

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 35 No. 2

April
1990

日本不妊学会雑誌

第35巻 第2号

平成2年4月1日

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

会 告

第 35 回日本不妊学会総会および学術講演会 (第 2 回予告)

第 35 回日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領にて開催いたします。会員の皆様方の多数のご参加をお願い申し上げます。

日時・会場

学術集会 1990 年 11 月 16 日(金), 17 日(土)

総会・評議員会 1990 年 11 月 16 日(金)

日本コンベンションセンター国際会議場(幕張メッセ)

〒260 千葉市中瀬 2-1 TEL 0472-96-0001

理事会・幹事会を 11 月 15 日(木)にホテル・サンガーデン(JR 千葉駅 10 分)で行ないます。

学術講演会

本講演会では、特別講演、シンポジウム、一般講演などを行なう予定です。シンポジウムの詳細については追ってお知らせいたします。

一般講演には多数の演題をお申し込み下さいますようお願い申し上げます。なお今回も演題の一部をポスターセッションにしたいと考えております。ご応募の方は申し込み要領に従い、倫理面を充分考慮してご応募下さい。採否は会長にご一任願います。

I. 特別講演：

1. 配偶子および胚の凍結保存－基礎－

Dr. S. P. Leibo (ベイラー医科大学産婦人科)

2. 配偶子および胚の凍結保存－臨床－

大野虎之進 教授(東京歯科大学市川総合病院)

3. 哺乳類初期胚発生に及ぼす環境因子の解析

野田洋一 助教授(京都大学産婦人科)

4. 射精障害に対する人工射精法

牛山武久 医長(国立身体障害者リハビリテーションセンター泌尿器科)

II. シンポジウム：

1. 精子形態異常の基礎と臨床

司会 永野俊雄 教授(千葉大学解剖)

片山 喬 教授(富山医科薬科大学泌尿器科)

2. Microfertilization (顕微受精法)

司会 入谷 明 教授(京都大学農学部)

広井正彦 教授(山形大学産婦人科)

III. 一般演題：

演題申込資格

講演者（共同発表者を含む）は本会会員に限ります。会員以外の方は演題申込と同時に、1990 年度会費（8,000 円）を納入の上、会員になって下さい。

演題申込要領

1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプまたはワープロで打ち書留郵便にて下記へお送り下さい。
〒280 千葉市亥鼻1-8-1
千葉大学医学部泌尿器科学教室内
第35回日本不妊学会事務局（担当 角谷秀典）
TEL 0472-22-7171 内線2242
2. 抄録は800字以内、図表はつけないで下さい。
3. 1施設より2題以上の出題のときは、必ず順位をつけて下さい。
4. 別紙演題申込書、受領書、採用通知書に所定事項を記入し、切手を貼り抄録用紙および抄録用紙コピー3部とともに送って下さい。
5. 申込締切：1990年7月20日（必着）

演題発表方法

講演時間は8分、討論時間は4分の予定です。スライドプロジェクターは各会場とも1台とします。発表形式（口演・ポスター）の最終決定は事務局にご一任願います。ポスターボードの大きさや討議方法などについては不妊学会誌に指示致します。

参加申込方法

当日学会会場にて受付ます。

学会参加費 7,000 円

懇親会会費 7,000 円

懇親会は学会第1日の終了後に会場内の国際会議室で行ないます。

1990年4月 第35回日本不妊学会
会長 島崎 淳

日本不妊学会誌

第35巻 第2号

平成2年4月1日

——目 次——

原 著

赤外線サーモグラフィーを用いた男子不妊症における精索静脈瘤の

臨床的検討……………高羽秀典・他 …… 1

急性及び亜急性の実験的精巣障害におけるラット血清中 LDH-X の出現

(英文)……………池本 庸・他 …… 7

Hypoosmotic swelling test と各種精子パラメーターとの

関連性についての検討……………布施秀樹・他 …… 13

ヒト先体反応精子の scoring に対する flow cytometry の応用 ……福田 勝・他 …… 18

精子無力症における精子の微細構造異常について 第5報

膿精液症および正常者の精子, 精子細胞等の微細構造について……………佐藤和宏・他 …… 23

特発性男子不妊症における Sertoli 細胞の定量的研究 ……長井辰哉・他 …… 29

囊胞腎と部分的逆行性射精を合併した精囊嚢状拡張症の1例……………遠坂 顕・他 …… 33

ラット精巣の加齢におけるペントースサイクル活性および

テストステロンのエストロジェンによる影響……………跡部一朗 …… 38

マウス前核期胚培養における酸素毒性の影響……………長岡 陽・他 …… 45

Superoxide Dismutase によるマウス 2-Cell block の解除 ……松本 央・他 …… 53

マウスの偽妊娠誘起法が胚盤胞の移植に及ぼす影響……………井原晴喜・他 …… 60

Caffeine-Kallikrein 処理精子による配偶者間人工授精への臨床的応用 ……渡辺政信・他 …… 66

ヒト型モノクローナル精子不動化抗体 (H6-3C4) 対応抗原の

組織局在性に関する検討……………亀田 絹・他 …… 73

洗浄濃縮-凍結精子の非配偶者間人工授精への応用……………小林俊文・他 …… 80

配偶者間人工授精 (AIH) の適応における精液所見と精子機能テスト

(Hypoosmotic swelling test) ……吉野和男・他 …… 85

八味地黄丸の乏精子症に対する効果……………森 明人・他 …… 89

高プロラクチン血症合併の造精機能低下症例に対する bromocriptine の効果

(英文)……………太田博孝・他 …… 94

高 TSH 血症を示す不妊(育)症患者の検討 ……安達知子・他 ……100

筋注 HCG 製剤の血中 HCG 値および HCG テストパックに及ぼす影響 ……假野隆司 ……105

排卵過程における過酸化脂質および free radical scavengers 活性の

変動と scavenger enzymes による排卵阻害効果

——過排卵処理幼若ラットにおける検討——……………須戸龍雄 ……109

多嚢胞性卵巣症候群における妊娠時の血中テストステロン動態について…高橋健太郎・他 ……116

月経異常と高アンドロゲン血症の関連について (英文) ……………田中昭一・他 ……120

八味地黄丸投与により妊娠・分娩に至った pituitary microadenoma を

伴った高プロラクチン血症の一例……………窪田早百合・他 ……125

IRMA 法を用いた TRH 負荷試験と潜在性高プロラクチン血症の検討 ……伊藤 哲・他 ……130

エンドセリン：月経周期、妊娠・分娩及び産褥における動態 (英文) ……白杵 愼・他 ……135

体外受精由来マウス胚の発生におよぼす EGF の効果 ……………坂本尚徳 ……143

新造影剤イオトロラン (イソピスト®) の子宮卵管造影法への応用

—臨床第 2 相多施設比較試験—……………百瀬和夫・他 ……148

経腔超音波断層法を用いた卵管疎通性の評価……………水上明保・他 ……159

経腔的超音波下卵管通水法の有用性の検討……………梁 善光・他 ……164

不妊婦人における子宮筋腫核出術の予後……………岡村 均・他 ……169

不妊症と Chlamydia trachomatis 感染 ……………武内裕之・他 ……175

不妊症夫婦における妊娠例の統計的解析……………大野洋介・他 ……180

Rokitansky-Küster-Hauser 症候群 10 例の検討 ……………鍋島雄一・他 ……186

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 35, No. 2, 1990)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Clinical Study on Male Infertility Associated with Varicocele
by Infrared Thermography *H. Takaba, T. Nagai,
T. Kinjo & K. Miyake* 1
- Appearance of LDH-X Activity in Rat Serum after Acute and
Subacute Testicular Damages *I. Ikemoto, T. Machida, A. Tanaka,
S. Kotera, H. Mikuriya & T. Shirai* 7
- Correlation between the Parameters of Sperm on
Semen Analysis and the Percentage of Swollen Sperm
in the Hypoosmotic Swelling Test *H. Fuse, I. Mizuno, S. Satomi,
T. Kazama, T. Terada & T. Katayama* 13
- Application of Flow Cytometry in Scoring Acrosome
Reacted Human Sperm *M. Fukuda, R. Miyazaki,
H. Takeuchi, S. Ito & M. Takada* 18
- Fine Structure of Asthenozoospermia in Infertile Men
5. Fine Structure of Sperm and Germ Cells in
Pyospermia and in Fertile Men *K. Satoh, S. Orikasa, I. Maehara,
S. Satoh, M. Takahashi & M. Hiramatsu* 23
- A Quantitative Study of Sertoli Cells in
Idiopathic Infertile Males *T. Nagai, H. Takaba,
M. Yamamoto & K. Miyake* 29
- Cystic Dilatation of Seminal Vesicles Associated with
Polycystic Disease of the Kidney and Partial Retrograde Ejaculation:
a case report *A. Tosaka, A. Yamazaki, A. Iwasaki,
M. Hirokawa, K. Matushita & S. Asakura* 33
- Pentose Phosphate Pathway Activity and Testosterone Production
in Rat Testis Treated Neonatally with Estrogen *I. Atobe* 38
- The Effects of Oxygen Toxicity on Early Development of
Mouse Embryo *Y. Umaoka, Y. Noda,
H. Matsumoto & T. Mori* 45

Release of Mouse 2-cell Block Phenomenon by Superoxide Disutase.....	<i>H. Matsumoto, Y. Noda, Y. Umaoka & T. Mori</i>	53
Effect of Pesudopregnancy Induction on Transplantation of the Fertilized Mouse Ova	<i>H. Ihara, T. Fukuyasu & K. Ashida</i>	60
Clinical Trials of Artificial Insemination with Husband's Sperm Treated with Caffeine and Kallikrein.....	<i>M. Watanabe, T. Tanifuji, H. Tashiro, H. Yoshida & K. Imamura</i>	66
Studies on Tissue Localization of Antigen Epitope Corresponding to the Human Sperm Immobilizing and Aggultinating Monoclonal Antibody (H6-3C4)	<i>K. Kameda, Y. Tsuji, T. Takemura & S. Isojima</i>	73
Cryopreservation of Concentrated Human Sperm, and its Use to AID	<i>T. Kobayashi, W. K. Won, K. Tanabe, R. Iizuka, S. Kaneko, Lee H. K., T. Oda & T. Ohono</i>	80
Study on the Semen Analysis and Hypoosmotic Swelling Test at Artificial Insemination with Husband's Semen	<i>K. Yoshino, K. Takahashi, A. Uchida, M. Kusakari, A. Manabe & M. Kitao</i>	85
Clinical Effects of Hachimijiougan on Oligozoospermia	<i>A. Mori, T. Douchi, S. Yamamoto, K. Takeuchi, S. Fukumoto, T. Oki & Y. Nagata</i>	89
Bromocriptine Administration for Oligospermic Infertility in Men with Marginal Hyperprolactinemia	<i>H. Ota, M. Fukushima & M. Maki</i>	94
Clinical Analysis of Sterility Patients with Hyperthyrotropinemia	<i>T. Adachi, Y. Shobu, M. Iwashita, A. Ohira, Y. Shinozaki, Y. Takeda & S. Sakamoto</i>	100
Evaluation of Influence of Extrinsic HCG on Serum HCG Level and Result of HCG Testpack	<i>T. Kano</i>	105
Changes of Lipid-peroxide and Free Radical Scavengers in the Superovulated Immature Rats Ovaries and an Inhibition of Ovulation by Scavenger Enzymes —Suggested Role of Free Radicals on Ovulation—	<i>T. Sudo</i>	109
The Plasma Testosterone Level in Pregnant Women with Polycystic Ovary Syndrome	<i>K. Takahashi, T. Shirai, K. Yosino, A. Nishigaki, Y. Eda, A. Uchida & M. Kitao</i>	116
Association of Menstrual Disorder and Hyperandrogenism	<i>S. Tanaka, H. Fukue, M. Mizunuma, M. Fujii, H. Yamamoto, H. Hata, T. Endo & M. Hashimoto</i>	120

Successful Treatment of Hyperprolactinemia with Hachimijiogan Resulted in Normal Pregnancy and Delivery: a Case Report	S. Kubota, S. Usuki, A. Oki, Y. Ichikawa & H. Iwasaki	125
The TRH Test Using the IRMA Method and Occulted Hyperprolactinemia	S. Itoh, Y. Toyonari, C. Okabe, H. Takeuchi, M. Fukuda & M. Takada	130
Endothelin-1: an Increase in Maternal Plasma Concentration During Labor Pain or on Delivery and the Existence of a Large Amount in Amniotic Fluid	S. Usuki, A. Oki, Y. Ichikawa, S. Kubota & M. Okane	135
Effect of EGF on the Preimplantation Development of Mouse Embryos Fertilized <i>in Vitro</i>	T. Sakamoto	143
Hysterosalpingography Using New Contrast Medium, Iotrolan (Isovist®)	K. Momose, M. Mizuno & H. Yamamura	148
Assessment of Fallopian Tubal Patency by Transvaginal Ultrasound	A. Mizukami, K. Sengoku, H. Takada, K. Tamate, Y. Kikukawa, M. Ishikawa & T. Shimizu	159
Utility of Hydrotubation under Transvaginal Ultrasonography	S. Liang, H. Masuda, N. Shinozuka, H. Gomibuchi, N. Mitsuhashi & M. Mizuno	164
Reproductive Outcome after Myomectomy in Infertile Women	H. Okamura, N. Nakamura & K. Matsuura	169
Infertility and Chlamydial Infection	H. Takeuchi, T. Iwasa, S. Utsuno, S. Ito, K. Ishikawa, M. Fukuda, T. Kubota & M. Takada	175
Statistical Analysis of Pregnant cases in Infertile Couples	Y. Ohno, H. Tamura, T. Tamura, M. Fukuoka, S. Hosoda, J. Kitawaki, Y. Inoue & H. Okada	180
Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome-Observations on 10 Cases	Y. Nabesima, M. Motobu, M. Saitoh, J. Sasaki & N. Mesaki	186

赤外線サーモグラフィーを用いた男子不妊症 における精索静脈瘤の臨床的検討

Clinical Study on Male Infertility Associated with Varicocele by Infrared Thermography

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 三宅弘治教授)

高 羽 秀 典	長 井 辰 哉	金 城 勤
Hiddenori TAKABA	Tatsuya NAGAI	Tsutomu KINJO
	三 宅 弘 治	
	Koji MIYAKE	

Department of Urology,
Nagoya University School of Medicine,
Nagoya 466, Japan

男子不妊症における赤外線サーモグラフィーの精索静脈瘤の診断的意義について臨床的検討を施行した。

対象は、名古屋大学泌尿器科不妊外来を受診した男子不妊症患者のうち、精索静脈の高位結紮術を施行され、術前術後に赤外線サーモグラフィーにより検査された48例である。赤外線サーモグラフィーは、精索静脈瘤の診断、手術後評価に有用であった。また手術効果の検討では、全般的に精液所見の改善を認めた。しかし赤外線サーモグラフィーの所見の有無で統計学的に有意差は認められなかった。一方 clinical varicocele 群では精液所見の改善傾向が認められ、妊娠係数は有意に改善した。しかし赤外線サーモグラフィーにより診断された subclinical varicocele 群の手術後の精液所見の改善は認められなかった。妊娠例を4例認めたが全て clinical varicocele 群であった。

赤外線サーモグラフィーは精索静脈瘤の客観的診断、subclinical varicocele の診断には有用であったが、必ずしも手術の有効率を向上させなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 241-246, 1990)

緒 言

赤外線サーモグラフィーは被験者に侵襲を与えず、副作用の心配もなく、操作も比較的簡便な診断機器であるため、広く臨床医学に応用されてきた。泌尿器科領域では、外陰部領域の診断に用いられ、特に陰囊疾患のスクリーニング検査としてその有用性が報告されている¹⁾。欧米はもとよりわが国でも精索静脈瘤の検査法の一つとして、多くの施設で使用され、その有用性も認められている^{2,3)}。

名古屋大学泌尿器科では、1984年から放射線科の協力を得て、男子不妊症患者における陰囊部サーモグラフィーを精索静脈瘤検索の補助診断法として施行してきた。今回は、陰囊部赤外線サーモグラフィーの術前診断の臨床的意義、手術後の精液所見との関係について検討を加えたので報告する。

対 象

対象は1984年7月より1988年6月までの4年間で名古屋大学泌尿器科不妊外来を受診した患者のう

ち、陰嚢部赤外線サーモグラフィーおよび精索静脈瘤高位結紮術（塞栓術を含む）を施行され、術後の経過観察可能であった 48 例である。

年齢分布は、22-46 歳、平均 32.4 歳であった。不妊期間は、6 カ月-18 年、平均 4.2 年であった。視触診で精索静脈瘤を認めた症例の Grade は I 度-6 例、II 度-10 例、III 度-7 例であった。視触診では、精索静脈瘤を認めず、赤外線サーモグラフィーにより hot spot または Valsalva test 陽性を示し subclinical varicocele と診断された症例は 14 例であった。またサーモグラフィーで異常所見を認めない特発性男子不妊症と考えられる 11 症例にいても高位結紮術を施行した。

方 法

測定機器は Nippon Avionics 社製の Thermal Video System-4300 を使用した。これは、scan time が 1 秒間に 16 回で、画像のコンピューター処理、撮影が可能である。従って Valsalva 負荷時の瞬時の温度変化を記録できる。室温を 25℃ 前後に一定にした後、患者の陰嚢部を露出、陰茎を腹壁に固定して、大腿部を布で被い、できるだけ大腿部皮膚温の影響をうけないようにした。立位安静時と Valsalva 負荷時に測定撮影した。今回の測定では、サーモグラフィーのスクリーニング検査の意義を確認する目的のため、サーモグラフィーの所見については、温度の検討は施行しなかった。精索部の温度上昇部を hot spot とし、Valsalva test により温度の上昇を認めたものを Valsalva test 陽性とした。そして理学所見上精索静脈瘤が明らかではないが、上記の所見を有する患者をサーモグラフィー上の精索静脈瘤（sub-

clinical varicocele）と診断した。患者の精液所見は 5 日間以上禁欲後に採取し、3 回の平均値で示した。統計処理は paired T-test および X^2 検定を施行した。 $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 術前のサーモグラフィー所見

（1）手術症例のサーモグラフィー所見（表 1）

表 1 に示すように hot spot および Valsalva test 陽性は 30 例、また hot spot がなく Valsalva test も陰性の症例は 14 例であった。hot spot がないにも拘らず、Valsalva test にて陽性となった症例は 1 例のみであった。

（2）サーモグラフィー所見と Grade との関係

表 2 に hot spot の有無と視触診所見による grade との関係を示す。両者は X^2 検定で有意な相関関係を認めた。視触診にて精索静脈瘤を認めない症例中、13 例 (52%) に hot spot を認め、これらは subclinical varicocele と診断された。また、false negative を 3 例に認めた。

表 3 に Valsalva test の結果と視触診所見による

表 3 サーモグラフィーのバルサルバテストと精索静脈瘤の grade との関係

Valsalva test	-	+	Total
Grade 0	13	12	25
Grade 1	0	6	6
Grade 2	3	7	10
Grade 3	1	6	7
Total	17	31	48

$$X^2 = 6.27 \quad P < 0.05$$

表 4 hot spot の有無と手術前後の精液所見

hot spot	+	-
精液量 (ml)	3.5 ± 1.4 3.3 ± 1.3	3.6 ± 1.3 3.9 ± 1.7
精子数 (10^6 /ml)	9.2 ± 10.2 14.6 ± 20.8	9.5 ± 7.2 15.7 ± 12.0
運動率 (%)	34.2 ± 21.9 39.1 ± 21.4	25.3 ± 20.8 30.6 ± 20.9
奇形率 (%)	18.9 ± 14.1 16.2 ± 14.1	23.6 ± 22.5 20.0 ± 21.3
妊娠係数	9.8 ± 12.2 21.8 ± 30.0	8.4 ± 10.6 17.9 ± 18.6

$$\text{妊娠係数} = \text{精液量} \times \text{精子量} \times \text{運動率} \times 10^{-6} \quad \begin{array}{l} \text{上：術前} \\ \text{下：術後} \end{array}$$

表 1 手術症例 (48 例) のサーモグラフィー所見

左精索部の hot spot	+	-
Valsalva test		
+	30	1
-	3	14

表 2 サーモグラフィーの hot spot と精索静脈瘤の grade との関係

hot spot	-	+	Total
Grade 0	12	13	25
Grade 1	0	6	6
Grade 2	3	7	10
Grade 3	0	7	7
Total	15	33	48

$$X^2 = 6.81 \quad P < 0.01$$

grade との関係を示す。両者は χ^2 検定で有意な相関関係を認めた。視触診所見で精索静脈瘤を認めない症例中、12 例 (48 %) に Valsalva test 陽性所見を認め、これらも subclinical varicocele と診断された。そのうち 11 例は hot spot も認められた。明らかな精索静脈瘤があるにも拘らず Valsalva test の陰性を 4 例に認めた。

視触診で精索静脈瘤がなく赤外線サーモグラフィーにより診断された subclinical varicocele は 14 例 (14/25 例, 56 %) であった。また明かな精索静脈瘤があるにも拘らず、赤外線サーモグラフィーにて全く所見の認められなかった症例 (false negative) は 3 例 (3/23 例, 13 %) であった。

2. サーマグラフィー所見と手術前後の精液所見

(1) hot spot の有無と精液所見 (表 4)

術後の精液所見の各パラメーターは改善傾向を示

表 5 バルサルバテストと手術前後の精液所見

Valsalva test	+	-
精液量 (ml)	3.7±1.4 3.4±1.4	3.3±1.2 3.6±1.6
精子数 (10^6 /ml)	9.4±10.3 11.4±11.5	9.1±7.2 21.2±25.7
運動率 (%)	33.6±21.9 39.0±20.6	27.2±21.5 31.4±22.5
奇形率 (%)	20.4±14.8 17.2±14.3	21.0±22.2 18.3±21.3
妊娠係数	10.0±12.5 18.4±22.6	8.2±10.2 24.8±34.0

妊娠係数 = 精液量 × 精子数 × 運動率 × 10^{-6} 上: 術前
下: 術後

表 6 Clinical varicocele と Subclinical varicocele の手術前後の精液所見

	Clinical	Subclinical
精液量 (ml)	3.8±1.7 3.4±1.5	3.3±0.9 3.3±1.2
精子数 (10^6 /ml)	12.4±11.6 20.7±24.4	4.3±4.0 4.9±5.8
運動率 (%)	31.2±21.6 42.8±22.3	38.2±21.7 32.8±18.5
奇形率 (%)	18.8±16.2 16.8±16.1	24.6±7.4 17.0±4.1
妊娠係数	11.1±13.2 31.3±34.5	7.2±10.3 7.3±9.9

上: 術前
下: 術後

* $P < 0.1$
* * $P < 0.05$

した。しかし統計学的に有意差を認めなかった。hot spot の所見の有無でも精液所見の改善に有意差を認めなかった。

(2) Valsalva test と精液所見 (表 5)

術後の精液所見の各パラメーターは改善傾向を示した。しかし統計学的に有意差を認めなかった。Valsalva test の陽性所見の有無でも有意差を認めなかった。

(3) subclinical varicocele 群と clinical varicocele 群の手術前後の精液所見 (表 6)

視触診で明かな精索静脈瘤を認める clinical varicocele 群では術後の精液所見は改善を認め、妊娠係数は有意に改善した ($P > 0.05$)。一方視触診では精索静脈瘤を認めず、サーモグラフィーで hot spot または Valsalva test 陽性を示した subclinical varicocele 群では、奇形率のみ改善傾向がみられたがその他の精液所見のパラメーターでは改善を認めなかった。図 1 に各症例の術前と術後の妊娠係数を示した。subclinical varicocele 群で有意に妊娠係数の増

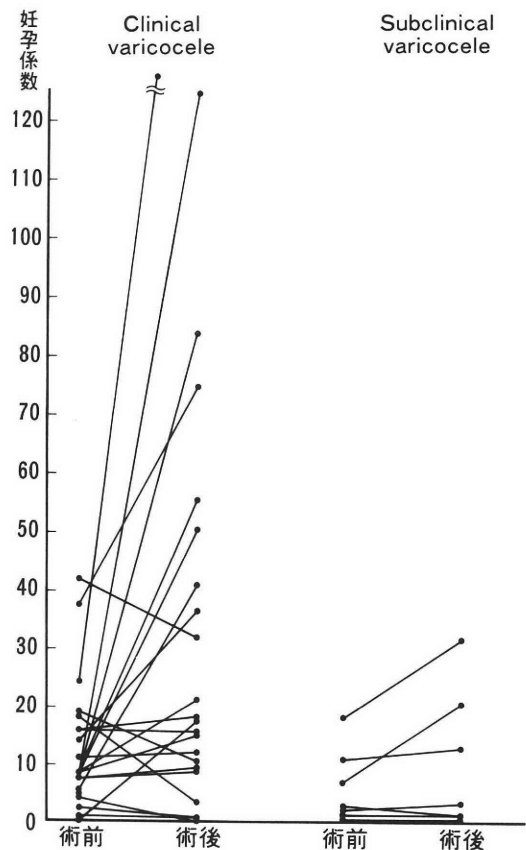


図 1 Clinical varicocele と Subclinical varicocele の妊娠係数の比較

加した症例は認められなかった。

3. 手術有効率

手術効果判定を精子濃度について行った。精子濃度を 500 万未満, 500 万から 2000 万, 2000 万から 5000 万, 5000 万以上の 4 ランクに分類し, 術後, 2 ランク以上あがったものを著効, 1 ランクのみ上がったものを有効とした。なお, 妊娠例は全て著効とした。有効以上で有効率を算出した。clinical varicocele 群の有効率は 39.1 % (9/23 例) であった。一方 subclinical varicocele 群の有効率は 0 % (0/11 例) であった。

4. 妊娠率

手術後, 4 例が妊娠した。妊娠例は全て clinical varicocele 群であった。全症例における妊娠率は 8.3 % (4/48 例) であった。赤外線サーモグラフィーにて精索静脈瘤と診断された症例における妊娠率は, 10.5 % (4/34 例), また clinical varicocele 群では 18 % (4/23 例) であった。

5. 手術後のサーモグラフィー所見

手術後のサーモグラフィーでは術前に認められた hot spot は全例消失し, Valsalva test も全例陰性化した。術後新たに hot spot が認められたり, Valsalva test が陽性化した症例は認めなかった。

考 察

精索静脈瘤の客観的診断法としては, サーモグラフィー (接触型, 非接触型赤外線), 精索静脈造影, 陰嚢部シンチグラフィー, 超音波ドップラー法などがある。それぞれに長所, 短所があり, いくつかの方法を併用して診断率を高めている。それぞれの診断法についての比較検討が報告されている。赤外線サーモグラフィーの診断率は, 静脈造影にやや劣るとされている^{4,5)}。陰嚢部シンチグラフィーは false negative 率が高く, 超音波ドップラー法は false positive 率が高いと報告されている⁶⁾。また陰嚢部シンチグラフィーは他の検査法に比較して感受性に落ちるが, サーモグラフィーと, 理学所見に差がある場合に有用であると報告されている^{7,8)}。また超音波ドップラーと接触型サーモグラフィーの組合せで正診率が高いとの報告もある⁹⁾。Gallo らは赤外線サーモグラフィーによる診断率は理学所見及び超音波ドップラー法にて診断した精索静脈瘤と 92 % で一致し, さらに陰性例の 20 % が陽性となったと報告し, 赤外線サーモグラフィーが精索静脈瘤の診断率を高めることを認めている¹⁷⁾。

赤外線サーモグラフィーの温度と精索静脈瘤の程度とは関連する, あるいは Grade III のみが関連する

という報告がある^{4,9)}。一方 Grade と温度差とは関連しないという報告もある³⁾。今回の研究では温度に関しては詳細な検討を行わなかったが, 赤外線サーモグラフィーの所見の正確さは Grade と有意に関連したことより, Grade の高い症例ほど, 精索部あるいは陰嚢部の高い温度上昇を示すものと考えられる。

赤外線サーモグラフィーのような補助的診断法が有用になるのは, subclinical varicocele を診断するときである。Netto らは, subclinical varicocele の診断における赤外線サーモグラフィーの 40.9 % の有効率を報告している¹⁰⁾。また Gallo らは, 男子不妊症の 31 症例に対し, 赤外線サーモグラフィーの定量化を施行し, 24 例の subclinical varicocele を赤外線サーモグラフィー検査により確定診断し, false negative も認めなかったと報告している¹¹⁾。今回の検討では, hot spot の有無で 6.3 % の false negative を認め, それらの症例は Valsalva test を行っても温度の上昇を認めなかった。この原因は温度の上昇しない精索静脈瘤が存在するためか, または測定時の温度調節あるいは機械の設定ミスなどが考えられる。一方赤外線サーモグラフィーでは false positive が認められ, その率が診断上問題になると考えられる。この false positive をできるだけ少なくするためには, 一つの方法のみでなく, いくつかの補助診断法を併用して, 診断することが肝要と考える。

Fornage らは, Valsalva test は小さな精索静脈瘤や subclinical varicocele の検出率の向上に有効であったと報告している¹²⁾。しかし今回の検討では, subclinical varicocele の診断率を高めるための Valsalva test の結果は, Valsalva 負荷前から高温域を有した症例に対し, 高温域を有しない症例での期待した検出率の上昇は認められなかった。すなわち Valsalva test は理学所見における精索静脈瘤の診断には有効であるが, 赤外線サーモグラフィーにおける subclinical varicocele の診断率の上昇には有効ではなかった。

術後の手術効果判定について, 赤外線サーモグラフィーは有効であるとする報告¹³⁾や, 術後に赤外線サーモグラフィーにて陰性になった症例は, 不変であった症例と比較して有意な精液所見の改善を認めた報告¹⁷⁾がある。今回の検討においても全例に高温部の消失, Valsalva test 陰性化を認め, 赤外線サーモグラフィーの術後効果判定の有用性が確認された。

顕性の精索静脈瘤に対する手術療法の有効性はすでに確立されており, その精液所見の改善率は 60-85 %^{15,16)}と報告されている。しかし今回の検討の目的は赤外線サーモグラフィーによる精索静脈瘤の診

断意義を検討することにより、そのため手術成績に関しては、赤外線サーモグラフィーで異常所見を有するものと有しないもの、すなわち特発性男子不妊症と考えられる症例とで手術成績を比較した。その結果、手術後の精液所見の改善に関しては、両者に有意差を認めなかった。これは、赤外線サーモグラフィーで異常所見を示した群に含まれる subclinical varicocele 群の手術改善度が非常に悪かったためであると考えられる。

subclinical varicocele に対する手術療法はいまだ議論のあとである。Ponchiatti らは超音波ドップラーと赤外線サーモグラフィーで診断した subclinical varicocele 患者の精索静脈瘤高位結紮術後に精液所見の有意な改善を認めている¹⁴⁾。一般に subclinical varicocele に対しても手術療法が有効であるという報告が多い。しかし我々の検討では、subclinical varicocele 群では術後の精液所見の改善を認めず、手術効果も得られなかった。唯一術後奇形率の改善傾向が示されたが、これは clinical varicocele 群にも認められるので、何か基本的な問題をはらんでいるのかもしれない。今回検討しなかったが、精巣の大きさやホルモン動態の異常なども手術効果に大きな影響を及ぼしていると考えられ、手術の適応決定には慎重な考慮が払われるべきだと考える。さらに varicocele を認めない群の中に術後精液所見の改善した症例があったことより、今回採用した赤外線サーモグラフィーの hot spot と Valsalva test の診断基準が十分でなかった可能性や赤外線サーモグラフィー検査における false positive の存在も考えられる。

一方 clinical varicocele 群においては、術後の精液所見の改善を認めた。顕性の精索静脈瘤の手術成績のよいことは、既に多くの研究者により報告されている事実であり、我々の検討でも同じ結果を得た。

我々の検討における精索静脈瘤の手術成績は、諸家の報告に比べて低く、妊娠例もわずか4例(8.3%)と少なかった。これは、varicocele を認めず特発性男子不妊症と診断された症例や、精子濃度が1000万以下の症例に対しても、積極的に手術を施行したためであると考えている。この結果から精索静脈瘤の認められない明かな特発性男子不妊症の患者に対しては、精索静脈瘤高位結紮術は無効であり、施行すべきでないと考え、また妊娠例は全て clinical varicocele 群であったことから、症例を選んで手術を施行すれば妊娠率、有効率は高くなるものと考えられる。

結 果

- 1) 赤外線サーモグラフィーを男子不妊症の48例に施行した。赤外線サーモグラフィーは精索静脈瘤スクリーニング検査に有効な補助診断法であった。
- 2) 精索静脈瘤高位結紮術を48例に施行した。手術後の赤外線サーモグラフィーは、手術効果判定に有効であった。
- 3) 精索静脈瘤高位結紮術により全般的には術後の精液所見には改善傾向が認められた。しかし術前の赤外線サーモグラフィーの所見について検討すると、hot spot の有無や Valsalva test の所見に関しては精液所見の改善に統計学的に有意差を認めなかった。
- 4) clinical varicocele 群と subclinical varicocele 群とで、精索静脈瘤高位結紮術後の精液所見を比較すると、clinical varicocele 群において精子濃度、運動率、奇形率で改善傾向がみられ、妊娠係数は有意に改善した。subclinical varicocele 群では、奇形率のみ改善傾向を認めた。
- 5) 術後、4例(8.3%)の妊娠症例を得たが全て clinical varicocele 群であった。

文 献

- 1) 平山 嗣：陰嚢内疾患におけるサーモグラフィーの応用，泌尿紀要，24：11，923，1978
- 2) 酒徳治三郎，越戸克和，瀧原博史：泌尿器科のサーモグラフィー，Biomedical thermology，：170，1988
- 3) 松下全巳，島谷 昇，広岡九兵衛，守殿貞夫，岡伸俊，浜口毅樹，岡田 弘，羽間 稔，松本 修，石神穰次：赤外線サーモグラフィーを用いた精索静脈瘤の臨床的研究，日不妊会誌，30：103，1985
- 4) Comhaire, F., Monteyne, R. and Kunnen, M.: The value of scrotal thermography as compared with selective retrograde venography of the internal spermatic vein for the diagnosis of subclinical varicocele, Fertil. Steril., 27: 6, 694, 1976
- 5) Comhaire, F., Kunnen, M., Vandeweght, M. and Simons, M.: Comparison of four different methods for the diagnosis of varicocele: Varicocele and Male Infertility II, 78, Springer, Verlog, 1984
- 6) World Health Organization: Comparison among different methods for the diagnosis of varicocele, Fertil. Steril., 43: 575, 1985
- 7) Nicolaij, D., Steeno, O. P., Coucke, W., Lamberigts, G., Steen, A. V., Devos, P. and De-Roo, M.: Comparison of scrotal scintigraphy and thermography for the diagnosis of varicocele, Eur. J. Nucl. Med., 8: 123, 1983

- 8) Comhaire, F., Vandeweghe, M. and Simons, M.: Comparison between thermography and venous scintigraphy of the scrotum in the diagnosis of varicocele, *Inter j. Andrology*, 4: 663, 1981
- 9) Hirsh, A. V., Kellett, M. J., Robertson, G. and Pryor, J. P.: Doppler Flow Studies, Venography and thermography in the evaluation of varicoceles of fertile and subfertile men. *Brit. J. Urol.*, 52: 560, 1980
- 10) Netto, Jr. N. R., Lemons, G. C. and Barbosa, E. M.: The Value of Thermograph and doppler ultrasound in varicocele diagnosis, *Int. J. Fertil.*, 29: 176, 1984
- 11) Gallo, L. M., Bosiger, P., Rageth, C. J. and Stucki, D.: Quantitative infra-red thermography to identify varicoceles as the cause of male infertility, *Biomed. Technic.*, 30: 284, 1985
- 12) Fornage, B. D., Valeyre, J. L., Lemaire, P. L. and Lardennois, B. M.: Scrotal thermography of 231 normal young adults, *Acta Thermographia*, 5: 38, 1980
- 13) Jones, C. H. and Hendry, W. F.: Thermographic examination of the scrotum, *Acta Thermographia*, 4: 38, 1979
- 14) Ponchietti, R., Scarselli, G. F., Noci, I., Rinovati, A. and Fiorelli, C.: Tele-Thermography and Eco-Doppler evaluation of subclinical varicocele in infertile men, *Acta Euro. Fertil.*, 14: 283, 1983
- 15) Dubin, L. and Amelar, R. D.: Varicolectomy as therapy in male infertility: a study of 504 cases, *J. Urol.*, 113: 640, 1975
- 16) Saypol, D. C.: Varicocele, *J. Androl.*, 2: 61, 1981
- 17) Gallo, L. M., Bosiger, P., Stucki, D. and Rageth,

C. J.: Quantitative infrared thermography in varicocele screening, *Thermography*, 2: 554, 1987

Clinical study on male infertility associated with varicocele by infrared thermography

Hidenori Takaba, Tatsuya Nagai,
Tsutomu Kinjo and Koji Miyake

Department of Urology,
Nagoya University School of Medicine,
Nagoya 466, Japan

Male infertility associated with varicocele was assessed by infrared thermography. Forty-eight patients with varicolectomy were examined before and after surgery. Infrared thermography was found useful for the clinical diagnosis and assesment of the effects of varicolectomy. No statistically significant sperm quality improvement was observed in the positive and the negative groups. It was noted in the clinical varicocele group after varicolectomy compared with the subclinical varicocele group. Four patients of the clinical varicocele group were pregnant.

From these results, infrared thermography may be considered useful for diagnosing subclinical varicocele but fails to enhance the chance of fertility after varicolectomy.

(受付: 1989 年 7 月 4 日)

APPEARANCE OF LDH-X ACTIVITY IN RAT SERUM AFTER ACUTE AND SUBACUTE TESTICULAR DAMAGES

Isao IKEMOTO, Toyohei MACHIDA,
Akira TANAKA, Shigeyuki KOTERA,
Hiroharu MIKURIYA and Takasi SHIRAI

Department of Urology
Jikei University School of Medicine,
Tokyo 105, Japan

Abstract: The usefulness of determining the release of LDH-X into the blood as a noninvasive indicator of various types of testicular damage was examined experimentally. Four kinds of acute (cadmium chloride administration and experimentally induced-testicular torsion) and subacute (dibutyl phthalate administration and experimentally induced-cryptorchidism) testicular damage were induced in mature male Wistar rats. LDH-X activity in the serum was assayed enzymatically at various times after the treatment. In all cases, serum LDH-X activity was detected after damage to the seminiferous tubules was proved histologically. The changes in the serum LDH-X activity were correlated with the histological changes. Therefore, we concluded that screening for LDH-X activity in serum might serve as a reliable and noninvasive marker for early detection of not only experimental testicular damage but also various clinical testicular disorders.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 247-252, 1990)

Introduction

LDH-X is an isozyme of the lactate dehydrogenase system. It is specific for the postpubertal testis and is the most active form of the enzyme present in mature sperm¹⁾. Haqqi and Adhami (1982) first reported LDH-X activity in the serum from aphorated-treated rats²⁾. Itoh and Ozasa (1985) investigated the LDH-X activity in the serum of cadmium (CdCl_2)-treated rats and suggested that the activity of this enzyme in serum might serve as a reliable and convenient marker for early detection of cadmium-induced testicular damage³⁾. However, no one has yet reported the activity of this enzyme in common testicular diseases, such as testicular torsion and cryptorchidism. Accordingly, we investigated the activity of LDH-X in serum from rats with var-

ious types of experimental testicular damage and looked for a correlation with histologic changes in the testis.

Materials and Methods

Animals: A hundred adult male Wistar rats, from laboratory bred and maintained stock, were used. They were about 10 weeks old and weighed about 200 gm. Experimental protocol (Fi. 1): The animals were divided into 4 groups of 25 each. The cadmium group received a single intraperitoneal injection of CdCl_2 , 4 gm/kg-body weight. The testicular torsion group rats were subjected to bilateral spermatic cord torsion of 360 degrees counterclockwise. In the cryptorchidism group, both testes were raised into the intraperitoneal position and the epididymides were anchored to the posterior abdominal wall by suture ligation.

The dibutyl phthalate (DBP) group was orally administered DBP at a dose of 2.4 mg/kg for 7 consecutive days. At various times after each of the above treatments, the rats were killed (details are shown in Fig. 1). The rats were sacrificed by blood puncture from the abdominal aorta, and the serum was separated by the conventional method. Both testes of the rats were resected, weighed, fixed with Bouin solution, dehydrated and sliced into 5- μ sections. The sections were stained with PAS-hematoxylin solution and examined under by light microscopy.

Serum LDH-X activity assay: Serum LDH-X assay was performed at 25°C by measuring the decrease in absorbance of NADH at 340 nm using a Hitachi 220-10 spectrophotometer equipped with a temperature-controlled cuvette chamber. The assay mixture contained 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), 0.15 mM NADH, 0.15 mM α -ketovaleric acid (specific substrate for LDH-X) and an appropriate amount of serum in a final volume of 3.0 ml. The reaction was initiated by the addition of the substrate and followed by the decrease in absorbance of NADH at 340 nm. Because a distinct decrease in absorbance was observed immediately after the addition of NADH into the buffer solution containing the serum, the actual measurement was started only after the non-specific oxidation of NADH had come to an end. One unit of LDH-X activity was defined as the amount of enzyme which catalyzed the oxidation of 1 μ mol of NADH at 25°C in 1 min. (3).

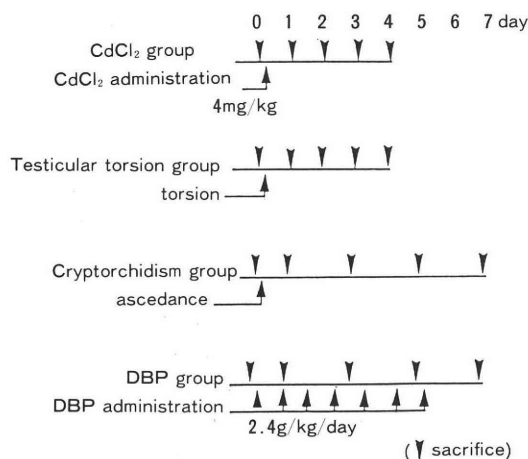


Fig. 1 Experimental protocol.

Results

We first analyzed the influences of the incubation time and the serum volume on the enzyme reaction employed in this experiment. The serum LDH-X activity showed a linear increase in proportion to the incubation time up to 8 min. (Fig. 2). The serum volume, ranging from 100 to 400 μ l, exerted no inhibitory effect on the enzyme reaction (Fig. 3). These results indicate that the enzymatic assay of LDH-X activity in this experiment is highly reliable.

The cadmium and testicular torsion groups of rats showed nearly the same time-dependent changes in the LDH-X activity in serum and the testicular histology. Before the experiment, no LDH-X activity was detected in the sera. LDH-X activity appeared in the serum within 1 day after the administration of CdCl₂ or induction of testicular torsion. The serum LDH-X activity reached a maximum value 2 days after the experimental treatment, began to decrease within 3 days, and continued to decrease thereafter (Fig. 4). The time-dependent changes in testicular histology correlated with the change in LDH-X activity in the serum. On Day 1 after the administration of CdCl₂ or induction of torsion, the testes already showed destruction of both seminiferous tubules and interstitial tissue, and such damage became more severe with time (Fig. 5 and 6).

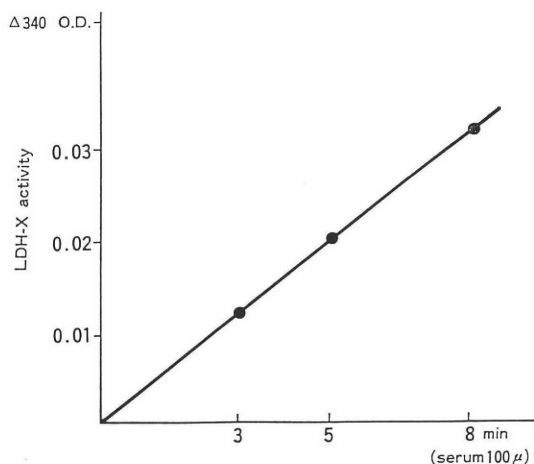


Fig. 2 Changes in LDH-X activity in the rat serum as a function of incubation time.

The DBP and cryptorchidism groups of rats showed identical time-dependent changes in the serum LDH-X activity and the testicular histology. On Day 3 after the administration of DBP and induction of bilateral cryptorchidism, LDH-X activity appeared in the serum, and the activity increased gradually thereafter (Fig. 7). Histologically, the damage was confined to the germ cells and Sertoli cells, while the interstitial tissue was preserved (Figs. 8 and 9). Sometimes germ cells were seen to have sloughed from the seminiferous epithelium and were floating in the lumen as clusters (Fig. 10).

Discussion

Recently urologists have shown much interest in serum markers. Tumor markers, such as HCG as HCG and AFP, are good examples, and they are of great help in the diagnosis, staging and design of the treatment plan for testicular tumors. However, there have been no ideal markers in the field of male infertility. A marker which could predict damage to the seminiferous tubules in a noninvasive and reliable way, would obviate the need for invasive testicular biopsy and facilitate decision of the treatment plan for various testicular diseases. Therefore, we urgently need a reliable marker of testicular damage.

Haggi and Adhami first reported that LDH-X is released from germ cells in to the systemic circulation after induction of testicular damage by alkylating agents²⁾. Itoh and Ozasa reported find-

ing LDH-X activity in serum from mice treated with CdCl_2 , and they suggested that the determination of this enzyme activity in serum could detect CdCl_2 -induced testicular damage in an early stage³⁾. However, those investigators did not try to correlate the serum LDH-X activity with testicular histologic changes in various common testicular diseases. Our present experiment is thus very unique in that we investigated the serum LDH-X activity and correlated it with testicular histologic changes in various testicular diseases, both acute and subacute.

All the male Wistar rats used in this experiment showed normal mature testicular histology and no serum LDH-X activity before the treatment. The enzymatic assay of LDH-X activity used in this experiment was highly reliable, as is proved by the data in Figs. 2 and 3.

We created 4 kinds of experimental testicular disorders in this experiment. The CdCl_2 administration and testicular torsion represented acute, pretesticular causes of male infertility^{4,5)}, while the DBP administration and cryptorchidism represented subacute to chronic, testicular causes of male infertility^{6,7)}.

The testicular torsion and CdCl_2 groups of rats showed the same acute time-dependent changes in serum LDH-X activity and testicular histology. In both groups, the testicular histology showed rapid

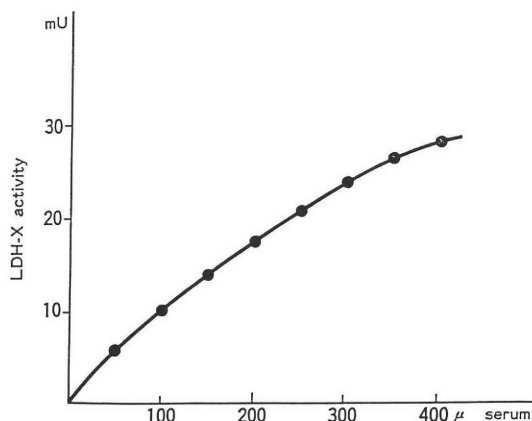


Fig. 3 Changes in the LDH-X activity in the rat serum as a function of serum concentration.

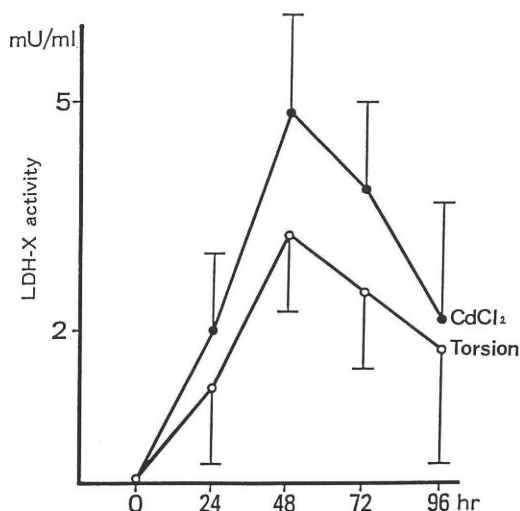


Fig. 4 Changes in the LDH-X activity of rat serum after dosing of CdCl_2 and testicular torsion.

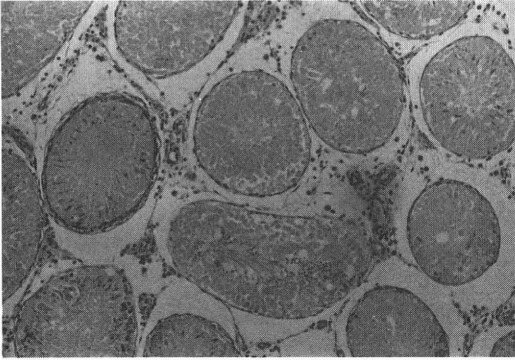


Fig. 5. Microscopic section of the rat testis 96 hr after CdCl_2 treatment.

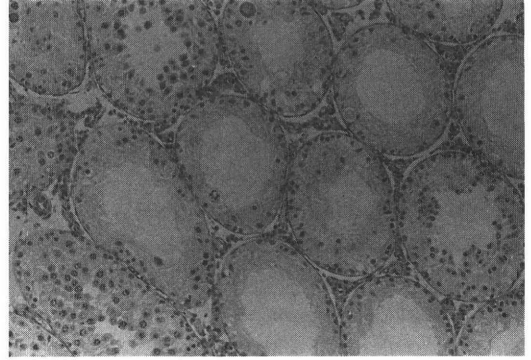


Fig. 8. Microscopic section of the rat testis Day 7 after bilateral cryptorchidism.

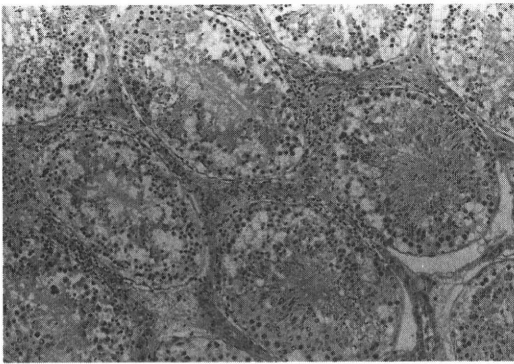


Fig. 6. Microscopic section of testis 96 hr after bilateral testicular torsion.

Fig. 5. and 6. showed severe damage of testicular histology and the damage was formed both seminiferous tubules and interstitial tissue for a short term.

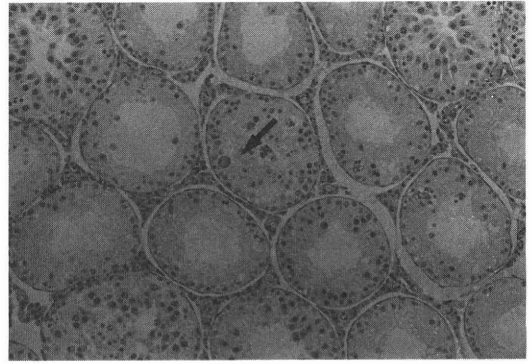


Fig. 9. Microscopic section of the rat testis Day 7 after DBP treatment.

Fig. 8. and 9. showed intratubular damage and normal findings in interstitial tissue. Arrow indicated multinucleated giant cell in tubules.

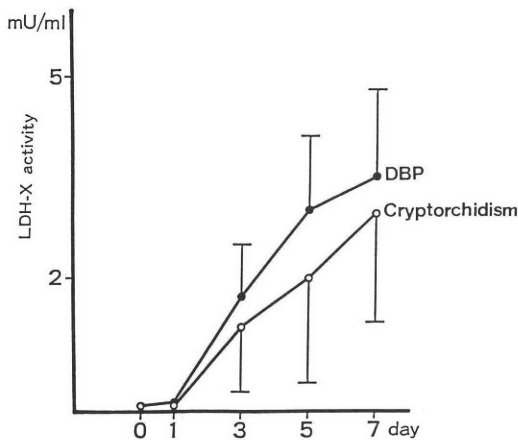


Fig. 7 Changes in the LDH-X activity of rat serum after experimentally induced cryptorchidism and dosing of DBP.

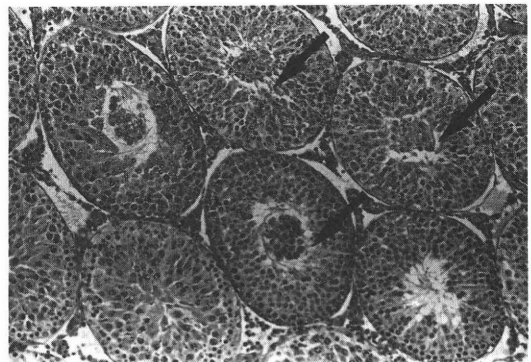


Fig. 10. Microscopic section of the rat testis Day 3 after DBP treatment.

The germ cells were observed as "sloughing" floating like island in the tubule (arrows).

destruction. The time-dependent change in serum LDH-X activity was closely correlated with the disappearance of mature germ cells. Therefore, we believe that acute damage to the testes induces the release of LDH-X into the systemic circulation whenever mature germ cells are destroyed, and that LDH-X activity in the serum is a highly reliable marker of acute, pretesticular causes of male infertility.

Both the DBP and cryptorchidism groups of rats showed the same, subacute time-dependent changes in serum LDH-X activity and testicular histology. There are two reasons why we used DBP in this experiment. First, DBP induces damage mainly to the seminiferous tubules, and that is a common histologic finding of the testes in male infertility patients⁶⁾. Many of the DBP group rats showed so-called "sloughing phenomenon", which is commonly seen in the testes of varicocele patients⁸⁾. Second, DBP is a prototype of environmental pollutants and gonadotoxins⁹⁾. Recently, there has been much interest in male infertility induced by environmental pollutants and gonadotoxins^{10,11)}. We surmise that LDH-X activity in the serum can serve as a reliable marker of seminiferous tubular damage in patients with varicocele and in various testicular diseases. In this regard, the LDH-X activity in serum is highly promising as a marker of various kinds of testicular damage.

In summary, we conclude that LDH-X activity in serum is a sensitive and specific marker of various kinds of testicular damage, and it will obviate the need for invasive testicular biopsy and facilitate the design of treatment for various clinical testicular disorders. In addition, our experimental findings indicate that leakage of this enzyme into the extratesticular environment may stimulate the autoimmune system of human body. Therefore, LDH-X may ever play an important role in autoimmune infertility.

References

- 1) Goldberg, E.: Lactic and malic dehydrogenases in human spermatozoa, *Science*, 139: 602, 1963
- 2) Haqqi, T. M. and Adhami, U. M.: Testicular damage and change in serum LDH isozyme

pattern induced by multiple sub-lethal doses of apholate in albino rats, *Toxicol. Lett.*, 12: 199, 1982

- 3) Itoh, R. and Ozasa, H.: Changes in serum lactate dehydrogenase isozyme-X activity observed after cadmium administration, *Toxicol. Lett.*, 28: 151, 1985
- 4) Parizek, J.: Effect of cadmium ion on testicular tissue, *Nature Lond.*, 177: 1036, 1956
- 5) Smith, G. I.: Cellular changes from graded testicular ischemia, *J. Urol.*, 73: 355, 1955
- 6) Isao, I.: Experimental studies on testicular damage induced by phthalic acid esters (in Japanese), *Jikeidaisi*, 100: 1115, 1985
- 7) Robinson, J. N. and Engle, E. T.: Some observation on the cryptorchid testis, *J. Urol.*, 71: 726, 1954
- 8) Okuyama, A., Koide, T., Itatani, H., Sonoda, T., Aono, T., Mitsubayashi, S., Yoshida, T. and Miyagawa, M.: Pituitarygonadal function in schoolboys with varicocele and indications of varicocele, *Eur. Urol.*, 7: 92, 1981
- 9) Oishi, S. and Hiraga, K.: Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: Effect on testosterone and Zn concentrations, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53: 35, 1980
- 10) Berthelsen, J. G.: Testicular cancer and fertility, *Inter. J. Androl.*, 10: 371, 1987
- 11) Auroux, M., Dulloust, E. M., Nawar, N. Y. and Yacoub, S. G.: Antimitotic drugs (cyclophosphamide and vinblastine) in the male rat, Death and behavioral abnormalities in the offspring, *J. Androl.*, 8: 378, 1986

急性及び亜急性の

実験的精巣障害における

ラット血清中 LDH-X の出現

東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室

池本 庸 町田豊平 田中 彰
小寺重行 御厨裕治 白井 尚

乳酸脱水素酵素 (LDH) のアイソエンザイムのうち LDH-X は精子及び成熟精巣にのみ特異的に存在する。急性の実験的精巣障害でこの酵素が血中に出現することが最近報告された。そこで血中の LDH-X の測定が精巣障害の指標として有用かどうか実験的に検討した。

成熟雄ウイスターラットに4種の実験的精巣障害、即ち (A) 塩化カドミウム1回投与、(B) 実験的精索捻転、(C) dibutyl phthalate 週間投与、(D) 実験的停留精巣を作製し、処置後1週間経時的に血中の LDH-X 活性を酵素法にて測定、精巣の組織像と併せて検討した。その結果、(A) 及び (B) では処置前血中に認められなかった LDH-X 活性が処置後2日目をピー

クに血中で証明され、(C) 及び (D) では処置後経時的に上昇傾向を示して証明された。

以上より実験的精巣障害では血中 LDH-X 活性の測定が精巣障害のマーカーとして信頼に足るものであり、

臨床的にも急性の精巣障害において応用の可能性があることが示唆された。

(受付: 1989 年 7 月 17 日)

Hypoosmotic swelling test と各種精子パラメーター との関連性についての検討

Correlation between the Parameters of Sperm on Semen Analysis and the Percentage of Swollen Sperm in the Hypoosmotic Swelling Test

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)

布施 秀 樹

Hideki FUSE

風 間 泰 蔵

Taizo KAZAMA

水 野 一 郎

Ichiro MIZUNO

寺 田 為 義

Tameyoshi TERADA

里 見 定 信

Sadanobu SATOMI

片 山 喬

Takashi KATAYAMA

Department of Urology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University,
Toyama 930-01, Japan (Director: Prof. T. Katayama)

特発性男子不妊症を対象として、hypoosmotic swelling test を施行した。本法により精子尾部の膨化した精子の割合を算定し、精子膨化率とした。これと各種精子パラメーターとの関連について検討し、以下の結果をえた。

精子濃度および精子運動率は、ともに精子膨化率と比較的高い相関をみたが、後者の方が前者より相関係数が高かった。平均精子直進性および平均精子運動速度は、ともに精子膨化率との相関が低かった。

以上より hypoosmotic swelling test での精子膨化率は、精子パラメーターのうち、特に精子運動率と関係が深く、一方精子運動率は、妊孕性と深くかかわっているとされるので、本検査が精子受精能の判定に役立つ可能性のあることが示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 252-357, 1990)

緒 言

精液所見が正常であるにもかかわらず、不妊である症例を経験する一方、乏精子症でも妊娠する場合があります。一般精液検査のみでヒト精子の受精能を判定するには問題がある。

ヒト精子の受精能検査としてハムスターテストがあるが¹⁾、その手技は煩雑である。そこで Jeyendran ら²⁾は、間接的に精子の受精能を判定できる方法として、hypoosmotic swelling test を開発した。今回、本法を実施し、その成績と各種精子パラメーターとの関連を検討したので報告する。

対象および方法

不妊を主訴とした患者のうち無精子症を除いた特発性男子不妊症 63 例を対象とした。年齢は、21 歳～48 歳、平均 32 歳であった。5 日以上禁欲後、用手法にて精液を採取し、室温で 30 分間液化させた後、従来の鏡検および精液自動分析装置（セルソフトラシリーズ 3000）による測定に供した。

両者により得られた精子濃度および精子運動率はともに高い相関を示した（未発表データ）。ここでは、これらの精子パラメーターは前者によるものとした。一方、平均精子直進性および平均精子運動速度

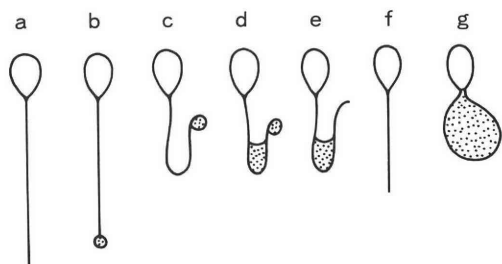


図1 膨化精子の分類

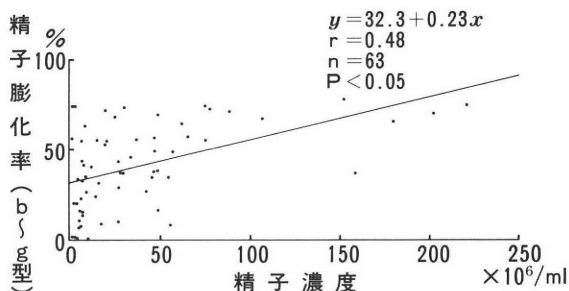


図2 精子濃度と精子膨化率 (b~g型) の関係

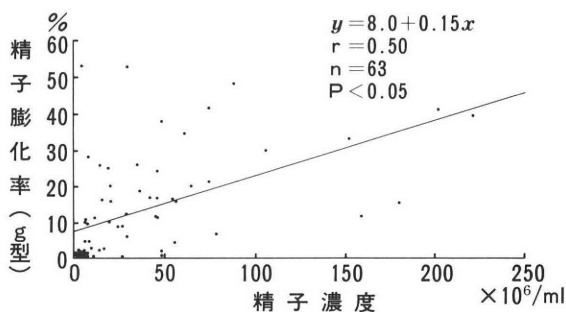


図3 精子濃度と精子膨化率 (g型) の関係

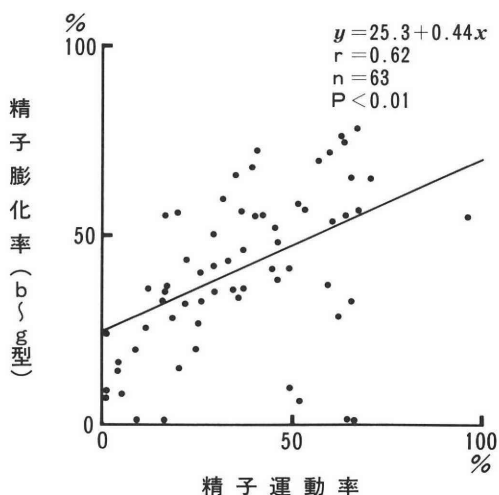


図4 精子運動率と精子膨化率 (b~g型) の関係

表1 精液所見と精子膨化率

精液所見	膨化率 (b~g型)	膨化率 (g型)
精子濃度		
40×10 ⁶ /ml	53.1±20.0	21.7±14.0
以上 (n=23)		(n=23)
40×10 ⁶ /ml	37.1±83.8	13.9±14.8
未満 (n=40)		(n=40)
	p<0.05	p<0.001
精子運動率		
50%以上	52.3±26.5	27.2±17.2
(n=19)		(n=19)
50%未満	27.6±24.1	13.9±14.8
(n=44)		(n=44)
	p<0.01	p<0.05

(microns/sec) ³⁾は後者により測定した。

精液 0.1 ml と 150 m Osmol の浸透圧の hypoosmotic solution (sodium citrate・2H₂O 7.35g/l, fructose 13.51g/l) 1ml を混合し, 30~60 分間, 37℃ でインキュベーションし, 位相差顕微鏡 (×400) にて鏡検した。100 以上の精子を観察し, 精子尾部の細胞膜の形態的变化により, a~g までの 7 種類の型に分類した²⁾ (図1)。膨化した精子の割合, すなわち観察した全精子に対する b~g 型のものの割合を算定した (以下, 精子膨化率 (b~g 型))。また精子尾部全体が大きく膨化している g 型は, 精子尾部の細胞膜が無傷であると推定されるので, 同じく g 型の割合も算定した (以下, 精子膨化率 (g 型))。

これら精子膨化率と精子濃度, 精子運動率などの精子パラメーターとの関係を検討した。

結 果

1) 精子濃度と精子膨化率

精子濃度が高くなるに従って, 精子膨化率 (b~g 型) が高値となる傾向を示した ($r=0.48$, $p<0.05$) (図2)。精子膨化率 (g 型) も, 精子濃度と正の相関を示した ($r=0.50$, $p<0.05$) (図3)。

精子濃度が 40×10⁶/ml 以上のものの精子膨化率 (b~g 型) は, それ未満のもののそれより有意に高かった ($p<0.05$)。精子膨化率 (g 型) についても同様の傾向を示した (表1)。

2) 精子運動率と精子膨化率

精子運動率と精子膨化率 (b~g 型) とは正の相関を示した ($r=0.62$) (図4)。精子膨化率 (g 型) とも $r=0.60$ と比較的高い相関をみた (図5)。

精子運動率が 50% 以上のものの精子膨化率は b~g 型のそれが 52.3%, g 型のみのが 27.2% であり, 精子運動率 50% 未満の場合に比し, 両者と

も有意に高率であった(それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$) (表1).

3) 平均精子直進性と精子膨化率

平均精子直進性と精子膨化率 (b~g型およびg型) とは, それぞれ相関係数 0.35 および 0.31 と相関は低かった (図6, 7).

4) 平均精子運動速度と精子膨化率

両者の相関係数は, b~g型およびg型のみの精子膨化率の場合, それぞれ 0.23 および 0.21 と低値を示した (図8, 9).

5) 精子膨化率; b~g型とg型の比較

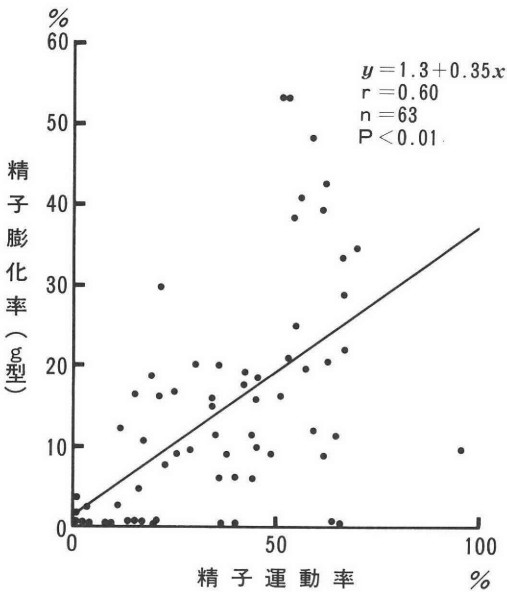


図5 精子運動率と精子膨化率 (g型) の関係

精子膨化率 (b~g型) と精子膨化率 (g型) とは, $r = 0.63$ と比較的高い相関を示した ($P < 0.01$) (図10).

考 按

精子が受精を完遂するためには, capacitation と呼ばれる機能的変化を遂げる必要がある. 柳町ら¹⁾は, この capacitation を終えた精子は透明帯を除去したハムスター卵子に侵入すると報告し, この方法により間接的に精子の capacitation 能力を知ることができるとした. ちなみに, Albertsen ら⁴⁾および守殿⁵⁾は, この精子侵入試験 (sperm penetration assay, 以下 SPA) は, 各種精子パラメーターのうち, 受精能をもっとも反映するものとしている. しかし, この方法は煩雑であり, 外来でルーチンに用いるには問題

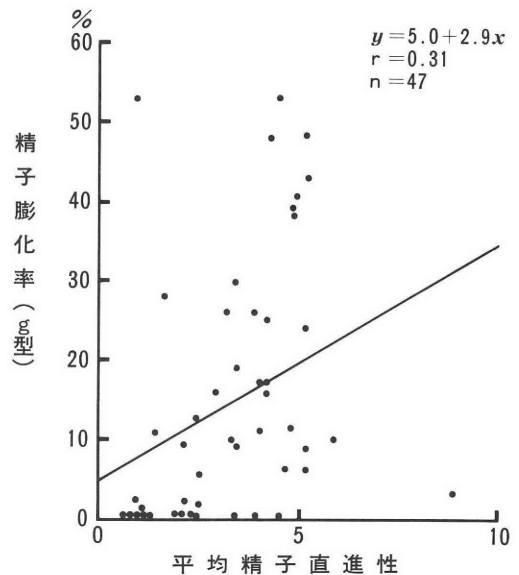


図7 平均精子直進性と精子膨化率 (g型) の関係

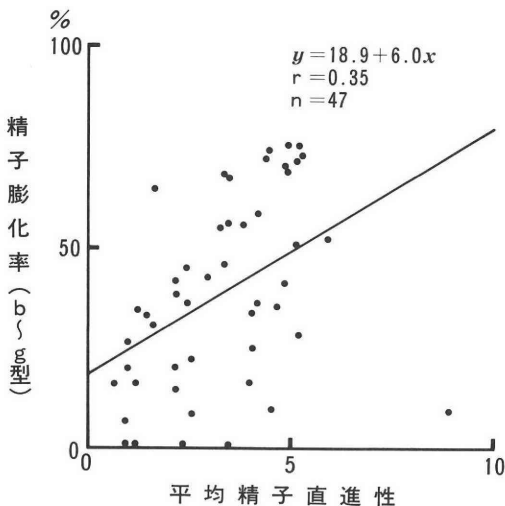


図6 平均精子直進性と精子膨化率 (b~g型) の関係

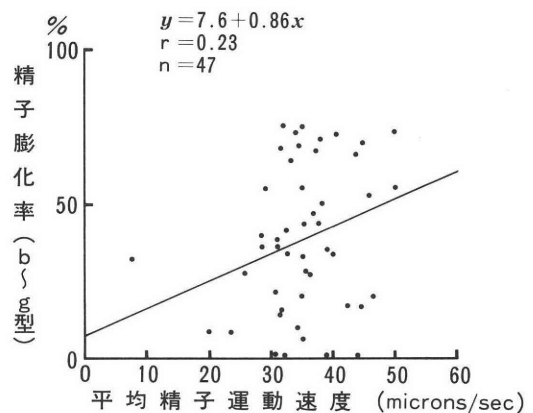


図8 平均精子運動速度と精子膨化率 (b~g型) の関係

がある。

Hypoosmotic swelling test は Drevius⁶⁾が哺乳類の精子について最初に報告したが、1984 年、Jeyendran²⁾が、本法をヒト精子にはじめて応用した。本法は、精子に低浸透圧負荷を与えて、その尾部にみられる膨化の程度を観察し、それにより尾部細胞膜の機能を推定することにより、精子の受精能を判定しようとするものである。この方法は、手技がきわめて簡単に短時間内に結果が判定できるという利点がある。しかし SPA と異なり本法は、精子についてのみの試験であり、受精という現象をみていないことより SPA の代用とならないとする報告もある^{7,8)}。一方、精子尾部細胞膜と頭部の機能とは関連が深いとする報告²⁾、両試験が良好な相関を示したとするものもあり⁹⁾、意見の一致をみず、今後さらに検討が望まれる。

他の精子パラメーターと hypoosmotic swelling test との関連性はどうか。Chan⁷⁾は精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率 40 % 以上のものを正常所見として、その精子膨化率をみたところ、正常所見を有する例の精子膨化率は、異常所見のものそれに比し、有意に高値を示したとしている。同じく吉野¹⁰⁾も、正常精液群の精子膨化率が 67.3 %、異常精液群のそれが 48.6 % と前者が有意に高かったと報告している。自験例でも、精子濃度、精子運動率が正常のものの精子膨化率は、異常のもののそれより有意に高値であった。一方、自験例で精子濃度および精子運動率と精子膨化率とにそれぞれ正の相関をみたが、後者と精子膨化率との相関係数が前者との場合よりも高い傾向を示した。Wang¹¹⁾も、精子濃度よりも精子運動率のほうが精子膨化率との相関が高いとしている。なお精子運動性に関して、自験例で精液自動分析装置にてえられた平均精子運動速

度および平均精子直進性と精子膨化率との関連では、いずれも相関が低かった。すなわち精子膨化率は、各種精子パラメーターのうち、妊孕性に深く関係している精子運動率と最も関連があり、精子の受精能を示すパラメーターの 1 つとしてよいだろう。最近、Van der Ven¹²⁾は、ヒト体外受精で受精した例の精液の hypoosmotic swelling test での膨化率は、受精しない例のそれより高いとしており、上記のことを裏付けするものといえる。

次に、自験例で g 型の膨化形態をとったもののみの割合すなわち精子膨化率 (g 型) は、他の膨化形態をとった精子をも含めた精子膨化率 (b ~ g 型) と比較的高い相関を示したが、このことは吉野¹⁰⁾も指摘しており、本法の成績を前者のみで評価できる可能性を示すものと思われる。一方、膨化した精子を走査型電子顕微鏡で観察すると、位相差顕微鏡で同じ膨化形態を示した精子でも、異なった形態をとっているものがあり、また膨化せず、尾部がコイルしているだけのものもみられるとする報告があり¹³⁾、今後、膨化の形態について、さらに詳細な検討が望まれるとともにその精子機能とのかかわりについても検討する必要がある。

結 語

特发性男子不妊症患者 63 例に対して hypoosmotic swelling test を施行し以下の結果をえた。

精子膨化率は、各種精子パラメーターのうち特に精子運動率と関連が深く、本検査が精子受精能の判定に役立つ可能性を示した。

本論文の要旨は、第 8 回日本アンドロロジー学会

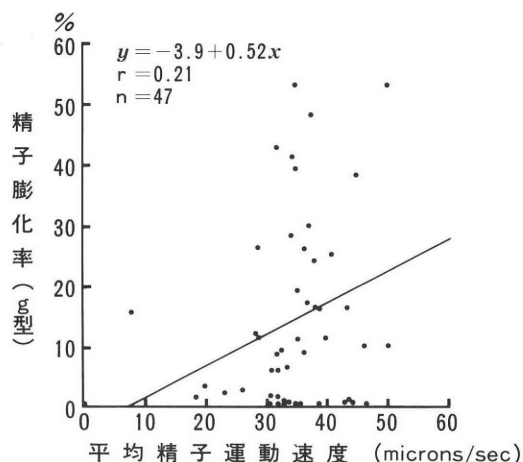


図 9 平均精子運動速度と精子膨化率 (g 型) の関係

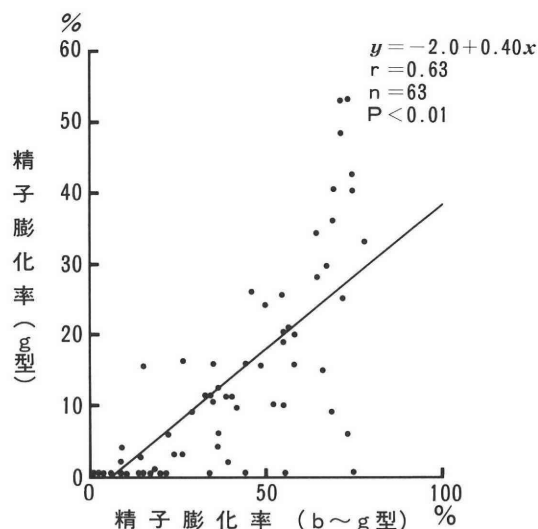


図 10 精子膨化率の比較 (b ~ g 型 — g 型)

にて発表した。

文 献

- 1) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 15: 471, 1976
- 2) Jeyendran, R. S., Van-der-Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Gravo, B. G. and Zaneveld, L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, *J. Reprod. Fertil.*, 70: 219, 1984
- 3) Ginsburg, K. A., Moghissi, K. S. and Abel, E. L.: Computer-assisted human semen analysis sampling errors and reproducibility, *J. Androl.*, 9: 82, 1988
- 4) Albertsen, P. C., Chang, T. S., Vindivich, D., Robinson, J. C. and Smyth, J. W.: A critical method of evaluating tests for male infertility, *J. Urol.*, 130: 467, 1983
- 5) 守殿貞夫：男性不妊の臨床—最近の話題を中心に—, *臨泌*, 40: 7, 1986
- 6) Drevious, L. O. and Eriksson, H.: Osmotic swelling of mammalian spermatozoa, *Expl. Cell. Res.*, 42: 136, 1966
- 7) Chan, S. Y. W., Wang, C., Fox, E. J., Tang, L. C. H., Chan, M. M. C., Tang, G. W. K., Tsoi, W. and Ho, P.: The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay, *Fertil. Steril.*, 44: 668, 1985
- 8) 高橋健太郎, 草刈万寿夫, 内田昭弘, 山崎裕行, 白井孝昭, 吉野和男, 北尾 学：ハムスターテストと hypoosmotic swelling test との関連性について, *日不妊会誌*, 34: 113, 1989
- 9) 柳沢洋二, 吉田竹郎, 津端捷夫, 高木繁夫：精子の機能テストとその有用性, *臨産婦*, 40: 195, 1986
- 10) 吉野和男, 高橋健太郎, 草刈万寿夫, 内田昭弘, 白井孝昭, 西垣 新, 山崎裕行, 北尾 学：精子機能テストとしての hypoosmotic swelling test と一般精液検査との関連性について, *日不妊会誌*, 34: 101, 1989
- 11) Wang, C., Chan, S. Y. W., Matthew, N. G., So, W. W. K., Tsoi, W. L., Lo, T. and Leung, A.: Diagnostic value of sperm function tests and routine semen analyses in fertile and infertile men, *J. Androl.*, 9: 384, 1988
- 12) Van-der-Ven, H. H., Jeyendran, R. S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K. and Zaneveld, L. J. D.: Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and *in vitro* fertilization, *J. Androl.*, 7: 190, 1986
- 13) 西垣 新, 高橋健太郎, 荒木芳美, 飯田幸司, 吉野和男, 白井孝昭, 北尾 学：精子の hypoosmotic swelling test とその走査型電子顕微鏡観察について, *日不妊会誌*, 33: 792, 1988

Correlation between the parameters of sperm on semen analysis and the percentage of swollen sperm in the hypoosmotic swelling test

Hideki Fuse, Ichiro Mizuno,
Sadanobu Satomi, Taizo Kazama,
Tameyoshi Terada and Takashi Katayama

Department of Urology, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University,
Toyama 930-01, Japan
(Director: Prof. T. Katayama)

We performed hypoosmotic swelling test to the patients with idiopathic male infertility. Sperm was examined for typical tail abnormalities indicative of the occurrence of hypoosmotic swelling and percentage of swollen sperm was calculated.

The correlation between the results of hypoosmotic swelling test and various sperm parameters was examined.

The positive correlation was observed between sperm concentration and the percentage of swollen sperm, and between sperm motility and the percentage of swollen sperm. But, no significant correlation was recognized between mean sperm linearity and the percentage of swollen sperm, and between mean sperm velocity and the percentage of swollen sperm.

Sperm motility out of various sperm parameters was most highly correlated with the percentage of swollen sperm. Since sperm motility is related to pregnancy, it seems to be suggested that hypoosmotic swelling test is useful to estimate the fertility potential of human sperm.

(受付: 1989年8月16日)

ヒト先体反応精子の scoring に対する flow cytometry の応用

Application of Flow Cytometry in Scoring Acrosome Reacted Human Sperm

順天堂大学医学部産科婦人科学教室

福 田 勝 宮 崎 亮 一 郎 武 内 裕 之
Masaru FUKUDA Ryoichiro MIYAZAKI Hiroyuki TAKEUCHI

伊 藤 哲 高 田 道 夫
Satoshi ITO Michio TAKADA

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

ヒト先体反応精子の scoring をより正確で迅速、かつ簡便化するために、細胞内特定物質に対し親和性をもつ種々の蛍光 Probe と Laser 分光測定技術による flow cytometry (FCM) を用いて検索し、結果を蛍光顕微鏡による鏡検法の成績と比較検討した。精子の生と死の判別には Pridium iodide (PI) を用い、先体反応の判定に FITC-pea lectin を使用した。

- (1) ヒト精子は FCM で検出可能であった。
- (2) 蛍光顕微鏡により観察された PI 陽性率は FCM による成績と非常に近似していた。
- (3) 蛍光顕微鏡と FCM によって得られた先体反応発生率の成績は有意な相関を示した ($r = 0.98$, $P < 0.001$)。

以上より FCM は蛍光顕微鏡による観察に比べ、より多くの精子を客観的に scoring することが可能であり、有用な方法であることが判明した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 258-262, 1990)

緒 言

哺乳動物の精子が卵子と受精するためには、機能的変化である受精能獲得 (capacitation)^{1,2)} と引き続いて形態的变化である先体反応 (acrosome reaction)^{3,4)} が行われなくてはならないとされている。したがって、先体反応の発生を知ることは精子の quality, そして受精能を理解する上で重要なことである。従来、我々はヒト精子の先体反応の判定に fluoresceinated lectin と supravital stain である bisbenzimidazole, Hoechst 33258 による 2 重蛍光染色法を行い、蛍光顕微鏡で観察する方法^{5,6)} を報告してきた。今回、この先体反応精子の scoring に際して、蛍光顕

微鏡による鏡検法の代わりに細胞内特定物質に対し高い親和性をもつ種々の蛍光 Probe と Laser 分光測定技術による flow cytometry (FCM) を応用し、FCM がヒト先体反応精子の scoring において、より正確、迅速かつ簡便な方法となり得るか否かを検討した。

対象および方法

用手法により得られた donor 精液を 30-60 分室温に静置して液化させた。精漿および白血球など精子以外の細胞成分を除去するために 40% と 80% の Percoll density gradient の Percoll 2 層法 (Percoll, Pharmacia Fine Chemicals) で運動精子を回収して本研究に供した。精子濃度は 3 mg/ml HSA (Sigma)

を含む精子培養液 (HEPES 480mg/dl, HANKS 960mg/dl, NaHCO_3 100mg/dl: PH7.4) を用いて 30×10^6 sperm/ml に調整した。死滅精子は凍結と融触をくり返すことで作成, また先体反応精子は the divalent cation ionophore, A23187 (Sigma) を用いて先体反応を誘起して作成した。生存精子の生理的先体反応の発生を正確に評価するには死滅精子を判定, これらを先体反応精子の scoring より除外する必要があるため, その判定には Pridium iodide (PI) (Sigma) を用いた。すなわちヒト精子を $10 \mu\text{g/ml}$ PI と 5 分間インキュベーションし, その後 40 % polyvinylpyrrolidone40-PBS 上に層積, 600g, 5 分間遠心して非結合 PI を除去した。これら精子を 100 % エタノールで 30 分間固定後, fluorescein isothiocyanate (FITC) の蛍光色素をつけた lectin, FITC-PSA (Pisum sativum agglutinin) (Vector) を用い先体反応の判定を行なった。すなわちエタノール固

定された精子に FITC-PSA を 10 分間結合させ, その後非結合 FITC-PSA を PBS で洗浄除去し, 検体の一部は蛍光顕微鏡を用いた方法, また一部は FCM (BECTON DICKINSON, FAC star) による方法で先体反応精子の scoring を行ない, 両者によって得られた成績を比較検討した。

結 果

図1はヒト精子頭部の PI と FITC-PSA により染色・結合される部位を示している。PI は fluorescent DNA-binding dye で死滅変性により壊れた精子細胞膜を容易に透過し, 内部の核の DNA と結合する。したがって PI 染色陽性精子が死滅精子, PI 染色陰性精子が生存精子である。FITC-PSA は精子先体内容物中に存在する glycoconjugate と結合する。先体反応

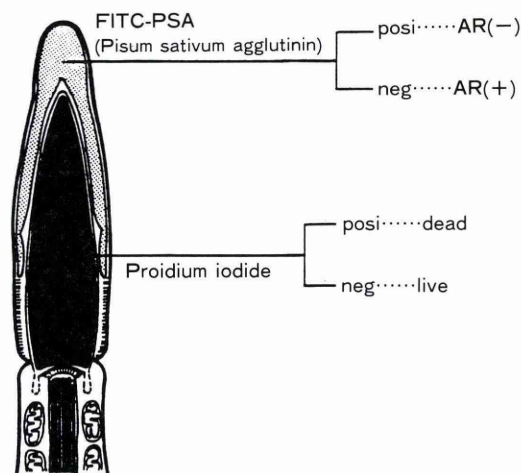


図1 ヒト精子頭部の PI と FITC-PSA の結合部位。
posi: positive, neg: negative, AR: acrosome reaction

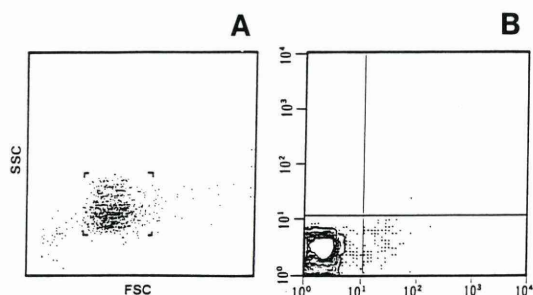


図2 ヒト精子の FCM ドット表示(A)とその cytogram (B)。

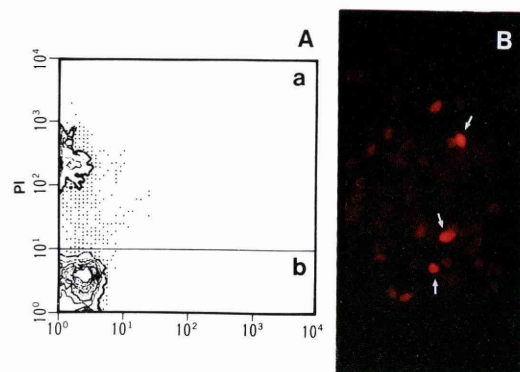


図3 PI 染色。
cytogram の縦軸が PI の蛍光強度で a が PI 陽性精子, b が PI 陰性精子 (A)。蛍光顕微鏡写真: intensive red を発している精子が PI 陽性精子 (矢印, B)。

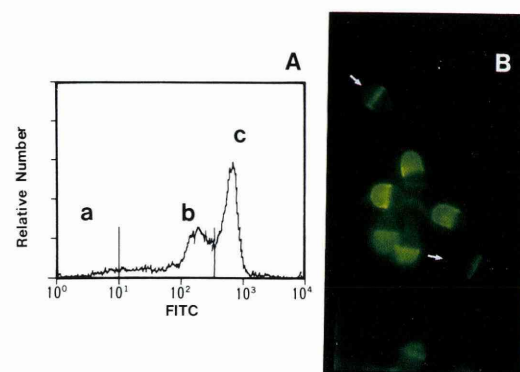


図4 FITC 染色。
hystogram の横軸が FITC の蛍光強度, 縦軸が細胞数。a と b が FITC 陰性精子, c が FITC 陽性精子 (A)。蛍光顕微鏡写真: 赤道帯のみ FITC-PSA と結合した FITC 陰性精子 (矢印, B)。

精子は先体外膜と原形質膜が癒合、離脱し先体内容物が放出され、FITC-PSA と結合する先体内容物が存在しないため FITC-PSA が結合せず FITC 陰性を示す。一方先体反応を起こしていない精子は先体内容物が存在するため FITC-PSA と結合し、FITC 陽性を示す。

図 2 は FCM によるヒト精子の検出結果を示している。A がそのドット表示、B がその cytogram である。

図 3 はヒト精子の PI 染色の FCM cytogram (A) とその同一検体の蛍光顕微鏡写真 (B) である。15% の精子 (A, a) が PI 染色陽性精子、すなわち死滅精子である。蛍光顕微鏡下では PI 染色陽性精子は intensive red を発している (B)。蛍光顕微鏡による

観察での PI 染色陽性率は FCM による成績と非常に近似していた。

図 4 はヒト精子の FITC 染色である。A が FCM histogram で精子先体部が FITC-PSA と結合していない細胞群 (a)、赤道帯のみ FITC-PSA と結合している細胞群 (b)、先体部が FITC-PSA と結合している細胞群 (c) に分けられる。精子先体部が FITC に染色されていない細胞群 (a) と赤道帯のみ FITC に染色されている細胞群 (b) が先体反応精子で、その先体反応発生率は 48% であった。

先体反応発生率について蛍光顕微鏡による先体反応精子 scoring の成績と FCM により得られた成績とを比較検討した結果では図 5 のように両者とも非常に近い値を示した。

図 6 は PI 染色と FITC 染色による 2 重蛍光染色法の cytogram である。PI 染色陰性、FITC 陰性の細胞群 (b, c) が生存精子で生理的先体反応をおこなっている精子である。

図 7 は図 6 と同一検体の蛍光顕微鏡写真である。

考 察

従来、医学、生物学の分野において細胞の生物学的特徴を研究するためには顕微鏡は必須のものであった。しかし医学機器の目ざましい発展により顕微鏡に取って代わる画期的装置である FCM⁷⁾が開発された。近年 FCM はモノクローナル抗体などの細胞工学的発展とあいまって、リンパ球の表面抗原を中心とした免疫学的解析の面で広く応用されている^{8,9)}。一方、FCM を用いて種々の癌細胞における相対的核 DNA 量についての検討も盛んに行なわれている^{10,11)}。FCM による DNA 量解析の応用はこれらの他、男性不妊症診断にも利用されている。すなわち FCM を用いて睾丸生検組織の DNA 量分布を測定することより精細胞の成熟度が明らかとされる。またその分布

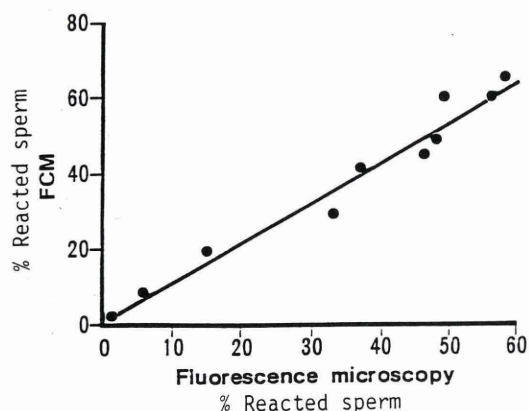


図 5 FCM と蛍光顕微鏡による同一検体の先体反応精子の scoring (先体反応発生率) の比較。両者に有意な正の相関を認める ($y = 0.2715x + 1.0667$, $r = 0.98$, $P < 0.001$)。

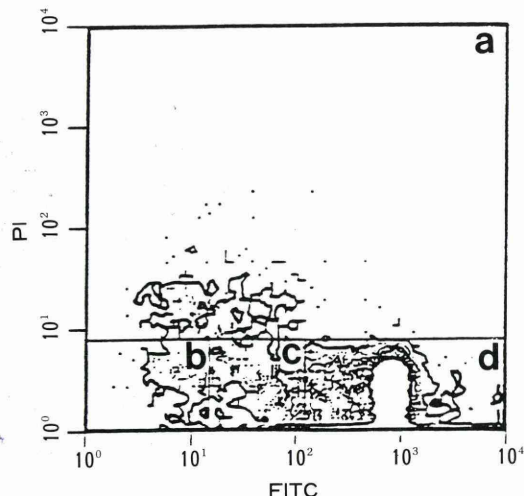


図 6 PI 染色と FITC 染色による 2 重蛍光染色法の cytogram. a が PI 陽性精子、b と c が PI 陰性先体反応精子。

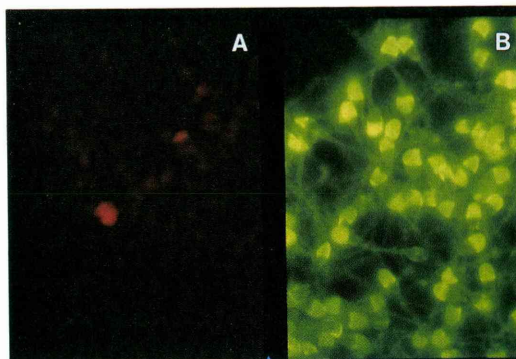


図 7 図 6 と同一検体の蛍光顕微鏡写真: A が PI 染色、B が FITC 染色。

から精子形成能が評価され男性不妊症の診断、治療に有力な情報がもたらされている。¹²⁾最近ではX染色体やY染色体精子のDNA量の測定、分取というところまでその応用範囲が拡大されている^{13,14)}。

本研究では、精子の卵子の透明帯貫通および形質膜との融合に不可欠な変化であるヒト精子先体反応の評価に対しFCMを応用し、ヒト精子先体反応判定法にFCMが有用であることを証明し得た。先体反応判定にPSAというlectinに色素安定であり蛍光強度が保たれやすいFITCをつけたFITC-PSAを使用している。先体反応発生の有無は精子先体の内容物の存在の有無による。したがって先体内容物中に豊富に存在しているlectinのレセプターと結合するFITC-PSAは先体反応の判定に有効となる。またFCMレーザーの励起レベルでFITC-conjugateがすぐれた蛍光強度を示すことを利用して、FCMによる先体反応発生の解析を行い得た。しかし生存精子の先体反応を評価するためには死滅精子を除外しなければならない。このために我々は従来から使用されていたHoechst 33258の代わりにFCMレーザーの励起レベルがFITCと同様な励起レベルであり、しかも異なった放出光をもち、overlapが起きないような色素の組み合わせを行なうことにより死滅精子の除外を可能にした。すなわちHoechst 33258に代わりPIを使用し、PIとFITCの2重蛍光染色法を行なうことで生存精子と死滅精子との判定と先体反応の判定をFCMで同時に行なうことを可能とした。今回は光源として1本のレーザーを使用したため、励起波長の同じ蛍光色素での2重染色法を行なったが、今後、励起波長の異なる蛍光色素での2重染色などがレーザー、感知器、フィルターを新たに加えてその組み合わせを行なうことにより可能となり、さらに複雑な多数のパラメーターの解析も可能となると考えられる。

結 語

PI染色、FITC染色の2重蛍光染色法を用い、FCMにより生存精子の生理的先体反応の発生を評価することができた。またFCMは蛍光顕微鏡による方法に比べ、より多くの精子を客観的にscoringすることが可能で、より正確な結果が迅速に得られることが明らかにされた。

以上よりFCMは先体反応精子のscoringに有用な方法と考える。

文 献

1) Austin, C. R.: Observations on the penetration

of the sperm into the mammalian egg, *Aust. J. Sci. Ser.*, B4: 581, 1951

- 2) Chang, M. C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes, *Nature (London)*, 168: 697, 1951
- 3) Austin, C. R. and Bishop, M. W. H.: Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization, *Proc. R. Soc. London Ser.*, B149: 241, 1958
- 4) Barros, C., Bedford, J. M., Franklin, L. E. and Austin, C. R.: Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction, *J. Cell Biol.*, 34: C1-C5, 1967
- 5) Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W. and Hanson, F. W.: Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm, *Gamete Res.*, 15: 213, 1986
- 6) 福田 勝, 高田道夫: ヒト精子先体反応の新しい判定法とその応用, *臨産婦*, 43 (5): 411, 1989
- 7) Melamed, M. D., Mullaney, P. F. and Mendelsohn, M. L.: *Flow cytometry and sorting*, ed 3: John Wiley and Sons, Inc., 1979
- 8) 安保 徹, 熊谷勝男: NK細胞に対するモノクローナル抗体によるヒト疾患の解析, *免疫と疾患*, 8: 779, 1984
- 9) 澤田滋正, 武井正美, 桜田正仁, 康 浩一, 天木一太: 自己免疫病とリンパ球, *単球サブセット*, *最新医学*, 40: 38, 1985
- 10) Hoshino, T., Nomura, K., Wilson, C. B., Knebel, K. D. and Gray, J. W.: The distribution nuclear DNA from human brain tumor cells, *J. Neurosurg.*, 49: 13, 1978
- 11) Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Russell, P., Musgrove, E. A., Hedley, D. H. and Tattersall, M. H. N.: Ploidy as a prognostic factor in ovarian cancer, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2 (1): 55, 1983
- 12) 川井修一, 酒徳治三郎: Spermatogenesisの評価に対するflow cytometryの役割, *最新医学*, 40: 142, 1985
- 13) Johnson, L. A., Flook, J. P., Look, M. V. and Pinkel, D.: Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations, *Gamete Res.*, 16: 1, 1987
- 14) Johnson, L. A., Flook, J. P. and Look, M. V.: Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342, *Gamete Res.*, 17: 203, 1987

Application of flow cytometry in scoring acrosome reacted human sperm

Masaru Fukuda, Ryoichiro Miyazaki,
Hiroyuki Takeuchi,
Satoshi Ito and Michio Takada

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

The flow cytometry (FCM) with various fluorescent probes and laser spectroscopic measuring techniques with a high affinity to specific substances within the cells was used in scoring of the acrosome reaction (AR) of human sperm to determine if it will serve as a more accurate, faster and simpler method. Proidium iodide (PI), a substance which binds with DNA, was used in the detection of the nonviability of the sperm.

