

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 35 No.3

July
1990

日本不妊学会雑誌

第35巻 第3号

平成2年7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 3 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。

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、論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 (千葉大学解剖)

片山 喬 (富山医科薬科大学泌尿器科)

(1) 基礎

1. 精子形成に関する 2, 3 の問題

永野俊雄 (千大・解剖)

2. ヒト精子の微細構造, 正常及び異常例について 佐藤和宏 (東北大・泌尿)

(2) 臨 床

- | | |
|--------------------------|----------------|
| 1. Immotile Cilia 症候群の臨床 | 角谷秀典 (千大・泌尿) |
| 2. 精索静脈瘤と手術前後の精子形態の変化 | 広川 信 (藤沢市民・泌尿) |
| 3. 精子形態異常と妊孕性 | 三浦一陽 (東邦大・泌尿) |
| 4. 抗精子モノクローナル抗体と精子抗原 | 篠崎雅史 (神戸大・泌尿) |

2. Microfertilization (顕微受精法)

司会 入 谷 明 (京都大学農学部)
広 井 正 彦 (山形大学産婦人科)

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| 1. 精子の前処置と Microfertilization | 細井美彦 (京大・農) |
| 2. zona opening | 小田原靖 (慈大・産婦) |
| 3. zona drilling | 井上正人 (東海大・産婦) |
| 4. 囲卵腔内精子注入法 | 斉藤英和 (山形大・産婦) |
| 5. 細胞質内精子注入法 | 佐藤嘉兵 (日大・農) |

III. 一般演題:

一般演題の申し込締切は1990年7月20日です。演題申込要領は日本不妊学会雑誌 第35巻第2号をご参照下さい。

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。

お問合せ先

〒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

1990年4月 第35回日本不妊学会
会長 島崎 淳

※宿泊のご案内は巻末をご覧ください

日本不妊学会誌

第35巻 第3号

平成2年7月1日

——目 次——

理事長講演

インセミネーションから IVF へ——きのう、きょう、あす……………飯塚理八 …… I

原 著

HMG によるラットの過排卵誘起……………橋詰良一・他 …… 1

レセルピン投与ラットへの胚盤胞移植 1. 胎児重量について……………辻井弘忠 …… 6

マウスの加齢に伴うグリコゲン含有卵母細胞の出現率の

変化について (英文) ……………成田 成・他 …… 12

着床遅延マウス胚盤胞におけるプロスタグランジン E_2 の

免疫組織化学的検出……………新村末雄・石田一夫 …… 18

妊娠初期マウス子宮内膜間質細胞の脱落膜化についての超微形態学的検討,

——predecidualization, decidualization にともなう形態変化——……………上原茂樹・他 …… 23

体内および体外受精後に発生する一卵性双胎について (英文) ……………千田 智 …… 32

マウス 2 細胞期以後の胚発育に及ぼす SOD 添加低酸素下培養の効果……………馬岡 陽・他 …… 37

Growth hormone の卵巣 DNA 合成および

somatomedin C/insulin-like growth factor 1 レベルに及ぼす

影響について: *In vitro* および *in vivo* 実験における検討 (英文) ……………白杵 愼・他 …… 43

不妊症症例の妊娠例における TRH 負荷試験の検討……………新谷恵司・他 …… 51

TRH 負荷試験を指標とした Prolactin 関連卵巣機能障害に対する

Bromocriptine 漸増投与法の検討……………辻 泰二・他 …… 55

GnRH agonist を用いた各種過排卵刺激法の比較検討……………武内裕之・他 …… 63

経腔超音波断層法による卵胞計測と卵子成熟度および受精・分割率の検討…千石一雄・他 …… 69

Gonadotropin 療法施行患者における尿中 estrogen の

ラテックス凝集阻止法による測定 (英文) ……………関 克義・永田一郎 …… 74

AID の妊娠成功例と不成功例の解析による LH カラーの有用性と限界……………假野隆司 …… 78

正プロラクチン (PRL) 血性不妊症に対する Bromocriptine (BRC)

併用療法の検討——妊娠例 123 例の転帰——……………山下三郎・他 …… 84

多嚢胞性卵巣症候群に対する超音波ガイド下経腔的卵胞穿刺術の

効果に関する検討……………大谷嘉明・他 …… 92

正常月経周期婦人及び多嚢胞卵巣症候群婦人における

LH-RH テストに対する肥満と血中 testosterone の

影響について (英文) ……………吉野和男・他 …… 96

血清 CA 125 を用いたダナゾール療法の効果判定 (英文) ……………高橋健太郎・他 ……101

排卵誘発時の性ステロイドホルモンと血中ハプトグロビン値の

相関性について	久保春海・他	105
子宮卵管造影剤としてのイソピストの使用効果	大野洋介・他	110
卵管性不妊症と Chlamydia trachomatis 感染に関する検討	野口昌良・他	115
子宮腔癒着症の術後妊孕性に関する検討	沖 利通・他	120
子宮外妊娠症例に対する少量 ametopterin 製剤 (methotrexate, MTX)		
投与療法に関する検討	生水真紀夫・他	125
ビタミン B ₁₂ 欠乏症の一例, 一不妊との関連において	渡辺裕之・他	132
男性不妊症における膿精液症 (pyospermia) の診断と治療について	佐藤和宏・他	136
Adriamycin 投与ラットにおける造精機能障害に関する		
内分泌学的, 組織学的検討	永井 敦・他	141
実験的精索静脈瘤の下垂体—精巣系におよぼす内分泌学的影響	石津和彦・他	146
操作手順を簡略化した精子不動化試験とその成績	辰巳賢一・他	152
精子運動能と Caffeine-cell soft system による解析	杉元幹史・他	157
特発性男子不妊症の精巣の形態学的研究		
——精細管基底膜の肥厚と血中ホルモンとの関係について——	高羽秀典・他	162
男子不妊症に対する hCG-hMG 療法の臨床的検討	山下良孝・他	169
地方部会講演抄録		175

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 35, No. 3, 1990)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Presidential Address

- From Artificial Insemination to IVF.....*Rihachi Iizuka* 1

Originals

- Induction of Superovulation in Rats using HMG*Ryoichi Hashizume, Masao Ito,
Ruriko Maru & Eisei Ozawa* 1
- Blastocyst Transplantation in Reserpine-Induced
Pseudopregnant Rats, 1. Fetal weight*Hirotsada Tsujii* 6
- Age-related Changes in the Percentage of Glycogen-laden
Oocytes in Mice*Akira Narita, Sueo Niimura
& Kazuo Ishida* 12
- Immunohistochemical Detection of Prostaglandin E₂ in
Delayed Implanting Mouse Blastocysts*Sueo Niimura & Kazuo Ishida* 18
- Ultrastructural Observation on Mouse Predecidualized and
Decidualized Endometrial Stromal Cells*Shigeki Uehara, Takashi Tsumuraya,
Yumiyo Kurahayashi, Kunihiro Okamura,
Toshifumi Takabayashi & Akira Yajima* 23
- Monozygotic Twin Formation in Mouse Embryos
Following Fertilization *in vitro* and *in vivo**Satoru Chida* 32
- The Effects of SOD Added Low Oxygen Culture on
Mouse Embryos after the First Cell Cycle*Yoh Umaoka, Yoichi Noda
& Takahide Mori* 37
- Is Induction of DNA Polymerase α Activity in Immature Rat
Ovaries by Growth Hormone Independent of Somatomedin
C/Insulin-like Growth Factor 1?*Satoshi Usuki, Sayuri Kubota
& Sohei Miyakawa* 43
- The TRH Loading Test of Pregnant Case of Infertile Case
.....*Keiji Shintani, Nobutaka Yoshida,
Ichirou Shirakawa, Takaaki Katayama,
Shigeki Taga, Kiyoshi Urabe & Kaoru Sekiba* 51

Bromocriptine Gradual Increase Trial According to the TRH test; To Decide the Adequate Dosage of Bromocriptine for the Treatment of Dysfunctional Ovaries Related Secretion of Prolactin	<i>Taiji Tsuji, Masato Nishida & Hirokazu Iwasaki</i>	55
The Effect of GnRH Agonist on Various Types of Controlled Ovarian Hyperstimulation	<i>Hiroyuki Takeuchi, Satoshi Itoh, Masaru Fukuda & Michio Takada</i>	63
Correlation of Transvaginal Ultrasound Measurement of Follicular Size with Oocyte Maturity and Fertilization and Cleavage Rates	<i>Kazuo Sengoku, Kenichi Tamate, Yoshiichi Kikukawa, Mutsuo Ishikawa & Tetsuya Shimizu</i>	69
Measurement of Urinary Estrogen Concentration with Latex Agglutination Inhibition Method in Patients Treated with Gonadotropins	<i>Katsuyoshi Seki & Ichiro Nagata</i>	74
Usefulness and Limitation of LH-Color Based on the Analysis of the Pregnancy Rate Following AID	<i>Takashi Kano</i>	78
Bromocriptine (BRC) Therapy for the Normoprolactinemic Infertile Women, —Outcome of 123 Cases of Pregnancy—	<i>Saburo Yamashita, Masayuki Kobayashi, Akio Narimatsu, Kimikazu Hayashi & Takehisa Ito</i>	84
Studies about the Clinical Efficacy of Transvaginal Ultrasonically Guided Follicular Puncture in Polycystic Ovarian Disease	<i>Yoshiaki Ootani, Hisashi Okata & Satoru Aoki</i>	92
Effects of Obesity and Plasma Testosterone Levels on the Reaction Type of LH-RH Test in Patients with a Normal Ovulatory Cycle and Polycystic Ovary Syndrome	<i>Kazuo Yoshino, Kentaro Takahashi, Takaaki Shirai, Arata Nishigaki, Yoshimi Eda & Manabu Kitao</i>	96
Serum CA-125 as a Marker for Follow-up the Response to Danazol Treatment in Patients with External Endometriosis	<i>Kentaro Takahashi, Kazuo Yoshino, Masuo Kusakari, Akihiro Uchida & Manabu Kitao</i>	101
Correlation between Sex Steroid Hormones and Serum Haptoglobin Levels during Follicular Stimulations	<i>Harumi Kubo, Akira Usui, Yuji Abe, Susumu Katayama, Yutaka Sasabe, Chuang-Yi Huang & Kaoru Morita</i>	105

Isovist as a Contrast Agent for Hysterosalpingography	
.....	<i>Yohsuke Ohno, Hideko Tamura, Jo Kitawaki,</i> <i>Takaya Tamura, Masaaki Fukuoka, Ryoji Itoh</i> <i>& Hiroji Okada</i>110
Tubal Infertility in Relation to Previous Chlamydia Infection	
.....	<i>Masayoshi Noguchi, Toshimichi Okamoto,</i> <i>Shigeo Hieda, Tetsuo Masahashi,</i> <i>Hiromitsu Yabushita & Masami Nakanishi</i>115
Fertility After Treatment of Intrauterine and	
Cervical Uterine Adhesion	<i>Toshimichi Oki, Akito Mori,</i> <i>Sinichi Yamamoto, Seigo Fukumoto,</i> <i>Kazuhiro Takeuchi, Tsutomu Douchi,</i> <i>Naomi Arima & Yukihiro Nagata</i>120
Conservative Treatment of Ectopic Pregnancy with	
Individualized Reduced Dose of Methotrexate...	<i>Makio Shozu, Yoshihiro Takahashi,</i> <i>Takenori Harada, Kazutada Iida,</i> <i>Hirohisa Ueno, Yoshi Kubota</i> <i>& Kazutomo Akasofu</i>125
Vitamin B ₁₂ Deficiency and Infertility,	
—A Case Report—	<i>Hiroyuki Watanabe, Tomoaki Ikeda,</i> <i>Masatoshi Yamaguchi & Norimasa Mori</i>132
Diagnosis and Treatment of Pyospermia in Infertile Men	
.....	<i>Kazuhiro Satoh, Seiichi Orikasa,</i> <i>Ikuo Maehara, Sigeaki Satoh,</i> <i>Masaru Takahasi & Masayosi Hiramatsu</i>136
Endocrinological and Histological Studies on Spermatogenic	
Dysfunction in the Rat Treated with Adriamycin ...	<i>Atushi Nagai, Teruhisa Ohashi,</i> <i>Yozo Ohashi, Yoshitaka Yamashita,</i> <i>Yoshiteru Kohama, Tadashi Oeda,</i> <i>Susumu Yamane, Mitsuhiro Yoshida</i> <i>& Hiroyuki Ohmori</i>141
Endocrinological Effect of Surgically Induced Varicocele	
on Pituitary-testicular Axis	<i>Kazuhiko Ishizu, Hiroshi Takihara,</i> <i>Takuya Ueno, Hidetsugu Hayashida,</i> <i>Ri-ichiro Isoyama, Yoshikazu Baba</i> <i>& Jisaburo Sakatoku</i>146
A Simple Sperm Immobilization Test and its Result	
.....	<i>Kenichi Tatsumi, Yoichi Noda,</i> <i>Nobuyuki Emi & Takahide Mori</i>152

