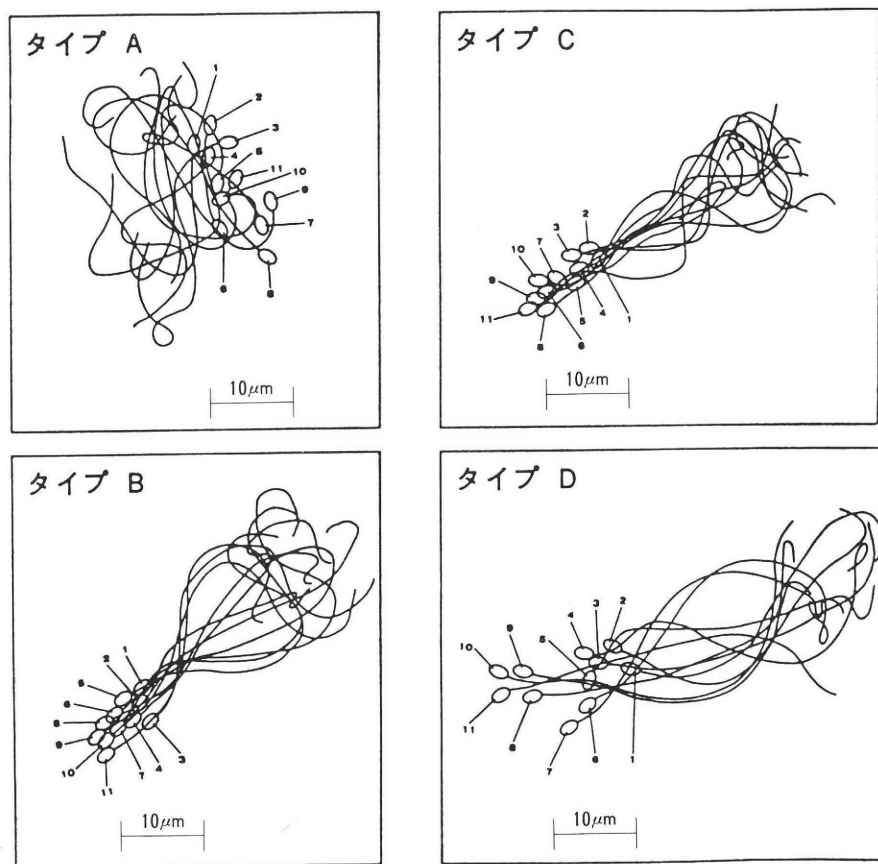
用手法にて採取された精液は 30 分室温に置くことにより十分液化させ、Makler¹⁾ の counting chamber

を用いて精液分析(精液量, 精子濃度, 精子運動率, 奇形率)を行なった。

次いでPENETRAK testを施行した。PENETRAKは排卵前のウシ頸管粘液が充填された長さ約10cm, 幅0.4cm, 厚さ0.15cmの扁平なガラス毛細管で, 使用前は $-12\sim-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存されている。使用時は凍結品を融解し, 室温に放置して十分に平衡させた。まず, 毛細管を所定の箇所で切り, 開放端を下にして液化した精液が0.2ml入った標本容器に2本立て, 室温に静置した。90分後毛細管を取りだし, 位相差顕微鏡下に観察して先頭精子の到達距離を計測し, 2本の平均値を求めてPENETRAK値とした。PENETRAK値は一般に20mm以下が不

良・20~30mmが判定保留・30mm以上が良好と判定されるが, 今回は30mm未満を不良・30mm以上を良好として検討した。

PENETRAK testと平行して, 同一精子のhyperactivationについて調べた。すなわち, 先ず液化した精液を1.0ml試験管にとり, その上に培養液(modified Biggers, Whitten and Whittingham液; mBWW)を2.0ml重層し精液静置²⁾法を行なう。上層mBWWを 37°C で5時間培養後1滴Makler counting chamberに滴下して100~200個の運動精子を顕微鏡ハイスピードビデオ(Nac社製, MHS-200)で録画, 再生画面から精子の運動形態を図1のように分類し全運動精子に占めるhyper-



(0.025秒毎の動きを示す)

タイプA	タイプB	タイプC	タイプD
非常に活発に動くが, 尾部の動き・進行方向とも極めて不規則。	直進運動。 尾部末端の振動の大きい動きが目立つ。	尾部の振幅が小さくなり, 速度も増す。	直進運動。 尾部全体が波を打つようにリズムカルに動く。

図1 培養液内精子の運動タイプ分類

activated sperm (タイプD) の割合を求めた³⁾.

成 績

33 例の検査成績を表 1 に示した.

1. 精液分析成績と PENETRAK 値

PENETRAK 値と精子濃度, 精子運動率, 運動精子総数の間にはそれぞれ相関係数 $r=0.664, 0.610, 0.601$ で有意 ($p<0.01$) な正の相関が認められた (図 2~4).

精液分析正常例 (精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上かつ精子運動率 50% 以上) と異常例 (精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満または精子運動率 50% 未満のいずれか 1 つにあてはまる) の PENETRAK 値 (mean $\pm$ S.D.) は, それぞれ $50.9 \pm 12.6 \text{ mm}$ ($n=19$), $24.6 \pm 17.9 \text{ mm}$ ($n=14$) で両者に有意差が認められた ($p<0.001$). 精液分析成績の正常・異常と PENETRAK の良好・不良の関連をみてみると, 精液分析正常例の 95% (18/19) が PENETRAK 良好を示したが, 精液分析異常例で

表 1 33例の PENETRAK 値, 精液分析, hyperactivated sperm の割合

Case	PENETRAK 値 (mm)	精液分析成績			hyperactivated sperm の割合 (%)	
		精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子運動率 (%)	運動精子総数 ($\times 10^6$)		
1	59.0	98	79	271	62	妊孕性(+)
2	46.5	216	74	959	56	妊孕性(+)
3	45.0	112	74	83	64	妊孕性(+)
4	43.0	223	70	234	53	妊孕性(+)
5	42.5	108	76	246	49	妊孕性(+)
6	68.5	131	58	266	80	IVF-ET
7	67.0	136	46	313	50	IVF-ET
8	66.5	185	77	570	89	IVF-ET
9	61.5	130	70	273	50	IVF-ET
10	60.0	313	83	831	52	IVF-ET
11	59.0	205	63	258	54	IVF-ET
12	57.5	195	56	218	51	IVF-ET
13	54.0	202	89	539	35	IVF-ET
14	44.0	37	41	30	54	IVF-ET
15	40.5	240	66	545	48	IVF-ET
16	38.5	100	67	80	31	IVF-ET
17	34.5	76	59	90	12	IVF-ET
18	34.5	38	71	113	40	IVF-ET
19	30.0	223	32	171	34	IVF-ET
20	26.0	148	37	164	0	IVF-ET
21	14.5	29	41	24	9	IVF-ET
22	5.0	36	8	9	0	IVF-ET
23	66.5	158	56	177	43	GIFT
24	64.5	116	76	309	67	GIFT
25	51.5	120	46	331	88	GIFT
26	26.5	46	30	28	8	GIFT
27	25.0	42	52	98	11	GIFT
28	24.0	18	72	39	7	GIFT
29	19.5	3	55	7	5	GIFT
30	15.0	3	20	2	0	GIFT
31	9.0	0.6	66	1	0	GIFT
32	8.5	37	8	6	9	GIFT
33	3.5	3	37	4	0	GIFT

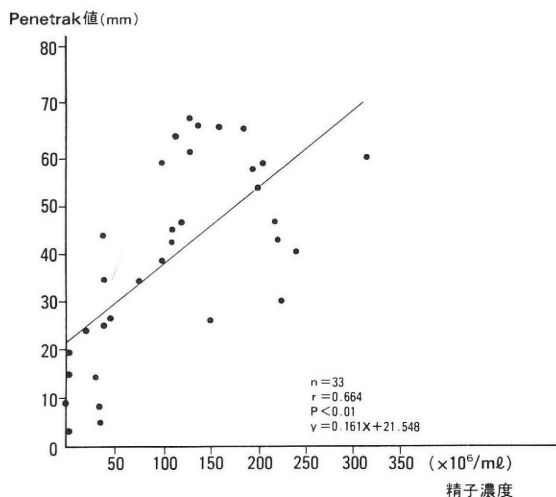


図 2 PENETRAK 値と精子濃度との相関

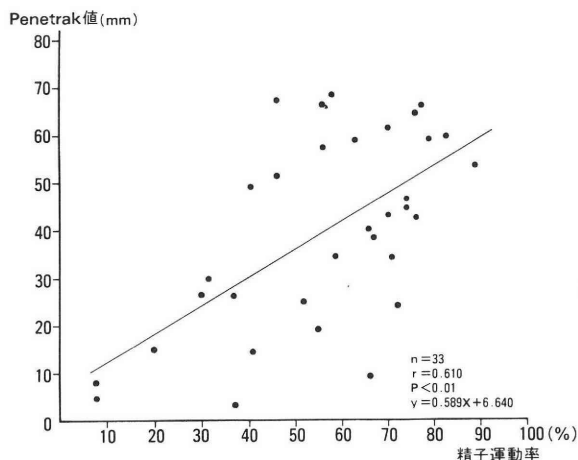


図 3 PENETRAK 値と精子運動率の相関

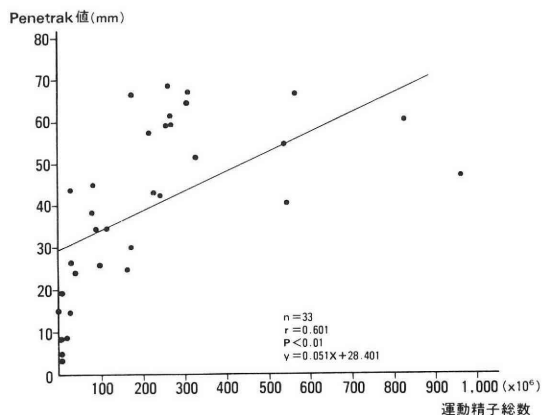


図 4 PENETRAK 値と運動精子総数との相関

の PENETRAK 不良は 71% (10/14) でしかなかった (表 2)。

2. hyperactivated sperm の割合と PENETRAK 値

培養液の中で 5 時間培養した時に認められる hyperactivated sperm の割合と PENETRAK 値の間には極めて高い有意な正の相関が認められた ($r=0.862$, $p<0.01$; 図 5)。

われわれは、精子が受精能を発揮するには培養 5 時間時の全精子に占める hyperactivated sperm の割合が 30% 以上あることが必要であると報告してある⁴⁾。そこで hyperactivated sperm 30% 以上 (良好)・未満 (不良) と PENETRAK 良・不良の関連を調べた。その結果、hyperactivation 良好群では全てが (21/21) PENETRAK 良好を示し、hyperactivation 不良群はその 92% (11/12) が PENETRAK 不良で、hyperactivation と PENETRAK の判定は殆ど一致

表 2 PENETRAK と精液分析成績

		PENETRAK	
		良好	不良
精液分析	正常	18	1
	異常	4	10

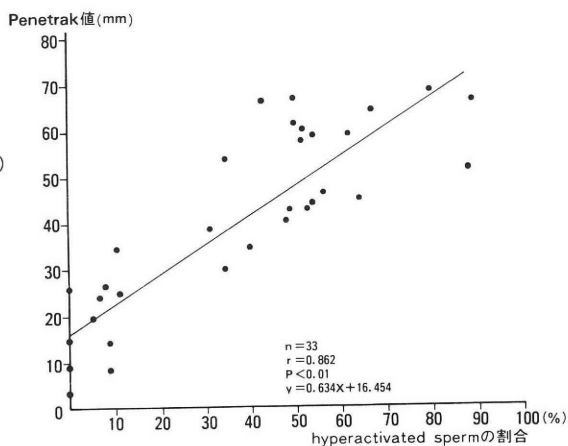


図 5 PENETRAK 値と hyperactivated sperm の割合との相関

表 3 PENETRAK と hyperactivation

		PENETRAK	
		良好	不良
hyperactivation	良好	21	0
	不良	1	11

していた(表3)。また hyperactivation 良好群・不良群の PENETRAK 値は $52.4 \pm 11.5 \text{ mm}$ (mean $\pm$ S.D.; $n=21$), $17.6 \pm 9.4 \text{ mm}$ ($n=12$) でやはり両者間に有意差が認められている。(p<0.001)。

考 察

男性不妊症の診断は、従来より主として精液分析の結果で行なわれてきた。しかし、精液量・精子濃度・精子運動率・奇形率などは必ずしも個々の精子の妊娠能力を示しているわけではなく、その検索のためには精子機能検査が必要となる。受精における精子側の条件としては「受精能獲得」「先体反応」「運動性の維持」が重要因子として挙げられ、この3条件の一つでも不足すると受精は起こらない。受精に直接関連する精子の運動としては、受精の始る前にみられる精子運動の活性化・hyperactivation が知られている⁵⁾。多くの哺乳動物精子で確認されているこの hyperactivation がヒトの精子にも存在するかどうかは不明とされていたが、われわれはその存在を明らかにし、さらに妊娠能と密接に関連することを指摘してきた⁶⁾。顕微鏡ハイスピードビデオを用いてヒト精子の動きを詳細に観察すると、その運動形態は4つのタイプに分類され、最後に現れるタイプは明らかに他と異なったパターンを呈する。すなわち非常に speedy で dynamic な動き方を示し、これはヒト精子の hyperactivation とみなし得ると考えたわけである。そしてこの hyperactivated sperm の割合が培養5時間後に30%以上あることが受精に必要なことも確認している。

精子・頸管粘液適合試験は精子の運動能および妊娠性の免疫学的要因を検索する方法である。冒頭でも述べたように、この検査法には *in vivo* での性交後検査 (post coital test, Huhner test⁷⁾) と *in vitro* での Kremer test⁸⁾, Miller-Kurzrock test⁹⁾がある。近年ウシの頸管粘液が組成、構造、結晶形成性などの点でヒトのそれと極めて類似^{10,12)}、その中におけるヒト精子の行動もよく似ていることが報告された^{10,13)}。PENETRAK test とは、発情期に30~50 ml と大量に採取されるこのウシ頸管粘液をヒト頸管粘液の代りに用い、ウシ頸管粘液へのヒト精子貫通試験を行なおうとするものである^{14,15)}。既に、Huhner test の成績とよく相関するとか、精子運動評価法として優れているとか、臨床的に精子機能検査法(妊娠性評価)になり得る^{16,18)}との報告が数多くみられ、実施手技が簡便なこともあって広く臨床応用されている。われわれも精液分析法の各パラメーターと PENETRAK 値との相関を調べてみたが、精子濃度・

精子運動率・運動精子総数との間に有意な正の相関を認めることが出来た。そしてこれらの関連性よりもさらに強い相関が、hyperactivation (hyperactivated sperm の割合) との間に得られている。

PENETRAK test はいわばウシ頸管粘液を用いて行なう Kremer test であるが、妻の頸管粘液を使用しているわけではないので夫婦間の免疫学的側面から妊娠性を検討することは不可能である。しかし、既に報告したように hyperactivated sperm の存在はこれまでのどの男性不妊検査法の成績よりも妊娠性を強く反映しており、hyperactivation と強い相関性を有するこの PENETRAK test はヒト精子の運動能ひいては受精能を screening する方法として非常に優れていると言える。PENETRAK test はテスト開始90分後、hyperactivation は5時間後とその判定時間の違いが懸念されるが、“近い将来 hyperactivation の形態をとる精子は頸管粘液中を進む速度も速い”と考えると理解し易い。

稿を終わるにあたり本研究のため PENETRAK を提供していただいたセローノ・ジャパン社に深謝致します。

文 献

- 1) Makler, A.: The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation, *Fertil. Steril.*, 33: 337, 1980
- 2) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 村木 章, 斎藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行なっている精液静置法“layering method”による静液中からの良好精子の分離, *日不妊会誌*, 28: 101, 1983
- 3) 星 和彦, 柳田 薫, 会田都美子, 佐藤 章: 培養液内におけるヒト精子運動形態の変化, *日不妊会誌*, 33: 268, 1988
- 4) 柳田 薫: ヒト精子の運動形態と受精能, *福島医学雑誌: 投稿中*
- 5) Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, edited by L. Mastroianni and J. D. Biggers, 81, Plenum, 1981
- 6) 星 和彦, 柳田 薫, 会田都美子, 吉松宣弘, 遠藤 力, 佐藤 章: 精子の受精能, *臨婦産*, 42: 881, 1988
- 7) Huhner, M.: Necrostermia and viability of spermatozoa in the cervical canal, *J. Am. Med. Associ.*, 107: 1581, 1936
- 8) Kremer, J.: A simple sperm penetration test, *Int. J. Fertil.*, 10: 209, 1965
- 9) Miller, E. G. and Kurzrock, R.: Biochemical studies of human semen. III. Factors affecting migration of sperm through the cervix, *Am. J.*

- Obstet. Gynecol., 24: 19, 1932
- 10) Alexander, N. J.: Evaluation of male in fertility with an *in vitro* cervical mucus penetration test, Fertil. Steril., 36: 201, 1981
 - 11) Meyer, F. A.: Comparison of structural glycoproteins from mucus of different sources, Biochem. Biophys. Acta., 493: 272, 1977
 - 12) Lee, W. I., Verdygo, P., Blandau, R. J. and Gaddum-Rosse, P.: Molecular arrangement of cervical mucus: a reevaluation based on laser lightscattering spectroscopy, Gynecol. Invest., 8: 254, 1977
 - 13) Moghissi, K. S., Segal, S., Meinhold, D. and Agronow, S. J.: *In vitro* sperm cervical mucus penetration: Studies in human and bovine cervical mucus penetration: Studies in human and bovine cervical mucus, Fertil. Steril., 37: 823, 1982
 - 14) 中島敬和, 水沼英樹, 宇津木利雄, 伊吹令人, 五十嵐正雄: ウシ頸管粘液 (Penetrak) を用いたヒト精子機能の評価, 日不妊会誌, 34: 126, 1989
 - 15) 宮崎豊彦, 田辺清男, 名取道也, 青木 類, 遠藤勝英, 小林俊文, 飯塚理八: ウシ頸管粘液を用いたヒト精子の運動性評価, 日不妊会誌, 32: 630, 1987
 - 16) 猪熊健一郎, 須野成夫, 松田孝之, 長谷川昭子, 香山浩二, 磯島晋三: 乏精子症患者精子の精子機能に関する検討——ヒト・ウシ頸管粘液内通過能ならびに透明帯除去ハムスター卵による受精能について——, 日不妊会誌, 34: 134, 1989
 - 17) 伊藤直樹, 立木 仁, 南部明民, 三熊直人, 高木良雄, 梅原次男, 丸田 浩, 熊本悦明: 男子不妊症に於ける PENETRAK の検討, 日不妊会誌, 34: 159, 1989
 - 18) 矢野 哲, 水野正彦: 精子機能検査としての Penetrak test, 産婦治療, 58: 445, 1989

The relationship between human sperm motility and PENETRAK test

Susumu Tsukikawa, Kazuhiko Hoshi,
Kaoru Yanagida, Chikara Endo
and Akira Sato

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College,
Fukushima 960-12, Japan

A new *in vitro* cervical mucus penetration test, PENETRAK, which measures forward migration of sperm into capillary tube filled with bovine cervical mucus, was applied to 33 cases. Relationships between PENETRAK and routine semen analysis and hyperactivation were studied, and the following results were obtained.

(1) Sperm migration (PENETRAK value) showed significant correlation with each parameter of routine semen analysis such as sperm concentration ($r=0.664$, $p<0.01$), sperm motility ($r=0.610$, $p<0.01$) and total number of motile sperm ($r=0.601$, $p<0.01$). The mean sperm migration value of group with good semen analysis (sperm concentration $>20 \times 10^6/\text{ml}$ and sperm motility $>50\%$) was $50.9 \pm 12.6\text{mm}$ (mean $\pm$ S.D., $n=19$), while that of those with poor semen analysis was $24.6 \pm 17.9\text{mm}$ ($n=14$) respectively.

(2) The correlation between PENETRAK value and hyperactivated sperm rate was significantly higher ($r=0.862$, $p<0.01$) as compared with that between PENETRAK and parameters of routine semen analysis. When the semen samples indicated 30% hyperactivated sperm rate or over 5 hours after incubation were evaluated good hyperactivation and those indicated less than 30% were poor hyperactivation, the mean PENETRAK value of good hyperactivation group was $52.4 \pm 11.5\text{mm}$ ($n=21$), while that of poor group was $17.6 \pm 9.4\text{mm}$ ($n=12$) respectively.

Since hyperactivation is confirmed to reflect the fertilizing ability of human spermatozoa strongly, this study suggests that PENETRAK is reliable to assess the sperm function.

(受付: 1989年5月29日)

排卵障害例に対する温経湯の投与による 内分泌変動について —ゴナドトロピンの律動性分泌を含めて—

Endocrinologic Studies of Unkei-to (TJ-106) in Anovulatory Women —With an Effect on Pulsatile Secretion of Gonadotropins—

大阪医科大学産科婦人科学教室

後山 尚久 坪倉 省吾 井本 広済
Takahisa USHIROYAMA Shogo TSUBOKURA Hirosumi IMOTO
山下 英俊 岡崎 審 杉本 修
Hidetoshi YAMASHITA Tadashi OKAZAKI Osamu SUGIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Medical College, Osaka 569, Japan
(Director: Prof. O. Sugimoto)

卵巣機能不全症に対し、最近温経湯の効果が注目されている。今回、排卵障害例への温経湯投与による hormone 値の経日的変動および gonadotropin の律動性分泌を検討した。

第1度無月経4例、第2度無月経5例に対し、温経湯7.5 g/日を10週間投与し、血中 FSH, LH, estradiol 値の変動をみた。第1度無月経例では血中 FSH, LH, estradiol 値は投与によりやや増加した。第2度無月経例では投与により血中 LH 値は変動はなかったが血中 FSH 値は4週で3.6倍 ($P < 0.01$)、8週で3.1倍 ($P < 0.05$)と有意に増加した。血中 estradiol 値は投与4週で1.4倍 ($P < 0.05$)と有意に増加した。また温経湯投与により、FSH の基礎値の上昇および LH の律動性分泌の出現と頻度の増加が、とくに第2度無月経例において著明に認められた。温経湯による排卵率は22.2% (2/9)であった。これらより、温経湯は排卵障害例でゴナドトロピンの律動性分泌を改善する作用をもつことが明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 80–85, 1990)

緒 言

不妊症や更年期障害に対する漢方薬の効果はよく知られている。なかでも当帰芍薬散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸はよく用いられるが最近では、排卵障害に対する温経湯の効果が注目されている。西洋薬に比べ漢方薬の薬理作用はいまだ未知の部分が多いが、温経湯は月経不順、月経痛などに効果があり、性機能賦活作用があるともいわれている¹⁾。三宅ら²⁾は、

間脳下垂体還流実験で、温経湯が LH の放出を増加させることを認めている。一方、Taketani ら³⁾はラットの下垂体培養細胞系での実験で、温経湯が LH および FSH の産生、放出を増加させ、プロラクチンの分泌を抑制させることを報告している。臨床的な検討としては、視床下部性の排卵障害のうち、clomiphene 無効例に対し、温経湯を併用したところほぼ45%に排卵誘発効果がみられたことを吉本らが報告している⁴⁾。

本研究では排卵障害例に対する温経湯の効果およびその作用機序を検討する目的で、温経湯投与による経日的なホルモン値の変動とゴナドトロピンの律動性分泌パターンを検討した。

対象および方法

対象は、大阪医科大学産婦人科内分泌外来を訪れた排卵障害患者のうち、第1度無月経4例（平均年齢 23.2 ± 1.8 歳）、第2度無月経5例（平均年齢 22.4 ± 3.5 歳）である。これらの症例には高プロラクチン血症や体重減少を伴った症例は含まれていない。これらに消退出血の7日目からツムラ温経湯（7.5 g/日）を10週間投与した。なお、本研究における症例

選択では、“証”は考慮に入れなかった。上記症例に対しホルモン測定のため、薬剤投与前、原則として治療中2週間ごとに採血した。また消退出血の2～6日目、投与終了時に15分間隔で3時間にわたり採血した。血中LHおよびFSHは第一ラジオアイソトープ社製の固相化IRMA (immunoradiometric assay) 法によるキット (SPAC-S) にて測定した。Estradiol (E_2) は Sorin Biomedica 社製 (仏) のキットにて二抗体法による radioimmunoassay で測定した。各ホルモンの pulse は前値から平均 $X \pm X$ intraassay C. V. 以上急峻に上昇した場合に pulse ありと定義した。各種ホルモン値は、Student t-test により検定を行った。

結 果

1. 排卵障害例に対する温経湯投与中の血中ホルモン値の症例別の推移 (Fig. 1)

温経湯投与期間中の血中LH、FSHおよびestradiol値の経日的推移を各症例につき検討した。

血中LH値は第1度無月経においては1例で投与2週で2.6倍 (7.8mIU/ml から 20.4mIU/ml) に上昇したが、その他の例では変化はみられなかった。第2度無月経では1例を除き、投与2～4週で徐々に上昇した。

血中FSH値は第1度無月経例においては2例で、それぞれ投与2週および4週に増加したが、その後投与前値まで下降した。その他の2例は、投与6～8週にやや上昇した。これに対し、第2度無月経例では投与2週目で全例が増加し、その後はほぼ同じレベルを維持した。

血中estradiol値は第1度無月経例は一定の傾向を示さなかった。投与3週目で血中estradiol値151pg/mlを示した例は、排卵の2～3日後に採血したと思われた。第2度無月経例は投与前は全例、血中estradiol値が25pg/ml以下であったが、投与2週目より徐々に増加し、投与8週以後では全例が25pg/ml以上の値を示した。温経湯投与前22.9pg/mlの血中estradiol値を示した例は投与6週目に59.0pg/mlの値を示し、7週目に排卵した。

2. 排卵障害例に対する温経湯投与によるホルモン値の経日的変化 (Fig. 2)

温経湯投与前、投与4週目、投与8週目の血中LH、FSHおよびestradiol値の平均値を比較した。第1度無月経例では、投与4週目より血中FSH、LH値は増加したが、症例によるバラツキが大きく、有意差はなかった。血中estradiol値も投与によりやや増

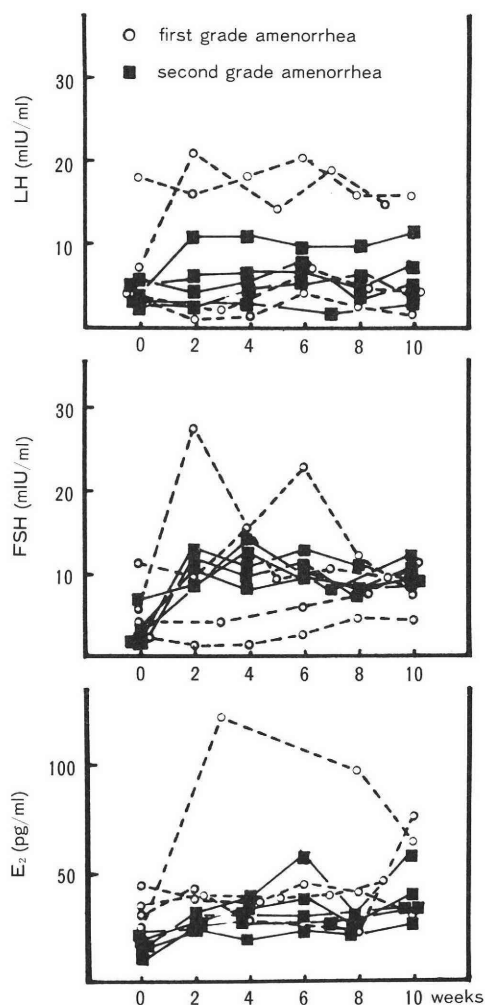


Fig. 1 Plasma LH, FSH and estradiol levels in anovulatory patients during the treatment with Unkei-to

加したが、有意差はなかった。第2度無月経例では、温経湯投与により血中 LH 値は、やや上昇したが有意差はなかった、血中 FSH 値は投与前 $3.0 \pm 2.8 \text{ mIU/ml}$ /

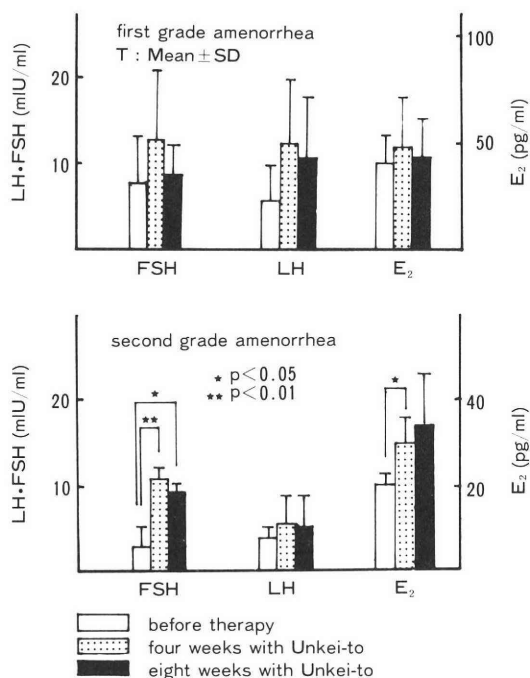


Fig. 2 Plasma LH, FSH and estradiol levels in anovulatory patients treated with Unkei-to

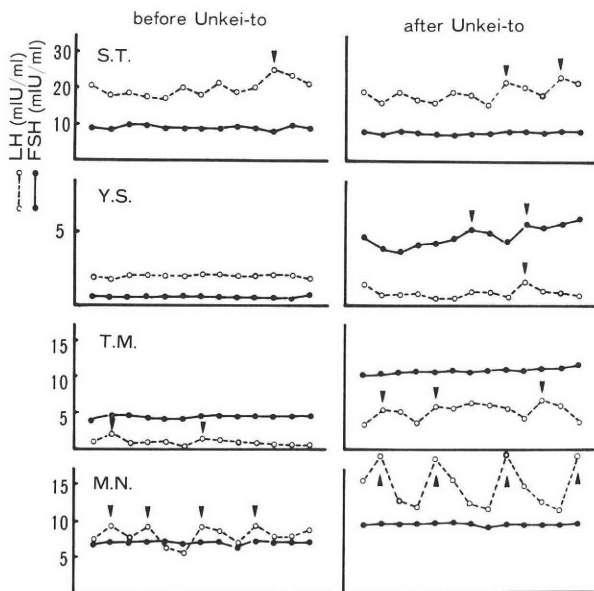


Fig. 3 Pulsatile patterns of LH and FSH secretion of first grade amenorrhea before and after treatment with Unkei-to

ml, 投与4週目で $10.8 \pm 1.3 \text{ mIU/ml}$ ($P < 0.01$), 8週目で $9.2 \pm 1.1 \text{ mIU/ml}$ ($P < 0.05$) で有意に増加した。また血中 estradiol 値は投与前値が $20.5 \pm 0.79 \text{ pg/ml}$, 投与4週目が $29.3 \pm 5.47 \text{ pg/ml}$ で有意に ($P < 0.05$) 増加した。投与8週目は $34.0 \pm 12.7 \text{ pg/ml}$ とさらに増加したが、統計的な有意差はなかった。

3. 温経湯投与による排卵障害例のゴナドトロピン律動性分泌の変化

9例の排卵障害例に対し温経湯投与前および10週間の投与後にゴナドトロピンの律動性分泌のパターンを比較した。第1度無月経例 (Fig. 3) では、温経湯投与前は4例中3例に1~4回/3hのLHの律動性分泌が認められた。FSHの律動性分泌は認められなかった。投与後LHの律動性分泌において、4例中2例に基礎値の上昇 (T. M.: 1.1 mIU/ml から 3.7 mIU/ml , M. N.: 6.5 mIU/ml から 11.6 mIU/ml) があり、2例に頻度の増加 (1回/3h) があった。投与前に律動性分泌があった3例のうち、2例は振幅の増加 (T. M.: 0.69 mIU/ml から 2.5 mIU/ml , M. N.: 2.15 mIU/ml から 6.38 mIU/ml) を示した。FSHの基礎値は投与前は 0.32 mIU/ml ~ 8.5 mIU/ml と症例によりさまざまであった。投与後これら4例のうち、3例 (75%) に基礎値の上昇を認めた。また1例に律動性分泌の出現を認めた。

第2度無月経例 (Fig. 4) ではLH, FSHの基礎値は温経湯投与前では全例 5 mIU/ml 以下であった。また5例中、1例 (I. O.) に1回/3hの頻度でLHの律動性分泌を、1例 (M. Y.) に1回/3hの頻度でFSHの律動性分泌を認めた。温経湯投与後FSHの基礎値は全例 (100%) で 5 mIU/ml 以上に増加 (投与前値の平均8.9倍) し、律動性分泌のみられなかった4例中2例 (50%) に1回/3hの頻度で律動性分泌が出現した。投与前FSHの律動性分泌のみられた例 (M. Y.) では、投与後基礎値が増加したが振幅は変化しなかった。

LHの律動性分泌の基礎値は温経湯投与により5例中1例のみ増加した。しかし、投与前に律動性分泌をみとめなかった4例すべて (100%) に1~2回/3hの頻度で律動性分泌の出現を認めた。温経湯投与前に律動性分泌のみられた例 (I. O.) ではその基礎値はやや低下したが、頻度は増加 (1回から2回/3h) した。

4. 温経湯投与による治療成績

本剤の投与により、第1度無月経では4例中1例 (25%) が排卵し、排卵をみなかった3例中2例には血中 estradiol 値の増加が認められた。すべてのホルモン値に変動が認められなかったのは1例のみであ

った。Fig. 5は21歳の第1度無月経例(T.M.)であり、温経湯投与前はFSHの律動性分泌はなく、LHは2回/3hの律動性分泌を認めた。血中estradiol値は温経湯投与により増加し、投与後約3週間で排卵を起した。また温経湯投与により、FSHの基礎値は2.7倍(4.2mIU/mlから11.4mIU/ml)に、LHの基礎値は3.4倍(1.1mIU/mlから3.7mIU/ml)に上昇した。律動性分泌は3回/3hの頻度に、振幅も3.6倍(0.69mIU/mlから2.5mIU/ml)に増加した。本例はその後も順調な排卵が持続した。

第2度無月経例では5例全例(100%)にestradiolの分泌を認め、1例(20%)に排卵、2例(40%)に無排卵性の出血を認めた。Fig. 6は26歳の第2度無月経例(A.H.)で温経湯投与前はLH、FSHともに全く律動性分泌を認めなかった。投与後2週間で血中estradiol値が25pg/ml以上となりその後徐々に増加した。約4週間で無排卵性の出血が来し7週目に排卵した。消退出血後FSHの基礎値は投与前の12.3倍(0.47mIU/mlから5.8mIU/ml)に上昇した。LHの基礎値は投与により変化しなかったが、律動性分泌の出現(1回/3h)を認めた。

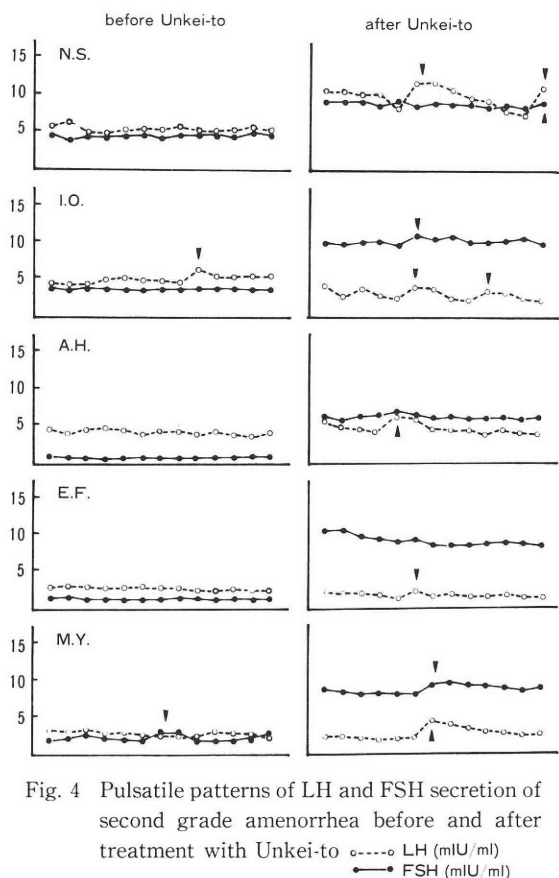


Fig. 4 Pulsatile patterns of LH and FSH secretion of second grade amenorrhea before and after treatment with Unkei-to ○-○-○ LH (mIU/ml) ●-●-● FSH (mIU/ml)

考 察

温経湯は産婦人科領域では、稀発月経、頻発月経、無月経、月経困難症などに広く用いられる漢方薬である。生薬として、麦門冬、半夏、当帰、甘草など12種類が混合されている。これらは君薬、臣薬、佐

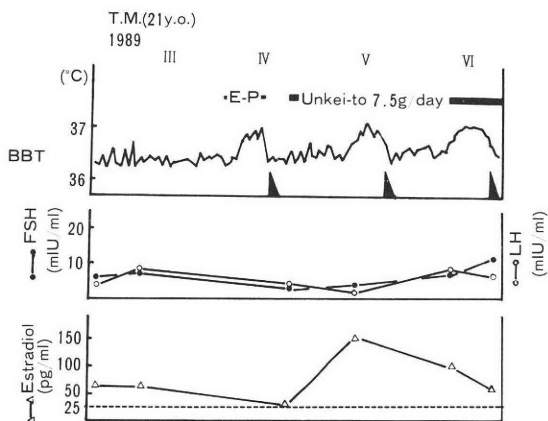


Fig. 5 A case of first grade amenorrhea ovulated by the treatment with Unkei-to

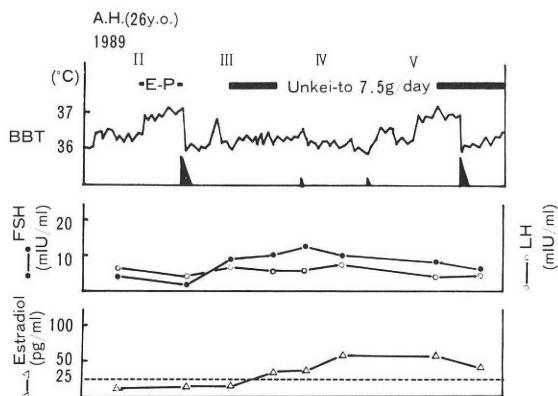


Fig. 6 A case of second grade amenorrhea ovulated by the treatment with Unkei-to

薬、使薬の4つに構成され、そのなかで君薬としての桂皮、呉茱萸が主薬であり、循環促進作用を持つとされている。しかし本剤の間脳・下垂体・卵巣系に対する作用機序に関してはいまだ明快な説明がなされていない。

三宅ら²⁾は、*in vitro*でラットの脳・下垂体連続還流での結果、温経湯投与は間脳・下垂体を連続で還流するとLH分泌を増加させたが、下垂体のみの還流ではLH分泌を認めなかったことを報告している。一方、Takataniら³⁾はラットの下垂体細胞培養系で温経湯は下垂体前葉細胞に直接作用し、LHおよび

FSHの産生と放出を共に刺激することを示した、とくに下垂体細胞内のFSH濃度の上昇は著しく、またFSH放出効果に関しても50 μ g/mlのmedium中濃度での温経湯の投与でその分泌量は3.1倍に増加したとしている。今回の排卵障害例での検討では、血中LH値は第1度無月経、第2度無月経共に温経湯投与により経目的にやや増加したが有意ではなかった。これに対し血中FSHは第1度無月経例では有意に増加はしなかったが、第2度無月経例では全例(100%)に増加を認め、投与4週で3.6倍($P < 0.01$)になった。血中estradiol値は第1度無月経例では4例中1例は投与3週で著明に増加したが、その他の例ではあまり増加はみられなかった。第2度無月経例では全例に増加がみられ、投与4週でその値は1.4倍($P < 0.05$)に増加した。

最近、ゴナドトロピンの律動性分泌が排卵に大きく関わる事が報告されるようになった⁵⁾。著者らは排卵障害例に対するメサルモン[®]—Fの投与により、LHの基礎値の上昇と律動性分泌の改善およびFSHの基礎値の上昇がみられることを観察した⁶⁾。今回も同様に第1度無月経4例においてFSHの基礎値の上昇が3例(75%)、律動性分泌の出現が1例にみられた。またLHの基礎値の上昇が2例、律動性分泌の頻度の増加が2例、振幅の増加が2例にみられ、何らかの形で全例に律動性分泌の改善を確認できた。一方、第2度無月経5例においては温経湯投与によりFSHの基礎値の増加が全例に認められ、律動性分泌の出現も2例にみられた。また、LHの基礎値の増加が1例、律動性分泌の出現が4例、および頻度の増加を1例に認め、全例に律動性分泌の改善を認めた。このようにゴナドトロピンの律動性分泌は、ほぼ全例に改善され、とくに第2度無月経例では温経湯投与2週間で血中FSH値が著明に増加し、その値を維持し、estradiol値が徐々に増加した。このことから、温経湯は間脳からのLH-RHの分泌あるいは下垂体のLH-RHに対する反応性を生理的状态に移行させる可能性があると考えられた。楠原ら¹⁾も排卵障害例においてLHが低値のものでは増加させ、高値のものでは低下させる作用を温経湯が有することを報告している。

一方、温経湯による排卵障害例の治療成績に関しては楠原ら¹⁾が温経湯単独投与で第1度無月経で31.5%、無排卵周期症で60%の排卵率を得ている。また吉本ら⁴⁾は、間脳不全による無排卵周期症および第1度無月経でclomiphene 150 mg/dayの投与で2周期以上排卵しない例に温経湯を併用した場合、43.8%の排卵率が得られたと報告している。われわれは

今回、10週間の温経湯単独投与で22%(2/9)の排卵率を得たが、第2度無月経例で全例に血中estradiol値の増加をみたのは特筆に値すると思われる。

以上、排卵障害例に対する温経湯の作用機序としてゴナドトロピンの律動性分泌パターンを改善し、間脳・下垂体・卵巣系を正常化する可能性が考えられた。今後卵巣に対する直接作用についても、さらに検討していく必要があると考える。

本研究において御協力いただいた岸田恵子嬢ならびに内田美香嬢に心より感謝いたします。

文 献

- 1) 楠原浩二, 松本和紀, 横山 敬, 小田原靖, 村江正始, 本村英三, 篠塚正一, 蜂屋祥一: 未婚の排卵障害婦人に対する温経湯の効果, 産婦人科漢方研究のあゆみ, 1:17, 1984
- 2) 三宅 侃, 田坂慶一, 大塚志郎, 吉本泰弘, 青野敏博, 谷澤 修: 間脳—下垂体連続還流システムによる温経湯のLH分泌機構の検討, 産婦人科漢方研究のあゆみ, 2:105, 1985
- 3) Taketani, Y., Kugu, K., Hayashi, N. and Mizuno, M.: Action of Unkei-to (TJ-106) on cultured rat pituitary cells, in Recent advances in the pharmacology of Kampo (Japanese herbal) Medicines: p184, Excerpta Medica, 1988
- 4) 吉本泰弘, 三宅 侃, 田坂慶一, 谷澤 修, 青野敏博: Clomiphene 無効の無排卵症に対する温経湯—Clomiphene 併用効果, 産婦人科漢方研究のあゆみ, 5:40, 1988
- 5) Bohnet, H. G., Dahlen, H. G., Wuttke, W. and Schneider, H. P. G.: Hyperprolactinemic anovulatory syndrome, J. Clin. Endocrinol. Metab., 42: 132, 1976
- 6) 後山尚久, 佐伯理男, 好川元庸, 奥田喜代司, 杉本 修: 排卵障害例に対するMetharmon[®]-F投与による血中ホルモン値の変動—ゴナドトロピンの律動性分泌の検討を含めて—, ホと臨床, 36: 1315, 1988

Endocrinologic studies of Unkei-to (TJ-106) in anovulatory women —With an effect on pulsatile secretion of gonadotropins—

Takahisa Ushiroyama, Shogo Tsukubura,
Hirosumi Imoto, Hidetoshi Yamashita,
Tadashi Okazaki and Osamu Sugimoto

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka Medical College,
Osaka 569, Japan
(Director: Prof. O. Sugimoto)

Kampo medicines have been reported to be effective in the treatment of menstrual disorders. Unkei-to (TJ-106) is well known to be effective in various menstrual disorders of abnormal uterine bleeding. The mechanisms of action involved, however, are yet unknown. This study examined the effect of Unkei-to on pulsatile secretion of gonadotropins in the treatment of nine anovulatory patients.

Unkei-to was effective in increasing the FSH level 3.6 times ($p < 0.01$) and estradiol level 1.4 times ($p < 0.05$) in four weeks treatment of second grade amenorrhea. Plasma estradiol level, especially, increased in 3 of 4 patients of first grade amenorrhea

and all patients of second grade amenorrhea. In 8 of 9 anovulatory patients (88.9%) Unkei-to was effective in increasing the basal level of FSH secretion after ten weeks treatment. Moreover, the pattern of pulsatile FSH and LH secretion remarkably changed. FSH and LH pulses appeared in 3 of 8 and 4 of 4 patients, respectively, who had no pulses before the treatment with Unkei-to. The ovulatory rate of Unkei-to in the treatment of anovulatory patients was 22% (1 of 4: first grade amenorrhea, 1 of 5: second grade amenorrhea). Two of four patients of second grade amenorrhea had vaginal bleeding without ovulation after the treatment.

These results indicate that Unkei-to is effective on improvement of gonadotropin pulsatile secretion. This suggests that Unkei-to may enhance the pituitary response to LHRH in anovulatory patients.

(受付: 1989年8月15日特掲)

クロミフェン無効の正プロラクチン血性排卵障害症例に対する クロミフェン—温経湯併用療法の検討

Studies on the Combination Treatment with Unkei-to and Clomiphene Citrate

徳島大学医学部産科婦人科学教室

安井 敏之 青野 敏博 苛原 稔
Toshiyuki YASUI Toshihiro AONO Minoru IRAHARA

Department of Obstetrics and Gynecology,
The University of Tokushima, School of Medicine, Tokushima 770, Japan

麻植協同病院産婦人科

高橋 久寿
Hisatoshi TAKAHASHI

Oe Kyodo Hospital

小松島赤十字病院産婦人科

吉田 順一 猪野 博保 坂本 康紀
Junichi YOSHIDA Hiroyasu INO Yasuki SAKAMOTO

Komatsujima Red Cross Hospital

徳島県立中央病院産婦人科

井川 昭 高橋 弘子 奈賀 脩
Akira IKAWA Hiroko TAKAHASHI Osamu NAKA

徳島県立三好病院産婦人科

Tokushima Prefectural Central Hospital Tokushima Prefectural Miyoshi Hospital

徳島市民病院産婦人科

阪口 彰 吉本 忠弘
Akira SAKAGUCHI Tadahiro YOSHIMOTO

Tokushima Municipal Hospital

徳島通信病院産婦人科

岸 恭也 山下 明美 河野 美香
Yasuya KISHI Akemi YAMASHITA Mika KAWANO

Tokushima Teishin Hospital

香川県立津田病院産婦人科

高柳 真 鎌田 正晴 前川 正彦
Makoto TAKAYANAGI Masaharu KAMADA Masahiko MAEGAWA

Kagawa Prefectural Tsuda Hospital

大樹会総合病院回生病院産婦人科 国立善通寺病院産婦人科

鎌田 敏雄 長町 典夫

Toshio KAMADA Norio NAGAMACHI

Kaisei General Hospital Zentuzi National Hospital

愛媛県立今治病院産婦人科

高知県農協総合病院産婦人科

中郷 吉二郎 井原 正之 黒岩 俊一郎

Kichijiro NAKAGO Masayuki IHARA Shunichiro KUROIWA

Ehime Prefectural Imabari Hospital

Kochi Nokyo General Hospital

高知市立市民病院産婦人科

国立高知病院産婦人科

岡山 哲也 竹内 悟 三木 鈴

Tetsuya OKAYAMA Satoru TAKEUCHI Suzu MIKI

Kochi Municipal Hospital

Kochi National Hospital

佐川町立高北国民健康保険病院産婦人科

藤島 一典

Kazunori FUJISHIMA

Kohoku National Health Insurance Hospital

クロミフェン無効の正プロラクチン血性排卵障害患者に対して、クロミフェン・温経湯併用療法を行い、その有効性を検討するとともに、温経湯の作用機序についても検討を試みた。その結果、24例中13例(54.2%)、72周期中31周期(43.1%)に排卵が認められ、3例(12.5%)に妊娠が認められた。一方、内分泌学的検査では、排卵前期のエストラジオール値ならびに黄体期中期のプロゲステロン値は、排卵が認められた群において温経湯投与により有意に増加していた。さらに月経周期の12日目にLHの律動性分泌について検討を行った結果、温経湯投与により排卵の有無にかかわらず、LHの律動性分泌は回復していた。以上の結果より、クロミフェン・温経湯併用療法はクロミフェン無効の正プロラクチン血性排卵障害の治療に有効であること、さらに温経湯は視床下部・下垂体系に作用しゴナドトロピンの分泌を促進する役割を果たしていることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 86-93, 1990)

緒 言

現在、無排卵周期症や第1度無月経による不妊症に対してクロミフェンが第一選択として使用されており、70~80%の高い排卵率を得ている。しかしながら、残り20~30%はクロミフェン治療が無効であり、このような症例に対する有用な排卵誘発法の確立が望まれている。一方、最近漢方薬に対する関心が高まってきており、排卵障害の治療においても当帰芍薬散を始めとして、桂枝茯苓丸、温経湯、芍薬甘草湯、八味地黄丸などが使用されており、さらに、その作用機序についての内分泌学的検討も試みられ

ている。今回、我々はこれら排卵障害の治療に用いられている漢方薬の中から *in vitro* の実験系によってLH-RH分泌促進作用の認められている^{1,2)}温経湯を、クロミフェン単独治療に抵抗を示す無排卵周期症や第1度無月経患者に併用し、その有効性を検討するとともに、内分泌学的検査から温経湯の作用機序についても検討を加えたので報告する。

対象および方法

1) 対象

本研究は1988年1月から12月までにおいて徳島大学医学部産科婦人科学教室を中心に関連病院の共

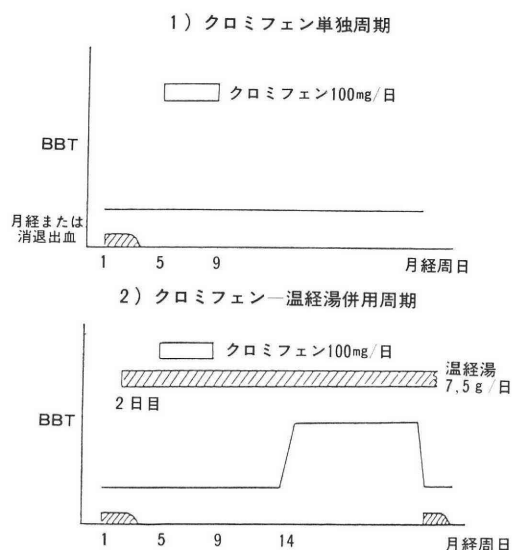


図1 投与スケジュール

表2 クロミフェン-温経湯併用療法の排卵誘発成績

症例別 排卵率	周期別 排卵率	症例別 妊娠率
54.2% (13/24)	43.1% (31/72)	12.5% (3/24)

同研究として行った。対象は、クロミフェン1日100mgを5日間2周期以上投与しても排卵の認められない無排卵周期症または第1度無月経患者で、かつ血清中プロラクチン値が30ng/ml以下で乳汁漏出の認められない24例とした。対象患者の年齢分布は23歳から35歳(平均28.3歳)であり、排卵障害の内訳は無排卵周期症患者が14例、第1度無月経患者が10例であった。

2) 薬剤投与スケジュール

今回の検査における薬剤の投与スケジュールを図1に示した。クロミフェン単独の周期ではクロミフェン100mg/日を月経または消退出血の5日目より5日間投与し、またクロミフェン・温経湯併用周期においては月経または消退出血の2日目より温経湯を1日7.5g連日投与するとともに、周期5日目よりクロミフェン100mg/日を5日間投与した。

3) 内分泌学的検討

排卵の確認については、基礎体温の高温相が10日間以上続いたか妊娠に至ったもの、あるいは黄体期中期のプロゲステロン値が5 ng/ml以上のものとした。さらに、投与期間中、卵胞期(月経周期7~8日目)に血中LH、FSH、プロラクチン(PRL)値を、排卵前期(月経周期14~15日目)に血中エストラジ

表1 投与対象患者の臨床内分泌学的所見

症 例	年齢 (歳)	排卵障害	基 礎 値			クロミフェン 温経湯 併用療法に よる排卵
			LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	PRL (ng/ml)	
1.	28	第1度無月経	32.1	10.6	11.8	+
2.	23	無排卵周期症	12.7	7.7	28.0	+
3.	29	無排卵周期症	11.4	10.2	16.5	+
4.	31	第1度無月経	18.4	7.6	12.1	+
5.	28	無排卵周期症	6.8	8.6	22.9	+
6.	29	無排卵周期症	10.2	8.0	20.3	+
7.	25	第1度無月経	26.2	9.2	26.1	+
8.	35	無排卵周期症	20.0	13.8	15.5	+
9.	32	無排卵周期症	26.4	14.3	13.7	+
10.	24	第1度無月経	17.5	14.0	20.3	+
11.	29	無排卵周期症	11.6	16.1	23.6	+
12.	25	無排卵周期症	6.1	5.9	7.4	-
13.	27	第1度無月経	36.0	10.0	14.0	-
14.	28	無排卵周期症	11.8	7.5	24.6	-
15.	25	第1度無月経	22.2	11.0	15.0	-
16.	28	無排卵周期症	11.9	10.5	9.0	-
17.	30	第1度無月経	10.4	15.8	17.0	-
18.	29	第1度無月経	12.2	9.3	11.3	-

オール (E_2) 値を、黄体期中期 (月経周期 22~23 日目) に血中プロゲステロン値の測定を行った。一部の症例については月経周期の 12 日目に、4 時間にわたって 15 分毎に採血を行い、LH の律動性分泌について検査を行った。この LH の律動性分泌の検討に関しては LH の立上がりから頂値までの差が、観察時間内の平均測定値に LH の測定内変動係数を乗じた数値の 2 倍を越える場合をパルスありと認めた。なお、血中 LH, FSH, PRL 値の測定はそれぞれ LH キット「第一」、FSH キット「第一」、プロラクチンキット「第一」I I (第一ラジオアイソトープ研究所) を、エストラジオール、プロゲステロンについてはそれぞれ E_2 キット「第一」(第一ラジオアイソトープ研究所)、プロゲステロン・I-125 キット (ミドリ十字株式会社) を用いた。投与対象患者 24 例のうち、これらの内分泌学的検査を行えた 18 例について表 1 に LH, FSH, PRL 値の基礎分泌値を示した。LH 値が 30mIU/ml 以上と比較的高値を示したものが 2 例あったが、FSH 値および PRL 値は全例正常範囲内であった。

結 果

1. 排卵誘発成績

24 例 72 周期に本療法を行い、その結果を表 2 にまとめた。24 例中 13 例、54.2% に排卵が認められ、周期別では 72 周期中 31 周期、43.1% に排卵が認められた。さらに、24 例中 3 例、12.5% に妊娠が認められた。図 2 に遅延排卵であったが妊娠に至った 1 例の基礎体温表を示した。

2. 温経湯投与前後での各種ホルモンの比較

卵胞期における血中 LH, FSH, PRL 値を温経湯投与前後で比較した (図 3)。内分泌学的検査を行えた 18 例のうち、温経湯投与により排卵の認められたのは 11 例、排卵の認められなかったのは 7 例であった。排卵が認められた群においては、温経湯投与により LH, FSH, PRL 値はそれぞれ平均値で 22.6mIU/ml から 25.1mIU/ml へ、15.3mIU/ml から 15.3mIU/ml へ、18.9ng/ml から 15.3ng/ml へと変動したが、いずれも統計的に有意差は認められなかった。また、排卵が認められなかった群では、温経湯投与により LH, FSH, PRL 値はそれぞれ平均値で 20.2mIU/ml から 20.3mIU/ml へ、11.6mIU/ml から 13.1mIU/ml へ、12.7ng/ml から 14.1ng/ml へと変動したが、いずれも有意差はみられなかった。

次に、排卵の認められた群において、温経湯投与前後での卵胞期 LH, FSH, PRL 値の個々の変動を示した (図 4)。それによると、LH 値については、投与前 30mIU/ml をこえる高めの値を示していた症例は下降傾向に、逆に投与前 10mIU/ml 近くの低めの値を示していた症例は上昇傾向を示し、結果として投与後 20mIU/ml から 30mIU/ml の間に集中する傾向がみられた。しかし、FSH については LH にみられたような一定の傾向は認められなかった。また PRL 値については、1 例を除き全体的に下降する傾向が

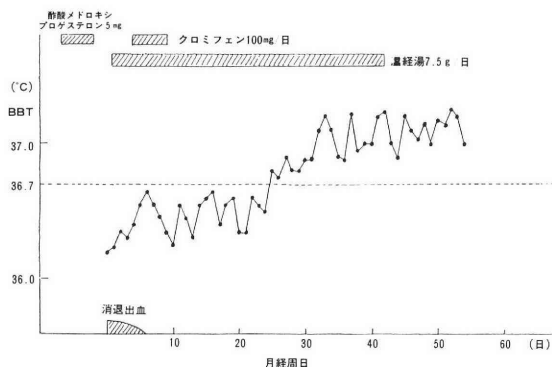


図2 クロミフェン-温経湯併用療法により妊娠に至った症例の基礎体温曲線

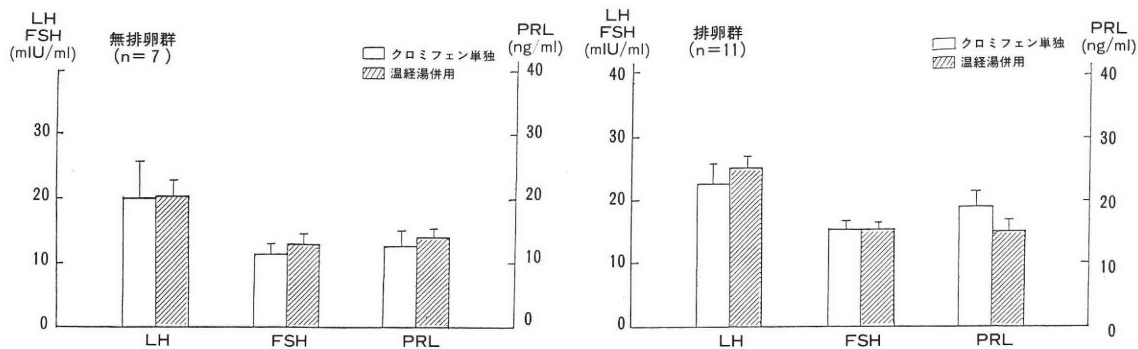


図3 温経湯投与前後における卵胞期の LH, FSH, PRL 値の比較

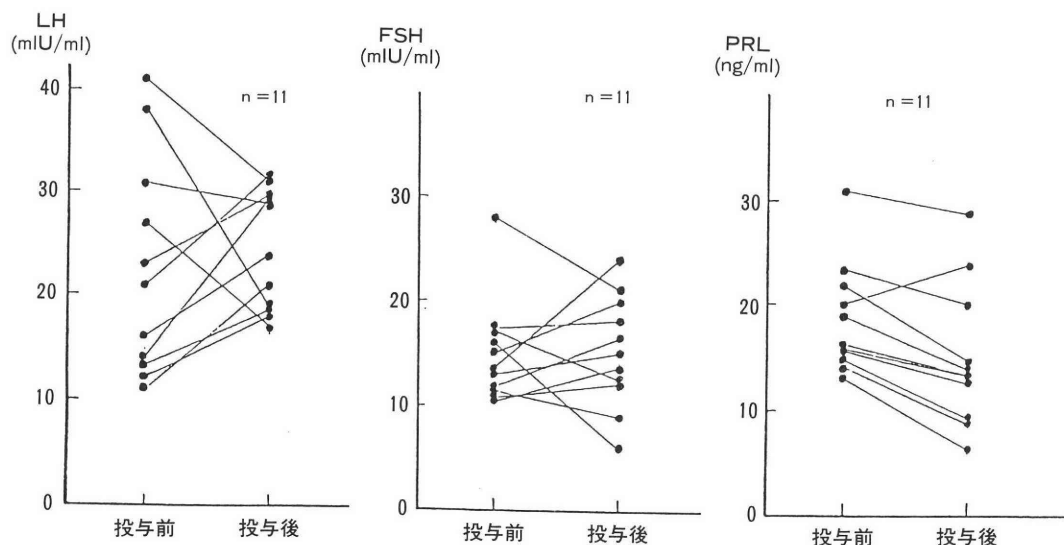
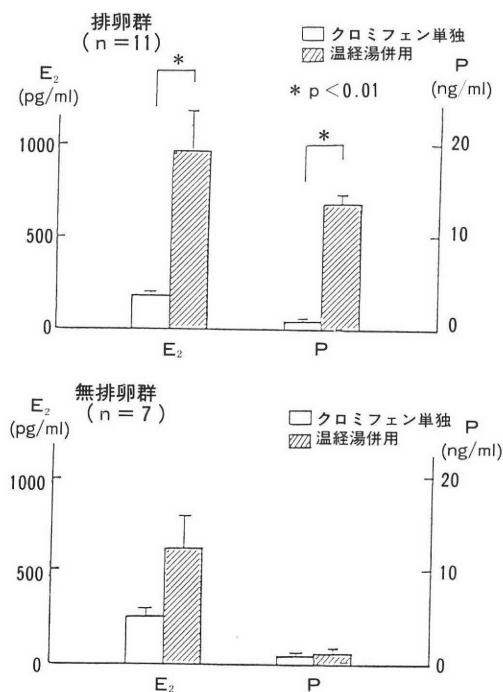


図4 温経湯投与前後における卵胞期の LH, FSH, PRL 値の変動

図5 温経湯投与前後の排卵前期のエストラジオール値 (E₂) と黄体期中期のプロゲステロン値 (P) の比較

認められた。

さらに排卵前期におけるエストラジオール値と黄体期中期のプロゲステロン値を温経湯投与前後で比較した(図5)。排卵が認められた群においては、温経湯を併用することにより排卵前期のエストラジ

ールは平均値で $181 \pm 19 \text{ pg/ml}$ から $957 \pm 224 \text{ pg/ml}$ へ、黄体期中期のプロゲステロン値は $1.1 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ から $12.8 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$ へといずれも有意に増加した ($P < 0.01$)。一方、排卵の認められなかった群においては、排卵前期のエストラジオール値は $252 \pm 44 \text{ pg/ml}$ から $616 \pm 182 \text{ pg/ml}$ へと増加傾向を示していたものの、黄体期中期のプロゲステロン値は $0.8 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ から $1.2 \pm 0.7 \text{ ng/ml}$ とほとんど増加していなかった。

3. 温経湯投与前後における LH の律動性分泌の比較

今回、温経湯の作用機序について検討する目的で、クロミフェン単独周期とクロミフェン-温経湯併用周期の各周期について月経周期の12日目にLHの律動性分泌の測定を行い、比較した(図6, 7)。図6は温経湯を併用することにより排卵が認められた症例のLHの律動性分泌である。この症例は35歳の無排卵周期症患者であるが、クロミフェン単独周期においてはLHのパルスは1回のみしか認められなかったが、温経湯を併用することにより4回に増え、LHの律動性分泌の回復が認められた。一方図7に温経湯を併用しても排卵の認めることができなかった症例のLHの律動性分泌を示した。この症例は29歳の第1度無月経患者であるが、クロミフェン単独周期においてはLHのパルスは1回しか認められなかったが、温経湯を併用することにより排卵は認められなかったものの、LHの律動性分泌は3回に増えLHの律動性分泌の回復を認めることができた。

考 察

最近、産婦人科領域における漢方療法の普及にはめざましいものがあり、その有効性が検討されるとともに、作用機序についても科学的に解析が進められている。排卵障害の治療においても、数種の薬剤について有効性が報告され、その作用機序に関しても知見が報告されている。たとえば、当帰芍薬散は視床下部およびその上位の中枢に対する作用が考えられており³⁾、また芍薬甘草湯は卵巣に対する直接作用によりテストステロンを抑制するとの報告がなされている^{4,5)}。さらに、八味地黄丸にはプロラクチン抑制作用が、桂枝茯苓丸にはLH-RH アゴニスト様作用があるといわれている³⁾。今回我々が使用した温経湯は、金匱要略によれば「婦人小腹寒、久しく胎を受けず、月経血が多すぎたり、月経が遅れているものによい」といわれており⁶⁾、東洋医学の見地からすれば温経湯は不妊症患者の内性器の寒冷による機能不全を改善するものと解釈できる。温経湯の作用機序に関する科学的検討に関しては、田坂ら^{1,2)}によりラットの視床下部一下垂体連続還流システムを用いた実験において、温経湯が視床下部からのLH-RH分泌を促進するという報告が、また武谷ら⁷⁾によりラットの下垂体細胞培養系に温経湯を加えた実験にお

いて、温経湯の下垂体に対する直接作用が報告されており、温経湯が視床下部一下垂体系に作用してゴナドトロピン分泌を促進することが示唆されている。そこで、今回我々はこれら温経湯のもつ視床下部一下垂体系への作用に注目し、本研究を行った。

温経湯の排卵誘発効果については、無排卵周期症に対する温経湯単独投与で50～60%の排卵が^{8,9)}、また無排卵周期症および第1度無月経に対する温経湯・クロミフェン併用療法により45%の排卵が報告されている¹⁰⁾。さらに妊娠率についても、温経湯単独で18%に⁹⁾、温経湯・クロミフェン併用療法では6.8%¹¹⁾といった報告がされている。今回の検討は、クロミフェンが無効な比較的重症の排卵障害に対し温経湯併用の有効性を検討したが、症例別排卵率54.2%、症例別妊娠率12.5%と、本併用療法の有効性を示す結果を得た。

次に内分泌学的検討の結果では、全体の平均値としては温経湯投与前後で卵胞期のLH、FSH、PRL値に有意な変化はみられなかったものの、それらの個々の変動を見てみると、朝海ら¹²⁾が報告しているように温経湯の投与によりゴナドトロピンが正常化する傾向が認められた。このゴナドトロピンの正常化の機序は不明であるが、漢方薬が種々の作用を持ついくつかの成分より構成される薬剤であることを考える

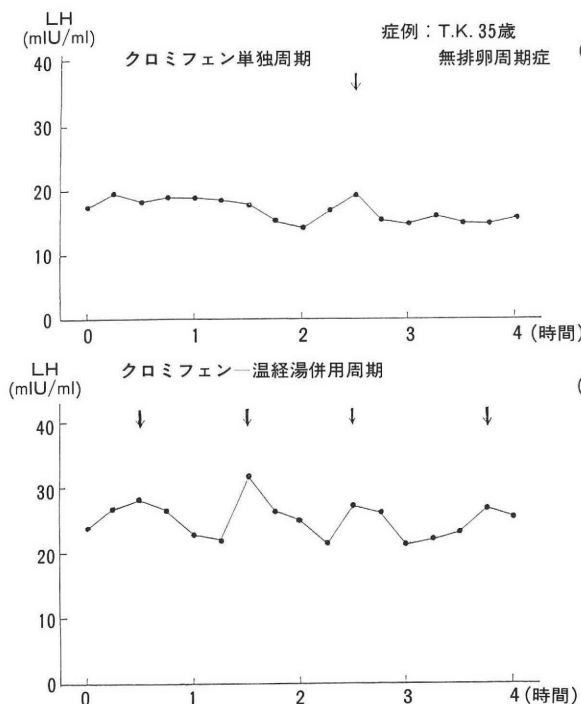


図6 温経湯併用にて排卵の認められた症例のLHの律動性分泌

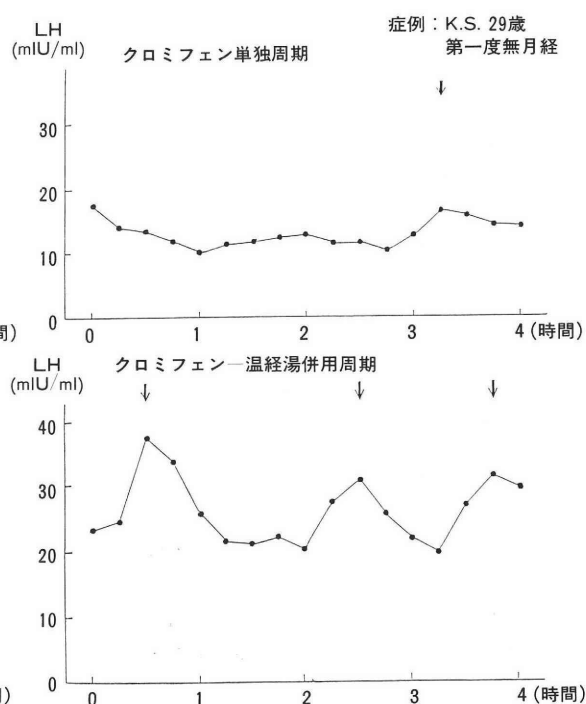


図7 温経湯併用にて排卵の認められなかった症例のLHの律動性分泌

表 3 温経湯の組成

本品 7.5g 中に下記の割合の混合生薬の乾燥エキス 5.0g を含有する。

日局 バクモンドウ(麦門冬)	4.0g
日局 ハンゲ(半夏)	4.0g
日局 トウキ(当帰)	3.0g
日局 カンゾウ(甘草)	2.0g
日局 ケイヒ(桂皮)	2.0g
日局 シャクヤク(芍薬)	2.0g
日局 センキュウ(川芎)	2.0g
日局 ニンジン(人參)	2.0g
日局 ボタンビ(牡丹皮)	2.0g
日局 ゴシュウ(呉茱萸)	1.0g
日局 ショウキョウ(生姜)	1.0g
アキョウ(阿膠)	2.0g

と、温経湯に含まれる成分の総合作用と考えられる。温経湯の中には表 3 に示すような種々の成分が含まれている。このうち芍薬と甘草については、これら 2 成分のみからなる芍薬甘草湯が多嚢胞卵巣症候群を含む高テストステロン血性排卵障害に対して有効であるという報告があるので^{4,5)}、今回の我々の症例の中で LH が比較的高値を示していた症例はこれら多嚢胞卵巣症候群に似た排卵障害の可能性が考えられ、それらに対して芍薬と甘草が作用し LH の低下をきたしたと考えられる。また一方、温経湯の成分の 1 つに牡丹皮が含まれているが、ラットの視床下部—下垂体連続還流システムを用いた実験から、牡丹皮に LH 分泌促進作用が認められており⁹⁾、LH が比較的低値を示していた症例は、この牡丹皮による作用により LH の上昇をきたした可能性が考えられる。しかし、漢方薬の作用はこのような 1 つ 1 つの成分だけが効果を発揮するのではなく、実際のところは温経湯の中に含まれている各成分が複雑に作用しあう可能性もあり、今後の検討課題といえよう。

さらに温経湯の作用機序を追跡するため、LH の律動性分泌について検討した結果、排卵の有無にかかわらず、LH の律動性分泌が回復していたことは、*in vitro* での LH-RH 促進効果を裏付けることになり、温経湯が視床下部・下垂体に対して促進的な役割を果たしていることが示された。また、温経湯を併用しても排卵が認められなかった群においても、排卵前期のエストラジオールは増加傾向にあったことから、温経湯の中核への作用の結果、エストラジオールが増加した可能性が考えられる。すでに温経湯には頸管粘液を増加させる作用のあることも報告されており^{9,12)}、今回のエストラジオールの増加と関連し

ている可能性もあり興味深いところである。

現在、クロミフェン無効の無排卵周期症あるいは第 1 度無月経に対して様々な排卵誘発法が試みられている。クロミフェン—温経湯併用療法は今回の検討より 54 % の排卵率を得ており、今後、排卵障害の治療に応用する価値があると思われる。また、今回検討を行わなかったが、温経湯がエストラジオールを増加させる作用をもつことから、クロミフェンで排卵はみられるものの妊娠に至らないような症例に対して、クロミフェン—温経湯併用療法を行うことにより、妊娠率向上が期待できるかもしれない。このような西洋薬と漢方薬の組み合わせは最近注目を浴びているが、漢方薬の作用を科学的に究明し、各薬剤の特質をいかした使い方をすれば、新しい治療法となりえるであろう。

稿を終えるにあたり、本研究に御協力いただいた斉藤真平先生、小笹皓雍先生に感謝致します。

文 献

- 1) 田坂慶一、三宅 侃、大塚志郎、吉本泰弘、青野敏博、谷沢 修：温経湯の LH-RH 分泌促進作用、日産婦誌、37：2821, 1985
- 2) Miyake, A., Jin-Woo Lee, Tasaka, K., Ohtsuka S., Aono, T.: Wen-Jing-Tang, a traditional chinese herbal medicine increases luteinizing hormone release *in vitro*, Am. J. Chinese Med., 14: 157, 1986
- 3) 小山嵩夫：不妊と漢方、産婦治療、57：294, 1988
- 4) 柳沼 恣、竹内 亨：芍薬甘草湯高 testosterone 血症性稀発月経あるいは無月経患者における血液 testosterone 濃度低下作用と排卵誘発作用およびその作用機構、産婦人科漢方研究のあゆみ（診断と治療社）、5：74, 1987
- 5) 産婦人科 S-K 研究会（代表 小林拓郎）、芍薬甘草湯（S-K）の高 testosterone 血症性婦人における血中 androgens 濃度の低下作用、排卵誘発効果と安全性—多施設協同研究、日不妊会誌、33：134, 1988
- 6) 張仲景：金匱要略（中医研究院編、付・北京図書館編著、鈴木達也訳）395、中国漢方、1982
- 7) 武谷雄二、林 直樹、久見宏司、水野正彦：下垂体前葉に対する温経湯の直接作用、産婦人科漢方研究のあゆみ（診断と治療社）、4：69, 1987
- 8) 楠原浩二、松本和紀、横山 敬、小田原靖、村江正始、本村英三、篠塚正一、蜂屋祥一：未婚の排卵障害婦人に対する温経湯の効果、産婦人科漢方研究のあゆみ（診断と治療社）、1：17, 1984
- 9) 新川唯彦、宇津木利雄、五十嵐正雄：月経異常による不妊症に対する温経湯の使用経験、産婦人科漢方研究のあゆみ（診断と治療社）、2：76, 1985
- 10) 吉本泰弘、三宅 侃、田坂慶一、谷沢 修、青野敏博：Clomiphene 無効の無排卵症に対する温経湯—clomiphene 併用効果、産婦人科漢方研究のあ

ゆみ (診断と治療社), 5:40, 1988

- 11) 今泉英明, 星合 晃, 鈴木雅洲: 不妊症に対する
温経湯・クロミッドの使用経験, 第4回日本産婦
人科漢方研究会講演要旨集: 13, 1984
- 12) 朝海 伶, 左雨秀治, 岡本良平, 岡田紀三男, 小
畑英介: 温経湯の続発性無月経患者内分泌動態に
およぼす影響とその治療効果, 産と婦, 55:1089,
1988
- 13) 五十嵐正雄, 宇津木利雄, 鹿沼達哉, 新川唯彦:
不妊症に対する漢方療法, Therap. Res., 2:
1022, 1985

Studies on the combination treatment with Unkei-to and clomiphene citrate

Toshiyuki Yasui, Toshihiro Aono
and Minoru Irahara

Department of Obstetrics and Gynecology,
The University of Tokushima, School of Medicine,
Tokushima 770, Japan

Hisatoshi Takahashi
Oe Kyodo Hospital

Junichi Yoshida, Hiroyasu Ino
and Yasuki Sakamoto
Komatsujima Red Cross Hospital

Akira Ikawa and Hiroko Takahashi
Tokushima Prefectural Central Hospital

Osamu Naka
Tokushima Prefectural Miyoshi Hospital

Akira Sakaguchi and Tadahiro Yoshimoto
Tokushima Municipal Hospital

Yasuya Kishi, Akemi Yamashita
and Mika Kawano
Tokushima Teishin Hospital

Makoto Takayanagi, Masaharu Kamada
and Masahiko Maegawa
Kagawa Prefectural Tsuda Hospital

Toshio Kamada
Kaisei General Hospital

Norio Nagamachi
Zentuzi National Hospital

Kichijiro Nakago and Masayuki Ihara
Ehime Prefectural Imabari Hospital

Shunichiro Kuroiwa
Kochi Nokyo General Hospital

Tetsuya Okayama and Satoru Takeuchi
Kochi Municipal Hospital

Suzu Miki
Kochi National Hospital

Kazunori Fujishima
Kohoku National Health Insurance Hospital

The combination treatment with Unkei-to (Wen-Jing-Tang), a traditional Chinese herbal medicine, and clomiphene citrate was applied for 24 normoprolactinemic patients who did not respond to clomiphene citrate alone. The mechanism of the effect of combination treatment was studied. This combination treatment restored ovulation in 13 of 24 patients (54.2%) and 3 patients (12.5%) became pregnant. The patients who responded to combination treatment showed a significant increase in the serum level of estradiol in the preovulatory phase and of progesterone in the mid-luteal phase. The patients with or without ovulatory response to combination treatment showed increase in the frequency of luteinizing hormone (LH) pulsatility on day 12 of the cycle. These results indicate that the combination treatment with Unkei-to and clomiphene citrate is effective for treatment of patients with normoprolactinemic anovulation who do not respond to clomiphene alone, and suggest that Unkei-to induces LH release by increasing in the frequency of LH pulsatility.

(受付: 1989年4月12日)

経口避妊薬服用時における
Fibrinopeptide A, Fibrinopeptide B _{β 15-42} および
凝固線溶阻害因子に関する研究

Studies on Fibrinopeptide A, Fibrinopeptide B _{β 15-42}
and Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis
during Use of Oral Contraceptives

東邦大学医学部第2産婦人科学教室

小倉久男	勝見喜也	中込才
Hisao OGURA	Yoshiya KATSUMI	Hitoshi NAKAGOMI
武田毅	川村良	横山元信
Tsuyoshi TAKEDA	Makoto KAWAMURA	Motonobu YOKOYAMA
	岩城章	
	Akira IWAKI	

2nd Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Toho University,
Tokyo 153, Japan

経口避妊薬服用時における凝固線溶系の変化を検討するため、新しい凝固、線溶能の鋭敏な指標である Fibrinopeptide A, B _{β 15-42} (FPA, FPB _{β 15-42}) および凝固、線溶阻害因子血漿 antithrombin III (AT III), α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI) を長期間測定し興味ある成績を得た。

- 1) FPA は経口避妊薬服用時にはほとんど変動を示さず, thrombin の産生はみられなかった。
- 2) FPB _{β 15-42} は, 3~5 回投与後, 11~12 回投与後では増加がみられたが ($p < 0.05$), 18, 24 回目では有意差が認められなかった。
- 3) 血漿 AT III 活性は初回投与後, 有意な低下 ($p < 0.05$) を示すが, 3~5 回投与前後では変動がみられなくなった。11~12 回目投与後では再度 AT III の減少がみられるようになるが, さらに投与を重ねても, 慣れのためか減少がみられなくなった。免疫活性濃度でも同様の変化がみられるが, その程度は軽度であった。
- 4) α_2 PI は初回投与後, 3~5 回投与後に軽度の減少傾向 ($p < 0.1$) がみられたが, その後は特に変動は認められなかった。
- 5) norethisterone 5mg 単独投与例では FPA, FPB _{β 15-42}, AT III, α_2 PI に特に変動は認めなかった。

以上の結果より血漿 AT III の減少は, FPA の増加が認められない事より, 消費性低下というよりエストロゲンによる AT III そのものの減少と考えられる。また, FPB _{β 15-42} の増加から plasmin の産生がみられ, それが血栓形成が少ない理由であると考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 94-101, 1990)

緒 言

経口避妊薬服用時において、欧米諸国では血栓栓塞症などの発生率が非服用者に比べ高く、また、心筋梗塞などの心疾患の発生率の増加も問題にされており、その原因として経口避妊薬中のエストロゲンの量が問題にされてきた。近年、low dose pill や mini pill が開発され、エストロゲンの量が抑えられて、血栓症などの副作用も軽減されてきているが、わが国においては、いまだ pill は解禁されておらず、従来のエストロゲンの含有量の多い薬剤が使用されている。しかし、日本婦人においては経口避妊薬服用時において血栓症の発生はほとんどみられていない。

凝固学的には von Kaulla et al.¹⁾や他の研究者^{2,10)}により経口避妊薬投与時に antithrombin III (AT III) の減少および第 V, X 因子の増加が報告され、さらに著者³⁾も血栓症の少ない日本婦人においても AT III の減少がみられる事を報告してきた。一方、線溶系では、荻野⁴⁾は日本婦人では経口避妊薬投与時に米国人に比べ、尿中 plasmin 活性が増加していると述べており、線溶系への影響が示唆されている。

今回、われわれは経口避妊薬服用時における新しい鋭敏な凝固因子である Fibrinopeptide A (FPA)、線溶因子 Fibrinopeptide B_{β15-42} (FPB_{β15-42}) および主要な凝固線溶阻害因子 AT III, α₂ Plasmin inhibitor (α₂ PI) を測定し、興味ある成績を得たので報告する。

実験対象および方法

20歳から35歳までの正常日本婦人31例に経口避妊薬として mestranol 0.05 mg と norethisterone 1 mg の合剤を月経周期第5日目より連続21日間投与し、初回投与前後、3～5回投与前後、11～12回投与前後、18回投与後、24回投与後で FPA, FPB_{β15-42}、血漿 AT III 活性、濃度、α₂ PI を測定した。さらに6例について norethisterone 5 mg の単剤を同様2周期使用し比較検討した。

測定方法

FPA, FPB_{β15-42} 測定用血漿は、ヘパリン 500 u/ml, トラジロール 10000 u/ml の入った Si 化真空採血管で血液8に対し inhibitor 2 の割合にて採血し、冷却下で3000回転, 10分間遠沈分離後直ちに-20℃にて凍結保存した。

AT III, α₂ PI 測定用血漿は3.8%クエン酸ナトリウムを用いて、1:9の割合で採血し、同様に遠沈分離後直ちに凍結保存した。

1. FPA, FPB_{β15-42} 測定法

FPA および FPB_{β15-42} の測定法は IMCO 社製のキットを用い Nossel et al.⁵⁾ および kudryk et al.⁶⁾ の方法に基づき大野⁷⁾ の変法による RIA 法で行なった。

血漿中の fibrinogen を除くため、血漿に等量の ethanol を加え放置し、3000回転, 20分間遠心分離を2回行ない、上清を血漿サンプルとした。血漿を取り、50℃恒温槽にて N₂ ガスを吹きつけ蒸発乾燥固定させ、ethanol を除去後 buffer にて再溶解させ、測定用サンプルとした。

測定は測定用サンプル 100 μl に抗血清 100 μl, 標識抗原 100 μl, Tris-NaCl-albumin buffer (pH 8.5) を加え、4℃にて16時間 incubation し、r-globulin 100 μl を加え、さらに polyethyleneglycol 500 μl を加えて混和し、4℃にて10分間遠心分離し、polyethyleneglycol 法にて BF 分離を行ない、上清を除き、沈殿物の放射活性を測定した。

2. 血漿 AT III 測定法

血漿 AT III 活性は von kaulla の法を modify し、血漿を2倍に希釈して、AT III 時間を測定し、AT III 活性(%)を表現した。AT III 濃度は一元免疫拡散平板法 (Behring 社製) を用い、標準 AT III 液 (25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml) にて標準曲線を作成し、被験血漿を測定した。

3. 血漿 α₂ PI 測定法

0.05 M Veronal buffer (pH 8.6) と 0.05% NaN₃ に agarose を加え加温溶解し、56℃ water bath 中

表1 Fibrinopeptide A and B_{β15-42} values in women taking oral contraceptives.