FITC-PSA was used to detect acrosome reacted sperm. The results obtained by FCM and those obtained by fluorescence microscopy were compared. (1) It was possible to detect human sperm by FCM. (2) The percentage of PI labeled sperm determined by FCM was closed to those obtained by fluorescence microscopy. (3) Comparison of AR scoring in 10 sperm suspensions, determined by FCM and fluorescence microscopy showed that these methods gave very similar results ($r=0.98$, $P<0.001$).

Objective scoring of more sperm was possible by FCM than by fluorescence microscopy, and FCM is useful as a simple method for the analysis sperm AR.

(受付: 1989 年 8 月 24 日)

精子無力症における精子の微細構造異常について

第5報 膿精液症および正常者の精子、 精子細胞等の微細構造について

Fine Structure of Asthenozoospermia in Infertile Men 5. Fine Structure of Sperm and Germ Cells in Pyospermia and in Fertile Men

東北大学医学部泌尿器科

(主任：折笠精一教授)

佐藤 和宏

Kazuhiro SATOH

佐藤 滋彰

Sigeaki SATOH

折笠 精一

Seiichi ORIKASA

高橋 勝

Masaru TAKAHASHI

前原 郁夫

Ikuo MAEHARA

平松 正義

Masayoshi HIRAMATSU

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Miyagi 980, Japan

精子無力症かつ膿精液症を呈した3症例の精子、精液中細胞の微細構造を観察し、コントロールとして正常者10名の精子尾部を観察した。膿精液症の精液中には、変性した初期精子細胞、精母細胞、セルトリ細胞、精子を含む多核細胞などみられ、精子の異常は核の濃縮異常、尾の形成不全(軸糸9+2の乱れ、線維鞘の肥厚等)が主なものであった。このような症例で精子の運動性が減弱する主たる原因は、精子形成段階における障害と推測された。

正常精子尾部の構造異常は平均28.9%にみられ、その内容は主に双微細管の欠損と過剰であった。精子の病的構造異常とは、このような異常が殆どの精子に起こった場合と、ダイニン腕等の特殊な部位の構造異常に大別されると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 263-268, 1990)

緒 言

膿精液症とは精液中に一定数以上の白血球が出現する病態をさし^{1,2)}、精子運動性が抑制されている例が多い事から男子不妊症の原因の一つと考えられている²⁾。膿精液症の精液中には白血球と共に immature germ cell が多く出現する事が知られているが、今回はこれらの精液中に出現する細胞の微細構造を観察し、精子運動性減弱との関連性について考察を加えてみたい。

一方このような検討の control として正常者(妊孕性を有し精液所見正常)精子の微細構造異常につい

ても観察する必要があるが、こうした問題に対する報告は殆ど見られない³⁾。そこで今回は正常者10名の精子を観察し、異常所見の割合及び内容などについて検討したので報告する。

対象と方法

これまで検討した精子無力症40名の内、膿精液症者は6名おり、その内の3名に電顕的検索を行った。以下これら3名の電顕検索時における精液所見概要などについて記す。症例1は30歳、不妊期間7年、精子濃度 $24 \times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率34%、運動能(SMEI)12.5、WBC 14-15/hpf semen、症例2

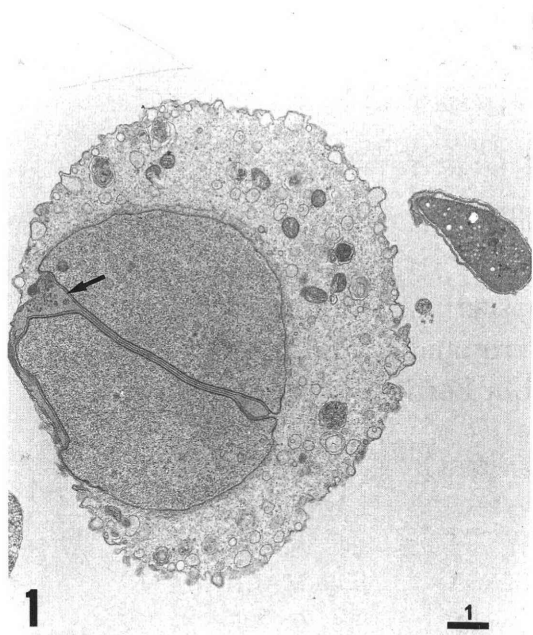


fig. 1 Step 3 spermatid. Two nuclei share common acrosome (arrow).

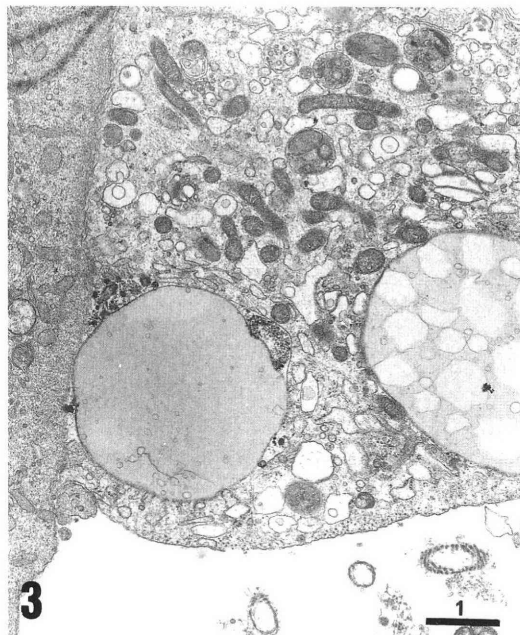


fig. 3 Sertoli cell in semen. Characteristic of Sertoli cell, lipid droplet, long mitochondria and microfilament, are observed.

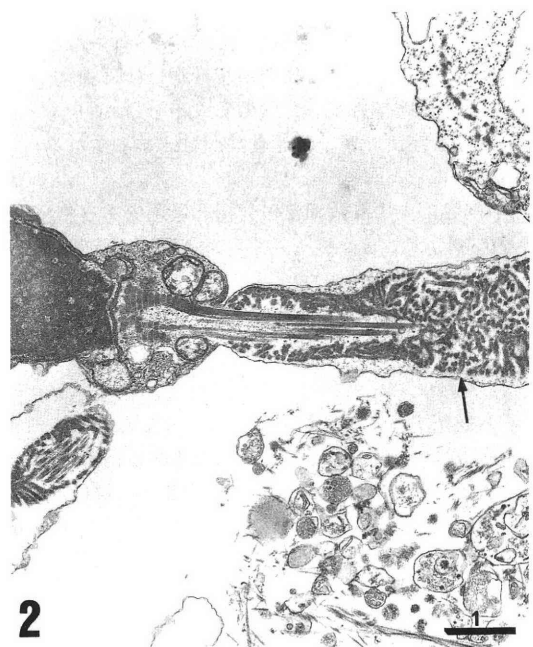


fig. 2 Abnormal sperm tail. In this picture, short middle piece, absence of central microtubules and thickened fibrous sheath (arrow) are seen.

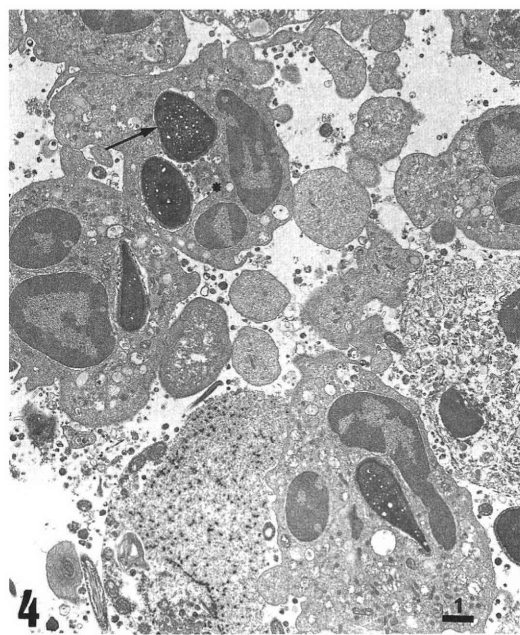


fig. 4 Polymorphonuclear cells contain sperm head (arrow) and sperm tail (star mark).

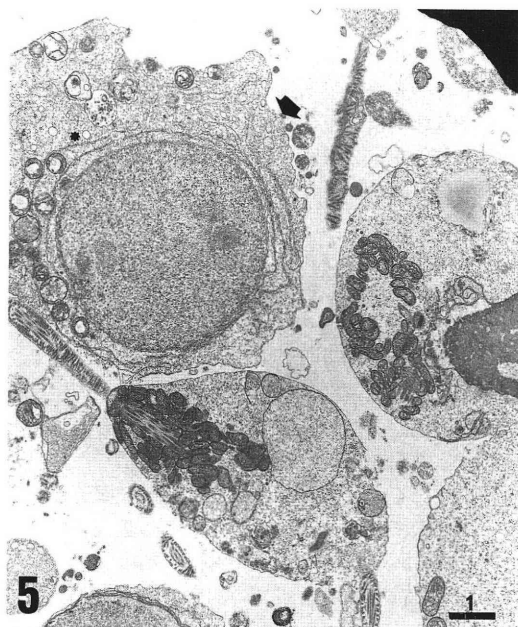


fig. 5 Secondary spermatocyte (arrow) in semen. Homogeneous chromatin, concentrically arranged ER around the nucleus are characteristic of secondary spermatocyte.

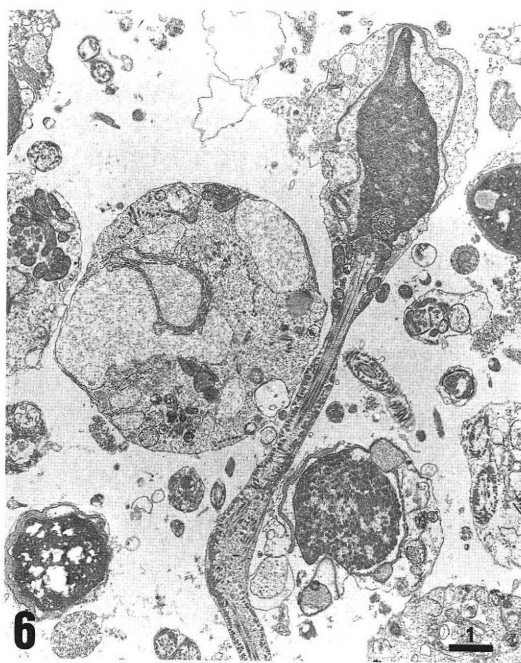


fig. 6 Detached acrosome, axonemal and periaxonemal structural abnormality are seen.

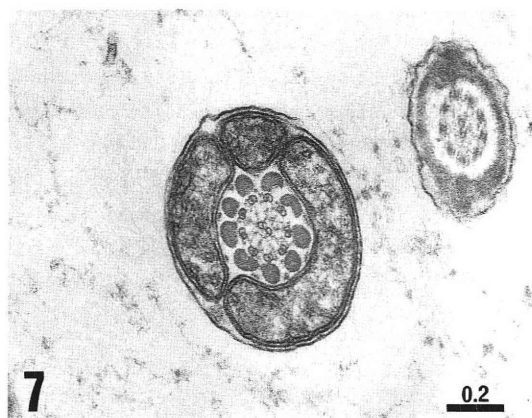


fig. 7 Spermatozoal middle piece (horizontal picture) of fertile men.

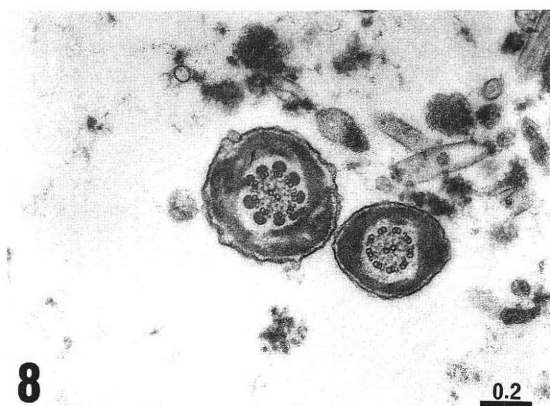


fig. 8 Spermatozoal principal piece (horizontal piece) of fertile men. Fibrous sheath thickened slightly.

は 31 歳, 不妊期間 4 年, 精子濃度 $68 \times 10^6/\text{ml}$, 精子運動率 6%, 運動能 1.5, WBC 20-25/hpf semen, 症例 3 は 30 歳, 不妊期間 4 年, 精子濃度 $42 \times 10^6/\text{ml}$, 精子運動率 24%, 運動能 11.1, WBC 14-15/hpf semen, これら 3 症例の精液中細胞をペレットに作製し⁴⁾, 電顕的検索を施行した. 正常者 10 名 (子供を有し精液所見正常な volunteer 10 名) の精子も同様にして電顕的検索を施行した.

結 果

症例 1 の精液中には fig. 1 のごとく spermiogenesis の step 3 に相当する early spermatid (2 核で共通の acrosome を有している) の出現を見, 精子の微細構造では fig. 2 のごとく 9 + 2 の乱れ (双微細管の欠損や過剰, 中心微細管の欠損, 9 + 0),

線維鞘の肥厚などの所見が見られた。更に精細胞の nursing cell とも言うべき Sertoli 細胞 (fig. 3) の出現まで見たことから、この症例に於ける Sertoli、精細胞系の構築及び spermatogenesis にかなりの障害が起きていることが予想された。症例 2 の精液中では、多核の核を有する細胞の胞体中に、精子頭部及び尾部があたかも貧食されているがごとき像が得られた (fig. 4)。これが多核白血球が精子を貧食している像であるか否かは更に検討を要するが、この症例の電顕観察時このような像は観察野に多数見られた。症

例 3 では均質な chromatin を有する核とその周囲に円弧状に配列する粗面小胞体の存在から 2 次精母細胞と思われる細胞や変性した初期精子細胞の出現が多くみられ (fig. 5)、精子の所見では核の濃縮異常、尾の軸糸、9 + 2 構造の乱れ、線維鞘の肥厚などが見られた (fig. 6)。

以上を総括すると、今回観察した膿精液症の精液中の細胞群としては、Sertoli 細胞、2 次精母細胞、変性した精子細胞、核の濃縮異常や尾の構造異常を伴う精子、精子を含む多核細胞などが見られた。

次に正常者 10 名の精子 653 個を観察した結果を table 1 に示す。各例平均 65 個ずつの精子の尾部横断面像を観察した。control として fig. 7,8 に正常と思われる中間部及び主部の横断面像を示した。異常所見の主なもの、fig. 9 のような 9 + 2 構造における一部双微細管の欠損及び過剰、中心微細管の欠損であり、特に双微細管の欠損の割合が多かった (table 1 参照)。これらの異常所見の割合は観察した精子の 15.1% - 39.5% と各症例毎に異なったが、平均 $28.9 \pm 7.8\%$ (mean $\pm$ SD) の精子に上記の異常が観察された。

考 察

精子運動性が極端に減弱しているいわゆる精子無力症の原因の一つとして、精子の尾部構造異常があり、我々は immotile cilia syndrome⁵⁾、精子尾部中間部の形成不全、異常伸長の例⁶⁾、短尾精子症⁷⁾、多核多尾精子症、軸糸形成不全⁸⁾などについて報告してきた。これらの成因はヒトでは不明と言わざるを得ないが、家畜精子などでの観察結果からこれらの多くは遺伝性が疑われ⁹⁾、形態的にもかなり特殊な構造異常であると考えられる。

一方最近男性不妊症の原因のひとつとして注目さ

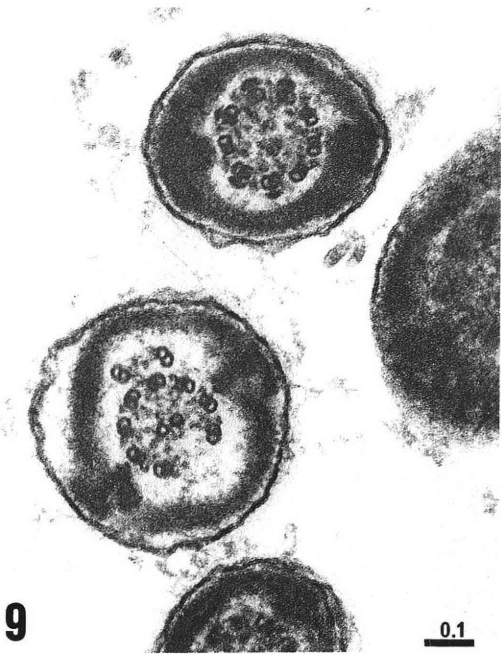


fig. 9 Missing No. 5 doublet microtubules and extra two doublet microtubules (lower picture). Missing central microtubules and thickened fibrous theath (upper picture).

Table. 1 Incidence of abnormalities in the sperm of fertile men

case	observed sperm	normal form (%)	abnormal form (%)	microtubules		
				missing	extra	9 + 0
1	62	48 (77.4%)	14 (22.6%)	13	1	0
2	81	49 (60.5)	32 (39.5)	26	4	2
3	64	42 (65.6)	22 (34.4)	17	3	2
4	53	45 (84.8)	8 (15.1)	7	0	1
5	85	63 (74.1)	22 (25.9)	16	3	3
6	65	44 (67.7)	21 (32.3)	20	1	0
7	77	49 (63.6)	28 (36.4)	—	—	—
8	54	37 (68.5)	17 (31.5)	—	—	—
9	52	42 (80.8)	10 (19.2)	—	—	—
10	60	43 (71.7)	17 (28.3)	—	—	—

れている膿精液症 (pyospermia) は、不妊を主訴とした患者 (無精子症は除外) の約 10 % を占め、膿精液症の精子運動性は減弱しているものが多く、その原因のひとつとして顆粒球 elastase の関与が推定されている²⁾。この病態は原因疾患である慢性前立腺炎などの治療により回復可能と思われるが、なかには精液中白血球数、精子運動性とも治療に抵抗する難治性のものが存在する。今回観察した3症例は正にこのような症例であり、精子などの微細構造異常が起こっている可能性が予想されたので精液中細胞の電顕的観察を行ってみた。

今回の観察で特徴的な事は、2次精母細胞、変性した精子細胞などの本来なら精巣組織内にあるべき精細胞系、更には Sertoli 細胞までが精液中に見られた事である。殊に変性した精子細胞は比較的多く見られた。これらの精細胞は 100 個の精子あたり不妊症者で平均 5.55 個、正常者で 2.83 個見られるとの報告もあり¹⁰⁾、光顕による精液検査上構造異常を呈する精子数とこれら非精子細胞数との割合は相関することも知られている。すなわち一般に精液中に精子以外の精細胞などが多く出現しているものでは精子自体の構造異常の割合も高いと言うことであり、これは精子発生 (spermatogenesis) 不全を意味するものと思われる。ことに今回の症例では核の濃縮異常、先体、尾の形成不全を示す精子細胞の頻度が高いことから精子発生過程の精子形成 (spermiogenesis) の段階の障害が推察される。以上のように臨床的に難治性 (治療によっても精液中白血球数、精子運動性が改善せぬ例) の膿精液症では、精液中に出現する細胞の観察から精子形成過程の障害が推察され、そのことが精子の頭部、尾部の形態異常の原因と思われる。この障害過程の原因、即ち副性器感染症との因果関係や不可逆的な変化なのか否かなどについては不明であり、今後精巣の組織学的検索などを通して明らかにされるべきである。

症例2でみられた精子を含む多核細胞が、多核白血球が精子を貪食した像であるか否かについては、電顕観察上更に検討を要するが、Berger ら¹¹⁾はこのような像を基に多核白血球の精子運動性に対する影響について論じている。即ち精子を貪食した多核白血球が毒性物質を放出し、それが精子運動性を減弱せしめるという考えである。この毒性物質としては superoxide, granulocyte elastase などが考えられているが、その放出機構については更に検討の余地がある。

以上のごとく膿精液症で精子運動性が減弱する原因としては白血球の放出する液性因子、例えば super-

oxide や granulocyte elastase の関与と、精子形成過程の障害を通じた精子尾部構造異常が挙げられる。

精子尾部の構造異常の主なものは、軸糸の 9 + 2 構造の異常、即ち一部双微細管の欠損や過剰及び中心微細管の欠損、線維鞘の肥厚などといったいわば非特異的構造異常であったが、観察した多くの精子尾部にこのような構造異常が見られた。

正常者精子の尾部軸糸異常の割合について言及した論文は少なく、我々の知る限りでは Escalier ら¹²⁾、Hunter ら³⁾が発表しているに過ぎない。Escalier らは 7 人の正常者の精子尾部を一人当たり 45—100 個観察し、平均 20 % に尾部の構造異常が見られたことから 30 % 以上の精子尾部に異常が見られるものを異常としている。

Hunter らは 20 名の正常者尾部を詳細に観察し光顕像では 12.5 ± 5.5 % (mean $\pm$ SD)、1 検体当たり最低 50 個の精子を観察した電顕像では 24.4 ± 7.7 % (8—35 %) の異常を見いだしている。構造異常の内容としては、双微細管の過剰及び欠損 (No. 4, 5, 6, 7 に多く見られる) が 95 % を占め、そのほか中心微細管の欠損を伴う双微細管の形成不全などが観察されている。興味深いのは、双微細管の過剰は中間部、主部上部に多く、双微細管の欠損は主部下部に多く見られたことであり、これは一本の軸糸内で双微細管が foldback した結果であろうと Hunter は推測し、このこと自体は生理的範囲での変化であろうと述べている。そして精子軸糸の病的異常とは、このような変化が軸糸の大部分に起こった場合と、dynein arms, radical spokes などの特別な部位に異常が見られる場合に大別できるとしている。前者は今回観察したような場合であり、後者は遺伝性が予想される構造異常の場合と言えよう。

今回の観察結果では、10 名の正常者の精子尾部軸糸異常は電顕観察上 28.9 ± 7.8 % (15.1—39.5 %) に見られ、その大部分は双微細管の欠損及び過剰であった事から、Hunter らの報告とほぼ一致していると考えられる。一方正常者 10 名の Spermac stain 法による精子先体染色陽性率が 81.5 % であったこと¹³⁾を考え合わせると、正常者精子でも 20—30 % の規格外精子が生産されている事が推測され、興味深い。

結 語

1) 精子無力症でかつ難治性の膿精液症を呈した 3 症例の精子、精液中細胞の微細構造を観察し、このような症例では精子形成段階における障害が精子運動性減弱の主な原因と推察した。

2) 正常者 10 名の精子尾部の微細構造の観察では、

平均 28.9 % に構造異常がみられた。

(本論文の要旨は第 31 回日本泌尿器科学会総会及び日本アンドロロジー学会第 6 回学術大会において発表した。稿を終えるにあたりご協力頂いた当科検査室高橋勝治氏に感謝いたします。)

文 献

- 1) World health organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 27, Cambridge University Press, 1987
- 2) 佐藤滋彰, 佐藤和宏, 折笠精一, 前原郁夫, 高橋勝, 平松正義: 膿精液症 (Pyospermia) に関する基礎的臨床的検討, 日泌尿会誌, 投稿中
- 3) Hunter, D. G. and Kretzer, F. L.: Abnormal axonemes in sperm of fertile men, Arch. Androl., 16: 1, 1986
- 4) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について, 第 1 報, 精子無力症の臨床的事項に関する一考察, 日不妊会誌, 32: 338, 1987
- 5) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について, 第 2 報, immotile cilia syndrome の 1 例, 日不妊会誌, 33: 257, 1988
- 6) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について, 第 3 報, 精子尾部中間部形態異常の 3 例, 日不妊会誌, 34: 785, 1989
- 7) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について, 第 4 報, 短尾精子症と思われた 5 例について, 日不妊会誌, 34: 152, 1989
- 8) 佐藤和宏, 折笠精一, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 高橋勝, 平松正義: 精子無力症における精子の微細構造について, 第 6 報, 多核多尾精子症の 3 例および精子軸糸異常の 1 例について, 日不妊会誌, 投稿中
- 9) 小島義夫: 遺伝が予測される精子の形態異常: 尾部, 日不妊会誌, 33: 438, 1988
- 10) Auroux, M., Collin, C. and Couvillers, M. L.: Do nonspermatozoal cells mainly stem from spermiogenesis? Study of 106 fertile and 102 subfertile men, Arch. Androl., 14: 73, 1985
- 11) Berger, R. E., Karp, L. E., Williamson, R. A., Koehler, J., Moore, D. E. and Holmes, K. K.:

The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay, Fert. Steril., 37: 557, 1982

- 12) Escalier, D. and David, G.: Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum. axonemal and peri-axonemal anomalies, Biol. Cell, 50: 37, 1984
- 13) 佐藤和宏, 佐藤滋彰, 前原郁夫, 折笠精一: 精子先体の形態学的評価, Spermac stain の有用性および round-headed spermatozoa について, 日泌尿会誌, 80: 562, 1989

Fine structure of asthenozoospermia in infertile men

5. Fine structure of sperm and germ cells in pyospermia and in fertile men

Kazuhiro Satoh, Seiichi Orikasa,
Ikuro Maehara, Sigeaki Satoh,
Masaru Takahashi and Masayoshi Hiramatsu

Department of Urology,
Tohoku University School of Medicine,
Miyagi 980, Japan

Fine structures of sperm and germ cells in severe pyospermia cases in infertile men were studied. In the semen, sperm with decondensed nuclei and malformed tails, early spermatid, secondary spermatocyte and even Sertoli cells were observed. The mechanism why these cells appeared in the severe pyospermia and the relationship of these cells and sperm motility was discussed.

Then, sperm of 10 fertile men were analyzed for axonemal abnormalities by TEM. In the quantitative analyses, $28.9 \pm 7.8\%$ abnormal axonemes were observed. Most of them were missing some doublet microtubules and/or extra peripheral microtubules.

The presence of these abnormalities in fertile men indicated that they were part of a normal process of axonemal instability.

(受付: 1989 年 9 月 12 日)

特発性男子不妊症における Sertoli 細胞の定量的研究

A Quantitative Study of Sertoli Cells in Idiopathic Infertile Males

名古屋大学医学部泌尿器科学教室

長 井 辰 哉 高 羽 秀 典 山 本 雅 憲
Tatsuya NAGAI Hidenori TAKABA Masanori YAMAMOTO
三 宅 弘 治
Koji MIYAKE

Department of Urology, Nagoya University
School of Medicine, Nagoya 464, Japan

特発性男子不妊症 26 症例において、精巢生検標本より Sertoli 細胞の定量化を試みた。また、その結果と、特発性男子不妊症に特徴的とされる、内分泌学的変化(FSH, LH の上昇, FSH/LH の上昇, テストステロン/LH の低下等), 及び精巢生検所見との関係を検討した。1) 1 精巣細管断面当たりの Sertoli 細胞数は 16.2 ± 10.8 であった。2) Sertoli 細胞は FSH, LH の上昇, FSH/LH の上昇, Leydig 細胞の増加とともに減少した。3) Sertoli 細胞は精細管壁厚が $10 \mu\text{m}$ 以上になると殆ど消失した。

以上より、特発性男子不妊症にみられる内分泌学的変化に Sertoli 細胞数の減少が関与している可能性が示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 269-272, 1990)

目 的

特発性男子不妊症における血清ゴナドトロピン値の変化、すなわち FSH, LH の上昇は、二次的な現象と考えられている¹⁾。LH に関しては、テストステロンによって、feed back control がなされていることが知られており、特発性男子不妊症では Leydig 細胞の機能低下が報告されている²⁾。一方 FSH の feed back control については必ずしも確立されていないが、精細管内の Sertoli 細胞が精細管外の因子(テストステロン等)とともにその分泌調節に重要な役割を果していると考えられている³⁻⁵⁾。しかし、特発性男子不妊症においてはその内分泌学的変化と Sertoli 細胞との関係は必ずしも明確ではない。そこで我々は特発性男子不妊症の精巢生検所見から Sertoli 細胞の定量化を試み、血清ゴナドトロピン、テストス

テロン値及び、精巢生検所見との関係を検討した。

対象及び方法

昭和 62 年 3 月から昭和 63 年 2 月までの 1 年間に、当科不妊外来を受診し特発性男子不妊症と診断された 26 例を対象とした。患者の特徴は Table 1 に示す通りである。Charny⁶⁾の方法に準じ、右精巣より生検を行い、採取試料は直ちに Carnoy 液にて固定後、脱水、パラフィン包埋、 $4 \mu\text{m}$ に薄切した後、HE 染色を施し光顕にて観察した。全視野の Sertoli 細胞数を計測し、1 精細管断面当たりの平均 Sertoli 細胞数を算出した。加えて、精細管壁の厚さをマイクロメーター (Nikon 測微接眼レンズ 2) で計測、Leydig 細胞についてもその増加の有無を検討した。血清 LH, FSH, テストステロン値は全例において午後 1 時に採血し、北里バイオケミカルラボラトリーズにて RIA

Table. 1 対象症例

特発性男子不妊症	26例
乏精子症*	15例
無精子症	11例
年齢	23.7~44.5歳 (平均32.0)
不妊期間	0~13年 (平均4.3)

* 精液検査 3 回以上の平均精子濃度

$1.0 \times 10^7 / \text{ml}$ 以下

Table. 2 血清ホルモン値とSertoli細胞数

項 目	平均Sertoli細胞数/1精細管断面
血清FSH	
<22mIU/ml	20.7±9.4 (n=16)
≥22mIU/ml	9.1±9.4 (n=10)
血清LH	3
<20mIU/ml	22.2±9.7 (n=13)
≥20mIU/ml	10.3±8.7 (n=15)
血清Testosterone	1
<500ng/dl	16.3±9.3 (n=15)
≥500ng/dl	16.1±13.2 (n=11)

* $p < 0.01$

二抗体法により測定した。

結 果

計測した精細管断面は 1 症例につき 15~139, 平均 71 であった。1 精細管断面当たりの Sertoli 細胞数は 16.2 ± 10.8 (0~43.3) であった。FSH は 2~11.7 mIU/ml (正常値 2~22), LH は 2.8~72.3 mIU/ml (6.5~34.5) テストステロンは 225~905 ng/dl (250~880) であった。精細管壁の厚さは最も薄い部分の厚さをその精細管壁の厚さとしたが、1.8~47.1 μm , 平均 $7.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ であった。Leydig 細胞は増加なし 8 例, やや増加 12 例, 著明に増加 5 例であった。

Sertoli 細胞と FSH との関係では、FSH 正常範囲内の群は、1 精細管断面当たりの Sertoli 細胞数 20.7 ± 9.4 , FSH 高値群では 9.1 ± 9.4 と有意な差が認められた (Table 2)。

テストステロン値との関係では、Sertoli 細胞数とテストステロン値との間には一定の関係は認められなかった (Table 2)。

テストステロン/LH は Leydig 細胞の機能を表す指標と考えられており^{7,8)}, 特発性男子不妊症においてはその病変の進行に連れて、この値が低下すると考えられているが⁹⁾, 今回の検討においてはテストステロン/LH の低下に連れて Sertoli 細胞数も減少する

Table. 3 各種パラメーターとSertoli細胞数

項 目	平均Sertoli細胞数/1精細管断面
Testosterone/LH	
<30	10.2±8.2 (n=14)
≥30	23.2±9.5 (n=12)
FSH/LH	
<1	21.8±9.6 (n=14)
≥1	9.7±8.5 (n=12)
Leydig細胞増加度	
増加なし	24.9±9.9 (n=8)
やや増加	15.7±8.5 (n=12)
著明に増加	3.7±4.6 (n=5)

** $p < 0.01$ ** $p < 0.05$

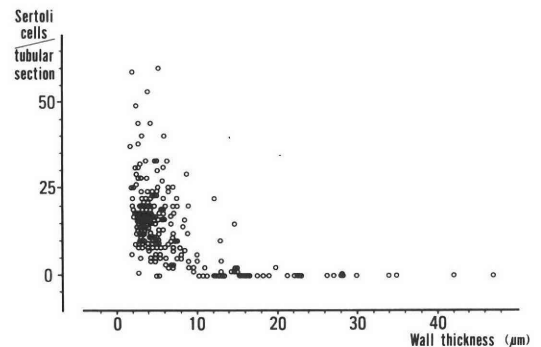


Fig. 1 精細管壁厚と 1 精細管断面当たりの平均 Sertoli 細胞数

ことが認められた。(Table 3)。

特発性男子不妊症では FSH の上昇が LH の上昇よりも早期に起こりかつ急速であり、FSH, LH とともに正常範囲内に留まる場合でも RIA 二抗体法により測定した国際単位での FSH/LH が 1 を越えると精巣病変がかなり進行していることが多いとされる¹⁾, 今回の検討でも FSH/LH が 1 未満の群と 1 以上の群とでは、Sertoli 細胞数に有意な差が認められた (Table 3)。

Leydig 細胞の増加度との検討では Leydig 細胞増加の高度な群ほど、Sertoli 細胞数は減少していた (Table 3)。

Sertoli 細胞数と精細管壁厚との関係では精細管壁が 10 μm を越えると、Sertoli 細胞はほとんど消失していた (Fig. 1)。

考 察

Sertoli 細胞の機能が明らかになるに連れ、血清ゴナドトロピン値のコントロールにおける Sertoli 細胞

の果す役割の重要性が広く認められてきている。すなわち、Sertoli 細胞は inhibin 等を分泌して下垂体の FSH 分泌に対し feed back control をかけ^{4,5)}、また精巣内においては paracrine 機構を介して Leydig 細胞と密接な相互作用を示して造精機能の調節を行っている⁹⁾とされている。特発性男子不妊症においては、ゴナドトロピン値の上昇が認められることがあり、その上昇が精細管障害の程度と相関することが広く知られている¹⁾。LH の標的細胞である Leydig 細胞については橋本ら²⁾によりすでに特発性男子不妊症患者の精巣におけるその増減とゴナドトロピン値との関係が報告されている。しかし精細管内の Sertoli 細胞とゴナドトロピン値との関係についてはその機能低下を推測する報告は多いが Sertoli 細胞とゴナドトロピン値との関係について定量的な検討をした報告はみられない。

1 精細管断面当たりの Sertoli 細胞数としては、Rowley ら¹⁰⁾により、正常成人で 10 ± 0.3 、Jarow ら¹¹⁾により正常成人で 17 ± 1 、Vasectomy 後では 10 ± 1 等の報告があるが、特発性男子不妊症に関しては報告が少なく、一般的には、Skakkebaek ら¹²⁾が精細胞/Sertoli 細胞を精細管障害の指標としたように、高度の精細管障害が認められるようになるまでは Sertoli 細胞数は不変であると考えられてきた。しかし特発性男子不妊症においてしばしばモザイク像が認められ、完全に硝子化して細胞成分を全く含まない精細管を認めることも稀ではない。このような症例においては硝子化した精細管を含めた精巣全体として考えた場合、Sertoli 細胞数が一定であるとは考えにくい。今回の我々の検討では、血清 FSH 値、LH 値、FSH/LH の上昇、Leydig 細胞の増加等の特発性男子不妊症に特徴的とされる指標との検討では、これらの値が異常を示す群では、明らかに Sertoli 細胞数が減少していた。特発性男子不妊症における内分泌学的な変化の原因としては、従来 Sertoli 細胞の機能低下、精細管の肥厚と間質の線維化による精巣内 paracrine 機構の異常等が考えられてきたが、今回の結果は、原因の一つとしてさらに Sertoli 細胞数の減少も示唆するものと思われる。また精細管壁の肥厚は特発性男子不妊患者の精巣における特徴的な所見の一つであり、本症における精細管障害の一次的な原因の一つであると考えられているが¹⁾、今回の検討で精細管壁厚 $10 \mu\text{m}$ 以内の場合は、Sertoli 細胞数は不定であり、壁の肥厚の程度と Sertoli 細胞数とは必ずしも相関しなかった。しかし $10 \mu\text{m}$ 以上の肥厚の場合には精細管内の Sertoli 細胞はほとんど消失しており、精細管壁の肥厚は Sertoli 細胞に対して重大

な影響を及ぼすと考えられた。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般研究 C）課題番号 62570721 によって行われた。

文 献

- 1) 三宅弘治：特発性男子不妊症の病態生理，臨泌，42：105，1988
- 2) 橋本純一，山本雅憲，三宅弘治，星野 洸：特発性男子不妊症の精巣の形態学的研究—Leydig 細胞の定量化及びその超微細構造について—，泌尿紀要，34：1995，1988
- 3) Booth, J. D., Merriam, G. R., Clark, R. V., Louriaux, D. L. and Sherins, R. J.: Evidence for Leydig cell dysfunction in infertile men with selective increase in plasma follicle-stimulating hormone, J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1194, 1987
- 4) Steinberger, A. and Steinberger, E.: Secretion of FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells, Endocrinology, 99: 918, 1976
- 5) Scott, R. S. and Burger, H. G.: An inverse relationship exists between seminal plasma inhibin and serum follicle-stimulating hormone in men, J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 796, 1981
- 6) Charny, C. W.: Testicular biopsy. Its value in male sterility, JAMA, 115: 1429, 1940
- 7) 三宅弘治，欄 芳郎，佐藤正文：精巣生検よりみた特発性男子不妊症，泌尿紀要，29：991，1983
- 8) de Krester, D. M., McLachlan, R. I., Robertson, D. M., Burger, H. G.: Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders, J. Endocrinol., 120: 517, 1989
- 9) Sharpe, R. M.: Physiology and toxicology of male reproduction, 71, Academic Press, Inc., 1988
- 10) Rowley, M. J. and Heller, C. G.: Quantification of cells of the seminiferous epithelium of the human testis employing the Sertoli cell as a constant, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 115: 461, 1971
- 11) Jarow, J. P., Budin, R. E., Dym, M., Zirkin, B. R., Noren, S. and Marshall, F. F.: Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy A controlled study, N. Engl. J. Med., 313: 1252, 1985
- 12) Skakkebaeck, N. E. and Heller, C. G.: Quantification of human seminiferous epithelium, J. Reprod. Fert., 32: 379, 1973

A quantitative study of Sertoli cells in idiopathic infertile males

Tatsuya Nagai, Hidenori Takaba,
Masanori Yamamoto and Koji Miyake

Department of Urology, Nagoya University,
School of Medicine
Nagoya 464, Japan (Director: Prof. Miyake)

We performed a quantitative study of Sertoli cells in twenty-six cases of idiopathic infertile males. And the relations of the Sertoli cell number to endocrinological disorders such as elevation of serum LH and FSH, the changes in FSH/LH ratio and testosterone LH ratio, and to other findings of

testicular biopsy specimens were also investigated. The results were as follows. 1. The mean Sertoli cell number per tubular section was 16.2 ± 10.8 . 2. The mean Sertoli cell number decreased with the elevation of serum LH, serum FSH, FSH/LH ratio, and increase of Leydig cell number. 3. Sertoli cells were disappeared in the seminiferous tubules of which the wall thickness were more than 10 micrometer. It was revealed that the decrease of Sertoli cell number might be obligated to the endocrinological disorders which were seen in idiopathic infertile males.

(受付: 1989 年 11 月 25 日特掲)

嚢胞腎と部分的逆行性射精を 合併した精嚢嚢状拡張症の1例

Cystic Dilatation of the Seminal Vesicles
Associated with Polycystic Disease of the Kidney
and Partial Retrograde Ejaculation: a case report

藤沢市民病院泌尿器科 (部長: 広川 信)

遠 坂 顕 山 崎 彰 岩 崎 皓
Akira TOSAKA Akira YAMAZAKI Akira IWASAKI

広 川 信
Makoto HIROKAWA

Department of Urology, Fujisawa City Hospital,
Fujisawa 251, Japan

同中検病理 (部長: 松下和彦)

松 下 和 彦
Kazuhiko MATUSHITA

Department of Pathology, Fujisawa City Hospital,
Fujisawa 251, Japan

朝倉医院 (院長: 朝倉茂夫)

朝 倉 茂 夫
Shigeo ASAKURA

Asakura Clinic, Fujisawa 251, Japan

男子不妊症に見られた精嚢嚢状拡張症の1例を報告する。報告例は嚢胞腎と部分的逆行性射精を合併していた。27歳男性、主訴は結婚後4年来の不妊。睾丸は正常大で睾丸生検像もほぼ正常であった。血中テストステロン、LH、FSHは正常値。精液検査では精液量が少なく、かつ乏精子症であった。射精後の尿中に平均 2.94×10^4 個の精子を認めた。膀胱鏡検査では三角状に開大した内尿道口を認めた。両側の精管精嚢造影では嚢状に拡張した精嚢と拡張した精管膨大部を認めた。嚢胞腎を合併した精嚢嚢状拡張症の報告は本邦15例目である。逆行性射精を伴う例は自験例が初めてであった。精嚢嚢状拡張症と嚢胞腎の関係は不明だが互いに合併しあうことが多い。自験例では、残尿はみられなかったが、精嚢の嚢状拡張、内尿道口の変化、逆行性射精などから推察して、achalasiaやHirschsprung病に見られるような神経障害が存在する可能性も考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 273-277, 1990)

Table 1 Results of semen analysis and sperm counts in urine after ejaculation. Semen analysis was performed five times. Central values were presented (range).

semen analysis	median value (range)	
semen volume	1.0ml	(0.5-1.6)
sperm concentration	$16 \times 10^4/\text{ml}$	(5×10^4 - 110×10^4)
percent motile	4 %	(0-10)
eosin(+)sperm	75%	(40-100)
normal sperm	84%	(83-85)
sperm count in the urine after ejaculation	29400	(18000-38500)

緒 言

嚢胞腎と両側の精嚢の嚢状拡張とが見られた報告が散見される¹⁻⁷⁾。しかしこの病態は一般にはあまり知られていない。

私達は男子不妊症の検索で、両側精嚢に嚢状の拡張した病変を認め、嚢胞腎と部分的逆行性射精を合併した1症例を観察したので報告する。

症 例

患者：27歳，男性

主訴：不妊

家族歴：父親は脳血管障害で47歳のときに死亡している。

既往歴：特記すべきことなし

現病歴：1981年11月結婚したが不妊のため、1985年8月某大学病院を受診したところ乏精子症を指摘された。妻は26歳で婦人科的に異常をみとめていない。1986年2月26日当科不妊外来を受診した。

現症：血圧125/70 mmHg。頭部、胸部、腹部に異常を認めない。直腸診で前立腺は正常に触れる。睪丸の大きさは外表計測（山口大式 orchidometer）では左 $3.8 \times 1.8 \times 1.9$ cm (14 ml)，右 $3.7 \times 1.8 \times 1.9$ cm (15 ml)，硬度は正常である。精索静脈瘤を認めない。精管、副睪丸も正常に触知する。

検査所見：末梢血液、血液生化学、尿検査などに異常を認めない。Ccr（1時間法）；130 ml/min。P. S. P 排泄試験；35 %（15分），80 %（120分）。血中ホルモン；LH 6.2 mIU/ml，FSH 5.5 mIU/ml，テストステロン 4.31 ng/ml。染色体；46 XY。

膀胱鏡検査：尿管間靱帯に肥厚が見られ、内尿道口は三角状に開大している。精阜は大きく球状で、粘膜面に慢性炎症の所見を認めた。

精液検査：中央値（5回施行）でみると、精液量

Table 2 Cystic dilatation of the seminal vesicles associated with polycystic disease of the kidney ; Profiles of 15 cases reported in Japan.

No.	author	year	age	chief complaint	semen analysis
1	Nakajima ¹⁾	1958	20	hematospermia	oligozoospermia
2	Moriwaki ²⁾	1962	37	hematospermia	oligozoospermia
3	Sakatoku ³⁾	1973	28	general fatigue	
4	"	"	28	infertility	oligozoospermia
5	"	"	32	infertility	azoospermia
6	"	"	39	rt-flank mass	oligozoospermia
7	"	"	49	rt-flank pain	
8	Nakajima ⁴⁾	1977	62	hematuria	
9	Itou ⁵⁾	1982	32	infertility	oligozoospermia
10	"	"	30	infertility	oligozoospermia
11	Iwasaki ⁶⁾	1986	35	infertility	azoospermia
12	"	"	31	infertility	azoospermia
13	"	"	41	infertility	azoospermia
14	Matuhasi ⁷⁾	1987	32	infertility	azoospermia
15	Tosaka		27	infertility	oligozoospermia

1.0 ml，精子濃度 16 万/ml，活動精子率 4 %である。さらに、射精直後の膀胱内洗浄液中に平均 2.94×10^5 個の精子を認めた（Table. 1）。

睪丸生検：両側睪丸とも、精細管内に多数の後期精子細胞（late spermatid）と精子を認めるが、成熟の遅れた部分も若干認めた（Fig. 1）。

精嚢精管造影：精管膨大部は拡張し、精嚢は本来の房状の形態が消失して嚢状に拡張している。この病変はほぼ左右対称に見られた（Fig. 2）。

腹部 CT 検査を施行したところ、両側の腎にびまん性に大小の嚢胞が認められた（Fig. 3）。経静脈性尿路造影（IVP）で、両腎杯に軽度の圧排像がみられた。

考 察

無精子症、乏精子症を伴う、両側性の精嚢、精管膨大部の拡張性病変は様々な名称で報告されている。欧米では seminal vesicle obstruction⁸⁾，dysplastic vesicles⁹⁾，seminal vesicle dilatation¹⁰⁾，本邦では精嚢腺嚢胞¹⁾，精嚢腺異常拡張症^{11,12)}，精嚢腺憩室²⁾，精嚢および精管末端部嚢胞状拡張³⁾などの名称で報告がある。最近、岩崎らはこれらの病変を検分分類して、精嚢嚢状拡張症と呼ぶことを提唱している⁶⁾。

本邦での報告をみると、嚢胞腎を合併した例が多くみられ、関心がもたれる疾患である。今迄に自験例を含め 15 例の報告がある¹⁻⁷⁾（Table 2）。嚢胞腎では脳動脈瘤や肝嚢胞を伴うことが多く、その他の

臓器にも嚢胞がみられることがある¹³⁾。精嚢嚢状拡張症もこれらの全身性の嚢胞性病変の1つと考えられる。

15例の年齢分布は、20歳から62歳で、平均年齢は34.9歳であった。

主訴は、不妊が9例(60%)と多く、嚢胞腎によ

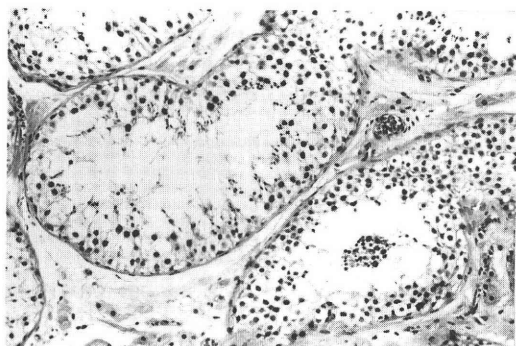


Fig. 1 Testicular biopsy demonstrates almost normal spermatogenesis (H. E. ×170).

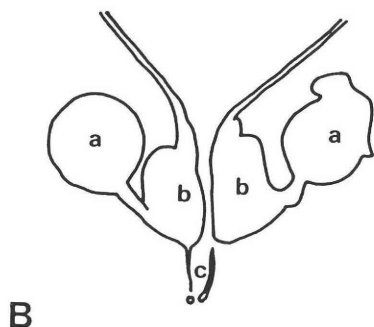
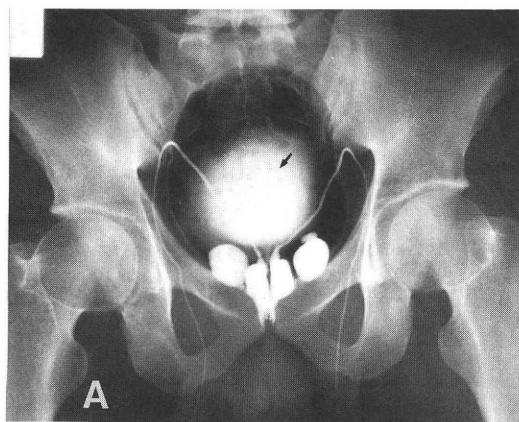


Fig. 2 A: A bilateral vasoseminal vesiculogram. bladder (arrow)

B: A schematic drawing of cystic seminal vesicles (a), dilated deferential ampullas (b) and narrow ejaculatory ducts (c).

る症状4例(27%), 血精液症3例(20%)である。30歳前後では、血精液症と不妊が病態となっている。報告年度が新しいほど、不妊を主訴とする例が多い。既婚者13名中12名(92%)が不妊である。

精液所見について記載のある12例でみると、乏精子症7例、無精子症5例と全例に異常所見をみる。12例の平均年齢は32歳(20-41歳)、精液量は平均1.8 ml (0.6-4 ml)、精子濃度は平均 $5.4 \times 10^6/\text{ml}$ ($0-28 \times 10^6/\text{ml}$)、活動率は平均13.4% (0-80%)であった。自験例では部分的逆行性射精が存在していた。睾丸生検像は比較的良いが、精液量が少なく、得られた精液も高度の乏精子症で、活動精子率4%と低率である。

精嚢嚢状拡張症では、特異な精嚢精管の造影所見をみる。両側の精嚢が本来の房状の構造を失って atonic に拡張し、両側の精管膨大部も拡張する(症例14は精管膨大部のみ拡張)。この病変はほぼ左右対称にみられる。精嚢は思春期以降に複雑な内腔構造を形成するが¹²⁾、思春期以前の未熟な状態のまま拡張した場合、本症のような形になると思われる。

自験例でみられた部分的逆行性射精という病態は今まであまり知られていない。この現象について Keiserman ら¹⁴⁾(1974年)は new type of retrograde ejaculation として報告している。Campbell's Urology (5th ed)¹⁵⁾に partial retrograde ejaculation という名称で紹介されている。

逆行性射精の原因は、TUR-P や開腹による前立腺摘除術後、後腹膜リンパ節隔清による両側交感神経の切断、糖尿病性ニューロパチー、降圧剤(抗交感神経剤)服用、などが挙げられている¹⁵⁾。布施ら^{16,17)}によると本邦では、糖尿病性、骨盤内もしくは整形外科的手術後、原因不明のことが多い。両側精嚢の嚢胞性病変に逆行性射精が合併したという報告¹¹⁾もある。自験例では、残尿は認められなかったが、精嚢の嚢状拡張、内尿道口の変化、逆行性射精などの事実から推察して、食道の achalasia や、結腸の Hirshs-

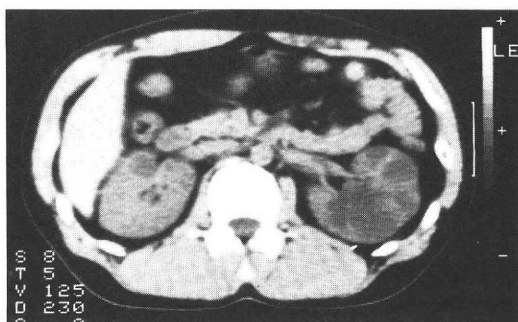


Fig. 3 CT scan shows bilateral polycystic kidney.

prung 病に見られるような神経障害が存在する可能性もあると考えられる。

精嚢嚢状拡張症は、手術的に妊孕性が回復できる点で重要である。拡大部の形成術¹²⁾や TUR による射精管の切除⁸⁾により妊娠に成功した例が報告されている。岩崎ら⁶⁾の報告例中の 1 例 (症例 13) は、尿管カテーテルで逆行性に射精管を拡張したところ、妊娠に成功した。副睾丸管の拡張がみられることもあり、その場合人工精液嚢造設術などが試みられている^{6,7)} (症例 11, 12, 14)。

結 語

精嚢嚢状拡張症に部分的逆行性射精のみられた男子不妊の 1 例を報告した。自験例は嚢胞腎を合併していた。

(稿を終えるに当たり、御校閲を頂いた恩師大島博幸 東京医科歯科大学泌尿器科学教授に深謝致します。

本論文の要旨は第 452 回日本泌尿器科学会東京地方会 (1987 年 12 月) にて発表した)

文 献

- 1) 中島啓雄, 柳瀬功一: 精嚢嚢腺嚢胞の 2 例, 日泌尿会誌, 49: 731, 1958
- 2) 森脇 宏, 結縁繁夫: 精嚢嚢憩室について: とくにその分類について, 日泌尿会誌, 53: 43, 1962
- 3) 酒徳治三郎, 桐山菅夫, 佐長俊昭, 上領頼啓, 小金丸恒夫, 平山 嗣: 多発性嚢胞腎を合併した精嚢嚢および精管末端部嚢嚢状拡張について, 西日泌尿, 35: 12, 1973
- 4) 中嶋和喜, 内藤克輔, 勝見哲郎: 精嚢の嚢嚢状拡張をともなった嚢胞腎の 1 例, 日泌尿会誌, 68: 508, 1977
- 5) 伊藤浩紀, 楠山弘之, 中目康彦, 黒川順二, 沼 秀親, 内島 豊, 阿久津元秀, 平賀聖悟, 岡田耕市, 駒瀬元治: 精嚢の嚢嚢を伴い不妊症を示す嚢胞腎の 2 例, 日泌尿会誌, 73: 1487, 1982
- 6) 岩崎 皓, 広川 信, 穂坂正彦, 岩本晃明, 木下裕三, 松下和彦: 精嚢嚢状拡張およびその分類について, 日泌尿会誌, 79: 1385, 1988
- 7) 松橋 求, 原 啓, 高波真佐治, 三浦一陽, 沢村良勝, 白井将文, 安藤 弘: 嚢胞腎に合併した副睾丸管および精管膨大部拡張症の 1 例, 日泌尿会誌, 79: 564, 1988
- 8) Weintraub, C. M.: Transurethral drainage of the seminal tract for obstruction, infection and infertility, Brit. J. Urol., 52: 220, 1980
- 9) Marina, S.: Oligozoospermies of obstructive cause, In Oligozoospermia, Recent Progress in Andrology, Edited by Frajese, G., Hafez, E.S.E., Conti, C. and Fabbrini, A., 1st ed., 285, Raven Press, 1981
- 10) Colpi, G. M., Ballerini, G. and Zanollo, A.:

Ultrasonography of the seminal vesicles in infertility, Prog. reprod. Biol. Med., 12: 124, 1985

- 11) 石神襄次, 加古 賢, 矢田文平, 吉田秀政, 中野順道: 精嚢嚢並びに精管末端部の異状拡張症に就いて, 泌尿紀要, 6: 792, 1960
- 12) 石神襄次: 精嚢嚢線診断の意義, 臨泌, 28: 13, 1974
- 13) Bernstein, J. and Gardner, K. D. Jr.: Renal cystic disease and renal dysplasia, In Campbell's Urology, Edited by Walsh, P. C., Gittes, R. F., Perlmutter, A.D. and Stamey, T. A., 5th ed., Vol. 2, 1760, W. B. Saunders Company, 1986
- 14) Keiserman, W. M., Dubin, L. and Amelar, R. D.: A new type of retrograde ejaculation: Report of three cases, Fertil. Steril., 19: 1071, 1974
- 15) Sherins, R. J. and Howards, S. S.: Male infertility, In Campbell's Urology, Edited by Walsh, P. C., Gittes, R. F., Perlmutter, A. D. and Stamey, T. A., 5th ed. Vol. 1, 640, W. B. Saunders Company, 1986
- 16) 布施秀樹, 伊藤晴夫, 安田耕作, 島崎 淳, 真田寿彦: 逆行性射精の 5 例, 西日泌尿, 44: 1031, 1982
- 17) 布施秀樹, 角谷秀典, 石井弘之, 島崎 淳: 逆行性射精, 日不妊会誌, 32: 619, 1987

Cystic dilatation of the seminal vesicles associated with polycystic disease of the kidney and partial retrograde ejaculation: a case report

Akira Tosaka, Akira Yamazaki,
Akira Iwasaki and Makoto Hirokawa

Department of Urology, Fujisawa City Hospital,
Fujisawa 251, Japan

Kazuhiko Matushita

Department of Pathology, Fujisawa City Hospital,

Shigeo Asakura

Asakura Clinic, Fujisawa 251, Japan

Reported was an infertile male aged 27 years who had cystic dilatation of bilateral seminal vesicles, polycystic disease of the kidney and partial retrograde ejaculation. He had been married for 4 years. Bilateral testes had a size within normal limits and testicular biopsy demonstrated almost normal sper-

matogenesis. Plasma testosterone, LH and FSH levels were normal. Semen analysis revealed reduced semen volume and oligozoospermia. Sperms were present in the urine after ejaculation with median value of 2.94×10^4 . Cystoscopy revealed widely opened bladder neck. Vaso seminal vesiculogram demonstrated cystic dilatation of bilateral seminal vesicles and dilated deferential ampullas. This is the 15th case of cystic dilatation of the seminal vesicles associated with polycystic disease of the kidney in Japan. No case with partial

retrograde ejaculation has been reported. The relationship between cystic dilatation of the seminal vesicles and polycystic disease of the kidney remains unclear but both are frequently associated together. The present case had no residual urine, but atonic seminal vesicles, wide opening of bladder neck and partial retrograde ejaculation observed in the case suggest neural dysfunction such as achalasia of esophagus or Hirschsprung's disease of colon.

(受付: 1989年8月31日)

ラット精巢の加齢におけるペントースサイクル活性 およびテストステロンのエストロゲンによる影響

Pentose Phosphate Pathway Activity and Testosterone Production in Rat Testis Treated Neonatally with Estrogen

東邦大学第1産婦人科学教室

跡 部 一 朗

Ichiro ATOBE

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

Wistar 系ラットに出生1日齢より5日齢までの5日間 Estradiol-17 β (E₂) 処置し、胚上皮の分化増殖を初期発生段階で抑制し、ペントースサイクル活性、テストステロン産生および精子形成能に出現する変化を検索し、ペントースサイクルが静止形成過程にどのような機能的意義を有するかを検討した。

- 1) 精巢重量は、6日齢を除き E₂ 処置群で有意に減少した。
- 2) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) 活性は、20日齢を除き E₂ 処置群で有意に減少した。
- 3) 無処置群、E₂ 処置群のテストステロン値には、両群間の各日齢で有意差はみられなかった。
- 4) 組織所見では E₂ 処置群に精子形成遅延がみられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 278-284, 1990)

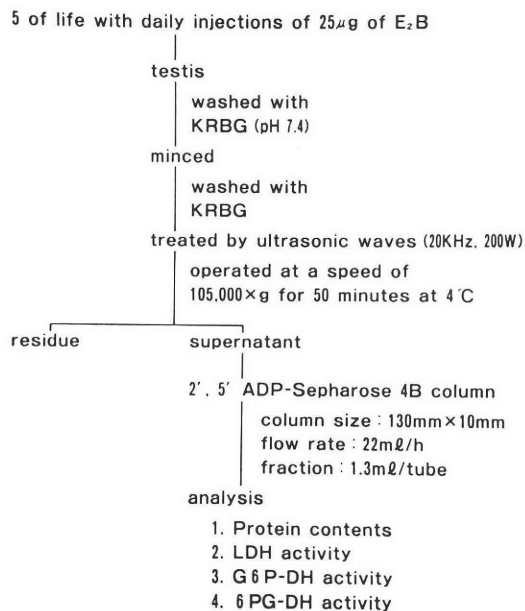
緒 言

精巢はテストステロンと精子を産生する2つの機能をもつ器官である。一方ペントースサイクルは、赤血球、肝臓、授乳期の乳腺、脂肪組織、副腎皮質に解糖の Embden-Meyerhof 経路の代替路として存在している。この経路が活発な組織の大多数では、この側路からの NADPH が脂肪酸やステロイドの合成およびグルタミン酸デヒドロゲナーゼを経たアミノ酸合成に活発に使用されている。またヌクレオチドと核酸合成のためのリボースを供給する。このような機能をもつ本経路が精子形成能の発現と維持をつかさどり、ホルモン標的臓器である精巢に他組織と比べ、より高い活性を有することは容易に推測される。

既にわれわれはブタ精巢におけるペントースサイ

クルの存在を酵素学的¹⁾、組織化学的²⁾に証明し、さらにラット精巢の精子形成過程に本経路が関与している可能性を指摘した。すなわちペントースサイクルは精子形成の全過程および次の精細胞の分化を維持してゆくために必要な代謝系であり、ことに精原細胞から leptotene 精母細胞への分化、増殖に大に関与している可能性を示唆した³⁾。もしこの説が支持されるとすれば、精巢機能を抑制した場合、ペントースサイクル活性の明らかな減弱がみられ、同時に精子形成過程に何らかの障害が現れるはずで、その結果、本研究の目的である精子形成過程におけるペントースサイクルの機能的意義を一層明確にすることになる。そこで著者は Wistar 系ラットに外因性エストロゲン (E₂) を負荷し、その精巢機能を抑制することによりペントースサイクル活性の低下が起りうるのか、同時に精子形成過程にいかなる変化

が現われるのかを組織学的に検索し、併せて精子形成に必須のテストステロン産生との関連について検討した。



Experimental Procedure

図1 Wistar-derived rats were treated between days 1 and 5 of life with daily injections of 25 μ g of E₂B

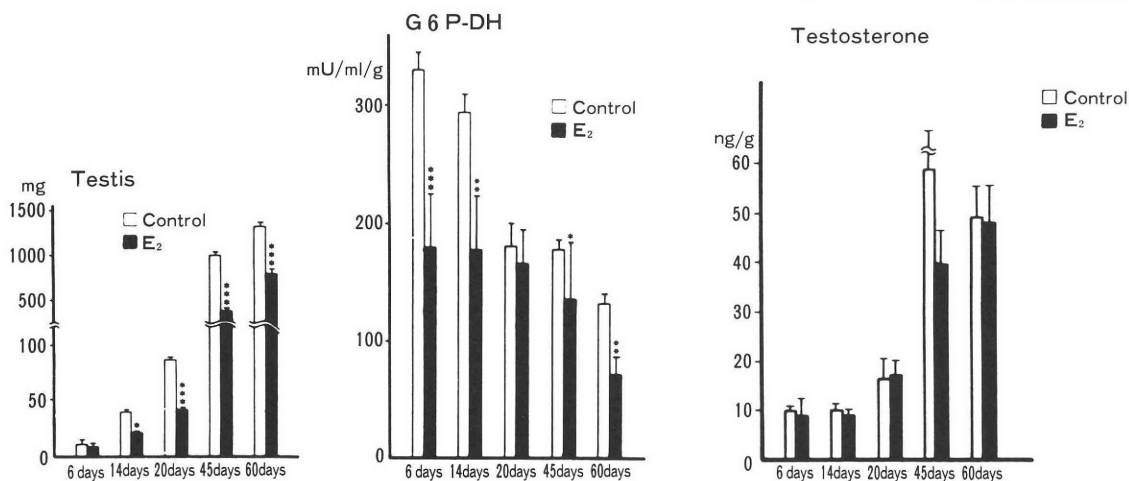
1) 精巢

Wistar ラットの出生1日齢より Estradiol-17 β (E₂) 25 μ g/20 μ l を24時間毎に5日間皮下注射し、6日齢、14日齢、20日齢、45日齢、60日齢の精巢を実験に供した。飼育条件は12時間明暗自動サイクルの室内で飼育し、21日齢までは1ゲージに母親1匹に対し3匹から9匹の子を入れ、その後は離乳させた。塩酸ケタミンの麻酔下で摘出した精巢はその重量を測定後、直ちにペントースサイクルの鍵酵素であるG6P-DH活性の測定に使用した。テストステロン測定のための精巢は-80 $^{\circ}$ Cで保存した。なお、45日齢、60日齢精巢はカプセルを除去し使用した。

2) 各精巢の粗抽出液の作製 (図1)

精巢はKRBG (PH 7.4) 中で十分洗浄し、付着した血液を取り除き、同KRBG中で細片した。細片後10mMメルカプトエタノール、5mMEDTA 3Naを含む0.1M Tris-Hcl buffer PH 7.6を精巢細片沈澱物に対し等量加え、発振周波数20KHz、200Wの出力で1分間づつ3回音波処理をした。この際、熱の発生を押さえるため、冷水中で操作し、1分間のインターバルをおいて行なった。超音波処理後、4 $^{\circ}$ C、105,000g、50分間冷却遠心し、得られた上清を東洋濾紙No.7で濾過した。この濾液を精巢の粗抽出液とした。

3) 2', 5'ADP-Sepharose 4B⁴⁾による精製 (図1)



The results represent the means $\pm$ SEM. significant differences between the control and treatment groups is indicated by asterisks (* $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.001$)

図2 G6P-DH activities, concentrations of testosterone and testis weights in control rats and those treated with E₂B between 1 and 5 days of age

Table. 1 Testis weights in control rats and those treated with E₂B between 1 and 5 days of age

	Control	25 μ g of E ₂ B
6 days old	9.91 $\pm$ 0.7 (n=7) N.S	8.43 $\pm$ 0.45 (n=4)
14 days old	38.9 $\pm$ 1.2 (n=14)	19.95 $\pm$ 0.6 (n=4) ***
20 days old	87.5 $\pm$ 2.6 (n=24)	41.6 $\pm$ 1.1 (n=7) ***
45 days old	1013.6 $\pm$ 14.6 (n=24)	431.7 $\pm$ 39.8 (n=9) ***
60 days old	1390.0 $\pm$ 20.0 (n=11)	802.0 $\pm$ 42.6 (n=4)

Unit : mg

The number of animals is 4-24 per group; means $\pm$ SEM are presented. The asterisks indicate statistically significant differences between the control and treatment groups

(* P < 0.05, ** P < 0.001, N.S; no significant difference)

Table. 2 G6P-DH activity in control rats and those treated with E₂B between 1 and 5 days of age

	Control	Estradiol
6 days old	n=4 333.1 $\pm$ 16.9	*** n=4 181.6 $\pm$ 48.4
14 days old	n=4 294.3 $\pm$ 15.0	** n=4 178.2 $\pm$ 47.1
20 days old	n=4 182.6 $\pm$ 19.6	N.S n=4 167.7 $\pm$ 30.7
45 days old	n=4 178.0 $\pm$ 8.7	* n=4 136.5 $\pm$ 48.4
60 days old	n=3 132.1 $\pm$ 12.6	** n=4 72.1 $\pm$ 17.9

Unit : mU/ml/g

The results represent the means $\pm$ SEM. significant differences between the control and treatment groups is indicated by asterisks (* P < 0.05, ** P < 0.02, *** P < 0.001, N. S : no significant difference)

方法は本誌既報^{1,5)}に準じた。なお 2), 3) の行程はすべて低温で操作した。

4) 蛋白量および各酵素活性の測定

(1) 蛋白量

Marison の方法⁶⁾にもとづき測定した。

(2) LDH 活性

Hill 変法^{7,8)}にもとづき測定した。

(3) G6P-DH 活性

Löhr-Waller の方法⁹⁾にもとづき測定した。

(4) 6PG-DH 活性

Wolfson らの方法¹⁰⁾にもとづき測定した。

5) テストステロンの測定¹¹⁾

Table. 3 Concentration of testosterone in control rats and those treated with E₂B between 1 and 5 days of age

	Control	Estradiol
6 days old	n=4 10.1 $\pm$ 1.1	N.S n=4 9.2 $\pm$ 1.7
14 days old	n=4 10.1 $\pm$ 1.0	N.S n=4 9.0 $\pm$ 3.9
20 days old	n=4 16.5 $\pm$ 4.0	N.S n=5 16.7 $\pm$ 2.9
45 days old	n=5 58.6 $\pm$ 17.3	N.S n=5 39.8 $\pm$ 6.8
60 days old	n=3 48.7 $\pm$ 6.5	N.S n=5 48.0 $\pm$ 7.1

Unit : ng/g

The results represent the means $\pm$ SEM

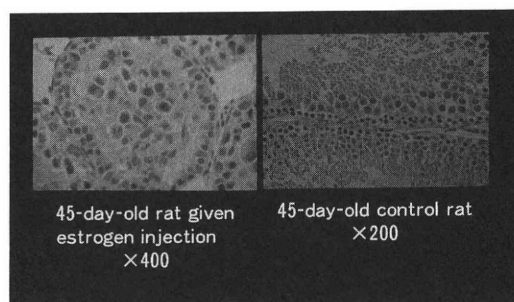


写真1 Histology of rat testis

試料に回収率補正用 T-³H 1000 dpm 添加後、エーテルで抽出した。Chromatography は Sephadex LH-20 (Pharmacia Uppsala, Sweden) を micro column に 2 ml 充填し、System は hexane: benzene: MtOH (90 : 5 : 5) を用いた。テストステロンの溶出部分を採取し、その 1/2 を回収率補正用に、残り 1/2 に T-³H を 1000 dpm 添加し assay に用いた。

実験結果

1) 精巣重量 (表 1)

表 1 は E₂ 処置群と無処置群の各日齢の精巣重量を示す。6 日齢精巣を除き各日齢の精巣は E₂ 処置群で有意に減少した。

2) G6P-DH 活性 (表 2)

表 2 は E₂ 処置群と無処置群の各日齢の精巣における G6P-DH 活性を示す。6 日齢、14 日齢精巣で E₂ 処置群は無処置群の約 1/2 の活性低下を示した。20 日

齡精巣では両群に有意差はみられないが、E₂処置群に低下傾向がみられ45日齡精巣では再度有意に減少し、60日齡精巣では無処置群に比べ約1/2に低下した。

3) テストステロン値 (表3)

表3は各日齡のE₂処置群および無処置群の精巣テストステロン値を示す。E₂処置群のテストステロン値は、精巣重量が無処置群と比較し各日齡で有意に減少しているにもかかわらず無処置群との間に有意な差はみられなかった。

4) E₂処置群および無処置群の45日齡精巣の組織所見 (写真1)

右が無処置群精巣、左がE₂処置群精巣を示す。無処置群精巣の精巣管腔内には既に精子形成が完了している。E₂処置群精巣では管腔形成がみられず、精子形成も精子細胞あるいはpachytene精母細胞の段階で停止し、明らかな精子形成の遅延がみられる。

考 案

ペントースサイクルの鍵酵素であるG6P-DH活性は、20日齡を除き各日齡で無処置群と比較し有意に減少したが、テストステロンは、精巣重量が6日齡を除き各日齡で無処置群のそれより有意に減少し続けているにもかかわらず両群に差がみられなかった(図2)。組織所見では、無処置群の45日齡精巣では精細管腔内に精子の出現が認められているが、E₂処置群では精子細胞あるいはpachytene精母細胞の段階で成熟停止している。

E₂処置によりペントースサイクル活性は、6日齡、14日齡で無処置群より約1/2に減弱したが、先にわれわれは6日齡、14日齡のペントースサイクル活性が、各日齡に比べ高活性を示した結果から、本経路は精細胞の初期発生、殊に精原細胞からleptotene精母細胞への分化、増殖に関与している可能性を示唆した³⁾。E₂処置後のこの日齡におけるペントースサイクル活性の著明な減弱、テストステロン産生の不変および精子形成過程の遅延は、われわれのこの仮説を一層支持する。またテストステロン産生が、E₂処置により抑制されていないにもかかわらず精子形成遅延が認められたことは、この時期の精子形成にテストステロンが関与していない可能性を示している。20日齡でのペントースサイクル活性が両群間で差がみられなかった理由は不明である。20日齡より上昇しはじめるテストステロン産生に関与しはじめたのかも知れない。

20日齡から45日齡の精巣は、精子形成の成熟段階といわれており、無処置45日齡精巣では既に精子形

成が完了している。しかし、この時期の精子形成の最も重要な要素であるテストステロンが無処置群と有意差がみられないにもかかわらず、E₂処置した45日齡精巣では、精細胞が最も發育したとしても精子細胞の段階までである。このことは20日齡から45日齡にかけての精子成熟段階ではテストステロン以外の要素が関与している可能性もあり、ペントースサイクル活性の減弱もその一つの要因であるかも知れない。

60日齡精巣のペントースサイクル活性もE₂処置群は無処置群と比べ有意に減少している。60日齡精巣のペントースサイクル活性は、次の精細胞の分化と増殖を維持してゆくのに必要な活性である可能性を示唆³⁾したが、この証明には長期的な観察が必要である。

それではペントースサイクルはどの部位で作用しているのだろうか。われわれは組織化学的検索で、本経路は間質組織および精細管壁から内腔に局在することを報告した²⁾。6日齡、14日齡無処置精巣のテストステロンは低値を示しE₂処置によってもその産生は抑制されない。一方、ペントースサイクル活性は、E₂処置より1/2に減弱した。従ってペントースサイクルが、この時期のLeydig細胞に作用しテストステロン合成に関与している割合は極めて少ないと考えられる。

ペントースサイクル活性の減弱は、精子形成の遅延を伴うことから、精子形成を制御するSertoli細胞あるいは精原細胞に関与している可能性がある。Sertoli細胞は、精原細胞から精子に至る精子形成の全過程の栄養に関係すると考えられ、精子形成にたいするFSHやアンドロジェンの間接的作用はSertoli細胞を介している。この細胞はFSHの標的細胞であり、FSHのSertoli細胞に対する働きは、増殖刺激だけでなく、成熟したSertoli細胞におけるアンドロジェン結合タンパクやエストロジェンの合成の促進、酵素プロテインキナーゼの活性化、インヒビシン合成などが知られている。Sertoli細胞の機能はその細胞膜に局在しているFSHの特異的受容体にFSHが結合し、アデニル酸シクラーゼの活性化→サイクリックAMP産生→タンパク質リン酸化酵素の活性化→酵素、構造タンパク質のリン酸化→生物学的作用発現という経路が主要なものと考えられる。ラットの精巣FSH受容体は2日齡から15日齡で3倍の増加を示し、その後減少し、20日齡からは変動がみられない¹²⁾。

このFSH受容体の増加は、精巣でのFSHの生理的作用と密接に関係するのは上述した通りである。

すなわち、5 日齢から 20 日齢の未成熟ラット精巣では FSH は Sertoli 細胞でのアデニル酸シクラーゼを最大限に活性化¹³⁾し、アンドロジェン結合タンパクなどの合成を促進する。20 日齢以降は FSH によるアデニル酸シクラーゼ活性はみられない、従って、Sertoli 細胞の成熟が不完全であれば、精子形成の完成へ向けての初期段階が阻止される。E₂処置によって新生児ラットの下垂体前葉を抑制した時、LH 分泌は抑制されるが FSH には変化がみられない¹⁴⁾。しかし、E₂処置した Sertoli 細胞は、核が小さくその発育が抑えられており¹⁵⁾、Sertoli 細胞に対する FSH の作用が発揮されていないことを示している。この事実は E₂が FSH 受容体に直接作用してその結合部位数あるいは親和性またはその両者を減少させているのかも知れない。その結果、Sertoli 細胞でのペントースサイクルの活性化が低下し、Sertoli 細胞の増殖、発育が抑制されたと考えられる。

FSH は精原細胞にも特異的に結合する^{16,17)}。従って Sertoli 細胞と同じような直接阻害が精原細胞の FSH 受容体に起こるとすれば、ペントースサイクルの活性化が低下し、精原細胞から精子形成へ向けての分化、増殖が抑制される。

外因性 E₂による精巣機能の抑制は視床下部一下垂体前葉によって仲介された細胞レベルでも直接的に抑制される^{18,19)}。精巣機能抑制による顕著な変化はテストステロン産生の減少である。

E₂処置によってテストステロン産生が抑制されなかったことは意外であった。しかし、Leydig 細胞が Sertoli 細胞や精子形成より、はるかに外的刺激に対する抵抗性が強く、加えて E₂処置が出生直後からという毒性を受けにくい時期に実施されたことを考慮すると、その可能性はありうる。またラットの Leydig 細胞には性成熟の過程で大きな変化がみられる²⁰⁻²²⁾。

Huhtaniemi^{22,23)}らは出生 2 週間までの Leydig 細胞と 3 週頃に出現してくる Leydig 細胞との間にはその細胞数やステロイド合成に明らかな相違があり、前者を胎児 Leydig 細胞、後者を成人 Leydig 細胞と分類し、両者の置換期は 15 日から 20 日齢の間であると指摘している。従って、テストステロン産生に抑制がみられなかった理由は、1 日齢から 5 日齢という極めて早い時期に E₂処置が行なわれたためと考えられる。一般に外因性 E₂が直接精巣に作用してテストステロン産生を抑制する機構は、E₂が Leydig 細胞に局在するといわれる E₂受容体²⁴⁾に結合し、エストロジェン受容体機構を介して 17 β -hydroxylase と C₁₇-C₂₀lyase の活性を減少させるためと考えられている¹⁹⁾。

E₂による直接阻害効果がみられなかった本実験の結果は、E₂投与時期の精巣に E₂受容体が出現していないか、出現していたとしても正常に機能していないかのどちらかであろう。

E₂はまた中枢を介して LH 分泌を阻害し、Leydig 細胞でのテストステロン分泌を阻害する。従って精巣への E₂の直接阻害効果がみられなかったとしても、LH 分泌阻害によりテストステロン産生は抑制された筈である。Leydig 細胞の機能は、その細胞膜に局在している LH の特異的受容体に LH が結合することにより誘起される。従って Leydig 細胞が有効に働くためには、LH 受容体数および LH に対する応答の程度が問題になる。精巣当たりの hCG 結合は、精巣当たりの Leydig 細胞数に変化がみられない 2 日齢と 11 日齢では 2 倍に増加しており、このことは Leydig 細胞当たりの LH 受容体数の増加を反映している²²⁾。また hCG によるテストステロン産生は、新生児ラット Leydig 細胞では成熟ラットの 4 倍であるという²⁵⁾。従って E₂による LH 分泌が抑制されても十分 Leydig 細胞の機能が發揮でき、テストステロン産生に影響を与えないと考えられる。成熟ラットでは高濃度の hCG 処置により LH 受容体の downregulation が惹起されるが、新生児ラットではそれがみられない²²⁾。従って新生児精巣が生理的状态で LH 受容体数に比べ高濃度の LH にさらされているとしても LH 作用の阻害が起こらない筈である。

Cigorrage ら²⁶⁾は E₂に精巣 LH 受容体を直接阻害する作用があると報告しているが、新生児精巣にはみられないようである²²⁾。

LH によるステロイド合成の完全な機構はまだ不明であり、LH の作用を E₂が抑制する確実な部位を特定することは出来ない。Saez ら²⁴⁾は正常ラットでは E₂処置後 LH 受容体数は減少するが、cAMP は逆に増加するので LH に対する減弱したテストステロン合成反応を説明できないと指摘している。この結果は、E₂処置したラットの LH 刺激によるテストステロンが分泌に対する主要な阻害部位は、cAMP 産生後にあることを示しており、Moger ら¹⁹⁾の説と一致する。すなわち脂溶性ホルモンであるエストロジェンは、細胞膜を通り抜けて細胞質内にある特異的で親和性の高い受容体と結合する。次にこのエストロジェン受容体複合体が活性化反応を起こし、その結果、大きさや立体構造、表面電荷が変化して、核内に移行後クロマチンと結合できるようになる。エストロジェン受容体複合体は DNA の特異的な領域に結合して、エストロジェン作用を發揮する。従って新生児ラット精巣では、細胞質 E₂受容体の欠如によっ

てE₂効果が発揮されないために、E₂のLH分泌阻害によるテストステロン産生の抑制が起こらないのかも知れない。

またこの時期血中の α -Fetoproteinが高濃度を示す。 α -Fetoproteinはエストロジェンと極めて結合しやすい蛋白で、20日齢までは血中で主要なエストロジェン結合成分として存在している。これらの機構が働いて新生児ラットの精巣はエストロジェン作用から防御されている可能性がある。Huhtaniemiら²²⁾は、新生児ラット精巣にエストロジェンを介して行なわれるLHあるいはhCG作用の阻害がみられないのは、成熟ラットよりも高いテストステロン産生率から説明できると指摘している。成熟ラット精巣ではゴナドトロピンの刺激によるエストロジェン形成は過度のアンドロジェン形成を阻止し、テストステロン分泌に関する持続的な阻害作用を働かせるという一つの調節機構を行なう。しかし、胎児、新生児ラットでは、テストステロンの高濃度が雄の生殖器および中枢系の発育、分泌に必須であることから、このような阻害機構は生理的に受け入れられないのであろう。

以上の結果を総括すると、ペントースサイクルは精原細胞からleptotene精母細胞の分化、増殖に関与し、テストステロンの関与は極めて少ないと考えられ、この時期の本経路の作用部位はSertoli細胞および精原細胞に局在している可能性がある。従って精細胞の初期発生過程でFSHが精子形成を完成させるための生化学的現象の引き金として作用することが示唆される。また、20日齢以降のテストステロン値が高値を示しながら精子形成が遅延していることは、Sertoli細胞の発育が未熟なため、アンドロジェン結合タンパクの産生や分泌機能が低下し、テストステロンを標的細胞に十分輸送されなかったためかも知れない。同時にこの時期のペントースサイクル活性が有意に減少していることにより、本経路は精子成熟のこの過程にも関与している可能性がある。

(本稿を終わるに臨み、本研究に際し御指導、御鞭撻下され、御校閲下さった第1産科婦人科学教室百瀬和夫教授、生化学教室天野久夫教授に深謝致します。なお本研究は伊藤元博助教授との共同研究の一部であり、共同研究途上での御指導および御尽力に心より感謝致します。

本研究の要旨は、第8回日本アンドロロジー学会において発表した。)

文 献

1) 伊藤元博, 中岡義明, 渡辺 仁, 江川恵基, 天野

- 久夫: プタ精巣におけるペントースサイクルと解糖, 日不妊誌, 31: 22, 1986
- 2) 伊藤元博, 中岡義明, 渡辺 仁, 天野久夫: プタ精子, 精巣におけるペントースサイクルの脱水素酵素の局在について, 日産婦誌, 39: 195, 1987
- 3) 伊藤元博, 跡部一朗, 天野久夫: ラット精巣の発育過程におけるペントースサイクル活性の推移, 日不妊誌, 34: 134, 1989
- 4) Brodelius, P., Larsson, P. O. and Mosbach, K.: The synthesis of three AMP-analogues, N⁶-(6-aminoheptyl)-adenosine 5'-monophosphate, N⁶-(6-aminoheptyl)-adenosine 2', 5'-bisphosphate and N⁶-(6-aminoheptyl) adenosine 3', 5'-bisphosphate and their applications as general ligands in biospecific affinity chromatography, Eur. J. Biochem., 47: 81, 1974
- 5) 有沢克夫, 中岡義明, 渡辺 仁: アフィニティークロマトグラフィーによるブタ精子のグルコース-6-リン酸脱水素酵素, 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の分離, 日不妊会誌, 42: 30, 1985
- 6) Marison, M. B.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Anal. Biochem., 72: 284, 1976
- 7) Hill, B. R. and Levi, C.: Elevation of a serum component in neoplastic disease, Cancer Res., 14: 513, 1954
- 8) Hill, B. R.: Some properties of serum lactic dehydrogenase, Cancer Res., 16: 460, 1956
- 9) Löhr, G. W. and Waller, H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, In methods of enzymatic analysis, Vol. 2B Bergmeyer, H. U. ed. 636, Academic press, 1974
- 10) Wolfson, Jr. S. K. and Ashman, H. G. W.: Isocitric and 6-phosphogluconic dehydrogenase in human blood serum, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 96: 231, 1957
- 11) 牧野拓雄, 稲富顕二, 吉田孝雄, 田 根培, 高木繁夫, 神戸川明: 性ステロイドホルモンのradioimmunoassay (その4) -Testosteroneのradioimmunoassay-, ホルモンと臨床, 21: 107, 1973
- 12) Ketelslegers, J. M., Hetzel, W. D., Sherins, R. J. and Catt, K. J.: Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat, Endocrinology, 103: 212, 1978
- 13) Mary, V. S., James, M. O., Lutz, B. and Anthony, R. M.: Development changes in the hormonal regulation of rat testis Sertoli cell adenylyl cyclase, Endocrinology, 109: 1270, 1981
- 14) Aguilar, E., Tejero, A., Vatica, M. D. and Galaz, C. F.: Dissociation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone control mechanisms in male and female rats by neonatal administration of estradiol benzoate or testosterone propionate, Horm. Res., 19: 108, 1984

- 15) Gaytan, F., Pinilla, L., Aguilar, R., Lucena, M. C. and Paniagua, R.: Effects of neonatal estrogen administration on rat testis development with particular reference to Sertoli cells, *J. Androl.*, 17: 112, 1986
- 16) Means, A. R., Fackunding, J. L., Huckins, C., Tindall, D. J. and Vitale, R.: Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis, *Recent. Prog. Horm. Res.*, 32: 477, 1976
- 17) Orth, J. and Christensen, A. K.: Autoradiographic localization of specifically bound 125 I-labelled follicle-stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis, *Endocrinology*, 103: 1944, 1989
- 18) Jones, T. H., Fand, V. S., Landau, R. L. and Rosenfield, R.: Direct inhibition of Leydig cell function by estradiol, *J. Clin. Endocr.*, 47: 1368, 1978
- 19) Moger, W. H.: Direct effects of estrogens on the endocrine function of the mammalian testis, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 58: 1011, 1980
- 20) Roosen-Runge, E. C. and Anderson, D.: The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat, *Acta Anat.*, 37: 125, 1959
- 21) Lording, D. W., Dekretser, D. M.: Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development, *J. Reprod. Fertil.*, 29: 261, 1972
- 22) Huhtaniemi, I. P., Nozu, K., Warren, D. W., Dufau, M. L. and Catt, K. J.: Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis, *Endocrinology*, 111: 111, 1982
- 23) Tapanainen, J., Kuopio, T., Pelliniemi, L. J. and Huhtaniemi, I.: Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity, *Biol. Reprod.*, 31: 1027, 1984
- 24) Saez, J. M., Haour, F., Loras, B., Sanchez, P. and Cathiard, A. M.: Oestrogen induced Leydig cell refractoriness to gonadotropin stimulation, *Acta Endocrinol.*, 89: 379, 1978
- 25) Huhtaniemi, I. P., Katikinemi, M. and Catt, K. J.: Regulation of luteinizing-hormone receptors and steroidogenesis in the neonatal rat testis, *Endocrinology*, 109: 588, 1981
- 26) Cigorruga, S. B., Sorrell, S., Bator, J., Catt, K. J. and Dufau, M. L.: Estrogen dependence of a gonadotropin induced lesion in rat testicular Leydig cell, *J. Clin. Invest.*, 65: 669, 1980
- 27) Mulder, E., van-Beurden-Lamers, W. M. O., Brinkmann, A. O., Mechielsen, M. J. and van der Molen, H. J.: High affinity binding of oestradiol by rat testis interstitial tissue and by several other tissues of the male rat, *J. Steroid Biochem.*, 5: 955, 1974
- 28) Raynaud, J. P., Mercier-Bodard, C. and Baulieu, E. E.: Rat estradiol binding plasma protein, *Steroids*, 18: 767, 1971

Pentose phosphate pathway activity and testosterone production in rat testis treated neonatally with estrogen

Ichiro Atobe

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

The role of postnatal pentose cycle activity in sexual maturation was studied in male rats. Rats were injected once daily with estradiol- 17β (E_2), 25 μ g, on days 1-5 of life, and killed on day 6, 14, 20, 45 and 60 of life. The weights of testes were reduced. Pentose cycle activities were suppressed by 50% on days 6 and 14 of life, compared to controls, by hormone treatment, but testicular testosterone was unchanged at all ages studied. From 45 days of age onward, complete spermatogenesis was established in control rats. In contrast, 45-day-old estrogenized rats showed the tubules with maturation arrest at the level of early spermatids or pachytene spermatocytes. These data demonstrate that the pentose phosphate pathway may be important in providing ribose for DNA in the primary cellular proliferation, whereas the differentiation from spermatogonia to leptotene spermatocyte is not hormone-dependent.