Influence of Caffeine on Movement Characteristics of Human Spermatozoa-analysis by the Cell Soft System	<i>Mikio Sugimoto, Isaku Nomura, Noriyoshi Matsuoka, Isao Kobayashi & Ikumasa Takenaka</i>	157
Histological Studies on Testes from Patients with Idiopathic Male Infertility Correlation between the Thickness of Seminiferous Basement Membrane and Serum Hormonal Levels.....	<i>Hidenori Takaba, Tatsuya Nagai, Yoshikazu Tsuji & Koji Miyake</i>	162
Clinical Evaluation of hCG-hMG Combined Therapy in Patients with Male Infertility	<i>Yoshitaka Yamashita, Atsushi Nagai, Tadashi Oheda, Yoshiteru Kohama, Teruhisa Ohashi & Hiroyuki Ohmori</i>	169

理事長講演

*

インセミネーションから IVF へ—— きのう、きょう、あす

第 34 回日本不妊学会学術講演会——理事長講演

飯塚 理八

きょうお話しすることは、歴代理事長もときどき理事長講演をなさっておりますけれども、それらに比べまして、まことに雑駁なお話になると思います。私の旧制中学時代に島崎藤村が教科書にございました。「我が胸のそのここには言いがたき秘め事住めり」。きょうは別に秘め事を開陳するわけではございません。藤村はときどき気障な歌をつくっております、中学生時代、何のことを言っているのかなと思いましたが、このように年をとりますと、ときどき秘め事を言ってみたいというような、勝手なことを申すかもしれません。きょうはひとつ、日ごろ、いろいろとお世話になっている先生方を前にして、脱線をするやもしれませんが、ご容赦をいただきたいと思います。

それでは、話があちこち飛び、中心がどこにあるかわかりませんが、実はこの題意もインセミネーション、授精でございまして、それから受精へ、すなわち授精から受精へとしたかったんでございますけれども、ちょっと語呂が悪いので、あえて、この「ファートリゼーション、IVF」というような形にいたしました。授精、精液を、あるいは精子を授けるほうから、いまや人工的ファートリゼーションの時代へ来たわけでございます。

思えば、私の 40 年近い、まことに考えてみれば遅々として進まなかった道が、この 10 年はその前の 30 年を一気に駆け抜けてくるような、目まぐるしいこととございまして、きょう、スライドをお出しするのを会場の若い先生方から見れば、何だ、こんなこととおしかりを受けるかもしれませんが、年寄りはいだんだん昔語りをしがちでございます。その点をご容赦いただければと思います。

表 1 は私どもの安藤先生が不妊研究会というのをつくりまして、それから不妊学会ができま

した。その当時、第1回の私どもの大学にあります北里講堂で、中島教授が不妊学会総会を持ちまして、当時、私どもは会場の設営にうろちょろしておったことを覚えております。ご承知のように、昭和45年に本学会が法人化いたしまして、昭和51年、幾多の先輩のご努力で日本医学会の分科会に入ることができました。この間、法人化は第7回の国際不妊学会という、林基之教授のまことに今でも頭の下がるようなご努力、事務総長としてご尽力したわけでございます。年を聞しまして、今回、第34回を清水先生がご主宰しておられるわけでございます。

表1 日本不妊学会のあゆみ

昭和31年4月5日 日本不妊学会設立 (理事長 安藤画一教授)
昭和31年10月21日 第1回日本不妊学会総会 (会長 中島 精教授)
↓
昭和45年 法人化
昭和51年 日本医学会加入
平成元年 9月2～3日 第34回 日本不妊学会総会 (会長 清水哲也教授)

表2 日本不妊学会歴代理事長一覧

理事長名	任 期	在任期間
安藤 画一	昭.31.4.1～43.11.3	12年7カ月
長谷川俊雄	昭.43.11.4～45.12.25 昭.45.12.26～49.10.10	5年11カ月(法人)
澤崎 千秋	昭.49.10.11～53.11.16	4年
高井 修道	昭.53.11.17～57.11.16	4年
松本 清一	昭.57.11.17～61.11.16	4年
石神 襄次	昭.61.11.17～63.11.15	2年

表2は、まことに恐縮でございますが、歴代の理事長先生のご任期とご努力のあとを追ったわけでございます。安藤先生が最初にご就任いたしまして、それで1968年、テルアビブの学会で、日本に安藤先生を会長として国際不妊学会の第7回をやるようにと、私もそのとき林先生などと一緒に出席したことを覚えております。しかし、残念なことに、その2年後に安藤先生が急逝されましたので、長谷川先生が理事長となられまして、国際不妊学会を立派に開催なされたことが今でも目に浮かぶようでございます。

爾来、沢崎先生、高井先生、松本先生、石神先生、歴代の理事長先生方のご尽力によりまして発展してきたのです。

写真1は初代の恩師の安藤先生でございまして、そのときお年は65歳でございます。私どもが教室に入ったとき、今の私の年と同じ年でございまして、その品格、その他、全然、雲泥の差でございました。まことに忸怩たるものがございます。



写真1 安藤画一先生

会員の数もこのように漸増いたしまして、いまや3,500人を超える、先ほども総会で申し上げましたが、まことに立派な学会になりました。これは産科婦人科学会、泌尿器科学会は申すに及ばず、畜産学会、動物学会、生物学会、あらゆる分野の先生方のご尽力によるところでございます。まことにご同慶と、また各先生方には深甚なる感謝の意を表する次第でございます。

これはまことに独断的になるかもしれませんが、私どもの安藤先生が終戦後、いろいろと、いち早くアメリカにおきます国際不妊学会にご出席になりまして、日本での不妊学会の必要性をお認めになり、国内の各先生方にお声をかけ、先ほどのように設立したわけでございますけれども、昭和24年8月に人工授精の第1号ができております。私どもがフレッシュマンの時代でございます。その当時、使い走りをしたようなことを覚えております。

それからしばらくいたしまして、凍結保存精子の人工授精が慶応でもできるようになりました。先ほどの1968年に私がテルアビブに持っていったときには、凍結保存精子による妊娠例が100例に達しておりまして、この当時は日本の例数が世界で一番多かったというようなことで、いろいろとご質問を受けたという記憶がございます。

しかし、その後10年間、このリプロダクションに関することは精子に及ばず、体外受精のはしりでございますが、1971年に、日本における第7回国際不妊学会のときにもエドワーズが来てシンポジウムをやっておりますけれども、そのときは64分割を発表いたしました。林先生のところでは32とか、慶応では16とか32とか、そういうようなことで、そんなに遜色はなかったわけでございますが、その後の、いわゆるスチューデントパワーとか、医局でのいろいろなブレーキによりまして、リプロダクションの研究は一時ストップいたしました。そこでブランクが生じたわけでございます。

その後、日本でもこのように鈴木雅洲先生のところで体外受精は成功いたしました。エドワーズの成功が1978年でございますので、1979年日本で開催されたFIGO(坂元先生が会長)のときにも体外受精のステプトーなども来て講演をしております。これに触発されまして、日本の成功につながったと思いますけれども、不妊学会の一分派でございます日本受精着床学会が有志の先生方によって成立いたしまして、それが臨床へつながったというふうに感じております。日本でのこういうようなことが、これが進歩かどうか分かりませんが、これより先の20年、30年よりも、少なくともその波は非常に早いというふうに感じております。

表3はもう一度書きかえてみたところでございますけれども、先ほどの書いていない配偶者、非配偶者凍結保存精子銀行と、私どもが凍結精子の勉強をするときには、当時、千葉の農事試

験場におられました西川義正先生、昭和32年ごろでございますが、私と、現在の市川病院長の犬野教授などと一緒に、その教えを請いに参ったことがございます。このように学際的に不妊学会というのができました関係上、多くの先生方に接触

でき、教えを請う、従いまして私自身の学位論文は、「不妊性における男性要因の研究」テストイクター・バイオブシーでございました。

こんなことを言っでは失礼でございますが、私が勉強していたころは、このような分野も、おそらく志田圭三先生がパイオニアであったかと思います。バイオブシーなどをやっているとところはなかなかございませんで、大変戸惑ったことがございます。私どもの泌尿器科の先生方もその分野をしたことはない。もちろん、いろいろな悪性腫瘍につきましては勉強しておるわけでございますけれども、そのような関係で、当時、上野動物園にブタオザルというのがいまして、それが不妊である、少し手伝いなさいということで、4、5人で参りまして、精巣のバイオブシーをやってくれと、ブタオザルの麻酔がよく分からない。飼育係の先生方、獣医の先生方にお聞きしても、どのぐらいの量をやっていいかわかりませんので、それでは面倒くさいからと言って、4、5人でおりからサルの手をぐっと引っ張りまして、手を離しますと、指を折られてしまう。飼育係の指を見ますと指が曲がっております。これはどうしたんですかと聞きましたら、ブタオザルにひっかかれて、そのついでに骨が折れたんだと、そういうふうなことを申しますので、我々もおっかなびっくり、おりから4、5人で手を出して、ラボナールをもって、それこそいいかげんでございます。就眠量をやって、それからそのあと少し加えたというようなことがございます。ところが全然起きてこない。2時間も人工呼吸をしている。ブタオザル1匹幾らですかといいますと、当時15万円。慶応の給料は幾らかというと、助手給が5,000円でございます。5,000円でもって15万払うのであれば何年……、殺しちゃったら大変だということで青くなりまして、半日ぐらい人工呼吸をしたら、やっと生き返ったというようなエピソードがございました。その精巣のバイオブシーを見て、どうしてもスペルマトジェネシスが弱い。それで帝国臓器さんに頼みまして、シナホリン（複合ゴナドロピン）というお薬がございまして、そのペレットと、テストステロン・ピロピオネートのペレットを埋め込みました。ところが、それを埋め込んだあと2カ月で妊娠した。そんなことがあるのかと、自分ながら驚いたことがございまして、この論文は「ホルモンと臨床」に載せていただいております。

表3 洗浄濃縮—凍結精子による人工授精の利点

1. 夫が排卵日に来院する必要がない。
2. 一排卵周期に頻回授精が可能である。
3. 高度精子減少症において数回の射精液を集めることにより十分な精子数が得られる。

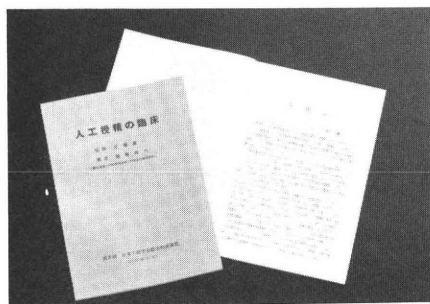


写真2 人工授精の臨床

ます。

それから、私事になりますけれども、津市で小南先生が会長をされた第8回不妊学会のときに、西川先生がアニマルのほうのリプロダクションの人工授精につきましてご講演され、安藤先生はヒトについての招請講演をお引き受けになったわけですが、急にソ連に行く

ようになりまして、急遽私が代演しました。しかし、今から考えますと、もう既にソ連に行かれることが決まっておったのに、ご自分で引き受けられて、私に譲ったのではないかと、ひそかに思っております。まじめな先生でございますから、それは一言も、おっしゃいませんけれども、私のような一介の助手が特別講演をさせていただいて、まことに、私自身の感傷に浸るような本を当時配った覚えがございます。それ以来30年近いんですけれども、これ以上に熱を込めて書いたことがないので反省しておるわけでございます。

当時、ドライアイスでアルコールを冷やしまして、マイナス89度Cぐらいで、毎日のこぎりでもってドライアイスを切りまして、そうして、畜産のほうで既に開発されておりました卵黄を、保存液を入れまして、132日保存したのでできたというようなことをテルアビブのほうで発表し、皆さん方がワンダフルなんて言ってくれたことを覚えております。その当時は、簡単なジャーでやっていました。このように心を込めてやりますと、むしろその当時のほうが、現在の液体窒素よりも成績がよかったような、これは手前みそになるかもしれませんが、そういう感じでございます。

現在外来に置いてあります液体窒素では、夫が長期出張するとか、そういったケースに凍結しております。凍結の仕方、保存液には格段の進歩がございます。

これまでにフレッシュ、フローズンをあわせて、人工授精児は7,000人誕生しているわけですが、もちろん、便りのないのはよい便りでございまして、いろいろとクレームがつくときだけびっくりさせられるようなことがございますけれども、今のところ、これは大変な事になったというようなことはほとんどございません。もちろん奇形児は2、3ございました。例えば兔唇とか、それから残念ながらダウン症が1例ございます。これはお母さんの年齢は30歳以下の方でございますので、一応、教科書どおりにはいかないということでございます。DQとIQを調べたところではフレッシュよりも、むしろフローズンのほうが成績がよろしいという結果がございまして、こういうデータは私どもが発表したときには世界になかった。ハ

ーバード学派が最近こういうふうなことを大々的にやろうとしているが、なかなかこれには秘密主義がございまして、わずか 10 例ぐらいやるのに何年もかかるというようなことでございます。まして数十例のデータというのはなかなかつかみがとうございます。

2 歳半以上の IQ を調べ、ここで何を言いたいのかといいますと、人工授精児は知能指数がよろしいということを言いたいわけでございます、これも手前みそになるかもしれませんが、これは我々と関係のない、第 3 者の心理学者が測定しているのです。