	1 n=20		3～5 n=18		11～12 n=16		18 n=15	24 n=12
	before	after	before	after	before	after	after	after
F P A ng/ml	0.76 ±0.08	0.99 ±0.14	0.86 ±0.09	0.92 ±0.12	0.73 ±0.09	0.94 ±0.12	0.90 ±0.11	0.88 ±0.10
FPB _{β15-42} ng/ml	3.32 ±0.18	3.48 ±0.14	3.32 ±0.12	4.12* ±0.30	3.53 ±0.16	4.68* ±0.57	4.0 ±0.57	3.89 ±0.58

*P<0.05

mean ± S.E.

で抗ヒト α_2 PI 血清 (持田) 175 μ l (26 μ g/ml) を各試験管に入れ, 平板を作成し, 一元免疫拡散法により, 標準ヒト α_2 PI 血漿 (5.2 mg/dl) を用い, 標準曲線を作成し測定した.

測定成績の統計学的処理は student's t test を用いた.

実験成績

I. 経口避妊薬投与時における各因子の変動

1. FPA

FPA は thrombin の産生を反映するものであるが, 表 1 のごとく, 投与前値 0.76 ± 0.08 ng/ml, 初回投与後値 0.99 ± 0.14 ng/ml と増加傾向を示すが, 特に有意の増加は認められなかった. しかし, 個々の症例でやや高値を呈した例が 3 例認められ, thrombin 産生の増加がみられた (図 1). 3 ~ 5 回目投与前後, 11 ~ 12 回目投与前後, 18 回目, 24 回目投与後では有意の変動を示さなかった.

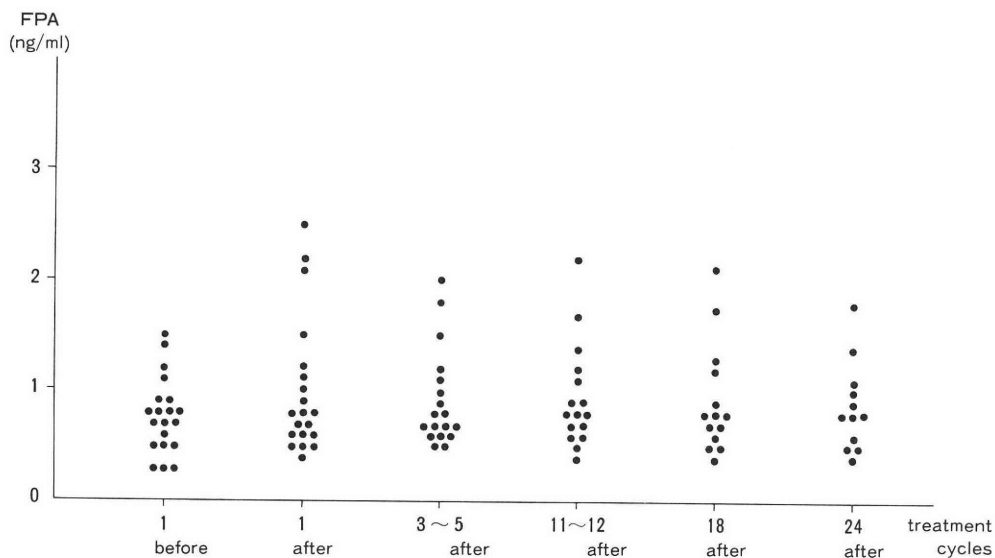


図 1. Fibrinopeptide A in woman taking oral contraceptives.

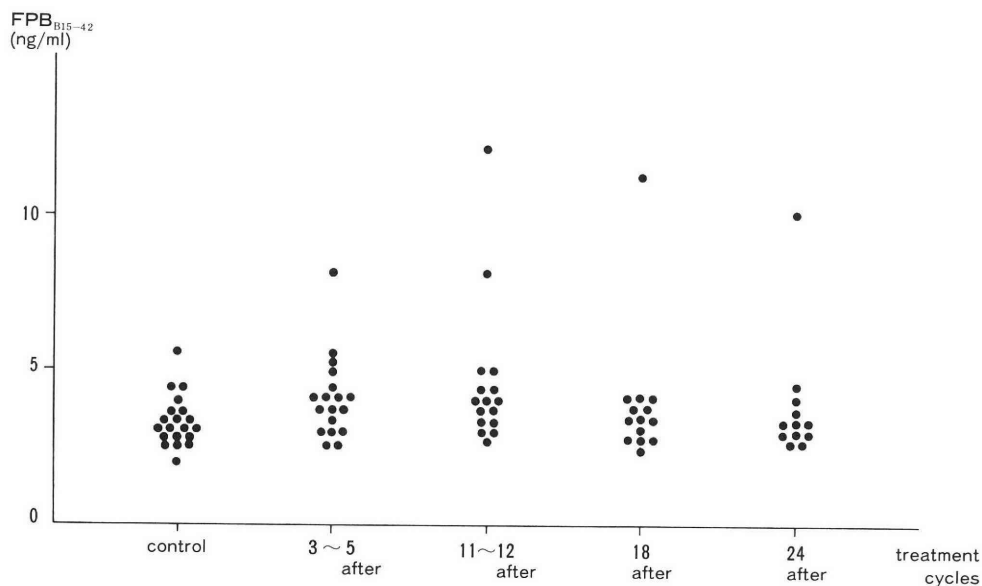


図 2. Fibrinopeptide B β_{15-42} in women taking oral contraceptives.

2. $FPB_{\beta_{15-42}}$

$FPB_{\beta_{15-42}}$ はplasminの産生を反映するものであり、投与前値 3.32 ± 0.18 ng/ml, 初回投与後 3.48 ± 0.14 ng/ml と有意の増加は認められなかったが, 3~5回目投与後値 4.12 ± 0.30 ng/ml, 11~12回目投与後値 4.68 ± 0.57 ng/ml と $p < 0.05$ で有意の増加を示していた。しかし, 18回目後値 4.0 ± 0.57 ng/ml, 24回目投与後値は 3.89 ± 0.58 で有意の増加はみとめられなかった(表1)。個々の症例で $FPB_{\beta_{15-42}}$

に異常高値を示す例がみられた(図2)。

3. 血漿 AT III

血漿 AT III 活性は初回投与後 77% と著明な低下を示していたが ($p < 0.01$), 3~5回目投与前値では 94% と回復しており, 投与後値でも 93% と有意差が認められなかった。11~12回目では投与前値 84%, 投与後値 76.5% と有意の低下 ($p < 0.05$) がみられた。しかし, 18回目, 24回目投与後値では初回投与前値と比べ有意の低下がみられなかった(図3)。

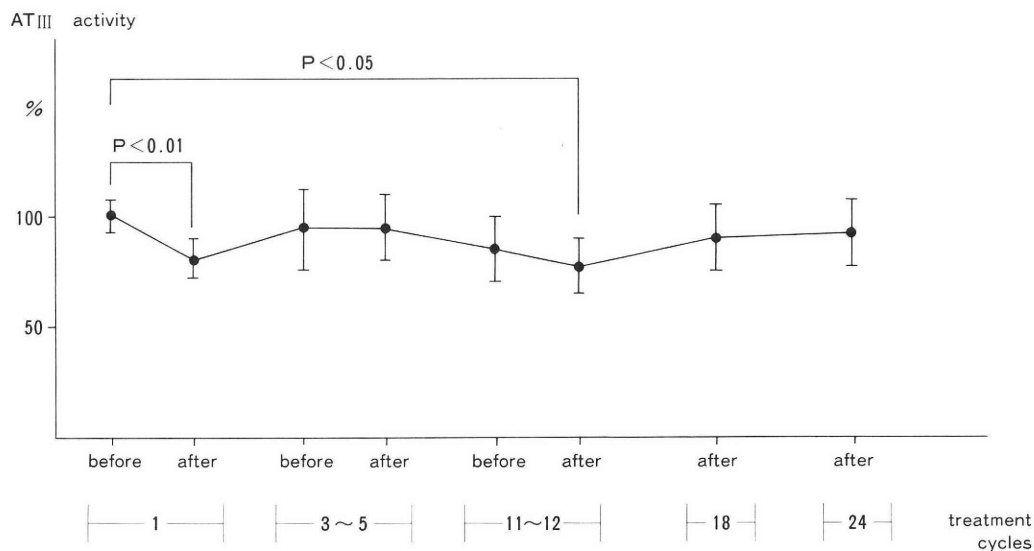


図3. Plasma antithrombin III activity in women taking oral contraceptives.

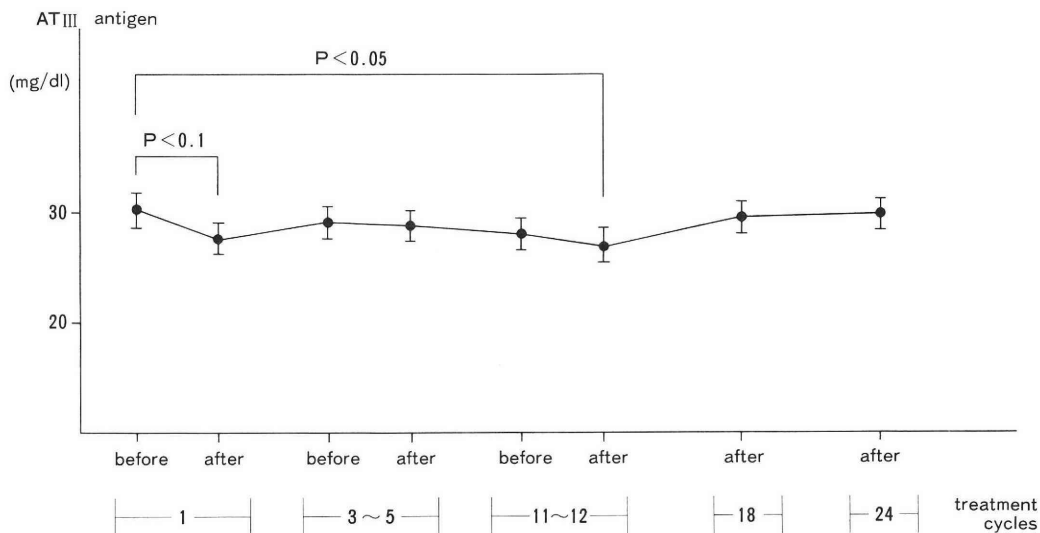


図4. Plasma antithrombin III antigen in women taking oral contraceptives.

血漿 AT III 濃度でも初回投与前値 30.4 ± 0.56 mg/dl, 投与後値 28.0 ± 0.44 mg/dl と軽度減少 ($p < 0.1$) 傾向を示すが, 3~5 回目投与前後では特に低下を認めなかった。しかし, 11~12 回目投与後では 26.8 ± 0.58 mg/dl と有意の減少 ($p < 0.05$) を示していたが, 18 回目投与後, 24 回目投与後では減少がみられなかった (図 4)。

4. α_2 PI

α_2 PI は投与前値 5.70 ± 0.20 mg/dl, 後値 5.4 ± 0.15 mg/dl, 3~5 回目投与後値 5.48 ± 0.10 mg/dl と軽度減少傾向 ($p < 0.1$) を示していたが, それ以後では特に異常を認めなかった (図 5)。

II. norethisterone 5 mg 単独投与例

gestagen 単独投与例では FPA, FPB_{β15-42}, 血漿 AT III, α_2 PI には 1~2 回目投与前後特に変動を認めなかった (表 2)。

考 察

欧米諸国では経口避妊薬服用時に血栓性静脈炎や血栓症の発生の増加がみられ, Vessey, et al.⁸⁾によると血栓症の発生率が非投与婦人に比べ 9 倍にもなると報告しており, また, 心筋梗塞などの心疾患との関連が注目されている⁹⁾。血栓症の成因として Virchow は 3 つの要因をあげているが, 特に経口避妊薬服用時における血栓症発生の要因としては, このうち血液凝固線溶系の変化が主に関与していると考えられる。

血液凝固因子の変動については, Ygge, et al.¹⁰⁾, Ambrus, et al.¹¹⁾, Mink, et al.²⁰⁾, によると fibrinogen, 第 V, VII, X 因子などの増加が報告されている。凝固阻害因子の面では von Kaulla, et al.¹⁾, Peterson, et al.¹²⁾, Fagerhol, et al.²⁾は血清 AT III の減少

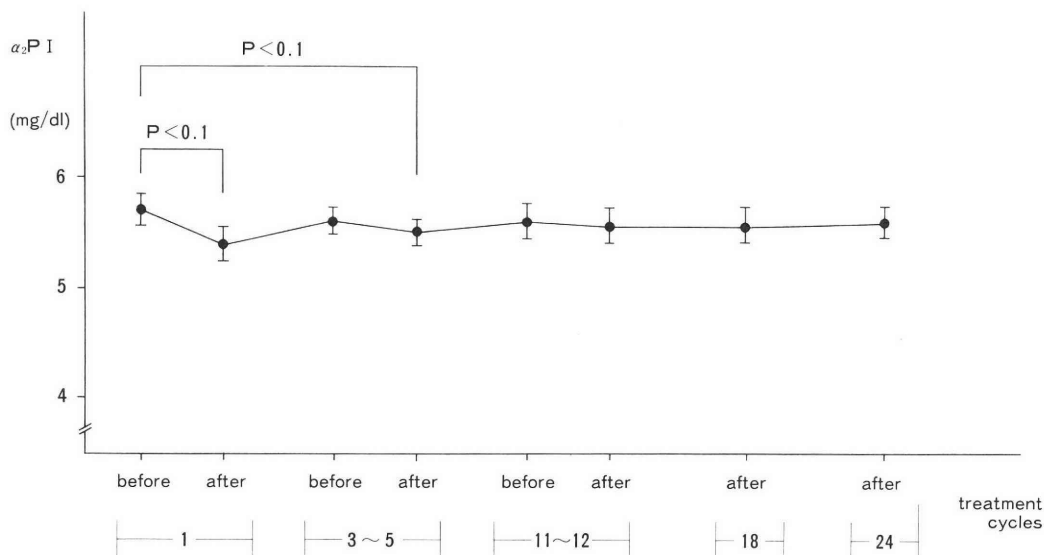


図 5. Plasma α_2 -plasmin inhibitor in women taking oral contraceptives.

表 2 Fibrinopeptide A and B_{β15-42}, plasma anti-thrombin III and α_2 plasmin inhibitor in women taking gestagen.

		1		2	
		before	after	before	after
F P A	ng/ml	0.81 ± 0.10	0.84 ± 0.11	0.79 ± 0.12	0.83 ± 0.12
FPB _{β15-42}	ng/ml	3.22 ± 0.14	3.28 ± 0.15	3.26 ± 0.12	3.32 ± 0.14
ATIII _{activity}	%	100.2 ± 1.0	99.3 ± 1.1	98.3 ± 1.3	98.6 ± 1.2
ATIII _{concentration}	mg/dl	30.0 ± 0.38	29.3 ± 0.39	29.9 ± 0.34	29.6 ± 0.44
α_2 P I	mg/dl	5.7 ± 0.18	5.8 ± 0.15	5.7 ± 0.12	5.6 ± 0.12

mean ± S.E.

を認めており、日本人において著者も同様の報告³⁾をしているが、とくに Zuck, et al.¹³⁾は偏頭痛などの血栓症を思わせる症例のある患者で高度の AT III の減少を見る例が多いとしている。血漿 AT III については Fagerhol, et al.¹⁴⁾, Howie, et al.¹⁵⁾が軽度の減少を認めており、血清中よりも血漿中での減少は少ないが、経口避妊薬服用により、血漿 AT III の低下、ひいては凝固能亢進状態が起こると考えられる。

著者³⁾は以前、mestranol 0.1 mg 含有経口避妊薬と 0.05 mg 含有のものとは、estrogen の量の少ない方が血漿 AT III 活性の低下が少ない事を報告し、さらに、mestranol 0.05 mg と norethisterone 1 mg の合剤使用時に血漿 AT III 活性、濃度において初回投与後および 11~12 回投与後に減少がみられ、血漿 AT III 活性の低下の方が大きく、むしろ血漿 AT III 濃度より活性の低下により凝固能亢進が起こる事を述べてきた¹⁶⁾。今回、さらに 18 回、24 回と長期に投与しても、血漿 AT III 活性、濃度ともにほとんど有意の減少がみられなくなった。これは経口避妊薬服用による慣れの現象と考えられる。

近年、欧米諸国では estrogen の量をごく少なくした low dose pill, 2 相性, 3 相性 pill, また estrogen の含まれていない mini pill が使用され、血栓症などの副作用の減少に努めている。Notelovitz, et al.¹⁷⁾は low dose pill 投与により血漿 AT III に特に有意の減少がないとしており、estrogen の量を少量に抑える事により AT III の減少を防げるとしている。著者の成績でも estrogen の含まれていない norethisterone 5 mg 単独投与では、血漿 AT III 活性、濃度にほとんど影響を認めず、estrogen の量を抑えることにより AT III の減少を防げることが示唆された。

一方、新しい凝固能の鋭敏な指標である FPA は fibrinogen に直接 thrombin が使用し、fibrinogen の A α 鎖の NH₂ 末側の arginy-glycin 結合が thrombin で切断されて遊離した peptide であり、thrombin 産生の直接の指標として重要な因子である。正常人における値は 0.5~2.0 ng/ml であるが、Cronlund, et al.¹⁸⁾や村越ら¹⁹⁾は血栓症や DIC の際に増加すると報告している。著者ら¹⁶⁾は 1988 年に初めて経口避妊薬投与時における FPA について報告し、1 年未満の投与では、AT III 減少を示す初回投与時にも FPA の増加を認められない事を示したが、今回、さらに長期に投与を続けた例にも FPA の有意の増加はみられず、個々の症例で正常範囲ではあるがやや高値を示した例がみられた。AT III が減少を示しているにもかかわらず、FPA の増加がみられないことから、AT III の減少は thrombin 産生亢進による消費性低下によるもの

ではなく、エストロゲンによる AT III 産生の低下によるものと考えられる。

欧米婦人に比べ一般的に血栓性疾患の頻度が低いとされている日本婦人において、経口避妊薬服用時に AT III の減少を認めているにもかかわらず、血栓症発生の報告は少ない。その原因として線溶能に相違のある事が考えられる。Mink, et al.²⁰⁾および他の研究者²¹⁾によると、経口避妊薬服用時に plasminogen, plasmin 活性が亢進していると述べており、また荻野⁴⁾は日本婦人と米国婦人について尿中 plasmin 活性を測定し、米国婦人では服用前後で有意差を認めなかったが、日本婦人では経口避妊薬服用 6 カ月目、1 年目で有意の増加を認めており、これが日本婦人に血栓症の少ない理由であるとしている。

今回、著者らは新しい線溶系の指標である FPB₉₁₅₋₄₂ を測定し、微妙な線溶系の変化について検討した。FPB₉₁₅₋₄₂ は thrombin により FPB が遊離した fibrin (fibrin II) に plasmin が作用し、B β 鎖の NH₂ 末の arginyl(β_{42})-glycin(β_{43}) 結合が切れて遊離した peptide であり、plasmin の発生を直接反映するとされている。大野⁷⁾によると、成人では 1.2~3.8 ng/ml (2.1 $\pm$ 2 ng/ml) であり、特に DIC や線溶亢進の時に増加するとされているが、経口避妊薬投与時における FPB₉₁₅₋₄₂ の報告はいまだみられない。今回の成績では、投与前値 3.32 $\pm$ 0.18 ng/ml、初回投与後値 3.48 $\pm$ 0.14 ng/ml とやや増加傾向を示すが、有意差はみられなかった。しかし、3~5 回目後 4.12 ng/ml、12 回目後 4.68 ng/ml と軽度増加 ($p<0.05$) を示していたが、24 回目後では有意差を認めなかった。また、個々の症例でみると、正常値以上の高値を示す例がみられ、経口避妊薬投与の際には何らかの原因により plasmin の産生が促がされるものと考えられる。

線溶阻害因子の面では、青木ら²²⁾により精製された α_2 PI は線溶阻害作用の主要な因子であり、plasmin の約 35% を阻害するといわれ、DIC などの際に減少をするとされている。経口避妊薬投与時における α_2 PI の変動については、Huisveld, et al.²³⁾が α_2 PI の減少がみられるとしており、Notelovitz, et al.¹⁷⁾は low dose pill を使用し、3 回目、6 回目投与後で軽度減少を示しているが、7 回目ではすでに control 値にもどっているとしている。しかし、日本婦人における α_2 PI の報告はいまだみられていない。今回の研究で、日本婦人においても初回投与後および 3~5 回投与後では軽度減少傾向を示した ($p<0.1$) が、それ以後では変動がみられず、産生の減少によるものか、plasmin との complex をつくっているかどうか

か知るには、新しい因子である α_2 PI complex の測定を試みなければならない。

一方, estrogen を除き norethisterone 5 mg を使用した例において, 短期間であるが血漿 AT III 活性, 濃度, α_2 PI, FPA, FPB_{β15-42} の変動はみられなかった。norethisterone は estrogenic gestagen に属し, 体内で一部 estrogen に転換するが, estrogen 作用は弱いとされており, そのため今回, 各因子の変動を示さなかった理由と考えられる。現在, 欧米諸国では mini pill として gestagen の単独使用が行なわれているが, 血液凝固能亢進を防ぐという点からみれば, estrogen の含まれていない pill, または low dose pill の使用を日本でも早急に考えてよいと思われる。(本論文の要旨は第 39 回日本産科婦人科学会総会にて発表した。)

文 献

- 1) von Kaulla, E., Droegemueller, W., Aoki, N. and von Kaulla, K.N.: Antithrombin III depression and thrombin generation acceleration in women taking oral contraceptives, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 109: 868, 1971
- 2) Fagerhel, M. K. and Abildgaard, U.: Immunological studies on human antithrombin III, *Scand. J. Haemat.*, 7: 10, 1970
- 3) 小倉久男, 宮地慧子, 木下 佐, 青木延雄: 妊娠および経口避妊薬投与時における Antithrombin III の変動について, *日血誌*, 40: 232, 1977
- 4) 荻野雅弘: 日米経口避妊薬服用者における線溶系の反応に関する研究—尿中 plasmin 活性を中心として, *日産婦誌*, 38: 817, 1986
- 5) Nossel, H. L., Younger, L. R., Wilner, G. D., Procupez, T., Canfield, R. E. and Buther, V. P.: Radioimmunoassay of human fibrinopeptid A, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68: 2350, 1971
- 6) Kudryk, B., Robinson, D., Netre, C., Hessel, B., Blombäck, M. and Blombäck, B.: Measurement in human blood of fibrinogen/fibrin fragments containing the B_{β15-42} sequence, *Thromb. Res.*, 25: 277, 1982
- 7) 大野安男: フィブリノペプチド A および B_{β15-42} の測定に関する検討, *SRL 宝函*, 7: 20, 1983
- 8) Vessey, M. P. and Doll, R.: Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease, *Brit. Med. J.*, 2: 199, 1968
- 9) Royal College of General Practitioner's oral contraception study. Further analysis of mortality in oral contraceptive users, *Lancet.*, 1: 541, 1981
- 10) Ygge, J., Brody, S., Kersan-Bengtson, K. and Nilsson, L.: Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 104: 87, 1969
- 11) Ambrus, J., Niswander, K. R., Courey, N. G., Wamsteker, E. F. and Mink, I. B.: Progestational agents and blood coagulation, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 103: 994, 1969
- 12) Peterson, R. A., Krull, P. E., Finley, P. and Ettinger, H.: Changes in antithrombin III and plasminogen induced by oral contraceptives, *Am. J. Chin. Path.*, 53: 468, 1970
- 13) Zuck, T. F., Bergin, J. J., Raymond, J. M. and Dwyre, W. R.: Implication of depressed antithrombin III activity associated with oral contraceptives, *Surg. Gynec. Obstet.*, 133: 609, 1971
- 14) Fagerhol, M. K., Abildgaard, U., Bergsjö, P. and Jacobsen, J. H.: Oral contraceptives and low antithrombin III concentration, *Lancet*, 1: 1175, 1970
- 15) Howie, P. W., Prentice, C. R. M. and McNicol, G. P.: A method of antithrombin estimation using plasma defibrinated with ancrod, *Brit. J. Haemat.*, 25: 101, 1973
- 16) 小倉久男, 勝見喜也, 三島真喜子, 横山元信, 岩城 章: 経口避妊薬投与時における血漿 antithrombin III, Fibrinopeptide A の変動および結合型 estrogen の antithrombin III 阻害作用について, *日不妊会誌*, 33: 72, 1988
- 17) Notelovitz, M., Zauner, C., McKenzie, L., Suggs, Y., Fields, C. and Kitchens, C.: The effect of low-dose oral contraceptives on cardiorespiratory function, coagulation, and lipids in exercising young women: A preliminary report, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 156: 591, 1987
- 18) Cronlund, M., Hardin, J., Burton, J., Lee, L., Haber, E. and Bloch, K. J.: Fibrinopeptide A in plasma of normal subjects and patients with disseminated intravascular coagulation and systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Invest.*, 58: 142, 1976
- 19) 村越敏雄, 山内雅夫, 小熊 豊, 長田 博, 長谷川淳: 血栓性患者における Fibrinopeptide A の研究, *血液の脈管*, 10: 576, 1970
- 20) Mink, I. B., Courey, N. G., Niswander, K. R., Moore, R., Lillie, M. A. and Ambrus, J. L.: Progestational agents and blood coagulation, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 119: 401, 1974
- 21) Zacherle, B. J. and Richardson, J. A.: Irreversible renal failure secondary to hypertension induced by oral contraceptives, *Ann. Inter. Med.*, 77: 83, 1972
- 22) Moroi, M. and Aoki, N.: Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma, *J. Biol. Chem.*, 251: 5956, 1976
- 23) Huisveld, J. A., Hosten, A. J. H. and Bernink, M. J. E.: Oral contraception and fibrinolysis

among female cyclists before and after exercise, *Appl. Physiol.*, 53: 330, 1982

**Studies on fibrinopeptide A,
fibrinopeptide B _{β_{15-42}} and inhibitors
of blood coagulation and fibrinolysis
during use of oral contraceptives**

Hisao Ogura, Yoshiya Katsumi,
Hitoshi Nakagomi, Tsuyoshi Takeda,
Makoto Kawamura, Motonobu Yokoyama
and Akira Iwaki

2nd Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Toho University,
Tokyo 153, Japan

To examine a change occurring in the coagulation-fibrinolytic system during administration of oral contraceptives, the author measured for a long period Fibrinopeptide A and B _{β_{15-42}} (FPA and FPB _{β_{15-42}}) which are new sensitive indicators of coagulation and fibrinolytic activity, as well as coagulation fibrinolysis inhibiting factor plasma antithrombin III (AT III) and α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI). As can be seen in the following, the results of the above examination were interesting:

1) FPA showed almost no change during administration of the oral contraceptive, nor was thrombin

observed to be produced.

2) FPB _{β_{15-42}} increased when the drug was administered 3 to 5 times and 11 to 12 times ($p < 0.05$), but showed no significant difference when the drug was given for the 18th and 24th times.

3) Plasma AT III activity decreased significantly ($p < 0.05$) when the drug was given for the first time, but showed no change when the drug was given 3 to 5 times. When the drug was administered 11-12 times, AT III was observed to decrease again, but repeat administrations did not cause AT III to decline probably because of inurement. A similar change in immune activity concentration was observed, but the change was slight.

4) When the drug was administered 3-5 times following the first administration, a slight decrease ($p < 0.1$) occurred in α_2 PI levels, but no change worthy of special mention was noted to occur thereafter.

5) In patients administered norethisterone 5mg alone, no particular change was observed to occur in FPA, FPB _{β_{15-42}} , AT III, or α_2 PI.

Judging from the above results, especially from the fact that an increase was recognized in FPA, the decrease in AT III levels may be attributed not to a lowering of consumption but to a decrease in AT III itself due to estrogens. It is also considered that an increase in FPB _{β_{15-42}} led to plasmin production, which was why few thromboses were observed to form.

(受付: 1989年7月19日特掲)

子宮鏡により診断し得た 卵管間質部妊娠の1例

Hysteroscopic Diagnosis of a Case with Interstitial Tubal Pregnancy

秋田大学医学部産婦人科

太田 博孝 真木 正博
Hirotaka OTA Masahiro MAKI

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

卵管間質部妊娠は子宮外妊娠の中でも稀で、卵管妊娠の0.6-5%を占めるにすぎない。本症のうち無症状、あるいは症状の軽い例では副角妊娠、Piscacek 徴候などとの鑑別が時に難しい。しかし、近年の内視鏡や超音波断層法の進歩により子宮外妊娠の診断はより容易になってきた。今回われわれは本症の子宮鏡により術前診断に成功した症例を経験したので報告する。

症例は25歳、3妊1産で稽留流産、人工妊娠中絶術、各1回の妊娠歴がある。最終月経は昭和61年12月29日で、昭和62年1月25日より褐色帯下があった。3月18日(妊娠11週2日)の超音波断層法で子宮底部に一致し、内腔不整の囊腫状腫瘤を認めたが、胎児像はなかった。この時の尿中hCGは8000 U/lであった。子宮外妊娠の疑いで直ちに当科を紹介され、入院となった。子宮鏡検査で卵管間質部に胎嚢を確認したので、腹式左卵管間質部楔状切除術を行った。経過良好で術後14日目に退院した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 102-105, 1990)

緒 言

従来、子宮外妊娠の診断は双合診、子宮内膜組織診、ダグラス窩穿刺、子宮卵管造影などで疑い、開腹手術を行うことにより診断を確定してきた。最近、超音波断層法、CTなどの新しい医療機器の導入によりその診断はより容易となった。さらに無症状、あるいは診断が困難な例でも、腹腔鏡、子宮鏡などの内視鏡の応用により鑑別できるようになってきた。このうち腹腔鏡はその施行に際し十分な麻酔を必要とするため、開腹手術直前に行われることが多い。一方、子宮鏡は局所麻酔、あるいは無麻酔で施行可能で、一般に外来レベルで行われている。また子宮内膜組織診では結果が出るのに時間がかかり、迅速性に欠ける。

今回われわれは、卵管間質部妊娠を子宮鏡で術前に診断し得た症例を経験したので、文献的考察を加え報告する。

症 例

患 者： 25歳 主婦
主 訴： 褐色帯下
家族歴： 特記すべきことなし
既往歴： 10歳時虫垂炎にて虫垂切除術、初経は11歳、月経周期は32日型で整、結婚は20歳、妊娠歴は3妊1産で、21歳時妊娠満期で女兒を自然分娩、妊娠初期に稽留流産、人工妊娠中絶術、各1回あり。
現 症： 最終月経は昭和61年12月29日より5日間で、昭和62年1月25日より少量の褐色帯下あり、2月14日某医を受診した。この時の超音波断

層法で子宮内に胎嚢を認め、妊娠6週5日と診断された。3月18日(妊娠11週2日)の超音波検査で子宮底部左側に一致し、内腔不整の嚢腫状腫瘍が見られたが胎児像はなかった。この時尿中hCGは8000 U/lであった。

3月22日(妊娠11週6日)、子宮外妊娠の疑いで当科外来を紹介され、受診した。外来での子宮内膜組織診で絨毛成分を認めなかったため、4月6日入院となった。

入院時所見：入院時の双合診で子宮は前傾前屈、鶯卵大で正常硬、子宮底部左側からダグラス窩にかけ圧痛を認めた。左右付属器は正常で圧痛、抵抗はなかった。子宮腔消息子診では右方向に7cm、左方向に10cm挿入可能であった。ダグラス窩穿刺では血液を吸引できなかった。

入院時の一般検査では体重68kg、脈拍86/分、体温36.9℃、血沈は1, 2時間値がそれぞれ24, 57mmと中等度に亢進。また血色素10.5g/dl、赤血球361万/mm³と軽度貧血であったが、肝、腎機能、電解質の値は正常であった。

超音波断層法で腫瘍は子宮底部左側から卵管間質

部にかけて存在し、大きさは67×56×55mm、一部小嚢腫状で不均一な像を示した(図1)。

子宮鏡所見では子宮内に絨毛を認めず、子宮底部にかけて細血管の増生を認めた。右卵管口は正常であったが、左卵管口は還流液の注入により著明に開大し、その奥、すなわち卵管間質部に一致して赤桃色、表面平滑な胎嚢を認めた。胎嚢は周囲壁、特に子宮底部側に付着していた(図2, 3)。

入院後の経過：入院前より尿中hCGは徐々に低下し、入院時には320 U/lとなった(図4)。また自発痛はあまりなかった。しかし妊娠14週6日に至り子宮底部左側に強い疼痛が出現した。このため左卵管間質部妊娠切迫破裂の診断で開腹手術を行った。この時の所見では子宮は鶯卵大に腫大、さらに左卵管間質部は小鶏卵大に腫大し、後壁の一部は極めて薄くなり、出血斑を認めた(図5)。直ちに同部位を切開、胎嚢を出した後卵管間質部を楔状に切除した。胎嚢内は血腫が大部分を占め、一部に絨毛が存在したが、胎児は認めなかった(図6)。術後経過は良好で10日目の尿中hCGはLHレベルとなり、術後14日目に退院した。

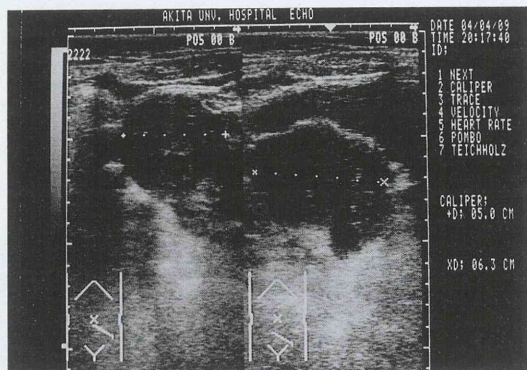


図1 超音波断層法による胎嚢像



図3 子宮鏡による卵管間質部の胎嚢像



図2 子宮鏡による卵管間質部の胎嚢像

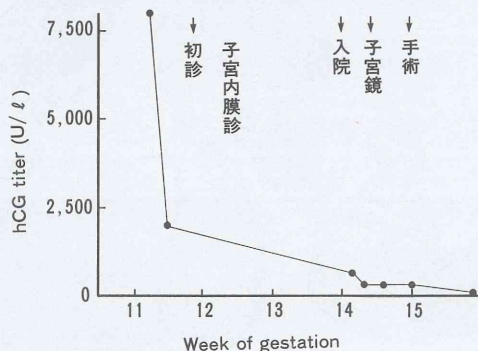


図4 本症例における入院前後の尿中hCG値の推移

病理学的検査では胎嚢はやや腫大した絨毛と血腫からなり、胎児部分を認めなかった(図7)。

考 察

卵管間質部妊娠とは卵管が子宮筋層を貫く極くわずかの部分である卵管間質部に妊娠が成立した場合をいう。その頻度は卵管妊娠のうちでは最も低く、

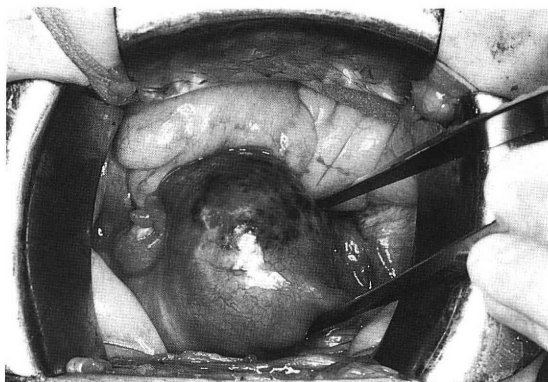


図5 開腹手術時の所見



図6 摘出した胎嚢の肉眼所見



図7 胎嚢の組織学的所見

0.6~5.0%の範囲にある¹⁾。

本症の成因には幾つか挙げられている。本症は圧倒的に経妊婦に多いが、特に人工妊娠中絶術の経験者にやや多い²⁾とされている。今回の症例も以前に人工妊娠中絶術と自然流産を各1回経験していた。また、子宮内膜症、特に子宮腺筋症³⁾や子宮筋腫⁴⁾による間質部の狭窄を原因と考える人もいる。さらに子宮の先天性奇形や發育不全が原因となる場合もあるという。

本症は受精卵の着床部位が子宮筋層内となるため、その着床する部位の差、および受精卵の發育方向によって特徴ある病変を示す。Hoehne⁵⁾の分類によると、間質峡部型、狭義間質部型、間質部子宮型の3型に分けられる。間質峡部型は受精卵の着床が卵管峡部に接近した間質部に起こった場合をいい、比較的早期に腹腔内に破裂し易い。狭義間質部型は間質部中央に受精卵が着床した場合をいい、妊娠中期まで持続することがある。間質部子宮型は子宮腔内に接近した間質部に受精卵が着床した場合をいい、自然分娩、ないし流産の形をとることがあるという。本症例では図2、3から明らかなように、胎嚢が卵管間質部に存在し、かつ子宮底側に主に着床していること、さらに妊娠15週まで継続し得たことから、狭義間質部型に当てはまると考えられた。本症例では手術直前に強度の腹膜刺激症状が出現した。これは図5にみられるように子宮底部左側の膨隆部にそって散在性の出血斑を認め、かつ切開時同部壁が極めて薄くなっていたことより破裂直前の状態にあったと考えられた。

子宮外妊娠の診断は医療機器の発達により、より容易になってきた。従来行なわれてきた子宮卵管造影法、ダグラス窩穿刺、子宮内膜組織診はもちろん、超音波断層法、CTなどの有用性は本症例からも明らかである。しかし、無症状の例や着床部位の特異な卵管間質部妊娠、卵巣妊娠、腹膜妊娠などの例では、その確定診断は時に困難で開腹手術や腹腔鏡に頼らざるをえない。腹腔鏡は全身麻酔を必要とするため、簡単には行い得ない。一方、子宮鏡は従来の硬性型に加え、軟性型(flexible type)のものが開発され進歩が著しい。現在使用可能な軟性型子宮鏡は直径5mm前後と極めて細く、そのまま挿入可能で局所浸潤麻酔を必要としない。また本症例に使用した硬性子宮鏡でも深い麻酔は必要でなく、頸管拡張時に局所浸潤麻酔が必要なだけである。子宮鏡は従来行われてきた盲目的子宮腔消息子診、子宮内膜組織診、子宮卵管造影法などと比べ、極めて簡便でかつ直視下に胎嚢や絨毛の有無を確認できる。

子宮鏡で妊娠初期の胎嚢は容易に確認できる。通常胎嚢は子宮体部で青白色の半球状腫瘍として認められ、胎嚢の子宮付着部も容易に観察できる。しかしこの時期の胎嚢はその内腔を透視することはできない。また、正常妊娠時壁脱落膜で細血管のnetworkを見ることはあまりない。しかし本症例のようにhCG分泌の低下した稽留流産例では壁脱落膜が萎縮し、細血管のnetworkを見ることがある。杉本によると27例の卵管妊娠中7例(26%)⁶⁾に子宮鏡で卵管口から血液の逆流がみられたという。本症例では還流液として高粘稠デキストラン(キセラン[®])を使い、徐々に子宮腔内圧を高めた結果、図2、3に示したように明らかな胎嚢を認めることができた。しかし、今まで子宮鏡により卵管間質部妊娠を診断しえた報告は極めて少ない^{7,8)}。

本症例は初診時子宮底部左側に強い痛みがあり、左卵管角部が大きく膨隆しており、比較的定型的な症例と思われた。しかし卵管間質部妊娠で症状が比較的軽い場合は、副角妊娠、Piscacek徴候、付属器腫瘍や卵管炎などと誤診され易い。これらの鑑別には従来方法に加え、超音波断層法や内視鏡などを駆使することが必要不可欠となる。

(本論文の要旨は第27回日産婦内視鏡学会(大阪)において発表した。)

文 献

- 1) 澤崎千秋, 柳澤洋二: 子宮外着床異常(子宮外妊娠), 現代産科婦人科学体系17A, 妊娠異常・妊娠中毒症I, 282, 中山書店, 1974
- 2) 山元清一, 川島吉良: 子宮外妊娠の統計的観察(戦前と戦後の比較), 日産婦誌, 10: 939, 1958
- 3) 矢内原啓太郎: 間質部喇叭管妊娠3例並に之が原因としての「アデノミオーシス」"Adenomyosis"に就て, 日産婦誌, 28: 1190, 1933
- 4) 寺尾一水: 間質性喇叭管妊娠の3例に就て, 臨床医学, 7: 1199, 1919
- 5) Hoehne, O.: Die ektopische Schwangerschaft, In Halban, J. und Seiz, L.: Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. 7, II. Teil, S., 597, Urban and Schwarzenberg, 1928
- 6) Sugimoto, O.: Diagnostic and therapeutic hysteroscopy, 184, Igaku-Shoin, 1987
- 7) 伊藤正尚, 市川文雄, 杉本 修: 内視鏡検査からみた卵管間質部妊娠及び頸管妊娠の各症例について, 日産婦内視鏡誌, May: 20, 1985
- 8) 高島英世, 道本知子, 諏訪美鳥, 津田信代, 池内正憲, 小野吉行, 平池秀和, 姫野清子, 浅野 定: 子宮外妊娠診断へのエンドスコピーの応用, 日産婦内視鏡誌, May: 85, 1985

Hysteroscopic diagnosis of interstitial tubal pregnancy: Report of a case

Hiroataka Ota and Masahiro Maki

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

Interstitial tubal pregnancy is rare in ectopic pregnancy. The incidence of the disease is ranging between 0.6-5% of the total tubal pregnancy. When the signs or symptoms of pregnancy are mild or none, it is difficult to differentiate from rudimentary horn pregnancy, Piscacek sign or adnexal tumors. We report here the successful diagnosis of a case with left interstitial tubal pregnancy by hysteroscopy. A 25 year-old female, para 1-0-2-1, consulted a doctor with a complaint of brown vaginal flow since 1/25/87. Her last menses started on 12/29/86. She was diagnosed at the gestation of 6th week. Ultrasonographic examination on 3/18/87 revealed a cystic mass with irregular walls inside along the left uterine fundus, without any sign of a fetus. At this time the urinary hCG titer was 8000U/l. She was transferred to our clinic with a diagnosis of ectopic pregnancy. Hysteroscopic examination on admission exhibited a gestational sac at the left interstitial portion, and a laparotomy was performed to do wedge resection of left interstitial portion. Her postoperative course was uneventful. She was discharged on the 14th postoperative day.

(受付: 1989年4月20日)

副腎皮質ホルモン療法により生児を得た 抗磷脂質抗体症候群合併妊娠の一例

A Pregnancy with the Antiphospholipid Antibody Syndrome Treated by Prednisolone

東海大学医学部産婦人科学教室

松山 毅彦 岩崎 克彦 藤井 明和
Takehiko MATSUYAMA Katsuhiko IWASAKI Akikazu FUJII

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokai University School of Medicine, Kanagawa 259-11, Japan

近年、抗磷脂質抗体〔ループス型循環抗凝血素（LAC）や抗 cardiolipin 抗体（aCL）〕と反復性流早産との関連が注目されている。私達はLACが陽性で、3回の子宮内胎児死亡歴を有する妊婦に対して副腎皮質ホルモンを投与したことにより生児を得ることができたので報告する。症例は30歳、女性。反復する子宮内胎児死亡を主訴として昭和61年4月当科を受診。抗核抗体20倍diffuse型、VDRL（+）、aPTT 48.2秒（対照30.0）、希釈組織トロポプラスチン試験等が陽性を示したことからLACの存在を確認し、抗磷脂質抗体症候群と診断した。昭和62年2月双胎妊娠（7週）と判明。aPTT 58.5秒、IgG-aCL 140GPL（ $N < 5.0$ ）、IgM-aCL 4.9MPL（ $N < 3.0$ ）と高値のためprednisolone（PSL）40 mg/日を開始した。その後aPTTは正常化し、IgG-aCLも低下したが、5月頃より再び上昇傾向を示したためPSLを増量（60 mg/日）し、aspirin（81 mg/日）を併用した。しかしaPTT高値持続と、胎児仮死徴候のため7月6日（妊娠29週）帝王切開術を施行し女児（882g Ap7）および男児（926g Ap6）を得た。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 106-111, 1990)

緒 言

習慣性流早産の原因には、母体側因子としての子宮の器質的異常、内分泌異常、各種感染症や、胎児側因子としての妊卵染色体異常、夫婦間染色体異常などが挙げられているが¹⁾、近年、自己抗体の一つである抗磷脂質抗体（ループス型循環抗凝血素：LACや抗 cardiolipin 抗体：aCL）と反復性流早産との関連が注目されてきている²⁻⁷⁾。今回我々は、LAC及びaCLが陽性で3回の子宮内胎児死亡（24週、24週、25週）の既往歴を有する妊婦に対して副腎皮質ホルモン〔prednisolone（PSL）〕およびacetylsalicylic acid（aspirin）を投与することにより生児を得た症例を経験したので報告する。

症 例

患者 (30歳、女性)
主訴 反復する子宮内胎児死亡
家族歴 母親が胃癌にて死亡している。
既往歴 特記事項なし
妊娠歴 昭和57年、24週で子宮内胎児死亡
 昭和58年、24週で子宮内胎児死亡
 昭和60年、25週で子宮内胎児死亡
検査所見（表1）：末梢血液像ではWBC 3900/ mm^3 、RBC $389 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、Hb 11.7g/dl、platelet $19.4 \times 10^4/\text{mm}^3$ と軽度の白血球減少、貧血を認めた。血清学的検査では、抗核抗体（20倍diffuse型）とVDRLが陽性を示し、凝血学的にはPT 11.2秒（対照10.2）、a-PTT 48.2秒（対照30.0）とa-PTTは

延長していた、内因系凝固因子活性の低下(VIII; 40%, IX; 50%, XI; 35%, XII; 54%)が認められ、希釈組織トロンプラスチン試験(DTTT)を含めたいくつかのLACに対する検査⁸⁾が陽性を示した。

表1 初診時検査所見

Serological studies		Coagulation studies	
CRP	(-)	*PT	11.2 sec (10.2)
*VDRL	(+)	*a-PTT	48.2 sec (30.0)
RA test	(-)	fibrinogen	256 mg/dl
RAHA	(-)	F VIII	40 %
*ANA ×20, diffuse	(-)	F IX	50 %
Anti-DNA	(-)	F XI	35 %
Antibodies to		F XII	54 %
RNP	(-)	Lupus anticoagulant	
Sm	(-)	*APTT 1:1	(+)
SS-A	(-)	*1/5 APTT	(+)
SS-B	(-)	*KCT mix	(+)
direct Coombs'	(-)	*DTTT	(+)
HBs-Ag	(-)	*PNP	(+)
IgG	1677 mg/dl	Anticardiolipin antibodies	
*IgA	361 mg/dl	*IgG-aCL	105 GPL (N<5)
*IgM	385 mg/dl	IgM-aCL	2.8 MPL (N<3)
*C3	49 mg/dl		
*C4	15 mg/dl		

* = abnormal results

Rayne Institute, U. K.より得た標準血清を用いた enzyme-linked immuoadsorbent assay⁹⁾で測定した IgG-aCL は 105GPL (N<5) と著しい高値を示したが、IgM-aCL は 2.8MPL (N<3) と陰性であった。子宮の器質的異常、内分泌異常、各種感染症の所見を認めず、妊卵染色体異常、夫婦間染色体異常も認めなかった。

全身性エリテマトーデス (SLE) 等の膠原病を含めた内科疾患の存在を認めず、SLE とは診断されないが、LAC の存在及び IgG-aCL 高値より反復する子宮内胎児死亡を主訴とする抗磷脂質抗体症候群と診断した。

経 過

昭和 62 年 2 月無月経にて当科を再受診し、双胎妊娠 (7 週) と判明した (図 1)。a-PTT 58.5 秒、IgG-aCL 140GPL、IgM-aCL 4.9MPL と高値を示していたため prednisolone (PSL) 10 mg/日を開始し、妊娠 9 週より 40 mg/日に増量した。その後 a-PTT は正常化し、IgG-aCL の低下も認めていたが、妊娠 21 週頃

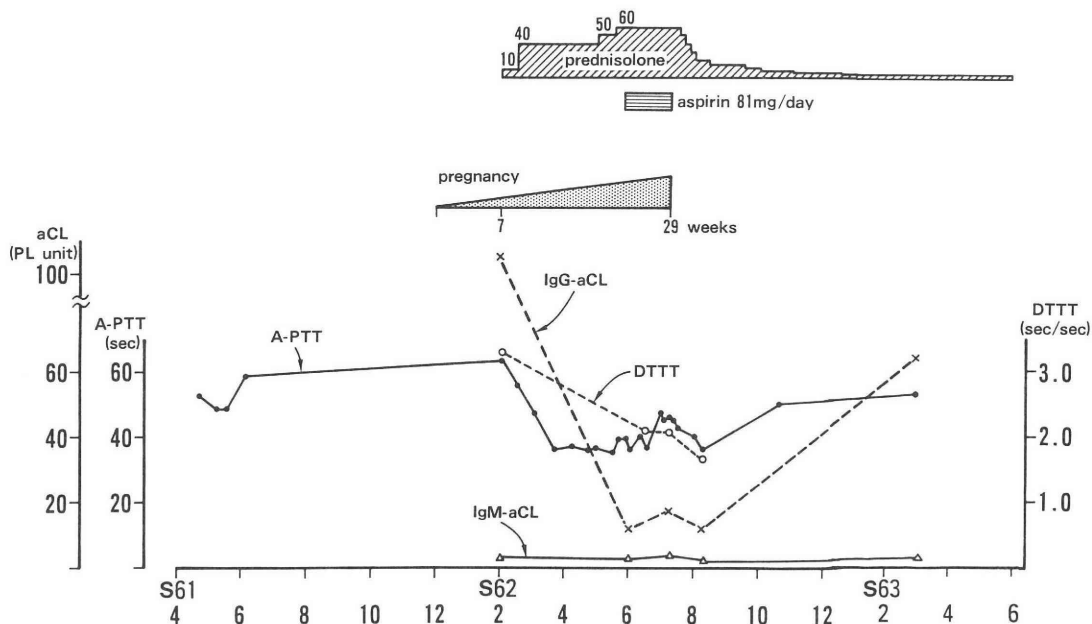


図1 臨床経過

より a-PTT の再上昇傾向を認めたため PSL を増量 (60 mg/日) し、更に aspirin (81 mg/日) を併用した。

超音波計測による推定体重の増加は、両児とも妊娠 22 週頃までは順調であったが、その後やや発育遅延傾向を示した (図 2)。

PSL 増量後も a-PTT は正常値に回復せず、また 7 月 4 日 (妊娠 28 週 6 日) の超音波検査で両児とも子宮内胎児発育遅延 (IUGR) と診断され、胎児水腫と胎盤梗塞を疑う所見も出現してきたため、胎児仮死の診断のもとに 7 月 6 日 (妊娠 29 週 1 日) 帝王切開術を施行し、女兒 (882g, Apgar score 7 点)、男児 (926g, Apgar score 6 点) を娩出した。児には異常を認めず、その後の身体発育、精神・運動の発達についても現在までのところ異常を認めていない。

胎盤は 460 g で肉眼的に臍帯の辺縁付着を認めたが病理組織学的検索では梗塞や血管炎の所見はなく、免疫酵素抗体法でも免疫グロブリンの沈着を認めなかった。

また、分娩時の母体血では IgG-aCL 17.5GPL, IgM-aCL 3.1MPL とともに低値ではあるが異常値を示していた。しかし臍帯血の aCL 抗体価は正常値を

示した (表 2)。

母体に投与していた PSL は、児娩出後より比較的急速に減量でき、昭和 63 年 6 月より中止することができた。PSL の副作用に関しては妊娠中を含め認められなかった。一方、母体血 aCL 抗体価は PSL 減量に伴い再上昇し、a-PTT も 51.6 秒と再び妊娠前値に近づいた。母体の全身状態は以後良好で、現在までのところ膠原病の発症は認められていない。

考 察

LAC は、個々の凝固因子の活性を抑制せずに、磷脂質依存性の凝固検査を阻害する免疫グロブリンと定義されている¹⁰⁾。LAC は、a-PTT、血漿混合試験による a-PTT 測定、カオリン凝固時間などのスクリーニングテストや、各種凝固因子活性の定量検査により検出される^{8,11)}。

一方、Radioimmunoassay (RIA)¹²⁾、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{9,13)} により aCL を特異的かつ鋭敏に測定することが可能となり、aCL 抗体陽性例に動静脈血栓症、血小板減少症、

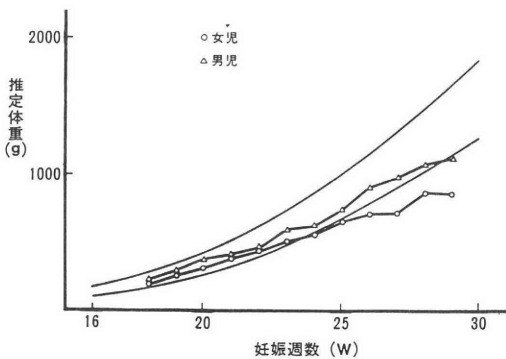


図 2 推定体重

表 2 Anticardiolipin antibodies in maternal and cord blood sera at the time of delivery

	maternal serum	cord blood sera	
		I	II
aCL			
IgG-aCL(GPL)	17.5	1.70	0.87
IgM-aCL(MPL)	* 3.1	0.18	0.20
immunoglobulins			
IgG (mg/dl)	958	457	304
IgA (mg/dl)	438	<7	<7
IgM (mg/dl)	383	<7	<7

表 3 抗リン脂質抗体症候群における臨床特徴

1. 動静脈血栓症

静脈血栓……深部静脈血栓、腎静脈血栓、網膜中心静脈血栓、下大静脈血栓、Budd Chiari 症候群、腋窩静脈血栓など

動脈血栓……脳血管障害 (脳梗塞、一過性脳虚血発作)、心筋梗塞、肺梗塞、網膜中心動脈血栓、末梢動脈閉塞・皮膚壊疽、腎動脈血栓、腸間膜動脈血栓など

その他……肺高血圧症、大腿骨頭無菌性壊死

2. 習慣性流産 (子宮内胎児死亡)

胎盤梗塞

3. 血小板減少症

4. その他の臨床症状

偏頭痛、舞蹈病、てんかん、

Livedo reticularis、

Guillain-Barré 症候群、脊髄炎、

(?) 心内膜疾患、

(?) 痴呆 (反復する脳動脈血栓による)

5. その他の検査成績

凝固能異常、

クームス試験陽性、

抗ミトコンドリア抗体、

LAC 陽性, VDRL 陽性を高率に認めたとする報告があり¹²⁾, 1986 年には Hughes, Harris らが, “抗 cardiolipin 症候群”という疾患概念を提唱した¹⁴⁾. しかし, 他の陰性荷電を有する磷脂質に対する抗体も同時に認められることから¹⁶⁾抗磷脂質抗体症候群とも呼ばれている^{17,18)}.

抗磷脂質抗体症候群の臨床特徴は, 動静脈血栓症, 習慣性流産(子宮内胎児死亡), 血小板減少症などである(表3)¹⁵⁾. また, 抗磷脂質抗体の isotype は, IgG, IgM, IgA のいずれもが血清中に検出される^{9,16,19)}. とくに, 高力価の IgG-aCL が本症候群の特異症状[動静脈血栓症, 習慣性流産(子宮内胎児死亡), 血小板減少症, クームス試験陽性]の出現と関連しているとの報告がある^{18,20,21)}.

1975 年, Nilsson らは, 習慣性流産を有する例に凝固能異常と胎盤梗塞を認めたと報告した²²⁾. その後, LAC 陽性例に習慣性流産(子宮内胎児死亡)が多く見られるといういくつかの報告が見られ²⁻⁷⁾, また aCL 抗体陽性例に自然流産が多いとする報告も多い²³⁻²⁷⁾. その原因としては, 抗磷脂質抗体による胎盤血管の血栓形成(胎盤梗塞), 抗磷脂質抗体が胎盤のリン脂質と反応し, 胎盤の発育を抑制することなどが考えられている²⁴⁾.

治療法としては, Lubbe らが PSL と aspirin の併用療法により, 凝固能異常の改善, 流産の予防が認められたと報告^{28,29)}して以来, この併用が有効と考えられてきた^{18,20)}. PSL 投与により, aCL 抗体価, LAC 活性の低下の見られるとする報告も多い¹²⁾. しかし, 凝固能が改善しても子宮内胎児死亡が認められた症例も報告されている^{30,31)}.

本症例では反復する子宮内胎児死亡と a-PTT の延長により抗磷脂質抗体症候群を疑い各種検査を施行し診断することができ, Lubbe らの方法に準拠して治療を行なった. その結果, 生児を得ることができた. しかし, PSL の投与により aCL 抗体価および LAC 活性の低下が認められるとする報告から考えると, 妊娠前より PSL 投与を開始したほうがよいと考えられるが, 本症例では PSL の総投与量の減量を考えて, 妊娠初期からの投与とし, a-PTT を PSL 投与量の目安とした. しかし, 妊娠 21 週を過ぎる頃より PSL 投与量が 60 mg/日に達したにもかかわらず, a-PTT の延長傾向が出現してきたため, aspirin の投与を追加した. Lubbe らの治療法に準ずるとこれ以上薬剤の投与量を増加することが難しいことと, 胎盤病変によると考えられる子宮内胎児発育遅延も出現してきたため, 産科的適応も考慮して娩出時期を慎重に決定することとした. 結局本症例では, 妊娠 29 週 1 日

にて胎盤梗塞・胎児仮死の適応にて児を娩出させた. 胎盤には臍帯の辺縁付着はあったが肉眼的にも顕微鏡的にも梗塞などの病変は認められず, このことが治療効果に関連しているかどうかは不明である.

本症例の場合, さらに病態を複雑にしたのは双胎妊娠という点であった. 双胎は子宮内胎児発育遅延(IUGR)になりやすく胎児仮死の原因ともなりうるため, 特に妊娠 20 週以降の病態の分析が困難であった. 児娩出の適応となった病態の本態が抗磷脂質抗体症候群のためか, 双胎のためか, あるいはその両方によるのかは梗塞等の胎盤病変が認められなかったこともあり確定しがたい.

本症例では, a-PTT の変動をマーカーとすることにより生児を得ることができたと考えられるが, 私達は以前に LAC 陽性 SLE 患者の妊娠例で, a-PTT の変動をマーカーに PSL 量を決定したにもかかわらず妊娠中期に子宮内胎児死亡に終わった例を経験している³²⁾. この症例でもやはり胎盤病変を認めなかった. 前述のごとく諸家の報告によれば妊娠中の PSL 投与により抗磷脂質抗体が抑制され妊娠の維持・生児の分娩に成功したとするものから, PSL, aspirin 投与にもかかわらず病勢が悪化し流産をおこしたとするものまでその成績は種々であり, 抗磷脂質抗体症候群の病型にはいくつかのタイプがあると考えられる. 本症例は前 3 回の早産(死産)時期に一致するように病勢の悪化を見ており後者のタイプと思われた. いずれにしても抗磷脂質抗体症候群で生児を得るためには, 妊娠中の病勢の把握と的確な管理, 治療が重要と思われた.

結 語

習慣性流産の原因の一つとして考えられている抗磷脂質抗体を有する症例では, 流産防止のため aPTT や aCL 抗体価を指標とする副腎皮質ホルモン治療が有効である可能性を示唆した.

本稿をまとめるにあたり助言をいただいた東海大学第 4 内科, 市川幸延, 有森 茂, 同輸血センター小林信昌, 同中検血液, 川田勉の各氏に感謝します.

文 献

- 1) 八神喜昭: 習慣流産の診断と治療, 産婦治療, 56: 264, 1988
- 2) Hughes, G. R. V.: Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant, Br. Med. J., 287: 1088, 1983
- 3) Lubbe, W. F., Butler, W. S., Palmer, S. J. et al: Lupus anticoagulant in pregnancy, Br. J. Obstet. Gynaecol., 91: 357, 1984

- 4) Scott, J. S.: Connective tissue disease antibodies and pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 6: 19, 1984
- 5) Branch, D. W., Scott, J. R., Kochenour, N. K. et al: Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant, *N. Engl. J. Med.*, 313: 1322, 1985
- 6) Gleicher, N., Friberg, J.: IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual aborters, *J. Am. Med. Assoc.*, 253: 3278, 1985
- 7) Lubbe, W. F., Liggins, G. C.: Lupus anticoagulant and pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 153: 322, 1985
- 8) Ichikawa, Y., Kawada, T., Simizu, H., Moriuti, J., Takaya, M., Arimori, S.: Detection of Lupus anticoagulant (LAC) by various coagulation tests and clinical significance of LAC in systemic lupus erythematosus, *Jpn. J. Rheumatol.* (in press)
- 9) Kobayasi, N., Ichikawa, Y., Kawada, T., Watanabe, K., Arimori, S.: Antiphospholipid antibodies determined by ELISA: Their reactivities, isotypes and association with lupus anticoagulant, *Jpn. J. Rheumatol.* (in press)
- 10) Shapiro, S. S., Thiagarajan, P.: Lupus anticoagulants, *Prog. Hemost. Thromb.*, 6: 263, 1982
- 11) 村上 博: Lupus anticoagulants, *Immunohaematology*, 8: 333, 1986
- 12) Harris, E. N., Gharavi, E. A., Boey, M. L. et al: Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus, *Lancet*, 2: 1211, 1983
- 13) Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H. et al: Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.*, 56: 193, 1984
- 14) Hughes, G. R. V., Hariss, E. N., Gharavi, A. E.: The anticardiolipin syndrome, *J. Rheumatol.*, 13: 486, 1986
- 15) Kaburaki, J.: 抗リン脂質抗体症候群, *リウマチ*, 28: 379, 1988
- 16) Gharavi, A. E., Harris, E. N., Asherson, R. A. et al: Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity, *Ann. Rheum. Dis.*, 46: 1, 1987
- 17) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Hughes, G. R. V.: Antiphospholipid antibodies, *Clin. Rheum. Dis.*, 11: 591, 1985
- 18) Harris, E. N., Hughes, G. R. V., Gharari, A. E.: Antiphospholipid antibodies: An elderly statesman dons new garments, *J. Rheumatol.*, 14 (Suppl 13): 208, 1987
- 19) Weidmann, C. E., Wallase, D. J., Peter, J. B. et al: Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in systemic lupus erythematosus, *J. Rheumatol.*, 15: 74, 1988
- 20) Harris, E. N., Chan, J. K. H., Asherson, R. A. et al: Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia: predictive value of the anticardiolipin antibody test, *Arch. intern. Med.*, 146: 2153, 1986
- 21) Meyer, O., Piette, J. C., Eourgeois, P. et al: Antiphospholipid antibodies: a disease marker in 25 patients with antinuclear antibody negative systemic lupus erythematosus (SLE), Comparison with a group of 91 patients with antinuclear antibody positive SLE, *J. Rheumatol.*, 14: 502, 1987
- 22) Nilsson, I. M., Astedt, B., Hedner, U. et al: Intrauterine death and circulating anticoagulant ("Antithromboplastin"), *Acta. Med. Scand.*, 197: 153, 1975
- 23) Derue, G. J., Englert, H. J., Harris, E. N. et al: Fetal loss in systemic lupus: association with anticardiolipin antibodies, *J. Obstet. Gynecol.*, 5: 207, 1985
- 24) Lockshin, M. D., Druzin, M. L., Goei, S. et al: Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.*, 313: 152, 1985
- 25) Cowchock, S., Smith, J. B., Gocial, B.: Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 155: 1002, 1986
- 26) Lockwood, C. J., Reece, E. A., Romero, R. et al: Anti-phospholipid antibody and pregnancy wastage, *Lancet*, 2: 742, 1986
- 27) Lockshin, M. D., Qamar, T., Druzin, M. L. et al: Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant, and fetal death, *J. Rheumatol.*, 14: 259, 1987
- 28) Lubbe, W. F., Butler, W. S., Palmer, S. J. et al: Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus anticoagulant, *Lancet*, 1: 1361, 1983
- 29) Lubbe, W. F., Walker, E. B.: Chorea gravidarum associated with circulating lupus anticoagulant: successful outcome of pregnancy with prednisone and aspirin therapy, Case report, *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 90: 487, 1983
- 30) Feinstein, D. I.: Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss, *N. Engl. J. Med.*, 313: 1348, 1985
- 31) Hedfors, E. V. A., Lindahl, G., Lindblad, S.: Anticardiolipin antibodies during pregnancy, *J. Rheumatol.*, 14: 160, 1987
- 32) 市川幸延, 高屋正敏, 野崎弘幸, 川田 勉, 内山光昭, 清水宏明, 山内邦彦, 守内順子, 有森 茂: 膠原病患者に見られるループス型循環抗凝血素

(Lupus anticoagulant)と反復性流産、リウマチ、
25:87, 1985

**A pregnancy with the
antiphospholipid antibody
syndrome treated
by prednisolone**

Takehiko Matsuyama, Katsuhiko Iwasaki
and Akikazu Fujii

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokai University School of Medicine,
Kanagawa 259-11, Japan

Recently, the relationship between antiphospholipid antibodies, such as the Lupus anticoagulant (LAC) and anticardiolipin antibody (aCL), and habitual abortion has attracted interest. We experienced a patient who was LAC positive and a history of three intrauterine fetal deaths. The patient was treated with prednisolone (PSL), which resulted in live birth. She was 30 years old, and

came to our clinic complaining of habitual intrauterine fetal deaths in April 1986. We diagnosed the antiphospholipid antibody syndrome based on the positive LAC data: antinuclear antibody, 20-fold, diffuse type; VDRL, positive; aPTT, 48.2 sec (30.0 sec in controls), and dilute tissue thromboplastin test, positive. Pregnancy was diagnosed in February 1987, and it was twins. Her laboratory data showed high levels such as aPTT, 58.5 sec; IgG-aCL, 140GPL (N<5.0), and IgM-aCL, 4.9MPL (N<3.0). Oral PSL treatment was started at 40 mg/day. aPTT and IgG-aCL soon recovered but they became worse again from May. The dose of PSL was increased to 60 mg/day and aspirin was also administered at 81 mg/day. aPTT continued at an abnormally high level, and signs of fetal distress appeared. Therefore, a Cesarean section was performed on July 6, in 29th gestational week. The patient gave birth a female weighing 882g, Apgar score 7; and a male weighing 926g, Apgar score 6. Both mother and children have been doing well.

(受付:1989年2月28日)

当科における習慣流産の検査成績と 夫リンパ球を用いた免疫療法による治療成績

Habitual Abortion: Parental Sharing of HLA and Immunotherapy

大阪大学医学部産科婦人科学教室

鮫 島 義 弘	亀 田 隆	木 村 正
Yoshihiro SAMEJIMA	Takashi KAMEDA	Tadashi KIMURA
徳 川 吉 弘	脇 本 昭 憲	大 橋 一 友
Yoshihiro TOKUGAWA	Akinori WAKIMOTO	Kazutomo OHASHI
古 山 将 康	松 崎 昇	東 千 尋
Masayasu KOYAMA	Noboru MATSUZAKI	Chihiro AZUMA
佐 治 文 隆	谷 澤 修	
Fumitaka SAJI	Osamu TANIZAWA	

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

- 1) 習慣流産患者 51 例に種々の検査を行ったところ、HSG 上の子宮形態の異常を認めた患者 4 例、黄体機能不全 2 例、不規則性抗体陽性 2 例、ループスアンチコアグラント陽性 1 例、原因不明 42 例であった。
- 2) 42 例の原因不明習慣性流産患者のうち、夫婦間で HLA クラス II 抗原を 2 つ以上共有する患者が 27 例 (64.3 %) あった。
- 3) 26 例に夫リンパ球を用いた免疫療法を施行し、このうち 15 例が妊娠した。妊娠した 15 例中 13 例が妊娠の維持に成功した。(成功率 86.7 %)

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 112—119, 1990)

緒 言

習慣流産は、その原因として子宮の器質的異常、内分泌学的異常、感染症、染色体異常等多くの要因が挙げられる。しかし、実地臨床上多くの場合は種々の検査によっても原因を特定できない、いわゆる原因不明習慣流産である。

近年、着床とそれにつづく妊娠の維持を一つの移植としてとらえる試みがなされ、そこに免疫学的な機構の関与が考えられてきた。そして、原因不明習慣流産の中に免疫学的妊娠維持機構の破綻によるものの存在が考えられた。

一方、ヒトリンパ球抗原 (HLA) は、自己・非自己の認識を通じて免疫応答において重要な役割を果たし、さらに、主要組織適合抗原として移植免疫に大きく関与していることが明らかにされてきた。

そこで、免疫学的妊娠維持機構の破綻としての原因不明習慣流産と HLA の関係が注目され、原因不明習慣流産患者夫婦は正常夫婦に比べて多くの HLA を共有しているとの報告がなされた。しかし、いまだ結論は出ていない。

妊娠における免疫の関与について研究が進められる中、1981 年 Taylor ら¹⁾および Beer ら²⁾により、原因不明習慣流産患者に対するリンパ球を用いた感作

療法が報告された。その後、Mowbray ら³⁾の報告をはじめとして、本療法の有効性に関する報告が多数なされている⁴⁻⁸⁾。当科においても、Beer らの報告に準じた方法により、原因不明習慣流産患者に対する免疫療法を試みており、良好な成績を得ている。

ここに、習慣流産患者51例の検査成績と夫リンパ球を用いた免疫療法による治療成績について報告し、さらに、原因不明習慣流産患者夫婦におけるHLAの共有について文献の考察を加える。

方 法

【対象】連続した3回以上の流産の既応のある患者を習慣流産患者として扱った。

昭和58年12月から昭和63年11月までの間に当科を受診した習慣流産患者51例を検討の対象とした。

【検査】習慣流産患者に対して、その原因を検索するために、以下の検査を行った。

- ①一般検血、検尿、生化学検査
- ②耐糖能検査：空腹時血糖値、ヘモグロビン Alc、(必要があれば75 g OGTT)
- ③血液型、不規則抗体検査
- ④感染症に関する検査：梅毒 (TPHA, RPR 定性)、TORCH、B型肝炎ウイルス、クラミジア
- ⑤内分泌学的検査：卵巣機能 (基礎体温、血中 LH、FSH、PRL、黄体中期血中プロゲステロン)、甲状腺機能 (T3、T4、TSH)
- ⑥止血検査 (PT, A-PTT、線溶、FDP、フィブリノーゲン、ヘパラスチンテスト、Lupus Anticoagulant)
- ⑦自己免疫疾患に関する検査：抗核抗体、LE テスト、リウマチ因子、血清補体価
- ⑧形態学的検査：子宮卵管造影検査 (HSG)、超音波検査
- ⑨夫婦の染色体検査
- ⑩夫婦の HLA：クラス I (A、B、C 座) およびクラス II (DR、DRw 52・53、DQ 座)

【免疫療法の適応】習慣流産患者のうち、次の3項目をすべて満たす例を免疫療法の適応の原則とした。

- 1) 妊娠12週未満の初期の流産を3回以上連続して繰り返している。
- 2) 先にあげた諸検査で異常を認めない。
- 3) 夫婦間で、2つ以上の HLA クラス II 抗原を共有している。

【免疫療法の実際】夫のヘパリン加静脈血100mlから、Ficoll-Paque を用いた比重遠沈法により末梢血単核球を分離し、これをリン酸緩衝液にて4回洗浄した。次いで、X線を2000rad照射して細胞を不活化した

後、リン酸緩衝液で細胞を数回洗浄した。得られた夫の不活化末梢血単核球の全て ($5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個) を、生食約0.5mlに浮遊し、患者 (妻) の前腕内側の数カ所に皮内注射した。

免疫は、妊娠前に3-4週の間隔で2回行い、妊娠が明らかになった時点 (妊娠4-6週) で1回追加した。なお、妊娠するまでの間は、3-4カ月毎に追加免疫を行った。

【免疫効果の判定 (夫婦間リンパ球混合培養反応抑制試験)】免疫効果の判定は、夫婦間のリンパ球混合培養反応を行い、この反応系に患者 (妻) の血清を加えて、その抑制効果をみることで行った。

具体的には、夫婦各々のヘパリン加静脈血より、Ficoll-Paque を用いた比重遠沈法によって末梢血単核球を分離し、これをリン酸緩衝液で洗浄した。夫の末梢血単核球はマイトマイシンC ($50 \mu\text{g/ml}$, 30分) 処理を行って不活化した後に、再度リン酸緩衝液で十分に洗浄した上で stimulator cell として用いた。妻の末梢血単核球を responder cell として、一方のリンパ球混合培養反応を行った。

responder, stimulator 各々 1×10^5 個ずつの細胞を、96穴U底 microtiter plate の各穴に分注し、これに非働化した妻血清または対照血清を25%の最終濃度で加えて、全量を $200 \mu\text{l}$ とした。なお、対照血清としては健康成人男子 AB 型血清を用いた。

これを 37°C で72時間培養した後、各穴当り $0.5 \mu\text{Ci}/20 \mu\text{l}$ の ^3H -thymidine を添加した上で、さらに18時間培養した。次いで、各穴の細胞を回収し、細胞内に取り込まれた ^3H -thymidine の量を、液体シンチレーションカウンターで測定した。

測定値を次の式に代入し、リンパ球混合培養反応抑制値 (blocking effect: BE) を算出した⁶⁾。

$$\text{BE} = \left(1 - \frac{\text{mean cpm of culture in tested serum}}{\text{mean cpm of culture in control AB serum}} \right) \times 100 \%$$

結 果

【初診時年齢】今回検討した51例の習慣流産患者の初診時の年齢を調べたところ、23歳から38歳に広く分布していた。初診時の年齢が38歳の患者の初回流産時の年齢は26歳であった。また、他の患者についても流産がすべて35歳以降のものである患者は認められなかった。従って、今回検討した患者群の年齢が特に高いとは考えられない。

【既往歴】流産に結びつくと思われる既往歴を有している患者は、子宮筋腫核出術を受けていた1例のみであった。この1例は、HSGでも子宮内腔の形態に異常が認められた。

【妊娠歴】流産の回数の最も多い患者は、5回の流産の既往を有していた。

流産を反復する以前に流産以外の妊娠の既往のある患者は16例あり、このうち正期産の既往のある患者が8例、早産の既往のある患者が1例、胎状奇胎の既往のある患者が3例、人工妊娠中絶術を受けた既往のある患者が6例あった。(1例重複)

【検査結果】先にあげた諸検査の結果認められた異常の種類とその頻度を表1に示した。51例中9例(17.6%)に何らかの異常が認められた。

検査で異常を認めた9例のうち最も多かったのは、HSG上の子宮形態の異常の4例(7.8%)であった。このうち1例は、先の述べた子宮筋腫核出術の既往のある患者である。他の患者は、単角子宮1例、双角子宮1例、子宮体部左側に原因不明の陰影欠損の認められる患者が1例であった。Stray-Pedersen ら⁹⁾は195例の習慣流産患者のうち30例15.4%に子宮形態の異常を認めたと報告している。我々の成績は、これに比しやや低い頻度であった。

不規則性抗体陽性患者が2例あり、そのうち1例は、流産との関係が強いといわれている抗P抗体¹⁰⁻¹²⁾を有しており、他の1例は抗P₁抗体を有していた。後者は、流産との関連性は低いとされている。

また、ループスアンチコアグラント陽性患者が1例あった。

黄体機能不全の患者は2例(3.9%)認められた。Stray-Pedersen ら⁹⁾の報告では、195例中6例3.1%に黄体機能不全が認められたとし、我々の成績とはほぼ同様の結果を示している。一方、Daya ら¹³⁾は、連続した2-9回の流産歴を持つ患者のうち40%と高率に黄体機能不全を認め、そのうちの81%が治療により妊娠の維持に成功したと報告している。

以上の9例を除いた残りの42例には、種々の検査によっても、流産の原因となる異常は認められなかった。

なお、今回検討した患者群の中には、夫婦の染色体に異常の認められた例はなかった。また、近親者に染色体異常が認められる例や、以前に染色体異常児を出産した例も認められなかった。Portnoi ら¹⁴⁾の報告によれば、3回以上の自然流産の既往を有する原発性習慣流産患者349例中14例4.0%に夫婦の少なくとも一方に染色体の異常を認めたとする。また、Stray-Pedersen ら⁹⁾は、習慣流産患者195例中5例2.6%に染色体異常を認めたと報告している。

【原因不明習慣流産患者の夫婦間のHLAの共有数の検討】検査で異常を認めなかった42例について夫婦のHLAのクラスI(A, B, C座)およびクラスII

(DR, DRw 52・53, DQ座)のタイピングを行い、その夫婦間の一致数を調べた。(表2, 3)

HLAクラスIでは、最高4個の一致を認めたが、26例(61.9%)は1個以下の一致しか認めなかった。(表2)各座毎に少なくとも1つ以上共有している夫婦の割合をみると、特にA座の共有率が27/42(64.3%)とB座の10/42(23.8%), C座の13/42(31.0%)と比較して高かった。(表3)

HLAクラスIIに関しては、最高5個の一致を認めた患者が1例あり、2個以上一致した患者が27例(64.3%)を占めた。(表2)特にDR座に関しては、19例(45.2%)が少なくとも1個の共有を認めた。(表3)

【免疫療法】検査で異常を認めなかった42例のうち、先に示した免疫療法の適応条件を満たした患者は27例あった。このうち26例に免疫療法を施行した。免疫療法を施行した26例のうち現在までに15例が妊娠し、そのうち13例が初期流産の予防に成功した。

表1 習慣流産患者の検査結果

HSG上の子宮形態異常を認める	4
不規則性抗体陽性	2
ループスアンチコアグラント陽性	1
黄体機能不全	2
特に異常を認めない	42
計	51

表2 原因不明習慣流産患者の夫婦間のHLA各クラスの共有数

共有数	クラスI	クラスII
0	8	4
1	18	11
2	10	8
3	5	11
4	1	7
5	0	1
6	0	0
計	42	42

表3 原因不明習慣流産患者におけるHLAを共有する夫婦数

共有数	A	B	C	DR
0	15	32	29	23
1	21	9	12	18
2	6	1	1	1
計	42	42	42	42

しかし、2例が流産した。従って、現在までの初期流産予防成功率は86.7%である。(表4)

初期流産の予防に成功した13例のうち7例が既に分娩を終えて生児を得ている。これら7例はいずれ

表4 原因不明習慣流産患者に対する免疫療法の成績

免疫療法施行例	26
免疫療法後に妊娠した例	15
妊娠維持成功例	13
分娩後	7
妊娠経過中	6
流産例	2

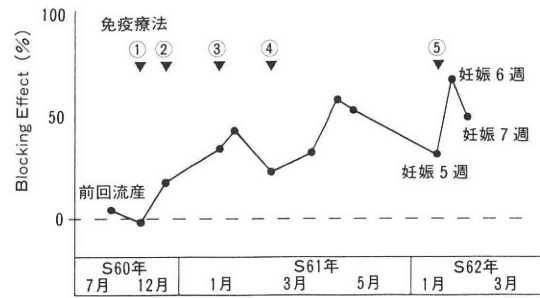


図1 習慣流産患者の夫婦間リンパ球混合培養反応に対する患者血清の抑制効果の推移

表5 免疫療法後に出生した新生児

症例	分娩時妊娠週数	出生時体重(g)	アプガースコア	性別	外表奇形	分娩時の異常
1	38w1d	2880	9/9	女	なし	なし
2	38w5d	3110	10/10	男	なし	なし
3	39w2d	3270	9/9	男	なし	なし
4	39w5d	2930	8/9	女	なし	なし
5	40w2d	3550	8/9	男	なし	なし
6	38w5d	2940	9/9	女	なし	骨盤位
7	40w4d	3510	8/9	男	なし	なし

表6 HLA を共有する夫婦数

	習慣流産群				対 照 群			
	A	B	C	DR	A	B	C	DR
Lauritsen (1976)	—	—	—	—	22/35	11/35	—	—
Komlos (1977)	5/8	3/8	—	—	3/7	1/7	—	—
Gerencer (1979)	—	—	—	—	20/79	20/79	—	—
Taylor (1981)	3/4	3/4	2/4	3/4	—	—	—	—
Beer (1981)	10/10	4/10	1/10	4/9	3/14	1/14	0/14	2/14
Aoki (1982)	—	—	—	—	26/45	10/45	—	11/45
McIntyre (1983)	8/20	7/20	2/20	7/20	4/12	5/12	2/12	1/12
Oksenberg (1983)	11/33	7/33	—	—	13/30	9/30	—	—
Caudle (1983)	3/12	3/12	2/12	2/10	17/39	8/39	—	—
Unander (1983)	7/8	1/8	1/8	7/8	0/2	1/2	0/2	0/2
Bolis (1984)	10/20	8/20	4/20	—	2/20	3/20	1/20	—
Reznikoff (1984)	9/20	8/20	8/20	14/20	19/32	4/32	15/32	6/32
Vanoli (1985)	22/47	12/47	6/47	8/47	23/65	13/65	2/20	1/17
Thomas (1985)	6/16	6/16	—	6/16	9/21	5/21	—	3/21
Takakuwa (1986)	12/18	4/18	7/18	13/18	11/13	2/13	4/13	3/13
Balasch (1986)	2/10	4/10	—	1/9	26/57	22/57	—	24/57
大阪大学 (1988)	27/42	10/42	13/42	19/42	—	—	—	—
計 (%)	135/268* (50)	80/268 (30)	46/201 (23)	84/203** (41)	202/483* (42)	117/483 (24)	26/122 (21)	51/213** (24)

* P = 0.025 で有意差あり ** P = 0.005 で有意差あり

も正期産で、新生児には外表奇形など特記すべき異常は認められず、出生時体重も全員正常範囲内であった。1例の骨盤位を除いて分娩時にも特に異常はなく、アプガースコアも正常であった。また、男女比のかたよりも認められなかった。(表5)

なお、患者本人にも、皮内注射部位の発赤・腫脹と掻痒感以外には、特記すべき副作用は認められなかった。

【夫婦間リンパ球混合培養反応抑制試験】免疫の効果は、先に述べた方法で夫婦間リンパ球混合培養反応抑制試験を行って判定した。図1に代表的な症例6の抑制値の推移を示した。夫白血球を免疫することによって、妻の血液中に夫婦間のリンパ球混合培養反応を抑制する因子が形成されており、免疫の効果が出ていることがわかる。

考 察

習慣流産は、その原因となりうる要因は数多く知られているが、実際に個々の患者についてその原因を特定できる割合は少ない。当科でも種々の検査を行ったが、51例中42例(82.4%)はその原因が特定できず、いわゆる原因不明習慣流産患者であった。

検査で異常の認められなかったいわゆる原因不明習慣流産患者42例に関して、夫婦間のHLAの共有数を調べた。(表2、3)クラスIに関しては、A座に比較して、B、C座において共有率が低かった。その原因は、B座に関しては、そのタイプの多様性のためと思われる。実際現れたタイプのは、A座8種、B座21種であった。C座に関しては、多様性は低いもののblankが多いために、A座に比し共有率が低くなっているものと考えられた。

HLAクラスIIについてみると、DRw 52・53およびDQ座に関しては、タイプの多様性が低いため、当然ながら夫婦間の共有率も高くなっていた。DR座に関しては、14種類のタイプが認められ、19例45.2%が少なくとも1個の共有を示した。

習慣流産におけるHLAの共有性の意義については、数多くの報告がみられるが、いまだはっきりとした結論は出ていない。その原因の一つとして、各々の報告における検討対象の条件が一定でないことがあげられる。そこで、次のような条件で過去の報告^{1-3,6,8,15-27)}を検討しなおした。すなわち、1)連続3回以上自然流産を反復した習慣流産患者である。2)少なくともその報告の時点で原因不明である。3)原発性、続発性は問わないが、2人以上の子供を有するものは除く。以上の3条件を満たすように、各々報告を修正あるいは削除した。また、対照群も

少なくとも1人以上の子供を有しており、流産の既往のないものという条件のもとに統一を試みた。条件をそろえたことで、各報告の結果を加算して検討することが可能になる。その結果を表6に示した。

A、B、C、DR各座について、少なくとも1つ以上共有する夫婦の数を示した。合計を χ^2 検定と比較すると、A座は有意水準0.025、DR座は有意水準0.005で、原因不明習慣流産患者群の方が対照群よりもHLAを共有する夫婦の割合が有意に高かった。B、C座については原因不明習慣流産群と対照群の間に有意な差は認められなかった。

今後さらにprospectiveな検討や、あるいはHLAの共有数と免疫療法の成績を比較するなどの方法により、HLAの共有の意義について検討を加えていく必要があるものと考えられる。

免疫療法の適応に関しては、種々の報告¹⁻⁸⁾がみられるが、免疫療法の作用機作が不明である現時点においては、いたずらにその適応を広げることは、その成績を評価する上でかえって混乱を招くことになりかねない。そういう意味で、免疫療法の適応を妊娠12週未満の初期の流産を3回以上連続して繰り返した原因不明の習慣流産患者に限ることは、重要なことと考える。その限られた範囲の中で成績を検討することにより、真の適応条件が、さらには作用機作が明らかになっていくものと考えられる。

今回我々が示したもう1つの適応条件であるHLAの共有に関しては、先に述べたように、今後検討を要する問題であると考えられる。

免疫療法の実施方法についても、報告者¹⁻⁸⁾によって異なっているのが現状である。免疫原については、夫リンパ球を用いる報告者^{2-4,6,8)}と、第三者リンパ球を用いる報告者^{1,5,7)}と、その他絨毛細胞膜分画等を用いる報告者²⁸⁾とに分けられる。Denegriら²⁹⁾は、夫リンパ球を用いる方法では、患者(妻)の血液型がRh陰性であった場合に実施できないという点を、夫リンパ球を用いる方法の欠点としてあげている。しかし、本邦においてはRh陰性の頻度は低く、一般的な心理的抵抗性や感染症の問題、費用の面などを考慮すれば、成績に著しく差がないならば、夫リンパ球を用いる方がよいと考えられる。実際、Aokiら⁸⁾、Takakuwaら⁶⁾も夫リンパ球を用いている。

リンパ球の精製度および投与経路に関しても種々の報告がみられるが、我々やTakakuwaら⁶⁾が行っているように、単核球を分離・洗浄して皮内あるいは皮下に投与する方が、完全に分離せずに他の大量の血液成分と共に静脈内に投与するよりも、副作用が少ないものと考えられる。

さらに、免疫の時期についても、報告者によって、妊娠前のみ、妊娠後のみ、妊娠前後両方共に行うのは3通りに分けられる。我々は妊娠前後の両方に行っているが、Mowbray ら³⁰⁾は、妊娠後のみの免疫でも妊娠前から免疫していた場合と変わらない成績で流産を十分に阻止でき、特に妊娠40日までに免疫を行えば非常に良好な成績で流産を阻止できたと報告している。また、Aoki ら⁸⁾も妊娠後(妊娠6-8週)のみの免疫で十分に流産を阻止できると報告している。妊娠前の免疫の必要性あるいは妊娠何週までに免疫を行えばよいのか、免疫療法の作用機作との関連において、今後さらに検討を要する問題と考えられる。

夫リンパ球の皮内接種による免疫の効果は、夫婦間リンパ球混合培養反応抑制試験を行い、その抑制値の増減で判定した。この抑制効果そのものが流産を予防する要因であるかどうかは不明であるが、抑制値の変動をみることにより、免疫そのものの効果判定は行えると考えている。

図1に示した例のように、免疫を行うことにより抑制値の上昇がみられ、他の例でも同様の推移が認められた。しかし、流産した2例については抑制値の上昇がなく、夫リンパ球による感作そのものが充分ではなかったものと考えられた。

免疫療法の成績は、免疫療法施行後に妊娠した15例のうち妊娠の維持に成功したものが13例で、成功率は87%であった。Beer ら³¹⁾の79%、Mowbray ら³⁰⁾の74%、Aoki ら⁸⁾の85%、Takakuwa ら⁶⁾の71%とほぼ同様の良好な成績が得られた。

Mowbray ら³⁾は、患者自身の白血球を免疫した群を対照として randomized study を行い、免疫療法の有効性を検討している。それによると、夫の白血球を投与した群の流産阻止率は20/25 (80.0%)であり、患者自身の白血球を投与した対照群の流産阻止率(10/27, 37.0%)より有意に高かったという。我々の成績も、彼らの対照群に比し有意に高い流産阻止率であった。(有意水準0.005)

先に述べたように、流産した2例に関しては、免疫そのものの効果も不十分であったと思われるが、そのうちの1例については、絨毛細胞の染色体の分析で第21染色体のトリソミーが認められた。

13例の妊娠維持成功例のうち7例は既に分娩を終えており、これら7例の新生児は出生時体重、アプガースコア等に異常はなく、外表奇形等の異常も認められなかった。また、男女比のかたよりも認められなかった。

Beer ら³¹⁾は免疫療法後に低出生体重児が認められ

たことを報告している。一方、Mowbray ら³⁰⁾、小林 ら³²⁾は免疫療法後の出生児に関して、その出生時体重に特に大きなかたよりはなく、その他にも特記すべき異常は認められなかったという。我々の成績でも同様の結果が得られた。

患者本人に関しても、今までのところ皮内接種部の搔痒感以外には特に副作用は認められていない。免疫療法の作用そのものが不明なため、未知の副作用もありうるが、基本的には輸血の副作用に準ずると考えられる。また、自己免疫疾患の誘発の可能性を指摘する意見もある^{33,34)}が、我々の現在までの経験では自己免疫疾患の副作用は認められなかった。

GVH 反応に関しては、当科では夫リンパ球に2000radのX線を照射して不活化した上で妻に投与しているので起こりえない。

文 献

- 1) Taylor, C. and Faulk, W. P.: Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions, *Lancet*, 2: 68, 1981
- 2) Beer, A. E., Quebbeman, J. F., Ayers, J. W. T. and Haines, R. F.: Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 987, 1981
- 3) Mowbray, J. F., Gibbings, C., Liddel, H., Reginald, P. W., Underwood, J. L. and Beard, R. W.: Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells, *Lancet*, 1: 941, 1985
- 4) Reznikoff-Etievant, M. F., Simonney, N., Janaud, A., Darbois, Y. and Netter, A.: Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal leucocyte, *Lancet*, 1: 1398, 1985
- 5) McIntyre, J. A., Faulk, W. P., Nichols-Johnson, V. R. and Taylor, C. G.: Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion, *Obstet. Gynecol.*, 67: 169, 1986
- 6) Takakuwa, K., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.: Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexplained recurrent abortions: the role in successful pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10: 1, 1986
- 7) Unander, A. M. and Landholm, A.: Transfusions of leucocyte-rich erythrocyte concentrates: a successful treatment in selected cases of habitual abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154: 516, 1986
- 8) Aoki, K., Tanaka, H., Katahira, T. and Yagami,

- Y.: Specific immunotherapy for habitual abortion of unknown etiology, *AM. J. Reprod. Immunol.*, 7: 137, 1985
- 9) Stray-Pedersen, B. and Stray-Pedersen, S.: Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 148: 140, 1984
 - 10) 押田真知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 林 悟, 山本一恵, 吉川起代子, 倉田義之, 南川義夫, 佐治文隆, 谷澤 修: 習慣性流産の患者に見いだされた P₁ の 1 例, *日輸血誌*, 34: 85, 1988
 - 11) Levine, P. and Koch, E. A.: The rare human isoagglutinin anti-Tj^a and habitual abortion, *Science*, 120: 239, 1954
 - 12) Lopez, M., Cartron, J., Cartron, J. P., Mariotti, M., Bony, V., Salmon, C. H. and Levene, C.: Cytotoxicity of anti-PP₁P^k antibodies and possible relationship with early abortions of p mothers, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 28: 296, 1983
 - 13) Daya, S., Ward, S. and Burrows, E.: Progesteron profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesteron treatment in patients with recurrent spontaneous abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 225, 1988
 - 14) Portnoi, M., Joye, N., Akker, J. V. D., Morlier, G. and Taillemite, J. L.: Karyotypes of 1142 couples with recurrent abortion, *Obstet. Gynecol.*, 72: 31, 1988
 - 15) Lauritsen, J. G., Kristensen, T. and Grunnet, N.: Depressed mixed lymphocyte culture reactivity in mothers with recurrent spontaneous abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 125: 35, 1976
 - 16) Komlos, L., Zamir, R., Joshua, H. and Halbrecht, I.: Common HLA antigens in couples with repeated abortions, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 7: 330, 1977
 - 17) Garencer, M., Drazancic, A., Kuvacic, I., Tomashovic, Z. and Kastelan, A.: HLA antigen studies in women with recurrent gestational disorders, *Fertil. Steril.*, 31: 401, 1979
 - 18) Aoki, K.: HLA-DR compatibility in couples with recurrent spontaneous abortions, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 34: 1773, 1982
 - 19) McIntyre, J. A. and Faulk, W. P.: Recurrent spontaneous abortion in human pregnancy: results of immunogenetical, cellular, and humoral studies, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 4: 165, 1983
 - 20) Oksenberg, J. R., Persitz, E., Amar, A., Schenker, J., Segel, S., Nelken, D. and Brautbar, C.: Mixed lymphocyte reactivity nonresponsiveness in couples with multiple spontaneous abortions, *Fertil. Steril.*, 39: 525, 1983
 - 21) Caudle, M. R., Rote, N. S., Scott, J. R., DeWitt, C. and Barney, M. F.: Histocompatibility in couples with recurrent spontaneous abortion and normal fertility, *Fertil. Steril.*, 39: 793, 1983
 - 22) Unander, A. M. and Olding, L. B.: Habitual abortion: parental sharing of HLA antigens, absence of maternal blocking antibody, and suppression of maternal lymphocytes, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 4: 171, 1983
 - 23) Bolis, P. F., Bianchi, M. M., Soro, V. and Belvedere, M.: HLA typing in couples with repetitive abortion, *Biol. Res. Preg.*, 5: 135, 1984
 - 24) Reznikoff-Etievant, M. F., Edelman, P., Muller, J. Y., Pinon, F. and Sureau, C.: HLA-DR locus and maternalfoetal relation, *Tissue Antigens*, 24: 30, 1984
 - 25) Vanoli, M., Fabio, G., Bonara, P., Eisera, N., Pardi, G., Acaia, B. and Smeraldi, S. R.: Histocompatibility in Italian couples with recurrent spontaneous abortions of unknown origin and with normal fertility, *Tissue Antigens*, 26: 227, 1985
 - 26) Thomas, M. L., Harger, J. H., Wagener, D. K., Rabin, B. S. and Gill, T. J. III: HLA sharing and spontaneous abortion in humans, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 151: 1053, 1985
 - 27) Balash, J., Pastor, M., Martorell, J., Vanrell, J. A., Cuturi, C. and Gonzales-Merlo, J.: Shared HLA antigens between parents and recurrent spontaneous abortion, *Int. J. Fertil.*, 31: 213, 1986
 - 28) Johnson, P. M., Chia, K. V., Hart, C. A., Griffith, H. B. and Francis, W. J. A.: Trophoblast membrane infusion for unexplained recurrent miscarriage, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 95: 342, 1988
 - 29) Denegri, J. F., Altin, M., McConnachie, P., Peterson, J., Benny, W. B., Zouves, C. G. and Wilson, D.: Immunotherapy of primary immunological aborters: rationale for the use of pooled cryopreserved purified normal peripheral blood mononuclear cells, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 12: 65, 1986
 - 30) Mowbray, J. F., Underwood, J. L., Michel, M., Forbes, P. B. and Beard, R. W.: Immunisation with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage, *Lancet*, 2: 679, 1987
 - 31) Beer, A. E., Quebbeman, J. F., Hamazaki, Y. and Semprini, A. E.: Immunotherapy of recurrent spontaneous abortion. In: Gill, T. J. and Wegmann T. G. eds.: *Immunoregulation and fetal survival*: p286, Oxford University Press, 1987
 - 32) 小林淳一, 牧野恒久, 福岡一樹, 元山鎮雄, 原 利夫, 飯塚理八: 習慣流産免疫療法後の出生児に関する研究, *日産婦誌*, 39: 221, 1987
 - 33) Marelli, G., Vignali, M., Cenzuales, S. and

Busacca, M.: Blood transfusions in habitual abortion, *Fertil. Steril.*, 46: 1167, 1986

- 34) Christiansen, O. B., Grunnet, N., Andersen, E. S. and Lauritsen J. G.: Blood transfusions in habitual abortion, *Fertil. Steril.*, 49: 186, 1988

Habitual abortion: parental sharing of HLA and immunotherapy

Yoshihiro Samejima, Takashi Kameda,
Tadashi Kimura, Yoshihiro Tokugawa,
Akinori Wakimoto, Kazutomo Ohashi,
Masayasu Koyama, Noboru Matsuzaki,
Chihiro Azuma, Fumitaka Saji
and Osamu Tanizawa

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

Fifty-one couples with histories of habitual abortion (i. e., three or more consecutive spontaneous

abortions in the first trimester of pregnancy) were investigated for known causes of habitual abortion, including chromosomal, infectious, hormonal, autoimmune and anatomic problems.