(受付: 1989 年 11 月 24 日特掲)

マウス前核期胚培養における酸素毒性の影響

The Effects of Oxygen Toxicity on Early Development of Mouse Embryo

京都大学医学部婦人科学産科学教室

馬 岡 陽 野 田 洋 一 松 本 央
Yoh UMAOKA Yoichi NODA Hisashi MATSUMOTO
森 崇 英
Takahide MORI

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

酸素毒性がマウス初期胚発育に及ぼす影響を検討するため、低酸素（5%）濃度下および高酸素（20%、大気中）濃度下で O_2^- の消去系酵素である superoxide dismutase (SOD) を添加して、前核期胚から胚盤胞まで培養し、次のような結果を得た。

1) 高酸素濃度下培養の胚盤胞率は1.3%で、2-cell block が成立することが確認された。低酸素濃度下培養での胚盤胞率は28.4%で、2-cell block 解除効果が認められた。SOD 添加低酸素濃度下培養の胚盤胞率は75.2%と著しく高値であった。

2) 一過性でも高酸素（20%）に被曝すれば、以後の培養を低酸素濃度下で行なっても有意に胚盤胞率が低下した。

3) SOD 添加低酸素濃度下培養の胚発育効率は、同時刻に *in vivo* から回収した胚の発育効率には及ばないが、2-cell block 解除効果が知られている EDTA 添加高酸素濃度下培養の胚発育効率に比べ有意に高値であった。

以上の結果より、酸素毒性がマウス初期胚発育に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。この結果は、ヒト体外受精胚移植法においても酸素毒性からの胚の保護が必要であり、この目的のために SOD 添加低酸素濃度下培養が応用可能である事を示している。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 285-292, 1990)

序 論

近年、不妊治療の一環としヒト体外受精胚移植法¹⁻⁴⁾が盛んに行なわれるようになってきている。しかし我が国はもとより世界各国を見渡しても、その妊娠成功率は未だ十分とは言えず、大多数の医療機関においては妊娠成功率は10~30%^{1,4)}程度である。妊娠成功率が低い理由を特定するのは困難であるが、*in vivo* における胚発育と最も異なっているものの1

つとして、胚培養条件設定の方法を考えるのは当然であろう。

哺乳類胚の *in vitro* 培養は必ずしも確立されたものではなく、ウシ⁵⁾、ヒツジ⁶⁾、ブタ⁷⁾などの家畜を始め、マウス⁸⁾、ラット⁹⁾、ハムスター⁹⁾等のげっ歯類においても stage specific な胚発育の停止が知られている。In vivo では問題なく進行するこれらの胚発育が *in vitro* ではうまく進行しない理由は不明である。その原因を考えると、胚発育の場に体細胞が欠如して

表1 酸素およびSODの2-cell block 解除効果

O ₂ concentration	SOD ^{a)} concentration	No. of embryos ^{b)}	No. of embryos obtained				
			2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	Blastocyst (%)	
20%	0 mg/ml	231	209 (90.5)	80 (34.6)	16 (6.9)	3 (1.3)	***
	0.5 mg/ml						
	0.5 mg/ml	113	108 (95.6)	71 (62.8)	48 (42.5)	35 (31.0)	
5 % ^{c)}	0 mg/ml	201	175 (87.1)	128 (63.7)	90 (44.8)	57 (28.4)	***
	0.5 mg/ml	153	148 (96.7)	140 (91.5)	137 (89.5)	115 (75.2)	

a) r-hSOD

b) TUCK ♀ × TUCK ♂

c) 5 % O₂ 5 % CO₂ 90% N₂ の気相下で採卵，培養

*** : χ^2 test P<0.01

表2 酸素およびSODの2-cell block 解除におよぼす用量－反応関係

group	SOD ^{b)} concentration (μg/ml)	No. of experiment	No. of embryos ^{E)}	No. of blastocyst (%)	
O ₂ 5% ^{A)}	0	3	55	13 (23.6)	***
	0.05	3	48	12 (25.0)	
	0.5	3	46	16 (34.8)	
	5.0	3	45	17 (37.8)	
	50.0	3	56	28 (50.0) ^{a)}	
	500.0	3	56	46 (82.1) ^{b)}	
O ₂ 20%→5% ^{B)}	0	3	48	6 (12.5) ^{c)}	**
	0.05	4	60	11 (18.3) ^{d)}	
	0.5	4	60	12 (18.3) ^{e)}	
	5.0	3	53	11 (20.8) ^{f)}	
	50.0	4	72	22 (27.8) ^{g)}	
	500.0	3	54	34 (63.0) ^{h)}	
O ₂ 20% ^{C)}	0	7	120	2 (1.7) ⁱ⁾	*
	0.05	7	113	1 (0.9) ^{j)}	
	0.5	5	74	2 (2.7) ^{k)}	
	5.0	7	100	3 (3.0) ^{l)}	
	50.0	6	88	4 (4.5) ^{m)}	
	500.0	6	90	25 (27.7) ⁿ⁾	

A) 5 % O₂ 5 % CO₂ 90 % N₂ の気相下で採卵，培養

B) 一過性（1時間）高酸素被曝後，5 % O₂ 5 % CO₂ 90 % N₂ の気相下で培養

C) SOD : recombinant human Cu・Zn-superoxide dismutase

D) 高酸素濃度下で採卵培養

E) TUCK ♀ × TUCK ♂

χ^2 test
* P < 0.05, ** P < 0.01

a : g p < 0.05,
b : h p < 0.01,
c : i p < 0.01,
d : j p < 0.01,
e : k p < 0.01,
f : l p < 0.01,
k : m p < 0.05,
l : n p < 0.05

いることと同時に *in vivo* に比して酸素濃度が高いことがあげられる。

卵管液中の酸素分圧は大気中の酸素分圧の1/3程度で¹⁰⁻¹²⁾，*in vitro* で胚培養を行なう場合に酸素分圧を5%に設定することで高い胚盤胞率の得られることが，各種哺乳動物で既に報告されている¹³⁻¹⁷⁾。

また，最近，野田等はO₂の scavenger である superoxide dismutase (SOD)¹⁸⁻²⁰⁾を培養液に添加することにより，マウス 2-cell block が解除されることを

The Instruments Devised for Recovery and Culture of Early Embryos under Low Oxygen Concentration

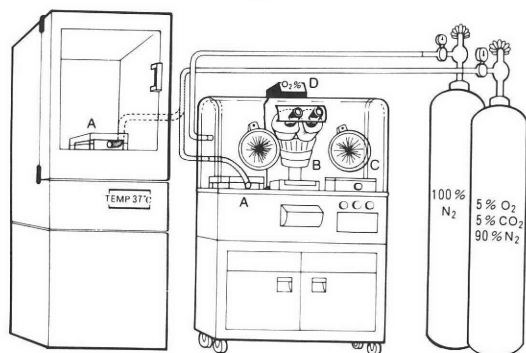


図1 低酸素下採卵装置

- A) 閉鎖系低酸素濃度下培養チェンバー
B) 実体顕微鏡
C) 恒温板
D) 酸素濃度計 (OX-30, アトム社)

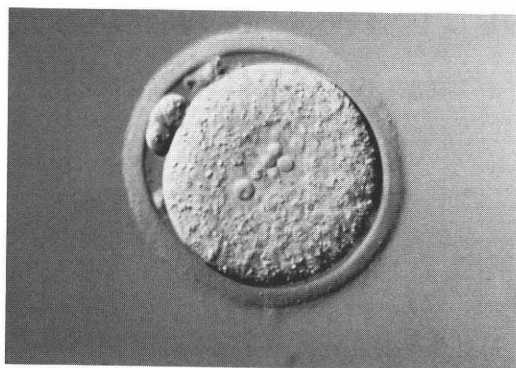


写真1 hCG 18時間後に採卵した前核期胚

特級試薬を用いた。

2. 過排卵処理及び採卵²⁴⁾

4 週齢雌マウス (TUCK: outbred) に PMSG, hCG 各々 5 単位を 48 時間間隔で腹腔内投与して過排卵処理を行ない, hCG 投与後に同系雄と同居させ, 翌朝陰栓を確認し妊娠 1 日目とした。hCG 投与 18 時間後に, 頸椎脱臼法にて屠殺し, BWB 液²⁵⁾を用いて卵管灌流法にて胚を回収した。0.1 % ヒアルロニダーゼ加 BWB 液中で卵丘細胞を除去し, 変性卵を除外したのち前核期胚のみを実験に使用した (写真 1)。

3. 低酸素下採卵装置および閉鎖系低酸素下培養装置 (図 1, 図 2)

可及的に酸素濃度を 5 % にして採卵するために, アトム社インファントウォーマー (V-55) を改裝し低酸素下採卵装置を考案, 作製した (図 1)。可能な限り装置内各所を密封し, 外気との交通を遮断したインファントウォーマー内に実体顕微鏡, 恒温板, 培養チェンバーを設置し, 酸素濃度計 (OX-30, アトム社) で, 装置内の酸素濃度 (%) を連続測定しながら採卵操作を行なった。まず装置内の酸素濃度を低下させるために, 100 % 窒素ガスを急速注入し, 約 15 分間で酸素濃度を 5 % に低下させ, 次に 30 分間混合ガス (5 % 酸素 5 % 2 酸化炭素 90 % 窒素) を注入し, 装置内の気相を 5 % 酸素, 5 % 2 酸化炭素, 90 % 窒素に安定させた。 (図 2)。装置内温度は 37°C に設定した。大気中で TUCK 雌マウスを屠殺し, 直ちに装置内に移した後開腹し, 実体顕微鏡下で形態正常な前核期胚を回収した。回収した前核期胚は, 4-Well Multidish (Nunc) の培ち移し, 予め同混合ガスで気相を安定させた閉鎖系低酸素濃度下培養チェンバーに収納し 37°C で培養を行なった。採卵所要時間は, 平均 11 分であった。

4. 培養条件の設定

培養液は Milli-Q 装置で作製した超純水を用い,

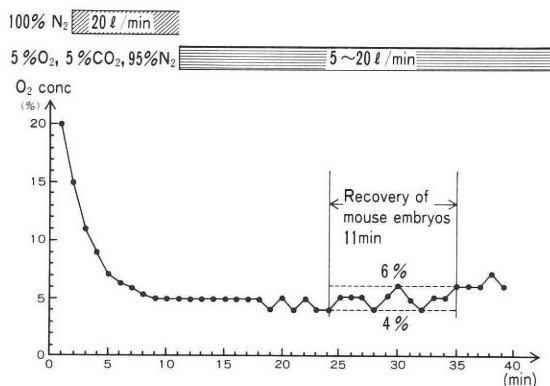


図2 採卵装置内酸素濃度

発見し²¹⁾, SOD のもつ作用から考えて, 活性酸素の毒性が 2-cell block の成立に関与していると報告した^{22,23)}。本研究ではこれらの事実を踏まえて, in vitro 初期胚発育における酸素の影響を, SOD 添加低酸素濃度下培養を行なうことによって検討した。

方 法

1. 薬剤

この実験に使用した主な薬剤は, Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA: 半井化学), Bovine serum albumin (BSA, シグマ社), Hyaluronidase (シグマ社) 等で, Recombinant human Cu · Zn-superoxide dismutase (r-hSOD)¹⁹⁾ は, 日本化薬株式会社からの提供を受けた。マウス過排卵処理は Serotropin (PMSG, 帝国臓器), Gonatropin (hCG, 帝国臓器) を使用し, 他の薬剤は全て半井化学社製,

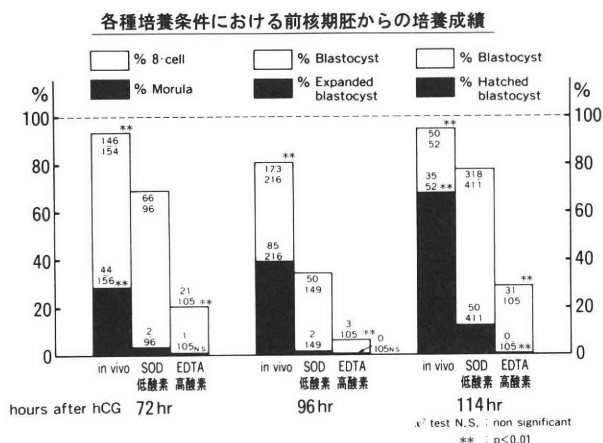


図3 3群における胚発育効率の比較

in vivo 群: 各時刻に *in vivo* より回収

SOD 添加低酸素群: 500 μg/ml SOD 添加低酸素濃度下培養

EDTA 添加高酸素群: 30 μM 添加高酸素濃度下培養

χ² test

N. S.: Not significant

その他: P < 0.01

0.3% BSA を添加した BWB²⁵⁾ を基本培養液とした。各実験の 12 時間前に基本培養液を調整し、フィルター (0.2 μ: Milipore) で濾過後各々の実験条件における気相に平衡させた。培養は 4-Well Multidish (Nunc) を用い、各々の培養液は 500 μl として 10 から 15 個の前核期胚を移して実験に供した。

以上の基礎条件を設定して、酸素濃度および SOD が初期胚に及ぼす影響を検討するために以下の実験を行なった。

実験 1 (表 1)

酸素濃度が胚発育に及ぼす影響を調べるために、高酸素濃度下培養 (大気中、酸素濃度 20%) および低酸素濃度下培養 (酸素濃度 5%) を行ない、前核期胚が胚盤胞に達した数を算定し胚盤胞率を比較した。さらに予想される酸素毒性が胚発育に及ぼす影響を評価するために、SOD (r-hSOD: 500 μg/ml) を基本培養液に加え、SOD 非添加群の胚盤胞率と比較した。各々の培養は 96 時間連続して行ない、胚の形態観察はノマルスキー微分干渉装置付倒立顕微鏡 (OLIMPUS, IMT-2) を用いた。

実験 2 (表 2)

SOD によるマウス 2-cell block 解除効果の用量-反応関係に、酸素が及ぼす影響を検討するために次の 3 群を設定し、それぞれの群に SOD を 0.05 μg/ml から 500 μg/ml まで種々の濃度を基本培養液に添加した。

① 高酸素濃度下培養群。

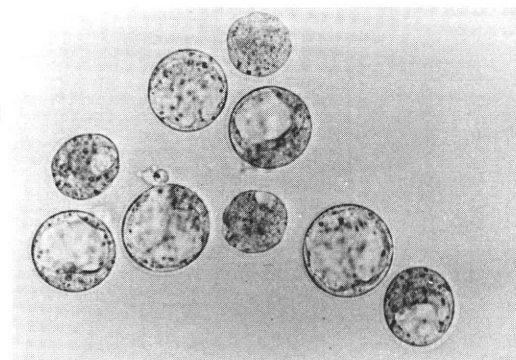


写真 2 SOD 添加低酸素濃度下培養で得られた hCG 114 時間後の胚盤胞。 *in vivo* から回収した胚盤胞と匹敵する健全な形態を示している。

② 低酸素濃度下培養群。

③ 一過性高酸素被曝群。短時間の高酸素 (酸素濃度 20%) 被曝の影響を知るために、高酸素濃度下で採卵培養を開始し、1 時間後より低酸素濃度下で培養した群。

なおいずれの培養も実験 1 と同様に連続して行ない、96 時間目に胚盤胞率を算定し比較検討した。

実験 3 (図 3)

酸素濃度がマウス前核期胚の発育効率に及ぼす影響を知るために、次の 3 群を設定し各々の胚発育効率を比較検討した。

① *in vivo* 群

② SOD 添加低酸素濃度下培養群。 (SOD: 500 μg/ml 添加)

③ EDTA 添加高酸素濃度下培養群。 (EDTA: 30 μM 添加)

同時刻に過排卵処理及び交配を行ない、膣栓を確認した雌を 3 群に分けた。①群は *in vivo* より hCG 後 72, 96 および 114 時間に各々卵管子宮灌流法により胚を回収し、胚発育の段階を形態学的に観察し分類した。②群は hCG 後 18 時間で前核期胚を採卵し、実験 1 で述べた手順で SOD 添加低酸素培養系に導入し、hCG 後 72, 96 および 114 時間に胚の形態を観察した。③群は、②群と同時に大気中で採卵し、マウス 2-cell block 解除効果が報告されている EDTA を添加して 5% CO₂ in air で連続培養後、②群と同時に胚を観察した。

5. 統計処理

各実験の結果は、χ² test を用い有意差検定した。

結 果

実験 1 (表 1)

高酸素濃度下培養の胚盤胞率は 1.3% (3/231)

で、TUCKで2-cell blockが成立することが確認された。低酸素濃度下培養の胚盤胞率は28.4% (57/201)と、高酸素濃度下培養の胚盤胞率と比べ有意に高値を示し、2-cell blockの解除効果が認められた ($P < 0.01$)。次にSOD添加高酸素濃度下培養の胚盤胞率は31.0% (35/113)で、低酸素濃度下培養と同程度の2-cell block解除効果を示した ($P < 0.01$)。SOD添加低酸素濃度下培養の胚盤胞率は75.2% (115/153)で、低酸素濃度下培養およびSOD添加高酸素濃度下培養の胚盤胞率よりも、さらに高い胚盤胞率が得られ、低酸素培養とSOD添加の相乗効果が確認された ($P < 0.01$)。

実験2 (表2)

高酸素濃度下培養群、低酸素濃度下培養群、および一過性高酸素被曝群の3群におけるSODの2-cell block解除効果を比べると、低酸素濃度下培養群における培養成績が最も良く、次いで一過性高酸素被曝群の成績が良好で、高酸素濃度下培養群が最も成績が悪かった。このことは、各々のSOD添加濃度における胚盤胞率にその傾向がみられ、特に500 $\mu\text{g/ml}$ のSODを添加培養した胚盤胞率(27.7%, 63.0%, 82.1%)に有意差が認められたことによる。また3群の胚盤胞率は対応する各々のSOD濃度においても、図3に示すような有意差があり、この結果は採卵後1時間でも高酸素に被曝すれば、胚に対し阻害的な影響があることを示している。

実験3 (図3)

hCG後72時間、96時間、114時間の各時刻におけるSOD添加低酸素濃度下培養群およびEDTA添加高酸素濃度下培養群の胚発育効率、各々の時刻に*in vivo*群より回収した胚の発育効率に比べて明らかな遅延を呈した。しかしSOD添加低酸素濃度下培養群とEDTA添加高酸素濃度下培養群を比較すると、各時刻ともSOD添加低酸素濃度下培養群の成績が良好であり、発育効率に有意差が認められた。これらのことは、hCG後114時間の胚盤胞率が顕著に現わしている。*in vivo*群は96.2% (50/52)、SOD添加低酸素濃度下培養群が77.3% (318/411)であったのに比べて、EDTA添加高酸素濃度下培養群では、わずか29.7% (31/105)と有意に低率であった。さらに形態学的に検討すると、EDTA添加高酸素濃度下培養群で得られた胚盤胞は、胚盤胞の形成に関与していない変性した割球が散見されたが、SOD添加低酸素濃度下培養群で得られた胚盤胞は、*in vivo*から回収した胚盤胞に匹敵する健全な形態を示した(写真2)。以上の結果より、SOD添加による胚発育促進効果は、EDTA添加によるその効果と比べて、著明

に有効であることが示された。

考 察

本研究では、低酸素濃度下培養およびSOD添加培養の結果から酸素毒性がマウス初期胚発育に対して有害な作用を及ぼしていることが実証された。

通常酸素毒性は細胞内において発生し、酸化酵素による触媒反応の中間体として発生する $\text{O}_2^{\cdot-}$ ²⁶⁻²⁸⁾を介して発現するものと考えられている。酵素反応の結果生成した $\text{O}_2^{\cdot-}$ は、SODによってdismutation¹⁸⁾され、以下の反応 $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ によって化酸化水素と酸素に転換される。さらに、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ が発生すると自動的またはSODによる不均化反応で H_2O_2 が発生し、*in vivo*では金属イオンを触媒として以下のHarder-Weiss反応²⁹⁻³²⁾ $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{O}_2 + \text{HO}\cdot$ により最も反応性の強い $\text{HO}\cdot$ が発生するとされており、その $\text{HO}\cdot$ によって脂質の過酸化が進行し細胞に障害を起こすと考えられている^{33,34)}。以上よりマウス2-cell blockの原因の1つとして、活性酸素による脂質の過酸化による細胞障害が考慮されるべきであろう。

一方マウス2-cell blockが、どのような機序で成立するのか未だ証明されていないが、胚発育停止を示した2細胞期胚のgenomeは4nであることか既に明らかにされている³⁵⁾。このことより受精後第1回の細胞周期のG2期以後に、割球分割不全等の問題が生ずると考えられる。しかし複雑な細胞内現象の解析は困難であり、2-cell blockの成立機序については完全な解答が与えられていない。僅かにGoddard³⁵⁾らによって“Culture induced block to development”であると述べられているにすぎない。

我々は既にSODを培養液に添加することにより、マウス2-cell blockが解除されることを報告し、SODのもつ触媒作用から考えて、マウス2-cell block成立の機序をsuperoxide等の活性酸素による酸素毒性との関連から推論してきた^{21,23)}。さらに松本らは、SODより作製したアポ蛋白を培養液に添加した場合にも、2-cell blockが解除されることを報告し、アポ蛋白が酵素活性を持たないことから、SODによる2-cell block解除が単にSODの酵素活性によるものではなく、ある種のgrowth promoting activityによる可能性をも示唆している²²⁾。

本研究では酸素毒性の観点から、低酸素濃度下培養及びSOD添加培養系を用いて、マウス初期胚発育に及ぼす影響を検討した。その結果、実験1にみられたごとく、低酸素濃度下培養で胚盤胞率が上昇し、とりわけSOD添加低酸素濃度下培養で、75%の胚盤

胞率を得ることができた。この高い胚盤胞率は SOD 添加高酸素濃度下培養と低酸素濃度下培養における胚盤胞率を合わせたよりも、著しく高値であったことより、マウス 2-cell block 解除および胚発育促進効果は、基本的には SOD の活性酸素不均化反応^{18,36)}によるものとしても、その他の機序の存在も否定できないのではないかと考えている。

実験 1 で、SOD 添加低酸素濃度下培養のマウス 2-cell block 解除および胚発育促進における相乗効果が明らかとなったので、次に SOD の用量-反応関係に各種酸素濃度が及ぼす影響を検討した。

表 2 にみよれるように SOD の効果は低酸素濃度下培養の成績が、他の 2 つの培養条件の成績よりもはるかに顕著であった。また SOD の濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で基本培養液の培養成績と有意に高い胚盤胞率が得られた。ここで注目すべきことは、20%酸素濃度に 1 時間被曝した後、低酸素濃度下培養に供した一過性高酸素被曝群は高酸素濃度下培養群の胚盤胞率よりも有意に高い結果が得られたが、低酸素濃度下培養群の胚盤胞率に比して低い傾向があったことである。この様に一過性であっても高酸素に被曝すれば、初期胚発育に大きな影響があることが明らかになった。

さらに胚発育効率に及ぼす影響を実験 3 で検討した。SOD 添加低酸素濃度下培養条件は、決して *in vivo* に匹敵するほど高い発育促進効果が得られたわけではなかった。しかし従来から 2-cell block 解除効果の報告がある EDTA を添加^{37,38)}した高酸素濃度下培養に比べると、明らかに良好な発育促進効果が得られた。なお予備実験で低酸素濃度下に EDTA を添加し同様に培養したが、高酸素濃度下培養成績との間には有意差が認められなかった。

以上の結果から考えて、SOD のマウス 2-cell block 解除効果および胚発育促進効果は、EDTA で想定されている 2 価金属の chelation による効果³⁷⁾や、EDTA 鉄複合体においてみられる O_2^- の scavenger としての効果³⁹⁾のみではなく、一種の growth promoting activity を介して作用する可能性も示唆されたが、今後、更なる検討が必要である。

本実験を含めこれまでに報告のみられるマウス 2-cell block 解除は EDTA および SOD を培養液中に添加することによるものであった。その他の方法として体細胞との共培養によるものが知られている。例えば、Gandorfi ら⁶⁾は羊卵管上皮を回収し羊前核期胚と共培養した場合、45.8%が胚盤胞に達したことを報告している。その他、牛では Eyestone^{40,41)}が、ブタでは Allen⁴²⁾、マウスでは Cole⁴³⁾、Sakkas⁴⁴⁾らが報

告している。これらの報告をみると 2 細胞期から 4 細胞期の胚には、卵管由来の体細胞との共培養により促進効果が得られ、8 細胞期以後の胚には子宮由来の体細胞との共培養で促進効果が得られている。このように体細胞との共培養によってみられる胚発育促進効果は stage specific であり、必ずしも SOD が関与する機序が働くとは考えられない。従って本論文で検討した EDTA あるいは SOD の胚発育促進効果以外に体細胞由来の胚発育促進因子が存在していることがうかがわれ、今後こういった体細胞由来の胚発育促進因子の解析も必要であろう。

本研究の結果から考えて、現在行なわれているヒト体外受精³⁾でより合理的な培養条件を確立するには、酸素毒性に対する配慮がもっと必要と思われる。但し SOD 添加低酸素濃度下培養をヒト体外受精に応用するには、これによって得られた胚が高い発育能を有し、移植により健全な産仔が得られることを動物実験で実証する必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、r-hSOD を提供して頂いた日本化薬株式会社に深謝致します。

本研究は文部省重点領域（生殖系列）および科研費一般研究 B（01480391）により補助を受けた。

文 献

- 1) Droesch, K., Jones, G. S. and Rosenwaks, Z. R.: Timing of oocyte retrieval in cycles with a spontaneous luteinizing hormone surge in a large *in vitro* fertilization program, *Fertil. Steril.* 50: 451, 1988
- 2) Edwaras, R. G., Steptoe, P. C. and Purdy, J. M.: Establishing full term pregnancies using cleaving embryos growth *in vitro*, *J. Obstet. Gynecol.* 87: 737, 1980
- 3) Jones, H. W. Jr., Jones, G. S. and Wright, G.: The program for *in vitro* fertilization at Norfolk, *Fertil. Steril.*, 38: 14, 1982
- 4) Scott, R. T., Oehninger, S. and Rosenwaks, Z.: Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of *in vitro* fertilization outcome, *Fertil. Steril.*, 51: 651, 1989
- 5) Wright, R. J. Jr. and Bondioli, K. B.: Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals, *J. Anim. Sci.*, 53: 702, 1981
- 6) Gandolfi, F. and Moor, R. M.: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells, *J. Reprod. Fertil.*, 81: 23, 1987
- 7) Davis, D. L. and Day, B. N.: Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*, *J.*

- Anim. Sci., 46: 1043, 1978
- 8) Whittingham, D. G.: Fertilization, early development and storage of mammalian ova *in vitro*; In The early development of mammals, Cambridge, U. K., 1, 1975
 - 9) Yanagimachi, R. and Chang, M. C.: *In vitro* fertilization of golden hamster ova, J. Exp. Zool., 156: 361, 1964
 - 10) Bishop, D. W.: Oxygen concentration in the rabbit genital tract, In Proceedings of the Third International Congress of Animal Reproduction, Section I, Cambridge, 53, 1956
 - 11) Maas, D. H. A., Storey, B. T. and Mastroianni, L. Jr.: Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), Fertil. Steril., 27: 1312, 1976
 - 12) Mastroianni, L. Jr. and Jones, R.: Oxygen tension within the rabbit fallopian tube, J. Reprod. Fertil., 9: 99, 1965
 - 13) Auerbach, S. and Brinster, R. L.: Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos, Nature, 217: 465, 1968
 - 14) Quinn, P. and Harlow, G. M.: The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*, J. Exp. Zool., 206: 73, 1978
 - 15) Tervit, H. R., Whittingham, D. G. and Rowson, E. A.: Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova, J. Reprod. Fertil., 30: 493, 1972
 - 16) Whitten, W. K.: Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*, In Advances in the Biosciences 6, Raspe, G., ed., Pergamon Press, 129, 1970
 - 17) Wright, R. W. Jr., Anderson, G. B., Cupps, P. T. and Drost, M.: Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage, Biol. Reprod., 14: 157, 1976
 - 18) Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutase, Accs. Chem. Res., 5: 321, 1972
 - 19) Kajihara, J., Enomoto, M., Seya, K., Sukehara, Y. and Katoh, I.: Physicochemical properties of charge isomers of recombinant human superoxide dismutase, J. Biochem., 104: 638, 1988
 - 20) McCord, J. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase, J. Biol. Chem., 244: 6049, 1969
 - 21) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutase によるマウス 2-cell block の解除, 日産婦会誌, 41: 751, 1989
 - 22) 松本 央, 野田洋一, 馬岡 陽, 辰巳賢一, 岸 淳二, 森 崇英: Superoxide Dismutase によるマウス 2-cell block の解除について, 哺乳動物卵子研究会誌, 6: 65, 1989
 - 23) 馬岡 陽, 野田洋一, 松本 央, 岸 淳二, 辰巳賢一, 森 崇英: 低酸素濃度培養系におけるマウス 2-cell ブロック解除について, 哺乳動物卵子研究会誌, 6: 67, 1989
 - 24) Brinster, R. L.: A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two cell to blastocyst, Exp. Cell. Res., 32: 205, 1963
 - 25) Bigger, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos *in vitro*, In Methods in mammalian embryology, Daniel, J. C. Jr. ed., Freeman Co., 86, 1971
 - 26) Fridovich, I. and Handler, P.: Detection of free radicals generated during enzymatic oxidations by the initiation of sulfite oxidation, J. Biol. Chem., 235: 1835, 1960
 - 27) 浅田浩二: スーパーオキシドとスーパーオキシドジスムターゼ, 代謝, 17: 1705, 1980
 - 28) 浅田浩二: 酸素毒性, 生化学, 48: 226, 1976
 - 29) Haber, F. and Weiss, J.: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, Proc. Roy. Soc. Lond. A., 147: 332, 1932
 - 30) McCord, J. M. and Day, E. D.: Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalysed by an iron • EDTA complex, FEBS Lett., 86: 139, 1978
 - 31) Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?, FEBS Lett., 92: 321, 1978
 - 32) Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system, FEBS Lett., 96: 238, 1978
 - 33) Ribarov, S. R. and Benov, L. C.: Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation, Biochim. Biophys. Acta, 640: 721, 1981
 - 34) Ding, A. and Chan, P. C.: Singlet oxygen in copper-catalyzed lipid peroxidation in erythrocyte membranes, Lipids, 19: 278, 1984
 - 35) Goddard, M. J. and Pratt, H. P. H.: Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the 2-cell block, J. Embryol. Exp. Morph., 73: 111, 1983
 - 36) McCord, J. M., Keele, B. B. Jr. and Fridovich, I.: An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 68: 1024, 1971
 - 37) Abramczuck, J., Solter, D. and Koprowski, H.:

- The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium, *Dev. Biol.*, 61: 378, 1977
- 38) Toyoda, Y., Azuma, S. and Takeda, S.: Effects of chelating agents on preimplantation development of mouse embryos fertilized *in vitro*, Development of preimplantation embryos and their environment, Alan R. Liss, Int., 171, 1989
 - 39) Halliwell, B.: The superoxide dismutase activity of iron complexes, *FEBS Letters*, 56: 34, 1975
 - 40) Eyestone, W. H., Vignieri, J. and First, N. L.: Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium, *Theriogenology*, 29: 387, 1987
 - 41) Eyestone, W. H. and First, N. L.: Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue, In *Brief Communications*, 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 470, 1988
 - 42) Allen, R. L. and Wright, R. W. Jr.: *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants, *J. Anim. Sci.*, 59: 1657, 1984
 - 43) Cole, E. A. and Paul, P.: Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them, In 'Preimplantation Stages in Pregnancy' Eds Wolstenholme, G. E. W. and Connor, M. O., 82, 1965
 - 44) Sakkas, D., Trounson, A. O. and Kola, I.: *In vivo* cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells, *Reprod. Fertil.*, 1: 127, 1989

The Effects of Oxygen Toxicity on Early Development of Mouse Embryo

Yoh Umaoka, Yoichi Noda,
Hisashi Matsumoto and Takahide Mori

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

To improve the culture condition for mammalian embryos, the effects of oxygen toxicity on embryo development were assessed using mouse embryos, a low oxygen culture system and human recombinant

superoxide dismutase (r-hSOD), a potent scavenger of oxygen radicals.

Mouse pronuclear embryos (TUCK; outbred) recovered 18hr after hCG injection were cultured in BWW medium supplemented with 0.3% bovine serum albumin (basic medium) at 37, 5%CO₂ in air (standard culture condition). By keeping the embryos under the mixed gas phase (5%O₂, 5%CO₂, 90%N₂, low oxygen culture) from recovery through culture, the effects of oxygen radicals on embryo development were assessed by comparing the blastocyst rate to that of the standard culture condition.

As the another modality for assessing the effects of oxygen radicals, r-hSOD was added to the culture and the resultant blastocyst rates were compared between low oxygen culture and standard culture condition. The culture efficiencies in these conditions were also evaluated by comparing the rate of embryos reaching the 8-cell stage or the blastocyst stage, 72-114 hr after hCG injection.

The results were as follows.

(1) At a low oxygen concentration, 28.4% of embryos reached the blastocyst stage when cultured in the basic medium, where as, by the addition of r-hSOD to the culture, 75.2% of embryos developed into the blastocyst stage. These results were significantly higher than those with the standard culture condition (1.3%) as examined by chi-square test.

(2) When pronuclear embryos were exposed to atmospheric oxygen concentration only for 1 hr, the growth rates from the pronuclear stage to the blastocyst stage were lowered significantly as compared to that of low oxygen culture.

(3) Seventy seven percent of embryos reached blastocyst stage when cultured under a low oxygen with r-hSOD, as judged at 114 hr after hCG injection. The culture efficiency thus obtained seemed highly effective, but it was not effective as compared to the rate of blastocyst *in vivo* (96.2% blastocyst rate at 114 hr). On the other hand, the culture efficiency under a low oxygen with r-hSOD was higher than that of standard culture condition added with EDTA that had been known to release 2-cell block phenomenon in mouse embryos.

These results suggest that the 2-cell block phenomenon in mouse embryos is involved in oxygen toxicity on the embryos treated in the atmosphere. These findings may have clinical importance in improving the success rates in IVF-ET program.

(受付: 1989 年 12 月 4 日特掲)

Superoxide Dismutase によるマウス 2-Cell block の解除

Release of Mouse 2-cell Block Phenomenon by Superoxide Disutase

京都大学医学部婦人科学産科学教室

松 本 央 野 田 洋 一 馬 岡 陽
Hisashi MATSUMOTO Yoichi NODA Yoh UMAOKA
森 崇 英
Takahide MORI

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

哺乳類初期発生に及ぼす酸素毒性の影響を明らかにするために、マウス胚の *in vitro* 培養を行ない、活性酸素の消去酵素である Superoxide dismutase (SOD) を培養液に加え、マウス 2-cell block に与える影響を検討した。

マウス前核期胚 (ICR または TUCK) を hCG 投与 18 時間後に回収し、BWW 培養液中 37°C, 5% CO₂ in air の条件下 (基本培養条件) で培養を行なった。その結果 5.7% の ICR 前核期胚が胚盤胞に達し、また TUCK 前核期胚を用いた場合は、0.5% の胚が胚盤胞に達した。このように基本培養条件下で *in vitro* 2-cell block が成立する事が明らかとなった。

遺伝子組換えによって得られたヒト CuZn 型 SOD (recombinant-human SOD: r-hSOD) を、培養液に添加した場合、SOD の濃度依存性に 2-cell block が解除され、0.5 mg/ml の濃度下で 44.6% の高い胚盤胞率が得られた。またウシ赤血球由来 CuZn 型 SOD、E. Coli 由来 Mn または Fe 型 SOD を培養液に加えた場合にも、いずれも高い胚盤胞率が得られ、ウシ CuZn 型 SOD では 63.5%, Mn 型 SOD では 33.8%, Fe 型 SOD では 51.0% であった。

さらに、いずれの SOD 標品を透析してもマウス 2-cell block 解除効果は消失せず、熱処理によってこの効果が失われた。

培養液に加えた SOD 標品に含まれるいかなる成分が、マウス 2-cell block 解除に関与するか検討するために、r-hSOD 存在下に抗 r-hSOD 抗体を添加して同様に培養を行なったところ、抗 r-hSOD 抗体を加えた場合に有意に胚盤胞率が低下した。

これらの事実から、O₂ の scavenger である SOD がマウス *in vitro* 2-cell block の解除に働く事が証明され、*in vitro* 胚発生阻止の現象の重要な原因として活性酸素による細胞障害が考えられる事が明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 293-299, 1990)

緒 言

着床前の哺乳類胚が *in vitro* で発育する場合 *in*

vitro におけるそれと比べてその発生が遅延することが一般に知られており^{1,2)}、げっ歯類においては、*in vitro* で培養された前核期胚において 2-cell block が

観察される事が知られている^{3,4)}。この現象は1957年にWhittenが報告⁵⁾して以来30年もの間知られていますが、この発育阻止の詳細な機構は今日に至るまで不明である。McLaren⁶⁾、Goddard⁷⁾の行なった交配実験や、Muggleton-Harrisら⁸⁾の行なった細胞質の移植実験あるいは、中村ら⁹⁾の行なった核移植実験の結果から考えると、2-cell blockの現象は細胞質中の要因によって左右されるもので、父親由来の遺伝子によって影響されるものでないことが既に明らかとなっている。更にBiggersら¹⁰⁾の報告によれば、マウス受精卵は器官培養中の卵管に移植する事によって、2-cell blockが解除され、*in vivo*におけると同様の発育率で胚盤胞に達する事が知られている。このような種々の報告を見ると*in vitro*において、マウス胚にみられる発育阻止現象の原因は、卵管液中のある種の要素の欠如か、あるいは卵管から胚に与えられる微小環境の欠如によって起こるものと考えるのが妥当であろう。なぜなら2-cell blockは、*in vivo*すなわち卵管中では生じないからである。

卵管によって胚に与えられる微小環境で*in vitro*において欠けているものは幾つも考えられるが、その主たるものは卵管上皮など体細胞の欠如と酸素濃度の差異であると考えることができる。その一つである酸素濃度についてのこれまでの報告を見ると、低酸素下胚培養により*in vitro*胚発育が促進される事が既に知られており、例えばAuerbachら¹¹⁾はマウス2細胞期胚を、Whitten¹²⁾はマウスF1前核期胚を、Tervitら¹³⁾はヒツジおよびウシ胚を、Wrightら¹⁴⁾はウシ胚を、Quinnら¹⁵⁾はマウスF1前核期胚をそれぞれ用いて低酸素下胚培養(5%酸素濃度)が高い胚盤胞率を与える事を報告している。更にMastroianniら¹⁶⁾によれば卵管内酸素濃度は約40-60 mmHgと報告され、この事は先に述べた*in vitro*における低酸素下胚培養が良好な結果をもたらすとの報告とよく一致している。本研究班では、既に培養液にSOD標品を添加することによってマウス2-cell blockが解除されることを発見し報告(野田ら¹⁷⁾)している。そこで本研究では、哺乳類胚の培養条件改善を目的として酸素毒性がマウス胚発育に与える影響をSuper-oxide Radicalの強力なScavengerであるSODおよび抗SOD抗体を用いて詳細に検討した。

方 法

1. 化学薬品および酵素標品

本研究では化学薬品はすべて試薬特級を用いた。EDTAは半井化学、ウシ血清アルブミン(BSA)はSigma社より、それぞれ購入しさらなる精製を行な

わずそのまま使用した。SOD標品はSigma社の製品で、ウシ赤血球由来CuZn-SOD^{18,19)}、E. Coli由来Mn-SOD²⁰⁾およびE. Coli由来Fe-SOD²¹⁾を実験に用いた。更に、遺伝子組換えによって得られたヒト型CuZn-SOD(r-hSOD、梶原ら²²⁾)は、日本化薬株式会社より提供していただいた。これらのSOD標品を使用前に蒸留水に対して十分に透析し凍結乾燥の後実験に供した。

2. 前核期胚の回収と培養条件

マウス胚培養は基本的にBiggersら²³⁾の方法による。TUCKまたはICR雌マウス(5-8週令)にPMSG(5 IU)-hCG(5 IU)による過排卵処置を行ない、hCG18時間後の前核期胚を回収した。4-well multidish(Nunc社)中に、0.6% BSA添加600 μ lのBWWを調整しこれに10-15個の胚を導入し培養を行なった(基本培養条件)。本研究に用いられた水標品はミリQシステムにより調整されたものを更に再蒸留して用いた。胚培養は37°C、5% CO₂ in airで行ない、5日間継続した。

培養効率および胚発育促進効果の判定は、基本培養条件下にEDTAまたはSOD標品を加え、その後各ステージに発育する胚の割合をもって評価した。その際の培養液中の蛋白濃度は全ての実験条件下で、6 mg/mlになるように調整した。また、得られた胚の形態学的評価を行ない、観察は倒立型顕微鏡にて行なった。

3. 抗r-hSOD抗血清の調整とIgG分画の抽出

抗r-hSOD抗血清を作製するに当り、免疫原をフロインド完全アジュバントと共に雌ウサギの足底部に2週間間隔で3回免疫し、最終日より1週間後に採血した。得られた抗血清は免疫原と単一の沈降線を形成し(オクタロニー法²⁴⁾)、BSAまたはE. Coli抽出物との間には沈降線は形成されなかった。IgG分画を非免疫家兎および免疫家兎血清よりプロテインAセファロース4Bカラム法(Duhamelら²⁵⁾)により回収し、透析の後凍結乾燥を行ない、その後実験に供した。

4. 抗r-hSOD抗体添加実験

IgG分画10 mg/mlを含むBWW75 μ lを培養液に加え終量600 μ l、蛋白終濃度6 mg/mlになるように調整した。この培養条件の設定は培養開始12時間前に行なったが、培養開始前には抗血清由来IgGを加えた培養スポットでは白色沈澱物が形成されたが、正常家兎由来IgG分画を加えたスポットでは認められなかった。この様に調整した培養スポットに前核期胚を導入し、胚盤胞に達した胚数を培養96時間および120時間後に計数した。

表 1 基本培養条件および EDTA 添加培養における胚発生効率

		No. of Experiment	No. of embryos employed	No. of embryos obtained		
				2-cell (%)	4-cell (%)	blastocyst (%)
I	ICR ^{a)}	17	259	237 (91.5)	85 (32.8)	15 (5.7)
	ICR+EDTA ^{b)}	4	71	67 (94.4)	35 (49.3)	22 (31.0)**
II	TUCK ^{a)}	15	242	222 (91.7)	60 (24.7)	1 (0.5)
	TUCK+EDTA ^{b)}	4	64	57 (89.1)	36 (56.3)	13 (20.3)**

a) 基本培養条件

** : P < 0.01

b) EDTA (30 μ M) 添加培養表 2 *in vitro* 胚発生におよぼす SOD 促進効果

	Culture condition	No. of Experiment	No. of embryos employed	No. of embryos obtained		
				2-cell (%)	4-cell (%)	blastocyst (%)
I	BWW ^{a)}	5	105	94 (89.5)	51 (48.6)	5 (4.8)
	BWW+r-hSOD					
	0.125mg/ml	5	74	72 (97.3)	52 (70.3)	14 (18.9)**
	0.25 mg/ml	5	62	56 (90.3)	42 (67.7)	22 (35.5)**
	0.5 mg/ml	5	92	87 (94.6)	72 (78.3)	41 (44.6)**
	1.0 mg/ml	5	96	85 (88.5)	58 (60.4)	37 (38.5)**
	2.0 mg/ml	5	83	81 (97.6)	63 (75.9)	34 (41.0)**
	4.0 mg/ml	5	140	124 (88.6)	84 (60.0)	39 (27.9)**
II	BWW	3	68	66 (97.1)	33 (48.5)	6 (8.8)
	BWW					
	+Cu•Zn-SOD ^{b)}	3	63	62 (98.4)	56 (88.9)	40 (63.5)**
	+Mn-SOD ^{c)}	3	65	62 (95.4)	52 (80.0)	22 (33.8)**
	+Fe-SOD ^{d)}	3	57	56 (98.2)	49 (86.0)	29 (51.0)**

a) 基本培養条件

** : P < 0.01

b) ウシ赤血球由来 (6100U/ml)

c) E. coli 由来 (6100U/ml)

d) E. coli 由来 (6100U/ml)

5. SOD 標品の熱処理

熱処理による影響を検討するため SOD 標品を蒸留水に溶解せしめた後、沸騰水浴中で 3 分間処理した。その際生じた変性蛋白は可及的に粉碎し浮遊液を作った後、2 倍濃度に調整した培養液を加えて培養スポットを作製した。

以上 2 から 5 の各項に述べたいずれの実験においても、対照実験（基本培養条件）と実験群（SOD 添加培養）は同時に行ない、それぞれの実験条件は少なくとも 3 回以上繰り返した。

また効果判定はそれぞれの実験条件における胚盤胞率を基本培養条件における胚盤胞率と比較し、 χ^2 test で有意差を検定した。

6. 卵管液の回収と SOD 活性

ニュージーランド白ウサギの卵管峡部および采部に卵管結紮を施行し、結紮後家兎 1 羽当たり 1000 IU の

hCG を投与した。hCG 投与 24 時間後に卵管膨大部に貯溜している無色透明な卵管液を注射器にて回収した。この様にして回収された卵管液を、3000 G、15 分間遠心し濾過した後、electron spin resonance 法 (ESR 法²⁶⁾) による SOD 活性の測定を行なった。なお spin trapper としては、5,5-methyl-1-prolin-n-oxide (DMPO) を用いた。同時にそれぞれ家兎より血清標品を回収し SOD 活性を測定した。蛋白定量は Lowry ら²⁷⁾の方法によった。

結 果

まず最初に基本培養条件下における ICR および TUCK より回収した前核期胚 (写真 1) の培養効率を調べた (表 1)。両系統のマウスともおよそ 70 % の前核期胚が 2 細胞期で発生を停止し、ICR および TUCK において、それぞれ 5.7 % および 0.5 % の胚

表3 SOD 添加培養による 2-cell block 解除効果に与える抗 SOD 抗体の影響

	Culture condition	No. of Experiment	No. of embryos employed	No. of embryos obtained		
				2-cell (%)	4-cell (%)	blastocyst (%)
I	BWW	5	108	107 (99.0)	56 (51.8)	8 (7.4)
II	BWW + r-hSOD 0.5mg/dl	5	104	101 (97.1)	88 (84.6)	63.5)
III	BWW + r-hSOD 0.5mg/dl + NRS-IgG 1.25mg/ml	4	88	86 (97.7)	77 (87.5)	57 (64.8)**
IV	BWW + r-hSOD 0.5mg/ml + $\bar{\alpha}$ -SOD-IgG 1.25mg/ml	5	125	118 (94.4)	70 (56.0)	23 (18.4)
V	BWW + + $\bar{\alpha}$ -SOD-IgG	5	93	91 (97.8)	53 (57.0)	3 (3.2)
VI	BWW + r-hSOD 2mg/ml + head treatment	3	48	42 (87.5)	12 (25.0)	1 (2.1)

** : P < 0.01, Significantly different as compared to the standard culture condition (I) and also to the culture with $\bar{\alpha}$ -SOD-IgG (IV).



写真1 : hCG 後 18 時間に回収した前核期胚

が胚盤胞に達した。

表1の実験Iおよび実験IIにおいて示されるように、EDTAを培養液中に添加した場合に有意に高い4細胞及び胚盤胞率がそれぞれの系統のマウスで得られた。この様に既にAbramuzukら²⁸⁾によって知られているEDTAによる2-cell block解除効果も再現できたので、我々が設定した基本培養条件はSODの効果判定するのに適当であると考えられた。

次にCuZn-SOD (r-hSOD)を、種々の濃度で培養液に加えマウス前核期胚発育に与える効果を検討した(表2)。著明な胚盤胞率の上昇が観察された。それは濃度依存性であって0.5 mg/mlの濃度で最高の胚盤胞率44.6%が得られた(表2実験I、写真2)。

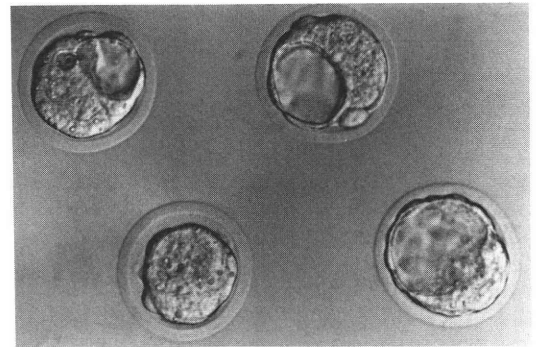


写真2 : SOD 添加培養で得られた胚盤胞

同様の結果がウシ赤血球由来のCuZn-SODとE. Coli由来のMn-SODまたはFe-SODを培養液に加えた場合にも観察された。すなわち63.5% (CuZn-SOD)、33.8% (Mn-SOD)、および51.0% (Fe-SOD)の胚盤胞率がそれぞれ得られた(表2実験II)。培養液に加えたSOD標品に含まれているもののうち、如何なる分子種がここに観察された2-cell block解除効果にあずかっているのかを同定するために、正常家兔(NRS-IgG)および免疫家兔($\bar{\alpha}$ SOD-IgG)より回収したIgG分画を培養液に添加した(表3)。

表3実験IIのごとく0.5 mg/mlのSOD存在下に、63.5%の胚盤胞率が得られた。1.25 mg/mlのNRS-IgGを更に加えた場合(実験III)でも、64.8%の胚

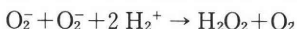
盤胞率が得られた。しかし、NRS-IgG の代わりに、 α SOD-IgG を加えた場合には、胚盤胞率は 18.4 % と有意に低下した(表 3 実験IV)。この際 α SOD-IgG のみを基本培養液に加えた場合には、基本培養条件と同程度の胚盤胞率が得られた(表 3 実験V)、なお SOD 標品を熱処理した場合には、基本培養条件における同程度の胚盤胞率が得られた(表 3 実験VI)。SOD 添加の培養条件下得られた胚盤胞の形態は正常と判定された(写真 2)。

8 羽のウサギから得られた卵管液標品は、透明で溶血は認められなかった。ESR 法による SOD 活性の測定は明らかに卵管液中の SOD 活性の存在を示し、その活性は 2617 ± 1171 mU/mg 蛋白 (mean $\pm$ SD) であり、血清中の SOD 活性 599 ± 199 mU/mg 蛋白 (mean $\pm$ SD) より 4.4 倍高値であった。

考 察

本研究において基本培養条件下および SOD 添加培養条件下における胚盤胞率を比較する事によって、SOD の 2-cell block 解除効果が、明らかに示された。基本培養条件下における安定した、そして再現性のある胚盤胞率、異なった出発材料から精製された 3 種類の SOD がいずれも 2-cell block 現象に対して同様の生物作用をもっていた事、この SOD の生物活性は透析によっては消失せず、熱処理または培養液中へ α -SOD-IgG を加える事によって、著明に阻害された事などを考慮すると、本研究で観察された SOD 標品の 2-cell block 現象に対する効果は、SOD 標品に含まれている未知の物質によるものでなく、SOD そのものによると考えられる。

Superoxide dismutase¹⁹⁾は、Superoxide radical を以下のごとく不均化し、酵素反応の特異性は極めて高いものとして知られている。



この酵素は好気代謝を行なう生物においてあまねく存在する事が既に知られており²⁹⁾、酵素毒性に対する防御機構において重要な役割を演じているものとされている。このような酵素反応および生物作用の特異性を考慮すると、本研究で観察されたマウス胚に対する SOD の生物効果は培養液中や胚の内部で産生された Superoxide radical が消去される事によると考える事が自然であろう。その際、添加された酵素は胚の細胞膜表面のごく近く、または割球の内側に取り込まれて作用すると考えられる。なぜなら SOD に加えて α -SOD-IgG を添加した場合、培養液中で免疫沈降物が形成されるが、その際生じた免疫沈降物の中でなお SOD の酵素活性が作用しているにも関わ

らず³⁰⁾、2-cell block が解除されなくなるからである。

これまで既に低酸素下胚培養が種々の哺乳類胚発生に促進的影響を与える事が報告されている。例えば Auerbach ら¹¹⁾は、マウス 2 細胞期胚を培養し、Whitten¹²⁾あるいは Quinn ら¹⁵⁾は、マウス胚 F1 前核期胚を培養し、Tervit ら¹³⁾はおよび Wright ら¹⁴⁾はヒツジやウシの 1 細胞期あるいは 8 細胞期胚を低酸素下で培養し良好な胚盤胞率を得られたとしている。しかしこれらのいずれの報告も低酸素下培養によって得られる胚発育促進効果が酸素毒性を介した細胞の障害の軽減という概念を用いて説明しておらず、また *in vitro* 胚発生停止の現象を酸素毒性の観点から議論しているものもない。マウス胚における *in vitro* 胚発生阻止の現象自体は、長年の研究課題であった。Goddard ら⁷⁾は、2 細胞期で発育阻止されたマウス胚を用いて 2-cell block の現象を詳細に検討し、この現象は培養によって誘起された細胞質の欠陥であると結論づけている。しかしこの欠陥の性質や生ずる原因は今尚明らかにされていない。Abramczuk ら²⁸⁾はマウス 2-cell block 現象に対する EDTA のもつ解除効果を報告し、その中でこの効果は Ca や Mg 以外の金属イオンをキレートする事によるものであると述べている。また最近 Loutradis ら³¹⁾はマウス胚における発育阻止に hypoxanthin が関与している事を報告している。このように多くの学者たちが、*in vitro* 胚発生の停止について多くの観点から解析を加えているが、この *in vitro* 胚発生停止の概念を一つの仮設で提唱したものはない。しかし、先に挙げた低酸素下胚培養が哺乳類胚発生に良い影響を与える報告^{11~15)}、本研究で示された SOD のもつ 2-cell block 解除効果および卵管液中の酸素濃度が 40-60 mmHg と低値(約 5 % 酸素濃度)であるという報告¹⁶⁾や本研究で示された卵管液中の SOD 活性の存在などを考慮すると、*in vitro* で観察されるマウス 2-cell block の現象が、 O_2 を介した細胞障害の結果であると推論する事は充分可能である。

最近 Iannaccone ら³²⁾は、マウス胚盤胞を回収しマウス肝由来 microsome 分画と供培養した場合、マウス胚盤胞が *in vitro* で障害を受けること、そしてそれが SOD 添加によって保護される事を報告しており、この際観察された細胞障害が肝 microsome により産生される O_2 によるものと推論している。また Pabon ら³³⁾はマウス F1 前核期胚を回収し、大気中に 1 時間暴露する事によって胚発生が阻害される事を、低酸素下培養における成績と比較して報告している。

マウスを初めとする哺乳類初期胚に観察される *in vitro* 胚発育停止の現象はおそらく複雑な一連の細胞

内現象の結果であり、単に活性酸素による細胞障害の結果であると片づける事はできないが、しかしここで観察された SOD のもつ胚発生促進効果が顕著であったがゆえに、またこれまで積み上げられた諸家の報告などを考慮して、今後 *in vitro* 胚培養条件の改善の観点から O_2 を中心とした活性酸素による細胞障害から胚を保護する事を考慮する事が肝要であろうと思われる。

謝 辞

本研究を施行するにあたり、r-hSOD および抗 r-hSOD 血清を提供していただいた日本化薬株式会社に深謝いたします。本研究は文部省重点領域（生殖系列）および科研費一般研究 B（01480391）により補助を受けた。

文 献

- 1) Davis, D. and Day, B. N.: Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*, J. Anim. Sci., 46: 1043, 1978
- 2) Wright, R. J. Jr. and Bondioli, K. R.: Aspects of *in vitro* fertilization and embryoculture in domestic animals, J. Anim., 53: 702, 1981
- 3) Yanagimachi, R. and Chang, M. C.: *In vitro* fertilization of golden hamster ova, J. Exp. Zool., 156: 361, 1964
- 4) Whittingham, D. G.: Fertilizin, early development and storage of mammalian ova *in vitro*, in The early development of mammals, Balls, M. and Wild, A. E. ed. Cambridge University Press, 1, 1975
- 5) Whitten, W. K.: Nutrient requirement for the culture of preimplantation embryos *in vitro*, In Advances in the Biosciences 6, Raspe, G. ed., Pergamon Press, 129, 1971
- 6) McLaren, A.: Analysis of maternal effects on development in mammals, J. Reprod. Fertil., 62: 591, 1981
- 7) Goddard, M. J. and Pratt, H. P. M.: Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the 2-cell block, J. Embryol. Exp. Morph., 73: 111, 1983
- 8) Muggleton-Harris, A. L., Whittingham, D. G. and Wilson, L.: Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse, Nature, 299: 460, 1982
- 9) Nakamura, K., Tsunoda, Y. and Sugie, T.: An analysis of *in vitro* 2-cell block by using nuclear transplantation technique, Teratology, 34: 443, 1986
- 10) Biggers, J. D., Gwatkin, R. B. L. and Brinster, R. L.: Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium, Nature, 194: 747, 1962
- 11) Auerbach, S. and Brinster, R. L.: Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos, Nature, 217: 465, 1968
- 12) Witten, W. K.: Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*, In Advances in the Biosciences 6, Raspe, G. ed., Pergamon Press, 129, 1970
- 13) Tervit, H. R., Whittingham, D. G. and Rowson, L. E. A.: Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova, J. Reprod. Fertil., 30: 493, 1972
- 14) Wright, R. W. Jr., Anderson, G. B., Cupps, P. T. and Drost, M.: Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage, Biol. Reprod., 14: 157, 1976
- 15) Quinn, P. and Harlow, G. M.: The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*, J. Exp. Zool., 206: 73, 1978
- 16) Mastroianni, L. Jr. and Jones, R.: Oxygen tension in the rabbit fallopian tube, J. Reprod. Fertil., 9: 99, 1965
- 17) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutase によるマウス 2-cell block の解除, 日産婦会誌, 41: 751, 1989
- 18) McCord, J. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase, J. Biol. Chem., 244: 6049, 1969
- 19) Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutase, Accs. Chem. Res., 5: 321, 1972
- 20) Keele, B. B. Jr., McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase from Escherichia coli B, J. Biol. Chem., 245: 6176, 1970
- 21) Yost, F. J. and Fridovich, I.: An iron-containing superoxide dismutase from Escherichia coli, J. Biol. Chem., 248: 4905, 1973
- 22) Kajihara, J., Enomoto, M., Seya, K., Sukehara, Y. and Katoh, I.: Physicochemical properties of charge isomers of recombinant human superoxide dismutase, J. Biochem., 104: 638, 1988
- 23) Biggers, L. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos *in vitro*, In Methods in mammalian embryology, Daniel, J. C. ed., Freeman Co., 86, 1971
- 24) Ouchterlony, O. and Nilsson, L. A.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, In Handbook of experimental immunology, Weir, D. M. ed., Black well Scientific Publication, 19., 1, 1978
- 25) Duhamel, R. C., Schur, P. H., Brendel, K. and Neezar, E.: PH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose, J. Immunol. Methods., 31: 211, 1979
- 26) Kohno, M. and Mitsuda, K.: Measurement of superoxide dismutase activity in the serum by electron spin resonance, In Proceedings of the

- 9th Symposium of Magnetic Resonance in Medicine, Sendai, May, 1987
- 27) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randal, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951
 - 28) Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowsky, A.: The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium, *Dev. Biol.*, 61: 378, 1977
 - 29) McCord, J. M., Keel, B. B. and Fridovich, I.: An enzyme-based theory of obligate anoerabiosis: The physiological function of superoxide dismutase, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 68: 1024, 1971
 - 30) Kajihara, J.: Personal communication, 1988
 - 31) Loutradis, D., John, D. and Kissling, A. O.: Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos, *Biol. Reprod.*, 37: 311, 1987
 - 32) Iannaccone, P. M.: Microsomal mediated embryo toxicity due to superoxide radicals, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 6: 237, 1986
 - 33) Pabon, W. E., Findley, W. E. and Gibbons, W. E.: The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development, *Fertil. Steril.*, 51: 896, 1989

Dissolution of mouse 2-cell block phenomenon by superoxide disutase

Hisashi Matsumoto, Yoichi Noda,
Yoh Umaoka and Takahide Mori

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

To improve the culture conditions for mammalian embryos, the effect of oxygen toxicity on embryo development was assessed by the use of superoxide dismutase (SOD), a potent scavenger of superoxide radicals, and mouse embryos cultured *in vitro*.

Mouse (ICR and TUCK) pronuclear embryos recovered at 17 h after hCG were subjected for culture in BWW, at 37°C, 5%CO₂ in air.

By the addition of SOD to the culture medium, *in vitro* 2-cell block in the mouse was found to be markedly attenuated. Culture of pronuclear stage embryos in the presence of Cu Zn-SOD (500μg/ml) increased the blastocyst rate significantly (44.6%) compared to the standard culture (4.8%). Essentially the same effects were observed with SOD containing Mn or Fe in the catalytic center. Heat treatment of the SOD preparation, and the addition of anti-SOD antibodies to the culture medium, significantly reduced the 2-cell block releasing effect of SOD, which indicates that this effect in SOD is dependent. On the other hand, SOD activity was detected in rabbit oviduct fluid (2627±1171mIU/mg) by the electron spin resonance method.

These results suggest that the 2-cell block phenomenon in mouse embryos is involved in the toxicity of oxygen on the embryos treated in air, and that SOD may play a crucial role in the oviduct for protecting the embryos from oxygen radicals.

(受付: 1989年12月4日特掲)

マウスの偽妊娠誘起法が 胚盤胞の移植に及ぼす影響

Effect of Pesudopregnancy Induction on Transplantation of the Fertilized Mouse Ova

麻布大学獣医学部衛生学第二教室

井原 晴喜 福安 嗣昭 芦田 淨美
Haruki IHARA Tsuguaki FUKUYASU Kiyomi ASHIDA

Department of Animal Health II
School of Veterinary Medicine, Azabu University,
Sagamihara 229, Japan
(Director; Prof. K. Ashida)

メスマウスに精管結紮オスマウス交尾刺激 (I 群), 電気刺激 (II 群) およびレセルピン処理 (III 群) をおこなって偽妊娠を誘起させ, 胚盤胞の着床に与える影響を調べた。

I, II 群マウスでは全例に, III 群では 70 % に偽妊娠が誘起された。偽妊娠持続期間は I 群マウスが最も長く, 平均 10.2 ± 2.25 日, II 群で 6.8 ± 2.25 日, III 群では 5.1 ± 1.07 日であった。偽妊娠誘起法の違いによる胚盤胞の着床率は I 群マウスで 30 %, II 群 6 %, III 群 0 % であった。I 群と他の 2 群との間には有意差が認められた。移植胚盤胞数の違いによる平均着床率は 2 個移植で 20 %, 6 個移植で 30 %, 10 個移植で 18 % であった。これらの平均着床率の間に有意差は認められなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 300-305, 1990)

緒 言

畜産の分野では, 家畜の品種改良や優れた遺伝形質を持つ雌畜から多数の子畜を生産することを目的として, 受精卵の移植技術の開発が進められている。また, 実験動物における受精卵の移植は, 畜産上の基礎的研究のみならず遺伝学, 発生学, 生殖生理学あるいは免疫学などの多岐にわたる諸問題を究明する手段として, それぞれの分野で応用されている¹⁰⁾。受精卵移植を成功させるためには, ドナー (卵子供給者) とレシピエント (卵子受容者) の時間的適合およびレシピエントの黄体相の成立が不可欠である。牛, 山羊, 綿羊, 馬などの多くの家畜は, 完全性周期型であるため黄体相の成立を考慮することはあまり必要でない。しかし, マウスおよびラットなど黄体相の欠落した不完全性周期型の動物をレシピエントにする場合, 移植に先立ち偽妊娠を誘起し, 内分

泌機能を活性化させ機能黄体相を成立させることが不可欠である¹⁴⁾。

一般的に雌マウスの偽妊娠を誘起するためには, 精管を結紮した雄マウスと交配する方法がある^{6,7,18)}。さらに, その他偽妊娠を誘起する方法として, 電気刺激, ガラス棒, 膣タンポン, バイブレーターおよび子宮の穿刺などで子宮頸部を物理的に刺激する方法^{6,7,8,9,13,17,18,20)}, やヒスタミン, レセルピン^{2,10,12,20)}などの薬物の投与, エストロジェンやプロジェステロンなどの性ステロイドホルモン投与, プロラクチンの投与, 乳頭部の刺激および脳内の一定部位を電気刺激する方法⁹⁾が知られている。

そこで, 偽妊娠マウスに胚盤胞を移植した場合, 偽妊娠の誘起法の違いが胚盤胞の着床にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために, 偽妊娠の誘起法として精管結紮雄マウスの交尾刺激, 電気刺激およびレセルピン処理を用い, これら誘起法の違い

による偽妊娠誘起の有無、その持続期間および移植胚盤胞の着床率について検討した。

材料と方法

供試動物：供試した動物は、JCL: ICR 系マウスで、成熟雌マウス（約8～11週齢，体重約28g～35g，日本クレア）と雄マウス（約5ヶ月齢，体重約35g，日本クレア）を用いた。雌マウスはすべて、1日1回午前9時の膣垢検査により、4～5日の性周期律動性が認められた個体のみを試験に用いた。また、雄マウスは交配あるいは偽妊娠を誘起するために精管結紮手術を行い供試した。

性周期像の判定法：性周期像の判定は膣垢塗抹標本検査法によった。すなわちスライドガラス上の膣垢洗浄液をアルコール火炎で乾燥固定し、ギムザ染色した後、光学顕微鏡下（100倍）で鏡検した。膣垢標本は発情前期（多数の小円形有核細胞を主体とし白血球を欠くもの）、発情期（角化細胞だけで構成され白血球を欠くもの）、発情後期（角化細胞、白血球および少数の有核細胞を混在するもの）および発情休止期（白血球が主体を占め多数の粘液と少数有核細胞および角化細胞が混在するもの）に判別した。

レシピエントマウスの作出法：偽妊娠マウスは、精管結紮雄マウスの交尾刺激、電気刺激およびレセルピン処理の3方法により作出し、それぞれ偽妊娠3日目のマウスを胚盤胞移植のためのレシピエントとして実験に用いた^{5,9)}。これらのレシピエントマウスは、未経産マウスと一部雄マウスと交配し1回分娩した経産マウスを用いた。

精管結紮雄マウス交尾刺激法：午前9時の膣垢検査で発情前期を示した雌マウスと精管結紮雄マウスを午後7時に同居させ、翌日午前9時に膣栓が確認されたものを精管結紮雄マウス交尾刺激による偽妊娠マウスとした。さらにこの日を偽妊娠1日目とし、偽妊娠1日目から発情回帰日までを偽妊娠期間とした^{1,7,21)}。

レセルピン処理法：結晶レセルピン（半井化学薬品）を用い、その1.5mgをジメチルスルホキシド7.5mlに溶解した後、滅菌蒸留水7.5mlを加え、レセルピン溶液（0.1mg/ml）を調整した。膣垢検査により発情後期を示した雌マウスの皮下にレセルピン溶液を体重kgあたり1mgの割合で注射した²⁾。レセルピン投与した前日を偽妊娠1日目とし、発情回帰日までを偽妊娠期間とした。

電気刺激法：膣垢検査により発情前期を示しその翌日発情期を示したマウスに、発情前期当日の午後5時と発情期当日の午前10時の2回それぞれ

電極を装着したガラス棒を膣内に挿入し、10Vの交流電流を10秒間隔で継続的に3回子宮頸管を電気刺激した。さらに電気刺激後膣内に生理食塩水をしみこませた膣タンポンを挿入した。また、2回目の電気刺激を行った日を偽妊娠1日目とし、発情回帰日までを偽妊娠期間とした^{13,17,18,21)}。

ドナーマウスの作出と胚盤胞の採取法：膣垢像で発情前期を示した雌マウスと正常雄マウスを1晩同居させ、翌日膣栓および膣垢内の精子の存在により交尾を確認した。この日を妊娠1日目とし、妊娠4日目のマウスをドナーとした^{5,10)}。ドナーマウスを正午から午後2時の間に、エーテル吸入法により殺し、ただちに摘出子宮灌流法によって胚盤胞を採取した^{1,9,16)}。すなわちドナーマウスの下腹部を正中切開後、子宮を露出し子宮頸管の上端部から子宮卵管接合部までを切り取り、滅菌キャピラリー（先端内径約1mm）で約0.5～1.0mlのPB₁液¹⁾を灌流液（37℃）として子宮頸管側の断端から静かに注入し、その灌流液とともに胚盤胞を時計皿上へ採取した。採取した胚盤胞は、双眼実体顕微鏡および倒立顕微鏡（40倍）下で観察し、形態的に異常の認められなかったものを37℃に保った加温板上の時計皿に移して移植に供した。

胚盤胞の移植法：胚盤胞の移植は、子宮内移植法により行った^{1,9,16)}。すなわち、各偽妊娠処理したレシピエントマウスの腹腔内にネプタール注射液（ラボットラボラトリーズ製、50mg/ml）をそれぞれ40mg/Kg投与して全身麻酔し、両腹側部を約5～7mm切開した。卵巣の黄体の有無を観察し偽妊娠状態にあることを確認した後、子宮卵管接合部側の左右子宮角にそれぞれ1～5個の胚盤胞を約0.5μl容量のPB₁液とともに、滅菌済みのマイクロリシンジ（10μl, KROHEN）を用いて静かに注入した。胚盤胞注入した子宮角はただちに腹腔内に戻し、速やかに切開部を縫合し、移植後のレシピエントマウスは個別ケージで飼育した。

剖検：胚盤胞の移植7日後、レシピエントマウスをエーテル麻酔法により殺し、マウスの下腹部を正中切開後、左右の卵巣、卵管および子宮を摘出した。胚盤胞の着床の有無は子宮内の胎児確認により判定した。また、卵巣の黄体数の確認と同時に肉眼的にそれぞれの生殖器の観察を行った。

成 績

マウスにおいて胚盤胞を移植する際のレシピエントマウスの偽妊娠の誘起法の違いが胚盤胞の着床にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、

Table 1 Pseudopregnancy induction and the duration on the mouse with copulatory stimulus, electro-stimulus and reserpine injection for pseudopregnancy induction

Methods of pseudo-pregnancy induction	No. of tested	No. of positive pseudopregnancy (%)	Duration of induced pseudopregnancy (days $\pm$ SE)
Copulatory stimulus ¹⁾	10	10 (100)	10.2 $\pm$ 2.25*
Electro-stimulus	10	10 (100)	6.8 $\pm$ 2.25
Reserpine injection	10	7 (70)	5.1 $\pm$ 1.07

1) Copulatory stimulus were used male mouse with deferent duct ligated.

* : There is a significant difference at the level of 5% by one way variance analysis.

Table 2 Implantation of the fertilized ova on the mouse with copulatory stimulus, electro-stimulus and reserpine injection for pseudopregnancy induction

Methods of pseudo-pregnancy induction	Mouse number	No. of implantated		blastocyst ¹⁾ Total (%)	No. of corpus luteum		
		Left	Right		Left	Right	Total
Copulatory stimulus ²⁾	1	1	3	4	7	6	13
	2	3	0	3	7	7	14
	3	2	0	2	5	6	11
	4	0	0	0	7	6	13
	5	0	0	0	5	5	10
	Total	6	3	9(30)*	31	30	61
	Average	1.2	0.6	1.8	6.2	6.0	12.2
Electro-stimulus	1	0	0	0	5	6	11
	2	2	0	2	6	6	12
	3	0	0	0	6	5	11
	4	0	0	0	7	6	13
	5	0	0	0	5	5	10
	Total	2	0	2(6)	29	28	57
	Average	0.4	0	0.4	5.8	5.6	11.4
Reserpine injection	1	0	0	0	6	5	11
	2	0	0	0	7	5	12
	3	0	0	0	6	7	13
	4	0	0	0	5	6	11
	5	0	0	0	5	5	10
	Total	0	0	0(0)	29	28	57
	Average	0	0	0	5.8	5.6	11.4

1) Three fertilized ova were transplanted to left and right uterine horn of each mouse.

2) Copulatory stimulus were used male mouse with deferent duct ligated.

* : There is a significant difference at the level of 5% by χ^2 analysis.

偽妊娠の誘起法として精管結紮雄マウスとの交尾刺激、電気刺激およびレセルピン処理を行ったレシピエントマウスに胚盤胞を移植した。これらの誘起法の違いによる偽妊娠誘起の有無、その持続期間および移植胚盤胞の着床率について比較検討した。

1. レシピエントマウスの偽妊娠誘起法について

偽妊娠を誘起するために、精管結紮雄マウス交尾刺激、電気刺激およびレセルピン処理した未経産のレシピエントマウス各 10 例について、偽妊娠誘起率とその持続期間の成績を Table 1 に示した。各偽妊娠誘起法による偽妊娠誘起は精管結紮雄マウス交尾

刺激群および電気刺激群のいずれも 10 例中全例認められ、これら両群の偽妊娠の誘起率は 100% であった。しかし、レセルピン処理群の偽妊娠誘起は 10 例中 7 例 (70%) であり他の二群よりも若干低率であった。しかし、 χ^2 検定で三つの偽妊娠の誘起法の間にはその誘起率に有意な差は認められなかった。

一方、偽妊娠の持続期間は、精管結紮雄マウス交尾刺激群が最も長く平均 10.2 $\pm$ 2.25 日であり、ついで電気刺激群の 6.8 $\pm$ 2.25 日、レセルピン処理群 5.1 $\pm$ 1.07 日であった。これら偽妊娠の誘起法の違いによる偽妊娠の持続期間は、分散分析で精管結紮雄

Table 3 Effect of the number of the transplanted fertilized ova and the delivered or non-delivered mouse in the implantation of blastocyst on the mouse

	No. of transplanted blastocyst			No. of tested	No. of implantated blastocyst				Average no. of corpus luteum		
	Left	Right	Total		Head(%)	Left	Right	Total(%)	Left	Right	Total
delivered	1	1	2	5	2 (40)	0.2 ¹⁾	0.2	0.4(20)	5.8	5.4	11.2
	3	3	6	5	3 (60)	1.2	0.6	1.8(30)	6.2	6.0	12.2
	5	5	10	5	3 (60)	1.2	0.6	1.8(18)	5.6	5.4	11.2
non-delivered	3	3	6	5	4 (80)	1.4	0.6	2.0(33)	5.8	5.8	11.6

1) No. of implantated blastocyst is average of five tested mice.

マウス交尾刺激群と電気刺激群およびレセルピン処理群の間に危険率 5% で有意な差が認められ、精管結紮雄マウス交尾刺激で誘起した偽妊娠は他の二つの誘起法のそれより長く持続することが明らかとなった。

2. 偽妊娠の誘起法と胚盤胞の着床について

未経産の雌マウスをそれぞれ精管結紮雄マウス交尾刺激、電気刺激およびレセルピン処理により偽妊娠を誘起したレシピエントマウスの左右子宮角に、胚盤胞を 3 個づつ移植した結果を Table 2 に示した。いずれの偽妊娠の誘起法においても全ての個体に黄体が認められ、平均黄体数は精管結紮雄マウス交尾刺激群 12.2 個、電気刺激群およびレセルピン処理群はいずれも 11.4 個であり、偽妊娠の誘起法による差はほとんどなかった。しかし、精管結紮雄マウス交尾刺激群では 5 例中 3 例 (60%)、電気刺激群では 5 例中 1 例 (20%) の個体に胚盤胞の着床が認められたが、レセルピン処理群では、胚盤胞の着床はいずれの個体でも全く認められなかった。さらに各偽妊娠誘起法別の胚盤胞の着床は、精管結紮雄マウス交尾刺激群では 30 個中 9 個 (30%)、電気刺激群では 30 個中 2 個 (6%) であった。これら偽妊娠の誘起法の違いによる胚盤胞の着床率は X^2 検定で精管結紮雄マウス交尾刺激、電気刺激およびレセルピン処理の間に危険率 5% で有意な差が認められ、精管結紮雄マウス交尾刺激は他の二つの偽妊娠誘起法より胚盤胞の着床率が高いことが明らかとなった。

3. 移植胚盤胞数と経産および未経産レシピエントにおける胚盤胞の着床について

未経産のマウスを精管結紮雄マウス交尾刺激により偽妊娠を誘起した後、左右子宮角にそれぞれ 1 個、3 個および 5 個の胚盤胞を移植し、移植胚盤胞数とその着床について検討した結果を Table 3 に示した。胚盤胞の着床が認められた個体は、胚盤胞 2 個移植群では 5 例中 2 例 (40%)、胚盤胞 6 個および 10 個移植群ではいずれも 5 例中 3 例 (60%) であった。

また、移植した胚盤胞の着床は、胚盤胞 2 個移植群では 10 個中 2 個 (20%)、胚盤胞 6 個移植群では 30 個中 9 個 (30%)、胚盤胞 10 個移植群では 50 個中 9 個 (18%) であった。これら移植胚盤胞数の違いによる着床率は X^2 検定で 3 つの移植胚盤胞数の間に有意な差は認められなかった。また、これらの全ての個体に黄体が認められ、その平均黄体数は、胚盤胞 2 個移植群では 11.2 個、胚盤胞 6 個移植群で 12.2 個、胚盤胞 10 個移植群では 11.2 個であった。

また、未経産マウスと同様に精管結紮雄マウス交尾刺激により偽妊娠を誘起した経産マウスをレシピエントにした時の胚盤胞の着床について検討した結果、胚盤胞の着床が認められた個体は 5 例中 4 例 (80%) で、着床した胚盤胞は 30 個中 10 個 (33%) であった。これら経産マウスをレシピエントに用いた場合の胚盤胞の着床は、未経産マウスの胚盤胞を移植した場合とほぼ同様であった。さらに経産マウスにおいても未経産マウスとほぼ同数の黄体が認められた。すなわち左右卵巣の黄体数はそれぞれ 5 個から 7 個で、左右の合計は平均 12.2 個であった。

考 察

マウスは黄体相の欠落した不完全性周期型の動物であり、そのためマウスの胚盤胞の移植においては偽妊娠を誘起させ、内分泌機能を活性化し、機能的黄体相を形成させることが必要である。

精管結紮雄マウス交尾刺激群および電気刺激群ではいずれも 10 例中全例に偽妊娠の誘起が認められたが、レセルピン処理群では 10 例中 7 例 (70%) と他の 2 群よりも低率であった。しかし、これら 3 群間に統計的な差 (X^2 検定) は認められなかった。不完全性周期型の動物であるマウスの子宮頸管に精管結紮雄マウス交尾刺激などを加えると、1 日 2 回の周期でプロラクチンはサージ状に分泌される⁹⁾。また、レセルピンの投与によりプロラクチンの放出が促進されることが明らかにされている。さらに、これらのプ

プロラクチンは黄体細胞を刺激することにより、プロジェステロンの 20 α -ダイハイドロプロジェステロンによる異化を抑制し、プロジェステロンの分泌相および機能的黄体相を確立することが明らかにされている¹²⁾。したがって、今回の試験においても精管結紮雄マウス交尾刺激、電気刺激およびレセルピン処理のいずれの刺激においても、同様の内分泌機序により機能的黄体相が形成され、偽妊娠が誘起されたものと推察される。

一方、ラットにおける偽妊娠の持続期間は、偽妊娠の誘起法により差がなく、12~14 日であることが明らかにされている^{8,15)}。さらに、DeFeo, V. J.⁴⁾は、ヒスタミンなどの化学的誘発物質よりも精管結紮雄マウス交尾刺激および電気刺激などの物理的刺激の方が偽妊娠期間が長く持続することを報告している。このように偽妊娠誘起法の違いによるその持続期間については必ずしも同じでない。しかし今回のマウスにおける試験結果は、精管結紮雄マウス交尾刺激の偽妊娠持続期間が最も長く平均 10.2 日、ついで電気刺激の 6.8 日、さらにレセルピン処理の 5.1 日であり、精管結紮雄マウス交尾刺激は、他の二つの偽妊娠誘起法との間に有意な差 (分散分析) があり DeFeo, V. J. の報告と一致していた。

今回、レセルピン投与によりラットの偽妊娠を 100 % 誘起させ、しかも約 13 日間持続させる用量^{2,10)}、すなわち体重 kg あたり 1 mg のレセルピンをマウスの皮下に注射した結果、マウス 10 例中 3 例に偽妊娠が誘起されなかった。また、誘起した 10 例中 7 例の平均持続期間は 5.1 日であり、ラットに比べ著しく短かった。このことは、ラットでの偽妊娠の持続期間は、レセルピン投与量に依存することが明らかにされている¹⁰⁾ことから、ラットに対するレセルピンのこの投与量では、マウスに対し偽妊娠を 100 % 誘起させ、しかも長期間偽妊娠を持続させるための投与量として不足しているものと考えられる。さらに、ラットおよびマウスの生体内におけるレセルピンの動態が異なることに起因しているものと推察される。したがって、マウスの偽妊娠とレセルピンの投与量および投与回数について、さらに今後検討すべきであると考えられる。

偽妊娠誘起法の違いによる胚盤胞移植後の平均着床率は、精管結紮雄マウス交尾刺激の 30 個中 9 個 (30 %)、電気刺激の 30 個中 2 個 (6 %) であったが、レセルピン処理では 30 個移植した結果、移植胚盤胞の着床は全く認められなかった。これら胚盤胞の着床率において、精管結紮雄マウス交尾刺激は最も高率であり、他の二つの誘起法との間に有意な差 (X^2

検定, $P < 0.05$) があった。偽妊娠が誘起されたラットでは、偽妊娠中期までは主としてプロラクチンに、それ以降はプロラクチンと LH の分泌により、プロジェステロンの持続的分泌相が形成され、偽妊娠は持続される¹¹⁾。また、偽妊娠 5 日目から分泌が開始される LH により卵巣が刺激され、胚盤胞の着床に必要なエストロゲンが分泌されることが明らかにされている²⁰⁾。一方マウスにおいてもプロラクチンおよび LH によって偽妊娠は持続し、さらに着床に必要なプロジェステロンおよびエストロゲンが分泌される¹²⁾。これらのことから、電気刺激およびレセルピン処理では、プロラクチンおよび LH の分泌が不十分になり、偽妊娠期間が短くなったのではないかと考えられる。すなわち、胚盤胞の着床に必要なプロジェステロンおよびエストロゲンの分泌が不足し、移植胚盤胞は着床しなかったものと考えられる。したがって、マウスでは胚盤胞の着床率に偽妊娠の持続期間が大きく影響しているものと推察される。

一方、胚盤胞移植 7 日後の剖検時において、いずれの偽妊娠誘起法においても全例マウス黄体の形成が認められ、それらのうち胚盤胞の着床が認められたマウスの黄体は妊娠黄体であるが、しかし胚盤胞の着床が認められなかったマウスにも黄体が認められた。これらの黄体は胚盤胞が着床したマウスの妊娠黄体と肉眼的に区別することができなかった。したがってこれらの黄体は、移植操作の子宮の穿孔により偽妊娠が誘起され^{8,20)}、その結果形成されたものであると推察される。

胚盤胞を子宮に移植すると着床前あるいは着床直後に胚盤胞の約 10~20 % が死滅することが明らかにされている^{15,19)}。さらに、多胎動物では着床が近づくと胚盤胞は子宮内部で等間隔に分散する。すなわち、“まどり”が正常に行われることにより、着床した胚盤胞が正常な発生と発育を維持するが、“まどり”が正常に行われない場合には、胚盤胞が過密状態となり、胚盤胞の吸収や早期死滅が増加することも明らかにされている^{3,19)}。したがって、胚盤胞の着床率は、移植する胚盤胞数に大きく影響すると思われる。しかし、移植胚盤胞数の違いによる平均着床率は、胚盤胞数 2 個移植群では 10 個中 2 個 (20 %)、6 個移植群では 30 個中 9 個 (30 %)、10 個移植群では 50 個中 9 個 (18 %) であり、それぞれ胚盤胞の移植群間における平均着床率には有意な差 (X^2 検定) がなかった。

一方、経産マウスに 6 個の胚盤胞を移植した結果、着床個体は 5 例中 4 例 (80 %)、平均着床率は 30 個中 10 個 (33 %) であり、いずれも未経産マウスのそ

れと有意な差 (X^2 検定) はなかった。このような経産および未経産における胚盤胞の着床について、牛では受胎率に差はないことが明らかにされている。マウスにおいても胚盤胞の着床にはレシピエントマウスの経産の有無は影響しないことが判明した。

文 献

- 1) 若杉 昇：実験動物の胚の採取法および凍結保存法，リプロダクション実験マニュアル，飯塚理八ら編，116，講談社，1985
- 2) Barraclough, C. A., Sawyer, C. H.: Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine, *Endocrinology*, 65: 563, 1959
- 3) Blandau, R. J.: Embryo-endometrial interrelationship in the rat and guinea pig, *Anat. Rec.*, 104: 331, 1949
- 4) DeFeo, V. J.: Determination in the sensitive period for the induction in the rat by different inducing procedures, *Endocrinology*, 73: 488, 1963
- 5) Dickmann, Z.: Egg transfer methods in mammalian embryology, Daniel. J. C. ed., 133, W. H. Freeman and Company, 1971
- 6) 福田芳詔ら：マウスの人工授精について，第65回日本畜産学会講演要旨，47：21，1976
- 7) 猪 貴儀：マウス，ラット人工授精法の検討，実験動物，10：107，1961
- 8) 川上正澄，貴邑富久子：偽妊娠，妊娠中のプロラクチン分泌と調節，内分泌生理学，188，南山堂，1978
- 9) 堤 義雄：哺乳動物の卵子(19)，畜産の研究，30：1026，1976
- 10) Kisch, E. S.: Disparity between the states of pseudopregnancy induced by reserpine and cervical stimulation in the rat, *Acta. Endocrinol.*, 67: 203, 1971
- 11) Lam, P. C. O., Rothchild, I.: The influence of luteinizing hormone (LH) in the control of progesterone secretion in the pseudopregnant rat, *Endocrinology*, 101: 1503, 1977
- 12) 堤 義雄：哺乳動物の卵子(18)，畜産の研究，30：904，1976
- 13) 尾川昭三：ラット，マウスの人工授精及び哺乳動物胚の凍結保存について，実験動物，27：110，1978
- 14) Stockard, C. R., Papanicolaou, G. N.: Recent advances in sex and reproductive physiology, Robson, J. M., 4, J. & A. Churchill Ltd., 1917
- 15) 菅原七朗：繁殖生理，実験動物学ラット，石橋雅彦ら編，140，講談社，1984
- 16) 杉江 佑：家畜の受精卵移植 国内の現状，家畜繁殖誌，24：36，1978
- 17) 竹島 勉，豊田 裕：マウスの人工授精，とくに受胎率および産次数に及ぼす注入精子数の影響について，実験動物学，26：317，1977
- 18) 竹島 勉：実験小動物の人工授精，哺乳動物の初期発生—基礎理論と実験法—，妹尾左知丸ら編，177，理工学社，1981
- 19) 館 鄰，館 澄江：脱落膜の形成機構，代謝（臨時増刊号），16：1321，1979
- 20) 館 鄰ら：初期胚の移植，哺乳動物の初期発生—基礎理論と実験法—，妹尾左知丸ら編，257，理工学社，1981
- 21) 東条伸平：視床下部，下垂体，卵巢系の概念，内分泌産科学，7，南山堂，1977

Effect of pseudopregnancy induction on transplantation of the fertilized mouse ova

Haruki Ihara, Tsuguaki Fukuyasu
and Kiyomi Ashida

Department of Animal Health II,
School of Veterinary Medicine,
Azabu University,
Sagamihara 229, Japan
(Director; Prof. K. Ashida)

Effects of pseudopregnancy induction on transplantation of the fertilized ova were examined in the mouse. The methods of pseudopregnancy induction in recipient female mice were copulatory stimulus by the male mouse with the ligated deferent duct (1st group), electro-stimulus at the cervix-uteri (2nd group), and reserpine injection (3rd group).

(1) The number of positive induction of pseudopregnancy and their average duration were 10/10 mice (100%), 10.2 ± 2.25 days in the 1st group, 10/10 mice (100%), 6.8 ± 2.25 days in the 2nd group, and 7/10 mice (70%), 5.1 ± 1.07 days in the 3rd group respectively.

(2) Implantation ratio of 30 blastocysts per 5 mice were comparatively examined in each group. The positive number were 9/30 blastocysts (30%) in the 1st group, 2/30 blastocysts (6%) in the 2nd group, and 0/30 blastocysts (0%) in the 3rd group. In all group, functional corpora lutea were observed in each ovaries of mice.

(3) Effect of the different number of the transplanted blastocysts on the fertilization were examined. Fifteen mice were divided into 3 groups. Number of the transplanted blastocysts were 2, 6 and 10 per head in each group. However, the results were not significant statistically among the groups. Also, the delivered or non-delivered recipient were almost same in the transplanted ratio of blastocysts.

(受付：1989年9月19日)

Caffein-Kallikrein 処理精子による 配偶者間人工授精への臨床的応用

Clinical Trials of Artificial Insemination with Husband's Sperm Treated with Caffeine and Kallikrein

昭和大学医学部泌尿器科学教室（主任：今村一男教授）

渡 辺 政 信 谷 藤 匠 田 代 博 紹
Masanobu WATANABE Takumi TANIFUJI Hirotugu TASHIRO
吉 田 英 機 今 村 一 男
Hideki YOSHIDA Kazuo IMAMURA

Department of Urology, School of Medicine,
Showa University, Tokyo 142, Japan
(Director: Prof. K. Imamura)

精子運動率不良の男子不妊症に対する治療法の一つとして caffeine-kallikrein 処理精子による AIH を試みるために、先ず caffeine および kallikrein 各種濃度による精子運動率の変化について基礎的に検討し AIH 用の caffeine, kallikrein の濃度を決定した後、精子運動率 40 %以下の男子不妊症 9 例にこの caffeine, kallikrein 処理精子による AIH を本邦において初めて試み、以下の結果を得た。

1. 6.0, 7.5, 9.0 mM (final concentration) の caffeine 濃度を男子不妊症 10 例の精子において検討し、7.5 mM 培養液で最も良好な精子運動率の改善を認めた。
2. 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 KU/ml の kallikrein 濃度を男子不妊症 8 例の精子で検討し、1 KU/ml 培養液で最も良好な精子運動率の改善率を認めた。
3. これらの基礎的検討結果から、その実際の臨床応用として 7.5 mM caffeine および 1 KU/ml kallikrein 添加培養液処理精子による AIH を 9 症例に試み、3 例の妊娠に成功し、その中 2 例で正常児の分娩に成功したが、1 例では 12 週目に流産となってしまった。
4. これらの基礎的、臨床的検討から精子運動不良の男子不妊症に対する caffeine-kallikrein 添加培養液処理精子を用いた AIH は、外来で比較的簡単に施行できるため今後有力な手段となることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 306-312, 1990)

緒 言

各種の薬物療法を行なっても妊娠を得られない男子不妊症の治療法として、配偶者間人工授精 (artificial insemination with husband's semen, AIH)¹⁾のみならず、体外受精、胚移植²⁾や、配偶子卵管内移植³⁾なども応用されるようになり、そのための運動良好精子回収方法^{4,5)}について種々な工夫がなされている。しかし精子運動能が著明に低下している症例に対し

ては、これらの運動良好精子回収方法による AIH でも妊娠の可能性は低く、何らかの方法で運動能の改善を図ることが必要となって来る。我々は精子運動能の stimulants として報告されている caffeine⁶⁻⁹⁾と kallikrein^{10,11)}について検討を加え、caffeine の精子運動促進作用と kallikrein の精子運動維持作用とを確認し、さらに caffeine-kallikrein の混合培養液による処理により臨床的に応用しうる精子運動能の促進効果を確し報告した¹²⁾。今回、AIH に用いる

Table 1 Semen analysis used for the study of caffeine and kallikrein
(mean $\pm$ S.D.)

	cases	Age	sperm density $\times 10^6/\text{ml}$	sperm motility %
Caffeine	10	26-39	58.0 ± 24.4	40.3 ± 12.1
Kallikrein	8	29-39	45.9 ± 16.0	59.6 ± 9.8

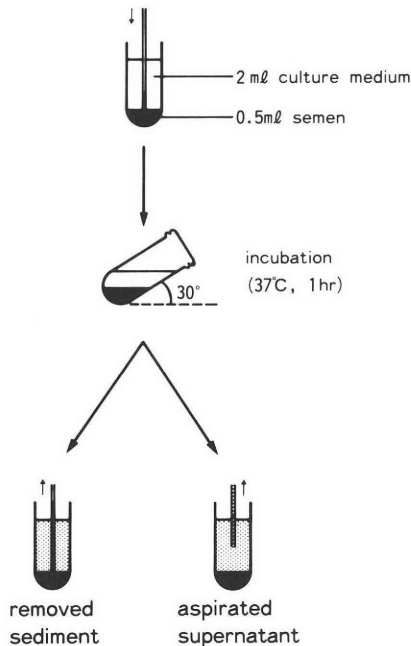


Fig. 1 Modified layering method to separate good sperms from seminal samples

caffeine と kallikrein の濃度についてさらに検討を加えるとともに、その臨床応用として不妊を訴えて昭和大学病院泌尿器科を受診し、種々の薬物療法を行なうも精子運動率が 40 %未満のままであり自然妊娠に至らなかった男子不妊症と膀胱内精子運動率が著明に低下していた逆行性射精に対し、この caffeine-kallikrein 混合液処理精子による AIH を患者の了解の下に試み、本邦で初めて妊娠分娩に成功し、かつ新生児に何らかの奇形を認めなかった症例を経験したのでその有用性について報告する。

対象と方法

caffeine (SIGMA CHEMIKAL CO.) と kallikrein (BOYER CO.) の濃度を検討するために用いた症例は、caffeine については男子不妊症の未治療 10 例、kallikrein では未治療 8 例で、両群の精液所見を Table 1 に示した。caffeine 濃度は 6.0, 7.5, およ

Table 2 Components of medium on this clinical study

Ham's F-10 solution
7.5mM/final concentration of caffeine
1KU/ml of kallikrein
100U/ml of penicillin G

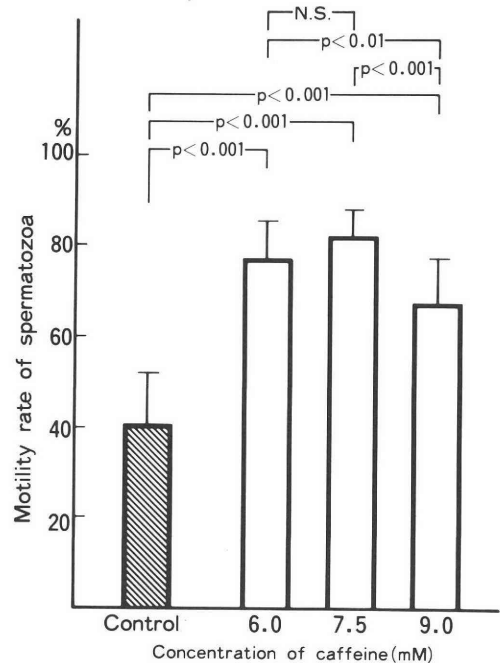


Fig. 2 Motility rate of spermatozoa in four concentrations of caffeine (mean $\pm$ S.D.)

び 9.0 mM (final concentration), kallikrein 濃度は、0.2, 0.5, 1.0, 3.0 および 5.0 KU/ml で、各濃度の基剤は Ham's F-10 液 (GIBCO Laboratories) としたものを作製し、精液を注入した各々の培養液を 37°C で 1 時間静置し、swim up して来た精子の運動率 (前進運動率) について検討した。

Ham's F-10 液は精子運動能に影響を与えないので¹²⁾、対象群は Ham's F-10 液のみとした。射精 3 時間後に検査を開始したため、処置前精子運動率は射精直後の運動率よりやや低値を示している。一方、臨床応用として caffeine と kallikrein 処理精子による AIH を行った症例は 36 歳から 46 歳の 9 例で、その中の 7 例は精子運動率が著明に低下しており、各種薬物療法を試みるも妊娠に成功せず、また一部は通常の AIH を試みるも妊娠に成功しなかった男子不妊症例で、他の 2 例は逆行性射精で膀胱内精子運動率が著明に低下していた症例である。妻側に不妊因

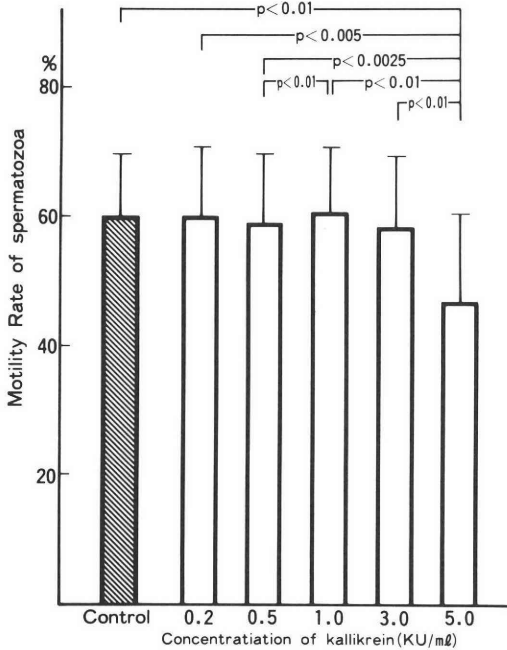


Fig. 3 Motility rate of spermatozoa in five concentrations of kallikrein (mean $\pm$ S.D.)