これも畜産のほうに先駆者がおりまして、永瀬先生がペレット法というのを開発しまして、北大の先生方もそれを追試なさって、大変よろしいと。しかし、最近これは取り上げられなかったんですけれども、私どもが保存液を改善することによって、これがまた脚光を浴びてまいりました。ドリルでもってドライアイスに穴をあけまして、保存液と精子と一緒にしまして、ペレットをつくります。これをビンに保存いたしまして、用に供するとき、これを溶かすわけでございます。これは日常、プライベートクリニックをお持ちの先生方には大変役に立つんじゃないか、また、リバイバルでございます。しかも、その陰には保存液の改良、たとえばマグネシウムとかリン、この辺のところをいろいろと改良いたしました。こういう面では入谷先生、毛利先生のご教示が大変役に立ったわけございまして、こういうことがなければ、私どもも全然進歩しなかったわけございまして、今さらにここに鳴謝するわけでございます。こういうような保存液を改善することによって、日常、診療に、例えばご主人が出張するというようなときには、先ほどのようなペレット状にして、簡単な容器でもって保存しておくといひのでございます。

表 4 精子洗浄，比重勾配

1. 精漿の除去
2. 細菌等の除去
3. 運動精子のみ選別
4. X.Y. 精子の分別

それから、もう一つこれに加えてまして、洗浄して、濃縮していく。凍結によって、先ほどの一般演題のときでも、なぜ濃度が必要かと。しかし、常識的には精子の数がいい、それからモティリティのいいのがいいわけございまして、数百万のものよりも、数億の精子のほうが教科書的にはよろしいわけでございます。しかし、いまやそれを補うためにマイクロファータリゼーションなどがございすけれども、しかし、常識的には精子をコンデンスする、それには洗浄濃縮がよろしゅうございます。

最近の例で精子減少症のものを何回か濃縮いたしまして、凍結することができてまいりました。もちろん洗浄すること、それから凍結することに不安を感じるということをよく質問で受けますけれども、これは昭和 30 年代に我々がフローゼンシーメンをやったところにも感じたわけ

でございます。それにはできたもので証明するしかないという、まことに冒険的なことを言ったわけでございます。大体、異常なものはアボーションしていくという通則に外れないんじゃないかというふうに思います。

常識的にシーメンというものは、人工授精の場合に一番初めはたくさん入れればいいだろうというので、ネラトンカテーテルでボリューム全部を、3 ml とか、あるいは4 ml をボンボン入れてまして、それで腹膜炎を起こした。抗生物質のやり方も悪かったわけでございますけれども、そういう過ちもあったわけでございます。

今、世界を席卷しているエイズの問題がでございます。エイズウイルスは凍結では死にません。それを防ぐためにはどうしても洗浄していくということが必要になっている。これの1つの分派といたしまして、XY 精子の分別が出てまいりました。

今、皆さん方にご愛用をいただいているパーコールというのが登場いたしました。これは成分輸血に使われる薬でございまして、昭和天皇のご病気のときにも、こういうような成分輸血の話が出て、常識的になってまいりましたが、これを使うことによって、細胞には害はないということが定説でございます。これでもって、まず精子を洗浄していくということでございます。

エイズが人工授精でもって感染したということが、数年前に発表されました。それで凍結でもって防ぐことはできない。それでは何かというと、リンパ球を取り除くというようなことには精液を洗浄しなきゃいけない。日本では人工授精によるエイズというのはそう心配ございませんが、ドナーについてはやはり調べていく必要がございまして、もし大事を取るならば、フレッシュなシーメンを使うよりは、洗浄した精子を使っていくということが大切なことでございます。凍結されたものでも、このように発症しております。こういうふうなことで発症したんでは大問題でございまして、イアトルジェニック、これに極まるということでございます。

パーコールを使用していく段階において、ボトムのほうに精子が沈澱してまいります。これを精子減少症のものに使ってございましたところが、女の子が圧倒的に多いという事実が分かりました。それによりまして、こちら側はX精子、こちら側はY精子ということは、当然この分野を研究なさる先生方は気がつくわけでございます。こちら側を取れば女の子ができるというの想像がつくわけでございまして、それをボランティアを使って、7人やりまして、7人とも女の子ができたという報告を、3年前にしたわけでございまして、それが引き金となりまして、産科婦人科学会に倫理要綱ができて、現在、血友病その他、伴性遺伝の場合には用いてよろしいということになっております。

表5 HIT の操作手順

- (1) 授精 30 分前に、ブスコパン 1A 筋注。
- (2) 1 ml のツベルクリン・シリンジに 400 万～500 万/ml に調整した精子浮遊液を約 0.5 ml 吸う。
- (3) 精子注入用チューブへ、ハックス液を注入。
- (4) 精子注入用チューブを Hysteroscope の灌流液注入腔へ挿入。
- (5) Hysteroscope を子宮腔内へ挿入、生食にて灌流しながら卵管口を確認。
- (6) 精子注入用チューブへ、精子浮遊液を 0.35 ml 注入。
(チューブのデッドスペースが 0.32 ml のため)
- (7) 卵管口へチューブを挿入 (0.5～1.0 cm)
- (8) 精子浮遊液を 0.05 ml 注入。
- (9) 注入後 30 分安静を保ち終了。

実際の面では、ビーズを入れて段階的にパーコールを入れまして、遠沈いたしますと、それぞれの比重勾配的に分かれる。ですから、こちら側がX精子、こちら側がY精子というふうに分かれていくわけで、これは既に不妊症に利用されている方法の応用でございますから、しかもパーコール洗浄というのは、各施設でお使いになっていただいておりますから、生まれたお子さんについては心配ないと思いますけれども、なお、しばらくその成育状態、先ほどの IQ、DQ ではございませんけれども、フォローの必要があ

らうと思います。

また、私どもの杉村講師が詳細にお話しすると思いますけれども、ヒステロスコピック・インセミネーション・イントゥ・チューブ (HIT) でございます (表5)。こういう命名は日本医大可世木講師がおつけになったもので、敬意を表するわけでございます。

人工授精は子宮腔でしたが、これをもう少し先の卵管に入れる。しかも盲目的ではない、あるいはエコーではなくて、日本独特のヒステロスコプを、非常にフレキシブルな細いのを使って入れていこうという方法でございます。

普通の方法で妊娠しない症例、AIH や AID もそうでございますが、シビア・オリゴスパーミア、これを何とか防ごう、改良しようというのでやってみたわけでございます。

細かい話は明日に譲るといたしまして、生食水で灌流していない、ドライメソッドでもやっております。

その用具は、既に先生方もお使いになっているので、あえてご説明いたしませんけれども、非常にフレキシブルな細かいものを用いております。

これは臨床には看護婦さん 1 人と、それから術者 1 人でやればいいので、十分こういうことにご興味、習練された先生はプライベートクリニックでもおやりになれるはずでございます。

卵管子宮口では、慣れた方は瞬時に見つかります。

現在まで 6 例妊娠しておりまして、分娩しておりますけれども、AID は 1 例、それから、今

度報告を得た6例目はフロースンのAIDでございます。このように応用範囲がだんだん広まりまして、4月のイスラエルの国際体外受精学会に参りまして、GIFT法は、GIFTを開発したアッシュ自身も、もうそれよりもトランスバギナル、トランスサービカルにカテーテルを入れて、そこから受精卵を入れる方法が主流だというふうに言っております。ラパロスコープもよろしいんですけれども、患者さんにとりましては、ラパロといえども針を刺されるということでございますから、トランスバギナル、トランスサービカルにカテーテルをいれれば傷がつかないわけです。しかも、受精卵とか精子、卵を入れてあげるということは今後、だんだん主流になるんじゃないかというふうに感じております。

いろいろな目まぐるしい名前が出てまいりまして、GIFTから受精卵、卵管移植とか、AIH、AIDは分かりますけれども、HITとか、大変略字ばかり出て恐縮でございますけれども、今の若い方はどんどんついていかれますので、私どもにはあんまり目まぐるしくて、メモをしておかないと国際学会でもなかなかわからないというようなところでございます。

今度の国際学会ではいろいろと、自分が開発したんだというので、勝手につくってるものもおりますし、学会でも公認されたと申しますか、そういうのもありますし、これなどはダイレクト・イントラペリトニアル・インセミネーション、要するに、ダグラスに精液を入れて、それで卵管を通してピックアップしてもらおうという、フランス学派がやっていることで、昔、日本でもそのようなことをやった先生おります。私の先輩の山口講師なども昔こんなことをやったような気がいたします。しかし、それはあえて論文になさりませんでしたので、今のところ残っておりませんけれども、いろいろな略字が出てまいりまして、大変戸惑うような、かえって若い先生方のほうがどんどんお進みになっておると思います。

古典的な体外受精のモディファイはいいし、とにかく外国では何か新しい方法、自分の方法、自分の方式ということを主張し、自分のこれを見てもらう、あるいは是認してもらうということが大変なことでございます。そういう点も競争が激しいと言えは激しいので、半年ぐらいたつとガラッと展開するというような感じがいたします。これは体外受精ができたころの古典的な方法からどんどん変わってきているというわけでございます。

ご承知のGIFTも、こちらのほうから入れるのが今に主流になってくるということでございます。

先ほどのべたギフトとか、プロストとか、要するに接合子とか、雌雄前核のころの段階を入れるというのが、いろいろ名前を変えているわけでございます。

4月にイスラエルに行って驚いたことには、マイクロマニプレーションという、名前はどう

でもよろしゅうございますけれども、とにかくこれで臨床例が既に分娩しておるということでございまして、2年前の国際ワールド・コンGRESS・オン・ヒューマン・リプロダクションの折には、オーストラリアのトランソンが予告いたしまして、来年、ですから昨年はもうこれをやるんだというようなことを言うておりました。オーストラリアでも国内ではいろいろ問題があるようでございまして、その学派がシンガポールに行ったり、あるいは同時にロサンゼルスの方でその一派が進めておりまして、今、妊娠中、あるいは生まれたのを含めて数十例を数えるのではないかと思います。これが日本の国内でも研究会がございまして、基礎的な実験に移っているわけでございます。この点も畜産の入谷先生、それから動物の毛利先生のご指示を仰がなければならぬわけでございますけれども、十分な基礎的な研究をし、臨床にはそんなに急ぐことはないと思います。このインセミネーション、私どもが最初取り上げたものとしたしましては、非常に数の少ないものを救うために数百万の単位をいろいろと洗浄するとか、最初はスプリットメソッドとか、2段法とかやってきた者にとりましては、ファイナルな目標としては、このマイクロマニプレーションと申しますが、マイクロファーターゼーションというようなことでいかなければ、救えないものはたくさんあるのではないかという気がいたします。しかし、これはまた不妊学会の方でも倫理委員会がございまして、ご検討をいただくことでございまして、日本産婦人科学会、日本アンドロロジー学会というところでもご検討をいただくことでございまして、外国でやったからすぐ日本で取り入れるとその風土によって違うわけございまして、例えば私が司会をしたセッションではサロゲートマザーはイスラエルという、ああいう人口400万くらいのところでもう100例に達しております。ホストマザーの方、なぜそんなに要求があるのか、遺伝の関係をなくすとか、いろいろなことを言うておりました。その活発なことは大いに分かるんでございますけれども、司会に当たる者、関係者としては複雑な感じがいたしました。

卵を押さえて、精子を中へ挿入する、それから、これは主なテ 表6 家族計画

クニックの1つでございまして、卵胞腔の中に注入する。頭だけとか尾っぽを残してしまうとか、いろいろな方法で工夫をなさっております。来年度はこのシンポジウムが企画されておりますので、大変時宜に適したことと思います。

それからDNA診断、胚についてのエンブリオ・バイオプシーとか、そういうようなことで、もうこれは動物のほうとか畜産のほうでは実験面に応用なさっておりますけれども、染色体の異常

数—	
間隔—	
性の選択	$\left\{ \begin{array}{ll} \text{♂♂} & \bigcirc \\ \text{♀♀} & \bigcirc \end{array} \right.$
伴性遺伝の回避	
X.Y.選別	
羊水分析	染色体診断
C.V.S.	DNA診断

などを見つけるには、分割したものの片割れと申しますか、一部を取って、その異常があるかないかということをやっておるわけでございます。

時代の流れとともに、私自身が経験したこと、私がまだ理解できないこともたくさんございます。しかし、私を考えてみますと、恩師安藤先生のまねばかりしておるような気がいたします。入局した当時も基礎体温、頸管粘液、というようなこともどんどんお始めになる。新し物好きと、少し誇りを受けたようなこともありますけれども、先生自身は世界のいろいろな知識を導入して、それを本邦の若い人々に紹介し、正確な知識をもって教えるのを年来のモットーとなされたということでございます。そのときにもよくおっしゃいました。人工授精をやるということは悲しい夫婦、そういうシチュエーションに置かれた夫婦は悲しいけれども、他人の精子までもらって、自分たちの子として育てるということはまことに見上げた勇気である、それを手助けするのは我々医師の務めである。それまでにディスカッションして別れる者は別れてしまったり、いろいろなことが起きるけれども、それを乗り越えて、自分らの家庭を築いていくと、それに感動して私は始めるということで、そういう熱意と人格があったからこそ、当時いろいろな世相、陰しいときにありましても、安藤先生だから人工授精はまあいいでしょうと、それも許されたと。やはり医師というものは人格というものがなければ、その人の品と申しますか、格がなければ患者の共感は得られないと思います。狭い視野に入りまして、自分はこれをやらないから反対であるという、それも結構でございます。その信念、それは貫いていただければ結構でございますけれども、なるべく途中で変節しないということが大切ではないかと老来感じております。少なくとも、若い人々の邪魔にならないように、自分の固定した観念だけでもって人に押しつけないことというのが安藤先生の教えでございまして、これをあと何年か分かりませんが、一生懸命やっていきたいと思います。「ひたぶるにかそけき道の遠くとも、師の声胸になおも行かなん」という思いでございます。