The abnormalities observed were four cases of anomalies of uterine body detected by hysterosalpingography, two cases of irregular antibodies (anti-P and anti-P1 antibodies), two cases of luteal insufficiency and one case of lupus anticoagulant. No chromosomal abnormality was detected.

Forty-two couples with unexplained habitual abortion were studied for HLA. The number of couples that shared at least one antigen at the A, B, C and DR loci were 27/42, 10/42, 13/42, and 19/42, respectively.

Among forty-two patients of unexplained habitual abortion, twenty-six were treated by immunotherapy with intradermal administration of husband's leucocytes. Fifteen of treated patients became pregnant and seven of them delivered normal infants in term, six are now more than sixteen weeks pregnant and two have aborted.

(受付: 1989年2月27日)

INCREASE IN DEOXYRIBONUCLEIC ACID POLYMERASE α ACTIVITY RELATED TO DEOXYRIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS DUE TO GROWTH HORMONE IN OVARIES OF IMMATURE HYPOPHYSECTOMIZED ESTROGEN-TREATED RATS

Satoshi USUKI and Sayuri KUBOTA

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

Abstract: To gain some clarification as to how the growth hormone (GH) participates in cell proliferation and cell division of rat ovary, immature hypophysectomized estradiol-17 β (E₂)-treated rats *in vivo* were treated with it, followed by examination of the changes that took place in the ovarian deoxyribonucleic acid (DNA), DNA polymerase α activity and somatomedin C/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) levels. The administration of ovine GH to immature hypophysectomized E₂-treated rats *in vivo* significantly increased the DNA polymerase α activity, DNA content and IGF-1 level in the ovaries. In contrast, the specific activity (DNA polymerase α activity/ovary DNA content) showed no significant change. Mixing experiments with different kinds of ovarian extracts suggested that neither activators nor inhibitors of DNA polymerase α activity were present in the extracts.

These results suggest that GH causes the induction of DNA polymerase α activity accompanying DNA synthesis by inducing the local production or accumulation of IGF-1 during cell proliferation in immature rat ovaries.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 120–127, 1990)

Introduction

Growth hormone (GH) has only recently been reported to participate in ovarian function and play an important regulatory role in follicular growth and pubertal development directly^{1–4} or *via* an intraovarian somatomedin C/insulin-like growth factor 1 (IGF-1)⁵. GH administration in GH-deficient female mice stimulates ovarian growth⁶, and GH can exert direct ovarian differentiation^{4–5}. Furthermore, the ovary itself may produce or accumulate IGF-1 to presumably represent a novel paracrine or autocrine me-

chanism by which ovarian development can be controlled⁵, as in the case of the testis^{7–9}, and IGF-1 stimulates cell proliferation and cell differentiation in the gonads^{10,11}. While the results of these studies suggest a direct ovarian effect by GH on ovarian cell proliferation and cell differentiation, the mechanism of GH action on the ovary remains to be investigated. Recently, Usuki et al.^{12–16} reported that estrogen, follicle-stimulating hormone (FSH) or luteinizing hormone (LH) enhances an increase in DNA polymerase α , a replicative enzyme in eukaryotic cells¹⁷, activity related to DNA synthesis in the rat ovary.

However, very few studies showing further metabolic pathways leading to DNA replication and cell proliferation induced by GH during ovarian growth have been reported.

This study was carried out to elucidate the relationship between GH and DNA polymerase α activity leading to DNA replication in the ovaries of immature hypophysectomized E_2 -treated rats.

Materials and Methods

Chemicals

Unlabelled deoxyribonucleoside 5'-triphosphates [deoxyadenosine 5'-triphosphate, deoxycytidine 5'-triphosphate, deoxyguanosine 5'-triphosphate and deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP)] and 2', 3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate were obtained from Boehringer-Mannheim (Mannheim, West Germany). [Methyl 1', 2', 3'- 3H] dTTP (96.8 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear (Boston, MA, U. S. A.). Aphidicolin was a gift from Dr. S. Ikegami (Hiroshima University, Japan). N-Ethylmaleimide was a product of Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). Calf thymus DNA was donated by Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U. S. A.).

Hormones, animals and treatments

Ovine GH (NIADDK-oGH-12, AFP-4015 A, with bio-potency-1.5 I.U./mg determined with the hypophysectomized female rat by weight gain bioassay; with an FSH potency of less than 1% by weight, an LH potency of less than 2% by weight, a prolactin potency of less than 2% by weight and a thyroid-stimulating hormone potency of less than 2% by weight) was kindly provided by Drs. S. Raiti (University of Maryland, Baltimore, MD, U. S. A.) and A. F. Parlow (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, U. S. A.). Estradiol-17 β (E_2) was obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U. S. A.).

Female Wistar-Imamichi rats, obtained from the Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama, Japan), were hypophysectomized on the 21 postnatal day, using the parapharyngeal approach. These rats were then maintained in air-conditioned quarters illuminated between 8:30 AM and 8:30 PM.

Hypophysectomized rats were treated daily

with 1 mg/day of E_2 in sesame oil, subcutaneously, beginning at 25 days of age, i. e., 4 days after the hypophysectomy, and continued until the injection of GH at 29 days of age. Hypophysectomized E_2 -treated rats were injected subcutaneously with 200 μ g GH in saline at 29 days of age. The animals were killed by decapitation under mild ether anesthesia 5 and 12 hours after initiation of the injection.

After autopsy, the ovaries were quickly resected and the periovarian bursa was stripped off. The ovaries in both the first and second experiments were used for enzyme activity, DNA and IGF-1 measurements.

Measurement of DNA polymerase α and DNA content in ovaries

The ovaries were homogenized in 100 μ l of 1.0% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.9), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1.0 M NaCl and 2 mg/ml bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.) for about 20 minutes at 0°C. The homogenate was centrifuged at 15,000 $\times$ g for 30 minutes. Fifty μ l of the supernatant was then mixed with 25 μ l of 90% glycerol to stabilize DNA polymerase activity. Aliquots (0.5-2.0 μ l) of the supernatant were assayed for DNA polymerase α activity, as described previously¹³⁾. At the same time, the ovaries were treated and centrifuged as described for the assaying of DNA polymerase α activity. The precipitate was treated as described previously¹³⁾ and then assayed as to the DNA content according to the method of Burton¹⁸⁾.

Measurement of the somatomedin C/insulin-like growth factor 1 level in ovaries

The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) level in the ovaries was measured by a radioimmunoassay, a modification of the method of Furlanetto et al.¹⁹⁾ IGF-1 was kindly donated by Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan. The IGF-1 preparation was synthesized by means of recombinant DNA technology and this IGF-1 produced is pure²⁰⁾. Ovaries were homogenized in 500 μ l of phosphate buffer saline at 4°C in an ice-cold water bath and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C, and the resultant super-

natants were used for assaying IGF-1. One hundred μ l-aliquots of the supernatants were extracted with 900 μ l ethanol and 1N HCL (9:1, v/v), mixed for 5 minutes with a stirrer and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C. A 100 μ l aliquot of each supernatant was mixed with 400 μ l of IGF-1 assay buffer (Nicholas Institute, San Juan, CA, U. S. A.). Fifty μ l-aliquots of diluted samples, blanks or IGF-1 standards (0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 and 1,000 pg) were preincubated with 250 μ l of the assay buffer and 100 μ l of IGF-1 antiserum for 1 hour at room temperature. Rabbit antiserum to IGF-1 was prepared by immunizing rabbits with a mixture of IGF-1 and ovalbumin emulsified in Freund's adjuvant and it did not cross-react with insulin-like growth factor II. One hundred μ l of [125 I] IGF-1 was added at the end of the preincubation, followed by incubation for 16 hours at 4°C. To each tube was added 50 μ l of goat anti-rabbit gamma globulin (a double antibody), followed by incubation for 1 hour at 4°C. Twenty μ l of normal rabbit serum (a precipitation agent) was added, followed by incubation at 4°C, and 1 hour later, the mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant fraction was discarded and then radioactivity counting was performed for 2 minutes with a gamma scintillation counter. The inter-assay and intra-assay coefficients of variation for IGF-1 were 7.5 and 8.9%, respectively. The mean extraction efficiency for IGF-1 was 93%. Data were expressed as pg/mg ovarian wet weight.

Other methods

All reagents were of analytical grade and distilled prior to use. Protein content was determined by the method of Lowry et al.²¹⁾, with bovine serum albumin as a standard. Statistical evaluation of the results was performed using Student's t test, and differences were considered to be significant at the value of $p < 0.05$.

Results

When hypophysectomized E_2 -treated rats were injected with 200 μ g GH, the ovarian DNA content and DNA polymerase α activity increased, depending on the time after initiation of

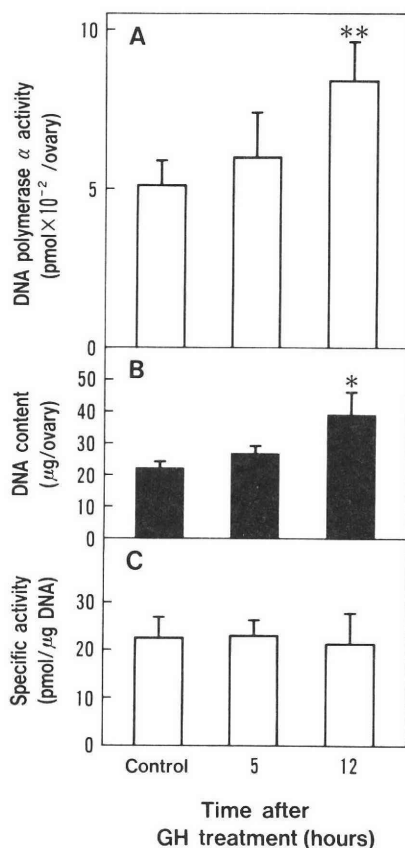


Fig. 1 Enhancement of DNA polymerase α activity (A), DNA content (B) and specific activity (C) by growth hormone in hypophysectomized estradiol-17 β -treated rat ovaries *in vivo*.

Hypophysectomized rats were injected daily with estradiol-17 β (E_2) (1 mg/day) for 4 days until the injection of growth hormone (GH) at day 29, as described under Materials and Methods. Hypophysectomized E_2 -treated rats were injected with 200 μ g GH at 29 days of age. Saline was injected as a control. Five and 12 hours after the injections, the DNA polymerase α activity and DNA content were measured as described in the text. DNA polymerase activity is expressed as pmol dNMP (dAMP, dCMP, dGMP and dTMP) incorporated in 20 minutes at 37°C. Specific activity is expressed as DNA polymerase α activity per μ g DNA. DNA polymerase α (open bars); DNA content (solid bars). Each value is the mean $\pm$ SD for eight determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ compared with GH-untreated hypophysectomized E_2 -treated rats (Student's t-test).

the GH treatment: 600.0 ± 145.0 pmol/mg wet weight and 26.6 ± 2.6 μ g/mg (mean $\pm$ SD, $n=8$) and 825.0 ± 125.0 and 39.0 ± 7.6 at 5 and 12 hours after initiation of the GH treatment, respectively (Fig. 1A and B).

The nuclear DNA content and DNA polymerase α activity in the ovaries resected 12 hours later were significantly different ($p < 0.05$ and $p < 0.02$, respectively) compared with findings in the case of the rats injected with saline only (control: 22.6 ± 2.6 and 515.1 ± 50.0 , respectively). However, there was no significant increase in the nuclear DNA content and DNA polymerase α activity in the ovaries resected 5 hours later. As for the

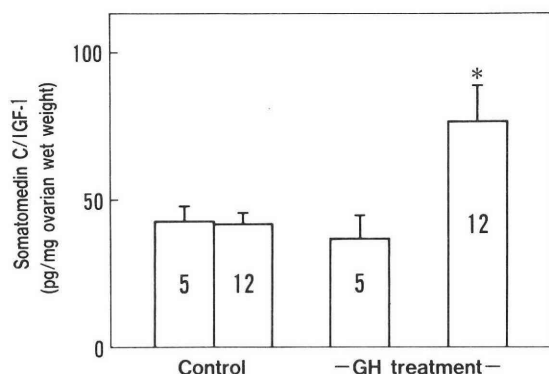


Fig. 2 Effects of growth hormone on the somatomedin C/IGF-1 level in immature hypophysectomized estradiol-17 β -treated rat ovaries *in vivo*.

Hypophysectomized rats were injected daily with estradiol-17 β (E₂) (1 mg/day) for 4 days until the injection of growth hormone (GH) at day 29, as described under Materials and Methods. Hypophysectomized E₂-treated rats were injected with 200 μ g GH at 29 days of age. Saline was injected as a control. Five and 12 hours after the injections, ovarian tissue IGF-1 levels were measured as described in Materials and Methods. The IGF-1 level was expressed as pmol/mg ovarian wet weight. The numbers in open bars are the times (hours) when the ovaries resected after initiation of the GH treatment. Each value is the mean $\pm$ SD for eight determinations. * $p < 0.01$ compared with GH-untreated hypophysectomized E₂-treated rats (Student's *t*-test).

specific activity of DNA polymerase α (DNA polymerase α activity per ovary DNA content) (Fig. 1C), the activity showed no significant change compared with the GH-untreated rats (control).

To investigate the presence of activators or inhibitors of DNA polymerases in the ovarian extracts in this experiment, mixing experiments were performed. The DNA polymerase α activities were additive and no significant stimulation or inhibition was detected (data not shown).

Successively, the GH-enhancing effect on the ovarian IGF-1 level was examined (Fig. 2).

The administration of 200 μ g GH *in vivo* significantly ($p < 0.01$) increased the tissue IGF-1 level in ovaries at 12 hours after initiation of the GH-treatment (76.0 ± 12.5 pg/mg ovarian wet weight; mean $\pm$ SD, $n=8$) compared with the control groups (saline only) (42.6 ± 5.1).

In addition, this increase in ovarian IGF-1 was much higher than that in blood, indicating the local production or accumulation of IGF-1 in ovaries. In contrast, there was no significant increase in the level of IGF-1 in ovaries at 5 hours (37.5 ± 7.8) after commencement of the GH-treatment.

Discussion

DNA polymerase α activity in the ovaries of immature hypophysectomized E₂-treated rats changed due to the stimulation of GH. DNA polymerase α is known to be involved in DNA replication during follicular growth in the immature rat ovaries^{13-16,22,23}. In the present *in vivo* study, GH enhanced the induction of DNA polymerase α activity with a simultaneous increase in the DNA content in ovaries of immature hypophysectomized rats, in which DNA polymerase α activity decreases¹³. Since mixing experiments using GH-treated and -untreated ovarian extracts suggested the presence of neither activators nor inhibitors of DNA polymerase α activity in this experiment, the induction of the enzyme activity seems to be enhanced by GH.

In contrast, the specific activity of DNA polymerase α (DNA polymerase α activity/ovary DNA content) did not change significantly in

these hypophysectomized E_2 -treated rat ovaries. These findings are consistent with those in the case of the administration of GH to E_2 -untreated hypophysectomized rats (manuscript in preparation). Therefore, this GH-induced DNA polymerase α activity seems to depend on the number of cells, but not an increase in the DNA polymerase α molecule itself, which contain the enzyme.

This mechanism is apparently different from that in the case of estrogen^{13,16}, FSH¹³⁻¹⁵ or LH-RH^{22,23}. Recently, Donaldson and Gerner²⁴ have reported that fluctuation in DNA polymerase α activity in rat-1 (tsLA24/RSV) cells (rat embryonic fibroblasts infected with a Rous sarcoma virus mutant that is temperature-sensitive for the transformed phenotype) is not due to changes in DNA polymerase α protein content, or nuclear translocation, but that phosphorylation/dephosphorylation reactions might regulate DNA polymerase α activity. This or a similar posttranslational mechanism might also account for an induction of the enzyme activity by GH in immature rat ovaries. This elucidation awaits future studies.

These results suggest that GH causes the induction of DNA polymerase α activity involved in DNA synthesis in immature hypophysectomized estrogen-treated rat ovaries.

The present study was carried out with whole ovaries. It is difficult to determine which ovarian cells responded as to the induction of DNA polymerase α activity. However, rat granulosa cells have receptors for GH³. Furthermore, DNA synthesis due to GH is consistent with granulosa cell proliferation in this case (our published data). So, DNA polymerase α in granulosa cells may be sensitive to GH.

As suggested by Davoren and Hsueh⁵, GH may act at the ovary: 1) through GH receptor-mediated events independent of IGF-1; 2) through its classical pathway²⁵⁻²⁷, by inducing hepatic production of IGF-1; or 3) by increasing intraovarian IGF-1 levels, whereby this resultant peptide could then directly affect ovarian function.

Recently, Davoren and Hsueh⁵ reported that GH may act in the rat ovary to increase local levels of somatomedin C/IGF-1, a major mediator

of the growth-promoting action of GH. In addition, IGF-1 has been recently shown to be produced by porcine granulosa cells²⁸⁻³⁰, to stimulate rat granulosa cell cytodifferentiation^{5,31-33} and bovine granulosa cell replication³⁴ *in vitro*, and to increase the granulosa cell number and DNA synthesis^{35,36}. Furthermore, IGF-1 also plays a role in rat ovarian thecal-interstitial cell differentiation³⁷.

In the present study, treatment of hypophysectomized rats with GH *in vivo* caused an increase in the level of ovarian tissue IGF-1, presumably due to local production and not blood contamination, as suggested previously^{5,28-30}. These results suggest that GH enhances the ovarian IGF-1 level in hypophysectomized, immature female rats and may enhance DNA polymerase α activity in conjunction with DNA synthesis *via* an intraovarian mediator IGF-1.

We conclude from these results that GH functions in such a manner that it induces DNA polymerase α activity in conjunction with DNA synthesis during follicular growth in immature rat ovaries and may act by at least inducing the local production or accumulation of IGF-1.

The physiological significance of the direct action of GH in the ovary is also a very intriguing problem that should be investigated, from both basic and clinical aspects. The results of such a study may provide unique models for understanding the mechanism of the GH action in cellular proliferation during ovarian follicular growth.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs. S. Raiti, University of Maryland, Baltimore, MD, and A. F. Parlow, Director, Pituitary Hormones and Antisera Center, Torrance, CA, U. S. A., for providing us with the ovine GH, and Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan for providing us with the pure somatomedin C/IGF-1 produced by recombinant DNA technique.

We also wish to thank Miss Y. Hayasaka, Miss S. Kanzaki, Mrs. H. Nakamura and Mrs. S. Kawamura for their technical assistance, and Mrs. K. Nakagawa for her skillful typing of this paper.

This work was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, the University of Tsukuba Project Research, and the University of Tsukuba Special Project Research on Metabolism.

References

- 1) Sheikholislam, B. M. and Stempfel, Jr. R. S.: Hereditary isolated somatotropin deficiency: effects of human growth hormone administration, *Pediatrics*, 49: 362, 1972
- 2) Advis, J. R., Smith, W. S. and Ojeda, S. R.: Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat, *Endocrinology*, 108: 1343, 1981
- 3) Hsueh, A. J. W. and Jones, P. B. C.: Direct hormonal modulation of ovarian granulosa cell maturation: effect of gonadotropin-releasing hormone. In *Follicular Maturation and Ovulation*, Edited by R. Rolland, E. V. Van Hall, K. P. McNatty and J. Schoemaker: p19, *Excerpta Medica*, 1982
- 4) Jia, X. C., Kalmijn, J. and Hsueh, A. J. W.: Growth hormone enhances follicle-stimulating-hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells, *Endocrinology*, 118: 1401, 1986
- 5) Davoren, J. B. and Hsueh, A. J. W.: Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I *in vivo*, *Endocrinology*, 118: 888, 1986
- 6) Bartke, A.: Histology of the anterior hypophysis, thyroid and gonads of two types of dwarf mice, *Anat. Rec.*, 149: 225, 1964
- 7) Jansen, M., van Schaik, F. M. A., Ricker, T., Bullock, B., Woods, D. E., Gabby, K. H., Nussbaum, A. L., Sussenbach, J. S. and Van den Brande, J. L.: Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor 1 precursor, *Nature*, 306: 609, 1983
- 8) Ritzen, E. M.: Chemical messengers between sertoli cells and neighbouring cells, *J. Steroid. Biochem.*, 19: 499, 1983
- 9) D' Ercole, A. J., Stiles, A. D. and Underwood, L. E.: Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 81: 935, 1984
- 10) Zapf, J., Schmid, C. H. and Froesch, E. R.: Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) 1 and II. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 13:3, 1984
- 11) Hizuka, N., Takano, K., Shizume, K., Asakawa, K., Miyakawa, M., Tanaka, I. and Horikawa, R.: Insulin-like growth factor 1 stimulates growth in normal growing rats, *Eur. J. Pharm.*, 125: 143, 1986
- 12) Usuki, S., Iwasaki, H., Usuki, Y. and Shioda, M.: Effects of LH, FSH and prolactin on induction of DNA polymerase α and β by rat preovulatory follicles, In *Gamete Quality and Fertility Regulation*, Edited by R. Rolland, M. J. Heineman, S. G. Hillier and H. Vemer., 63, *Excerpta Medica*, 1985
- 13) Usuki, S. and Shioda, M.: Follicle-stimulating hormone and estrogen elevate deoxyribonucleic acid α -nucleotidyltransferase activity in relationship to deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovaries, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 155: 447, 1987
- 14) Usuki, S. and Shioda, M.: Induction of DNA polymerase α in isolated immature rat ovaries by follicle-stimulating hormone, *Horm. metab. Res.*, 19: 508, 1987
- 15) Usuki, S. and Usuki, Y.: Follicle-stimulating hormone induces deoxyribonucleic acid polymerase α before deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovarian follicles perfused *in vitro*, *Obstet. Gynecol.*, 71: 307, 1988
- 16) Usuki, S.: Stimulatory action of estradiol-17 β on deoxyribonucleic acid α -nucleotidyltransferase activity in immature hypophysectomized rat ovaries, In *Preservation of Tubo-ovarian Function in Gynecologic Benign and Malignant Diseases*, Edited by K. Ichinoe, S. J. Segal and L. Mastroianni: Raven Press, 48: 295, 1988
- 17) Hübscher, U.: DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: mode of action and biological implications, *Experientia*, 39: 1, 1983
- 18) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction or colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem. J.*, 62: 315, 1956
- 19) Furlanetto, R. W., Underwood, L. E., Van-Wyk, J. J. and D' Ercole, A. J.: Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay, *J. Clin. Invest.*, 60: 648, 1977
- 20) Niwa, M., Sato, S., Saito, Y., Uchiyama, F., Ono, H., Yamashita, M., Kitaguchi, T., Shiga, Y., Notani, J., Yamada, H., Ishii, Y., Ueda, I. and Takagi, Y.: Chemical synthesis, cloning, and expression of genes for human somatomedin C (insulin-like growth factor 1) and ^{59}Val -somatomedin C, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 469: 31, 1986
- 21) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. and Randall, R. J.: Protein measurement with the

- Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265, 1951
- 22) Usuki, S., Usuki, Y., Sakamoto, K. and Shioda, M.: LH-RH stimulates inducement of DNA polymerase α prior to DNA synthesis in immature rat ovaries, In Neuro-endocrinology of Reproduction, Edited by R. Rolland, M. J. Heineman, N. Naaktgeboren, J. Schoemaker, H. Vemer and W. Willemsen: Excerpta Medica, ICS, 751: 51, 1987
 - 23) Usuki, S., Kubota, S. and Usuki, Y.: Effects of luteinizing hormone-releasing hormone on induction of DNA polymerase α activity and DNA synthesis in hypophysectomized immature rat ovaries, Biomed. Res., 9: 133, 1988
 - 24) Donaldson, R. W. and Gerner, E. W.: Phosphorylation of a high molecular weight DNA polymerase α , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84: 759, 1987
 - 25) Salmon, Jr. W. D. and Daughaday, W. H.: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*, J. Lab. Clin. Med., 49: 825, 1957
 - 26) Zapf, J., Rinderknecht, E., Humbel, R. E. and Froesch, E. R.: Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum, recent accomplishments and their physiologic implications, Metabolism, 27: 1803, 1978
 - 27) Phillips, L. S. and Vassilopoulou-Sellin, R.: Somatomedins, New Engl. J. Med., 302: 371, 1980
 - 28) Hammond, J. M., Baranao, J. L. S., Skaleris, D., Rechler, M. M. and Knight, A. P.: Somatomedin (Sm) production by cultured porcine granulosa cells (GC), J. Steroid Biochem., 20: 1579, 1984
 - 29) Hammond, J. M., Baranao, J. L. S., Skaleris, D., Knight, A. B., Romanus, J. A. and Rechler, M. M.: Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells, Endocrinology, 117: 2553, 1985
 - 30) Hsu, C. J. and Hammond, J. M.: Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-1 production by porcine granulosa cells *in vitro*, Endocrinology, 120: 198, 1987
 - 31) Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Svoboda, M. E., and Van-Wyk, J. J.: A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of the ovarian granulosa cell, Endocrinology, 115: 1227, 1984
 - 32) Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Svoboda, M. E., Van-Wyk, J. J., Hascall, V. C. and Yanagishita, M.: Independent and synergistic actions of somatomedin-C in the stimulation of proteoglycan biosynthesis by cultured rat granulosa cells, Endocrinology, 118: 456, 1986
 - 33) Dornington, J. H., Bendell, J. J. and Lobb, D. K.: Aromatase activity in granulosa cells: regulation by growth factors, Steroids, 50: 411, 1987
 - 34) Savion, N., Lui, G. M., Laherty, R. and Gospodarowicz, D.: Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium, Endocrinology, 109: 409, 1981
 - 35) Adashi, E. Y., Resnick, C. E., D' Ercole, A. J., Svoboda, M. E. and Van-Wyk, J. J.: Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function, Endocr. Rev., 6: 400, 1985
 - 36) Baranao, J. L. S. and Hammond, J. M.: Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 124: 484, 1984
 - 37) Cara, J. E. and Rosenfield, R. L.: Insulin-like growth factor 1 and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells, Endocrinology, 123: 733, 1988

**成長ホルモンのラット卵巣
DNA 合成及び somatomedin
C/insulin-like growth factor 1
レベルに及ぼす影響について：
下垂体摘出エストロゲン処理ラットに
おける *in vivo* での検討**

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 愼 窪田早百合

Growth hormone (GH) が卵巣に直接的に働くことは知られているが、その作用機序は不明の点が多い。そこで、GH の卵胞に於ける作用機序を解明する目的で、ラットを用いて以下の実験を行なった。

Wistar-Ismamichi 系雌ラットを用い、21 日齢に下垂体を摘出し、下垂体摘出後 4 日目から estradiol-17 β を 1 mg/日、4 日間皮下投与し、GH 投与後 5 ないし 12 時間目にエーテル麻酔下で断頭・屠殺し、卵巣を摘出した。対照群としては、GH のかわりに生食を投与した。

摘出卵巣を homogenize し、卵巣組織中の deoxyribonucleic acid (DNA) polymerase α 活性、DNA 量および somatomedin C/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) レベルを測定した。

GH 投与後 12 時間で、卵巣組織中の DNA polymerase α 活性、DNA 量および IGF-1 レベルは有意な増加

を示した ($p < 0.02$, $p < 0.05$ および $p < 0.01$). 一方, DNA polymerase α の specific activity (DNA polymerase α 活性/DNA 量) については, estrogen, FSH および GnRH と異なって有意な変化が認められなかった.

これらの事実は, GH が少なくとも卵巣内 IGF-1 の autocrine ないし paracrine 作用に依って, 卵胞の

DNA polymerase α 活性を促進させ cell proliferation にかかわっているが, estrogen, FSH および GnRH とは異なった機序で働いていることを示唆している.

(受付: 1989 年 2 月 9 日)

COMPARATIVE STUDY OF TRANSVAGINAL ULTRASOUND WITH TRANSABDOMINAL ULTRASOUND FOR DIAGNOSING POLYCYSTIC OVARIAN DISEASE

Kentaro TAKAHASHI, Arata NISHIGAKI, Yoshimi EDA,
Masuo KUSAKARI, Kazuo YOSHINO and Manabu KITAO

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

Abstract: To assess the usefulness of transvaginal ultrasound (TVU) for diagnosing polycystic ovarian (PCO) disease, 20 patients with PCO diagnosed by TVU were studied. In 9 cases, PCO were also seen by transabdominal ultrasound (TAU). Of the 20 cases 6 were endocrinological PCO ($LH \geq 25$ mIU/ml, testosterone ≥ 100 ng/dl and E_1/E_2 ratio ≥ 1.0). But, one of 6 endocrinological PCO was not observed PCO by TAU.

Therefore, TVU may become a useful method for screening of PCO disease.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 128–130, 1990)

Introduction

Polycystic ovarian (PCO) disease is an interesting disease in field of infertility because it has a chain of spectrum and has a morphological abnormality with abnormal production of hormones. As this disease has various clinical symptoms and conditions, the definite diagnostic criteria and treatment have heretofore not been established. However, we should diagnose this disease in early stage and treat as soon as possible, considering that this disease is a progressive disease.

On the other hand, we should assess the ovaries not only endocrinologically but also morphologically because this disease has various morphological characteristics (polycystic swelling of bilateral ovaries, thickness of albuginea ovarii and increase of theca cells). However, it is impossible to attempt laparoscopy or laparotomy for all patients with suspect of PCO disease.

Modern ultrasound has made startling progress. Several investigators¹⁻⁵⁾ reported the application ultrasound, which is good for confirming soft parts, to morphological diagnosis for PCO disease. We⁶⁾ also reported the relationship between ultrasonographical forms and endocrinological changes of PCO. The development of transvaginal ultrasound (TVU) made a morphological observation of the ovary more clear and easy.

In this study, to assess the usefulness of TVU for diagnosing PCO disease, we examined PCO using transabdominal ultrasound (TAU) and TVU simultaneously.

Materials and Methods

The subjects were 20 patients with PCO noted by TVU, who visited the sterility clinic of Shimane Medical University Hospital from January 1988 to June 1988. To confirm PCO, TVU

scanning and TAU scanning were simultaneously performed within the 7th day of menstrual cycle or 7 days after initiation of withdrawal uterine bleeding. Ultrasound installation is Mochida Sonovista-SL with 3.5 MHz transabdominal probe and 5MHz/7.5MHz transvaginal probe. We

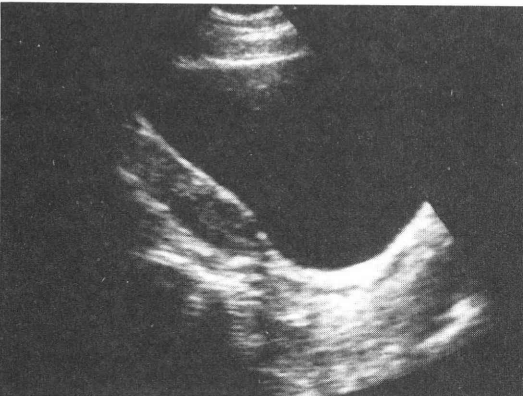


Fig. 1_a Transabdominal ultrasound image of PCO

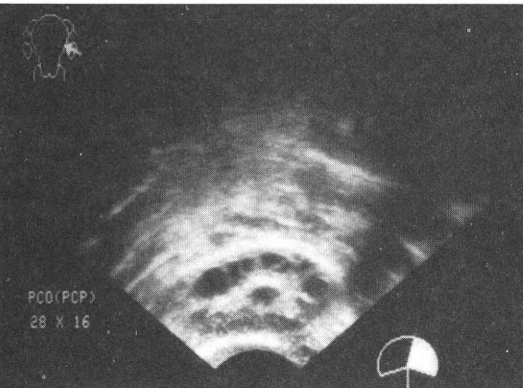


Fig. 1_b Transvaginal ultrasound image of PCO

measured serum luteinizing hormone (LH), testosterone, estrone (E_1) and estradiol-17 β (E_2) using a LH, testosterone, E_1 and E_2 Radioimmunoassay Kit, respectively. Endocrinological PCO was diagnosed using the diagnostic criteria of PCO⁷⁾ ($LH \geq 25$ mIU/ml, testosterone ≥ 100 ng/dl and E_1/E_2 ratio ≥ 1.0).

We studied the rate of coincidence of ultrasonographical PCO and endocrinological PCO.

Results

TAU appearance of PCO is shown in Figure 1_a. Small cysts under the capsule of the ovary are regularly arranged. The same case with TVU view is shown in Figure 1_b. The cysts are more distinct than that of TAU. Of 20 cases of PCO noted by TVU, 9 cases (45.0%) were also seen by TAU. The rate of coincidence with ultrasonographical PCO and endocrinological PCO is shown in Table 1. Of the 20 cases 6 (30.0%) were endocrinological PCO. On the other hand, five cases (55.6%) of the 9 transabdominal ultrasonographical PCO were endocrinological PCO. The rate of confirmation of PCO by ultrasound in 6 endocrinological PCO is shown Table 2. Using TVU PCO appearance was noted in all cases. However, using TAU one false negative case was diagnosed.

Discussion

Several investigators¹⁻⁶⁾ studied PCO disease using ultrasound. However, all of them used TAU. The ovaries are intrapelvic organs, far

Table 1. The rate of coincidence of ultrasonographical PCO and endocrinological PCO

Ultrasound	no. of PCO observed	no. of coincidence	rate of coincidence(%)
TVU	20	6	30.0
TAU	9	5	55.6

TVU : transvaginal ultrasound
TAU : transabdominal ultrasound

Table 2. The rate of confirmation of PCO by ultrasound in 6 endocrinological PCO

Ultrasound	no. of confirmation	rate of confirmation(%)
TVU	6	100
TAU	5	83.3

TVU : transvaginal ultrasound
TAU : transabdominal ultrasound

from abdominal wall and are located near the posterior fornix of the vagina. Using TAU, a full bladder is needed. Modern TVU has made startling progress, we have been able to obtain many detailed informations. In this study, because the total number of cases was small, we could not put forward that TVU is superior to TAU for diagnosing PCO disease. Although the rate of coincidence of endocrinological PCO and TAU was higher than that of TVU, TVU confirmed all cases of endocrinological PCO and therefore it may become a useful method for screening of PCO disease.

References

- 1) Swanson, M., Saverbrei, E. E., and Cooperberg, P. L.: Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries, *J. Clin. Ultrasound*, 9: 219, 1981
- 2) Parsi, L., Tramonti, M., Casciano, S., Zurli, A. and Gazzarrini, O.: The role of ultrasound in the study of polycystic ovarian disease, *J. Clin. Ultrasound*, 10: 167, 1982
- 3) Parsi, L., Tramonti, M., Derchi, L. E., Casciano, S., Zurli, A. and Rocchi, P.: Polycystic ovarian disease: Ultrasonic evaluation and correlations with clinical and hormonal data, *J. Clin. Ultrasound*, 12: 21, 1984
- 4) Hann, L. E., Hall, D. A., McArdle, C. R. and Seibel, M.: Polycystic ovarian disease: Sonographic spectrum, *Radiology*, 150: 531, 1984
- 5) Orsini, L. F., Venturoli, S., Lorusso, R., Pluchinotta, V., Paradisi, R. and Bovicelli, L.: Ultrasonic findings in polycystic ovarian disease, *Fertil. Steril.*, 43: 709, 1985

- 6) Takahashi, K., Yoshino, K., Shibukawa, T., Hata, T., Sawada, K. and Kitao, M.: Study on the relation between ultrasonographic forms and endocrinic change of polycystic ovary (PCO), *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 31: 51, 1986 (English Abst.)
- 7) Mori, T.: The diagnostic criteria of polycystic ovary syndrome, *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.*, 36: 637, 1984 (in Japanese)

多嚢胞性卵巣症候群の診断における 経腹・経膣超音波検査の比較検討

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 西垣 新 江田芳美
草刈万寿夫 吉野和男 北尾 学

近年、経膣超音波プローブの開発により内性器、特に卵巣の形態観察がより鮮明に、容易になってきた。そこで、今回昭和 63 年 1 月より 6 月までに当科不妊・内分泌外来を受診した多嚢胞性卵巣 (PCO) 患者 20 名に経腹及び経膣超音波検査を施行し、比較検討したので報告する。経膣超音波検査で PCO と診断した 20 名のうち、経腹超音波検査でも PCO が認められたのは 9 名であった。また、多嚢胞性卵巣症候群の内分泌学的診断基準 ($LH \geq 25 \text{ mIU/ml}$, $\text{testosterone} \geq 100 \text{ ng/dl}$, $E_1/\text{解}E_2 \text{ 比} \geq 1.0$) を満たすものは 6 名であり、このうち 5 名は経腹及び経膣超音波検査で PCO が認められたが、1 名は経膣超音波検査でしか PCO が認められなかった。以上より、経膣超音波検査は PCO のスクリーニング検査として有用であることが示唆された。

(受付: 1989 年 6 月 2 日)

男子不妊症患者における加水分解曲線解析法を 用いた精子 DNA の検討 (第一報)

A Study of Sperm DNA in Infertile Men Using an Acridine Orange Hydrolysis Curve Analysis (Preliminary Report)

金沢大学医学部泌尿器科学教室

山本 秀和 内藤 克輔 久住 治男
Hidekazu YAMAMOTO Katsusuke NAITO Haruo HISAZUMI

Department of Urology, School of Medicine,
Kanazawa University, Ishikawa 920, Japan

福井医科大学病理学講座

三好 憲雄 福田 優
Norio MIYOSHI Masaru FUKUDA

Department of Pathology,
Fukui Medical School, Fukui 910-11, Japan

福田らにより開発されてきた加水分解曲線解析法を用いて、不妊男子および健康男子の精子 DNA の質的相違について検討した。精子は RNase 処理後、30°C 2N HCl にて種々の時間加水分解し、単鎖 DNA 量を測光定量した。その平均値と SD を経時的にプロットし加水分解曲線を作成、Bateman 式に従いパラメーター y_0 , k_1 , k_2 を求めた。乏精子症および精子無力症で、 k_1 , k_2 が有意に高値を示し、また、精子 DNA 量も高値を示した。 k_1 はクロマチンの濃縮度を、 k_2 は DNA の脆弱度を表しており、乏精子症および精子無力症では、クロマチンの濃縮度が小さく、DNA の安定性も低いことが示唆された。さらにこのことより精子の未熟性をも示唆された。また乏精子症および精子無力症では、SD と平均値の比も有意に高値を示し、精子の不均一な成熟度も示唆された。以上より、本法は精子の性状を知るのに有用であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 131-136, 1990)

緒 言

従来、妊孕力を知るために、精液検査として一般に精液量、精子濃度、精子運動率、精子奇形率の算定が汎用されてきた。しかし、これらの検査結果が必ずしも妊孕力と一致しておらず、近年精子の質 (quality) を知ろうとする動きがでてきた。例えば、透明帯除去ハムスター卵子を利用した Sperm Penetration Assay (SPA)^{1,2)}、人工頸管粘液 (Penetrak[®])

を用いた精子運動性の評価³⁾、密度勾配遠心用担体ペーコールを用いた精子性状分析法 (精子細胞密度分析法)⁴⁾などが報告されている。

福田らにより開発されてきたアクリジンオレンジを用いた加水分解曲線解析法⁵⁻⁹⁾は、DNA の微小な損傷や質的相違を鋭敏にしかも高い再現性にて検出、定量化できる方法であることか知られており、精子の性状を知るうえでも有用と思われる。今回われわれは、本法にて精子 DNA の質的相違を、精子濃度、

精子運動率, 精子奇形率で比較検討したので報告する。

対象及び方法

1) 対象

1987年6月より10月までに、2年以上の不妊を主訴に金沢大学医学部付属病院泌尿器科を受診した14例と、挙子ある3例を含む健康男子5例である。年齢分布は25歳より41歳、平均32.5歳である。身体所見上1例に尿道下裂の手術既往があり、2例が慢性前立腺炎の治療中であるが、全員精巣の触診所見は正常であった。さらに、乏精子症患者には、内分泌学的検査(血清LH, FSH, testosterone, T_3 , T_4 , TSHなど)が施行されたが、すべて正常範囲内であった。また、不妊症例のpartnerはすべて産婦人科学的に異常は認められなかった。

2) 方法

①精液検査

精液検査は、原則として5日間以上の禁欲後、用手法にて採取した。採取後30分経た精液をMacomber-Saunders液を用いて白血球算定用メランジュールで希釈し、Thoma-Zeissの血球算定板にのせた後、検鏡算定した。また、精子運動率、精子奇形率は原液を直接スライドにのせて検鏡算定した。

②加水分解及び染色法

精液検査に使用した精液の残りを、Tris-EDTA buffer (Tris 0.1 M, NaCl 0.07 M, EDTA 0.005 M, pH 7.5)にて溶解後、1,200 rpm, 5分間遠心分離し精子を採取した。精子は無蛍光スライドガラスに塗抹し、半乾燥後70% ethanol, 4℃中で16時間から24時間固定した。次に、RNase (1 mg/ml in Tris-buffer, Type 1-A, Sigma)にて37℃, 1時間処理し、RNAの影響を除外した。各スライドは30℃, 2N HClにて種々の時間(0分, 1分, 3分, 6分, 10分, 20分, 30分, 60分, 90分, 120分)加水分解し、室温にて20分間アクリジンオレンジ(AO)染色(30 μ g/ml in Dulbecco's PBS, Sigma)した。各スライドを、Dulbecco's PBSにて封入後、オリンパス社製落射蛍光測光顕微鏡(BH2-QRFL)を用いて、Vバンド励起(405 nm)にて、AO赤色蛍光(650 nm)およびAO緑色蛍光(530 nm)を測光した。

③加水分解曲線作成および解析法

各加水分解時間における赤色蛍光のヒストグラムの平均値とそのSD (standard deviation)を求め、経時的にプロットすることによって加水分解曲線を作成した。さらに、computer fittingし、Bateman式に従ってアプリン酸(単鎖DNA)の生成速度定数 k_1 、崩壊速度定数 k_2 、初期潜在単鎖DNA量 y_0 、お

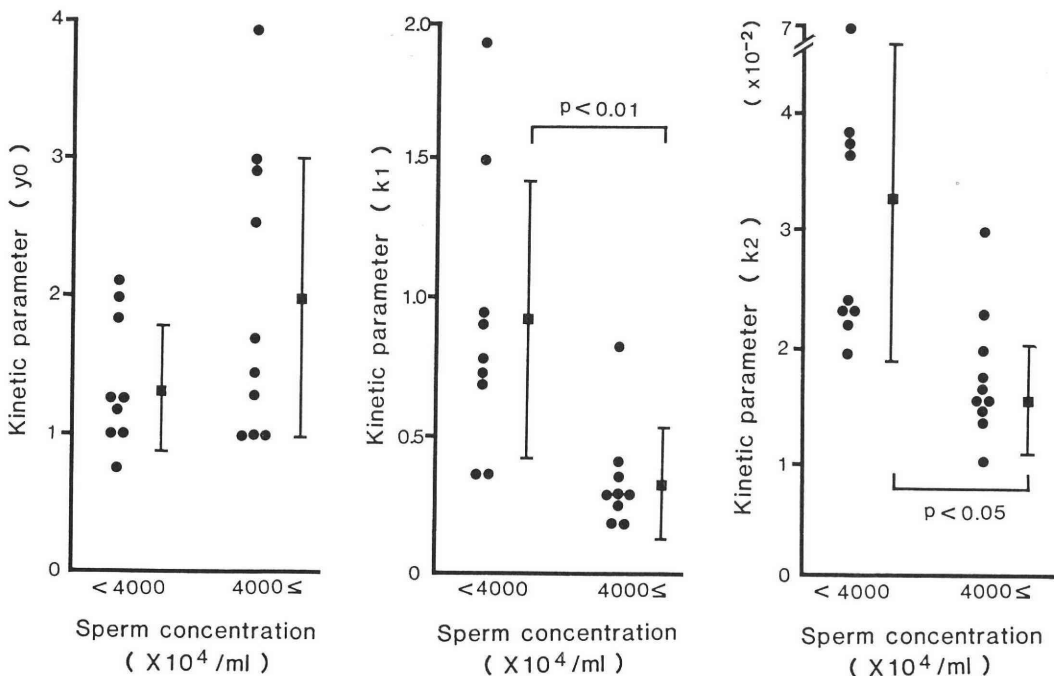


図1 精子濃度 $4,000 \times 10^4$ /ml以上と $4,000 \times 10^4$ /ml未満におけるBateman式の各パラメーターの比較検討

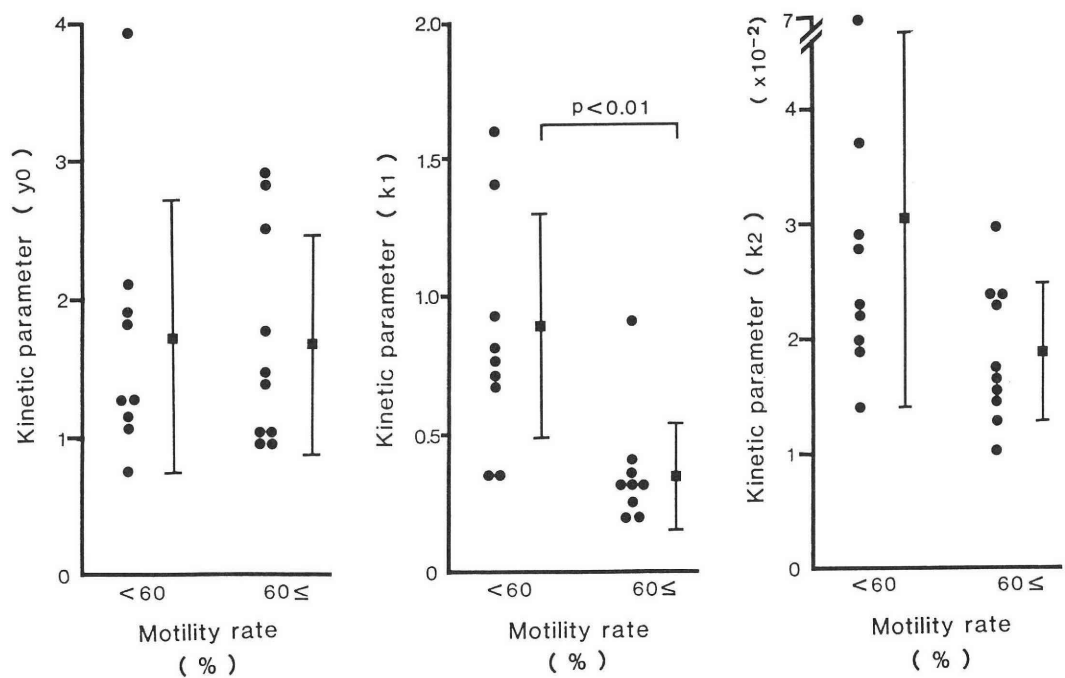


図 2 精子運動率60%以上と60%未満における Bateman 式の各パラメーターの比較検討

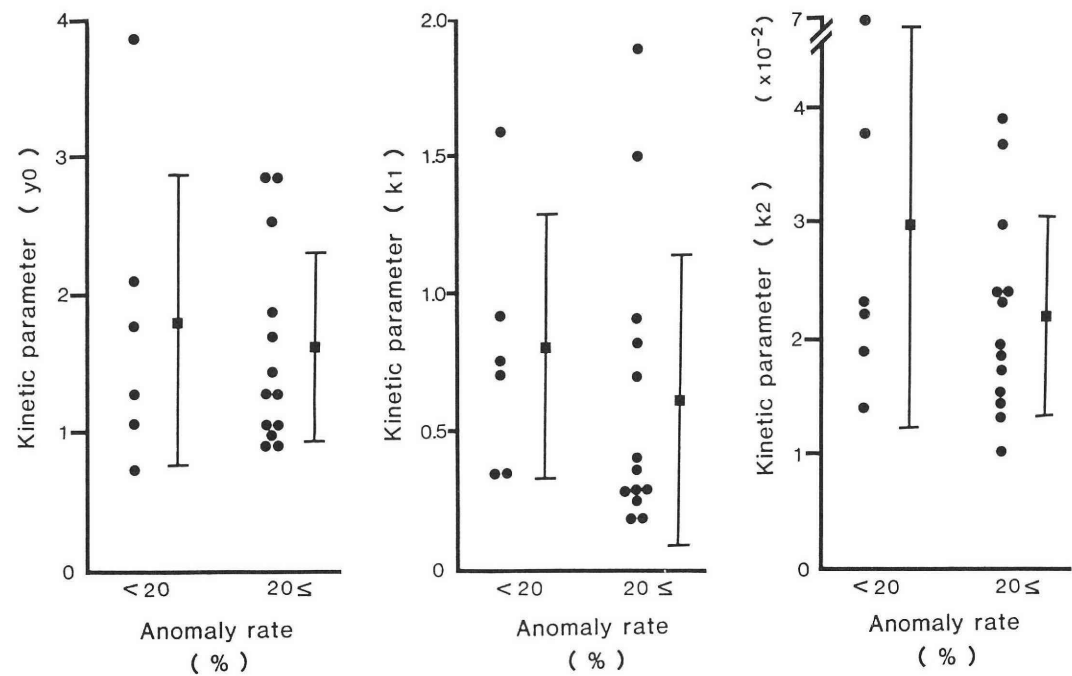


図 3 精子奇形率20%以上と20%未満における Bateman 式の各パラメーターの比較検討

および加水分解曲線の peak time を求めた。また、各ヒストグラムの SD と平均値の比を求め、精子 DNA における加水分解速度の分布を検討した。また、RNase 処理のみのスライドの緑色蛍光強度は精子 DNA 量を表しており、その結果についても検討した。

以上の結果と、精子濃度、精子運動率、精子奇形率との関係を検討した。なお、従来より妊孕可能の限界については諸説があるが、今回は精子濃度 $4,000 \times 10^4/\text{ml}$ 以上、精子運動率 60% 以上、精子奇形率 20% 未満を正常とした。また、統計処理は Student t test にて行った。

結 果

1) Bateman 式における各パラメーターの比較検討

①精子濃度による比較検討 (図 1)

精子濃度 $4,000 \times 10^4/\text{ml}$ 未満の群では、 $4,000 \times 10^4/\text{ml}$ 以上の群に比較して、 k_1 では 1% の危険率で、 k_2 では 5% の危険率で、 k_1 、 k_2 が有意に高値を示した。 y_0 には有意差は認められなかった。

②精子運動率による比較検討 (図 2)

運動率 60% 未満の群では、60% 以上の群に比較して、 k_1 が 1% の危険率で有意に高値を示した。しかし y_0 、 k_2 には有意差は認められなかった。

③精子奇形率による比較検討 (図 3)

y_0 、 k_1 、 k_2 いずれにも有意差は認められなかった。

④精液所見の正常群と異常群との比較検討 (表 1)

精液所見の異常群では、正常群に比較して、 k_1 では 1% の危険率で、 k_2 では 5% の危険率で、 k_1 、 k_2 が有意に高値を示した。 y_0 には、有意差は認められなかった。

2) 加水分解曲線の peak time の比較検討 (表 2)

精液所見の異常群は、正常群に比較して、加水分解曲線の peak time は 1% の危険率で有意に低値を

示した。

3) 各ヒストグラムにおける SD と平均値との比の比較検討 (表 2)

精液所見の異常群は正常群に比較して、1% の危険率でヒストグラムにおける SD と平均値の比は有意に高値を示した。すなわち、精液所見の異常群では精子 DNA の加水分解速度の分布の広がり認められた。

4) 精子 DNA 量の比較検討 (表 2)

精液所見の異常群は正常群に比較して、精子 DNA 量は高値を示したが、有意差は認められなかった。

考 察

福田ら⁷⁻⁹⁾によると、細胞核内 DNA は、加水分解により DNA 分子中のプリン塩基(アデニン、グアニン)が切り離され糖鎖とピリミジン塩基で構成されるアプリン酸(単鎖 DNA)が生成される。さらに加水分解が進行するとアプリン酸よりピリミジン塩基(チミン、シトシン)も遊離しアプリン酸も失われていく。そこで、アプリン酸の生成速度定数と崩壊速度定数をそれぞれ k_1 、 k_2 とすると、加水分解時間 t でのアプリン酸の量は Bateman 式

$$y(t) = y_0 k_1 / (k_2 - k_1) \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

で表される。ここで y_0 は、 $t = 0$ に存在するアプリン酸の総潜在量である。この時、塩酸の濃度を 2 N、温度を 30°C に条件を設定した場合最も良く理論的加水分解カーブと一致することが知られており、この加水分解条件は DNA の微妙な質的变化を検出するのに好都合である。一般的に $1/k_1$ は核クロマチンの濃縮度を、 k_2 は核 DNA の脆弱度(不安定性)を、そして y_0 は損傷などの質的变化を総合的に表すパラメーターとしてとらえることができる。

今回、奇形率 20% 以上と未満の 2 群で各パラメー

表 1 精液所見の正常群と異常群(乏精子症、精子無力症)における Bateman 式の各パラメーターの比較検討

Kinetic parameter	Normozoospermia	Oligozoospermia and/or asthenospermia
y_0	1.77 ± 0.80	1.64 ± 0.90
k_1	0.34 ± 0.19	0.97 ± 0.52 ($p < 0.01$)
k_2	$(1.77 \pm 0.57) \times 10^{-2}$	$(3.10 \pm 1.60) \times 10^{-2}$ ($p < 0.05$)

表 2 精液所見の正常群と異常群(乏精子症、精子無力症)における加水分解曲線の peak time、各ヒストグラムの SD と平均値との比、および精子 DNA 量の比較検討

	Normozoospermia	Oligozoospermia and/or asthenospermia
Peak time (min)	10.6 ± 3.6	4.5 ± 2.1 ($p < 0.01$)
SD/mean (%)	16.0 ± 2.2	21.6 ± 3.8 ($p < 0.01$)
DNA content (a.u.)	1.13 ± 0.14	1.42 ± 0.56

ターを比較した場合には有意差を認められなかったが、精子濃度で比較した場合精子濃度 $4,000 \times 10^4/\text{ml}$ 未満の群において k_1 , k_2 が、また運動率で比較した場合運動率 60% 未満の群において k_1 が有意に高値を示した。さらに、精液所見を正常群と異常群（乏精子症、精子無力症）とに大別した場合精液所見の異常群で k_1 , k_2 が有意に高値を示した。また、peak time は精液所見の異常群で有意に低値を示した。これらの結果より、精液所見に異常の見られる群、すなわち乏精子症患者または精子無力症患者では、クロマチンの濃縮度が小さく、かつ DNA の安定性も低いことが示唆された。次に、各ヒストグラムの SD と平均値との比を比較した場合、精液所見の異常群で有意に高値を示した。このことは、精子の加水分解の速度にばらつきがあることを示しており、すなわちクロマチンの濃縮度にばらつきがあることが推察された。

Manfredi Romanini ら¹⁰⁾によると、哺乳類の精子成熟過程は、主として2つに分けられる。まず、精巣内でクロマチンは濃縮され、DNA は不活性の状態にかわる。この過程で somatic histone は、testis specific protein (TSP: protamine) に置換される¹¹⁾。更に精巣内では核の size も小さくなり、DNA 量も減少する。次に、精巣上体から精管を移動する間にクロマチンは安定化し DNA を保護する。この過程で TSP のシステインの SH 残基に—S—S—クロスリンクが形成される^{12,13)}。すなわち、精子の成熟により、クロマチンは高度に濃縮されかつ安定化する¹⁴⁾。その結果、精子は遺伝子を不活化の状態で保護しながら女性性器内を移動し、受精までクロマチンは安定している¹⁵⁾。

今回の結果のうち k_1 に注目すると乏精子症または精子無力症患者ではクロマチンの濃縮度が小さいことが示唆されたが、上記の精子成熟過程を考慮すると、このことは精子の未熟性をも示唆しているといえる。又、各ヒストグラムの平均値と SD との比が大きいことより、精子の成熟度のばらつきも示唆された。Porcelli ら¹⁶⁾は、雄牛の精子を使用し加水分解曲線を解析した結果、今回の我々の結果と同様、不妊の雄牛では k_1 , k_2 が高値を示し、クロマチンの濃縮度が小さく未成熟であること、また、精巣、精巣上体、精管と移動するにつれて k_1 , k_2 が小さくなり成熟していくことを示した。

また、精液所見に異常の見られた群では正常群に比し、精子 DNA 量には有意差は見られなかったものの高値を示した。この結果については、Yamada¹⁷⁾、中川¹⁸⁾は、精液所見の異常群では、haploid cell の

割合が少ないためであると述べている。さらに精液所見の異常群、特に乏精子症患者において k_2 が高値を示し、精子 DNA の不安定性が示唆されたが、このことより精子 DNA に何らかの障害が存在したことが推察される。すなわち、精子が haploid cell まで成熟するまでに何らかの障害があり、その結果、haploid cell の割合が小さくなり平均精子 DNA 量は高値を示しかつ精子 DNA の安定性も小さくなることが推察された。

以上、本法は精子の性状を調べるうえで非常に有用であると言える。しかし、本法は臨床応用するにはやや複雑であり、ソフト類の問題もある。今回は種々の時間加水分解したが、Evenson ら^{19,20)}が述べているように、ある適当な時間熱処理（または加水分解）し、 $\alpha_t \{ \text{red} / (\text{red} + \text{green fluorescence}) \}$ を求め比較するのも有用であろう。

今回は精子濃度 $4,000 \times 10^4/\text{ml}$ 、精子運動率 60%、精子奇形率 20% で精液所見を分け各パラメーターを比較検討したが、妊孕可能な限界については諸説あり今後さらに検討を要するものと思われる。今後症例を重ね、精液所見と各パラメーターとの相関関係をさらに検討するとともに、妊孕力との相関関係や、治療効果判定に応用できないか検討する予定である。

なお本論文の要旨は、第 32 回不妊学会総会で発表した。

文 献

- 1) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free naimal ova as a test system for the assesment of the fertilizing of human spermatozoa, Biol. Reprod., 15: 471, 1976
- 2) 浜口毅樹, 松本 修, 守殿貞夫: 男性不妊における精子受精能に関する研究; 透明帯除去ハムスター卵精子侵入試験とヒト精子受精能, 泌尿紀要, 32: 1867, 1986
- 3) 宮崎豊彦, 田辺清男, 名取道也, 青木 類, 遠藤勝英, 小林俊文, 飯塚理八: ウシ頸管粘液を用いてヒト精子の運動性評価, 日不妊会誌, 32: 630, 1987
- 4) Oshio, S., Kaneko, S. and Mohri, H.: Characterization of rabbit sperm by equilibrium sedimentation in Percoll during frequent ejaculation, Arch. Androl., 17: 189, 1986
- 5) Fukuda, M., Miyoshi, N., Hattori, T., Sugihara, H., Hosokawa, Y. and Nakanishi, K.: Different instability of nuclear DNA at acid hydrolysis in cancerous and noncancerous cells as revealed by fluorescent staining with acridine orange, Histochemistry, 84: 556, 1986

- 6) Miyoshi, N. and Fukuda, M.: Quantitative detection of DNA damage in the neuronal cells of the cerebellum and cerebrum by the analysis of Feulgen hydrolysis curves, *Histochemistry*, 84: 561, 1986
- 7) 福田 優, 三好憲雄, 中西和夫: 細胞核 DNA 損傷の定量的解析法, *組織細胞科学*: 101, 1985
- 8) 福田 優, 三好憲雄, 法木左近, 今村好章: 顕微蛍光測光法による生体試料分析の動向, *ぶんせき*, 9: 612, 1987
- 9) Madokoro, S., Urata, Y., Hosokawa, Y., Hattori, T., Pellicciari, C., Oki, F., Sugihara, S., Miyoshi, N. and Fukuda, M.: Computer analysis of subparameters of depurination and depolymerization rate constants in Feulgen DNA hydrolysis, *Bas. Appl. Histochem.*, 29: 199, 1985
- 10) Manfredi-Romanini, M. G., Biggiogera, M., Formenti, D., Frascini, A., Garagna, S., Pellicciari, C. and Redi, C. A.: Sperm-chromatin maturation in the mouse; A cytochemical approach, *Histochemistry*, 84: 484, 1986
- 11) Goldberg, R. G., Geremia, R. and Bruce, W. R.: Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse, *Differentiation*, 7: 167, 1977
- 12) Marushige, Y. and Marushige, K.: Transformation of sperm histones during formation and maturation of rat spermatozoa, *J. Biol. Chem.*, 250: 39, 1975
- 13) Pellicciari, C., Hosokawa, Y., Fukuda, M. and Manfredi-Romanini, M. G.: Cytofluorometric study of nuclear sulphhydryl and disulphide groups during sperm maturation in the mouse, *J. Reprod. Fert.* 68: 371, 1983
- 14) Pellicciari, C., Redi, C. A., Garagna, S., Fukuda, M. and Manfredi-Romanini, M. G.: Cytochemical patterns of mouse sperm chromatin during the passage along the female genital tract, *Acta Histochem. Cytochem.*, 17: 51, 1984
- 15) Ashikawa, I., Kinoshita, Jr. K., Ikegami, A. and Tobita, T.: Changes of the DNA packaging mode during bore sperm maturation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 908: 263, 1987
- 16) Porcelli, F., Redi, C. A. and Succi, G.: Chromatin condensation patterns of spermatozoa during epididymal passage in a normal and a chimeric bull, *Bas. Appl. Histochem.*, 28: 159, 1984
- 17) Yamada, M.: Studies on the DNA content of human spermatozoa in relation to sterility and infertility, *Nagoya Medical J.*, 23: 107, 1978
- 18) 中川恵彰, 浅井光興, 野口昌良, 中西正実, 石原実: 精液検査としてのヒト精子 DNA 量の測定, *日不妊会誌*, 32: 614, 1987
- 19) Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M. R.: Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility, *Science*, 210: 1131, 1980
- 20) Evenson, D. P., Higgings, P. J., Grueneberg, D. and Ballachey, B. E.: Folw cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea, *Cytometry*, 6: 238, 1985

A study of sperm DNA in infertile men using an acridine orange hydrolysis curve analysis (Preliminary report)

Hidekazu Yamamoto, Katsusuke Naito
and Haruo Hisazumi

Department of Urology, School of Medicine,
Kanazawa University, Ishikawa 920, Japan

Norio Miyoshi and Masaru Fukuda

Department of Pathology,
Fukui Medical School, Fukui 910-11, Japan

An analysis of DNA hydrolysis curves using acridine orange was used to study sperm DNA and chromatin in 19 men. Sperms were hydrolyzed with 2N HCl at 30°C for various times. The hydrolysis curves were determined by fluorescence cytophotometry and were fitted to the Bateman function using a computer. The values of kinetic parameters of the Bateman function, k_1 and k_2 , were significantly higher in oligozoospermia and asthenospermia groups than normal controls, and sperm DNA content was also significantly higher in the patient groups. These results indicate the presence of lowly condensed sperm chromatin and less stabilized sperm DNA. And an irregular degree of the sperm hydrolysis suggests a lack of uniform sperm maturation in the patient groups.

(受付: 1989 年 2 月 13 日)

分離 Leydig 細胞の testosterone 産生に及ぼす ketoconazole の影響

The Effects of Ketoconazole on Steroidogenesis in Purified Rat Leydig Cells

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室（主任：片山 喬教授）

風 間 泰 蔵 里 見 定 信 笹 川 五 十 次
Taizo KAZAMA Sadanobu SATOMI Isoji SASAGAWA
寺 田 為 義 片 山 喬
Tameyoshi TERADA Takashi KATAYAMA

Department of Urology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan
(Director: Prof. T. Katayama)

広いスペクトルを有する抗真菌剤として、近年その有用性が評価されている ketoconazole のラット分離 Leydig 細胞に及ぼす内分泌学的効果につき検討した。Leydig 細胞は、SD 系ラット精巣より得た crude interstitial cells を、さらに percoll により密度勾配遠心することにより採取した。得られた Leydig 細胞を HCG 添加群と非添加群に分け、それぞれに種々の濃度の ketoconazole を添加し一定時間培養した後の培養液中の testosterone および細胞内外の c-AMP 濃度を測定した。その結果、培養液中の testosterone は、ketoconazole の濃度増加にしたがって減少し、本剤の testosterone 合成抑制作用が確認された。一方、細胞内外の c-AMP には ketoconazole の添加量による影響は認められず、この作用は c-AMP 産生機構を介さないものであることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 137-141, 1990)

緒 言

Ketoconazole は、広いスペクトルを持つ経口抗真菌剤として知られている。最近まで比較的副作用は少ないとされていたが、その長期使用に伴う、男性患者の女性化乳房の発現が報告されて以来¹⁾、副腎、精巣に及ぼす作用がクローズアップされ、これに関する報告も多く見られるようになってきている。

われわれは、今回 percoll によるラット精巣 Leydig 細胞の分離採取を試み、これを用いて、ketoconazole の testosterone 産生に及ぼす影響につき、若干の検討を加えたので報告する。

材料および方法

1) ラット Leydig 細胞の分離

8 週令の Sprague-Dawley 系雄性ラットを断頭屠殺して直ちに精巣を摘出、白膜を除去した後、collagenase (Worthington Type I) 1.25mg/ml, bovine serum albumin (以下 BSA, Sigma) 1mg/ml を含む medium199 (以下 M199, Flow laboratory) 10ml 内で 34°C 下、30 分振盪することにより cell dispersion を行なった。これをナイロンメッシュで濾過して精細管を除去し、250 g で 15 分間遠沈することにより crude interstitial cell を得た。Leydig 細胞の分離採取は、Browning ら²⁾の方法にのっとり行なった。すなわち percoll 1:1.8 倍濃縮 M199-BSA を、9:11 に混合した液を予め、20,000 g にて遠沈しておき、これに前述の crude interstitial cell を静かに添加、800 g、4°C 下にて 20 分間遠沈した。この操作により、細胞は 3 層に分かれる。この中間層

のみを採取し M199-BSA にて 2 回洗浄, 95 % O_2 , 5 % CO_2 混合ガス下での 2 時間の preincubation を行なった後, 以下の実験に供した.

2) Leydig 細胞の組織化学的同定

得られた Leydig 細胞の同定は 3β -hydroxysteroid dehydrogenase の染色により行なった. つまり, 0.1M phosphate buffer pH7.6, 4 ml に対して 3 mg/ml NAD (半井化学), 16 mg/解 ml nicotinamide (半井化学), 1 mg/ml nitro-BT (半井化学), dehydroepiandrosterone (Sigma) 0.2 mg の割合となるように混じて染色液を作成し, 細胞浮遊液 1 ml にこの染色液を 0.3ml 加えて, $37^\circ C$ 下に 60 分間 incubate した. ついで鏡検により, 全体の細胞数および 3β -hydroxysteroid dehydrogenase を有する細胞に相当する, 濃青色の顆粒の認められた細胞数をカウントした.

3) 内分泌学的検討

pre-incubation を行なった分離 Leydig 細胞は, 最終的に 1 ml 中の細胞数が 10^5 cells になるように調整後, まず HCG (帝国臓器) 添加による, 培養液中の testosterone の変化を検討した. 0 ~ 1,000 mIU/ml の HCG を加えて $34^\circ C$, 混合ガス下に 3 時間培養した後, 遠沈し, 上清中の testosterone を RIA にて測定した.

次に同じく 10^5 cells/ml に調整した細胞を HCG 添加群と非添加群に分け, Pont ら³⁾にしたがって無水 ethanol に溶解した ketoconazole を 0.1, 0.5, 1, 5 mg/l の各濃度となるように加えて, $34^\circ C$, 混合ガス下に 3 時間培養した後, 培養液中の testosterone, c-AMP および細胞内の c-AMP を RIA にて測定した. 培養液中 c-AMP の測定は, 予め培養液中に phosphodiesterase inhibitor である 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) を添加しておいて行なった. また細胞内 c-AMP の測定は, 最終濃度が 0.1 N

になるように HCl を加えて反応を停止し, その後 $100^\circ C$ で 2 分煮沸して c-AMP を抽出することによって行なった.

結 果

今回の分離法により, 最終的に一つの精巣あたり約 4×10^5 個の細胞が得られた. この細胞には精子, 赤血球は殆ど含まれておらず, また 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 染色を行なったところ, 全細胞の約 90 % に濃青色の顆粒が認められた. (Fig. 1) また, pre-incubation 後に行なった trypan blue dye exclusion test での, cell viability は 90 % 以上を示した.

次に内分泌学的検討についてであるが, まず各濃度の HCG 添加後, 3 時間培養での培養液中 testosterone 濃度は, Fig. 2 のごとくであった. すなわち,

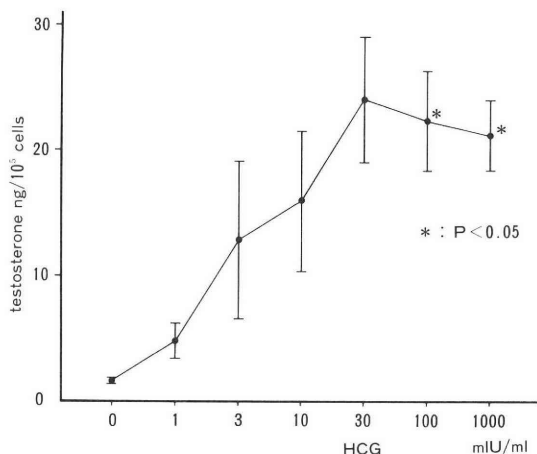


Fig. 2 Effects of HCG on testosterone production ($M \pm S. E.$, $n=3$)

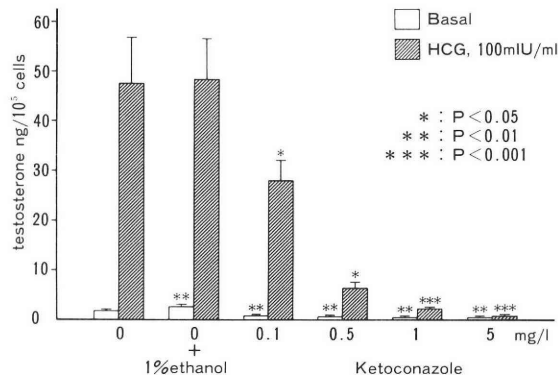


Fig. 3 Effects of ketoconazole on testosterone production ($M \pm S. E.$, $n=5$)

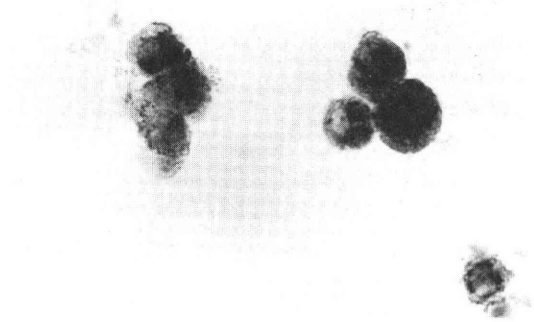


Fig. 1 Purified Leydig cells

HCG 非添加においては, 1.67 ± 1.9 ng/ 10^5 cells (以下 Mean $\pm$ S. E.) であったが, その後添加した HCG 濃度の増加にしたがっての増加傾向を示し, HCG 100 および 1,000mIU/ml の濃度では,それぞれ 22.3 ± 4.0 ng/ 10^5 cells および 21.1 ± 2.8 ng/ 10^5 cells となり HCG 非添加時との間に, 有意差を認めた. したがって次の ketoconazole 添加実験においては, 同時に添加する HCG の濃度は, 100mIU/ml とした.