子のないことは確認されている。なお全例とも、処理前の精子運動率は40%未満である。今回AIHに用いた培養液の組成をTable 2に示したが、今回の基礎的な検討結果からcaffeineは7.5 mM (final concentration), kallikreinは1 KU/mlとした。AIHに用いる運動良好精子回収法としては、採取精液を回転速度 $\times$ 600 gで10分間遠心し精子パレットを作製した後、星らの方法を一部改良したmodified layering method¹³⁾を用い、37°Cで1時間のincubationを行なった。その概略をFig. 1に示した。swim upした精子を回収する際、精子濃度が多い場合にはaspirated supernatant法を、一方精子が少ない場合にはremoved sediment法を用いた。

精子濃度と精子運動率（前進精子運動率）の測定はMaklerのcounting chamber¹⁴⁾を使用し、推計学的処理はWilcoxon-Whitney MannのU検定により行なった。

結 果

1. caffeine および kallikrein 濃度の検討

各caffeine濃度における精子運動率の変化をFig. 2に示したが、処理前精子運動率は $40.3 \pm 12.1\%$ (mean $\pm$ S.D.)に比し、6.0 mMでは $77.3 \pm 9\%$ 、7.5 mMでは $82.4 \pm 6.1\%$ 、9.0 mMでは $67.3 \pm 10.6\%$ とcaffeine処理後は有意に上昇した。9.0 mMでの

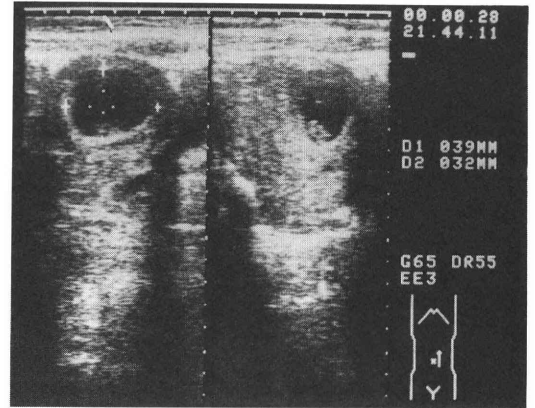


Fig. 4 Transabdominal echography at 9 weeks period of pregnancy in case No. 7

結果は他2者に比較して有意に ($P < 0.01$) に低く、6.0 mMと7.5 mMにおける運動率の比較では有意差はなかったが、7.5 mM caffeineで最も良好な運動率であった。この結果からAIH用のcaffeine濃度は7.5 mM (final concentration) とした。

同様にkallikreinについては、0.2, 0.5, 1.0, 3.0および5.0 KU/mlの5濃度について検討し、その結果をFig. 3に示した。kallikrein 5.0 KU/mlでは他の濃度に対し精子運動率はむしろ有意に低下したが、0.2~3.0 KU/mlではほとんど差を認めなかったものの1.0 KU/mlが最も良好な結果であった。すでに1 KU/ml kallikreinの精子運動能維持作用を報告しており、上記の結果からAIHのkallikrein濃度を1 KU/mlとした。

2. 臨床応用としての caffeine-kallikrein 処理精子を用いた AIH の結果について

caffeine-kallikrein 処理精子によるAIH施行時の各症例の処理前後の精子運動率、精子濃度、妊娠の有無をTable 3に示した。平均精子濃度は $59.2 \pm 33.7 \times 10^6/\text{ml}$ (mean $\pm$ S.D.)と良好であるが、精子運動率が $18.7 \pm 12.9\%$ (mean $\pm$ S.D.)と著明に低下していたが、caffeine-kallikrein 混合培養液による処理の運動率は $44.8 \pm 23.4\%$ と有意 ($P < 0.05$) に改善されていた。臨床応用9名に計27回のcaffeine-kallikrein 処理精子によるAIHを行なったところ、3例で妊娠に成功し、そのうち2例で正常分娩に成功したが、1例は流産に終わってしまった。正常分娩に成功した2例の新生児の代表的奇形は認めず、その後の成長にも現在のところ異常は認められていない。

以下妊娠症例の臨床経過について述べる。

(症例の3) O. S. 30歳 不妊期間2年

Table 3 Results of AIH with caffeine and kallikrein

No. of cases	Age	sperm density $\times 10^6/\text{ml}$	% motility before treatment	% motility after treatment	pregnancy
1	41	45	20	55	—
		28	22	36	—
		40	30	58	—
		51	21	58	—
2	39	27	35	61	—
		43	31	60	—
3	30	68	35	69	—
		59	30	85	girl (3170g)
4	36	40	30	61	—
		42	24	79	—
		22	28	73	—
5	30	38	32	51	—
		34	35	44	—
6	37	57	0.2	3	—
		187	7	27	—
		68	0.02	6	—
7 *	33	81	5	45	girl (2630g)
8 *	44	55	35	57	—
		70	3	14	—
		84	10	43	—
		56	11	38	—
9	37	53	0.2	6	—
		89	8	22	—
		38	6	15	—
		106	10	55	abortion

* case of retrograde ejaculation

1984年5月12日初診。精子濃度 $10\sim 20\times 10^6/\text{ml}$ 、運動率35~40%であったため補中益気湯6g/日を4ヵ月間内服し、精子濃度 $33\sim 40\times 10^6/\text{ml}$ 、運動率66~78%と改善したが妊娠を認めず、9月よりノイキノン60mg/日併用療法を3ヵ月間行ない精子濃度 $37\sim 40\times 10^6/\text{ml}$ 、運動率66~69%になっていたが治療をその後中断していた。

1985年3月9日再診したところ精子濃度 $10\sim 13\times 10^6/\text{ml}$ 、運動率20~30%となっており、メチコパール3000r/日の内服を開始し3ヵ月以降精子濃度 $55\sim 68\times 10^6/\text{ml}$ 、運動率28~42%と改善し、その後通常のAIHを4回試みたが妊娠に成功しなかった。同年9月に地方転勤になることのため患者の強い希望もあり、6月よりcaffeine-kallikrein処理精子によるAIHを施行し2回目に妊娠に成功した。10月地方転職となり1986年4月3170gの女児の出産に成功

した。近医の小児科での1ヵ月および3ヵ月健診で何らかの奇形をみつめなかった。

(症例の7) K. S. 33歳

腰椎圧迫骨折による逆行性射精と診断され1981年9月3日初診。既に報告¹⁵⁾したように、Hotchkiss¹⁶⁾等の方法に準じた膀胱内精子処理法によるAIHを行ない4回目に妊娠に成功し1983年12月男子を出産した。その後第2子を希望し1985年5月再診した。膀胱内精子濃度は $58\sim 64\times 10^6/\text{ml}$ と比較的良好であったが、運動率は5回測定したが2~7%と低値を示したため、caffeine-kallikreinで処理したところ運動率が41~56%と著明改善を確認したため同年10月よりAIHを行ない1回目で妊娠に成功した。妊娠9週目の胎児エコーをFig. 4に示した。1986年6月3日自然分娩にて2630gの女児を出産し、現在2歳となるがとくに奇形を認めていない。

(症例の9) Y. N. 37歳 不妊期間2年

1985年12月28日初診。精子濃度は $41 \sim 60 \times 10^6$ /mlで、運動率 $0 \sim 0.1\%$ であったためカリクレイン、補中益気湯を投与するが運動率の改善を認めなかった。1987年4月より caffeine-kallikrein 処理精子による AIH を4回試み、1988年に1月に成功したが、妊娠12週目に流産となった。

考 察

不妊症の治療法の1つとして AIH が試みられているが、男子側要因として精子運動率の著明に低下した症例では妊娠に至ることは難しいとされている¹⁾。男子不妊症の妊娠成功例の精液側の条件として精子運動率あるいは精子運動能の改善が最も重要な因子¹⁷⁾とされており、近年著明な精子運動率の改善が得られる多層 percol を用いた精子洗浄濃縮法を用いた AIH が報告されている¹⁸⁾。しかしこの方法は手技がやや複雑であるので、日常の外来診療に、かつ少数で行なえる方法が必要と考え、今回我々は簡単に精子運動能の改善を得る方法として従来より精子運動能刺激物質として得られる caffeine, kallikrein の基礎的検討を行ない、caffeine-kallikrein 処理精子の臨床応用の可能性を示唆して来た。

caffeine は精子運動率⁶⁻⁹⁾、精子妊孕力¹⁹⁾と精子の子宮頸管粘侵入²⁰⁾を促進するといわれ、その作用機序は、精子の phosphodiesterase を抑制することより cyclicAMP 濃度が上昇し、精子運動性が改善されると考えられている²¹⁾。またその cyclicAMP 濃度が精子の原形質膜の Ca イオン輸送調節に関与しているのではないかとされている²²⁾。

caffeine 濃度検討では、不妊症患者精子において、3, 6, 12 mM^{7,9)}が精子運動率を改善し、健康人凍結精子でも 2.5, 7.2, 10 mM^{14,19,23)}の caffeine で運動率の改善が得られたとされている。しかし 1, 3, 6, 10, 13.7 mM^{23,24)}では対照群の運動率とに差はなかったとする報告もあり、今回 6, 7.5, 9 mM における精子運動率を検討したところ、6, 7.5 mM で運動率の改善を認めた。

一方、Dougherty ら²⁴⁾は caffeine にヒト精子運動能を高める作用はなかったとし、Harrison ら²⁵⁾は 6 mM の caffeine 処理精子を用いた AIH を 34 例の男子不妊症に計 450 回試み、caffeine によりその精子運動率は改善したにもかかわらず 1 例の妊娠にも成功しなかったことから、むしろ caffeine は精子を障害する可能性があるとし唆した。さらに、6 mM の caffeine で incubation した精子の電顕的観察を行ない精子頭部に変形を認めたことを報告した^{26,27)}。しか

し Barkay ら¹⁹⁾は 7.2 mM caffeine による処理精子には何ら変形を認めなかったことから凍結精子により artificial insemination with doner's semen (AID) に caffeine を用い、caffeine 未使用 AID の妊娠は 7 例に対し、caffeine 使用 AID の妊娠は 14 例と 2 倍を占め、また Harrison の結果は電顕的標本処理段階で起こった変化であろうと考え、caffeine により fertilizing capacity はむしろ高まると結論している。Prins ら²⁸⁾も 1 例であるが人工精液瘤から採取した精子の hamster zone-free oocyte sperm penetration assay を行ない、penetration rate は caffeine 非処理精子の $22 \pm 3\%$ (mean $\pm$ S.D) に対し、caffeine 処理精子では $50 \pm 10\%$ と高率であったと報告しており、これは caffeine 処理精子の臨床応用の有用性を示唆している。

kallikrein は精子の細胞内代謝系の賦活化²⁹⁾や acrosin 活性³⁰⁾へ関与するのではないかと推測されており、kallikrein の臨床例^{11,13)}でも有用であるとされ、in vitro でも 0.1~5 KU/ml 濃度^{10,32)}で精子運動率を改善するといわれている。しかし Makler⁸⁾、Hamm ら³³⁾は精子運動能促進作用はないとし、小川ら¹²⁾も運動率の改善よりは運動能の維持を認めた。今回、我々も未処理群に対し、有意な運動率の改善を認めなかった。牛・豚の精子であるが、Hamm ら³³⁾も caffeine-kallikrein 混合液で精子運動率の改善を認めており、今後は kallikrein の精子運動維持作用機序、kallikrein と caffeine の相互作用について研究が必要である。

今回は、精子運動率が低下し、しかも他の薬物療法に反応しなかった症例に対し患者への詳細に説明と承諾を得た上で caffeine-kallikrein 処理精子による AIH を試み、本邦において初めて 3 例の妊娠を認め、うち 2 例で分娩に成功したが、1 例の流産を経験した。

薬物療法でも精子運動率の改善が認められない症例に対し通常の AIH を行なっても妊娠の可能性は低いため、caffeine などの stimulants により精子運動率の改善を計った上での AIH が有用であると考えますが、多数の症例追加検討が必要であり、妊娠率の向上のため、さらに正確な排卵時期を測定し AIH を行なう必要がある。しかし caffeine の精子への障害の有無については今後も検討しなければならない。また催奇性の点も充分考慮し、患者の十分な了解のもとに症例を限定した慎重な臨床応用が必要であることはもちろんであるが、今回我々が本邦において初めて caffeine-kallikrein 処理精子による AIH を試み正常児の妊娠分娩に成功したことは、今後の AIH を

主体とした男子不妊症に対する治療法の一つとしてこの分野における新しい可能性をもたらすことが強く示唆された。

文 献

- 1) 森 崇英：乏精子症に対する治療の現況日本アンドロロジー学会，第5回学術大会講演抄録集，6，1986
- 2) Trounson, A. O., Mohg, L. R., Wood, C., and Leston, J. F.: Effect of delayed insemination of *in-vitro* fertilization, culture and transfer of human embryo, *J. Reprod., Fert.*, 64: 285, 1982
- 3) 田中 温，戸枝通保，長沢 敢，山本 勉，中潟直己：配偶子卵管内移植 (GIFT) の開発とその検討，産婦の世界，38：727，1986
- 4) 審 和彦，長池文康，桃野耕太郎，京野広一，村木 章，斉藤 晃，鈴木雅洲，林 恵子，柳田隆造：われわれの行っている精液静置法 “layering method”における精液中からの良好精子の分離，日不妊誌，28：102，1983
- 5) 真田利男，小林俊夫，兼子 智，小堀 清，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，日不妊誌，28：267，1983
- 6) Haesungcharen, A. and Chulavatnatol, M.: Stimulation of spermatozoal motility by caffeine, *Fertil. Steril.*, 24: 663 1973
- 7) Schoenfeld, C. Y., Amelar, R. D., and Dubin, L.: Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine, *Fertil. Steril.*, 26: 158 1975
- 8) Makler, A., Makler, E., Itzkovitz, J. and Brandes, J. M.: Factors affecting sperm motility, IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein and other metabolically active compounds, *Fertil. Steril.*, 33: 624, 1980
- 9) Moussa, M. M.: Caffeine and sperm motility, *Fertil. Steril.*, 38: 845, 1983
- 10) Schill, W. B., Faleo, O. B. and Haberland, G. L.: The possible role of kinins in sperm motility, *Int. J. Fertil.*, 19: 163, 1974
- 11) Ishigami, J., Matsumoto, O., Hazama, M., Tomioka, O. and Kaminodono, S.: Kallikrein and male infertility, kininogenkallikrein, 5: 65, Schattaluer, 1980
- 12) 小川 肇，田代博紹，吉田英機，今村一男：男子不妊症患者精子の運動能におよぼす caffeine と kallikrein の基礎的研究，日不妊誌，33：26，1988
- 13) 渡辺政信，田代博紹，吉田英機，今村一男，精液静置法による良好精子分離法の検討，第29回日本不妊学会学術総会抄録号：623，1984
- 14) Makler, A.: The improved ten-microneter chamber for rapid sperm count and motility evaluation, *Fertil. Steril.*, 33: 337, 1980
- 15) 内藤善文，渡辺政信，吉田英機：AIHにて妊娠に成功した逆行性射精の1例，日不妊会誌，28：582，1983
- 16) Hotchkiss, R. S., Pinto, A. B. and Kleegman, S.: Artificial insemination with semen recovered from the bladder, *Fertil. Steril.*, 6: 337, 1955
- 17) 守殿貞雄：男子不妊症の臨床—最近の話題を中心に，臨泌，40：7，1986
- 18) 飯塚理八，小林俊文，遠藤勝英：人工授精の実際，産婦人科治療，53：264，1986
- 19) Barkay, J., Bartoov, B., Ben-Ezra, S., Langsman, J., Feldman, E., Gordon, S. and Zuckerman, H.: The influence of *in vitro* caffeine treatment on human sperm morphology and fertilizing capacity, *Fertil. Steril.*, 41: 913, 1984
- 20) Aitken, R. J., Best, F., Richardson, D. W., Schats, R. and Simm, G.: Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 67：19，1983
- 21) Barkay, J. and Zuckerman, H.: Treatment of Male Infertility, 263, Springer, Verlag, 1982
- 22) Peterson, N. P., Seyler, D., Bundman, D. and Freund, M.: The effect of theophylline and dibutyryl cyclic AMP on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 55: 385, 1979
- 23) Barky, J., Zuckerman, H., Sklan, D. and Gordon, S.: Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm, *Fertil. Steril.*, 28: 175, 1977
- 24) Dougherty, K. A., Cochet, A. T. K. and Urry, R. L.: Caffeine, theophylline and human sperm motility, *Fertil. Steril.*, 27: 541, 1976
- 25) Harrison, R. F.: Insemination of husband semen with and without the addition of caffeine, *Fertil. Steril.*, 29: 532, 1978
- 26) Harrison, R. F., Sheppard, B. L. and Kalischer, M.: Observation on the motility, ultrastructure and elemental composition of human spermatozoa incubated with caffeine, *Andrologia*, 12: 34, 1980
- 27) Harrison, R. F., Sheppard, B. L. and Kalszer, M.: Observation on the motility, ultrastructure and elemental composition of human spermatozoa incubated with caffeine, II. a time sequence study, *Andrologia*, 12: 434, 1980
- 28) Prins, G. C. and Ross, L. S.: Properties of human epididymal sperm obtained from an alloplastic spermatocele: motility assessment and penetration of zona-free hamster oocytes in the presence and absence of caffeine, *Fertil. Steril.*, 44: 401, 1985
- 29) Leidl, W., Prinzen, R., Schill, W. B. and Fritz, H.: The effect of kallikrein on motility and

metabolism of spermatozoa *in vitro*, kininogenase-kallikrein 2, 33, Schattauer, 1975

- 30) 長谷川剛志, 酒井伸嘉, 中原健次, 小田隆晴: kallikrein 添加培養液中のヒト精子アクトシン活性の啓時の変化について, 第 33 回日本不妊学会学術講演会抄録: 953, 1988
- 31) 田代博紹, 宮本憲治, 星野真希夫, 吉田英機, 今村一男: 男子不妊症に対する kallikrein (TKT-100) の臨床効果と末梢血中 LH, FSH および testosterone 値の変動について, 日不妊会誌, 33: 298, 1985
- 32) Schill, W. B.: Die Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen mit kallikrein, Dtsch. Mtsch. Med. Wschr., 101: 1733, 1978
- 33) Hamm, B. and Kelami, A.: How to increase the motility of spermatozoa from the epididymis of bulls and alloplastic spermatocytes in minipigs, Andrologia, 16: 26, 1984

**Clinical trials of
artificial insemination with
husband's sperm treated with
caffeine and kallikrein**

Masanobu Watanabe, Takumi Tanifuji,
Hirotsugu Tashiro, Hideki Yoshida
and Kazuo Imamura

Department of Urology, School of Medicine,
Showa University, Tokyo 142, Japan
(Director: Prof. K. Imamura)

For the purpose artificial insemination with husband's sperm (AIH) with addition of caffeine and kallikrein, which was carried out on wives with infertile husbands, different doses of caffeine and kallikrein were added to infertile semen samples and their effects on sperm motility were investigated. In dose of 7.5mM/final concentration, caffeine markedly increased the percentage of motile sperms. 1KU/ml kallikrein relatively enhanced sperm motility compared with other doses of kallikrein.

From these results, nine wives with infertile husbands whose sperm motility was less than 40% underwent AIH with addition of 7.5mM caffeine and 1KU/ml kallikrein. Seven of 9 infertile husbands were idiopathic male infertility and 2 cases of all were retrograde ejaculation. Three cases became pregnant by this AIH method. The two cases gave birth to normal children and the other had a miscarriage.

(受付: 1989 年 9 月 9 日)

ヒト型モノクローナル精子不働化抗体 (H6-3C4) 対応抗原の組織局在性に関する検討

Studies on Tissue Localization of Antigen Epitope Corresponding to the Human Sperm Immobilizing and Aggulating Monoclonal Antibody (H6-3C4)

兵庫医科大学産婦人科学教室

亀田 絹
Kinu KAMEDA

辻 芳之
Yoshiyuki TSUJI
磯島 晋三
Shinzo ISOJIMA

竹村 正
Tadashi TAKEMURA

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

精子不働化抗体陽性不妊婦人の末梢血リンパ球に由来するヒト型精子不働化モノクローナル抗体 (Mab) H6-3C4 が認識する糖鎖構造 i 抗原の組織局在性について、免疫組織化学的方法および抗体吸収実験により検討した。男性生殖組織では精巣・前立腺は染色されず、精巣上体・精囊腺上皮に染色が認められた。抗体吸収実験から正常精液に比し精管結紮後の射精精液中の抗原性は著しく減少していた。従って Mab H6-3C4 対応抗原は精巣上体を通過する間に精子膜表面に新たに付着すると考えられた。一般体組織では腎遠位尿細管、扁平上皮が染色された。胎児血球に対し低温でのみ軽度の凝集作用を認めたが、腎モホジネートや胎児血球で Mab の精子不働化作用は吸収できなかった。従って、一般体組織中の i 抗原は量的に少ないか、又は抗原交叉性が弱く、Mab の反応性は射精精子に特に強いことが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 313-319, 1990)

緒 言

精子不働化抗体 (SI-Ab) による不妊症の発生原因をめぐっては主に精子の性管内通過障害にあると考えられているが、さらに、受精や着床にも影響する可能性も考えられている。SI-Ab による不妊機序を解明するため、我々は、SI-Ab 陽性不妊婦人の末梢血リンパ球由来のヒト型モノクローナル抗体 (Mab) H6-3C4 を作製することに成功し¹⁾、この Mab を用いて抗体が認識する抗原エпитープがタイプ II ネオラクトサミン構造を有する i-抗原またはシアル化 i 抗原であることを明らかにしてきた²⁾。

本研究では、Mab H6-3C4 対応抗原エピトープの男性生殖組織および一般体組織における局在性をヒト正常組織標本を用いた免疫組織化学染色により検討した。さらに、精子上の Mab H6-3C4 対応糖鎖抗原であるシアル化 i 抗原または i 抗原と交叉反応を示す正常一般体組織中の共通抗原の Mab H6-3C4 との反応性について、それら組織を用いた Mab の抗体吸収実験により検討した。

実験方法

1. モノクローナル抗体 H6-3C4 の作製
ハイブリドーマ H6-3C4 の作製についてはすでに報

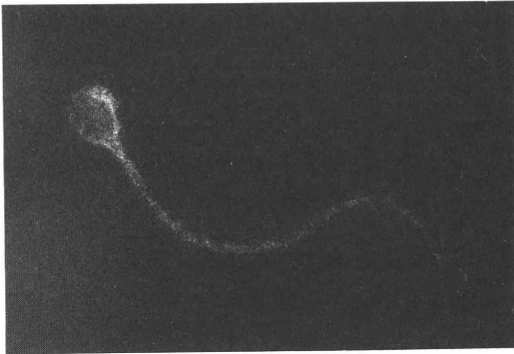


写真1 Immunofluorostaining of intact ejaculated spermatozoa

告したが、ここで用いた Mab H6-3C4 は SI-Ab 抗体陽性不妊婦人 (精子不動化値 SI_{50} : 45) の末梢血リンパ球を予めヒト精子および PMW で刺激した後、マウスミエローマ細胞 (NS-1) とポリエチレングリコール 1000 により細胞融合を行なって得たハイブリドーマ H6-3C4 の培養上清で、その SI_{50} は 5,000 unit であった。対照にマウスミエローマ細胞 (NS-1) の培養上清を用いた。

2. 精子の蛍光染色

精子は洗浄射精精子を生細胞のまま、あるいは固定した後染色した。洗浄精子を 96 ウェル U 底プレートに入れ、H6-3C4 培養上清を 4℃ にて 30 分間反応させ、PBS で洗浄後、FITC 標識抗ヒト IgM (Cappel, USA) (40 倍希釈) を 30 分間反応させ PBS で洗浄後スライドガラスに一滴滴下しカバーガラス下で蛍光顕微鏡にて観察した。あるいは、洗浄精子をスライドガラスに塗布しメタノールにて 5 分間固定後、Mab H6-3C4 を室温にて 60 分間作用させ、次に FITC 標識抗ヒト IgM を 30 分間反応させた後 90 % グリセリン-PBS にて封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。

3. 免疫組織化学的染色

男性生殖組織は事故死した健康成人男子から摘出された標本を、一般体組織は外科的に摘出されたもので組織学的に異常のないものについて検討した。摘出標本は 10 % ホルマリン固定後パラフィン包埋薄切切片を作成し、脱パラフィン・親水化の後、0.3 % H_2O_2 -メタノールを室温にて 30 分間反応させた。10 % 正常ヤギ血清を 30 分間反応させた後、H6-3C4 培養上清を 4℃ で一夜反応させた。対照には NS-1 培養上清を用いた。次いで、ビオチン化抗ヒト IgM、ABC 試薬 (Vector USA) を室温にて各 40 分間作用させた後 0.05 % diaminobenzidine-0.01 % H_2O_2 -50mM Tris HCl (pH 7.2) により呈色させた。Mayer の

hematoxylin 液にて後染色を行なった後、観察に供した。

4. 寒冷凝集試験

O 型成人末梢血液、O 型臍帯血液を採血し、生理食塩水で 3,000 rpm、5 分間 3 回洗浄した後、Mab の希釈液 0.5 ml と 0.25 % 血球浮遊液 0.1 ml を混合し、4℃ あるいは 37℃ に一夜静置後、赤血球凝集の有無を観察した。

5. 抗体吸収実験

吸収材料として射精精子、胎児血球は、精液、臍帯血液を各 3,000 rpm、5 分間 3 回遠沈洗浄して用いた。肝、腎組織は、ガラスホモゲナイザーにて磨砕後 10,000 rpm、20 分間遠沈した沈渣を用いた。約 20 名の pool した正常あるいは無精子症患者の精漿 (10,000 rpm、30 分間遠心上清) を、100 % 飽和硫酸で沈澱させ、十分透析後、凍結乾燥したものを用いた。また、精管結紮の数日後および 1 か月後に採取した精液 (前者は精子を 10^5 /ml、後者は数匹/1 回射精量を含んでいた) の精漿は同様に 100 % 飽和硫酸で沈澱させた分画を十分透析後を用いた。人乳も 100 % 飽和硫酸で沈澱させた分画を用いた。組織ホモジネートおよび細胞による吸収実験の場合、反応溶液中の遠沈沈渣の体積比が 1/2, 1/8, 1/32 になるように、また精子では 1/4, 1/16, 1/64 になるように Mab H6-3C4 を加えてよく懸濁した。H6-3C4 培養上清を SI_{50} 値が約 10 になるよう 500 倍希釈して用いた。精漿、人乳は 50 mg/ml から順次希釈し、250 倍希釈した H6-3C4 培養上清 (最終 SI_{50} 値は約 10) と等量ずつ混合した。4℃ で一夜吸収させた後遠沈し上清に残る抗体活性を微量精子不動化試験^{4,5)}によって調べた。

実験結果

1. 精子の蛍光染色

射精精子の生細胞を蛍光染色した場合、精子膜表面に強い蛍光が認められた (写真 1)。スライドガラス上に固定した場合にも精子全体に蛍光が認められた。

2. 男性生殖組織の組織染色

精巣の精細管、精巣上体頭部の精巣輸出管は全く染色されなかった。精巣上体体部の精巣上体管は染色されなかったが、尾部の精巣上体管が染色され、特に上皮細胞の不動毛に強い染色を認めた。精囊の上皮細胞表面にも染色を認めたが、前立腺は染まらなかった (写真 2)。3 例について調べたが、いずれも同様の結果を示した。

3. 正常一般体組織の組織染色

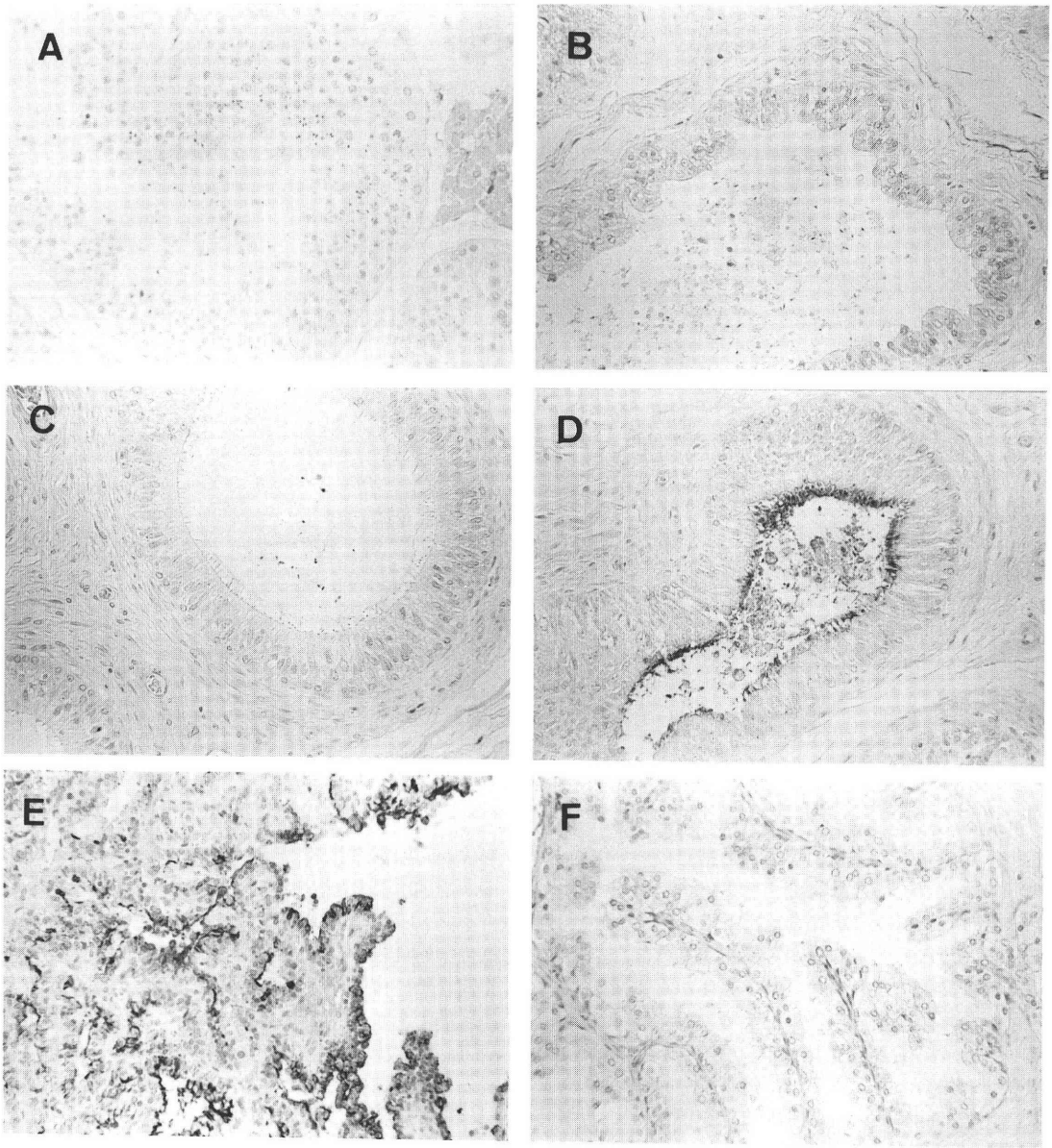


写真2 Immunohistochemical staining of male genital organ

A testis, B caput epididymis, C corpus epididymis, D cauda epididymis, E seminal vesicle, F prostate

腎の遠位尿管上皮、皮膚や食道の重層扁平上皮の基底細胞は染色された。肺胞上皮は軽度に染色された(写真3)。唾液腺では腺細胞は染まらなかったが導管は軽度に染色された。胃底部は表面上皮細胞の一部が染色された。胎盤トロホブラストのジンチウム細胞に染色が見られた。一方、肝、すい臓は染色されなかった。組織染色の結果を表1に示す。

4. 寒冷凝集反応

O型臍帯血球に対し、培養上清は×4まで寒冷凝

集が観察された。成人血球に対する凝集作用は全く観察されなかった(表2)。

5. 抗体吸収実験

Mab H6-3C4の精子不動化作用は、射精精子遠沈沈渣の体積比がMab上清に対して1/16のときは完全に、1/64でも80%まで吸収することができたが、肝や腎のホモジネート、臍帯血球では遠沈沈渣の体積比がMab上清に対して1/2でも精子不動化作用を吸収することはできなかった(図1)。正常あるいは

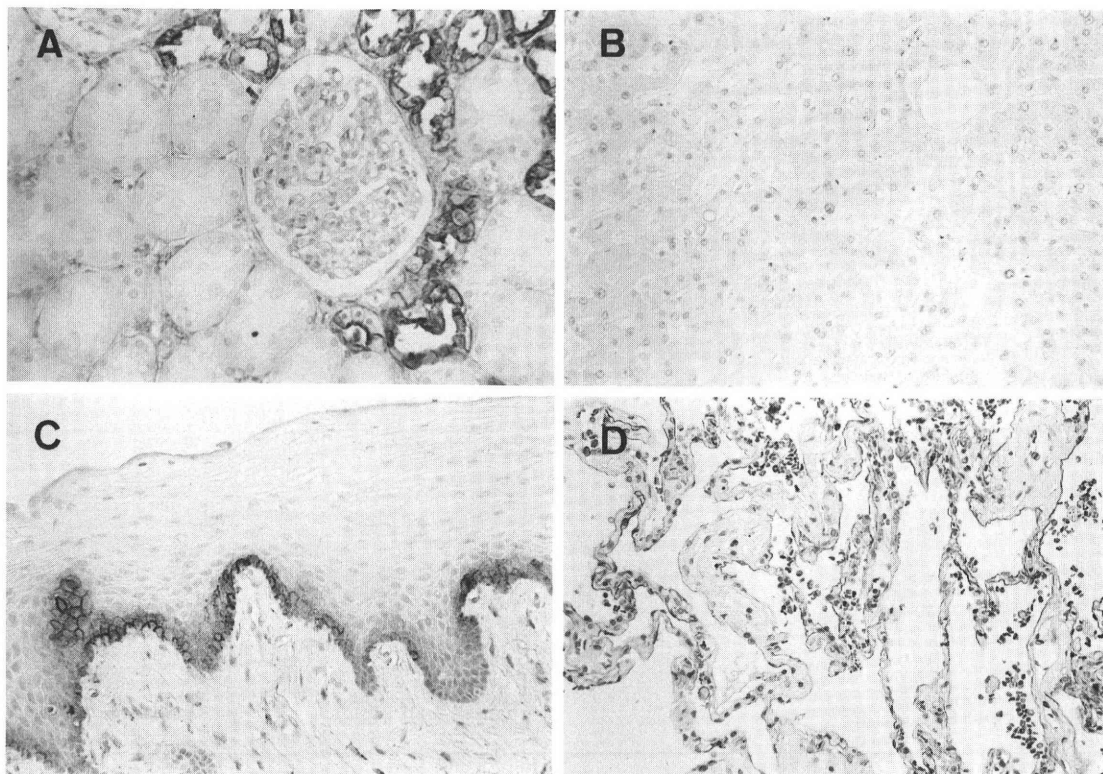


写真3 Immunohistochemical staining of somatic organ
A kidney, B liver, C skin, D lung

は無精子症の精漿および精管結紮の精漿について抗体吸収実験を行なった結果を図2に示す。用いた精管結紮数日後の精液には精子が 10^6 cell/mlみられた。さらに1か月後もわずかながら精子が見られた。これは、精管結紮により精巣、精巣上体からの精子の供給は断たれたが精管以降の生殖器にまだ残っていた精子と思われる。精管結紮後の精漿でMab H6-3C4を吸収した場合、正常あるいは無精子症精漿による吸収に比して同程度の抗体吸収結果を得る為には約10ないし100倍量の精漿を必要とした。

考 察

SI抗体保有不妊婦人の末梢血リンパ球とマウスミエローマの細胞融合により作製したMab H6-3C4は、精子に対して強い補体依存性精子不活化作用および精子凝集作用を示した。FITC標識抗ヒトIgMを用いた間接蛍光染色法でこのMabを用いて固定前の新鮮精子の抗原局在性を調べた結果から、このMabの対応抗原は精子膜表面全体に分布していることが判明した。

このMab対応抗原が精子上に出現するのは、精子

形成から射精されるに至るまでのいずれの時期であるかを調べるため、男性生殖組織のホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片を用いてABC法にて免疫組織化学的染色を行なった結果、精巣、精巣上体頭部や前立腺には抗原性は認められなかったが、精巣上体尾部上皮および精囊腺上皮表面に染色が見られた。一方、抗体吸収実験により精管結紮後に採取した精液と正常精液を比べたところ、Mabの精子不活化作用は精管結紮後の精漿では吸収力が顕著に減少していた。精管結紮した場合、その精液は精囊、前立腺、尿道球腺の分泌物から成り、精巣、精巣上体由来のものを含まないので、精子上のMab H6-3C4対応糖鎖抗原であるシアル化i抗原は、精巣内で精子が形成された時点ではまだ存在せず、精巣上体上皮で恐らくi抗原として産生・分泌され、上皮細胞表面か、尾部以下の精管内で、末端部にシアル酸が結合してシアル化i抗原となり、管を通過する間に精子細胞膜上に付着すると考えられる。さらに組織染色から精囊腺より分泌されるものなのか、精漿中の抗原が細胞表面に付着したものとするべきかは確定できないが、精管結紮後の射精精液中の抗原量が激減する

表1 Immunohistochemical detection of H6-3C4 antigen in normal tissue

Tissue	Staining
Genital organ	
Ejaculated spermatozoa	+ (whole)
Testis	—
Epididymis	+ (epithelium)
Seminal vesicle	+ (epithelium)
Prostate	—
Somatic organ	
Liver	—
Kidney	+ (distal tubule)
Lung	+ (alveolar cell)
Pancreas	—
Esophagus	+ (basal cell of squamous epithelium)
Skin	+ (basal cell of epidermis)
Salivary gland	— (secretory cell) ; + (duct cell)
Fundus of stomach	+ (surface epithelial cell)
Placenta villi (first trimester)	+ (trophoblast cell)

ことから考えて抗原産生は主に精巣上体が関与しているものと考えられる。

精巣上体は哺乳動物において精子が受精能を獲得する場所であり，ここを通過する間に，運動および代謝機能が射精精子に近い状態へと成熟変化すると考えられている。また，Magargee らは⁷⁾精子に対す

表2 Hemagglutination assay of Mab H6-3C4

Red blood cell	Temperature	Hemagglutination
Cord (O type)	4℃	× 4
	37℃	—
Adult (O type)	4℃	—
	37℃	—

Sperm immobilization (SI₅₀ 5,000)
Sperm agglutination (1 : 1,600 dilution)

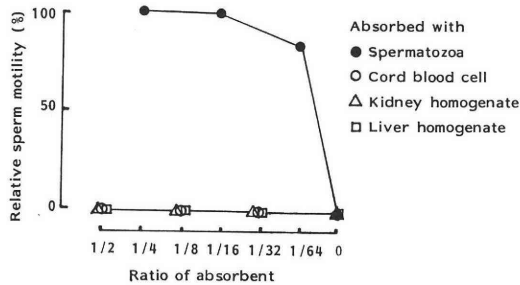


図1 Antibody absorption experiment with cells and tissue homogenates

る各種レクチンの結合様式が精巣上体を通過する間に著しく変化することを報告しており，精巣上体は精子膜表面へ新しい糖鎖が付加されるところでもある。従って，Mab H6-3C4 が抗原エピトープとして認識している糖鎖 i 抗原も精巣上体における精子成熟過程に関連して精子膜表面に新たに付着されるものであると考えられる。

i 抗原は箱守ら⁸⁾によって見出されたII型ネオラクトサミンで $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta\text{-Cer}$ の糖鎖構造を有し，胎児血球のほかに正常組織にも存在する。Hirohashi⁹⁾らは肺癌患者の局所リンパ節から作製したヒト型モノクローナル抗体 NCC-1004 が i 抗原を認識することを明らかにし，肺癌や食道癌組織中に抗原が表現されており，正常組織においては肺胞上皮，扁平上皮

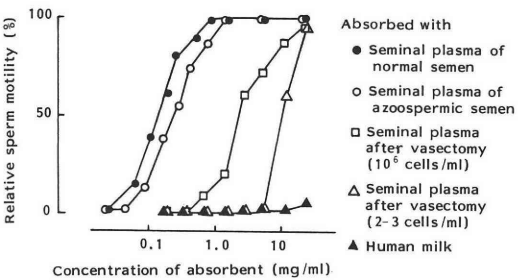


図2 Antibody absorption experiment with seminal plasma and human milk

(基底細胞)、腎遠位尿管等に抗原が検出されたと報告している。正常組織にける Mab H6-3C4 対応抗原の局在性は NCC-1004 と類似しており、また Mab H6-3C4 は弱いながら低温 (4℃) において O 型胎児血球に対し寒冷凝集作用を持っていた。

しかしながら、Mab H6-3C4 の精子不動化作用は精子では Mab との吸収反応液中の遠沈沈渣の体積比が 1/64 でも吸収できたが、組織染色で Mab H6-3C4 に対して抗原交叉性を示した腎のホモジネートや胎児血球では吸収における抗原と抗体溶液との体積比が 1/2 でも吸収することはできなかった。これは、組織中の抗原量が、精子精漿に比して少ないためか、または Mab H6-3C4 に対する結合性が弱いためとも考えられる。また、Mab H6-3C4 の胎児血球に対する寒冷凝集作用は弱く、かつ低温 (4℃) に限られ、25℃ および 37℃ にでは認められないのに対し、その精子不動化作用、精子凝集作用は温度に関係なく 25℃ または 37℃ においても顕著に見られた。

以上の点からみて、Mab H6-3C4 は正常組織に分布する i 抗原と反応はするが、極めて弱いものであり、精子にのみ特異的に強い結合性を有することが強く示唆された。

この Mab 作製の際に末梢血リンパ球を提供した精子不動化抗体陽性不妊婦人は、通常の医学的検査を反復行なっても腎、肝および他の臓器には病的所見は認められておらず、また自己免疫性溶血性貧血等の自己免疫性疾患も認められず、不妊であること以外には極めて健康な状態であった。この患者血中には Mab H6-3C4 に相応する精子不動化抗体が存在していることはすでに証明している。生体では、抗体が循環しているにもかかわらず、たとえ組織中に対応抗原が存在していても病的疾患をもたらすほどの強い抗原抗体反応を起こしていないと考えられるが、抗体の結合を防止する何らかの防御機能がはたっている、あるいは抗体結合の結果生じた補体結合物が循環血流によって容易に消失しているとも想定される。

Hirabayashi らは、メラノーマの細胞表面に表現されているガングリオシドを特異的に認識する Mab M2590 が、正常細胞の生体膜構成成分である G_{m3} ガングリオシドを対応抗原エピトープとしていること⁹⁾を報告した。このような現象は、細胞表面に表現されている抗原エピトープの三次構造がその特異的認識にとって重要であることを示唆している。細胞表面の抗原エピトープの密度¹⁰⁾や糖蛋白質抗原の場合はペプチドの構造の寄与が考えられる。Mab H6-3C4 も体組織中の i 抗原と酵素抗体法による免疫組織化

学的染色では反応する一方で、精子に対して特に高い特異的とも思われる反応性を持っている点が非常に興味深く思われる。

参考文献

- 1) Isojima, S., Kameda, K., Tsuji, Y., Shigeta, M., Ikeda, Y., Koyama, K.: Establishment and characterization of a human hybridoma secreting monoclonal antibody with high titers of sperm immobilizing and agglutinating activities against human seminal plasma, *J. Reprod. Immunol.*, 10: 67, 1987
- 2) Tsuji, Y., Clausen, H., Nudelman, E., Kaizu, T., Hakomori, S., Isojima, S.: Human sperm carbohydrate antigens defined by an antisperm human monoclonal antibody derived from an infertile woman bearing antisperm antibodies in her serum, *J. Exp. Med.*, 168: 343, 1988
- 3) Isojima, S., Koyama, K.: Quantitative estimation of sperm immobilizing antibody in the sera of women with sterility of unknown etiology: the 50% sperm immobilization unit (SI₅₀). *Recent Advances in Human Reproduction*, 10, Excerpta Medica, 1976
- 4) Isojima, S., Koyama, K.: Microtechnique of sperm immobilization test. In *Immunology of Reproduction* (Bratanov, K., et al. eds), 215, Bulgarian Academy of Science, 1976
- 5) 澤井英明, 柴原浩章, 巽 利昭, 小林真一郎, 横山一海, 繁田 実: 微量精子不動化試験による血中抗精子抗体の簡易測定, *産婦進歩*, 39: 637, 1987
- 6) Hirohashi, S., Clausen, H., Nudelman, E., Inoue, H., Shimosato, Y., Hakomori, S.: A human monoclonal antibody directed to blood group i antigen: heterohybridoma between human lymphocytes from regional lymphnodes of a lung cancer patient and mouse myeloma, *J. Immunol.*, 136: 4163, 1986
- 7) Magargee, S. F., Kunze, E., Hammerstedt, R. H.: Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation, *Biol. Reprod.*, 38: 667, 1988
- 8) Niemann, H., Watanabe, K., Hakomori, S., Childs, R. A., Feizi, T.: Blood group i and I activity of "lacto-N-norhexaosylceramide" and its analogues: the structural requirements for i-specificities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81: 1286, 1978
- 9) Hirabayashi, Y., Hamaoka, A., Matsumoto, M., Matsubara, T., Tagawa, M., Wakabayashi, S., Taniguchi, M.: Syngeneic monoclonal antibody against melanoma antigen with interspecies crossreactivity recognizes G_{m3}, a prominent ganglioside of B16 melanoma, *J.*

Biol. Chem., 260: 13328, 1985

- 10) Nores, G., Dohi, T., Taniguchi, M., Hakomori, S.: Density-dependent recognition of cell surface GM₃ by a certain anti-melanoma antibody, and GM₃ lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen, J. Immunol., 139: 1578, 1987

**Studies on tissue localization
of antigen epitope
corresponding to the human
sperm immobilizing and
agglutinating monoclonal antibody
(H6-3C4)**

Kinu Kameda, Yoshiyoki Tsuji,
Tadashi Takemura and Shinzo Isojima

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

The human monoclonal antibody (H6-3C4) with strong sperm immobilizing and agglutinating activities was produced from the hybridoma which was established by fusing peripheral blood lymphocytes from an infertile woman with mouse myeloma cells. The antigen epitope corresponding

to this Mab was identified as type II neolactosamine, i-antigen. In this paper we studied tissue localization of the antigen epitope, i-antigen corresponding to Mab H6-3C4, by immunohistochemical staining method and antibody absorption experiments.

In male reproductive tissues, epithelial cells of cauda epididymis and seminal vesicle were stained, but testis and prostate were not stained. In somatic tissues, distal tubules of kidney, basal cells of squamous epithelium, alveolar cells of lung and trophoblast cells of first trimester placenta villi were stained. Sperm immobilizing activity of Mab H6-3C4 was completely absorbed with washed ejaculated spermatozoa and seminal plasma. The antibody absorbing activity of human seminal plasma from normal men was much stronger than that from vasectomized men. Though distal tubules of kidney and cord blood cells express i-antigen, they failed to absorb the sperm immobilizing activity of Mab H6-3C4.

These results indicated that the antigen molecules corresponding to Mab H6-3C4 may mainly be produced in the cauda epididymis and adhered on spermatozoa. The antigen epitope corresponding to Mab H6-3C4 was expressed in somatic tissues but the binding affinity to Mab H6-3C4 may be weak.

(受付: 1989 年 9 月 20 日)

洗浄濃縮—凍結精子の非配偶者間人工授精への応用

Cryopreservation of Concentrated Human Sperm, and its Use to AID

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

小林 俊文 翁 文 開

Toshifumi KOBAYASHI W. K. WON

田 辺 清 男 飯 塚 理 八

Kiyoo TANABE Rihachi IIZUKA

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

東京医科大学市川総合病院産婦人科

兼 子 智 李 顕 銑

Satoru KANEKO LEE H. K.

小 田 高 久 大 野 虎 之 進

Takahisa ODA Toranoshin OHONO

Department of Obstetrics and Gynecology, Ichikawa General Hospital,
Tokyo Dental College, Chiba 272, Japan

1. 運動良好精子を選択的に濃縮し得る攪拌密度勾配法を用いて donor 精子を洗浄濃縮精子とした後 KS-II 精子凍結保存液と等量混合し、室温から 5℃ までは緩速冷却 (1℃/分)、5℃ 以下は急速凍結 (-30℃/分) した。

2. あらかじめ精子濃縮することにより、精子保存液添加による精子濃度低下を補償できた。攪拌密度勾配法を用いて調製した運動良好精子は耐凍性が高く、 $82 \pm 11\%$ の精子蘇生率を得、融解後の運動率は原精液を上回っていた。その結果、凍結融解後においてもほぼ原精液に匹敵する運動精子濃度が得られた。

3. 本研究で確立した洗浄濃縮—凍結保存法を AID に応用した結果、24 例の妊娠例 (妊娠率: 10.3%) を得ることに成功した。5 例が流産し、Follow up 不能が 1 例あったが、分娩に至った 18 例の妊娠経過に特記すべき事項はなく全例に正期産であり、児に外表奇形等の異常を認めなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 320-324, 1990)

緒 言

1949 年 Polge ら¹⁾が精子凍結保護剤としてグリセリンが有効であることを報告し、1953 年 Bunge, Sherman²⁾がドライアイスを用いてヒト精子を -70℃ で凍結保存、融解後に蘇生させることに成功したことは、凍結精液を人工授精に応用する端緒となった。

本邦では飯塚ら³⁾が 1958 年に凍結保存精液を用いた非配偶者間人工授精 (Artificial insemination with Donor's semen, AID) による分娩例を報告して以来、われわれは凍結保存法精液を AID に臨床応用してきた⁴⁾。現在までに凍結保存精液を用いた AID により 300 例以上の分娩例を得ている。

従来行なわれてきた精液凍結法は精子保存液添加

表1 80%等張 Percoll 液の調製法
溶 液 I

Hepes	4.7 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	0.05g
KH ₂ PO ₄	0.06g
NaHCO ₃	0.8 g
グルコース	1.0 g

蒸留水 100ml
IN NaOH で pH7.4

溶 液 II

MgCl ₂	0.05g
MgSO ₄	0.05g
CaCl ₂	0.14g

蒸留水 100ml

Percoll	80ml
溶液 I	10ml
溶液 II	10ml
ヒト血清アルブミン	0.1g
抗生物質 (ABPC, LMOX)	各1.0mg

80%等張 Percoll 100ml

による精子濃度減少, 凍結融解過程における精子運動率の低下などにより運動精子数が減少 (精子妊孕精の劣化) するという問題点を有しており, その妊娠率は新鮮精液を用いた場合と比べ必ずしも満足すべきものではなかった。

われわれは前報^{5,6)}において Percoll⁷⁾を用いた遠心分離法を応用してあらかじめ精子洗浄濃縮を行うことにより凍結保存液添加による精子濃度低下を補償できること, またプログラムフリーザーを用いて凍結を行うことにより融解後において高い精子蘇生率が得られることを示した。

本論文は攪拌密度勾配法⁸⁾により調製した洗浄濃縮精子を凍結保存し, AID への応用を試みた。

方 法

精子調整法

精液は4日間禁欲後に用手的に採取し, 約30分間室温で液化した。精子数はトーマ氏血球算定盤を用い, 精子運動率は鏡検法により測定した。

精子洗浄濃度に用いる80%等張化 Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 調製法を表1に示した。ミリポアフィルター (0.45 μm) で

表2 AID 妊娠例における洗浄濃縮前後, 凍結融解後の精子性状

	精子濃度 (X10 ⁶ /ml)	運動率 (%)
原精液	69±14	67±10
(Donor 精液)		87±6.2
洗浄濃縮精子	142±32	87±6.2
凍結融解精子	71±16	71±12

n = 24

ろ過滅菌した後4℃で保存し, 使用時には約30℃に加温した。凍結保存に供する精子の洗浄濃度には, 運動精子の選択的濃縮が可能な攪拌密度勾配法⁸⁾を用いた。80% Percoll 6.0 ml に射精精液全量を層積した後, Percoll 層の上半分と精液をL型攪拌棒を用いて数度攪拌し, 連続密度勾配を作製した。シングアウトローターを用いて400 Xg, 30分間遠心分離すると, 運動良好精子は沈澱中に選択的に濃縮されるので, 上層を捨て0.5 ml に再懸濁した。

精子凍結保存

洗浄濃縮精子の凍結保存にはKS-II 精子保存液^{5,6)}を用いた。洗浄濃縮精子に等量のKS-II 精子保存液を混和した後0.5 ml プラスチックストロー (富士平工業製) に充填し, ポリエチレングリコールパウダーで封入した。ストローはプログラムフリーザー (大阪酸素製) のチャンパーに垂直に装着し, 室温から5℃までは-1℃/分で冷却し, 5℃から-100℃までは30℃/分で急速凍結を行った。試料温度が-100℃に達したら約10分間ホールドし, その後液体チソタンク中で保存した。融解はストローを微温湯 (約30℃) に投入して行い, 約10分間保温した。精子蘇生率 (%) は凍結融解後の運動率を洗浄濃縮精子の運動率で除し, 100倍して求めた。

人工授精

Donor 精液は精液検査後, 血液型別 (A, B, AB, O) に分類し, 攪拌密度勾配法により洗浄濃縮, 凍結保存した。排卵日の推定には基礎体温, 子宮頸管粘液, 経膈プローブ超音波診断法による卵胞計測, 尿中あるいは血中 LH 等を指標とした。凍結精子は融解後, 約0.5 ml を飯塚式授精針で緩徐に子宮腔内に授精した。授精後20分間安静を指示し, 抗生物質を服用させた。

結 果

前報^{5,6)}において確立した洗浄濃縮-凍結保存法をAIDに供する精子の調製に臨床応用し, その有用精を検討した。不妊を主訴として慶応義塾大学病院産婦人科を受診し, AIDの対象となった232症例 (32±

表3 凍結精子による妊娠例の新生児所見

症例	年齢	在胎週間	分娩様式	生下時体重(g)	性別	奇形	備考
1	30	39.0	V	3500	♂	(-)	
2	32	38.0	V	2720	♀	(-)	
3	29	41.3	V	3702	♀	(-)	
4	31	39.4	V	3542	♂	(-)	
5	26	38.4	V	3855	♂	(-)	
6	24	38.0	V	2884	♀	(-)	
7	26	38.5	V	3290	♂	(-)	
8	29	38.3	CS	3194	♂	(-)	
9	27	40.0	V	4170	♀	(-)	
10	24	40.6	V	3090	♀	(-)	
11	22	37.3	V	2814	♀	(-)	
12	22	37.4	V	① 2580 ② 2018	♀ ♀	(-)	双胎
13	35	39.5	V	3574	♂	(-)	
14	23	38.2	V	2880	♂	(-)	
15	35	40.2	CS	2975	♀	(-)	
16	33	38.5	CS	3150	♀	(-)	
17	29	39.3	V	3390	♂	(-)	
18	25	39.1	V	1060	♂	(-)	
28±4.2		39±1.0		3175±496			

3.8歳, 不妊期間 67±37 ヵ月) に延べ 440 周期施行した。対象症例はいずれも新鮮精液による AID を 2～21 周期施行したが妊娠せず, 洗浄濃縮-凍結保存精子を用いた AID を 1～2 周期 (平均 1.9 周期) 試みた。その結果, 24 例の妊娠例が得られ, 妊娠率は 10.3% であった。表 2 は妊娠例における洗浄濃縮前後および凍結融解後の精子性状を示している。Donor 精液 ($69 \pm 14 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率 $67 \pm 10\%$) に攪拌密度勾配法を施行した結果, 精液性状は $142 \pm 32 \times 10^6/\text{ml}$, $87 \pm 6.2\%$ に向上した。凍結融解後においても $71 \pm 12\%$ の運動率を保持しており, 蘇生率は $82 \pm 11\%$ であった。

妊娠した 24 例のうち 5 例が流産し, 1 例が Follow up 不能であった。表 3 に分娩に至った 18 例をまとめた。いずれも妊娠経過に特記すべき事項はなく, 全例が正期産であり 3 例が帝王切開にて分娩した。1 例が双胎であった。生下時体重は $3175 \pm 496 \text{ g}$, 性比は (♂:♀) 9:10 であり, 外表奇形等の異常を認めなかった。

考 察

従来凍結保存精液は AID において被授精者の血液型に合致する新鮮 Donnor 精液を毎常用意できない場合における精液備蓄の観点から臨床応用されてきた。教室におけるヒト精子の凍結保存は, 当初ドライア

イス-アルコールを用いた-70℃保存が行われていたが^{3,9)}が, Nakada は 1969 年液体チッソ凍結を導入して 3 例の妊娠例を報告した¹⁰⁾。さらに真井は精子蘇生率の向上を目的として基礎的検討を行い, KS 精子保存液を直接精液に添加して液体チッソ蒸気中を下降させて凍結する方法で 50～60% の精子蘇生率を得ている¹¹⁾。これまでに 300 例以上の分娩例を得ているが, 精子保存液による希釈, 凍結融解過程における精子運動率の低下 (精子蘇生率が 50% のとき精子保存液による希釈のため運動精子濃度は原精子の約 1/4 に低下してしまう) などにより, その妊娠率は新鮮精液を用いた場合と比べ満足すべきものでなかった。われわれは前報^{5,6)}において, 凍結精液の妊娠性向上策として, 精子をあらかじめ濃縮して精子保存液添加による精子濃度低下を補償するとともに高い蘇生率を得ることが有用であることを示した。

密度 1.10 g/ml に相当する 80% Percoll に直接精液を層積し, L 型攪拌棒を用いて連続密度勾配を作成する攪拌密度勾配法は簡便であり, 精子濃縮と同時に運動率の向上が可能である。われわれは本法を精子減少症, 精子運不良例の AIH に応用した結果, これまでに 47 例の妊娠例 (妊娠率 31%) を得ており¹²⁾, 精子洗浄濃縮が精子妊娠性向上に有用であることを報告した。本研究においても表 2 に示したように, 凍結保存に供する精子をあらかじめ濃縮することに

より凍結保存液添加による精子濃度低下を補償できた。

近年、精子の凍結にはプログラムフリーザーが繁用されるようになり種々の精子凍結プログラムが報告されてきたが^{13,14,15)}、前報^{5,6)}において洗浄濃縮精子をKS-II精子保存液を用いて凍結するのに最適な凍結条件を検討した結果、室温から5℃までは緩速(1℃/分)、5℃以下は急速(-30℃/分)に凍結した場合に80%以上の精子蘇生率が得られた。本研究においても精子洗浄濃縮精子をプログラムフリーザー凍結した結果、82±11%の精子蘇生率が得られ、融解後においても原精液に匹敵する精子妊孕性を保持できた。攪拌密度勾配法により選別した運動良好精子は耐凍性が高く、凍結保存に適していた。

洗浄濃縮一凍結保存法の有用性を検討するため本法をAIDに応用した結果、24例の妊娠例を得ることができた。これまで報告されてきた凍結精液を用いたAIDの成績は、授精周期数、排卵モニター、さらには患者背景等がまちまちであり妊娠成績をいかに比較することはできないが、飯塚らは凍結精子を用いたAIDの妊娠率は8.1%であり、妊娠例数の累積度数分布は1周期で16.5%(妊娠率1.3%)、2周期で30%(5.4%)であったと報告している^{9,16)}。本研究における対象症例が新鮮精液を用いたAIDを2から21周期施行して妊娠しなかった症例であったことを考慮すると、洗浄濃縮一凍結保存精子を用いたAIDを1ないし2周期(平均1.9周期)施行した結果、24例(妊娠率10.3%)の妊娠例が得られたことは、本研究において試みた凍結保存法の改良により融解後においても高い精子妊孕性が維持されていたことを示唆していると考えられる。

文 献

- 1) Polge, G., Smith, A. U., Parkers, A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature*, 164: 666, 1949
- 2) Bunge, R. G. and Sherman, J. K.: Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa, *Nature*, 172: 767, 1953
- 3) 飯塚理八, 沢田喜彰: 凍結保存人精子による人工授精成功例, *日不妊誌*, 3: 241, 1958
- 4) 飯塚理原, 小林俊文: ヒト精子凍結保存と人工授精への応用, 現代産婦人科学大系, 年間追補, 45, 中山書店, 1979
- 5) 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授精の妊娠率向上のポイント, 産婦人科の実際, 36: 1897, 1987
- 6) 翁文開, 小林俊文, 兼子 智, 李顕銑, 飯塚理八: 洗浄濃縮精子の凍結保存に関する研究, *日不妊誌*,

33: 639, 1198

- 7) Pertoft, H., Hirtenstein, M. and Kagedal, L.: Cell separations in a now density gradient medium, *Percoll*. In *Cell Populations Methodological Surveys (B) Biochemistry*, 9: 67, Ellis Horwoods Ltd., 1979
- 8) Kaneko, S., Sato, H., Kobanawa, K., Oshio, S., Kobayashi, T., Iizuka, R.: Continuous-step density gradient for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen, *Arch. Androl.*, 19: 75, 1987
- 9) 飯塚理八, 沢田喜彰: 精液銀行(精液の永久保存), 産婦人科治療, 4: 689, 1962
- 10) Nakada, T.: Studies on the preservation of human spermatozoa by using a liquid nitrogen refrigerator, *Jap. J. Fert. Ster.*, 14: 212, 1969
- 11) 真井徳幸: ストロー法によるヒト精子凍結保存の研究, *日不妊誌*, 26: 132, 1981
- 12) Sato, H., Kaneko, S., Ohyama, T., Yamaguchi, M., Kobayashi, T., Iizuka, R.: Improved semen quality following a continuous-step density gradient centrifugation; its efficacy in artificial insemination, 117, in abstract of VIth World Congress of Human Reproduction, 1987
- 13) Tayler, P. J., Wilson, J., Laycook, R., Weger, J.: A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen, *Fertil. Steril.*, 37: 100, 1982
- 14) Mahadevan, M., Torounson, A. O., Leeton, J. F.: Successful use of human semen cryobanking for *in vitro* fertilization, *Fertil. Steril.*, 40: 340, 1983
- 15) Harrison, R. A.: A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa, *J. Repros. Fert.*, 151: 241, 1976
- 16) 飯塚理八, 小林俊文: 性細胞凍結とその産婦人科領域への応用, 産婦人科の世界, 24: 25, 1972

Cryopreservation of concentrated human sperm, and its use to AID

Toshifumi Kobayashi, W. K. Won, Kiyoo Tanabe, and Rihachi Iizuka

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

Satoru Kaneko, Lee H. K.,
Takahisa Oda, Toranoshin Ohono

Department of Obstetrics and Gynecology,
Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College
Chiba 272, Japan

To compensate the sperm dilution by adding a cryo-medium, human semen were washed and concentrated prior to freezing by means of the continuous-step density gradient, which was capable of separating progressively motile sperm. The processed sperm was mixed with KS-II cryo-medium, and then frozen by using the programmable biological freezer at the rates of $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (room temperature to 5°C), $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (5°C to -100°C).

The concentration of sperm prior to freezing

compensated sperm dilution with cryo-medium. The mean sperm survival rates was found to be $82 \pm 11\%$. Therefore, the post thaw fertility index (sperm concentration/ml $\times$ sperm motility % $\times 10^{-8}$) was comparable to those of original semen or even more.

The present procedure was applied to 232 infertile couples who directed AID. After 440 insemination cycles, 24 successful pregnancies were obtained, where 18 cases were terminated at full term delivery, 1 case was loss of follow up and 5 cases were aborted. Non of the newborns noticed abnormality. The pregnancy rate of 10.3% suggested the usefulness of the present procedure.

(受付: 1989 年 7 月 22 日)

配偶者間人工授精 (AIH) の適応における精液所見と 精子機能テスト (Hypoosmotic swelling test)

Study on the Semen Analysis and Hypoosmotic Swelling Test at Artificial Insemination with Husband's Semen

島根医科大学医学部産科婦人科学教室

吉野 和男 高橋 健太郎 内田 昭弘
Kazuo YOSHINO Kentaro TAKAHASHI Akihiro UCHIDA
草刈 万寿夫 真鍋 敦 北尾 学
Masuo KUSAKARI Atsushi MANABE Manabu KITAO

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

男性因子により3回以上の配偶者間人工授精(AIH)を施行した患者にその都度 hypoosmotic swelling test (HOST) を施行し、その関連性を検討し、以下の結果を得た。1) AIH 施行患者の精液所見で運動精子濃度が $36 \times 10^6/\text{ml}$ 以下であった回数は全回数の 62.3% を占めていた。また、妊娠症例の妊娠時の精液所見はそれ以外の時に比べて大きな変化は認められなかった。2) 妊孕性の確認できている男性の精液所見は AIH 施行患者の精液所見に比べて良い結果であった。3) AIH 施行患者の HOST の結果は妊孕性の確認できている男性の HOST の結果に比べて有意な低値であった。また、AIH 施行患者のうち妊娠症例の妊娠時の HOST の結果は他の周期に比べて良い結果であった。以上の事より、AIH 施行時の精子機能の評価は精液所見よりも HOST の結果の方が有用であると推察された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 325-328, 1990)

緒 言

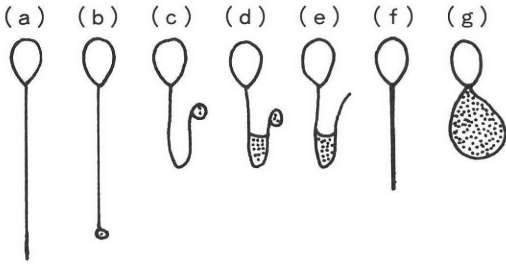
配偶者間人工授精 (AIH) は男性側の不妊因子としての精子減少症、精子運動率低下や女性因子としての頸管因子などに対する治療法として用いられている。しかし、AIH が IVF-ET や GIFT に比べて簡便に施行できる点においては問題のないところであるが、男性側の不妊因子に対する治療手段としての有用性に関しては必ずしも満足のいく成績が得られているとはいえない。その理由として、AIH が必要と思われる症例においても自然妊娠することが認められたり、同一個人内においての精液所見の変動、治療施設による適応、手技の相違などいろんな要素によりその評価が一定でないことが挙げられる。Hypoosmotic swelling test (HOST) は 1984 年、

Jeyendran et al¹⁾により報告され、精子の尾部細胞膜の機能をもとにして、精子受精能力を判定しようとするものである。今回、当科を受診し、男性因子により3回以上の AIH を施行した患者に、その都度 HOST を施行し、その関連性を検討したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

研究対象及び方法

1) 研究対象：当科不妊・内分泌外来を受診し、精子減少症、精子運動率低下などの男性因子により3回以上 AIH を施行した患者 10 名 (AIH 群) を対象とし、妊孕性の確認ができている男性 10 名 (コントロール群) を対照とした。

2) 精液所見：当科では正常精液所見を精液量 2 ml 以上、総精子濃度 $60 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、精子運動率 60



a : no change
b—g : various types of tail changes

図1 hypoosmotic swelling test における精子尾部膨化の模式図
(Jeyendran et al. 1894¹⁾)

表1 AIH 施行患者の精液所見

症例	総精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子運動率 (%)	運動精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)
1	71.0 $\pm$ 39.1	51.0 $\pm$ 24.1	40.8 $\pm$ 28.8
2	101.2 $\pm$ 38.6	64.4 $\pm$ 17.3	63.3 $\pm$ 23.4
3	40.8 $\pm$ 20.4	47.3 $\pm$ 7.8	19.3 $\pm$ 9.7
4	55.2 $\pm$ 30.1	44.1 $\pm$ 20.6	23.8 $\pm$ 20.4
5	82.0 $\pm$ 54.0	32.5 $\pm$ 21.2	24.0 $\pm$ 18.2
6	106.3 $\pm$ 26.0	51.3 $\pm$ 23.5	59.4 $\pm$ 27.4
7	37.3 $\pm$ 8.7	73.1 $\pm$ 10.3	28.7 $\pm$ 9.5
8	33.3 $\pm$ 21.7	21.1 $\pm$ 8.6	5.3 $\pm$ 1.8
9	60.9 $\pm$ 38.6	31.3 $\pm$ 16.1	22.6 $\pm$ 18.3
10	11.8 $\pm$ 9.3	43.7 $\pm$ 17.2	4.3 $\pm$ 4.0
平均	62.8 $\pm$ 44.0	46.4 $\pm$ 22.1	31.7 $\pm$ 28.4

表2 妊娠症例の精液所見と HOST の結果

症 例	精液所見			HOST	
	総精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子運動率 (%)	運動精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	総精子膨化率 (%)	g type 精子膨化率 (%)
4	1) 51	60.8	31	35.0	10.0
	2) 21	28.6	6	28.7	11.1
	3) 89	5.6	5	17.0	7.0
	4) 32	50.0	16	47.0	33.0
	5) 102	63.7	65	51.0	26.0
	6)* 36	55.6	20	60.0	31.0
7	1) 26	62.9	18	46.2	14.1
	2) 47	87.2	41	35.2	27.6
	3)* 39	69.2	27	65.5	38.1
8	1) 12	25.0	3	41.5	7.5
	2) 48	14.6	7	42.3	13.5
	3) 61	11.5	7	35.0	12.0
	4)* 12	33.3	4	52.6	26.4

*：妊娠周期

%以上、精子奇形率 15 %以下としているが、対象とした症例の AIH の適応は初診時に運動精子濃度 $36 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の精液所見を呈した症例である。

3) HOST の方法：150 mOsmol の低浸透圧となる溶液を作成し、30～60 分間、37℃、5 % CO_2 in air 下で incubate した後倒立位相差顕微鏡下 ($\times 400$) で顕鏡した。

4) HOST の判定：図 1 に示すように a～g type までの 7 種類の型の精子が認められるので、total 100 以上の精子を算定し、それぞれの type の割合を算出した。なお、a type は変化がなく、b～g type は精子の尾部が膨化していると判定した。

研究結果

1) AIH 群の精液所見：AIH を施行した患者では、AIH の回数は 3～9 回であり平均の総精子濃度は $62.8 \pm 44.0 \times 10^6/\text{ml}$ (mean $\pm$ S. D.)、精子運動率は 46.4 ± 22.1 %、運動精子濃度は $31.7 \pm 28.4 \times 10^6/\text{ml}$ であった。そして、運動精子濃度が $36 \times 10^6/\text{ml}$ 以下であった回数は全回数の 62.3 %を占めていた(表 1)。一方、AIH による妊娠は症例 4、7、8 で認められ、妊娠時の精液所見は、その患者の妊娠成立が認められない周期に比べて大きな変化は認められなかった(表 2)。

2) コントロール群の精液所見：総精子濃度は $115.6 \pm 47.0 \times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率は 78.3 ± 127.3 %、運動精子濃度は $86.1 \pm 26.4 \times 10^6/\text{ml}$ であり、AIH 群の精液所見に比べて有意な高値を示した。

表3 AIH施行患者のHOSTの結果

症例	総精子膨化率(%)	g type 精子膨化率(%)
1	54.6±10.4	17.7± 5.3
2	59.4± 8.4	33.9±15.1
3	40.6±10.3	16.9± 5.9
4	39.8±14.4	19.7±10.6
5	58.7± 7.4	23.0± 4.2
6	48.6±14.8	14.1± 6.4
7	49.0±12.5	26.6± 9.8
8	42.9± 6.3	14.9± 7.0
9	49.4± 9.6	21.4± 7.4
10	19.2± 7.2	6.5± 2.6
平均	45.6±16.0	19.3±11.6

3) AIH群のHOSTの結果: AIH群のHOSTの結果は、総精子膨化率が45.6±16.0%, g type 精子膨化率が19.3±11.6%であり、コントロール群の総精子膨化率(57.6±7.9%)及びg type 精子膨化率(23.8±5.0%)に比べて共に有意に低値であった(表3)。また、AIH群のうち妊娠症例の妊娠時のHOSTの結果は他の周期に比べて高い値であった(表2)。

考 察

男性不妊、特に乏精子症に対する治療法としてAIH, IVF-ET, GIFTなどがあり、その有用性についての報告は多い^{2,3,4)}、しかし、IVF-ET, GIFTはどの施設でも容易に施行できる訳ではなく、大多数の施設では現在なお乏精子症に対してAIHを施行しているのが現状である。しかし、その妊娠率は低く、現在では精子を調整してからAIHを行うことがbetterであると報告されており星ら⁵⁾は精子静置法(layering method)により、受精能を有している良好精子だけを精液中から効率よくとり出し、人工授精を行い良好な成績を得ている。また、真田ら⁶⁾は密度勾配遠心蔗糖重合体を用いた精子洗浄濃縮法を報告しており、我々も以前に精子swim up 洗浄濃縮法を用いたAIHの有用性について報告した^{7,8)}。鮫島ら⁹⁾も精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の患者群では $10 \times 10^6 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ の患者群と比べて妊娠率は有意に低く、AIHを施行する際に精液の性状をできるだけ改善しておくことがAIHの成績の向上につながると報告している。一方、AIHの有用性についての否定的な意見もある。中谷ら¹⁰⁾は精子濃度 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以下をAIHの適応として検討すると $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の群にAIH成功例がなく、逆に $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の群でも自然妊娠が存在した。さらに $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群で自然妊

娠例が多く、特に $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群では全例自然妊娠したことより精子過少症においてAIHの有用性を確認することは出来なかったと報告している。また、Russel¹¹⁾はAIHが妊娠の機会を増す証拠はなく、精液に対する人為的操作は精子のqualityを落とすことからむしろ逆効果であると報告している。さらに精子数あるいは運動率が低下している場合、性交の方がAIHよりも妊娠のチャンスがあるという報告¹²⁾や同一個人での検査値の変動の大きさを指摘し、多くの研究はこの“自然治癒”を考慮せず、生じた妊娠はすべてAIHに帰していると批判している報告¹³⁾もある。今回の検討でも男性因子によるAIHで妊娠が成立した症例の精液所見は妊娠の成立しなかった症例に比べて大きな変化はなく、また、妊娠が成立した症例においても妊娠成立周期と妊娠の成立しなかった周期と比べても大きな変化は認められなかった。そして、妊娠症例における精液検査所見も一定の傾向はみられず、精液所見よりのAIHの適応は明らかでなかった。

ヒト精子は受精能獲得過程を経て、先体反応を起こし透明帯を通過し、卵実質内に侵入し、雄性前核を形成し受精に至る。HOSTは、1984年Jeyendran et al.¹¹⁾により開発された精子受精能力検査である。これは、精子の尾部が低浸透圧負荷で膨化することにより、精子尾部細胞膜機能より精子の受精能力を判定しようとするものである。このHOSTに関してChan et al.¹⁴⁾は一般精液所見と比較検討し、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率40%を基準として、その前後で正常・異常精液所見に分け、その精子膨化率を比較してみると、それぞれの精子膨化率に有意差があると報告している。また、Van der Ven et al.¹⁵⁾はヒト体外受精において、受精した精子のほとんどは精子膨化率60%以上であり、受精しない精子の精子膨化率はほとんどが60%以下で、HOSTは受精に関する能力の指標になると報告している。当科においても一般精液検査との比較検討の結果、ある程度HOSTは一般精液検査と関連が認められた¹⁶⁾。また、妊孕性の確認出来ている男性より基準値(総精子膨化率42%, g type 精子膨化率14%)を設定してみると¹⁷⁾、今回の妊娠症例の妊娠成立周期のHOSTの結果はすべて基準値以上であった。さらに、妊娠成立周期の精液所見が必ずしもその症例中最も良い値ではないのに対して、HOSTの結果は症例4のg type 精子膨化率を除いて一番良い値であった。以上のことよりHOSTは外来で手軽に行え、一般精液検査との関連性もあるので妊娠成立に必要な精子の受精機能としてのHOSTの結果を参考にするにはAIHの

際に極めて有用であると思われる。

文 献

- 1) Jeyendran, R. S., Van-der-Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. and Zanevelds, L. T. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other characteristics, *J. Reprod. Fertil.*, 70: 219, 1984
- 2) Yoshino, K., Takahashi, K., Ryuko, K., Kusakari, M. and Kitao, M.: Clinical application of the swim-up and washing of human spermatozoa and a new device for intrauterine insemination, *Int. J. Fertil.*, in press
- 3) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 淡路英雄, 松山毅彦, 藤井明和: IVF, GIFT の現状と問題点, *日産婦誌*, 40: 101, 1988
- 4) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 松山毅彦, 宮川和子, 藤井明和: 配偶子卵管内移植 (GIFT) の成績, *産婦世界*, 38: 721, 1986
- 5) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 斎藤 晃, 鈴木雅州, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行っている精子静置法 "layering method" による精液中からの良好精子の分離, *日不妊会誌*, 28: 101, 1983
- 6) 真田利男, 小林俊文, 兼子 智, 小堀 清, 飯塚理八: 密度勾配遠心蔗糖重合体を用いた精子洗浄濃縮法の AIH への応用, *日不妊会誌*, 28: 267, 1983
- 7) 吉野和男, 柳光寛二, 草刈万寿夫, 白井孝昭, 西垣 新, 高橋健太郎, 北尾 学: 当科で施行している精子 swim up 洗浄濃縮法を用いた AIH の有用性に関する研究, *日不妊会誌*, 33: 225, 1988
- 8) 西垣 新, 高橋健太郎, 草刈万寿夫, 吉野和男, 白井孝昭, 北尾 学: 当科で施行している精子 swim up 洗浄濃縮法及び MAKLER INSEMINATION DEVICE を用いた AIH の有用性に関する検討, *産婦実録*, 投稿中
- 9) 鮫島義弘, 上浦祥司, 亀田 隆, 大橋一友, 古山将康, 東 千尋, 松崎 昇, 根来孝夫, 佐治文隆, 谷澤 修: 当科不妊外来における 14 年間検査・治療成績の検討—AIH を中心として—, *日不妊会誌*, 33: 77, 1988
- 10) 中谷一夫, 星合 昊: 精子過少症に対する配偶者間人工授精 (AIH) の有用性に関する検討, *日不妊会誌*, 32: 72, 1987
- 11) Russel, J. K.: Artificial insemination (husband) in the management of childlessness, *Lancet.*, 2: 1223, 1960
- 12) Dixon, R. E.: Buttram, V. C. Jr. and Schum, C. W.: Artificial insemination using homologous semen: A review of 158 cases, *Fertil. Steril.*, 27: 647, 1976
- 13) Glass, R. H. and Ericsson, R. J.: Spontaneous cure of male infertility, *Fertil. Steril.*, 31: 305,

1979

- 14) Chan, S. Y. W., Fox, E. S., Chan, M. M. C., Tsoi, W., Wang, C., Tang, L. C. H., Tang, G. W. K. and Ho, P.: The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis and the human sperm Zona-free hamster ovum penetration assay, *Fertil. Steril.*, 44: 668, 1985
- 15) Van-der-Ven, H. H., Jeyendran, R. S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, L. and Zaneveld, L. J. D.: Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and *in vitro* fertilization, *J. Androl.*, 7: 190, 1986
- 16) 吉野和男, 高橋健太郎, 草刈万寿夫, 内田昭弘, 白井孝昭, 西垣 新, 山崎裕行, 北尾 学: 精子機能テストとしての hypoosmotic swelling test と一般精液検査との関連性について, *日不妊会誌*, 34: 101, 1989
- 17) 吉野和男, 高橋健太郎, 白井孝昭, 西垣 新, 内田昭弘, 北尾 学: 異常精液患者における精子機能テスト (Hypoosmotic swelling test) に関する研究, *日産婦誌*, 41: 149, 1989

Study on the semen analysis and hypoosmotic swelling test at artificial insemination with husband's semen

Kazuo Yoshino, Kentaro Takahashi,
Akihiro Uchida, Masuo Kusakari,
Atsushi Manabe and Manabu Kitao

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

We studied the relationship between the routine semen analysis at artificial insemination with husband's semen (AIH) due to poor semen analysis and hypoosmotic swelling test (HOST). The results were as follows: 1) sixty-two point three per cent of total AIH was under $36 \times 10^6/\text{ml}$ of motile sperm concentration. There was no significant difference of routine semen analysis at a pregnant cycle in the pregnant cases. 2) The routine semen analysis of 10 fertile men was better than that of poor semen analysis. 3) The results of HOST of 10 fertile men were better than those of poor semen analysis. The results of pregnant cycle with poor semen analysis were better in pregnant cases of poor semen analysis. We suggest that HOST is a useful test for sperm integrity at AIH.

(受付: 1989 年 6 月 12 日)

八味地黄丸の乏精子症に対する効果

Clinical Effects of Hachimijiougan on Oligozoospermia

鹿児島大学医学部産婦人科

森 明 人	堂 地 勉	山 元 慎 一
Akito MORI	Tsutomu DOUCHI	Shinichi YAMAMOTO
竹 内 一 浩	福 元 清 吾	沖 利 通
Kazuhiro TAKEUCHI	Seigo FUKUMOTO	Toshimitsu OKI
	永 田 行 博	
	Yukihiro NAGATA	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, Kagoshima University,
Kagoshima 890, Japan

乏精子症患者 51 例に対し八味地黄丸を連日投与したところ 11 例 (21.5%) に妊娠の成立をみた。累積妊娠率では 80% が投与開始 3 ヶ月以内に妊娠した。投与後、精子濃度を詳細に追跡できた 27 例 (妊娠群 10 例, 非妊娠群 17 例) のうち 15 例 (55.6%) で精子濃度の改善をみた。また軽度乏精子症 ($10 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$) に対しては 76.5% (13/17) で臨床的に有効であったのに対し高度乏精子症 ($10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下) では 30% (3/10) の有効率でしかなかった。この臨床的有效例 16 例において、投与前の値を 100% とすると、精子濃度では投与後は $350 \pm 150(\%)$ と著明な改善を見たが、運動率は $130 \pm 30(\%)$ でそれほど著明には改善しなかった。

以上から八味地黄丸は乏精子症に対して有効であることが認められた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 329-333, 1990)

はじめに

最近の不妊症治療の進歩は著しい。しかし、それらの多くが女性側の不妊因子に対するものである。これに対し、男性不妊症ではその 70-80% を占める特発性造精機能障害の治療は必ずしも良好な成績を挙げていない。今後、不妊症の治療成績を向上させるには乏精子症などの造精障害に対する治療法の確立がますます重要になるものと思われる。

最近は多くの疾患に漢方薬が使用されている。婦人科領域においても例外ではなく、とくに排卵障害や更年期障害によく使用されている。また男性不妊症の多くを占める乏精子症にも使われ、有効であったという報告も見られる。

今回、われわれは乏精子症患者を対象に八味地黄丸を投与し、良好な成績を得たので若干の考察を加え報告する。

対象と方法

1985 年 12 月より 1988 年 12 月までの 3 年間に、鹿児島大学医学部産婦人科不妊外来で診断を受けた乏精子症患者 51 例を対象に八味地黄丸 7.5 g/日を連日投与した (表 1)。そのうち 11 例 (21.8%) に妊娠成立をみた。そこで、この中で詳細に経過を追跡し得た妊娠例 10 例と非妊娠例 17 例について八味地黄丸の精液所見 (精子濃度、精子運動率) に及ぼす影響を検討した。

乏精子症とは精子濃度 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下で、精子運

表 1 対象

症 例	不妊期間 (年)	八味地黄丸投与期間 (月)	投与前精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	投与前運動率 (%)	既往 AIH (回)
妊 娠 群 11 例	4.7 ± 2.7	3.0 ± 2.6	17.2 ± 9.0	37.2 ± 14.4	3.0 ± 4.3
非妊娠群 40 例	5.6 ± 3.7	7.1 ± 3.8	11.6 ± 6.5	33.0 ± 15.6	8.8 ± 5.5

表 2 八味地黄丸投与による妊娠例の詳細

症例	年齢	妊娠分娩歴	不妊期間	八味地黄丸投与期間	投与前精子濃度 (/ml)
1	30歳	0-0-1-0	7 年	1 ヶ月	23×10^6
2	28歳	0-0-0-0	2 年	6 ヶ月	28×10^6
3	27歳	0-0-0-0	2 年	1 ヶ月	18×10^6
4	35歳	0-0-0-0	11 年	3 ヶ月	17×10^6
5	27歳	0-0-1-0	7 年	3 ヶ月	4×10^6
6	25歳	0-0-0-0	3 年	2.5 ヶ月	15×10^6
7	39歳	0-0-5-0	5 年	1 ヶ月	11×10^6
8	30歳	0-0-0-0	2 年	2 ヶ月	9×10^6
9	29歳	0-0-0-0	7 年	1 ヶ月	12×10^6
10	27歳	0-0-0-0	3 年	10 ヶ月	15×10^6
平均	30 ± 4.1		4.9 ± 2.8	3.0 ± 2.7	$15.2 \pm 6.5 (\times 10^6)$

表 3 八味地黄丸投与・非妊娠例の詳細

症 例	年齢	妊娠分娩歴	不妊期間	八味地黄丸投与期間	投与前精子濃度 (/ml)
1	23歳	0-0-0-0	2 年	8 ヶ月	14×10^6
2	30歳	1-0-0-1	2 年	9 ヶ月	19×10^6
3	27歳	0-0-0-0	4 年	10.5 ヶ月	9×10^6
4	28歳	0-0-0-0	2 年	3 ヶ月	12×10^6
5	30歳	0-0-0-0	3 年	4 ヶ月	0.5×10^6
6	27歳	0-0-0-0	2 年	5.5 ヶ月	16×10^6
7	33歳	0-0-1-0	4 年	6.5 ヶ月	7×10^6
8	36歳	0-0-0-0	5 年	3.5 ヶ月	9×10^6
9	30歳	0-0-0-0	3 年	5.5 ヶ月	2×10^6
10	34歳	0-0-0-0	11 年	9 ヶ月	10×10^6
11	32歳	0-0-0-0	3 年	3 ヶ月	6×10^6
12	32歳	0-0-0-0	6 年	3 ヶ月	20×10^6
13	44歳	0-0-0-0	11 年	12 ヶ月	13×10^6
14	36歳	0-0-0-0	4 年	18.5 ヶ月	4×10^6
15	38歳	0-0-1-0	14 年	4.5 ヶ月	27×10^6
16	37歳	0-0-0-0	10 年	6 ヶ月	13×10^6
17	34歳	0-0-0-0	5 年	7.5 ヶ月	18×10^6
平 均	32.4 ± 4.8		5.35 ± 3.6	6.4 ± 2.7	11.7 ± 6.7

動率が50%以下とした。精子濃度はマクラー精子濃度算定盤で測定した。

結 果

妊娠した10例の詳細をみると(表2), 八味地黄丸の投与期間は1ヶ月から10ヶ月(平均 3.0 ± 2.7 ヶ月), 投与前精子濃度は $4 \times 10^6/\text{ml}$ から $28 \times 10^6/\text{ml}$ (平均 $15.2 \pm 6.5 \times 10^6/\text{ml}$)であった。非妊娠例17例では(表3)投与期間は3ヶ月から18.5ヶ月(平均 6.4 ± 2.7 ヶ月), 投与前精子濃度は $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ から $27 \times 10^6/\text{ml}$ (平均 $11.7 \pm 6.7 \times 10^6/\text{ml}$)であった。

さらに臨床的有効例16例について精液所見に及ぼす影響を精子濃度と精子運動率で比較した。八味地黄丸投与前の値100%とすると八味地黄丸投与後、精子濃度は 350 ± 150 (%)と著明に改善をみたが、精子運動率は 130 ± 30 (%)であり、それほど改善は認められなかった。(図3)。

考 察

男性不妊症の70-80%を占める特発性造精機能障害すなわち乏精子症に対しては従来から種々の治療法が試みられている。薬物療法に人工授精(AIH)などの方法を加えると実に20種類にものぼる。このことから、乏精子症の治療は困難をきわめて現在でも未解決であることがわかる。

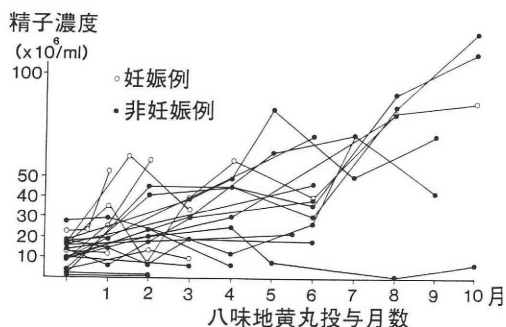


図1 八味地黄丸投与による精子濃度の変化

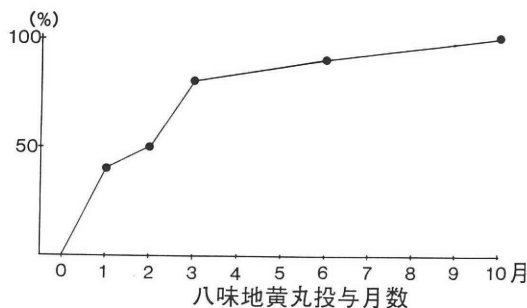


図2 八味地黄丸で妊娠した例の累積妊娠率

最近, 多くの疾患に漢方薬が応用されているが, 乏精子症の治療薬としても漢方薬が有効であるという報告が見られる。われわれも乏精子症患者に対して八味地黄丸を使用したところ, 21.6%(11/51例)という良好な妊娠率を得た。この成績は, 白杵¹⁾らの29.1%(14/48)に匹敵するもので, 内藤²⁾らの21.2%(11/52), 椎名³⁾らの12%(3/25), 三浦⁴⁾らの7.5%(4/53), 奥山⁵⁾らの0%(0/23)という妊娠率より良い結果が得られた。佐治⁶⁾らは乏精子症にAIHを行い16.3%, 大野⁷⁾らは10.3%が妊娠したとしているから, われわれの成績はAIHに比較してもまずまずの成績である。さらに今回対象とした症例がすでにAIHを受けているにも拘わらず妊娠しなかった症例であったことを考えれば, われわれの成績はさらに評価されてもよいと考える。

さて, 八味地黄丸の精液所見に及ぼす効果をみると, 我々の検討では, 55.6%(15/27)に精子濃度の改善をみた。諸家の報告では81.3%(26/32)¹⁾, 55.8%(29/52)²⁾, 40%(10/52)³⁾, 75.5%(40/53)⁴⁾, 21%(5/23)⁵⁾等であった。泌尿器科からの報告でも妊娠率は低いが精子濃度の有意の改善をみている。妊娠例10例と非妊娠例17例の年齢はそれぞれ 30.0 ± 4.1 (歳), 32.4 ± 4.8 (歳)であり有意差はなかった。原発不妊の割合はそれぞれ7/10(70%), 14/17(82.4%), 不妊期間はそれぞれ 4.9 ± 2.9 (年), 5.4 ± 3.6 (年)と両群間に有意差はなかった。

八味地黄丸投与後の精子濃度の変化を, 妊娠例10例と非妊娠例17例でみると計27例中15例(55.6%)に精子濃度の改善を見た(図1)。八味地黄丸で妊娠した10例の累積妊娠率をみると8例(80%)が投与開始3ヶ月以内に妊娠した(図2)。

精子濃度が投与前の3倍以上に増加した場合を有効例とし, これに妊娠例を加えて臨床的有効例と定義し, 八味地黄丸の精液所見に及ぼす影響を検討し

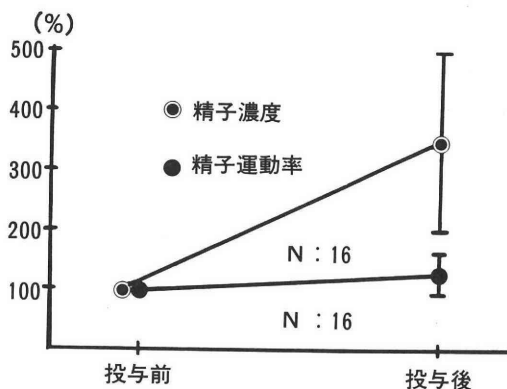


図3 八味地黄丸の精液所見に対する効果

表 4 八味地黄丸の臨床的效果

	軽度乏精子症	高度乏精子症	計
症 例 数	17	10	27
妊 娠 成 立	8	2	10
(%)	(47.1%)	(20.0%)	(37.0%)
有 効 例	5	1	6
(%)	(29.4%)	(10.0%)	(22.2%)
臨床的有効例	13	3	16
(%)	(76.5%)	(30.0%)	(59.3%)

軽度乏精子症：総精子数 $10\sim40\times10^6/\text{ml}$
 高度乏精子症：総精子数 $10\times10^6/\text{ml}$ 以下
 有 効 例：妊娠成立には至らなかったが、総精子数が3倍以上に増加した例
 臨床的有効例：妊娠例+有効例

た。その結果、臨床的有効例は軽度乏精子症（精子濃度が $10\sim40\times10^6/\text{ml}$ ）では17例中13例（76.5%）であり、高度乏精子症（ $10\times10^6/\text{ml}$ 以下）では10例中3例（30%）であった（表4）。

われわれの検討では八味地黄丸は精液所見の中でも、精子濃度の改善に効果が認められた。太田⁸⁾らは八味地黄丸は精子濃度の改善に有効であり、一方補中益気湯は精子運動率に対して有効であるとしている。臼杵らも同様の報告を行っている。これらを総合すると、八味地黄丸は精液所見の中でも特に精子濃度を改善して妊娠成立に寄与しているものと考ええる。

つぎに八味地黄丸はどの程度の乏精子症に有効かをみると、われわれの検討では軽度乏精子症に対しては76.5%が有効であり、高度乏精子症では30%の有効率でしかなかった。臼杵らは特に高度の乏精子症に対して運動率の改善効果が著しかったとしている。しかし、内藤らは、われわれと同様に、軽度乏精子症で71.4%、高度乏精子症で23.5%の有効率であったとし、三浦らは高度乏精子症ではほとんど改善を見ず、その効果は軽度乏精子症に限られるとしている。吉田⁹⁾は中程度から軽度の乏精子症に著しい効果が認められたとしている。このようなことから、八味地黄丸は軽度乏精子症に対して特に有効と言える。

妊娠した症例の80%は投与開始3ヶ月以内に妊娠した。このことは、八味地黄丸投与後の精液所見の改善は4週から8週間の比較的早期から見られるという報告²⁾とよく一致する。すなわち、八味地黄丸の投与開始後3ヶ月以内は妊娠する可能性が高いから女性側もそれを受け入れる準備を積極的に行うことが大切である。AIHやIVF-ETの成績が必ずしも満足はいかない現在、副作用のない八味地黄丸の投与

は意義あるものと考ええる。

八味地黄丸は中国で古くから前立腺肥大症、インポテンツ、腰痛症、糖尿病、高血圧、神経衰弱、排尿障害、皮膚掻痒症、白内障などの老人病に使用されてきた。八味地黄丸の薬理作用をみるとわずかにサンヤクに男性ホルモン増強作用があるのみであり、これだけでは乏精子症に対する効果をすべて説明することは不十分である。

最近、ラット前立腺において八味地黄丸はアンドロゲン作用がないにも拘わらず副性器重量を増加させ、親和性に影響せず DHT receptor の結合部位数を増加させて効果を発揮するとの報告¹⁰⁾が注目されている。細胞レベルでの作用機序の解明もなされつつある。しかし、八味地黄丸がヒトに於いて前立腺肥大症に有効である¹¹⁾という事実と矛盾するようでもある。

また八味地黄丸投与前後でゴナドトロピン系に変化はなかったという報告^{1,2,8)}や、testosterone も有意の変化を示さなかったとする報告^{1,2)}が多い。すなわち、八味地黄丸の乏精子症に対する効果を内分泌学的側面から証明することは現在のところ困難である。

結 語

1. 八味地黄丸は乏精子症に有効な薬剤であり、これは精液所見の中でも特に精子濃度の改善に効果がある。
2. 八味地黄丸の効果は軽度乏精子症に対して有効であり、その効果は投与開始3ヶ月以内に著明にみられる。
3. AIH, IVF-ET の成績が必ずしも満足のいかない現在、副作用のない八味地黄丸の短期間の投与は試みる価値がある。

文 献

- 1) 白杵 〇, 重光貞彦, 西田正人, 岩崎寛和: 八味地黄丸の Spermatogenesis に及ぼす影響と内分泌学的検討, 産婦人科漢方研究の歩み, 1: 57, 1984
- 2) 内藤善文, 吉田英機, 今村一男: 乏精子症に対する八味地黄丸の効果と末梢血中ホルモン値の変動について, 日不妊会誌, 30: 156, 1985
- 3) 椎名正樹, 角ゆかり, 吉村慎一, 小田高久, 飯塚理八: 精液性状不良に対する人参湯と八味地黄丸の使用経験—とくに AIH 併用例に関して—, 日不妊会誌, 30: 303, 1985
- 4) 三浦一陽, 松橋 求, 牧 昭夫, 高波真佐治, 藤尾幸司, 中山幸一, 白井将文, 安藤 弘: 男子不妊症者に対する八味地黄丸の臨床効果について, 泌尿紀要, 30: 97, 1984
- 5) 奥山明彦, 並木幹夫, 園田孝夫, 林 知厚: 男子不妊症に対する八味地黄丸及び人参湯の効果, 泌尿紀要, 30: 409, 1984
- 6) 佐治文隆, 中室嘉郎, 谷澤 修: AIH 治療の評価, 産婦人科の実際, 34: 7, 1985
- 7) 大野虎之進, 椎名正樹, 小林俊文: 人工授精, 産婦人科の世界, 31: 9, 1979
- 8) 太田博孝, 福島峰子: 乏精子症に対する補中益気湯・八味地黄丸の効果, 産婦人科漢方研究の歩み, 5: 60, 1988
- 9) 吉田英機: 男子不妊症に対する漢方療法 (八味地黄丸), 漢方医学, 5: 12, 1981
- 10) 宇津木利雄, 五十嵐正雄, 矢崎千秋, 長谷川喜久, 宮本 薫, 谷口雄一, 野村修一, 新川唯彦: 八味地黄丸の視床下部—下垂体—睾丸系機能に対する効果, 日産婦誌, 35: 2305, 1983
- 11) 新島端夫, 上野 精, 川辺香月: 前立腺肥大症の自覚症状改善に対する八味地黄丸の効果, 泌尿紀要, 25: 977, 1979

**Clinical effects of chinese herb
medicine (Hachimijiougan)
on Oligozoospermia**

Akito Mori, Tutomu Douchi, Kazuhiro Takeuchi,
Seigo Fukumoto, Shinichi Yamamoto,
Toshimitsu Oki and Yukihiro Nagata

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, Kagoshima University,
Kagoshima 890, Japan

To elucidate the effects of chinese herb medicine on spermatogenesis, we administered TSUMURA Hachimijiougan 7.5g doses three times a day to 51 male infertile patients with oligozoospermia. The diagnosis of oligozoospermia was made by following criteria; sperm concentration less than $50 \times 10^6/\text{ml}$ and motility less than 50%

The overall pregnancy rate was 21.6% (11 patients). Sperm concentration was improved in 15 (55.6%) out of 27 patients (10 pregnant, 17 non-pregnant cases). Sperm concentration was improved in 13 (76.5%) of 17 moderate oligozoospermic patients, but only in 3 (30%) of 10 severe oligozoospermic patients. In 16 patients who responded to Hachimijiougan, sperm concentration was improved by 3.5 ± 1.5 fold, whereas motility was improved by 1.3 ± 0.3 fold. 8 of 10 patients became pregnant within 3 months during Hachimijiougan administration.

We conclude that Hachimijiougan is an alternative drug therapy without any side effects for male infertile patients, especially in oligozoospermic patients. Hachimijiougan has a good effect on sperm concentration. However, the effect of Hachimijiougan is limited in moderate oligozoospermia and lasts only for several months during the period of administration. Therefore, Hachimijiougan is applicable to pretreatment of artificial insemination, in-vitro fertilization and embryo transfer, gamete intrafallopian transfer in oligozoospermic infertile patients.

(受付: 1989年7月20日)

BROMOCRIPTINE ADMINISTRATION FOR OLIGOSPERMIC INFERTILITY IN MEN WITH MARGINAL HYPERPROLACTINEMIA

Hiroataka OTA, Mineko FUKUSHIMA and Masahiro MAKI

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

Abstract: Nine infertile male subjects were selected for evaluation of the clinical usefulness of bromocriptine on oligospermia with marginal hyperprolactinemia. Basal prolactin levels ranged between 21 and 42 ng/ml (mean 29 ng/ml). The subjects were administered bromocriptine, 2.5mg daily, for 8 to 16 weeks. Every 4 weeks serum hormone levels and semen quality were examined. LHRH (100 μ g) or TRH (250 μ g) tests were performed on 8 of the 9 subjects. Administration of bromocriptine returned the prolactin level to normal in all cases within 4 weeks of the treatment. The basal level of serum testosterone was low-normal, while the serum estradiol level was significantly elevated over the control ($p < 0.01$). Prolactin response to TRH was excessive, suggesting disturbed regulation of prolactin by dopamine. Both sperm number and motility began to increase 4 weeks into the administration and levels peaked at 12 weeks showing 185 and 174% of the pretreatment values, respectively. It was concluded that the use of bromocriptine was beneficial in treating infertile men with slightly elevated levels of prolactin.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 344-339, 1990)

Introduction

It is known that hyperprolactinemia is often associated with infertility, although the incidence in men^{1,2)} is lower than that in women^{3,4)}. Hyperprolactinemia in men causes various symptoms such as impotence, hypogonadism, testicular atrophy and/or galactorrhea^{5,6)}. Bromocriptine administration in cases of moderate or severe hyperprolactinemia (approx. ≥ 50 ng/ml) is confirmed to be quite beneficial by many investigators. However, the treatment of cases with marginally elevated hyperprolactinemia remains controversial. Segal et al.⁷⁾ reported the successful treatment of oligospermic men with marginal hyperprolactinemia by recovery of the sperm number to within normal values. Saidi et al.⁸⁾ observed simi-

lar effects showing rapid improvement in sperm number within 4-7 weeks. However, several investigators maintain there is no measurable effect of the drug on semen quality in men with slightly elevated prolactin levels^{9,10)}. Therefore, the present study was performed to evaluate more clearly the effect of bromocriptine on sperm number and motility as well as serum hormone levels through examination every 4 weeks.

Materials and Methods

Patients Nine subjects were selected by measuring serum prolactin levels from a randomized group of 174 infertile male patients evaluated at the infertility Unit, Akita University Hospital. Subjects ranged between 23 and 39 years of age (mean 32 years) and had primary or secondary

infertility for 2 to 11 years. None of the subjects had any clinical, radiological or other hormonal evidence of pituitary disease. None had a history of orchitis, trauma or varicocele, or had undergone radiation therapy or had been on drug administration during the past one year. Controls were aged between 23 and 39 (mean 32 years: $n=12$) and proven to be fertile.

Hormone assays Blood was collected every 4 weeks between 10:00 A. M. and 12:00 NOON. Sera were separated by centrifugation at 3,000 rpm and stored at -20°C until assay. The radioimmunoassay (RIA) kits for the measurement of serum LH, FSH, prolactin were purchased from Daiichi radioisotope Co. (Tokyo, Japan). Serum testosterone and estradiol levels were determined by using a kit obtained from Eiken Co. (Tokyo, Japan) and Midori Juji Co. (CIS; Tokyo, Japan). Pretreatment levels of serum prolactin were determined a minimum of 2 to 3 times and the mean value of each patient was listed in the table. Hyperprolactinemia was defined as present when the

prolactin level exceeded 20 ng/ml.