会長の清水哲也、旭川医大教授、座長の黒田一秀、名誉会員に深く感謝致します。

ご清聴ありがとうございました。

HMG によるラットの過排卵誘起

Induction of Superovulation in Rats using HMG

東京農業大学生物産業学部生物工学研究室

橋 詰 良 一

Ryoichi HASHIZUME

Laboratory of Biotechnology,
Department of Bioindustry,
Tokyo University of Agriculture,
Abashiri 099-24, Japan

日本大学医学部衛生学教室

伊 藤 雅 夫
Masao ITO

丸 瑠璃子
Ruriko MARU

小 澤 英 世
Eisei OZAWA

Department of Hygiene,
School of Medicine,
Nihon University, Tokyo 173, Japan

HMG (閉経期婦人尿性性腺刺激ホルモン) を用いて SD 系ラットの過排卵誘起を検討した。その成績は以下の通りである。

1) HMG を 5, 10, 20, 30 および 40 IU 投与し, 48 時間後に HCG を 5IU 投与して排卵反応を調べた結果, HMG 量は 10 ないし 20 IU が適量で, 30 IU 以上では排卵数の減少が認められた。

2) HMG を 5, 10, 20, および 30 IU 投与し, 48 時間後に HCG を 0, 5, 10 および 20 IU 併用投与して排卵状況を調べた結果, HMG5IU 処置を除き HMG と HCG の併用は排卵に悪影響がみられた。また, 最も良好な成績は HMG 20 IU 単用処置で, 排卵数は 32.0 個であった。

3) 性周期の発情後期 (IV期) の 17:00 を基本処置として HMG の投与適期を検討した結果, HMG は投与タイミングの適確な選択が必要であり, その適期はIV期の 17:00 であると判断された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 433-437, 1990)

緒 言

実験動物を用いて発生工学的研究を進めてゆく上では, まず, 誘起排卵法が重要な基礎技術となる。この誘起排卵法には, 従来から PMSG と HCG を併用投与する過排卵誘起法が主に採用されてきているが, 処置後の反応に個体差が大きくみられることや, 卵子の正常性に問題があることなどが指摘されてきている¹⁻²⁾。特に成熟ラットの過排卵誘起は, 石橋ら³⁾

の研究報告をはじめとして, いくつかの報告⁴⁻⁷⁾がみられるが, 系統によっては PMSG-HCG 法では必ずしも良い成績は得られておらず⁸⁾, いまだ過排卵誘起法の検討の余地が多々残されているのが現状である。

これに対して近年, PMSG に代わる FSH 様製剤として HMG (閉経期婦人尿性性腺刺激ホルモン) が注目されてきており, 同ホルモンは PMSG に比べて排卵反応の個体差が小さいことや, 投与タイミングの適確な選択により安定した排卵反応が得られるこ

となどが指摘されてきた⁹⁻¹⁰⁾。そこで本実験では、発生工学研究の基礎技術の開発を目的としてラットの過排卵誘起を試み、HMG の投与量、HCG との相互関係および性周期における投与適期等について検討し興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

供試したラットは SD 系の成熟未経産雌である。ラットの飼育は室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ を目標に制御した飼育室内で行ない、照明は朝 6 時から夜 8 時までの 14 時間とした。飼料は育成用固形飼料(オリエンタル酵母工業 KK)を用い水とともに不断に給与した。

過排卵処理は、膣スメア検査法により発情周期を 2 サイクル確認できた動物に対して発情後期(IV期)の 17:00 に HMG (ヒュメゴン、オルガノン社)を投与し、48 時間後に HCG (動物医薬品検査所標準品)を投与して雄と交配させる方法を基本処置とした。

排卵の検査は、交配の翌日に交尾を確認できた雌について次の日の夜 7 時～8 時にラットを屠殺し、卵管内の 4-cell 卵子を灌流して顕微鏡下でその数と分割状況を記録した。

実験は次の 3 つに分けて行なった。

[I] HMG の適量を決定するため、同ホルモンを 5, 10, 20, 30 および 40 IU 投与し、48 時間後に HCG を 5IU 投与して排卵反応を調べた。

[II] HMG と HCG の相互関係を見るため、HMG を 5, 10, 20 および 30 IU 投与し、48 時間後に HCG を 0, 5, 10, および 20 IU 併用投与して排卵状況を調べた。

[III] HMG の性周期における投与適期を調べるため、IV期の 17:00 投与を基本処置としてそれより前後 3 および 6 時間 HMG 投与をずらした場合の排卵反応を調べた。さらに、発情休止期(V期)の 17:00 投与についても検討した。

結 果

HMG を 5, 10, 20, 30 および 40 IU 投与し、48 時間後に HCG を 5IU 投与して排卵反応を調べた結果は Table 1 に示したとおりである。Table 1 からあきらかなように HMG の各投与量でそれぞれ 15.3, 21.5, 22.5, 21.4, および 19.4 個の排卵数が得られ、その内正常分割卵子(4-cell 卵子)はそれぞれ 12.5, 20.8, 18.6, 14.6 および 15.2 個(正常分割率, 82, 96, 82, 68 および 79%)であった。この結果から、HMG 量は 10 ないし 20 IU が適量であり、投与量が 30 IU 以上に増加すると排卵数は減少することが示された。

HMG を 5, 10, 20 および 30 IU 投与し、48 時間後に HCG を 0, 5, 10 および 20 IU 併用投与して排卵状況を調べた結果は Table 2 に示したとおりであり、Fig. 1 はその結果を図によって示したものである。Table 2 および Fig. 1 からあきらかなように、HMG5IU 投与では HCG の併用処置で排卵数が多く認められ、HCG10IU 併用で 20.8 個、次いで 20 IU 併用で 17.8 個の卵子が認められた。しかし、HMG 量が増加するにつれてこの結果は逆転し、HCG 併用量が高いほど排卵数は低下する傾向が認められた。すなわち、HMG 10, 20 および 30 IU 投与では、HCG を投与しない処置(0IU, HMG 単用)が最も高い排卵数を示し、最高の成績は HMG20IU 単用処置で 32.0 個の排卵数を認めた。一方、HCG 併用量が 5, 10 および 20 IU と増加するにつれて排卵数は減少し、HCG20IU 併用では各実験区とも最低の排卵数であった。この結果から、HMG5IU 処置を除き HMG と HCG の併用は排卵に悪影響を及ぼすものと考えられ、最も良好な過排卵誘起法は、HMG20IU 単用処置であった。

性周期の IV期の 17:00 を基本処置として、HMG の投与適期を検討した結果は Table 3 に示したとおりであり、Fig. 2 はその結果を図によって示したも

Table 1. Ovulatory responses in rats treated with HMG and HCG

HMG dose (IU)	HCG dose (IU)	No. of rats used	No. of rats ovulated (%)	Mean no. of ova ovulated	Mean no. of ova cleaved nomally	% of ova cleaved nomally
5	5	5	4 (80)	15.3 $\pm$ 1.3	12.5 $\pm$ 5.8	82.0
10	5	10	8 (80)	21.5 $\pm$ 13.1	20.8 $\pm$ 12.8	96.5
20	5	11	11 (100)	22.5 $\pm$ 9.3	18.6 $\pm$ 8.1	82.7
30	5	5	5 (100)	21.4 $\pm$ 2.9	14.6 $\pm$ 6.8	68.2
40	5	5	5 (100)	19.2 $\pm$ 9.3	15.2 $\pm$ 8.5	79.2

$\bar{X} \pm \text{S.D.}$

Table 2. Ovulatory responses in rats treated with HMG and HCG

Treatment	No. of rats used	No. of rats ovulated (%)	Mean no. of ova ovulated	Mean no. of ova cleaved nomally	% of ova cleaved nomally
Control	7	7 (100)	12.3± 3.3	11.7± 3.1	95.3
HMG 5IU					
HCG 0IU	4	4 (100)	16.3± 6.4	15.3± 7.1	93.8
5IU	5	4 (80)	15.3± 1.3	12.5± 5.8	82.0
10IU	4	4 (100)	20.8± 4.1	20.3± 4.2	97.6
20IU	4	4 (100)	17.8± 2.5	17.0± 2.4	95.8
HMG 10IU					
HCG 0IU	4	4 (100)	22.8± 4.3	17.3± 4.5	75.8
5IU	10	8 (80)	21.5±13.1	20.8±12.8	96.5
10IU	4	2 (100)	16.5±12.0	16.5±12.0	100.0
20IU	3	3 (100)	14.7± 9.0	14.3± 8.5	97.7
HMG 20IU					
HCG 0IU	6	6 (100)	32.0± 7.1	27.7± 5.8	86.5
5IU	11	11 (100)	22.5± 9.3	18.6± 8.1	82.7
10IU	6	6 (100)	16.7± 6.3	14.3± 6.4	86.0
20IU	4	3 (75)	13.0± 4.0	7.7± 3.2	59.0
HMG 30IU					
HCG 0IU	4	2 (100)	24.0±21.2	23.0±21.2	95.8
5IU	5	5 (100)	21.4± 2.9	14.6± 6.8	68.2
10IU	4	2 (100)	10.5± 7.8	9.5± 7.8	90.5
20IU	4	2 (50)	7.0± 2.8	6.5± 2.1	92.9

$\bar{X} \pm S.D.$

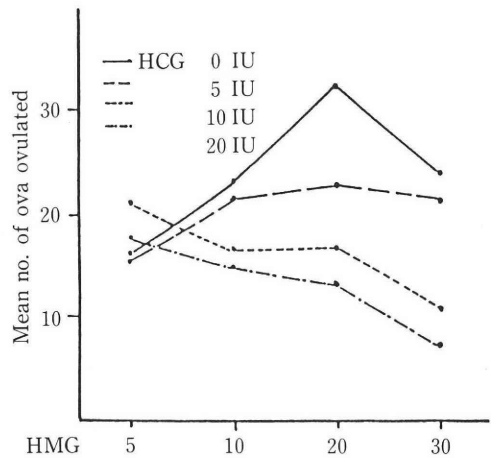


Fig. 1 Ovulatory responses in rats treated with HMG and HCG

のである。Table 3 および Fig. 2 からあきらかなように、IV期の 17：00 を上まわる排卵数は HMG20IU 単用 (I) および HCG5IU 併用 (II) のいずれの実験区においても得られなかった。14：00 処置では 17：

00 処置に類似した結果が得られたものの、他の処置時間では排卵数および正常卵子数のいずれも基本処置より少なかった。また、発情後期 (V期) 投与では 17：00 投与でも過排卵誘起は起きなかった。この結果から、HMG は投与タイミングの適確な選択が必要であり、その適期はIV期の 17：00 であることが明らかとなった。

考 察

外因的に性腺刺激ホルモン (GTH) を投与し過排卵誘起を行なう場合、卵巣への過剰刺激が問題となる。すなわち、石島ら¹¹⁾は、PMSG と HCG の投与により家兎卵巣に異常卵胞が出現することを認めており、特に血胞が投与後 30 日以上長期にわたって持続するとしている。また、今井ら¹²⁾は、PMSG 投与後卵巣組織を検索した結果、卵胞閉鎖が PMSG の投与量に従って増加することを認めており、GTH の卵巣への過剰な刺激は結果的には排卵数の減少を誘発する。

これに対して、HMG は閉経期婦人尿を原料として

Table 3. Effect of treated times on ovulation induced with HMG

Times of HMG treated	Group [#] of treated	No. of rats used	No. of rats ovulated (%)	Mean no. of ova ovulated	Mean no. of ova cleaved nomally	% of ova cleaved nomally
Metaestrus						
11:00	I	10	10 (100)	19.0±8.6 ^a	18.0±8.7 ^a	94.7
	II	6	3 (50)	11.0±5.6	7.0±4.4	63.6
14:00	I	8	8 (100)	29.8±13.6	27.6±13.2	92.9
	II	4	4 (100)	22.8±6.4	20.8±2.8	91.2
17:00	I	6	6 (100)	32.0±7.1	27.7±5.8	86.5
	II	11	11 (100)	22.5±9.3	18.6±8.1	82.7
20:00	I	7	7 (100)	21.4±10.5	13.1±7.0	61.3
	II	6	6 (100)	12.8±12.1	9.5±10.8	74.0
23:00	I	4	3 (75)	9.7±6.7	8.0±4.2	55.2
	II	6	6 (100)	8.7±4.9	3.8±5.9	44.2
Diestrus						
17:00	I	9	8 (89)	17.3±5.6	14.0±5.2	81.2

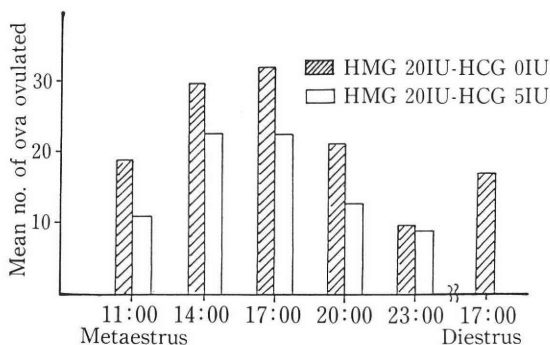
[#] I: HMG 20IU±HCG 0IU, II: HMG 20IU±HCG 5IU^a Mean±S.D.