各濃度の ketoconazole 添加 3 時間培養後の培養液中の testosterone 濃度を, Fig. 3 に示す. HCG 非添加群では, ketoconazole 非添加で 1.77 ± 0.22 ng/ 10^5 cells (以下 Mean $\pm$ S. E.) であったが, 0.1 mg/1 において 0.75 ± 0.13 ng/ 10^5 cells, 0.5 mg/1 において 0.36 ± 0.06 ng/ 10^5 cells, 1 mg/1 において 0.31 ± 0.07 ng/ 10^5 cells, 5 mg/1 において 0.30 ± 0.07 ng/ 10^5 cells と ketoconazole の濃度増加にしたがって抑制される傾向を示した. また HCG 100mIU/ml 同時添加群では, ketoconazole 濃度が, 0 mg/1, 0.1 mg/1, 0.5 mg/1, 1 mg/1, 5 mg/1 と増加すると, その testosterone 濃度は順に, 47.5 ± 9.29 ng/ 10^5 cells, 28.2 ± 3.91 ng/ 10^5 cells, 6.23 ± 1.18 ng/ 10^5 cells, 2.21 ± 0.32 ng/ 10^5 cells, 0.53 ± 0.12 ng/ 10^5 cells とやはり抑制されていく傾向が認められた. ketoconazole の溶解に使用した ethanol は testosterone 産生に何等の影響も与えなかった.

同じく各濃度の ketoconazole 添加 3 時間培養後の細胞外の c-AMP を Fig. 4 に示す. HCG 非添加群では, ketoconazole 非添加で, 2.79 ± 0.71 pmol/ 10^5 cells (以下 Mean $\pm$ S. E.) という値であり, 以下, ketoconazole 濃度を 0.1 mg/1, 0.5 mg/1, 1 mg/1, 5 mg/1 と順に上げていっても, 2.05 ± 0.17

pmol/ 10^5 cells, 2.36 ± 0.31 pmol/ 10^5 cells, 2.91 ± 0.53 pmol/ 10^5 cells, 1.75 ± 0.21 pmol/ 10^5 cells とほとんど変化は認められなかった. HCG 添加群においてもこれは同様であり, ketoconazole 濃度 0 mg/1, 0.1 mg/1, 0.5 mg/1, 1 mg/1, 5 mg/1 において, それぞれ 214.9 ± 30.4 pmol/ 10^5 cells, 270.4 ± 41.1 pmol/ 10^5 cells, 249.2 ± 35.2 pmol/ 10^5 cells, 254.9 ± 36.4 pmol/ 10^5 cells, 218.2 ± 38.0 pmol/ 10^5 cells という結果であった. 細胞内 c-AMP についても ketoconazole の濃度の変化による影響は認められなかった. すなわち, ketoconazole 濃度 0 mg/1, 0.1 mg/1, 0.5 mg/1, 1 mg/1, 5 mg/1 内 1 6 5 6 1 の順に, HCG 非添加群で, 0.50 ± 0.09 pmol/ 10^5 cells (以下 Mean $\pm$ S. E.), 0.47 ± 0.06 pmol/ 10^5 cells, 0.49 ± 0.06 pmol/ 10^5 cells, 0.53 ± 0.06 pmol/ 10^5 cells, 0.51 ± 0.02 pmol/ 10^5 cells, HCG 添加群で, 11.90 ± 1.23 pmol/ 10^5 cells, 20.61 ± 2.89 pmol/ 10^5 cells, 18.34 ± 2.63 pmol/ 10^5 cells, 18.30 ± 1.68 pmol/1 6 5 6 10^5 cells, 16.92 ± 3.19 pmol/ 10^5 cells という結果であった (Fig. 5).

考 察

ketoconazole は, イミダゾール環を有する抗真菌剤であり, その作用は真菌内における lanosterol から ergosterol に至る 14 脱メチル化反応を阻害することによるものと考えられている⁴⁾. 1981 年 DeFelice らは, ketoconazole の使用により女性化乳房の発生をみた症例を報告した¹⁾. 彼らは, その機序として乳房に対する直接効果を考え, ステロイド合成あるいは結合に対する効果は無いものと考えたが, その後の検討により, ketoconazole が副腎あるいは精巣で

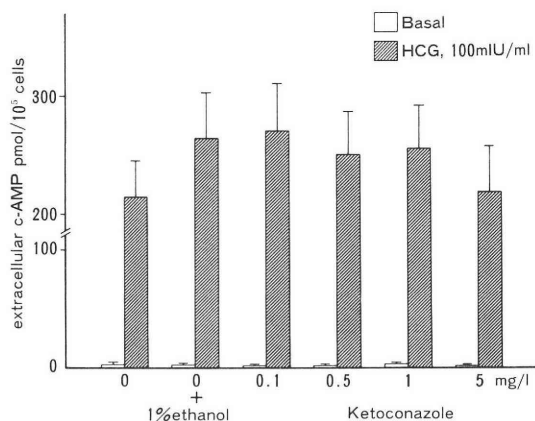


Fig. 4 Effects of ketoconazole on extracellular c-AMP (M $\pm$ S. E., n=5)

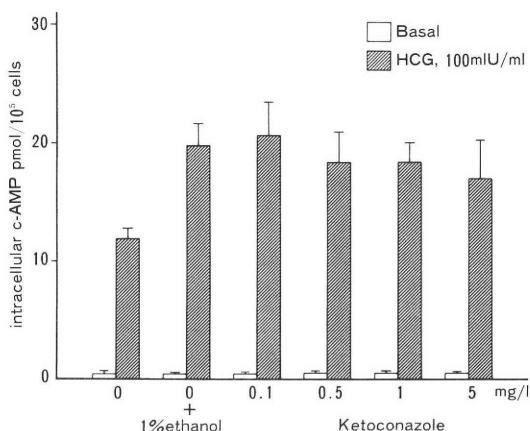


Fig. 5 Effects of ketoconazole on intracellular c-AMP (M $\pm$ S. E., n=5)

のステロイド合成を阻害することが明らかになってきた^{3,5)}。精巣の testosterone 合成に及ぼす影響をみたものとしては、まず Pont らの報告³⁾があげられる。かれらは 600 mg の ketoconazole を成人ボランティアに投与して 2 時間後には、血中の testosterone 値がすでに投与前の 47 % に低下したことより、本剤の testosterone 合成抑制作用を確認した。かれらはこの際の血中 ketoconazole 濃度が 7.9 mg/l に達することをあわせて報告しているが、これは今回われわれのデータではもし直接細胞に触れるとするなら testosterone 生合成の抑制には十分過ぎる濃度であり、通常真菌感染症に対して使用される 200~400 mg の一回使用量でも十分に血中 testosterone が低下しうることを示唆している。現在、欧米においては、この作用を利用して、前立腺癌⁶⁾、Cushing 症候群⁷⁾および思春期早発症⁸⁾などに対する使用がすでに試みられている。他の副作用があまり見られないなど、その性質よりみて本邦においても今後さらに基礎的あるいは各疾患に対しての臨床的な検討が行われていくものと思われる。われわれは、今回その内分泌学的検討を行なう手段として分離 Leydig 細胞を用いた。その有用性は、本邦においても鶴田ら⁹⁾によりすでに報告されているが、われわれの検討でも、分離後の HCG 刺激による testosterone 分泌は良好に保たれており、また ketoconazole の testosterone 分泌抑制作用がはっきりと示されるなど、その簡便性と併せて、特に今回のような薬剤の影響を見る場合の *in vitro* の実験方法として適しているものと考えた。

ホルモン分泌抑制の機序に関してはやはり既にある程度の研究がなされており、精巣では、C 17-20 lyase や 17 α -hydroxylase、また副腎では、C 20-22 lyase、11 β -hydroxylase や 18-hydroxylase などチトクローム P-450 が関与する酵素反応を阻害するとする意見が大勢を占めているようである^{10,11)}。しかし、最近 Sikka¹²⁾らは、crude な精巣の interstitial cells を用いての実験で、これ以外の機序も関与している可能性を指摘している。すなわち、かれらは、チトクローム P-450 は関与していないとされる 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性に対する ketoconazole の影響を調べた実験において、HCG 非添加群に ketoconazole を加えてもやはり何らの影響も認めなかったが、HCG を添加することにより増強された 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は、さらに ketoconazole を添加することによって抑制されるとした。つまり HCG 添加群のみの酵素活性を抑えるということから HCG receptor や adenylyl cyclase 活性にも影響している可能性について述べたもので

ある。副腎についてはこの点に関してすでに Loose¹⁰⁾が、c-AMP の産生があまり強力では無いながらも、ketoconazole により抑制されることを報告している。今回の検討の主な興味は、これが精巣にもあてはまるかどうかという点にあったのであるが、われわれのデータでは、精巣での ketoconazole の c-AMP 産生に対する作用は確認されなかった。この理由としては、副腎と精巣では、ketoconazole の作用が若干違う形で表われるという可能性を考えるよりも、実験条件などの違いによる結果の差と考えるほうが妥当と思われる。今後、さらに HCG receptor, adenylyl cyclase 活性に対する影響などを含めて、検討を追加すべきものと考えている。しかし、いずれにせよ ketoconazole の、c-AMP 産生に及ぼす影響を介しての testosterone 分泌減少作用は、非常に小さいものと考えてよいであろう。

稿を終えるにあたり、Leydig 細胞分離法についてご助言頂いた熊本大学泌尿器科学教室鶴田一真先生に深謝致します。なお、本論文の要旨は第 7 回日本アンドロロジー学会にて発表した。

文 献

- 1) DeFelice, R., Johnson, D. G., Galgiani, J. N.: Gynecomastia with Ketoconazole. *Antimicrob., Agents Chemother.*, 19: 1073, 1981
- 2) Browning, J. Y., D'Agata, R., Grotjan, E. Jr.: Isolation of purified rat Leydig cells using continuous percoll gradients. *Endocrinology*, 109: 667, 1981
- 3) Pont, A., Williams, P. L., Azhar, S., Reitz, R. E., Bochra, C., Smith, E. R., Stevens, D. A.: Ketoconazole Blocks Testosterone Synthesis. *Arch. Intern. Med.*, 142: 2137, 1982
- 4) Van den Bossche, H., Willemsen, G., Cools, W., Cornelissen, F., Lauwers, W., Cussem, J.: *In Vitro* and *in vivo* effects of the antimycotic drug ketoconazole on steroid synthesis. *Antimicrob., Agents Chemother.*, 17: 922, 1980
- 5) Pont, A., Williams, P. L., Loose, D. S., Feldman, D., Reitz, R. E., Bochra, C., Stevens, D. A.: Ketoconazole Blocks Adrenal Steroid Synthesis. *Ann. Intern. Med.*, 97: 370, 1982
- 6) Heyns, W., Drochmans, A., Van der Schueren, E., Verhoeven, G.: Endocrine effects of high-dose ketoconazole therapy in advanced prostatic cancer. *Acta Endocr.*, 110: 276, 1985
- 7) Sonino, N., Boscaro, M., Merola, G., Mantero, F.: Prolonged Treatment of Cushing's Disease by Ketoconazole. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 61: 718, 1985
- 8) Rudd, B. T.: Chapter 8 Precocious and delayed

sexual development in children, *Acta Endocr.*, 288: 66, 1988

- 9) 鶴田一真, 吉田正貴: ラット睪丸よりのLeydig細胞採取法の検討, *西日泌尿*, 46: 519, 1984
- 10) Loose, D. S., Kan, P. B., Hirst, M. A., Marcus, R. A., Feldman, D.: Ketoconazole Blocks Adrenal Steroidogenesis by Inhibiting Cytochrome P450-dependent Enzymes, *J. Clin. Invest.*, 71: 1495, 1983
- 11) Lambert, A., Mitchell, R., Robertson, W. R.: The effect of ketoconazole on adrenal and testicular steroidogenesis *in vitro*, *Biochem. Pharmac.*, 35: 3999, 1986
- 12) Sikka, S. C., Swerdloff, R. S., Rajfer, J.: *In Vitro* Inhibition of Testosterone Biosynthesis by Ketoconazole, *Endocrinology*, 116: 1920, 1985

**The effects of ketoconazole on
steroidogenesis in
purified rat Leydig cells**

Taizo Kazama, Sadanobu Satomi,
Isoji Sasagawa, Tameyoshi Terada
and Takashi Katayama

Department of Urology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University,
Toyama 930-01, Japan
(Director: Prof. T. Katayama)

Ketoconazole has recently been shown to be an effective broad spectrum antifungal agent. In this study, we investigated the effects of ketoconazole on steroidogenesis in purified rat Leydig cells. Continuous percoll gradients were utilized to isolate purified Leydig cells from rat testicular crude interstitial cell suspensions. Ketoconazole inhibited basal and human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone secretion from rat Leydig cells in a dose dependent manner. On the other hand, no effects were detected to intracellular and extracellular c-AMP concentrations. These findings indicate that the c-AMP production system does not seem to play a role in the ketoconazole inhibition of testicular steroidogenesis.

(受付: 1989年3月6日)

片側性精索静脈瘤による両側精巣の 造精機能障害—実験的研究

Impairment of Spermatogenesis in Bilateral Testes by Unilateral Varicocele: Experimental Study

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

石 津 和 彦

Kazuhiko ISHIZU

Department of Urology, Yamaguchi University
School of Medicine, Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

今回、片側性精索静脈瘤の両側精巣の造精機能に及ぼす影響を調べる目的で、左腎静脈部分結紮に加えて新たな工夫として左内精静脈と左総腸骨静脈の間の側副路を結紮して10週令Wistar系ラットに左精索静脈瘤を作製し、5週後に精巣重量および精巣内DNA量分布を測定し、以下の結果を得た。

1. 精巣重量: varicocele群 ($n=10$) ではsham operation群 ($n=10$) に比べ両側とも低値を示した(左側: $P<0.01$, 右側: $P<0.1$). varicocele群では左側は右側に比べ有意に低値をとった($P<0.01$).

2. Percentage of haploid cells: varicocele群ではsham operationに比べ両側とも有意に低値を示した(左側: $P<0.01$, 右側: $P<0.05$). varicocele群では左側は右側に比べ有意に低値をとった($P<0.01$).

以上の結果より、片側性精索静脈瘤は両側精巣の造精機能を障害し、その程度は患側に強いことが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 142—149, 1990)

緒 言

精索静脈瘤は主に臨床的経験より男子不妊の原因の1つとして考えられており^{1,2)}、当教室でも、陰囊シンチグラムに加えて、新たに考案開発した精巣部深部温測定によって精索静脈瘤の発見に努め、積極的に手術療法を行ない良好な成績を得てきた^{3,4)}。しかし、精索静脈瘤の臨床データは主に不妊患者から得られたものであり、妊孕力を保持した精索静脈瘤の症例も多く経験されている⁵⁾。そのため、精索静脈瘤が単独で男子不妊を直接惹起するか否かは未だ完全な解明がなされていない疑問であり⁶⁾、またこれらの直接の関係を否定する報告すらある⁷⁾。さらに、精索静脈瘤が片側性であっても両側性に造精機能を障

害することは「なぞ」とされてきたが⁸⁾、臨床的にはその障害の程度に左右差はみとめないという報告が多い^{8,9,10)}。しかし、最近では患側に障害の程度が強いという報告もみられ¹¹⁾、当教室において左精索静脈瘤のある不妊患者の精巣体積、Johnsen's mean scoreおよび精巣内DNA量分布を検討した結果、患側に強い造精機能障害があることが示唆された^{4,12,13)}。今回、ヒトにおいて片側性静脈瘤が男子不妊の原因となるか、すなわち両側精巣の造精機能を障害しうるものか、その障害の程度は患側と健側の間に差があるかどうかを調べる目的で、基礎的研究を行なった。すなわちラットに静脈瘤の病態生理の1つと考えられている腎静脈から内精静脈への逆流を生じさせる片側性静脈瘤モデルを新たな工夫を加えて作製し、

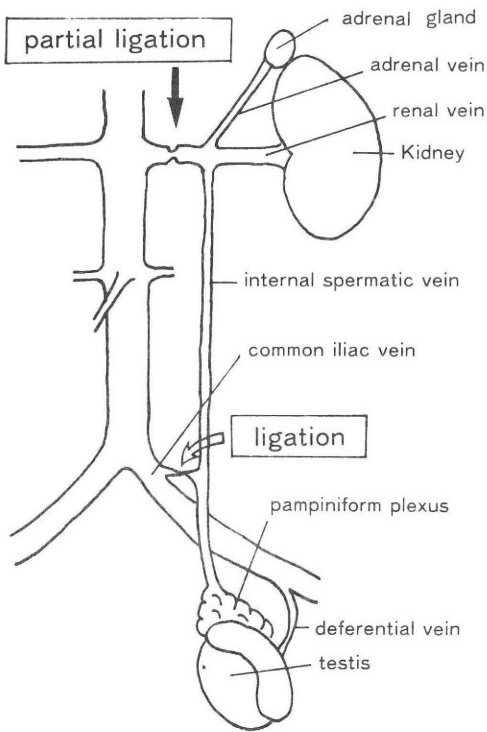


Fig. 1 Schema of the procedure inducing left varicocele

精巣重量および本教室で造精機能の評価法として利用してきた精巣内 DNA 量分布^{14,15)}から片側性精索静脈瘤の両側精巣に及ぼす影響を検討した。

実験材料および方法

1. 実験材料

10 週令 Wistar 系雄性ラット (250~300 g) を用いた。ラットは実験 7 日前より飼育し、水、飼料、光等同一条件に飼育した。ラットは以下に示す 2 群に分けた。

2. 方法

1) varicocele 群

Wistar 系雄性ラットの左精巣を中心とした最も一般的な静脈系は Fig. 1 の如く考えられている¹⁶⁾。ラット 50 匹に対し、エーテル麻酔下、腹部正中切開にて、従来の方法¹⁷⁾に従い左腎静脈を左内精静脈合流部より下大静脈側で外径が 1 mm となるように絹糸にて部分結紮した。さらに今回の工夫として、左内精静脈中の左総骨静脈に流入する側副路をナイロン糸にて結紮した (Fig. 1)。術後 5 週に同一麻酔で再開腹し、左内精静脈から下大静脈あるいは総腸骨静脈へ新たに太い側副路が生じず、かつ左内精静脈が腎静脈から下方まで全長にわたり術前の 3 倍以上に拡張したラットを varicocele 群 (n=10) とした (Fig. 2)。ラットを屠殺後、精巣および精巣上体を摘出、



Fig. 2 Left internal spermatic vein (arrow)

A. prior to the ligations B. 5 weeks after the operation

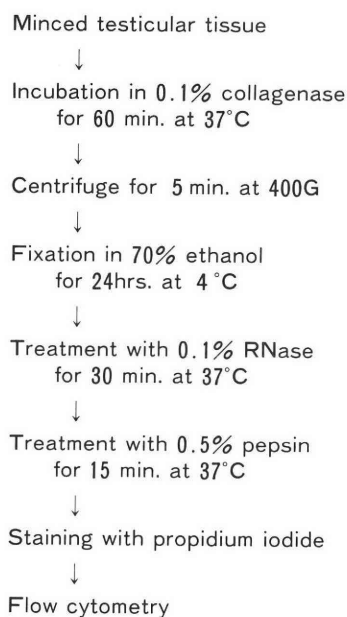


Fig. 3 Method

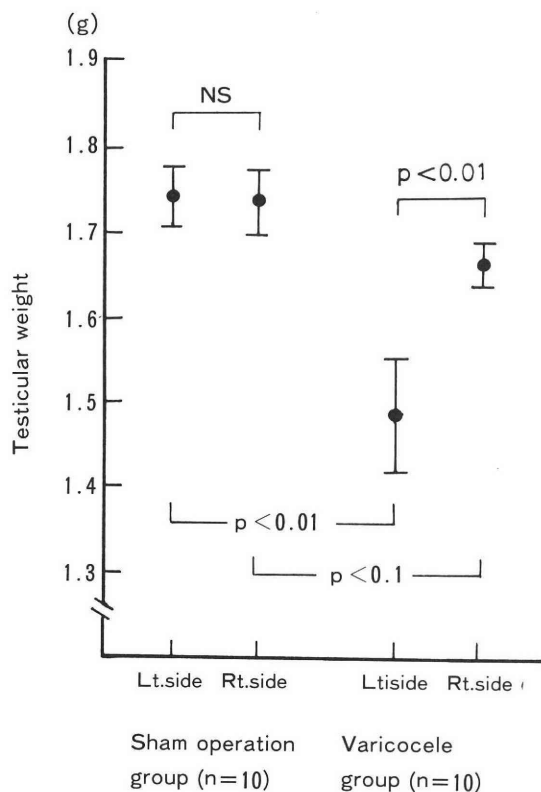


Fig. 4 Testicular weight (mean ± SE)

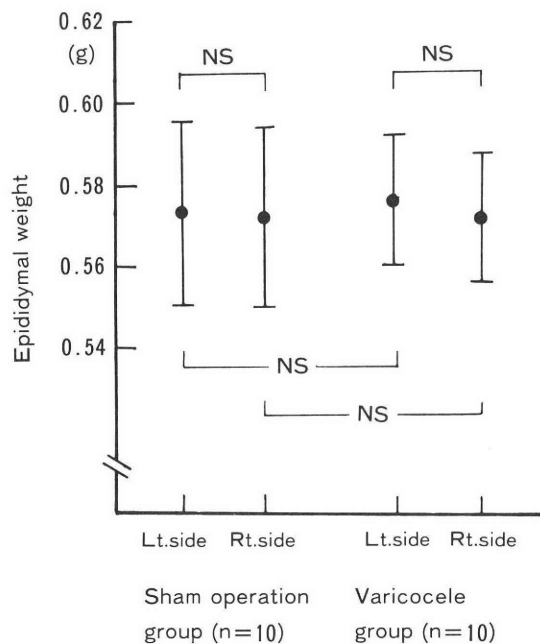


Fig. 5 Epididymal weight (mean ± SE)

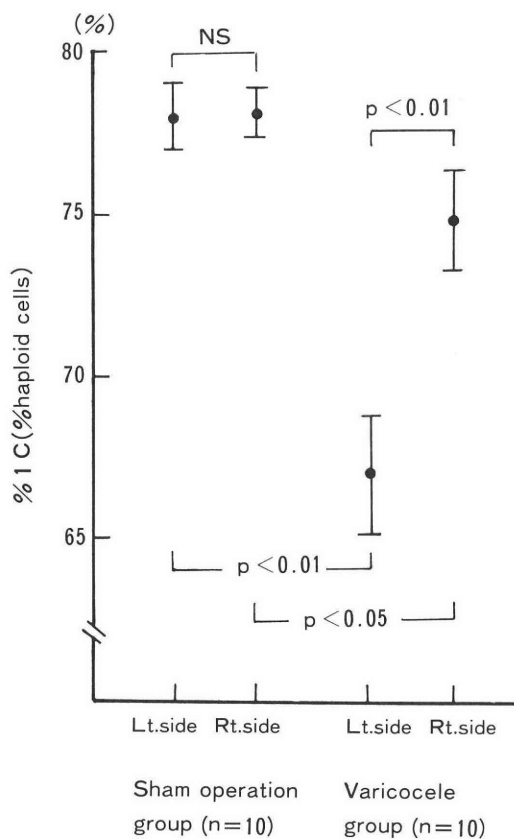


Fig. 6 Percentage of haploid cells (mean ± SE)

wet weight を測定した。さらに、当科からすでに報告している検体処理¹⁴⁾ (Fig. 3) を行ない flow cytometry 測定用試料とし、EPICS 753 (Coulter Electronics, Inc) を用いて精巣 DNA 量分布を測定した。

2) sham operation 群

ラット 10 匹に対し、同一麻酔下に開腹のみを行ない、結紮は全く行わずに閉腹し、sham operation 群 (n=10) とした。術後 5 週に varicocele 群と同様な処置をした。

結 果

1) ラット体重

varicocele 群では 397 ± 4 g (mean $\pm$ SE), sham operation では 392 ± 4 g で、両群に有意の差をみとめない。

2) 精巣重量 (Fig. 4)

varicocele 群では左側 1.49 ± 0.07 g, 右側 1.66 ± 0.02 g, sham operation 群では左側 1.74 ± 0.03 g, 右側 1.74 ± 0.04 g で、varicocele 群では sham opera-

tion 群に比べて、左側では有意に低値を示し ($P < 0.01$)、右側では低値の傾向をみとめた ($P < 0.1$)。sham operation 群では左右差をみとめなかったのに対し、varicocele 群では左側は右側に比べ有意に低値をとった ($P < 0.01$)。

3) 精巣上体重量 (Fig. 5)

varicocele 群では左側 0.58 ± 0.02 g, 右側 0.57 ± 0.02 g, sham operation 群では左側 0.57 ± 0.02 g, 右側 0.57 ± 0.02 g で、左右両側とも両群の間に有意の差を示さず、両群の間で左右差をみとめなかった。

4) % 1 C (% haploid cells) (Fig. 6)

varicocele 群では左側 67.0 ± 1.8 %, 右側 74.7 ± 1.8 % で、sham operation 群では左側 77.9 ± 1.1 %, 右側 78.1 ± 0.7 % で、varicocele 群では sham operation 群に比べて、左側では有意に低値をとり ($P < 0.01$)、右側でも低値を示した ($P < 0.05$)。sham operation 群では左右差をみとめなかったのに対し、varicocele 群では左側は右側に比べ有意に低値をとった ($P < 0.01$)。

5) % 2 C (% diploid cells) (Fig. 7)

varicocele 群では左側 21.0 ± 2.2 %, 右側 15.0 ± 1.1 % で、sham operation 群では左側 11.9 ± 0.4 %, 右側 11.6 ± 0.5 % で、varicocele 群は sham opera-

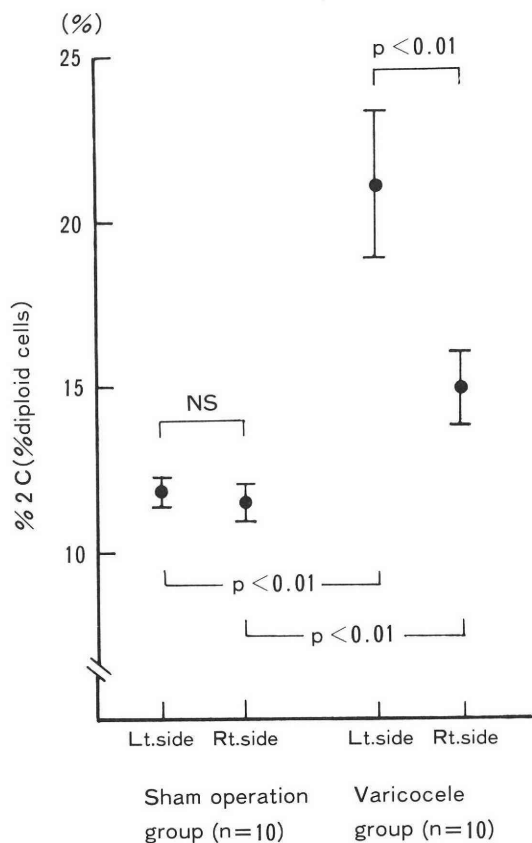


Fig. 7 Percentage of diploid cells (mean $\pm$ SE)

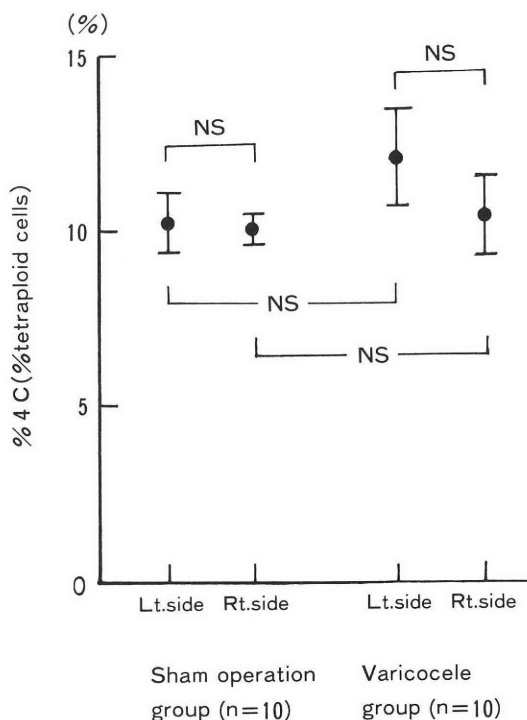


Fig. 8 Percentage of tetraploid cells (mean $\pm$ SE)

tion 群に比べ両側とも有意に高値を示した ($P < 0.01$). sham operation 群では左右差をみとめなかったのに対し, varicocele 群では左側は右側に比べ有意に高値をとった ($P < 0.01$).

6) % 4 C (% tetraploid cells) (Fig. 8)

varicocele 群では左側 $12.1 \pm 1.3\%$, 右側 $10.4 \pm 1.1\%$ で, sham operation 群では左側 $10.2 \pm 0.9\%$, 右側 $10.0 \pm 0.4\%$ で, 左右両側とも両群の間に有意の差を示さず, 両群とも左右差をみとめなかった.

考 察

精索静脈瘤は, 主に次の3つの事が臨床的に経験されている. すなわち, 精索静脈瘤の頻度は一般男子におけるよりも不妊男子において高いこと, 精索静脈瘤の存在では精液所見および精巣組織像に異常をきたすことが多いこと, および精索静脈瘤の手術は精液所見と妊娠率の改善率をもたらすことより, 男性不妊の原因の1つとして考えられてきた²⁾. 手術療法後の妊娠率は他の治療法と比較して良好とされており, 当教室でも陰嚢シンチグラムに加えて, 新たに考案開発した精巣部深部温測定によって精索静脈瘤の発見に努め, 積極的に手術療法を行ない比較的良好な成績を得ている^{3,4)}. しかし, 精索静脈瘤に関する臨床データは主に不妊患者から得られたものであり, 不妊の原因として他の要因が関与している可能性もある. さらに, 避妊手術(精管結紮術)で受診した190例中の26.3%に精索静脈瘤をみとめたという報告もあるように, 妊孕性のある精索静脈瘤の症例も多い⁵⁾. そのため, 精索静脈瘤と男子不妊が直接関係するかどうかについては疑問もあり⁶⁾, また, これを否定するものすらある⁷⁾. 加えて, 精索静脈瘤が片側性であっても両側性に造精機能が障害されることは「など」とされていたが, その理由には温度勾配で健側も高くなるためとする説や静脈系の吻合で有害物資の逆流が両側性に生じるためとする説があげられている⁵⁾. 上記の説が正しいとするならば, 理論的には, 温度が高く逆流も多いと考えられる患側の方が健側より障害の程度は強いはずである. しかし, 臨床的にはその障害の程度は患側に強いという報告もみられるが¹¹⁾, 明らかに左右差をみとめないとする報告も多く⁸⁾. Dubin ら⁹⁾は10%の症例だけに精巣組織像において左右差を, 広川ら¹⁰⁾は精子形成のみられた精細管で比較した場合だけに患側に強い障害の傾向をみとめたと報告している. 今回, ヒトにおいて片側性精索静脈瘤が男子不妊の原因となりうるか, すなわち両側の造精機能を障害するのか, またその障害の程度は患側と健側の間で差があるかど

うかを調べる目的で, 新たな工夫を加えラット実験モデルを作製し, 片側性精索静脈瘤の両側精巣の造精機能へ及ぼす影響を検討した.

ラットにおいては, 左総腸骨静脈起始部の結紮, nutcracker 現象の作製, あるいは左腸骨動静脈の側々吻合による精索静脈瘤実験モデルも報告されている^{16,18)}. しかし, ヒト精索静脈瘤による精巣の造精機能障害の機序の一つとして腎静脈血中の有害物質の精巣への逆流が考えられている. そのため, 主にラット精索静脈瘤の実験モデルの作製には Sprague-Dawley (S-D) 系ラットに対する左腎静脈部分結紮が用いられてきた^{17,19,20,21,22,23)}. 著者も S-D 系ラット 50 匹に対して左腎静脈部分結紮を行ない, 約 70% に内精静脈の拡張をみとめた. しかし, 内精静脈の拡張したラットの約 90% に, 術中には肉眼的にはみとめられなかった左内精静脈から左総腸骨静脈への太い側副路が新たに生じ, 内精静脈では側副路から腎静脈側は著明に拡張するが, 精巣側は細いという現象がみられた. そのため, 著者は Wistar 系ラットに対して腎静脈血の内精静脈への逆流を生じさせる目的で従来での左腎静脈部分結紮を行ない, 今回新たな工夫として, 腎静脈血が精巣へ逆流せずに側副路を通じて内精静脈から総腸骨静脈へ流出するのを防止する目的で内精静脈中の側副路を結紮した. Wistar 系ラットを用いた理由は, Wistar 系ラットは S-D 系ラットに比べ先の側副路が術前において太く結紮が容易なためである.

従来 S-D 系ラットに対する左腎静脈部分結紮のみによる精索静脈瘤作製の成功率が 48~75% であるのと比較して, Wistar 系ラットに対する著者の方法による成功率は 20% と低率であった. この理由として, 第一に内精静脈と総腸骨静脈の間の側副路を閉鎖しても, 術後新たに内精静脈と下大静脈の間に太い側副路が生じることがあり, 本実験ではこの様な場合は varicocele 群から除外したためと考えられる. 第二に, 従来方法では総腸骨静脈側副路が発達することにより腎静脈血の内精静脈への逆流が生じやすくなるのに対し, 著者の方法では側副路の発達が悪く逆流が少ないために内精静脈が拡張しにくいことも考えられる. しかしながら, いずれにしても腎静脈血の精巣への確実な逆流が惹起されたラットを精索静脈瘤モデルとする場合, 内精静脈から明かな側副路が生じた場合には本実験のごとく除外するか, あるいは何らかの方法で逆流を確認する必要があると考えられた.

本実験において精巣重量を測定した結果, varicocele 群は sham operation 群に比べて, 左側では

有意に低値を示し、右側では低値の傾向をみとめた。当教室、瀧原ら²⁴⁾はすでに山口大式 orchimeter を使用して不妊患者を対象に検討し、ヒト精巣体積が精巣機能の各種パラメーターと相関し、特に造精機能を良く反映することを報告している。ラット精巣重量も造精機能を反映すると推定される。そのため、本実験における精巣重量の結果から片側性精索静脈瘤は両側精巣の造精機能を障害すると考えられる。しかし、腎静脈部分結紮だけによる実験モデルによる報告では、イヌにおいては本実験と同様に、精索静脈瘤群は対照群に比べ精巣重量は有意に低値を示した¹⁷⁾が、ラットにおいては両群の間に明らかな精巣重量の差はみとめられていない。

spermatogenesis は、精細胞が、spermatogonia → primary spermatocyte → secondary spermatocyte → spermatid → sperm の成熟過程を通っておこなわれ、それに伴って核 DNA 量も $2C \rightarrow 4C \rightarrow 2C \rightarrow 1C$ と変化することが報告されている (Fig. 9)。当科では flow cytometry を用いて、その精巣 DNA 量分布測定を行ない、精巣の造精機能を評価してきた^{14,15)}。本実験においても同様な方法で DNA 量分布測定を行なった結果、varicocele 群では sham operation 群に比べ、左右両側とも $1C$ は有意に低値を示し、varicocele 群では両側精巣の造精機能が障害されていることが示唆された。さらに、DNA ヒストグラムパターンは当教室、川井の分類¹⁵⁾による Type C:

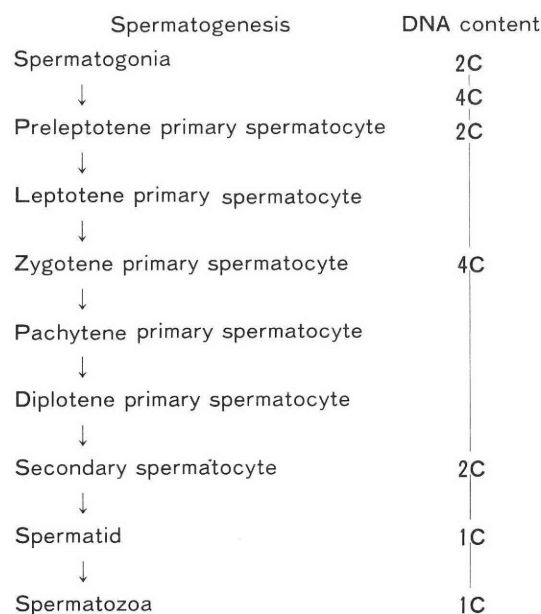


Fig. 9 The change of DNA content in spermatogenesis

Hypospermatogenesis に相等し、特に spermatid への成熟が障害されていると考えられた。精索静脈瘤実験モデルにおいて flow cytometry を使用し造精機能を評価したのは、Nagler ら²⁴⁾の報告を見るのみである。彼らは、 $1C$ は術後1日目では左側 $71.3 \pm 2.9\%$ 、右側 $67.7 \pm 3.9\%$ 、術後49日目では左側 $29.9 \pm 8.4\%$ 、右側 $50.5 \pm 14.9\%$ で、術後49日目では術後1日目に比べ、左側では本実験と同様に有意に低値を示し、右側では有意差をみとめないものの低値をとったと報告している。しかし、本実験モデルによる造精機能障害の程度は彼らの実験に比較してかなり軽度であった。その理由としては、彼らの観察期間が本実験に比べ長いこと、および彼らの比較方法には加齢の要素を必ずしも除外されていないことがあげられる。

本実験において精巣重量および $1C$ は、sham operation では左右差をみとめないのに対して、varicocele 群において左側では右側に比べ有意に低値をとり、本精索静脈瘤モデルにおいて患側では健側に比べて精巣の造精機能障害の程度は強いことが示唆された。しかし、腎静脈部分結紮だけによる実験モデルにおいては、本実験と同様に患側では健側に比べ強かったという報告²³⁾もある一方、障害の程度は左右差をみとめなかったという報告^{19,20)}もみられる。

以上、本実験モデルにおいては両側精巣の造精機能は障害され、その障害の程度は患側では健側に比べ強いことが示唆された。この結果は、当教室においてすでに報告した左精索静脈瘤のある不妊患者を対象とした精巣体積、Johnsen's score および精巣内 DNA 量分布からの検討結果^{1,12,13)}とよく一致する。

ヒト精索静脈瘤に血流動態の研究²⁵⁾から、精索静脈瘤の病態生理の1つとして腎静脈血の内精静脈への逆流があげられている。同様に、本実験モデルにおいても作製方法から腎静脈血の逆流が生じていると考えられている。しかし、他の精索静脈の血流動態として、内精静脈の静脈還流不良なものおよび血流状態は良好であるが蔓状静脈叢のみが拡張するものも考えられている。従って、今回の実験モデルが全てのヒト精索静脈瘤を再現しているわけではない。また、ヒト精索静脈瘤においては立位と臥位では逆流の程度が異なるためにその逆流は比較的時間的であるのに対して、ラット実験モデルにおいてはその逆流は常時生じていると考えられる。そのため、本実験モデルは必ずしも腎静脈血によるヒト精索静脈瘤をそのまま再現しているわけではない。しかし、ヒト精索静脈瘤でも本実験モデルと同様な変化を生じさせていると仮定するならば、ヒトにおいても片

側性静脈瘤は両側精巣の造精機能を障害し不妊の原因となりうること、およびその障害の程度は患側に強いことが推定される。

稿を終えるに臨み、御指導ならびに御校閲を賜った恩師酒徳治三郎教授に深謝致します。また本研究にあたり御指導ならびに御教授を賜った瀧原博史講師に深謝致します。さらに御指導、御協力下さった山口大学泌尿器科学教室の諸先生方に深謝致します。

文 献

- 1) Cockett, A. T. K., Takihara, H. and Cosentino, M. J.: The varicocele, *Fertil. Steril.*, 41: 5, 1984
- 2) 伊藤晴夫, 柳 重行, 川村健二, 片海善吾, 五十嵐辰夫, 角谷秀典, 布施秀樹, 宮内大成, 島崎 淳: 精索静脈瘤不妊症の成因, I, 精索静脈瘤は男子不妊の原因か, 西日泌尿, 48: 1105, 1986
- 3) 山口政俊, 山川弦一郎, 馬場良和, 磯山理一郎, 原田宏行, 川井修一, 藤井光正, 藤沢章二, 瀧原博史, 酒徳治三郎: 男子不妊症特に精索静脈瘤における睾丸部深部温度測定について, 日不妊会誌, 30: 664, 1985
- 4) 瀧原博, 植野卓也, 石津和彦, 山口政俊, 磯山理一郎, 馬場良和, 酒徳治三郎: 精索静脈瘤, 病理と臨床, 投稿中
- 5) 広川 信, 松下和彦: 精索静脈瘤—病態生理—アンドロロジー最近の進歩, ホと臨床, 34(増刊号): 49, 1986
- 6) Turner, T. T., Varicocele: still an enigma, *J. Urol.*, 129: 695, 1983
- 7) Nisson, S., Edvinsson, A. and Nilsson, B.: Improvement of semen and pregnancy rate after ligation and division of the internal spermatic vein: fact or fiction?, *Brit. J. Urol.*, 51: 591, 1979
- 8) Agger, P. and Johnsen, S. G.: Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicocele, *Fertil. Steril.*, 29: 52, 1978
- 9) Dubin, L. and Hotchkiss, R. S.: Testis biopsy in subfertile men with varicocele, *Fertil. Steril.*, 20: 50, 1969
- 10) 広川 信, 岩本晃明, 岩崎 皓, 佐藤和彦, 松下和彦, 朝倉茂夫: 精索静脈瘤の臨床的研究: 睾丸生検像からみた精子形成能について, 日不妊会誌, 27: 83, 1982
- 11) 友吉唯夫, 石田 章: 両側精巣生検組織像の比較検討, 泌尿紀要, 34: 1939, 1988
- 12) 磯山理一郎, 山口政俊, 馬場良和, 原田宏行, 川井修一, 藤沢章二, 瀧原博史, 酒徳治三郎: 精索静脈瘤患者における造精機能評価—とくに Flow cytometry を用いて—, 日不妊会誌, 31: 176, 1986
- 13) Takihara, H., Yamakawa, G., Isoyama, R., Baba, Y. and Sakatoku, J.: Recent advances in the assesment of human spermatogenesis and its clinical application in infertility, *Proceedings of the VI th World Congress on Human*

Reproduction: 615, 1988

- 14) 橋本 治: Flow Cytometry (FCM) によるラット睾丸 DNA 量の測定, 西日泌尿, 46: 533, 1984
- 15) 川井修一: Flow cytometry による睾丸内精子形成能の評価判定, 第2報: 男子不妊症患者の精子形成能の評価, 泌尿紀要, 31: 87, 1985
- 16) 荻田 卓: 精索静脈瘤に関する実験的研究, 日不妊誌, 31: 326, 1986
- 17) Saypol, D. C., Howards, S. S., Turner, T. T. and Miller, E. D.: Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature and histology in adult rats and dogs, *J. Clin. Invest.*, 68: 39, 1981
- 18) Carmignani, G., Tedde, G., De Stefani, S., Montella, A., Pirozzi-Farina, F. and Maffezzini, M.: Experimental varicocele in the rat—a new experimental model, I. effect on testicular structure, *Urol. Res.*, 11: 195, 1983
- 19) 柳 重行, 寺田為義, 片山 喬: ラットにおける実験的精索静脈瘤の睾丸におよぼす影響, 日不妊会誌, 29: 97, 1984
- 20) 笹川五十次, 片山 喬: 精索静脈瘤の研究, 第2報, ラットにおける実験的精索静脈瘤精巣の光顕的・電顕的研究, 日泌尿会誌, 77: 1067, 1986
- 21) Green, K. F., Turner, T. T. and Howards, S. S.: Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair, *J. Urol.*, 131: 1208, 1984
- 22) Green, K. F., Turner, T. T. and Howards, S. S.: Effects of varicocele after unilateral orchiectomy and sympathectomy, *J. Urol.*, 134: 378, 1985
- 23) Nagler, H. M., Li, X., Lizza, E. F., Deitch, A. and White, R. D.: Varicocele: temporal considerations, *J. Urol.*, 134: 411, 1985
- 24) Takihara, H., Cosentino, M. J., Sakatoku, J. and Cockett, A. T. K.: Significance of testicular size measurement in androgy: II. correlation of testicular size with testicular function, *J. Urol.*, 137: 416, 1987
- 25) 岩本晃明, 広川 信: 精索静脈瘤の血流動態 time activity curve の検討, 西日泌尿, 48: 1129, 1986

Impairment of spermatogenesis in bilateral testes by unilateral varicocele: experimental study

Kazuhiko Ishizu

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine,
Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

In order to investigate the effects of unilateral varicocele on spermatogenesis in both testes, left varicocele was induced in 10-week old Wistar rats by ligation of the collateral vein between the left renal vein and the left common iliac vein, in addition to partial ligation of the renal vein. Five weeks after the operation, testicular weights were measured and testicular tissues were evaluated by flow cytometric DNA analysis. The following results were observed.

1. In comparison with the sham operation group ($n=10$), the testicular weights in the varicocele ($n=10$) were decreased bilaterally (left side: $p<0.01$, right side: $p<0.1$). In the varicocele group, left

testicular weight was significantly smaller than right testicular weight ($p<0.01$).

2. The percentages of haploid cells (%1C) in the varicocele group revealed significant decreases on both sides in comparison with the sham operation (left side: $p<0.01$, right side: $p<0.05$). In the varicocele group, the %1C on the left side was significantly decreased compared to the %1C on the right side ($p<0.01$).

The results suggest that unilateral varicocele impairs spermatogenesis in both testes and that the extent of impairment tends to be more severe on the ipsilateral side than on the contralateral side.

(受付: 1989年3月9日)

男子不妊症における精索静脈瘤の手術療法

Operative Therapy of Varicocele in Infertile Men

筑波大学臨床医学系泌尿器科

吉井 慎一

Shin-ichi YOSHII

真鍋 文雄

Fumio MANABE

友政 宏

Hiroshi TOMOMASA

武島 仁

Hitoshi TAKESHIMA

石川 博通

Hiromichi ISHIKAWA

小磯 謙吉

Kenkichiro KOISO

Department of Urology, Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

精索静脈瘤をもつ男子不妊症患者 93 例に対して高位結紮術を施行した。術前術後の精液所見と内分泌所見を比較検討し、更に妊娠例 (21 例) と非妊娠例 (72 例) に分けて比較検討した。高位結紮術後で精子濃度、運動率の有意な上昇と、奇形率の有意な減少を認めた ($P < 0.01$)。妊娠例と非妊娠例で精液所見を比較すると、術後の精子運動率が妊娠例で有意に高値を示した ($P < 0.01$)。これより、妊娠成立には術後の運動率が関与していることが示唆された。術前術後の内分泌所見は、FSH, LH, テストステロン、プロラクチンいずれも有意な変化は示さず、妊娠例と非妊娠例でも有意な差は認められなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 150—155, 1990)

緒 言

精索静脈瘤は男子不妊症の原因と考えられる疾患のなかで、最も頻度の高いものである。精索静脈瘤と男子不妊症の関係は比較的古くから知られており、1929 年に Macomber ら¹⁾は男子不妊症患者に精索静脈瘤の切除を施行して、精液所見の改善と妊娠の成立を報告している。精索静脈瘤による造精機能障害の発生機序はいまだ明確にはされていないが、主に 3 つの説が考えられている。1) 陰嚢内温度上昇説：静脈血の逆流により陰嚢内の温度が上昇し、造精障害が生じる。2) 精巣酸素分圧低下説：酸素分圧の低い静脈血の停滞により造精障害が生じる。3) 有害物質逆流説：主に左内精静脈を介して、腎および副腎で生成されたホルモン等が逆流して造精障害が生じる。これら 3 つの説を支持する報告は多いが²⁻⁷⁾、いずれも明確な証明はなされていない。また、精索静脈瘤と精液所見との関係や、手術による効果を否定する報告もある。しかし現在では、精索静脈瘤に

対する手術治療により精液所見の改善と、妊娠率の向上が見られるとする報告が多く、精索静脈瘤の手術は広く行われている。

当院でも、理学的所見で精索静脈瘤が認められる男子不妊症患者では、原則として手術療法 (高位結紮術) を行って来た。今回われわれは、過去 5 年間に精索静脈瘤に対して高位結紮術を施行した 93 例について、精液所見、内分泌環境の変化、ならびに妊娠例の検討をおこなったので報告する。

対象と方法

1. 対象

1983 年 4 月から 1988 年 3 月の 5 年間に、筑波大学男子不妊症外来を受診した患者は 331 例で、そのうち理学的所見で精索静脈瘤を認めたものは 155 例であった。このうち精液所見に異常 (原則として精子濃度 $40 \times 10^6/\text{mm}^3$ 未満、あるいは精子運動率 60 % 未満) のあるもので、配偶者に大きな婦人科的異常が認められなかった 93 例に対して高位結紮術を施行し

た。

患者は最低23歳から最高47歳で平均32歳であった。不妊期間は最低1年から最高18年で平均4.4年であった。患側は左側が75例、両側が18例で右側のみは存在しなかった。

2. 方法

1) 精索静脈瘤の診断

精索静脈瘤の診断は立位にて、視診と触診にて静脈の怒張を調べ、さらにValsalvaの手技をとらせ触診をおこなった。

2) 高位結紮術

腰椎麻酔下に体位は仰がい位をとらせた。上前腸骨棘より約2横指内側から皮膚割線に沿って約6cmの切開をおいた。外腹斜筋を鈍的に分け後腹膜に入り、内精静脈を結紮した。内精静脈は2～4本存在するが、それらを総て結紮した。原則として動脈と静脈は区別しないで結紮した。

3) 精液検査

4, 5日間の禁欲期間をおき、用手法にて広口びんに採取した。精液は液化させた後、精液量、精子濃度、運動率、奇形率を測定した。精液検査は原則的に3回施行し、その平均値をとった。

4) 内分泌検査

血清FSH, LH, テストステロン, プロラクチン値は、午前9時から午前11時の間に採血された検体を用い、ラジオイムノアッセイにて測定した。

5) 術前術後の比較

精索静脈瘤の高位結紮術前・術後3カ月での精液所見(精液量、精子濃度、運動率、奇形率)、内分泌所見(血清FSH, LH, テストステロン, プロラクチン値)を比較検討した(paired t-test)。

6) 妊娠例と非妊娠例の比較

自験例では、全症例93例のうち妊娠例は21例に認められた。妊娠例と非妊娠例との間で術前・術後

3カ月の精液所見、内分泌所見について比較検討した。(unpaired t-test)。

結 果

1) 精索静脈瘤の高位結紮術前・術後3カ月での精液所見(表1)

①高位結紮術全例(93例)において、手術前は精液量 $3.2 (\pm 1.4)$ ml (平均値 $\pm$ 標準偏差)、精子濃度 $19.8 (\pm 19.8) \times 10^6/\text{mm}^3$ 、運動率 $40.0 (\pm 21.4) \%$ 、奇形率 $17.8 (\pm 12.9) \%$ であった。手術後は精液量 $3.3 (\pm 1.4)$ ml、精子濃度 $26.3 (\pm 28.8) \times 10^6/\text{mm}^3$ 、運動率 $51.7 (\pm 20.1) \%$ 、奇形率 $7.7 (\pm 8.9) \%$ であった。精子濃度と運動率は術後に統計学的に有意に増加し、奇形率は有意に減少した($P < 0.01$)。精液量は術前後で有意差は無かった。

②妊娠成立例(21例)において、手術前は精液量 $2.9 (\pm 1.3)$ ml、精子濃度 $15.0 (\pm 13.4) \times 10^6/\text{mm}^3$ 、運動率 $45.0 (\pm 17.4) \%$ 、奇形率 $16.3 (\pm 10.3) \%$ であった。手術後は精液量 $3.1 (\pm 1.2)$ ml、精子濃度 $20.4 (\pm 23.9) \times 10^6/\text{mm}^3$ 、運動率 $65.0 (\pm 12.6) \%$ 、奇形率 $7.9 (\pm 7.5) \%$ であった。精子運動率は術後に統計学的に有意に増加し($P < 0.01$)、奇形率は有意に減少した($P < 0.05$)。精液量、精子濃度は術前後で有意差は無かった。

③妊娠非成立例(72例)において、手術前は精液量 $3.3 (\pm 1.5)$ ml、精子濃度 $20.9 (\pm 21.1) \times 10^6/\text{mm}^3$ 、運動率 $38.7 (\pm 22.3) \%$ 、奇形率 $18.2 (\pm 13.6) \%$ であった。手術後は精液量 $3.4 (\pm 1.4)$ ml、精子濃度 $28.4 (\pm 23.9) \times 10^6/\text{mm}^3$ 、運動率 $46.8 (\pm 20.3) \%$ 、奇形率 $7.7 (\pm 9.4) \%$ であった。精子濃度($P < 0.05$)と運動率($P < 0.01$)は術後に統計学的に有意に増加し、奇形率($P < 0.01$)は有意に減少した。精液量は術前後で有意差は無かった。

2) 妊娠例と非妊娠例での精液所見の比較検討(表

表1 精液所見の変化

		精液量(ml)	精子濃度($\times 10^6/\text{mm}^3$)	精子運動率(%)	奇形率(%)
高位結紮術全例 (93例)	術前	$3.2 (\pm 1.4)$	$19.8 (\pm 19.8)$	$40.0 (\pm 21.4)$	$17.8 (\pm 12.9)$
	術後	$3.3 (\pm 1.4)$	$26.3 (\pm 28.8)^*$	$51.7 (\pm 20.1)^*$	$7.7 (\pm 8.9)^*$
妊娠成立例 (21例)	術前	$2.9 (\pm 1.3)$	$15.0 (\pm 13.4)$	$45.0 (\pm 17.4)$	$16.3 (\pm 10.3)$
	術後	$3.1 (\pm 1.2)$	$20.4 (\pm 23.9)$	$65.0 (\pm 12.6)^*$	$7.9 (\pm 7.5)^{**}$
妊娠非成立例 (72例)	術前	$3.3 (\pm 1.5)$	$20.9 (\pm 21.1)$	$38.7 (\pm 22.3)^{***}$	$18.2 (\pm 13.6)$
	術後	$3.4 (\pm 1.4)$	$28.4 (\pm 23.9)^{**}$	$46.8 (\pm 20.3)^*$	$7.7 (\pm 9.4)^*$
m($\pm$ S.D.)					

Paired t-test (手術前と手術後) * $P < 0.01$ ** $P < 0.05$

Unpaired t-test (妊娠例と非妊娠例) *** $P < 0.01$

1)

術後の精子運動率で、妊娠例 65.0 (±12.6) % が非妊娠例 48.6 (±20.3) に比べて統計学的に有意に高かった ($P < 0.01$)。その他の術前術後の精液所見には有意差は無かった。

3) 精索静脈瘤の高位結紮術前・術後 3 カ月での内分泌所見 (表 2)

① 高位結紮術全例 (93 例) において、手術前は FSH 16.6 (±13.3) mIU/ml, LH 15.9 (±12.6) mIU/ml, テストステロン 5.9 (±2.9) ng/ml, プロラクチン 10.8 (±3.7) ng/ml であった。

手術後は FSH 15.8 (±8.9) mIU/ml, LH 14.1 (±5.9) mIU/ml, テストステロン 6.0 (±2.9) ng/ml, プロラクチン 10.1 (±3.9) ng/ml であった。

② 妊娠成立例 (21 例) において、手術前は FSH 20.9 (±22.7) mIU/ml, LH 18.5 (±23.4) mIU/ml, テストステロン 7.0 (±3.5) ng/ml, プロラクチン 11.0 (±3.1) ng/ml であった。手術後は FSH 18.3 (±7.8) mIU/ml, LH 14.6 (±3.8) mIU/ml, テストステロン 6.2 (±4.7) ng/ml, プロラクチン 11.1 (±4.6) ng/ml であった。

③ 妊娠非成立例 (72 例) において、手術前は FSH 15.3 (±8.6) mIU/ml, LH 15.1 (±6.6) mIU/ml, テストステロン 5.6 (±2.7) ng/ml, プロラクチン 10.7 (±3.9) ng/ml であった。手術後は FSH 14.8 (±9.2) mIU/ml, LH 13.9 (±6.5) mIU/ml, テストステロン 5.9 (±1.8) ng/ml, プロラクチン 9.8 (±3.7) ng/ml であった。

高位結紮術全例、妊娠例、非妊娠例いずれの場合でも、術前術後でホルモン値に統計学的に有意差は認めなかった。

4) 妊娠例と非妊娠例でのホルモン値の比較検討 (表 2)

術前テストステロン値で妊娠成立例 7.0 (±3.5)

ng/ml が非妊娠成立例 5.6 (±2.7) ng/ml より高い傾向にあるが、統計学的に有意差は無かった。その他の検査値も統計学的に有意差は無かった。

5) 妊娠確認までの期間

高位結紮術 3 カ月までに妊娠を確認したものは 2 例、4 カ月から 6 カ月までが 5 例、7 カ月から 12 カ月までが 11 例、13 カ月から 18 カ月までが 2 例、18 カ月以上が 1 例であった。21 例中 18 例 (約 86 %) が術後 1 年以内で、7 例 (約 33 %) が術後 6 カ月までに妊娠に至っていた。

考 案

精索静脈瘤は蔓状静脈叢の拡張した状態である。蔓状静脈叢は精巣および精巣上体の静脈が、精索中において精管の前側で互いに吻合して形成される。この静脈叢は主に内精静脈に入り、左側は腎静脈に右側は下大静脈に流入する。精索静脈瘤の成因は、内精静脈を通じての腎静脈血の逆流によると考えられている。そのため手術はこの内精静脈を結紮する高位結紮術が一般的に施行されている。内精静脈の結紮により、理学的に 90 % 以上の症例で精索静脈瘤が消失するが、完全に静脈の怒張が消失しない症例も存在する。この理由として、1) 内精静脈以外の静脈系とくに腸骨静脈系が関与している症例が存在する⁸⁾、2) 逆流によって静脈壁が動脈化し逆流が消失しても拡張が完全にはもどらないことが考えられる。我々は精索静脈瘤にたいしてはまず高位結紮術を施行し、静脈の怒張が消失しない症例にたいして陰囊切開にて静脈瘤の切除を施行している。

精索静脈瘤の手術適応であるが、思春期前に発見される場合と不妊を主訴に発見される場合とで考えなければならない。以前は不妊を主訴としない症例では、痛み、熱感を生じる時、あるいは鼠径部までおよぶ巨大な静脈瘤の場合のみ手術適応があるとき

表 2 血清ホルモン値の変化

		FSH(mIU/ml)	LH (mIU/ml)	テストステロン (ng/ml)	プロラクチン (ng/ml)
高位結紮術全例	術前	16.6(±13.3)	15.9(±12.6)	5.9(±2.9)	10.8(±3.7)
	(93例) 術後	15.8(± 8.9)	14.1(± 5.9)	6.0(±2.9)	10.1(±3.9)
妊娠成立例	術前	20.9(±22.7)	18.5(±23.4)	7.0(±3.5)	11.0(±3.1)
	(21例) 術後	18.3(± 7.8)	14.6(± 3.8)	6.2(±4.7)	11.1(±4.6)
妊娠非成立例	術前	15.3(± 8.6)	15.1(± 6.6)	5.6(±2.7)	10.7(±3.9)
	(72例) 術後	14.8(± 9.2)	13.9(± 6.5)	5.9(±1.8)	9.8(±3.7)
					m(±S.D.)

れていたが、最近では思春期前でも積極的に手術すべきとする意見もある⁹⁾。思春期後でも不妊症を伴った精索静脈瘤の場合は、その精液所見が問題となる。精索静脈瘤と精液所見の関係については、精索静脈瘤があると精液所見に異常を生じるとする意見¹⁰⁻¹⁷⁾と、異常を生じないとする意見とがある¹⁹⁾。精液所見の正常値は存在しないが WHO の精液所見の基準を参考にすると、今回の症例では特に運動率と正常精子率が低下しており、精子濃度も幾分低下していた。我々は手術適応としてはっきりとした基準は定めておらず、精液所見が良好で不妊期間も短く、配偶者が比較的若いときは経過をみるが、不妊を伴うときは積極的に手術を施行している。

精索静脈瘤の手術療法による精液所見の変化については多くの報告がある¹⁰⁻¹⁷⁾その改善率については、およそ 60~70 % と乏精子症に対する内服治療に比較してはるかに良好な成績を示している。精液所見の改善率は術前の精子濃度に関係するという意見もおおい。Dubin ら¹²⁾は、504 例の精索静脈瘤患者において全体では 71 % の精液改善率であったが、術前精子濃度が $10 \times 10^6/\text{mm}^3$ 以上では 88 % の改善率、 $10 \times 10^6/\text{mm}^3$ 以下では 33 % の改善率であったとしている。また石川¹⁸⁾は、精索静脈瘤に対して選択的精巣静脈造影を施行し、蔓状静脈叢を経由して内精静脈以外の静脈が描出される症例の手術有効率が 28.5 % であるのに対して、蔓状静脈叢までが造影される症例は 77.8 % であったとしている。

一方、手術による妊娠率であるが、精液所見の改善率に比べるとだいたい 10 % から 50 % という報告が多く、精液所見の改善が必ずしも妊娠には結び付いていない。Steinberger ら¹⁹⁾は、精索静脈瘤を手術した場合の妊娠率は 46 % で、手術を施行しなかった場合の妊娠率 51 % におとる結果を得ており、手術の意義に疑問をもっている。対照的に Fogh-Andersen ら²⁰⁾は、手術症例の妊娠率は 32 % で非手術群の 5 % と比較して有意に高かったとし、手術を積極的に勧めている。今回の症例では精索静脈瘤の術前と術後で、精液所見のうち精液量に変化は無かったが精子濃度、運動率ともに術後有意に上昇し、奇形率は有意に減少していた。また 93 例に手術を施行、21 例に妊娠を認め妊娠率は約 23 % であった。今回、妊娠例と非妊娠例とに分けて精液所見と手術による変化を検討したが、術前の精液所見はいずれも統計学的に有意差は無かった。興味深いのは、非妊娠例でも精子濃度、運動率、奇形率ともに改善しているのに対し、妊娠例では運動率、奇形率は改善しているものの精子濃度に有意差がなかった点である。妊娠例と

非妊娠例で有意差のあったものは術後の精子運動率であった。以上を考えると、今回の結果からは精索静脈瘤の手術により精子濃度、運動率ともに改善するが、特に運動率の改善が妊娠に関与しており、術後に運動率があるレベル以上になって妊娠に至ると考えられる。さらに妊娠に至るまでの期間が 1 年以内がほとんどで、6 カ月以内の症例も多く見られることより、本手術療法は有効と考える。

精索静脈瘤を伴う男子不妊症患者の内分泌所見と、高位結紮術後の変化についてであるが、今回の症例では妊娠例の術前のテストステロン値が、非妊娠例の術前のテストステロン値に比べ高い傾向にあるが統計学的には有意差が無かった。その他のホルモン値 (FSH, LH, プロラクチン) は妊娠例も非妊娠例も術前術後で統計学的に有意な変化は示さなかった。この結果から精索静脈瘤では手術によって内分泌環境に変化はおきないと考えられるが、諸家の報告を見ると間脳-下垂体-性腺系の変化を指摘するものが多い²¹⁻²⁸⁾。ホルモン基礎値では、Freire²¹⁾、Adamopoulos²²⁾らは精索静脈瘤における血清 FSH, LH の高値を指摘しており、Roboch²³⁾、Comhaire²⁴⁾は血清テストステロン値が低下するとしている。精索静脈瘤に対してホルモン負荷試験を施行し、その反応の異常を指摘した報告もある。

Robert ら^{25,26)}は、22 例の精索静脈瘤患者に GnRH テストを施行し、術前に GnRH に対する過大反応を認め、術後精子濃度の改善した例では GnRH テストにたいする反応も正常化したと報告している。これは精索静脈瘤ではホルモン合成障害があり、それが可逆であることを示している。また武島²⁷⁾は、精索静脈瘤の術前術後で HCG 負荷試験を施行し、術後の反応量の増加を示し、Leydig 細胞の機能障害の存在と術後の改善を報告している。さらに Nagao ら²⁸⁾は、正常男子と精索静脈瘤をもつが妊孕性のあるもの、精索静脈瘤を伴った男子不妊症患者とを比較して、精索静脈瘤があっても妊孕性のあるものでは内分泌所見は正常と変わらないが、男子不妊症では血清 FSH, LH の高値と LH-RH テストでの過大反応を示したと報告している。すなわち精索静脈瘤の造精障害はいろいろな程度で起こっているものと考えられる。

精索静脈瘤の手術療法で、精液所見の改善を見なかったり妊娠に成功しないときには、われわれは内服治療をひきつづき行っているが、妊娠の殆どが術後 1 年以内に成立しているために、術後 1 年は経過を見ることを原則としている。非ホルモン剤として漢方薬、ビタミン B₁₂ や kallikrein 製剤を使用してい

るが、2例に妊娠を認めている。また、精液所見が改善しても1年以上経過し、内服治療に反応しない場合は積極的にAIHを施行している。

以上、精索静脈瘤に対する高位結紮術は、男子不妊症の治療の中ではその有効性ももっとも高いものである。しかし精索静脈瘤がいかにして造精障害を引き起こすかについては明確では無く、高位結紮術後の効果判定についても確立されていない。今後は臨牀的にさらに症例をかさねていくとともに、精索静脈瘤と造精障害について基礎的な研究によりそのメカニズムを明確にすることが必要と考える。

文 献

- 1) Macomber, D. and Saunders, M. B.: Spermatozoa count; its value in diagnosis, prognosis and treatment of sterility N. Eng. J. Med., 200: 981, 1929
- 2) Zorgniotti, A. W. and MacLeod, J.: Studies in temperature, human semen quality and varicocele, Fertil. Steril., 24: 854, 1973
- 3) Tessler, A. N. and Krahn, H. P.: Varicocele and testicular temperature, Fertil. Steril., 17: 201, 1966
- 4) Donohue, R. E. and Brown, J. S.: Blood gases and PH determinations in internal spermatic veins of subfertile men with varicocele, Fertil. Steril., 20: 365, 1969
- 5) Compaire, F. and Vermeninien, A.: Varicocele sterility: Cortisol and catecholamines, Fertil. Steril., 25: 88, 1974
- 6) Lindholmer, C., Thulin, L. and Eliasson, R.: Concentrations of cortisol and renin in the internal spermatic vein of men with varicocele, Andrologia, 5: 21, 1973
- 7) Ito, H., Minagawa, H., Kawamura, K., Murakami, M. and Shimazaki, J.: Internal spermatic vein prostaglandins in varicocele patients, Fertil. Steril., 37: 218, 1982
- 8) Coolseat, B. L. R. A.: The varicocele syndrome: Venography determining the optimal level for surgical management, J. Urol., 124: 833, 1980
- 9) Wyllie, G. G.: Varicocele and Puberty the Critical Factor?, B. J. Urol., 57: 194, 1985
- 10) Scott, L. S. and Young, D.: Varicocele: a study of its effects on human spermatogenesis, and of the results produced by spermatic vein ligation, Fertil. Steril., 13: 325, 1962
- 11) Charney, C. W. and Baum, S.: Varicocele and infertility, J. Amer. Med. Assoc., 204: 1165, 1968
- 12) Dubin, L. and Amelar, R. D.: Varicocelectomy as therapy in male infertility: a study of 504 cases, J. Urol., 113: 640, 1975
- 13) Gunter, D.: The Palmo operation for varicocele and its effects on fertility, Br. J. Urol., 47: 230, 1975
- 14) Glezerman, M., RaKowszczyk, M., Lunenfeld, B., Beer, R. and Goldman, B.: Varicocele in oligospermic patients: pathophysiology and results after ligation and division of the internal spermatic vein, J. Urol., 115: 562, 1976
- 15) Brown, J. S.: Varicocelectomy in the subfertile male: a ten-year experience with 295 cases, Fertil. Steril., 27: 1046, 1976
- 16) 石神襄次, 谷村実一, 西村保昭, 山本 治: 男子不妊症に対する手術的療法, 泌尿紀要, 11: 1120, 1965
- 17) 根岸壯治: 精索静脈瘤に対する高位結紮術—その術式と手術成績—, 手術, 24: 1235, 1970
- 18) 石川博通, 長倉和彦, 篠田正幸, 佐々木光信, 小山雄三, 中園昌明, 古寺研一: 男子不妊症における精索静脈瘤—選択的精索静脈造影所見と手術成績の関連について—, 日不妊会誌, 27: 393, 1982
- 19) Steinberger, E.: Current thoughts in andrology Jpn. J. Fertil. Steril., 24: 357, 1979
- 20) Fogh-Andersen, P., Nielsen, N. C., Rebbe, H. and Stakemann, G.: The effects on fertility of ligation of the left spermatic vein in men without clinical sign of valicocele, Acta Obstet. Gynec. Scand., 54: 29, 1975
- 21) Freire, F. R. and Nahoum, C. R. D.: Endocrine evaluation in infertile men with valicocele, Andrologia, 13: 395, 1981
- 22) Adamopoulos, D., Lawrence, D. W., Vasiliopoulos, P., Kapolla, N., Kontogeorgos, L. and McGarrigle, H. H. G.: Hormonal levels in the reproductive system of normospermatic men and patients with oligospermia and valicocele, J. Clin. Endocrinol. Metab., 59: 447, 1984
- 23) Raboch, J. and Starka, L.: Hormonal testicular activity in men with a valicocele, Fertil. Steril., 22: 152, 1971
- 24) Comhaire, F. and Vermeulen, A.: Plasma testosterone in patients with varicocele and sexual inadequacy, J. Clin. Endocrinol. Metab., 40: 824, 1975
- 25) Robert, W. H., Ramon, A. P., Vinton, A. C. and David, E. M.: Hormonal parameters of men with varicocele before and after varicocelectomy, Fertil. Steril., 43: 905, 1985
- 26) Robert, W. H., Ramon, A. P., Vinton, A. C. and David, E. M.: Hormonal parameters in incidental varicoceles and those causing infertility, Fertil. Steril., 45: 692, 1986
- 27) 武島 仁, 石川博通, 小磯謙吉: 男子不妊症患者における精索静脈瘤の臨牀的検討, 日不妊会誌, 31: 524, 1986
- 28) Nagao, R. R., Pilmate, S. R., Berger, R. E., Perin, E. B. and Paulsen, C. A.: Comparison of

gonadal function between fertile and infertile men with varicoceles, *Fertil. Steril.*, 46: 930, 1986

Operative therapy of varicocele in infertile men

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

Department of Urology,
Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba,
Ibaraki 305,
Japan

In 93 cases of male infertility with varicocele, the high ligation of internal spermatic vein was performed. Semen quality and hormonal levels of peripheral blood were assessed before and 3 months after varicocelectomy. Sperm density and motility increased, and sperm abnormality decreased significantly after varicocelectomy. Postoperative sperm motility of pregnant cases (21 cases) was significantly higher than that of impregnant cases (72 cases). This result suggested that the improvement of sperm motility after varicocelectomy was strongly related to the pregnancy. Hormonal levels showed no significant changes after varicocelectomy.

(受付: 1989 年 3 月 11 日)

男子不妊症患者の内分泌動態の再評価 —乏精子症患者の血中 LH について—

Re-evaluation of the Endocrinological Analysis of Male Infertility —the Serum LH in Oligozoospermic Males—

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	植 野 卓 也	石 津 和 彦
Yoshikazu BABA	Takuya UENO	Kazuhiko ISHIZU
磯 山 理 一 郎	瀧 原 博 史	酒 徳 治 三 郎

Riichiro ISOYAMA Hiroshi TAKIHARA Jisaburo SAKATOKU

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine,
Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

138名の男性に対して、それぞれ尿中ゴナドトロピンと下垂体性ゴナドトロピンとを標準品とした2種類の下垂体性ゴナドトロピン測定用キットを使用し、血中LH、FSHを測定した。尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットでの血中LHの測定値は、下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットでの血中LH、FSH両者の測定値の影響を同等に受けているため、特に、高度の乏精子症患者では血中LHは高値をとった。血中FSHに関しては両者のキットがよく相関していた。以上より従来の尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットを使用した血中LHの測定値は再評価する必要がある、下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットの使用が推奨される。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 156—158, 1990)

緒 言

血中 lutenizing hormone (LH) と血中 follicle stimulating hormone (FSH) の測定は男子不妊症患者の評価に必須の検査法である。従来本邦では LH と FSH の測定に関して尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットが使用されてきたが¹⁾、最近下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットが市販されるようになり各施設でも切り替えられつつある²⁾。この2種類のキットは多施設における臨床的検討で非常に高い相関を示し、測定値の違いはあるものの各種疾患において同様のパターンをとるとされている²⁾。しかしながら尿中ゴナドトロピンを標準品としたキッ

トにおいては他のゴナドトロピンとの交差反応が高く、特に血中 FSH が高値をとるものが多い男子不妊症患者では血中 LH の測定値が影響を受けることが予想される。このため、我々は同一社製のキットを使用し、尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットと下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットとを比較検討した。また、比較的 Leydig 細胞機能障害が少なく、血中 LH の変動が少ないと考えられる乏精子症患者に対して、検討を加えた。

対象と方法

対象は1987年7月より1989年1月までに山口大学泌尿器科を受診した者のうち、男子不妊症、イン

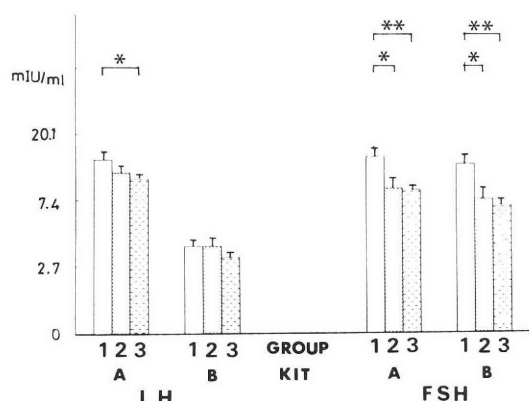


Fig. 1 乏精子症患者の血中ゴナドトロピン
 it A: LH (FSH) キット「第一」
 it B: スパック-S LH (FSH) キット

** $p < 0.01$

* $p < 0.05$

ポテンズ、男性性器疾患等で内分泌学的精査を受けた138名である。内訳は男子不妊症122名、インポテンズ8名、男性性器疾患8名であった。血中LH・FSHの測定には尿中ゴナドトロピンを標準品とした第一ラジオアイソトープ研究所製のLH (FSH) キット「第一」(旧キットと略す)と²⁾下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたスパック-S LH (FSH) キット(新キットと略す)を²⁾使用した。まず新旧キットの相関を見た。次いで、旧キットでの他のゴナドトロピンの測定値に対する影響を見る目的で、旧キットのLH (FSH) を従属変数として新キットのLH, FSH をそれぞれ独立変数として重回帰分析を行なった。

次いで男子不妊症を主訴として精液検査を施行され、無精子症でなかった82名について検討を加えた。これらを精子濃度500万/ml以下(第1群と略す)、精子濃度500-2000万/ml(第2群と略す)、精子濃度2000万/ml以上(第3群と略す)の3群に分けた。第1群17名、第2群17名、第3群48名であった。精液検査にはMakler 精子算定盤を使用した³⁾。それぞれの群の血中LH・FSHの平均値について検討を加えた³⁾。

結 果

以下の検討は測定値を正規化するため自然対数に変換したものをを用いた。

1) 新旧キット間の測定値の比較

LH では両キット間の相関係数は $r=0.82$ と比較的高く、非常によく相関しており多施設での検討の結果とほぼ一致する。FSH においても相関係数が $r=$

0.94 と高く、非常によく相関しており多施設での検討の結果とほぼ一致する²⁾。また、旧キットのLH, FSH 間の相関係数は0.82と高かったが、新キットのLH, FSH 間の相関係数は0.75と低かった。

2) 旧キットの測定値に対する重回帰分析

旧キットでのLHの測定値を対数変換したものを y 、新キットでのLHの測定値を対数変換したものを x_1 、新キットでのFSHの測定値を対数変換したものを x_2 とすると、重回帰式は $y=0.37x_1+0.35x_2+1.30$ であった。重相関係数は0.88と新旧LH間の相関係数よりも高かった。

以上から旧キットでのLHの測定値は新キットでのLH, FSHの測定値の両者と同程度に相関していることが証明された。このことから従来の旧キットの血中LHの測定値はFSHの測定値の影響を強く受けており、特に、FSHが高値をとることが多い不妊症患者では高めの測定値をとることが推定される。

一方、旧キットのFSHに対する新キットのLHの偏相関係数は低く、両者に有意の相関を認めなかった。

3) 乏精子症患者の血中ゴナドトロピン (Fig. 1)

旧キットでのLHの平均値は第1群13.7 mIU/mlに比べ、第3群10.3 mIU/mlと精子濃度の上昇と共に有意に低下した($p < 0.05$)。これに対して、新キットでのLHの平均値は第1群3.7 mIU/ml、第2群3.7 mIU/ml、第3群3.1 mIU/mlと有意の差を認めなかった。

旧キットでのFSHの平均値は第1群14.0 mIU/mlに比べ、第2群8.8 mIU/mlと有意に低下した($p < 0.05$)。第3群でも同様に8.5 mIU/mlと第1群に比べ有意に低下した($p < 0.01$)。これに対して、新キットでのFSHの平均値は第1群12.6 mIU/mlに比べ、第2群7.5 mIU/mlと有意に低下した($p < 0.05$)。第3群でも同様に6.8 mIU/mlと第1群に比べ有意に低下した($p < 0.01$)。FSHに関しては新旧キットとも同一の傾向を示した。

考 察

血中ゴナドトロピンの測定は男子不妊症患者の評価に必須の検査法である。しかしながら、本邦で汎用されていた下垂体ゴナドトロピン測定キットは尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットであり、国際的に汎用されている下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットではなかった。最近になり下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットが発売されるようになり、従来の検査値とは、測定値が異なり、新旧キット間の比較が必要になってきた。苛原ら⁵⁾の

報告では一定の換算率を掛けることにより新旧キット間の測定値の比較が可能であるとしている。しかし、今回の我々の新旧キットの測定値に対する重回帰分析の結果からすると、FSH については一定の換算率を掛けることにより新旧キット間の測定値の比較が可能であるが、LH については問題が残る。すなわち、旧キットの測定値が新キットの LH、FSH とほぼ同程度に相関していることから、血中 FSH が高値をとるような病態では旧キットの血中 LH の測定値が実際よりも高値をとることが推定される。以上より従来の尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットを使用した血中 LH の測定値は再評価する必要があり、下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたキットの使用が推奨される。

これが実証されるのは乏精子症患者の測定値である。乏精子症患者の血中ゴナドトロピンについて、Rosen ら⁶⁾は精子数の減少にともない血中 FSH は増加するが血中 LH は変化しないと報告している。これに対して尿中ゴナドトロピンを標準品としたキットを使用した本邦の報告では⁷⁾、今回の旧キットを使用した我々の結果と同様に、血中 LH も血中 FSH にやや遅れるものの精子濃度の減少に伴い増加するとされている。しかしながら、新キットを使用した我々の結果は Rosen らの結果と同様であった。これは、乏精子症患者では精子数の減少に伴い血中 FSH が増加するために旧キットの LH の測定値が高値をとるためと考えられる。

文 献

- 1) 青野敏博, 南川淳之祐, 河村憲一, 正田常雄, 谷沢 修, 倉智敬一: ヒト LH・FSH の Radioimmunoassay kit による測定とその臨床応用, 産婦の世界, 25: 1315, 1973
- 2) 青野敏博, 松本脩三, 熊本悦明, 佐々木康人, 玉田太朗, 水野正彦, 飯塚理八, 鎮目和夫, 出村 博, 日比逸郎, 入江 実, 紫芝良昌, 友田 豊, 森 崇英, 井村裕夫, 仲野良介, 守殿貞夫, 太田善介, 苛原 稔, 森 宏之: 下垂体性ゴナドトロピン標準品を用いた LH および FSH の Immunoradiometric 測定法 (スバックス LH, スバックス FSH) の多施設における臨床的検討, ホと臨床, 36: 1087, 1988
- 3) 酒井亮二, 青木繁伸, 大野曜吉: 医学データ解析法, マイコン・プログラム・パッケージ, 医学書院, 1987
- 4) 林田英嗣, 石津和彦, 山川弦一郎, 磯山理一郎, 瀧原博史, 酒徳治三郎: Makler 算定盤の使用経験, 日不妊会誌, 33: 185, 1988
- 5) 苛原 稔, 安井敏之, 東敬次郎, 青野敏博: 下垂体性ゴナドトロピン標準品を用いた LH および FSH の Immunoradiometric 測定法 (スバックス LH, スバックス FSH) の基礎的検討, ホと臨床, 36: 1223, 1988
- 6) Rosen, S. W. and Weintraub, B. D.: Monotropic increase of serum FSH correlated with low sperm count in young men with idiopathic oligospermia and aspermia, J. Clin. Endocrinol., 32: 410, 1971
- 7) 伊藤晴夫, 川村健二, 片海善吾, 角谷秀典, 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の関係, 日不妊会誌, 29: 294, 1984

Re-evaluation of the endocrinological analysis of male infertility — the serum LH in oligozoospermic males —

Yoshikazu Baba, Takuya Ueno,
Kazuhiko Ishizu, Riichiro Isoyama,
Hiroshi Takihara and Jisaburo Sakatoku

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine,
Ube 755, Japan
(Director; Prof. J. Sakatoku)

The serum LH and FSH of one hundred thirty-eight males measured with kit using pituitary gonadotropins standards (the conventional kit) were compared with those measured with a kit using urinary gonadotropins standards (the new kit).

The serum FSH measured with the conventional kit correlated significantly with the serum FSH measured with the new kit ($r=0.94$). The serum FSH measured with the conventional kit correlated with the serum LH and FSH measured with the new kit by multiple regression analysis ($R=0.88$). The serum LH in the severely oligozoospermic group was elevated as compared with that in the normozoospermic group when measured with the conventional kit ($p<0.05$); however, the serum LH in the severely oligozoospermic group was not elevated as compared with that in the normozoospermic group when measured with the new kit. Therefore, the serum LH measured with the conventional kit should be re-evaluated, especially in the severely oligozoospermic group.