Semen analysis Semen samples were collected once a month by masturbation after 5 days of abstinence. The volume, sperm number, percentage motility and morphology were measured. The values of sperm number and motility in the figure are expressed as percent change against the pretreatment level (zero). In each man a minimum of two previous semen analyses had shown a consistent decrease in the number and/or motility of sperm (less than $20 \times 10^6/\text{ml}$ and/or 50% of motile sperm).

LHRH and TRH tests In 8 of the 9 subjects LHRH test was performed to determine the response of serum LH and FSH. Subjects were injected with LHRH (100 μg ; Tanabe Pharm. Co.: Tokyo, Japan) and controls were administered an intravenous bolus, also between 10:00 A.M. and 12:00 NOON. Blood was collected at 0, 30 and 60 min. Additionally, on the following day, TRH (250 μg ; Tanabe Pharm. Co.; Tokyo, Japan) was administered to the same subjects to determine

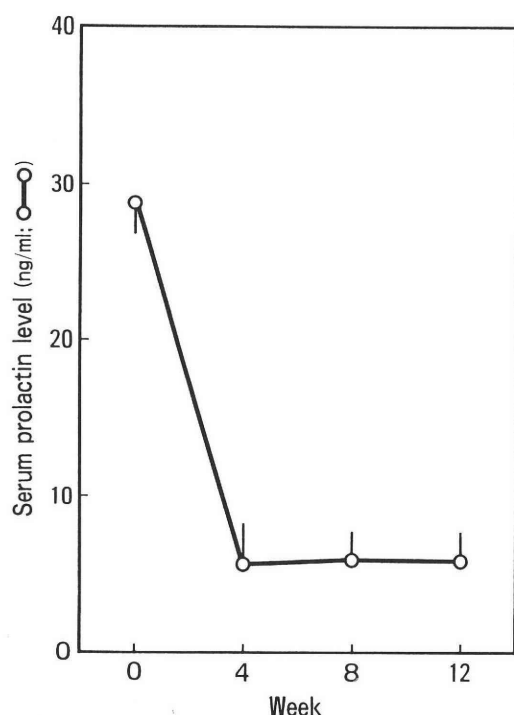


Fig. 1 Levels of serum prolactin before and during the bromocriptine administration. Each value expressed as mean $\pm$ SE for 5 to 9 cases.

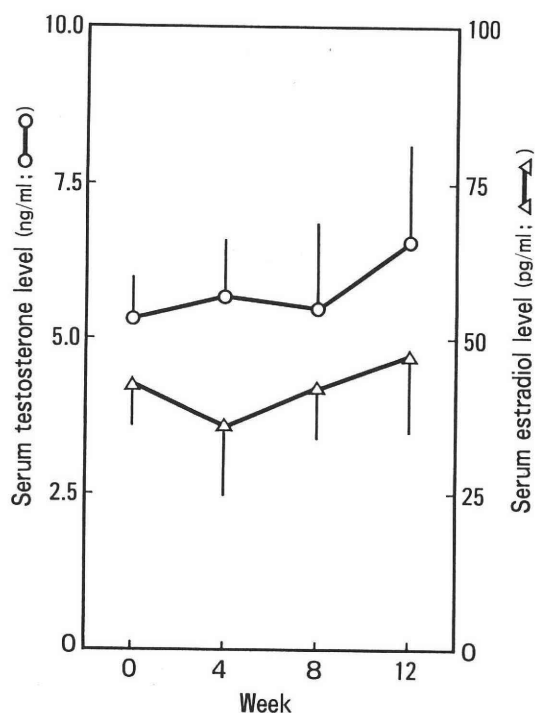


Fig. 2 Levels of serum testosterone and estradiol before and during the bromocriptine administration. Each value expressed as mean $\pm$ SE for 5 to 9 cases.

the serum prolactin response, and blood drawn at 0, 15, 30 and 60 min.

Treatment All 9 subjects were administered bromocriptine (2-bromo- α -ergocryptine mesylate; Sandoz Ltd., Basal, Switzerland). Administration was 2.5 mg divided into two doses. Drug administration continued for 8 to 12 weeks in 4 patients and for 16 weeks in 5 patients.

Statistics The values in the table and figures are expressed as mean $\pm$ SE. The cumulative differences from control mean or the pretreatment measurements were calculated for each subject using Student's *t*-test (unpaired) or new multiple range test (Duncan), respectively.

Results

Hormone levels Serum prolactin levels ranged between 21 and 42 ng/ml prior to administration. Administration of bromocriptine to 9 male subjects with marginal hyperprolactinemia produced significant effect on hormonal levels. The serum prolactin level was reduced at 4 weeks of administration and maintained at a low-normal level throughout the period (Fig. 1). Serum LH and FSH levels were as same as control. Bromocriptine administration did not alter either level during the experiment. The serum testosterone level showed a low-normal range, while the mean estradiol level was significantly elevated over the control ($p < 0.01$). Thus, the testosterone to

estradiol ratio fell below the control value. Neither steroid level varied during the administration (Fig. 2).

Semen analysis Four subjects had a normal sperm number of >20 million/ml and the remaining 5 were oligospermia (Table 1). Impaired sperm motility was found in all subjects. Ejaculate volume was between 1.1 and 2.0 ml in 3 of the 9 subjects and between 2.5 and 6.8 ml in the other 6 subjects. Mean ejaculate volume was 2.8 ml. The mean volume began to increase to 122% at 4 weeks of administration, and further increased to 147% and 130% at 8 and 12 weeks. Both sperm number and motility began to increase at 4 weeks, peaking at 12 weeks at 175-185% of the pretreatment level (Fig. 3). However, both levels tended to decline at 16 weeks of administration. Throughout the experimental period, the relative increase was more marked in sperm motility than in sperm number. The only side effects of bromocriptine were nausea and headache in two patients. These were transient and disappeared within one week.

LHRH and TRH tests LHRH administration revealed a normal serum LH response (Fig. 4). Of the 8 subjects examined, 5 had a normal LH response, 2 had an overresponse and the remaining case a poor response. FSH response among the subjects was varied, although the mean value after LHRH injection tended to increase beyond the control.

Table 1 Serum hormone levels and semen quality of 9 infertile men with marginal hyperprolactinemia

Case No.	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	PRL (ng/ml)	T (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	T/E ₂ ($\times 10^{-2}$)	Sperm number ($\times 10^6$ /ml)	Sperm motility (%)	Volume (ml)
1	14	17	21	7.2	56	1.30	16	35	1.8
2	7	13	37	2.1	15	1.45	17	48	2.6
3	8	8	21	5.1	34	1.48	94	35	2.5
4	10	8	29	6.4	35	1.83	3	30	2.0
5	11	8	26	5.2	65	0.80	24	20	2.6
6	6	11	42	3.1	47	0.66	9	30	2.6
7	17	20	24	4.0	44	0.92	13	42	3.5
8	11	6	29	8.2	57	1.44	37	46	6.8
9	10	7	32	6.5	38	1.73	36	39	1.1
M $\pm$ SE	10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2	5.3 $\pm$ 0.7	43 $\pm$ 5	1.29 $\pm$ 0.14	28 $\pm$ 9	36 $\pm$ 3	2.8 $\pm$ 0.5
Control (n = 12)	12 $\pm$ 4	10 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	6.8 $\pm$ 0.5	25 $\pm$ 3	3.02 $\pm$ 0.32	>20	>50	4.1 $\pm$ 0.4
P	N.S.	N.S.	0.001	N.S.	0.01	0.001	—	—	N.S.

PRL : prolactin, testosterone, E₂ : estradiol N.S. : not significant

TRH administration revealed that 6 out of 8 subjects had an overresponse of prolactin, resulting in a significant increase in the prolactin level over that of control (Fig. 5).

Discussion

Incidence of hyperprolactinemia in infertile men^{1,2)} is lower than that in women^{3,4)}. Symptoms induced by hyperprolactinemia in women are apparently different according to the levels of prolactin and the duration of the period. Marginal hyperprolactinemia ranging between 25 and 50 ng/ml rarely causes anovulation, but rather induces impaired ovarian function such as reduced secretion of progesterone and short luteal phase¹⁾. Near these levels it is seldom associated with galactorrhea. In contrast, when prolactin

levels exceed 100 ng/ml, it will often result in anovulation, amenorrhea, hypogonadism and/or galactorrhea. Thus, the prolactin levels in hyperprolactinemic infertile men are a key for the assessment of the symptoms and endocrine profile.

It is quite interesting that the response of serum prolactin on TRH administration was excessive in 6 of the 8 subjects examined. Similarly, overresponse of serum prolactin has already been established in women with transient or occult hyperprolactinemia¹²⁾, masked hyperprolactinemia^{13,14)} or endometriosis¹⁵⁾, but not in severe hyperprolactinemia associated with prolactinoma¹⁶⁾ in which the prolactin responses were lowered. Prolactin secretion from the pituitary is regulated by both prolactin releasing factor (PRF) and prolactin inhibiting factor (PIF), and a principal PIF component consists of dopamine from the hypothalamus¹⁷⁾. Overresponse of prolactin and the effectiveness of bromocriptine on the prolactin level suggests that the dopaminergic control of prolactin secretion is disturbed¹⁸⁾. A second hypothesis is that the high level of estradiol as observed in the present study might be involved in inducing the prolactin secretion, since estrogen is one of the key steroid hormones stimulating the pituitary to secrete prolactin¹⁹⁾.

Estradiol secretion from testis is lower than

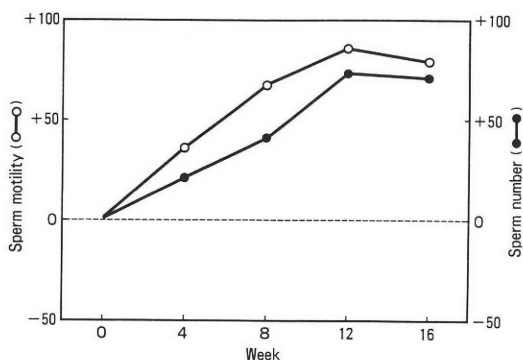


Fig. 3 Percent change of sperm motility and number before and during the bromocriptine administration. Each value expressed as mean $\pm$ SE for 5 to 9 cases.

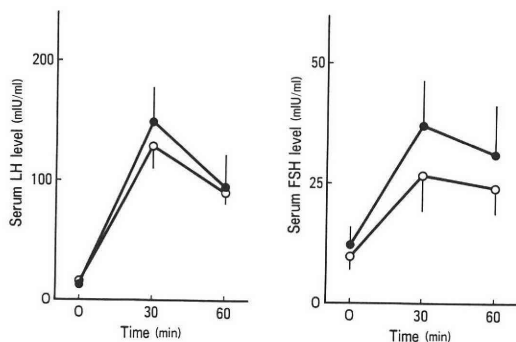


Fig. 4 Response of serum LH and FSH on LHRH injection. LHRH (100 μ g) was injected via intravenous bolus. Blood was drawn at 0, 30 and 60 min. ○—○; control group (n=12), ●—●; hyperprolactinemic group (n=8)

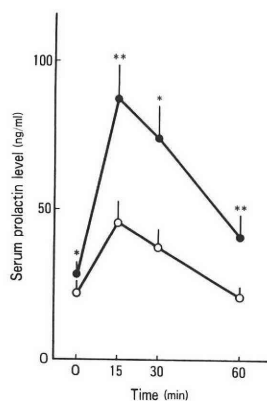


Fig. 5 Response of serum prolactin on TRH injection. TRH (250 μ g) was injected via intravenous bolus. Blood was drawn at 0, 15, 30 and 60 min. ○—○; control group (n=12), ●—●; hyperprolactinemic group (n=8), (* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$)

that from ovary²⁰). Over half of the estrogen in peripheral blood is derived from the aromatization of androgen. Estradiol feedbacks to the hypothalamic-pituitary system and regulates LHRH and/or gonadotropin secretion²¹). Further, estradiol appears to act directly on testis through the binding of its receptor on Leydig cells²²). In the present study, estradiol was markedly elevated in the hyperprolactinemic group over the controls, resulting in a low testosterone to estradiol ratio. Recent studies also indicate that a considerable percentage of high estradiol levels is observed in oligospermic infertile men²³). It is also common to find such cases in Sertoli cell tumors²⁴). It is still unclear if high levels of estradiol could affect testicular function. Bromocriptine administration in the present study did not change the level of testosterone secretion. While our previous study revealed that testicular steroidogenesis was improved by raising testosterone and the testosterone to estradiol ratio upon herbal medicine administration²³), the role of estradiol in testicular function remains to be elucidated.

In all subjects sperm motility was less than 50%, while only 5 subjects had oligospermia of less than 20 million/ml. If the prolactin level remains slightly elevated between 20 and 50 ng/ml, it does not appear to severely disturb spermatogenesis. Bromocriptine administration steadily raised semen quality in terms of both sperm number and motility. Present recovery of quality is more marked in sperm motility than in sperm number. The results here are in part consistent with that by Saidi et al⁸), who obtained recovery of semen quality within one month. But the present improvement was not as neat in comparison to their results. There are several reports that maintain that the use of bromocriptine on men with normal or slightly elevated prolactin levels is ineffective^{9,10}). However, most such reports so far examined did not show data on a monthly basis. This can easily mislead in understanding of the significance of administration, since the maximal drug effect appears between 8 to 16 weeks of the administration, and the effect may begin to fall thereafter.

It is concluded that the use of bromocriptine is

beneficial in treating infertile men with marginally elevated levels of prolactin. The effect of the drug appears to vary according to the duration of the treatment, consequently monthly analysis of hormonal levels and semen quality is definitely necessary to assess continuation.

References

- 1) Hargreave, T. B., Kyle, K. F., Kelly, A. M. and England, P.: Prolactin and gonadotrophins in 208 men presenting with infertility, *Brit. J. Urol.*, 49: 747, 1977
- 2) Segal, S., Yaffe, H., Laufer, N. and Ben-David, M.: Male hyperprolactinemia: effects on fertility, *Fertil. Steril.*, 32: 556, 1979
- 3) Pepperell, R. J.: Prolactin suppression in the treatment of female infertility, *Med. J. Aust. (Suppl)*, 3: 20, 1978
- 4) Wolf, A. S., Musch, K. and Lauritzen, C.: Hyperprolactinemia in anovulatory women, Incidence and endocrine features, *J. Endocrinol. Invest.*, 2: 5, 1979
- 5) Jequier, A. M., Crich, J. C. and Ansell, I. D.: Clinical findings and testicular histology in three hyperprolactinemic infertile men, *Fertil. Steril.*, 31: 525, 1979
- 6) Murray, F. T., Cameron, D. F. and Ketchum, C.: Return of gonadal function in men with prolactin-secreting pituitary tumors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 59: 79, 1984
- 7) Segal, S., Polishuk, W. Z. and Ben-David, M.: Hyperprolactinemic male infertility, *Fertil. Steril.*, 27: 1425, 1976
- 8) Saidi, K., Wenn, R. V. and Sharif, F.: Bromocriptine for male infertility, *Lancet*, 1: 250, 1977
- 9) Baker, H. W. G. and Pepperell, R. J.: Lack of effect of bromocriptine on semen quality in men with normal or slightly elevated prolactin levels, *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 20: 158, 1980
- 10) Merino, G., Canales, E. S., Vellido, M. L., Forsbach, G., Solis, J. and Zárate, A.: Abnormal prolactin levels in serum and seminal plasmas in infertile men, *Arch. Androl.*, 4: 353, 1980
- 11) Del Pozo, E., Wyss, H., Tolis, G., Alcañiz, J., Campana, A. and Naftolin, F.: Prolactin and deficient luteal function, *Obstet. Gynecol.*, 53: 282, 1979
- 12) Aisaka, K., Ando, S., Kokubo, K., Yoshida, K. and Mori, H.: Effects of transient or occulted hyperprolactinemia on luteal function, *Folia Endocrinol.*, 62: 117, 1986 (Japanese)
- 13) Corenblum, B. and Taylor, P. J.: A rationale for the use of bromocriptine in patients with

- amenorrhea and normoprolactinemia, *Fertil. Steril.*, 34: 239, 1980
- 14) Peillon, F., Vincens, M., Cesselin, F., Doumith, R. and Mowszowicz, I.: Exaggerated prolactin response of thyrotropin-releasing hormone in women with anovulatory cycles: possible role of endogenous estrogens and effect of bromocriptine, *Fertil. Steril.*, 37: 530, 1982
- 15) Muse, K., Wilson, E. A. and Jawad, M. J.: Prolactin hyperstimulation in response to thyrotropin-releasing hormone in patients with endometriosis, *Fertil. Steril.*, 38: 419, 1982
- 16) Franks, S., Jacobs, H. S., Martin, N. and Nabarro, J. D. N.: Hyperprolactinemia and impotence, *Clin. Endocrinol.*, 8: 277, 1978
- 17) Meites, J., Lu, K. H., Wuttke, W., Welsch, C. W., Nagasawa, H. and Quadri, S. K.: Recent studies on functions and control of prolactin secretion in rats, *Recent Prog. Horm. Res.*, 28: 471, 1972
- 18) Kato, Y., Ohgo, S., Chihara, K. and Imura, H.: Stimulation of human prolactin secretion by sulpiride, *Endocrinol. Jpn.*, 22: 457, 1975
- 19) Friesen, H. G., Fournier, P. and Desjardins, P.: Pituitary prolactin in pregnancy and normal and abnormal lactation, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 16: 25, 1973
- 20) DiZerega, G. S. and Sherins, R. J.: Endocrine control of adult testicular function. The testis, Burger, H. and de Kretser, D., eds., 127, Raven Press, 1981
- 21) Franchimont, P., Bourguignon, J. P. and Demoulin, A.: Follicle-stimulating hormone-actions on testicular functions and regulation of its secretion in oligozoospermia: recent progress in andrology, Frajese, G., Hafez, E. S. E., Conti, C. and Fabbrini, A., eds., 121, Raven Press, 1981
- 22) Kato, J., Onouchi, T., Okinaga, S. and Ito, N.: Estradiol receptor in rat testis, *Endocrinology*, 94: 902, 1974
- 23) Ota, H., Fukushima, M., Kodama, H. and Maki, M.: Effects of Hotyu-ekkito on patients with oligospermia, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 32: 624, 1987 (Japanese)
- 24) Huggins, C. and Maulder, P. V.: Estrogen production by Sertoli cell tumors of the testis, *Cancer Res.*, 5: 510, 1945

高プロラクチン血症合併の 造精機能低下症例に対する bromocriptine の効果

秋田大学医学部産科婦人科

太田博孝 福島峰子

真木正博

高プロラクチン (PRL) 血症を合併した造精機能低下症 9 例に bromocriptine (BC) を投与し、その臨床効果を検討した。BC の投与方法は 1 日量 2.5 mg を分 2 で 8 から 16 週間連日服用させた。4 週毎に採血し、血中の LH, FSH, PRL, テストステロン (T), エストラジオール (E_2) を、同時に精子濃度、精子運動率を測定した。さらに 8 例に LHRH, TRH テストを行った。PRL 値は治療前平均 29 ng/ml (21-42 ng/ml) で、BC 投与により 4 週目より正常化した。血中 T 値は正常低値で、 E_2 値は逆に有意に高値 ($p < 0.01$) であった。服用期間中両ステロイド値に変動はなかった。TRH 負荷に対し PRL は 6 例で過剰反応を示した。治療前平均精子濃度は 28×10^6 /ml、精子運動率は 36 % であった。精子濃度、精子運動率は 4 週目より増加し、最高それぞれ前値の 185 %, 174 % となった。BC は特に精子運動率に有効であった。以上より BC は高 PRL 血症合併の造精機能低下症によく奏功することが明らかとなった。

(受付: 1989 年 8 月 19 日)

高 TSH 血症を示す不妊(育)症患者の検討

Clinical Analysis of Sterility Patients with Hyperthyrotropinemia

東京女子医科大学産婦人科
東京女子医科大学母子総合医療センター*

安達 知子	菖蒲 由美子	岩下 光利*
Tomoko ADACHI	Yumiko SHOBU	Mitsutoshi IWASHITA*
大平 篤	篠崎 百合子	中林 正雄*
Atsushi OHIRA	Yuriko SHINOZAKI	Masao NAKABAYASHI*
武田 佳彦	坂元 正一*	
Yoshihiko TAKEDA	Shoichi SAKAMOTO*	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokyo Women's Medical College,
Maternal and Perinatal Center*,
Tokyo 162, Japan

不妊、不育症患者の血中 TSH を高感度測定キットを用いた RIA で測定し、 $3.6 \mu\text{U/ml}$ 以上を示した 24 例を高 TSH 血症患者として、潜在性甲状腺機能異常と不妊、不育症との関連について分析、検討した。

1. 本患者は不妊、不育症患者 272 名の約 9% を占めた。2. 臨床的に甲状腺機能低下の症状はなく、T3, free T4 値は全例正常範囲にあり、甲状腺機能は低下状態または、潜在性低下状態にあると推測された。また、TSH の高低と T3, free T4 値の間に一定の傾向は認めなかった。3. 高 PRL 血症の合併は 18 例、70.8% に認めた。4. T4 製剤投与または T4 製剤と Bromocriptin 併用投与により、すみやかに TSH は正常化し、14 例中 6 例が妊娠し、妊娠中の T4 製剤継続投与により、3 例が生児を得て母児経過は良好であり、残り 3 例は現在妊娠継続中で正常な経過を示している。一方 Bromocriptin 単独投与では 3 例妊娠し、2 例が流産した。

甲状腺機能低下は潜在性のものであっても、不妊、不育症と密接な関係を持ち、このスクリーニングに血中 TSH 測定は簡便かつ有用であり、治療として T4 製剤の投与が有効であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 340-344, 1990)

緒 言

従来より甲状腺機能が性機能と密接な関係にあることはよく知られていることである。我々は、不妊、不育症患者、排卵障害患者に対し、その卵胞前期、または消退出血後にルチンに血中 LH, FSH, testosterone, prolactin (PRL) の他、TSH, T3, free T4 値を測定している。

今回、甲状腺機能の鋭敏な指標である TSH を測定し、TSH $3.6 \mu\text{U/ml}$ 以上の高 TSH 血症患者の臨床検討、ならびに甲状腺剤投与等による治療成績について検討したので、甲状腺ホルモンの生殖現象への関与に対する考察も加えて報告する。

対象及び方法

1987 年 3 月から 1988 年 5 月までに当院不妊外来

を受診した患者 272 例のうち、血清 TSH $3.6 \mu\text{U/ml}$ 以上を示した高 TSH 血症患者 24 例を対象とした。内訳は原発不妊 15 例、続発不妊 6 例、習慣性流産 3 例で、これは各不妊（育）症の 182 例、81 例、9 例に対し、8.2 %、7.8 %、33 %を占め、高 TSH 血症全体では総患者数の 9 %を占めた。なお、原発不妊群の中に Basedow 病手術後の 2 症例が含まれ、習慣性流産の 3 例中 1 例は Lupus anticoagulant 陽性と考えられる症例であった。また初診時基礎体温上、排卵を認めなかったものは 3 例で、原発不妊 2 例、続発不妊 1 例であった。

採血はすべて月経周期 3 ~ 6 日目、もしくは消退出血後に、13 時から 15 時の間に施行し、TSH はダイナボット社の TSH RIA ビーズ II 法による高感度測定キットで、T3 はダイナボット社の RIA キット

で、free T4 はアマーシャム社の Amerlex F T4 キットで、PRL は第 1 ラジオアイソトープ社の PRL RIA キット第 1 で測定した。結果は t 検定により解析した。

結 果

1. 内分泌学的分析

高 TSH 血症 ($3.6 \mu\text{U/ml}$ 以上) を示す原発不妊、続発不妊、習慣性流産の TSH 値の平均値 $\pm$ SE は、それぞれ $7.2 \pm 1.4 \mu\text{U/ml}$, $5.6 \pm 1.0 \mu\text{U/ml}$, $11.3 \pm 4.0 \mu\text{U/ml}$ で各不妊症群で差を認めなかった。また無排卵の 3 症例も TSH 値に有意差は認めなかった (図 1)。

対象とした 24 例は全例 T3, free T4 値は正常範囲に分布した (図 2)。これらをさらに TSH $5.0 \mu\text{U/ml}$ ($+6.3$ SD に相当) 以上および $5.0 \mu\text{U/ml}$ 未満 $\sim 3.6 \mu\text{U/ml}$ の 2 群に分けて TSH の高低による甲状腺ホルモン値の関係を検討したが、T3, free T4 値共に両群間には有意差を認めなかった。

当科では、PRL 20 ng/ml 以上を高 PRL 血症として治療の対象としているが、高 TSH 血症 24 例のうち、PRL 20 ng/ml 以上を示したものは 16 例、TRH テストで PRL の異常反応を示したものが 2 例であり、この 2 例を潜在性高 PRL 血症とすると、高 PRL 血症を合併したものは 18 例で、全体の 70.8 %であった (図 3)。なお、TSH 値の高低と PRL 値の分布には一定の傾向は認めなかった。また 1 例、PRL 値 119.2 ng/ml と異常高値を示したものは、抗潰瘍薬服用による薬剤性高 PRL 血症例であった。

2. 治療成績 (表 1)

高 TSH 血症 24 例のうち、6 例に T4 製剤 (チラーヂン S[®]) $0.025 \sim 0.1 \text{ mg/日}$ 、7 例に Bromocriptin

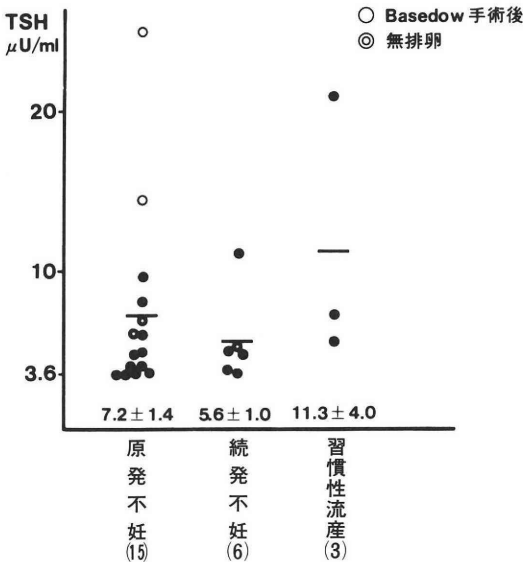


図 1 高 TSH ($\geq 3.6 \mu\text{U/ml}$) 各不妊 (育) 症の TSH 値の比較

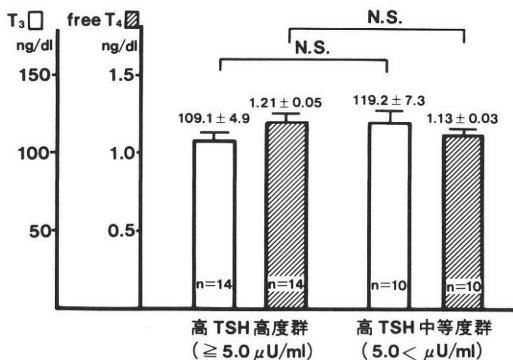


図 2 TSH 値と T3, free T4 の関係

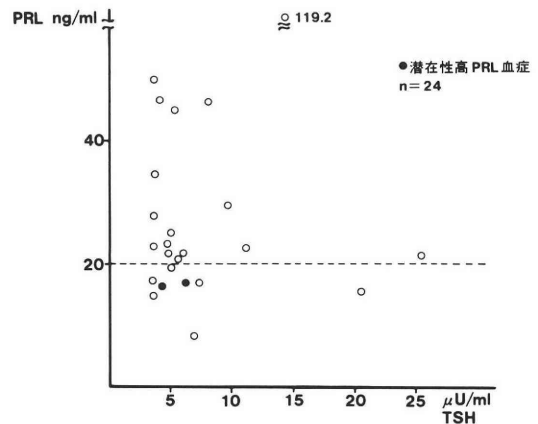


図 3 高 TSH 血症と PRL 値の関係

(パーロデル[®]) 1.25~5 mg/日、8例にT4製剤とBromocriptinの併用投与を行い、3例は無治療で経過観察した。T4製剤単独、およびT4製剤とBromocriptin併用投与でTSHはすみやかに正常化し、6例が妊娠し、妊娠中にT4製剤を継続投与して3例に正常産、AFDの生児を得ており、3例は妊娠継続中で胎児発育は順調である。また、臍帯血中甲状腺系ホルモン値は3例共に正常範囲であった。一方、Bromocriptin単独投与では3例が妊娠したが、その内2例が7週と8週で流産した。

3. 投与方法の実際 (図4, 5)

図4, 5にBasedow病手術後、甲状腺機能低下となった症例、および潜在性機能低下と考えられる病態の異なる2症例を提示し、経過の概要を示した。なお、両症例共に来院時基礎体温は2相性であった。

症例 H. S. 32歳, G1P0 7年前に胞状奇胎娩出、Basedow病手術後、不妊5年の患者(図4)は、来院時TSH 25 μ U/ml, T₃, free T₄ 正常範囲, PRL 21.1 ng/mlであった。T4製剤0.1 mg/日投与8週でTSHは正常範囲となり、妊娠4週が確認され、以後定期的にTSH, T₃, free T₄の測定を行いつつ、T4製剤の継続投与で妊娠40週、女児3210g, Apgar score 9点を娩出した。母体抗TSH受容体抗体は陰性で、児に奇形および甲状腺機能異常は認めなかった。

表1 治療方法と妊娠

	総 数	妊娠数	流産数
T ₄ 製剤単独	6	4	0
T ₄ +Bromocriptin	8	2	0
Bromocriptin単独	7	3	2
無 治 療	3	0	0
計	24	9	2

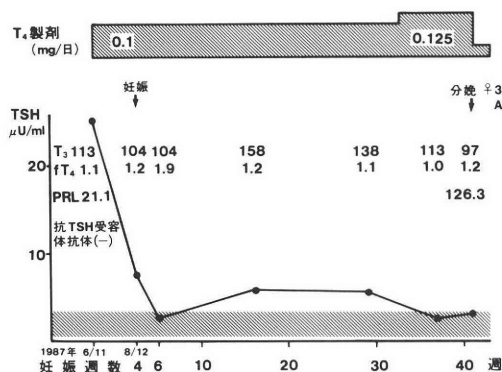


図4 症例 H. S. 32歳 G1P0 Basedow手術後 不妊5年

症例 Y. I. 30歳, G0P0 不妊2年の患者は来院時、TSHは3.6 μ U/mlと軽度亢進、T₃, free T₄ 正常、PRL 21.8 ng/mlを示した。Bromocriptin 1.25 mg/日を投与したところ、まもなく妊娠したが、Bromocriptinを中止したところ、妊娠9週で流産した。流産後、半年でTSH値は4.8 μ U/mlと高値を示し、PRLは20.4 ng/mlであった。T4製剤0.05 mg/日、Bromocriptin 2.5 mg/日を併用したところ妊娠し、Bromocriptinを中止して、定期的に甲状腺系のホルモンの測定を行いつつ、T4製剤を継続投与して妊娠40週、男児3295g, Apgar score 9点を娩出した。本症例は妊娠中期にT4製剤を減量したところ、後期にT₃, free T₄値がやや低値を示したため、再びT4製剤を増量した。児に奇形および甲状腺機能異常は認めなかった。

考 察

甲状腺機能異常のうち、甲状腺機能亢進症は若い女性に好発するため妊娠との合併も多く、その活動期においては流産、胎児奇形、胎内発育遅延、妊娠中毒症などをきたすことが知られており^{1,2)}、従来より産婦人科領域で注目されていた。一方、甲状腺機能低下症は代表的な橋本病が40代という比較的高齢の女性に発症するため、甲状腺機能亢進症に比べ、生殖現象に対してはそれほど注目されていなかった。しかし、近年月経異常、特に乳汁漏を伴う無月経や流産、習慣性流産などの関連が報告されてきており^{3,4)}、甲状腺機能低下症と生殖現象との関わりがクローズアップされてきた。

一般に、原発性甲状腺機能低下症では、血中TSHの高値、およびTRH負荷テストによるTSHの過剰反応を示すことが知られており、T₄, T₃値は必ずしも低値を示すとは限らないとされている。本研究の対象もTSHは3.6 μ U/ml以上と高値を示しているが、甲状腺機能低下の臨床症状はなく、全例甲状腺

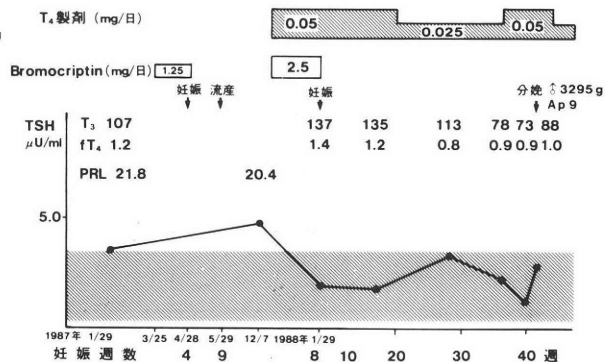


図5 症例 Y. I. 30歳 G0P0 不妊2年

ホルモン (T3, free T4) レベルは正常範囲にあり、甲状腺機能低下、または潜在性甲状腺機能低下状態にあると考えられ、不妊、不育症患者全体の 9% と高率であった。またこの中には Basedow 病手術後 2 例、抗マイクロゾーム抗体などより橋本病と診断した症例が 1 例含まれていた。潜在性の甲状腺機能低下症は、厳密には TSH 値が正常範囲でも、TRH テストの TSH 過剰反応群も含まれると考えられるが、今回は簡便かつ容易な高感度アッセイ法による TSH 基礎値測定によって分析した。

甲状腺機能低下状態は間脳からの TRH 分泌を促進し、これによって TSH 分泌を促進するばかりでなく高 PRL 血症を惹きおこす可能性が大である。事実無月経、乳汁漏、高 PRL 血症、下垂体の腫大がしばしば原発性甲状腺機能低下症で認められ、甲状腺ホルモン補充療法にてこれらの症状が改善したとの報告もみられる⁹⁾。また、本研究でも高 TSH 血症を示した患者の 70.8% に高 PRL 血症を合併した。しかし、TSH 値と PRL 値の間に相関はみられず、T4 製剤を単独投与した 4 例に、投与前と TSH が正常範囲に下降した時点における PRL 値を測定して PRL 値の比較を行ったが、一定の傾向は示さなかった。従って、高 TSH 血症に高 PRL 血症は合併しやすいと考えられるが、相互の調節系については不明な点が多く、今後の解析が必要と考えられる。

排卵障害、特に PCO と甲状腺機能低下の関連を示唆する報告⁶⁾もあるが、本対象中、基礎体温上排卵を認めなかった症例はわずかに 3 例であり、このうちの 1 例が内分泌学的に (LH/FSH > 2.0, LH-RH テストで LH の過剰反応、中等度高 testosterone > 0.9 ng/ml) PCO と考えられた。しかし、今回の検討では母集団が不妊 (育) 症であるため、今後月経異常を主訴とした患者に同様の検討を行う必要がある。次に不妊、不育症に対する甲状腺ホルモンの関与について考察する。

卵胞発育、卵成熟、排卵、受精に対しては 1940 年代より卵胞成熟への甲状腺ホルモンの関与を示唆する報告がなされていた⁷⁾。Maruo⁸⁾らは、ブタ卵巣の顆粒膜細胞培養系を用いて、各種濃度の T4 または T3 と FSH の同時添加を行い、至適濃度の T4、T3 は顆粒膜細胞の形態分化、LH/HCG receptor の induction ならびに steroidogenesis enzyme (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, aromatase) の induction に対し、FSH 作用の amplifier として促進的に働くことを明らかにした。また、この T4、T3 の最大刺激濃度は生理的血中濃度と一致し、過剰または不足状態では効果が抑制されることを示した。これらの

事実は、甲状腺ホルモンが卵胞発育の過程で卵胞内ホルモン環境の形成、特に estrogen の産生に重要な役割を果たしていることを示す。一方、Yoshimura らは^{9,10)}家兎卵巣灌流装置を用いた *in vitro* の系で、3 β -HSD を抑制する cyanoketone や、cholesterol side chain cleavage を抑制する aminoglutethimide などの投与により卵巣での steroidogenesis を抑制したところ、HCG によって排卵 (卵胞破壊) は生じるが、その排卵卵の受精率、また受精卵の桑実胚までの発育は有意に抑制され、estrogen 添加により、その抑制効果は回復されることを示した。また IVF-ET のプログラムの中で、その妊娠率は卵胞液中の estrogen 濃度と正の相関を示すことが知られている¹¹⁾。受精およびその後の受精卵の発育には排卵時卵が十分成熟していることが大切である。卵核成熟は、LH surge とともに開始するが、その他の卵細胞成熟は、卵胞発育時の卵胞内ホルモン環境特に estrogen 濃度に左右されると言われ、この卵細胞成熟は、受精能およびその後の卵の発育能に不可欠と考えられ、ここへの甲状腺ホルモンの重要な関与が推測される。

妊娠維持機構、特に初期胎盤を中心とした内分泌環境に関しては、初期絨毛培養系で適量の甲状腺ホルモンは 3 β -HSD と aromatase 活性に対し、促進的に作用して progesterone と estradiol の産生を高め、同時に HCG (α , β) 産生を増加させることが報告され、甲状腺ホルモン過剰状態では逆にこれらホルモン産生が抑制されることが示されている¹²⁾。以上より、甲状腺機能異常の婦人は不妊、または流産をきたしやすいと考えられ、不妊、不育症治療に対する甲状腺ホルモン療法の有用性が推測される。

最後に、治療の実際に対し考察する。我々は、T4 製剤を中心に治療を行い、TSH の正常化を行っているが、高 PRL 血症の合併が多いため、Bromocriptin との併用も行っている。Bromocriptin 単独治療の患者は、PRL 値は正常化したものの、高 TSH 血症が継続し、妊娠した 3 例のうち 2 例が流産した。高 TSH 血症を伴う高 PRL 血症では、first choice として T4 製剤を投与し、PRL 値の低下が十分でない場合に T4 製剤と Bromocriptin 療法の併用を行う方針としている。また、妊娠が確認された場合は、T4 製剤は妊娠中の TSH、T3、free T4 をモニターしながら継続投与し、現在のところ妊娠経過、および児に対し特に異常は認めていない。

本論文の要旨は、第 33 回日本不妊学会総会学術講演会にて発表した。

文 献

- 1) 藤本征一郎, 服部哲夫, 出店正隆: 甲状腺機能亢進症と妊娠中毒症, 臨婦産, 40: 278, 1986
- 2) 百溪尚子: パセドウ病と妊娠, Pharma Medica, 4: 62, 1986
- 3) Onishi, T., Miyai, K., Aono, T., Shioji, T., Yamamoto, T., Okada, Y. and Kumahara, Y.: Primary hypothyroidism and galactorrhea, Am. J. Med., 63: 373, 1977
- 4) 望月真人, 片山和明: 不育症のホルモン療法, 産婦治療, 56: 292, 1988
- 5) Groff, T. R., Shulkin, B. L., Utiger, R. D. and Talbert, L. M.: Amenorrhea-galactorrhea, hyperprolactinemia, and suprasellar pituitary enlargement as presenting features of primary hypothyroidism, Obstet. Gynecol., 63: 86S, 1984
- 6) 竹中 章, 松本治朗, 笠原一彦, 吉田吉信: 不妊症婦人における甲状腺機能の解析—TRH 負荷後 TSH とプロラクチン動態の関係を中心に一, 日不妊誌, 33: 17, 1988
- 7) Williams, R. H., Weinglass, A. R., Russel, G. W. and Peters, J.: Anatomical effect of thiouracil, Endocrinology, 34: 317, 1944
- 8) 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
- 9) Yoshimura, Y., Hosoi, H., Atlas, S. J., and Wallach, E. E.: The effect of ovarian steroidogenesis on ovulation and ovum maturation in the *in vitro* perfused rabbit ovary, Biol. Reprod., 35: 943, 1986
- 10) Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Bongiovanni, A. M., Santulli, R., Atlas, S. J., Wallach, E. E.: Are ovarian steroids required for ovum maturation and fertilization? Effects of cyanoketone on the *in vitro* perfused rabbit ovary, Endocrinology, 120: 2555, 1987
- 11) Boteno-Ruiz, W., Laufer, N., DeCherney, A. H., Polan, M. L., Haseltine, F. P. and Behrman, H. R.: The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes *in vitro*, Fertil. Steril., 41: 820, 1984
- 12) 丸尾 猛: 成長因子と生殖機能 (山田隆司編) 内分泌学の進歩 (第5回富士ホルモカンファレンス記録), トプコ出版, 111, 1987

Clinical analysis of sterility patients with hyperthyrotropinemia

Tomoko Adachi, Yumiko Shobu,
Mitsutoshi Iwashita*, Atsushi Ohira,
Yuriko Shinozaki, Masao Nakabayashi,
Yoshihiko Takeda and Shoichi Sakamoto*

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokyo Women's Medical College,
Maternal and Perinatal Center*,
Tokyo 162, Japan

The serum levels of TSH were measured by RIA in 272 women with infertility or habitual abortion.

Twenty-four women, that is 9% of all patients, showed elevated levels of TSH ($\text{TSH} \geq 3.6 \mu\text{U/ml}$) with normal levels of T3 and free T4. Further endocrinological analysis were performed in these 24 patients.

Hyperprolactinemia ($\text{PRL} \leq 20 \text{ ng/ml}$) were associated with 70.8% of those patients, however, the levels of TSH did not correlate with the levels of PRL.

After normalization of levels of TSH by administering thyroxine agent with or without bromocriptin, 6 out of 14 patients became pregnant. All of them showed uneventful pregnant course. Three out of 7 patients treated with only bromocriptin, whose TSH levels remained high, became pregnant. However, 2 out of those 3 patients had miscarriage at 7 and 8 weeks, respectively.

These results indicate that elevated serum levels of TSH with normal levels of T3 and free T4 may reflect to the status of latent hypothyroidism and that normalization of elevated levels of TSH with thyroxine therapy is important to treat the sterility.

(受付: 1989 年 9 月 7 日)

筋注 HCG 製剤の血中 HCG 値および HCG テストパックに及ぼす影響

Evaluation of Influence of Extrinsic HCG on Serum HCG Level and Result of HCG Testpack

假野クリニック

假 野 隆 司

Takashi KANO

Kano Clinic,
Osaka 542, Japan

黄体機能賦活目的で筋注した HCG 製剤の早期妊娠診断目的の基礎体温高温 16 日目の血中 HCG 値、HCG テストパックの反応に与える影響を調べた。7 日前に 5000 IU 筋注した群と注射しなかった群の血中 HCG 値と HCG テストパックの反応には有意な差はなかった。ところが、3 日前、2 日前に筋注した群では 7 日前筋注群に対して血中 HCG は有意に高値を示し、HCG テストパックの陽性率も高率であった。7 日以内に 10000 IU 以上を筋注した群でも同じ結果が認められた。この結果より 5000 IU を 3 日前、2 日前に、あるいは総量 10000 IU 以上を 7 日以内に筋注したケースでは 50 IU/ml 以上の血中 HCG 値を測定するか、HCG テストパックの垂直方向線が水平方向線より濃くなければ妊娠を確認できないことが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 345-348, 1990)

緒 言

近年、モノクロナール抗体応用の高感度妊娠診断薬の開発が進み早期の妊娠診断が可能になった。ところが試薬の高感度化は黄体機能不全の治療として行なう HCG 筋注が診断薬の反応に影響を与えるといった新たな問題¹⁾をひきおこして chemical pregnancy²⁾という言葉が生まれるように不妊症の診療現場での早期妊娠診断に混乱が生じるようになってきた。そこで、黄体機能賦活目的で筋注した HCG 製剤が最も高感度な妊娠診断薬である HCG テストパック¹⁾や血中 HCG 値³⁾にどのような影響を与えるかを検討した。

対象と方法

1988 年 1 月から 12 月までに假野クリニックを挙児希望で来院した患者の中で基礎体温 (BBT) の高温相が 18 日以上持続し、血中 HCG 値あるいは HCG テ

ストパック以外の検査で妊娠を証明できなかった 25 歳から 39 歳までの延べ 152 例を対象とした。このうち 124 例は血中 HCG 値測定あるいは HCG テストパック (ダイナボット) 検査施行日に先立つ 1 週間以内に 5000 IU を基本単位として HCG (プレグニール、日本オルガノン) の筋注を受けている。残りの 28 例は当該周期に HCG を全く筋注していない。以上の症例は高温 16 日目に血中 HCG を ¹²⁵I-RIA³⁾で、尿中 HCG を HCG テストパックで半定量判定⁴⁾した。各群の平均値は Student's t-test で、百分率は χ^2 test で有意検定を行なった。

結 果

1. 高温 16 日目の血中 HCG 値に与える影響

血中 HCG 値と HCG 筋注日の関係を検討すると、コントロールとしての HCG 筋注を受けていない 28 例では、最高 152.0 mIU/ml、最低 3.2 mIU/ml、 $M \pm S.D.$ は 25.8 ± 34.8 mIU/ml、10 mIU/ml 以上³⁾は 13

Table. 1 Effect of injected HCG on serum HCG levels.

(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$; Significant different from the cases injected 7days before.)

Serum HCG	Day after Injection							
	—	7	6	5	4	3	2	1
Under 10mIU/ml	11/28 (39.3%)	21/27 (77.8%)	8/11 (72.7%)	10/23 (43.5%)	2/34 ** (6.9%)	1/37 *** (2.7%)	2/17 * (11.8%)	2/3 (66.7%)
Over 10mIU/ml	17/28 (60.3%)	6/27 (22.2%)	3/11 (27.3%)	13/23 (56.5%)	32/34 *** (94.1%)	36/37 *** (97.3%)	15/17 * (88.2%)	1/3 (33.3%)

Table. 2 Effect of injected HCG on reaction of HCG Testpack.

(No significant differences each other)

HCG Testpack	Day after Injection						
	7	6	5	4	3	2	1
(-)	25/27 (92.6%)	10/10 (100.0%)	22/24 (91.7%)	31/33 (93.9%)	24/38 (63.2%)	7/17 (41.2%)	1/2 (50.0%)
(±)	0/27 (0.0%)	0/10 (0.0%)	1/24 (4.2%)	2/33 (6.1%)	4/38 (10.5%)	6/17 (35.3%)	0/2 (0.0%)
(+)	2/27 (7.4%)	0/10 (0.0%)	1/24 (4.2%)	0/33 (0.0%)	10/38 (26.3%)	4/17 (23.5%)	1/2 (50.0%)

Table. 3 Does effect of injected HCG on reaction of HCG Testpack.

(No significant differences each other)

HCG Testpack	Gross Volume(IU) of Injected HCG			
	0	5000	10000	15000
(-)	15/16 (93.8%)	92/111 (82.9%)	16/25 (64.0%)	0/1 (0.0%)
(±)	1/16 (6.3%)	9/111 (8.1%)	3/25 (12.0%)	0/1 (0.0%)
(+)	0/16 (0.0%)	10/111 (9.0%)	6/25 (24.0%)	1/1 (100.0%)

例 (46.4%) であった。7 日前に HCG 筋注を受けた 27 例では最高 138.0 mIU/ml, 最低 3.2 mIU/ml, $M \pm S.D.$ は 14.6 ± 25.6 mIU/ml, 10 mIU/ml 以上は 6 例 (22.2%) でいずれも非注射群と有意の差はなかった。6 日前, 5 日前, 4 日前の $M \pm S.D.$ はそれぞれ 9.7 ± 6.4 mIU/ml ($n=11$), 21.8 ± 30.9 mIU/ml ($n=23$), 22.6 ± 20.2 mIU/ml ($n=34$) で, 非注射群, 7 日前注射群と比較して有意の差は認められなかった。これに対して, 3 日前, 2 日前に筋注を受けた症例は 60.5 ± 34.4 mIU/ml ($n=37$), 93.3 ± 41.1 mIU/ml ($n=17$) で前述の 2 群に対して有意 ($P < 0.001$) に高値であった。10 mIU/ml 以上は 4 日前 32 例 (94.1%), 3 日前 36 例 (97.3%), 2 日前 15 例 (88.2%) で 7 日前群と比較して有意

($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.5$) に高率であった (Fig. 1, Table. 1)。1 週間以内に筋注した HCG 総量と血中 HCG 値との関係は, 5000 IU 群は 32.8 ± 36.3 mIU/ml ($n=98$) で未注射群と比較して有意な差を認められなかったが, 10000 IU 群では 66.5 ± 12.3 mIU/ml で未注射群に対して有意 ($P < 0.01$) に高値であった (Fig. 2)。

2. 高温 16 日目の HCG テストパックに与える影響

HCG テストパックの反応と HCG 筋注日の関係は, (一) 群では 3 日前, 2 日前群が 7 日前群より低率であったが有意差はなかった。(±) (+ (±) +) 群では 3 日前, 2 日前群が 7 日前群より高率であったが有意差はなかった (Table. 2)。

筋注 HCG 量と反応との関係は, 10000 IU 群で (一)

反応は未注射群, 5000 IU 筋注群に比較して低率で, (±), (+) 群で高率であったが有意の差はなかった (Table. 3).

考 察

血中 HCG 値の測定やモノクローナル抗体応用の高感度妊娠試薬の出現によって妊娠の早期診断や早期予後診断⁴⁾が可能になったが, RIA による血中 HCG 値測定や高感度妊娠診断薬は高感度ゆえ黄体機能賦活目的で筋注した HCG 製剤を測定してしまう可能性がある。事実, 現在市販されている尿妊娠試薬の中で感度 20 mIU/ml ともっとも高感度で false positive がない⁴⁾HCG テストパックの反応に 1 週間以内に筋注した HCG 製剤が影響を与えることが報告¹⁾されて不妊症の臨床現場での早期妊娠診断に混乱が生じている。しかし, 投与した HCG 製剤と妊娠反応としての血中及び尿中 HCG 値への定量的な研究報告はない。

そこで, 早期妊娠診断の信頼性を高めるために筋注 HCG 製剤の血中 HCG 値および HCG テストパック反応に及ぼす影響を調べた。まず血中 HCG については, 7 日前に 5000 IU を一回筋注した群の血中 HCG 値は注射しなかった群の HCG 値と有意の差はなかった。HCG 値を評価する時 LH, FSH, TSH の交叉反応が問題になるが, BBT+16 Day に妊娠診断の目的で血中 HCG を測定する場合, 10 mIU/ml 以上あれば内因性 HCG を証明, すなわち着床を確認³⁾したと考えていいが, 10 mIU/ml 以上の症例は未注射群の方がわずかに多かった。

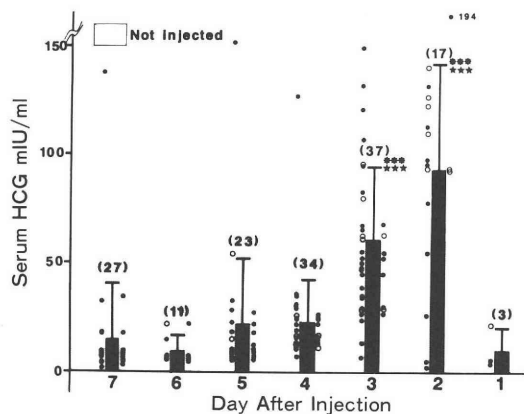


Fig. 1. Effect of injected HCG on serum HCG levels.

Data are presented as M ± S.D.

***: $P < 0.001$, Significant different from the cases injected 7 days before.

***: $P < 0.001$, Significant different from not injected cases.

HCG を筋注した方が注射しなかった例より妊娠する確率が高い可能性を考慮に入れて, 未注射群でなく 7 日前筋注群をコントロールに設定すると, 3 日前, 2 日前筋注群は 7 日前筋注群より血中 HCG は有意に高値であった。さらに 7 日前筋注群と 3, 2 日前筋注群が同じ確率で妊娠すると仮定すると, 3, 2 日前筋注群の血中 HCG 値は明らかに筋注した HCG 製剤の影響を受けている (注射した HCG を測定している) と言える。さらに 10 mIU/ml 以上の症例は 3 日前, 2 日前筋注群が 7 日前群と比較して有意に高率であった。さらに 7 日前筋注群のなかで血中 HCG が 10 mIU/ml 以上の症例は 22.2% であった。どの群も同じ確率で妊娠すると仮定すると, 3 日前筋注群は血中 HCG 値が 50 mIU/ml 以上測定されなければ内因性の HCG (着床) を証明できたとは言えないと考えられる。

7 日以内に筋注した HCG 量と血中 HCG 値の関係では, 10000 IU 筋注群は未注射, 7 日前筋注群に比較して有意に高値であった。この事実から, 7 日以内に 10000 IU 以上を筋注した症例では血中 HCG 値は明らかに筋注した HCG 製剤の影響を受けていると考えられる。ここでも 22.2% が妊娠していたと考

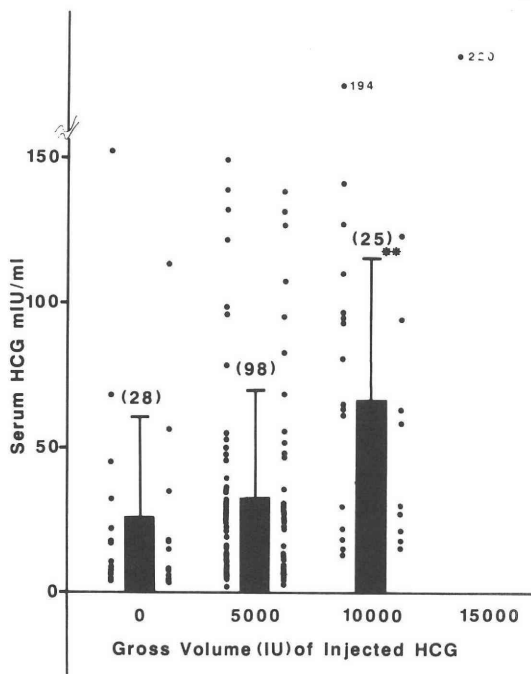


Fig. 2. Dose effect of injected HCG on serum HCG levels.

Data are presented as M ± S.D.

***: $P < 0.001$, Significant different from not injected cases.

えると測定値が90 mIU/ml以上で初めて内因性HCGを確認したと言える。

しかしながら3日前、2日前、10000 IU群いずれにも10 mIU/ml以下の症例が存在するため、HCG製剤の吸収、代謝には大幅な個人差があると考えられ、設定値以下の症例でも一概に内因性HCGの証明を否定できない。

一方、HCGテストパック反応へのHCG製剤の与える影響は、3日前筋注群、2日前筋注群で有意の差は認められないものの、未注射群、7日前注射群に対して(−)反応が約50%の低率で、(+)反応は約3.5倍高率であった。筋注HCG量との関係ではこれも有意差は認められないが10000 IU群の(±)反応は未注射群、7日前群に比較して2倍高率であった。これらの結果は血中HCG値の結果とよく相関しており、筋注したHCG製剤に反応している可能性が高い。以上の事実はHCGを3日前、2日前、10000 IU筋注している場合はHCGテストパックが(±)、(+)を呈したとしても妊娠と診断できないことを示している。しかし、3日前、2日前、10000 IU筋注群にも(−)反応が64.0%も存在するので、注射されたHCG製剤の吸収、代謝、尿への排泄にはこれまた大幅な個人差があることは明白であり、(±)、(+)反応を即HCG製剤の反応と断定して非妊娠(黄体機能存続症)と診断することはできない。

以上の結果から、BBT+16 Dayに妊娠診断を行う時、3日あるいは2日前にHCG 5000 IUを、あるいは7日以内に10000 IU筋注した症例では筋注したHCG製剤の影響で血中HCGが50 mIU/ml以上測定されなければ妊娠の診断はできない。また、HCGテストパックが(±)、(+)の反応を呈しても妊娠の診断は下せないことが明らかになった。

本論文の要旨は第34回日本不妊学会総会学術講演会(旭川市)で発表した。

文 献

- 1) 丸尾 猛, 西村隆一郎, 望月真人, 荒川 修, 竹内正七, 林 直樹, 武谷雄二, 水野正彦, 斉藤 満, 後藤 満, 後藤節子, 友田 豊, 水野金一郎, 八神喜昭, 岩田以津子, 大槻芳郎, 谷沢 修, 三宅正晃, 上田一之, 鳥越 正: Two-step sandwich法EIAを応用した高感度尿中hCG検出薬HCGテストパックの基礎的研究と臨床応用, 産と婦, 54: 1228, 1978
- 2) Howard, W. J. Jr., Jeanne, M., Anibal, A. A., Bruce, A. S., Mason, C. A., Lucinda, V., Jario, E. G., Theresa, W. W., Georgeanna, S. J., Charles, A. W., Themis, M. and George, L. W. Jr.: What is a pregnancy? A question for program of in vitro fertilization, Fertil. Steril., 40: 728, 1983
- 3) 假野隆司, 出馬淳名, 伊藤正尚: BBT 高温 16 日の HCG 値による妊娠, およびその予後の判定, 日不妊誌, 33: 332, 1988
- 4) 假野隆司: Two-step sandwich 法応用ディスク式 HCG EIA Test (HCG テストパック) の半定量判定による妊娠の早期予後診断, 日不妊誌, 33: 719, 1988

Evaluation of influence of extrinsic HCG on serum HCG level and result of HCG Testpack

Takashi Kano

Kano Clinic,
Osaka 542, Japan

An early diagnosis of pregnancy has depended on a measurement of HCG level either in serum or in urine. The current usage of extrinsic HCG which is an activator of luteal function might interfere with the accuracy of diagnosis of pregnancy. To evaluate the effect of HCG supplement for a diagnostic accuracy of pregnancy, a titer of HCG level in serum and in urine HCG Testpack were assessed in 16th day of Basal Body Temperature (BBT) in 4 groups: A; group without treatment, B; group treated with 5,000 units of i. m. HCG at 9th day of BBT, C; group treated with 5,000 units of HCG at 13th or 14th day of BBT, D; group treated with more than 10,000 units of HCG at after 9th day of BBT, respectively.

There was no significant difference between group A and B in serum HCG level and result of HCG Testpack. We could observe marked increase of serum HCG level in group C but not in group B. Similar result was observed in group D.

Thus, it is concluded that pregnancy can be diagnosed in group C and D by either more than 50mIU/ml of serum HCG or the vertical line is darker than horizontal line in HCG Testpack.

(受付: 1989 年 9 月 13 日)

排卵過程における過質化脂質および
free radical scavengers 活性の変動と
scavenger enzymes による排卵阻害効果
——過排卵処理幼若ラットにおける検討——

Changes of Lipid-peroxide and Free Radical Scavengers
in the Superovulated Immature Rats Ovaries and
an Inhibition of Ovulation by Scavenger Enzymes
——Suggested Role of Free Radicals on Ovulation——

滋賀医科大学産科学婦人科学教室（主任：吉田吉信教授）

須 戸 龍 男

Tatsuo SUDO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shiga University of Medical Science,
Shiga 520-21, Japan
(Director: Prof. Y. Yoshida)

排卵過程における活性酸素 (FR) の影響を検討する目的で、過排卵処理幼若ラットの卵巢組織を用いて、FR によって生成される過酸化脂質 (LPO) および FR を消去する superoxide dismutase (SOD) 活性、vitamin E (V.E) 濃度と、glutathione peroxidase (GSH-PX) 活性を測定し、hCG 投与後の経時的な変動を見た。さらに過排卵処理ラットでの、SOD 単独および SOD/catalase 投与、また、短期 V.E 欠乏状態での排卵数の変化を検討した。

(1) LPO 濃度は排卵前の hCG 投与 9 時間後で一過性のピークを示した。

(2) SOD 活性は hCG 投与後より速やかに上昇し、排卵期に相当する hCG 投与 12 時間後まで直線的に上昇した。

(3) SOD および SOD/CAT の投与により排卵数は減少した。また、21 日齢より短期に V.E 欠乏状態としたラットでは排卵数は増加した。

以上より、hCG 投与後に SOD 活性が急激に上昇したにもかかわらず、LPO が増加を示したことは、hCG 刺激による大量の FR の発生が示唆された。また、過排卵処理ラットにおいて FR の増減が排卵数に変化を起こしたことは、FR および LPO が排卵過程、特に卵胞破裂機構に密接に関与していることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 349-355, 1990)

緒 言

排卵現象は LH surge により誘起され、卵胞破裂による卵細胞の放出と卵胞顆粒膜細胞の黄体化の二

つの現象よりなる。このうち、卵胞破裂現象のメカニズムには不明の点が少なくない。Bjersing, et al.¹⁾ や奥田ら²⁾ は成熟卵胞周囲は排卵期に近づくにつれ、毛細血管の拡張と透過性の充進が起り、卵胞周囲

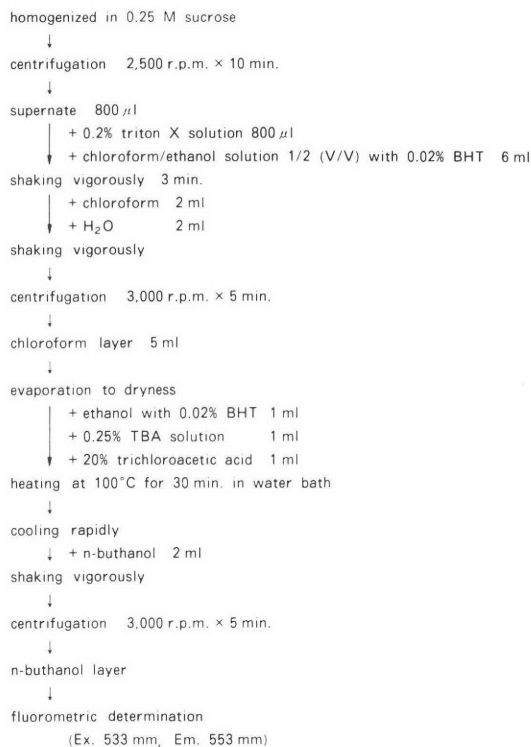


Fig. 1 Assay procedure of lipid peroxide in rats ovaries.

の浮腫および卵胞内への血液成分の漏出が見られるため、排卵期卵胞周囲は炎症に類似した状態となると述べた。さらに Espey, et al.³⁾らは多種の消炎剤により、排卵が阻害されることから排卵現象は炎症類似の反応であると報告している。また, prostaglandins (PGs) が排卵に関与することは知られた事実であり、ラット卵胞液中の PGs は排卵期に相当する hCG 投与 12 時間後にピークとなることが知られているが⁴⁾, LH surge がどのような機序で PGs の誘導・増加を起こすかは明らかではない。

近年, free radicals (FR) は動脈硬化や発癌などに関係するだけでなく、炎症の起因物質としての作用が注目されている。superoxide radical (O_2^-) を代表とする FR および過酸化脂質 (LPO) が炎症に関与するとの数多くの報告があり⁵⁾, さらにこれらは、PGs 合成の促進と関連している^{6,7)}。

つまり, FR および LPO は炎症状態を惹起し積極的に PGs 合成を促す訳であり、卵胞破裂現象が一種の炎症類似状態である以上, FR または LPO の関与が理論的に成り立ち得る。排卵過程において FR および LPO の関与を示した報告はいまだ見られておらず、これを明らかにする目的で, PMSG/hCG にて過排卵

A) Component of medium

	final concentration
(1) Epinephrine	2×10^{-4} M
(2) Xanthine	2×10^{-4} M
(3) Xanthine oxidase	$5 \sim 7 \times 10^{-8}$ M
(4) tris-Malate buffer (pH 8.6)	0.05 M
(5) Sample or standard SOD	

B) Principle

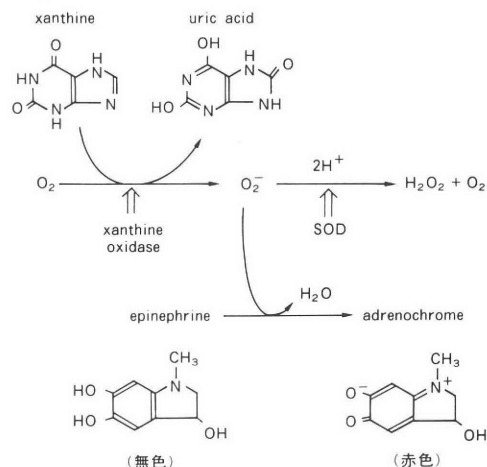


Fig. 2 Assay procedure of SOD activity.

処理を行った未成熟ラット卵巣組織を用いて, hCG 投与後の LPO 濃度, その radical scavengers である superoxide dismutase (SOD) 活性, glutathione peroxidase (GSH-PX) 活性, および vitamin E (V.E) 濃度の変動を見るとともに, 短期 V.E 欠乏ラット, scavengers 投与ラットでの排卵数の変化を観察し, FR または LPO が排卵現象に密接な関係を有することを示唆したので報告する。

研究対象および方法

(実験 1) 過排卵処理ラットの過酸化脂質および radical scavengers 活性の測定。

Wistar 系雌性未成熟ラットを用い, 14-10 時間照明の空調飼育室にて, 固形飼料 (オリエンタル酵母工業 K.K.) と水を自由摂取させた。生後 25 日齢 (体重 50 g 程度) にて PMSG 20 単位を, さらに 48 時間後に hCG 20 単位をそれぞれ腹腔内に投与した。hCG 投与後の 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 24, 36 および 48 時間後に卵巣を摘出し, 直ちに 40 倍量の 0.25 M sucrose にて homogenize し, 800 g × 10 分間遠心後, その上清を -20°C にて凍結保存し, 数日以内に試料として測定に供した。

① 過酸化脂質 (LPO) 濃度の測定は, thiobarbituric

Table. 1 Changes of LPO and radical scavengers in PMSG/HCG-treated immature rats ovaries.

Time after HCG (hrs.)	TBA-RS (nM MDA/g weight)	SOD activity (Unit/mg weight)	GSH-PX activity (nM NADPH/min./mg weight)	α -tocopherol (ng/mg weight)
0	13.88 $\pm$ 0.68 (N=12)	0.68 $\pm$ 0.04 (N=22)	5.51 $\pm$ 0.53 (N=6)	37.71 $\pm$ 1.62 (N=11)
3	13.85 $\pm$ 1.08 (N=7)	0.84 $\pm$ 0.06 (N=18)	9.19 $\pm$ 0.87 (N=4)	34.93 $\pm$ 2.12 (N=3)
6	14.41 $\pm$ 1.37 (N=17)	1.05 $\pm$ 0.06 (N=16)	8.25 $\pm$ 0.67 (N=6)	35.71 $\pm$ 2.38 (N=9)
9	19.25 $\pm$ 2.02 (N=18)	1.18 $\pm$ 0.05 (N=29)	11.19 $\pm$ 0.63 (N=4)	47.10 $\pm$ 4.90 (N=8)
12	12.56 $\pm$ 1.03 (N=9)	1.32 $\pm$ 0.06 (N=27)	10.39 $\pm$ 0.49 (N=5)	48.40 $\pm$ 4.65 (N=7)
15	12.30 $\pm$ 1.33 (N=8)	1.05 $\pm$ 0.05 (N=31)		67.35 $\pm$ 12.58 (N=8)
20	9.59 $\pm$ 1.72 (N=4)	1.25 $\pm$ 0.11 (N=14)	10.25 $\pm$ 0.80 (N=7)	72.30 $\pm$ 3.67 (N=18)
24	12.60 $\pm$ 1.30 (N=10)	1.15 $\pm$ 0.04 (N=4)		79.10 $\pm$ 6.98 (N=11)
36	10.60 $\pm$ 0.74 (N=3)	1.27 $\pm$ 0.05 (N=3)		114.40 $\pm$ 18.85 (N=3)
48	11.20 $\pm$ 1.10 (N=5)	1.60 $\pm$ 0.13 (N=10)		159.32 $\pm$ 6.31 (N=5)

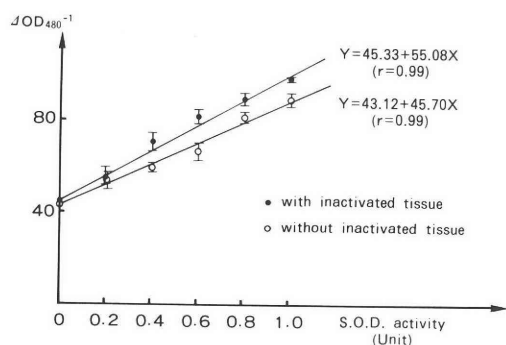
Mean $\pm$ S.E.

Fig. 3 SOD standard curve with/without inactivated tissue.

acid(TBA)とLPOの酸性下での分解生成物であるmalondialdehyde(MDA)との反応で生じる赤色物質(いわゆるTBA reacting substance)の定量法⁸⁾を一部改変した。0.2% triton-xにて細胞膜を可溶化し、Bligh-Dyer法にて抽出した脂質に、20% trichloroacetic acid(TCA)と0.25% TBAの混合液を添加して100°Cで30分間加熱した。加熱後急冷し、TBA reacting substanceを分光蛍光光度計(日立F-4000)を使用して励起波長533 nm、蛍光波長553 nmで励起蛍光を測定し、過酸化脂質の相対量とした(Fig. 1)。また0.2% triton-xのみを含む精製水で同様の処理を行いblankとした。

②SOD活性の測定はmitochondriaおよびmicrosomeなどによる酸化還元酵素の影響を受けないepinephrine酸化阻止反応法により行なった。xanthine-xanthine oxidaseにより生成したO₂⁻がepinephrineを酸化してadrenochromeを生じる。

SODは2分子のO₂⁻をH₂O₂とO₂に不均化し、adrenochromeの生成を用量依存的に阻害する。epinephrine酸化阻止反応法はMisra et al.⁹⁾の方法を一部改変した。すなわち反応混合液中のepinephrine濃度を2 $\times$ 10⁻⁴Mと飽和量まで増加させ、さらにepinephrineの自動酸化を出来るだけ妨げ、しかも本来のSOD活性を損なわない条件として、緩衝液をph=8.6とした(Fig. 2)。epinephrine酸化阻害は分光光度計(島津UV200S)を使用し、480 nmの吸光度変化で求めた。標準曲線はadrenochrome生成量が Δ OD_{480nm}=0.025/min.となる様に、あらかじめxanthine oxidaseを調整し、精製bovine SOD(Sigma EC 1. 15. 1. 1)にて標準曲線を求めた。活性は0~1.2単位/cuvetteの範囲で直線性を示した。さらに、回収実験として試料中のSOD以外の酸化還元反応の影響を見るために、bovine SOD(Sigma EC 1. 15. 1. 1)が完全に不活化する60°C $\times$ 30分間の条件で試料をインキュベートし、内因性SODを不活性化したうえで、精製SODを加え標準曲線を求め、充分な直線性を得た(Fig. 3)。

③ α -tocopherol(V.E)濃度の測定はpascou, et al.¹⁰⁾の方法に準じた。tocol(エーザイ社の提供による)を内部標準として、試料をethanolと5倍量のhexanにて直接抽出し、高速液体クロマトグラフィーアンペロメトリック検出器(医理化社製Σ875)を使用してピーク面積比により定量した。カラムは医理化社製RP-18T(ϕ 4 mm $\times$ 250 mm)を使用し、移動相は57.17M Na₂ClO₄ in ethanol/methanol(V/V=20/80)、Apply voltageは、OX. 700 mV、流速は0.5 ml/min.で行なった。本条件下でのV.Eの

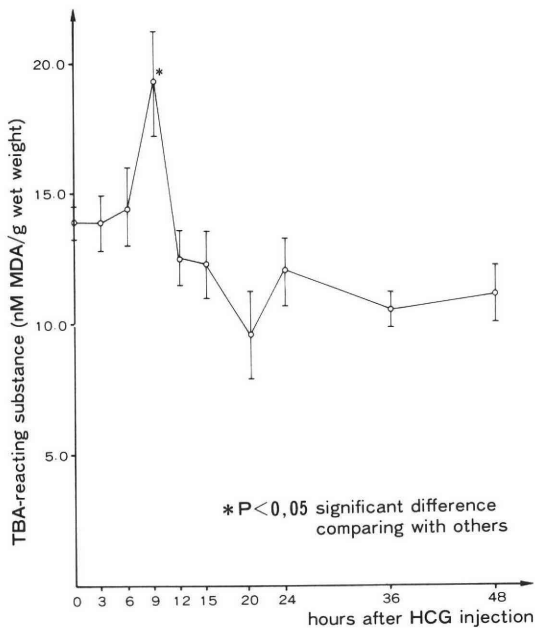


Fig. 4 Changes of LPO level in PMSG/HCG-treated immature rats ovaries.
(Mean $\pm$ S.E.)

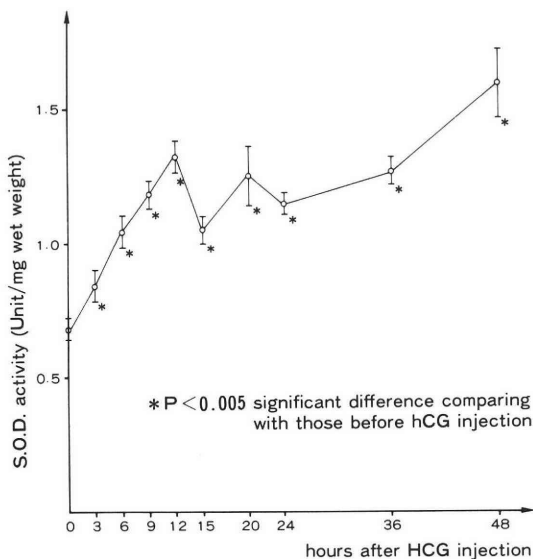


Fig. 5 Changes of SOD activity in PMSG/HCG-treated immature rats ovaries.
(Mean $\pm$ S.E.)

retention time は 12.0 min. で検出された。

④ GSH-Px 活性は Yasumoto et al.¹¹⁾の方法に準

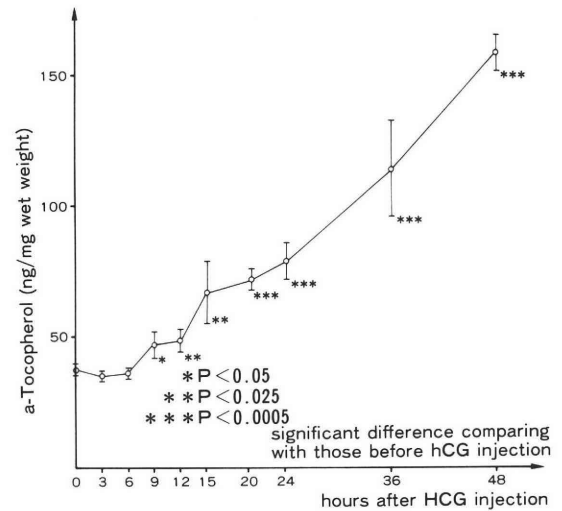


Fig. 6 Changes of V.E (a-tocopherol) concentration in PMSG/HCG-treated immature rats ovaries.
(Mean $\pm$ S.E.)

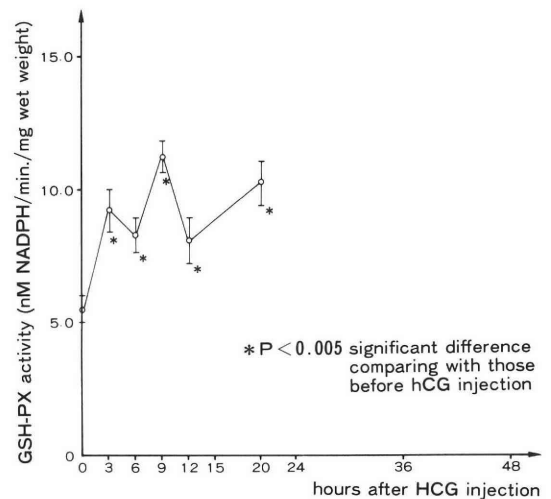


Fig. 7 Changes of GSH-PX activity in PMSG/HCG-treated immature rats ovaries.
(Mean $\pm$ S.E.)

じた。0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で還元型 glutathione (GSH) を試料に反応させ NADPH-glutathione reductase 系を共役させることで、NADPH の 340 nm での吸光度の減少より活性を求めた。

(実験 2) 過排卵処理ラットの排卵数の算定。

まず FR を減少させる条件として, scavenger であ

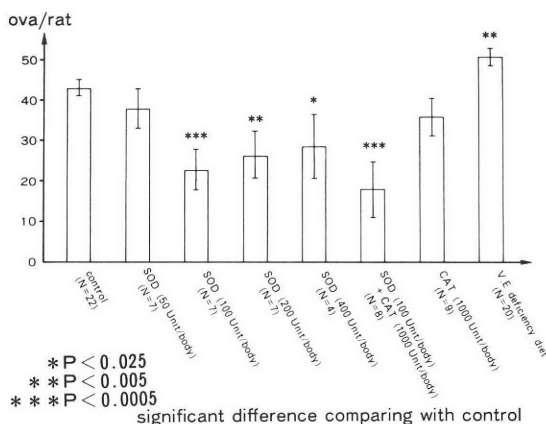


Fig. 8 Effect of SOD and/or CAT administered 3 hours after hCG injection and V.E deficient diet on ovulation in superovulated immature rats.

(Mean $\pm$ S.E.)

る SOD および catalase (CAT) を投与した。SOD 単独投与群は、SOD が生体内で比較的速やかに不活性化されることを想定し、hCG 投与 3 時間後に bovine SOD (Sigma EC 1. 15. 1. 1) を 50, 100, 200 および 400 単位/rat をそれぞれ静脈内投与した。同様に CAT 単独投与群および SOD/CAT 同時投与群も、hCG 投与 3 時間後に CAT (Sigma EC 1. 16. 1. 6) 1000 単位、または SOD 100 単位/rat および CAT 1000 単位/rat を同時に静脈内投与した。次に FR を増加させる条件として、日本クレア社製の VE 欠乏食を生後 21 日齢より自由摂取させ、短期 VE 欠乏群とした。いずれの群も過排卵処理は生後 25 日齢より PMSG 20 単位を腹腔内に投与し、さらに 48 時間後に hCG を 20 単位腹腔内投与を行い、hCG 投与 20 時間後に開腹し、実体顕微鏡にて卵管膨大部中の卵細胞数を算定した。

研究成績

(1) 卵巣中の過酸化脂質および radical scavengers の変動

① 過酸化脂質 (LPO) 変動 (Fig. 4 Table 1)

TBA reacting substance (malondialdehyde 相対量) を指標とした過酸化脂質は排卵直前の hCG 投与 9 時間に一過性の上昇を示したが、それ以外の変動は見られなかった。

② SOD 活性の変動 (Fig. 5 Table 1)

SOD 活性は hCG 投与後 3 時間ですでに有意に上昇を示し、排卵期に相当する hCG 投与 12 時間後まで直線的に活性は増加した。排卵直後に相当する hCG

投与 15 時間後で活性は一時低下するが以後再び上昇し、hCG 投与 48 時間後の黄体形成後に最大の活性値を示した。

③ α -tocopherol 濃度の変動 (Fig. 6 Table 1)

α -tocopherol 濃度は hCG 投与 6 時間までは著変はなかったが、排卵直前の hCG 投与 9 時間後で増加を見せ、排卵後よりさらに急激な増加を認めた。黄体形成後に最大濃度を示した。

④ GSH-PX 活性の変動 (Fig. 7 Table 1)

GSH-PX 活性は hCG 投与 3 時間後に有意に上昇するが、以後の変動に一定の傾向はみられなかった。

(2) V.E. 欠乏ラットおよび scavengers 投与ラットの排卵数の比較 (Fig. 8)

21 日齢より V.E 欠乏食とした群では、排卵数は対照群に比べ有意に増加した。SOD を単独投与した群では、50 単位投与では対照群と有意差はなかったが、減少傾向にあり、100 単位投与群は対象群に比べ有意に減少した。しかし 100 単位以上の投与群では、これ以上の減少は見られなかった。CAT 単独投与群は対照群と有意差は見られなかったが、やや減少傾向にあった。さらに、SOD と CAT を併用した群では対照群に比べ有意に排卵数は減少し、また、SOD 100 単位投与群と比べても減少傾向にあった。

考 案

superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical ($OH\cdot$) などの free radicals (FR) は、生体の各種の酸化反応時に、例えば X 線および紫外線の irradiation, xanthine oxidase や NADPH oxidase など flavin enzymes の反応時に、また、mitochondria での respiratory chain 障害時などで局所で発生する。FR の発生は、生体が oxidative phosphorylation に依存し酸素を利用したエネルギーを獲得している以上不可避のものであり、正常細胞の mitochondria での respiratory chain より O_2^- として leak すると言われている¹²⁾。この FR の発生に対し、生体には種々の scavenger enzymes が存在し、例えば O_2^- に対しては superoxide dismutase (SOD) が H_2O_2 および O_2 へと不均化させ無毒化する。生じた H_2O_2 は glutathione peroxidase (GSH-PX) や catalase (CAT) などにより最終的に H_2O となり FR を処理する。また、 α -tocopherol (V.E) や ascorbic acid など抗酸化物質が scavenger enzymes と共同して FR を処理する。このような防御機構をくぐり抜けて発生した FR は細胞膜および血中の不飽和脂肪酸を過酸化化させ、過酸化脂質 (LPO) を生じさせる。LPO は Fe^{2+} , Cu^{+} などの遷移性物質の存在下に OH を発生し、さらに蛋白・

脂質の過酸化が一層促進される¹³⁾。それにより血管内皮障害などの病変を誘発し¹⁴⁾、炎症などの病変にいたると考えられている⁵⁾。

今回の観察で過排卵処理幼若ラット卵巣中において、hCG 投与後速やかに卵巣中の SOD 活性が上昇し、さらに、LPO の指標とされる TBA reacting substance が排卵前に一過性のピークを形成することが明らかとなった。このことは hCG 刺激により比較的急激に誘導された scavengers 活性の上昇をも上回る大量の FR の生成が惹起されたことを意味するものと解釈され、排卵時卵巣周囲に見られる炎症類似の変化は、これらの FR により引き起こされる可能性が高いと思われる。

一方、排卵との密接な関係が認められている PGs との関係については、これら FR および LPO は細胞膜に作用して PGs の合成を促進することが知られている。in vivo において、Ōyanagi⁶⁾は PGs 生成は O_2^- が規定すると報告した。また、in vivo においても同様に、O'Brien, et al.⁷⁾は少量の過酸化物が不飽和脂肪酸をラジカル化して PGs 様物質を産生させると報告した。以上のことより、種々の FR および LPO が PGs 合成の trigger として働くことが推測されている。

排卵過程では、ラット卵胞液中の PGs は、hCG 投与 12 時間後にピークとなることが知られているが、今回の観察の卵巣中 LPO は hCG 投与 9 時間後に一過性のピークを形成し、卵胞液中の PGs のピークに先行する結果となった。このことは FR および LPO が PGs の生成系を介しても排卵現象に関与する可能性を示唆する。

FR の動態は scavenger enzymes により間接的に知ることができるが、排卵前において主要な 2 つの scavenger enzymes 活性の間に不均衡が見られた。すなわち、SOD 活性は hCG 投与により速やかに直線的に上昇したのに対し、GSH-PX 活性は hCG 投与後 3 時間での上昇が見られるものの、以後の変動は一定ではなかった。SOD 活性の急上昇にもかかわらず LPO が一過性にピークを取ることは、scavengers 間の活性の不均衡のため、 H_2O_2 が蓄積されたために、過酸化がさらに進行したと解釈するか、scavengers による消去を上回る FR の生成量があるものと考えられる。

そこで FR が実際に in vivo において卵胞破裂に関与するか否かを検討するために、実験 2 において、過排卵処理未成熟ラットに対し hCG 投与 3 時間後に SOD および CAT を投与し、FR を減少させた時の排卵数を対照群と比較した。SOD を単独投与し、 O_2^- 量を減少させた系では 100 単位以上の投与群では

対照群に比べ明らかに排卵数は減少した。一方 SOD 100 単位と CAT 1000 単位を併用投与し、 O_2^- と H_2O_2 量を減少させた系では、排卵数は SOD 100 単位の単独投与に比べ、さらに若干の低下傾向があった。以上の結果より、in vivo で各種の FR の発生量を低下させた場合には排卵が抑制され、したがって FR が卵胞破裂に密接に関与することが強く示唆された。このことは強力な scavenger 物質である V.E の欠乏実験でも支持される。生後 21 日齢より短期に V.E 欠乏としたラットでは逆に排卵数は増加した。これは FR の増加により排卵が促進されたためと考えられる。なお、このことは比較的 steroid 合成能の低い未熟な卵胞をも破裂させた可能性があるものと考えられる。

以上の結果より、排卵に FR が関与することが明らかにされた。おそらくは FR あるいは LPO が増加することで直接的に、また、PGs などの合成を促進し、炎症性変化を起こして卵胞破裂に働きかけているものと推測される。

排卵後の SOD 活性は一過性に低下するが、黄体完成時に最大値となった。一方、V.E 濃度は排卵後急激に上昇し、やはり黄体完成時に最大濃度を示した。黄体期においても、この 2 つの scavengers 機能は上昇しており、このことは steroids 合成との関連が強く示唆される。すなわち、steroids 合成のための酸素添加反応の際に FR が大量に生じている可能性があり、scavengers 機能の上昇はその酸化 stress に対する防御機能と解釈される。したがって黄体機能発現には scavengers 活性も不可欠のものと推測される。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師吉田吉信教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に終始直接の御指導を頂きました竹中 章講師に深く感謝致します。

本論文の要旨は第 41 回日本産科婦人科学会学術講演会（岡山，1989）、第 34 回日本不妊学会総会学術講演会（旭川，1989）で発表した。

文 献

- 1) Bjersing, L. and Cajander, S.: Ovulation and the mechanism of follicle rupture. VI. Ultrastructure of theca interna and the inner vascular network surrounding rabbit graafian follicles prior to induced ovulation, Cell Tiss. Res., 153: 31, 1974
- 2) 奥田雄二，岡村 均，神崎秀陽，竹中 章，森本幸巳，西村敏雄：排卵過程における家兔卵胞壁毛細血管の超微形態学的研究，日産婦誌，32：739，1980

- 3) Espey, L. L., Stein, V. I. and Dumitrescu, J.: Survey of antiinflammatory agent and related drugs as inhibitor of ovulation in the rabbit, *Fertility and Sterility*, 38: 238, 1982
- 4) 佐藤和雄, 三橋直樹, 福岡秀典, 柴田治郎, 中林正雄, 河合康夫, 安水洗彦, 金子義晴, 木下勝之, 坂元正一: 排卵における Prostaglandin および線溶系の意義, 産科と婦人科, 44: 91, 1977
- 5) 大柳善彦: 活性酸素の炎症への種々の関与様式, 炎症, 3: 377, 1983
- 6) Ōyanagi, Y.: Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot oedema, *Biochem. Pharmacol.*, 25: 1465, 1976
- 7) O'Brien, P. J. and Rahimtula, A.: The possible involvement of a peroxidase in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70: 832, 1976
- 8) Buege, J. A. and Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation, In *Method in Enzymology*, 52: 302, Academic Press, 1978
- 9) Misra, H. and Fridovich, I.: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *Biol. Chem.*, 247: 3170, 1972
- 10) Pascoe, G. A., Duda, C. T. and Reed, D. J.: Determination of α -tocopherol and α -tocopherylquinone in small biological sample by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, 414: 440, 1987
- 11) Yasumoto, K., Iwami, K. and Yoshida, M.: Vitamin B dependence of selenomethionine and selenite utilization for glutathione peroxidase in the rat, *J. Nutr.*, 109: 760, 1979
- 12) Hohl, H. and Hegner, D.: Do mitochondria produce oxygen radicals *in vivo*?, *Europ. J. Biochem.*, 82: 563, 1978
- 13) 中野 稔: 活性酸素による生体脂質膜の傷害, *スーパーオキシドと医学*, 107, 共立出版, 1981
- 14) Yagi, K., Okawa, H., Ohishi, N., Yamashita, M. and Nakashima, T.: Lesion of aortic intima caused by intravenous administration of linoleic acid hydroperoxide, *J. Appl. Biochem.*, 3: 58, 1981

**Changes of lipid-peroxide and
free radical scavengers in
the superovulated immature rats
ovaries and an inhibition of
ovulation by scavenger enzymes
—Suggested role of free radicals on ovulation—**

Tatsuo Sudo

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shiga University of Medical Science,
Shiga. 920-21, Japan
(Director: Prof. Y. Yoshida)

Recent studies on ovulation have suggested that follicle rupture has been related to perfollicular changes resembling to inflammation. However, the mechanism leading to these perfollicular changes is still obscure. To determine if free radicals and radical scavengers participate some roles in ovulation and luteinization, lipid peroxide (LPO) and radical scavenger activities, namely superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and α -tocopherol (V.E) were investigated in superovulated immature rats ovaries induced by PMSG/hCG. LPO concentration transiently elevated prior to ovulation. SOD activity promptly increased after hCG injection and reached a maximum at 48 hours after the injection. GSH-PX activity rapidly increased after hCG injection, however, no increase followed 3 hours after the injection. V.E concentration drastically increased after ovulation and reached a maximum at 48 hours after hCG injection. Furthermore, SOD and/or catalase administration at 3 hours after hCG injection decreased the number of ova shed in superovulated immature rats, while feeding with V.E deficient diet for 5 days increased the number of ova shed. These data not only suggest that a large amount of free radicals exceeding the scavenger activities is yielded by gonadotropin stimulation but also indicate free radicals participate in follicle rupture, acting as an inducer of inflammatory reaction.

(受付: 1989年11月18日特掲)

多嚢胞性卵巣症候群における妊娠時の 血中テストステロン動態について

The Plasma Testosterone Level in Pregnant Women with Polycystic Ovary Syndrome

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	白井 孝昭	吉野 和男
Kentaro TAKAHASHI	Takaaki SHIRAI	Kazuo YOSINO
西垣 新	江田 芳美	内田 昭弘
Arata NISHIGAKI	Yoshimi EDA	Akihiro UCHIDA
	北尾 学	
	Manabu KITAO	

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

高 testosterone 血症を有する多嚢胞性卵巣症候群患者で、治療後妊娠に至った婦人（PCOS 妊娠群 5 名）の妊娠時における母体血中 testosterone 濃度の動態を知る目的で、正常妊婦 37 名を対照として検討を行なった。正常妊娠群では、妊娠週数とともに testosterone 濃度の増加が認められ、妊娠前値に比べて妊娠中期で約 3 倍、後期で約 5 倍の増加を呈した。PCOS 妊娠群での血中 testosterone の推移は、上昇した testosterone 濃度が、中期で一度低下する傾向を認めるが、後期にかけては著しく上昇し、妊娠前期に比べて中期で約 3 倍、後期で約 7 倍の増加を呈した。妊娠による testosterone 増加は、主として胎盤で産出されるものと、testosterone binding globulin との総和によると考えられているが、PCOS 妊娠群で著しく高値を示すことは、胎盤および卵巣での aromatase 活性の低下による母体血中 testosterone の増加による可能性であることが推察された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 356-359, 1990)

はじめに

妊娠時には、母体および胎児は共に特別な内分泌環境下におかれており、非妊時とはその内分泌動態は異なるものである。妊娠中の血中ホルモンやホルモン様物質ならびに酵素の動態に関する報告は数多く¹⁻⁵⁾血中 testosterone 濃度については、estrogen, progesterone が上昇するように、妊娠を通して漸増すると報告されている^{1,3,4)}。今回、高 testosterone 血症を合併する場合が多い多嚢胞性卵巣症候群における testosterone の妊娠による変化を知るために、多

嚢胞性卵巣症候群の患者で、治療後妊娠に至った症例に関して、正常妊娠を対照として、妊娠中の testosterone の動態について検討したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

研究対象および方法

島根医科大学医学部附属病院産科婦人科不妊・内分泌外来を受診した多嚢胞性卵巣症候群患者で、芍薬甘草湯および clomiphene の投与を行ない、治療後妊娠に至った婦人 5 名（PCOS 妊娠群）を対象とした。なおコントロールとして合併症のない正常妊婦

表1 妊娠前における血中testosterone値

	治療前	妊娠前
PCO妊娠群	146.5±15.5 (ng/dl)	72.8±1.8 (ng/dl)
正常妊娠群	—	67.1±5.9 (ng/dl)

(mean±S.E.)

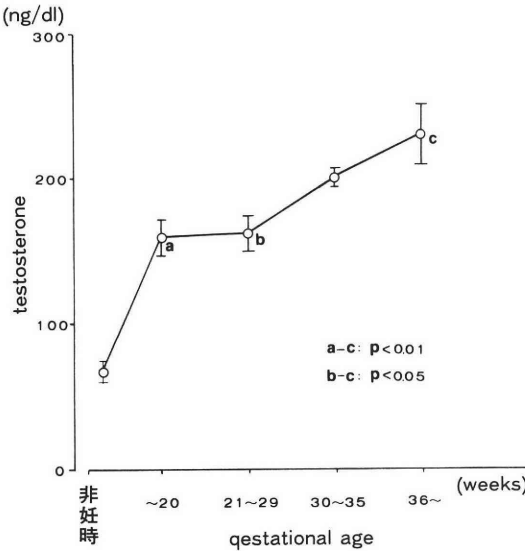


図1. 正常妊娠群における血中 testosterone 値の推移
(mean±S.E.)

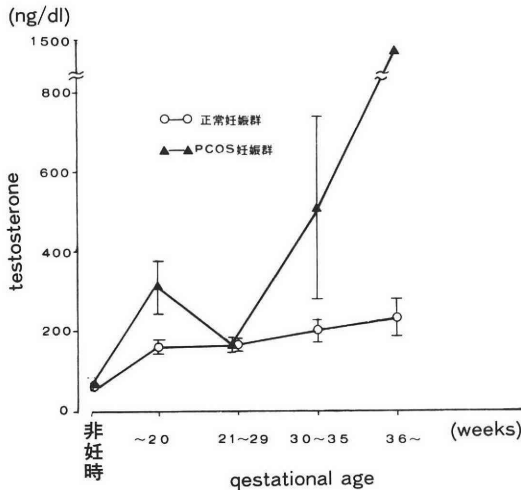


図2. 正常およびPCOS妊娠群における血中testosterone 値の推移
(mean±S.E.)