Fig. 2 Effect of treated times on ovulation induced with HMG

製造された FSH 活性を有する下垂体性性腺刺激ホルモンであるが、動物胎内に投与された場合には PMSG に比べて半減期が短く、不要な残留による過剰刺激がない⁹⁻¹⁰⁾。また、過排卵後 Progesterone の急上昇および LH サージ等のタイミング良い開始も認められ⁹⁻¹⁰⁾、HMG は PMSG にくらべて卵巣刺激の少ない優れた GTH であると言える。この HMG の特徴は、ラットを用いた本実験においても、HMG 単用処置で排卵陽性率が 100% であることに顕著に現われているものと思われ (Table 2)、卵巣への刺激が軽度であることから、自然発情の回帰や LH サージ等が順調に進行したものと考えられる。

しかし、Table 1 に示されるように HMG の過剰な投与は、かえって排卵数の減少をきたし、HMG にも Over dose があることを示唆している。Over dose

については PMSG-HCG 併用処置で詳細に検討されており、伊藤ら¹¹⁾は、PMSG がある一定量を越えて排卵を抑制した場合は、HCG の併用量を高くしても排卵は改善されないとしている。本実験でも Table 2 に示すように、排卵が低下し始める 30 IU 処置では HCG の併用量を増加しても排卵数の回復は認められておらず、HMG の Over dose は HCG の併用量とは無関係に出現する可能性があることを示唆している。

また、同じく Table 2 に示されるように、HMG5IU 処置を除いて、HMG 10, 20 および 30 IU 処置では、HCG 併用量が増加するにつれて排卵数が減少する傾向が認められた。このような HCG による排卵の抑制は、伊藤ら¹¹⁾によると PMSG と同様に HCG の Over dose であると考えられており、この Over dose は前処置される PMSG の投与量により変化するとしている。本実験でも HMG 10, 20 および 30 IU 処置では HCG5IU 併用投与から排卵の抑制が始まっているが、HMG5IU 処置では HCG20IU 併用投与でも排卵の抑制は認められていない。すなわち、HMG を用いた過排卵誘起においても、PMSG と同様に HMG の前処置量によって HCG の Over dose は変動するものと考えられる。

性周期における HMG の投与適期は、Table 3 および Fig. 2 に示されるように、IV 期の 17:00 に特異的に認められた。マウスにおいても IV 期の 24 時が PMSG の投与適期であり、周期が進むにつれて排卵反応は低下し、発情期 (III 期) 処置が最低であると

されている¹³⁾。このように、投与適期がIV期に存在する理由は不明であるが、血中のFSHおよびLH量がIV期に低値を示すことはラット¹⁴⁾やマウス¹⁵⁾で報告されている。すなわち、IV期は外因的に与えられたGTHと体内のGTHとの交互作用が比較的少ない時期であると予想され、このことが外因性GTHの働きを効率良くしている一つの原因かもしれない。

なお、HMGには含有されるFSHとLHの量比が低い製剤(低FSH/LH製剤、本実験で用いたヒュメゴン)と高い製剤(高FSH/LH製剤)とがあり、その比によっては性腺への刺激が大きく異なることが明らかとなってきた¹⁶⁾。そこで、今後は未検討の高FSH/LH製剤の有用性についても検討してみる必要があるものと考えられる。

稿を終るにあたり、御指導・御校閲を賜った当研究室下村徹教授ならびに、生物生産学科長石島芳郎教授に謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) 伊藤雅夫, 横尾芳夫, 関秀雄, 萩島浩, 野入五男, 石川明芳: 過排卵処理マウスにおけるPMSおよびHCGの投与量と排卵数の関係, 日大医誌, 35: 117, 1976
- 2) 伊藤雅夫: 誘起排卵の異常, 産婦人科Mook, 19: 234, 1982
- 3) 石橋功: 過排卵ラット卵子の形態的研究, I. 性腺刺激ホルモン投与後の成熟ラットの排卵数について, 家畜繁殖誌, 12: 127, 1967
- 4) Husain, S. M.: Facilitation of gonadotrophin-induced ovulation in adult rats by estrogens, *Revue can. Biol.*, 28: 137, 1969
- 5) 石橋功: 種々の量のPMSGとHCGを投与した成熟ラットにおける排卵数と受精および発育について, 家畜繁殖誌, 29: 1, 1983
- 6) 利部聡: 成熟ラットにおけるPMSG投与後の大型卵胞の消長ならびに過排卵処理後の排卵数におよぼすベントバルビタールの影響, 家畜繁殖誌, 29: 20, 1983
- 7) 高橋寿太郎, 伊藤敦, 安田寿久: 下垂体抽出液投与によるラットの過排卵誘起と初期発生の観察, 哺乳卵研誌, 2: 115, 1985
- 8) 石島芳郎, 藤本秀典: 成熟ラット (Sprague-Dawley系)の過排卵に及ぼす日齢の影響, 畜産の研究, 31: 1126, 1977
- 9) Lauria, A., Genazzani, A. R., Oliva, O., Inandi, P., Gremonesi, F., Monittola, C. and Anreli, G.: Clinical and endocrinological investigation on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin, *J. Reprod. Fert.*, 66: 219, 1982
- 10) Lauria, A., Oliva, O., Genazzani, A. R., Cremonesi, F., Crotti, S. and Barbetti, M.: In-

proved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotrophin (HMG), *Theriogenology*, 18: 357, 1982

- 11) 石島芳郎, 石田一夫: 過排卵処理によって誘起された家兔血胞の日数経過にともなう形態変化, 家畜繁殖誌, 16: 126, 1971
- 12) 今井俊武, 笹本修司, 鈴木俊郎: 性腺刺激ホルモン (PMS および HCG) 投与幼若マウス卵巣の組織学的研究, 家畜繁殖誌, 10: 114, 1965
- 13) 伊藤雅夫, 小松博道: マウスの過排卵誘起におけるPMS投与 timing について, 第70回日本畜産学会大会講演要旨, 1979
- 14) Butcher, R. L., Collins, W. E. and Fugo, N. W.: Plasma concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat, *Endocrinology*, 94: 1704, 1974
- 15) Kovacic, N. and Parlow, A. F.: Alternations in serum FSH/LH ratios in relation to the estrous cycle, pseudopregnancy, and gonadectomy in the mouse, *Endocrinology*, 91: 910, 1972
- 16) 淵利雄, 石丸忠之, 黄宏駿, 増崎英明, 鮫島哲郎, 藤下晃, 山辺徹: HMG-HCG投与時の副作用発現因子に関する考察—家兎による実験的検討—, 臨婦産, 39: 895, 1985

Induction of superovulation in rats using HMG

Ryoichi Hashizume
Laboratory of Biotechnology,
Department of Bioindustry,
Tokyo University of Agriculture,
Abashiri 099-24, Japan

Masao Ito, Ruriko Maru and Eisei ozawa
Department of Hygiene,
School of Medicine,
Nihon University, Tokyo 173, Japan

The superovulatory response of rats injected with various doses of HMG (human menopausal gonadotrophin) and HCG 48 hours later was examined. Furthermore, the optimum time of HMG administration was also examined. The results obtained were as follows.

- 1) Number of ovulated ova tended to increase by higher dose of HMG within the limit of 20IU. 30IU of HMG was probably over dose for rats.
- 2) The maximal ovulation was induced with 20IU of HMG administration alone.
- 3) The optimum time of HMG administration was 17:00 at metestrus of the estrus cycle.

(受付: 1989年11月20日)

レセルピン投与ラットへの胚盤胞移植

1. 胎児重量について

Blastocyst Transplantation in Reserpine-Induced Pseudopregnant Rats

1. Fetal weight

信州大学農学部家畜繁殖学教室

辻 井 弘 忠

Hirohada TSUJII

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

ラットの受精卵移植において、レシピエントの偽妊娠誘起法の違いが移植後の胚の発育に及ぼす影響について調べた。

偽妊娠誘起は、①レセルピン投与(1 mg/kg)、②精管結紮雄、③発情前期電気刺激、④発情期電気刺激の4群で行った。その結果、各偽妊娠誘起法による偽妊娠期間の違いはみられなかった。偽妊娠5日目に妊娠5日目の胚盤胞を移植したところ、発情前期電気刺激群の胎児発生率ならびに着床生存率は他の群に比べて有意に低かったが、他の群において着床率、胎児重量、胎盤重量は有意な差はみられなかった。次に、偽妊娠4日目に妊娠5日目の胚盤胞を移植したところ、レセルピン投与群と精管結紮雄群の着床率、胎児発生率には差がみられなかった。しかし、レセルピン投与群の胎児重量は精管結紮雄群より有意に重かった。また、偽妊娠5日目に移植した場合より偽妊娠4日目に移植した場合の方が、胎児重量が有意に大であった。これら胎児重量の増加の原因は、子宮内膜の感受性の差によって生じたものと推察した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 438—443, 1990)

諸 論

受精卵の移植において、ドナーとレシピエントの発情日が同一であることが望ましい。すなわち卵子を取り巻く環境、内分泌状態を同じくして着床しやすくするためである。ラットのレシピエントの場合、内分泌的条件すなわち黄体相の成立が不可欠である¹⁾。

ラットの受精卵の移植において、レシピエントの偽妊娠誘起法の違いと移植した胚の着床率との関係を論じた報告は Banik and Ketchel²⁾と Mantalena-kis and Ketchel³⁾の報告しかない。また、これらの報告はいずれも性ステロイドホルモンやプロラクチン投与による偽妊娠誘起したもので、レセルピン投与により誘起した偽妊娠ラットに受精卵を移植した

報告例はない。

著者ら^{4,5)}はレセルピン投与による偽妊娠誘起ラットと精管結紮雄による偽妊娠誘起ラットの脱落膜反応について比較したところ、子宮内膜の感受状態に差異があることを見出した。そこで、子宮内膜の感受性に差異のあるレセルピン投与、精管結紮雄による偽妊娠誘起ラットに受精卵移植した場合、偽妊娠誘起法の違いが移植した胚の着床以降の発生にどのような影響を及ぼすかを検討することを目的とした。

実験1 レセルピン投与、精管結紮雄、電気刺激によって偽妊娠誘起した場合の各偽妊娠期間について調べた。

実験2 レセルピン投与、精管結紮雄、電気刺激によって偽妊娠誘起し、偽妊娠5日目の子宮に妊娠

5日目の胚盤胞を移植して、着床ならびに胎児への発生について比較検討した。

実験3 レセルピン投与、精管結紮雄によって偽妊娠誘起し、偽妊娠4日目の子宮に妊娠5日目の胚盤胞を移植して、着床ならびに胎児への発生について比較検討した。

材料および方法

当研究室において、系統維持しているウィスター系雌ラット、4日周期を2回以上示した90~150日齢(体重210~370g)のものをを用いた。飼育条件は、12時間明/暗(午前6時点燈)、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、市販の固形飼料ならびに水は自由摂取とした。

ラットの偽妊娠誘起は以下の4群で行った。

- (1)レセルピン群：レセルピンによる偽妊娠誘起は、レセルピン(半井化学)をBennett and Kendle⁶⁾による方法で調整し、発情後期の午前9時~10時に体重1kg当たり1mg皮下注射を行った。レセルピン投与前日の発情期を偽妊娠第1日とした。
- (2)精管結紮雄群：精管結紮雄による偽妊娠誘起は、発情前期像を示した雌を同系統の精管結紮雄と一晚同居させ、翌日腔栓を確認し、確認した日(発情期)を偽妊娠第1日とした。
- (3)発情前期電気刺激群：腔垢像が発情前期を示した日の夕方、先端に電極のついたガラス棒を腔内に挿入し約1秒間隔で断続的に5回、交流電流(55V)

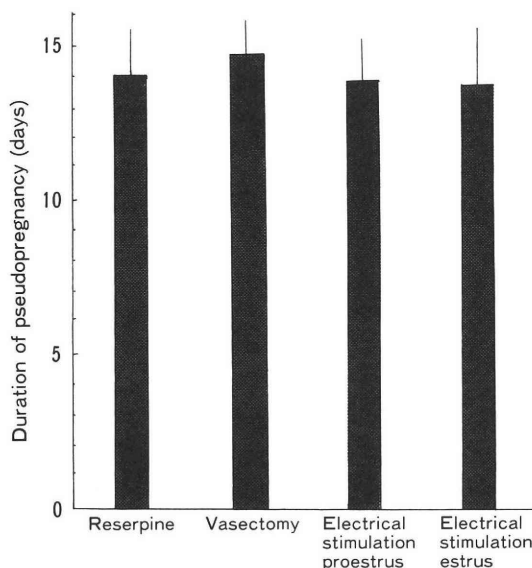


Fig. 1 Duration of pseudopregnancy in the Reserpine-, Vasectomy- and Electrical stimulation- pseudopregnancy groups. Vertical lines represent standard deviations.