(受付: 1989 年 9 月 5 日特掲)

精索静脈瘤に対する プロスタグランディン合成酵素阻害剤の効果

Effect of Prostaglandin Synthetase Inhibitor on Varicocele

千葉大学医学部泌尿器科学教室

石井 弘之	布施 秀樹	角谷 秀典
Hiroyuki ISHII	Hideki FUSE	Hiddenori SUMIYA
高原 正信	始 関 吉 生	島 崎 淳
Masanobu TAKAHARA	Yoshio SHISEKI	Jun SIMAZAKI

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

精索静脈瘤の造精機能障害にプロスタグランディンの逆流の関与が推測されている⁴⁾。このため37名の精索静脈瘤をもつ不妊症患者にプロスタグランディン合成酵素阻害剤のフルルビプロフェンを投与した。このうち3例は消化器症状が強く投与を中止した。残り34例について投与前、投与後3カ月、6カ月の精液所見及び血中ホルモン値の変動をみた。投与後6カ月の精子濃度、精子運動率の改善率は、それぞれ36%、40%であった。これは当教室の手術成績とほぼ同じであり、また当教室の特発性男子不妊症患者への同剤の成績より良好であった。血中ホルモン値は、テストステロンが投与後減少する傾向にあったが、LH、FSHは投与前後に差はなかった。以上の結果より精索静脈瘤による造精機能障害に対してプロスタグランディン合成酵素阻害剤が適応となることが示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 159-164, 1990)

緒 言

精索静脈瘤が造精機能を障害する機序についてはいくつかの説^{1,2,3)}があるが、いまだ議論のあるところである。当教室の伊藤ら⁴⁾は、最近腎より Prostaglandin (以下 PG) が、睾丸へ逆流し、造精機能を障害することを見出した。これにもとづき精索静脈瘤患者に PG 合成酵素阻害剤を投与し、その造精機能に及ぼす影響について検討した。

対象ならびに方法

1981年12月より1986年4月までに千葉大学医学部付属病院泌尿器科に不妊を主訴に来院した精索静脈瘤患者185例中、無作為に選んだ37例にたいしフルルビプロフェン（フローベン）を投与した。この

うち3例は副作用のため投与を中止したので、残り34例を対象とした。

患者の年齢は24～44歳、平均32.9歳であり、結婚から来院までの期間は1年3カ月～15年2カ月、平均4年3カ月であった。初診時の精索静脈瘤の grade⁵⁾は、grade I 4例、grade II 3例、grade III 27例である。

フルルビプロフェンを1日120mg分3で投与し、投与の前後に精液検査を施行した。胃潰瘍防止の為に塩酸セトラキサート（イノエル）を600mg分3で投与した。精液所見を無精子症、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の高度乏精子症、 $10 \times 10^6/\text{ml} \sim 30 \times 10^6/\text{ml}$ の中等度乏精子症、 $30 \times 10^6/\text{ml} \sim 50 \times 10^6/\text{ml}$ の軽度乏精子症、 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の正常精子濃度のものに分類した⁶⁾。症例は高度、中等度、軽度乏精子症および正常なも

のがそれぞれ 14 例, 7 例, 3 例, 10 例であった。精子運動率は 50 % 以上のものを正常としたが, 正常 1 例, 不良 33 例であった。治療効果の判定は飯塚ら⁶⁾の基準に従って, 精子濃度および運動率を 3 カ月および 6 カ月の時点で, 著効, 有効, 不変, 悪化とし, 著効, 有効のものを効果ありとした。また本剤投与前後に血中 LH, FSH およびテストステロン値も測定した。それぞれ“LH キット第一”“FSH キット第一”(第一 RI 社), “テストステロン H₃ キット”(CIS

社) にて測定した。

結 果

1) 精子濃度

投与前の精子濃度の平均 $28.2 \times 10^6/\text{ml}$ が, 投与後 3 カ月で $34.6 \times 10^6/\text{ml}$, 6 カ月で $35.2 \times 10^6/\text{ml}$ となり, いずれも増加傾向を示したが統計的に有為の差はなかった。(図 1)。飯塚らの基準により著効および有効のもの, すなわち効果を認めたものは, $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群では投与後 3 カ月で 25.0 %, 6 カ月で 42.9 % であった。 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の群では効果を認めたものは, 3 カ月で 14.3 %, 6 カ月で 27.3 %

精子濃度
($\times 10^6/\text{ml}$)

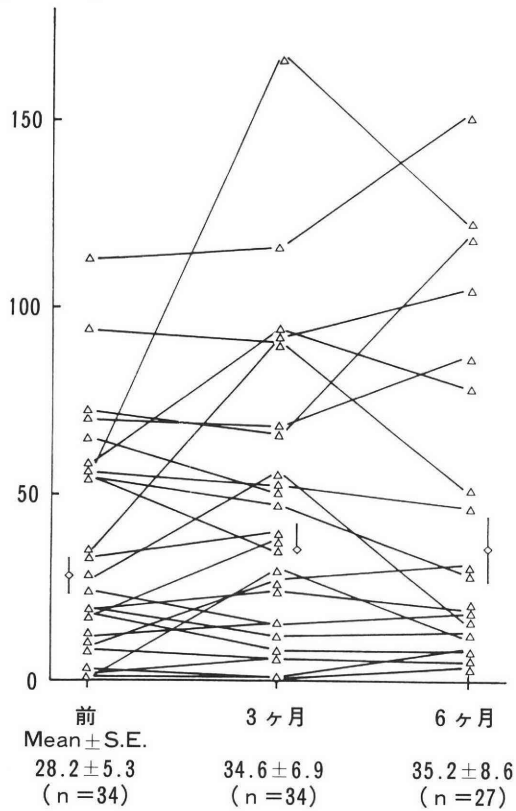


図 1 精子濃度の変動

精子運動率
(%)

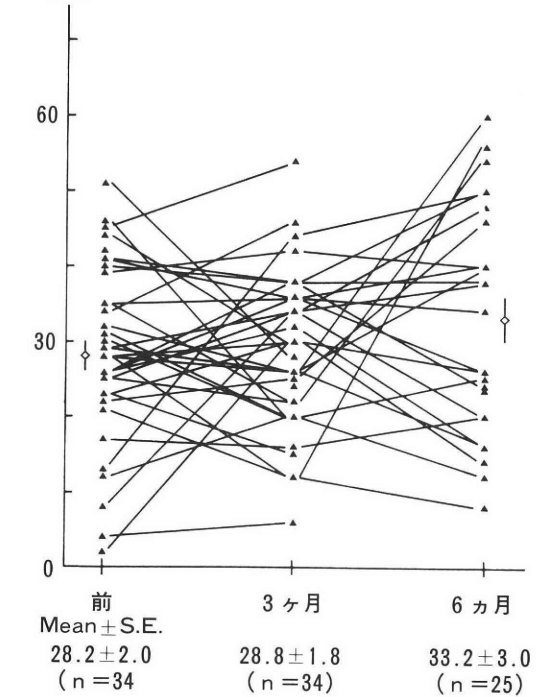


図 2 精子運動率の変動

表 1 治療効果 (精子濃度)

治療群 効果*	10×10 ⁶ /ml以上の群		10×10 ⁶ /ml未満の群	
	3 カ月	6 カ月	3 カ月	6 カ月
著 効	5	5	2	2
有 効	0	1	0	1
不 変	10	2	12	8
悪 化	5	6	0	0
計	20	14	14	11

* 飯塚ら⁶⁾の判定基準による。

であった。両群全体で効果をみたものは、3カ月で20.6%、6カ月で36.0%であった(表1)。

2) 精子運動率

投与前の精子運動率は28.2%であり、投与後3カ月で28.2%、6カ月で33.2%とやや増加傾向をみたが有意の差はなかった。(図2)。飯塚らの基準によると、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群で効果をみたものは、3カ月の時点で10.0%、6カ月で35.7%、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の群では3カ月で28.6%、6カ月で45.5%

であった。全体では3カ月で17.6%、6カ月で40.0%の例に効果をみた(表2)。

3) 総運動精子数

投与前の平均が 30.2×10^6 、投与後3カ月、6カ月では 37.3×10^6 および 42.5×10^6 であった。いずれも

総運動精子数
($\times 10^6$)

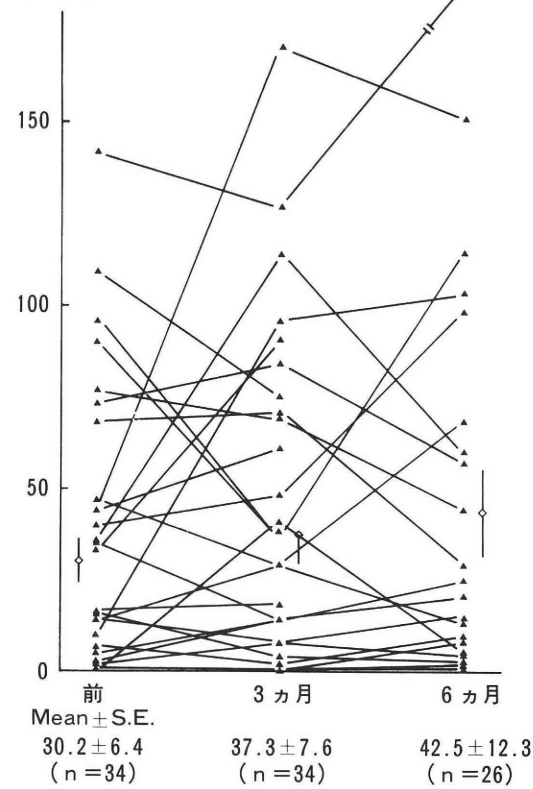


図3 総運動精子数の変動

血中LH値
(mIU/ml)

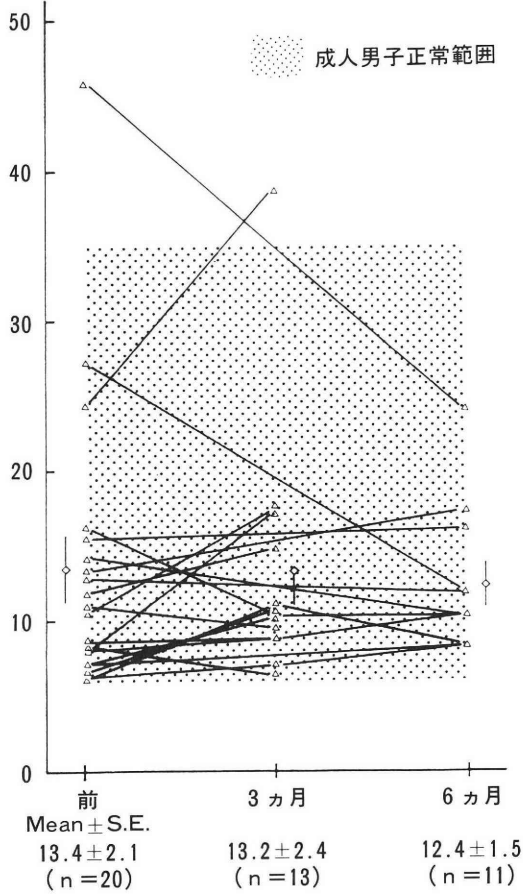


図4 血中LH値の変動

表2. 治療効果(精子運動率)

治療群 効果*	10×10 ⁶ /ml以上の群		10×10 ⁶ /ml未満の群	
	3カ月	6カ月	3カ月	6カ月
著効	1]	2]	2]	2]
有効	1]	3]	2]	3]
不変	15	7	6	4
悪化	3	2	4	2
計	20	14	14	11

*飯塚ら⁶⁾による。

増加傾向を示したが統計的には有意の差は認めなかった(図3)。

4) 血中 LH 値

投与前後に差をみなかった(図4)

5) 血中 FSH 値

血中 LH 値と同様、投与前後で変化しなかった(図5)。

6) 血中テストステロン値

投与後3カ月、6カ月ともやや減少傾向にあったが、有意の差ではなかった(図6)。

7) 精索静脈瘤の変化

投与前後静脈瘤の grade が変化したものはなかった。

8) 妊娠

本剤投与中に妻の妊娠の成立をみたものはなかった。これは、本剤投与後6カ月以上経過したら手術をすすめることを原則としているため、follow up 期間が短くなっていることと関係あろう。

このうち11例にフローベン投与後手術施行したが、妊娠成立例は2例あった。

9) 副作用

消化器症状を呈した例が4例あり、このうち3例は副作用のために投与を中止した。ほかに皮疹をみたものが1例あった。

考 案

精索静脈瘤が造成機能傷害を引き起こし、手術により造精機能が改善することは、多く報告されている⁸⁻¹²⁾。これらの報告では、手術による精液所見の改善は、60%—81%に認めており、手術後の妊娠率は、25%—55%である。本邦における高位結紮術後の妊娠率は、守殿¹³⁾は39.1%、三浦¹⁴⁾は21%、田中¹⁵⁾は24%と報告している。当教室の成績は、高位結紮術後6カ月で精子濃度、精子運動率の改善率は、それぞれ39%、30%であり、術後6カ月以上の妊娠率は25%であった¹⁶⁾。

血中 FSH 値
(mIU/ml)

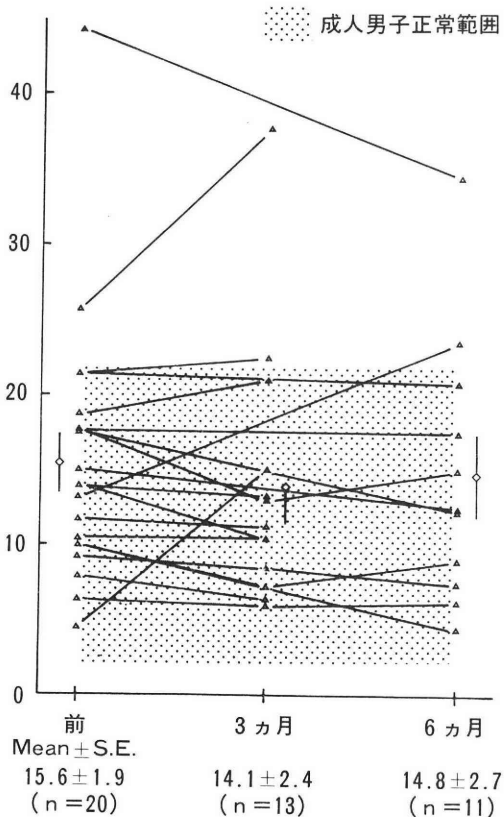


図5 血中 FSH 値の変動

血中テストステロン値
(ng/dl)

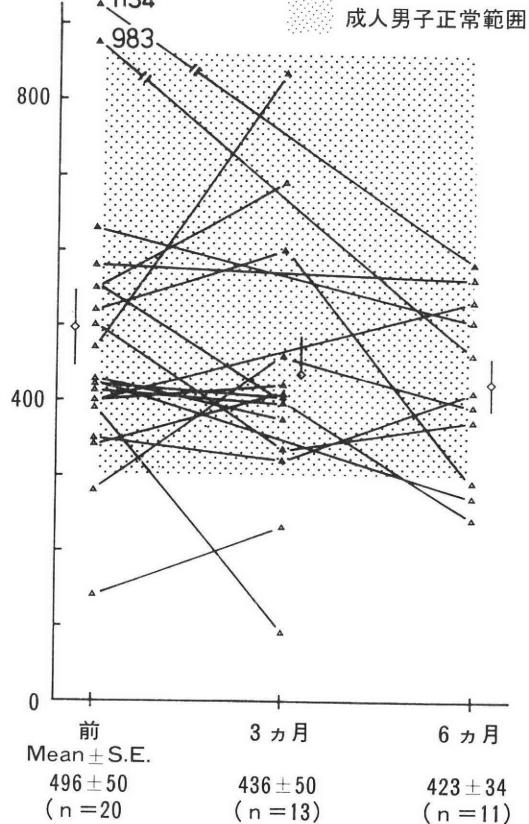


図6 血中テストステロン値の変動

今回の精索静脈瘤患者に対するフローベン投与の精液所見の改善率は、手術と同じ程度であったが、妊娠率では劣っていた。

フローベンは消化器障害などの副作用も強く長期投与が難しいこと、精索静脈瘤自体を治療する薬剤でないこと、投与成績も手術に劣ることより、手術にかわり得る治療ではない、手術を拒否した患者や、手術まで時間のある患者が第一の適応になると思われる。

当教室の男子不妊症に対するビタメジン（ビタミンB₁、B₆、B₁₂合剤）、ユベラ（ビタミンE剤）、クロミッド（クエン酸クロミフェン）の投与成績は以下の如くである。ビタメジン、ユベラは3カ月で判定したが、ビタメジンでは精子濃度、精子運動率に31%、24%の改善があり、ユベラでは同様に32%、23%に改善をみた⁶⁾。クロミッドは、特発性男子不妊症に対する投与であるが、24週で精子濃度、精子運動率はそれぞれ37%、22.2%の改善をみている¹⁷⁾。今回の成績をこれらと比較すると、ユベラ、ビタメジンには劣っているが、クロミッドとはほぼ同じである。

当教室の布施ら¹⁸⁾は特発性男子不妊症患者にフローベンを投与し、精子濃度は3カ月で20.6%、6カ月で29%、精子運動率は3カ月で23.7%、6カ月で29%のものに効果を認めたとしている。（6カ月の成績は未発表）この成績を今回の精索静脈瘤患者に投与したものと比較すると、3カ月の時点では精子濃度に関してはほぼ同等の成績であり、精子運動率では特発性男子不妊症の成績が良好であった。6カ月では精子濃度、精子運動率とも精索静脈瘤が、特発性男子不妊症より良好な成績を示した。特に精子運動率については、精索静脈瘤では6カ月の改善率が、3カ月のその2倍となっていた。以上よりPG合成阻害剤による成績は、精索静脈瘤のほうが特発性男子不妊症に比して良好であり、伊藤らの腎臓より逆流したPGが造精機能に障害を及ぼすとする説を裏づけるものだろう。

文 献

- 1) Vestoppen, G. R. and Steeno, O. P.: Varicocele and pathogenesis of the associated subfertility: a review of various theories III: theories concerning the deleterious effects of varicocele on fertility, *Andrologia*, 10: 85, 1978
- 2) Lewis, R. W. and Harrison, R. M.: Diagnosis and treatment of varicocele, *Clin. Obst. Gynecol.*, 25: 501, 1982
- 3) Howard, S. S.: Varicocele, *Fertil. Steril.*, 41: 356,

1984

- 4) Ito, H., Fuse, H., Minagawa, H., Kawamura, K., Murakami, M. and Shimazaki, J.: Internal spermatic vein prostaglandins in varicocele patients, *Fertil. Steril.*, 37: 218, 1982
- 5) 鈴木良徳：精索静脈瘤の研究，*日泌尿会誌*，58：1105, 1967
- 6) 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
- 7) 飯塚理八，己斐秀豊，高橋輝雄，仁科進弘：男子不妊症に対する Vitamedin の効果，*臨婦*，20：41, 1966
- 8) Dubin, L., Amelar, R. D.: Varicocelectomy as therapy in male infertility: a study of 504 cases, *J. Urol.*, 113: 640, 1975
- 9) Scott, L. S., Young, D.: Varicocele: a study of its effects on human spermatogenesis, and of the results produced by spermatic vein ligation, *Fertil. Steril.*, 13: 325, 1962
- 10) Brown, J. S.: Varicocelectomy in the subfertile male: a ten-year experience with 295 cases, *Fertil. Steril.*, 27: 1046, 1976
- 11) Glezerman, M., Rakowszczyk, M., Lunenfeld, B., Beer, R., Goldman, B.: Varicocele in oligospermic patients: pathophysiology and results after ligation and division of the internal spermatic vein, *J. Urol.*, 115: 562, 1976
- 12) Greenberg, S. H.: Varicocele and male fertility, *Fertil. Steril.*, 28: 699, 1977
- 13) 守殿貞夫：精索静脈瘤の診断と治療，*日不妊会誌*，27：571, 1982
- 14) 三浦一陽：特発性精索静脈瘤に関する研究，第2報：精索静脈の逆流防止術と治療成績，*日泌尿会誌*，75：1236, 1984
- 15) 田中啓幹，木内弘道，酒徳治三郎，滝原博史，岩本晃明，吉田謙一郎，藤尾幸司，伊藤晴夫：精索静脈瘤の治療成績，*西日泌尿*，48：1147, 1986
- 16) 川村健二：精索静脈瘤による男子不妊症の発生機序，*千葉医学*，62：33, 1986
- 17) 角谷秀典，川村健二，伊藤晴夫，島崎 淳，村上信乃：特発性男子不妊症のホルモン治療，*日不妊会誌*，30：97, 1985
- 18) 布施秀樹，皆川秀夫，伊藤晴夫，島崎 淳：男子不妊症に対するプロスタグランディン合成酵素阻害剤の効果，*泌尿紀要*，30：1439, 1984

Effect of prostaglandin synthetase inhibitor on varicocele

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

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

It seems to be that the reflux of prostaglandines from the renal vein disturbs spermatogenesis (Ito H. et al.: Fertil. Steril. 37: 218, 1982). According to this hypothesis, flurbiprofen was administered to 37 infertile patients with varicocele. Flurbiprofen of 120 mg was administered daily for 3 or 6 consecutive months. Drug use was discontinued in 3 cases because of digestive symptoms.

Semen findings and serum hormone values were compared before and after medication. After 6 months medication, sperm concentration and

motility improved in 36% and 40%. This improved rates were superior to that of idiopathic infertile patients who were administered flurbiprofen in our university.

Serum LH and FSH levels were not different before and after medication.

Testosterone level in blood tended to decrease a little, but not with statistical significance.

This result suggests that prostaglandin synthetase inhibitor has a beneficial effect on disturbance of spermatogenesis in patients with varicocele.

(受付: 1989 年 2 月 23 日)

男子不妊症に対する α -Blocker; β -Stimulant 併用療法の臨床的検討

Clinical Evaluation of Combined α -Blocker and β -Stimulant Therapy in Patients with Male Infertility

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

山下良孝	永井敦	大枝忠史
Yoshitaka YAMASHITA	Atsushi NAGAI	Tadashi OHEDA
小浜吉照	大橋輝久	大森弘之
Yoshiteru KOHAMA	Teruhisa OHASHI	Hiroyuki OHMORI

Department of Urology, Okayama University
Medical School, Okayama 700, Japan
(Director: Prof. H. Ohmori)

男子不妊症 50 症例に対し、 α -blocker として塩酸ブナゾシン (デタントール[®]) 2 mg, β -stimulant として塩酸プロカテロール (メプチン[®]) 100 μ g を用いた、 α -blocker, β -stimulant 併用療法を行い、12 週, 8%, 24 週, 17% の全般改善率を得た。無精子症には、治療効果を認めず、治療前 LH, FSH 高値例では治療効果が低い傾向を示した。また 3 例 (6%) に妊娠の成立を見た。副作用は 18 例 (36%) に認められ、その多くは β -stimulant によるものであり、今後は α -blocker 単独投与による検討が必要と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 165—169, 1990)

緒 言

最近、ラットおよび人精細管に交換神経の存在が認められ、その α 受容体の刺激で精細管は収縮し、 β 受容体の刺激では弛緩することが報告されている^{8,9)}。また不妊精巣では精細管の一部に不規則なくびれがあり、精子の通過障害を引き起こしており、これに対して、 α -blocker, β -stimulant 併用療法が有効であるとの報告がなされている¹⁾。今回我々は、不妊を主訴として当科を受診した 50 症例に対し、その臨床的有用性を検討した。

対象および方法

対象は、昭和 62 年 4 月より昭和 63 年 6 月迄の間に不妊を主訴に当科を受診した 50 症例である。患者

の年齢は 42 歳—24 歳 (平均 33 歳) で、妻の年齢は 39 歳—23 歳 (平均 29 歳) である。治療前の精子濃度は無精子症 8 例、乏精子症 42 例のうち精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満 33 例、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上 9 例であった。治療開始前、39 症例に精巣生検を行い、J. S. C. は 9.3—2.0, 平均 7.5 であった。

投与方法に関しては、 α -blocker として塩酸ブナゾシン (デタントール[®]) 2 mg, β -stimulant として塩酸プロカテロール (メプチン[®]) 100 μ g を連日 12 週から 24 週内服し、12 週後、24 週後に精液検査、血中ホルモン濃度の測定を行なった。また治療効果の判定は、Methyl-B₁₂ 用量比較試験の際使用された判定基準を用いた (表 1)。

表1 治療効果判定基準

- 1) 精子数改善度 (投与前値が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のものに対して判定する)
- (1) 著明改善……精子数が治療前値より $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの。
 - (2) 改善……精子数が治療前値より $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの。
 - (3) 不変……精子数が治療前値と比較して $\pm 10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の変動のもの。
 - (4) 悪化……精子数が治療前値より $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上減少したもの。
- 2) 運動率改善度 (投与前値が50%以下のものに対して判定する)
- (1) 著明改善……運動率が治療前値に比べ、20%以上改善したもの。
 - (2) 改善……運動率が治療前値に比べ、10%以上改善したもの。
 - (3) 不変……運動率が治療前値と比較して10%未満の変動のもの。
 - (4) 悪化……運動率が治療前値に比べ、10%以上悪化したもの。
- 3) 全般改善度

精子数および運動率に対する治療効果を総合的に判定し、5段階で判定する。

1. 著明改善 2. 改善 3. やや改善 4. 不変 5. 悪化

表2 治療効果一覧

層 別	週	総計	著明改善	改善	やや改善	不変悪化	改善率
精子濃度改善度	12	50	1	0	—	49	2%
	24	30	2	3	—	25	17%
運動率改善度	12	50	7	9	—	34	32%
	24	30	9	1	—	20	33%
全般改善度	12	50	2	2	13	33	8%
	24	30	2	3	10	15	17%

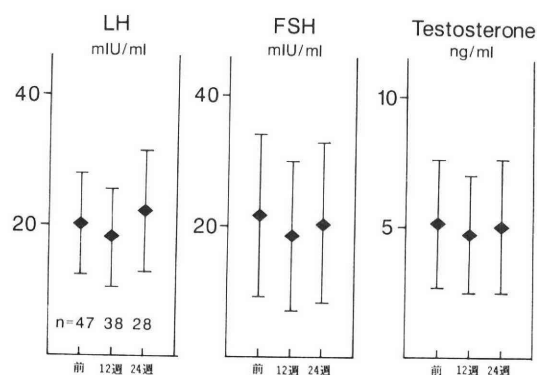


図1 治療前後の血中ホルモン濃度の推移

結 果

まず血中ホルモン濃度の変動についてであるが、治療前、12 週後、24 週後の LH, FSH, testosterone いずれについても、治療前後で有意の変化を認めなかった(図1)。また精液量、精液の pH についても治療前後で有意の変化を認めなかった。

精液所見の治療効果については、表2 に示したご

とくであるが、12 週後の精子濃度改善度は改善率 2 %で、治療前精子濃度 $11 \times 10^6/\text{ml}$ が治療後 $42 \times 10^6/\text{ml}$ に改善した 1 例以外には改善例を認めなかった。運動率改善度では著明改善 7 例、改善 9 例で、改善率 32 %と、精子濃度に比較して良好な結果を得た。また全般改善度は 8 %であった。24 週後の治療効果は、精子濃度改善度では著明改善 2 例、改善 3 例、改善 17 %と 12 週に比較して上昇を示した。運動率改善度では、著明改善 9 例、改善 1 例、改善率 33 %とほぼ 12 週と同様の結果であった。全般改善度は 17 %と精子濃度の改善率の上昇を受けて 12 週より上昇した。なお妊娠例は、3 例 (6 %) に認められた。その内訳については、治療前精子濃度 $7.6 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 25 %、12 週後では精子濃度 $1.2 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 15 %の症例に治療開始後 20 週目に、治療前精子濃度 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 65 %、24 週後、精子濃度 $0.9 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 15 %、の症例に治療開始後 24 週目に、治療前精子濃度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 75 %、12 週後では精子濃度 $1.7 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 45 %の症例に治療開始後 20 週目にそれぞれ妊娠の成立を見たものである。

次に治療前精子濃度、精子運動率、LH 濃度、FSH

表 3 治療前精子濃度別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改善	やや改善	不変悪化	改善率
10×10 ⁶ /ml以上	12	9	1	0	2	6	11%
	24	7	2	1	3	1	43%
10×10 ⁶ /ml未満	12	33	1	2	10	20	9%
	24	19	0	2	7	10	11%
無 精 子 症	12	8	0	0	1	7	0%
	24	4	0	0	0	4	0%

表 4 治療前精子運動率別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改善	やや改善	不変悪化	改善率
20%未満	12	31	1	1	10	19	7%
	24	20	1	2	7	10	15%
20%以上	12	19	1	1	3	14	11%
	24	10	1	1	3	5	20%

表 5 治療前 LH 濃度別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改善	やや改善	不変	改善率
15 未 満	12	16	0	1	6	9	6%
	24	8	0	0	4	4	0%
15以上30未満	12	26	2	1	5	18	12%
	24	17	2	3	4	8	29%
30 以 上	12	5	0	0	1	4	0%
	24	3	0	0	0	3	0%

LH : mIU/ml

濃度別に治療効果を検討した。

治療前精子濃度については、精子濃度 10×10⁶/ml 以上群、10×10⁶/ml 未満群、無精子症群の 3 群に分けて治療効果を検討した(表 3)。10×10⁶/ml 以上群では、12 週、24 週の全般改善率は、11%、43%、10×10⁶/ml 未満群では、9%、11%であった。無精子症群では、12 週後に精子濃度 0.6×10⁶/ml、運動率 35%、となった 1 例を認めたのみで、12 週、24 週後の改善率は、ともに 0%であり、他の 2 群に比較して治療効果を認めなかった。

治療前精子運動率では、精子運動率 20%以上群、20%未満群の 2 群別に治療効果を検討した(表 4)。12 週、24 週の全般改善率は、20%以上群では 11%、20%、20%未満群では 7%、15%で、治療前の精子運動率の高い群に治療効果を認めた。

治療前 LH 濃度では 15 mIU/ml 未満群、15 mIU/ml 以上 30 mIU/ml 未満群、30 mIU/ml 以上群の 3 群別に検討した(表 5)。15 mIU/ml 未満群では、全

般改善率 12 週、6%、24 週、0%、15 mIU/ml 以上 30 mIU/ml 未満群では、12 週、12%、24 週、29%、30 mIU/ml 以上群では、12 週、0%、24 週、0%と LH が 30 mIU/ml 以上の高値群では、治療効果を認めなかった。

治療前 FSH 濃度では 10 mIU/ml 未満群、10 mIU/ml 以上 20 mIU/ml 未満群、20 mIU/ml 以上群の 3 群別に治療効果を検討した(表 6)。10 mIU/ml 未満群では、全般改善率 12 週、22%、24 週、0%、10 mIU/ml 以上 20 mIU/ml 未満群では、12 週、6%、24 週、25%、20 mIU/ml 以上群では、12 週、5%、24 週、18%であった。治療前 FSH 濃度においても、LH にみられたほど明らかではないが、FSH 高値群では治療効果が低い傾向にあった。

副作用については重篤なものは認められなかったが、18 例 (36%) に認められ、うち 1 例で内服を中止した(表 7)。これらの副作用の内、心悸亢進、手指振戦は、 β -stimulant によるものと考えられた。

表 6 治療前 FSH 濃度別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改善	やや改善	不変	改善率
10 未 満	12	9	1	1	4	3	22%
	24	5	0	0	3	2	0%
10以上20未満	12	17	1	0	4	12	6%
	24	12	2	1	3	6	25%
20 以 上	12	21	0	1	4	16	5%
	24	11	0	2	2	7	18%

FSH : mIU/ml

表 7 副作用一覧

心悸亢進	5例
手指振戦	3例
腹筋のスパズム	2例
鼻閉感	2例
全身倦怠感	2例
立ちくらみ	2例
吐き気	1例
頭 痛	1例
総計	18例 (36%)

考 察

自律神経機能の性腺機能および、造精能に果たす役割については、未だ不明の部分が多い。

両側除神経されたラット精巣における検討では、精巣重量、造精能、性行動、testosterone 分泌には、急性、慢性の影響を与えないが、正常では急性ストレスにより引き起こされる testosterone の増加が、除神経されたラットでは認められなくなると報告されている²⁾。また catecholamine は、犬において、testosterone 濃度を上昇させるとの報告もあるが³⁾、人⁴⁾、ラット^{5,6)}での同様の検討では catecholamine は testosterone 産性を低下させ^{4,5)}、血中 testosterone 濃度を低下させる^{4,5,6)}こと、その際、精巣血流は不変である⁵⁾と報告されている。またラットにおいて慢性ストレスによって引き起こされる testosterone 濃度の低下は、 β_2 -blocker において拮抗されることより、 β_2 -receptor を介して引き起こされると推測するものもある⁷⁾。

このように、精巣の内分泌機能に対する交感神経、catecholamine の働きについては、未だ不明の部分が多い。

山本ら⁹⁾はラット精細管、Miyake ら⁸⁾はヒト精細管に、 α_1 , β , ムカスリン, receptor を認め *In vitro* で

は α_1 , β , ムカスリン, receptor の刺激で精細管は収縮し、 β -receptor の刺激では弛緩することを示した。また不妊精巣に認められる精細管の狭窄が、精細管内の精子輸送の障害を引き起こしていることを示している¹⁰⁾。これらのことを理論的根拠として、Yamamoto ら¹⁾は男子不妊症に対する α -blocker, β -stimulant 併用療法を行ない、その有効性をすでに報告している。しかしラットにおける *In vivo* の検討では、コリン作動性薬、adrenaline, noradrenaline は、精細管内圧に影響を与えないこと、しかし用量依存生に精巣上体管内圧を上昇させること、adrenaline 作動性薬のこの効果は α -blocker の投与によって拮抗されること、 β -stimulant である、isoproterenol では内圧の上昇が認められないことなどより、これが α -receptor を介した作用であるとの報告¹¹⁾もなされており、 α -blocker, β -stimulant 併用療法の作用機序を考える上で興味深い。Yamamoto ら¹⁾の報告では、対象症例 20 症例（うち 6 例は無精子症）、に対し α -blocker として塩酸ブナゾシン（デタントール[®]）2 mg, β -stimulant として塩酸プロテカロール（メプチン[®]）100 μ g を、5 ヶ月連日内服させ、16 例（80 %）に精子濃度、精液量の有意の増加を認め、うち 3 例（15 %）に妊娠の成立を見ている。また運動率の改善は認めていない。さらに無精子症 6 例中 5 例に、 $0.1 \times 10^6/\text{ml}$ から $10 \times 10^6/\text{ml}$ の精子の出現をみている。我々は対象症例として無精子症を含む特発性男子不妊症患者 50 例について、彼らの投与量に準じて治療を行ない前記の結果を得た。判定基準の相違で単純に比較はできないが、我々の得た結果では、精子濃度では 17 %, 運動率では 33 %, 全般改善度では 17 %, 妊娠率 6 %で、精子濃度よりも、運動率改善に効果が高かった。しかし精子濃度改善度、妊娠率は期待されたほどではなかった。また精液量に関しては、治療前後で有意の差を認めなかった。治療前精子濃度、精子運動率、LH 濃度、FSH 濃度と治療効果との関係より、治療前 LH, FSH が

高値を示す、高度乏精子症例では効果が低く、特に無精子症に対する効果は認められなかった。この事は精巣における造精能が既に高度に障害されている症例では、治療効果が期待できない事を示している。また β -stimulantによるものと考えられる心悸亢進、手指振戦などの副作用が18例(36%)に認められた。今後は作用機序の解明とともに、臨床的には α -blocker単独投与による検討が必要と考えられた。

結 語

1) 男子不妊症50例に α -blocker, β -stimulant併用療法を行ない、12週、8%、24週、17%の全般改善率を得た。また3例(6%)に妊娠の成立を見た。

2) 無精子症には治療効果を認めず、治療前LH, FSH高値例では治療効果が低い傾向を示した。

3) 副作用は18例(36%)に認められ、その多くは β -stimulantによるものであり、今後は α -blocker単独投与による検討が必要と考えられた。

(本論文の要旨は、第26回日本不妊学会中国四国支部総会で発表した。)

文 献

- 1) Yamamoto, M., Takaba, H., Hashimoto, J., Miyake, K. and Mitsuya, H.: Successful treatment of oligospermic and azoospermic men with α -blocker and β -stimulator: new treatment for idiopathic male infertility, *Fertil. Steril.*, 46: 1162, 1986
- 2) Frankel, A. I. and Ryan, E. L.: Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress, *Biology of Reproduction*, 24: 491, 1981
- 3) Ein-Nes, K. B.: An effect of isoproterenol on rates of synthesis and secretion of testosterone, *American Journal of Physiology*, 217: 1764, 1969
- 4) Levin, J., Lloyd, C. W., Lobotsky, J. and Friedrich, E. H.: The effect of epinephrine on testosterone production, *Acta Endocrinologica*, 55: 184, 1967
- 5) Damber, J. E. and Janson, P. O.: The effects of LH, adrenaline and noradrenaline on testicular blood flow and plasma testosterone concentrations in anaesthetized rats, *Acta Endocrinol.* 88: 390, 1978
- 6) Gotz, F., Stachl, F., Rohde, W. and Dorner, G.: The influence of adrenalin on plasma testosterone in adult and newborn male rats, *Exp. Clin. Endocrinol.*, 81: 239, 1983

- 7) Collu, R., Gibb, W. and Ducharme, J. R.: Role of catecholamines in the inhibitory effect of immobilization stress on testosterone secretion in rats, *Biology of Reproduction*, 30: 416, 1984
- 8) Miyake, K., Yamamoto, M., Narita, H., Hishimoto, J. and Mitsuya, H.: Evidence for contractility of the human seminiferous tubule confirmed by its response to noradrenaline and acetylcholine, *Fertil. Steril.*, 46: 734, 1986
- 9) 山本雅恵, 三宅弘治, 三矢英輔: 微小穿刺法によるラット精細管蠕動に関する研究, *日泌尿会誌*, 74: 907, 1983
- 10) 三宅弘治: 特発性不妊精巣の病態生理, *臨泌*, 42: 105, 1988
- 11) Pholpramool, C. and Triphrom, N.: Effect of cholinergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis *in vivo*, *J. Reprod. Fert.*, 71: 181, 1984

Clinical evaluation of combined α -blocker and β -stimulant therapy in patients with male infertility

Yoshitaka Yamashita, Atsushi Nagai,
Tadashi Oheda, Yoshiteru Kohama,
Teruhisa Ohashi and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology, Okayama University
Medical School, Okayama 700, Japan
(Director: Prof. H. Ohmori)

Fifty infertile men were treated by oral administration of α -blocker (Bunazosin, 2mg/day) and β -stimulant (Procaterol, 100 μ g/day) for 24 weeks. General improvements of the sperm density and the sperm motility were noted in 8% of the patients at 12 weeks and 17% at 24 weeks after the therapy. Only a little clinical effect was found in patients with azoospermia and elevated plasma gonadotropin levels. Pregnancies were achieved in only 3 cases with oligozoospermia. On the other hand, adverse effects mainly due to β -stimulant were noted in 18 cases (36%). Therefore, it was suggested that combined α -blocker and β -stimulant therapy might be useful for mild oligozoospermic patients with the normal gonadotropin levels, and further investigation should be necessary to use only α -blocker.

(受付: 1989年3月30日)

先天性副腎性器症候群における神経血管保存法 及び逆U字皮弁法を用いた外陰部形成術

Surgical Reconstruction of the External Genitalia with Preservation of the Neuro-vascular Bundle and Using an Opposite U Skin Flap in Congenital Adrenogenital Syndrome

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎教授）

磯山理一郎 山川弦一郎 馬場良和
Riichiro ISOYAMA Gen-ichiro YAMAKAWA Yoshikazu BABA
瀧原博史 酒徳治三郎
Hiroschi TAKIHARA Jisaburo SAKATOKU

Department of Urology, Yamaguchi University
School of Medicine, Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

先天性副腎性器症候群 (AGS) の女児では、生来 ambiguous な外性器を呈し、種々の男性化をきたすので、機能面および外観上からも成形手術の適応となるが、将来の精神心理面の発達を考慮し、可能なかぎり神経血管を保存し正常に近い形態での形成手術が望まれ、これまでに多くの術式が発表されている。最近著者らは男性化の強い3歳のAGS女児に神経血管保存的陰核形成と逆U字皮弁法を用いて陰口形成を行い、さらに包皮を用いて小陰唇形成を行い、ほぼ満足すべき結果を得た。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 170-174, 1990)

緒 言

先天性副腎性器症候群 (congenital adrenogenital syndrome 以下 AGS) の女児では、生来 ambiguous な外性器を呈し、ステロイド補充療法を行っていても外性器に種々の程度の進行性男性化をきたし、機能面のみならず外観上の見地からも形成外科手術の適応となる。しかし、対象に乳幼児が多く、早期診断、早期治療は重要な問題であるが、不随する性器異常に対する外科的治療にあたっては、将来の人間形成ならびに社会的生活において機能面のみならず、精神心理面の発達等を考慮し、可能なかぎり正常に近い形態での形成術が望まれる。手術法についてはこれまでに多くの術式が発表されているが、最近わ

れわれは男性化の強い3歳8カ月のAGS女児に神経血管保存的陰核形成と逆U字皮弁法を用いて陰口形成を行い、さらに包皮を用いて小陰唇形成を行い、ほぼ満足すべき結果を得たので術式を中心に報告する。

症 例

患者：3歳8ヵ月 女児

主訴：外陰部の異常

家族歴：9歳姉も同様 AGS にて陰核形成術を受けている。

既応歴：生下時に心房中隔欠損 (ASD) があったが自然閉鎖、大動脈狭窄症 (AS) もあって当院小児科にて経過観察中

現病歴：正常満期産，生下時より脱水症状があり，当院小児科にて塩類喪失型 21-hydroxylase 欠損症（染色体検査 46xx）と診断され，glucocorticoid 及び mineral corticoid の補充療法を受けていたが，著明な陰核肥大があり，外陰部形成を目的として当科を受診



Fig. 1 術前の外陰部：著明な陰核肥大があり，小陰唇は癒合し，尿道口と膣口は尿生植洞口として陰核基部下方に開口していた。

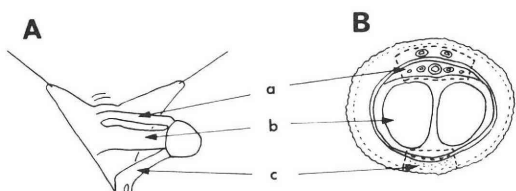


Fig. 2 陰核形成術模式図：A，側面図，B：断面図，a，神経血管束，b，陰核海綿体部，c，腹側面皮膚粘膜弁

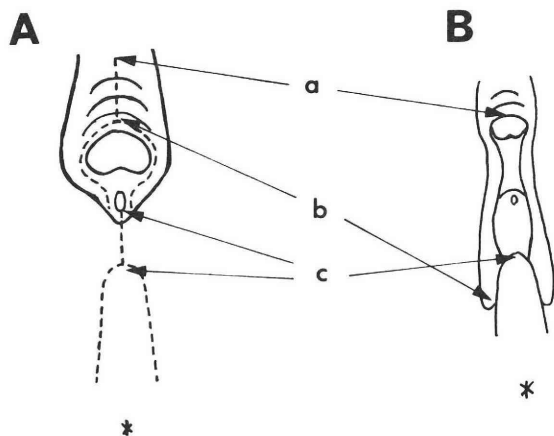


Fig. 3 外陰部形成術（膣口形成術及び小陰唇形成術）模式図：A，形成術前，B，形成術後，a, b, c, 各々が一致するように縫合形成を行う。

した。

現症：身長 90.2 cm (−2 SD)，体重 13 kg (−1 SD) で外陰部は著明な陰核肥大があり，その基部下方に小孔（尿生植洞口）を形成し，尿道口と膣口は同一開口部となっていた (Fig. 1)。その他は全身的に特に異常は認めなかった。

手術計画：陰核形成術は，陰核背側の神経血管束を白膜を含めて根部深くから亀頭後端まで帯状に保存し，腹側面皮膚粘膜も保存して膣前庭とし，陰核海綿体のみを切除する方法とした (Fig. 2)。外陰部形成術は，包皮背面正中に根部より亀頭部まで縦切開を加え，さらに亀頭部周囲冠状溝に沿う弧状切開から尿生植洞口に沿って腹側面に皮膚粘膜弁を形成するように切開を加え，背側面は2葉の皮膚弁として小陰唇形成をこれを用いて行い，尿生植洞口は下縁から縦切開したのち，その中央を頂点とする大陰唇下端を越える逆U字型の皮膚弁を作成して膣口形成を行う方法とした (Fig. 3)。

手術：手術前日朝より通常の倍量の glucocorticoid 及び mineral corticoid を服用させ，手術当日朝は glucocorticoid として hydrocortisone 20mg を筋注し，術中は hydrocortisone 100mg を点滴静注し，mineral corticoid の不足に対しては，水・Na の補給で対処し，夕より両 corticoid 1 日量を服用，翌日より通常量の内服とした。他は通常の小児の術前処置と同様とした。手術は全身麻酔下に軽度の碎石位をとらせ，陰核亀頭部に支持系をおき，包皮を冠状溝に沿って弧状に切開し，さらに12時方向に背面縦切開を加え，皮下を剥離し陰核基部を露出し，ネラトンカテーテルにて血流を遮断したのち陰核背面の皮下静脈及び陰核の背面動静脈と神経を白膜を含んだ神経血管束として保存し陰核海綿体と分離する (Fig. 4)。つづいて，腹側面では根部から亀頭部まで

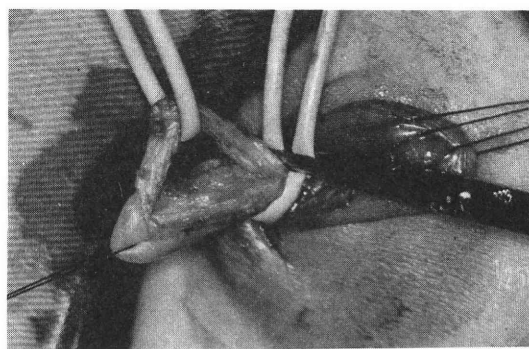


Fig. 4 陰核形成術：神経血管束を保存し，陰核海綿体部と分ける。

带状に皮膚粘膜を残して陰核海綿体のみを脚部から亀頭部にかけて切除し、両断端は4-0 vicrylにて結紮止血縫合した。その結果、海綿体の欠如した双茎の陰核亀頭弁が作成される (Fig. 5)。つぎに、血流を再開した双茎の陰核亀頭弁を完全に止血したのち互いに5-0 vicrylにて逢着し、陰核提靱帯付近の所定の位置に深く埋没するように固定する。亀頭の大きさは適当と思われ縫縮は行わなかった (Fig. 6)。つづいて腹側面の带状皮膚粘膜弁にて腔前庭を形成し、包皮の冠状溝に沿った弧状皮膚切開線を尿生殖洞口両側に至るまで延長した。尿生殖洞口は6時の位置を腔口が見えるところまで縦切開し、ここを頂点とする逆U字皮膚弁を基部は大陰唇をこえるまで弧状切開を延長して作成し、4-0 vicrylにて腔後壁の切開部に皮膚弁の頂点を縫合し、他の側面は5-0 vicrylにて縫合した (Fig. 7)。また、包皮の2葉の舌状皮

膚弁を左右とも先端が一部逆U字皮膚弁にかかるように5-0 vicrylにて伸展しつつ縫合し、これにて小

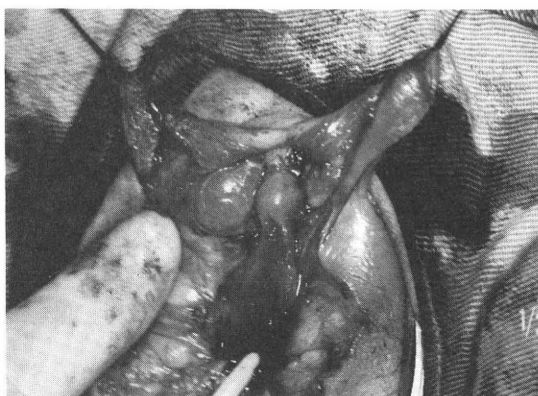


Fig. 7 腔口形成術：尿生殖洞口を切開し、逆U字皮膚弁にて腔口形成を行う。

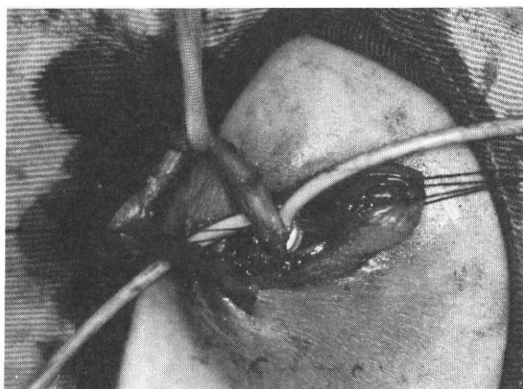


Fig. 5 陰核形成術：陰核海綿体部を切除し神経血管束と腹側面皮膚粘膜弁の双茎の陰核亀頭弁を作成する。

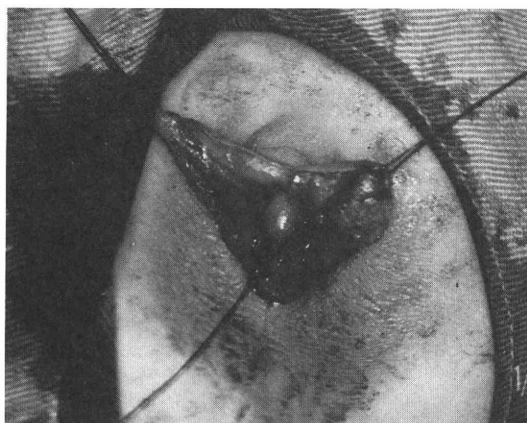


Fig. 6 陰核形成術：陰核亀頭弁を陰核提靱帯付近に固定する。



Fig. 8 小陰唇形成術：包皮の2葉の舌状弁にて小陰唇を形成する。



Fig. 9 術後10日目の外陰部所見

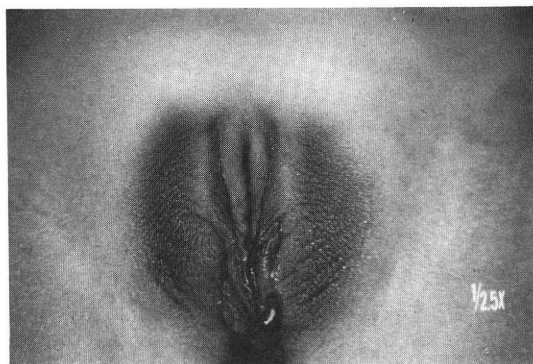


Fig. 10 術後3ヵ月目の外陰部所見

陰唇を形成する。できあがりには、陰核は退縮し、包皮をかぶった状態となり、陰前庭及び小陰唇が形成され逆U字皮膚弁にて陰口が形成される。皮下にドレンは留置しなかった(Fig. 8)。術後10日目には浮腫もとれ、陰核及び皮膚弁は血流良好で皮膚弁先端の壊死もなく、おおむね正常に近い外陰部が形成されている。感染もなくバルンカテーテルを抜去した(Fig. 9)。術後3ヵ月目では、陰口は小陰唇におおわれ、脚を閉じると陰裂も形成されるようになり、会陰部の手術痕も目立たず、将来下着にて十分かくれる範囲内であり、ほぼ満足のいく結果となった(Fig. 10)。

考 察

21-hydroxylase deficiency による AGS の女児では、生下時により種々の程度の男性化をきたし、ambiguous な外性を呈している。その治療方針は、1) ステロイド補充療法を行い、性器の成熟、身体の発達を暦年齢に保つ、2) 外的ストレスに対して、急性発症しないようにする、3) 外性器異常、性早熟に対する精神心理面及び機能面を社会生活に適應できるようにすることであり、早期診断、早期治療が必要である。なかでも外性器の異常に対しては形成手術が有効であり、適應となる。外陰部形成術は従来1) 肥大した陰核を縮小ないし摘除すること、2) 隠れた陰口を表在化することが主な目的とされ、種々の術式が提唱されてきたが、患者の精神心理面の発達及び機能面からも、より生理的で正常に近い形態となる形成術が望まれる。われわれは、陰核形成術に対しては、そのまま埋没させたり^{1,2)}、逆に摘除してしまう³⁾よりは、陰核龟头部を神経血管を含めて保存し、陰核海綿体は切除するが脚部は保存した。脚部に関しては本来、陰核脚として生理的に存在するものであるし、海綿体断端の勃起時の疼痛例³⁾は経験

しておらず、これが生じた場合には完全切除を考慮することとし、手術侵襲も考慮し保存した。陰核龟头部は、大きさによっては年齢に応じた縫縮術⁴⁾が必要と思われるが、本例には必要ないと判断した。また、陰核腹側面を保存して、これを陰前庭部とした。陰口形成にあたっては、尿生植洞口を形成し、外尿道口と陰口がみえない症例に対して行なわれ、外陰部の形態異常は Prader⁵⁾により5型に分類されており、Fay⁶⁾はその程度により、II型では、cut-back法、III~IV型では perineal-scrotal-flap法、V型では pull-through法を選択すべきとしている。本例はIII型に相当すると考えられ、Fortunoff⁷⁾の方法に準じた皮弁を用いたが、原法では皮弁が細く鋭角すぎ血行維持に不安を覚えたのでウィングラスを逆にした型の基部の広い逆U字皮弁を用いた。この方が術後の陰口部の狭窄⁸⁾をきたしにくいのではないかと考えた。将来狭窄が生じれば、ヘガールにてブジーを行うか、再建術⁹⁾が必要と考える。小陰唇形成に関しては、従来より余り重要視されておらず、わずかに Merberger¹⁰⁾、Hendren¹¹⁾らの報告に認められる程度であるが、包皮に余剰がある場合、切除してしまうよりはこれを用いて小陰唇形成を行った方がより正常に近い形態となり、手術の目的に合致するものと考え施行した。結果として手術法の全過程は Kay¹²⁾の方法に準じることとなった。手術時期に関しては諸説あり、より早期にという傾向もあるが、形成手術であり、技術的に満足のいく形成術が可能か否かの考慮が必要であり、乳幼児期では手術および麻酔の侵襲も無視できず、塩類喪失型ではより risk が高い。Spence¹³⁾は1歳程度としており、Sotiropoulos¹⁴⁾の早期の陰口形成は狭窄をきたしやすいという報告もあり、ステロイド補充療法の安定した時期で、患者が社会生活に入る前及び性の意識が高まる前に行えば十分ではないかと考えている。その方が一期的に手術が行え、より正常に近い形態への形成術が容易である。もちろん尿生殖洞孔が狭く、尿路感染をくりかえす場合は別である。手術の本来の評価は長期の経過観察によらなければならないが、不十分なステロイド補充療法は再度の男性化をきたし、過度の補充療法は早期の骨端閉鎖をきたし、術後のステロイド補充療法の重要性が認識される。以上を手術の基本的原理として外陰部形成術を行い、手術手技も比較的容易に行え、術後ほぼ満足のいく結果を得たので報告した。

文 献

- 1) Lattimer, J. K.: Relocation and recession of the

- enlarged clitoris with preservation of the glans: an alternative to amputation, *J. Urol.*, 86: 113, 1961
- 2) Randolph, J. G. and Hung, W.: Reduction clitoroplasty in females with hypertrophied clitoris, *J. Pediatr. Surg.*, 5: 224, 1970
 - 3) Gross, R. E., Randolph, J. G. and Crigler, J. F. Jr.: Clitorectomy for sexual abnormalities: Indications and technique, *Surgery*, 59: 300, 1966
 - 4) Perlmutter, A. D.: Adrenogenital syndrome: Glenn JF ed, *Urologic Surgery* 3rd ed, 1043, JB Lippincott Co., 1983
 - 5) Prader, V. A.: Der Genitalbefund beim Pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms: Morphologie, Häufigkeit, Entwicklung und Vererbung der verschiedenen Genitalformen, *Helv. Pediatr. Acta.*, 9: 231, 1954
 - 6) Fay, R. and Brosman, S.: Surgical management of female congenital adrenal hyperplasia (adrenogenital syndrome), *J. Urol.*, 112: 813, 1974
 - 7) Fortunoff, S., Lattimer, J. K. and Edson, M.: Vaginoplasty technique for female pseudohermaphrodites, *Surg. Gynecol. Obstet.*, 118, 545, 1964
 - 8) Jones, H. W. Jr., Verkauf, F. S. and Verkauf, B. S.: Surgical treatment in congenital adrenal hyperplasia: Age at operation and other prognostic factors, *J. Obstet. Gynec.*, 36: 1, 1970
 - 9) Jones, H. W. Jr., Garcia, F. S. and Klingensmith, G. J.: Secondary surgical treatment of the masculinized external genitalia of patients with virilizing adrenal hyperplasia, *J. Obstet. Gynec.*, 48: 73, 1976
 - 10) Marberger, M., Marberger, H., Stockamp, K. and Straub, E.: Die Korrektur des intersexuellen Genitale in die weibliche Richtung, *Akt. Urol.*, 6: 99, 1975
 - 11) Handren, W. H. and Donahoe, P. K.: Correction of congenital abnormalities of the vagina and parineum, *J. Pediatr. Surg.*, 15: 751, 1980
 - 12) Kay, R.: Clitoral Surgery: Stewart BH ed, *Operative Urology*, 402, Williams and Wil-

kins, 1982

- 13) Spence, H. W. and Allen, T. D.: Genital reconstruction in the female with the adrenogenital syndrome, *Brit. J. Urol.*, 45: 126, 1973
- 14) Sotiropoulos, A., Morishima, A., Homsy, Y. and Lattimer, J. K.: Long-term assessment of genital reconstruction in female pseudohermaphrodites, *J. Urol.*, 115: 599, 1976

Surgical reconstruction of the external genitalia with preservation of the neuro-vascular bundle and using an opposite U skin flap in congenital adrenogenital syndrome

Riichiro Isoyama, Gen-ichiro Yamakawa,
Yoshikazu Baba, Hiroshi Takihara
and Jisaburo Sakatoku

Department of Urology, Yamaguchi University
School of Medicine, Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

Female pseudohermaphroditism with congenital adrenogenital syndrome (AGS) is the most common type of intersex problem seen in children. In females with this disorder, the internal genital organs are usually normal, but variable degrees of virilization can be observed externally. Surgical correction of ambiguous external genitalia in patients with this syndrome is necessary in view of sexual function and cosmetic problems.

This is a case report of a three-year-old girl with AGS who had clitoral hypertrophy and a urogenital sinus. We performed surgical reconstruction of the external genitalia with clitoroplasty, preservation of the neuro-vascular bundle and vaginoplasty, using an opposite U skin flap and creating labia minora using the foreskin.

(受付: 1989年5月11日)

特発性男子不妊症に対する内分泌療法

Hormonal Treatment to Idiopathic Male Infertility

千葉大学医学部泌尿器科学教室（主任：島崎 淳教授）

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

*現：富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

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

*Toyama Medical and Pharmaceutical University

特発性男子不妊症 141 例に対してクエン酸クロミフェン、クエン酸タモキシフェンおよび hCG, hMG を投与した。精子濃度の改善率は、それぞれ 27 %, 28 % および 12 % であり、精子運動率のそれは、16 %, 22 % ならびに 18 % であった。妻の妊娠の成立をみたものは、それぞれ 5 例 (9 %), 2 例 (4 %) および 1 例 (3 %) であった。hCG, hMG の治療成績は、前 2 剤に比し悪かった。

3 剤とも治療前 LH ないし FSH が比較的低値なものに精液所見の改善をみたものが多かった。また治療後テストステロン値の上昇の幅が大のものが精子濃度の改善をみた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 175—181, 1990)

緒 言

特発性男子不妊症の治療は、内分泌療法と非内分泌療法に大別される。非内分泌療法は造精機能への作用機序解明が十分でなく、理論的根拠の明らかでないものが多い。Steinberger¹⁾によれば、造精機能の導入および維持には、FSH およびテストステロンが必要とされるので、内分泌療法すなわち両者を高める薬剤を投与することは、造精機能の改善に合目的とされ、近年応用が増加した。

以前、内分泌療法剤に属するクエン酸クロミフェン、クエン酸タモキシフェンおよび hCG, hMG による治療成績を報告したが^{2,3)}、さらに症例を重ねて 3 剤を比較検討した。

対象および方法

1986 年より 1988 年までに千葉大学泌尿器科において特発性男子不妊症の診断をうけたものを対象とした。薬剤としてクエン酸クロミフェン（クロミッド[®]、塩野義）は 1 日 25 mg の 3 週内服、1 週休薬を 12 週施行、クエン酸タモキシフェン（ノルバデックス[®]、ICI）は 1 日 20 mg、12 週間連日投与、hCG, hMG は hCG（ゴナトロピン[®]、帝国臓器）1000 単位、hMG（ヒュメゴン[®]、オルガノン・三共）75 単位を同時に週 2 回連続 12 週筋注した。

投与症例は、クエン酸クロミフェン 56 例、クエン酸タモキシフェン 51 例、hCG, hMG 34 例である。

以上の薬剤投与前後の精子濃度、精子運動率および血中 LH, FSH, プロラクチン、テストステロンな

Table 1 クエン酸クロミフェンの治療効果

治療前精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精 子 濃 度				精 子 運 動 率				妊 娠		
	著効	有効	不変	悪化	著効	有効	不変	悪化	有	無	不明
0	0 └ 0 %	0	15	0	0 └ 0 %	0	15	0	0 (0 %)	15	0
<10	2 └ 11 %	0	16	0	2 └ 39 %	5	9	2	1 (6 %)	17	0
10 ≤ <20	3 └ 38 %	0	2	3	0 └ 0 %	0	6	2	0 (0 %)	8	0
20 ≤ <30	5 └ 63 %	0	1	2	0 └ 14 %	1	7	0	3 (38 %)	5	0
30 ≤ <40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 ≤ <50	1 └ 67 %	1	0	1	0 └ 33 %	1	2	0	0 (0 %)	3	0
50 ≤	2 └ 75 %	1	1	0	0 └ 0 %	0	3	1	1 (25 %)	3	0
計	13 └ 27 %	2	35	6	2 └ 16 %	7	42	5	5 (9 %)	51	0

Table 2 クエン酸タモキシフェンの治療効果

治療前精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精 子 濃 度				精 子 運 動 率				妊 娠		
	著効	有効	不変	悪化	著効	有効	不変	悪化	有	無	不明
0	0 └ 0 %	0	13	0	1 └ 8 %	0	12	0	0 (0 %)	12	1
<10	2 └ 17 %	0	10	0	1 └ 17 %	1	5	5	1 (10 %)	9	2
10 ≤ <20	2 └ 33 %	0	3	1	0 └ 50 %	3	2	1	0 (0 %)	6	0
20 ≤ <30	2 └ 57 %	2	3	0	0 └ 14 %	1	5	1	0 (0 %)	5	2
30 ≤ <40	1 └ 50 %	0	0	1	0 └ 0 %	0	2	0	0 (0 %)	2	0
40 ≤ <50	1 └ 33 %	0	1	1	1 └ 33 %	0	2	0	0 (0 %)	3	0
50 ≥	4 └ 50 %	0	2	2	1 └ 38 %	2	5	0	1 (13 %)	7	0
計	12 └ 28 %	2	32	5	4 └ 22 %	7	33	7	2 (4 %)	44	5

らびにエストラジオール値の変動を検討した。前2剤は、12週投与翌日、hCG、hMG投与例は、最終筋注3日後に採血した。精液は5日間以上禁欲させた後、用手法で採取させ、室温に30分放置後、鏡検に供した。治療による精液所見の変化は、飯塚ら⁴⁾による治療効果判定基準により評価し、精子濃度が著効および有効のものを改善、不変および悪化のものを非改善とした。なお血中ホルモン値の測定は、それぞれHLH“栄研”キット、HFSH“栄研”キット、

プロラクチンリアビーズIIキット(ダイナボット社)、テストステロンI₁₂₅キット(栄研)およびエストラジオールH₃キット(CIS社)によった。

結 果

1) 治療効果

①クエン酸クロミフェン

精子濃度は、治療前 $20 \times 10^6/\text{ml} \sim 30 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $40 \times 10^6/\text{ml} \sim 50 \times 10^6/\text{ml}$ 、および $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の

Table 3 hCG, hMG の治療効果

治療前精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精 子 濃 度				精 子 運 動 率				妊 娠		
	著効	有効	不変	悪化	著効	有効	不変	悪化	有	無	不明
0	0 「0 %」	0	14	0	1 「7.1 %」	0	13	0	0 (0 %)	14	0
<10	0 「0 %」	0	11	1	1 「25 %」	2	8	1	0 (0 %)	13	0
10 $\leq$ <20	3 「50 %」	0	2	1	0 「0 %」	0	5	1	1 (25 %)	3	1
20 $\leq$ <30	0 「50 %」	1	1	0	1 「100 %」	1	0	0	0 (0 %)	2	0
計	3	1	28	2	3	3	26	2	1	32	1
	12 %				18 %				(3 %)		

Table 4 治療前ホルモン値と治療効果

薬 剤	治 療 前 血 中 ホ ル モ ン 値									
	LH		FSH		プロラクチン		テストステロン		エストラジオール	
	改善例	非改善例	改善例	非改善例	改善例	非改善例	改善例	非改善例	改善例	非改善例
クエン酸 クロミフェン	9.0 $\pm$ 4.9 (n=5)	13.9 $\pm$ 8.4 (n=24)	8.5 $\pm$ 5.5* (n=5)	22.4 $\pm$ 17.1 (n=24)	9.4 $\pm$ 2.1 (n=5)	9.5 $\pm$ 4.3 (n=25)	5.0 $\pm$ 2.2 (n=5)	4.6 $\pm$ 1.9 (n=24)	17.7 $\pm$ 4.4 (n=2)	22.8 $\pm$ 10.4 (n=16)
クエン酸 タモキシフェン	8.0 $\pm$ 3.5 (n=11)	10.6 $\pm$ 5.8 (n=30)	11.6 $\pm$ 4.4* (n=11)	19.0 $\pm$ 15.7 (n=28)	12.9 $\pm$ 6.4 (n=11)	13.5 $\pm$ 11.9 (n=25)	4.2 $\pm$ 2.3 (n=7)	5.3 $\pm$ 2.3 (n=25)	17.6 $\pm$ 8.8 (n=5)	16.0 $\pm$ 9.2 (n=2)
hCG, hMG	11.3 $\pm$ 5.7 (n=3)	19.7 $\pm$ 9.5 (n=18)	13.1 $\pm$ 5.6 (n=3)	21.6 $\pm$ 15.0 (n=18)	10.5 $\pm$ 1.9 (n=3)	11.1 $\pm$ 3.8 (n=18)	4.9 $\pm$ 1.5 (n=3)	4.1 $\pm$ 2.1 (n=18)		23.0 $\pm$ 16.5 (n=4)

a: それぞれの非改善例と有意差あり (P<0.05)

ものが、それぞれ 63 %, 67 %ならびに 75 %の改善率であり、 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の精子濃度のものと比較し、改善率が高かったが、統計的に有意ではなかった。全体では、精子濃度および精子運動率それぞれ 27 %および 16 %の改善率であった。妊娠したものは、5 例、9 %であった (Table 1)。

②クエン酸タモキシフェン

治療前精子濃度の $20 \times 10^6/\text{ml} \sim 30 \times 10^6/\text{ml}$ のものの精子濃度の改善率は、他の精子濃度のものに比し高く、7 例中 4 例、57 %であった。しかし統計的有意差はなかった。無精子症の 1 例に精液に精子をみとめ、 $2 \times 10^4/\text{ml}$ となった。全体では、28 %の改善率であった。一方、精子運動率は 22 %のものが改善した。妊娠したものは 2 例であった (Table 2)。

③ hCG, hMG

精子濃度および精子運動率の改善率は、それぞれ 12 %および 18 %であり、前 2 剤と比較し、低率であった。妊娠したものは 1 例であった (Table 3)。

2) 治療効果の検討

i) 治療前ホルモン値と治療効果

治療前の血中 LH および FSH 値は、3 剤とも改善例が非改善例より低値を示した。血中プロラクチン

値は、治療効果との関係をみなかった。クエン酸タモキシフェン投与例では、改善例の血中テストステロン値が低値の傾向をみた。血中エストラジオール値は、3 剤とも改善例と非改善例に差をみなかった (Table 4)。

ii) ホルモン値の変動と治療効果

血中 LH 値は、3 剤いずれも治療後上昇をみたが、改善例と非改善例とに差をみなかった (Fig. 1)。

血中 FSH 値はクエン酸クロミフェンおよびクエン酸タモキシフェンでは治療後上昇したが、hCG, hMG 投与例では低下傾向をみた (Fig. 2)。

血中プロラクチン値は 3 剤とも治療前後で大きな差はなく、改善例と非改善例との間にも差はなかった (Fig. 3)。

クエン酸クロミフェンおよびクエン酸タモキシフェンでは、血中テストステロン値の治療後の平均上昇率 ((治療後テストステロン値—治療前テストステロン値) $\times 100$ / 治療前テストステロン値) は、それぞれ改善例で 77 %および 64 %, 非改善例で 68 %および 45 %であり、改善例の上昇率が高い傾向を示したが、統計的有意差はなかった (Fig. 4)。

血中エストラジオール値は 3 剤とも治療後上昇し

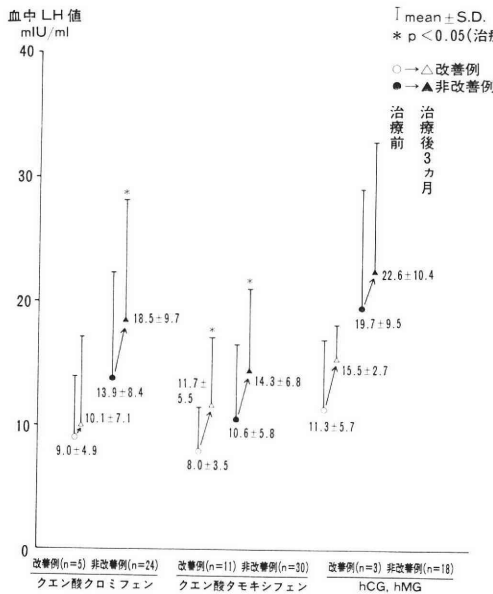


Fig. 1 治療効果と血中LH値の変動

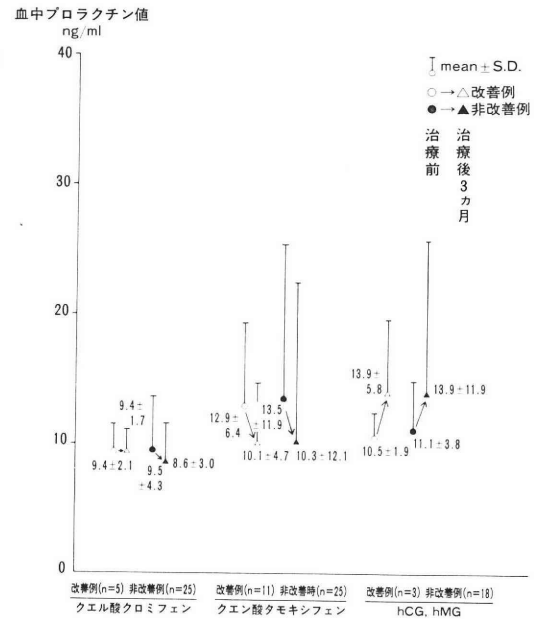


Fig. 3 治療効果と血中プロラクチン値の変動

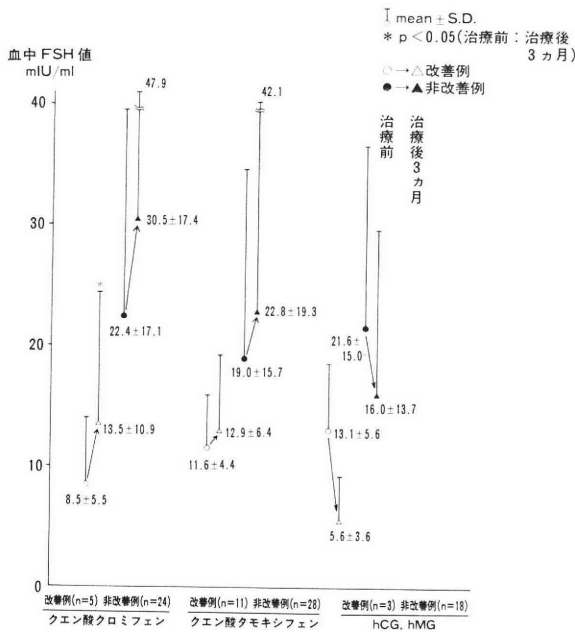


Fig. 2 治療効果と血中FSH値の変動

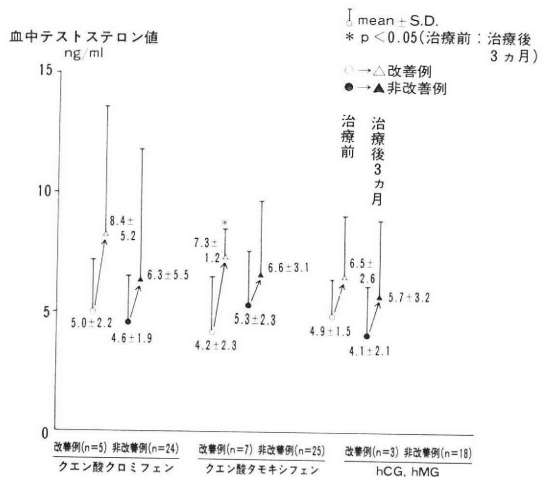


Fig. 4 治療効果と血中テストステロン値の変動

た、改善例と非改善例とに差をみなかった (Fig. 5).

考 按

特発性男子不妊症に対する内分泌療法の薬剤としてクエン酸クロミフェンは最も広く用いられている薬剤である。本剤は、非ステロイド性の抗エストロゲン剤であり、視床下部のレセプター部位にエスト

ロゲンあるいはアンドロゲンと競合して結合し、ネガティブフィードバック機構を阻害し、ゴナドトロピンの分泌を促す⁵⁾。この内因性のゴナドトロピンにより不妊症患者の睾丸を刺激する。本剤の投与量として1日100mgないしそれ以上を試みた報告もあるが⁶⁾、精子数の減少をみたとするものもあり⁷⁾、Paulson⁸⁾の1日25mgを25日間投与し、5日間休薬とする方法が広く実施されてきた。自験例は、ほぼそれに準じた方法で投与した。諸家の本剤による成績をみると、Paulson⁹⁾は、70%、Jonesら¹⁰⁾75%、Solerら¹¹⁾26.7%、Charny¹²⁾6.8%~10%と有効率に大きな開

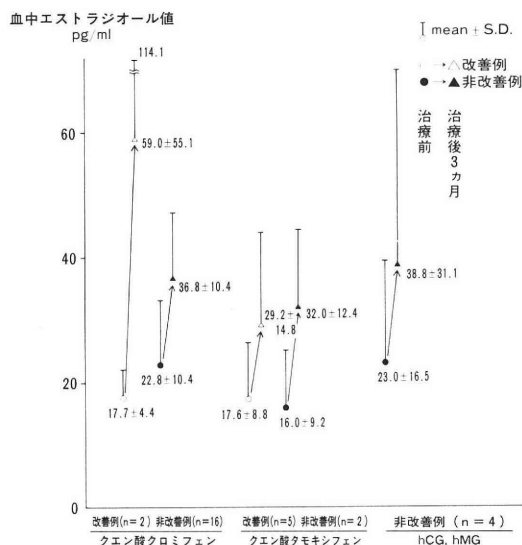


Fig. 5 治療効果と血中エストラジオール値の変動

きがある。これは対象症例や効果判定基準のちがいが一因であろう。自験例は、精子濃度の改善率が27%であった。なお以前、私もは、本剤25mgを1週間の休薬期間なしで投与したが²²⁾、ほぼ今回の治療成績と同様の結果であった。一方、Ansari ら¹³⁾、Jungck ら¹⁴⁾および小寺ら¹⁵⁾は、1～5mgの投与量で諸家による25mg投与の成績とその有効率に差がなく、リビド低下、めまい等の副作用もないことより、この少量投与を推奨している。この場合、ゴナドトロピンの上昇は軽度という。

今回の検討で、治療前LHおよびFSHの高値のもの、治療効果がよくなかったが、これらの例は、すでにゴナドトロピンが上昇しているので、本剤により、さらにゴナドトロピンの分泌を促しても効果が少ないものと考えられる。またこのような例は、造精機能の障害の程度が高度といえるので、その治療効果も不十分なのだろう。一方、血中テストステロン値が比較的低値でゴナドトロピンの上昇をみないものは、良好な成績を示したが、このような例は、造精機能の障害の一因がテストステロンの欠乏によるものだろう。

クエン酸クロミフェンには、それ自身にエストロゲン作用があり、また今回示されたように本剤投与によりエストラジオールが上昇する。エストラジオールはライデッヒ細胞に作用してLHによるテストステロンの産生を抑制する¹⁶⁾。またエストロゲンの増加は性ホルモン結合グロブリンの上昇を促し、活性型の遊離型テストステロンが減少する。これらは造精機能に悪い影響を及ぼすといえる。したがってク

エン酸クロミフェンと同様、非ステロイド性の抗エストロゲン剤であるが、エストロゲン作用のないクエン酸タモキシフェンないしエストロゲン作用の弱いシス型クロミフェン¹⁷⁾は、クエン酸クロミフェンより効果が期待される。

クエン酸タモキシフェンの治療成績は良好との報告があり、妊娠率は21～38%とされている¹⁸⁻²⁰⁾。自験例では、精子濃度の改善率28%、妊娠率4%と必ずしも、クエン酸クロミフェンのそれらを上回る成績ではなかった。最近、クエン酸タモキシフェンによるエストラジオールの増加を防止するためテストラクトンの併用が試みられた²¹⁾。これによりエストラジオール値の変動はみられなかったが、治療成績はクエン酸タモキシフェン単独投与と差がなかったという。

ゴナドトロピン投与による内分泌療法は、hCGないしhMGが用いられる。PMSGが試みられたこともあったが²²⁾、抗体産生のため現在では、ほとんど使用されてない。hCG、hMGそれぞれ単独療法の報告もあるが、造精機能にはテストステロンおよびFSHの両者が必要であるので、両剤の併用が望ましい。その場合、hCGは週3000～5000単位、hMGは、週150～225単位の投与量で25～50%のものが精液所見の改善をみたとされている²³⁾。自験例は、hCGは週2000単位、hMG週150単位を投与したが、改善例が少なかった。他2剤に比し、対象に治療前精液所見の悪いものが多かったことも一因と思われる。なおhCG、hMGの投与量、両剤の量的比率または投与方法には、検討の余地があるが、この点については、内因性のゴナドトロピンを高めるクエン酸クロミフェンおよびクエン酸タモキシフェンは、より生理的といえる。

特発性男子不妊症に対する内分泌療法の成績は必ずしも良好とはいえない。しかし非内分泌療法に比べ若干良好であるという意見が多い^{23,24)}。本療法の成績の向上のためには、薬剤の投与法の工夫等も必要であるが、すでにゴナドトロピンの上昇している例などを対象から除外するなど症例の選択も必要であろう。

結 語

特発性男子不妊症141例に対してクエン酸クロミフェン、クエン酸タモキシフェンおよびhCG、hMGを投与し以下の結果をえた。

1) 精子濃度の改善率はクエン酸クロミフェン、クエン酸タモキシフェンおよびhCG、hMG投与例で、それぞれ27%、28%および12%であり、精子運動

率のそれは、おのおの 16%, 22% ならびに 18% であった。hCG, hMG 投与例の成績は、前 2 者に比べて悪かった。

2) 3 剤とも治療前 LH ないし FSH が比較的低値のものに精液所見の改善をみたものが多かった。治療後テストステロン値の上昇の幅が大きいものが精子濃度の改善をみた。

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) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis, *Physiol. Rev.*, 51: 1, 1971
- 2) 角谷秀典, 川村健二, 伊藤晴夫, 島崎淳, 村上信乃: 特発性男子不妊症のホルモン療法, *日不妊会誌*, 30: 97, 1985
- 3) 布施秀樹, 高原正信, 石井弘之, 角谷秀典, 島崎淳: クエン酸タモキシフェンによる特発性男子不妊症の治療, *日不妊会誌*, 33: 671, 1988
- 4) 飯塚理八, 己斐秀豊, 高橋輝雄, 仁科進弘: 男性不妊に対する Vitamedin の効果, *臨婦*, 20: 41, 1966
- 5) Schellen, T. M. C. M.: Clomiphene treatment in male infertility, *Int. J. Fertil.*, 27: 136, 1982
- 6) Tyler, E. T., Winer, J., Gotlib, M., Olson, H. J. and Nakabayashi, N.: Effects of MRL-41 in human male and female fertility studies, *Clin. Res.*, 10: 119, 1962
- 7) Allag, I. S. and Alexander, N. J.: Clomiphene citrate therapy for male infertility, *Urology*, 14: 500, 1979
- 8) Paulson, D. F.: Clomiphene citrate in the management of male hypofertility: predictors for treatment selection, *Fertil. Steril.*, 28: 1266, 1977
- 9) Paulson, D. F.: Cortisone acetate versus clomiphene citrate in pregerminal idiopathic oligospermia, *J. Urol.*, 121: 432, 1979
- 10) Jones, T. M., Fang, V. S., Rosenfield, R. L. and Schoenberg, H. W.: Parameters of response to clomiphene citrate in oligospermic men, *J. Urol.*, 124: 53, 1980
- 11) Soler, R. A., Ibarz, S. L., Orus, J. V., Blanco, S. R., Castellano, L. J. M. and Rerde, J. C.: Treatment of male infertility with clomiphene citrate, *Med. Clin.*, 75: 284, 1980
- 12) Charny, C. W.: Clomiphene therapy in male infertility: a negative report, *Fertil. Steril.*, 32: 551, 1979
- 13) Ansari, A. H., Wieland, R. G. and Klein, D. E.: Cisclophene citrate in the management of oligospermia, *J. Urol.*, 108: 131, 1972
- 14) Jungck, E. C., Somnath-Roy, M. B. B. S., Greenblatt, R. B. and Mahesh, V. B.: Effect of

clomiphene citrate on spermatogenesis in the human, *Fertil. Steril.*, 15: 40, 1964

- 15) 小寺重行, 池本庸, 桂井清人, 稲葉善雄, 町田豊平: 特発性男子不妊症に対するクエン酸クロミフェン少量長期投与の治療成績, *日不妊会誌*, 28: 177, 1983
- 16) Kalla, N. R., Nisula, B. C., Merand, R., Loriaux, D. L.: The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis, *Endocrinology*, 106: 35, 1980
- 17) Sorbie, P. J. and Perez-Marrero, R.: The use of clomiphene citrate in male infertility, *J. Urol.*, 131: 425, 1984
- 18) Comhaire, F.: Treatment of oligospermia with tamoxifen, *Int. J. Fertil.*, 21: 232, 1976
- 19) Schill, W. B. and Landthaler, M.: Erfahrungen mit dem Antiöstrogen Tamoxifen zur Therapie der oligozoospermie, *Hautarzt.*, 32: 306, 1981
- 20) Bartsch, G. and Scheiber, K.: Tamoxifen treatment in oligozoospermia, *Eur. Urol.*, 7: 283, 1981
- 21) Maier, U. and Hienert, G.: Tamoxifen and testolactone in therapy of oligozoospermia: Results of a randomized study, *Eur. Urol.*, 14: 447, 1988
- 22) 長田尚夫, 井上武夫, 平野昭彦, 田中一成: PMSG 療法が有効であったと思われる男子不妊症の 1 例, *日不妊会誌*, 31: 165, 1977
- 23) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility, *Andrology*, 11: 77, 1979
- 24) Ross, L. S.: Diagnosis and treatment of infertile men: a clinical perspective, *J. Urol.*, 130: 847, 1983

Hormonal treatment to idiopathic male infertility

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

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

One hundred and forty-one patients of idiopathic male infertility were treated with hormonal drugs including clomiphene citrate, tamoxifen citrate, and combination of human chorionic gonadotropin (hCG) and human menopausal gonadotropin (hMG).

Sperm concentration was improved in 27%, 28% and 12%, respectively. The improvement in sperm motility were found in 16%, 22% and 18%, respectively. Five (9%), two (4%) and one patient (3%)

treated with respective drugs impregnated their wives after administration. Combination therapy of hCG and hMG showed worse result than the formers.

Patients with low basal plasma levels of LH or FSH tended to respond to the treatment of either clomiphene citrate or tamoxiphen citrate, with

concomitant increase of plasma testosterone. Infertile men with elevated LH and FSH did not improve semen quality. Therefore, candidate for treatment with hormonal drug might be selected by the level of LH and FSH.