37名(正常妊娠群)を用いた。多嚢胞性卵巣症候群は、ホルモン学的に 1) 血中 LH $\geq$ 30 mIU/ml あるいは LH/FSH 比が 3.0 以上, 2) testosterone $\geq$ 100 ng/dl, 3) E₁/E₂比 $\geq$ 1.0 以上であり, 超音波断層法にて両側卵巣に多嚢胞が認められる症例である。testosterone の測定は,¹²⁵I-testosterone RIA キット(栄研)により, radioimmunoassay で行ない, PCOS 妊娠群では, PCOS の治療前, 治療後および妊娠中の初期, 中期, 後期で測定を行なった。また正常妊娠群では, 妊娠前および妊娠中の初期, 中期, 後期に testosterone 値の測定を行なった。なお, 統計学的な検討は Student's t-test を用いた。

研究結果

1) 妊娠前における血中 testosterone 値

PCOS 妊娠群において, 治療前の testosterone 値は, 146.5±15.5 ng/dl (mean±S.E.) であり, 治療後で妊娠前には全例が 100 ng/dl 未満と正常域に改善し, 平均で 72.8±1.8 ng/dl であった。一方, 正常妊娠群の妊娠前 testosterone 値は, 67.1±5.9 ng/dl であり, PCOS 妊娠群との間には, 有意差は認められなかった(表1)。

2) 正常妊娠群, PCOS 妊娠群における血中 testosterone 値の推移

正常妊娠群においては, 週数とともに testosterone 濃度は増加し, 特に妊娠後期において増加の程度が大きい傾向を示した(図1)。一方, PCOS 妊娠群では, 増加した testosterone 濃度が一度中期で低下する様子がみられるものの, 後期にかけて, 正常妊娠群に比べて, 著しく上昇する傾向が認められた(図2)。また妊娠前値を 100 とした時の testosterone 増加率でみると, 正常妊娠群では, 中期で約3倍, 後期で約5倍の増加率があるが, PCOS 妊娠群では, 中期では約3倍と正常妊娠とはほぼ同様な増加を示したが, 後期では, 約7倍もの増加率が認められた(図3)。

次に, 多嚢胞性卵巣症候群で治療後に妊娠した1症例を示す。

症 例

患者: 31 歳, 主婦 G(1)P(1)

当科不妊・内分泌外来にて, 挙児希望にて通院中の患者で, 血中 testosterone 値は 137.1 ng/dl, LH は 35 mIU/ml, FSH は 10 mIU/ml, LH/FSH 比は 3.5, E₁/E₂比は 3.0 であり, hirsutism が認められ, 超音波断層装置で, 多嚢胞性卵巣があり, 多嚢胞性卵巣症候群と診断し, 芍薬甘草湯を 7.5 g/day を分

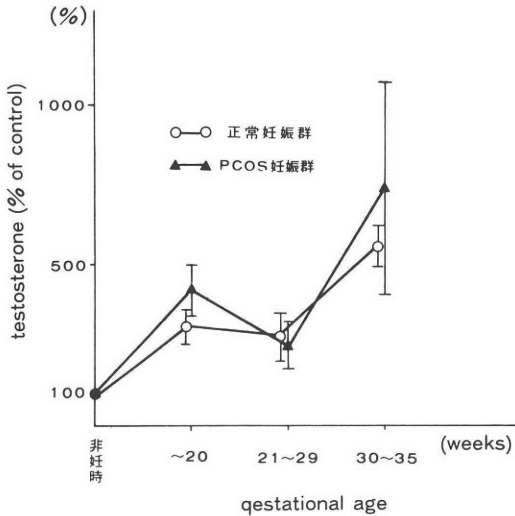


図3. 正常およびPCOS妊娠群における血中 testosterone 増加率の変化

(mean $\pm$ S.E.)

3で食前に投与したところ、血中 testosterone 値は 69 ng/dl と低下した。芍薬甘草湯投与のみでは無排卵であったので、clomiphene を併用し、芍薬甘草湯、clomiphene 投与 3 クール目で妊娠に至った。妊娠後の血中 testosterone 値は、10 週で 364.7 ng/dl と上昇、20 週で 192.8 ng/dl、24 週で 169.9 ng/dl と一度低下傾向を示したが、34 週で 837.5 ng/dl と再上昇した。妊娠 36 週 5 日で陣痛発来し、2550 g の男児を出産した。分娩直後の testosterone 値は、1394.3 ng/dl と非常に高値を示し、産後 7 日目には、587 ng/dl と高値ながらも妊娠後期より低下を示し、4 週間後には、78.3 ng/dl と正常域にもどった(図4)。なお、妊娠前、妊娠中、分娩後における hirsutism の変化は認められなかった。

考 察

妊娠時の母体血中 testosterone 濃度については、他の増加するステロイドホルモンと同様、非妊娠時に比べて高値を示すことが知られている¹⁻⁵⁾。Mizuno et al.³⁾は、妊娠時の testosterone 濃度の増加は、妊娠初期より始まり、13~16 週で約 2.5 倍、末期には約 4 倍に上昇すると報告している。Klinga et al.⁵⁾は、男児を有する妊婦は、妊娠 7 週より増加した testosterone 濃度が、9~11 週で peak に達し、15~20 週までに減少するとしている。また、石井¹⁾によると、妊婦の testosterone 濃度は、妊娠の進行とともに漸増し、40 週で非妊娠時の約 4 倍と peak に達すると報告している。このように、妊娠が進むにつれて、母

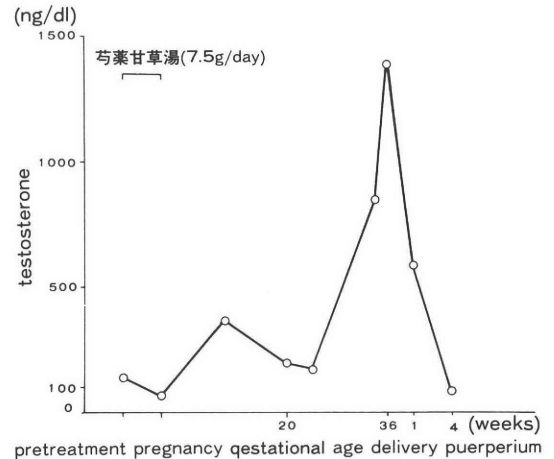


図4. 多嚢胞性卵巣症候群患者の妊娠における血中 testosterone 値の推移

体血中 testosterone が増加するというのは、大体の一致した意見であり、今回の結果においても、正常妊娠において妊娠週数とともに、母体血中 testosterone 濃度は増加し、後期では非妊娠時の約 5 倍の増加を示した。

多嚢胞性卵巣症候群では、aromatase 活性の障害により、testosterone 濃度の増加をきたしている⁶⁾が、治療により testosterone 濃度が正常域に達していても、PCOS 妊娠群では、正常妊娠群に比べて母体血中 testosterone 濃度の増加率は高く、後期では非妊娠時の約 7 倍もの高値を示した。血中 testosterone 濃度が妊娠時増加するのは、主として胎盤で産生されていると思われる testosterone が、単に増加するのと、testosterone binding globuline (TBG) が増加するという説がある^{1,7)}。しかしいずれにしても正常妊娠に比べて、PCOS 妊娠群で testosterone の増加率が高いことを考えると、PCOS 妊娠群では胎盤および卵巣での aromatase 活性低下の可能性がある。今回検討した PCOS 妊娠群では、妊娠中に testosterone が非常に高値であるにもかかわらず、hirsutism が妊娠前に比べ増強せず、また正常妊娠群でも同様であることを考えると、TBG の増加が血中 testosterone 増加に影響している可能性を示唆している。このように、PCOS 妊娠での高 testosterone 血症の意義については明らかではないが、正常妊婦での胎児の性分化、発育に作用しているのではないかとされており¹⁾、今後 testosterone 並びにその関連物質、児の性別などについて検討を加えていきたいと思っている。

(本論文の要旨は、第 41 回日本産科婦人科学会中国四国合同地方部会総会にて発表した。)

文 献

- 1) 石井久淑：妊娠時の血中 testosterone 動態について，日産婦誌，24：513，1972
- 2) 高橋 諄，矢内原 巧：血中ホルモンレベルからみた男女差，産と婦，53：1646，1986
- 3) Mizuno, M., Lobotsky, J., Lloyd, C. W., Kobayashi, T. and Murasawa, Y.: Plasma androstenedione and testosterone during pregnancy and in the newborn, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28: 1133, 1968
- 4) Dawood, M. Y., Saxena, B. B.: Testosterone and dihydrotestosterone in maternal and cord blood and in amniotic fluid, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 129: 37, 1977
- 5) Klinga, K., Bek, E. and Runnebaum, B.: Maternal peripheral testosterone levels during the first half of pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131: 60, 1978
- 6) 柳沼 恣，他：芍薬甘草湯 (S-K) 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—多施設共同研究，日不妊誌，33：606，1988
- 7) August, G. P., Tkachuk, M. and Grumbach, M. M.: Plasma testosterone-binding affinity and testosterone in umbilical cord plasma, late pregnancy, prepubertal children, and adults, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29: 891, 1969

The plasma testosterone level in pregnant women with polycystic ovary syndrome

Kentaro Takahashi, Takaaki Shirai,
Kazuo Yosino, Arata Nishigaki,
Yoshimi Eda, Akihiro Uchida
Manabu Kitao

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

Plasma testosterone was measured during pregnancy in five women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and in thirty-seven normal women. In normal pregnant women, plasma testosterone level was increasing gradually on the advance of gestational week, and reaching three times and five times the prepregnancy values in the second and third trimesters, respectively. In PCOS pregnant women, plasma testosterone level increased more than that of normal pregnant women with three times and seven times the prepregnancy values during the second and third trimester, respectively. During pregnancy, plasma testosterone is mainly produced in placenta, but in PCOS pregnant women, it is suggested that the increased testosterone level was due to the reduced activity of aromatase at placenta and ovary.

(受付：1989年7月24日)

ASSOCIATION OF MENSTRUAL DISORDER AND HYPERANDROGENISM

Shoichi TANAKA, Hiromi FUKUE, Masahiro MIZUNUMA,
Miho FUJII, Hiroshi Yamamoto, Hiroshi HATA,
Toshiaki ENDO and Masayoshi HASHIMOTO

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

Abstract: An investigation was carried out to know relations among serum LH, FSH, DHEA-S, and A-dione in the 27 cases of high testosterone cases out of cases of abnormal menstruation as the subject.

Out of the 27 cases, amenorrhea was found in 25 cases and anovulatory cycles were noted in 2 cases. In 21 out of the 25 cases, a diagnosis of PCO could be made.

Investigation into relations between serum LH and testosterone, DHEA-S, or A-dione failed to reveal any relations between LH and DHEA-S or A-dione.

It was not possible to clarify the mechanism by which hyperandrogenism acts on any part of the hypothalamic-pituitary-ovarian system thereby causing disturbed menstruation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 360-364, 1990)

Introduction

Regular menstrual cycles require regular secretion of Gn-RH from the hypothalamus, gonadotropins from the pituitary and various steroid hormones from ovary. Abnormal secretion of these hormones results even in menstrual disorder. Amenorrhea, irregular menstrual cycles are frequently associated with hyperandrogenism in women^{1,2)}. The mechanisms underlying this association are unclear. Abnormally high serum androgen levels are generally found in women with clinical signs of hyperandrogenism and disturbed ovarian function^{1,2)}.

In order to know the effect of androgen on the menstrual cycle, an investigation has been undertaken on the menstrual cycle in hyperandrogenic women and secretion of gonadotropin and steroid hormones.

Materials and Methods

Subjects

Women with abnormal menstruation, particularly amenorrhea, who visited our clinics were the subject. Serum levels of LH, FSH, prolactin (PRL), estradiol (E₂), and testosterone were measured in amenorrheic cases as the routine examination to find high testosterone cases with 85ng/dl of testosterone. Further, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and androstenedione (A-dione) were successfully measured in 27 subjects with high testosterone levels. Serum testosterone was measured several times to select the subject who repeatedly showed 85ng/dl or higher of serum testosterone.

Methods to determine serum gonadotropin and steroid hormones

The RIA kit of Daiichi Radioisotope Institute and CIS RIA kit were used for serum levels of LH, FSH, PRL, and E_2 and for testosterone, respectively. The testosterone levels in women with normal menstrual cycles ranged between 10 and 85 ng/dl by the method. DHEA-S and A-dione were measured with the kit of Otsuka Assay Laboratory.

Results

High testosterone cases

Serum testosterone levels were 85 ng/dl or higher in 27 cases who were in their teens in 14 cases, twenties in 12, and thirties in one case. Their menarches averaged at 12 years and 9 month. Out of the 27 cases, 21 cases (77.8%) were diagnosed as polycystic ovary syndrome (PCO) based on the PCO criteria of our clinic³⁾. The 21 cases were in their teens in 11 cases (52.4%) and twenties in 10 cases (47.6%) (Table 1 and 2).

The 27 cases of abnormal menstruation consisted of 2 cases of anovulatory cycles and 25 cases of amenorrhea; 8 cases were the married and 19 were the unmarried. The married all had the chief complaint of infertility but none of the 27 cases complained of hirsutism and obesity. The serum testosterone level in the 27 cases ranged between 86 and 227 ng/dl (mean: 126.4 ng/dl). The serum testosterone level in 21 high LH cases (PCO) ranged between 86 and 220 ng/dl (mean: 119.0 ng/dl), whereas that in 6 normal LH cases ranged between 101 and 227 ng/dl (mean: 152.3 ng/dl).

Serum LH, FSH and PRL levels

The LH level in 21 high LH cases (PCO) ranged between 26.2 and 43.4 mIU/ml (mean: 35.6 mIU/ml) and the FSH level, between 6.1 and 12.7 mIU/ml (mean: 9.6 mIU/ml) with the LH/FSH ratio of 3.7. All of normal LH cases other than PCO cases (22.2%) suffered from I grade amenorrhea and, on the basis of the data of serum LH and FSH levels and LH-RH test, the amenorrhea was considered not to be pituitary but hypothalamic in all the cases. The LH level in the 6 cases ranged between 10.2 and 23.9 mIU/ml (mean: 16.9 mIU/ml) and the FSH level ranged between 3.2 and 9.4 mIU/ml (mean: 6.3 mIU/ml).

The PRL level ranged between 7.4 and 29.8 ng/

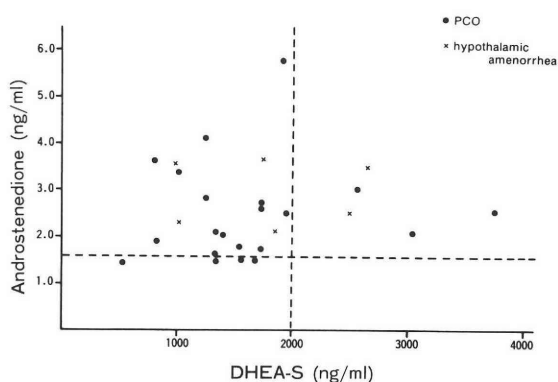


Fig. 1 Correlations between the serum DHEA-S and A-dione

ml (mean: 12.8 ng/ml) in the 27 cases, 7.4 and 19.4 ng/ml (mean: 11.5 ng/ml) in the 21 PCO cases, and 8.3 and 29.8 ng/ml (mean: 12.9 ng/ml) in the 6 normal LH cases.

Serum DHEA-S and A-dione levels

Fig. 1 illustrates the association of DHEA-S with A-dione in the 27 cases. A diagnosis of PCO with ovarian hyperandrogenism was made in 14 of the 21 PCO cases; a diagnosis of PCO with adrenal hyperandrogenism was made in 3; and the rest 4 cases were of normal type.

Serum E_2 level

The serum E_2 level ranged between 22 and 100 pg/ml (mean: 40.9 pg/ml), in the 27 cases, 22 and 100 pg/ml (mean: 41.0 pg/ml) in the PCO cases, and 25 and 51 pg/ml (mean: 42.0 pg/ml) in the 6 normal LH cases, respectively, showing no difference between the PCO and normal LH cases (Table 1 and 2).

Correlation between serum levels of LH and testosterone, DHEA-S, or A-dione

As seen from Fig. 2 and 3, there was no correlation between the serum levels of LH and testosterone, DHEA-S, or A-dione.

Discussion

Abnormal menstruation and amenorrhea have been reported to result from high testosterone^{1,2)}. This is considered to be due to functional disorder in the hypothalamic, pituitary, and ovarian sys-

Table. 1 Hyperandrogenism in women with high serum LH levels (PCO)

No	Age	married(+) unmarried(-)	LH (miu/ml)	FSH (miu/ml)	PRL (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	test. (ng/dl)	A dione (ng/ml)	DHEA S (ng/ml)
1	29	+	33.1	9.1	10.3	23	94	2.12	1373
2	28	+	43.1	12.3	16.0	21	156	4.20	1237
3	21	-	30.3	7.1	11.6	22	97	1.50	1397
4	26	+	40.7	11.8	12.3	39	140	3.65	801
5	18	-	26.2	8.0	7.5	42	100	2.65	1729
6	27	+	45.6	9.4	11.2	45	179	1.98	833
7	18	-	25.9	9.9	19.4	45	89	2.88	1245
8	27	+	28.3	11.9	9.8	45	88	1.49	515
9	18	-	40.8	10.1	11.9	33	93	3.06	2577
10	28	+	34.7	9.2	14.5	100	105	1.82	1549
11	17	-	39.1	12.7	13.2	55	88	1.52	1669
12	16	-	35.1	10.1	7.9	39	99	2.14	3071
13	24	+	35.4	8.0	7.4	34	148	3.43	1041
14	17	-	28.9	10.5	13.4	62	220	5.68	1919
15	16	-	42.7	6.1	10.3	45	144	1.78	1736
16	17	-	30.9	9.2	7.9	29	86	2.67	1795
17	22	-	42.0	10.5	7.7	30	94	1.58	1382
18	16	-	39.1	9.8	11.0	25	138	2.55	1970
19	20	-	36.7	10.0	16.7	23	95	2.62	3767
20	15	-	39.8	8.8	11.4	66	124	1.54	1556
21	19	-	28.9	6.4	10.5	32	122	2.07	1407
mean			35.6	9.6	11.5	41	119		

Table. 2 Hyperandrogenism in women with normal serum LH levels

No	Age	married(+) unmarried(-)	LH (miu/ml)	FSH (miu/ml)	PRL (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	test. (ng/dl)	A dione (ng/ml)	DHEA S (ng/ml)
1	16	-	19.1	6.0	10.3	39	133	2.17	1857
2	29	+	19.7	3.8	29.8	34	205	3.60	425
3	18	-	17.8	8.0	9.0	62	101	3.67	1747
4	32	+	10.2	3.2	10.9	25	147	3.53	2678
5	18	-	23.9	7.5	8.3	51	101	2.52	2508
6	20	-	10.7	9.4	8.8	41	227	2.29	1050
mean			16.9	6.3	12.9	42	152.3		

PRL : prolactin

E₂ : estradiol

test : testosterone

A dione : androstenedione

DHEA S : dehydroandrostenedione sulfate

tem caused by hyperandrogenism⁴⁾.

It has been reported that serum testosterone levels are associated with changes in the menstrual cycle and circadian changes^{1,5,6)}. According to Seki et al.⁷⁾, however, these changes are so small that it is hardly necessary to take them into consideration in the determination of serum testosterone measurements. The serum testosterone

level was measured in the present study in the subjects of amenorrhea and anovulatory cycles and the test for various hormones was done on serum samples collected at the first visit or in the

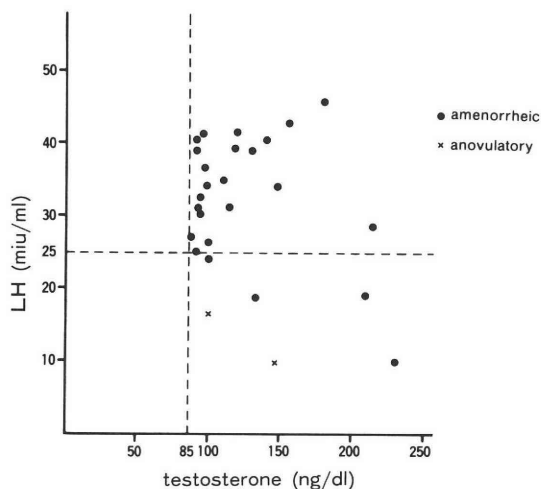


Fig. 2 Correlations between the serum LH and testosterone

morning in the period following withdrawal bleeding.

The 25 cases of secondary amenorrhea were all of I grade amenorrhea and 21 out of them were found to be PCO. The serum testosterone level found in the high LH cases of the amenorrheic cases diagnosed as PCO was between 86 and 220 ng/dl (mean: 119.0 ng/dl), whereas that in the 6 normal serum LH level cases varied between 101 and 227 ng/dl (mean: 152.3 ng/dl), indicating that it was lower in the high serum LH level cases. Seki et al.⁷⁾ have reported that there was a correlation between the serum testosterone level and the LH level in I grade amenorrhea patients and that the serum testosterone level of the normal LH group was lower than that in the high LH group but higher than that in normal women and elevated in anovulatory cases which did not exhibit characteristic features of PCO. The findings were different from our data where no correlation was found between the levels of serum LH and testosterone as shown in Fig. 2. Seki et al.⁷⁾ also have reported that it is not clear whether high testosterone levels in the normal LH group are responsible even in part for abnormality in the hypothalamic-pituitary-ovarian system.

It is generally accepted that increased secretion of serum LH stimulates testosterone production mainly in the ovary⁸⁾. As shown in Fig. 3, how-

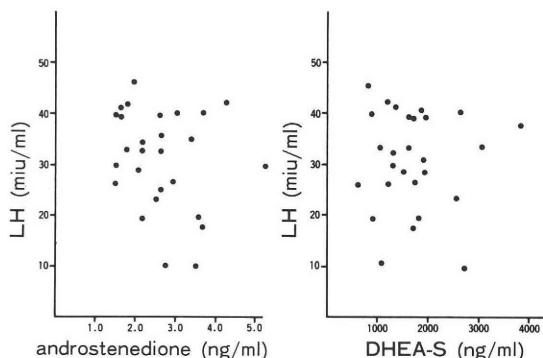


Fig. 3 Correlations between the serum LH and Androstenedione or DHEA-S

ever, serum LH was found to have no relations with A-dione, one of testosterones which is of ovarian derivation, and with DHEA-S of adrenal derivation, indicating no clear correlations that increased secretion of serum LH stimulates testosterone production in the ovary.

Classification of PCO cases in terms of DHEA-S and A-dione into ovarian and adrenal types resulted in the result, contrary to the previous data³⁾, that ovarian type (14 cases) was more than adrenal type (3 cases) as shown in Fig. 1. This would be due to the difference in the subjects of PCO who were selected from among high serum testosterone cases in the present study but which was diagnosed on the basis of serum levels of LH and FSH and the LH/FSH ratio in the previous report³⁾.

There are many reports describing that PCO cases are complicated with high serum PRL⁹⁾. The present data showed that the PRL level in the PCO cases was within the normal range and that there was no difference between the normal LH cases and the PCO cases. Some reports describe that high PRL influences ACTH secretion by the pituitary gland thereby stimulating DHEA-S secretion in the adrenal glands^{8,9)} but our data did not show any relations between the PRL level and DHEA-S by the finding that serum PRL levels in the PCO cases were within the normal range (Table 1). We have failed to obtain the results indicating positive participation of PRL in DHEA-S secretion.

Serum E₂ is derived from A-dione by aromat-

ization. The E_2 level in the present study was 40.9pg/ml which is higher than the level in the follicular phase of the normal menstrual cycle, suggesting a possibility that hyperandrogenism is responsible.

The present data would not allow us to consider that hyperandrogenism resulted from high LH. There were no results clearly indicating that hyperandrogenism promotes LH secretion which then stimulates the ovary to secrete ovarian testosterone in an increased amount. Therefore, it was impossible to clarify the cause of hyperandrogenism and the mechanism by which abnormal menstruation and amenorrhea develop. Further studies will be required to clarify the pathophysiology of ovulatory dysfunction associated with hyperandrogenism in women.

References

- 1) Steinberger, E., Smith, K. D., Tcholakian, R. K., Rodriguez-Rigau, L. J.: Testosterone levels female partners of infertile couples, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 133: 133, 1979
- 2) Paulson, J. D., Keller, D. W., Wiest, W. G., Warren, J. C.: Free testosterone concentrations in serum: Elevation is the hallmark of hirsutism, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 128: 851, 1977
- 3) Tanaka, S., Mizunuma, M., Watanabe, H., Hata, H., Endo, T., Hashimoto, M.: Polycysticovary syndrome, *Obst. Gynec. Therapy (in Japanese)*, 56: 240, 1988
- 4) Greenblatt, R. B., Mahesh, V. B.: The androgenic polycystic ovary, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 125: 712, 1976
- 5) Smith, K., Rodriguez-Rigau, L. J., Tcholakian, R. K., Steinberger, E.: The relation between plasma testosterone levels and the lengths of phases of the menstrual cycle, *Fert. Steril.*, 32: 403, 1979
- 6) Breuer, H.: Androgen production in the woman, androgenization in women 21, ed: J Hammerstein, V Laclnit-Fixson, F Neumann and G Plewig, *Excerpta Medica*, 1980
- 7) Seki, K. and Kato, K.: Serum testosterone concentration in patients with ovarian dysfunction, *Obstet. Gynec. Therapy (in Japanese)*, 53: 344, 1986
- 8) Sirinathsingji, J. S., Mills, I. M.: Effect of human pituitary luteinizing hormone administration on plasms levels of dehydroepiandrosterone, androstenediol and their sulphates and testosterone in women with secondary amenorrhea, *J. Endocrinol.*, 98: 201, 1983
- 9) Vermeulen, A., Suy, E., Rubens, R.: Effect of prolactin on plasma DHEA-S levels, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 1222, 1977

月経異常と高アンドロゲン血症の 関連について

札幌医科大学産婦人科学講座

田中昭一 福江ひろみ 水沼正弘

藤井美穂 山本 弘 幡 洋

遠藤俊明 橋本正淑

月経異常を主訴に来院した症例で血中 testosterone 値が高値を示した 27 例の血中 LH, FSH, Dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S), Androstenedione (A-dione) との相関を検討したので報告する。

27 例の月経異常は 25 例が無月経, 2 例が無排卵周期症であった。無月経症例 25 例のうち 21 例は polycystic ovary syndrome (PCO) であった。

血中 LH と testosterone, DHEA-S, APdione との相関を検討した。

血中 LH と testosterone とは相関はなく, LH と DHEA-S, A-dione との間にも相関は認められなかった。

高 testosterone が視床下部—下垂体—卵巣系のどの部位に作用して月経障害を喚起する機序について明らかには出来なかった。

(受付: 1989 年 7 月 24 日)

八味地黄丸投与により妊娠・分娩に至った pituitary microadenoma を伴った 高プロラクチン血症の一例

Successful Treatment of Hyperprolactinemia with Hachimijiogan Resulted in Normal Pregnancy and Delivery: a Case Report

筑波大学臨床医学系産婦人科

窪田 早百合 臼 杵 哲 沖 明 典
Sayuri KUBOTA Satoshi USUKI Akinori OKI
市 川 喜 仁 岩 崎 寛 和
Yosihito ICHIKAWA Hirokazu IWASAKI

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

プロモクリプチン治療にて妊娠に至らなかった pituitary microadenoma を伴った高プロラクチン血症性不妊婦人に、八味地黄丸エキス顆粒を投与し、正常な妊娠・分娩に至った症例を経験した。

以上より、八味地黄丸エキス顆粒が、高プロラクチン血症性不妊症の治療に有効であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 365-369, 1990)

緒 言

高プロラクチン血症性不妊婦人の治療に、プロモクリプチンが汎用され、著効をあげている。

一方、プロモクリプチンを投与しても妊娠しにくい症例や、プロモクリプチンの持つ副作用（嘔気、嘔吐など）の為、治療を中断せざるをえない症例も少なくない。

不妊領域において、副作用の少ない漢方製剤が広く用いられており、われわれは、乏精子症患者の八味地黄丸エキス顆粒での治療に際し、同剤が高プロラクチン血症に有効である可能性を示唆した¹⁾。

今回、pituitary microadenoma を伴った高プロラクチン血症性不妊婦人に八味地黄丸エキス顆粒を投与し、妊娠・分娩に至った症例を経験したので報告する。

症 例

患者：F. Y., 37 歳

主訴：続発性不妊

妊娠分娩歴：1 回経妊 0 回経産

月経歴：初経 14 歳，周期 24-29 日型，持続 6 日間，中等量，BBT 2 相性

既往歴：23 歳急性肝炎

家族歴：特記事項なし

現病歴：昭和 56 年，妊娠 2 カ月で自然流産。

続発性不妊を主訴に近医を受診し，黄体機能不全と診断されたが，治療は受けなかった。

昭和 59 年 5 月，続発性不妊を主訴として当科を受診した。

初診時全身所見：+31 %の高度肥満を認めたが，色素沈着，多毛，乳汁漏出などの異常は認められな

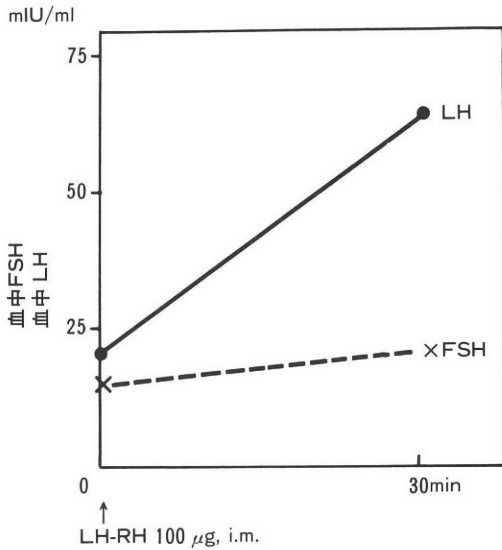


図1. 初診時のLHRHテスト



図2. 初診時のトルコ鞍単純X-P

かった。

初診時内診所見：異常なし

初診時検査所見：内分泌学的所見としては、血中FSH 15.3 mIU/ml, LH 21.4 mIU/ml, プロラクチン 62 ng/ml, エストラジオール $17\beta(E_2)$ 102 pg/ml, プロゲステロン 12.7 ng/ml, テストステロン 0.5 ng/ml, T_3 118 ng/dl, T_4 11.0 µg/dl, とプロラクチン値の高値を除き、他は正常であった。LH-RHテストに異常は認められなかった(図1)。トルコ鞍単純写

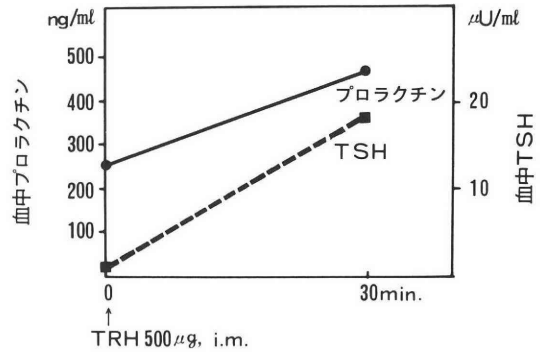


図3. プロモクリプチン投与中止後のTRHテスト

真も正常であった(図2)。

その他、月経血結核菌培養、子宮卵管造影、卵管通気検査などにも異常を認めず、高プロラクチン血症を伴う続発性不妊症と診断した。

臨床経過：昭和59年7月より、プロモクリプチン(パーロデル®, サンド薬品、東京)5.0 mg/日にて治療を開始したが、内服を怠り、血中プロラクチン値が143 ng/mlまで上昇した時を除き、血中プロラクチン値は順調に低下した。

血中プロラクチン値が15 ng/mlを維持した為、昭和60年10月初旬にプロモクリプチン投与を中止したが、投与中止後2週間目に血中プロラクチン値は再び259 ng/mlに上昇した為、同年10月下旬より八味地黄丸エキス顆粒(ツムラ、東京)5.0 g/日を開始した。開始前のTRHテストにおいて、負荷前の血中プロラクチン値は259 ng/mlと高値で、負荷30分後の血中プロラクチン値は472 ng/mlと過剰反応を示した(図3)。

トルコ鞍単純写真では、前回同様、異常が認められなかった。

八味地黄丸エキス顆粒製剤の投与により、血中プロラクチン値は緩徐ながらも順調に低下し、4週間後には71 ng/mlを示した。

しかし、血中プロラクチン値が70 ng/ml未満に低下しない為、同年12月上旬より、同剤を7.5 g/日に増量したところ、昭和61年1月上旬から血中プロラクチン値は40~60 ng/mlを維持し、同年2月4日に妊娠5週と診断し、八味地黄丸の投与を中止した。妊娠中、血中プロラクチン値は、60~135 ng/mlを維持し、経過は順調で、同年10月9日(妊娠40週5日)自然陣発し、3650 grの男児を正常分娩した。児のApgar scoreは8点(1分後)~10点(5分後)で、胎盤(598 gr)にも異常は認められなかった。児に奇形等の異常は認められず、その後の発育も正常である。

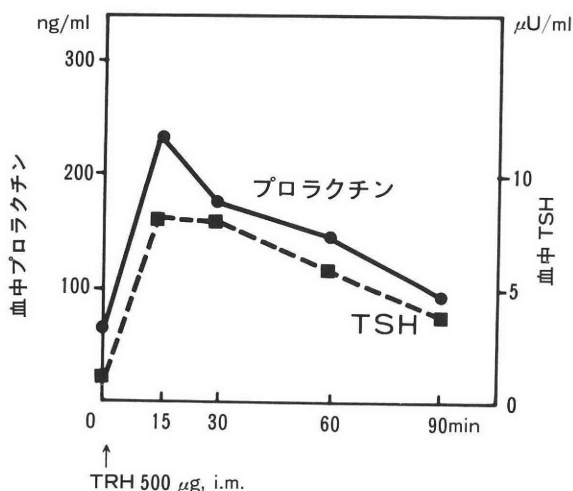


図4. 入院時の TRH テスト

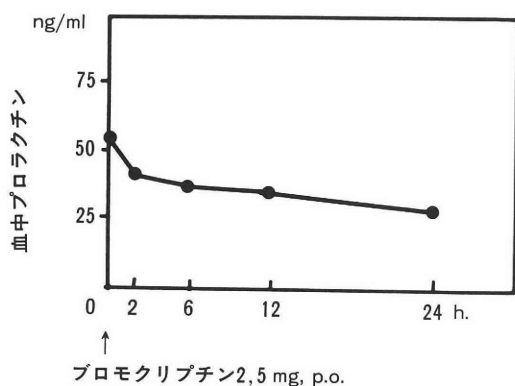


図5. 入院時のプロモクリプチン テスト

分娩後、乳汁分泌が不良であった為、約3カ月間で授乳を中止した。

月経は、昭和62年1月より再来し、24-29日周期で、BBTは2相性を示した。

昭和62年4月(分娩6カ月後)に施行したトルコ鞍冠状CT(Computed Tomography)にて、6×8mmのpituitary microadenomaが認められ、同年8月、精査目的の為に当院に入院した。

血中プロラクチン値72 ng/mlを除き、他のホルモン値は正常であった。又、TRHテストでは過剰反応、プロモクリプチンテストでは血中プロラクチン値の低下、L-DOPAテストではやや不良な血中プロラクチン値の低下が認められた(図4-6)。

入院後のトルコ鞍CT、及びMRI(magnetic resonance imaging)では、前回同様にpituitary microadenomaが認められたが、大きさに変化は認められなかった(図7)。

臨床症状がないこと、血中プロラクチン値が非常

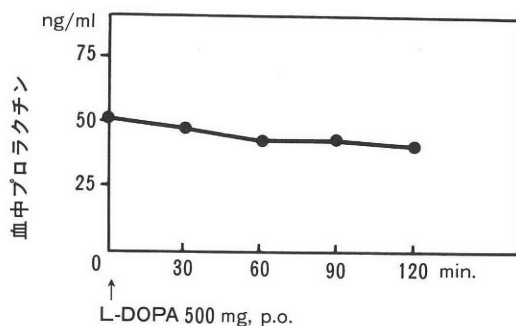


図6 入院時のL-DOPA テスト

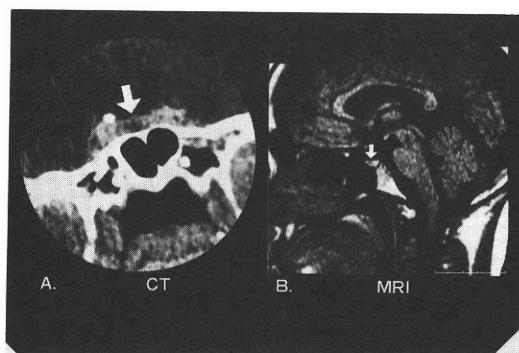


図7. 入院時(分娩10カ月後)のトルコ鞍CT、及びMRI

に高い値ではなく50~70 ng/mlを維持していること、画像診断上、pituitary microadenomaの大きさに変化がないことなどより、経過観察とし、同年8月末に退院した。

同年9月より、八味地黄丸エキス顆粒5.0~7.5g/日の再投与を開始し、昭和63年12月まで経過をみているが、血中プロラクチン値は40~60 ng/mlを維持している。途中、八味地黄丸エキス顆粒の内服を怠った期間があるものの、前回のように血中プロラクチン値が上昇することはなかった。又、昭和63年4月(分娩後18カ月)に施行したトルコ鞍CTでは、画像上pituitary microadenomaの大きさに変化は認められなかった。図8は初診時よりの全経過を示す。

考 察

八味地黄丸は、8種類の生薬成分からなり¹⁾、主要薬理作用として、利尿作用、末梢血管拡張作用、脂質分解阻害作用、蛋白合成促進作用、抗アレルギー作用などが挙げられ、インポテンツ、糖尿病、高血圧、神経衰弱、皮膚掻痒症、膀胱炎などに広く使用されてきている²⁾が、近年は、更に男性不妊症での乏精子症の改善にも用いられている^{3,4)}。

白杵ら^{1,5)}は、乏精子症患者の治療に際し、八味地黄丸エキス顆粒の投与により、高プロラクチン血症

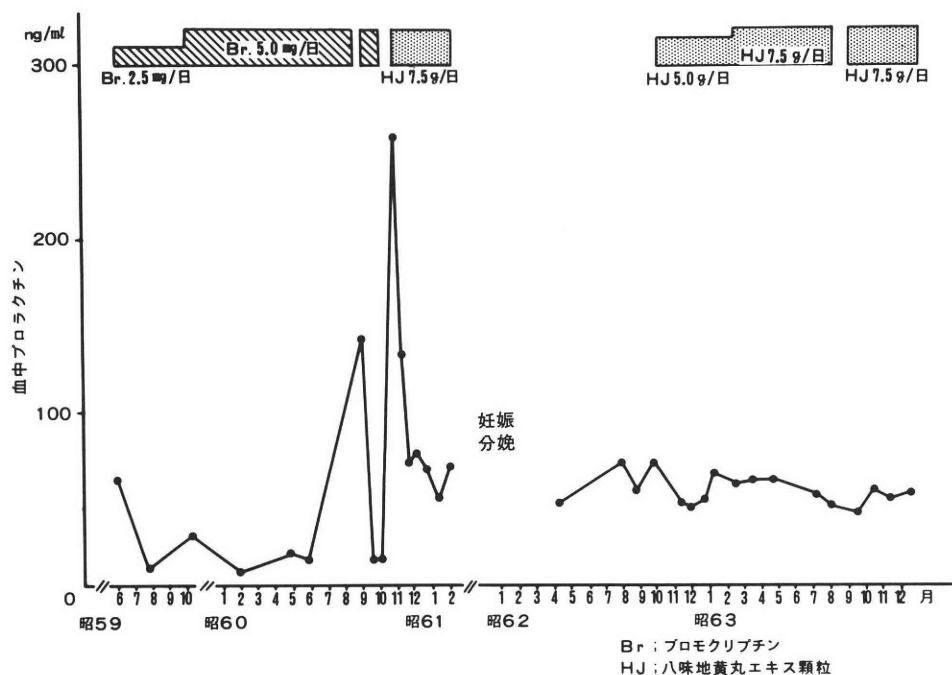


図 8. 初診時よりの全経過

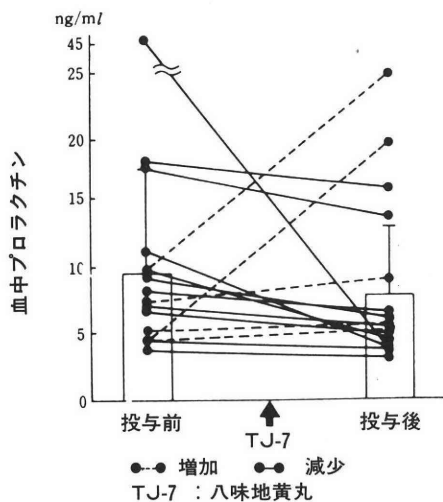


図 9. 八味地黄丸エキス顆粒投与前後の血中プロラクチン値

が改善される傾向にあることを報告した (図 9)。

ラットを用いた基礎的実験で、八味地黄丸エキスが視床下部レベルでのドーパミンの増加と下垂体レベルでのドーパミン受容体の増加を促す作用があること (未発表) から、われわれは、不妊症を主訴に来院する女性のうち、プロモクリプチンを長期間投与するも妊娠しない高プロラクチン血症性不妊患者への八味地黄丸エキス顆粒の投与を検討し、その有

効性を認めている^{6,7)}。

更に、八味地黄丸エキス顆粒投与を中止した場合の lingering effect, ないし irreversibility についても、数例に確認されている。

副作用の点でも、軽度の嘔気が認められたのみで、投薬を中止するには至らなかった。

一方、ドーパミン作動性麦角誘導体であるプロモクリプチンは、投与により比較的急激に血中プロラクチン値を低下させ^{8,9)}、山路ら¹⁰⁾によると、投与中断により、すぐに血中プロラクチン値が上昇し、前値の平均 78 % に戻ると報告されている。

今回の症例は、昭和 51 年に結婚し、5 年間避妊後、昭和 56 年に妊娠 2 カ月で自然流産し、昭和 59 年 5 月に続発性不妊を主訴に当科を受診した。諸検査により、高プロラクチン血症を伴う続発性不妊症と診断し、プロモクリプチン投与により、すぐに血中プロラクチン値は 30 ng/ml 未満の値を維持したが、投与を中止すると、血中プロラクチン値は前値を越えて 259 ng/ml まで上昇した。

約 1 年半にわたり、プロモクリプチンを投与したが、妊娠には至らなかった。

そこで、八味地黄丸エキス顆粒の投与に変更したところ、血中プロラクチン値は緩徐に低下し、その値は八味地黄丸エキス顆粒を投与しても 41~65 ng/ml と比較的高値を維持しており、投与を中止しても

再上昇しなかった。

更に、血中プロラクチン値が正常域に達しなかったにもかかわらず、正常な妊娠、及び分娩に至った。

このことは、八味地黄丸エキス顆粒が、血中プロラクチン値を改善させるだけでなく、漢方特有の全身改善作用⁹⁾も関与しているものと推測できる。

今回の症例を含め、高プロラクチン血症の治療に際し、八味地黄丸エキス顆粒を使用した際の特徴についてまとめてみると、

1. 八味地黄丸エキス顆粒投与による血中プロラクチン値の低下は、プロモクリプチンに比べ、緩徐である。
2. 低下値は、比較的高値を維持する。
3. 投与中止後の血中プロラクチン値の lingering effect, ないし irreversibility は、プロモクリプチンよりも強い。
4. 血中プロラクチン値が正常化しない場合でも妊娠の可能性が認められ、漢方特有の全身改善作用の関与が考えられる。更に、妊娠、分娩、児への影響も認められない。
5. pituitary microadenoma に対するプロモクリプチンによる腫瘍縮小効果が、以前報告されたが、その一方、山路ら¹⁰⁾は、トルコ鞍CTで得られる腫瘍縮小効果に関して、変化の可逆性も報告した。

八味地黄丸エキス顆粒の腫瘍縮小効果に関しては、現在のところ、症例が少ないこともあって不明である。

おわりに

プロモクリプチン投与にもかかわらず、1年半妊娠しなかった pituitary microadenoma を伴った高プロラクチン血症患者に、八味地黄丸エキス顆粒を投与し、妊娠、分娩に至った1例を報告した。

今後、更に経過を追い、八味地黄丸エキス顆粒の血中プロラクチン低下機序、及び腫瘍縮小効果について、検討を加えたい。

文 献

- 1) Usuki, S.: Hachimijiogan changes serum hormonal circumstance and improves spermatogenesis in oligospermic men, *Am. J. Chin. Med.*, XIV: 37, 1986
- 2) 有馬正明, 佐川史郎, 園田孝夫: 排尿障害に対する保存的治療, *泌尿器科紀要*, 25: 1231, 1979
- 3) 宇津木利雄, 五十嵐正雄, 矢崎千秋, 長谷川喜久, 宮本 薫, 谷口雄一, 野村修一, 新川唯彦: 八味地黄丸の視床下部-下垂体-睾丸系機能に対する

効果, *日本産科婦人科学会誌*, 35: 2305, 1983

- 4) 吉田英機: 男性不妊症に対する漢方療法, *産婦人科の世界*, 34: 114, 1982
- 5) 臼杵 愼, 重光貞彦, 西田正人, 岩崎寛和: 八味地黄丸の spermatogenesis に及ぼす影響と内分泌学的検討, *産婦人科漢方研究のあゆみ*, 1: 57, 1984
- 6) 臼杵 愼, 細川明美, 市川喜仁, 窪田早百合, 岡根真人, 斎藤正博, 神埼さゆり, 楠美美和子, 早坂優子: 高プロラクチン血症患者への八味地黄丸の臨床的応用, *産婦人科漢方研究のあゆみ*, 5: 43, 1988
- 7) Usuki, S. and Kubota, S.: Hachimijiogan for the treatment of hyperprolactinemia, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 34: 1, 1989
- 8) Moriondo, P., Travaglini, P., Nissim, M., Conti, A. and Faglia, G.: Bromocriptine treatment of microprolactinomas: Evidence of stable prolactin decrease after drug withdrawal, *J. Clin. Endo. Metab.*, 60: 764, 1985
- 9) Martin, T. L., Kim, M. and Malarkey, W. B.: The natural history of idiopathic hyperprolactinemia, *J. Clin. Endo. Metab.*, 60: 855, 1985
- 10) 山路 徹, 石橋みゆき: プロラクチン産生下垂体腺腫の内科的治療, *下垂体ワークショップ*, 第2回公演集: 13, 1981

Successful treatment of hyperprolactinemia with Hachimijiogan resulted in normal pregnancy and delivery: a case report

Sayuri Kubota, Satoshi Usuki,
Akinori Oki, Yoshihito Ichikawa
and Hirokazu Iwasaki

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

The hyperprolactinemic infertile woman with a pituitary microadenoma, who was resistant to bromocriptine treatment as to induction of pregnancy, succeeded in normal pregnancy and delivery by treatment with Hachimijiogan, traditional herbal medicine. The present paper reports one case who conceived and gave birth to healthy appropriate-for-date infant following Hachimijiogan treatment.

(受付: 1989年9月19日)

IRMA 法を用いた TRH 負荷試験と 潜在性高プロラクチン血症の検討

The TRH Test Using the IRMA Method and Occulted Hyperprolactinemia

順天堂大学産婦人科学教室

伊 藤 哲	豊 成 由 佳	岡 部 親 宣
Satoshi ITOH	Yuka TOYONARI	Chikayoshi OKABE
武 内 裕 之	福 田 勝	高 田 道 夫
Hiroyuki TAKEUCHI	Masaru FUKUDA	Michio TAKADA

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

正常月経周期をもつボランティア 36 名に対し TRH 250 μ g 負荷試験を施行し, MRC 81/541 を標準品とした IRMA 法を用いてプロラクチン (PRL) の測定を行なった. その結果, 1) PRL の正常基礎分泌値は 16 ng/ml 未満であった. 2) 潜在性高プロラクチン血症 (OHP) の診断基準は基礎分泌値正常, 負荷 15 分値 140 ng/ml 以上であり, 100~139 ng/ml にあるものを OHP 疑診群とした. また, この診断基準に基づき当科内分泌外来を受診した 249 名について検討を加え, OHP に対する Bromocriptine の反応性についても検討した. 1) OHP は 249 例中 23 例 (9.2%) に認められ, OHP 疑診群は 26 例 (10.4%) に認められた. 2) OHP のうち下垂体型を除けば, Bromocriptine の投与は非常に有効であった (排卵率 66.7%). また OHP 疑診群においても下垂体型を除けば非常に有効であると考えられた. 3) OHP および OHP 疑診群に対する Bromocriptine の有効性を TRH 負荷試験の結果から事前に類推することはできなかった.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 370-374, 1990)

緒 言

血清 PRL の測定は内分泌外来診療においては不可欠な検査であり, ラジオイムノアッセイ (RIA) 法の導入とともにルーチンに行なわれてきている.

従来 PRL の測定には NIH の VLS シリーズを標準品とした RIA が用いられていたが, 1989 年 7 月頃から WHO の 1st-IPR-PRL 75/504 を標準品とした immunoradiometric assay (IRMA) 法が使用されてきており, それに伴い PRL の正常値も従来の 2 抗体法に比べ, 低値を示すことが報告されている.

また近年, 夜間睡眠中に一過性の高 PRL 状態を示し, それに起因する排時卵障害を呈する病態を潜在

性高 PRL 血症 (occulted hyperprolactinemia: OHP) と呼び, 高 PRL 血症とともに数多く報告され注目を浴びている. 本来 OHP の診断には夜間睡眠時の血清 PRL 値の測定が不可欠ではあるが, 外来診療上困難であるためその簡便な診断法として TRH (thyrotropin-Releasing Hormone) 負荷試験が汎用されている. しかし, TRH 負荷試験による OHP の診断基準は施設により種々であり一定していない.

そこで今回, 正常月経周期をもつボランティアに対して TRH 負荷試験を行ない, MRC 81/541 を標準品とする IRMA 法を用いて血清 PRL 値を測定し, PRL の正常基礎分泌値と OHP の基準値の設定を試みた. また, 設定された基準値をもとに OHP に対し

て Bromocriptine 治療を施行し、その排卵効果を検討した。

対象および方法

1. TRH 負荷試験

正常月経周期をもち、基礎体温から自然排卵のあることを確認し得たボランティア 36 名に対して月経周期の 7 日前に TRH (TRH 注射液タナベ) 250 μ g を肘静脈から静注し、負荷前および負荷後 15 分に採血し PRL 値をそれぞれ測定し、正常基礎分泌値と OHP の診断基準値を決定した。ボランティア 36 名の年齢は 18~36 歳、平均 25.5 歳であり、月経周期は 27~36 日、平均 29.6 日であった。PRL の測定は MRC 81/541 (National Biological Standard Boods) で検定されたヒト下垂体抽出 PRL を標準品として用いた IRMA 法により行なった。この標準品は WHO の標準品と 1 ngMRC 81/541=37 μ IU 1st-IRP-PRL 75/504 で換算することができる。

2. 当科内分泌外来における OHP の検討

1988 年 7 月から 1989 年 5 月までの 11 か月間に月経不順および排卵障害を主訴として当科内分泌外来を来院し、LH-RH 負荷試験および TRH 負荷試験を施行し得た 249 名のうち OHP と診断された症例に対して検討を加えた。LH-RH 負荷試験と TRH 負荷試験は消退出血 7 $\pm$ 1 日目に LH-RH 100 μ g (LH-RH 注射液タナベ) と TRH 250 μ g (TRH 注射液タナベ) を肘静脈から静注し、負荷前および 15 分、30 分、60

分、120 分に採血しそれぞれの PRL 値、LH 値、FSH 値を測定した。

また LH-RH 負荷試験により排卵障害の部位別に視床下部型、下垂体型、PCO 型、卵巣型の 4 型に分類した。LH の基礎分泌値と FSH の基礎分泌値から LH<1.5 mIU/ml, FSH<3 mIU/ml の両者を満たすものを下垂体型、LH $\geq$ 16 mIU/ml, FSH $\geq$ 24 mIU/ml の両者を満たすものを卵巣型、LH $\geq$ 12 mIU/ml, LH-FSH $\geq$ 1.8 の両者を満たすものを PCO 型とし、これらに属さないものを視床下部型とした。

3. OHP に対する Bromocriptine の反応性

OHP に対する Bromocriptine の反応性を検討するために、OHP 群 12 例、OHP 疑診群 4 例に Bromocriptine (Palodel®) 5 mg/day を 3 か月間単独投与し、排卵の有無を確認した。

成 績

1. TRH 負荷試験

正常月経周期をもつボランティア 36 名の PRL 基礎分泌値は 6.6 ± 8.8 ng/ml (mean $\pm$ 2 S.D.) であり、TRH 負荷後 15 分の PRL 値は 75 ± 64 ng/ml であった (Fig. 1)。以上より PRL 基礎分泌正常値は 16 ng/ml 未満であり、OHP 診断基準は基礎分泌値 16 ng/ml 未満でかつ負荷後 15 分値が mean+2 S.D. すなわち 140 ng/ml 未満とした。また、負荷後 15 分値が mean+1 S.D. から mean+2 S.D. すなわち 100~139 ng/ml を示した症例を OHP 疑診群とした (Fig. 2)。

2. 内分泌外来における OHP の検討

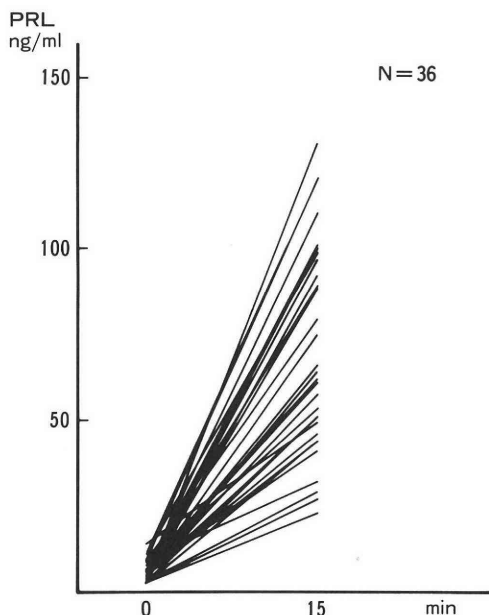


Fig. 1 TRH 負荷試験における PRL 測定値

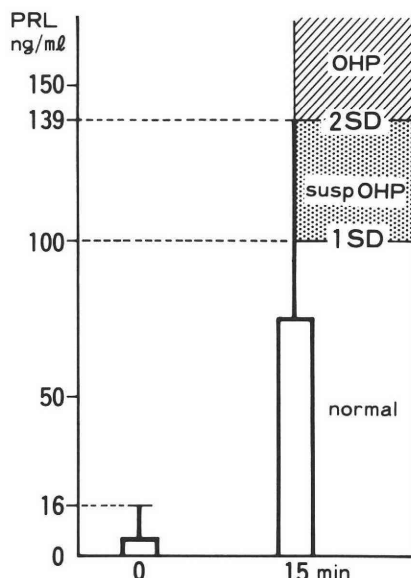


Fig. 2 PRL 正常基礎分泌値と OHP 診断基準

Table 1 内分泌外来患者における排卵障害部位別のOHPの頻度

TRH	LH-RH	hypothalamic	pituitary	PCO	ovarian	total
OHP p PRL $\geq$ 140ng/ml [†]		14 (10.6%)	4 (6.3%)	5 (10.4%)	0 (0%)	23
OHP suspect p PRL100~139ng/ml [†]		14 (10.6%)	8 (12.5%)	3 (6.3%)	1 (20.0%)	26
normal p PRL<99ng/ml [†]		86 (65.2%)	49 (76.5%)	37 (77.0%)	3 (60.0%)	165
HP b PRL>16ng/ml [‡]		18 (13.6%)	3 (4.7%)	3 (6.3%)	1 (20.0%)	35
total		132	64	48	5	249

p PRL:peak PRL
b PRL:basal PRL

249 名に対し LH-RH・TRH 負荷試験を施行し、そのうち OHP の診断基準を満たしたものは 23 例 (9.2%) であり、OHP 疑診例は 26 例 (10.4%) であった (Table 1)。排卵障害の部位別に見ると、OHP は視床下部型で 14 例 (10.6%)、下垂体型で 4 例 (6.3%)、PCO 型で 5 例 (10.4%) に認められ、卵巣型には認められなかった。また OHP 疑診例は視床下部型で 14 例 (10.6%)、下垂体型で 8 例 (12.5%)、PCO 型で 3 例 (6.3%)、卵巣型で 1 例 (20.0%) に認められた。

ボランティアを正常群として、さきの 249 例のうちの OHP 群と OHP 疑診群の各々の PRL 基礎分泌値を正常群と比較すると、正常群 6.6 ± 4.4 ng/ml (mean $\pm$ 1 S.D.)、OHP 群 9.6 ± 3.0 ng/ml (mean $\pm$ 1 S.D.)、OHP 疑診群 8.8 ± 2.7 (mean $\pm$ 1 S.D.) と両群ともに統計学上の有意差が認められた (Fig. 3)。この結果は正常群と OHP とを負荷前値のみで鑑別し得る可能性を示していると考えられるが、両者の基礎分泌値はオーバーラップしてしまい鑑別することはできないとする報告があり、今後症例を増やしての検討が必要である。

3. Bromocriptine に対する反応性

OHP 群 23 例のうち下垂体型の 4 例を除く 19 例に Bromocriptine 5 mg/day を 3 か月間投与し、脱落症例 7 例 (うち嘔気、嘔吐等の副作用発現による服用中止 3 例) を除外した 12 例中 8 例 (66.7%) に基礎体温上の排卵を認めた (Table 2)。その内訳は視床下部型 5 例、PCO 型 3 例であった。一方、OHP 疑診群 26 例のうち下垂体型 8 例を除く 18 例のうち 10 例に Bromocriptine 5 mg/day を 3 か月間投与し、脱落症例 6 例 (うち副作用出現による服用中止 4 例) を除く 4 例中 3 例 (75.0%) に排卵を認めた (Table 3)。

Table 2 OHPにおけるBromocriptineに対する反応性

	hypothalamic	PCO	total
Bromocriptine 反応群	5	3	8
Bromocriptine 非反応群	3	1	4
total	8	4	12

Table 3 OHP疑診群におけるBromocriptineに対する反応性

	hypothalamic	PCO	total
Bromocriptine 反応群	2	1	3
Bromocriptine 非反応群	1	0	1
total	3	1	4

また、Bromocriptine を投与した OHP 12 例と OHP 疑診群 4 例の排卵を認めた反応群と排卵の認められなかった非反応群とに分けて TRH 負荷試験による peak PRL 値を比較してみたが、OHP 群の反応群 195 ± 4 ng/ml (mean $\pm$ 1 S.D.)、非反応群 168 ± 15 ng/ml (mean $\pm$ 1 S.D.)、OHP 疑診群の反応群 127 ± 6 ng/ml (mean $\pm$ 1 S.D.)、非反応群 127 ± 6 ng/ml (mean $\pm$ 1 S.D.) と OHP 群で若干反応群に高い傾向は見られるものの、両群ともに Bromocriptine に対する反応性には有意差は認められなかった (Fig. 4)。すなわち TRH 負荷試験の反応性により、前もって Bromocriptine が有効かどうかを判定することはできないことが示唆された。

考 察

近年、PRL のみならず LH、FSH の測定においても従来より汎用されている NIH 標準品を用いた RIA 2 抗体法に代わり WHO 標準品を用いた immunoradiometric assay (IRMA) 法が主流となってきた。測定法と標準品の変換とともに、その測定値も変化し RIA 2 抗体法に比べ低値を示す。今回の検討では成人女性の PRL の基礎分泌正常値は 16 ng/ml 未満であった。これは諸家の報告と一致している¹⁾。

また夜間睡眠時に一過性の高 PRL 状態を示し、それに起因する排卵障害を示す病態を潜在性高 PRL 血症 (occulted hyperprolactinemia: OHP) と呼び、高 PRL 血症 (hyperprolactinemia: HP) とともに注目されており、多くの報告がある²⁻⁵⁾。OHP は夜間睡眠時の血清 PRL の増加が診断の決め手となるが、外来診療において全例に血清 PRL 値の日内変動を測定することは困難であるため、種々の負荷試験によ

り診断することが一般に行なわれている。その中でも TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) 負荷試験は広く用いられ、OHP の診断に有用であることが報告されている⁶⁾。しかし、その診断基準は施設によりまちまちであり、今回 WHO 標準品を用いた IRMA 法の導入に伴い OHP の診断基準値を設定してみた。その結果、TRH 250 μ g 静注負荷後 15 分値が 140 ng/ml 以上を示す症例を OHP と設定し得た。また、100~139 ng/ml にある症例は OHP 疑診群とし、OHP に準ずる治療を行った。排卵障害、月経不順を主訴とする患者 249 例中 OHP は 23 例 (9.4%) に認められ、HP 35 例 (14.1%) よりもやや低値を示した。

PRL 基礎分泌値の正常群と OHP 群、OHP 疑診群との比較では統計学的には有意差を認めたが、これは正常群と OHP とを負荷前値のみで鑑別し得る可能性を示している。しかし、森らは正常例と OHP 例の基礎分泌値はオーバーラップしてしまい、昼間値の測定によって両者を鑑別することはできないとしており⁵⁾、今後症例数を増やしての検討が必要である。

高 PRL 血症に対する dopamine agonist である Bromocriptine (Parlodel) の有用性は周知のことであるが、OHP に対しての有効性も数多く報告されている⁷⁾。今回の投与例においても OHP 群で 66.7%、OHP 疑診群で 75.0% と良好な排卵率を示した。また、Bromocriptine に対する反応性から有効群と無効群の PRL の peak 値を比較してみたが、OHP 群、

OHP 疑診群ともに両者に有意差を認め得なかった。すなわち TRH 負荷試験の反応性により、前もって Bromocriptine が有効かどうかを類推することはできなかった。PRL は heterogeneity が存在し、近年その生物活性についての検討が試みられているが^{8,9)}、有効群と無効群とに有意差を認めなかったことは、TRH 負荷に反応する PRL の heterogeneity の相違が Bromocriptine に対する反応性の相違として現れてくるためかもしれない。

結 論

1. 正常月経周期をもつボランティア 36 名に対して TRH 250 μ g 負荷試験を行ない、IRMA 法による血清 PRL 測定を行ない以下の結果を得た。

1) PRL 基礎分泌値は 16 ng/ml 未満であった。

2) 負荷後 15 分値は mean $\pm$ 2 S.D. で 139 ng/ml, mean $\pm$ 1 S.D. で 100 ng/ml であった。以上より 140 ng/ml 以上を OHP, 100~139 ng/ml を OHP 疑診とした。

2. 上記の診断基準に基づき当科内分泌外来における OHP の検討を行なった。また、OHP に対する Bromocriptine の反応性についても検討した。

1) OHP は 249 例中 23 例 (9.2%) に認められ、OHP 疑診群は 26 例 (10.4%) に認められた。

2) OHP のうち下垂体型を除けば、Bromocriptine の投与は非常に有効であった (排卵率 66.7%)。また、OHP 疑診群においても下垂体型を除けば非常に有効であると考えられる。

3) OHP および OHP 疑診群に対する Bromocriptine の有効性を TRH 負荷試験の結果から事前

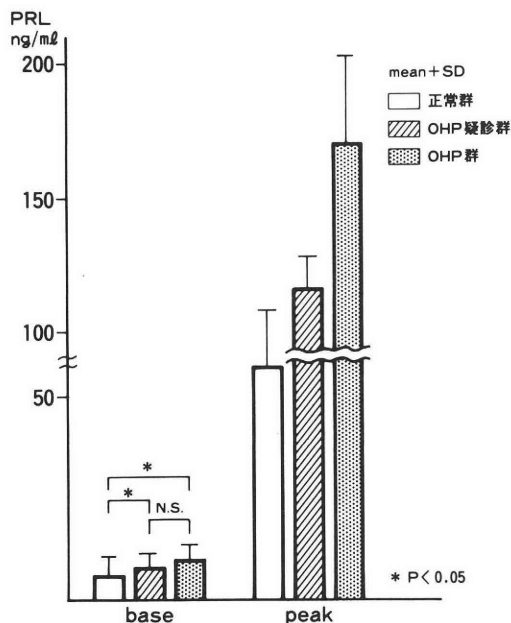


Fig. 3 各群における PRL の基礎分泌値と peak 値

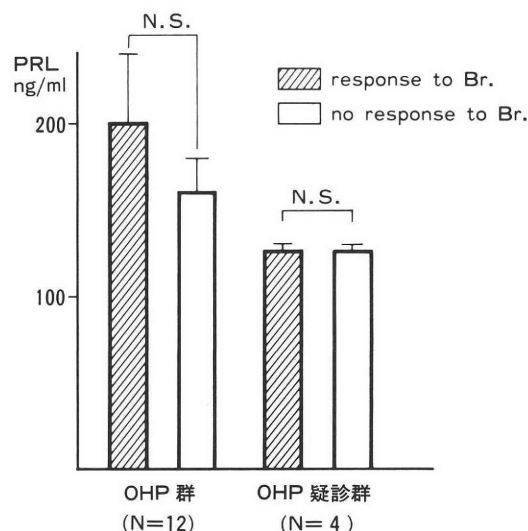


Fig. 4 Bromocriptine に対する反応性と peak PRL 値

に類推することはできなかった。

本論文の要旨は第34回日本不妊学会総会学術講演会(旭川)において発表した。

文 献

- 1) 青野敏博: プロラクチン測定の意義, 産と婦, 319: 845, 1989
- 2) Sassin, J. F., Frantz, A. G., Weitzman, E. D., Kapen, S.: Human prolactin 24hr pattern with increased release during sleep, *Science*, 117: 1205, 1972
- 3) Sassin, J. F., Frantz, A. G., Kapen, S., Witzman, E. D.: The nocturnal rise in human prolactin is dependent on sleep, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 37: 436, 1973
- 4) Ben-Devid, M., Schenker, J. G.: Transient hyperprolactinemia: a correctable cause of idiopathic female infertility, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 442, 1983
- 5) 森 宏之, 松岡 良, 飯野好明: 潜在性高プロラクチン血症, 産と婦, 37: 1145, 1988
- 6) 合阪幸三, 安藤三郎, 国保健太郎, 金田幸枝, 多和田哲雄, 吉田浩介, 森 宏之: 潜在性高 prolactin 血症の診断法としての TRH 及び metoclopramide 負荷テストの意義, 日内会誌, 63: 853, 1987
- 7) 多賀理吉, 池田万里郎, 榊原秀也: 高プロラクチン血症に対するホルモン療法の最近の考え方, 産と婦, 38: 531, 1989
- 8) 片岡邦孝: ヒト Prolactin (PRL) の Heterogeneity に関する研究, 日内会誌, 57: 1622, 1981
- 9) 小田高久, 大野虎之進, 角ゆかり, 田辺清男, 飯塚理八, 中村幸雄, 田中敏章: Prolactin の Molecular Heterogeneity および Biological Activity と間脳下垂体卵巣機能, ホルモンと臨床, 35: 15, 1987

The TRH test using the IRMA method and occulted hyperprolactinemia

Satoshi Itoh, Yuka Toyonari,
Chikayoshi Okabe, Hiroyuki Takeuchi,
Masaru Fukuda and Michio Takada

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

A 250 μ g TRH test was performed on 36 volunteers with normal menstrual cycles, and prolactin (PRL) was measured by the IRMA method using MRC 81/541 as the standard. The results indicated that 1) the normal basic secretion level of PRL was under 16ng/ml, and 2) the diagnostic criteria for occulted hyperprolactinemia (OHP) are a normal basic secretion level and a 15-minute value of at least 140ng/ml. Cases in the 100-139ng/ml range were suspected OHP cases. Based on these diagnostic criteria, 249 outpatients complaining mainly of menstrual and ovulatory disorders in the Endocrinological Clinic were studied. The response of Bromocriptine to OHP was also examined. 1) OHP was confirmed in 23 out of 249 cases (9.2%) and OHP was suspected in 26 cases (10.4%). 2) If the pituitary type of OHP was excluded, administration of Bromocriptine was very effective (ovulation rate: 66.7%). In the suspected OHP group, Bromocriptine was also very effective if the pituitary type cases were excluded. 3) The efficacy of Bromocriptine against OHP and suspected OHP could not be inferred beforehand from the results of the TRH test.

(受付: 1989 年 10 月 3 日特掲)

ENDOTHELIN-1: AN INCREASE IN MATERNAL PLASMA CONCENTRATION DURING LABOR PAIN OR ON DELIVERY AND THE EXISTENCE OF A LARGE AMOUNT IN AMNIOTIC FLUID

Satoshi USUKI, Akinori OKI, Yoshihito ICHIKAWA,
Sayuri KUBOTA, Masato OKANE and Hirokazu IWASAKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba, Ibaraki 305, Japan
(Director: Prof. H. Iwasaki)

Abstract: The concentration of endothelin-1 (ET-1) in plasma and amniotic fluid from normal pregnant women was determined by a sensitive sandwich-enzyme immunoassay system, established recently. The plasma ET-1 level increased gradually during normal pregnancy as the pregnancy advanced, the levels (0.39 ± 0.13 pmol/l, $n=42$) being significantly ($p < 0.05$) higher after 29 weeks of gestation than those (0.33 ± 0.08 pmol/l, $n=28$) before 28 weeks of gestation. The plasma ET-1 level during labor pain was significantly higher (0.59 ± 0.18 pmol/l, $n=10$) compared with that (0.39 ± 0.13 pmol/l, $n=42$) in the third trimester of pregnancy without labor pain ($p < 0.02$). Moreover, a high level of ET-1 (17.38 ± 6.43 pmol/l, $n=18$) was detected in amniotic fluid on term delivery. The ET-1 level in amniotic fluid was significantly higher than those in maternal and umbilical cord plasma ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). After delivery the maternal ET-1 level decreased gradually and 2 day postpartum ET-1 levels reached the normal non-pregnant level.

These results suggest that ET-1 may play an important role in uterine contraction and also participate in labor.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 375-382, 1990)

Introduction

Endothelin (ET), which was isolated from conditioned culture medium of porcine aortic endothelial cells, exhibits strong vasoconstricting activity, being at least 1 or two orders of magnitude more potent than other vasoconstrictors¹⁾, such as angiotension II²⁾, vasopressin³⁾, neuropeptide Y⁴⁾, Bay K 8644⁵⁾, histamine⁵⁾, acetylcholine⁵⁾, or prostaglandin F_{2a}⁵⁾. Amino-acid sequences of human and porcine ET-1

are an identical peptide⁶⁾. It has become evident that this peptide causes a potent long-lasting vasoconstriction and pressor response^{1,7,8)}, and exerts positive inotropic and chronotropic actions on the myocardium^{9,10)}. In addition, ET releases eicosanoids from the lung¹¹⁾ and stimulates the release of neurotransmitters in the spinal cord¹²⁾. These observations suggest its important role in the physiological function of various systems. Recently, the three isopeptides of human ET have been identified by screening a genomic deoxyr-

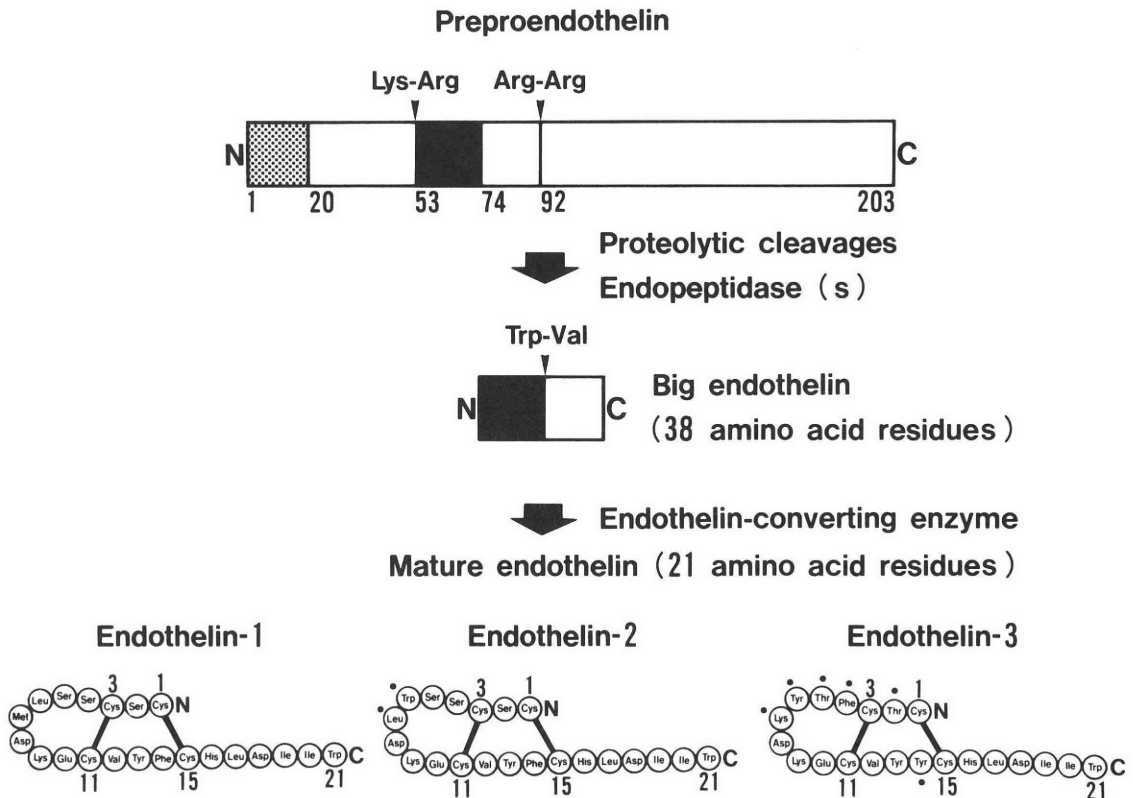


Fig. 1 Structures of preproendothelin and mature endothelin. Structure of big ET-1 cDNA, but not big ET-2 and -3, is analysed at present (human big ET-1, Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-Val-Asn-Thr-Pro-Glu-His-Val-Val-Pro-Tyr-Gly-Leu-Gly-Ser-Pro-Arg-Ser; porcine big ET-1, Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-Val-Asn-Thr-Pro-Glu-His-Ile-Val-Pro-Try-Gly-Leu-Gly-Ser-Pro-Ser-Arg-Ser). The small closed circles indicate different amino acids.

ibonucleic acid (DNA) library and named ET-1 (the 'classical' ET), ET-2 and ET-3¹³) (Fig. 1), and ET-1 (1-21) is the most active form¹⁴). However, the physiological significance is still poorly understood. Recently, we first established a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for human ET¹⁵). This method will enable us to study on its roles in various physiological systems via determination of the ET concentration.

The present study was performed to determine the concentration of immunoreactive ET-1 in maternal blood during normal gestation, labor and the postpartum period, and in amniotic fluid and umbilical cord blood on delivery. Furthermore, we compared their mutual relationships. The relationship between these parameters and fetal

sex, birth weight and placentae were also analysed.

Materials and Methods

Antibodies for sandwich-enzyme immunoassay. A monoclonal antibody, AwETN40 (IgG1, κ)¹⁵), was derived from the fusion product of mouse myeloma cells and splenocytes of mice immunized with synthetic ET. The neutralizing activity¹⁵) of AwENT40 was assessed using helical strips of coronary arteries from porcine hearts, and it was found that the response to ET decreased to 8.3% after preincubation of ET with AwETN40, whereas it did not change on preincubation with subclass-matched control antibody 2AAP68-37 (IgG1, κ). Anti-ET-BSA (bovine serum albumin)

antiserum¹⁵⁾ from a rabbit immunized with synthetic carboxyl-terminal heptapeptide ET₍₁₅₋₂₁₎ was purified on an Arg-ET₍₁₆₋₂₁₎-coupled Sepharose 4B column (CNBr-activated Sepharose 4B; Pharmacia, Uppsala, Sweden). The Fab' fragment was coupled with maleimidated horseradish peroxidase (HRP)¹⁶⁾.

Samples. Amniotic fluid was collected from eighteen pregnant women at term transvaginally, five with premature rupturing of the membranes, six preterm delivery women and five women, by amniocentesis, at the 32nd gestational week. Umbilical cord arterial and venous blood was obtained from eight fetuses at the time of delivery. Maternal venous blood was also obtained during gestation, labor and the post-partum period. In addition, serial blood samples were collected from five pregnant and puerperal women. Blood was collected from forty-six normal non-pregnant female volunteers (mean age, 27 years; 21 to 39 years), as a control. All the samples were individually collected in vacuum tubes containing aprotinin (Bayer, Leverkusen, West Germany), at the final concentration of 300 KIE (Kallidinogenase Inaktivator-Einheiten)/ml, and 2 mg/ml of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and then kept at 4°C. The samples were

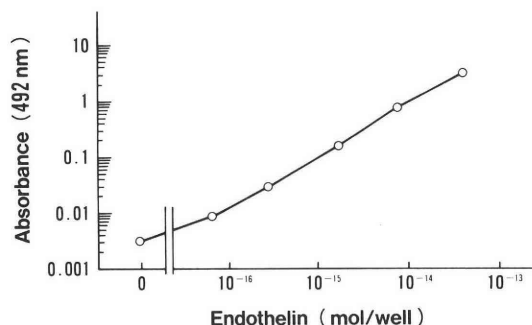


Fig. 2 Standard curve for endothelin-1 in the sandwich-enzyme immunoassay (EIA). Affinity-purified anti-carboxyl-terminal-endothelin (15-21) antibodies (Fab') were conjugated with HRP and then a sandwich-EIA for endothelin-1 was established using AwENT40 (IgG1, κ) as an immobilized antibody, as described under Materials and Methods. A492 denotes the absorbance at 492 nm.

centrifuged at 1,000×g for 10 minutes at 4°C immediately and a 1 ml aliquot of each supernatant was stored at -80°C until the ET-1 assay. ET was extracted from samples by passing them through Sep-pak C-18 cartridges (Waters Assoc., Massachusetts, U.S.A.)¹⁷⁾. The samples were acidified with acetic acid to pH 3, loaded into the cartridges, washed with distilled water, eluted with 86% alcohol containing 4% acetic acid and then dried up. The extracts were dissolved in 250 μ l of buffer E and then subjected to the sandwich-EIA reported by Suzuki et al.¹⁵⁾. When ET-1 was added to human plasma, at a final concentration of 24 pmol/l, the recovery ratio was 90.0±2.9%.

Sandwich-enzyme immunoassay. Twenty μ g/ml (100 μ l) of AwENT40 was added to each well of AwENT40-coated microtest plates, to which was then added 300 μ l of Block Ace (Snow Brand Milk Products Co., Tokyo, Japan) diluted 4 times with phosphate-buffered saline (PBS). ET-1 or samples in 100 μ l of buffer E (0.02 M phosphate buffer [PB], pH 7, containing 10% Block Ace, 0.2% BSA, 0.4 M NaCl and 2 mM EDTA) were put into the wells, followed by incubation at room temper-

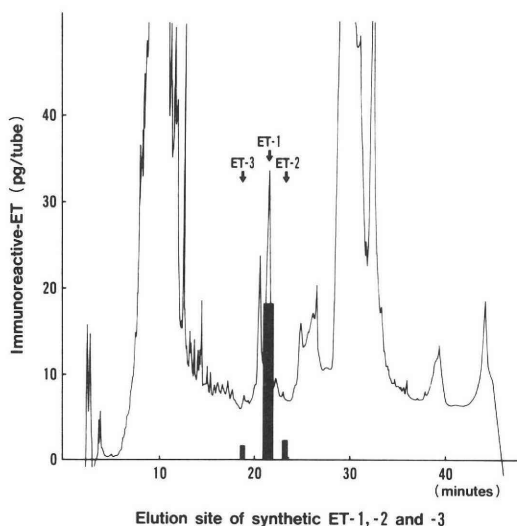


Fig. 3 Reversed-phase high pressure liquid chromatography elution profiles of immunoreactive endothelin in amniotic fluid. ET-1, -2 and -3, indicate chemically synthesized endothelin-1, -2 and -3, respectively; the vertical arrows indicate the position of chemically synthesized ET.

Table 1 Immunoreactive endothelin-1 in amniotic fluid before and after adsorption with monoclonal antibodies.

Samples	Immunoreactive endothelin-1			
	Before	After adsorption		After adsorption
	adsorption	with 2AAP68-37	with AwETN40	
	(pmol/l)	(pmol/l) (%)	(pmol/l) (%)	
1	11.2	9.8	87.5	<0.2 <1.4
2	20.3	15.7	77.2	<0.2 <0.7

ature for 1 day. After washing with PBS, the plate was reacted with 100 μ l of anti-ET-1 (15-21) Fab'-HRP, at a dilution of 1:400 in buffer C (0.02 M PB, pH 7, containing 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA and 1% BSA), at 4°C for 16 hours. After washing with PBS, the bound enzyme activity was measured using 0-phenylenediamine as a chromogen¹⁶⁾. Figure 2 shows the standard curve for ET-1 in the sandwich-EIA. The sensitivity was 8.0×10^{-17} mol/well. As 1.0 ml samples were used in this study, the detection limit for ET-1 was 200 fmol/l. The intra-assay (n=10) and inter-assay (n=5) variations were 11% and 13%, respectively, as judged with a sample containing 0.8×10^{-15} mol/1.0 ml of ET-1.

High-performance liquid chromatography. The amniotic fluid samples, concentrated with the Sep-pak C18 cartridges, were eluted with 4 ml of acetic acid/ethanol/H₂O (4:86:16), dried under a stream of N₂ and then resolved with 250 μ l of 60% acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid. The preparation was then applied to a TSK DS-80 column, eluted and dried. Each fraction was lyophilized and assayed for ET. The immunoreactive ET-1 contents were calculated as to the original volume (Fig. 3). The same data were obtained for plasma. Therefore, the assaying for ET in this study was specific for ET-1.

Adsorption study. In the adsorption study on ET-1 in amniotic fluid, the extracts in buffer E were treated at 4°C for 30 minutes with 25 μ g of immobilized antibody AwETN40 or 2AAP68-37 (1.5 mg of each antibody was coupled to 1 g of CNBr-activated Sepharose 4B). After the mixtures had been centrifuged twice at $1,500 \times g$ for 10 minutes, the supernatants were subjected to the assay. ET-1 in amniotic fluid was adsorbed with mono-

Table 2 Endothelin-1 concentrations in maternal plasma, umbilical cord plasma and amniotic fluid on term delivery.

Case	GW	MP	UA	UV	AF
1	38	0.62	3.16	4.05	13.96
2	39	0.62	3.16	4.05	11.24
3	40	0.89	4.37	3.06	12.44
4	40	0.70	1.96	3.00	9.91
5	41	0.59	2.42	3.35	16.85

Plasma endothelin concentrations in these subjects during pregnancy and on the postpartum day are shown in Figure 6. GW, gestational week at delivery; MP, maternal plasma; UA, umbilical cord arterial plasma; UV, umbilical cord venous plasma; AF, amniotic fluid. Each value is expressed as pmol/l.

clonal antibody AwENT40 (<0.2 pmol/l) almost completely. On the contrary, the control subclass-matched antibody 2AAP68-37 reduced the ET-1 activity by the most 23% (Table 1). It was previously reported that ET-1 in plasma is also adsorbed with this antibody¹⁵⁾. The assay thus seems specific for ET-1.

Statistics. Student's t-test was used for statistical analysis and a p value of less than 0.05 was taken as a significant difference.

Results

ET-1 levels during pregnancy, labor and the postpartum day

Figure 4 shows that the ET-1 levels in maternal venous plasma during gestation and the postpartum period were 0.33 ± 0.08 pmol/l (mean $\pm$ SD, n=28) in the first and second trimester of pregnancy, 0.39 ± 0.13 pmol/l (n=42) in the third trimester without labor pain, with labor that was 0.59 ± 0.18 pmol/l (n=10) at term and 0.39 ± 0.09 pmol/l (n=8) on the first and fifth postpartum day, respectively. The value in the third trimester with labor pain was significantly ($p < 0.01$) higher than that at each trimester of pregnancy without labor pain or on the postpartum day (Fig. 4). The level in normal non-pregnant woman's plasma was 0.37 ± 0.07 pmol/l (n=46) (Fig. 5). This level was higher compared with that in the first and second trimester of pregnancy (Fig. 4), however, significantly ($p < 0.001$) lower compared with the level of normal adult male plasma (0.63 ± 0.03

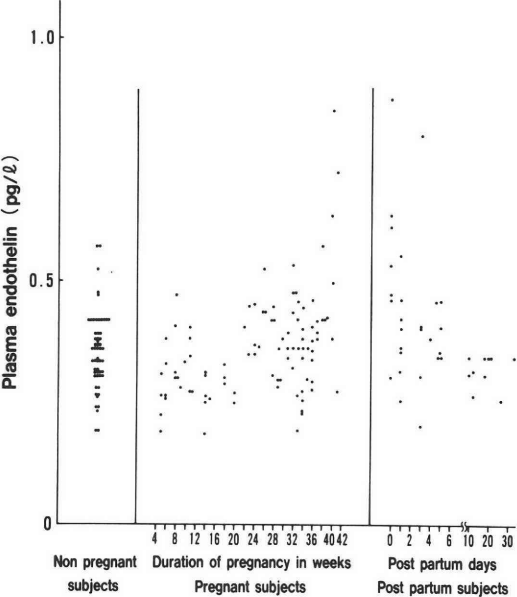


Fig. 4 Changes in the level of immunoreactive endothelin-1 in maternal blood during gestation, labor and on the post-partum day. Each sample was subjected to endothelin-1 measurement, as described in the text. Horizontal bars indicate the mean levels.

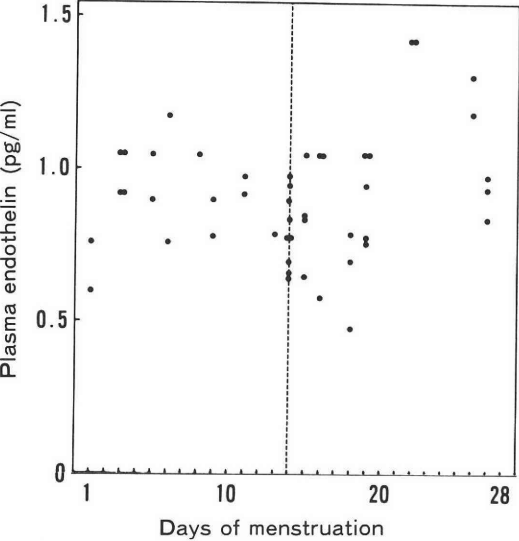


Fig. 5 Changes in the level of plasma immunoreactive endothelin-1 during the menstrual cycle. The ET-1 level during the luteal phase (0.39 ± 0.09 pmol/l, $n=18$) tended to increase compared with those during the follicular phase (0.35 ± 0.05 , $n=18$) or menstruation (0.37 ± 0.07 , $n=10$), being not significantly different from each other.

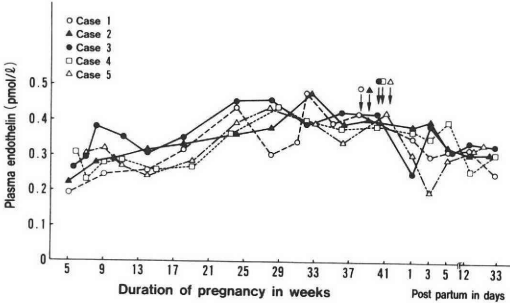


Fig. 6 Serial plasma endothelin-1 concentrations in 5 pregnant women. Endothelin-1 concentrations in maternal plasma, umbilical cord plasma and amniotic fluid on term delivery in these women are shown in Table 2. Vertical arrows indicate the date of delivery.

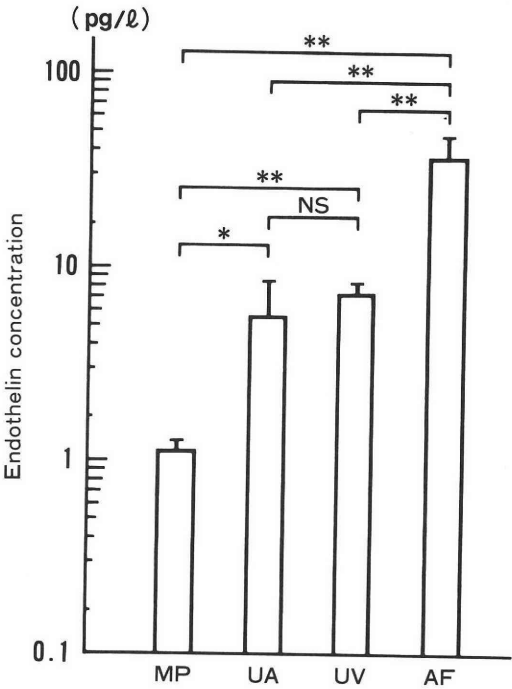


Fig. 7 Mean levels of immunoreactive endothelin-1 in maternal and umbilical cord plasma, and amniotic fluid on normal term delivery. Figure shows the log-transformed data. MP, maternal plasma ($n=9$); UA, umbilical cord arterial plasma ($n=8$); UV, umbilical cord venous plasma ($n=8$); AF, amniotic fluid ($n=18$). Each sample was subjected to endothelin-1 measurement, as described in the text. *, $p<0.01$; **, $p<0.001$; NS, not significant.

pmol/l, $n=24$)¹⁵⁾ by the same assaying system. There are similarities with those in the serial measurements of plasma ET-1 concentration in five women (Fig. 6 and Table 2).

ET-1 levels in amniotic fluid and plasma on delivery

Figure 7 shows that the ET-1 level in amniotic fluid at normal term delivery was 17.38 ± 6.43 pmol/l ($n=18$), and that in the case of premature rupturing of the membranes at term 13 ± 0.05 pmol/l ($n=5$). The ET-1 level in amniotic fluid in the case of preterm delivery was 23.51 ± 0.81 pmol/l ($n=6$) and 21 ± 1.51 pmol/l ($n=5$) in the women who underwent amniocentesis preterm. The ET-1 level in the plasma of umbilical cord arterial and venous blood, and maternal venous blood at labor were 2.76 ± 1.36 pmol/l ($n=8$), 3.46 ± 0.67 pmol/l ($n=8$) and 0.61 ± 0.13 pmol/l ($n=9$), respectively. There are similarities with those in the serial measurements of ET-1 concentrations in five women throughout pregnancy and on the postpartum (Fig. 6). The ET-1 concentration in the amniotic fluid did not show appreciably correlation with fetal sex, birth weight or placental weight (data not shown).

Discussion

The level of ET-1 in the amniotic fluid (17.38 ± 6.43 pmol/l) on normal term delivery was significantly higher than in any other body fluids, e. g., maternal plasma throughout pregnancy and on the postpartum day, and umbilical cord arterial and venous plasma. Furthermore, the umbilical cord plasma ET-1 level was also significantly higher than in maternal plasma. This suggests that the origin of ET-1 in amniotic fluid is the fetus, placenta or membranes (amnion, chorion and decidua). The immunoreactive ET-1 in the amnion was recovered in the same fraction¹⁾, as the intact ET-1 on reversed-phase high pressure liquid chromatography, and was measured by means of the radioimmunoassay, its concentration being 463 fmol/g tissue (manuscript in preparation). This value was extremely high in comparison with those in the blood and the amniotic fluid. Using an immunohistochemical procedure, ET-1 was also detected in amniotic

epithelial cells (manuscript in preparation). Furthermore, Cultured chorionic cells secrete ET, mainly ET-1, or big ET-1 (manuscript in preparation.) In addition, Itoh et al.⁶⁾ isolated ET-1 cDNA from a human placenta cDNA library. These results strongly suggest that ET-1 in amniotic fluid is generated largely from the amnion and/or placenta. The circulating ET-1 during pregnancy might originate partly in the uterus. Nevertheless, it is also possible that tissues other than those in the uterus are related to at least the circulating ET-1 for which further investigation is needed to elucidate.

Recently, Uchida et al.¹⁹⁾ reported that ET produces the contraction of non-vascular smooth muscles, e. g. the guinea-pig tracheal muscle, as well as a vasoconstrictor effect. Likewise, ET-1 also causes potent contractions of the rat myometrium, in a dose-dependent manner, the half effective concentration being 4.9 ± 0.12 nmol/l (data not shown). Furthermore, Kozuka et al.²⁰⁾ reported that ET induces rhythmic contractions of isolated rat uterus via calcium channels in a very similar way to those induced by oxytocin. The results indicate that ET-1 might be one of the most potent uterine constrictors.

In this study, the ET-1 concentration in the maternal plasma during pregnancy with labor pain or on delivery was significantly increased, when compared with that in maternal plasma during pregnancy without labor and during the puerperal period. If the increase in maternal ET-1 reflects the production of ET-1 within the amnion or placenta, an increase in the intrauterine ET-1 concentration may cause uterine contraction directly or indirectly through the release many contractile substances, e. g., prostaglandins, synthesized in the amnion, as Antunes et al.¹¹⁾ reported that ET released eicosanoids. Therefore, it appears likely that ET-1 is closely involved in events related to a physiological process of labor.

The ET-1 concentration in the amniotic fluid on preterm delivery due to premature rupturing of the membrane or obtained by amniocentesis was not significantly different from that on term delivery, but was significantly higher than that in maternal blood. This implies that ET-1 could

remain in the amniotic fluid from earlier in the pregnancy. Since ET has been shown to accelerate the proliferation of cells, which is associated with increases in Ca^{2+} influx, expression of proto-oncogenes and deoxyribonucleic acid synthesis²¹⁾, this implication suggests that ET-1 might also play an important role in fetal development. However, the physiological significance of this effect on fetal environment and the onset of labor has yet to be elucidated.

In the present study, using a novel assay method for immunoreactive ET-1, we determined the ET-1 concentrations in maternal blood, amniotic fluid and fetal blood, and the results suggested the possibility that this peptide may be produced in large quantities, presumably in the amnion or placenta, and may play an important role in events related to labor or uterine contraction, and further to fetal environment. These possibilities highlight the need to explore the role that ET-1 plays during pregnancy. The physiological significance of the action of ET-1 during pregnancy is very intriguing with regard to not only the basic medical viewpoint but also from clinical aspects. The results of a study on the mechanism underlying the ET action may lead to a better understanding of the physiology and pathology during pregnancy.