を流し子宮頸を刺激した。

(4)発情期電気刺激群：腔垢像が発情期を示した日の早朝、上記と同様に電気刺激を行った。

胚盤胞の採取は、腔垢像が発情前期を示した雌を正常雄と一晚同居させ、翌日腔垢中の存在により交尾を確認し、妊娠1日とした。妊娠5日目の午前8時頃、開腹し、Dulbecco Phosphate-buffered saline (pH 7.3)で子宮を灌流し採卵を行った。実体顕微鏡で形態的に異常の認められなかった胚盤胞を移植に供した。胚盤胞の移植は、偽妊娠5日目の午前8時頃、レシピエントにペントバルビタールナトリウム(アボットラギラトリーズ社製)を0.6 ml/kg腹腔内注射して麻酔し、腹位に保定後、両側腹部を約2cm切開した。切開部から子宮を引き出して卵管側の端に針で穴をあけ、約1 μl の液中に9~10個の胚盤胞をマイクロシリンジを用いて子宮内に移植した。

着床数の検査は、妊娠12日目のレシピエントをエーテル麻酔下で背位に保定し、腹部正中線に沿って切開、子宮に認められた着床胚の数をもって着床数とした。移植した胚盤胞数に対する着床数の割合を百分率で表わし、着床率とした。

剖検は、妊娠20日の昼頃頸椎切断後、子宮から生存胎児、胎盤を取り出した。移植した胚盤胞数に対する生存胎児数の割合を胎児発生率とした。また、着床数に対する生存胎児数の割合を着床胚生存率とした。胎児および胎児重量は、トーションバランスを用いて測定した。胎児の雌雄は、胎児の肛陰距離および解剖による性腺の観察によった。

1. 偽妊娠誘起法と偽妊娠期間

上述の4群の偽妊娠誘起をそれぞれ10例ずつ行った。腔垢像を連日採取し、偽妊娠第1日より腔垢像中に白血球の見られた最後の日までを偽妊娠期間とした。

2. 偽妊娠5日目の子宮への胚盤胞移植

上述の4群の偽妊娠誘起ラットの偽妊娠5日目の子宮に各群12例ずつ胚盤胞を移植した。

3. 偽妊娠4日目の子宮への胚盤胞移植

精管結紮雄群とレセルピン群の偽妊娠4日目の子宮に各群12例ずつ移植を行った。剖検は妊娠19日と妊娠20日に分けて行った。

有意検定は分散分析、t検定または χ^2 検定で行ない、5%の有意水準をもって有意差とした。

結 果

1. 偽妊娠誘起法と偽妊娠期間

4群の全個体が偽妊娠誘起した。各群の平均偽妊娠期間をFig. 1に示した。レセルピン群14.1日、精

Table 1. Implantation and fetal development of blastocysts transferred to 5-day pseudopregnant rats.

Groups of treatment	No. of recipients	No. of blastocysts transferred	Implantation sites	Viable fetuses	% of survival fetuses (B/A)
			No. (A) (%)	No. (B) (%)	
Reserpine	12	116	83 (72)	51 (44)	61
Vasectomy	12	121	87 (72)	59 (49)	68
E.s. proestrus	12	116	85 (73)	34 (29)*	40*
E.s. estrus	12	109	75 (69)	52 (48)	69

E.s. = Electrical stimulation

* Significant difference from other three groups ($P < 0.05$).

Table 2. Fetal sex ratios, fetal weights and placental weights on day 20 of pregnancy in the rats transferred blastocysts on day 5 of pseudopregnancy.

Groups of treatment	No. of males : females (%)	Fetal weights g*	Placental weights mg*
Reserpine	28 : 23 (54.9)	2.31 ± 0.26	386 ± 64
Vasectomy	28 : 31 (47.5)	2.26 ± 0.28	399 ± 67
E.s. proestrus	19 : 15 (55.9)	2.31 ± 0.38	417 ± 89
E.s. estrus	28 : 24 (53.8)	2.36 ± 0.24	402 ± 60

E.s. = Electrical stimulation

* Mean ± S.D

Table 3. Implantation and fetal development of blastocysts transferred to 4-day pseudopregnant rats.

Groups of treatment	No. of recipients	No. of blastocysts transferred	Implantation sites	Viable fetuses	% of survival fetuses (B/A)
			No. (A) (%)	No. (B) (%)	
Reserpine	12	115	104 (90)	62 (54)	60*
Vasectomy	12	132	110 (83)	81 (61)	74

* Significant difference between the two values ($P < 0.05$).

Table 4. Fetal sex ratios, fetal weights and placental weights in the rats transferred blastocysts on day 4 of pseudopregnancy.

Day of pregnancy at autopsy	Groups of treatment	No. of males : females (%)	Fetal weights g**	Placental weights mg**
19	Reserpine	25 : 11 (30.6)	2.24 ± 0.19	401 ± 49
	Vasectomy	17 : 20 (45.9)	1.92 ± 0.28	372 ± 43
20	Reserpine	16 : 10 (61.5)	3.52 ± 0.40	402 ± 68
	Vasectomy	21 : 23 (47.7)	3.00 ± 0.55	403 ± 60

* Significant difference between the two values ($P < 0.05$).

** Mean ± S.D

管結紮雄群 14.8 日, 発情前期電気刺激群の 13.9 日, 発情期電気刺激群の 13.8 日と, 4 群とも有意な差は認められなかった ($F_{3,8}=0.89$).

2. 偽妊娠 5 日目の子宮への胚盤胞移植成績

4 群の着床率, 胎児発生率および着床胚生存率を Table 1 に示した. 48 匹のドナーから採取した 503 個の卵子のうち 462 個の胚盤胞を移植したところ, 48 例すべてが受胎した. χ^2 検定の結果, 着床率には各群間に有意差が認められなかった ($\chi^2=1.78$). 胎児発生率および着床胚生存率ではレセルピン群, 精管結紮雄群, 発情期電気刺激群は各群間に有意差がみられなかった (胎児発生率 $\chi^2=0.59$, 着床胚生存率 $\chi^2=1.28$). しかし, 発情前期電気刺激群の胎児発生率, 着床胚生存率は他のいずれの群より有意に低かった (胎児発生率 $\chi^2=11.51$, 着床胚生存率 $\chi^2=19.02$).

移植した 4 群の雌雄胎児数, 胎児および胎盤の平均重量を Table 2 に示した. 胎児の性比はレセルピン群 54.9 %, 精管結紮雄群 47.5 %, 発情前期電気刺激群が 55.9 %, 発情期電気刺激群が 53.8 % と有意差がなかった. 胎児重量, 胎盤重量とも分散分析の結果, 群間に有意差が認められなかった (胎児重量 $F_{1,92}=1.10$, 胎盤重量 $F_{1,92}=1.38$).

3. 偽妊娠 4 日目の子宮への胚盤胞移植成績

4 群の着床率, 胎児発生率および着床胚生存率を Table 3 に示した. 24 匹のドナーから採取した 250 個のうち 247 個の胚盤胞を移植したところ 24 例すべてが受胎した. レセルピン群と精管結紮雄群を比較すると着床率, 胎児発生率には有意差がみられず (着床率 $\chi^2=2.68$, 胎児発生率 $\chi^2=1.40$), 着床胚生存率は精管結紮雄群の方が有意に高かった ($\chi^2=4.79$).

レセルピン群の性比は雄 41 に対して雌 21 で 66.1 % と有意差が認められた ($\chi^2=6.45$). しかし, 精管結紮雄群の対比は雄 38 に対して雌 43 で 46.9 % と有意差はなかった ($\chi^2=0.31$).

レセルピン群と精管結紮雄群の胎児重量, 胎盤重量を Table 4 に示した. 胎児重量は妊娠 19 日, 20 日ともレセルピン投与群の方が精管結紮雄群より有意に大であった (妊娠 19 日 $t_0=5.767$, 妊娠 20 日 $t_0=4.189$). また, 胎盤重量は妊娠 19 日では精管結紮雄群よりレセルピン群の方が有意に大であった ($t_0=2.635$) が, 妊娠 20 日では両群間に有意差がみられなかった. ($t_0=0.070$).

偽妊娠 4 日目と 5 日目の移植成績を比較すると, レセルピン群において, 着床率は偽妊娠 4 日目移植の方が有意に高かったが ($\chi^2=13.35$), 胎児発生率, 着床胚生存率には有意差がみられなかった (胎児発生

率 $\chi^2=2.29$, 着床胚生存率 $\chi^2=0.06$). 妊娠 20 日で剖検時の胎児重量は偽妊娠 4 日目移植の方が有意に大であった ($t_0=13.896$). また, 両者間の胎盤重量には有意差がみられなかった. ($t_0=1.062$). 精管結紮雄群において, 着床率, 胎児発生率は偽妊娠 4 日目移植の方が 5 日目移植より有意に高かった (着床率 $\chi^2=4.79$, 胎児発生率 $\chi^2=4.06$) が, 着床胚生存率には有意差がみられなかった ($\chi^2=0.80$). また, 胎児重量は偽妊娠 4 日目移植の方が 5 日目移植より有意に大であった ($t_0=8.216$) が, 両者間の胎盤重量には有意差がみられなかった ($t_0=0.348$).

考 察

Barraclough and Sawyer⁷⁾はラットの発情後期にレセルピン 1 mg/kg 投与により, 偽妊娠誘起率 100 % を得ている. また, Kisch⁸⁾は発情後期にレセルピン 0.75–1.5 mg/kg 投与したところ, ラットの偽妊娠誘起率は 94 %, 平均偽妊娠期間は 13.0 日であり, 子宮頸を電気刺激したラットとほぼ同様であったと報告している. これらは本報告の結果と同じであった.

ラットは子宮頸への刺激により黄体相を獲得する¹⁾. Smith et al⁹⁾はラット子宮頸の刺激後, プロラクチンが 1 日 2 度の律動的サージ (diurnal および nocturnal surge) を示すことを報告している. 一方, レセルピン投与されたラットにおいてプロラクチンの放出を促進する¹⁰⁾ことが知られている. このようにラットの偽妊娠を誘起する上でプロラクチンが第一義的な黄体刺激の割合を果たし, 黄体相を獲得するかあるいは性周期を回帰するかは, この時点に十分量のプロラクチンが存在するか否かに関わるものと考えられている¹⁾.

ラット受精卵移植における着床率は Banik and Ketchel¹¹⁾ 57 %, Mantalenakis and Ketchel¹²⁾ 76 %, Yoshinaga and Adams¹³⁾ 66 %, また, 胎児発生率は Noyes and Dickmann¹⁴⁾ 58 %, Noyes et al¹⁵⁾ 16 %, Mantalenakis and Ketchel¹²⁾ 64 %, Vickery et al¹⁶⁾ 50 % と報告している. 本報告の移植成績は, これらの報告に劣らない成績であった.

子宮頸の刺激によらない偽妊娠誘起法でラット受精卵移植に応用された例は, Mantalenakis and Ketchel¹²⁾がプロジェステロン投与で着床率 66 %, 胎児発生率 7 %, メドロキシプロジェステロン投与で着床率 74 %, 胎児発生率 59 %, また, プロラクチン投与で着床率 71 %, 胎児発生率 54 %, Yoshinaga and Adams¹³⁾がプロジェステロン投与で着床率 52 %, さらにまた, Banik and Ketchel¹²⁾がプ

ロラクチン投与で着床率 50 % であったと報告している。これらはいずれも 8 日間各ホルモンを投与した例で、単一投与の例は Banik and Ketchel²⁾がプロジェステロン単一投与によって誘起した偽妊娠ラットに胚盤胞の移植を試みたが着床はみられなかったと報告している。これらのことから本実験のレセルピン投与は単一投与による偽妊娠誘起であり、かつ上述の着床成績に劣らない結果であった。

Chatterjee and Harper¹⁷⁾は妊娠ラットにレセルピン (0.5 mg/kg) を妊娠 2 日から 6 日まで連日投与するか、または妊娠 6 日から 13 日まで連日投与すると着床後の胚の生存が阻害されると報告している。本実験はレセルピン投与後 3 日目に胚の移植を行ったためか、移植した胚盤胞の着床あるいは着床後の生存に悪影響は現れなかったものと思われた。

Noyes and Dickmann¹⁴⁾は、ラット妊娠 5 日齢胚の移植において、胎児発生率ならびに胎児重量は偽妊娠 5 日目より 4 日目に移植した方が高いと報告している。本実験のレセルピン群および精管結紮雄群においても同様の結果を得た。胎児重量が増えることについて、Noyes et al¹⁵⁾は妊娠 5 日齢胚は偽妊娠 4 日目の子宮に移植されても着床時期は早まらず、移植胚が着床前に付加された 1 日の間に成長したためと推察している。

ラットの性比について、当教室で出産した 53 匹で調べたところ総産仔数 597 匹で、雄 303 に対して雌 294、性比 50.8 % で理論値の 50 % と有意差はみられなかった ($\chi^2=14$)。偽妊娠 4 日に胚移植したレセルピン投与群の胎児性比は、66.1 % (雄 41, 雌 21) で雄が雌より有意に多かった。Toyoda and Chang¹⁸⁾はラットの体外受精で受精卵をレシipientに移植したところ、例数は少ないが雄の胎児が有意に多かったと報告している。偽妊娠 4 日目のレセルピン投与群では移植後レシipientの子宮から何らかの影響で雌が淘汰されたことが推察された。