(受付：1989 年 4 月 20 日)

冷蔵および凍結保存ハムスター卵 使用によるハムスターテスト

Human Sperm Penetration into Refrigerated or Frozen-thawed Zona-free Hamster Oocytes

福島県立医科大学産科婦人科学教室（主任：佐藤 章教授）

星 和 彦	渡 辺 清 彦	佐々木 宏 子
Kazuhiko HOSHI	Kiyohiko WATANABE	Hiroko SASAKI
鳴 瀬 淑	大 越 美 希 子	遠 藤 力
Shuku NARUSE	Mikiko OOKOSHI	Chikara ENDO
	佐 藤 章	
	Akira SATO	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan
(Director: Prof. A. Sato)

4℃冷蔵保存および-196℃凍結保存ハムスター卵を用いてハムスターテストを行ない、新鮮卵の場合と比較してその有効性を検討した。

1) 透明帯無処理の状態で24時間冷蔵保存した卵、48時間保存卵および72時間保存卵へのヒト精子侵入率は51%・7%・0%で、新鮮卵（control）の80%に比べ有意に低下していた。変性卵も高率に認められた。

2) 透明帯を除去して24時間冷蔵保存した卵および48時間保存卵への精子侵入率は39%・5%で、新鮮卵の85%に比べやはり有意に低下していた。

3) 一方、透明帯無処理の状態で凍結させた卵への精子侵入率は69.1%，また卵変性率は20.2%で、新鮮卵の75.8%・24.2%と差がみられなかった。

以上の成績から、冷蔵保存卵をハムスターテストに用いることは好ましくないが、凍結保存卵の利用は可能であると思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 182—187, 1990)

緒 言

透明帯を除去したハムスター卵にハムスター以外の哺乳動物の精子が侵入可能なことは、1972年にYanagimachiがモルモットの精子で初めて報告¹⁾して以来、多くの動物の精子でも確認されている。この異種動物間受精の発見が受精研究に寄与した功績は大きく、中でも「透明帯除去ハムスター卵へのヒ

ト精子侵入試験（以下ハムスターテストと略す）」はヒト精子の受精能もしくは妊孕能を確認するテストとして広く知られ、臨床的にも応用されている。

テストに用いる透明帯除去卵は、一般には成熟雌ゴールデンハムスターを過排卵処理してから得るため、少なくともテストする3日前からの準備が必要となる。そこで、もし随時使用が可能な卵の準備が出来ていればこのハムスターテストがさらに有

益になるものと考え、冷蔵保存および凍結保存ハムスター卵の応用を検討したのでその成績を報告する。

研究方法・材料

1. 研究方法の概略

冷蔵保存後37℃に戻したゴールデンハムスター卵および凍結保存後融解させた卵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状態を新鮮卵の場合(control)と比較検討した。

2. 透明帯除去ハムスター卵の作製

(1) 新鮮卵

体重90-150 gの成熟雌ゴールデンハムスターを使用した。性周期第1日にpregnant mare's serum (PMS) 30 international units (i. u.), 第3日にhuman chorionic gonadotropin (hCG) 30 i. u.をそれぞれ腹腔に注射して過排卵を起こさせ、hCG投与17時間後に開腹して卵管中から未受精卵を回収した。その卵を0.1% hyaluronidaseを含むmodified Biggers, Whitten and Whittingham's medium (mBWW)²⁾で15分間処理して卵丘細胞を分散除去した。次にmBWWで2回洗浄後0.1% trypsinを含むmBWWで3分間処理して透明帯を完全に溶解除去し、最後に新しいmBWWで3回洗浄して透明帯除去卵を作製した。

(2) 冷蔵保存卵

プラスチック製Petri皿に0.3% human serum albumin (HSA)を含むmBWW液を1-2 ml置き、その中に前述の方法で作製した卵丘細胞除去ハムスター卵(透明帯未処理)および透明帯除去卵を入れ、その上をミネラルオイルで覆いPetri皿毎4℃の冷蔵庫内で保存した。24-72時間後冷蔵庫から取り出し、透明帯除去卵は予め37℃に暖めておいたmBWWに移し30分間37℃の培養器内に静置した後実験に供した。透明帯未処理卵は同様の操作後0.1% trypsinで処理して透明帯除去卵にし、洗浄後実験に用いた。

(3) 凍結保存卵

0.1% hyaluronidaseにより卵丘細胞が取除かれたハムスター卵を、耐凍剤として1M dimethyl sulphoxide (DMSO)を含むTyrode's solution (3% bovine serum albumin: BSA)に移してストローに封入した。ストロー1本あたりの卵数は30-40個とし、封入後プログラムフリーザーで凍結させた。すなわち、室温から1℃/minで-6℃まで冷却し、-6℃で自動植氷後、0.3℃/minで緩慢凍結させ、-60℃で液体窒素中に投下して28-66日間保存した。融解は38℃の温湯にて急速に行なった。融解後、卵

をPetri皿内の0.3M sucroseあるいは0.3M trehalose中に投入し、その後mBWWを0.3-0.4 mlづつ2-3回に分け1分間隔で添加して耐凍剤を除去した。耐凍剤が除去された卵は0.1% trypsinで透明帯を溶解させ、mBWWで3回洗浄してハムスターテストに供した。凍結ハムスター卵の作製には日本農産工業株式会社の協力を得た。

3. 精子の準備

精液は健康成人男子から用手法にて得た。20分間室温に置くことにより十分液化させた精液に、0.3% HSAを含むmBWWで「精液静置法」³⁾を行ない、運動良好精子を集めた。

4. ハムスターテスト

0.3 mlのmBWW (3.5% HSAを含む)を3.5×1.0 cmのPetri皿に入れ、その上をミネラルオイルで覆う。培養液内に透明帯を除去された新鮮・冷蔵保存および凍結保存ハムスター卵と、mBWW (0.3% HSAを含む)の中で3時間前培養された精子を加え、37℃ 5% CO₂大気中で4時間培養した。最終精子濃度は $1-2 \times 10^7$ /mlになるように調節した。培養後、位相差顕微鏡下で観察して精子侵入の有無を調査した⁴⁾。鏡検時に、卵細胞質内が不透明で暗く、種々の顆粒が混在し、細胞外側縁が不明瞭なものは変性卵と記録した。

成 績

透明帯無処理(zona intact)のままで冷蔵保存した卵の場合は、24時間保存後で精子侵入率が51% (31/61)、48時間保存後で7% (7/97)を示し、72時間保存した後では侵入が認められない(0/8)。これらの値は新鮮卵(control)の80% (188/235)に比べると有意に低率であった。卵変性の割合は、control 18% (42/235)、24時間保存卵30% (18/61)、48時間保存卵97% (94/97)、72時間保存卵63% (5/8)で保存時間が長くなるほど増加しており、48時間以上では特に顕著だった(表1)。

透明帯除去卵(zona-free egg)の状態では24時間冷蔵保存した卵への精子侵入率は39% (13/33)、48時間保存卵へは5% (5/111)で両者ともcontrol 85% (141/165)に比べ有意に低率であるが、これらの値は透明帯無処理冷蔵保存と比較しても低値である。変性卵も24時間保存卵では48% (16/33)と約半数、48時間保存卵では100% (111/111)を占め、controlの25% (42/165)は勿論、透明帯無処理保存卵と比較してもかなり高率である(表2)。

凍結保存ハムスター卵へのヒト精子侵入率は69.1% (233/337)でcontrolの75.8% (201/265)

表 1 冷蔵 (4°C) 保存ハムスター卵へのヒト精子侵入

(1) 透明帯無処理卵 (zona intact eggs) の状態で保存した場合

冷蔵保存期間 (時間)	実験回数	実験に用いた 卵総数	精子侵入の認め られた卵数 (%)	平均侵入精子数	変性卵数 (%)
24	4	61	31(51) *	1.02	18(30) ***
48	3	97	7(7) *	0.10	94(97) *
72	1	8	0(0) *	0	5(63) *
0	8	235	188(80)	2.12	42(18)
control					

* P < 0.005

*** P < 0.05

表 2 冷蔵 (4°C) 保存ハムスター卵へのヒト精子侵入

(2) 透明帯除去卵 (zona free eggs) の状態で保存した場合

冷蔵保存期間 (時間)	実験回数	実験に用いた 卵総数	精子侵入の認め られた卵数 (%)	平均侵入精子数	変性卵数 (%)
24	3	33	13(39) *	0.67	16(48) **
48	3	111	5(5) *	0.05	111(100) *
0	6	165	141(85)	2.50	42(25)
control					

* P < 0.005

** P < 0.01

表 3 凍結保存ハムスター卵へのヒト精子侵入

透明帯除去 ハムスター卵の種類	実験回数	実験に用いた 卵総数	精子侵入の認め られた卵数 (%)	平均侵入精子数	変性卵数 (%)
凍結-融解卵	6	337	233(69.1) n.s.	2.09	68(20.2) n.s.
新鮮卵 (非凍結 controls)	6	265	201(75.8)	2.49	64(24.2)

n.s. = not significant

と大きな違いがなく、平均侵入精子数にも差がない (2.49:2.09)。また変性卵の割合は 20.2% (68/337) と 24.2% (64/265) でほとんど同様であった (表 3)。図 1 はヒト精子の侵入がみられた凍結融解後ハムスター卵の顕微鏡写真であるが、形態学的にも新鮮卵 (図 2) と変わらず、膨化した精子頭部の大きさも同じである。

考 察

1972 年に Yanagimachi が透明帯を除去したハムスター卵にモルモット精子が侵入可能なことを報告¹⁾して以来、同様の現象がマウス⁵⁻⁷⁾、シロアシネズミ⁸⁾、ラット⁵⁻⁷⁾、コウモリ⁹⁾、ウサギ⁸⁾、イルカ¹⁰⁾、ブタ¹¹⁻¹⁷⁾、

ウシ^{16,18,19)}、ヤギ²⁰⁾、ウマ¹⁹⁾、サル²¹⁾そしてヒト²²⁾と多くの哺乳動物の精子で確認されている。これら異種動物間でおこる *in vitro* の受精現象は受精のメカニズムを解明する研究手段として重要視されており、特に精子は採取できるものの卵の採取が困難な動物種にとっての意義は大きいと思われる。卵の使用が困難な代表的な動物はヒトであり、受精の基礎研究に用いられるほか、「透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入試験 (ハムスターテスト)」として精子の受精能検索のためにも臨床応用されている^{2,23-44)}。

ハムスターテストの準備・手技・判定などは決して難しいものではないが、臨床検査として用いる場合は卵が随時容易に入手出来る方が望ましい。そこ

で保存卵の有用性について検討を加えてみた。最も手軽な4℃の冷蔵保存は透明帯を付けた状態で24時間までであれば使用できないことはないが、精子侵入率において新鮮卵との差が大きく、ハムスターテストに利用することは好ましくないとされる。まして、透明帯除去卵にして保存した場合や48時間以上保存した時は変性卵の割合が高くなり、精子の侵入も生じなくなるため使用は不可能である。培養液のpHを調べてみると7.4から24時間後で8.0になっており、保存方法が単純なため培養液の性質が変化していくことが考えられ、これが卵変性の一因になっているようである。これに対し、凍結保存の場合は精子侵入率・平均侵入精子数そして卵変性率に関しても新鮮卵とかわりない良好なデータが得られている。凍結ハムスター卵の応用に関しては、Parkening & Chang⁴⁵⁾が-75℃での保存、Fleming et al⁴⁶⁾が-50℃の保存、そして-196℃についてはQuinn et al⁴⁷⁾の報告がみられる。-75℃保存でも、-50℃保存でも卵の回収(生存)率・受精率は良好であるとの成績が述べられているが、卵の大量保存やそれらの運搬の便を考えると、やはり液体窒素を用いる方が便利であり、どうしても-196℃保存について検討しなければならない。Quinn et alは-196℃保存に関する諸条件を調べ、以下の様な方法を推奨している。すなわち、透明帯は無処理のまま凍結すること。培養液は30mg/ml bovine serum albumin (BSA)を含むHepes-buffered Tyrode's medium (HT 6)、耐凍剤には2.0 M DMSOを用い、-80℃まで冷却後液体窒素に投入する。融解は緩慢法(8℃/min)、一段階希釈が好ましい。そしてこのような条件下で凍結・融解したとき卵の生存率は89%、ハムスターテストによる精子侵入率は45%でcontrolの42%より良好

であったと述べている。われわれの方法は、Quinn et alのとは多くの点で異なっているが、変性卵の出現率・ハムスターテストの成績はcontrolと差がなく、十分に利用は可能である。またQuinn et alは凍結・融解卵での雄性前核形成が新鮮卵に比べ遅れており、それは精子侵入の遅延に起因すると推測しているが、われわれの今回の検討では卵1個あたりの平均精子侵入数はcontrolとほぼ同数で(2.09:2.49)、膨化した頭部の大きさにも違いがみられず(図1, 図2)、精子侵入の開始に遅延があるとは考えられない。

ハムスターテストへの凍結卵の応用は、ハムスター卵の供給と運搬を容易にし、ハムスターの飼育が困難な実地臨床医療施設にとっては極めて有益であり、今後応用範囲が広がっていくものと期待される。(稿を終るに臨み凍結ハムスター卵の作製に協力をいただいた日本農産工業株式会社に深謝致します。)

文 献

- 1) Yanagimachi, R.: Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro, J. Reprod. Fertil., 28: 477, 1972
- 2) Overstreet, J. W., Yanagimachi, R., Katz, D. F., Hayashi, K. and Hanson, F. W.: Penetration of human spermatozoa into human zona pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients, Fertil. Steril., 33: 534, 1980
- 3) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 斎藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行なっている精液精置法"layering method"による精液中からの良好精子の分離, 日不妊会誌, 28: 101, 1983
- 4) 星 和彦, 斎藤 晃, 京野広一, 対木 章, 桃野耕太郎: ハムスター卵子を用いた精子の受精能検

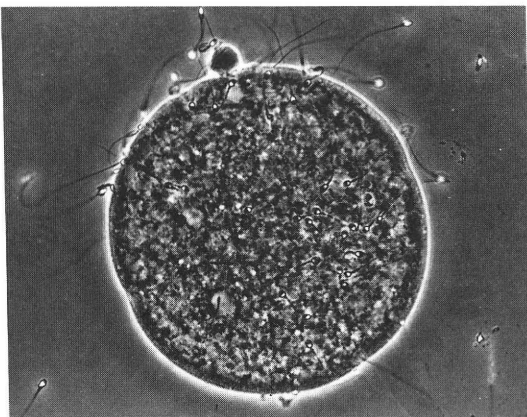


図1 ヒト精子侵入の認められる凍結保存融解後のハムスター卵 (x 400)

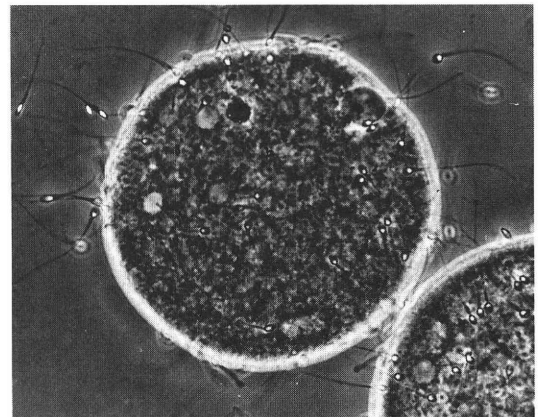


図2 ヒト精子侵入の認められる新鮮透明帯除去ハムスター卵 (x 400)

- 査, 細胞工学, 3: 595, 1984
- 5) Hanada, A. and Chang, M. C.: Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species, *Biol. Reprod.*, 6: 300, 1972
 - 6) Hanada, A. and Chang, M. C.: Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation, *J. Reprod. Fertil.*, 46: 239, 1976
 - 7) Pavlok, A.: Interspecies interaction of zona-free ova with spermatozoa in mouse, rat and hamster, *Anim. Reprod. Sci.*, 2: 395, 1979
 - 8) Hanada, A. and Chang, M. C.: Penetration of the zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro, *J. Exp. Zool.*, 203: 277, 1978
 - 9) Lambert, H.: Temperature dependence of capacitation in bat sperm monitored by zona-free hamster ova, *Gamete Res.*, 4: 525, 1981
 - 10) Fleming, A. D., Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H.: Spermatozoa of the atlantic bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, *J. Reprod. Fertil.*, 63: 509, 1981
 - 11) Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A.: Penetration in vitro of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.*, 51: 495, 1977
 - 12) Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A.: Time requirement for capacitation of boar spermatozoa assessed by their ability to penetrate the zona-free hamster egg, *J. Reprod. Fertil.*, 56: 489, 1979
 - 13) Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A.: Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs, *Biol. Reprod.*, 23: 481, 1980
 - 14) Pavlok, A.: Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro, *Int. J. Fertil.*, 26: 101, 1981
 - 15) Pavlok, A., Travník, P., Kopecny, V. and Stastna, J.: Fusion of hamster and pig zona-free eggs stimulated by boar and guinea pig sperm at fertilization *in vitro*, *Gamete Res.*, 6: 189, 1982
 - 16) Hanada, A. and Nagase, H.: Effects of sperm preincubation in rabbit uterus and imidazol on the penetration of zona-free hamster eggs by bull and boar spermatozoa *in vitro*, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27: 113, 1981
 - 17) Smith, M., Peterson, R. H. and Russell, L.: Penetration of zona-free hamster eggs by boar sperm treated with ionophore A23187 and inhibition of penetration by antiplasma membrane antibodies, *J. Exp. Zool.*, 225: 157, 1983
 - 18) Bousquet, D. and Brackett, B. G.: Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage, *Theriogenology*, 17: 199, 1982
 - 19) Brackett, B. G., Cofone, M. A., Boice, M. L. and Bousquet, D.: Use of zona-free hamster ova to assess fertilizing of bull and stallion, *Gamete Res.*, 5: 217, 1982
 - 20) Kim, C. I., Niwa, K., Imai, H. and Iritani, A.: Penetration of zona-free hamster eggs in vitro by goat spermatozoa preincubated in the reproductive tract isolated from a maturing gilt, *J. Exp. Zool.*, 213: 181, 1980
 - 21) Moore, H. D. M.: An assessment of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*), *Int. J. Androl.*, 4: 321, 1981
 - 22) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 15: 471, 1976
 - 23) Barros, C., Gonzales, J., Herrera, E. and Budtos-Obregon, E.: Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability, *Andrologia*, 11: 197, 1979
 - 24) Menge, A. C. and Black, C. S.: Effects of antisera on human sperm penetration of zona-free hamster ova, *Fertil. Steril.*, 32: 213, 1979
 - 25) Rogers, B. J., Van-Campen, H., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova, *Fertil. Steril.*, 32: 664, 1979
 - 26) Hall, J. L., Sloan, C. S. and Hammond, M. G.: Correlation of heterologous in vitro fertilization using human sperm and hamster ova with clinical evaluation of male infertility, *Fertil. Steril.*, 33: 238, 1980
 - 27) Hall, J. L.: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova, *Fertil. Steril.*, 35: 457, 1981
 - 28) Campana, A., Balerna, M., Nutini, L., Kaplan, E., Eppenberger, U. and Tomasi, F.: New parameters for selection of A. I. D. patient: Sperm acrosin content and hamster zona-free oocyte penetration, *INSERM*, 103: 281, 1981
 - 29) Karp, L. E., Williamson, R. A., Moore, D. E., Shy, K. K., Plymate, R. and Smith, W. D.: Sperm penetration assay: Useful test in evaluation of male fertility, *Obstet. Gynecol.*, 5: 620, 1981
 - 30) Pryor, J. P., Collins, W. P., Landon, G. and Tyler, J. P. P.: The clinical application of electron microscopy and the heterologous ova penetration test to the assessment of spermatozoa from infertile men, *Br. J. Urol.*, 53: 660, 1981
 - 31) Siddiquey, A. K. S.: Human/hamster *in-vitro* fertilization: A useful test for fertility status in

- male, INSERM, 103: 285, 1981
- 32) Tyler, J. P. P., Pryor, J. P. and Collins, W. P.: Heterologous ovum penetration by human spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.*, 63: 499, 1981
 - 33) Zausner-Guelmann, B., Blasco, L. and Wolf, D. P.: Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: A comparative study of proven fertile donors and infertile patients, *Fertil. Steril.*, 36: 771, 1981
 - 34) Aitken, R. J., Best, F. S., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O., Mortimer, D., Templeton, A. A. and Lees, M.: An analysis of sperm function in case of unexplained infertility: Conventional criteria, movement characteristic, and fertilizing capacity, *Fertil. Steril.*, 38: 212, 1982
 - 35) Aiteken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O. and Lees, M.: The correlates of fertilizing capacity of normal fertile men, *Fertil. Steril.*, 38: 68, 1982
 - 36) Aiteken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O., Templeton, A. and Lees, M. M.: An analysis of semen quality and sperm function in cases of oligozoospermia, *Fertil. Steril.*, 38: 705, 1982
 - 37) Cohen, J., Mooyaart, M., Vreeburg, J. T. M., Yanagimachi, R. and Zeilmaker, G. H.: Fertilizing ability and motility of spermatozoa from fertile and infertile men after exposure to heterologous seminal plasma, In Hafez, E. S. E., Semm, K. (eds): "Instrumental Insemination.", Martinus Nijhoff, 53, 1982
 - 38) Cohen, J., Webber, R. F. A., Van der Vijver, J. C. M. and Zeilmaker, G. H.: *In vitro* fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and prognostic value, *Fertil. Steril.*, 37: 565, 1982
 - 39) Hammond, M. G., Sloan, C. S. and Hall, J. L.: Application of interspecies *in vitro* fertilization in initial assessment of the infertile couple, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 142: 340, 1982
 - 40) Junca, A., Mandelbaum, J., Plachot, M. and De Grouchy, J.: Evaluation de la fecondance du sperme humain par la fecondation *in vitro* interspecific (hommehamster), *Ann. Gynecol.*, 25: 93, 1982
 - 41) Martin, R. H. and Taylor, P. J.: Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in the assessment of male fertility, *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 89: 951, 1982
 - 42) Albertsen, P. C., Chang, T. S. K., Vidiyich, D., Robinson, C. and Smyth, J. W.: A critical method of evaluating tests for male infertility, *J. Urol.*, 130: 467, 1983
 - 43) Margalioth, E. J., Laufer, N., Navot, D., Vosses, R. and Schenker, J. G.: Reduced fertilization ability of zona-free hamster ova by spermatozoa from male partners of normal infertile couples, *Arch. Androl.*, 10: 67, 1983
 - 44) Wickings, E. J., Freischem, C. W., Langer, K. and Nieschlag, E.: Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men, *J. Androl.*, 4: 261, 1983
 - 45) Parkening, T. A. and Chang, M. C.: Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs, *Biol. Reprod.*, 17: 527, 1977
 - 46) Fleming, A. D., Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H.: Fertilizability of cryopreserved zona-free hamster ova, *Gamete Res.*, 2: 357, 1979
 - 47) Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D. G.: Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 66: 161, 1982

Human sperm penetration into refrigerated or frozen- thawed zona-free hamster oocytes

Kazuhiko Hoshi, Kiyohiko Watanabe,
Hiroko Sasaki, Shuku Naruse,
Mikiko Ookoshi, Chikara Endo
and Akira Sato

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College,
Fukushima 960-12, Japan

We performed zona-free hamster oocyte penetration test (hamster test) using oocytes stored at 4°C or -196°C.

When hamster ova with and without their zonae pellucidae were stored at 4°C in mBWW medium containing 0.3% HSA for 24~72 hours, the penetration rates of human spermatozoa into these oocytes significantly decreased compared with that into fresh oocytes ($p < 0.005$).

While there was no difference in the penetration rate of human spermatozoa into frozen (69.1%) or fresh (75.8%) oocytes when a Tyrode solution containing 3% BSA and 1M DMSO was used as the freezing medium.

These results suggest that the oocytes stored at -196°C are suitable for hamster test, but those stored at 4°C are unsuitable. The use of frozen-thawed hamster ova provides a convenient way of supplying and transporting hamster oocytes for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa.

(受付: 1989年3月22日)

マウス胚の発育に及ぼす Fibronectin の影響

Effect of Fibronectin on the Development of Mouse Embryos

東邦大学医学部第2産婦人科学教室（主任：岩城 章教授）

千代倉 由 子

Yuko CHIYOKURA

2nd Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 153, Japan
(Director: Prof. A. Iwaki)

受精環境における fibronectin (FN) 発現の時期や胚に対する影響については、なお不明な点が多い。そこで、各濃度の FN を含んだ培養液を用いてマウス胚を培養し、胚における FN の発現時期を検索し、さらに正常月経周期婦人の低温期、排卵期、高温期での血液中 FN を測定し、興味ある成績を得た。

1) FN の添加濃度として 1～200 $\mu\text{g/ml}$ までの 8 段階に分け、各濃度で 24 時間培養したところ、5 $\mu\text{g/ml}$ 以下では 60 % の胚は 8-cell 以上となり特に異常を認めなかったが、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上ではほとんどの卵は発育の停止と変性が生じた。しかし、3 時間の FN 添加培養後 Brinster 培養液中に戻した卵の発生には異常が認められなかった。

2) Early blastocyst からでは FN 添加培養液の方が通常培養液と比較して発生促進がみられた。

3) 月経周期各ステージでの血漿 FN 濃度には変動が見られなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 188—194, 1990)

緒 言

Fibronectin (FN) は分子量 230,000 の大きな糖蛋白で、血漿 FN と細胞性 FN の 2 種類に分けられており、種々の生理活性作用をもち特に細胞性 FN は受精卵の発育や着床などに関与していると林ら¹⁾は述べている。

対木ら²⁾によると FN は卵胞の分化、成熟、維持に関係しており、さらに受精後の卵の中には著明な増加が認められるとしている。また、八日市谷ら^{3,4)}によると受精卵では FN は 2-cell stage より生成されており、卵管内通過の間は透明帯によりおおわれていると述べている。しかし、Wartiovaara et al.⁵⁾によると FN は受精後 4～5 日目より出現し始め、late blastocyst 以後は inner cell mass 内に認められるとしている。竹内ら⁶⁾は 2-cell から morula の間では FN の局在は全く見られず、early blastocyst から inner

cell mass 内に出現したという。また、*in vitro* で 2-cell から培養した blastocyst では FN が全く認められず、着床率も低いとしており、FN が着床現象において必要であると述べている。

今回、卵発育と FN の関係を調べるため培養液に各濃度の FN を加えて卵を培養し、興味ある成績を得たので報告する。

実験方法

DDY 系マウスに PMS 7.5 単位、さらに 48 時間後に HCG10 単位を腹腔内に投与して過排卵を誘起させた。交配後に陰栓を確認し、また、HCG 投与後より 24 時間後に 2-cell を、48 時間後、72 時間後および 96 時間後に各 4-cell、8-cell、morula、blastocyst を、卵管灌流法により採卵した。培養液としては Brinster 培養液（表 1）を用いた。

1. 酵素抗体法による FN の染色法

採卵した各 stage の卵細胞の透明帯を 10 % プロテアーゼを用いて除去し、Brinster 培養液で洗浄後、10 % ホルマリンにて固定し、ストラビジェン BSA-PO (M) (ビオチン、ストレプトアビジン-抗マウス Ig 抗体) 酵素抗体染色法により以下のごとく行なった。実体顕微鏡を用いホールグラス内で操作した。

①、 H_2O_2 1 滴添加し、5 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止する。

②、洗浄後、blocking reagent としてビオチン標識抗マウス Ig 抗体 (第 2 抗体) と同種の正常血清を添加し、5 分間 37°C にてインキュベートする。

③、洗浄後、マウスのモノクローナル FN 抗体 (第 1 抗体) を加える。この時 negative control として第 1 抗体と同種の正常血清を加え、両方を 37°C 30 分間インキュベートする。さらに、第 2 抗体を加え、37°C 5 分間反応させる。

④、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加し、37°C 5 分間反応させる。

⑤、AEC(3-amino-9-ethyl-carbazole) 反応にて発色させた後、培養液にて洗浄を行ない、検体を位相差顕微鏡を用いて FN の局在を観察した。

2. FN 添加培養液の作製ならびに実験法

今回実験に使用した FN は宝酒造株式会社より遺伝子工学手法を用い、大腸菌のドメイン組み換えにより産生されたヒト・フィブロネクチンフラグメント (HFN) であり、細胞接着ドメインを含む種々の鎖長のペプチドを産生させ精製したものである。HFN は、Brinster 培養液で溶解し、濃度は 0 (control)、1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、PH 7.2 に合わせた。

表 1 Brinster 培養液の組成 (g/dl)

NaCl	0.5546	Na pyruvate	0.0056
KCl	0.0356	Na lactate (liq)	0.2253
CaCl_2	0.0189	Glucose	0.1000
KH_2PO_4	0.0164	Bovine serum alb.	0.5000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0294	Streptomycin	0.0075
NaHCO_3	0.2106	Penicillin	0.0050

1) *in vitro* にて 2-cell より、HFN 添加培養液中で 24 時間培養し、卵の発生変化を観察した。

2) HFN 添加培養液中の卵に対する培養時間を 3 時間に短縮させて 24 時間培養と比較した。

3) *in vitro* にて、early blastocyst を HFN 添加培養液中にて 24 時間培養を行ない卵の発生を観察した。

3. 成熟婦人の血中 FN 値の測定

基礎体温を測定している月経周期正常な 20 歳から 27 歳までの成熟婦人の月経周期における各 stage (低温期、排卵期、高温期 7 日目頃) の血中 FN を測定した。測定方法としては、肘静脈より EDTA-2 Na 3 mg + トラジロール 1,000 単位入り容器にて血液を採取し、3,000 回転、10 分間遠沈分離を行ない、BMY 社の FN キットを用い、TIA 法により、FN + FN-Ab. $\rightarrow$ Ag-Ab. complex を作り、この複合体を紫外線濁度を利用し、波長 340 nm で Cobas 遠心式自動分析装置を用いて測定した。

実験成績

1. Brinster 培養液によるマウス胚の発生

1-cell 66 個よりは、表 2 のごとく morula まで 5 個 (7.6 %) が発育しており、また、2-cell では 98 個の内 19 個 (19.4 %) が morula まで発育した。4-cell 69 個の内 18 個 (26 %) が hatching まで発育したが、8-cell では 43 個の内 35 個 (81.4 %) が高率に hatch-

表 3 マウス胚における FN の出現について (酵素抗体法による)

胚の培養開始 時のステージ	In Vivo		In Vitro	
	染色胚数	出現	染色胚数	出現
1-cell	30	ND	20	ND
2-cell	60	ND	30	ND
4-cell	20	ND	20	ND
morula	30	ND	30	ND
early blastocyst	30	ND	30	ND
late blastocyst	30	ND	30	ND

ND: 検出不可能

表 2 Brinster 培養液におけるマウス胚の発生状況

胚の培養開始時 のステージ	培養胚数	培養胚の最終発生ステージ					
		2-cell	3-cell	4-cell	8-cell	morula	blastocyst hatching
1-cell	66	34	24	15	15	5	0
2-cell	98			47	21	19	0
4-cell	69				41	20	18
8-cell	43					37	35

表 4 Human Fibronectin (HFN) 添加培養液がマウス胚発生に及ぼす影響 (24時間培養)

HFN 濃度 (μg/ml)	胚の培養数	培養胚の最終発生ステージ			
		2-cell	4-cell	8-cell 以上	fragmentation
control	30	6	4	20	0
1.0	10	2	2	6	0
2.5	21	2	1	18	0
5.0	27	3	10	14	0
10.0	25	15	6	0	4
20.0	35	29	0		6
50.0	22	8	0		14
100.0	5	0			5
200.0	4	0			4

表 5 Human Fibronectin (HFN) 添加培養液によるマウス胚の発生に及ぼす影響 (3時間培養)

HFN 濃度 (μg/ml)	胚の培養数	培養胚の最終発生ステージ			
		2-cell	4-cell	8-cell 以上	fragmentation
control	25	3(12)	10(40)	10(40)	2(8)
2.5	17	3(17)	8(47)	6(35)	0(0)
12.5	13	1(8)	6(46)	5(38)	1(7)
50.0	16	1(6)	4(25)	7(43)	4(25)

() : 培養胚の最終発生%

表 6 Early blastocyst に対する Human Fibronectin (HFN) 添加培養液の影響 (24時間培養)

HFN 濃度 (μg/ml)	early blastocyst の培養数	培養胚の最終発生ステージ			
		early	expanded	hatching	fragmentation
control	31	6(19)	18(58)	5(16)	2(6)
5.0	33	0(0)	15(45)	16(48)	2(18)
10.0	40	2(5)	18(45)	18(45)	2(5)
20.0	33	2(6)	18(54)	10(30)	3(9)

() : 培養胚の最終発生%

表 7 Early blastocyst に対する Human Fibronectin (HFN) 添加培養液の影響 (3時間培養)

HFN 濃度 (μg/ml)	early blastocyst の培養数	培養胚の最終発生ステージ			
		early	expanded	hatching	fragmentation
control	23	1(5)	22(95)	0	0
5.0	24	2(8)	22(92)	0	0
10.0	36	4(11)	32(89)	0	0
20.0	26	2(8)	24(92)	0	0

() : 培養胚の最終発生%



写真1 マウスモノクローナル Fibronectin 抗体を用いて AEC 反応による発色させたマウス morula ($\times 200$)

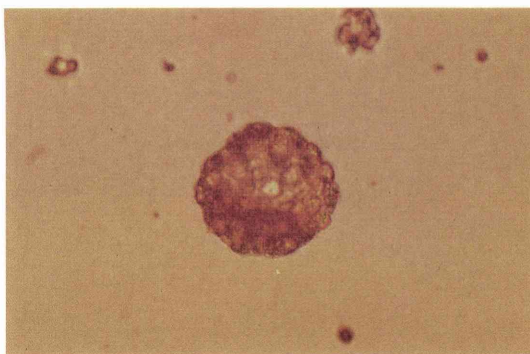


写真2 Negative control: マウスモノクローナル Fibronectin 抗体の代わりにマウス正常血清を用いて AEC 反応により発色させたマウス morula ($\times 200$)

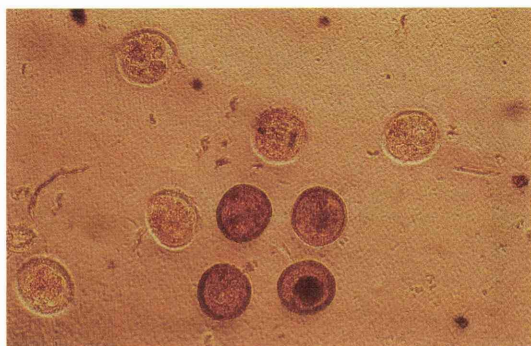


写真3 Human Fibronectin $10 \mu\text{g/ml}$ で 24 時間培養したマウス胚 ($\times 100$)
変性した 4 個の胚と発育停止した 5 個の胚が認められる。



写真4 Early blastocyst から Brinster 培養液による 24 時間後のマウス胚。良く発達した胞胚腔が見られる ($\times 100$)。



写真5 Human Fibronectin ($5 \mu\text{g/ml}$) を添加した Brinster 培養液中で early blastocyst を 24 時間培養した後に見られた hatching した胚。4 個に hatching 後の透明帯が見られる ($\times 100$)。



写真6 Early blastocyst から Human Fibronectin ($10 \mu\text{g/ml}$) の存在下で培養した 24 時間後のマウス胚 ($\times 100$)。
Expanded blastocyst と hatching 胚が見られる。

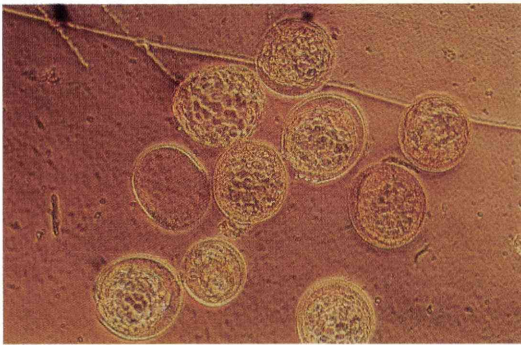


写真7 Early blastocyst から Human Fibronectin (20 $\mu\text{g/ml}$) を添加した培養液中で培養した 24 時間後のマウス胚 ($\times 100$). Expanded blastocyst と少数の hatching 胚が見られる。

ing まで発育した。この Brinster 培養液によるマウス胚の発育成績を control 群とする。

2. マウス初期胚における FN

2-cell から blastocyst の全ての段階において、*in vivo* および *in vitro* の両群ともに FN の出現はみられなかった(表 3)。なお、位相差顕微鏡により見られた状態を negative control と比較しても両者(写真 1, 2)とも、染色状態にほとんど差が認められず、また、位相差顕微鏡の微調整により、両者とも granular type を示し、あたかも FN が出現しているように見えるが、実際には FN は存在していないものと考えられた。

3. HFN 添加による胚の発生

a) 24 時間培養による影響

HFN 濃度を 1 $\mu\text{g/ml}$ から 200 $\mu\text{g/ml}$ までの 8 段階に分け、各濃度で 24 時間培養し卵の発生率を調べた。HFN 5 $\mu\text{g/ml}$ 以下では、約 60 % の胚が 8-cell 以上となり、その割合は control 群と有意差はなかった。しかし、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上ではほとんどの卵が発育を停止し、または、卵球が黒く萎縮し、卵の変性が生じた(表 4、写真 3；変性卵)。

b) 3 時間培養による影響

HFN 添加培養液で短時間(3 時間)培養を行ない、その後 Brinster 培養液に変えて培養したものでは、control 群と比べて濃度による影響は認められなかった(表 5)。

c) Early blastocyst に対する HFN 添加培養の影響

Early blastocyst から HFN 添加培養液で培養すると、HFN 濃度が初期胚に変性を起こす 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上でも変性を起こさず、促進的に作用して expanded

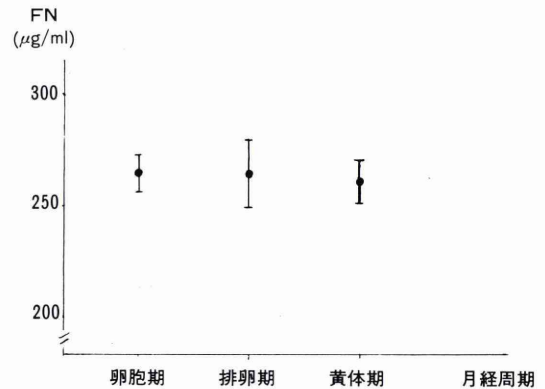


図1 正常婦人月経周期における FN の変動 (mean $\pm$ SE)

blastocyst, hatching まで成長した(表 6、写真 4 ~ 7)。

なお、写真 4 ~ 7 は、培養 24 時間後の卵の発育 stage を示す。

また、表 7 は、HFN 添加培養液で短時間(3 時間)培養した early blastocyst 群であるが、control 群との間に発生差は認められなかった。

4. 成熟婦人における plasma FN 値

基礎体温を付けている成熟婦人では低温期 264.5 $\pm$ 8.7 ($n=15$)、排卵期 265.1 $\pm$ 15.1 ($n=12$)、高温期 262.3 $\pm$ 9.6 $\mu\text{g/ml}$ ($n=12$) であり、月経周期における差は見られなかった(図 1)。

考 察

FN は卵の発生、分化、成熟、着床のすべての時期に重要な役割を果たしているとされ、FN の出現時期についてマウス胚で多くの研究が行なわれている。Wartiovaara et al. (1979)⁵⁾ は、間接蛍光抗体法を用いて late blastocyst 期にごく少量の FN が出現し始め、その後、着床時に egg cylinder 期になり初めて多量の FN が生じる事を報告している。八日市谷ら^{3,4)} は直接および間接免疫蛍光抗体法を用い、2-cell 期より FN が出現すると述べており、また、竹内ら⁶⁾ は酵素抗体法により early blastocyst の時期から生じると報告している。

このように FN の卵での出現時期については異なった報告が見られ、一定していない。今回、著者は酵素抗体法を使用し検討したところ、2-cell はもちろん late blastocyst 期にも FN は認められず、卵の FN は着床という現象にはあまり関与していないように思われた。しかし、FN は着床期に子宮内膜より産生

され、これが卵細胞表面の変化とあいまって両者の接着性が高まるのではないかと考えられる。

さらに、村木ら²⁾は Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) を用い、排卵前の卵胞液中にはかなりの FN が含まれており、また、受精卵は未受精卵に比較して多くの FN を含んでいると報告している。この事より、FN は着床現象というよりも、むしろ卵の発生に対して影響を及ぼしているのではないかと推測される。著者の研究では 2-cell から morula までの early stage においては、HFN 添加培養液の濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上になると発生促進作用は見られず、むしろ発育停止または変性作用が強く認められた。しかし、early blastocyst においては、HFN 添加培養液の方が、control 培養液と比較して発生促進が認められた。しかも、early stage において抑制作用が強かった 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも促進作用が顕著であった。

村木らは FN の添加濃度が 0.2 μM 以下では、early stage の卵に発生促進作用が認められたが、0.4 μM 以上では抑制作用が起こると述べており、また、この抑制効果は auto inhibitor (FN receptor への飽和結合作用) によると説明している。しかし、今回の著者の成績では、early stage と blastocyst stage において発生への影響に差があり、auto inhibitor のみでは説明ができない。Jenkinson et al.⁷⁾によると、blastocyst stage の細胞表面は、着床準備段階であり、表面の sialic (acylneuraminic) acid の減少がみられ、morula 以下と比較し細胞表面に大きな変化が生じると述べており、Ducibella et al.⁸⁾もランタン (放射線同位体) による追跡標識を行なった結果、morula から blastocyst への変化の過程で、各々の細胞表面結合能力に差が生じていると述べている。これらの報告から early stage の卵細胞と blastocyst では細胞表面に大きな変化があるのは確かであり、この性状の変化により、FN に対する反応も異なってくるのではないかと考える。また、卵割過程は状態が不安定で、FN の生理作用の一つである接着能により、過剰な FN がその表面に着くことで toxic な作用を被るのではないと思われる。さらに、細胞表面に FN が付着することで卵の分化、成長が物理的に抑えられてしまうことも考えられる。

今回使用した FN は、遺伝子工学的方法により産生したヒト FN で、その生成過程である大腸菌 [Human liver poly (A) RNA を転写させて産生させる] からの蛋白に不純物が生じ、これが toxic な作用を持つことも考えられる。一方、blastocyst になると、sialic acid の減少等により細胞表面の結合能に

変化が起き、FN の接着作用の低下が生じ、生理作用の一つと言われている細胞分化作用が強く働いて、blastocyst の発生促進を引き起こすのではないかと考えられる。ただこれらの変化は、全て FN 添加時間を 24 時間とした場合であり、もっと短時間の添加培養では、卵の発生には全く影響がなかった。

臨床的には平山ら⁹⁾によると妊娠時の FN 値は、非妊時に比べてやや高値を示すと報告している。そこで、今回は基礎体温をつけている成熟婦人の低温期、排卵期、高温期における plasma FN を調べたところ、特に各時期において FN 値には変動が認められなかった。このことより、plasma FN は、LH、FSH、Progesterone および E_2 等、月経周期に關与する性ホルモンの影響は受けないと考えられる。また、plasma FN は、卵細胞の変化に対してほとんど影響しないのではないかと推察される。

着床には、卵の産生する FN と子宮内膜の産生する FN の両者が重要な役割を果たしていると言われている^{9,10)}が、着床に關与する FN は、子宮内膜側からのものが主で、卵は細胞表面の成分変化により着床とかかわるのではないかと考えられる。著者の研究では FN の作用は、卵の表面の変化により抑制的にも促進的にも働くことが示唆された。今後、卵細胞表面のどのような変化が FN に作用していくかを検討していきたいと思う。

(本論文の要旨は、第 12 回アジア、オセアニア産婦人科学会にて発表した。稿を終わるに臨み、ご校閲を頂いた東邦大学医学部第 1 産婦人科教室百瀬和夫教授、恩師である同第 2 産婦人科教室岩城章教授に、また、直接ご指導頂いた同小倉久男助教授、さらに研究に多大なるご協力を頂いた日本大学農獣医学部佐藤嘉兵助教授、Human Fibronectin を提供していただいた、宝酒造株式会社に深甚なる謝意を表します。)

文 献

- 1) 林 正男, 平野英保: フィブロンネクチンの構造と機能, 蛋白 核酸酵素, 28: 169, 1983
- 2) Tsuike, A., Preyer, J. and Hung, T. T.: Fibronectin and glycosaminoglycans in human preovulatory follicular fluid and their correlation to follicular maturation, Human Repro., 3: 425, 1988
- 3) Yohkaichiya, T., Hoshiai, H., Uehara, S. and Yajima, A.: Fibronectin localization in the mouse embryo from the two cell stage to the blastocyst stage, J. Tohoku Exp. Med., 154: 95, 1988
- 4) Yohkaichiya, T., Hoshiai, H. and Yajima, A.:

Fibronectin localization in the mouse embryo from the blastocyst stage to the egg cylinder stage *in vitro*, J. Tohoku Exp. Med., 154: 261, 1988

- 5) Wartiovaara, J., Leivo, I. and Vaheri, A.: Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo, *Develop. Biol.*, 69: 247, 1979
- 6) 竹内一浩, 森 明人, 鶴木康資, 永田行博: マウス着床期胚におけるフィブロネクチン (FN) の意義と体外培養が胚の FN 出現に及ぼす影響について, 哺乳動物卵子研究会誌, 5: 105, 1988
- 7) Jenkinson, J. E. and Searle, F. R.: Cell surface changes on the mouse blastocyst at implantation, *J. Exp. Cell Res.*, 106: 386, 1977
- 8) Ducibella, T., Albertini, F. D., Anderson, E. and Biggers, D. J.: The preimplantation mammalian embryo; Characterization of intercellular junctions and their appearance during development, *Develop. Biol.*, 45: 231, 1975
- 9) 平山博章, 野島美知夫, 潮脇泰介, 多和田哲雄, 堤坂敏昭, 清田明憲, 奥山輝明, 古谷 博: 妊娠における血漿フィブロネクチンの動態に関する研究, 日産婦誌, 38 (suppl): 111, 1986
- 10) Armant, R. D., Kaplan, A. H. and Lennarz, J. W.: Fibronectin and laminin promote *in vitro* attachment and outgrowth of mouse blastocysts, *Develop. Biol.*, 116: 519, 1986
- 11) Kuusela, P., Ruoslahti, E., Engvall, E. and Vaheri, A.: Immunological interspecies cross-reactions of fibroblast surface antigen (Fibronectin), *J. Immun.*, 13: 639, 1976
- 12) Richa, J., Damsky, H. C., Buck, A. C., Knowles, B. B. and Solter, D.: Cell surface glycoproteins mediate compaction, trophoblast attachment and endoderm formation during early mouse development, *Develop. Biol.*, 108: 513, 1985

Effect of fibronectin on the development of mouse embryos

Yuko CHIYOKURA

2nd Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine,
Tokyo 153, Japan
(Director: Prof. A. Iwaki)

There are still obscure points regarding the effects and the time of appearance of fibronectin (FN) in the mouse embryo.

The development of mouse embryos was investigated using culture medium with several different levels of FN and the time of appearance of FN in the embryos was determined. Plasma FN levels in the proliferative, ovulatory and secretory phases of the menstrual cycle were also determined in normal women.

1) The culture medium with added FN (at eight concentrations from 1 $\mu\text{g/ml}$ to 200 $\mu\text{g/ml}$) was used to culture mouse embryos for 24 hours. Normal development of embryos occurred in culture medium with under 5 $\mu\text{g/ml}$ of FN because about 60 % of embryos developed until above the 8-cell stage.

With over 10 $\mu\text{g/ml}$ FN, almost all embryos ceased development and degenerated. Embryos showed normal growth after only three hours of culture.

2) Development was more rapid using culture medium with added FN than using control culture medium in the early blastocyst stage.

3) Plasma FN levels did not significantly differ throughout the menstrual cycle.

(受付: 1989 年 9 月 6 日特掲)

着床周辺期における prostaglandins の 役割に関する研究

A Study of Uterine and Endometrial Prostaglandins Synthesis, Binding and Specific Uptake during Periimplantation Period

日本大学医学部生化学教室

持 木 昭 人 中 川 滋 木
Akito MOCHIKI Shigeki NAKAGAWA

Department of Biochemistry, Nihon University
School of Medicine, Tokyo 173, Japan

日本大学医学部産科学婦人科学教室

高 橋 徹 坂 元 秀 樹 田 根 培
Toru TAKAHASHI Hideki SAKAMOTO Konbai DEN
高 木 繁 夫
Shigeo TAKAGI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nihon University School of Medicine, Tokyo 173, Japan

受精卵の着床に際しては、その受け入れ側である子宮内膜の逐次的変化が円滑に営まれることが重要である。本実験では prostaglandins (PGs) の関与について検討した。すなわち着床周辺期のラット・モデルを用い、子宮内膜組織中の PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ および PGI_2 の濃度、 PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の receptor (R) 量ならびにその特異的結合分布を測定した。また、cyclooxygenase 活性の推移から、同部における生成量をも併せて同時、定量的に求めた。その結果、受精卵の着床前には胞胚自身に相対する子宮内膜での局所的な PGs の生成・分泌が昂進し、次いで速やかに受精卵の着床部とその周辺部とで、それぞれ特異的な反応性の変化が起こることが認められた。したがって、胞胚の接着・定位、そして内膜の脱落膜化にはこれらの現象が段階的、選択的に機能し、その上で着床が完成するものと思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 195-202, 1990)

緒 言

受精卵の着床を受け入れ側の着床側から見ると、恐らくは、胞胚自身が出すシグナルに対応する内膜の反応態勢であろうと想像される。すなわち、未だ母体血行を介すること無く、子宮腔内液を介した胞胚との直接の係わりによる受け入れであろうと思わ

れる。受精卵の着床に際しては、一方で胞胚の透明体消失・接着と定位、他方で子宮内膜の血管透過性の昂進と脱落膜化とがあり、この2つの機序が共に円滑に行なわれて初めて着床が成立する。そしてこの間の同調性変化と引き続く妊娠の成立・維持には、いずれの段階においても、一連の内分泌因子が関与しているとされている。すなわち着床周辺期におい

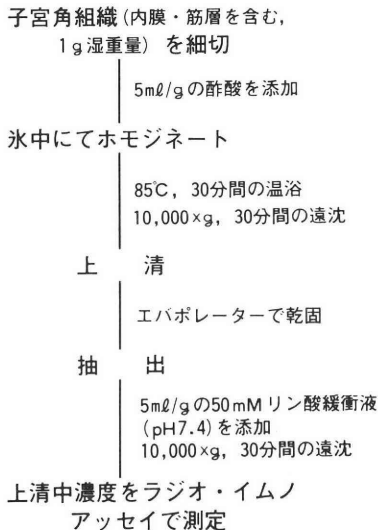
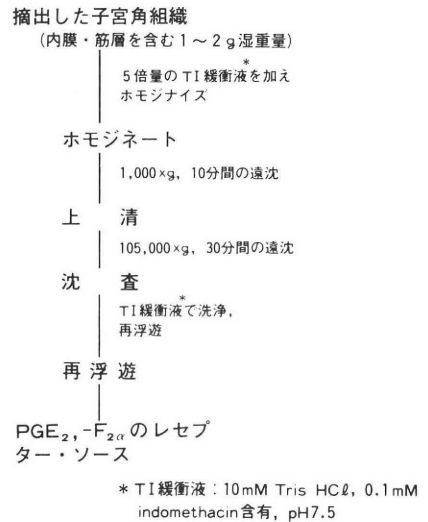
表1 子宮角組織中の prostaglandin E_2 , $F_{2\alpha}$ および 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の抽出操作

表2 Prostaglandins の receptor source の作製



ては、母体の下垂体・卵巣のみならず、子宮内膜細胞あるいは胎胚自身からのホルモン生成・分泌量、また脱落膜細動脈や胎胚腔液を含めた血液・体液あるいは組織局所のホルモン濃度が関与し機能していると考えられている。これら内分泌的な関連因子のうち、近年、prostaglandins (PGs), すなわち、PGE $_2$, PGF $_{2\alpha}$ あるいはPGI $_2$ などの関与が多角的に検討されて来ている。例えば、indomethacin (IND) 投与は、着床時の血管透過性や脱落膜化の阻害に加えて、着床そのもの、また胎胚の透明帯消失にも同様の阻害効果を示すことが明らかにされている¹⁾。そしてこの期間は子宮内膜・脱落膜での PGs 生成・分泌が旺盛であることや、胎胚自身に PGs 生成の可能性があることも示唆されている²⁾。

着床に際しての PGs 個々の動態、あるいは作用機序に関する知見は従来から比較的多く認められる。しかし着床現象そのものには、複数以上の PGs が互いに選択的かつ合目的に作用しあっているものと考えられる。さらに着床現象を内分泌系反応の立場から見た場合、上述したホルモン分泌量や濃度はもとより、それらに対応する着床側の子宮内膜における応答機能の態様も問題であり、考慮の対象となるはずである。著者らはこの観点から、ラット・モデルを用い、受精卵の着床前後における子宮内膜組織の PGs 濃度、receptor (R) 量をそれぞれ同時、経日的に求めた上、着床周辺期における相互の作用機序について検討した。

実験材料と方法

実験対象としては、妊娠第 0~9 日のウィスター系ラットを用いた。すなわち発情前期の当夜から翌日の間に交尾させ陰栓の形成を確認、これを妊娠第 0 日として起算した。その上で着床側の子宮角と非着床側の対側子宮角との動態を比較するため、以下の 2 系列の実験を行なった。すなわち、妊娠第 2 日にエーテル麻酔下に開腹して片側の卵管・子宮移行部を結紮、一旦閉腹し、第 5 日から第 9 日の間に順次再開腹、両側の子宮角を摘出した。可及的速やかに脂肪、結合組織を除去してから 1mm³以下に細切、その 1~2 g 湿重量を用いてまず、1) 表 1 に示した順序に従って抽出した組織中 PGE $_2$ 濃度を、PGE $_2$ ¹²⁵ I RIA Kit (New Engl. Nuclear), PGF $_{2\alpha}$ を³H-PGF $_{2\alpha}$ RIA Kit (Clinical Assay Co. Ltd.), PGI $_2$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ として)を 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ¹²⁵ I RIA Kit (New Engl. Nuclear)による radioimmunoassay (RIA) でそれぞれ測定した。次いで、2) その作製方法を表 2 に示した、receptor source を用いて PGF $_{2\alpha}$ -R 量の測定を行なった。すなわち、最終濃度 3mg/ml に調整した 100 μ l に 10×10³dpm, 100 μ l の PGF $_{2\alpha}$ [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H (N)] (150Ci/mmol) ならび PGE $_2$ [5, 6, 8, 11, 12, 14, 15-³H (N)] (170Ci/mmol, New Engl. Nuclear) と各純品の 100 μ l (1, 4, 10, 40ng) および TI 緩衝液 (10mM Tris HCl 0.1mM IND 含有, pH7.5) の 300 μ l を加え、

表3 子宮内膜における prostaglandin E₂, F_{2α} および indomethacin の特異的結合

妊娠第0～8日ラット

エーテル麻酔下を開腹

子宮腔ヘトレーサーを注入

100 μ Ci の ³H-PGE₂, F_{2α} および
インドメタシンをメチレン・フル
含有の乳酸加リンゲル液に
溶解

対側子宮腔ヘトレーサー, 純品を注入

100 μ Ci の ³H-PGE₂, F_{2α} および
インドメタシンと100倍量 (w/w)
の各純品

インキュベーション

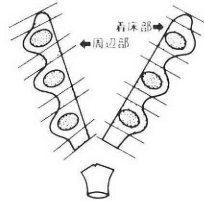
子宮角への循環維持下に15分間

両側子宮角摘出, 固定

10% パラフォルム・アルデヒド
で24時間

着床部と周辺部とを分割

実体顕微鏡下

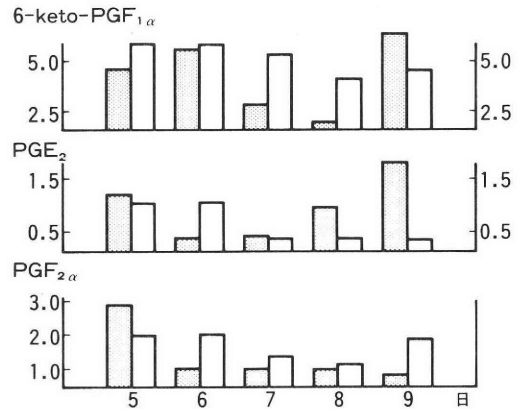


溶解, アイソトープ量測定

37°C, O₂/CO₂=95/5 気相下に 60 分間のインキュベートを行なった。次いで 25% polyethyleneglycol の 500 μ l を加えて氷水中に 10 分間静置し, その沈渣を IN NaOH の 500 μ l で溶解, 比放射能を測定した。なおこれらレセプター活性の指標としては, 解離定数 (dissociation constants, Kds), 結合部位数 (number of binding sites, NBS) を scatchard plot から算出して求めた。その際の蛋白濃度は通常 8 点とし, 原則的にはいずれも duplicate で測定, 数値は mean $\pm$ SD で表示, 各群の有意差検定は paired, unpaired Student's t test で行なった。

次に, 着床部とその周辺部とにおける PGs 結合および cyclooxygenase 活性の分布をみるため, 以下の 2 系列の実験を行なった。すなわちまず, 1) 妊娠第 6～9 日のラットについて, 表 3 に示したように, 実体顕微鏡下で分割した着床部と非着床部との組織中 PGs 濃度を上述と同様の抽出法, RIA で測定した。次いで, 2) 妊娠第 2～9 日の各ラットを開腹, 両側子宮の卵管側および子宮頸部側を結紮した上, 表 3 に示した操作順序に従って, PGE₂, PGF_{2α} および IND の特異的結合分布を測定した。なお摘出子宮は長軸方向に切開, 生理食塩水にて洗浄後に 10% 緩衝ホルマリン溶液中で室温, 24 時間の固定を行

着床側 vs. 非着床側



6-keto-PGF_{1α}: $p < 0.001$, 着床側の第 6 日 vs. 第 7 日および第 8 日 vs. 第 9 日, そして第 7 日, 第 8 日の着床側 vs. 非着床側

PGE₂: $p < 0.001$, 着床側の第 5 日 vs. 第 6 日および第 7 日 vs. 第 9 日, そして非着床側 第 6 日 vs. 第 7 日

PGF_{2α}: $p < 0.001$, 着床側の第 5 日 vs. 第 6 日

図1 着床側と非着床側との子宮角組織中における 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂ および PGF_{2α} 濃度 (ng/mg protein) の経日的推移

なった。着床部と周辺部とは実体顕微鏡下で分割, 濾紙上ににて余剰の水分を除去した。その湿重量を測定してから, 1ml の NCS (tissue solubilizer for liquid scintillation counting, Amersham Co, Ltd.) を加え, 70°C, 48 時間加温して組織を完全に溶解させた後, 10ml の econofluor (NEN Research Products) を加えて, それぞれの比放射能を測定した。最終的にグラム組織量等量に換算した後, ³H-PGs のみを注入した子宮角の値を総結合量 [A], 純品を同時に注入した反対側子宮角の値を [B] とし, $A - B = C$ を PGs の特異的結合として算定した。また IND の結合分布についても同様の方法で検討した。

実験成績

I. 着床側と非着床側との子宮角組織中における PGE₂, PGF_{2α} および 6-keto-PGF_{1α} 濃度の経日的推移 (図 1)

妊娠第 5～9 日の期間における子宮角組織中の immunoreactive PGs の濃度推移は以下のようであった。すなわち, PGE₂ 濃度はこの間ほぼ 0.4～1.8 ng/mg protein の間で変動するが (Ns=5), 着床側で第 5～6 日に $1.21 \pm 0.04 \sim 0.43 \pm 0.03$ と有意 ($P < 0.001$) に減少し, 第 7～9 日の間に $0.50 \pm 0.07 \sim 1.79 \pm 0.07$ と増加 ($P < 0.001$) する一方, 非着床側では第 6～7 日に $1.08 \pm 0.06 \sim 0.45 \pm 0.02$

と減少 ($P < 0.002$) し、以降はその濃度で推移する。PGF_{2α}濃度は $0.9 \sim 3.0 \text{ ng/mg protein}$ の範囲で変動し、着床側で第 5～6 日に $2.82 \pm 0.06 \sim 1.03 \pm 0.4$ と急減 ($P < 0.001$) し、以後その濃度に変化は無く、非着床側では第 7～8 日に $2.00 \pm 0.09 \sim 1.33 \pm 0.09$ と一過性の減少を見るのみである。

6-keto-PGF_{1α}濃度は $1.3 \sim 6.5 \text{ ng/mg protein}$ の範囲で変動し、着床側で第 6～7 日の間に $5.58 \pm 0.06 \sim 2.88 \pm 0.03$ と減少 ($P < 0.001$) する一方、非着床側では第 8 日： 4.15 ± 0.06 、第 6 日： 5.96 ± 0.04 であり、この間に推計学的な有意の変動は無い。

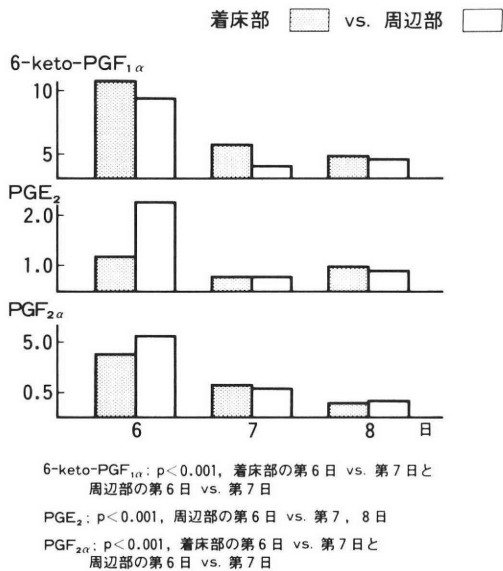


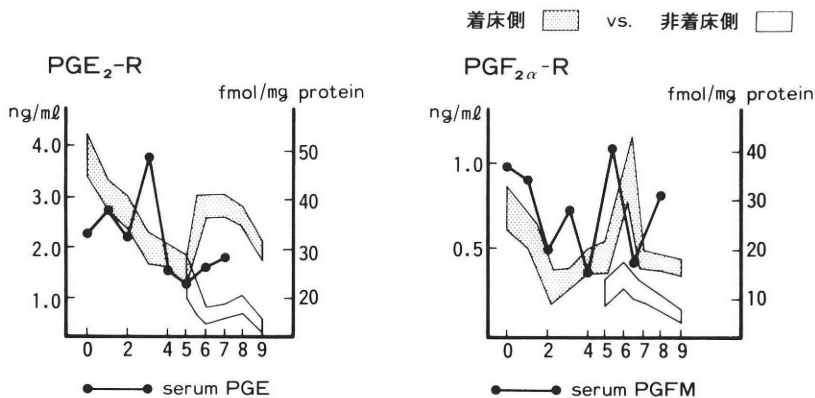
図 2 着床部とその周辺部における 6-keto-PGF_{1α} PGE₂および PGF_{2α}濃度 (ng/mg protein) の経日的推移

II. 着床部とその周辺部との組織中における PGE₂, PGF_{2α}および 6-keto-PGF_{1α}濃度の経日的推移(図 2)

着床部とその周辺部との PGE₂濃度はほぼ $0.6 \sim 2.2 \text{ ng/mg protein}$ の範囲にあり ($N_s=5$)、第 6 日の周辺部で 2.27 ± 0.10 と最も高く、第 7 日には 0.57 ± 0.07 と急減する。PGF_{2α}濃度は $0.5 \sim 5.2 \text{ ng/mg protein}$ の範囲にあり、第 6 日の周辺部で 5.25 ± 0.41 と最も高いが、第 7 日に 0.96 ± 0.07 と急減 ($P < 0.001$) し、着床部でもこの間 $1.94 \pm 0.26 \sim 1.00 \pm 0.08$ と減少 ($P < 0.02$) する。6-keto-PGF_{1α}濃度は $2.2 \sim 10.0 \text{ ng/mg protein}$ の範囲にあり、6 日の着床部： 10.70 ± 1.18 、周辺部： 9.18 ± 1.02 と共に高いが、第 7 日は 5.86 ± 0.37 , 2.22 ± 0.16 と急減 ($P < 0.002$, $P < 0.001$) する。

III. 着床側と非着床側との子宮角組織中における PGE₂-R, PGF_{2α}-R 量の経日的変動と推移 (図 3)

妊娠第 0～9 日の対照群ラットの子宮角組織中における PGE₂-R の Kds は $2.7 \pm 0.5 \text{ pM}$ 、NBS はほぼ $20 \sim 50 \text{ fmol/mg protein}$ の範囲で変動する ($N_s=5$)。第 0～2 日に $45.2 \pm 6.2 \sim 28.7 \pm 4.0$ と有意に減少 ($P < 0.01$) し、第 5 日に 20.3 ± 3.9 と最低値となるが、第 6 日には 31.2 ± 5.3 と増加 ($P < 0.01$) し、以後は同様濃度を維持し、第 9 日に低下する。一方、非着床側の PGE₂-R の NBS は第 5 日は着床側とはほぼ等しいが、第 6 日には 10.5 ± 3.3 対 31.2 ± 5.3 と解離して底値 ($P < 0.001$) となり、以後も同様である。この間、同時に測定した血漿中 PGE₂濃度はほぼ $0.10 \sim 3.0 \text{ ng/ml}$ の範囲で推移するが、第 3 日に 3.86 ± 0.60 とピークとなり、第 5 日には著減して 1.28 ± 0.34 となる。同一試料による PGF_{2α}-R の Kds



* PGE₂-R: $p < 0.001$, 第 6～9 日の着床側 vs. 非着床側
PGF_{2α}-R: $p < 0.001$, 第 6 日の着床側 vs. 非着床側

図 3 着床側とその対側 (非着床側) との子宮角組織中における PGE₂-, PGF_{2α} Receptor (R) 量の経日的推移

は $3.6 \pm 0.7 \text{ pM}$, また NBS は $14.0 \sim 40.0 \text{ fmol/mg protein}$ の範囲で変動するが, 第1日から減少し始め, 第2日には $27.2 \pm 2.3 \sim 14.6 \pm 5.3$ と底値 ($P < 0.01$) となる. 第4日に 21.3 ± 4.6 と再び増加 ($P < 0.02$) し, 第6日に 39.6 ± 5.0 とピークとなるが, 第7日には急減する. 一方, 非着床側では第5~9日まで $16.8 \pm 3.6 \sim 8.1 \pm 1.7$ と漸減し, この間いずれも着床側より低値となる. 血漿中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 濃度はこの間は $0.30 \sim 1.0 \text{ ng/ml}$ の範囲で推移し, 第3, 5日にそれぞれ $0.78 \pm 0.05, 1.05 \pm 0.09$ と2峰性の上昇を示す.

IV. 着床部とその周辺部とにおける $\text{PGE}_2, \text{PGF}_{2\alpha}$ および IND の特異的結合の分布 (図4)

上述した方法で得た着床, 周辺両部位の特異的結合の経日的な量的推移は, 図4に示すようになる. すなわち, PGE_2 の着床部の特異的結合は, ほぼ $50 \sim 350 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ 湿重量の範囲で推移する ($N_s=3$). 第2日には 315.2 ± 62.5 , 第4日には 356.3 ± 71.4 であり, 第5日には一時的に著減 ($P < 0.001$) して 53.5 ± 39.6 となるが, 第6日以降は再び増加傾向を示す. 他方, 周辺部でも第5日に 588.4 ± 112.4 と最も高く, 以後も着床部より常に高値となる. $\text{PGF}_{2\alpha}$ の

着床部における特異的結合はほぼ $10 \sim 290 \times 10^3 \text{ dpm/g}$ 湿重量の範囲で推移し, 第2~4日に $91.3 \pm 49.6 \sim 20.4 \pm 18.5$ と急減 ($P < 0.001$) し, 第5日には 293.1 ± 56.2 と急増 ($P < 0.001$) して最高値となるが, 第6日以降は減少する. 周辺部では第6~7日に $54.2 \pm 38.4 \sim 131.0 \pm 37.9$ と増加 ($P < 0.02$) し, また常に着床部より高値となる. 同様に比較, 検討した IND (いずれも $\times 10^3 \text{ dpm/g}$ 湿重量) は, 第4~5日に着床部で $74.2 \pm 33.4 \sim 614.2 \pm 124.7$, 周辺部で 549.3 ± 108.9 とこの間両部ともに著しく増加 (共に $P < 0.001$) し, 第6日には $269.2 \pm 57.3, 212.1 \pm 53.8$ と一様に半減, 第8日にはさらに著減する.

考 察

受精卵の着床を内分泌学的に見ると, 従来, 1) 循環する体液中ホルモン濃度の変化, 2) ギナトトロピンの直接作用³⁾, 3) 組織内の生成・代謝の昂進, 4) 胞胚からの生成・分泌⁴⁾, などが関与するとされている. しかし着床周辺期においてはむしろ, 子宮内膜・脱落膜の局所における一連の PGs 生成・分泌と, その場における PGs と標的臓器との直接的な結合反応が主となり, またそれらの態様が重要であろうと思われる. すなわち, 着床そのものを着床側の子宮内膜から見ると, 未だ母体血行を介することも無く, 単に子宮腔内液を介した胞胚との直接の係わり, 受け入れそのものに過ぎないと思われる.

著者らは今回の実験でまず, $\text{PGE}_2, \text{PGF}_{2\alpha}$ および PGI_2 の組織中濃度を同時に定量的に求めた. その結果は上述したように, 3者それぞれに極めて特異な動態を呈することが認められた. すなわち第1に, 着床側と非着床側との子宮角組織中における3者の濃度は両側ともに $\text{PGI}_2 > \text{PGF}_{2\alpha} > \text{PGE}_2$ の順であり, 着床側では $\text{PGE}_2, \text{PGF}_{2\alpha}$ が第6~7日に, PGI_2 が第7~8日に至り著減した. このうち $\text{PGE}_2, \text{PGI}_2$ は第9日に再び増加するが, その一方, 非着床側における変動は必ずしも明らかで無かった. 次いで第2に, 着床部とその周辺部との比較では, PGE_2 が周辺部で高く, $\text{PGF}_{2\alpha}, \text{PGI}_2$ は着床, 非着床部でともにほぼ等しかった. そして着床部では第6日の $\text{PGF}_{2\alpha}, \text{PGI}_2$ が高いが, 以後は急減し, この間の PGE_2 には変動が見られぬ一方, 周辺部では第6日に3者ともに一様に高く, 以後はやはり急減することが認められた.

この間の子宮内膜・脱落膜における PGs 生成・分泌の動態に関しては, 従来から比較的多くの知見が認められる. 例えば, 1) 卵巣摘出後の偽妊娠ラットにおける PGs の生成率は第5日にピークとなり,

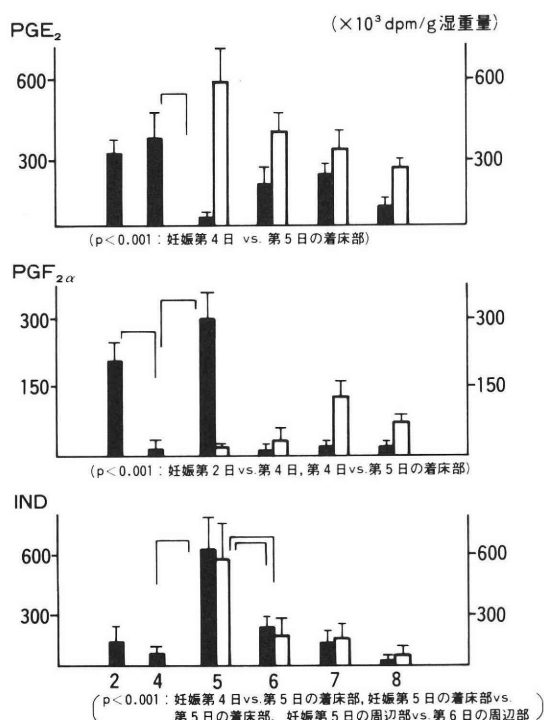


図4 着床部とその周辺部とにおける $\text{PGE}_2, \text{PGF}_{2\alpha}$ および Indomethacin (IND) の特異的結合分布の経日的推移

PGE₂で最も高く、また同一条件の妊娠ラットでは着床時点の第5日にPGE₂のみがピークとなる⁵⁾、2) 着床部とその周辺部とにおける産生率を比較すると、脱落膜化の著しい着床部に比べてむしろ周辺部で高く、PGE₂、PGF_{2α}ともに第6日の周辺部で高く、特にPGE₂で著しいが、第7日にはいずれも減少する⁶⁾などとされている。

さらに佐藤ら¹⁾は、この間のPGs生合成能についてマウス・モデルを用いて検討し、以下のような成績を報告している。すなわち、1) 子宮内膜における生成率はPGE₂>PGI₂>PGF_{2α}の順であり、いずれも着床直前の第4日で最も高く、着床後の第5日には既に減少し始め第7日には著減する、2) その生合成能は3者ともに周辺部で有意に高く、PGE₂>PGI₂>PGF_{2α}の順である、3) この間の子宮内膜を組織学的に見ると、第4～5日の着床時における着床部の脱落膜化は受精卵の近辺ほど著しいが、第6日にはその脱落膜化が周辺部よりむしろ軽度となる、などである。そして以上の成績を踏まえて、これらのPGs生成が着床後に一様に減少するのは、内膜の脱落膜化による変化に呼応したものであろうとしている。したがって、受精から着床に至る現象内では、上皮細胞と間質細胞とにおけるPGs生成率は順次異なり、この両細胞でそれぞれ選択的、合目的に作動しあっているものと思われる。

著者らは次に、子宮内膜におけるPGE₂、PGF_{2α}-R量を同様に求めた。この両者は膜レセプターであり、子宮内膜にも特異的レセプターが証明されている。すなわち、偽妊娠ラットの子宮内膜には第5日にPGE₂の特異的結合が出現し、第6日にピークとなるが、その結合率はprogesterone(P₄)依存性であり、PGE₂生成・分泌の場と同様に間質細胞に存在するとされている⁵⁾。今回の実験ではこの2つのPGs-Rについて、第1に着床側と非着床側との両子宮角における結合部位数を、第2に着床部とその周辺部との特異的結合の分布を、それぞれ比較・検討した。その結果は上述したように、着床側のPGE₂-R、PGF_{2α}-Rは両者ともに第5日までは漸減する傾向にあって低く、第6日に至り初めて増加して非着床側より高くなり、以後も同様となることが認められた。さらにまた、着床部と周辺部とにおける特異的結合は共に第5日に際立った動態を示した。すなわち、着床部でのPGE₂結合は第4日までは高いが、第5日に至り著減し、逆に周辺部での結合率は高く第5日以降もほぼ同様であった。その一方、PGF_{2α}は着床部で第4日に急減し、第5日にいっせいに増加するが、この間、周辺部では極めて低い結合率のままであった。したがっ

て、もし内膜の間質細胞の増殖や感受性の昂進がPGE₂-Rの出現をもって開始するとすれば、その変化は着床時点の妊娠第5～6日にあることになる。また同時に測定した血中PGE₂濃度は第3日に一過性に上昇し、PGF_{2α}濃度は第3、5日に高値となることから、この間、血中濃度とはいわゆる“down regulation”が行なわれている可能性も考えられる。

ところで、妊娠ラットへINDを投与すると、1) 妊娠第6日に見られる染色反応が遅延—内膜の血管透過性が低下する⁷⁾、2) 脱落膜化の遅延・阻害する⁸⁾、3) 妊娠初期の投与が着床そのものを遅延・阻害する、4) 胎胚再吸収による着床胎胚が減少する^{1,9)}、などの現象が見られるとされている。そしてこれらの処置後にPGE₂を子宮腔内へ追加投与すると、5) 血管透過性、脱落膜化さらに着床が回復する¹⁰⁾、6) しかし胎胚の間隔取りは乱れたままであり、透明帯消失も起こらない⁹⁾、ともされている。したがって、以上のPGsの組織中濃度やレセプター量に関する成績は、PGE₂、そして恐らくはPGI₂も、着床から脱落膜化の過程における胎胚—内膜の間の変化に、またPGF_{2α}は透明帯消失から接着・定位までの過程における胎胚自身および内膜に、それぞれ作用している可能性を示したものと受け取れる。

このことは着床部とその周辺部とにおけるINDの結合分布、すなわちcyclooxygenaseの活性分布が着床時には両部ではほぼ等しく著増し、またこの期間のPGE₂結合は周辺部、PGF_{2α}結合は着床部でそれぞれ高かった今回の成績からも十分に肯定し得よう。これらの現象は、局所性PGsが一方では胎胚の透明帯消失や間隔取りから接着・侵入まで、他方では着床部内膜の血管透過性の昂進から間質細胞の脱落膜化までの過程にそれぞれ関与し、その上で胎胚の着床態勢を整えていることを示唆したものと受け取れよう。

この間の機序に胎胚自身が関与するかどうかについては、現在なお一定の見解が得られていない。すなわち、1) マウスへのIND投与が透明帯消失を阻害する¹⁾、2) 胎胚にはestradiol(E₂)生合成系の酵素が存在する⁴⁾、とすれば、胎胚がPGs生成・分泌能を有する可能性がある。しかし、3) 胎胚は単に上皮細胞におけるPGs生成を刺激するのみであり、間質細胞内のPGs-Rに直接関与することはない¹¹⁾、4) 受精卵の着床後は着床部におけるPGs産生率が低下する⁹⁾、5) 妊娠第5日のラットのPGs産生量は偽妊娠ラットよりも低く、胎胚の存在は却ってPGs産生を阻害している可能性がある⁷⁾、とすれば、ラットやマウスなどの種族では着床前の胎胚がPGs生成

能を有することには疑問が残る。今後検討されるべき課題であろう。

著者らが今回の実験で用いたラット、マウスなどは、家兎、モルモットなどの動物種族とは異なり、その受精卵の着床に際しては性ステロイドの P_4 と併せて E_2 を必須の内分泌因子としている。因みに、 P_4 と E_2 とを同時に投与した後のphospholipase A_2 活性ならびにPGs産生率は、 P_4 単独投与のそれと比較し、両者ともに有意に高いとされている¹²⁾。そしてまた妊娠第2日のラットに E_2 生成阻害剤のtamoxifenを投与すると、通常は妊娠第5日に認められるPGs産生の増加が制御されるとされている⁷⁾。したがって、 E_2 は主要なPGs生成系の酵素であるphospholipase A_2 、cyclooxygenase活性をともに刺激してPGs産生・放出を促進し、その効果は P_4 との共働下で一層増強することになる。また前述したように、 PGE_2 -Rは P_4 依存性である。すなわち、偽妊娠ラットの第5日の血中 P_4 濃度のピークと PGE_2 -R量の増加の時期とが一致し、IND投与は逆に第6～9日の血中 P_4 濃度を低下させるとされている⁷⁾。

さらに血中 E_2 、 P_4 濃度の増加に伴って核内 E_2 、 P_4 -R (E_2 RN, P_4 RN) 量が増加することも認められている^{3,13)}。したがって以上の事実、血中 E_2 、 P_4 濃度の増加に伴う E_2 RN, P_4 RN量の増加に引き続いて、PGsとそのレセプターとの結合反応が誘導され昂進して来る可能性を強く示唆するものと思われる。しかしラット子宮内膜には $PGF_{2\alpha}$ -Rが同定されないが、 $PGF_{2\alpha}$ の投与によって血管透過性や脱落膜化は昂進し、逆にIND投与によって改善する¹⁴⁾、などの報告も認められる。

そのため、胞胚あるいは内膜におけるPGsの生成・代謝の経路には依然として未解決の部分が存在することも否定出来ない。例えば $PGF_{2\alpha}$ が9-hydroxydehydrogenase, 9-keto-reductaseなどの特異的酵素によって PGE_2 に変換され PGE_2 として作用する可能性がある¹⁰⁾、とした場合、 $PGF_{2\alpha}$ そのものの生成・作用機序についてもさらに検討の余地があるかもしれない。

以上のレセプター動態に加えて上述した生成・分泌の動態を併せて考察すると、本実験を以下のように結論し得るものと思われる。すなわち、ラットの受精卵の着床に際しては、恐らく、 E_2 、 P_4 などの性ステロイドとそのレセプターとの結合反応が起こり、これに引き続いて子宮内膜あるいは胞胚でPGsが生成され、着床部内膜におけるPGs-Rの反応性の昂進を見ることになるのであろう。そしてその結果、PGsの作用が胞胚の接着・侵入に際しての内膜の受け入

れ準備とその変化に対応するべく指向していくものと思われる。

しかし以上の子宮内膜に見る生物学的な現象は、着床に際して上皮細胞と間質細胞とにおける段階的な制御機構内においては、当然、異なっているものと思われる。すなわち、極めて限られた着床周辺期の間に上皮細胞では胞胚の接着・定位、次いで間質細胞では接着後の脱落膜化にと、選択的で合目的な作用が営まれていることを示したものと受け取れる。

本論文の要旨は、第30回日本不妊学会総会(1985年)、第38回日本産科婦人科学会・学術講演会(1986年)、ならびに第7回日本受精着床学会(1989年)においてそれぞれ発表した。

文 献

- 1) 佐藤和雄, 木下勝之, 堤 治, 石原 理, 矢野 哲, 坂元正一: 受精・着床とPG. 生殖生理とプロスタグランディン (佐藤和雄編): p 113, 現代医療社, 1985
- 2) Kasamo, M., Ishikawa, M., Yamashita, K., Sengoku, K. and Simizu, T.: Possible role of prostaglandin F in blastocyst implantation, Prostaglandins, 31: 321, 1986
- 3) Kreitmann-Gimbal, B., Bayard, F. and Hodgen, G. D.: Changing ratios of nuclear estrone to estradiol binding in endometrium at implantation: Regulation by chorionic gonadotropin and progesterone during rescue of the primate corpus luteum, J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 133, 1981
- 4) Puri, R. K. and Roy, S. K.: Estradiol receptors in embryonic and inter-embryonic segments of uterus of the rabbit during implantation, Ind. J. Exp. Biol., 19: 26, 1981
- 5) Kennedy, T. G., Martel, D. and Psychoyos, A.: Endometrial prostaglandin E_2 binding: Characterization in rats sensitized for the decidual cell reaction and changes during pseudopregnancy, Biol. Reprod., 29: 556, 1983
- 6) 田 根 培, 高橋 徹, 佐藤信義, 中川真一, 鈴木英夫, 坂元秀樹, 高木繁夫: レセプター・レベルよりみた着床およびその周辺期—ステロイドとプロスタグランディンについて, 産婦の世界, 38: 269, 1986
- 7) Phillips, C. A. and Poyser, N. L.: Studies on the involvement of prostaglandins in implantation in the rat, J. Reprod. Fert., 62: 73, 1981
- 8) Sananes, N., Baulieu, E. E. and Goascogne, C. L.: Prostaglandin as inductive factor of decidualization in the rat uterus, Mol. Cell. Endocr., 6: 153, 1976
- 9) 木下勝之, 佐藤和雄, 坂元正一: 着床のホルモン

調節, 産と婦, 54: 1257, 1987

- 10) Kennedy, T. G. and Doktorick, P. E.: Effects of analogues of prostaglandin E_2 and F_{2a} on the decidual cell reaction in the rat, Prostaglandins, 35:207, 1988
- 11) Kennedy, T. G., Martel, D. and Psychoyos, A.: Endometrial prostaglandin E_2 binding during the estrous cycle and its hormonal control in ovariectomized rats, Biol. Reprod., 29: 565, 1983
- 12) Pakrasi, P. L. and Dey, S. K.: Blastocyst is the source of prostaglandins in the implantation site in the rabbit, Prostaglandins, 24: 73, 1982
- 13) Logeat, F., Sartor, P., Vu-Hai, M. T. and Milgrom, E.: Local effect of the blastocyst on estrogen and progesterone receptor in the rat endometrium, Science, 207: 1083, 1980
- 14) El-Banna, A. A.: The degenerative effect on rabbit implantation sites by indomethacin, I. timing of indomethacin action, possible effect on uterine proteins and the effect of replacement doses of PGF_{2a} , Prostaglandins, 30: 558, 1980

A study of uterine and endometrial prostaglandins synthesis, binding and specific uptake during periimplantation period

Akito Mochiki and Shigeki Nakagawa

Department of Biochemistry,
Nihon University School of Medicine,
Tokyo 173, Japan

Toru Takahashi, Hideki Sakamoto,
Konbair Den and Shigeo Takagi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nihon University School of Medicine

For a successful implantation, it is indispensable that both endometrial as well as embryonal factors to synchronize in a serial manner. Among these factors, prostaglandins (PGs) appear to play important roles because indomethacin (IND) can inhibit the process of implantation in laboratory animals. In the present study, animals were operated immediately after conception and unilateral tube was ligated. The unilaterally implanted rats were used to study tissue concentrations of PGs, their receptor (R) distribution and tissue IND binding in the implanted and nonimplanted horn. The results showed; 1). In implanted horn, PGE_2 concentrations changed from 1.21 ± 0.04 to 0.43 ± 0.03 ng/mg protein between day 5 and 6 of post conception (PC) but increased from 0.50 ± 0.07 to 1.79 ± 0.07 between day 7 and 9 PC. On the other hand, there was only decrease in nonimplanted horn. 2). PGF_{2a} showed continuous decrease in both implanted and nonimplanted site; 2.82 ± 0.06 to 1.03 ± 0.04 ng/mg protein in implanted site, 2.00 ± 0.09 to 1.33 ± 0.09 in nonimplanted site. 3). 6-keto- PGF_{1a} showed significant decrease in implanted site from 5.58 ± 0.06 to 2.88 ± 0.03 ng/mg protein, whereas no change was observed in nonimplanted site. 4). Both PGE_2 - and PGF_{2a} -R showed significant increase in implanted site, but significant decrease in nonimplanted site. 5). *In vivo* saturable uptake of PGs and IND showed higher uptake in implanted site in PGs but not in IND.