Acknowledgements

The authors wish to thank Miss J. Terashima, Mrs. H. Nakamura and Miss Y. Hayasaka for their technical assistance, and Mrs. H. Yuzawa for typing of the manuscript. This work was supported in part by grants from the University of Tsukuba Project Research, the University of Tsukuba Special Project Research on Metabolism and the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

References

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature*, 332: 411, 1988
- 2) Regoli, D., Park, W. K. and Rioux, F.: Pharmacology of angiotensin, *Pharmac. Rev.*, 26: 69, 1974
- 3) Altura, B. M.: Significance of amino acid residues in vasopressin on contraction in vascular muscle, *Am. J. Physiol.*, 219: 222, 1970
- 4) Edvinsson, L.: Characterization of the contractile effect of neuropeptide Y in feline cerebral arteries, *Acta Physiol. Scand.*, 125: 33, 1986
- 5) Kasuya, Y., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T.: Model of action of endothelin, a potent endothelium-derived vasoconstrictor peptide, on porcine coronary artery, *Am. J. Physiol.* (in press), 1989
- 6) Itoh, Y., Yanagisawa, M., Ohkubo, S., Kimura, C., Kosaka, T., Inoue, A., Ishida, N., Mitsui, Y., Onda, H., Fujino, M. and Masaki, T.: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin, *FEBS. Lett.*, 231: 440, 1988
- 7) Tomobe, Y., Miyauchi, T., Saitoh, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T.: Effects of endothelin on the renal artery from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 152: 373, 1988
- 8) Wright, C. E., Fozard and J. R.: Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 155: 201, 1988
- 9) Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T.: Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria, *Am. J. Physiol.*, 255 (Heart Circ. Physiol. 24): H970, 1988
- 10) Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T.: Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 413: 108, 1988
- 11) Antunes, E., de Nucci, G. and Vane, J. R.: Endothelin releases eicosanoids from and is removed by isolated perfused lungs of the guinea-pig, *J. Physiol.*, 40p: 40, 1988
- 12) Yoshizawa, T., Kimura, S., Kanazawa, A., Yanagisawa, M. and Masaki, T.: Endothelin-1 depolarizes a ventral root potential in the newborn rat spinal cord, *J. Cardiovascular Pharmacol.*, 13 (suppl. 5): S216, 1989
- 13) Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. and Masaki, T.: The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicate by three separate genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 2863, 1989

- 14) Kimura, S., Kasuya, Y., Sawamura, T.: Structure-activity relationship of endothelin: Importance of the C-terminal moiety, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156: 1182, 1988
- 15) Suzuki, N., Matsumoto, H., Kitada, C., Masaki, T. and Fujino, M.: A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin, *J. Immunol. Methods*, 118: 245, 1989
- 16) Ichimori, Y., Suzuki, N., Kitada, C. and Tsukamoto, K.: Monoclonal antibodies to human interferon- γ II: Antibodies with neutralizing activity, *Hybridoma*, 6: 173, 1987
- 17) Rosmalen, F., Tan, A., and Benaad, T.: A sensitive radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide in human plasma, using a tracer with an immobilized glycouril agent, *Clin. Chim. Acta.*, 165: 331, 1987
- 18) Suzuki, N., Kondo, K., Tominaga, S., Kuroki, M. and Matsuoka, Y.: Heterogeneity of circulating carcinoembryonic antigen analyzed by sandwich-enzyme immunoassays with different specificities, *Can. Res.*, 47: 4782, 1987
- 19) Uchida, Y., Ninomiya, H., Saotome, M., Nomura, A., Ohtsuka, M., Yanagisawa, M., Goto, K., Masaki, T. and Hasegawa, S.: Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor, *Eur. J. Pharmacol.*, 154: 227, 1988
- 20) Kozuka, M., Ito, T., Hirose, S., Takahashi, K. and Hagiwara, H.: Endothelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage-dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 159: 317, 1989
- 21) Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F. and Yazaki, Y.: Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of

vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett.*, 238: 249, 1988

エンドセリン：月経周期、妊娠・分娩 及び産褥における動態

筑波大学臨床医学系産科婦人科

(主任：岩崎寛和教授)

白杵 愼 沖 明典 市川喜仁
窪田早百合 岡根真人 岩崎寛和

近年新しく発見されたエンドセリン (ET) の生殖領域における検討はまだ少ない。今回は、正常非妊婦、妊娠・分娩および産褥における変化について検討を加えた。ET-1 (従来の ET はこれに相当する) は、N 端と C 端の両方を特異的に conjugate させた特異性の高い sandwich-enzyme immunoassay (EIA) 法を用いて測定した。

正常月経周期中の ET-1 濃度は、黄体期で高い傾向にあったが、月経中ないし卵胞期との間に有意な差は認められなかった。妊娠中母体血中 ET-1 濃度は妊娠の経過とともに増加し、妊娠 28 週以前と 29 週以後の間で有意 ($P < 0.05$) な変化が認められた。

陣痛の有無での検討をすると、陣痛時の母体血中 ET-1 濃度は無陣痛に較べ有意 ($P < 0.02$) な増加を示した。分娩時の母体血、臍帯動脈血 (UA)、臍帯静脈血 (UV) および羊水での ET-1 濃度を比較すると、羊水で著明な増加が認められ、母体血、UA ないし UV 中 ET-1 濃度に較べ有意 ($P < 0.001$) の増加が認められた。分娩後の母体血中 ET-1 濃度は、徐々に減少し産褥 2 日目に正常非妊婦領域に戻った。

これらの事実、ET-1 が陣痛発来や胎児発育に関わっていることを示唆している。

(受付：1989 年 10 月 12 日特掲)

体外受精由来マウス胚の発生におよぼす EGF の効果

Effect of EGF on the Preimplantation Development of Mouse Embryos Fertilized *in Vitro*

獨協医科大学産婦人科学教室（主任：熊坂高弘教授）

坂 本 尚 徳

Takanori SAKAMOTO

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

EGF の初期胚に及ぼす作用を知るために、2細胞期で発生の停止（‘2-cell block’）がおこる ICR マウスを用い体外受精をおこないその効果を検討した。

- (1) 授精後6時間にEGFを2 ng/ml以上培地へ添加した場合、EGFは明らかに胚盤胞への発生率を改善し（2 ng/ml：20/60, 33.3%，4 ng/ml：12/57, 21.1%，10 ng/ml：4/28, 14.3%，20 ng/ml：5/26, 19.2%）その効果は‘2-cell block’に従来有効とされているEDTA添加培地（100 μ M/ml）による発生率（22/71, 31.0%）と、有意差のない値であった（ $P>0.05$ ）。
- (2) 授精後6時間にEGF（2 ng/ml）を添加した培地が最も良く胚盤胞への発生率を改善し（12/30, 40.0%），24時間（10/29, 34.5%），48時間（0/30.0%）とその効果は低下する傾向を示した。

以上の成績より、EGFは体外受精由来マウス胚の発生に、促進的に作用していること明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 383-387, 1990)

緒 言

Epidermal Growth Factor (EGF) は、マウス顎下腺より抽出されたポリペプチド細胞増殖因子である¹⁾。近年EGFが生殖現象において、重要な役割を果たしていることが示唆されている²⁾。しかし、その初期胚に対する作用は明らかではない。一方、哺乳類胚の*in vitro*培養では、stage specificな胚発生の停止がおこり³⁾、マウス胚の培養においても、卵子提供雌の系統によって2細胞期で発生の停止がおこる（‘2-cell block’）こと^{4,5)}、および培地へのEDTAの添加により4細胞期への発生が改善され、胚盤胞への発生が可能になること^{6,7)}が知られているが、いまだその原因は明らかにされていない。

そこで本研究では、EGFの‘2-cell block’に対する

効果を、同様に行ったEDTAの効果と比較検討した。

材料および方法

実験には全てJcl：ICR成熟マウスを用いた。体外受精は豊田らの方法^{8,9)}に従って行った。卵子はPMSGおよびHCG各5 iu/0.1 mlを48時間間隔で腹腔内に注射して、過排卵処理を施した成熟雌マウスの卵管膨大部から、HCG注射後15-16時間に採取した。精子については、成熟雄マウスの精巣上体尾部より採取し、受精能獲得のため2時間のプレインキュベート後、卵子を含む0.4 mlのTYH培地へ最終精子濃度が150精子/ μ lになるように、添加することにより体外受精を行った。ついで、授精後5-7時間に第2極体の放出が認められた卵子を、Whitten's培地¹⁰⁾に移し代え、授精後120時間まで培養した。以上

Table. 1 Effect of EGF concentration on the development of ICR mouse embryos fertilized in vitro

concentrations of EGF in media		No.of embryos cultured	No.of embryos developed to :		
			2cell 24hr(%)	4cell 48hr(%)	blastocyst 120hr(%)
ng/ml	20	26	22 (84.6)	15 (57.7) #	5 (19.2) #
	10	28	26 (92.9)	13 (46.4) #	4 (14.3) #
	4	57	41 (71.9)	26 (45.6) #	12 (21.1) #
	2	60	55 (91.7)	28 (46.7) #	20 (33.3) #
	1	55	38 (69.1)	16 (29.1) *	4 ((7.3) *
pg/ml	400	28	20 (71.4)	13 (46.4) #	1 ((3.6) *
	40	33	25 (75.8)	9 (27.3) *	3 ((9.1) **
	20	62	47 (75.8)	25 (40.3) #	10 (16.1) # **
	2	58	47 (81.0)	7 (12.1) *	0 (0) *
EDTA (2Na)		71	59 (83.1)	39 (54.9) #	22 (31.0) #
control		135	109 (80.7)	30 (22.2)	3 (2.2)

Marked values are significantly different from the control values.(# $p < 0.01$, ## $p < 0.05$)

Marked values are significantly different from the values with EDTA.(* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$)

EGF was added at 6 hours after insemination.

Table. 2 Effect of 2ng/ml EGF added at different time after insemination on the development of ICR mouse embryos fertilised in vitro

Time of EGF addition(hr)	No.of embryos cultured	No.of embryos developed to :		
		2cell	4cell	blastocyst
		24hr(%)	48hr(%)	120hr(%)
0	89	66(74.2) *	28(31.5) *##	5(5.6) *##
6	30	29(96.7)	20(66.7) #	12(40.0) #
24	29	27(93.1)	16(55.2) **#	10(34.5) #
48	30	30(100.0) # #	14(46.7) **	0(0) *
EDTA (2Na)	37	36(97.3)	30(81.1) #	15(40.5) #
control	34	30(88.2)	3(8.8)	0(0)

Marked values are significantly different from the control values.(# $p < 0.01$, ## $p < 0.05$)

Marked values are significantly different from the values with EDTA.(* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$)

EDTA was added at 6 hours after insemination.

の培養は、37℃、5 % CO₂、95 % 空気で行った。

以上の条件の下で、(1)各種濃度の EGF を授精後 6 時間の Whitten's 培地に添加し、授精後 48 時間における 4cell 率および胚盤胞率、(2)添加時期の相違による '2-cell block' に与える影響について検討した。

以上の全てに、Whitten's 培地 1 ml あたり 0.05 ml の EDTA 液添加群 (最終濃度 100 μM) と、同量の再蒸留水添加群の対照をおいた。

EDTA は和光純薬製を用い、EGF は Collabor-

ative Reserch 社製 (CR-Epidermal Growth Factor, culture grade) を使用した。

発生率の統計処理は、すべて χ^2 検定により行った。

結 果

(1) EGF 濃度に対する影響 (実験 1)

ICR 由来胚を用い 2 pg-20 ng/ml の EGF 濃度について検討した結果は、Table1 に示す通りである。授精後 24 時間における 2 細胞期への発生は、EGF の

2 pg, 20 pg, 40 pg, 400 pg, 1 ng, 2 ng, 4 ng, 10 ng, 20 ng のそれぞれに対して, 81.0 %, 75.8 %, 75.8 %, 71.4 %, 69.1 %, 91.7 %, 71.9 %, 92.9 %, 84.6 % で, EDTA 及び対照のそれぞれ 83.1 % および 80.7 % との間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$).

授精後 48 時間に 4 細胞期に発生した胚の割合は, 20 pg, 400 pg, 2 ng, 4 ng, 10 ng, 20 ng でそれぞれ 40.3 %, 46.4 %, 49.7 %, 45.6 %, 46.4 %, 57.7 % と EDTA (54.9 %) に対して有意差のない値 ($P > 0.05$) であり, 濃度の増加に伴って発生率は幾分高くなる傾向を示した. 一方, 2 pg, 40 pg, 1 ng では, それぞれ 12.1 %, 27.3 %, 29.1 % で EDTA に比較して明らかに低く, 対照 (22.2 %) と有意差のない値 ($P > 0.05$) であり, 濃度の低下に伴って発生率が下がる傾向にあった. 授精後 120 時間における胚盤胞への発生率は, 2 ng/ml 以上の濃度で高く, EDTA と比較して有意差のない値 ($P > 0.05$) であった. しかし 1 ng/ml 以下では, 20 pg では若干対照より高かったものの, 他は対照と有意差がなかった ($P > 0.05$). 以上の結果から, ICR 卵子由来胚では培地への EGF 添加によって, 4 細胞期以降への発生率が高められることが知られ, その効果は 2 ng/ml 以上で EDTA と同等の効果を示した.

(2) EGF の添加時期に対する影響 (実験 2)

ICR 由来胚を用い, 授精時を 0hr として, 0, 6, 24, 48 hr の各時期に, 2 ng/ml の EGF を添加した培養結果を Table 2 に示した.

授精時 (0 hr) より添加したものは, 授精後 24 時間における 2 cell への進行は 74.2 % と, 対照 (88.2 %) とは有意差がなかったものの ($P > 0.05$), EDTA (97.3 %) より有意に低く, 肉眼的に多精子受精を多く認めた. しかしそれ以後は, 4 cell (31.5 %), blastocyst (5.6 %) と対照 (それぞれ 8.8 %, 0 %) よりはやかったものの, EDTA (それぞれ 81.1 %, 40.5 %) より明らかに低かった.

授精後 6 時間に EGF を添加した場合は, 4 cell (66.7 %), blastocyst (40.0 %) と, 対照より明らかに良好で, EDTA と有意差のない値 ($P > 0.05$) であった.

授精後 24 hr に EGF を添加した場合は, 4 cell (55.2 %), blastocyst (34.5 %) と, 対照より明らかに良好であったが, EDTA との比較では 4 cell に達したものが有意に低く, blastocyst に達したものは有意差は認めなかったが, 若干低い傾向を示した. 48 hr 後に 2 cell である場合に EGF を添加したものは, 3 個のみ (10 %) が 4 cell で, 11 個が 3 cell の段

階で発生を停止していた. blastocyst へは全く進行しなかった.

以上の結果から, EGF の添加は培精後, 精子を洗浄後早期からの添加が最も高い '2-cell block' 抑制率を示した.

考 察

本研究の結果から, EGF は化学的に成分の明確な培地において体外受精に由来するマウス胚の発生を改善し, 胚盤胞への分化に有効に作用することが明らかにされた.

体外受精由来胚の培養では, 体外受精に供する配偶仔の系統によって胚盤胞への発生が異なることが知られている³⁾. マウスでは, 体外受精が可能になって以来 '2-cell block' 現象が知られており, ICR 卵子由来胚においては 2 細胞期にほとんど全ての胚が発生するにもかかわらず, 4 細胞期以降へ発生する胚は非常に少なく, 発生しても時間的に遅れ胚盤胞へ発生するまでに退行してしまう^{4,5)}. このことは対照培地における実験結果によっても確認された. 現在までのところ, この '2-cell block' の原因は明らかにされておらず, 培養条件の改善や 2, 3 の化学物質の添加により胚発生を改善したとの報告がある.

すなわち, 酸素分圧の問題がある. 受精の場合である卵管液中の酸素分圧が大気中の酸素分圧の 1/3 程度であること¹¹⁾, 空気中の酸素分圧では高すぎて発生の阻害をひき起こし, 5 % O₂, 5 % CO₂, および 90 % N₂ の気相がより好適な環境を与えること¹²⁾ Cu・Zn 型 Superoxide Dismutase (SOD) に培養液を加えることにより, '2-cell block' が解除されるとする報告¹³⁾ がある.

そのほか培養条件の問題としては, ビルビン酸と乳酸の比率の重要性も挙げられている¹⁴⁾. 1977 年に Abramzuk ら⁶⁾は, 非近交系由来の 1 細胞期胚を 10.8 μ M という微量の EDTA を添加した培地で体外培養し, 70 % 以上の胚が胚盤胞まで発生したことを報告した.

星ら⁷⁾によれば, EDTA の効果は極めて広い濃度範囲 (2.5 μ -500 μ M) で認められ, 別の Ca²⁺キレートである EGF では効果が見られなかったことで, Ca²⁺ および Mg²⁺ 以外の金属イオンとのキレート化を EDTA の作用機序として考えている. 本実験においても 100 μ M の EDTA 添加培地において明らかに胚発生の改善が認められている.

EGF は 53 個のアミノ酸からなり, 分子量は約 6000 である¹⁵⁾. 人をふくめた多くの動物種の血液, 尿, 乳汁, 唾液あるいは組織中に存在することが知られて

おり^{15,16,17)}, マウスでは特に母乳中には高濃度の EGF (>100 ng/ml) が含有され¹⁸⁾, 子宮にも高濃度の EGF の存在が報告されている¹⁹⁾. また, 組織培養では必須因子の一つと考えられ, 5-100ng の濃度で培地中に添加されている²⁰⁾. 本研究において EGF が生理的濃度で初期胚に作用していると言うことは, in vivo と in vitro の相違を考える上で重要な意義がある.

EGF の作用は EGF レセプターを介して伝達される. EGF レセプターは, 分子量約 17 万の糖蛋白で 1,186 個のアミノ酸からなる²¹⁾. 細胞膜の外側にある EGF 結合ドメイン, 膜貫通ドメイン, 及び細胞質内ドメインの 3 つの部分よりなり, 細胞質内には EGF 依存的にチロシンと磷酸化するチロシンキナーゼドメインとそのキナーゼにより磷酸化される自己磷酸化部位が存在する²²⁾. また, 2 細胞期で発生を停止する胚においては, 少なくとも DNA 合成が開始可能であり, '2-cell block' が DNA 合成能の欠如のためではないとされる²³⁾. さらにおもしろいことには, ICR などのような胚盤胞までの培養が困難である系統のマウス 1 細胞期胚の細胞質へ, 胚盤胞への発生が良好な F1 由来胚の一部を注入することによって '2-cell block' が克服されることから, 細胞質因子との関連も推測されている²⁴⁾. 胚の細胞質における母親由来のメッセンジャー RNA の一部が, 1 細胞期後半から 2 細胞期の前半にかけて活性化されるという報告は²⁵⁾, 本研究において, 受精後 6 時間に EGF を添加したものが最も良く, 24 時間後ではやや効果の低下が見られた実験結果と考え合わせると興味深い.

以上のことから, EGF の作用機序を考えれば, 卵管から局所的に分泌された EGF が EGF レセプターを介し, progression 因子として DNA 合成を引き起こし, 細胞分裂を促進しているのではないかと考えられる.

しかしながら, 透明帯が分子量 1200 以上の物質を通過させないことを考慮すれば, EGF の作用は, EDTA と同じくある種の重金属イオンの除去を通して作用している可能性も否定できず, 今後透明帯や卵子の EGF レセプターに関し検討が必要である.

いずれにしろ, 本研究を通して, EGF が初期胚に関しても重要な役割を果たしていることが示唆され, また, '2-cell block' の機序の解明に重要な手がかりに成り得るものと考えられる.

稿を終るに臨み, ご指導頂きました本学医動物学教室の山本久教授ならびに雪印乳業株式会社生物化学研究所の星雅樹氏に深謝します.

文 献

- 1) Choen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal, *J. Biol. Chem.*, 237: 1555, 1962
- 2) 堤 治, 水野正彦, 岡 孝巳: Epidermal Growth Factor と生殖生理, *臨婦産*, 42 (4): 303, 1988
- 3) Bavister, B. D.: Animal in vitro fertilization and embryo development, in *Developmental Biology* (Ed. by Gwatkin, R. B. L.), 125, Plenum Press, 1986
- 4) Biggers, J. D.: New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo, in *The Biology of the Blastocyst* (Ed. by Blandaw, R. J.), 319, The University of the Chicago Press, 1971
- 5) Whitten, W. K. and Biggers, J. D.: Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium, *J. Reprod. Fert.*, 17: 399, 1968
- 6) Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowsky, H.: The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium, *Develop. Biol.*, 61: 378, 1977
- 7) 星 雅樹, 豊田 裕: 体外受精に由来するマウス胚の発生に及ぼす EDTA の効果, *日蓄会報*, 56: 931, 1985
- 8) 豊田 裕, 横山峯介, 星冬四郎: マウス卵子の体外受精に関する研究, I. 精巣上体精子による受精成績, *家畜繁殖誌*, 16: 147, 1971
- 9) 豊田 裕, 横山峯介, 星冬四郎: マウス卵子の体外受精に関する研究, II. 精子進入時期に及ぼす精子体外培養の効果, *家畜繁殖誌*, 16: 152, 1971
- 10) Whitten, W. K.: Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro, *Advan. Biosci.*, 6: 129, 1971
- 11) Mastroianni, Jr., L. and Jhones, R.: Oxygen tension within the rabbit fallopian tube, *J. Reprod. Fert.*, 9: 99, 1965
- 12) Quinn, P. and Harlow, G. W.: The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro, *J. Exp. Zool.*, 206: 73, 1978
- 13) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutase によるマウス 2-cell block の解除, *日産婦誌*, 41: 751, 1989
- 14) Cross, P. C. and Brinster, R. L.: The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate, *Exp. Cell Res.*, 77: 57, 1973
- 15) Cohen, S. and Savage, C. R.: Recent studies of the chemistry and biology of epidermal growth factor, *Recent Prog. Horm. Res.*, 30: 551, 1974
- 16) Starkey, R. H. and Orth, D. N.: Radioimmunoassay of human epidermal growth factor

- (Urogastrone), J. Clin. Endocrinol. Metab., 45: 1144, 1977
- 17) Hirata, Y. and Orth, D. N.: Epidermal growth factor in human fluids: size heterogeneity, J. Clin. Endocrinol. Metab., 48: 673, 1979
- 18) Beardmore, J. M. and Richards, R. C.: Concentrations of epidermal growth factor in mouse milk throughout lactation, J. Endocrinol., 96: 287, 1983
- 19) Gonzalez, F., Lakshmanan, J., Hoath, S. and Fisher, D. A.: Effect of oestradiol-17 β on uterine epidermal growth factor concentration in immature mice, Acta Endocrinol., 105: 425, 1984
- 20) 友岡康弘: 増殖におけるホルモンと成長因子の相互作用, 組織培養, 14 (13): 426, 1988
- 21) Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Dawnward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D. and Seeberg, P. H.: Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, Nature, 309: 418, 1984
- 22) Downward, J., Parker, P. and Waterfield, M. D.: Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor, Nature, 311: 483, 1984
- 23) Luthardt, F. W. and Donahue, R. P.: DNA synthesis in developing two-cell mouse embryos, Dev. Biol., 44: 210, 1975
- 24) Muggleton-Harris, A., Whittingham, D. G. and Wilson, L.: Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse, Nature, 299: 460, 1982

- 25) Braude, P., Pelham, H., Flach, G. and Lobatto, R.: Post-transcriptional control in the early mouse embryo, Nature, 282, 102, 1979

Effect of EGF on the Preimplantation Development of Mouse Embryos Fertilized *in Vitro*

Takanori Sakamoto

Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan
(Director: Prof. T. Kumasaka)

The present study was undertaken to know whether EGF exerts beneficial effect on the preimplantation development of mouse embryos fertilized *in vitro*.

The development of ICR embryos beyond the 2-cell stage at 120hr after insemination was significantly enhanced by the presence of more than 2ng/ml EGF. While, 20 pg to 1ng/ml of EGF concentration improved the development to the 4-cell stage. Addition of EGF at 6hr after insemination remarkably improved the development beyond the 2-cell stage, but later than 24hr decreased the development to the blastocyst it.

These results indicate that EGF was effective to support the preimplantation development in ICR-mouse zygotes, and EGF was effective not only on the second stage but also the blastocyst formation.

(受付: 1989年11月24日特掲)

新造影剤イオトロラン(イソビスト®)の子宮卵管造影法への応用 —臨床第2相多施設比較試験—

Hysterosalpingography Using New Contrast Medium, Iotrolan (Isovist®)

東邦大学医学部産婦人科学教室

百瀬 和夫

Kazuo MOMOSE

1st Dep. Obstet. Gynec., Toho Univ., School of Med.,
Tokyo 143, Japan

東京大学医学部産婦人科学教室

水野 正彦

Masahiko MIZUNO

Dept. Obstet. Gynec., Tokyo Univ., School of Med.,
Tokyo 113, Japan

東京専売病院

山村 秀夫

Hideo YAMAMURA

Tokyo Senbai Hospital
Tokyo 108, Japan

新しく開発された非イオン性水溶性ヨード造影剤の2用量(300 および 240 mgI/ml)を用いて子宮・卵管造影を実施し(各群24例, 計48例), その有用性を比較検討した。

その結果, 造影効果では, 2用量群とも診断上十分な造影効果を認めたが, コントラストの点では300 mgI/mlの濃度がやや優れていた。

安全性では, 両群あわせて4例に腹痛, 発熱, 発疹がみられたが, いずれも一過性で軽度なもので, 両群間に差はなかった。投与前・投与後に実施された臨床検査値についても, 両群ともイソビストに起因すると思われる変動は認められなかった。以上より, イソビストの至適用量は300 mgI/mlが妥当と思われた。

イソビストは, 子宮・卵管造影用造影剤として十分な有用性を有することが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 388-398, 1990)

緒 言

産婦人科領域で日常検査法の一つとして汎用されている子宮卵管造影法の造影剤は2種類に分類される。1つはヨード油であり, もう1つは有機ヨード剤であり, 臨床使用上ともに一長一短がある。ヨー

ド油は植物性のため吸収が遅く, 数年間も体内に停滞するため, その障害が報告されている。また, 有機ヨード剤は血管に入っても安全であるが, 腹膜刺激症状が強く, 術後に疼痛や発熱がみられる¹⁾。

有機ヨード剤であるエンドグラフィンが登場して以来30年, 理想的造影剤の開発が絶えず試みられて

表1 施設および研究者

北海道大学 産婦人科	藤本征一郎, 田中俊誠
東北大学 産婦人科	矢嶋 聡, 星合 昊, 深谷孝夫, 大井嗣和
東京大学 産婦人科	水野正彦*, 三橋直樹, 梁 善光, 塩津英美 五味淵秀人(現・帝京大学産婦人科)
東邦大学 産婦人科	百瀬和夫, 古川隆正, 松島弘充
日本大学 産婦人科	高木繁夫, 津端捷夫, 長田尚夫
山梨医科大学 産婦人科	加藤順三, 吉田孝二
大阪大学 産婦人科	谷澤 修, 佐治文隆
大阪市立大学 産婦人科	須川 佶, 友田昭二, 中野昌芳
東京専売病院 院長	山村秀夫**

*: 試験総括医師

**: コントローラー

表2 除外規定

- | | |
|---|---|
| 1) ヨード過敏症の既往歴があるもの, および
ヨード過敏反応陽性のもの | 7) 妊婦または妊娠している可能性があるもの |
| 2) 一般状態の悪いもの | 8) マクログロブリン血症 |
| 3) 重症の心障害があるもの | 9) 骨盤腔内に急性炎症性疾患または強度の
性器出血を有するもの |
| 4) 重症の肝・腎障害(無尿等)があるもの | 10) 月経直前, 直後および月経中のもの |
| 5) 甲状腺機能亢進症, 多発性骨髄腫があるもの | 11) その他, 医師がこの試験の対象として
ふさわしくないと認めたもの |
| 6) 急性肺炎があるもの | |

きた。近年第3世代ともいべき非イオン化2量体型水溶性造影剤であるイソピスト(一般名:イオトロラン)が開発され、脊髄造影剤として承認されるに至った。本剤の特徴は、構造上すべての側鎖に強力な親水性置換基を配し、2個の3ヨードベンゼン環をマスキングしている。このため、血液と等張(isotonic)であり、従来の有機ヨード剤に比して生物学的活性も著しく低減している。これらの特徴から本剤は子宮卵管造影に应用できるものと期待された²⁾。

今回、われわれはイソピストの300 mgI/mlならびに240 mgI/mlの2剤型を用いて、子宮卵管造影における本剤の有用性を多施設共同研究にて検討したので報告する。

対象と方法

イソピスト300(以下H群)、イソピスト240(以下L群)の2用量について、子宮卵管造影における造影効果、安全性ならびに有用性について比較検討した。なお、本試験は表1に示す全国8施設により行なわれた。実施期間は、1988年5～8月までの4ヵ月間であった。

1. 対象

子宮卵管造影を必要とする20～45歳までの患者48

例(H群, L群, 各24例)を対象とした。薬剤の使用に当たっては、あらかじめ患者または家族の承認を得た。なお、除外規定(表2)に該当する患者は対象から外した。

2. 試験方法

1) 使用薬剤

イソピスト300は1 ml中Iotrolan 640.75 mg(300 mgI/ml)、イソピスト240は1 ml中512.59 mg(240 mgI/ml)を各々含有する容量10 mlの製剤で、浸透圧はいずれの製剤も血液と等張の(対生食水比1)である(図1)。

2) 投与方法

原則として6～10 mlを注入した。注入圧は300 mmHgを越えないように注意した。なお、使用薬剤はあらかじめ体温程度に暖め、過敏症テストを実施する場合は、本剤の一部(約1 ml)を用いた。

3) 撮影条件

現在、各施設で行なっている条件で撮影した。

4) 検査後の鎮痛剤の配付

あらかじめ鎮痛剤を患者に配付し、万一耐え難い腹痛が発現した場合にのみ服用するように指導した。

3. 評価方法

造影効果は担当医および読影医によって評価され、安全性と有用性は担当医により評価された。

1) 造影効果 (担当医)

得られたフィルムのうち、子宮、卵管および腹腔内の各部位に関し、それぞれ最も良いフィルムを選定し、下記基準に従って評価した。また、各部位の個別判定の結果を加味し、同じ判定基準により総合的に評価した。

[造影効果の判定基準]

- 卅：コントラストが良く、診断が容易なもの
- 卅：コントラストはやや劣るが、診断は比較的容易なもの
- ＋：コントラストは劣るが、診断は可能なもの
- －：コントラストが悪く、診断不可能なもの
- ×：判定せず(卵管閉塞などのため造影されず)

なお、造影不良「－」の場合はその原因を、「×」の場合はその理由を記入した。

2) 造影効果 (読影医)

担当医が造影効果判定に用いた全フィルムについて、1 症例分の全フィルムを 1 組として施設、症例を無作為割り付けし、3 名の読影医の合議による判定に供した。判定基準は担当医と同一とした。

更に、各症例のコントラストについて「濃い」「薄い」の判定を行なった。

3) 安全性

(1) 腹痛および発熱

腹痛：造影剤注入中および検査後に患者の訴え、医師の問診・観察により調査した。更に、検査後の腹痛発現状況について、帰宅後も患者調査票により調査した。

発熱：検査直前および直後に体温を測定した。更

に、検査後の発熱状況について帰宅後も患者調査票により調査した。

[造影剤注入中の腹痛の重症度判定基準]

- －：なし
- ＋：軽度疼痛
- 卅：中等度疼痛
- 卅：激しい疼痛

[検査後の腹痛の重症度判定基準]

- －：なし
- ＋：軽度疼痛 (薬の必要を全く感じなかった)
- 卅：中等度疼痛 (薬を飲んだが、寝込むほどのものではなかった)
- 卅：激しい疼痛 (薬を必要とし、寝込むか、病院に連絡した)

(2) 副作用

患者の訴え、医師の問診・観察および患者調査票により調査し、副作用が発現した場合、その症状、発現時間、持続時間、経過、処置および転帰について詳細に記載し、それぞれ下記の[重症度判定基準]と[本剤との関連性の判定基準]により判定した。なお、腹痛および発熱に関して、前記(1)の調査結果に基づき副作用と推定されたものについては副作用欄に記入し、その他の副作用と同様に判定した。

[重症度判定基準]

- ＋：薬剤による処置を必要としなかったもの
- 卅：薬剤による処置を必要としたもの

[本剤との関連性の判定基準]

- 1. 関連性あり
- 2. 関連性が疑われる

識 別 番 号	S H L 437 A	S H L 437 B
製 剤 名	イソビスト 300	イソビスト 240
一 般 名	iotrolan	iotrolan
組 成 (mg/ml)	640.75	512.59
使 用 剤 型	10mlバイアル	10mlバイアル
ヨード含量 (1ml中)	300mg	240mg
粘稠度 (cp. 37℃)	9.2	4.2
浸透圧比(対生食水比)	約 1	約 1
pH	6.5~8.0	6.5~8.0
構 造 式		

図 1 構造式ならびに物理化学的性質

3. 不明

4. 関連性なし

なお、「本剤との関連性の判定基準」が「1～3」と判定されたものを副作用として採用した。

(3) 臨床検査

投与前, 投与後に下記の臨床検査を実施し, 投与後の検査値が前値に比較し異常を示した場合には, 治験薬との因果関係について考察し, 可能な限り追

跡調査した。

血液一般検査：赤血球数, 白血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数

血液生化学検査：GOT, GPT, AL-P, LDH, 総ビリルビン, BUN, クレアチニン, Na⁺, K⁺, Cl⁻
尿検査：蛋白, 糖, ウロビリノーゲン (定性半定量)

4) 有用性の判定

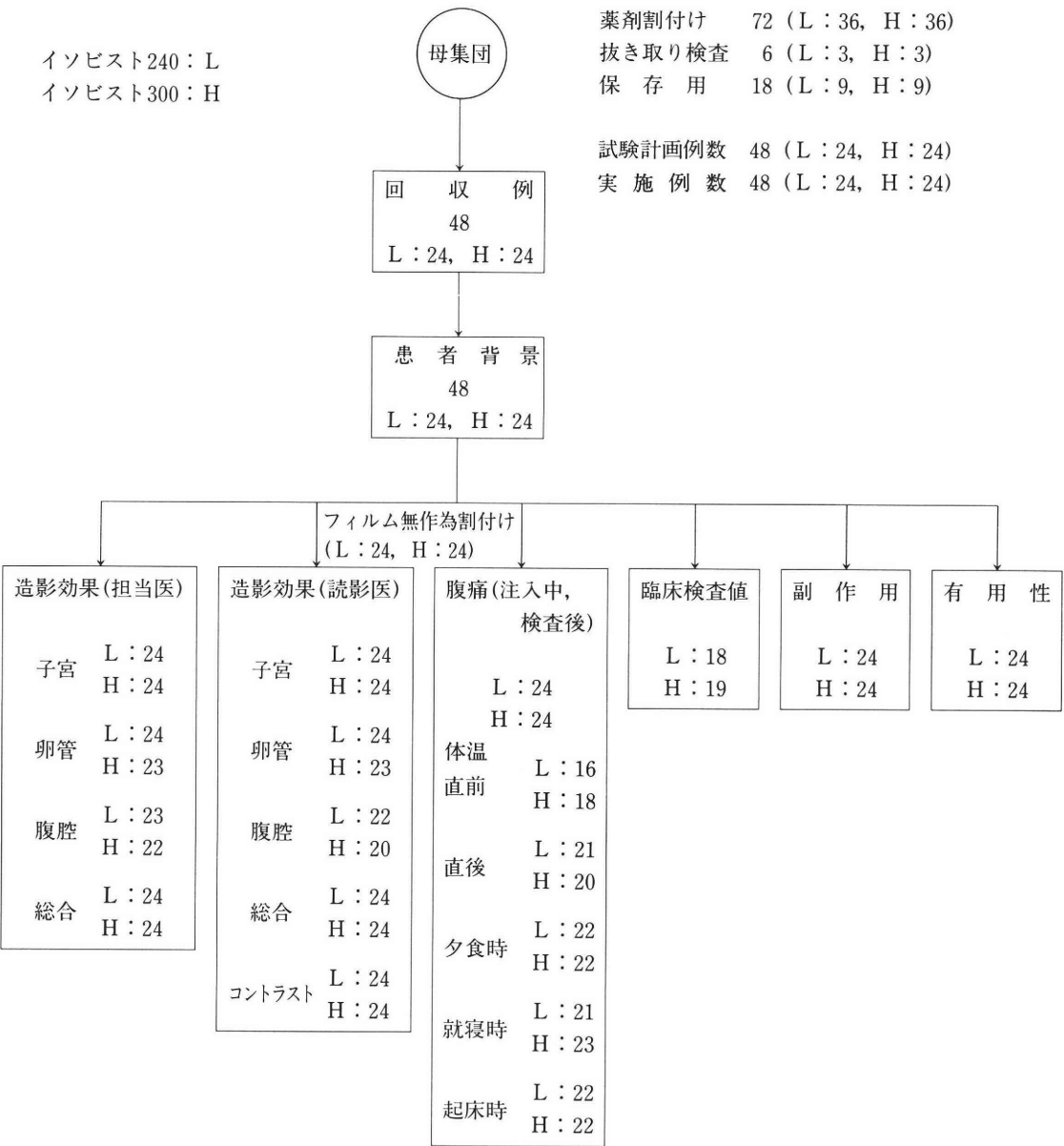


図 2 データ解析の流れ

表 3 患 者 背 景

項 目		イソピスト240	イソピスト300	格 定
症 例 数		24	24	
入 院 外	来	2	2	Fisher検定 P = 1.000 ^{NS}
		22	22	
造 影 剤 過敏症テスト	陰性	17	17	$X_o^2=0.1008$ P = 0.7508 ^{NS}
	実施せず	7	7	
年 齢	20～29	8	9	$X_o^2=0.3922$ Df = 2 P = 0.8219 ^{NS}
	30～39	14	14	
	40～45	2	1	
	平均±S.D.	32 ± 5	31 ± 5	U検定 $Z_o=0.5789$, P = 0.5627 ^{NS}
体 重 (kg)	≤ 39 (38)	0	1	$X_o^2=5.2093$ Df = 3 P = 0.1571 ^{NS}
	40～59	20	23	
	60～79	3	0	
	80 ≤ (87)	1	0	U検定 $Z_o=2.2979$, P = 0.0216 *
既 往 歴	無	18	15	$X_o^2=0.3879$ P = 0.5334 ^{NS}
	有	6	9	
アレルギー歴	無	20	22	Fisher検定 P = 1.000 ^{NS}
	有	4	2	
合 併 症	無	24	24	
	有	0	0	
前 投 薬	無	24	24	
	有	0	0	
初回 注入量 (mℓ)	1～5	13	12	$X_o^2=1.2218$ Df = 2 P = 0.5429 ^{NS}
	6～10	10	12	
	11～12	1	0	
	平均±S.D.	5.5 ± 2.5	5.8 ± 2.9	U検定 $Z_o=0.4369$, P = 0.6627 ^{NS}
追加 注入量 (mℓ)	追加注入せず	5	4	$X_o^2=1.1432$ Df = 2 P = 0.5646 ^{NS}
	1～5	14	15	
	6～10	5	4	
	11～15	0	1	U検定 $Z_o=0.5569$, P = 0.5776 ^{NS}
総投与 量 (mℓ)	4～5	1	2	$X_o^2=1.8039$ Df = 3 P = 0.6141 ^{NS}
	6～10	19	15	
	11～15	3	6	
	16～20	1	1	U検定 $Z_o=0.4288$, P = 0.6681 ^{NS}
初回 注入圧 (mmHg)	測定せず	15	17	$X_o^2=1.1432$ Df = 2 P = 0.5646 ^{NS}
	40～100	7	4	
	110～200	2	3	
	平均±S.D.	95.3 ± 67.8	112.9 ± 67.8	U検定 $Z_o=0.2138$, P = 0.8307 ^{NS}
追加 注入圧 (mmHg)	測定せず	20	19	$X_o^2=0.1685$ Df = 2 P = 0.9192 ^{NS}
	30～100	3	4	
	110～170	1	1	
	平均±S.D.	110.0 ± 40.8	84.0 ± 39.1	U検定 $Z_o=1.000$, P = 0.3169 ^{NS}
初回注 入時間 (s)	6～60	17	13	$X_o^2=1.5333$ Df = 2 P = 0.4646 ^{NS}
	61～120	6	10	
	121～180	1	1	
	平均±S.D.	61.5 ± 41.2	74.8 ± 42.8	U検定 $Z_o=1.3989$, P = 0.1618 ^{NS}
追加注 入時間 (s)	追加注入せず	5	4	$X_o^2=3.3434$ Df = 4 P = 0.5121 ^{NS}
	5～60	15	16	
	61～120	1	0	
	121～180	0	2	
	180 ≤	3	2	
	平均±S.D.	75.7 ± 91.6	77.3 ± 99.6	U検定 $Z_o=0.0142$, P = 0.9887 ^{NS}
総注入 時間 (s)	10～60	8	5	$X_o^2=3.8622$ Df = 4 P = 0.4250 ^{NS}
	61～120	9	8	
	121～180	2	7	
	181～240	2	1	
	240 ≤	3	3	
	平均±S.D.	121.5 ± 104.4	139.2 ± 103.9	U検定 $Z_o=0.8888$, P = 0.2741 ^{NS}

表4 造影診断名

診 断 名	イソピスト 240	イソピスト 300
付属器病変		
卵管閉塞, 卵管留水症	5	6
卵管・卵巣周囲癒着	5	3
卵巣嚢腫, 子宮内膜症	2	2
子宮病変		
子宮筋腫	1	3
子宮奇形	2	2
正常	9	8
計	24	24

造影効果, 副作用の種類と重症度, 臨床検査値および対象患者の病態などから, 総合的に試験薬剤の有用性を下記5段階に評価した。

[有用性の判定基準]

1. 極めて有用
2. 有用
3. やや有用
4. 無用
5. 有害

5) データの処理と解析

問題症例検討会で脱落, 除外例等の検討を行ない, 解析対象例を協議決定した。試験成績の解析は, 日本シエリング(株)が行なった。使用した統計法はFisher 検定, χ^2 -検定, U-検定である。

試験成績

1. 解析対象例ならびに患者背景

全施設からの回収例数は48例で, 各評価項目における対象例数を図2に示した。また, H群24例, L群24例について検討した結果, 年齢, 投与量等の背景因子に両群間に偏りは認められなかった(Fisher 検定, χ^2 -検定, U-検定)(表3)。

2. 造影診断名(表4)

付属器病変は, H群11例, L群12例。子宮病変は, H群5例, L群3例であった。正常例は, H群9例, L群8例であった。両群間に偏りは認められなかった。

3. 造影効果(表5)

1) 担当医判定

子宮像の造影効果では「++」以上と判定されたものでは, H群で24例中23例(95.8%), L群で24例中20例(83.3%)であった。H群, L群とも全例診断可能とされた。H群では, L群に比し「+++」の

頻度が高く, 一方, 「+」ではL群が高く, 2群間に有意差を認めた($P<0.05$, U-検定)(図3, 4)。

卵管像では, 「++」以上がH群で23例中23例(100.0%), L群で24例中20例(83.3%)であった。L群で「-」と判定された症例が2例あり, L群はH群に比し明らかに劣っていた($P<0.01$, U-検定)(図3, 4)。

腹腔像では, 「++」以上がH群で22例中20例(90.9%), L群で23例中19例(82.6%)であった。L群の1例が「-」の判定であったが, 2群間に有意差を認めなかった(図5, 6)。

子宮像, 卵管像および腹腔像から総合的に評価した造影効果では, 「++」以上がH群で24例中23例(95.8%), L群で24例中21例(87.5%)であった。H群はL群に比し明らかに優れた($P<0.05$, U-検定)。

2) 読影医判定

子宮像の造影効果で「++」以上と判定されたものは, H群, L群ともに24例全例であった。

卵管像では「++」以上が, H群23例中23例(100.0%), L群24例中23例(95.8%)であった。

腹腔像では「++」以上が, H群で20例中16例(80.0%), L群が22例中22例(100.0%)で有意差を認めた($P<0.05$, Fisher 検定)。

一方, 分布を見た場合には2群間に有意差を認めなかった(U-検定)。

子宮像, 卵管像および腹腔像から総合的に評価した造影効果では, 「++」以上がH群24例中23例(95.8%), L群24例中24例(100%)であった。H群の「+」と評価された1例を含め, H群, L群ともに全例診断可能と判定された。

更に, 各症例のコントラストについて, 「濃い」「薄い」を判定した結果, H群は24例中18例(75%)が「濃い」と判定され, L群の24例中11例(46%)よりコントラストの優れる傾向が認められた($P<0.1$, Fisher 検定)(表6)。

4. 腹痛(表7)

1) 注入中の腹痛

H群が軽度疼痛と判定されたものが24例中12例, L群が5例, 中等度疼痛と判定されたものが, H群, L群ともに各1例であった。

2) 検査後の腹痛

H群が軽度疼痛と判定されたものが24例中6例, L群6例, 激しい疼痛と判定されたものが, H群に1例認められた。なお, 2群間に有意差は認められなかった。

5. 体温(表8)

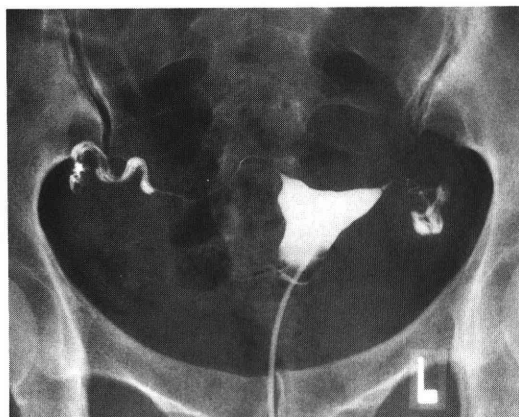


図3 H群(300 mgI/ml) 子宮像(担当医卅, 読影医卅)
卵管像(担当医卅, 読影医卅)



図6 L群 腹腔像(担当医卅, 読影医卅)

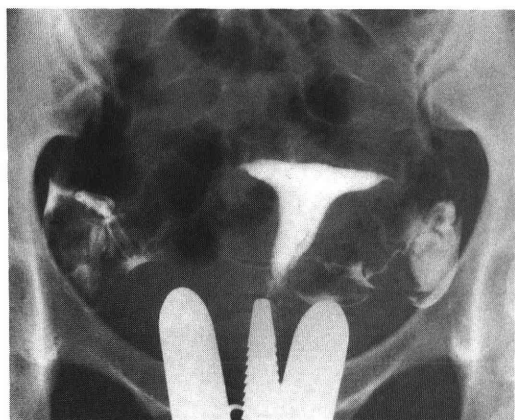


図4 L群(240 mgI/ml) 子宮像(担当医卅, 読影医卅)
卵管像(担当医卅, 読影医卅)



図7 H群 腹腔像(担当医卅, 読影医一)

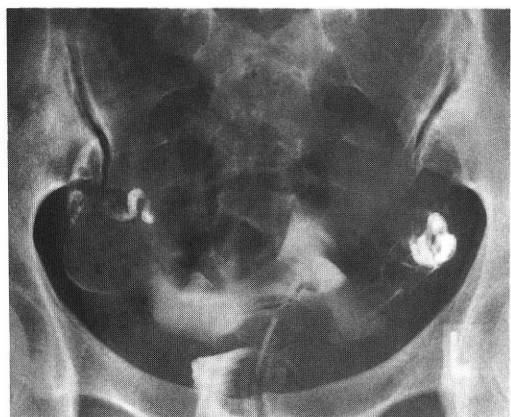


図5 H群 腹腔像(担当医卅, 読影医卅)

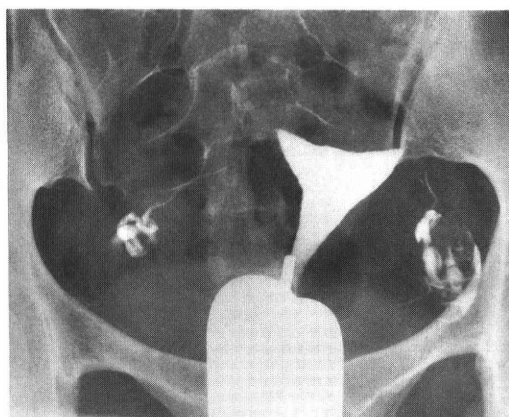


図8 H群 腹腔像(担当医卅, 読影医+)

表 5 造 影 効 果

撮影 部位	判定 医	剤 型	解 対 例	析 象 数	造 影 効 果					≧ 以上 (%)	Fisher 検 定	U-検定
					≧	≧	+	-	×			
子	担当 医	イソピスト240	24	10	10	4				83	P=0.3475 ^{NS}	Z ₀ =2.3730 P=0.0176*
		イソピスト300	24	18	5	1				96		
宮	読影 医	イソピスト240	24	20	4					100	—	Z ₀ =1.3832 P=0.1666 ^{NS}
		イソピスト300	24	23	1					100		
卵	担当 医	イソピスト240	24	8	12	2	2			83	P=0.3475 ^{NS}	Z ₀ =3.2215 P=0.0013**
		イソピスト300	23	18	5				1	100		
	読影 医	イソピスト240	24	18	5	1				96	P=1.0000 ^{NS}	Z ₀ =0.0140 P=1.0112 ^{NS}
		イソピスト300	23	17	6				1	100		
腹	担当 医	イソピスト240	23	9	10	3	1	1		83	P=1.0000 ^{NS}	Z ₀ =1.3722 P=0.1700 ^{NS}
		イソピスト300	22	13	7	2		2		91		
	読影 医	イソピスト240	22	15	7				2	100	P=0.0433*	Z ₀ =0.2943 P=0.7685 ^{NS}
		イソピスト300	20	14	2	3	1	4		80		
総	担当 医	イソピスト240	24	7	14	2	1			88	P=0.3589 ^{NS}	Z ₀ =2.5718 P=0.0101*
		イソピスト300	24	16	7	1				96		
	読影 医	イソピスト240	24	19	5					100	P=1.0000 ^{NS}	Z ₀ =0.0585 P=0.9534 ^{NS}
		イソピスト300	24	19	4	1				96		

* : P<0.05, ** : P<0.01 NS : 有意差なし

表 6 読影医によるコントラストの判定

薬 剤	濃い	薄い	Fisher検定
イソピスト240	11	13	P=0.0753*
イソピスト300	18	6	

+ : P<0.1

表 7 腹 痛

	腹痛の程度	一	十	卅	卄	U検定
注入中	イソピスト240	18	5	1	0	Z ₀ =1.9237
	イソピスト300	11	12	1	0	P=0.0544*
検査後	イソピスト240	18	6	0	0	Z ₀ =0.3870
	イソピスト300	17	6	0	1	P=0.6988 ^{NS}

NS : 有意差なし, + : P<0.1

表 8 体 温

	検査時間	前	直後	夕食時	就寝時	起床時
イソピスト240	n	16	21	22	21	22
	平均±S.D.	36.6±0.4	36.7±0.4	36.5±0.4	36.4±0.4	36.3±0.3
	min~max	35.8~37.2	35.2~37.1	35.8~37.0	35.6~37.7	35.7~36.7
イソピスト300	n	18	20	22	23	22
	平均±S.D.	36.7±0.4	36.8±0.4	36.8±0.4	36.5±0.5	36.4±0.3
	min~max	36.1~37.7	35.8~37.6	36.0~37.6	35.6~38.1	35.6~37.0

表 9 副 作 用

薬 剤	副 作 用	重症度	関連性	発現時間	持 続 時 間
イソピスト300	腹痛(注入中)	十	疑われる	0 分	5 分
	腹痛	十	あり	3時間	6時間
	発熱	十	あり	6時間	7時間
イソピスト240	発疹	卅	あり	14時間	48時間
	発熱	卅	疑われる	8時間	解熱剤を投与したため不明。 翌朝には平熱に回復。

表10 有 用 性

有 用 性	卅	卅	十	一	×	U検定
イソピスト240	8	14	2	0	0	$Z_0=1.9040$
イソピスト300	14	10	0	0	0	$P=0.0569^+$

+ : $P < 0.1$

H群, L群ともに検査前後の大きな変動は認められなかった。検査後, 38°C以上を示した症例は, H群の1例のみであった。

6. 副作用 (表9)

H群に腹痛 (注入中) 1例, 腹痛および発熱の1例の計2例が認められ, L群では発疹1例, 発熱1例の計2例に副作用が認められた。なお, 処置を必要としたものはL群の2例で, 発疹には抗ヒスタミン剤を, 発熱には解熱剤を投与した。H群の2例は無処置にて回復した。

7. 臨床検査値

検査前後ともに臨床検査を実施した症例はH群で24例中19例, L群で24例中18例であった。H群, L群ともに投与後本剤に起因すると思われる異常値は認められなかった。

8. 有用性 (表10)

有用以上と評価されたものは, H群で24例中24例 (100%), L群では24例中22例 (92%) であり, H群はL群に比し優れる傾向 ($P < 0.1$, U-検定) が認められた。

考 察

1. 患者背景

対象患者背景の体重分布についてH群とL群の間で偏りが認められた。これはL群に60~79 kgの患者3例, 87 kgの患者1例が含まれていたためであるが, 造影検査を実施する上では問題となるものではなかった。

2. 造影効果

子宮, 卵管, 腹腔像ならびに総合評価の判定を行なうにあたり, 担当医は造影検査前の各種臨床診断を背景にした診断能とコントラストの両方を加味してフィルムを評価した。一方, 読影医も同一判定基準で判定するものであるが, フィルムが盲検化され, フィルムから得られる情報のみから評価したため, 判定結果に担当医と読影医との間で若干の相違が認められた。

1) 担当医

造影効果に関しては子宮, 卵管では, いずれもL群に比しH群が有意に優れ ($P < 0.05$, U-検定), 腹腔では有意差は認められなかった。総合判定ではL

群に比しH群が有意に優れた ($P < 0.05$, U-検定)。これらの結果は, 担当医がコントラストの「濃い」「薄い」を造影効果判定に寄与させたことによると考えられた。

2) 読影医

子宮, 卵管, 腹腔ならびに総合評価のいずれの判定でも両群間に有意差は認められなかったが (U-検定), 腹腔像の「卅」以上と判定された症例では, L群がH群に比し有意に優れた ($P < 0.05$, Fisher-検定)。腹腔像に有意差が認められた点については, 読影医の評価が盲検化されたフィルムからのみのものであるのに対し, 担当医はフィルムを総合的視点から評価したために両者の判定結果が異なったものと考えられた。

3) 判定結果が担当医と読影医間で異なった理由

読影医は, 腹腔内へ十分量の流入が確認された拡散像のあるフィルムを造影効果の優れたものと判定し, それ以外のものは低く評価した。一方, 担当医は, 卵管疎通性の指標になれば腹腔内への拡散を待たずとも, 少量の流入をX線TV透視下で確認した段階で造影効果を優れたものと判定した (図7, 8)。このことが担当医と読影医の腹腔像判定結果の相違の原因となったと考えられる。以上のような症例は, H群に6例, L群に3例認められた。

造影剤の濃度と関連するコントラストについては, 担当医が「濃い」「薄い」を造影効果の判定に大きく反映させたのに対し, 盲検化されたフィルムのみが診断の情報を得る手段でしかない読影医は, 「濃い」「薄い」にかかわらず, フィルムが十分寄与すると判断された場合は造影効果を優れたものと判定した (図9, 10)。このような症例は, H群5例に対し, L群9例であった。

卵管像についても判定結果に相違が認められた。片側卵管のみ造影された場合で, 担当医は造影検査前の各種臨床診断, 造影時のX線TV透視下の状況, 注入圧などから片側卵管の閉塞と診断し造影効果を判定した。一方, 読影医は, 造影剤の注入量不足, 濃度の不足などの原因も考慮して, 両側とも造影された場合の判定結果よりも低く判定した (図11)。

以上のことから, 担当医と読影医の評価の視点を同一にする上で重要なことは, 担当医が参考にした患者の情報を読影医も必要最少限持つことと, 撮影した全フィルムを読影医が評価することと思われた。

4) コントラストの判定

読影医による当初の判定は, 前述の理由によりコントラストに重点は置かれなかったが, 本試験には, 第III相試験へ進むための濃度選択試験の目的も含ま

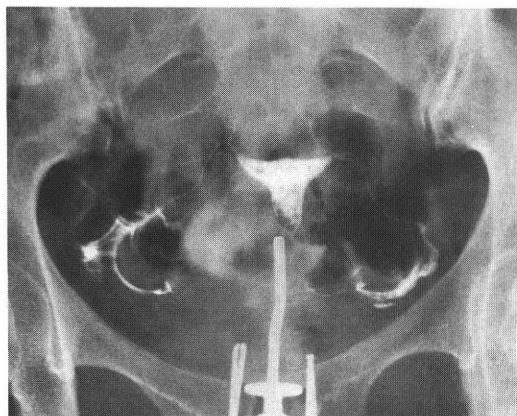


図9 L群 子宮像 (担当医Ⓐ, 読影医Ⓑ)
卵管像 (担当医Ⓐ, 読影医Ⓑ)



図10 L群 腹腔像 (担当医Ⓐ, 読影医Ⓑ)

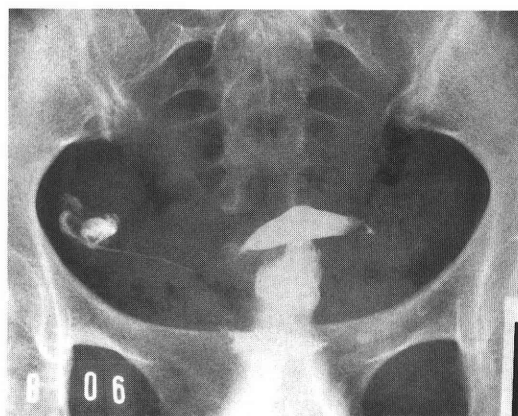


図11 H群 卵管像 (担当医Ⓐ, 読影医Ⓑ)

4. 有用性

有用性は担当医の判定のみにより評価されており、L群に比しH群が優れる傾向が認められた。このことは、L群に対してH群の造影効果が担当医の判定で子宮像、卵管像において有意に優れたことが大きく影響したものと考えられる。また、造影剤を使用する上では使い易さも有用性に影響を及ぼすと思われる。従来のイオン性水溶性ヨード造影剤の粘稠度18.3~19.1 cps (37℃) に比し、濃度240 mgI/mlの剤型の粘稠度4.2 cps (37℃) はかなり低く、注入した場所から流れ易く、より注意深い観察が必要と思われた。その点では300 mgI/mlの濃度の粘稠度9.2 cps (37℃) は240 mgI/mlより高く、使用上有利であると言える。

まとめ

1. 2量体型非イオン性水溶性造影剤であるイソピストを子宮卵管造影48例に使用し、300 mgI/ml (H群) および240 mgI/ml (L群) 濃度の2剤型を2群 (1群24例) に分けて、その造影効果、安全性ならびに有用性を多施設にて比較検討した。

2. 造影効果では両剤とも優れた造影効果を示したが、読影医によるコントラストの判定では、「濃い」と判定されたものが、L群で24例中11例、H群で24例中18例で、H群がL群に比しコントラストが良い傾向が認められた。また、主治医による造影効果の判定では子宮像、卵管像ならびに造影効果総合でH群がL群に比し有意に優れる結果を得た。

3. 安全性 (副作用、臨床検査) では、副作用の発現頻度が、H群は腹痛 (注入中) 24例中1例 (4%)、腹痛と発熱1例 (4%) の計2例 (8%)、L群は発疹24例中1例 (4%)、発熱1例 (4%) の計2例であった。また、両群間に本剤に起因すると

れるため、盲検化されたフィルムのコントラストについて判定した。その結果、H群はL群に比して造影剤の濃度としてはより強いコントラストが得られる傾向が認められた。H群の濃度 (300 mgI/ml) がL群 (240 mgI/ml) より適当であると考えられた。

3. 安全性

注入中の軽度疼痛ではL群に比しH群に多い傾向が認められた。このことは、L群の粘稠度が4.2 cps (37℃) に対し、H群は9.2 cps (37℃) と2倍近いいため、薬剤の注入圧による可能性が考えられ、腹膜刺激症状とは考えられなかった。注入中、検査後ともに、中等度疼痛以上の出現率で両薬剤間に有意差を認めなかった。

発熱については、両剤ともに体温の有意な変動を認めなかった。その他の副作用の出現率でも両群間に有意差は認められず、従来のイオン性水溶性ヨード造影に比し、全身ならびに局所的刺激は予想以上に少ないと思われた。

考えられる臨床検査値の異常は認められなかった。

4. 本剤に対する有用性の評価は、「極めて有用」と判定されたのがH群で24例中14例, L群で24例中8例, 「有用」以上ではH群で24例中24例, L群では24例中22例であった。

以上の総合評価によりH群はL群に比して優れた傾向が認められた。今後、臨床第Ⅲ相試験にて更に本剤の有用性を詳細に検討することが期待される。

(本試験に御協力いただいた各施設、研究者のかたがたに深甚なる謝意を表する)

文 献

- 1) 百瀬和夫：子宮卵管造影，臨放，28：1423，1983
- 2) 百瀬和夫：非イオン性水溶性造影剤イオトロランによる子宮卵管造影法の試み，日産婦東京会誌，37：15，1988
- 3) 百瀬和夫：子宮卵管造影，臨放，33：1507，1988

Hysterosalpingography using new contrast medium, iotrolan (Isovist[®])

Kazuo Momose, Masahiko Mizuno*
and Hideo Yamamura**

1st Dep. Obstet. Gynec., Toho Univ.,
School of Med., Tokyo 143, Japan

Dept. Obstet. Gynec., Tokyo Univ.,*
School of Med, Tokyo 113, Japan

Tokyo Senbai Hospital,**
Tokyo 108

1. In order to examine the radiopacity, safety and utility of Isovist 300 (300mgI/ml) and Isovist 240 (240mgI/ml), a new dimeric non-ionic water soluble contrast medium for hysterosalpingography, a clinical multicenter test was performed in 48 patients.

2. Both groups showed good radiopacity.

As to contrast, there was a tendency of superiority of Isovist 300 over Isovist 240 by evaluation of the physicians of the trial committee. Also, as to radiopacity of uterus and Fallopian tubes, Isovist 300 was superior to Isovist 240 by evaluation of the examining physicians.

3. The incidence of side effects was 8% (2 cases) in each group, these were, however, only slight and transient. In laboratory tests, there was no significant difference between the data before and after hysterosalpingography in either group.

4. The utility ratings "very useful and moderately useful" of Isovist 300 (100%) showed a tendency of superiority over Isovist 240 (92%).

Clinical usefulness of Isovist 300, as shown in this trial, warrants further study in phase III trial.

(受付：1989年11月9日，特掲)

経膣超音波断層法を用いた卵管疎通性の評価

Assessment of Fallopian Tubal Patency by Transvaginal Ultrasound

旭川医科大学産婦人科教室

水 上 明 保	千 石 一 雄	高 田 久 士
Akiyasu MIZUKAMI	Kazuo SENGOKU	Hisashi TAKADA
玉 手 健 一	菊 川 美 一	石 川 睦 男
Kenichi TAMATE	Yoshiichi KIKUKAWA	Mutsuo ISHIKAWA
清 水 哲 也		
Tetsuya SHIMIZU		

Department of Obstetrics and Gynecology,
Asahikawa Medical College,
Asahikawa 078, Japan

経膣プローブを用いた卵管疎通性の評価、特にそれぞれの卵管の評価が可能であるか否かを、HSGの結果を gold standard として比較検討し以下の結果を得た。①左右卵管の疎通性の評価は、56 名 112 卵管において、86.6 % の症例において可能であった。②左右卵管の疎通性の判定が可能であった 86 卵管について、HSG との所見の一致率は 92.9 % と高率であった。③ HSG の左右卵管の疎通性の所見を gold standard とした場合、sensitivity 83.3 %, specificity 100 %, 偽陽性率 0 %, 偽陰性率 16.7 % であった。経膣法による卵管疎通性の評価法は、子宮内腔、ダグラス窩への液体の貯留像が経腹法と比較して明瞭かつ容易に描出可能であった。さらに卵巣周囲への液体の貯留像、卵管采からの液体流出像より左右卵管の同定が高率に可能であり、しかも HSG の所見と比較して高い一致率を示しており、実地臨床上有用性が大きいことを明らかにした。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 399-403, 1990)

緒 言

不妊症の原因として卵管因子の占める割合は 25-50 %¹⁻⁶⁾と報告されており、卵管因子による不妊症患者は、年々増加傾向にあるといわれている。その原因として最近では、STD、人工妊娠中絶による PID、子宮内膜症による卵管機能異常などが関与している可能性が示唆されている。一方、卵管疎通性の評価法として、従来より、通気法、通水法、子宮卵管造影法 (HSG と略す)、あるいは、腹腔鏡や開腹手術時において直接、確認する通色素試験などが行われてきた。なかでも HSG は現在最も多用されている卵管疎通性検査であると考えられる⁷⁻⁹⁾。しかし、HSG

は X 線被曝やヨード過敏などの問題を有しており、一般外来診療で手軽に実施できる検査とはいえない。そこで HSG に匹敵する診断法で患者への侵襲が少ない検査法の開発が望まれ、我々は、経腹超音波断層法を用いた通水法について報告した¹⁰⁾。経腹超音波断層法による卵管の疎通性評価では、ダグラス窩への液体の貯留像の観察により少なくとも一側の卵管の疎通性の評価が可能であったが、左右卵管の疎通性の評価は容易ではなかった。

そこで今回我々は、経膣超音波プローブを用いて左右卵管の疎通性の評価が可能であるか否かについて検討を試みた。

研究方法

〈対象〉旭川医科大学産婦人科不妊症外来に通院中の不妊患者で、昭和 63 年 4 月から平成元年 3 月までに経腔超音波下通水法と HSG において卵管疎通性の評価を行なった 56 名を対象とした。不妊症の原因は、卵管因子 20 名、子宮内膜症 9 名、高プロラクチン血症 4 名、黄体機能不全 5 名、子宮中隔 1 名、子宮筋腫 3 名、男性因子 3 名、原因不明不妊症 11 名であった(表 1)。対象の年齢は 24 歳から 40 歳までで平均年齢 31.5 歳、不妊期間は 1.5 年から 18 年で平均 5.5 年であった。

〈方法〉卵巣の同定を容易にするため、月経開始後 3 日目から Clomiphen Citrate 50 mg を 5 日間で服用し卵胞発育を促し、月経開始後 9-12 日目に検査を施行した。通水法はまず、図 1 のごとく Foley 8 号バルーンカテーテルを経腔的に子宮内に挿入し、1 ml の生理食塩水にてバルーンを膨らませたのち、経腔プローブを挿入し、子宮、左右卵巣の位置を確認する。その後、カテーテルより抗生物質加滅菌生理食塩水

20-40 ml を注入して通水を施行し、その間に子宮腔内、両側卵巣周囲、ダグラス窩への液体貯留像を観察することにより左右卵管の疎通性の有無を判定した。さらに、その成績を HSG 所見を“gold standard”として比較検討した。使用した超音波断層装置は、横河 RT-3600 と東芝 SONOLAYER-L SAL-77B で、周波数 5 MHz の経腔プローブを用いた。

成 績

まず以下に経腔超音波法による代表的超音波断層像を示す。

写真 1 はバルーンカテーテルを子宮内に挿入後、通水開始時の超音波断層像である。子宮腔内にバルーンと、生理食塩水により拡張した子宮腔が観察される。

写真 2 は通水後の超音波断層像である。卵管の疎通性が認められた症例であり、ダグラス窩に液体が貯留している像が確認できる。

写真 3 a は卵管疎通性のある症例の右卵巣の超音波断層像である。直径 20 mm の卵胞が確認できる。

写真 3 b は同症例の通水中の超音波断層像である。

表 1 不妊原因別頻度

卵管因子	20名
子宮内膜症	9名
黄体機能不全	5名
高プロラクチン血症	4名
子宮筋腫	3名
子宮中隔症	1名
男性因子	3名
原因不明	11名
計	56名

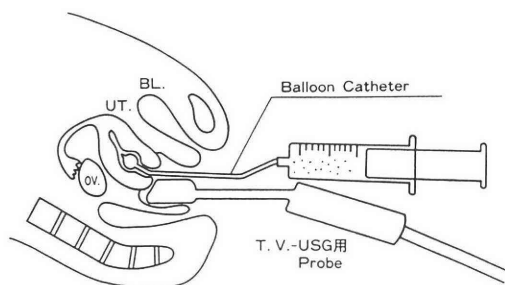


図 1 方法

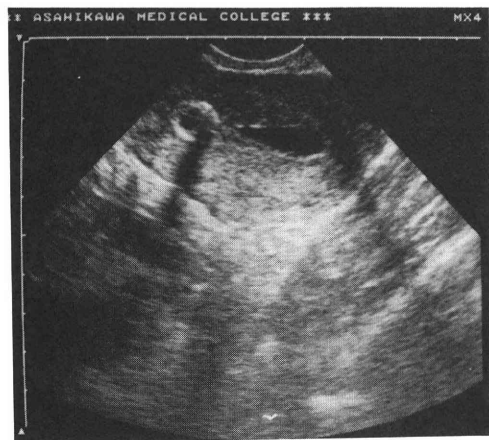


写真 1 バルーンカテーテルを子宮内挿入後、通水開始



写真 2 通水後

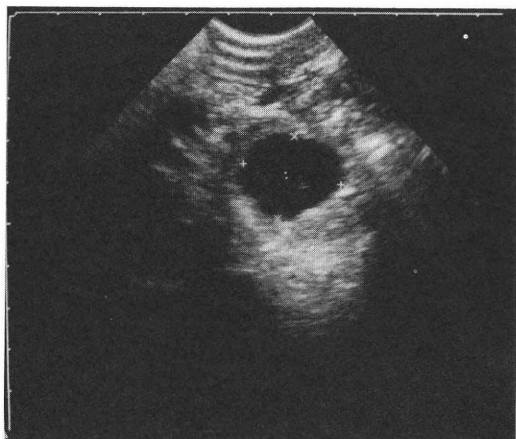


写真 3 a 通水前の卵胞および卵巣像



写真 3 b 卵巣周囲への液体流出像

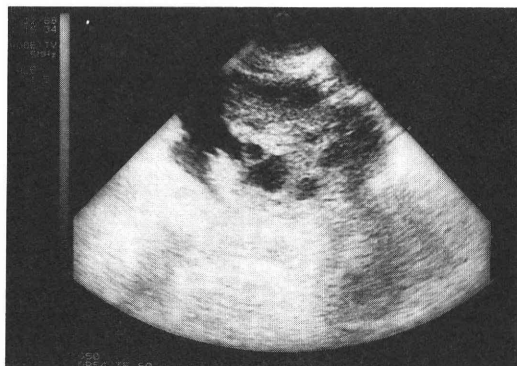


写真 4 卵管采の描出

卵巣周囲への液体流出像が認められる。

写真 4 は卵管采の描出が可能であった症例で、卵管疎通性の認められる症例では卵管采よりの液体流出像を明瞭に確認可能である。

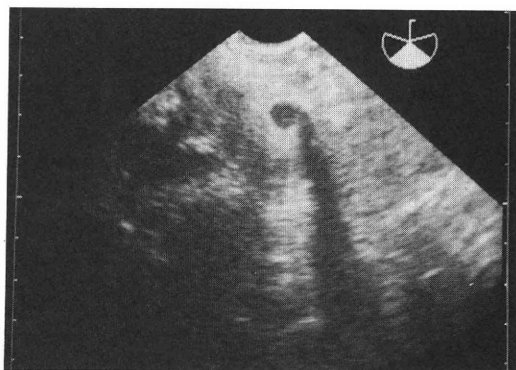


写真 5 a 卵管閉塞例の通水前

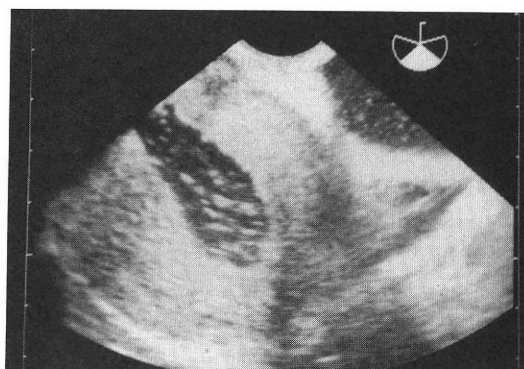


写真 5 b 同症例の通水後

写真 5 は両側卵管閉塞症例の通水前 (a) と通水後 (b) の超音波断層像である。生理食塩水 10 ml 注入にて子宮腔内の著明な拡張と強い抵抗が見られ、卵巣周囲、ダグラス窩に液体貯留像が見られない。

以上のような所見をもとに、HSG を gold standard として経腔超音波下通水法との一致率を比較した。

その結果、経腔超音波下通水を施行した 56 名、112 卵管において卵管疎通性の有無の確認が可能であったのは 97 卵管 (86.6 %) であり、卵管疎通性の有無の確認が可能であった症例中、HSG の所見と一致したものの 90 卵管 (92.9 %) と高い一致率を示した。

次に超音波法で卵管閉塞と判断し HSG で卵管閉塞なしと判断したものを偽陽性率とすると 0 % (0/97)、逆に超音波法で卵管閉塞なしと判断し HSG で卵管閉塞と判断したものを偽陰性率とすると 16.7 % (3/18) であった。また真陰性率である Specificity (特異度) は 100 % (79/79)、真陽性率である Sensitivity (敏感度) は 83.3 % (15/18) であった (表 2)。

なお、経腔超音波下通水後 8 例が妊娠しており、そのうち 5 例が通水法実施後第 2 月経周期までに妊娠に至り、通水療法としても有効であることが示唆

表 2 経腔超音波下通水と HSG との比較

		経腔超音波下通水	
		通過性なし (陽性)	通過性あり (陰性)
HSG	通過性なし (陽性)	15卵管 (15.5%)	3 卵管 (3.1 %)
	通過性あり (陰性)	0 卵管 (0 %)	79卵管 (81.4%)

HSG の卵管通過性の所見を gold standard とすると

Sensitivity	83.3% (15/18)
Specificity	100% (79/79)
偽陰性率	16.7% (3/18)
偽陽性率	0% (0/79)

された。

考 察

不妊症患者の中で卵管因子が占める割合は高く、その正確な診断は重要な問題である。しかし HSG、腹腔鏡あるいは開腹手術を頻回に行なうことは、X 線被曝、ヨード過敏、手術侵襲、などの問題を有しており事実上不可能であるといえる。

そこで以前経腔超音波下通水法を報告したが、この方法ではダグラス窩への液体の貯留像を観察することにより一方の卵管の疎通性の判定は容易であったが、左右卵管の疎通性の同定に関しては 1/3 の症例においてのみ確認可能であり、しかも膀胱充満が必要である欠点を有していた。

一方、経腔超音波プローブを用いた経腔超音波下通水法は、経腹法のように膀胱充満下で行なう必要がなく、それだけ患者への負担が少なく、しかも超音波プローブの先端と子宮、卵巣との距離が近接しているため、5 MHz と高い周波数のプローブが使用可能で鮮明な画像が得られる利点を有している¹¹⁾。さらに子宮内に挿入したカテーテルや Clomiphene citrate による卵巣刺激のために子宮、卵巣の位置が比較的簡単に同定しやすく、それを指標として卵管疎通性の判定も容易となった。また特別な設備を必要とせず、検査にかかる時間が短時間で外来で実施可能であり、生体への侵襲が少なく反復して検査できるなどの特徴を有している。これまで超音波断層法による卵管疎通性の評価法についての報告は、経腹法を用いたものがほとんどで経腔法を用いたものは少ない。またその成績についても経腹法では、ダグラス窩への液体の貯留によりどちらか一方でも疎通性が認められれば陽性所見としており、左右それぞれの

疎通性については判定率が低かった。

一方今回の検討から、経腔超音波による通水法では、左右卵管の疎通性の有無の確認が 86.6 % と高率に可能であり、そのうち HSG の所見と一致したものの 92.9 %、HSG の所見を gold standard とした場合、Sensitivity 83.3 %、Specificity 100 %、偽陽性率 0 %、偽陰性率 16.7 % と卵管疎通性検査のスクリーニング法としての有用性が示唆された。112 卵管中疎通性の有無の確認でできなかった 15 卵管において 2 名 4 卵管は HSG にて両側卵管閉塞と診断され、超音波下通水中に疼痛を訴えたため中止した。

また残り 11 卵管中 HSG で卵管閉塞ありと判断し超音波下通水で判定不能と判断したもの 4 卵管、HSG で卵管疎通性ありと判断し超音波下通水で判定不能と判断したもの 7 卵管であった。これらは卵胞、卵巣の位置の確認が困難で判定不能としたものである。このことから卵胞の発育を十分確認し卵巣を同定したうえで検査を行えば、疎通性の判定率は向上するものと考えられる。

また HSG の所見と一致しなかった 3 卵管は、HSG にて疎通性がなく超音波下通水で疎通性ありと判断した偽陰性率のみであった。これらの症例においてもどちらか一方の疎通性の判定についてはダグラス窩への液体の貯留の有無を観察することにより 100 % 可能であり、しかも前回報告した経腹法においても超音波下通水のほうが HSG に比し通色素試験との一致率が高率であった結果を考慮すれば、経腔超音波下通水法の成績がさらに評価される。

超音波下通水法の特徴操作の簡易さ、非侵襲性、HSG との高い一致率、繰り返し検査が可能で、かつ通水療法としても有効であることを考え合わせると卵管疎通性検査におけるスクリーニング法として極めて有用であり、経腔超音波下通水を外来診療レベルのスクリーニングとし、卵管閉塞例、卵管疎通性の判定不能例に HSG を行なうことにより生殖可能な女性への X 線被曝を極力避けることができると考えられる。

文 献

- 1) Wall, R. L. Jr.: Evaluation and management of infertility, Clin. Obstet. Gynaecol., 12: 889, 1969
- 2) Boyd, I.: Tubal sterility: patency tests and results, J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw., 80: 142, 1973
- 3) Philipsen, T. and Hansen, B. B.: Comparative study of hysterosaipingography and laparoscopy in infertile patients, Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 60: 149, 1981

- 4) Gomel, V.: Microsurgery in female infertility, Little Brown and Company, 1983
- 5) Yen, S. S. C. and Jaffe, R. B.: Reproductive endocrinology, W. B. Saunders Company, 1986
- 6) Keith, L. G., Bergen, G. S. and Lope-Zeno, J.: New concepts on the causation of pelvic inflammatory disease, Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility, 9: 15, 1986
- 7) Bokstedt, H.: Protection of the patient in X-ray diagnosis, Publication No. 16. IRCP, Oxford, 1969
- 8) 鈴木雅州, 佐藤 章, 星 和彦, 齊藤 晃: 子宮卵管造影法, 産と婦, 7: 1181, 1981
- 9) 百瀬和夫: 婦人科X線診断とくに子宮卵管造影法, 日産婦誌, 35: 727, 1983
- 10) 高田久士, 千石一雄, 浅川竹仁, 石川睦男, 清水哲也: 超音波断層法による卵管疎通性の評価, 日不妊会誌, 32: 291, 1987
- 11) 佐藤 章, 遠藤 力, 阿部利明, 荒木 壮, 星 和彦: 経膣プローブによる超音波診断, 周産期医学, 19: 73, 1989

Assessment of fallopian tubal patency by transvaginal ultrasound

Akiyasu Mizukami, Kazuo Sengoku,
Hisashi Takada, Kenichi Tamate,

Yoshiichi Kikukawa, Mutsuo Ishikawa
and Tetsuya Shimizu

Department of Obstetrics and Gynecology,
Asahikawa Medical College,
Asahikawa 078, Japan

Several methods have been used as diagnostic parameter to assess tubal patency in infertile patients. However these methods are invasive or have several disadvantages, including exposure to ionizing radiation, and to iodinated contrast materials. We found that ultrasound was comparable to HSG in detecting tubal patency using transabdominal sector scanner, but this technique was less accurate in evaluating which tubes were patent. The ability of transvaginal ultrasound to detect patency of each fallopian tubes evaluated in 56 infertile women. The presence of cul-de-sac fluid and the flow of fluid from fimbria were seen in the presence of associated tubal patency. All ultrasound findings demonstrated high correlation with HSG's findings (sensitivity 83.3%, specificity 100%). Transvaginal ultrasound assessment of tubal patency provides an accurate alternative to HSG in tubal patency.

(受付: 1989年8月2日)

経腔的超音波下卵管通水法の 有用性の検討

Utility of Hydrotubation under Transvaginal Ultrasonography

東京大学医学部産科婦人科学教室

梁 善 光	升 田 春 夫	篠 塚 憲 男
Shan-Guang LIANG	Haruo MASUDA	Norio SHINOZUKA
五味 淵 秀 人	三 橋 直 樹	水 野 正 彦
Hideto GOMIBUCHI	Naoki MITSUHASHI	Masahiko MIZUNO

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

経腔的超音波断層法観察下に卵管通水法を施行し、左右の卵管別に疎通性の診断を試みた。対象は不妊患者 25 例とし、うち 21 例では子宮卵管造影所見と、11 例では腹腔鏡下卵管通色素法の診断結果との比較を行ない、その正診性を確認し、本法の有用性と限界を検討した。

50 卵管中 48 卵管で本法により疎通性の有無を診断することができた。このうち卵管采からの溶媒の流出を確認できたものは 35 % であり、残りは主に卵管間質部～峡部の所見から疎通性を判断したものであった。腹腔鏡施行症例との比較では、本通水法で疎通性ありと診断した 18 卵管中 17 卵管、および疎通性なしと診断した 4 卵管は 4 例すべてで本法と腹腔鏡の所見が一致した。また、子宮卵管造影施行例との比較では、疎通性の診断が可能であったものではその一致率は 96 % に達した。以上より本法による診断は、溶媒等に改善の余地はあるものの、卵管疎通性のみに限れば十分有用であると思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 404-408, 1990)

緒 言

腹腔鏡検査が不妊治療の一貫として、近年広く各施設で施行されるようになったため、卵管の疎通性の診断としては、直視下の通色素検査の結果が最も信頼のおけるものであることに疑いはない。しかし、腹腔鏡検査は観血的操作であり麻酔を必要とするため決して簡便な検査法とはいえず、まだまだ実際の外来診療では非観血的卵管疎通性検査法である卵管通気検査・卵管通水法検査および子宮卵管造影のもつ診断的意義は大きい。だが、残念ながら卵管通水法は左右別の疎通性を正確に判断するには不適とされており、従来診断法としてよりむしろ治療法の一

つとして頻用されてきた。このため、卵管通水法と超音波断層法を同時に施行することにより、診断法として利用する試みが各施設ですでに検討されてきた¹⁻⁴⁾が、その多くは経腹的超音波診断法を用いたものであり、しかもその解像力の限界から左右別に疎通性を診断する目的で一般診療に応用するには十分な成果をあげるに至っていない。ところが、近年経腔的超音波断層法が開発されたことにより骨盤内臓器の状態をより正確に把握できるようになってきたため、子宮～卵管内の状態についても視覚的に捉えることが可能となり、経腹法での問題点を解決することができるであろうと考えられるようになった。そこで、今回われわれは、経腔的超音波断層法観察

下で卵管通水検査を行ない、疎通性の診断を試み、さらに本法による所見の正診性を確認する目的で、腹腔鏡施行時の直視下での診断結果および子宮卵管造影との比較を行ない、その有用性及び限界につき検討したので報告する。

対象および方法

当科不妊症外来通院中の不妊患者 14 例および腹腔鏡検査を目的で入院中の不妊患者 11 例の計 25 例を対象とした。経腔的超音波下卵管通水法は、子宮腔内に卵管通水用バルーンカテーテルを挿入・留置後、抗生物質加コントラスト用溶媒を注入し、同時に腔内に挿入した経腔プローベを用いて、子宮内～卵管～ダグラス窩への溶媒の流出を経腔的超音波断層法により観察した。施行時期は月経終了後から排卵前までの卵胞期に統一し、また超音波診断装置は SONOVISTA SLC、経腔プローベは周波数 5 MHz および 7.5 MHz を使用した。コントラスト用溶媒には、十分に振盪した低分子デキストランを用い、注入量は外来通院患者には 20～30 ml、腹腔鏡検査施行患者には 30～60 ml (平均 40 ml) とした。主要所見として子宮内溶媒貯留像・卵管間質部流出像・卵管峡部流出像・卵管水腫像・卵管采流出像およびダグラス窩貯留像の 6 つに着目し、これらの所見を左右別に記録し、同時に VTR に録画した。

11 例の腹腔鏡検査施行患者については、検査に先かけ全身麻酔導入後に本法を施行し、引き続き腹腔鏡下に行った indigocarmine 液を用いた卵管通色素検査による直視下の診断成績との比較を行ないその正診性につき検討した。また、本法施行の前後 6 か月以内に子宮卵管造影を行なった患者 21 例について

は、造影所見と本法での検査結果の比較も加えて行なった。なお、経腔的超音波下卵管通水法は不妊外来担当医師および超音波外来担当医師が共同してこれを行ない、腹腔鏡検査と子宮卵管造影は不妊外来担当医が施行、読影した。

結 果

経腔的超音波下卵管通水法における特徴的な超音波所見を図 1～4 に示す。検査は、左右の卵管別に子宮内腔（子宮卵管角部）の拡張像の有無を確認した後に、卵管間質部～峡部～膨大部～卵管采の順に流れる溶媒および溶媒中の気泡を描出し、総合的に疎通性を判断し、最後にダグラス窩への溶媒貯留を確認するという順に行なった。

本法により観察された 25 症例 50 卵管中 48 卵管 (96%) の疎通性の有無を診断することができた。卵管間質部より遠位部への溶媒流出を描出できなかったものは 4 卵管認められたが、このうち 2 卵管 (同一症例) ではダグラス窩貯留像がないことより疎通性なしと診断し、残りの 2 例は不明と判断した。間質部まで描出されたものは 12 卵管であったが、そのうち 6 卵管では、間質部の拡大像と溶媒の流れの速度より判断し、疎通性なしと診断した。また、峡部あるいは膨大部まで確認できたものは各々 18 卵管および 2 卵管であり、さらに遠位部には卵管水腫等の異常所見は認められなかったため、いずれも疎通性ありと診断した。卵管采からの流出を確認できたものは、疎通性を有すると診断された 40 卵管中 14 卵

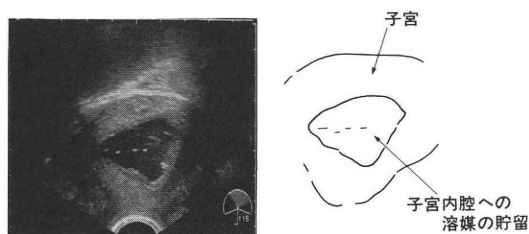


図 1. 子宮内腔拡大像

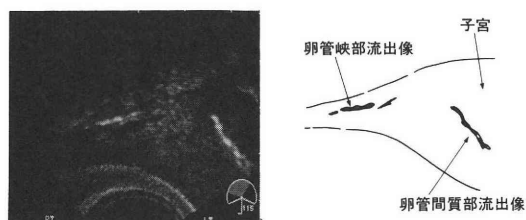


図 2. 卵管間質部～峡部への溶媒流出

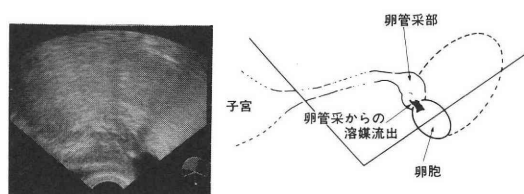


図 3. 卵管采部からの溶媒流出

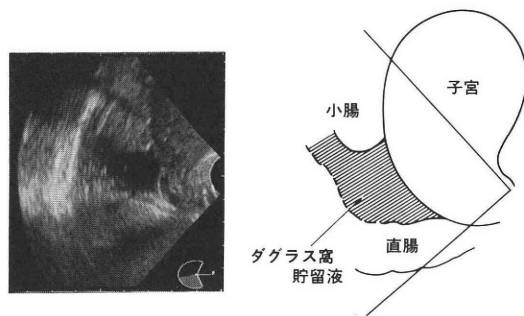


図 4. ダグラス窩貯留像

表 1 Correlation between the diagnosis and the portion of observation by the hydrotubation under transvaginal ultrasonography

		portion of observation				
		not observed	interstitial portion	isthmus	ampulla	fimbria
d i a g n o s i s	patency (+)	0	6	18	2	14
	patency (-)	2	6	0	0	0
	not decided	2	0	0	0	0

表 2 Comparison of the diagnosis between hydrotubation under transvaginal ultrasonography and laparoscopy

		laparoscopical diagnosis	
		patency (+)	patency (-)
ultra- sono- graphic diag- nosis	patency (+)	17	1
	patency (-)	0	4

管 (35 %) であった (表 1)。

同時に腹腔鏡検査下に卵管通色素検査を施行した 11 例につき、両者の結果の比較を表 2 に示した。本法により疎通性ありと診断された 18 卵管のうち、腹腔鏡により直視下で得た診断結果と一致したものは 17 卵管にのぼり、疎通性なしと診断した 4 卵管は全例腹腔鏡の結果と一致した。本法で疎通性ありと診断し、腹腔鏡で疎通性のなかった卵管は、本法では峽部までの流入が確認されたものであるが、直視下では膨大部までの indigocarmine の流入は認めたものの卵管采からの流出を認めなかったため、terminal obstruction と診断された例であった。また、本法で間質部までの観察で診断を下した卵管は 8 卵管あったが、それらのうち疎通性あり、疎通性なしと診断した卵管は各々 4 卵管ずつであり、これらは全例腹腔鏡下の診断結果と一致した。

次に、本法で得られた結果と子宮卵管造影の所見を 21 例で比較検討した。なお子宮卵管造影所見は、左右の疎通性にかぎり読影を行なった。表 3 に示したように、本法で疎通性ありと診断した 36 卵管中 33 卵管で子宮卵管造影でも疎通性ありと判断されたが、3 卵管は疎通性がないものあるいは判定保留と判断された。この 3 卵管は、いずれも腹腔鏡下の観察がなされていない症例のもののため最終診断は残念ながら不明であるが、そのうち 2 例は卵管角部に air が

表 3 Comparison of the diagnosis of tubal patency between hysterosalpingography and hydrotubation under transvaginal ultrasonography

		hysterosalpingography		
		patency (+)	patency (-)	not decided
ultra- sono- graphic diag- nosis	patency (+)	33	1	2
	patency (-)	0	5	0
	not decided	1	0	0

多く残ったために判定保留とされた例であった。しかし、他の 1 例は本法では、峽部までの流出が確認され、その先に卵管水腫は認められなかったために疎通性は保たれていると診断したにもかかわらず、子宮卵管造影上は卵管水腫を認め terminal obstruction と診断されたものであった。

一方、本法で疎通性はないと診断された 5 例については、子宮卵管造影でもすべて同様の所見を示した。ただし、本法では 5 例とも卵管間質部での閉塞と判断されたのに対し、子宮卵管造影上は 3 例が間質部閉塞、2 例が峽部閉塞であった。

考 察

非観血的卵管疎通性検査には、卵管通気検査、卵管通水検査および子宮卵管造影の 3 つがあるが、このなかで左右別に疎通性の有無を判定できるとされているものは子宮卵管造影のみである。前述したように、もっぱら治療法として頻用されている卵管通水検査に超音波検査を組み合わせ、卵管の疎通性を視覚的に把える試みはこれまでにも行なわれてきた。しかし、その多くは経腹的超音波断層法を用い

ていたため診断率や精度の点で問題があり、左右別の疎通性の診断ができるまでには至っていない。今回、経腔の超音波断層法を用いた筆者らの検討では、実施例のうち左右別に診断可能であった卵管の割合は、96%と高率であった。また、腹腔鏡下の卵管通色素法との比較によっても、sensitivity 100%, specificity 94%, accuracy 95%と良好な正診率を得ることができたため、経腔の超音波下卵管通水法による診断は左右別の卵管疎通性に限れば十分有用であると思われる。また子宮卵管造影との比較においても、両方で診断可能であったものではその一致率は96%に達した。当科における腹腔鏡所見と子宮卵管造影所見の一致率は、以前報告⁵⁾したように疎通性に関してのみであれば95%であることを考えると、この結果は納得のいくものであると思われる。

今回、腹腔鏡検査との比較を行なった症例では、溶媒の注入量を外来患者に比べ多く使用したが、適正量(約30 ml)でも十分これに準じた成績をあげることができると筆者らは考えている。今回の検討では、間質部・峽部までの観察しかできなかった例でもほとんどが腹腔鏡の結果と一致してだけでなく(間質部8/8:100%, 峽部4/5:80%), 間質部の拡大像や流出速度の細かい観察が可能となつてかなりの情報が得られており、仮に卵管の全走行を追えない例でも疎通性の判断は可能であると思われる。その一方で手技の熟練に伴い、卵管の全走行にわたり疎通性を確認できる例の割合は増加しており、現段階では35%であるが、さらに症例を増やしていくことによりこの割合は上昇するものと考ええる。

本法での所見と、直視下卵管通色素法あるいは子宮卵管造影の所見がくい違っていた2卵管は、本法では共に峽部までの流出が確認でき、さらに卵管水腫像を認めなかったために疎通性ありと判断したにもかかわらず、他の方法で描出可能限界の遠位部に閉塞が認められたものであった。本法で卵管采からの流出は確認ができなかったが総合判断により疎通性ありと判断した例については、その確率は5%以下に過ぎないものの、このような例がありうることに診断をくだすうえで留意する必要があると思われる。

本法で疎通性なしと判断されたもののうち、腹腔鏡または子宮卵管造影との対比を行なったなかにはfalse negativeの症例は1例もなかったが、また、その閉塞部位について検討を加えると2者(あるいは3者)の所見が一致したものは5卵管中3卵管(60%)のみであった。症例数が少ないため断定的なことはいえないが、“疎通性がない”ことを診断するう

えでは有用であるが、“閉塞部位の特定には不向き”である可能性が示唆された。この点についてはさらに症例の集積を待って再検討したい。

今回の検討で、本法が卵管疎通性検査としては子宮卵管造影に匹敵する診断価値を有することが示されたが、もちろん本法が子宮卵管造影に今後とって代わるものとなるとは考えていない。閉塞部位の診断には不適である可能性については前述したとおりであり、それ以外にも卵管の走行異常や骨盤内癒着を本法で類推することは現状では不可能である。これらの点では、諸家の報告^{5~8)}で腹腔鏡所見と比較しての正診率が問題になってはいらぬものの、子宮卵管造影より得られる情報が非観血的検査の中では最も信頼おけるものであることに変わりはない。しかし、経腔の超音波下卵管通水法は、外来診察室でいつでも施行できるため簡便性では子宮卵管造影より勝っており、また溶媒も浸透圧比1.00のものを使用するため患者に与える疼痛も少ない。さらにX線被曝の問題もないこと、ヨード禁忌の患者にも行なえること、コストも安いことなど子宮卵管造影に比べて有利な点も多く、今後外来診療の場で実施されるに十分な価値があるものと思われる。

本法の診断率の向上のために、さらに検討を加えていかねばならない問題として、コントラスト用溶媒の開発があげられる。鮮明な画像を得るためには、一様に含気された溶媒を使用できれば理想的である。筆者らの経験では生理食塩水単独では十分な画像を得ることができず、十分に振盪した低分子デキストランがより有効であった。しかしそれ以上に有効なものがあるかどうかの検討が必要であると考ええる。

以上、経腔の超音波下卵管通水法は、卵管疎通性検査として、十分に利用できると考えられた。今回の研究では言及しなかったが、このほか子宮内腔拡張像の消長等を分析することにより狭窄の有無についても診断しうる可能性が残されている。この点を含めその信頼性や限界について今後更に詳細な検討を加えて行きたい。

文 献

- 1) Richman, T. S., Viscomi, G. N., de Cherney, A., Polan, M. L. and Alcebo, L. O.: Fallopian tubal patency assessed by ultrasound following fluid injection, *Radiology*, 152: 507, 1984
- 2) Rasmussen, F., Larsen, C. and Justesen, P.: Fallopian tube patency demonstrated at ultrasonography, *Acta Radiol. Diagnosis*, 27: 61, 1986
- 3) 大野洋介, 藤林秀子, 富岡 恵, 福岡正晃, 山元

貴雄, 岡田弘二: 通水圧同時表示法を用いた超音波断層法による卵管機能評価の試み, 日不妊誌, 33: 27, 1988

- 4) 岡田弘二, 大野洋介: 超音波断層法による卵管疎通検査, 産婦治療, 58: 423, 1989
- 5) 五味淵秀人, 北川浩明, 武谷雄二, 佐藤孝道, 水野正彦: 子宮卵管造影施行例における腹腔鏡所見の検討, 日不妊誌, 32: 481, 1987
- 6) Duff, D. E., Fried, A. M., Wilson, E. A. and Haack, D. G.: Hysterosalpingography and laparoscopy: A comparative study, Amer. J. Roentgenol., 141: 761, 1983
- 7) 板倉啓一: 不妊症例における子宮卵管造影と腹腔鏡所見併用による診断的意義, 慶応医学, 59: 737, 1982
- 8) Philipsen, T. and Hansen, B. B.: Comparative study of hysterosalpingography and laparoscopy in infertile patients, Acta Obstet. Gynecol. Scand., 60: 149, 1981

Utility of hydrotubation under transvaginal ultrasonography

Shan-Guang Liang, Haruo Masuda,
Norio Shinozuka, Hideto Gomibuchi,
Naoki Mitsuhashi and Masahiko Mizuno

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

The patency of fallopian tube was assessed by hydrotubation under transvaginal ultrasonographic observation in 25 infertile cases (50 tubes). Well-shaken low moleculd dextran was used for hydrotubation to obtain the hyperechoic image. The results were compared with the laparoscopical findings in 11 cases and compared with the results of hysterosalpingography in 21 cases. The tubal patency was diagnosed in 48 tubes (96%), and the whole route from interstitial portion to fimbria was observed by ultrasound in 14 tubes. Ultrasound demonstrated tubal occlusion with a sensitivity of 100%, and showed tubal patency with a specificity of 94%, compared with the laparoscopical findings in 22 tubes. Additionally, the diagnosis of tubal patency by ultrasound was coincident with the findings of hysterosalpingography at 96% accuracy. These results suggested that the hydrotubation under transvaginal ultrasonography is the useful technique to diagnose the fallopian tubal patency.