レセルピン群の偽妊娠 4 日目移植時の胎児重量は、偽妊娠 4 日目および 5 日目移植の精管結紮雄群の胎児重量よりも有意に重かった。一般に雄胎児の方が雌胎児より重いのでレセルピン群と精管結紮雄群の胎児重量を雄および雌同士で比較すると、19 日剖検、雄 2.27 : 1.96 g, 雌 2.20 : 1.89 g, 20 日剖検、雄 3.57 : 3.02 g, 雌 3.44 : 2.98 g といずれもレセルピン群の方が大であった。しかし、偽妊娠 5 日目移植のレセルピン群と精管結紮雄群の胎児重量には差がみられなかったにもかかわらず偽妊娠 4 日目に移植した場合に差異がみられたのは、両者間には子宮環境の差異が存在すると考えられる。著者らはレセル

ピン群と精管結紮雄群の脱落膜反応⁴⁾ならびに子宮内膜の準備期細胞増殖⁵⁾に大きく差異がみられたのは偽妊娠 4 日目で、偽妊娠 5 日目では両者間に差異がないことを報告した。つまり、子宮内膜の感受性が異なる日と胎児重量に差をもたらした移植日が同じ偽妊娠 4 日目であった。また、前述の Noyes and Dickmann¹⁴⁾および本実験で、偽妊娠 4 日目と 5 日目との間に胎児重量に差が生じた理由と同様、レシipientの子宮内膜の感受性の違い、すなわち移植した卵子の着床時期の違いが、着床前の胚盤胞の一時的な成長を招き、胎児重量に差異を生じさせたと思われる。今後さらに着床時期等について検討する必要があると思われた。

文 献

- 1) 鈴木善祐：ホルモンと生殖(II)，65，学会出版センター，1979
- 2) Banik, U. K. and Ketchel, M. M.: Hormonal induction of pseudopregnancy in rats, J. Reprod. Fert., 10:85, 1965
- 3) Mantalenakis, S. J. and Ketchel, M. M.: Pseudopregnant recipients for blastocyst transfer in rats, Int. J. Fert., 11:318, 1966
- 4) 辻井弘忠：レセルピン投与ラットにおける脱落膜反応について，日不妊会誌，34 (2) : 165, 1989
- 5) 辻井弘忠：レセルピン投与ラットにおける子宮内膜の細胞増殖について，日不妊会誌，34 (3) : 474, 1989
- 6) Bennett, J. P. and Kendle, K. E.: The effect of reserpine upon the rate of egg transport in the fallopian tube of the mouse, J. Reprod. Fert., 13: 345, 1967
- 7) Barraclough, C. A. and Sawyer, C. H.: Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine, Endocrinology, 65: 563, 1959
- 8) Kisch, E. S.: Disparity between the states of pseudopregnancy induced by reserpine and by cervical stimulation in the rat, Acta Endocr., 67: 203, 1971
- 9) Smith, M. S., Freeman, M. E. and Neill, J. P.: The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy, Endocrinology, 96: 219, 1975
- 10) Lu, K. H., Amenomori, Y., Chen, C. and Meites, J.: Effect of central acting drugs on serum and pituitary prolactin levels in rat, Endocrinology, 87: 667, 1970
- 11) Banik, U. K. and Ketchel, M. M.: Hormonal induction of pseudopregnancy in rats, J. Re-

- prod. Fert., 10: 85, 1965
- 12) Mantalenakis, S. J. and Ketchel, M. M.: Pseudo-pregnant recipients for blastocyst transfer in rats, *Int. J. Fert.*, 11: 318, 1966
 - 13) Yoshinaga, K. and Adams, C. E.: Endocrine aspects of eggs implantation in the rat, *J. Reprod. Fert.*, 12: 583, 1966
 - 14) Noyes, R. W. and Dickmann, Z.: Survival of ova transferred into the oviduct of the rat, *Fert. Steril.*, 12: 67, 1961
 - 15) Noyes, R. W., Doyle, L. L. and Bentley, D. L.: Effect of preimplantation development on foetal weight in the rat, *J. Reprod. Fert.*, 2: 238, 1961
 - 16) Vickery, B. H., Erickson, G. I. and Bennett, J. P.: Nonsurgical transfer of eggs through the cervix in rats, *Endocrinology*, 85: 1202, 1969
 - 17) Chatterjee, A. and Harper, M. H. K.: Interruption of implantation and gestation in rats by reserpine, chlorpromazine and ACTH: possible mode of action, *Endocrinology*, 87: 966, 1970
 - 18) Toyoda, Y. and Chang, M. C.: Fertilization of rat eggs in vitro by epididimal spermatozoa and the development of egg following transfer, *J. Reprod. Fert.*, 36: 9, 1974

**Blastocyst transplantation
in reserpine-induced
pseudopregnant rats
1. Fetal weight**

Hirotada Tsujii

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

In our previous comparative investigation on the response of decidua and mitotic activity of endometrial cells in rats in which pseudopregnancy was induced by reserpine administration or by mating with vasectomized male rats, a difference has been found in the sensitivity of the endometrium. This study was designed to examine the effects of different modes of pseudopregnancy induction on the embryonic development following transplantation. Pseudopregnancy was induced by (1) administration of reserpine, (2) mating with vasectomized male, (3) electrical stimulation at the proestrous stage and (4) electrical stimulation at the estrous stage. No differences were found in the duration of diestrus by the modes of pseudopregnancy induction. When a blastocyst from a 5-day-pregnant rat was transferred on Day 5 of pseudopregnancy, the ratios of implantation and viable fetuses were significantly lower in Group (3) (proestrous electrical stimulation) compared to the other groups. In the other groups, no significant differences were found in the ratio of implantation, fetal weight and placental weight. When a blastocyst from a 5-day-pregnant rat was transferred on Day 4 of pseudopregnancy, there were no differences in the ratios of implantation and viable fetuses between Group (1) (reserpine administration) and Group (2) (mating with vasectomized male). However, the fetal weight was significantly larger in Group (1) than Group (2). The fetal weight was also significantly larger when the blastocyst was transferred on Day 4 than when transferred on Day 5. This seemed to suggest that the increase in fetal weight was partly attributable to the difference in endometrial sensitivity.

(受付: 1989 年 12 月 7 日)

AGE-RELATED CHANGES IN THE PERCENTAGE OF GLYCOGEN-LADEN OOCYTES IN MICE

Akira NARITA

Graduate School of Science and Technology,
Niigata University, Niigata 950-21, Japan

Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Niigata University, Niigata 950-21, Japan

Abstract: Histochemical detection of glycogen was performed using the follicular oocytes of 20-day-old 60- to 90-day-old and 360- to 390-day-old mice, and further with the ovulated oocytes of 30-day-old, 60- to 90-day-old and 180- to 210-day-old animals; then the percentage of glycogen-laden oocytes to all the oocytes observed was compared among different age groups. Among the stocked oocytes in primordial follicles, none was glycogen-laden whatsoever the age of the animals was. With growing oocytes in primordial follicles, a small number of glycogen-laden ones were observed, the percentage of which showing no significant difference among age groups. Among the oocytes in secondary follicles, a considerable number were glycogen-laden, and among those in antral follicles, even a large number of them were, and the percentages of such grew significantly lower alongside with the advance of animals' ages. Of ovulated oocytes, almost all were glycogen-laden, whose percentage showing no significant difference among age groups. In such oocytes, however, the percentage of those containing a small amount grew significantly higher with the advance of age, which naturally lowering the percentage of those containing a large amount.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 444—449, 1990)

Introduction

In our preceding paper¹⁾, the authors reported that the ultrastructures of oocytes stocked in primordial follicles and of those immediately after ovulation changed with the aging of mice; as for the cytoplasmic inclusions of the oocytes, fibrous strands showed a tendency to increase in the ovulated oocytes.

It is known, on the one hand, that the oocytes and early embryos of mammals generally contain glycogen granules and/or lipid droplets²⁻¹⁷⁾, and that such inclusions are utilized as an energy source for the growth of the oocytes or the devel-

opment of the embryos^{8-12,14)}. Age-related changes in the amount of glycogen in early embryos has histochemically been studied: namely, Parkening and Soderwall¹²⁾ compared the amount of glycogen in blastocysts between 90- to 150-day-old and 420- to 510-day-old hamsters, and reported that there appeared no significant difference between the two age groups. As for the oocytes, on the other hand, Ishida⁴⁾ performed a differential count of glycogen-free and glycogen-laden ones among rats at different ages, and reported that the percentage of glycogen-laden oocytes in growing follicles grew lower in senescent animals compared from young ones.

Present investigation deals with age-related changes in the percentages of glycogen-laden mouse oocytes at the stages of primordial, secondary and antral follicles as well as those immediately after ovulation.

Materials and Methods

One hundred and thirty-eight female mice of the ICR strain were kept and fed normally in a chamber (koitotron, EA-8HW) at 24°C and lit 14 hours a day, 4 a. m. through 6 p. m. Fourteen animals were killed at 20 days of age, 14 more at 60 to 90 days and as many at 360 to 390 days. The rest were superovulated with 5 i. u. PMSG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan), and with 5 i. u. hCG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) 48 hours later. Thirteen hours after hCG injection, some animals were killed at 30 days of age, some at 60 to 90 days and the rest at 180 to 210 days, respectively.

The ovaries and oviducts were immediately taken, fixed in Rossman fluid, embedded in paraffin, serially sectioned at a thickness of 7 μ m, and stained by the periodic acid-Schiff method¹⁸⁾. Glycogen which appeared in the cytoplasm of the oocytes was confirmed with a salivary test. A statistical analysis was carried out on the percentage of glycogen-laden oocytes, using a *t* test after the angle transformation.

Results

When deparaffinized tissue sections were treated by the periodic acid-Schiff method¹⁸⁾, red-purple granules appeared in the cytoplasm of the oocytes (Figs. 1 and 2). These granules were confirmed as glycogen, because they disappeared with a salivary test.

The results obtained about the number and percentages of glycogen-free oocytes (Fig. 3) as well as glycogen-laden ones at the stocked, growing and ovulated stages are given in Tables 1 to 5.

As shown in Table 1, the stocked oocytes in primordial follicles contained no glycogen at all in any age group. In the growing oocytes in primordial follicles, the percentages of glycogen-laden ones were 10.6 in 20-day-old mice, 11.6 in 60- to 90-day-old and 15.6 in 360- to 390-day-old ones

(Table 2). Statistically, there was no significant difference among the age groups.

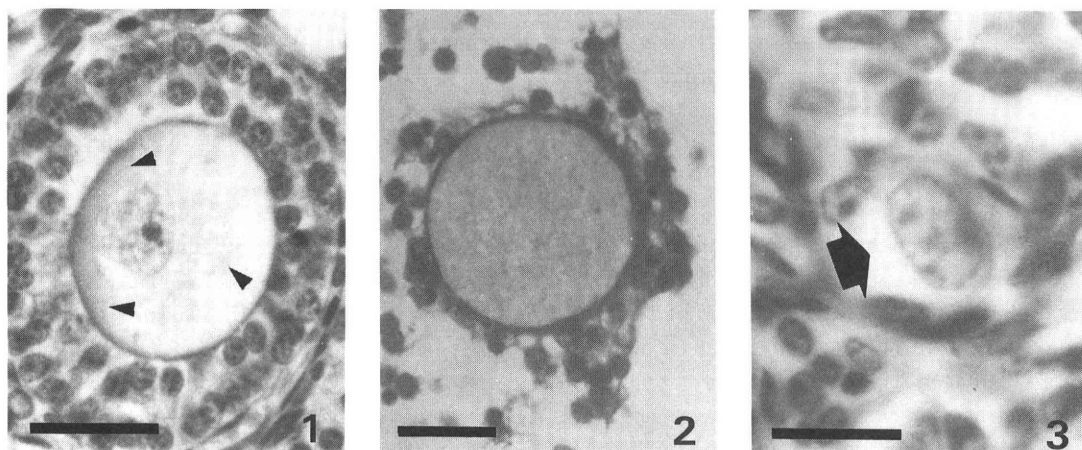
As shown in Table 3, the percentages of glycogen-laden oocytes in secondary follicles were 99.0 in 20-day-old mice, 80.2 in 60- to 90-day-old, and 55.7 in 360- to 390-day-old ones. The percentages of glycogen-laden oocytes, thus, grew lower with the advance of animals' ages, showing a significant difference between every two age groups out of the three ($P < 0.001$).

As shown in Table 4, the percentages of glycogen-laden oocytes in antral follicles were 96.2 in 20-day-old mice, 93.5 in 60- to 90-day-old, and 91.2 in 360- to 390-day-old. Thus, the percentages of glycogen-laden oocytes became slightly lower with the advance of animals' ages, showing significant differences between 20-day-old mice and the other two age groups ($P < 0.05$).

As shown in Table 5, the percentages of glycogen-laden oocytes immediately after ovulation were 100.0 in 30-day-old mice, 99.6 in 60- to 90-day-old, and 99.1 in 180- to 210-day-old ones, no significant difference being found among the three age groups. The percentages of the oocytes containing a small amount of glycogen grew higher with the advance of animals' ages, whereas those of the oocytes containing a large amount became lower; showing significant differences between 30-day-old mice and the other age groups ($P < 0.01$).