These observations suggest that there exist regional changes in PGs tissue concentrations and their binding sites. Since the profile in implanted and nonimplanted horn differed significantly, these differences may reflect functional roles of PGs in successful completion of implantation phenomenon.

(受付: 1989年7月11日特掲)

マストミスにおける卵巣間質腺細胞の 微細構造と組織化学的特徴

Ultrastructural and Histochemical Characteristics of Interstitial Gland Cells in the Mastomys, Praomys Natalensis

新潟大学農学部畜産学科

新 村 末 雄 石 田 一 夫
Sueo NIIMURA Kazuo ISHIDA

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Niigata University, Niigata 950-21, Japan

生後20日から120日までのマストミスの卵巣について、間質腺の微細構造を電顕的に、脂質の性質と含量、ならびに $\Delta^5-3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ($\Delta^5-3\beta$ -HSD) 活性を組織化学的に調べた。

一次間質腺は生後20日と30日のマストミスの卵巣に、また二次間質腺は生後30日以降のマストミス卵巣にみられたが、これらの間質腺の細胞は、小胞状の滑面小胞体、管状クリステをもつミトコンドリア、発達したゴルジ装置などを含んでおり、dehydroepiandrosteroneを基質にした $\Delta^5-3\beta$ -HSDの活性を示した。これらのことから、間質腺はステロイドの生合成と分泌を行っていることが推察できるが、 $\Delta^5-3\beta$ -HSD活性から判断するとステロイド合成能は一次間質腺より二次間質腺のほうが高いように思われる。

一次間質腺に含まれる脂質は類脂質とコレステロールからなっており、二次間質腺の脂質はこのほかに中性脂肪を含有していた。これらの脂質の含量は一次間質腺より二次間質腺のほうが著しく多かった。なお、マストミスの間質腺では、高級脂肪酸を含まないことが他のゲッ歯類の間質腺と異なる点であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 203-208, 1990)

緒 言

間質腺は食肉類、翼手類、ゲッ歯類、ウサギ類およびヒトの卵巣に存在し、動物種の間で発達の程度が異なるといわれている¹⁾。これらの動物の間質腺はコレステロールとそのエステル、トリグリセリドおよびリン脂質を多量に含んでいることが調べられている^{2,3)}。また、間質腺細胞は滑面小胞体が多く、ミトコンドリアは管状クリステをもっており、ゴルジ装置が発達しているなど、ステロイド分泌細胞の微細構造上の特徴を備えている²⁾。また、間質腺はアン

ドロジェン、エストロジェンおよびプロジェスタジェンを分泌していることが生化学的に調べられており⁴⁻¹⁴⁾、ステロイド合成に関与している各種のhydroxysteroid dehydrogenase (HSD) の活性も組織化学的に検出されているが¹⁵⁻²⁰⁾、間質腺から分泌されるステロイドの生理的役割については不明の点が多い。

マストミス (*Praomys natalensis*) は、ペストや寄生虫の感染実験²¹⁾および腺胃や皮膚の腫瘍研究^{22,23)}に主として用いられているゲッ歯類であるが、雌にも前立腺があることから²⁴⁾、前立腺の内分泌支配についての研究分野でも注目を集めている実験動物であ

る^{25,26)}。最近、新村ら²⁷⁾はマストミス卵巣の生後発達を観察しているが、一次および二次間質腺はそれぞれ生後 12 日および 29 日に出現し、いずれも出現後の発達が著しいことを報告した。

本実験は、生後 20 日から 120 日までのマストミスの卵巣にみられる一次間質腺と二次間質腺について、細胞の微細構造を電顕的に観察し、脂質の性質と含量、ならびに $\Delta^5-3\beta$ -HSD 活性を組織化学的に調べ、他のゲッ歯類の間質腺と比較したものである。

材料および方法

供試動物として生後 20 日から 120 日までのマストミス (*Praomys natalensis*) 35 匹を使用した。すなわち、生後 20 日、30 日、40 日、50 日、60 日、90 日および 120 日に、それぞれ 5 匹のマストミスから両側の卵巣を採取した。採取した左側卵巣の半分は、微細構造を観察するために、4%グルタルアルデヒドと 2%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に 4°C で 6 時間、前固定した。ついで、0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を数回交換しつつ一晩洗浄したのち、1%四酸化オスミウムを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に 4°C で 3 時間、後固定した。脱水はアセトン上昇系列で行い、包埋はエポン 812 で行った。超薄切片の電子染

色はウランと鉛で行い、写真撮影は JEM-100B 型電子顕微鏡で行った。

左側卵巣の残り半分は、ドライアイス・アセトンで凍結してクリオスタット切片を作製し、HSD 活性検出のために用いた。観察した HSD は、dehydroepiandrosterone (DHA) を基質にした $\Delta^5-3\beta$ -HSD で、基質液は Dickmann and Dey の使用した処方²⁸⁾に準じて作製した。クリオスタット切片の基質液への浸漬は、37°C で 1 時間行った。また、 $\Delta^5-3\beta$ -HSD の反応は NADH_2 脱水素酵素 ($\text{NADH}_2\text{-DH}$) の反応に依存しているの、この酵素の検出を Barka and Anderson の方法²⁹⁾に従って行った。 $\Delta^5-3\beta$ -HSD および $\text{NADH}_2\text{-DH}$ の活性の検出にあたり、いずれも基質を含まない液に浸漬した切片を対照として用いた。

右側卵巣は脂質検出のために用いた。すなわち、半分は 10%中性ホルマリン緩衝液 (pH 7.0) で固定し、ゼラチンに包埋した。氷結切片作製後、スダンブラック B およびスダン IV 脂質一般染色³⁰⁾、ナイルブルースルフェート中性脂肪染色³⁰⁾、Schultz コレステリン反応³⁰⁾および岡本らの高級脂肪酸染色³⁰⁾を施した。右側卵巣の残り半分は Ciaccio 法³⁰⁾に従って類脂質の検出にあてた。

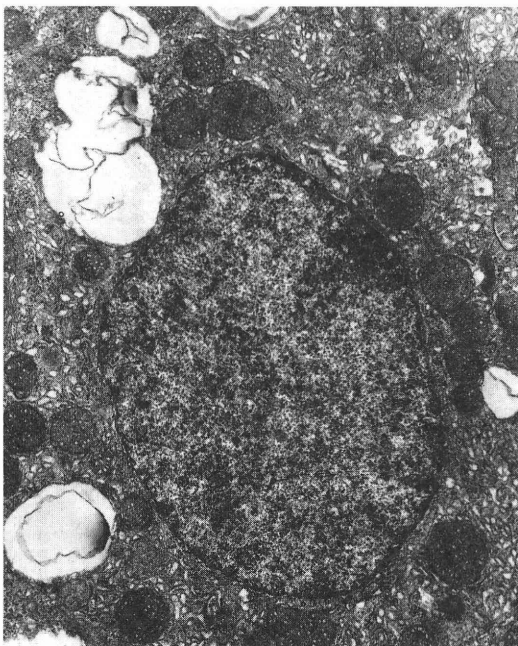


Fig. 1 Ultrastructure of a primary interstitial gland cell from an ovary of a 20-day-old mastomys. x 7500.

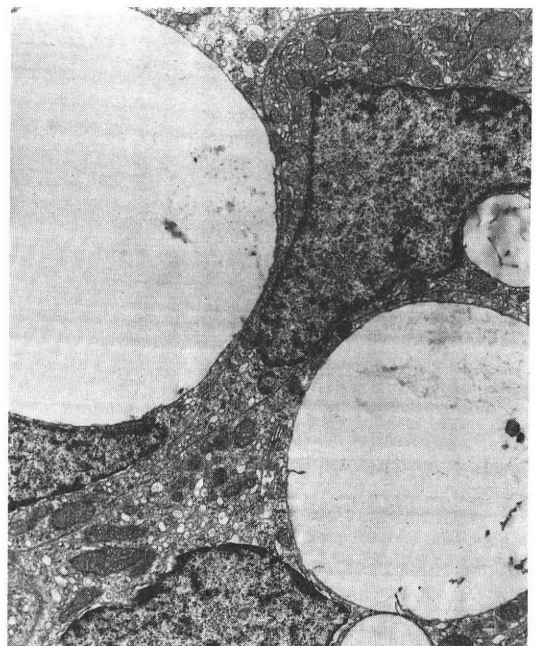


Fig. 2 Ultrastructure of secondary interstitial gland cells from an ovary of a 90-day-old mastomys. x 5000.

結 果

間質腺細胞の微細構造

生後20日のマストミスの卵巣において、一次間質腺は二次卵胞近くの支質に塊状を呈して存在していた。間質腺細胞を電子顕微鏡で観察すると、この細胞 (Fig. 1) は小型で不定形を呈しており、細胞表面に多数の微絨毛を有していた。核はほぼ円形で細胞の中央に位置しており、核小体を1個または2個有していた。ミトコンドリアは円形または楕円形で細胞質全域に多数分布しており、クリステは管状で、基質の電子密度は細胞質よりやや高かった。滑面小胞体は小胞状で細胞質全域に多数分布していたが、粗面小胞体は発達が悪く、断片的で槽状を呈するものが少数存在しているに過ぎなかった。ゴルジ装置は層板と小胞からなっており、細胞質に散在していた。遊離リボソームは細胞質全域に中等数認められた。脂質小滴は小型で核より小さく、細胞質に多数観察された。

生後30日のマストミスの卵巣では、一次間質腺細胞の脂質小滴は生後20日の一次間質腺細胞のものよ

り若干大型であったが、小器官の状態は同じであった。また、一次間質腺のほかに閉鎖胞状卵胞の卵胞膜内膜に由来する二次間質腺が若干認められたが、微細構造は一次間質腺細胞のものとよく似ていた。

生後40日から120日までのマストミスの卵巣では、二次間質腺が多数存在していた。一次間質腺はまだ存在しているものと思われるが、二次間質腺と識別することはできなかった。間質腺細胞 (Fig. 2) は大型で、脂質小滴はさらに大型となった。そのため核は細胞質に偏在し、核膜の陥入が目立った。脂質小滴の大型化と核膜の陥入は生後90日と120日の間質腺細胞において著しく、脂質小滴は細胞質の大半を占めていた (Fig. 2)。なお、生後40日から120日までの間質腺細胞におけるミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置およびリボソームの形態や分布は生後20日の間質腺細胞のものと同じであった。

間質腺の脂質の性質と含量

一次間質腺の脂質は類脂質とコレステロールからなっており、二次間質腺の脂質はこのほかに中性脂肪を含有していた (Table 1)。これらの脂質の含量はマストミスの加齢に伴って Table 1 にみられるよ

Table 1. The amounts of lipids in interstitial glands of the mastomys

Substances	Days after birth						
	20	30	40	50	60	90	120
Sudanophilic lipids	+	+	+++	++++	++++	++++	++++
Lipoids	+	+	++	++	++	++	++
Neutral fats	—	—	++	+++	+++	+++	+++
Cholesterols	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Higher fatty acids	—	—	—	—	—	—	—

— none, + small, ++ moderate, +++ large, ++++ very large



Fig. 3 Sudanophilic lipids in primary interstitial glands from an ovary of a 20-day-old mastomys. Sudan black B stain. x 250.

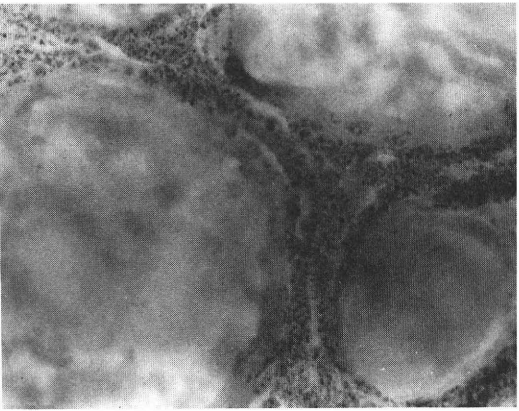


Fig. 4 Cholesterols in secondary interstitial glands from an ovary of a 40-day-old mastomys. Schultz method. x 100.

うな変化を示した。すなわち、スタン好性の脂質小滴の量は生後 20 日と 30 日では少量であったが (Fig. 3), 生後 40 日以降著しく増加した。類脂質とコレステロールは、生後 20 日および 30 日では少量であったが、生後 40 日以降増加した (Fig. 4)。中性脂肪は生後 30 日までの間質腺には検出されなかったが、生後 40 日に中等量出現し、生後 50 日から 120 日まで多量認められた (Fig. 5)。高級脂肪酸は検出されなかった。

間質腺の HSD と $\text{NADH}_2\text{-DH}$ の活性

DHA を基質にした $\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$ の活性は、いずれの時期の間質腺にもジホルマザン顆粒の沈着として認められた (Fig. 6)。なお、この顆粒は DHA を含まない液に浸漬した間質腺には出現しなかった。 $\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$ 活性は、生後 20 日と 30 日では弱かったが、生後 40 日から強くなった (Table 2)。また、いずれの日齢の間質腺にも強い $\text{NADH}_2\text{-DH}$ の活性が認められた (Table 2)。

考 察

一般に、成熟動物の卵巣にみられる間質腺細胞は、(1) 滑面小胞体がよく発達している、(2) ミトコンドリアのクリステが管状である、(3) ゴルジ装置

が発達しているなど、ステロイド分泌細胞の微細構造上の特徴を備えていることが知られている²⁾。マストミスはゲッ歯類に属するので、マウス、ラット、ハムスターなどのゲッ歯類同様、卵巣には間質腺がよく発達している²⁷⁾。さらに幼若動物には一次間質腺、成熟動物には二次間質腺が存在することも調べられている²⁷⁾。しかし、マストミスの間質腺細胞の微細構造についてはまだ調べられていないので、今回観察したところ、一次間質腺細胞についても、また二次間質腺細胞についても、微細構造の状態は他の動物種²⁾とほぼ同様であった。さらに、間質腺には常にステロイド生合成の指標となる $\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$ の活性が検出されたことから、マストミスの一次および二次間質腺は、ステロイドの生合成と分泌を行っていることが推察された。なお、間質腺の $\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$ 活性は生後 20 日と 30 日では弱かったが、生後 40 日以降強くなることから、間質腺のステロイド合成能は一次間質腺に比べ二次間質腺のほうが高いことが考えられた。

成熟したラット、マウスおよびハムスターの間質腺はスタン好性の脂質を多量に含んでおり、この脂質はリン脂質、中性脂肪、高級脂肪酸およびコレステロールからなっているといわれている^{31,32)}。本実験

Table 2 The activities of $\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$ and $\text{NADH}_2\text{-DH}$ in interstitial glands of the mastomys

Enzymes	Days after birth						
	20	30	40	50	60	90	120
$\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$	+	+	++	++	++	++	++
$\text{NADH}_2\text{-DH}$	+++	++	++	++	++	++	++

+ weak, ++ strong

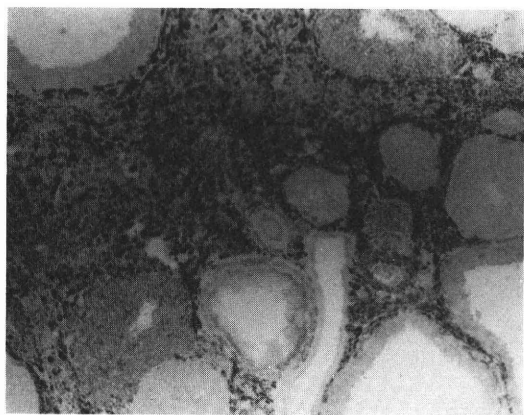


Fig. 5 Neutral fats in secondary interstitial glands from an ovary of a 120-day-old mastomys. Nile blue sulphate stain. x 40.

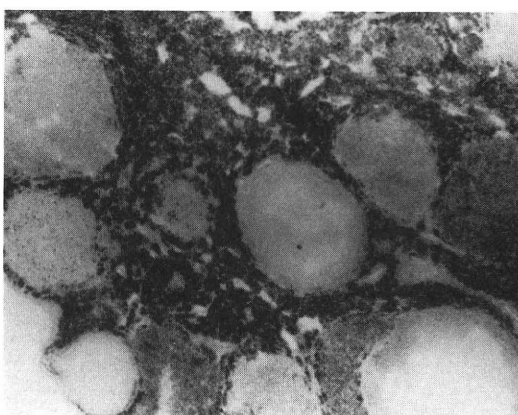


Fig. 6 $\Delta^5-3\beta\text{-HSD}$ activity (using dehydroepian drosterone as the substrate) in secondary interstitial glands from an ovary of a 60-day-old mastomys. Dickmann and Dey method. x40.

において、マストミスの間質腺についても脂質の組織化学的性質と含量を調べた。その結果、生後20日と30日の一次間質腺ではスタン好性脂質は少量しか含まれていなかったが、生後40日以降の二次間質腺では著しく多量に存在しており、間質腺細胞の電顕像の観察結果とよく一致していた。また、一次間質腺の脂質は類脂質とコレステロールからなっているが、二次間質腺の脂質はこのほかに中性脂肪を含んでいることが確認された。しかし、どの時期の間質腺においても、高級脂肪酸は含んでおらず、この点がラット、マウスおよびハムスターのものと異なっていた。

終りに、マストミスを分けて下さった新潟大学医療技術短期大学部の曽我淳教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Harrison, R. J. and Weir, B. J.: Structure of the mammalian ovary: In The Ovary, 2nd ed. Vol. 1, Zuckerman, P. L. and Weir, B. J. eds., 113, Academic Press, 1977
- 2) Guraya, S. S.: Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of the developing mammalian ovary, Int. Rev. Cytol., 51: 49, 1977
- 3) Bjersing, L.: Ovarian histochemistry. In The Ovary, 2nd ed. Vol. 1 Zuckerman, P. L. and Weir, B. J. eds., 303, Academic Press, 1977
- 4) Keyes, P. L. and Nalbandov, A. V.: Endocrine function of the ovarian interstitial gland of rabbits, Endocrinology, 82: 799, 1986
- 5) Dorrington, J. H.: Steroidogenesis *in vitro*, In The ovary, 2nd ed. Vol. 3: Zuckerman, P. L. and Weir, B. J. eds., 359, Academic Press, 1977
- 6) Dennefors, B. L., Janson, P., Knutson, F. and Hamberger, L.: Steroid production and responsiveness to gonadotrophin in isolated stromal tissue of human menopausal ovaries, Am. J. Obstet. Gynecol., 136: 997, 1980
- 7) Longcope, C., Hunter, R. and Franz, C.: Steroid secretion by the postmenopausal ovary, Am. J. Obstet. Gynecol., 138: 564, 1980
- 8) Bélanger, A., Cusan, L., Caron, S., Barden, N. and Dupont, A.: Ovarian progestins, androgens and estrogen throughout the 4-day estrous cycle in the rat, Biol. Reprod., 24: 591, 1981
- 9) McNatty, K. P.: Hormonal correlates of follicular development in the human ovary, Aust. J. Biol. Sci., 34: 249, 1981
- 10) Magoffin, D. A. and Erickson, G. F.: Primary culture of differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium, J. Biol. Chem., 257: 4507, 1982
- 11) Terranova, P. F., Martin, N. C. and Chien, S.:

Theca is the source of progesterone in experimentally induced atretic follicles of the hamster, Biol. Reprod., 26: 721, 1982

- 12) Sridaran, R. and Gibori, G.: Intraovarian localization of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin stimulation of testosterone and estradiol synthesis in the pregnant rat, Endocrinology, 112: 1770, 1983
- 13) Silavin, S. L. and Greenwald, G. S.: Steroid production by isolated theca and granulosa cells after initiation of atresia in the hamster, J. Reprod. Fert., 71: 387, 1984
- 14) Erickson, G. F., Magoffin, D. A., Dyer, C. A. and Hofeditz, C.: The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships, Endocr. Rev., 6: 371, 1985
- 15) Baillie, A. H., Fergusson, M. M. and Hart, D. M.: Developments in Steroid Histochemistry: 72, Academic Press, 1966
- 16) Cavallero, C. and Magrini, U.: Histochemical studies on β -hydroxysteroid dehydrogenase and other enzymes in the steroid-secreting structures of human fetus, In Excerpta Medica International Congress Series 132, Martini, L., Fraschini, F. and Motta, M. eds.: 667 Excerpta Medica, 1966
- 17) Goldman, A. A., Yakovac, W. C. and Bongiovanni, A. M.: Development of activity of β -hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues and in two anencephalic newborns, J. Clin. Endocr. Metab., 26: 14, 1966
- 18) Schlegel, R. J., Farias, E., Russo, N. C., Moore, J. R. and Gardner, L. I.: Structural changes in the fetal gonads and gonaducts during maturation of an enzyme, steroid β -ol-dehydrogenase, in the gonads, adrenal cortex and placenta of fetal rats, Endocrinology, 81: 565, 1967
- 19) 石田一夫, 石島芳郎, 遠藤 克: 家兎, ハムスターおよびマウスにおける卵巣間質腺の酵素組織化学的研究, 家畜繁殖誌, 17: 29, 1971
- 20) 石田一夫, 新村末雄, 佐々木博之: 卵巣, 生殖機能の組織学, 菅原七郎, 安田泰久, 石田一夫, 正木淳二編: 62, 理工学社, 1981
- 21) 須藤カツ子: マストミス, 開発途上の実験動物, 高垣善男, 鈴木 潔編, 59, 清至書院, 1984
- 22) Kamano, T., Kodama, T. and Kawasaki, M.: Tumors of the stomach, In Praomas (Mastomys natalensis, Soga, J. and Sato, H. eds., 31, The Daiichi Printing Co., 1977
- 23) Antmann, E., Volm, M. and Wayss, K.: Tumor induction in the rodent Mastomys natalensis by activation of endogenous papilloma virus genomes, Nature, 308: 291, 1984
- 24) Brambell, F. W. R. and Davis, D. H. S.: The normal occurrence, structure and homology of

prostate glands in adult female *Mastomys erythroleucus* temm, J. Anat., 75: 64, 1940

- 25) Ghanadian, R., Lewis, J. G. and Chisholm, G. D.: Androgen concentrations in prostate and serum of the male and female *Praomys* (*Mastomys*) *natalensis*, Invest. Urol., 15: 212, 1977
- 26) 鈴木善祐, 友田 仁, 浅野敏彦: マストミスーとくにその雌雄前立腺と副腎の性差について一, 実験生殖生理学の展開, 鈴木善祐編, 393, ソフトサイエンス社, 1982
- 27) 新村末雄, 藤沢信義, 前田宜俊, 佐藤徳光, 石田一夫: マストミス性腺の生後発達—とくに卵胞形成と精子形成について—, 新大農研報, 40: 61, 1988
- 28) Dickmann, Z. and Dey, S. K.: Two theories: the preimplantation embryo is a source of steroid hormones controlling (1) morula-blastocyst transformation, and (2) implantation, J. Reprod. Fert., 35: 615, 1973
- 29) Barka, T. and Anderson, P. J.: Histochemistry: 296, Hoeber Medical Division, Harper and Row Publishers, 1965
- 30) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英, 水谷 明: 顕微鏡的組織化学, 第3版, 285, 医学書院, 1965
- 31) Ishida, K.: Histochemical studies of lipids in the ovaries of domestic animals, Arch. histol. Jap. 19: 547, 1960
- 32) Guraya, S. S. and Greenwald, G. S.: A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary, Anat. Rec., 149: 411, 1964

Ultrastructural and histochemical characteristics of interstitial gland cells in the mastomys, *Praomys natalensis*

Sueo Niimura and Kazuo Ishida

Department of Animal Science,
Faculty of Agriculture,
Niigata University, Niigata 950-21, Japan

The ultrastructure of interstitial gland cells in the mastomys, 20 to 120 days of age, was electron-microscopically observed. The amount and histochemical characteristics of lipids, as well as the activity of Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (Δ^5 -3 β -HSD) in them, were observed also.

Primary and secondary interstitial gland cells, the former existing in the ovaries of 20 and 30 days of age and the latter in those of 30 to 120 days, possessed vesicles of smooth-surfaced endoplasmic reticulum, tubulocrista-typed mitochondria and well-developed Golgi complexes in the cytoplasm. Besides these ultrastructural features, such cells always showed the activity of Δ^5 -3 β -HSD when dehydroepiandrosterone was used as the substrate, this enzyme activity being stronger in secondary interstitial glands than in the primary. These results suggest that both primary and secondary interstitial glands have abilities of biosynthesis and secretion of steroid hormones, and that the ability of steroid biosynthesis is higher in secondary interstitial glands than in the primary.

Primary interstitial glands contained a small amount of lipids composed of lipoids and cholesterol, while secondary ones came to have a much larger amount of those composed of lipoids, cholesterol and neutral fats in addition. In interstitial glands of the mastomys, it was characteristic to have no higher fatty acids as are composed in such glands from other rodents.

(受付: 1989 年 3 月 15 日)

IN VITRO CAPACITATION AND FERTILIZING ABILITY OF RABBIT SPERMATOZOA TREATED WITH LYSOPHOSPHATIDYL CHOLINE

Kahei SATO and Tutomu GOTO

Laboratory of Animal Cell Biology,
Department of Applied Biological Science,
College of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Kanagawa 252, Japan

Abstract: We examined effects of lysophosphatidyl choline (LPC) on the incidence of the acrosome reaction and fertilizing ability of ejaculated rabbit spermatozoa. When rabbit spermatozoa were preincubated in a modified Tyrode's solution for 3 hours and then, were exposed to various concentration solutions of LPC (10, 25, 50, or 100 $\mu\text{g/ml}$) for 15 minutes, the acrosome reaction of spermatozoa was facilitated markedly. However, at 100 $\mu\text{g/ml}$ of LPC the sperm motility was injured considerably. The fertilizing ability of spermatozoa treated with LPC also was tested, using *in vitro* fertilization of rabbit eggs ovulated. From results obtained it was confirmed that ejaculated rabbit spermatozoa treated with LPC had high fully capacity to fertilize eggs.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35(1), 209—212, 1990)

Introduction

Recently, lysophosphatidyl choline (LPC) has been to induce sperm capacitation in the guinea pig^{1,2)}, hamster³⁾ and rabbit^{4,5)}. In the present time, however, the poromoting effect of sperm capacitation and fertilizing ability of LPC is unknown in details. In the present study, *in vitro* capacitation, the ability of zona attachment and fertilizing ability of ejaculated rabbit spermatozoa treated with LPC were examined.

Materials and Methods

Medium: The standard medium for *in vitro* capacitation and insemination was a modified Tyrode's solution containing with albumin, lactate, pyruvate, retinol, and taurine⁶⁾. The medium used was supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA, Frc. -V, Sigma Chem. Inc).

Only effective BSA preparations in supporting capacitation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa were used in the present study. The pH value of the medium was adjusted to 7.4 under air. All media were prepared immediately before use.

Sperm suspension preparations: Semen samples were obtained from 4 fertile bucks of New Zealand White rabbit. An aliquot of semen samples was diluted with the medium and sperm samples were centrifuged for 8 minutes at 1000 r. p. m. The spernatant was discarded and then, the sperm pellet again was suspended in the fresh medium. Sperm suspensions were examined by the light microsocope and only sperm samples in which at least 80% or more higher percentage of spermatozoa were motile after the centrifugation were used for experiments. Each sperm suspensions were diluted serially to obtain the lowest of

Table 1 Acrosome reaction and motility in spermatozoa treated with lysophosphatidyl choline during *in vitro* incubation

Dose ($\mu\text{g/ml}$) of LPC	% acrosome-reacted spermatozoa			% motility of spermatozoa		
	Hour after incubation			Hour after incubation		
	1	3	5	1	3	5
Control (0)	3.7	12.2	29.6	91.3	83.3	76.3
10	16.0*	25.0	55.2	90.5	78.5	74.3
25	26.0*	42.2*	69.7	80.2	78.3	69.7
50	35.7*	74.8*	93.1	83.3	78.3	69.2
100	85.3**	92.2**	93.9	49.8*	36.8*	21.9**

LPC ; Lysophosphatidyl choline

* ; $P < 0.05$ to control (within columns)** ; $P < 0.01$ to control (within columns)

which ranged from 3 to 4×10^5 motile spermatozoa/ml.

Experiments for inducing acrosome reaction: To determine the effect of LPC on the rate of perm acrosome reaction, washed spermatozoa were preincubated for 3 hours in the medium at 37°C under 5% CO_2 in air. At the end of the preincubation various concentrations of LPC (10, 25, 50, or 100 $\mu\text{g/ml}$) were added to each sperm suspension and then sperm suspension samples were incubated for 15 minutes. The percentage of motile spermatozoa, percent acrosome-reacted spermatozoa were examined at various intervals after an additional incubation in the fresh medium. The acrosome reaction was evaluated by the method of Talbot and Chacon⁷⁾. In each examination, 100 spermatozoa per slide were examined.

In vitro fertilization: To examine the fertilizing ability of rabbit spermatozoa treated with LPC, *in vitro* fertilization was carried out. The egg donors were superovulated with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Teikoku Zoki Mfg. Co.) and human chorionic gonadotropin (hCG, Teikoku Zoki Mfg. Co.). The donors were injected intravenously with 100 IU PMSG followed by an intravenous injection of 100 IU hCG 72 hours later. At 13.5 hours after hCG injection the donors were anesthetized by sodium pentobarbital (Nembutal, Abott Co.) and oviducts were removed and flushed with the fresh medium to obtain ovulated eggs. To remove the cumulu cells from eggs collected, eggs were transferred to the medium

containing 1% hyaluronidase for 5 minutes. After exposing to 1% hyaluronidase solution, all eggs were washed with the fresh medium and then, eggs were supplied for *in vitro* fertilization. Insemination was performed by adding 20 μl of the sperm suspension into a droplet of the medium containing 4-7 eggs in plastic dishies. After insemination, sperm-egg preparations were incubated at 37°C under 5% CO_2 in air for 5 hours. At various intervals after the start of incubation, the eggs were taken out from the dish, washed with the medium, and mounted between a slide glass and a coverslip supported by 4 spots of paraffin-veseline mixture. The eggs were gently compressed under the coverslip and examined by the phase-contrast microscope for evidence of fertilization

Results

Effect of LPC on sperm motility: Results obtained are presented in Fig 1. The majority of ejaculated rabbit spermatozoa (control) showed active motile. During and after incubation in LPC-treated groups the sperm motility was continued, but the motile spermatozoa decreased rapidly with the progress of incubation time. The percentage of motile spermatozoa was 52.2% 5 hours after incubation.

Effect of LPC on the acrosome reaction: In control, 1 hour after incubation the rate of AR spermatozoa preincubated for 3 hours was 3.7% (Table 1). LPC-treated spermatozoa at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, in contrast to control,

Table 2 *In vitro* fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa treated with lysophosphatidyl choline

Group	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized (%)	No. of eggs with swollen sperm head	No. of Eggs with pronucleus formation (%)
Control	28	19(67.9)	17(89.5)	9(47.4)
LPC 10 μ g/ml	13	12(90.3)	1(8.3)	11(91.7)
LPC 25 μ g/ml	12	12(100)	1(8.3)	11(91.7)
LPC 50 μ g/ml	20	20(100)	3(15.0)	17(85.0)
LPC 100 μ g/ml	15	15(100)	1(6.7)	14(93.3)

Observations were performed 5 hours after insemination
LPC; Lysophosphatidyl choline

showed 35.7% acrosome reaction the same time after incubation and at 100 μ g/ml the rate was 85.3%. However, at 100 μ g/ml of LPC the sperm motility decreased markedly 3 hours after sperm incubation.

Attachment of rabbit spermatozoa treated with LPC: Our previous studies have established that acrosome-reacted rabbit spermatozoa attaches to and penetrate through the zona pellucida of rabbit eggs⁹⁾. Under the present experimental conditions, the number of spermatozoa attached to the zona pellucida within 15 minutes after insemination in control groups. On the one hand, in LPC-treated groups the spermatozoa attached to the zona pellucida 5 minutes after insemination. At 30 minutes after insemination, the number of spermatozoa attached to each zona reached an average value of 20-27.

In vitro fertilization of rabbit eggs by spermatozoa treated with LPC: Results for *in vitro* fertilization of rabbit eggs using spermatozoa treated with LPC are present in Table 2. At 0.5 hours after insemination zona penetration of LPC-treated spermatozoa was observed in the majority of eggs. Then, enlargement of sperm heads started 1.5 hours after insemination and at 2 hours in about 89% of eggs swollen sperm heads were seen. Further, well formed female and male pronuclei in the egg cytoplasm were observed 3 hours after insemination. The fertilizing rate of eggs were in ranging 90.3-100% when eggs were examined 5 hours after insemination. On the other hand, in control spermatozoa, zona penetration was in 2 hours after insemination and a observation of swollen sperm head was in 3 hours. Pronu-

cleus formation started 4 hours after insemination.

Discussion

A lysolecithin, LPC has been reported to capacitate guinea pig spermatozoa^{1,2)} and hamster spermatozoa³⁾. Recent studies also have confirmed similar results in rabbit spermatozoa⁵⁾ and bovine spermatozoa⁸⁾. In the present study, LPC decreased clearly capacitation time and the time required to induce the acrosome reaction in rabbit ejaculated spermatozoa under *in vitro* conditions, suggesting that LPC promotes capacitation. According to Felming and Yanagimachi¹⁾, lysophospholipids, such as LPC, are intricately involved in the preparation of guinea pig sperm membranes for the acrosome reaction. From the present results, it is evident that LPC involves in capacitation of rabbit spermatozoa under *in vitro* conditions. Further, molecular biological studies of LPC on the induction of sperm capacitation or the acrosome reaction are required.

Results obtained from the *in vitro* fertilization studies showed similar results reported by other researchers^{1,5,9)}. The addition of LPC into the incubation medium appeared to promote the fertilizing ability of rabbit spermatozoa. However, in the present study, LPC concentrations used is showing the strong toxicity for sperm motility. Further studies are required to establish optimal conditions for *in vitro* fertilization.

References

- 1) Fleming, A. D. and Yanagimachi, R.: Effects of various lipids on the acrosome reaction and

- fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa, with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction, *Gamete Res.*, 4: 253, 1981
- 2) Huang, T. T. F., Fleming, A. D. and Yanagimachi, R.: Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida, A study using the guinea pig, *J. Exp. Zool.*, 217: 217, 1981
- 3) Ohzu, E. and Yanagimachi, R.: Acceleration of acrosome reactions in hamster spermatozoa by lecithin, *J. Exp. zool.*, 224: 253, 1982
- 4) Sato, K.: *In vitro* fertilization of rabbit eggs using spermatozoa treated with lysophosphatidyl choline, *J. Mamm. Ova Res.*, 2: 117, 1987
- 5) Kim, C. K., Im, K. S., Zheng, X. and Foote, R. H.: *In vitro* capacitation and fertilizing ability of ejaculated rabbit sperm treated with lysophosphatidylcholine, *Gamete Res.*, 22: 131, 1989
- 6) Sato, K. and Suzuki, Y.: *In vitro* fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution, *J. Mamm. Ova Res.*, 2: 149, 1985
- 7) Talbot, P. and Chacon, R. S.: A triple-stain techniques for evaluating normal actosome reaction of human sperm, *J. Exp. Zool.*, 215: 201, 1981
- 8) Wheeler, M. B. and Seidel, G. E.: Capacitation of bovine spermatozoa by lysophospholipids

and trypsin, *Gamete Res.*, 22: 193, 1989

- 9) Sato, K., Wakata, S. and Suzuki, Y.: Scanning electron microscopic study of *in vitro* fertilization in the rabbit, *J. Mamm. Ova Res.*, 3: 65, 1986

Lysophosphatidyl choline 処理 ウサギ精子の capacitation および 受精能力について

日本大学農獣医学部動物細胞学教室

佐藤嘉兵 後藤 勤

近年、先体反応を促進する物質として注目されている Lsophosphatidyl choline (LPC) を用いて、それがウサギ精子の先体反応および受精能力発現に及ぼす影響について検討を加えた。射精精子を洗浄後修正タイロッド液中で 3 時間培養を行い、更に精子を LPC 溶液 (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) に移して 15 分間培養を行なった。LPC 感作後 1 - 5 時間における精子の先体反応は顕著に促進された。また、LPC 処理精子の受精能力について体外受精法を用いて検討したところ、精子は高い受精能力を示した。しかし、LPC 100 $\mu\text{g/ml}$ において精子の運動性は有意に阻害された。

(受付: 1989 年 5 月 8 日)

地方部会講演抄録

第100回 日本不妊学会関東地方部会

日時: 1989年6月24日(土)
場所: コクヨホール 港区港南1-8-35(JR品川
駅港南口)

1. 排卵誘発時における尿中 LH 半定量法
(ゴナール LH) の有用性について

白井 彰・浅川真也子・上山 護
小島栄吉・大村 剛・久保春海
(東邦大第1産婦)

(目的) 排卵誘発時における酵素免疫法を用いた尿中 LH 簡易測定キット、ゴナール「LH」の有用性について検討した。

(対象および方法) 当科不妊外来通院中の排卵障害患者10名について各種の卵胞刺激法を用いて排卵誘発を実施し、排卵期前後の尿中 LH 濃度をゴナール「LH」より得た検体の吸光度より測定し、EIA で測定した血中 LH 濃度と比較検討した。

(結果) 尿中 LH 値と血中 LH 値の間に強い相関が見られたが、なかでも、排卵周辺期の LH レベルでは、高い相関を示した。しかし、LH が 30mIU/ml 以下では、全く相関を示さなかった。

(考察) ゴナール「LH」による尿中の LH 半定量は、排卵期周辺の LH レベルでは、尿中 LH 濃度と血中 LH 濃度が相関しているため、血中 LH の代用として使用できると考えられた。

2. 体外受精の過排卵周期における LH の意義

吉村慎一・原 利夫・河野八朗
竹原祐志・泉 康史・矢作みき
松本千秋・兼子 智・小田高久
大野虎之進

(東京歯科大市川総合病院産婦)

過排卵周期における LH の意義を解明するため、血清 LH、FSH、 E_2 、P の推移と、卵の受精率、分割率に関し検討した。過排卵刺激法として clomiphene-hMG、hMG 単独、FSH 単独の3種類を用い、hCG 投与の36時間後に採卵を行なった。血清 LH の推移により、全期間で LH 低値(I群)、hCG 投与後に LH 高値(II群)、hCG 投与前に LH 高値(III群)の3群に分類した。

hCG 投与前の血清 P は、III 群が I、II 群に比し有意に高値であった。受精率および分割率は、III 群が他の群に比して有意に低値で、妊娠率も III 群が低い傾向にあった。I 群と II 群の間には全く差は認められなかった。また採卵数、受精率、分割率には過排卵刺激法による差は存在しなかった。

以上より、hCG 投与前に血清 LH あるいは P が高値となる周期では、受精率、分割率が不良であることが明らかとなり、premature LH rise または premature luteinization の機序の解明の重要性が示唆された。

3. 同一症例における hMG 律動的皮下投与
法の妊娠周期・非妊娠周期の比較

山田春彦・中村幸雄・生方良延
南野智徳・吉田圭子・鈴木正彦
(杏林大産婦)

われわれはすでに各種無排卵症に対して、hMG を 90 分毎に律動的に皮下投与して排卵誘発を行ない、現在までに 18 例 20 周期に妊娠例を得ている。これから妊娠例のうち同一症例について妊娠周期、非妊娠周期を比較した。

症例は PCO、第 I 度無月経、第 II 度無月経あわせて 14 例、非妊娠周期 50 周期、妊娠周期 15 周期であった。

排卵までに必要とした hMG 量は妊娠周期、非妊娠周期全体でみると、妊娠周期の方が少ない傾向を示した。

黄体期の hCG 投与日数には差はなかった。

OHSS 発生率は妊娠周期で 2/15 (13.3%)、非妊娠周期で 9/50 (18.0%) と OHSS 発生周期に妊娠率が高いとはいえなかった。

排卵前の E_2 値、黄体期の E_2 、P 値(妊娠周期では排卵後 8 日までの値)には非妊娠周期と妊娠周期との間に統計学的な有意差はなかった。

4. LUFS 症例における内分泌動態

大平 篤・篠崎百合子・岩下光利
安達知子・高木耕一郎・武田佳彦
坂元正一 (東京女子医大産婦)

LUFS (Luteinized Unruptured Follicle Syndrome) 5 例について、その血中および卵胞液中のホ

ルモン動態を中心に検討した。

LUFs 症例 5 例の内訳は、原発性不妊 3 例、続発性不妊 2 例であり、BBT 上、黄体機能不全型を示すものが 3 例存在した。また、5 例のうち、パーロデルにてコントロール中で、左卵巣よりの排卵時のみ LUFs が診断された 1 例と、ボンゾール治療後に、LUFs と診断し、次の周期に clomid HCG にて、妊娠に至った 1 例を紹介した。

以上の LUFs 5 例をまとめると、高プロラクチン血症のためパーロデルでコントロール中の症例が 3 例存在したが、LUFs と診断された時、LH、FSH、PRL、Testosterone、TSH 等のホルモン基礎値は、いずれも正常値を示した。また黄体期中期の P_4 値は、正常対照群とくらべ低値であったが有意差はなかった。また、黄体期中期の卵胞径は、正常排卵期卵胞よりも有意に大きく、卵胞液中の E_2 値は正常排卵期卵胞の E_2 値よりも低値を示していた。

5. hMG-hCG に Buserelin を併用して

無事妊娠に成功した PCO 不妊の 1 症例

大蔵健義・方 世錦・三ツ矢和弘

榎本英夫・高見沢実・高橋一久

林 雅敏・矢追良正

(獨協医大越谷病院産婦)

卵巣腫大と腹水を伴った OHSS を経験した PCO 不妊患者に、Buserelin を併用して hMG-hCG 療法を行ない、OHSS を抑えて妊娠に成功したので報告する。

患者 E. I., 29 歳, 0-G, 初経 13 歳, 以後不順, 18 歳より月経は半年に 1 回程度, 27 歳結婚してすぐ当科受診 (昭和 61 年 12 月), しばらく clomid+parlodele 療法を行なったが, そのうち反応しなくなったため hMG-hCG 療法を行なったところ, 上記 OHSS を発生した。この 2 カ月後の昭和 63 年 11 月 14 日より Buserelin 1 日 900 μ g, 3 回に分けて鼻腔内噴霧投与した。投与開始 73 日目 (血中 LH 0.5mIU/ml, FSH 3.3mIU/ml, E_2 24pg/ml) から hMG 150IU/日を開始した。12 日間投与して, 左右合計 6~7 個の卵胞が 20~21 mm となった時点 (血中 E_2 683pg/ml, P 0.5ng/ml) で hCG に切り換え, OHSS を発生することなく排卵誘発に成功した。黄体機能は hCG 投与で維持して, そのまま妊娠が成立した。単胎妊娠で, 妊娠経過には異常ない。

6. Gn-RH analog (Buserelin)+hMG/

hCG 併用による PCOD の治療 (第 1 報)

楠原浩二・許山浩司・川勝雅秀

小田原靖・落合利彦・安江育代

寺島芳輝

(慈恵医大産婦)

Clomid resistant な PCOD の排卵誘発には hMG/hCG 療法が行なわれるが, OHSS 等の副作用も少なくなく, かつ重症化しやすい点が難点である。その原因の一つは本症の内因性の高 LH 状態が関与していると考えられる。そこで Gn-RH analog (a) にて pituitary desensitization し endogenous LH 分泌を抑制した上で hMG (FSH)/hCG を投与し, PCOD に対する効果を検討した。

方法は Gn-RHa (Buserelin) 900 μ g/day を 2 週間前投与した後, Gn-RHa/hMG (FSH)/hCG を 4 例 8 周期に投与した。その結果 7 周期・87.5 % が排卵し, OHSS の発症は 1 周期 12.5 % のみであった。しかし妊娠例はなかった。その原因を排卵例の黄体機能の面より分析すると short luteal phase が多く, かつ E_2 , Progesterone 比にアンバランスな例があり, この事より, 本法には適切な luteal support が必要と考えられた。

7. RIA 固相法を用いた TRH 負荷試験の検討

豊成由佳・伊藤 哲・岡部親宣

武内裕之・福田 勝・高田道夫

(順天堂大産婦)

(目的) 正常月経周期婦人に対して TRH 負荷試験を行ない, 血清 PRL の基礎分泌値と 15 分値を測定し, 潜在性高プロラクチン血症 (OHP) の診断基準について検討した。

(方法) 正常月経周期婦人 36 名に対し月経周期 7 日目に TRH 250 μ g 負荷し, 負荷前値と負荷後 15 分値を RIA 固相法にて測定した。また 88 年 7 月から 89 年 2 月までに月経不順を主訴に当科内分泌外来を受診し, LH-RH および TRH 負荷試験を施行した 184 名における OHP について検討を加えた。

(結果) 正常月経周期婦人の PRL の基礎分泌値は 16 ng/ml 以下であり, 負荷後 15 分値 140 ng/ml 以上を OHP, 100~139 ng/ml を OHP 疑診群と定めた。プロモクリプチンを投与することで, OHP 群 12 例のうち下垂体型 1 例を除く 11 例中 7 例に排卵を認め, OHP 疑診群 6 例のうち下垂体型 2 例を除く 4 例中 3 例に排卵を認めた。OHP, OHP 疑診ともに, 下垂体型を除けば, プロモクリプチン投与は非常に有効であると言える。

8. TRH 負荷試験の方法に対する再評価

家永 聡・可世木久幸・五十嵐俊夫
外山和秀・大村 浩・荒木 勤

(日本医大産婦)

(目的) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) 負荷試験は、同一症例から頻回に採血を行なっている場合が多い。われわれは負荷前と負荷後の2点のみでTRH 負荷試験の評価が可能かどうか検討した。(対象) 挙児希望の強い例および無月経の症例計60例。

(方法) 月経周期6～8日目にTRH 1500 μ g を静注し、前値、15分後および30分後に採血し、Prolactin (PRL) をRIA法を用いて測定した。

(結果) 1) 15分後にpeakを形成したのは55例であり、30分後は5例であった。2) 30分後にpeakを形成した例も、15分値は全例peakの-5%以内の近似値を示した。

(考察) TRH 負荷試験のpeakは15～30分後にとるとされている。例外的にanorexia nervosaやacromegalyはpeakが遅延する。しかしこれらは臨床症状や他の検査で容易に診断がつく。自験例では15分で大多数がpeakを示し、30分でpeakを示した例もpeakと15分値は近似していた。したがって、単なる潜在性高PRL血症の検索には前値と15分値のみで十分足りると考えられた。

9. 習慣流産と抗リン脂質抗体症候群

豊島 究・牧野恒久・中田浩一
飯塚理八 (慶応大産婦)

習慣流産の原因として最近抗リン脂質抗体が注目されている。われわれは慶応病院不妊外来患者のうち90名について、ELISA法を用いて抗カルジオリン抗体価の測定を行ない検討した。その結果90名のうち24名27.8%が陽性であった。その陽性例をさらに検討したところ、抗カルジオリン抗体価20単位以上の抗リン脂質抗体症候群の患者においては既往の妊娠に生児を得た例はなく、また抗カルジオリン抗体と関連が深いとされている妊娠第2期以降の胎児死亡は、抗カルジオリン抗体20単位以上では既往流産の17%を占めたのに対し、それ以下では4%にすぎなかった。

以上の結果から、習慣流産との関連において抗カルジオリン抗体を測定する場合は、定性のみでなく定量測定し考察することが必要と思われる。

10. 当院における挙児希望筋腫核出術例の予後 (画像診断の解析を中心にして)

田嶋達矢・高野 昇・上杉健哲
山賀明弘 (国立横浜東病院産婦)
田中尚武 (千葉大)

機能保存手術において診断は、手術適応決定のためより確実な術前診断、予後判定基準となり得るより正確な術後診断が望まれる。当院の挙児希望子宮筋腫46例のHSG像を中心に術前治療指針の適否、その予後について臨床検討を行なった。

その結果、①46例中22例47.8%に妊娠の成立がみられ、他の挙児希望機能保存手術に比べ高率であった。②術前のHSG、超音波上、確認された筋腫核の大小、数、位置に関係なく妊娠の成立が認められた。③術後妊娠成立までの期間は他の保存手術に比べ長く、術後HSG上、子宮陰影に拡大、変形、陰影欠損の残存する例では長期になる傾向がみられ、長期の術後観察が必要であった。④HSG上、造影剤筋層内異常侵入像、卵管陰影の延長、頭方への走行など卵管陰影の異常は子宮内膜症の合併が多く、予後に問題があり、手術適応に注意を必要とした。しかし筋腫のみによると考えられる不妊例は積極的な手術適応とすべきであると考えられた。

11. 各種子宮形成術式の適応に関する検討

西田正人・辻 泰二・山内 宏
本部正樹・宗田 聡・佐藤豊美
岩崎寛和 (筑波大産婦)

子宮奇形の種類と形成術式について検討した。代表的な形成術式であるStrassmann, Tompkins, Jones & Jonesに関して、Strassmannは双角子宮の形成術式として優れており、中隔子宮は適応にならない。Tompkinsは中隔子宮に対する術式であるが、中隔を切除しないため中隔が厚いと形成術後に再び中隔ができる欠点がある。従って、この術式は中隔子宮が粘膜下筋腫による底部の圧迫が分らないような場合に最も良い適応であると考えられた。Jones & Jonesは原法は形成術後の子宮腔が狭小となること、卵管角部を傷つけやすいこと、また術後の生児獲得率が約75%と低いことから行なわれない方が良いと考えられた。これに対し、われわれは中隔を切除する際に子宮腔に入らず子宮内膜を全て温存する術式を開発して施行しているが、術後生児獲得率が約90%と高かった。この他に、不妊原因となる単角子宮に対しても、新しい術式を試み、予後を追跡しているので報告する。

12. 不妊を主訴として来院した患者の心理テスト 結果の分析

坂本正俊・浜島寿充・池内隆夫
甲斐祥生
(昭和大藤が丘病院泌尿器)
北村 勉
(昭和大藤が丘病院精神神経科)

男子不妊症を主訴に来院した 21 名 (21~45 歳平均 34 歳) について心理テスト① Cornell Medical Index (CMI), ②矢田部 Guilford 性格検査 (Y-G), ③東大人格目録 (TPI) を施行した。

CMI では 1 名に IV 領域の異常を認め、Y-G では B と E type に 1 名づつ異常を認めたが、ほとんどは正常であった。さらに深層心理まで検査出来る TPI では 1/3 に異常が認められ、borderline でも 1/3 が認められた。すべてのテストに異常を示したのは 47 XXY の Klinefelter 症候群であった。精子数との関連では問題なかったが、不妊期間では 8 年と長期の者に異常を認めた。これらの異常と不妊に関しての関連についてさらに検討を行なう予定である。

13. 男性不妊症妊娠成立例における

Penetrak 値の検討

宇津木利雄・中島敬和
五十嵐正雄 (群馬大産婦)

不妊外来通院中の 41 カップルの精液検査後 2 年間のフォローアップ中に妊娠した群と未だ妊娠に至っていない群と比較した。従来の精子濃度、運動率、奇形率の他にウシ頸管粘液を使用したペネトラック (セロノ社) を用いた。41 例中 8 例が妊娠し、33 例は妊娠に至っていない。妊娠群と非妊娠群のペネトラック値には有意の差を認めなかった。また 30 mm 以上のペネトラック値を示す精子運動機能は良好と言われており、30 mm 以上と以下で妊娠群と非妊娠群の間で X²テストを行なったが有意性は認められなかった。女性因子を考慮し、卵管通過性良好で、かつ器質的疾患のない例で検討すると、ペネトラック値 10 mm 以下は妊娠しにくいことが判明した。

客観的精子機能評価値の得られるペネトラック検査も、その瞬間の精子検査所見の運動率、精子濃度と相関関係を示すものの、妊娠するか否かの予後判定は難しいように思われた。

14. 当院におけるバーコール AIH

清水 篤・木村武彦・荒木日出之助
(昭和大藤が丘病院産婦)

不妊夫婦の 13.5 % に精液検査異常を認め、無精子症を除く症例に Percoll AIH を行なった。適応は精子数 2000 万/ml 以下、もしくは運動率 60 % 以下の乏精子症、精子無力症、膿精子症、頸管粘液不良例や Huhner 試験不良例、免疫性不妊、高年齢や長期不妊の原因不明不妊等である。

基礎体温、頸管粘液、卵胞径、尿中エストラジオール、尿中 LH より排卵日と思われる日の朝に、自宅で用手法により採取した精液を Percoll にて洗浄し 1500 rpm, 25 min (400 G) にて遠沈後ペレットを含む試験管底の約 1 ml をフレスポイトにて使用した。精子数は平均 2 倍、運動率は平均 4.8 倍改善された。

成績：33 人 189 周期に施行し子宮外妊娠 1 例、流産 1 例を含む 10 例が妊娠した。(乏精子症、精子無力症 23 例中 4 例、高齢および長期不妊 7 例中 3 例、Huhner 試験不良例 3 例中 3 例、および免疫性不妊の疑われるもの 3 例中 1 例)。対患者妊娠率 30.3 %、対周期妊娠率 5.7 %、成功例に対する施行回数は 1 ~ 5 回であった。

シンポジウム

“Oligozoospermia の対策”

1. 薬物療法

角谷秀典 (千葉大)

1979 年 4 月より 1989 年 3 月までの 10 年間に当科を受診した特発性男子不妊症 (無精子症を除く) 304 例に薬物療法を施行した。非内分泌療法 (メチコバル・カルナクリン) に比し、内分泌療法 (クロミッド 25 mg 連日、クロミッド 25 mg 3 週投与後 1 週休薬、ノルバテックス 20 mg, hCG/hMG) の治療成績が良好であり、精子運動率は前者に比し後者で有意に改善した。内分泌療法のうち内因性ゴナドトロピンを上昇させるクロミッド、ノルバテックスが有効であった。内分泌療法の前後で、血清 LH, FSH, テストステロン、エストラジオール値は上昇する傾向を示し、改善例では非改善例に比し治療前のゴナドトロピン値は低値であった。妊娠例で、内分泌療法例では非内分泌療法に比べ、投与前の血清 LH, FSH は上昇し、精子濃度も低い傾向であり、より造精機能障害のつよい症例でも、内分泌療法の方が妊娠が期待できると考えられた。

2. 手術療法—精索静脈瘤—

岩本晃明 (聖マリアンナ医大)

藤沢市民病院泌尿器科不妊外来で経験した精索静脈瘤症例のうち、精子濃度2000万以下を示した乏精子症に対して、精索血管高位結紮術を行ない、以下の結果を得た。

術後、何らかの精液所見の改善例は、67.6%にみられた。活動精子率の改善の方が早くみられたが、1年半にて改善した症例の90%以上が精子濃度も改善した。術後の妊娠率は50%であった。術前の精子濃度1000万以下の症例でも45%に妊娠した。妊娠までの期間は最短2か月目に、遅い例では3年7か月後に妊娠した。術後6か月以内に30%、12か月以内に56%の症例が妊娠した。妊娠例は術後の精液所見が改善した症例に多くみられたが、精索静脈瘤の程度、精巣のサイズ、内分泌学的検査、そして術前の精液所見より予後の判定を行なうのは困難であった。手術後精液所見が改善してこない症例が30数%みられることから今後手術適応の検討が必要である。さらに精索静脈瘤が不妊を引き起こす機序について今後の研究課題である。

3. 精子洗浄濃縮による AIH と HIT

小林俊文 (慶応義塾大)

精子性状不良による低妊孕性症例のAIHに供する精子調製法として具備すべき条件は、1)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)方法の簡便性などである。この目的に適した精子洗浄濃縮法として、我々はpercollを用いた撹拌密度勾配法を開発した。本法は射精液全量を80%percoll6.0mlに層積しL型撹拌棒で数回撹拌後遠心分離する方法である。

本法を通常のAIHで妊娠し得なかった98例を含む152例に応用し47例(31%)に妊娠成立をみた。また従来oligospermiaには応用の困難であった凍結保存も精子洗浄濃縮、精子保存液の改良(KS-2保存液の開発)、錠剤化凍結法の開発等により可能となり、凍結融解後、原精液よりむしろ良好な精子性状を保持し得ることを明らかにした。この洗浄濃縮—錠剤化凍結法を従来の方法でAIHを10~31周期施行し妊娠成立しなかった60例に臨床応用し10例に妊娠をみた。また、新しいAIHの方法として卵管内に直接精子を注入するHIT法の臨床応用により妊娠成功例4例を得ている。

4. GIFTの適応と成績

小林善宗 (東海大)

乏精子症の問題点は、卵管内精子輸送障害が多いこと、精子受精能力(ZSPT検査)で異常(ZSPT<30%)、あるいは陰性(ZSPT0%)が多いこと、の2点であり、これが不妊の予後を悪化させている原因である。

1989年2月までの当科におけるGIFT(187例・224回・49妊娠・妊娠率20.1%)では、48例が乏精子症(精子数 $\leq 20 \times 10^6/\text{ml}$)であり、妻平均年齢33.4歳、平均不妊期間8.3年、AIH回数平均18.1、平均ZSPT40.4%であった。48例の乏精子症に69回のGIFTを行ない、10妊娠(14.5%)であった。これは乏精子症のない症例のGIFT妊娠率22.3%(39/155)より低かった。しかし、乏精子症GIFT成績でZSPT異常の妊娠率は7.1%(3/42)に過ぎず、ZSPT正常・中間群の25.9%(7/47)より有意に低かった。乏精子症のGIFTの成績は、ZSPT異常がなければ良好であった。

5. Microfertilizationの応用

小田原靖 (慈恵医大)

IVF-ETは男性不妊の治療法として広く用いられているが、その成績はいまだ満足すべきものではない。その主なる原因は低受精率にあると考えられる。受精成立後の卵の発育能が精子機能により低下することがないとするれば、受精率の向上は男性因子患者のIVF妊娠率を向上させるための重要な鍵と考えられる。

受精率の向上を目的とした顕微操作として①透明膜切除法(Zona Opening)、②精子の卵卵腔内注入(SIPVS)が現在までに発表されている。われわれが行なったZona Opening法は、ガラス製マイクロフックを用いて透明膜の一部に裂孔を作製するもので、マウスを用いた実験では、低濃度精子下での体外受精率の向上が明らかとなり、胚移植後の出生率も正常であった。ヒト卵を用いた実験でも受精率の向上が認められた。本法および精子卵卵腔注入法は海外ではすでに妊娠例も報告されており、今後の臨床応用が期待される。

第 27 回 日本不妊学会中国四国地方部会

日 時：平成元年 7 月 22 日（土）
場 所：徳島パークホテル

**1. 原発性無月経 60 名の細胞遺伝学的、
臨床的検討**

上田克憲・児玉尚志・三春範夫
大浜紘三・藤原 篤
(広島大産婦)

原発性無月経の原因として、性管の分化異常とともに性染色体の異常が大きな比重を占めることが知られている。そこでわれわれは、主として細胞遺伝学的な点から原発性無月経症例の検討を行なった。

その結果、1979 年 4 月より 1989 年 3 月までの 10 年間に、当科で染色体分析を行なった原発性無月経（満 16 歳以上）60 名のうち、正常女性核型（46, XX）を示した者は 39 名（65.0%）で、その他ターナー症候群の核型を示した者が 11 名（18.3%）、46, XY が 7 名（11.7%）、45, X/46, XY が 3 名（5.0%）であった。なお、ターナー症候群の核型では、45, X が 5 名、45, X/46, XX と 45, X/46, X, i (Xq) が各々 2 名、46, X, i (Xq) と 44, X, t (13 q 14 q) が各々 1 名であった。

一方、理学的所見、内分泌学的所見、腹腔鏡による性腺の組織学的所見などより、46, XX 例のうち 8 名が腔欠損症、1 名が副腎性器症候群と診断された。また、46, XY 例のうち性腺形成不全症と睾丸女性化症候群が各々 3 名であり、45, X/46, XY 例のうち 1 名が混合型性腺形成不全症であることが確認された。なお、46, XY 性腺形成不全症の 1 名は胚細胞腫瘍の発生のため腫瘍摘出術を受け、睾丸女性化症候群の 1 名は予防的な性腺摘出術を受けた。

以上より、原発性無月経患者（満 16 歳以上）の約 1/3 には性染色体の異常が認められ、さらに異常例の半数は性腺腫瘍発生の可能性がある Y 染色体を持つ例であることが判明した。

2. 乳癌合併症例を含む早発閉経の 2 症例

白井孝昭・高橋健太郎・吉野和男
草刈万寿夫・内田昭弘・江田芳美
北尾 学 (島根医大産婦)

早発閉経と臨床的に診断された 2 症例で、そのうち 1 症例に乳癌を合併した症例を経験したので報告する。

症例 1：32 歳、初経 12 歳で周期は 1 カ月～12 カ月と不規則、21 歳時妊娠 3 カ月で人工妊娠中絶、24

歳初婚、27 歳離婚、29 歳で再婚し挙児希望にて来院。身長 163 cm、体重 51 kg、血中 LH：120 mIU/ml、FSH：89 mIU/ml、PRL：15 ng/ml、 E_2 ：<10 pg/ml、testosterone：49.5 ng/dl、染色体検査 46XX inv (9 p + q-)。LH-RHtest では high good pattern、LH の 15 分毎の pulse では 134～156 IU/ml の間で変動した。腹腔鏡検査で子宮は鶏卵大で正常、両側卵巢はやや atrophic で streak gonad like pattern を呈していた。続発性第 1 度無月経であり、clomiphene または HMG-HCG 療法を施行するも反応がなく、Kaufmann 療法を施行中 3 クール目に右乳房のしこりに気づき精査の結果、進行期分類は stage II、 $T_2 N_0 M_0$ 、組織は infiltrating duct cell carcinoma にて手術を施行した。

症例 2：30 歳、初経 13 歳で周期は不整、27 歳で結婚し挙児希望にて来院。身長 162 cm、体重 53 kg、血中 LH：160 mIU/ml、FSH：140 mIU/ml、PRL：16 ng/ml、 E_2 ：20.9 pg/ml、testosterone：90 ng/dl、LH-RHtest では high good pattern であった。腹腔鏡検査で子宮は鶏卵大で正常、両側卵巢は streak gonad の状態であった。第 2 度無月経の状態であり、現在 Kaufmann 療法を施行中である。

**3. Hypothalamic hypogonadotropic
hypogonadism 婦人における TRH による
gonadotropin 分泌の促進**

武本幹彦・近藤 肇・樋口和彦
吉田順一・森下 一・青野敏博
(徳島大産婦)

(目的) TRH は下垂体前葉より TSH のみならず PRL も放出させることはよく知られているが、gonadotropin 分泌に対する作用は未だ判然としていない。また若年性原発性甲状腺機能低下症の一部では早発思春期が生じるが、その機序については不明である。思春期前の少女は hypothalamic hypogonadotropic hypogonadism の状態である。そこでわれわれは hypothalamic hypogonadotropic hypogonadism の状態において TRH が gonadotropin 分泌にどのような作用を及ぼすかを検討した。

(方法) 5 例の hypothalamic hypogonadotropic hypogonadism の婦人および 10 例の正常月経周期 7 日目の婦人に TRH (500 μ g) を静注し、注射前、注射後 15, 30, 60 分に採血し、血清中 LH, FSH, TSH, PRL の濃度を測定した。なお血清 estradiol 濃度は注射前のみ測定した。

(成績) 1) 血清 LH, FSH 濃度は TRH 投与により、正常婦人では変動を示さなかったが、hypothalamic

hypogonadotropic hypogonadism の婦人では LH, FSH とともに注射後 15, 30, 60 分に有意に上昇した。2) 血清 TSH, PRL 濃度は TRH 投与により、両群とも有意に上昇し、TSH の反応は両群間に差異はなかったが、PRL の反応は hypothalamic hypogonadotropic hypogonadism の婦人が正常婦人に比し低反応を示した。

(結論) hypothalamic hypogonadotropic hypogonadism の状態では、TRH は下垂体前葉よりの gonadotropin 分泌を促進させることが明らかとなり、原発性甲状腺機能低下症における早発思春期との関連が示唆された。

4. 内因性摂食調節物質 2-buten-4-olide の視床下部・下垂体・卵巣系への影響

斎藤誠一郎・井川 洋・松崎利也
植田敏弘・漆川敬治・安川敏之
兼松豊和・東敬次郎・苛原 稔
青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) ラットを絶食させると血中に増加する内因性有機酸 2-buten-4-olide (2-B4O) が神経性食摂不振症 (AN) の摂食行動異常の原因である可能性が示唆されている。今回われわれは、2-B4O の視床下部・下垂体・卵巣系に及ぼす影響について検討を行った。

(方法) ラットに体重 1 kg あたり 30 mg, 100 mg の 2-B4O を約 2 週間、連日腹腔内投与した。各ラットの体重、膣スミアを毎日観察し、投与終了時に断頭し、下垂体、卵巣、子宮の重量と血中 LH を測定した。更に、ラットの視床下部・下垂体の還流系を用いた *in vitro* の実験系に 100 μ M の 2-B4O を還流し、流出液の LH 濃度を測定することにより、2-B4O の視床下部・下垂体系への直接作用について検討を行った。

(成績) 100 mg/kg の 2-B4O を腹腔内投与した群では、体重増加の著明な抑制は認められなかったが、全例で性周期が不規則になった。下垂体重量は 100 mg 群で 9.7 ± 0.15 mg と対照群 (11.5 ± 0.79 mg) に比し有意 ($P < 0.02$) に軽量であった。*In vitro* の実験系では 2-B4O は下垂体からの LH の基礎分泌には影響を与えなかったが、LH-RH の刺激による LH 放出は、対照群で 407 ± 66 % の増加を示したのに対して、2-B4O 群での増加は 180 ± 47 % と、LH の放出が有意 ($P < 0.05$) に抑制された。

(結論) 2-B4O が視床下部・下垂体・卵巣系を抑制することが明らかとなり、2-B4O は AN における摂食異常のみならず月経異常の発現にも関与している可能性が示唆された。

5. インシュリン様成長因子 (IGF) が視床

下部・下垂体・卵巣系に及ぼす作用の検討

兼松豊和・井川 洋・斎藤誠一郎
松崎利也・漆川敬治・植田敏弘
東敬次郎・苛原 稔・青野敏博

(徳島大産婦)

(目的) 下垂体前葉細胞には、細胞成長因子の一種であるインシュリン様成長因子 (insulin-like growth factor; IGF) のリセプターが存在しているが、その意義は不明である。そこで、IGF が視床下部下垂体卵巣系に及ぼす作用について検討するため、Wistar 系雌ラットを用いた視床下部下垂体連続還流系により実験を行った。

IGF-I, 20 および 200 ng/ml の還流は、視床下部下垂体または下垂体単独からの LH 基礎分泌に有意の影響を及ぼさなかった。しかし、IGF-I, 200 ng/ml の存在下での LHRH 2ng/ml による LH 分泌刺激後は、基礎値を 100 % とした場合 1165.6 ± 145.8 % に達し、対照群での LHRH 2ng/ml による LH 分泌刺激後の 506.4 ± 61.4 % に比して有意に高値であった。

以上の成績より、*in vitro* において、IGF-I は比較的低濃度の LHRH に対する下垂体の感受性を高めることが分かった。このことより、*in vivo* においては、生理的濃度の IGF-I が視床下部下垂体の LH 分泌機能の一部に関与している可能性が示唆された。

6. 正常成熟婦人における夜間メラトニン分泌動態および prolactin 分泌動態との関連について

岡田真尚・岡谷裕二・相良祐輔
(高知医大産婦)

(目的) Melatonin (Mel) は松果体で合成される活性アミンで、夜間に分泌が亢進する日内変動が明らかにされている。一方 Prolactin (PRL) 分泌についても夜間に増量する日内変動が明らかにされているが、Mel-PRL の関連については未だ明確ではない。そこで今回 Mel の夜間分泌動態を明らかにすると同時に、PRL の分泌動態との関連について検討した。

(方法) 正常月経周期を有する婦人 (23~27 歳) 10 例を対象とし、卵胞期 7 日目に 20 時から翌朝 8 時まで 2 時間毎に採血した。明暗条件は 21 時に消灯し、6 時に点灯起床させた群 (I 群, $n = 6$)、明条件のまま 2~3 時に就眠した群 (II 群, $n = 4$) に分けて検討した。

(成績) I 群では血中 Mel は 22 時より増量し、平均

値のピークは2時で 118.7 ± 30.2 pg/ml で以後減少した。PRL 濃度は22時より増量し、平均値のピークは4時で 32.2 ± 19.0 ng/ml を示し以後減少した。各時刻の PRL 値の20時値に対する% change 値と、2時間前の Mel 値の間には有意の正の相関が認められた。II 群では Mel は就眠後増量し、平均値のピークは4時で 38.9 ± 30.9 pg/ml を示し以後減少した。PRL 濃度は2時までは増量は示さず、就眠後増量し、平均値のピークは6時で I 群と同様に Mel のピーク時刻より2時間遅れていた。以上の成績から夜間に増量する Mel は下垂体からの PRL 分泌に対しては促進的に作用する可能性が強く示唆された。

7. 排卵障害治療後妊娠の産褥における性機能の回復

松崎利也・井川 洋・斎藤誠一郎
植田敏弘・兼松豊和・東敬次郎
苛原 稔・青野敏博 (徳島大産婦)

無排卵による不妊婦人がクロミフェンや hMG-hCG 療法により妊娠した場合、その妊娠の終了後に自然排卵し再び妊娠することがある。どの程度の頻度でこの現象が認められるかに関して多数例について検討した。

対象は正プロラクチン血性無排卵症患者で、クロミフェンまたは hMG-hCG 療法により妊娠し、終了後に次回の妊娠を希望した婦人 199 例で、初回妊娠終了後、自然排卵の起こった症例が認められた。自然排卵が起らなかった症例に対しては再び排卵の誘発を図った。これらの症例について2回目妊娠率の検討、2回の妊娠での流産率の比較を行なった。

1 回目の排卵誘発剤の種類別に、2 回目の妊娠率を検討したところ、妊娠終了後の自然排卵妊娠はクロミフェン群では約 45 % と高率に認められ、hMG-hCG 群でも約 15 % と予想以上に率が高かった。自然排卵のなかった症例には排卵誘発剤を用いたが、妊娠した例では1回目の排卵誘発時と比べ、短期間で妊娠した。排卵誘発後の初回および2回目の妊娠の転帰を比較したところ、流産率は2回目の妊娠のほうが有意に低率であった。なお2回目の妊娠の流産率は排卵誘発の有無や薬剤の種類に関係なく、一般の率と差が無かった。また2回目の妊娠の転帰は1回目の妊娠の転帰に影響を受けなかった。

以上の成績より、無排卵症患者が妊娠を経過すると性機能が改善されること、さらに2回目の妊娠は良好な経過を辿る可能性が高いことがわかった。

8. 多嚢胞卵巣の経腔超音波断層法による診断および高 androgen 血症との関連性について

吉野和男・高橋健太郎・江田芳美
永田裕子・白井孝昭・北尾 学
(島根医大産婦)

多嚢胞卵巣の形態学的診断に超音波断層法が利用されている。しかし、超音波学的に多嚢胞卵巣を認めても正常月経周期である症例や異常月経周期である症例がみられる。そこで今回、経腔超音波断層法にて両側に多嚢胞卵巣を認めた25例を対象とし、正常月経周期群 (PCO 群 8 例)、異常月経周期群 (PCOS 群 17 例) に分け、また、卵巣に多嚢胞を認めず正常月経周期である9例を対照 (control 群) とし、多嚢胞卵巣症候群の内分泌学的特徴である高 androgen 血症について比較検討した。

測定項目は血中 testosterone (T)、free-testosterone (free-T) および sex hormone-binding globulin (SHBG) である。

結果として1) 血中 T は PCOS 群が 99.7 ± 35.9 ng/dl であり、PCO 群 (74.8 ± 3.8 ng/dl)、control 群 (66.0 ± 12.6 ng/dl) に比べて有意に高い値であった ($P < 0.01$)。2) 血中 free-T は PCOS 群が 1.90 ± 0.84 pg/ml であり、PCO 群 (0.98 ± 0.13 pg/ml)、control 群 (0.98 ± 0.21 pg/ml) に比べて有意に高い値であった ($P < 0.001$)。3) 血中 SHBG は PCOS 群が 87.4 ± 42.3 nmol/l であり、PCO 群 (125.0 ± 50.8 nmol/l)、control 群 (101.4 ± 29.6 nmol/l) と比べてやや低い値であった。

以上のことより、経腔超音波断層法で多嚢胞卵巣を認めても正常月経周期の有無により androgen 動態は異なることが示唆された。

9. 経腔超音波による endocervical echo および endocervical cavity の観察の有用性について

草刈寿夫・高橋健太郎・山崎裕行
内田昭弘・江田芳美・永田裕子
吉野和男・北尾 学
(島根医大産婦)

経腔超音波を用いて不妊患者の endocervical echo および endocervical cavity の観察を行い、頸管粘液スコアおよび尿中エストロゲン値と比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

当科不妊・内分泌外来患者 31 名 35 周期 (無治療群: 7 名 8 周期、クロミフェン群: 14 名 16 周期、HMG 群: 10 名 11 周期) について経腔超音波による頸管の観察を行ない、縦断面での endocervical echo

および endocervical cavity の厚さを計測した。同時に頸管粘液スコア、尿中エストロゲンの計測を行った。一方、endocervical echo の超音波測定の正確性を確認するために月経周期の規則的な子宮筋腫患者20名において、子宮摘出前に経腔超音波による endocervical echo の計測を行ない、術後に摘出子宮の頸管内腔の厚さを肉眼的に計測し両者を比較検討した。

子宮筋腫患者における経腔超音波による endocervical echo の厚さと肉眼的な計測による頸管内腔の厚さとの間には有意な正の相関関係が認められた。不妊症患者における endocervical echo の厚さと頸管粘液スコア、尿中エストロゲン値との間には有意な正の相関関係が認められた。endocervical echo と endocervical cavity の間には有意な正の相関関係が認められた。

以上の事から、不妊症患者における endocervical echo および endocervical cavity の計測は排卵管理の際の補助診断の一つとなる可能性が示唆された。

10. 当科不妊外来における腹腔鏡検査の統計

山崎裕行・高橋健太郎・吉野和男

内田昭弘・草刈万寿夫・江田芳美

永田裕子・白井孝昭・北尾 学

(島根医大産婦)

当科においては、不妊症患者の検査および治療を目的として腹腔鏡を施行しており、その臨床的統計を検討した。

昭和58年7月より平成元年4月までに131名に腹腔鏡を施行し、不妊症患者はそのうち86名であった。腹腔鏡施行前後で不妊原因の診断が異なったものは、子宮筋腫17例、卵管閉塞16例、子宮内膜症12例、卵管および卵巣周囲癒着7例、多嚢胞卵巣症候群7例、子宮發育不全3例、性器奇形2例であった。腹腔鏡検査にて新たに確認されたものは子宮筋腫が最も多く、否定されたものは卵管閉塞が最も多かった。腹腔鏡施行後の妊娠は86名中24名に認められ、妊娠症例の腹腔鏡施行後の診断では、子宮筋腫が最も多かったが、性器奇形も3例認められた。また妊娠症例で腹腔鏡施行時またはその後、子宮筋腫切除等の手術的操作を行ったものは5例であった。

以上より、腹腔鏡で得られる情報は多く、不妊症の診断および治療には欠かせないものと考えられる。

11. 原因不明不妊の現状と取扱いに関して

植田敏弘・井川 洋・斎藤誠一郎

松崎利也・漆川敬治・安井敏之

西田莊哉・兼松豊和・加川俊明

東敬次郎・苜原 稔・山野修司

青野敏博

(徳島大産婦)

(目的) 今回われわれは、原因不明不妊の管理指針を設定する目的で、不妊治療施設に対してアンケート調査を行ない、わが国における原因不明長期不妊に対する治療の現状を調査、分析したので報告する。
(対象と方法) 厚生省の研究班に所属する5大学に対して、アンケート調査を実施し回答で得られた334例の成績を分析した。

(結果) ①全不妊症に占める原因不明不妊の頻度は、13.5%であり、その不妊期間は6年以内が68.6%を占めた。②原因不明不妊に対しては人工授精、過排卵誘発、性交日の指導などが行なわれ、それぞれの治療別妊娠率は15~20%であった。また、妊娠症例の治療期間は3年以内が96.1%であった。③全施設で原因不明不妊に対する腹腔鏡の有用性を認めたが、その適応、あるいは実施時期は様々であった。なお、腹腔鏡後、平均1年以内に13.5%の症例で自然妊娠の成立がみられた。④全施設で原因不明不妊に対してGIFT法あるいはIVF-ET法を実施していたが、その妊娠率はGIFT法で16.2%、IVF-ET法では21.4%であった。

(結論) 原因不明不妊の取扱いに関しては、まず人工授精、過排卵誘発、性交日の指導などの一般的な治療法を3年間実施し、それでも妊娠しない症例に対しては、GIFT法あるいはIVF-ET法を適用することが適当であると考えられた。なお、原因究明のためおよび術後の自然妊娠も期待できることから、腹腔鏡検査の実施は原因不明不妊の治療に有用であると考えられた。

12. 妊娠成功周期の排卵期内分泌動態の分析

南 晋・鎌田正晴・高柳 真

(香川県立津田病院産婦)

前川正彦・奈賀 修

(徳島県立三好病院産婦)

われわれは原因不明不妊症患者に対して、種々の排卵誘発により排卵をコントロールし、タイミング指導またはAIHを行なってきた。今回、妊娠成功例を対象に、その妊娠成功周期と非妊娠周期の排卵期内分泌動態について比較検討した。

対象は妊娠成功例8例37周期で、clomid、HMG

または clomid+HMG で卵胞刺激後、最大主卵胞が 20 mm を越えた日に HCG 投与し(-1 日)、翌日タイミング指導または AIH を行なった(0 日)、非妊娠周期を-1 日の LH 値が 60 mIU/ml 以上である高 LH 群と、60 mIU/ml 以下である低 LH 群に分け、妊娠周期との 3 群で、-1 日、0 日、+1 日の血中 estradiol (E_2)、progesterone (P) を測定し、以下の結果を得た。

1) 高 LH 群は妊娠群に比し E_2 が早く低下し、逆に P は高値を示した。一方、低 LH 群では E_2 と P は妊娠群と同様のパターンを示した。

2) 3 日間の P/ E_2 は、それぞれ妊娠群が 1.32 ± 0.23 (mean $\pm$ SE, $n = 8$), 4.06 ± 0.47 ($n = 8$), 24.47 ± 4.71 ($n = 7$)、高 LH 群では 3.31 ± 0.43 ($n = 8$), 11.97 ± 2.21 ($n = 9$), 35.98 ± 10.17 ($n = 7$)、低 LH 群では 1.56 ± 0.3 ($n = 20$), 4.10 ± 0.45 ($n = 20$), 15.54 ± 4.37 ($n = 15$) であった。高 LH 群では、妊娠群の-1 日、0 日、低 LH 群の-1 日、0 日、+1 日に比し有意に高値を示した ($P < 0.05$)。一方低 LH 群では-1 日と 0 日で、妊娠群と同様の変化を示したが、+1 日で妊娠群より低い傾向がみられた。

13. Danazol 療法の副作用—体重増加の検討—

平野由紀夫・名越一介・友国弘敬
木山智之・野間 純・安藤尚子
鈴木康之・吉田信隆・林 伸旨
関場 香 (岡山大産婦)

(目的) Danazol 療法に伴う副作用の一つに体重増加があげられる。今回、子宮内膜症 Danazol 投与例に 4 週毎の体重測定を行ない、体重増加の程度、頻度、予後を検討した。

(方法) 昭和 62 年 9 月から昭和 63 年 8 月の期間に当院および関連病院において Danazol 400mg/day を投与し、体重変動の解析が可能であった 85 例を対象として、投与前、投与開始より 4 週毎、投与終了後 4 週・8 週に体重を測定した。

(成績) 体重増加が 1 kg 以上あった症例は、投与 4 週後では 74 例中/60 例 (81%)、8 週後では 77 例中/69 例 (90%)、12 週後では 79 例中/74 例 (94%)、16 週後では 68 例中/58 例 (85%) であった。また 3 kg 以上の体重増加は、4 週後では 74 例中 9 例 (12%)、8 週後では 77 例中 22 例 (29%)、12 週後では 79 例中 42 例 (53%)、16 週後では 68 例中 33 例 (49%) であった。体重増加 3 kg 以上症例の体重は、投与前 49.4 ± 6.9 kg (mean $\pm$ SD)、4 週後 49.4 ± 6.9 kg、8 週後 50.7 ± 6.7 kg、12 週後 52.1 ± 6.9 kg、16

週後 52.9 ± 7.1 kg であった。投与終了 4 週後に投与前体重以下に復した症例は 47 例中 15 例 (32%) で、投与終了 8 週後では 45 例中 16 例 (36%) であった。(結論) Danazol 投与による体重増加は、1 kg 以上は 95% の症例に認められ、3 kg 以上では 60% の症例に認められた。投与終了 8 週後までに投与前体重以下に復した症例は 36% であった。

14. 高プロラクチン血症におけるブロモクリプチン療法

新谷敏昭・北川博之・越智 博
矢野浩史・杉並 洋・松浦俊平
(愛媛大産婦)

ブロモクリプチン (以下 Br) を投与することにより妊娠した高プロラクチン血症のうち経過を追うことのできた 11 症例 (16 妊娠) について報告する。

治療前のプロラクチン (以下 PRL) の値は 30-300 $\uparrow$ ng/ml を示し BBT で排卵は認められなかった。Br 投与により PRL 値は 1 例を除きすべて正常化した。11 例中 6 例 (54.5%) は Br 単独投与により、3 例 (27.2%) はクロミフェン併用により、2 例 (18.2%) は hMG-hCG 併用により妊娠した。hMG-hCG の必要であった症例ではゴナドトロピンの分泌低下が認められ、クロミフェンの必要であった症例ではやや FSH 値が低い傾向がみられた。Br 投与開始後 2-12 カ月で妊娠が成立し、妊娠確認後直ちに Br を中止した。血中 PRL 値はほとんどの症例で急激に上昇したが、症状 (頭痛、視野狭窄等) の出現した 2 例 (12.5%) のみに Br 投与を再開し、他症例は経過観察のみとした。妊娠例のうち正期産 10 例、早産例 1 例、自然流産例 3 例、妊娠継続中 2 例であり、出生児に異常は認められなかった。授乳期における PRL 値は、Br 投与前の値より低値を示す傾向がみられた。高 PRL 血症患者が妊娠を望む場合 Br の投与は非常に有効であるが、Br で無排卵の症例も排卵誘発剤の併用により一層高い排卵率妊娠率を得ることができる。特にゴナドトロピン値の低い症例では排卵誘発が必要であると思われた。また、妊娠中は症状の出現しない限り必要ないと思われた。

15. clomiphene citrate 投与周期における hCG 投与の必要性に関する検討

片山隆章・新谷恵司・名越一介
平野由紀夫・多賀茂樹・吉田信隆
関場 香 (岡山大産婦)

(目的) clomiphene citrate (CC) は高い排卵率を有する誘発剤として汎用されている。この薬剤の使用

方法としてCC単独療法と、hCGを付加するCC-hCG療法があるが、今回われわれはhCG投与が必要であるか否かを検討した。

(対象)対象は月経終了直後より経日的に経膈超音波による卵胞の観察、血中LH、FSH、estradiol、progesteroneを測定した17例19周期であり、そのうち自然排卵例は12例12周期、CC投与例は5例7周期であった。

(結果)自然排卵例はいずれもLHサージを有し、排卵前日の最大卵胞平均径(1)は 19.5 ± 2.53 mmであった。CC単独により排卵を認めたのは3周期で、これらもLHサージを有し、排卵前日の1は22.3 mm、26 mm、28 mmと自然排卵例に比べて大きく、28 mmの例では黄体期は7日間と短かった。また他の1例は1 = 29 mmにてLHサージを認めたが排卵せず、さらに卵胞径が増大した4日後hCG投与により排卵したが、黄体期は9日間と短かった。そこでその後は1 = 20 mmでhCGを投与したところ、黄体期は12日間以上続いた。

(結論)CC単独療法では、十分な卵胞の発育とLHサージを認めるにもかかわらず排卵しない例がある。これらにhCGを投与すれば排卵するが、卵胞が大きくなり過ぎた時点で投与すると黄体期が短縮する。そこでCC投与時には、最大卵胞平均径20 mmとなった時点でhCG投与が必要であると考えられた。