(受付: 1989 年 8 月 18 日)

不妊婦人における子宮筋腫核出術の予後

Reproductive Outcome after Myomectomy in Infertile Women

熊本大学医学部産科婦人科学教室

岡村 均 中村 直樹 松浦 講平
Hitoshi OKAMURA Naoki NAKAMURA Kohei MATSUURA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kumamoto University, Medical School,
Kumamoto 860, Japan

1975年から1989年までの14年間に、53例の不妊婦人に施行した筋腫核出術の予後を検討し、以下の成績を得た。

- 1) 術後妊娠率は57% (30例)であった。
- 2) 手術から妊娠成立までの期間は、1年以内が16例 (53%)、1～2年が7例 (23%)であり、2年以内は23例 (77%)であった。
- 3) 手術施行時の筋腫子宮の大きさと妊娠率との関連性はみられなかった。
- 4) 筋腫存在部位別の妊娠率は、粘膜下が83% (5/6例)であり、以下筋層内54% (14/26例)、漿膜下52% (11/21例)であった。
- 5) 手術施行時の年齢別に妊娠率をみると30歳未満89% (8/9例)、30～34歳62% (18/29例)、35歳以上27% (4/15例)であり、年齢の上昇と共に妊娠率が低下した。
- 6) 妊娠が成立した30例の妊娠予後を見ると、流産率は20% (6例)で、正期分娩が70% (21例)であった。

帝切率は52% (11例)であった。

以上の成績より、子宮筋腫を有する不妊婦人において、他の不妊因子が否定されるか、他の因子に対する治療を充分行なった後も妊娠しない場合は、積極的に子宮筋腫核出術を行うべきであり、この場合の妊娠率は約60%を期待できる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 409-414, 1990)

緒 言

不妊の原因は男性因子も含めて多岐にわたっているが、各不妊因子の検出法さらにそれらに対する治療法の進歩はめざましく、それに伴って挙児希望患者の要求を満足させる確率も高くなってきている。卵管性不妊に対する体外受精・胚移植や配偶子卵管内移植といった生殖の根源的現象をまで取り扱う治療法や、microsurgery技術の普及などはその最たるものであろう。他方、産婦人科の臨床において極めてポピュラーな疾患の一つである子宮筋腫が不妊の

原因となりうるかという点については、古くて新しい命題であり論議の多いところである。

今回我々は、挙児希望を主訴として不妊外来を受診し、他の不妊因子を充分除外するか、又は十分治療したにもかかわらず妊娠の成立しない53例の婦人に対して、子宮筋腫核出術を施行し、術後の妊娠成立の面から検討したので報告する。

対象と方法

対象は、京都大学医学部婦人科学産科学教室 (1975～1985年)、及び熊本大学医学部産科婦人科学

表 1 対象患者の clinical profile (N=53)

	術後妊娠例 N=30	術後非妊娠例 N=23	合計 N=53
年 median 年齢 range	31.0 24~40	34.0 29~39	32.3 24~40
不妊期間	4年 0ヶ月	4年11ヶ月	4年 5ヶ月
経妊回数			
0	29	22	51
1	0	1	1
2	1	0	1
経産回数			
0	29	23	52
1	1	0	1
2	0	0	0
他の不妊因子			
(+)	12	17	29
(-)	18	6	24

教室 (1986~1989 年) において子宮筋腫核出術を施行した 53 例である。いずれも挙児希望を主訴として外来を受診し、男性因子、卵巣、卵管因子といった主要不妊因子を有しないかあるいは有しても軽度の症例、又は、卵巣因子のみを示すものに対してはこれを充分治療したにもかかわらず妊娠が成立しなかった症例である。このように筋腫核出術の適応とした症例では、幸い本術式を完遂できなかつたり、子宮全摘出術に移行しなければならなかった症例は全くなかった。一般的な症例を含めて、子宮筋腫であるかぎり、妊孕性を温存すべき症例で筋腫核出術ができない症例はまずないと考えている。子宮腺筋症の debulking や子宮形成術、卵管形成術、付属器周囲癒着剥離術などを主要術式として行ない、その際同時に子宮筋腫核出術を行なった症例は今回の対象から除外している。対象の年齢は、平均 32.3 歳 (24~40 歳) であり、その不妊期間は平均 4 年 5 ヶ月であった。妊娠分娩歴では、未妊婦 51 例、1 回妊婦、2 回妊婦がそれぞれ 1 例ずつみられ、このうち 2 例が流産を経験している。すなわち、対象 53 例中、既に子供を有している症例は 1 例のみである (表-1)。

術式は下腹部正中切開で行ない、十分に視野を確保し、再発予防の問題から触知し得る全ての筋腫核を摘出し、かつ正常の子宮構築成分は最大限に温存することを基本とした²⁾。縫合糸は全て組織反応性の少ない coated dextron 糸か vicryl 糸を用いており、すべての漿膜の欠損部は修復した。漿膜下筋腫で有

表 2 術前の筋腫子宮の大きさ別による術後妊娠率

		妊娠数/手術数	妊娠率
妊娠月数 で表現し た子宮の 大きさ	2	10/15	67
	3	12/26	44
	4	6/9	67
	5	1/2	50
	6	1/1	100
計		30/53	57

茎性のものでは、茎切断後漿膜を修復し、壁内筋腫では、子宮の長軸に平行な縦切開を加え筋腫核まで切りこみ、マーチン単鉤鉗子を用いたりして、Myom-kapsel と俗称される結合組織部分を鋭的にときに鈍的に切開剥離していった。広基性の粘膜下筋腫の場合には Jones 手術に準じて子宮内腔に到達して摘出した²⁾。このような筋腫核出術を行う場合には、Webster-Baldy や Alexander-Adams などの子宮位置矯正術を積極的に併用している。

結 果

1) 術後妊娠率：手術を施行した 53 例中、1989 年 6 月 30 日現在までに妊娠が成立した症例は 30 例であり、その妊娠率は 57 % であった (表-2)。妊娠例の平均手術時年齢は 31 歳であり、非妊娠例の 34 歳に対し若い。平均不妊期間は、妊娠例が 4 年、非妊娠例が 4 年 11 ヶ月であり、両者に差はみられなかった (表-1)。

2) 手術時の子宮の大きさと妊娠率：手術時の子宮の大きさを、妊娠月数による子宮の大きさと分類した場合の術後妊娠率を表-2 に示した。妊娠 2 ヶ月相当の大きさでは 67 % であったのに対し、3 ヶ月の大きさでは 46 % と低下し、さらに 4 ヶ月の大きさでは再び 67 % と上昇した。また、5、6 ヶ月相当の例は各々 2 例、1 例と少ないが、併せて 67 % の妊娠率であった。このように、術前筋腫子宮の大きさによって、術後の妊娠率に一定の傾向が見いだせる。すなわち筋腫子宮が大きいほど術後の妊娠率が低い、ということとはなかった。

3) 不妊期間と妊娠率：不妊期間を 3 年毎に分けた場合の妊娠率を図-1 に示した。3 年未満が 68 % (13/19 例) と最も高く、3~6 年 57 % (10/17 例)、6~9 年 33 % (5/15 例) であり、不妊期間が短いほどその後の妊娠率も高くなっているが、10 年、15 年の不妊期間の例でもそれぞれ 1 例ずつ妊娠しており、9~12 年 100 % (1/1 例)、12~15 年 100 % (1/1) という結果になった。

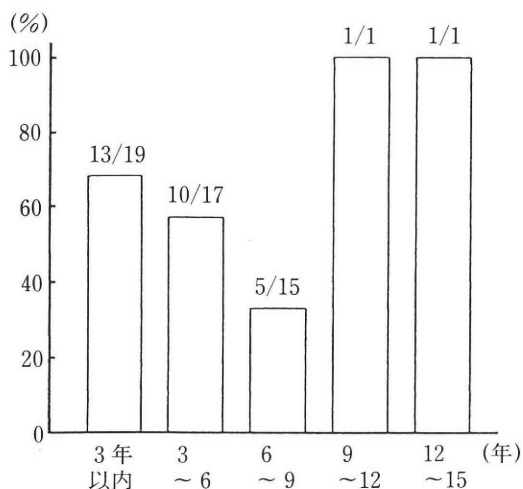


図 1 術後の不妊期間と術後の妊娠率

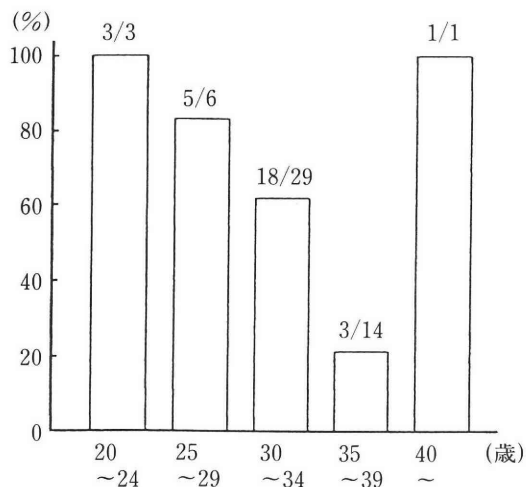


図 2 手術時施行時年齢と術後の妊娠率

4) 手術時の年齢と妊娠率: 手術時年齢の最年少は 24 歳, 最年長は 40 歳であったので, 年齢を 20 歳から 5 年毎に区分して各年代別の妊娠率を検討した (図-2)。20~24 歳が 100 % (3/3 例) と最も高く, 以下 25~29 歳 83 % (5/6 例), 30~34 歳 62 % (18/29 例), 35~39 歳 21 % (3/14 例) であり年齢と共に低下している。もっとも 40 歳の 1 例は妊娠しており, 40 歳以上 100 % (1/1 例) という結果であった。

5) 手術から妊娠成立までの期間: 手術から最低 3 ヶ月は待機期間をおき, 以後は必要に応じて妊娠成立のための補助療法を行なった。妊娠の成立をみた 30 例の手術から妊娠成立までの期間を図-3 に示し

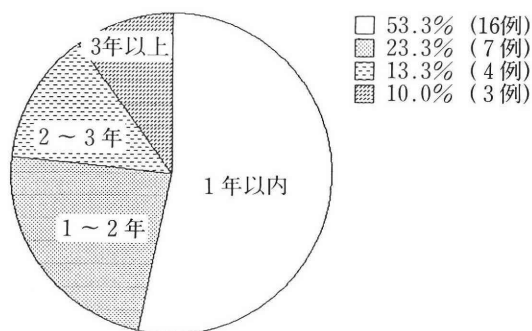


図 3 筋腫核出術から妊娠成立までの期間 (N=30)

た。最短で 3 ヶ月, 最長で 4 年 1 ヶ月であった。1 年以内の妊娠成立は 16 例 (53 %) と半数を超えており, 1~2 年で 7 例 (23 %), 2~3 年で 4 例 (13 %), 3 年以上では 3 例 (10 %) という結果であり, 2 年以内に全体の 77 % が妊娠している。

6) 筋腫の存在部位と妊娠率: 筋腫の存在部位を漿膜下, 筋層内, 粘膜下に分けて, 術後の妊娠率を検討した (表-3)。部位が重複する場合は, より大きな筋腫核が占める方をその部位とした。粘膜下筋腫の場合の妊娠率は, 83 % (5/6 例) であり, 筋層内で 54 % (14/26 例), 漿膜下で 52 % (11/21 例) であった。

7) 他の不妊因子: 他の不妊因子を除外した場合の妊娠率を表-4 に示した。男性因子, 卵巣, 卵管因子を明確に合併している症例を除外すると, その妊娠率は 62 % (24/39 例), 子宮内膜症を有する症例を除外すると, 66 % (25/38 例) となり, 全体の妊娠率, 57 % と比較して若干上昇してくる。さらに, PCO 症例で wedge resection を行なったり, 子宮後壁や付属器周囲の癒着に対する癒着剥離術を要した症例を除外した場合, すなわち, 子宮筋腫のみが明らかな病変と考えられる症例では 74 % (14/19 例) と妊娠率はより高くなっていく。

8) 妊娠の予後: 妊娠の成立をみた 30 例の妊娠の転帰を図-4 に示した。健児を得た症例は 21 例 (70 %) であり, そのうち 11 例が帝王切開による分娩で, 帝王切開率は 52 % であった。自然流産率は 20 % (6 例) であったが, このうち 2 例はその後再び妊娠が成立し分娩に至っている。他に, 現在妊娠継続中 1 例, 子宮外妊娠 1 例, 本人の事情により人工妊娠中絶を行なったものが 1 例あった。

考 案

子宮筋腫は, 生殖年齢婦人の約 20 % にみられ^{3,4)}婦

表 3 筋腫の存在部位別による術後の妊娠率

	漿膜下	筋層内	粘膜下
妊娠例数	11 (52%)	14 (54%)	5 (83%)
非妊娠例数	10	12	1
計	21	26	6

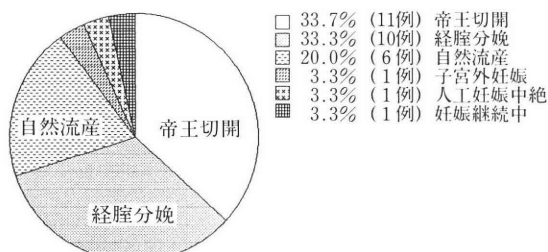


図 4 筋腫核出術後の妊娠例の転帰 (N=30)

人科におけるポピュラーな疾患といわれているが、これが妊娠成立に直接障害を及ぼすか否かについては論議も多く、明確にその妊孕性障害の機序が解明されているとは言い難い。臨床統計報告から、筋腫核出術後の妊娠率をみてみると、Buttram らが 1931~1981 年の期間を対象として review して集めた 1,202 例での妊娠率はおよそ 40 % であり、1970 年台以降の症例だけでは 50 % 前後となる³⁾。この成績は、婦人科手術へ microsurgery の技術や概念が導入されたことに伴うものと推察される。本邦の報告でも、杉本ら⁴⁾が 58 % (40 例中 23 例)、百瀬ら⁷⁾が 47 % (78 例中 37 例)、荒木ら⁸⁾が 70 % (10 例中 7 例) の妊娠率を報告している。今回、我々が 1975 年から 1989 年までの 14 年間に子宮筋腫核出術を施行した 53 例の成績でも、57 % (30 例) とほぼ同様の結果を示している。

手術施行時の子宮の大きさからみた結果では、大きさと術後の妊娠成功率との間に相関はみられず、妊娠 4 ヶ月相当子宮以上の大きさを示した 12 例だけをとりても、8 例 (67 %) が妊娠している。これは、筋腫核の大きさが大きくなると術後妊娠率が低下するとする Buttram らの報告⁴⁾とは、異なる結果であった。この原因として、今回の対象例では、大きい子宮筋腫核症例群に若年者が多く含まれていたことが関与していると考えられる。事実、今回の検討で、手術時の年齢が 30 歳未満の場合には 89 % (8/9 例) の妊娠率が得られており、年齢が術後妊娠率を左右するより大きな要因となっている。30 歳未満の女性に対し下腹部正中切開を施行することは、一般的に多少のためらいをもたらしものであろうが、今回の手術時年齢や手術までの不妊期間の解析結果から考えて、本手術はその適応さえ誤らなければ、早期に

表 4 他の不妊因子を除いた場合の術後の妊娠率

	妊娠率(%)	妊娠例/症例数
全症例	57	30/53
卵巣機能、男性因子	62	24/39
子宮内膜症	66	25/38
さらに adhesiolysis wedge resection 等の追加手術を要したもの	74	14/19

決断され積極的に施行されるべきであろう。

術後から妊娠までの期間をみると 2 年以内が 77 % であり、筋腫の再発の可能性も考慮すると、2~3 ヶ月の待機期間の後には比較的早期から、排卵調整、黄体機能賦活・補充などを含めた積極的な治療を行なって、妊娠成立へ向って努力するべきであると考ええる。

筋腫の存在部位によって術後妊娠率の相違をみると、粘膜下筋腫の場合に最も術後成績が良好であるが、これは着床障害といった面を考えると当然であろう。筋層内さらに漿膜下でも妊娠率 50 % という成績が得られていることは、粘膜下、筋層内筋腫に加えて、漿膜下筋腫を摘出することも妊孕性の向上につながると考えられる。子宮筋腫が妊孕性に影響を及ぼす要因の一つとして、女性性管内における精子の移送障害があげられているが、これは、筋腫の存在が、精子移送に関与すると考えられる子宮筋や卵管の収縮運動に障害を与えたり、さらに、子宮腔の拡大や歪み、卵管の偽閉塞や延長を生じさせる結果として解釈されよう。また、筋腫の存在自体が子宮内膜の変性や内分泌環境の障害を起こし、着床障害の原因にもなるとも考えられている⁹⁾。これらの事象は、粘膜下並びに筋層内筋腫と同様に、漿膜下筋腫でも少なからず起こっているものと推測され、これに加えて漿膜下筋腫の場合には隣接臓器との癒着や、圧迫による卵管の偽閉塞等の原因にもなり得よう。

今回の対象には不妊因子として近年特に注目されている子宮内膜症が、15 例に合併している。その重症度は、軽症 9 例、中等症 6 例であったが、これらを除外した場合の術後妊娠率は 66 % と上昇しており、本術式の適応を決定する際に腹腔鏡検査も含めた子宮内膜症のための十分な検査を行ない、その診断がつけば子宮内膜症に対する術前治療の併用も必要になってこよう。さらに、癒着剥離術、wedge resection、子宮内膜症の coagulation などの併用術式を要した症例を除外し純粋な筋腫核出術のみを対象とした場

合、術後の妊娠率は74% (14/19例)の高率となる。不妊の原因が他に見当らず、筋腫のみが存在するケースでは、より積極的に核出術を施行すべきであることを示唆する結果であろう。

手術を行なう際に確認しておくべき重要な点としては、筋腫核と卵管並びに子宮内膜との位置関係であろう。従来から、HSG、超音波断層法、子宮鏡を用いてその解明に努めてきたが、さらに最近では、軟部組織の描出、位置関係の同定に優れているMRI (magnetic resonance imaging) をも加えて¹⁰⁾、特に子宮内腔との関係を術前明確にしておくようにしている。

本手術を行なう際には、その妊娠性を高める目的で、子宮位置矯正術〈Webster-Baldy; Alexander-Adams; Menge-Latzko; Gilliam等〉を追加することを常に行っている。更に、手術後の癒着の発生は不妊の原因となり得ることが指摘されており^{1,11)}、これを防止する意味で、既述の追加術式に加えて、microsurgeryの概念を常に念頭においた愛護的な手術操作すなわち完全な止血、微温生理食塩水による内性器の術中 irrigation と閉腹前の充分な洗浄、さらに加えて、我々は、8%デキストラン70溶液100~150 mlの腹腔内投与を積極的に使用している。その詳細についてはretrospectiveに8年間、prospective random trialに4年間を費やして充分な症例を経験したのでいづれ報告する予定である。

本手術後に妊娠した場合の術後流産率は、20% (6/30例)であった。他の報告では、28~33%の流産率がみられるが^{7,8)}、我々の今回の成績ではこれより若干低くなっており、また一般にみられる自然流産率とそれほど差はなく、筋腫核出術そのものの影響よりはむしろ不妊の既往や高齢などの因子が流産率の上昇と関与していると考えている。

術後の分娩様式では、帝王切開が52%とやはり高率であった。高齢、長期の不妊期間、precious babyなどその患者背景を考慮すれば当然のことといえよう。しかし、本手術の術後という理由だけで、帝王切開の適応と考えてならないのは当然であり、今回11例の帝王切開のうち、前置胎盤、CPDなど純然たる産科的適応が7例あった。

以上、子宮筋腫を有する不妊婦人における筋腫核出術の術後妊娠率からみた成績について報告した。細心の注意を払って愛護的な手術を心掛ければ、本術式によって不妊症治療成績としては最も良い部類に属すると思われる。治療後60%近くの妊娠率が期待できる。

謝辞：本論文の対象患者の多くは、senior authorの京都大学在籍中の症例であり、その間御指導頂いた故西村敏雄教授、故東條伸平教授、ならびに森崇英教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 岡村 均, 川村直行, 森 崇英: 子宮筋腫, 不妊診療指針(杉本 修, 森 崇英監修), 同朋舎出版, 51, 1987
- 2) Garcia, C. R. and Tureck, R. W.: Submucosal leiomyomas and infertility, *Fertil. Steril.*, 42; 16, 1984
- 3) Novak, E. R., Woodruff, J. D.: Myoma and other benign tumors of the uterus, *Gynecologic and Obstetric Pathology*, Eighth Edition, 260, W. B. Saunders Co., 1979
- 4) Buttram, Jr. V. C., Reiter, R. C.: Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management, *Fertil. Steril.*, 36: 433 1981
- 5) Buttram, V. C. Jr. and Reiter, R. C.: Uterine leiomyomata, *Surgical Treatment of the infertile female*, 201, Williams & Wilkins, 1985
- 6) 杉本 修: 子宮筋腫摘除術, 産科と婦人科, 44; 247, 1977
- 7) 百瀬和夫, 小島栄吉, 小林信一, 篠原礼子: 不妊症における子宮筋腫—診断と対策—, 産婦実録, 33: 727, 1984
- 8) 荒木芳美, 吉野和男, 内田昭弘, 草刈万寿夫, 高橋健太郎, 北尾 学: 不妊症における子宮筋腫と核出術後の妊娠に関する研究, 日不妊会誌, 33: 88, 1988
- 9) Hunt, J. E. and Wallach, E. E.: Uterine factors in infertility—an overview, *Clin. Obstet. Gynecol.*, 17; 44, 1974
- 10) Christine-M. Dudiak, et al.: Uterine leiomyomas in the infertile patient: preoperative localization with MR Imaging versus US and hysterosalpingography, *Radiology*, 167: 627, 1988
- 11) Berkeley, A. S. et al.: Abdominal myomectomy and subsequent fertility, *Surg. Gynecology Obstetrics*, 156: 319, 1983

Reproductive outcome after myomectomy in infertile women

Hitoshi Okamura, Naoki Nakamura
and Kohei Matsuura

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kumamoto University Medical School,
Kumamoto 860, Japan

Clinical outcome after myomectomy in 53 infertile women during 14 years from 1975 to 1989 was

summarized as follows.

In 30 out of 57 cases, pregnancy was achieved after myomectomy. Conception rate was 57%.

Sixteen (53%) out of 30 pregnancies occurred in the first year after myomectomy, and 7 (23%) in the second year. Twenty three pregnancies (77%) were achieved in 2 years after the operation.

No correlation was observed between the preoperative uterine size and the postoperative conception rate.

Conception rate in cases of submucous myoma was 83% (5/6), 54% (14/26) in the intramural type, and 52% (11/21) in the subserous type.

Conception rate in patients under 30 years old

was 89% (8/9), 62% (18/29) between 30 and 34, 27% (4/15) over 35. The patient age is a prognostic factor for the successful outcome after the operation.

Six out of 30 pregnancies turned into spontaneous abortion (20%), 21 full term delivery (70%), and 11 out of 21 underwent cesarean section (52%).

The present data indicated that myomectomy could be performed with 60% of postoperative conception rate for the infertile women without other infertile factors who have not conceived in spite of intensive treatment for infertility.

(受付: 1989 年 8 月 30 日)

不妊症と Chlamydia trachomatis 感染

Infertility and Chlamydial Infection

順天堂大学医学部産婦人科学教室

武内 裕之	岩佐 剛	宇津野 栄
Hiroyuki TAKEUCHI	Takeshi IWASA	Sakae UTSUNO
伊藤 哲	石川 克美	福田 勝
Satoshi ITO	Katsumi ISHIKAWA	Masaru FUKUDA
久保田 武美	高田 道夫	
Takeyoshi KUBOTA	Michio TAKADA	

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

不妊症患者 117 例に HSG を施行し、血清抗クラミジア IgA, IgG 抗体価の測定および子宮頸管のクラミジア抗原の検索を行った。

HSG 正常群 68 例中 IgA 陽性は 3 例 4.4%, IgG 陽性は 19 例 27.9% であった。HSG 異常群 49 例中 IgA, IgG 陽性例は、それぞれ 17 例 34.7%, 26 例 53.1% であった。IgA, IgG 陽性率はともに HSG 異常群において HSG 正常群よりも有意に高かった ($p < 0.001$)。また、HSG 異常群においては、IgA, IgG 抗体価とも HSG 正常群よりも高い傾向を認めた。子宮頸管からの *C. trachomatis* 抗原が検出されたのは 6 例 (5.1%) のみで、HSG 所見との間に相関は見られなかった。

腹腔鏡を施行した 16 例において、腹腔内から *C. trachomatis* が検出されたのは 1 例のみであった。

HSG 所見と血清 IgA, IgG 抗体価の関係を検討すると、卵管の障害を推定する場合には IgA のほうが IgG よりも有用であるということが考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 415-419, 1990)

緒 言

近年産婦人科領域においても chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) 感染症が注目されてきており、STD のひとつとして子宮頸管炎、骨盤内感染症の原因となったり、周産期においては新生児の産道内感染をひきおこしたりすることが報告されている¹⁻⁵⁾。また、卵管への上行感染により器質的な障害をもたらし、卵管周囲の癒着や卵管の閉塞などを残し、卵管性不妊の発生原因になりうるということも認識されてきた⁶⁻⁸⁾。このような現状において、今まで困難であった *C. trachomatis* 感染の診断も、各種の検査法の開発により比較的容易になり、その感染の実態

が次第に明らかになってきた。

当教室では、妊婦や婦人科外来患者の *C. trachomatis* 感染の状況を報告してきたが⁹⁻¹³⁾、今回不妊症との関係をみるため不妊患者における子宮頸管ならびに骨盤内の *C. trachomatis* 抗原の検索ならびに血清抗クラミジア抗体価の測定を行ったので報告する。

対象と方法

1. 当教室不妊外来受診中の患者で、hysterosalpingography (HSG) を行った 117 例を対象とし、HSG 施行の前に採血するとともに swab で子宮頸管を擦過した。また、99 例の妊婦を control 群とした。

2. HSG には、油性造影剤の Lipiodol Ultra

Fluid を使用し、透視モニター下で観察し翌日 2 回目の撮影を行った。読影は不妊外来担当医が行い、卵管の癒着、狭窄、閉塞など何らかの障害が疑われる HSG 異常群 49 例と異常所見を認めない HSG 正常群 68 例に分類した。異常群 16 例に対しては腹腔鏡を施行し、卵管采部および腹水中より *C. trachomatis* 抗原の検出を試みた。

3. 子宮頸管、腹腔内からの *C. trachomatis* 抗原検索には、EIA 法である chlamydiazyme (C.Z: Abbott, ダイナボット社) を用いた。

4. 血清クラミジア IgG, IgA 抗体の測定は、*C. trachomatis* L₂ 株の細胞内封入体を抗原とした間接ペルオキシダーゼ抗体法による Ipazyme Chlamydia

キット (IPA, Savyon Diagnostics, 東進ケミカル) を使用した。患者血清を各々 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 に希釈し、1:16, 1:32 希釈血清で IgA を、1:64, 1:128 希釈血清で IgG を測定した。青色フィルター付き光学顕微鏡で鏡検し、感染細胞中のクラミジア封入体が青染した場合を陽性とし、青染が見られなかった場合を陰性とした。IgA に関しては希釈倍率 16 倍以上を、IgG に関しては 64 倍以上をそれぞれ陽性とした。

結 果

表 1 は、HSG 正常群、異常群、妊婦群における血清クラミジア抗体性陽性率を示したものである。HSG 異常群では IgA 陽性率が 34.7% で、IgG 陽性率は 53.1% であり、HSG 正常群では各々 4.4%, 27.9% で、妊婦群では各々 10.1%, 22.2% であった。HSG 異常群では IgA, IgG 陽性率ともに他の 2 群に比べ有意 ($P < 0.001$) に高かった。HSG 正常群では、IgA, IgG 陽性率ともに妊婦群と有意差を認めなかった。

図 1, 2 は HSG 正常群、異常群における血清抗クラミジア IgA, IgG 抗体価の頻度を示したもので、HSG 異常群では正常群に比較して IgA, IgG とともに高値をとる傾向がみられた。

表 1 不妊婦人及び対照婦人における抗クラミジア抗体価の比較

Group	No.	Chlamydial serology	
		IgA ≥ 16	IgG ≥ 64
Pregnant	99	10 (10.1%)	22 (22.2%)
HSG normal	68	3 (4.4%)	19 (27.9%)
HSG abnormal	49	17 (34.7%) ^a	26 (53.1%) ^a

a Compared with the pregnant group, the differences are statistically significant ($P < 0.001$)

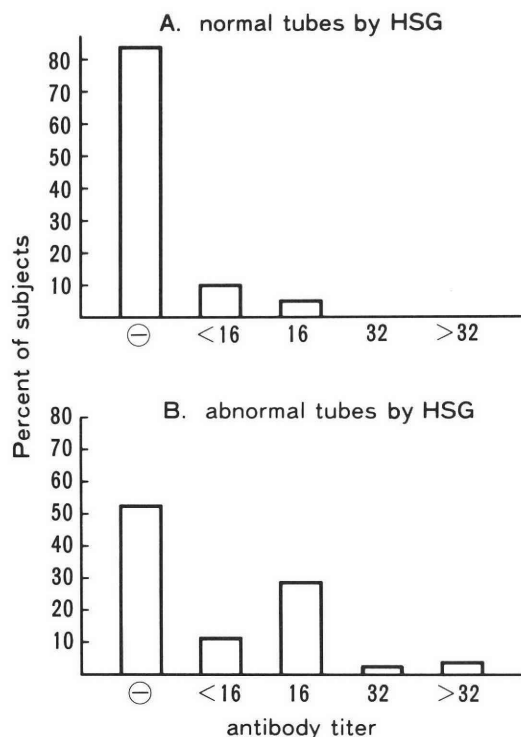


図 1 HSG 施行例における *C. trachomatis* 抗 IgA 抗体価の出現頻度

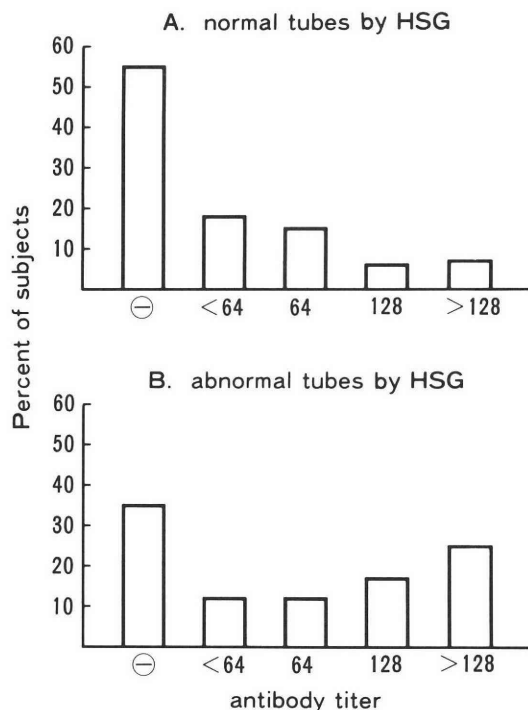


図 2 HSG 施行例における *C. trachomatis* の抗 IgG 抗体価の出現頻度

表 2 laparoscopy 施行群における HSG 所見および C. trachomatis の検出状況

	患者	年齢	不妊 期間 (年)	G-P ⁻	cervical c.z.	IPA		HSG	Laparoscopic finding			
						IgG	IgA			(卵管疎通性)		c.z.
										rt.	lt.	
1	K. U.	29	3	1-0	(-)	128 ↑	32 ↑	blt.PTA	blt.PTA	(+)	(-)	(+)
2	T. I.	32	1	0-0	(-)	128	16	lt.occ.	lt.PTA	(+)	(-)	(-)
3	J. T.	31	3	1-0	(-)	128 ↑	16	lt.PTA	lt.PTA	(+)	(+)	(-)
4	H. T.	28	8	1-0	(-)	128	16	lt.HS.rt.PTA	lt.HS,rt.PTA	(+)	(-)	(-)
5	I. B.	38	1	1-1	(-)	128 ↑	16	blt.PTA,occ.	blt.PTA	(+)	(-)	(-)
6	F. U.	38	4	3-1	(+)	128 ↑	16	blt.PTA,occ.	blt.PTA	(-)	(-)	(-)
7	T. S.	22	1	0-0	(+)	64	16	normal	normal,ascites(+)	(+)	(+)	(-)
8	U.M.	31	3	0-0	(+)	128 ↑	16	normal	normal,ascites(+)	(+)	(+)	(-)
9	K. A.	38	5	0-0	(-)	128	⊖	normal	Douglus adhesion	(+)	(+)	(-)
10	E. M.	30	3	0-0	(-)	128	⊖	lt.occ.	lt.PTA	(+)	(-)	(-)
11	K. Y.	30	5	1-0	(-)	64	⊖	normal	normal	(+)	(+)	(-)
12	M.M.	20	3	1-1	(-)	64	⊖	rt.PTA	normal	(+)	(+)	(-)
13	M.M.	28	4	0-0	(-)	64 ↓	⊖	blt.PTA	blt.PTA,endometriosis	(+)	(+)	(-)
14	N.M.	38	3	1-0	(-)	⊖	⊖	rt.occ,lt.PTA	endometriosis	(+)	(+)	(-)
15	R.M.	34	3	2-0	(-)	⊖	⊖	blt.PTA	normal		(+)	(-)
16	K. K.	34	2	0-0	(-)	⊖	⊖	blt.occ.	lt.PTA,endometriosis	(+)	(+)	(-)

表 3 chlamydiazyme の頸管陽性群における各種検査所見

	患者	年齢	不妊期間 (年)	G-P ⁻	IPA		H.S.G.	Laparoscopic finding	
					IgA	IgA			c.z.
1.	S. N.	38	1	2-1	128 ↑	16	blt. PTA	—	
2.	I. B.	23	1	0-0	128 ↑	16 ↓	rt. PTA, lt. occ.	—	
3.	F. U.	38	4	3-1	128	16	blt. PTA, occ	—	
4.	T. S.	22	1	0-0	64	16	normal	blt. PTA.	(-)
5.	U. M.	31	3	0-0	128 ↑	16	normal	normal	(-)
6.	M. K.	26	2	1-0	64 ↓	⊖	normal	normal	(-)

表 4 抗クラミジア IgA, IgG 抗体各々の陽性例からみた HSG 所見

Group	No.	No. of abnormal HSG
IgA ≥ 16	20 (IgG ≥ 64 20)	17 (85.0%)
IgG ≥ 64 and IgA < 16	25	9 (36.0%) P < 0.001

表 2 は腹腔鏡を施行した 16 例についてみたもので、HSG とほぼ同様の所見が腹腔鏡でも認められた。HSG で卵管の癒着や閉塞がみられるにもかかわらず、血清抗クラミジア抗体価が低値を示す者の中には、腹腔鏡下で endometriosis が認められることもあった。16 例のうち腹腔内からの検体で chlamydiazyme が

陽性を示したのは 1 例のみであった。なお、16 例のうち腹腔鏡と HSG の所見が一致したのは、卵管疎通性では 12 例 75.0 %、卵管周囲癒着では 11 例 68.8 % であった。

表 3 は、子宮頸管からの検体で chlamydiazyme が陽性であった 6 例を示したものである。これらの例では、血清抗クラミジア抗体価は IgA, IgG ともに高値を示す傾向にあったが、HSG で異常を認めたのは半数のみであった。

表 4 は、血清抗クラミジア IgA, IgG 抗体それぞれの意義を知るために、各々の陽性例について、検討したものである。IgA 陽性の 20 例においては、全例が IgG も陽性を示し、17 例 85.0 % に HSG 異常を認めた。一方 IgG 陽性でかつ IgA 陰性の 25 例において、HSG に異常を認めたのは 9 例 36.0 % であった。両

群の間には $P < 0.01$ で有意差を認めた。これらの結果は、血清抗クラミジア抗体価により卵管の障害を推定する場合、IgA 抗体価のほうが IgG 抗体価より相関性が高いことを示している。

考 察

不妊症患者の中で、卵管因子の占める割合は 25～50%といわれるほど高率で、その原因は多岐にわたっている^{14,15)}。今回我々は、卵管性不妊における C. trachomatis 感染について検索を行った。HSG において異常所見を示す群では、HSG 正常群および正常妊婦群に比べ血清抗クラミジア抗体価が有意に高く、C. trachomatis 感染は卵管性不妊の大きな原因の一つになっていることが示唆された。また、C. trachomatis 感染は、女性の子宮頸管炎をひきおこし上行性に子宮内膜炎、卵管炎、PID (Pelvic inflammatory diseases) へと波及すると考えられている。当教室における成績¹⁶⁾でも、STD (Sexually transmitted diseases) の患者の子宮頸管から高率に C. trachomatis 抗原が検出されている。

しかしながら、今回の成績では HSG 異常を示す患者においては、血清抗クラミジア抗体価が高値であるにもかかわらず子宮頸管や腹腔内から C. trachomatis 抗原が検出される例は少なかった。Gabriel Anastad ら¹⁷⁾は、不妊婦人 105 例について検討した結果、血清抗クラミジア抗体価が高値を示すにもかかわらず、腹腔鏡検査および開腹時に卵管から検体を採取して、McCoy 細胞による培養を行ったところ、C. trachomatis の検出された例は皆無であったと報告している。

C. trachomatis は偏性細胞寄生性の微生物で、感染性のある直径約 300 nm の基本小体 (EB) が宿主細胞に付着し、細胞のファゴゾームに取り込まれ、やがて大型の網様体 (RB) となり、分裂増殖をし、再び EB が出現するという独特な増殖環をもち、増殖の場として細胞質内に特有の封入体を形成するが、C. trachomatis 自体は病原性が弱く、侵襲性も弱いので、生体の防御反応を受けにくく、持続感染を起こしやすいと言われている¹⁸⁾。このような特性により、いったん C. trachomatis 感染が成立しても時間の経過とともに細胞内に潜伏し感染局所表面からの C. trachomatis の検出が難しいのかもしれない。John W. Sellors ら¹⁹⁾は、卵管性不妊において、卵管の biopsy を Alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) 染色をしたところ卵管上皮内に C. trachomatis が証明されたと報告している。

Ipazyme による血清抗クラミジア抗体の評価につ

いて、Sarov らは、IgG が 64 倍以上かつ IgA が 16 倍以上の例、IgA が陰性でも IgG が 128 倍以上あるものを活動性感染と判定している²⁰⁾。IgA、IgG 抗体価を別個に評価した我々の成績では、IgA 16 倍以上の例は全例が IgG 64 倍以上で、高率に HSG 異常が認められた。一方、IgA が陰性で IgG が 64 倍以上の例では HSG 異常を認めることは少なかった。このことから、Ipazyme による IgG は感染の既往を表し、IgA は感染の存在を示唆しているという推定も成り立つ。即ち、IgA が陽性を示す例は C. trachomatis の活動性感染というより、持続感染例であると考えのが妥当であろう。今後は、卵管性不妊の患者に対して、積極的に腹腔鏡検査を施行して検索を進めるとともに、開腹時に疑わしい病変を認めた場合にも、C. trachomatis 培養や Chlamydiazyme ばかりでなく、卵管や卵管周囲癒着組織の biopsy により C. trachomatis の潜伏を明らかにしていくことが、C. trachomatis 感染の実態を解明していくうえで重要であると考ええる。

文 献

- 1) Mardh, P. A., Ripa, K. T., Svensson, L., Westrom, L.: Chlamydia trachomatis in patients with acute salpingitis, N. Engl. J. Med., 296: 1377, 1977
- 2) Paavonen, J., Saikku, P., Uesterinen, E., Aho, K.: Chlamydia trachomatis in acute salpingitis, Br J. Vener Dis., 55: 203, 1979
- 3) Paavonen, J.: Chlamydia trachomatis in acute salpingitis, Am. J. Obstet. Gynecol., 138: 957, 1980
- 4) Schachter, J. and Saxon, E. M.: Chlamydial infections, Annu. Rev. Med., 32: 45, 1981
- 5) Harrison, H. R., English, M. G., Lee, C. K. et al.: Chlamydia trachomatis infant pneumonitis. Comparison with matched controls and other infant pneumonitis, N. Engl. J. Med., 293: 306, 1977
- 6) Sweet, R. L.: Chlamydial salpingitis and infertility, Fertil. Steril., 38: 530, 1982
- 7) Punnonen, R. et al.: Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence, Fertil. Steril., 31: 656, 1979
- 8) 岡田弘二, 保田仁介: 不妊症とクラミジア感染の既往, 産婦の実際, 36: 1, 1987
- 9) 高田道夫, 石川克美, 石 和久: Chlamydia trachomatis による PID, 産婦の実際, 36: 1, 1987
- 10) 久保田武美, 石川克美, 高田道夫: 産婦人科領域における Chlamydia trachomatis 抗原検索法としての EIA 法 (Chlamydiazyme) の意義について, 産婦の実際, 36: 5, 1987
- 11) 高田道夫, 石川克美, 石 和久: Chlamydia tra-

- chomatis による PID, 産婦の実際, 36: 7, 1987
- 12) 高田道夫, 石川克美: 産婦人科におけるクラミジア検査法の評価とコツ, 産婦の実際, 37: 3, 1988
 - 13) 石川克美, 久保田武美, 高田道夫: 妊婦の Chlamydia trachomatis 感染における各種検索法の比較検討成績, 日産婦誌, 40: 2, 1988
 - 14) Boyd, I.: Tubal sterility: patency tests and results, J. Obstet. Gynecol. Br. Commonw., 80: 142, 1973
 - 15) Philipsen, T. and Hansen, B. B.: Comparative study of hysterosalpingography and laparoscopy in infertile patients, Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 60: 149, 1981
 - 16) 高田道夫: 最近の Sexually Transmitted Diseases(STD)の動向, 日産婦誌, 38: 3, 1986
 - 17) Gabriel-Anestand, Ottar-Lunde, D. et al.: Infertility and chlamydial infection, Fertil. Steril., 48: 5, 1987
 - 18) 熊本悦明, 橋爪 壯: クラミジア感染症の基礎と臨床, 1, 金原出版, 1988
 - 19) Sellors, J. W., Mahony, J. B. et al.: Tubal factor infertility: an association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis, Fertil. Steril., 1988
 - 20) Piura, B., Sarov, B. et al.: Serum IgG and IgA antibodies specific for C. trachomatis in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay, Eur. J. Epidemiol., 1: 110, 1985

Infertility and Chlamydial infection

Hiroyuki Takeuchi, Takeshi Iwasa,
Sakae Utsuno, Satoshi Ito,

Katsumi Ishikawa, Masaru Fukuda,
Takeyosi Kubota and Michio Takada

Department of Obstetrics and Gynecology,
Juntendo University School of Medicine,
Tokyo 103, Japan

The purpose of this study is to define the relation between infertility and chlamydial infection. HSG (hysterosalpingography) was performed on 117 infertile patients. Serum IgA, IgG antibodies and antigen in the cervical canal were determined at the same time.

In 68 patients of the HSG normal group, 3 patients (4.4%) were IgA positive and 19 patients (27.9%) were IgG positive. In 49 patients of the HSG abnormal group, 17 patients (34.7%) were IgA positive and 26 patients (53.1%) were IgG positive. Both the IgA and IgG positive rates were significantly higher in the HSG abnormal group than in the HSG normal group ($p < 0.001$). In addition, the HSG abnormal group showed tendency to have higher IgA and IgG antibody titers.

C. trachomatis antigen was detected only 6 patients (5.1%) in the cervical canal and showed no correlation with the HSG findings.

Of the 16 patients which underwent laparoscopy, only one patient had C. trachomatis antigen in the abdominal cavity. An investigation of relationships between the HSG findings and serum IgA and IgG antibody titers suggested that IgA was more useful than IgG as an indicator of tubal disorders.

(受付: 1989年2月17日)

不妊症夫婦における妊娠例の統計的解析

Statistical Analysis of Pregnant Cases in Infertile Couples

京都府立医科大学産婦人科学教室

大野 洋介	田村 秀子	田村 尚也
Yohsuke OHNO	Hideko TAMURA	Takaya TAMURA
福岡 正晃	細田 修司	北脇 城
Masaaki FUKUOKA	Syuji HOSODA	Jo KITAWAKI
井上 滋夫	岡田 弘二	
Yosio INOUE	Hiroji OKADA	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine,
Kyoto 602, Japan

昭和62年4月から平成元年3月までの2年間に不妊原因別に分類された患者415名中の妊娠成立は105例(妊娠率25.3%)であった。全体の不妊原因では排卵障害(35.9%)がもっとも多く、以下男性因子(27.7%)、卵管因子(20.0%)、子宮内膜症(8.7%)、頸管因子(4.8%)、子宮因子(4.1%)の順であった。続発性不妊では卵管因子が増加し、男性因子や子宮内膜症のしめる割合が減少していた。排卵障害における妊娠率は39.6%ともっとも高く、ほとんどの症例が排卵誘発剤またはプロモクリプチン投与周期に妊娠した。男性因子における妊娠率は全体で7.8%ときわめて低く、さらに原発性不妊に限ればその妊娠率は5.6%と最低値であった。また男性因子妊娠例には男性因子にたいする治療法によらない妊娠成立が多かった。卵管性不妊の妊娠率は全体で25.3%であったが、続発性不妊では原発性不妊の約半分の妊娠率しかえられなかった。治療内容では排卵誘発剤投与周期妊娠がもっとも多く、ついで自然妊娠例が28例であった。以下プロモクリプチン11例、人工授精9例、通水療法9例、配偶子卵管内移植3例、体外受精胚移植3例の妊娠がみられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 420-425, 1990)

はじめに

当科における不妊外来患者の登録および諸データの記録は従来不妊台帳によっておこなわれていた。しかしながら不妊台帳による患者記録の書き込み、読みだしは煩雑で時間も要することから、患者記録が不備になりがちであった。そこで昭和59年4月より試験的にマイクロコンピュータによる患者管理を導入し、逐次その使用法、おもに入力方法に改良をくわえていった。昭和62年4月からはデータの書き込み、読みだしが外来のデスクトップにて行なう

ことが可能となったことにより、不妊患者全例の記録がデータベース上に登録され、またその記録の読みだしも外来で瞬時におこなうことが可能となった。同時に統計的考察が容易におこなえるようにプログラムを作成し、約3カ月に一度診断別、治療法別に妊娠例の検討をおこなうことにより、外来での治療の指針としている。

不妊症患者に対する治療の目標は妊娠の成立、ならびに健康な子供を不妊症夫婦にもたらすことである。たとえば薬剤による排卵誘発効果、子宮内膜症、精液所見等の改善がみられても妊娠の成立がこれに

表1 不妊症例における診断分類

診断	症例数(%)	原発性不妊 症例数(%)	続発性不妊 症例数(%)
男性因子	115(27.7)	90(31.3)	25(19.8)
排卵障害	149(35.9)	103(35.8)	46(36.5)
卵管因子	83(20.0)	51(17.7)	32(25.4)
子宮内膜症	36(8.7)	29(10.1)	7(5.6)
子宮因子	17(4.1)	12(4.2)	5(4.0)
頸管因子	20(4.8)	15(5.2)	5(4.0)
その他	13(3.1)	9(3.1)	4(3.2)
原因不明	28(6.7)	17(5.9)	11(8.7)
総症例数	415(100.0)	289(100.0)	126(100.0)

伴わないかぎり、完全な治療にはならないし、たとえ妊娠が成立しても、流産すれば患者の挙児希望を満たしたことはないのである。そこで、われわれは今回、不妊統計をまとめるにあたって、妊娠例についてより詳細に検討することがもっとも重要ではないかと考えるにいたった。

対象と方法

患者管理に使用しているシステムのハードウェアはパーソナルコンピュータ(NEC, PC9801VM)に20メガバイトのハードディスク、カラーディスプレイ、漢字プリンターを接続したごく基本的なシステムで、使用ソフトウェアはリレーショナルデータベース、R: BASE5000(ピーコンシステム)、これに日本語入力フロントプロセッサとしてATOK 6(ジャストシステム)を使用している。不妊外来データベースの構造はガイドテーブルを中心とした構造をとっている。ガイドテーブルには患者コード、氏名、年令、カルテ番号、初診日、結婚年月日、産科歴といった患者の全体像が記録されている。一般不妊検査項目としての、精液検査、性交後検査、子宮卵管造影検査、超音波通水検査^{1,2)}、内分泌検査はそれぞれ独立したテーブルを形成し、患者のデータは各テーブルに患者コードとともに格納されている。診断の決定により診断テーブルには患者の診断名が、さらに治療、投薬内容は治療テーブルに日付とともに記録される。各項目はできるだけコード化し、入力の簡素化をはかるとともに、このコード化は統計処理にもきわめて有用となっている。最後に妊娠テーブルが用意され妊娠例の最終月経、治療内容、妊娠経過の記録が入力されている。今回のデータ処理は全登録患者694名のうちで、昭和62年4月1日から平成元年3月31日までの間に受診し、かつ不妊一般検査を終了している患者424名を選択し、習慣流産

表2 診断分類別妊娠例数および妊娠率

診断	妊娠例数	原発性不妊	続発性不妊
男性因子	9((7.8)	5 (5.6)	4 (12.1)
排卵障害	59((39.6)	39 (37.9)	20 (43.5)
卵管因子	21((25.3)	16 (31.4)	5 (15.6)
子宮内膜症	7((19.4)	6 (20.7)	1 (14.3)
子宮因子	5((29.4)	4 (33.3)	1 (20.0)
頸管因子	4((20.0)	4 (26.7)	0 (0.0)
その他	4((30.8)	2 (22.2)	2 (50.0)
原因不明	6((21.4)	4 (23.5)	2 (18.2)
総妊娠例数	105 25.3	71 24.6	34 27.0

()は診断別に妊娠例数/診断例数をあらわす(%)。

| |は妊娠例数/症例数をあらわす(%)。

9名を除外した415名を検討対象とした。この2年間に妊娠成立をみた患者の総数は130名で、上記の条件を満たす検討症例における妊娠例はのべ105名であった。この105名の妊娠例を中心に検討をくわえた。

成 績

表1に検討症例415名における診断分類を示した。全体の不妊原因では排卵障害がもっとも多く、男性因子がこれについて多かった。原発性不妊289例と続発性不妊126例について個々に不妊原因をみると、続発性不妊症では排卵障害について卵管因子が第2位の不妊原因であった。すなわち原発性と続発性を比較すると、続発性不妊症では卵管因子の占める割合が増加し、男性因子や子宮内膜症の占める割合が減少していた。このことは逆に男性因子や子宮内膜症による不妊症患者の妊娠がきわめて困難であること、また流産、子宮外妊娠や妊娠中絶に伴う卵管性不妊の増加をあらわしている。表2は診断分類別の妊娠率で、排卵障害における妊娠率が全体で約40%ともっとも高く、原発性、続発性不妊についても同様にその妊娠率が高い。男性因子における妊娠率は全体で8%ときわめて低く、原発性不妊ではさらにその妊娠率は5.6%と、他の不妊原因の妊娠率がすべて20%以上であるのに比べてきわめて低かった。一方、続発性不妊での男性因子の妊娠率が原発性不妊のその約2倍みられたことは興味深い。卵管性不妊の妊娠率は全体で約25%で、原発性不妊でみると31%と、その妊娠率は良好であった。これは卵管不妊には片側卵管通過例も含まれていること、また配偶子操作による妊娠成立例が含まれていることによる。一方、続発性不妊での卵管性不妊の妊娠率は原発性不妊の約半分であった。続発性不妊の卵管因

表 3 妊娠例の治療内容

1. 無治療	28 (26.7%)
2. HMG-HCG	25 (23.1%)
3. クロミフェン	14 (13.3%)
4. クロミフェン-デキサメサゾン	12 (11.4%)
5. プロモクリプチン	11 (10.2%)
6. 通水療法	9 (8.3%)
7. 人工授精	9 (8.3%)
8. 配偶子卵管内移植	3 (2.8%)
9. 体外受精胚移植	3 (2.8%)
10. LH-RH アナログ	2 (1.9%)
11. グナゾール	2 (1.9%)
12. 配偶者抗生物質投与	1 (0.9%)
13. 腹腔鏡下卵巣楔状切除	1 (0.9%)

昭和62年4月1日から平成元年3月31日までの2年間に妊娠の成立した130例のうち、診断分類された患者のうちで妊娠の成立した105例の治療内訳を示す。治療法には複数の治療法を併用している例がある。ただし排卵誘発剤使用例間(1~4)には重複例を含まない。1~9は妊娠成立周期の治療内容を、10~13は妊娠との関連があると考えられた治療内容を示した。

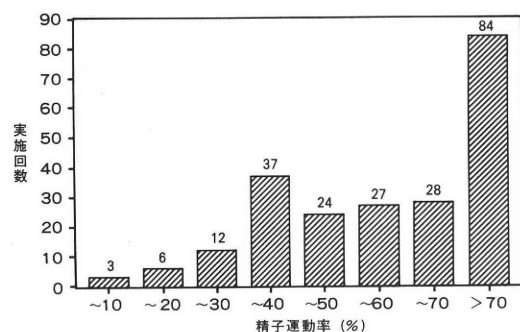
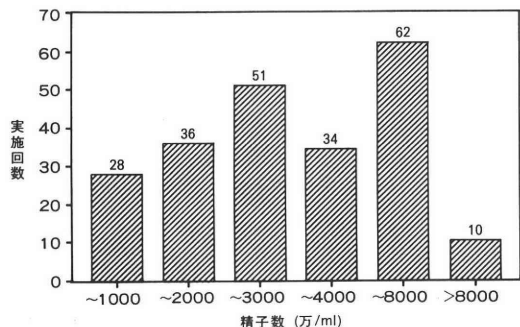


図1 AIH実施時の精子数、精子運動率

表 4 人工授精による妊娠例

精子数 /ml	運動率 (%)	精液調整 の有無	併用療法	流産の 有無
3400万	60%	無	HMG	
4600万	70%	無	通水療法	
3500万	70%	無	HMG	
8000万	90%	Swim Up	クロミフェン	
5800万	90%	Swim Up	HMG	流産
2500万	80%	無	クロミフェン	流産
9400万	70%	Swim Up	HMG	流産
1400万	40%	Swim Up	併用無し	
1700万	40%	無	HMG	

子症例には子宮外妊娠を含めて、なんらかの外科的処置を受けたものが多いことも理由のひとつと考えられた。これら妊娠例の治療法を表3に示した。排卵誘発剤による妊娠が46例と最も多く、排卵障害における妊娠率の高さをうらづける成績であった。プロモクリプチン投与による妊娠例も11例みられた。無治療妊娠群が28例、26.7%にみられた。このように不妊患者には当然自然妊娠にいたる症例があり、さらにこれらの症例が他院にて妊娠の診断を受けている場合もあると考えられることから、自然妊娠率はさらに高いと考えられる。無治療妊娠群における診断内訳は排卵障害8例、卵管因子8例、原因不明5例、男性因子3例、子宮内膜症、子宮筋腫、頸管因子、黄体機能不全の各1例であった。通水治療はのべ140周期に実施し9例が同周期に妊娠が成立した。妊娠例9例のうち3例は排卵誘発剤を併用していた。人工授精(AIH)は94例にたいして、のべ221回おこなわれ、9例が妊娠した。AIHは従来の無調整精液の子宮内注入法がのべ108回、5例の妊娠が成立、Swim up法による運動精子子宮内注入法がのべ113回、4例の妊娠が成立した。AIH実施時の精子数および精子運動率の分布を図1に示した。このようにAIH実施例に男性因子がその適応となっているものは少なかった。AIH妊娠成立例の内訳をみると男性因子によるAIHによる妊娠と考えられる症例はわずかに2例で、また9例中8例が妊娠周期に他の治療法を併用していた(表4)。配偶子卵管内移植は18例に23回実施し、その妊娠率は対症例数で17%、対実施回数で13%であった³⁾。体外受精胚移植法は昭和63年12月から平成元年3月の間に21例にたいしてのべ24回実施し、3例に妊娠が成立した。胚移植周期は12周期で、対胚移植周期数にたいする妊娠率は25%であった。子宮内膜症にたいする薬物療法後の妊娠は4例であった。これらの妊娠は薬物

表5 診断別および治療法別流産率

診断	流産/妊娠	流産率 (%)	治療	流産/妊娠	流産率 (%)
男性因子	2/ 9	22.2	無治療	4/28	14.3
排卵障害	12/59	20.3	排卵誘発剤	12/51	23.5
卵管因子	4/21	19.0	通水療法	2/9	22.2
子宮内膜症	1/ 7	14.3	AIH	3/9	33.3
子宮因子	1/ 5	20.0	GIFT	1/3	33.3
原因不明	1/ 6	16.6	IVF-ET	1/3	33.3
全流産症例数/全妊娠症例数 (20/105)			流産率 19.0%		

療法終了後の初回排卵にて3例が妊娠、2回目の排卵にて1例が妊娠した。妊娠例の妊娠経過は分娩55例、妊娠継続中30例、流産20例で流産率は19%であった。多胎妊娠は双胎が3例、品胎が1例で、品胎妊娠は流産にいたった。流産例の診断別、治療法別内訳をみると(表5)、診断別では絶対数として排卵障害例に12例と多いが、流産率では不妊原因によって明らかな相違を認めなかった。治療法別でも同様に排卵誘発剤によるものがその絶対数では多かった。流産率でみると、無治療群の流産率が14.3%と低く、AIH、GIFTやIVF-ETによる妊娠に流産率がやや高い傾向がみられた。

考 案

不妊症治療においては不妊原因の特定は重要ではあるが、実際には不妊原因の特定は困難なことが多い。今回はある程度その不妊原因の診断された症例についてのみ、妊娠例から統計的に検討をくわえた。

男性因子については精液量2ml以上、精子濃度2000万/ml以上、前進精子50%以上か、もしくは直進高速精子25%以上の条件を満たすものを正常精液所見とし、本所見に満たない精液検査回数が3回以上みられた症例を男性因子群とした。男性因子群における妊娠率は他の不妊因子群にくらべてきわめて低く、原発性不妊群ではその妊娠率は5.6%ともっとも低い値を示した。男性因子にたいする治療法には薬物療法^{4,5,6)}、AIH、GIFT、IVF-ETなどがあげられるが、いずれもその妊娠率は低く、AIHによる妊娠成立はわずかに2例で、さらにGIFT、IVF-ETによる妊娠例は1例もなかった。男性因子の妊娠についてさらに詳しく検討すると自然妊娠成立例が3例、女性側の排卵誘発併用周期妊娠が5例と、そのほとんどが男性因子に対する治療法によるものでなかった。また続発性不妊群での妊娠率が原発性不妊群の約2倍であることなどから、精子数や運動率から男性因子を診断するだけではその妊孕力を正確には推

定することが難しいのではないかと考えられた。

排卵障害は不妊原因のなかでもっとも多かったが、他の不妊因子との合併も、またもっとも多い疾患である。排卵障害の中には稀発月経から無月経にいたるさまざまな病態が存在し、その原因も多岐にわたっており、これらをひとまとめにして、その妊娠率を論ずることには無理がある。しかしながら排卵障害例ではその妊娠率は約40%と高く、また他の因子に比べて短期間の治療で妊娠成立をみる例が多いこともまた事実である。さらに無月経群における妊娠率は54%と高く、稀発月経群における妊娠率38%をうわまわっていた。無月経例では治療を受けるまではほとんど妊娠する可能性はないが、稀発月経群では受診までに妊娠の可能性は十分にあり、なおかつ妊娠しないということで受診することになる。すなわち稀発月経群では治療を開始しながら、他の不妊因子の検索も十分におこなう必要があると考えられた。排卵障害妊娠例の治療内容も自然妊娠例の8例、卵巣楔状切除術後の1例、通水療法の1例を除き、全例が妊娠周期に排卵誘発剤またはプロモクリプチンの投与をうけていた。さらに3例が通水療法、4例がAIHを併用療法としていた。

卵管因子の診断はきわめて困難で従来はおもに子宮卵管造影によっていたが、本統計からは腹腔鏡による診断例がかなりの数をしめている。昭和61年度の不妊統計では卵管因子は11%であったものが、今回は20%をしめるいたった。この増加がほんとうに卵管因子の増加なのか、診断技術の向上によるものかは定かではないが、両要素ともに関連していると考えられる。続発性不妊では第2位の不妊原因として約25%をしめている。また続発性不妊での卵管因子妊娠率は原発性不妊におけるそれと比べると約1/2であった。卵管因子による不妊症もその程度は患者間で大きく異なる。続発性不妊における卵管因子不妊の妊娠率の低下は、これらの患者では以前に流産、中絶といった子宮内操作や、子宮外妊娠などに

よる外科的操作のくえられた症例が多いことによると考えられる。卵管因子妊娠例の治療内容では無治療妊娠が 8 例 (38 %) ともっとも多く、原因不明の 83 % にはいたらないものの、診断分類された疾患のなかではもっとも高い自然妊娠率を示した。通水療法による妊娠が 6 例、IVF-ET による妊娠が 2 例、IVF-ET 排卵誘発キャンセル周期の妊娠が 1 例、hMG-hCG 療法による多発排卵周期の妊娠が 5 例みられた。これは我々の施設では片側卵管が正常で対側に異常のみられる場合にも卵管性不妊の診断項目に分類していることによると考えられる。今後、卵管性不妊における妊娠率は IVF-ET の臨床応用によりさらに上昇していくとおもわれる。

子宮内膜症は全不妊患者の 8.7 % であった。子宮内膜症は全例、開腹または腹腔鏡による診断によって、子宮内膜症と不妊との関連は明確にされていないが、子宮内膜症における妊娠率が 19.4 % であること、自然妊娠は 1 例ときわめて少ないこと、続発性不妊における子宮内膜症患者の減少などが内膜症と不妊との強い関連性を疑わせる。妊娠例をみるとダナゾールや Gn-RH アナログによる妊娠例が 4 例ともっとも多く、GIFT による妊娠が 1 例、通水療法による妊娠が 1 例みられた。しかしながら薬物療法は投与期間が長期にわたること、妊娠の成立が確実でないことから今後は GIFT 等の配偶子操作による積極的な妊娠成立に対する治療法の選択が増加することが予測される。

原因不明不妊の妊娠例 6 例中 5 例が自然妊娠 (無治療) であった。のこる 1 例は通水療法に AIH を併用した周期に妊娠が成立した。抗精子抗体陽性不妊は 3 例で 1 例が IVF-ET により妊娠した。

AIH による妊娠例は 9 例あり、対症例あたり 9.6 %, 対実施周期では 4.1 % の妊娠率であった。この妊娠率を高いとするか、低いとするかは別にして、すくなくとも男性因子不妊に対する有効な治療法とは考えにくい結果となった⁷⁾。頸管因子群における妊娠例 4 例のうち 2 例が AIH による妊娠であることから、AIH は男性因子より頸管因子に有効ではないかと考えられた⁸⁾。また AIH による妊娠例のうち 7 例が排卵誘発剤を併用していた。排卵誘発剤の併用は AIH の成功率を高めることが報告されており⁹⁾、同様な成績となった。同時期に Swim up AIH と従来の AIH をおこなった結果では両方の妊娠率で差をみとめなかった。Swim up AIH の有用性^{7,10,11)}については今後さらに慎重に検討していく必要があると考えられた。

我々は不妊外来患者管理にリレーショナルデータ

ベース R: BASE5000 を使用し、外来にて患者データの入出力をおこなっている。R: BASE の特長はデータの削除、修正、加工が簡単に行なえ、データベースへのさまざまなアクセスを繰り返しても、既存データは安定的に独立して保存されること、そしてデータベースとしての柔軟性の高いことがあげられる。すなわちデータベースの構造を従来のデータを壊す事無く簡単に改良できる点が大きな特長のひとつである。またコマンドファイルの作成により定型的な処理が迅速かつ容易におこなえることも利点のひとつであり、我々も自作コマンドファイルを患者データの入出力処理にもちいている。この機能は複数の担当医が入出力をおこなう場合に不可欠な機能であると思われる。またリレーショナルデータベースでは独立したテーブルにデータを蓄積しうることから、投薬、治療内容のようにひとりの患者に頻繁に入力するデータと、子宮卵管造影検査のようにひとりにほぼ 1 回しかおこなわないような検査を効率よく管理することができる。現在では外来受診日予約システムを本システムにくえ、患者に好評をえている。

文 献

- 1) 大野洋介, 藤林秀子, 富岡 恵, 福岡正晃, 山元貴雄, 岡田弘二: 通水圧同時表示法を用いた超音波断層法による卵管機能評価の試み, 日不妊誌, 33: 27, 1988
- 2) 岡田弘二, 大野洋介: 超音波断層法による卵管疎通検査, 産婦治療, 58: 423, 1989
- 3) 大野洋介, 田村秀子, 福岡正晃, 北川一郎, 細田修司, 田村尚也, 井上滋夫, 内藤和郎, 古谷幸子, 岡田弘二: 当科における配偶子卵管内移植 (GIFT) 法の実績, 京府医大誌, 98: 577, 1989
- 4) 大野洋介, 玉舎輝彦, 岡田弘二: クロミフェンによる乏精子症の治療, 産と婦, 50: 1502, 1983
- 5) 玉舎輝彦, 大野洋介, 岡田弘二: Kallikrein の不妊症への試み, 日不妊誌, 30: 71, 1985
- 6) 玉舎輝彦, 大野洋介, 岡田弘二: 乏精子症の補中益気湯による治療と随証療法指針, 日不妊誌, 32: 385, 1987
- 7) Ho, P. C., Poon, I. M. L., Chan, S. Y. W. and Wang, C.: Intrauterine insemination is not useful in oligoasthenospermia, Fertil. Steril., 51: 182, 1982
- 8) Velde, E. R., Kooy, R. J. and Waterreus, J. J. H.: Intrauterine insemination of washed husband's spermatozoa: a control study, Fertil. Steril., 51: 182, 1989
- 9) Kemmann, E., Boher, M., Shelden, R., Fiascnaro, G. and Beardsley, L.: Active ovulation management increases the monthly probability of pregnancy occurrence in ovulatory women who

received intrauterine insemination, *Fertil. Steril.*, 48: 916, 1987

- 10) DiMarzo, S. J. and Rakoff, J. S.: Intrauterine insemination with husband's washed sperm, *Fertil. Steril.*, 46: 470, 1986
- 11) Byrd, W., Ackerman, G. E., Carr, B. R., Guzick D. S., McConnell, J. D. and Edman, C. D.: Treatment of refractory infertility by transcervical intrauterine insemination of washed spermatozoa, *Fertil. Steril.*, 48: 921, 1987

Statistical analysis of pregnant cases in infertile couples

Yohsuke Ohno, Hideko Tamura,
Takaya Tamura, Jo Kitawaki,
Masaaki Fukuoka, Syuji Hosoda,
Yosio Inoue and Hiroji Okada

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine,
Koyto 602, Japan

From April 1987 to March 1989, 415 infertile couples with otherwise normal infertility evalua-

tion (semen analysis, postcoital test, hormonal assay, hysterosalpingogram and laparoscopy) were studied. The causes of infertility were in the order ovulatory dysfunction (35.9%)>male factor (27.7%)>tubal factor (20.0%)>endometriosis (8.7%)>cervical factor (4.8%)>uterine factor (4.1%). Tubal factor was increased, and the male factor and endometriosis were decreased in couples with secondary infertility. The conception rate in ovarian dysfunction was the highest (39.6%) and the most patients had medication for ovulation induction in the pregnant cycle. Only 7.8% of women having male factor achieved pregnancy, and this conception rate in couples with primary infertility was decreased to 5.6%. In tubal factor, 25.3% was achieved pregnancy, and conception rate in couples with secondary infertility was approximately half of that in couples with primary infertility. The overall number of pregnant women was 105 and conception rate was 25.3%. Sixty two women achieving pregnant were treated by ovulation induction including bromocriptine. Intrauterine insemination brought 9 pregnancies. After intrauterine infusion, 9 women conceived. There were 3 pregnancies as a result of each IVF or GIFT.

(受付: 1989年7月20日)

Rokitansky-Küster-Hauser 症候群

10 例の検討

Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome-Observations on 10 Cases

筑波大学臨床医学系産科婦人科 (主任 岩佐寛和教授)

鍋 島 雄 一 本 部 正 樹 斎 藤 正 博
Yuichi NABESIMA Masaki MOTOBU Masahiro SAITOH
佐 々 木 純 一 目 崎 登
Junichi SASAKI Noboru MESAKI

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

Rokitansky-Küster-Hauser 症候群は、全腔欠損、痕跡的子宮を特徴とする症候群であるが、卵巣には異常を認めず、他にも種々の発生学的異常を伴う場合が多い。我々は、開院以来 11 年間に本症を 10 例経験したので、本症の病態について考察するとともに、その管理ならびに治療について検討した。

初診時の平均年齢は 19.0 歳であった。平均身長は 154.1 cm、体重は 57.1 kg とやや肥満傾向がみられた。染色体検査、基礎体温記録、腹腔鏡検査または試験開腹、泌尿器系造影検査、内分泌的検索等、本症の病態を確認するための諸検査を実施したが、必ずしも全例に施行しえなかったため、検索しえた限りの成績を示した。

治療としては、特に希望しない症例 6 例には今後の生活設計の指導をしたのみで経過を観察している。1 例は既婚ですでに性交を行っていた。残りの 3 例には非観血的造腔療法を施行し、協力的でなかった 1 例を除き 2 例には性交可能な腔管の形成に成功した。成功した 2 例および既婚の 1 例は性交を定期的に行っており、腔管は 5 cm 以上で障害を訴えていない。

1) 本症では生殖器以外にも種々の奇形を合併し、また従来正常とされてきた卵巣・卵管にも異常を認めることがある。

2) 造腔法としては、コルポスタットによる圧迫という保存的治療後に、実際に性交を行なわせることが最も有効な対応策であると考えられ、観血的造腔術の適応は慎重であるべきである。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (2), 426-432, 1990)

緒 言

性管分化異常症は、原発性無月経や遅発思春期の成因の約 33% を占めており、重要な疾患である¹⁾。それらの中でも Rokitansky-Küster-Hauser 症候群は先天性腔欠損症の大部分を占める疾患である。

我々は 11 年間に本症候群と考えられる症例を 10 例経験したので、その病態について検討した結果を報

告するとともに、治療法としては、あえて観血的な造腔術を行う必要はなく、患者の努力があれば、非観血的治療で十分目的を達しうることと認めたので報告する。

対象および方法

昭和 51 年 10 月から昭和 63 年 3 月の間に、筑波大学附属病院を原発性無月経を主訴として受診し、

表 1 各症例の臨床像

症例	初診時 年齢	身長 (cm)	体重 (kg)	核型	B B T	LH-RH 負荷試験	I V P	他の先天異常
1	16.9	143	46	46,XX	二相性	正常	下垂腎	無
2	21.3	161	55	46,XX	二相性	正常	正 常	鼠径ヘルニア
3	16.2	158	62	46,XX	二相性	正常	左腎・尿管の欠損	無
4	21.0	156	62	—	二相性	—	正 常	鎖肛・二分脊椎
5	19.2	142	44	46,XX	一相性	過剰反応	正 常	無
6	15.8	161	70	46,XX	二相性	正常	—	無
7	23.1	152	68	46,XX	二相性	過剰反応	正 常	無
8	16.1	160	63	—	一相性	正常	—	無
9	17.1	151	40	—	二相性	—	正 常	無
10	23.5	157	58	—	二相性	正常	—	無
平均	19.0	154.1	57.1					

(— は施行せず)

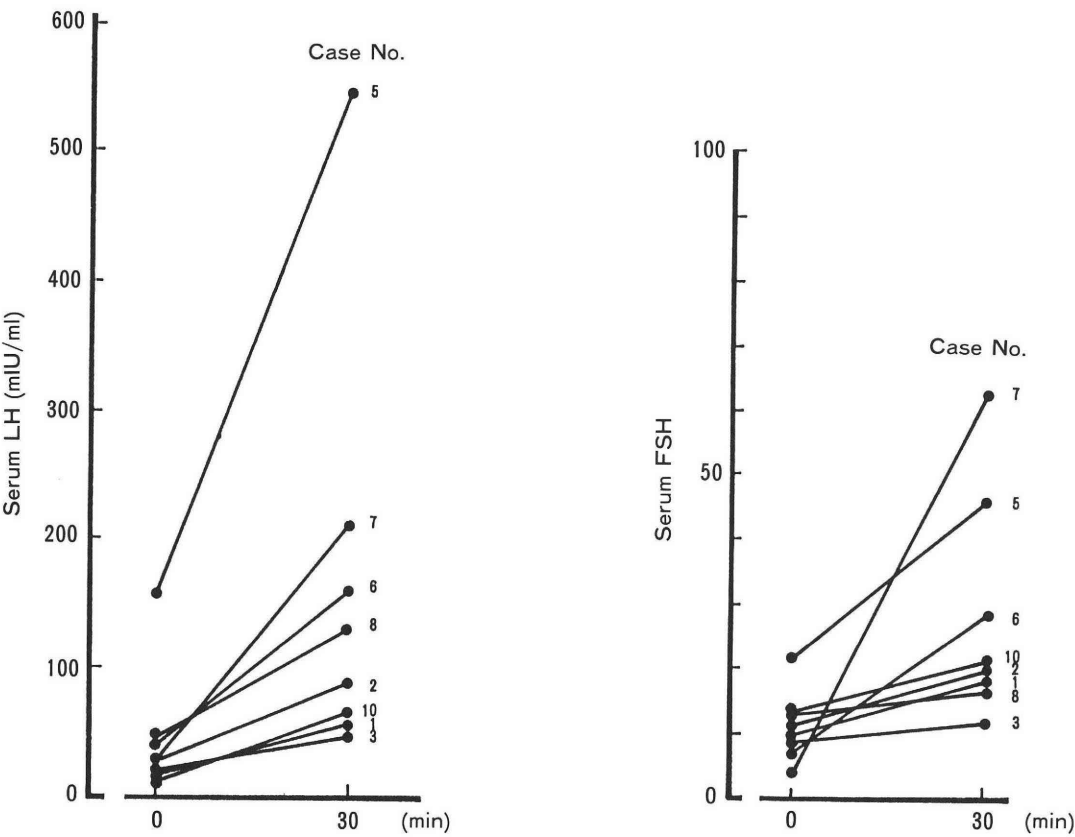


図 1 Serum LH and FSH Response to Intramuscular LH-RH (100μg) Injection

表 2 内分泌学的検査 (LH-RH 負荷試験を除く)

症例	prolactin (ng/ml)	estradiol (pg/ml)	progesterone (ng/ml)	testosterone (ng/ml)
1	13.0	127.0	8.5	0.4
2	—	—	—	—
3	—	156.0	—	0.7
4	15.0	109.0	—	1.2
5	13.0	—	—	—
6	13.0	130.0	—	0.7
7	—	—	—	—
8	32.0	22.0	0.7	0.9
9	—	—	—	—
10	15.0	24.0	0.4	0.7

(— は施行せず)

表 3 腹腔鏡所見

症例	子宮	卵 管	卵 巣
1	索状	正 常	正 常
2	索状	正 常	正 常
3	欠損	右正常・左欠損	正 常
4	索状	両側欠損	右正常・左欠損

Rokitansky-Küster-Hauser 症候群と診断された 10 例を対象として調査した。

全例について、2ヶ月間以上基礎体温 (BBT) を測定させた。染色体検査は 6 例に実施した。骨盤腹腔鏡検査は 4 例に対し、硬膜外麻酔下に Wolf 社製の骨盤腹腔鏡により施行した。経静脈的腎盂造影 (IVP) は 7 例に施行した。内分泌学的検査では、LH-RH 負荷試験を 8 例に施行し、他に血清中 prolactin, estradiol, progesterone, testosterone 濃度等を測定した。

治療については 7 例はそのまま経過観察中である。1 例はエストロゲン軟膏塗布および圧迫、他の 2 例には我々の作成したコルポスタットによる圧迫療法を施行した。

結 果

A. 臨床所見

各症例の臨床所見を表 1 に示す。

初診時の年齢は 16 歳から 23 歳であり、平均年齢は 19.0 歳であった。平均身長は 154.1 cm、体重は 57.1 kg とやや肥満傾向が認められた。

生殖器以外の先天異常としては、鼠径ヘルニアと左腎・尿管欠損の合併 1 例、鎖肛と二分脊椎の合併 1 例、鼠径ヘルニアの単独合併が 1 例であった。

B. 染色体検査

染色体検査は 6 例に実施し、全例 46 XX の正常女性型であった (表 1)。

C. 内分泌学的検査

BBT 所見では、8 例が 2 相性、2 例は 1 相性であった。

血清ホルモン検査では、LH-RH 負荷試験を施行した 8 例において、2 例に LH 基礎値の高値 (≥ 30 IU/ml)、2 例に LH, FSH の過剰分泌反応を認めた (図 1)。その中の 1 例 (症例 5) は estradiol が測定されておらず、BBT は一相性で、また腹腔鏡検査もないため確実な病態は不明であるが、卵巣欠損ないし卵巣異形成の可能性がある。血清 prolactin, estradiol, progesterone, testosterone 値は、全例がほぼ正常範囲内であったが、症例 8 では血清 prolactin 値は 32.0 ng/ml と軽度高値を示した (表 2)。

D. 経静脈的腎盂造影 (IVP)

7 例に対し IVP を実施し、左腎・尿管欠損 1 例 (症例 3)、下垂腎 1 例 (症例 1) を認めたのみで、他の 5 例に異常所見はなく、また骨盤腎は認められなかった (表 1)。

E. 骨盤腹腔鏡検査

骨盤腹腔鏡は詳細な検索に同意した 4 例に実施した。観察された内性器所見の概略を表 3 に示す。

子宮所見は欠損 1 例 (図 2, 症例 3)、索状 3 例 (図 3, 症例 1) であった。卵管所見では片側 (左側) 卵管欠損 1 例 (図 4, 症例 3)、両側卵管欠損 1 例 (症例 4) を認めた。卵巣所見では、3 例は両側とも正常であったが、症例 4 では右側は正常であったが、左側は欠損していた。

F. 治療および経過

7 例は患者が特に希望しなかったため治療を実施せず、将来の生活設計を指導したのみで経過観察中

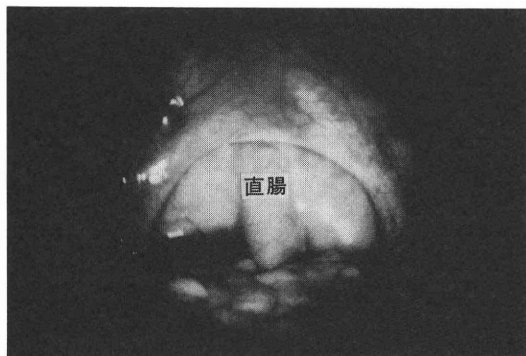


図2 子宮の欠損(症例3)

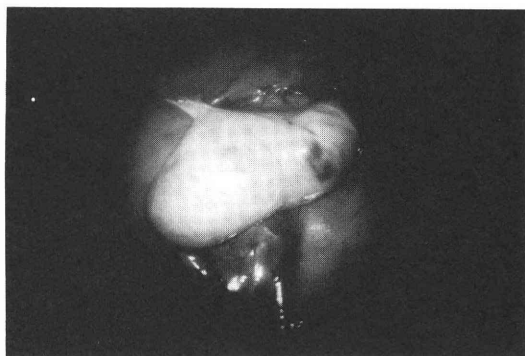


図4 卵管を欠損した左卵巣(症例3)



図3 索状子宮(症例1)

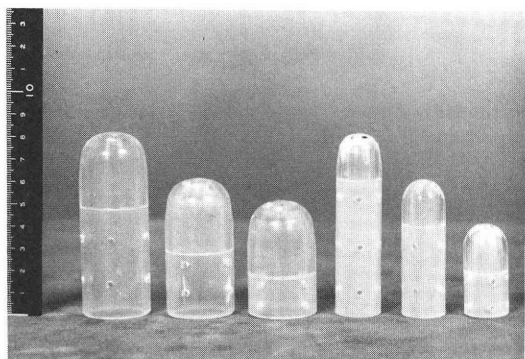


図5 コルポスタット

であるが、そのうちの1例は既に性的パートナーがあり、性交が行われているために圧迫により5 cmの腔管が確認された。残りの3例は将来の結婚を希望したため次のような治療を行った(表4)。

1例はエストロゲン軟膏を塗布しつつ圧迫療法を行なったが、患者自身の熱意も不足しており、必ずしも有効ではなかった。これに対し、我々の作成したコルポスタット(図5)による腔入口部への圧迫療法を実施した症例2および3では、腔管の拡大、延長が明らかに認められ、その後の性交においても、当初は多少の不快感を訴えたものの、明らかな性交障害は認められていない。

なお、性交を定期的に行っているものは、症例2、3および初診時に既婚であった症例5を含めて3例あり、いずれも圧迫時の障害の長さは5 cm以上となっている。

コルポスタットにて治療を行った2症例の治療経過を示す。

1. 症例2 Y・M

21歳の初診時、腔管は示指圧迫にて約3 cmであったが、検査目的にて入院時、ヘガール頸管拡張器にて連日10日間圧迫・拡張を行い、ヘガールNO. 25が

約5 cm挿入可能となった時点でコルポスタット自己挿入とし退院した。以後、コルポスタットのサイズ、挿入時間を変化させ、腔管の長さは圧迫時約8 cmとなった。なお、この患者は退院後、結婚を予定している性的パートナーと性交を行なうようになった。

2. 症例3 M・T

16歳の初診時には、腔管はほとんどなかったが、21歳の再診時には、腔管の長さは圧迫にて約4 cmとなっていた。その後、外来にてコルポスタットによる治療を開始し、結婚を予定している性的パートナーと性交も行なうようになった。腔管は拡大し長さも圧迫にて約8 cmとなった。

考 察

先天性腔欠損症は5,000人から10,000人に1人の頻度で発見され、Müller管ならびに泌尿生殖洞とMüller管の接合部の形成異常が原因とされる²⁾。そのうちでも、Rokitansky-Küster-Hauser症候群は先天性腔欠損症の典型であり、しばしば他にも種々の発生学的異常を伴う疾患である。生殖器以外の異常としては、腎の奇形(腎無形成、転移腎、馬蹄腎など)、脊椎の奇形(二分脊椎、側弯症など)、四肢の奇形、

表 4 治療および経過

症例	治 療	性交の有 無	腔 管 の 長さ (cm)
1	—	無	3.5
2	コルポスタット	有	3.0→8.0
3	コルポスタット	有	0→8.0
4	—	無	1.0
5	—	有	5.0
6	—	無	0
7	軟膏塗布・圧迫	無	0
8	—	無	0.5
9	—	無	0
10	—	無	0

(— は施行せず)

肋骨の奇形、鼠径ヘルニアなどが報告されている²⁻⁴⁾。

本症候群の診断・治療においては、臨床所見のみならず、染色体検査、内分泌学的検査、骨盤腹腔鏡検査などによって、内性器その他の病態を正確に把握することが重要である。

本症候群は Müller 管ならびに泌尿生殖洞と Müller 管の接合部の形成異常が原因とされる。古典的には、腔欠損、痕跡状子宮であるが卵巣・卵管には異常を認めないものと定義されている。しかしながら、諸家の報告では子宮、卵管の欠損あるいは低形成なども本症において認められると記載されている^{2,4)}。Tarry らは、Müller 管および卵巣の発生異常をその程度によって 5 型 (M 0~M 4) に分類しているが (表 5)⁶⁾、その第 2 型 (M 2) が古典的な本症候群にあたり、他には卵管の欠損 (M 3) さらに卵巣の欠損を伴ったもの (M 4) 等に分類される。なお、本症候群に骨盤腎を合併したものは Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser 症候群とよばれている。

我々の経験した症例においても、症例 3 では子宮の完全欠損とともに、片側卵管の欠損を認めている (右 M 2、左 M 3)。また、卵巣にも異常が認められる場合があり、卵巣の欠損や多嚢胞性卵巣 (PCO) 症候群の合併なども報告されている⁶⁾。我々の症例でも、症例 4 で片側卵巣の欠損を認めた (右 M 3、左 M 4)。また、症例 7 において認められた LH-RH 負荷試験に対する過剰分泌反応は、PCO 症候群の傾向を示している可能性がある。

10 例中 BBT 二相性の 8 例は、問題なく Rokitansky functional ovary を有すると考えられる。従って症例 4、9、10 の核型は検索されていないが 46 XX と考えられる。なお、症例 5 は核型が 46 XX、BBT が一相性であり、LH-RH 負荷試験の結果が high-

表 5 Müller 管発生異常の分類

(Tarry ら, 1986)

MO : right or left vagina and uterus, or duplex vagina and uterus with partial or complete septum
M1 : partial or complete absence of vagina
M2 : absence of vagina and uterus
M3 : absence of vagina, uterus and fallopian tube
M4 : absence of vagina, uterus, fallopian tube and ovary

good であることから、卵巣欠損ないし異形成の可能性はある (両側とも M 4)。症例 8 は estradiol 値が低い、LH-RH 負荷試験が正常であるので、卵巣の欠損はないと考えられる (M 2 あるいは M 3)。

Müller 管系と泌尿器系、すなわち後腎原器の発生は緊密な関係にあるため、本症候群の合併症としては泌尿器系の異常の合併が最も多く、馬島によれば 39 % に認められるという⁷⁾。今回の調査でも、IVP を施行した 7 例中 2 例に尿路系の異常を認めた。その他にも多くの先天異常が認められ、今回の調査では鼠径ヘルニア、鎖肛、二分脊椎といった合併症が認められた。しかし、内性器の形態との相関は明瞭ではなかった。

本症候群では機能性子宮は存在しないので、将来の妊孕性は得られない。したがって、その意味での根治的な治療法はなく、造腔術により性生活を可能にすることが本症候群の治療となる。そのため、本症候群の治療にあたって最も重要なことは、患者が身体的、精神的に十分発達し、性生活が日常生活において重要になってくることにより治療 (造腔術) の必要性を本人がよく認識し、治療に協力的であることである。

造腔法は多種考案されており^{8,9)}、代表的なものとしては、圧迫法である Frank 法¹⁰⁾、Ingram 法¹¹⁾、観血的な造腔術では前庭粘膜を利用する Wharton 法¹²⁾、皮膚移植による Mc Indoe 法¹³⁾、S 状結腸を利用する Ruge 法¹⁴⁾などがある。観血的な造腔術では、Mc Indoe 法が最も一般的である⁸⁾。観血的な造腔術においては、瘢痕による造腔腔の縮小、感染、膀胱腔瘻、直腸腔瘻などの合併症がよくみられるので、治療にあたっては保存的かつ簡易な方法から治療を開始すべきであるとされている^{4,8)}。また、腔前庭が正常の場合、悲観血的方法が有効であり、そうでない場合には腸管を利用する方法が成功率が高いとされている¹⁵⁾。

我々は、2例に対して我々の作成したコルポスタットによる圧迫療法を施行し、膣管の拡大は有効に進行し、性交障害も認めていない。なお、性交を定期的に行なっている症例はこの2例を含めて3例あり、いずれも膣管は5 cm以上となっている。本症候群のような膣は欠損しているが前庭粘膜は正常に存在する症例においては、まずコルポスタットによる圧迫療法を行い、その結果ある程度の膣腔が生じた後は実際に性交を行なわせることが膣管の拡大にとって不可欠な条件であると考えられる。性生活に対する欲望が切実な問題となってくる以前に治療を行うことはあまり意味がない。また観血的造膣法については、保存的療法が無効で、患者が熱望する場合に限って考慮するべきであると考えられる。なお、かかる造膣術は結婚生活（性交）は可能にしても挙児の可能性はないことを十分 informed consent を得た上で実施すべきである。しかし、それでも結婚対象となる男性に対してどう対応するか等の倫理的な問題は未解決である。

結 語

1) 本症候群では生殖器以外にも種々の奇形を合併し、また従来正常とされてきた卵巣・卵管にも異常を認めることがある。
2) 造膣法としては、コルポスタットによる圧迫という保存的治療後に実際に性交を行なわせることが有効な対応策であると考えられ、観血的造膣術の適応は慎重であるべきである。

なお、本論文の要旨は、第33回日本不妊学会総会学術講演会において発表した。

文 献

- 1) 本部正樹, 鍋島雄一, 佐々木純一, 目崎 登, 岩崎寛和: 初経未発来者に対する染色体検査および骨盤腔鏡検査の意義, 思春期学, 7: 165, 1989
- 2) 沢原光信, 伊藤隆志, 中村百合: Rokitansky-Küstner-Hausen (先天性膣全欠損) 症候群の2症例, 産婦人科治療, 46: 656, 1983
- 3) Ota, H., Fukushima, M., Kodama, H., Maki, M.: Rokitansky-Küster-Hauser syndrome-observations on 10 cases, Jpn. Fertil. Steril., 33: 403, 1988
- 4) 岩崎克彦, 見常多喜子, 井上正人, 黒島義男, 藤井明和: Mayer-Rokitansky-Küster 症候群の2例, 産科と婦人科, 50: 1549, 1983
- 5) Tarry, W. F., Duckett, J. W., Stephens, F. D.: The Mayer-Rokitansky syndrome: Pathogenesis, Classification and Management, The Journal of Urology, 136: 648, 1986

- 6) 堀江清繁, 高井一郎, 泰井俊造, 高倉賢二, 小笹宏, 野田洋一, 森 崇英: Rokitansky-Küster-Hauser 症候群に Polycystic Ovary 症候群を合併した珍しい症例, 産婦人科の進歩, 38: 847, 1986
- 7) 馬島季磨: Mayer-Rokitansky-Küster-syndrome と泌尿器系異常の合併について, 産科と婦人科, 40: 1278, 1973
- 8) 谷沢 修, 山地建二, 久 靖男, 倉智敬一: 性分化異常の取扱い, 産婦人科シリーズ No. 22 半陰陽のすべて (鈴木雅洲, 坂元正一編), 162, 南江堂, 1979
- 9) Te Linde, R. W.: Operative Gynecology, 4th edition: 457, Lippincott, 1970
- 10) Frank, R. T.: The formation of an artificial vagina without operation, Am. J. Obstet. Gynecol., 35: 1053, 1938
- 11) Ingram, J. M.: The bicycle seat stool in the treatment of vaginal agenesis and stenosis: A preliminary report, Am. J. Obstet. Gynecol., 140: 867, 1981
- 12) Wharton, L. R.: A simple method of constructing a vagina, Ann. Surg., 107: 842, 1938
- 13) McIndoe, A. H., Banister, J. B.: An operation for the cure of congenital absence of the vagina, J. Obstet. Br. Empire, 45: 490, 1938
- 14) Ruge, E.: Ersatz der Vagina durch die Flexur mittels Laparotomie, Deut. Med. Wschr., XI: 120, 1914
- 15) 岩崎寛和: 観血的造膣術とそれに対する批判, 臨床婦人科産科, 25: 1125, 1971

Rokitansky-Küster-Hauser syndrome-observations on 10 cases

Yuichi Nabeshima, Masaki Motobu,
Masahiro Saitoh, Junichi Sasaki,
Noboru Mesaki and Hirokazu Iwasaki

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

Ten patients with Rokitansky-Küster-Hauser syndrome were observed for the past 11 years. The average age at diagnosis was 19.0 years, and the mean height was 154.1 cm. The mean body weight was 57.1 kg with a tendency toward slight obesity.

Chromosomal analysis was done on 6 patients. The karyotype was 46, XX in all cases. Basal body temperature was monophasic in 2 cases and biphasic in 8 cases. Hormonal tests were normal in 8 cases, and LH-RH test was hyperreactive in 2 cases.

Laparoscopy was performed in 4 cases. Uterus

was absent in 1 case, rudimentary in 3 cases. Unilateral fallopian tube was absent in 1 case, bilateral fallopian tubes and unilateral ovary were absent in 1 case. Intravenous pyelography was performed in 7 cases. Left kidney and ureter were absent in 1 case, and ptosis of kidney was found in 1 case. Other abnormalities were inguinal hernia and aplasia of left kidney and ureter in 1 case, atresia ani and spina bifida in 1 case, and inguinal hernia in 1 case.

Some therapy was done in 3 cases. Estrogen ointment and pressure therapy was done in 1 case, but was not effective. Pressure therapy with

"Colpostat" was done in 2 cases, and this was very effective. Including these 2 cases, there are 3 cases who have regular coitus. These 3 cases all have vaginal canal of more than 5 cm.

1) This syndrome sometimes has abnormalities of fallopian tube and ovary as well as various extragenital anomalies.

2) Conservative therapy of this syndrome, that is practice of coitus after pressure therapy with "Colpostat", is very effective in most cases. Therefore, the necessity of surgical vaginoplasty should be considered very carefully.

(受付: 1989 年 9 月 27 日)

関連学会のお知らせ

第7回世界ヒト生殖会議

(VII World Congresson Human Reproduction)

会期：平成2年6月26日(火)～7月1日(日)

会場：Finlandia Hall (フィンランド：ヘルシンキ)

主催：International Academy of Human Reproduction

理事長：飯塚 理八

大会長：Makku Seppälä

プログラム内容および登録用紙請求は

(株)日本不妊学会事務局 (TEL 03-272-7077) へお問い合わせ下さい。

不妊症新治療ワークショップ 1990

会期：平成2年8月25日(土)、26日(日)

会場：仙台国際ホテル

〒980 仙台市青葉区中央四丁目6-1

TEL：022 (268) 1110

主催：不妊症新治療ワークショップ

〈世話人〉 鈴木雅洲 東北大学名誉教授

水野正彦 東京大学教授

なお、プログラム御希望の方は下記にご連絡下さい。

問合せ先：不妊症新治療ワークショップ事務局

〒989-24 宮城県岩沼市押分字志引 38-4

医療法人社団スズキ病院内

TEL：0223 (23) 3111 FAX：0223 (23) 3123

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 (品川駅南口徒歩 3 分)

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

副会長 印牧 義孝

第8回日本受精着床学会総会および学術講演会

下記により第8回日本受精着床学会総会ならびに学術講演会を開催いたしますので、多数の方々ご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9月13日(木)、9月14日(金) 学術講演会

9月13日(木) 理事会

9月14日(金) 評議員会、総会

会 場：東京ベイ ヒルトン インターナショナル

〒279 千葉県浦安市舞浜1-8 TEL 0473-55-5000

特別講演

I 『Implantation Window』

J. G. Schenker

(Professor and Chairman, Hadassah Medical Organization, Jerusalem)

II 『Micromanipulation Technologies for IVF, Hemizona Assay and Genetic Diagnosis of the Per-embryo』

G. D. Hodgen

(Professor and Scientific Director, The Jones Institute, Eastern Virginia Medical School)

理事長講演 『日本受精着床学会の発展を顧みて』

飯塚理八

(慶応義塾大学医学部産婦人科教授)

教育講演 『子宮内膜症の基礎と臨床』

高見沢裕吉

(千葉大学医学部産婦人科教授)

シンポジウム 『配偶子の成熟と胚の発育』

ワークショップ 『難治性不妊症へのアプローチ』

一般講演

なお、演題募集要項、その他詳細については後日学会員に郵送致します。

第8回日本受精着床学会

会長 大野虎之進

連絡先：〒272 千葉縣市川市菅野6-7-1

東京歯科大学市川総合病院産婦人科内

第8回日本受精着床学会事務局(担当：小田高久)

TEL 0473-22-0151 FAX 0473-25-4456

*なお、日本受精着床学会事務局は平成元年8月1日をもって日本大学医学部産婦人科教室より下記へ移転しました。

移転先：〒106 東京都港区麻布台1-9-14 A.H-1ビル

(株)コンベックス内

TEL 03-589-3460 FAX 03-505-2126

第1回日本インポテンス学会総会

会 長 白 井 将 文
(東邦大学医学部泌尿器科学教室)

期日 : 平成2年9月21日(金)、22日(土)
場所 : コクヨホール (JR品川駅・港南口徒歩1分)
 東京都港区港南1-8-35 ☎ 03-450-3712

演題申込方法 : 下記学術総会事務局に演題申込用紙を御請求下さい。
 〒143 東京都大田区大森西 6-11-1
 東邦大学医学部泌尿器科学教室内
 第1回日本インポテンス学会総会事務局
 三浦 一陽 宛
 ☎03-762-4151(内線3605)、FAX 03-768-8817

演題締切日 : 平成2年8月1日(水) 必着

性機能障害は直接生命と関係がないことからわが国ではとかく軽視されてきましたが、最近 quality of life が重視されるようになり性機能障害に対する関心も一段と深まって参りました。

わが国では昭和53年に日本インポテンス研究会が設立されて以来、早くも11年が過ぎ、学術集会も22回を数え年々発展の一途を辿って参りましたが、この度平成2年1月1日を期して学会に移行致しました。

本学会は人類の半分を占める、男性の性機能を総合的に解明することを目標としております。このように人類の繁栄と直結する学問を扱う第1回の学術総会ですので、多くの皆様の御参加を心よりお待ちしております。

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B5判横書き400字詰のものを使用し、組版に差支えないよう清書して下さい。ワープロを使用して結構です。(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2号

1990年3月25日 印刷
1990年4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