16. 当科における配偶者間人工授精の検討

内田昭弘・高橋健太郎・江田芳美

永田裕子・吉野和男・北尾 学

(島根医大産婦)

配偶者間人工授精(AIH)は男性不妊症の治療法として広く行なわれているが、実際にはその妊娠率はあまり高いものではない。今回、当科におけるAIH施行症例を検討し若干の知見を得たので報告する。

対象は昭和61年4月から平成元年3月までに島根医科大学附属病院産科婦人科不妊・内分泌外来においてAIHを施行した84例、353周期とした。

AIHによる妊娠は、12例、15周期に認められ、妊娠率は対象症例当たり14.3%、施行周期当たり4.2%であった。妊娠症例について検討してみると、妊娠に至るまでのAIH施行回数が5回以内であった症例が11例(91.7%)、14周期(93.3%)であった。そこで、6回以上のAIHを施行しても妊娠に至らない症例を非妊娠群(19例)として、妊娠群との比較を行なった。

その結果、妊娠群と非妊娠群の間には一般精液検査においては有意な差は認められなかった。しかし、

各群の不妊原因について検討してみると、妊娠群において男性因子および女性因子の合併症例は3例(25.0%)であったが、非妊娠群においては合併例は12例(63.2%)で有意に高率であった。以上の結果からAIHの実施時期に問題がなければ5回以内に妊娠に至る可能性が高く、もし妊娠に至らない場合には何らかの女性因子を合併している可能性があり、その検索を行ない、それらの結果をふまえた上で子宮鏡下人工授精、配偶子卵管内移植法および体外受精胚移植法などの新しい治療法を試みる必要があると思われた。

17. IVF-ETやGIFTのための迅速血中

ホルモンによる卵胞期管理

関島秋男・杉本伴芳・岩部富夫

大野原良昌・谷川正浩・寺戸博文

原田 省・戸田稔子・菊川章仁

見尾保幸・前田一雄(鳥取大産婦)

体外受精・胚移植(IVF-ET)・配偶子卵管内移植(GIFT)において、妊娠率の向上のためには、質の高い多数卵の回収や、poor responderやabnormal responderに対する至適卵巣刺激法の選択および卵胞期管理が極めて重要となる。そこで当科では、IVF-ETおよびGIFTプログラムにおいて卵胞期管理の指標とするために、RIA法を用いて迅速血中ホルモン測定を試み、その結果を検討した。

卵胞刺激方法は、クロミフェン+HMG療法をStandard regimeとし、さらにFSH+HMG療法およびGnRH analog+HMG療法の3種である。いずれの周期も、初期より血中Estradiol、Progesteroneを隔日または連日RIA法により迅速に測定し、その測定値と超音波断層法による卵胞径計測値とにより、HCG投与時期および採卵時期を決定した。Standard regimeにてpoor response、abnormal responseを示したものはcancellとし、次周期からFSH+HMG療法またはGnRH analog+HMG療法に順次変更した。これらの血中ホルモン値と卵胞径計測値とを指標として卵胞刺激周期管理を行なうことにより、至適卵胞発育およびnatural LH surgeやpremature luteinizationの発生を的確に把握できることから、IVF-ETやGIFTプログラムにおける血中ホルモン迅速測定法の導入は、その成績向上のために極めて有用と考えられ、現在までの当科における刺激法別血中ホルモン動態・採卵数・受精率・妊娠率の比較検討と共に考察を加えて報告したい。

18. GnRH agonist-HMG-HCG 卵巣

刺激法による IVF-ET の成績

西田莊哉・村山眞治・山口圭三
加川俊明・山野修司・松下光彦
青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) Premature LH surge による早期黄体化を予防するため、最近、体外受精・胚移植法 (IVF-ET) の卵巣刺激法に、GnRH agonist (GnRHa) が併用されるようになってきているが、その評価は定まっていない。今回われわれは GnRHa の IVF-ET における採取卵数・受精率・分割率および妊娠率に及ぼす影響を検討するため、GnRHa-hMG-hCG 法と従来の hMG-hCG 法の成績を比較検討したので報告する。

(方法) 対象は、GnRHa-hMG-hCG 法 (A 法) で IVF-ET を施行した両側卵管閉塞症例 15 例と、従来の hMG-hCG 法 (B 法) で IVF-ET を施行した 18 例である。A 法では GnRHa (Buserelin) 600 μ g/日を治療前周期の高温相 7 日目より投与開始し、hCG 投与前日まで連日経鼻投与した。hMG-hCG 投与法は、A 法・B 法とも同様の方法で行ない、hCG 投与時期は最終 hMG 投与の 50 時間後とした。卵採取法・体外受精法・胚移植法は、以前に述べた方法で行なった。

(成績) 平均採取卵数は、A 法で 3.9 個、B 法で 4.1 個であり、うち平均成熟卵数は両法とも 3.7 個であった。また過熟卵の率は、それぞれ 0%、6.8% であった。受精率・分割率は、A 法で 67.2%・56.9%、B 法で 68.5%・49.3% であり、1 人あたりの移植胚数は A 法で 2.2 個、B 法で 2.0 個であった。また、胚移植あたりの妊娠率は、A 法で 14.3% (2/14)、B 法で 13.3% (2/15) であり、両者間に有意差を認めなかった。

(結論) GnRHa の投与により分割率が上昇する傾向がみられたが、妊娠率は従来の方法と変わらなかった。

19. 体外受精および胚移植における黄体期補充療法の検討

新谷恵司・片山隆章・平野由起夫
多賀茂樹・名越一介・吉田信隆
関場 香 (岡山大産婦)

(目的) 体外受精および胚移植においては、一般的に排卵刺激法が用いられている。そして、黄体期に対する補充療法の必要性が問題となっている。われわれは排卵刺激周期において早期に黄体ホルモンが減少し、黄体期後期に補充療法が必要であることを示

した。今回は hCG を用いた黄体期の補充療法について比較検討した。

(方法) 当科において昭和 63 年 11 月から平成元年 3 月までに体外受精および胚移植を行なった 20 例 (うち妊娠例 4 例) のうち、排卵刺激方法としてはクロミッドー hMG 法を用いた 8 例とした。採卵を行なった日を day 0 として、そのうち 3 例に対しては黄体期前半 (day 1, 3, 5) に hCG3000IU を投与 (A 群)、5 例に対しては黄体期全期間 (day 3 から 18) を通して 3 日毎に hCG 1000 IU を投与 (B 群) して、血中 estradiol (E_2)、progesterone (P) を測定比較した。

(結果) A 群・B 群ともに day - 4 から day 6 の E_2 および P の間に差は見られなかったが、day 9 から day 12 では A 群では B 群に比べてその減少が著しかった。特に P は A 群で day 6, 9, 12 で平均は 113, 37.7, 9.1 ng/ml と減少したが B 群では day 6, 9, 11 で平均 92, 68, 82 と減少を認めなかった。

(結論) 排卵刺激方法としてクロミッドー hMG 用いた場合、黄体期の補充療法として hCG の黄体期前半の投与法に比べて、血中 E_2 、P の急激な変化を防ぐ hCG 1000 IU の黄体期全体を通じての投与が優れた治療法であると思われた。

20. 体外受精・胚移植において ET に至らなかった症例の検討

村山眞治・加川俊明・出口圭三
西田莊哉・福家義雄・東敬次郎
中山孝善・山野修司・松下光彦
青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 体外受精・胚移植 (IVF-ET) の成功率を上昇させるために、ET に至らなかった症例の原因を検討した。

(方法) 対象は当科で clomiphene (CC) -hMG-hCG 刺激周期で IVF-ET を施行した両側卵管閉塞症例 88 症例である。症例を妊娠群 (P 群, 10 症例)、受精・分割はしたが妊娠に至らなかった群 (F+C+群, 58 症例)、受精はしたが分割しなかった群 (F+C-群, 9 症例)、受精しなかった群 (F-群, 11 症例) の 4 群に分け、体外受精施行周期における卵胞数、血中 estradiol (E_2)、progesterone (P)、LH 値を比較検討した。

(結果) 1) F+C-群では、血中 E_2 値は、全期間を通じて低値の傾向にあり、特に -1 日 (hCG 投与日: 0 日) では、他の 3 群に比し有意に低値を示した。また、卵胞数 (平均径 16 mm 以上) も少ない傾向にあった。F+C-群における血中 P 値は、0 日以降低値傾

向を示し、特に、+2日では他の3群に比し有意に低値を示した。2)F-群では、血中E₂値は-4日から+3日までの間P群およびF+C-群との間に有意な差は認めなかったが、1卵胞あたりの血中E₂値は、-2日から0日にかけて急激に減少し、0日には他の3群に比し有意に低値であった。血中P値は、0日でP群に比して有意に高値を示した。

(結論)精液所見が正常な場合、受精しない症例ではearly luteinizationの関与が、受精しても分割しない症例ではgonadotropin刺激に対する卵巣の低反応性との関連が示唆された。

21. 糖の受精系に及ぼす影響

森 一正・平野正志・大頭敏文
青野敏博 (徳島大産婦)
鎌田正晴

(香川県立津田病院産婦)

(目的)前回、D-mannoseが透明帯の静止認識部位の一部を構成し、静止をD-mannoseにより前処理すると受精が阻害されることを報告した。今回、各種の糖のヒト受精系に及ぼす影響を検討するとともに、その作用機序について検討を加えた。

(方法)1)受精に及ぼす影響は、swim up法により得られた活動精子を種々の糖(50 mM/L)を含むWhittingham's T6(T6)培養液で30分間前培養後、ヒト成熟卵を加え媒精し、6時間後に卵透明帯への結合精子、貫通精子数を調べた。2)同様にして得られた精子を糖(50 mM/L)を含むT6培養液で培養し、精子acrosome reactionの経時的変化をtriple stain法により検討した。

(結果)1)D-mannoseおよびD-fructoseで精子を処理した場合、精子の透明帯への貫通が阻害された。しかし、他の糖(D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine, L-fucose)には阻害作用を認めなかった。2)D-mannoseで培養した精子をswim up直後、1, 3, 6時間後に検討した結果、acrosome reactionを起こした生存精子の割合はコントロール群と差が無く、acrosome reactionには影響しなかった。一方、D-fructoseで培養した精子では、acrosome reactionを起こした生存精子の割合は有意に低下した($P < 0.05$)。

(結論)D-mannoseは精子と透明帯精子レセプターとの結合を拮抗的に阻害し、D-fructoseはacrosome reactionを抑制する可能性が示唆された。

22. 精子不動化抗体による受精阻害作用に関する研究

山崎 淳・坂東律雄・村山眞治
西田莊哉・森 一正・加川俊明
大頭敏文・山野修司・青野敏博
(徳島大産婦)

鎌田正晴

(香川県立津田病院産婦)

(目的)精子不動化抗体(SIAb)による受精阻害作用を解明するために、triple stain法を用いて、SIAbがacrosome reaction(AR)に及ぼす影響を検討し、ヒト卵透明帯貫通試験(ZPT)の結果と合わせて興味ある知見を得たので報告する。

(方法)7.5%正常婦人血清(control血清)あるいは7.5%SIAb陽性血清(SIAb血清)を含む培養液でswim upした精子をそれぞれ2分し、control血清あるいはSIAb血清を含む培養液内で培養を行ない、経時的に精子運動率測定およびARの観察を行なった。また、control血清およびSIAb血清より抽出したIgG分画を加えた0.5% HSA添加培養液を用いて同様の実験を行なった。さらに、これらの培養系を用いてZPTを施行した。

(結果)精子運動率および死滅精子数ではControl群とSIAb群に差は認められなかった。ARを起こした生存精子の割合は、Control群では培養時間とともに増加した($P < 0.05$)のに対し、SIAb群では増加が見られなかった。また、培養時間中にSIAb血清を含む培養液からcontrol血清を含む培養液に移した精子群では、ARの経時的増加が認められた($P < 0.05$)。SIAb血清のIgG分画を加えた培養液中ではARの経時的増加が見られなかった。ARの増加が見られなかったSIAb群のZPTでは透明帯への貫通精子を認めなかった。

(結論)SIAbはARの誘起を抑制することにより受精を阻害する可能性が示唆された。また、この抑制作用は可逆的であることが判明した。

23. 当科における精子不動化試験

永田裕子・高橋健太郎・内田昭弘
草刈万寿夫・吉野和男・北尾 学
(島根医大産婦)

不妊症原因の一つとして免疫性不妊は近年、重要視されるようになっておりIVF-ETなどの治療により妊娠に至る例もあるので、その診断が正しくなされれば、今まで原因不明で適切な治療がなされなかった症例も、妊娠に至る可能性がある。当科におい

ては不妊症外来必須検査項目として精子不動化試験を行っており、その成績について検討したので報告する。

対象は1988年1月から1989年4月までに島根医科大学産科婦人科不妊・内分泌外来を受診した71名とした。精子不動化試験はモルモット補体を使用した磯島等の発表した方法を用いた。71例中1例が本試験陽性を呈し、陽性率は1.4%であった。陽性を呈した1例は原発性不妊症のため当科で精査施行するも、原因不明の症例であった。しかし、Huhner testで頸管内運動精子が毎視野3匹であり、同時に施行した本試験でも陽性を呈した。本症例に対しては今後IVF-ETなどの治療を検討中である。本試験は操作も簡便で免疫性不妊の診断に有効な検査と推察された。

24. 習慣性流産における原因の検討— autoimmune and alloimmune—

北川博之・中橋徳文・新谷敏昭

矢野浩史・杉並 洋・松浦俊平

(愛媛大産婦)

当科不妊外来を受診した22名の習慣性流産患者(生児を得ることなく2回以上の流産の既往、または生児を得ているが3回以上の流産の既往)に対し染色体、子宮卵管造影、血液型、不規則抗体、自己免疫系、凝固系、HLAなどの検査を施行し流産の原因について検討を加えた。

3組の夫婦において染色体異常(転座2, 逆位1), 重複子宮, 外傷性頸管無力症をそれぞれ1症例認めた。不規則抗体は2症例において認められ、いずれもanti p1 antibodyであった。自己免疫系の異常(LE, anti DNA, anti nucleus etc)は11症例において認められ、うち2症例においては凝固系検査によりlupus anticoagulant (LAC)の存在が強く疑われた。22組のうちHLA A, B, C, DR locusが2個以上一致しているのは10/22 (45%) (3個以上が4症例), DR locusが1個以上一致している症例が6/22 (27%) (2個が1症例)であった。これらの一致率は無作為抽出のpairの一致率と有意の差を認めなかった。一方染色体、子宮奇形、不規則抗体、自己免疫系などに明らかな異常が認めない4症例においてのみHLAの一致率を検討するとA, B, C, DR locusが2個以上一致が4/4 (100%) (3個以上が2症例), DR locusが1個以上一致が4/4 (100%) (2個が1症例)であり、有意に一致率が高く、alloimmuneのメカニズムの関与が示唆された。

25. 卵胞壁破裂機序における plasminogen activator-plasmin 系の意義について

—特に *In vitro* ラット卵巣灌流系を用いて—
森岡信之・相良祐輔 (高知医大産婦)

(目的) 卵胞内 plasminogen activator (以下 PA) - plasmin 系の卵胞壁破裂機序における役割が注目されているが、その詳細は未だ明確でない。われわれは、未成熟ラット卵巣灌流系を確立し、卵胞壁破裂機序における PA-plasmin 系の意義について検討した。

(方法) 27日齢 Sparague-Dawley rat を用い、PMSG 20 単位投与 48 時間後に右卵巣—卵巣動静脈摘出し、Medium M 199 にて灌流した。PA と plasmin の阻害剤である trans-4-(aminomethyl)-cyclohexanecarboxylic acid (AMCHA) および ϵ -aminocaproic acid (ACA) を LH 0.1 μ g/ml + IBMX (0.2 mM) 添加 1 時間後に Medium 中に加え、排卵抑制効果を検討した。また、steroid および prostaglandin level を測定し、阻害剤の toxic effect の有無を検討した。

(成績) LH+IBMX 単独群の平均排卵数は 18.6 ± 0.9 ($n = 5$) であった。一方、AMCHA 0.005—5 mM 添加により、有意の Dose dependent な排卵抑制効果が認められたが、ACA 添加群 (1—5 mM) では、排卵は抑制されなかった。更に、卵巣の steroidogenesis および prostaglandin synthesis には、AMCHA の影響は認められなかった。

(結論) ACA と比べ、plasmin に対して極めて強い活性抑制効果を有する AMCHA にのみ、排卵抑制が認められたことから、AMCHA の排卵抑制効果は、plasmin 活性に対する抑制効果に基づく可能性を明らかにし、卵胞壁破裂機序において、plasmin 系が重要な生物学的意義を有する可能性を示唆した。

26. マウス体外受精実験系における添加蛋白として 臍帯血清の効果

谷川正浩・岩部富夫・関島秋男

大野原良昌・寺戸博文・戸田稔子

原田 省・見尾保幸・前田一雄

(鳥取大産婦)

(目的) ヒト体外受精、胚移植の添加蛋白として fetal cord serum (FCS) は広く用いられている。しかし FCS の胚発生に及ぼす効果に関する報告は様々で、いまだ不明な点も多い。今回、マウス体外受精実験系を用い FCS の受精、および初期胚発生に及ぼす影響を検討した。

(方法) マウス体外受精は F₁ (C 57 BL $\times$ CBA) 雌

マウスを過排卵処理し卵細胞を採取, 精子はF₁雄マウスの精巣上体尾部より採取し, 前培養の後, 媒精した。培養液は10% FCS 添加 BWB 培養液を用い, 対照として1 mg/ml BSA 添加 BWB 培養液を用いた。FCS の受精に与える影響を精子侵入期, 前核期に分けて検討するために, A群(BSAのみ), B群(媒精後0~6時間FCSの後BSA), C群(媒精後6~12時間FCSの後BSA), D群(媒精後0~12時間FCSの後BSA), E群(FCSのみ)の5群に分け各群での受精率, 胚発生率を比較検討した。

(結果)受精率は, D群, E群で高値を示した, blastocyst への発生率は, E群で低値を示した。

(考察)D群, E群で高い受精率を示し, FCS はマウス体外受精における受精, 前核期に促進効果を有する可能性が示唆された。またE群でblastocyst 発生率は低値を示し, FCS は受精後の胚発育に抑制的に作用すると考えられた。

(結論)FCS はマウス体外受精において, 受精には促進効果, 胚発育には抑制効果を有する可能性が示唆された。

27. マウス受精卵凍結融解後の胚発生に及ぼす凍結保護剤の影響

大野原良昌・岩部富夫・関島秋男
谷川正浩・寺戸博文・戸田稔子
原田 省・菊川章仁・見尾保幸
前田一雄 (鳥取大産婦)

(目的)受精卵凍結保存は, IVF-ET プログラムにより得られた余剰卵の保存に有効であり, 多胎妊娠の防止と患者および術者の精神的肉体的負担軽減の観点からも注目されている。そこでヒト受精卵凍結保存の基礎的研究として, マウス体内受精卵を用いて凍結保護剤の違いによる凍結融解後の胚の形態学的正常性および培養後の胚発生率について比較検討した。

(方法)B6C3マウス2細胞胚を用い, 凍結保護剤として1.5 M propanediol (PROH)+0.1 M sucrose および1.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO)+0.1 M sucrose を添加した。凍結にはプログラムフリーザーを用い, -7℃まで2℃/minで冷却後, 10分間維持し手動的に強制植氷した。その後0.3℃/minで-30℃まで, 10℃/minで-30℃から-88℃まで冷凍し, 液体窒素中に投入した。融解は室温で40秒間, 30℃温水槽中40秒間に行なった。凍結保護剤除去は15分間3段階希釈した。融解直後の形態学的正常性を観察した後, BSA 添加 BWB 培養液にて培養し, 胚盤胞まで発育したものを生存胚とした。

(結果)融解直後の形態学的胚生存率はPROH群で良好であった。培養72時間における生存2細胞胚から胚盤胞までの発生率は両群で差を認めなかった。

28. 消毒薬, 局所麻酔薬, ヘパリンのマウス初期胚発生に及ぼす影響

岩部富夫・杉本伴芳・関島秋男
大野原良昌・谷川正浩・寺戸博文
原田 省・戸田稔子・菊川章仁
見尾保幸・前田一雄 (鳥取大産婦)

(目的)IVF-ET, GIFT における超音波ガイド下経腹および経腔採卵法の際に汚染される可能性のある消毒薬(ポピドンヨード), 局所麻酔薬(塩酸リドカイン), Flushing medium に加えるヘパリンナトリウムの安全性に関しマウス初期胚発生をもとに検討した。(方法)マウス1細胞胚はF₁雌マウスをPMSG 7.5 iu, hCG 10 iu で過排卵処理し, hCG 投与後22時間で採取した。培養液はBiggers-Whitten-Whittingham (BWB) にBovine Serum Albumin (BSA) を1 mg/ml 加えて使用した。ポピドンヨード(イソジン[®])は0.01, 0.05, 0.1 mg/ml, 塩酸リドカイン(キシロカイン[®])は, 1, 10, 100 μg/ml, ヘパリン(ノボヘパリン注10[®])は1, 10, 100 単位/mlの種々の濃度にし, 微小滴下培養法を用い37℃, 5% CO₂ in Air にて96時間培養しExpanded Blastocyst 以上の発生率を検討した。

(結果)イソジンおよびキシロカインは低濃度から胚発生を抑制し, ヘパリンは通常の使用濃度では, 初期胚発生には影響を与えなかった。

29. マウス妊娠成立における Embryo-derived platelet activating factor (EDPAF) の意義

安藤雅章・杉並 洋・松浦俊平
(愛媛大産婦)

(目的)Embryo-derived platelet activating factor (EDPAF) が妊娠成立に関与することが示唆されている。われわれはマウス胚移植実験系により, EDPAF の妊娠成立における意義を検討した。

(方法)ICR 雌マウスを自然交配後, Day 4 にdonor の子宮腔より採取し初期胚を同期した偽妊娠 recipient の子宮腔内に胚移植した。Day 13 に開腹し子宮内の着床率・生存胎仔率について検討した。なお, donor およびrecipient に対してDay 1~Day 4 に特異的PAF拮抗剤CV-6209 (3×200 μg/day),あるいはPAF acether (2×0.1 μg/day)を腹腔内に投与した。対照群には生食を投与した。

(成績) CV-6209-treated recipient 群における着床率・生存胎仔率は対照群と比較して有意に ($P < 0.01$) 低率であった (それぞれ 41.9 % vs 72.9 % および 36.2 % vs 51.2 %). CV-6209-treated donor 群における着床率・生存胎仔率 (76.5 % および 56.1 %) は対照群と差はなかった. PAF-treated recipient 群でのそれら (79.6 % および 68.5 %) はそれぞれ対照群より高い傾向を認めた.

(結論) ① EDPAF は fetal signal として子宮の妊卵受容性に影響を及ぼし、妊娠成立に促進的に作用することが示唆された. ② 特異的 PAF 拮抗剤である CV-6209 は初期胚の viability に影響を与えるのではなく、子宮の EDPAF に対する反応を阻害し、よって妊娠成立を抑制することが示唆された.

30. 精子自動分析装置の臨床応用とその問題点

植野卓也・石津和彦・林田英嗣
磯山理一郎・馬場良和・瀧原博史
酒徳治三郎 (山口大泌尿器)

昨年の本学会において、精子自動分析装置 (Motility Analyzer, HTM-2030) の精子運動能解析に対する有用性について述べた. 今回は、その臨床応用上の問題点について検討するため、当科不妊外来患者精液 137 検体を対象として精液検査を行ない、精子自動分析装置による測定値と顕微鏡下肉眼算定法による測定値とを、各パラメーター (精子濃度、運動率、運動精子濃度) について、濃度別に比較した. なお、両測定法とも、Makler 算定盤を使用した.

運動精子濃度は、精子濃度と関係なく、両測定法の間に有意の差は認められなかった. 精子濃度において、顕微鏡下に $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群では、両測定値の間に有意の差は認められなかったが、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の群では、自動分析装置による測定値が有意に高値を示した. 次に、正常精液に debris の多い無精子症患者精液を添加して、自動分析装置で測定すると、精子濃度は高く算定され、同装置による精子運動率測定値の相対的低下がみられた.

以上より、高度乏精子症患者や、無精子症患者の精液は、自動分析装置により、精子濃度が顕微鏡下測定値より高値に算定され、その原因として精漿中の debris の存在も一因であると考えられた.

31. 精子運動能と Caffeine

-cell soft system による解析

杉元幹史・松岡則良・小林勲勇
竹中生昌 (香川医大泌尿器)

精子の運動能を高める stimulants として、Caffeine は以前より著明な促進効果を有することが報告されている. 最近、精子自動解析装置 (Cell Soft System) を使用することが可能となり、精子運動能について、各種パラメーターを設定し測定している. 今回 Caffeine の精子運動能に及ぼす影響を検討したので報告する.

方法は、正常男子 volunteer 20 人を対象とし、4 日以上禁欲期間後に用手法にて精液を採取した. 液化後 modified BWB (HSA 0.3 %) のみ (medium 1), modified BWB (HSA 0.3 %) + 7.5 mM Caffeine (medium 2) の 2 種類の medium 2ml 中に精子濃度が約 10 million/ml となるように混和し、検索に用いた. Cell Soft System による解析は、①運動率②精子速度③直線性④鞭毛拍動回数の 4 項目について、経時的に 30 分から 6 時間までの変化について検討した.

非添加群では、運動率、精子速度、直線性、鞭毛拍動回数はそれぞれ、 $56.3 \pm 20.4 \%$, $42.2 \pm 11.1 \mu/\text{sec}$, 41.1 ± 0.9 , $14.0 \pm 2.5 \text{ Hz}$ であったが、Caffeine 添加群では、非添加群に比較して、精子運動の上昇が見られ、特に鞭毛拍動回数が上昇する傾向がみられた.

32. アルカリ、高浸透圧環境における精子運動性の変化

武田康成・中橋徳文・北川博之
杉並 洋・松浦俊平 (愛媛大産婦)

(目的) アルカリ、高浸透圧環境において精子の hyperactivation が惹起されることが報告されている. この環境下における精子運動性の変化を種々の不妊症例について検討した.

(方法) I 群 (妊娠歴を有する正常男性; $n = 5$), II 群 (妊娠歴が無く精子濃度 3000 万/ml 以上、運動率 50 % 以上のもの; $n = 10$), III 群 (妊娠歴が無く精子濃度 3000 万/ml 以下、あるいは運動率 50 % 以下のもの; $n = 8$) において用手的に採取し液化した精液を実験に供した. Ham's F-10 medium を NaCl および NaOH 処理により pH8.2, 350mOsm に調製したアルカリ、高浸透圧培養液 Ham's F-10 350 を作製した. 精液それぞれ 1 ml を Ham's F-10 で洗浄し遠沈した. 沈渣を 1 ml の Ham's F-10 350 に懸濁し、 37°C , 5 % CO_2 in air 下に 1 時間培養した. それぞれの精子運動性を検討した.

(成績) Ham's F-10 350 中において、精子は hyperactive なもの、および運動性を喪失したものに分類された. Hyperactive 精子濃度は I 群: 8330 ± 3960

万/ml, II群: 3370 ± 3290 万/ml, III群: 163 ± 318 万/mlであった。I群の0/5(0%), II群の2/10(20%), III群の5/8(62.5%)において精子の運動性はHam's F-10 350中で完全に消失した。

(考察) 精子のhyperactivationは精子妊孕性の指標になると思われた。III群では明らかに精子妊孕性が低下しているが、さらに、II群の中にも精子妊孕性が低下していると思われる症例が存在した。

33. 男子不妊症の内分泌学的検討

西田秀樹 (公立八鹿病院泌尿器)

宮川征男 (鳥取大泌尿器)

1979年1月より1988年12月までの10年間に、鳥取大学医学部附属病院泌尿器科外来に受診した男子不妊症患者181例中、検査成績の完備した85例について、精液所見と血中ホルモン値との関係について検討した。

FSH, LHは精子濃度の減少とともに上昇する傾向で、特にFSHは無精子症で有意に増加していた。テストステロン(T)と精子濃度の間には、明らかな関係はなかった。また、LHの方がT/LHに比べ、精子濃度との関係が良好であった。

精子数の表わし方として、精子濃度、総精子数、総運動精子数と血中ホルモン値との関係を検討したところ、精子濃度がFSH, LHと最もよい相関を示した。

FSH値により正常群、軽度上昇群、高度上昇群と分類し、LH, T, T/LHについて検討したところ、FSHの上昇に伴いLHが上昇していた。

アンドロゲン不応症の指標として提唱されたT×LH indexについては、85例中7例が200以上で、この内、Tが上昇していたものは1例のみであった。T×LHの上昇はLHの上昇によることが多く、このindexだけで、アンドロゲン不応症を判定することは困難であると考えられた。

34. Hypogonadotropic hypogonadism の13例

戦 泰和・井上啓史・森岡政明

藤田幸利 (高知大泌尿器)

男子不妊症、インポテンス、外陰部異常等を主訴として来院したHypogonadotropic hypogonadismの13例を報告する。13例の内訳は年齢8~41歳、平均24.4歳で、脳腫瘍に続発したものが5例、停留精巣検査時発見されたものが2例、小児科より紹介された汎下垂体機能低下症に伴うもの2例、思春期遅発症1例、Laurence-Moon-Biedl症候群1例で、脳腫瘍などの他の原因を認めない成人発症の2例も

経験した。治療はHCG-HMG療法を7例に、男性ホルモン補充療法を6例に行なっている。これらの症例について内分泌検査成績を提示し、その病因、病態、治療について若干の文献的考察を加えて報告する。

35. 特発性男子不妊症に対するKetotifen療法

大枝忠史・山根 享・吉田光宏

永井 敦・山下良孝・小浜吉照

大橋輝久・大森弘之

(岡山大泌尿器)

(対象・方法) 岡山大学医学部泌尿器科外来を受診した無精子症3例を含む特発性男子不妊症患者27例に対し、mast cell blockerであるKetotifen(商品ザジテン) 1mgを1日2回、原則として3か月間以上経口投与した。投与前および投与開始3か月後に5日間以上の禁欲期間で精液検査を行ない、精子濃度・運動率に対する効果、妊娠の有無およびこれらを併せた総合的な臨床効果につき検討した。効果判定にはMethyl-B₁₂用量比較試験の際使用した治療効果判定基準を用いた。また、併せて血清テストステロン・LH・FSHを測定し、血中ホルモン濃度に対する影響も検討した。

(結果) 投与開始3か月後における臨床効果は、精子濃度では著明改善2例、改善3例、不変20例、悪化0、精子運動率では著明改善6例、改善1例、不変12例、悪化6例、総合評価では著明改善4例、改善1例、やや改善4例、不変16例、悪化0であった。著明改善・改善を併せた有効率は、精子濃度で25.0%、精子運動率で28.0%、総合評価で25.0%であった。妊娠は2例に認められ、妊娠率は7.4%であった。また血清テストステロン・LH・FSH濃度には投与前後で有意の変動は認められなかった。

副作用は4例(14.8%)に認めたが、眠気3例、顔面発疹1例であり、いずれも軽度であった。

36. ホルモン産生下垂体腫瘍手術後の男子不妊症に

対するhCG-hMG併用療法

福島雅之・中原 満・相模浩二

碓井 亞 (広島大泌尿器)

向田一敏・魚住 徹 (同脳外科)

上田克憲・藤原 篤 (同産婦)

高プロラクチン血症(高PRL血症)を来す下垂体腫瘍は男子性腺機能不全や男子不妊症の原因の一つとして知られ、治療に良好な反応が期待できる点から臨床上きわめて重要である。今回、不妊を主訴と

して来院し、下垂体腫瘍の診断で手術的に高 PRL 血症を改善後、hCG-hMG 併用療法によって妊娠の成立を認めた症例を報告する。

症例 1: 31 歳, 初診 1986 年 12 月, 1987 年 4 月 GH-PRL 産生下垂体腫瘍の診断のもとに経鼻的腫瘍摘出術施行, 術後 9 か月の内分泌学的検査にて LH-RH 負荷テスト, hCG 負荷テストともに反応を認めたが, 血中テストステロン値は 0.6 ng/ml , 精液検査は乏精子症を呈し, 精子の運動性は不良であった。

症例 2: 31 歳, 初診 1986 年 11 月, 1987 年 12 月 PRL 産生下垂体腫瘍の診断のもとに手術施行術後約 1 か月の精液所見は無精子症であった。

以上の 2 例に対して hCG 2,000 単位, hMG 150 単位, 週 1 回筋注, 20 週間を施行した。症例 1 は治療開始 11 か月後に, 症例 2 は治療開始 4 か月後にいずれも妊娠の成立が確認できた。

(結論) ホルモン産生下垂体腫瘍による男子不妊症例に対しては下垂体腫瘍摘出術に引き続く hCG-hMG 併用療法がきわめて有効である。

37. 先天性精管欠損症の 5 例

稲井 徹・浜尾 巧・三宅範明

井上善雄・松下和弘・香川 征

(徳島大泌尿器)

先天性精管欠損症は, 精路通過障害の主な原因の一つとされ, 報告例も増加している。今回は, 当科不妊外来で先天性精管欠損症と診断された 5 例につき検討を行なった。

対象は, 昭和 59 年～63 年までの 5 年間に不妊を主訴とした 5 例で, 触診と陰嚢部試験切開にて本症と診断された。年齢は 25～37 歳 (平均 30.2 歳) であった。患側は, 両側欠損 3 例, 片側欠損 2 例 (右 1 例, 左 1 例) であった。精液検査では, 全例が無精子症で, 精液量は $0.2 \text{ ml} \sim 1.8 \text{ ml}$ (平均 1.0 ml) であった。合併症は, 1 例に右停留精巣と肝硬変をみた。精巣容積は停留精巣を除けば, ほぼ正常容積であり, 内分泌検査でも, 正常であった。精巣生検で造精機能を有することを確認した。

本症に対する手術療法としては, 精路再建術として精巣上体・精管吻合術を 2 例に, 人工精液嚢造設術を 3 例に施行した。術後の精液検査では, 精巣上体・精管吻合術は 2 例とも精子の出現は見られなかった。人工精液嚢造設術の 3 例では, 精子の回収が可能であり, そのうちの 1 例は術後 13 か月までに AIH を 8 回実施した。先天性精管欠損症では, 造精機能を有する例が多く, 人工精液嚢造設術による精子の回収を行なうべきと考えられた。

38. 男子不妊症の臨床統計的観察

稲井 徹・浜尾 巧・金山博臣

山本品弘・水田耕治・香川 征

(徳島大泌尿器)

昭和 60～62 年末までに, 当泌尿器科を不妊を訴え来院した患者 177 名に対して検討を行なった。男子患者に占める不妊症の割合は 10.1 % で, 新来患者のみでは 8.1 % であった。初診時の年齢は 21～49 歳 (平均 32 歳) であった。配偶者の年齢は 21～38 歳 (平均 29 歳) であった。不妊期間は 4 カ月～16 年 (平均 4 年 5 カ月) であった。

初診時の精液所見にて患者を 6 群に分類した。精子数 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上を 1 群 (28 例), $10 \times 10^6 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ を 2 群 (40 例), $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の乏精子症を 3 群 (54 例), 精路通過障害による無精子症を 4 群 (12 例), 原発精無精子症を 5 群 (29 例), 染色体異常を認めた無精子症を 6 群 (9 例) とした。

精巣容積は, 1 群 (平均 16.6 ml) と 2, 3, 5, 6 群との間に有意差を認めた ($P < 0.01$)。血清 LH は, 1 群と 5, 6 群との間に差を認めた ($P < 0.01$)。血清 FSH は, 1 群と 2 群間 ($P < 0.05$) に, 1 群と 3, 5, 6 群との間に差を認めた ($P < 0.01$)。血清テストステロンは, 1 群と 6 群間に差を認めた ($P < 0.01$)。プロラクチンに差はみられなかった。

以上の症例につき, さらに検討, 考察を加える予定である。

シンポジウム

“不妊症治療の新しいアプローチ”

1. 閉塞性無精子症に対する人工精液嚢の経験

河原弘之 (川崎医大泌尿器)

男性不妊症の原因としての精路通過障害は不妊患者の約 10 % といわれ, その 40～50 % が先天性精管欠損症であるとされる。従来これらの疾患に対する治療法はなかったが, 最近では人工精液嚢の造設による治療法が試みられている。今回, 先天性精管欠損症を含む 8 例に対し, 人工精液嚢の造設を行なったのでその経験を報告する。

(対象および方法) 対象は先天性精管欠損症 5 例, 精巣上体管閉塞 2 例, 脊椎損症 1 例である。年齢は 26～39 歳, 不妊期間は 1～12.5 年であった。人工精液嚢は Gore-tex 1 例, Wagenknecht 1 例, 昭和式 6 例を造設した。

(結果) 全例, 術後の穿刺で精子の出現が認められ, 精子数は $0.01 \sim 7 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率は 0～52 % であ

り、穿刺可能期間は3～6か月であった。

今回の対象症例中、残念ながら妊娠成功例はみられなかったが、以下の諸問題について考慮する必要性を痛感した。1) 穿刺の際の把握により graft がつぶれない様な graft の材料と形態を考慮する。2) 人工精液瘤の装置部位。3) 精巣上体管の閉塞を予防する方法。4) 採取した精子の処理が重要と考えられた。

2. 男性因子不妊に対する AIH, GIFT, PROST, IVF-ET 施行例の成績

本山洋明 (倉敷成人病センター産婦)

(目的) 男性因子不妊に対する各種治療法の成績を分析する。

(対象および方法) 最初に男性因子不妊群を運動精子濃度 (精子濃度×運動率) $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満と定義する。1985. 1 から 1988. 12 までの期間にこれら男性因子不妊群に対して行なった治療法は、HAM'S F 10洗浄法による AIH (WASH-AIH) 78 名、254 周期、2 層 PERCOLL 密度勾配法による AIH (PERCOLL-AIH) 110 名、335 周期、GIFT 10 名、10 周期、PROST (前核期卵卵管内移植) 6 名、6 周期、IVF-ET 2 名、2 周期である。なお、同一患者の複数治療法重複を含んでいる。

(結果) 妊娠例数は WASH-AIH 2 名 (対患者 2.5 %), PERCOLL-AIH 14 名 (同 12.7 %), GIFT 4 名 (40 %), PROST 1 名 (16.7 %), IVF-ET 0 名であった。WASH-AIH と PERCOLL-AIH との間には危険率 5 % で有意差を認めた。GIFT および PROST 妊娠例は 4 回から 27 回の AIH を受けていた。GIFT 妊娠不成立で余剰卵 IVF 受精 (+) の 1 例が 5 回目の AIH で妊娠し、PROST 妊娠不成立の 1 例が 10 回目の AIH で、また IVF-ET 妊娠不成立の 1 例が 18 回目の AIH で妊娠した。一方、PROST の予定で採卵したものの 10 個の卵すべて受精しなかった 1 例が 13 回目の AIH で妊娠した。

(結論) 男性因子不妊に対する AIH は PERCOLL-AIH が WASH-AIH 法よりも有効である。また PERCOLL-AIH を行ないつつ、採卵を伴う治療法を適当な時期に施行することが有意義であると考えられる。

3. Pure FSH 製剤を用いた排卵誘発法

苛原 稔 (徳島大産婦)

(目的) 排卵誘発法の一つとしてゴナドトロピン療法が行なわれ効果を上げているが、使用されている HMG 製剤は FSH のみでなく相当量の LH を含有しているために、多発排卵や多胎妊娠、卵巣過剰刺激症状

(OHSS) の発生頻度が高いなど、使用上の問題点も多い。最近、HMG 製剤から特異的に LH を除去した pure FSH 製剤が開発されたので、pure FSH 製剤の有用性を検討した。

(方法) 対象は、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 7 例、第 2 度無月経 7 例、無排卵周期症 1 例の 15 例であった。15 例中 6 例は HMG 無効例であり、5 例は HMG で OHSS を起こした症例であった。これらに対し pure FSH を単独投与した。投与開始量は 75～150 単位とし、卵胞発育の状態により適宜増量した。超音波卵胞計測等で卵胞の成熟を認めた後 HCG を投与した。投与期間中は、各種ホルモン測定、超音波断層法等を行ない経過観察し、HCG 投与後は排卵の確認、OHSS 等の副作用の有無を検討した。

(成績) 15 例 33 周期における排卵誘発率は症例別 80.0 % (周期別 81.8 %) と高率を示した。排卵までの平均投与総量は 1562 IU (675～2700)、排卵のあった 27 周期の平均成熟卵胞数は 2.9 個 (1～8)、妊娠率は症例別 26.7 % (周期別 12.1 %、いずれも PCOS 症例) で多胎はなかった。周期別 OHSS 発症率は 15.5 % であった。

(結論) pure FSH の臨床検討より、その高い排卵誘発率および低い副作用頻度が示され、特に PCOS による無排卵症患者の治療に有用であると考えられた。

4. 多嚢胞性卵巣症候群に対する治療的超音波ガイド卵胞穿刺術による排卵誘発

見尾保幸 (鳥取大産婦)

(目的) PCOD は、排卵障害・不妊症の代表的疾患で、われわれは本症に対する新たな排卵誘発法として超音波ガイド下卵胞穿刺術を応用し、その有効性を検討したので報告する。

(方法) 臨床症状、ゴナドトロピン分泌異常、超音波断層法による卵巣所見から PCOD と診断された不妊患者 18 症例 (20 周期) を対象とした。当科の IVF-ET プログラムに準じて、全例 clomiphene HMG, HCG により卵巣刺激を行ない、HCG 投与後 36 時間に超音波ガイド下で排卵前成熟卵胞の穿刺のみを行ない、洗浄精子による AIH を併用した群 (I 群、8 症例 10 周期) と、HCG 投与後に存続した嚢胞状閉鎖卵胞を黄体期に穿刺し、嚢胞液を吸引・排除した群 (II 群、10 症例) の 2 群に分類し、その後の周期における排卵・妊娠について検討した。また、穿刺時期、嚢胞液吸引の有無、LH-RH 負荷テストの結果の比較により、本法の排卵誘発機序、至適実施方法について考察した。

(結果) I 群の実施周期における妊娠率は 1/10 (10.0

%)であり、3周期目に1症例が妊娠に至った。またII群においては、薬物抵抗性の排卵障害であった3症例全例が穿刺後早期より薬物療法による排卵誘発が容易となった他、18か月の追跡期間中5/10(50.0%)に妊娠が成立した。

(結論) II群において穿刺術後に良好な排卵誘発率・妊娠率を認められ、PCODの不妊症患者に対する本法の有効性が確認され、その機序は卵巣に対する直接作用より、むしろ囊胞液除去による内分泌変化が関与していることが示唆された。

5. 子宮内膜症の診断と治療に関する一考察：

子宮内膜症病巣の腹腔鏡下焼灼について

中橋徳文(愛媛大産婦)

われわれは子宮内膜症の診断および治療に関して以下のプロトコルを導入している。①腹腔鏡による診断、②腹水の除去と病巣の焼灼、③通色素法による卵管疎通性検討、④生食による腹腔内洗浄、⑤6カ月～2年間の待機、⑥他の治療法の導入。今回、このプロトコルに沿って治療した80例につきretrospectiveに検討した。

80例中45例(56.3%)に妊娠の成立をみた。妊娠群および非妊娠群においてrAFS進行期分類に差は認められなかったが、平均年齢はそれぞれ28.8±2.9歳および31.4±3.8歳であり非妊娠群がより高齢であった($P<0.05$)。子宮内膜症病巣の完全焼灼群では46例中31例(67.4%)が妊娠しており、これは不完全焼灼群(34例中14例;41.2%)と比較して有意に高かった($P<0.05$)。待機期間中に妊娠した34例中27例(79.4%)は完全焼灼例であったが、他の治療を加えた後に妊娠した11例のうち完全焼灼例は4例(36.4%)であった($P<0.05$)。また、待機期間中に妊娠したものではその大多数が腹腔鏡検査後6カ月以内に妊娠の成立をみた。

以下の結論が得られた。(1)われわれの導入したプロトコル、特に病巣の焼灼は子宮内膜症不妊の治療に有効である。(2)病巣の焼灼が有効であり焼灼後短期間に妊娠が成立するという事実は子宮内膜症が不妊の一因であることを示唆する。(3)非妊娠群がより高齢であったという事実から、子宮内膜症不妊の治療はできるだけ早く始めるべきであろう。

特 別 講 演

哺乳動物の生殖分野における

バイオテクノロジーの進歩

入谷 明(京都大農学部畜産学科)

バイオテクノロジーを広義に解釈すれば、新技術

を使った効率的な動物生産ともいえる。一方、狭い意味での生物工学では今後期待される免疫学的な産子の性制御、クローン動物や有用な形質転換動物の生産などがあげられる。今回は医学分野にも関連のある2、3の新しい応用技術について解説する。

(1)人工授精：採取精液を希釈し、凍結保存することによって、1回の射精で数100頭にも授精でき、すぐれた形質をもつ雄動物をきわめて効率よく利用できる。(2)胚移植：ウシのような単胎動物では、生涯に10頭前後の子孫を残しうるにすぎないが、過排卵処理で多数の胚を採集して、借腹移植することによって、すぐれた雌動物の子孫を約10倍(100頭)も残すことができる。(3)未受精卵や胚の凍結保存：産業動物のうち経済価値の高いウシでは、年間約40万頭が胚移植で生まれているが、そのうち約10万頭は凍結胚の移植によるものである。倫理的問題が解決されればヒトのIVF-ETプログラムで凍結未受精卵や凍結胚の応用が推奨される。(4)1卵性多数子(クローン動物)の生産：胚盤胞期胚の顕微分断によって、1卵性双子が容易に作られている。また8～16細胞期胚や胚盤胞期胚の1割球からも個体発生が可能になっている。(5)体外受精：哺乳動物とヒトでのIVF-ET計画には根本的に大きな差があるが、その解析をもとに胚移植の同期化、受精後の胚の体外培養などヒトのIVF-ET成績の向上対策について考察する。(6)顕微受精：安全性に関する基礎研究が終わらないまま、一方でIVFをくりかえしてもなお不成功で、生殖年齢もすすむことから臨床応用にふみ切っているケースもある。精子側に問題のある不妊症への適用については、安全性を確かめ、また不妊原因に適した顕微受精法の選択と改善が望まれる。(7)形質転換動物の生産：生理活性物質の生産、生長促進動物の生産、特定の遺伝病発現遺伝子の導入によるモデル動物の生産、アンティセンスDNAの導入による特定遺伝子の発現抑制などの形質転換動物の生産に関する研究がすすめられている。

平成元年度 日本不妊学会中部支部学術集会

日 時：平成元年7月1日（土）午後2時～
場 所：八神製作所内サマニアンホール

1. M検システムによるインポテンスの診断

小谷俊一・成島雅博・伊藤裕一
(中部労災病院泌尿器)

歪み感応型導電性ゴム“ツデーックス”を素材とした rubber strain gauge (Mセンサー) とパーソナルコンピュータを組み合わせた勃起機能検査システム(M検システム, 三ツ星ベルト)を使用し, AVSS 負荷による陰茎周径変化曲線を測定した。

対象はコントロール群2名(平均年齢35歳), 勃起不全群20名(平均年齢50歳)である。陰茎周径増大率5%未満を反応(－), 5%以上15%未満を反応(±), 15%以上を反応(＋)として結果をまとめると, コントロール群では全例(＋)でAVSSに良く反応したが, 勃起不全群では3名が(＋), 6名が(±), 11名が(－)であり, 勃起機能の客観的診断上, 有用な検査法と考えられた。

2. 先天性陰茎湾曲症の3例

長井辰哉・高羽秀典・辻 克和
三宅弘治 (名古屋大泌尿器)

先天性陰茎湾曲症の3例を経験したので報告する。

症例1: 22歳男性, 勃起時の陰茎の下方への屈曲を主訴に当科を受診した。非勃起時の陰茎には異常を認めず, また尿道炎等の既往も認めなかった。患者自身の撮影による勃起時写真にて陰茎の下方への湾曲を認め, 先天性陰茎湾曲と診断, Nesbit 法による海綿体形成を施行し良好な結果をえた。

症例2: 26歳男性, 症例1と同様に非勃起時の陰茎には異常を認めなかったが, 勃起時撮影にて陰茎の左方への屈曲を認めた。Nesbit 法を施行し良好な結果をえた。

症例3: 33歳男性, 同様に勃起時陰茎の下左方への湾曲を認め, Nesbit 法を施行し良好な結果をえた。

Nesbit 法は侵襲も少なく有効な外科的治療法であると思われ, 患者の希望があれば, 積極的な治療がなされるべきであると思われた。

3. 男性不妊症に対するペントキシフィリン, 塩酸ニカルジピン, プロモクリプチン, カルボシステインおよび補中益気湯の治療成績

水谷哲也 (大同病院産婦)

(目的) 乏精子症はじめ, 男性不妊症は難治のことが

多く, 特に運動率の悪い症例には, 有効な薬がほとんど知られていない。われわれは本領域で従来あまり用いられてこなかった薬剤を, *in vitro* の実験で良好な成績を得られたものより選びだし, 臨床応用することにした。

(対象および方法) われわれは, 3年半にわたり, 精子数5000万/ml以下, または運動率60%以下の患者を主対象として投薬し, 4か月以上内服可能であり, また統計処理可能な110症例に関して検討を加えた。持続性脳微小循環改善剤であるペントキシフィリン, 血管拡張剤であるCa拮抗剤塩酸ニカルジピン, 高PRL血症改善剤プロモクリプチン, 去痰剤カルボシステイン, 補中益気湯を各々1種ずつ用いた。(結果) 精液量は, どの薬剤でも増加傾向を認めた。カルボシステインは高粘度の精液を対象とした。精子数は, ペントキシフィリン, プロモクリプチンで増加傾向を認めた。運動率は, 塩酸ニカルジピンのほぼ全症例で増加した。ペントキシフィリン, 補中益気湯でも増加を認めた。総精子数は, ペントキシフィリン, プロモクリプチンで増加傾向を認めた。総運動精子数は, 妊娠成立に有用なパラメーターといわれているが, 妊娠例との関連では明らかではなかった。塩酸ニカルジピン補中益気湯で上昇傾向があり, ペントキシフィリンで有意に改善した。(妊娠成績および考察) ペントキシフィリンにて, 22例中7例に妊娠が成立した。塩酸ニカルジピンでは, 34例中5例が妊娠した。プロモクリプチンでは22例中3例が妊娠した。カルボシステインでは14例中6例が妊娠した。補中益気湯では18例中5例が妊娠した。

精液所見の改善は, カルボシステインを用いた高粘度精液において早期にあらわれ, また妊娠までの期間も短かった。ペントキシフィリンは, 胃痛を訴えて3割以上が内服中止となったが, 妊娠率は高かった。

4. ラットにおける実験的精索静脈瘤の精巣に及ぼす影響

西山直樹・泉谷正伸・日比秀夫
米津昌宏・高梨勝男・篠田正幸
名出頼男

(藤田学園保健衛生大泌尿器)

生後8週齢のSprague-Dawley系ラットを用い, 左総腸骨静脈を結紮し, 実験的精索静脈瘤を作製し, 4週, 12週後にControl群, Shamoperation群とともに精巣温度, 精巣血流, 精巣重量, 精巣組織について検討した。

精索静脈瘤群では精巣重量は 12 週後で右 1.565 ± 0.433 g, 左 1.592 ± 0.538 g と対照群に比較し有意に低下し, 組織学的には精細胞数の減少, 細胞配列の乱れを認めた. 精巣温度は 4 週後で右 $32.22 \pm 0.68^\circ\text{C}$, 左 $32.68 \pm 0.91^\circ\text{C}$, 12 週後で右 $31.86 \pm 0.13^\circ\text{C}$, 左 $32.16 \pm 0.64^\circ\text{C}$ と左右とも有意に上昇しており, 精巣血流は 4 週, 12 週後で左側は 12.50 ± 1.22 ml/min/100g・tissue, 12.76 ± 2.42 ml/min/100g・tissue と, 左側精巣においてのみ増加していた.

精索静脈瘤における造精機能障害の原因としては, 精巣温度の上昇も無視出来ないが, その温度が 32°C 前後と比較的低いことからして温度以外の要因の関与が示唆された.

5. 男子不妊症における性染色体異常

高羽秀典・長井辰哉・辻 克和
三宅弘治 (名古屋大泌尿器)

最近 10 年間に名古屋大学泌尿器科で診断された 20 例の染色体異常を報告した. 47 XXY 18 例, 46 XX male 1 例, 45 X/46 X+mar 1 例である. 主訴は 18 例が不妊, 1 例が前立腺炎, 1 例が性器發育不全であった.

Klinefelter 症候群 18 例について臨床的検討を施行した. 染色体型は全例 47 XXY. 無精子症, 年齢 30.3 ± 2.6 歳 (平均 $\pm$ S.D.), 身長 173.5 ± 6.4 cm, 指極長 173 ± 8.0 cm, 精巣容量は, 右側 2.6 ± 1.0 ml, 左側 2.8 ± 1.0 ml. 女性化乳房は 1 例のみで認め, 恥毛は男性型 6 例, 女性型 9 例. LH 49.0 ± 15.8 mIU/ml, FSH 49.5 ± 15.9 mIU/ml と, 他の男子不妊症候群に比べ有意に高値を示し, テストステロンは 202 ± 104 ng/dl と低値を示した. プロラクチンは 8.2 ± 3.0 ng/dl と正常範囲内であった. 精巣生検を 11 例に行ない, 精細管の硝子化, 異常な形態を示す Leydig 細胞の増生を認めた. 2 例に男性ホルモン補充療法を行なっている. 以上の症例を報告するとともに文献的考察を行なった.

6. 男性不妊症の染色体異常

山口安三 (聖隷三方原病院泌尿器)

1987 年 7 月から 1989 年 3 月までに浜松医科大学附属病院泌尿器科の男子不妊専門外来を男子不妊を主訴として初診した患者 60 例を対象に, 染色体検査を施行し, 男子不妊症における染色体異常の頻度, 睪丸容量, 精液所見, 血清ホルモン値, 睪丸生検組織像との関連について検討を行なった.

60 症例中無精子症は 17 例, 乏精子症 30 例, 正常が 13 例であった. 無精子症 17 例中 7 例, 41.2 % に,

また乏精子症 30 例中 4 例, 13.3 % に染色体異常を認め, 全体では 18.3 % と高率に染色体異常を認めた. 無精子症例での染色体異常は全例 47, XXY であり, 乏精子症では 46 XX/46 XY mosaic, 46, X, inv (Yp+, q-), 46, XY, inv (9p+, q-), 46, XY, t (1p-, 22p+) を各 1 例認めた. 46 XXY では全例睪丸容量の低下, 血清 LH, FSH の高値, 精細胞欠如を認めたが, 他の染色体異常では睪丸容量, 血清ホルモン値, 組織学所見との間に関連は認めなかった.

7. Percoll 密度勾配法による AIH の試み

保科真二・樋口和宏・細井延行
堀 悟・稲葉芳一
(名鉄病院産婦)

精子濃度 4000 万/ml 以下または, 運動率 50 % 以下の症例 16 例 (42 周期) と排卵誘発例 1 例 (6 周期) に対し, 4 層 Percoll 密度勾配遠心分離法を用いた AIH を施行, 精子濃度, 運動率の改善および妊娠例について検討した.

4 層 Percoll 法後の精子濃度, 運動率の上昇率は 58 % ($P < 0.01$) と 45 % ($P < 0.01$) と有意に上昇し, 精子濃度が低く運動率が良好な例では精子濃度が, 反対に運動率が低い例では運動率が有意に上昇し, 精子性状の改善に 4 層 Percoll 法は有用であった. また女性不妊因子のない 7 例中妊娠したのは, 精子濃度 2000 万/ml 以上, 運動率 50 % 以上の 2 例で, 精子濃度 1000 万/ml 以下, 運動率 30 % 以下の 5 例は妊娠しなかった. したがって 4 層 Percoll 法の改善能力の限界は精子濃度 1000 万/ml, 運動率 30 % と推測された. ただし今回われわれが検討したのは, 精子濃度と運動率のみで, その他の精子妊孕能については検討しておらず, 今後の課題としたい.

8. 子宮内膜による排卵日推定

藤原義俱 (静岡市)

現在排卵日の推定には主として BBT, 尿中 LH カラー, E_3 , 超音波による卵胞計測等があるが, いずれも確実性に乏しい.

着床環境としての子宮内膜の厚さは, 形態的異常のみならず組織学的異常およびその背景にある内分泌学的異常を単純に表現していると考えられる. 不妊症患者の着床障害因子の 1 つである子宮内膜を測定し, その経日的変化をみると, 排卵日の推定 (AIH 等のタイミング) に有効なモニタリングになり得た. 月経後期の子宮内膜の厚さは平均 0.5 mm, 排卵期は 12 mm ~ 16 mm で midline 消失時期が AIH, GIFT のタイミングである.

内膜の厚さ14 mm以上の出現率は15.5%で、これが不妊症患者の妊娠予備群である。以上の事からAIH, GIFTの適応の中に排卵期子宮内膜の厚さを加えるべきで、AIHは12 mm以上、GIFT, IVFは14 mm以上が必要である。排卵誘発にブセレリンを使用する際のHCG投与時期は子宮内膜の厚さを考慮すべきで、症例報告と併せて若干の知見を得たので報告する。

9. 微量プロモクリプチン肛門座薬による妊娠例の検討

戸谷良造・榊原知代・山田隆祥
六鹿正文・柴田金光・内田雄治
片平智行・黒木尚之・唐沢哲郎
後藤濤二・三輪 是・鈴置洋三
(国立名古屋病院産婦)

僅かな高プロラクチン血症を伴う婦人は、月経周期が幾分長く、かつ不規則となっていることが多い。圧乳テスト陽性例の頻度も高く、血中プロラクチン値は正常でもTRHによる負荷値に過剰反応がみられるケースが多い。これらの所見を伴う挙児希望の婦人には、まず0.625 mgの微量プロモクリプチン肛門座薬を投与し、妊娠しない場合にはクロミフェンを加えて投与した。

現在までに25例の妊娠例を得ているが、流産例の頻度も高い。一方、習慣性流産例が本剤により妊娠し、妊娠中の連続プロモクリプチン投与により挙児しえた症例も見られた。プロラクチンの卵成熟、受精、胎児の発育への関与の大きさが示唆される。われわれはプロモクリプチン投与によりプロラクチンの調節をきめ細かくし、妊娠の成立、児の育成に適した環境を求めることが挙児率の向上につながるものと考えている。まだ症例数は少ないが、現在までの知見を報告する。

10. IRMAによる血中LH, FSH測定キット (スパック-S LH, FSH)の臨床的検討

森脇崇之・松澤克治・石原 豊
古橋 円・浅田義正・小栗久典
友田 豊 (名古屋大産婦)
山下英二・中村潔史・近藤育代
木村敏男・大沢政巳・成田 収
(名古屋大分院産婦)

近年モノクローナル抗体を用いたimmunoradiometric assay (IRMA) が放射免疫測定法の主流となり、測定の簡便化、迅速化および高感度化が図られている。

今回、われわれは、IRMAによるLH, FSHの測定法として、スパックS LH, FSHキットを用いて、その臨床的有用性の検討を従来のRIAキットとの比較を中心に行ない、若干の知見を得たのでここに報告する。

今回の検討では、従来のRIAキット測定値との間に、LH, FSHともに高い相関が得られたが、旧キットの測定値に比し、いずれも低値であった。また月経周期変動の検討、各種疾患における検討では、従来の報告および旧キット測定と同様のパターンを呈していた。しかしLH測定値が旧キットに比べて特に低値をとるため、PCOSに関しては診断基準の変更を含めた再検討が今後必要になると考えられた。

11. PLO-MR (徐放性プロモクリプチン経口剤)の止乳効果

戸谷良造・榊原知代・山田隆祥
六鹿正文・柴田金光・内田雄治
片平智行・黒木尚之・唐沢哲郎
後藤濤二・三輪 是・鈴置洋三
(国立名古屋病院産婦)

プロモクリプチン経口剤は、強力なプロラクチン抑制作用をもっており、高PRL血症の治療、産褥止乳など臨床的に必要性の高い薬剤である。しかし副作用も強く、悪心、嘔吐などのため、服用できない症例も存在する。副作用の一部は急速に胃腸管から吸収されることによる。これらの副作用を減弱すべく、徐放加工を施した薬剤が発案された。本剤の止乳効果、並びに副作用を検討したので報告する。

8例の症例に2.5 mg含有のカプセルを1日2錠、2週間投与した。投与期間中の血中プロラクチン値は抑制されたが、従来の経口剤に比べ、抑制の程度は少なかった。しかし止乳効果は認められた。副作用の発現もほとんどなく、産褥の止乳、乳汁分泌過多症の治療に有用な薬剤と考えられる。

12. 不妊症患者に対する開腹手術について

宇田川敦子・岡本美枝・成島正昭
深澤洋幸・鈴木明彦
(静岡済生会総合病院産婦)

不妊の原因が進行した子宮内膜症と考えられ、その保存的手術として、病巣切除術、癒着剥離術を行なった3例を報告する。いずれも術中通色素テストで卵管の疎通性が確認され、術後癒着防止として、低分子デキストラン、プレドニゾロン、抗生剤の腹腔内投与を行なった。しかし1例は、術後34日めの子宮卵管造影で再癒着がみられ、不妊症の保存的手

術での術後癒着防止の重要性和困難性を感じた。また、卵管機能面の術前評価が充分になされていない問題があり、今後の課題と思われる。

しかし、1例においては、チョコレート嚢胞摘出と癒着剥離により妊娠が成立したと考えられ、妊娠を希望する子宮内膜症患者の保存的手術を、積極的に考えてもよいと思われた。

13. 子宮筋腫合併不妊婦人の MRI による 筋腫核出術適応について

鈴木明彦・岡本美枝・成島正昭

深沢洋幸・宇田川敦子

(静岡済生会総合病院産婦)

未婚あるいは挙児希望あり、初診時子宮筋腫と診断され、筋腫核出術を予定した7例につき、MRIを行ない、特に子宮筋腫と子宮腺筋症の鑑別、筋腫核出術適応への有用性を検討した。

使用機器は東芝超電導 MRT-50A/SE (0.5 Tesla), Spin Echo 法にて、 T_1 、 T_2 強調画像の2条件にて撮影した。

結果：MRI 診断では3例が子宮筋腫、核出術可能。3例が子宮腺筋症。1例が子宮筋腫＋子宮腺筋症であった。手術例4例の術後診断はいずれもMRI診断と一致し、内診所見、Echo 所見とあわせた補助診断としてMRIが有用であった。われわれの症例では、子宮筋腫が原因で不妊を訴えて来院した患者は少なく妊孕性温存のために、筋腫核出術を行なった症例がほとんどであるが、補助診断としてMRIの有用性は、子宮筋腫合併不妊婦人にも適応され则认为る。

14. 早期卵巣癌に対する妊孕性温存の試み

太田正博・宮崎俊英・水野一夫

古橋義人・加納武夫・友田 豊

(東海卵巣腫瘍研究会)

早期卵巣腫瘍患者のうち、妊孕性を熱望する116名を対象に妊孕性温存手術を行ない、患者の予後に及ぼす功罪を、再発・死亡と妊娠・出産に焦点を当てて解析した。

その結果、いわゆる狭義の早期卵巣癌52例中、再発は3例、うち死亡1例であったが、同じ母集団中、卵巣癌で治療を行なった患者の10名が、18回の妊娠をして、12人の児を得た。

更に、悪性卵巣腫瘍の日産婦分類中間群にまで範囲を広げると、116名中18例の再発を認め、うち8例は死亡に至るといふ悲劇を経験せざるを得なかったものの、23名の母親が25人のわが子を生み、育てる事が出来た。

悪性腫瘍患者の Quality of life を向上させる試みが行なわれている中で、若年卵巣腫瘍患者にとって大きな朗報と言えよう。

15. 両側先天性精管欠損に対する人工精液瘤の 経験

後藤百万 (碧南市民病院泌尿器)

三宅弘治 (名古屋大泌尿器)

症例は31歳男性、結婚後3年の不妊を主訴として碧南市民病院泌尿器科を受診した。初診時、精液所見は無精子症、血中 LH, FSH, テストステロン、プロラクチンは正常であった。精索は両側とも容量18 ml で、大きさ、硬度とも正常、精巣上体も触診上正常であった。精管は精巣側は両側触れるも、遠位では触知不可、また左側に中等度の精索静脈瘤を認めた。二次性徴は正常、精巣生検では Johnsen スコア 7～9 で、精管造影時、精管は索状となって両側欠損していた。精嚢は経直腸エコー上、正常であった。治療として、右側精巣上体に人工精液瘤移植を行なった。移植後3週後の初回精液瘤穿刺では0.2 ml の液を採取、精子濃度は 5×10^6 /ml、運動率12%、奇形率48%であった。移植8週後、および16週後に第2、第3回目の穿刺を行ない AIH を行なったが、いずれも殆ど精子が存在せず、成功にいたらなかった。

16. 子宮内膜症患者における CA19-9 測定の意義

正橋鉄夫・小川麻子・数下廣光

浅井光興・鈴木正利・野口昌良

中西正美 (愛知医大産婦)

子宮内膜症の診断および follow up の marker として CA 125 が現在広く用いられているが、近年 CA 19-9 も子宮内膜症で高値を示すことが報告されている。そこで今回われわれは腹腔鏡または開腹手術により診断を確定した99例を対象として、子宮内膜症管理における CA 19-9 の有用性を検討した。

対象症例中、子宮内膜症は25例であった。CA 19-9 はⅢ期、Ⅳ期の症例で高値を示す傾向を認め、陽性率は各々83.3%、45.5%であった。また内膜症25例において CA 19-9 の陽性率は44%、CA 125 の陽性率は36%であったが、両者を組み合わせることによりどちらか一方が陽性となったものは60%となり、検出率の昇が認められた。しかしながら CA 19-9 においては、Ⅰ期、Ⅱ期の軽症例における陽性率の低さと、chocolate cyst を有する例における悪性卵巣腫瘍との鑑別が問題となると考えられた。

17. 多嚢胞性卵巣症候群における副腎機能の検討

木村敏男・成田 収・大沢政巳
近藤育代・中村潔史・山下英二
石原 豊 (名古屋大分院産婦)
松沢克治・小栗久典・浅田義正
古橋 円・友田 豊
(名古屋大産婦)

多嚢胞性卵巣症候群の診断基準は施設により異なり、各々の診断基準によってデータを発表しているようである。われわれはその内分泌学的特徴のひとつである高 LH 血症に注目し、

① LH (0') ≥ 30 mIU/mL

② LH/FSH (0') ≥ 2.5

③ LH (30') ≥ 150 mIU/mL

の全てを満たすものを高 LH 血症と定義した。

昭和 62, 63 年の 2 年間には 34 例の高 LH 血症患者を経験したが、いわゆる PCOD と極めて類似した症候群であった。これらに対し薬物療法、手術療法により 73% の排卵率と 60% の妊娠率を得た。さらに副腎性アンドロゲンである DHEA-S が 2500 ng/mL 以上を示した 10 例に対して、ACTH 負荷試験を行ない、副腎の酵素活性を検討した。その結果 11 β -Hydroxylase の活性低下を認めたが、21-Hydroxylase の活性は正常であった。これは高 LH 血症の原因であるのか、あるいは結果であるのかは、さらなる検討が必要である。

18. ヒト単球におけるエストロゲン結合部位について

和田圭介・伊藤俊哉・中川美紀
伊藤直樹・森 秀弘・玉舎輝彦
(岐阜大産婦)

子宮内膜症患者の腹水中には活性型マクロファージから放出される IL-1 の濃度が正常人のそれより高いことが知られ、さらにこの IL-1 が子宮内膜症組織の増殖に関与する可能性が指摘されている。また、ダナゾールは IL-1 のマクロファージからの放出も抑制し、子宮内膜症に効果を発揮しているともいわれているが、その作用機序は現在のところ不明である。

今回それを血液中の monocyte 用いて estrogen 結合部位の面から検討した。その結果、monocyte に estrogen type I (estrogen receptor), type II (II EBS) 結合部位が存在することが明らかとなった。この II EBS はウサギ、ラット子宮、ヒト子宮内膜に

存在し、estrogen 効果と密接な関係があり、ダナゾールにより結合阻害をうけ、部位数が減少することを報告してきた。estrogen は monocyte の IL-1 の放出を刺激するといわれ、ダナゾールはこの II EBS の減少、結合阻害を介して IL-1 の放出低下を引き起こすと考えられた。

19. ヒト卵巣における α -ANP (α -Atrial Natriuretic Peptide) の局在性に関する免疫組織化学的検討

松野忠明・西山真人・浜口元昭
中 義尚・矢納研二・山本稔彦
杉山陽一 (三重大産婦)

(目的) α -ANP は、強力な利尿・Na⁺排泄能を有する活性ペプチドであるが、ステロイド産生組織においても、ホルモンの産生調節に役を担っているとされている。そこでヒト卵巣組織における α -ANP の生理作用を明らかにする糸口として、種々の発育過程にある卵胞における α -ANP の局在性を免疫組織化学的手法を用いて検討した。

(方法) 免疫組織学的染色は、抗ヒト α -ANP ポリクロナール抗体を用いた Avidin-Biotin Peroxidase Complex Method (ABC 法) によった。反応特異性については、一次抗体を正常家兔血清に置換することにより確認した。

(結果) α -ANP は、莢膜細胞および莢膜細胞由来の細胞層に強染性を認めた。

(考察および結論) 莢膜細胞を中心とする α -ANP の局在性が明らかとなったことから、 α -ANP は主として卵巣における androgen 産生過程で何らかの重要な生理作用を発揮している可能性が示唆された。

20. ヒト初期胚の着床における接着性物質の局在に関する研究

朝比奈俊彦・林 賛育・小林隆夫
寺尾俊彦・川島吉良
(浜松医大産婦)

ヒト卵管妊娠組織を用いて、着床部位の接着性物質の局在を酵素抗体法にて検索し、若干の知見を得たので報告する。

(方法) 手術的に摘出した妊娠 7~8 週の卵管妊娠着床部位をホルマリン固定し、酵素抗体法の間接法を用い、fibronectin, laminin type IV collagen, XIII 因子 subunit A (XIII_A), XIII 因子 subunit S (XIII_S) の染色を行なった。

(結果) ① fibronectin は卵管内膜側の間質に強く染色された。② XIII_A は絨毛の間質細胞と卵管内膜側の

間質に強く染色されたが、 XIII_s はその両者ともに染色されなかった。

(考察)①ヒト初期胚の接着因子として、子宮内膜側の fibronectin とそれに架橋的に働く XIII 因子の関与が強く疑われた。②着床部における XIII 因子は、 XIII_A 単独であり、血小板由来である可能性が示唆された。③初期絨毛における XIII_A の産生は、間質細胞で行なわれている可能性が示唆された。

21. 一般病院における GIFT, PROST,

IVF-ET の施行とその問題点

浅田美佐・木村 隆・伊藤 尚
三輪茂美・柴田 均・藤村由美
越知正憲・呉 明超・宮崎俊英
石川 薫・可世木成明・風戸貞之
須之内省三

(名古屋第 1 赤十字病院産婦)

配偶子卵管内移植 (GIFT), 前核期胚卵管内移植 (PROST), 体外受精胚移植 (IVF-ET) を施行する上で、アンケートの結果、患者側から採精場所の不備、頻回の浣腸等が問題点として明らかとなり、採精室の確保、浣腸方法変更などの対応をしてきた。どの方法を選択するかは、患者の希望、受精の確認の必要性も考慮されるが、1 回目には腹腔鏡診断を兼ね、GIFT または PROST を行ない、手術室や腹腔鏡を使用するため、手術日の決まった時間で無ければ出来ず、HCG 切り替えはこれを考慮せざるを得ず、最適の時期に採卵が出来ていない。GIFT, PROST の、どちらにするかも、手術日との兼ね合いで決定される。また選任ラボランチン置きせず、培養液の調製などは医師が業務の合間に行なうため、均質性に不安が残る。これら問題点を不妊症専門ではない、一般病院という条件の中で解消するためには、出来る限りの処置を外来レベルで行なうのが最善の策であり、外来 IVF-ET を中心にやって行ける system にしたい。

22. Gn-RH analogue 併用による

IVF-ET の治療成績

貝田清隆・生田克夫・万歳 稔
花田征治・八神喜昭

(名古屋市立大産婦)

IVF-ET において Gn-RH analogue である Buserelin ($900 \mu\text{g}/\text{day}$) を併用した卵巣刺激方法で、HMG 製剤に含まれる LH 含有量の差が治療成績に及ぼす

影響について、17 症例 29 周期を対象として、FSH: LH が 75:75 の HMG と FSH: LH が 75:0.4 の FSH を使用し比較検討した。

HMG 群と FSH 群との比較では、HMG 投与中止時 E_2 値 (1526 ± 1079 , 1083 ± 871), 回収卵子数 (7.6 ± 6.1 , 5.2 ± 4.7), 回収成熟卵子数 (6.3 ± 5.2 , 4.1 ± 3.3) において、HMG 群に若干高い傾向がみられた。他は、受精卵子数 (3.2 ± 3.4 , 3.1 ± 2.4), ongoing pregnancy (33.3%, 16.7%) には有意差はみられなかった。

これらより FSH/LH の比の違いが卵胞の顆粒膜、莢膜細胞を介して E_2 の産生に若干影響を及ぼす可能性が考えられたが、受精率、妊娠率などに統計的に有意差が認められなかったこと、受精、分割卵子数には明らかな差を認めなかったことから、LH の含有量の違いは IVF-ET の治療成績に重要な影響を与えないものと考えられた。

23. 体外受精における卵胞液ホルモン濃度の検討

館山祐子・白木 誠・神谷貴之
丸山邦之・友松守彦・市川文隆
廣田 稜・澤田富夫・吉村泰典
河上征治・福島 稜

(藤田学園保健衛生大産婦)

当院にて施行した IVF-ET のうち、16 症例 21 周期を対象として卵胞液中ステロイドホルモン濃度を測定し、結果を比較検討したので報告する。

- ①卵胞液中 E_2 レベルは卵丘細胞の形態と相関関係がある
- ②分割卵は、卵胞液中に有意に高い E_2 , P 値を示している
- ③分割卵の卵胞液中の E_2/P 比は有意に高い値を示した

採取卵の受精能および分割能は、卵胞が十分に estrogenic であることが必要条件であると考えられた。しかしながら、 E_2 高値の卵胞が得られた形態学的に成熟した卵が必ずしも受精するとは限らず、未解決の問題が多数残されている。今後、卵の受精能力や受精後発育について、さまざまな角度から研究をすすめ、IVF-ET の成功率の向上に役立てたいと思う。

24. マウス卵を用いた顕微受精法の検討

(特に Zonadrilling 法について)

大沢政己・成田 収・木村敏男
近藤育代・中村潔史・山下英二
石原 豊 (名古屋大分院産婦)
松沢克治・小栗久典・浅田義正
古橋 円・友田 豊
(名古屋大産婦)

体外受精胚移植は本来卵管性不妊の治療法として開発されたものである。最近ではその適応は拡大し、男性不妊を含めた、さまざまな不妊症に対して応用

されている。受精が成立するためには、精子は卵丘細胞、放射冠、透明帯などの卵の周囲環境を順々に通過していかなければならないが、高度男性不妊症患者においては、精子がこれら周囲環境、特に透明帯を貫通することが難しいため、体外受精によっても受精を成立させることがしばしば困難である。しかし、哺乳動物において行なわれている顕微受精法の応用により、精子所見不良の症例でも受精を成立させる可能性が出てきた。今回われわれは、顕微受精法の一つである zona drilling について検討し、その臨床的意義について考察したので報告する。

関連学会開催のお知らせ

第13回産婦人科マイクロサージャリー学会・学術講演会

期 日：平成2年7月5日（木）

会 場：コクヨホール

東京都港区港南1-8-35

TEL 03-450-3712

一般講演：

特別講演：

I 婦人科マイクロサージャリーの現状と将来

座 長：東邦大

百瀬 和夫

演 者：カーネギー医院

印牧 義孝

II マイクロサージャリー最新の手技

座 長：カーネギー医院

印牧 義孝

演 者：東京警察病院

大森喜太郎

シンポジウム：

卵管間質部閉塞の診断・病理・治療

座 長：藤田学園保健衛生大

河上 征治

演 者：診断 東邦大

斉藤 真一

：病理 日本大

長田 尚夫

：治療 東海大

小林 善宗

川崎市立

関 賢一

群馬大

関 守利

連絡先：東邦大学医学部第1産婦人科学教室

〒143 東京都大田区大森西6-11-1

TEL 03-762-4151 内線3585

会長

百瀬 和夫

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

*なお、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

日本医学会だより

1989年10月 No.2

1. 幹事会

1989年9月12日(火)に第14回幹事会が開催され、以下のような日本医学会にとって重要な事項について審議された。

2. 第23回日本医学会総会の準備状況について

第23回総会は、岡本道雄会頭、佐野晴洋・佐野豊両副会頭、井村裕夫準備委員長の下で、1991(平成3)年4月5日から7日の3日間、京都市において開催される。

総会のメインテーマは、「転換期に立つ医学と医療—創造と調和と信頼—」に決定した。シンボルマークとしては、医学が原点から創造の未来に飛躍するとともに、医学と人間社会との調和、そして人間の信頼をシンプルに表現したものが採用された。

なお、学術講演会は、19会場を使用し、宝ヶ池地区と岡崎地区で行われる。特別講演、シンポジウム、パネル、教育講演的なミニレクチャーなどが予定されている。

展示は、4カ所に分散して行われ、かなりのスペースで機器の展示が予定されている。

3. 日本医学会総会あり方委員会

4年毎の日本医学会総会の間に「中間総会」を持つことについて、重点的に論議がすすめられている。

4. 日本医学会シンポジウムについて

現在、5名のシンポジウム企画委員会委員の協力の下に、課題を選んでいく。

今回の第87回日本医学会シンポジウムは、下記のとおり開催される(参加希望者は、日本医学会までお申し込み下さい)。

第87回日本医学会シンポジウム
主題「スポーツ医学の今日的課題」

日時：1989年11月28日(火) 9:30~17:30

場所：経団連会館ホール(東京、公開)

組織委員：黒田善雄(順天堂大・体育)・小野三嗣(慈恵医大・生理)・中嶋寛之(東大・教養)・村山正博(聖マ大・内科)・矢野 亨(日医常任理事)

なお、第84回日本医学会シンポジウムの「モデル動物と遺伝子」の記録は、単行書の形で刊行した。

第85回日本医学会シンポジウム「血管内皮細胞の機能と障害」の記録は、近く刊行の予定である(第85回日本医学会シンポジウムの記録をご希望の方は、日本医学会まで、葉書でお申込み下さい。無料領布)。

5. 医学用語管理委員会

現在、草間委員長、開原副委員長の下で、欧和版の第2版、和欧版の第1版の編集が、着々と進行している。

伊藤前委員長より引継いだ資料を基礎に検討が行われた。各委員に、具体的な問題点について意見を聞きながら進めている。同義語、反対語については、できる限り、関連語として採用する方向である。その他用語の取り上げ方については、各学会の用語委員会との連携を密にして、学会で採用しているものを使う方針である。

第2回委員会において、自治医大・生化学の香川靖雄教授を招き、意見を伺った。

6. 認定医制についての三者懇談会

7月5日(水)の第7回三者懇談会で、学会認定医制協議会と日本医師会との間で、概ね了解した事項は、次のとおりである。

① まず基本的科目について、認定医を公認する方向で今後推進していく。併せて第2段階として、専門科目について考える。基本科目は、医師国家試験科目、国立大学医学部の講座科目

の中から、小委員会で具体的に決めていく。

② 公認の方法として、まず学会が認定し、それに対して学会認定医制協議会議長、日本医学会会長、および日本医師会長の三者が追認する形をとる。

③医療法上の広告表示については、厚生省と日本医師会で協議していただく。

7. 日本医師会医学賞・医学研究助成費選考委員会

日本医師会より委託を受けて発足した標記委員会は、1989年9月12日（火）に開催された。

平成元年度日本医師会医学賞は、眞崎知生教授（筑波大・薬理）—「平滑筋収縮の分子薬理学的研究—その構造蛋白質の機能ドメインの研究とエンドセリンの構造と機能の研究—」、高久史麿教授（東大・内科）—「造血因子に関する基礎的・臨床的研究」、成毛詔夫博士（国立がんセンター・外科）—「肺癌のリンパ節転移と外科手術との相関に関する研究」の3氏に授賞が決定した。

平成元年度日本医師会医学研究助成費は、井上芳郎氏、中澤博江氏、森 正敬氏、清水不二雄氏、斎藤 厚氏、宮園浩平氏、西岡久寿樹氏、小林 正氏、北 徹氏、網野信行氏、早坂 清

氏、田村栄稔氏、桑原慶紀氏、安達恵美子氏、佐藤 暢氏の15氏に授賞が決定した。

11月1日の日本医師会設立記念医学大会の席上で表彰される。

8. 複写権センターについて

著作権問題については、複写権センター設立の機運がある。日本工学会が中心になっている。早い時期から日本医師会をメンバーに入れたいと考えられているが、費用の問題等、検討の余地があり、今なお、日本医学会としては参加していない状況である。

9. 会館の移転について

日本医師会館は、文京区本駒込に明年2月に新館が落成する。したがって、平成2年2月の第56回定例評議員会・第15回幹事会（1990年2月27日・火、10:30～幹事会、13:30～評議員会）は、経団連会館で開催することになる。

日本医学会

〒101 東京都千代田区神田駿河台 2-5

日本医師会館内 電話 03-291-2121(代表)

投 稿 規 定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある原著、総説、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、原則として未発表のものに限る。
3. 1 論文は、原則として刷り上り 6 ページ以内とし、超過は 4 ページ(計 10 ページ)までを認める。超過ページならびに特に費用を要する図、表、写真は実費を著者負担とする。
4. 原著、総説、論説、臨床報告などは必ず、400 字以内の和文抄録ならびに、ダブルスペース 2 枚以内の欧文抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付する。
5. 図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。
6. 記述は和文または欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。

a. 雑誌の場合

著者名：題名、誌名、巻数：ページ数、年次
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。誌名は規定または慣用の略名に従うこと。特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に入れて括弧で囲む、すなわち

著者名：題名、誌名、巻数(号数)：ページ数、

年次

例 1. Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy, Amer. J. Obstet. Gynec., 25: 104, 1933

2. 足高善雄, 竹村 喬, 美並義博: 最近 1 カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察, 日不妊会誌, 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, 68, 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の実費は著者負担とする。
14. 投稿先および諸費用の送付先は、東京都中央区日本橋 2 丁目 14 番 9 号 加商ビル(株)アイシーエス企画内 社団法人 日本不妊学会 事務局とする。

編集会議からのお知らせ

原稿用紙は B 5 判横書き 400 字詰のものを使用し、組版に差支えないよう清書して下さい。ワープロを使用しても結構です。(昭和 62 年 9 月)

ランニング・タイトル(和文で 25 字以内、英文では 40 letters 以内)を記載してください。(昭和 63 年 1 月)

編 集 委 員

百 瀬 和 夫 (委員長)

味 香 勝 也	石 島 芳 郎	遠 藤 克
小 林 俊 文	佐 久 間 勇 次	白 井 将 文
平 川 舜	穂 坂 正 彦	

EDITORIAL BOARD

Kazuo MOMOSE (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Yoshiro ISHIJIMA	Tuyoshi ENDO
Toshihumi KOBAYASHI	Yuzi SAKUMA	Masafumi SHIRAI
Shun HIRAKAWA	Masahiko HOSAKA	

事務局からのお知らせ

日本不妊学会の業務委託をしている(株)国際会議事務局の社名が(株)アイシーエス企画と変わりました。従って日本不妊学会事務局の住所は下記のとおりになります。

社団法人 日 本 不 妊 学 会
〒103 東 京 都 中 央 区 日 本 橋 2-14-9
加商ビル (株) アイシーエス企画内
(Tel. 03-272-7077)

日本不妊学会雑誌 35巻 1 号

1989 年 12 月 25 日 印 刷
1990 年 1 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