Discussion

It has recently been reported that fibrous strands, one of the cytoplasmic protein inclusion, are not contained in the mouse oocytes in primordial follicles, but that they appear at first in the oocytes in secondary follicles, and then increase gradually with the growth of oocytes¹⁹⁾. It is known, on the other hand, that lipid droplets are not stored in mouse oocytes while in primordial and secondary follicles, but they come to exist in the oocytes in antral follicles and in the embryos at the early developmental stages^{6,15)}. It is also known that mouse oocytes in primordial follicles lack glycogen granules, but when in secondary follicles they begin to accumulate such, and the majority of the oocytes come to have immediately



Explanation of Figures

All the microphotographs show mouse oocytes.
periodic acid-Schiff method

Fig. 1 An oocyte containing a small amount of glycogen (arrow heads), in a secondary follicle
A 20-day-old mouse Scale=20 μ m

Fig. 2 An oocyte containing a large amount of glycogen, immediately after ovulation
A 200-day-old mouse Scale=30 μ m

Fig. 3 A stocked oocyte containing no glycogen (an arrow), in the primordial follicle
A 380-day-old mouse Scale=10 μ m

Table 1 The number (%) of glycogen-free and glycogen-laden oocytes stocked in primordial follicles in mice at different ages

Age groups [days]	Total no. of oocytes observed	Number (%) of oocytes containing			
		no glycogen	glycogen [total]	small amounts of glycogen	large amounts of glycogen
20	18183	18183(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
60—90	1540	1540(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
360—390	367	367(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

Table 2 The number (%) of glycogen-free and glycogen-laden oocytes growing in primordial follicles in mice at different ages

Age groups [days]	Total no. of oocytes observed	Number (%) of oocytes containing			
		no glycogen	glycogen [total]	small amounts of glycogen	large amounts of glycogen
20	4508	4029(89.4)	479(10.6)	446(9.9)	33(0.7)
60—90	10279	9087(88.4)	1192(11.6)	1099(10.7)	93(0.9)
360—390	3478	2935(84.4)	543(15.6)	480(13.6)	63(2.0)

after ovulation⁹⁾.

As for age-related changes of cytoplasmic inclusions in mammalian oocytes, two investigations have been performed; one concerning about glycogen, and the other about fibrous strands. Using rats of different ages, Ishida⁴⁾ carried out

differential counts of glycogen-free and glycogen-laden oocytes under varied dietary conditions, and reported, as age-related changes, that in senescent rats, the percentages of glycogen-laden oocytes in secondary and antral follicles were significantly lower than in younger animals. On

Table 3 The number (%) of glycogen-free and glycogen-laden oocytes growing in secondary follicles in mice at different ages

Age groups [days]	Total no. of oocytes observed	Number (%) of oocytes containing			
		no glycogen	glycogen [total]	small amounts of glycogen	large amounts of glycogen
20	1499	15(1.0) ^a	1484(99.0) ^b	1019(68.0) ^c	465(31.0) ^{ef}
60—90	1674	331(19.8) ^a	1343(80.2) ^b	1168(69.8) ^d	175(10.4) ^e
360—390	618	274(44.3) ^a	344(55.7) ^b	303(49.0) ^{cd}	41(6.7) ^f

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters
[a, b, f : $P < 0.001$, c, d, e : $P < 0.01$].

Table 4 The number (%) of glycogen-free and glycogen-laden oocytes growing in antral follicles in mice at different ages

Age groups [days]	Total no. of oocytes observed	Number (%) of oocytes containing			
		no glycogen	glycogen [total]	small amounts of glycogen	large amounts of glycogen
20	420	16(3.8) ^{ab}	404(96.2) ^{cd}	291(69.3)	113(26.9) ^e
60—90	941	61(6.5) ^a	880(93.5) ^c	673(71.5)	207(22.0)
360—390	295	26(8.8) ^b	269(91.2) ^d	234(79.3)	35(11.9) ^e

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters
[a, c, d, e : $P < 0.05$, b : $P < 0.01$].

Table 5 The number (%) of glycogen-free and glycogen-laden oocytes immediately after ovulation in mice at different ages

Age groups [days]	Total no. of oocytes observed	Number (%) of oocytes containing			
		no glycogen	glycogen [total]	small amounts of glycogen	large amounts of glycogen
30	358	0(0.0)	358(100.0)	111(31.0) ^{ab}	247(69.0) ^{cd}
60—90	519	2(0.4)	517(99.6)	214(41.2) ^a	303(58.4) ^c
180—210	329	3(0.9)	326(99.1)	149(45.3) ^b	177(53.8) ^d

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters
[a, b, c, d : $P < 0.01$].

the other hand, the present authors reported that fibrous strands in mouse oocytes immediately after ovulation tended to increase with the advance of animals' ages, suggesting a rise in the ability of protein synthesis¹⁾.
The present investigation revealed that glycogen first appear in mouse growing oocytes in primordial follicles, and the percentage of glycogen-laden oocytes become higher with the growth of the follicles, so that the majority of oocytes contain glycogen when ovulated. As for age-related changes, the percentages of glycogen-laden oocytes in secondary and antral follicles become lower with the advance of the age of

mice; as for ovulated oocytes, in the mean time, the percentage of those containing a large amount of glycogen become lower, naturally causing the raising of the percentage of those containing a small amount. These results closely resembled the results obtained from rats⁴⁾.
As already mentioned, Parkening and Soderwall¹²⁾ compared the amount of glycogen in blastocysts between 90- to 150-day-old and 420- to 510-day-old hamster groups, and reported that there was no significant difference between the two age groups. The present investigation using mouse oocytes revealed, however, the percentages of glycogen-laden ones in secondary follicles, in

antral follicles and immediately after ovulation become lower with the advance of age. We do not believe this discrepancy should have been caused by the difference between species or ages but rather by the difference between the growing and developmental stages of their eggs, because the eggs containing none or a small amount of glycogen will be atrophied in the course of their development, resulting in the fact that all the blastocysts contain the essential amount of glycogen.

Using rat skeletal muscles, Dall'Aglio et al.²⁰⁾ biochemically studied age-related changes of the amount of glycogen and activity of glycogen synthase in them. They reported that both of the amount and activity decreased with the advance of animals' ages, and further that glycogen synthase activity declined under the condition of saturated concentration of UDP-glucose. From these results, they assumed that the decrease in the amount of glycogen with aging would be affected by the decline of glycogen synthase activity. Accordingly, the decrease, in our study, in the percentage of glycogen-laden oocytes in growing follicles with aging of mice may also be caused by the decline of glycogen synthase activity.

References

- 1) Narita, A., Niimura, S. and Ishida, K.: Ultrastructural changes of oocytes with the advancement of age of mice, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, in press
- 2) Ishida, K.: Histochemical studies of rat ova with special reference to glycogen of them after ovulation, *Tohoku J. Agr. Res.*, 3: 39, 1952
- 3) Ishida, K.: Cytochemical studies of tubal ova, *Tohoku J. Agr. Res.*, 5: 1, 1954
- 4) Ishida, K.: Comparison in the number of glycogen-free and glycogen-laden ova in rat ovaries under various dietary conditions, *Tohoku J. Agr. Res.*, 3: 127, 1958
- 5) Ishida, K.: Differential counts of glycogen-free and glycogen-laden ova in rat ovaries during estrous cycle, pregnancy and lactation, *Arch. hist. jap.*, 16: 69, 1959
- 6) Ishida, K.: Histochemical studies of lipids in the ovaries of domestic animals, *Arch. hist. jap.*, 19: 547, 1960
- 7) Ishida, K.: Differential counts of glycogen-free and glycogen-laden ova of the sow and rabbit with special reference to the tubal ova, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 7: 251, 1962
- 8) Thomson, J. L. and Brinster, R. L.: Glycogen content of preimplantation mouse embryos, *Anat. Rec.*, 155: 97, 1966
- 9) Snyder, T. E., Weitlauf, H. M. and Nelson, S. R.: Comparison of the glycogen content of eggs in the uteri and oviducts of intact and hypophysectomized mice, *Biol. Reprod.*, 5: 314, 1971
- 10) McReynolds, H. D. and Hadek, R.: Periodic acid Schiff-positive material in hamster preimplantation embryos, *J. Reprod. Fert.*, 30: 173, 1972
- 11) Ozias, C. B. and Stern, S.: Glycogen levels of preimplantation mouse embryos developing in vitro, *Biol. Reprod.*, 8: 467, 1973
- 12) Parkening, T. A. and Soderwall, A. L.: Histological localization of glycogen in preimplantation and implantation stages of young and senescent golden hamsters, *J. Reprod. Fert.*, 41: 285, 1974
- 13) Loewenstein, J. E. and Cohen, A. I.: Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 12: 113, 1964
- 14) Niimura, S. and Ishida, K.: Histochemical observations of lipid droplets in mammalian eggs during the early development, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 26: 46, 1980 (in Japanese)
- 15) Ozdzenski, W. and Czolowska, R.: Lipid inclusions in oocytes and preimplantational embryos of different strains of mice, *Folia. Morphol.*, 39: 497, 1980
- 16) Hishinuma, M., Takahashi, Y. and Kanagawa, H.: Histochemical observations of lipid droplets in mouse embryos, *Jpn. J. Vet. Res.*, 33: 51, 1985
- 17) Hishinuma, M., Nakata, H., Urano, K., Takahashi, Y. and Kanagawa, H.: Histochemical observations of lipid droplets and glycogen in mouse eggs with abnormal development, *Jpn. J. Vet. Res.*, 33: 145, 1985
- 18) McManus, J. F. A.: Histological and histochemical use of periodic acid, *Stain. Technol.*, 23: 99, 1948
- 19) Weakley, B. S.: Comparison of cytoplasmic lamellae and membranous elements in the oocytes of five mammalian species, *Z. Zellforsch.*, 85: 109, 1968
- 20) Dall'Aglio, E., Chang, H., Reaven, G. M. and Azhar, S.: Age-related changes in rat muscle glycogen synthase activity, *J. Gerontol.*, 42: 168, 1987

マウスの加齢に伴う グリコゲン含有卵母細胞の出現率の 変化について

新潟大学大学院自然科学研究科

成田 成

新潟大学農学部畜産学科

新村末雄 石田一夫

20日齢, 60~90日齢および360~390-齢のマウスの
卵胞内卵母細胞と, 30日齢, 60~90日齢および
180~210-齢のマウスの排卵直後の卵母細胞について,
過沃素酸-シッフ法を用いてグリコゲンを組織化学的

に検出し, グリコゲン含有卵母細胞の出現率(%)を
日齢間で比較した。原始卵胞中に貯蔵されている卵母
細胞はどの日齢においてもグリコゲンを含んでいなか
ったが, 原始卵胞中で発育を開始している卵母細胞で
はグリコゲンを含有するものが少数出現した。その出
現率は動物の日齢の間で有意な差はみられなかった。
二次卵胞と胞状卵胞のグリコゲン含有卵母細胞は卵胞
の発育とともに増加したが, その出現率は日齢の間で
は老齢のものほど有意に低かった。排卵直後ではほと
んどすべての卵母細胞がグリコゲンを含有しており,
グリコゲンを多量に含む卵母細胞の出現率は動物の加
齢に伴って有意に低下し, 少量含むものの出現率は必
然的に有意に上昇した。

(受付: 1989年11月29日)

着床遅延マウス胚盤胞における プロスタグランジン E₂ の免疫組織化学的検出

Immunohistochemical Detection of Prostaglandin E₂ in Delayed Implanting Mouse Blastocysts

新潟大学農学部畜産学科

新 村 末 雄 石 田 一 夫
Sueo NIIMURA Kazuo ISHIDA

Department of Animal Science,
Faculty of Agriculture,
Niigata University, Niigata 950-21, Japan

マウスの Day 4 の胚盤胞、着床遅延胚盤胞 (Day 13, Day 23 および Day 33) および estradiol を投与して着床を誘起した着床遅延胚盤胞 (Day 13) について、プロスタグランジン (PG) E₂ を免疫組織化学的に検出した。Day 4 の胚盤胞では、PGE₂ の局在を示す特異蛍光は栄養膜と内細胞塊の各細胞の細胞質に中等度に出現した。着床遅延胚盤胞では、PGE₂ の蛍光は栄養膜細胞の細胞質にのみ弱く観察され、その強さは着床遅延期間による変化を示さなかった。また、着床を誘起した着床遅延胚盤胞でも、蛍光の分布と強さは誘起しないものと変わらなかった。以上の結果は、マウス胚盤胞における PG の生理活性が着床遅延期間を通して低下していること、また、着床を誘起させても変わらないことを示唆している。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 450—454, 1990)

緒 言

ウサギの胚盤胞¹⁾がプロスタグランジン (PG) E-A と PGF を含有していることが、1975 年に初めてラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて報告されて以来、ウサギ²⁻⁴⁾ばかりでなくヒツジ^{5,6)}、ブタ⁷⁾およびウシ⁸⁾の胚盤胞も各種の PG を含んでいることが RIA によって確かめられている。また、これらの動物の胚盤胞は PG の合成能と分泌能を持っていることも *in vitro* の実験で調べられている^{2,4,5,6,9-20)}。さらに最近、マウス、ハムスター、ラットおよびウサギの 1 細胞期の卵から胚盤胞期までの胚も PGE₂ と PGF₂α を含んでいることが、間接蛍光抗体法を用いて調べられている^{21,22)}。

一方、PG の不活化の第一歩を担っているプロスタグランジン脱水素酵素 (PGDH) の活性が、ハムス

ター²³⁾、マウス^{24,25)}およびブタ²⁶⁾の卵や胚で組織化学的に検出されており、これらの動物の卵や胚に PG の代謝能のあることが確かめられている。また、三善ら²⁵⁾は、マウスの着床遅延胚盤胞は Day 4 の胚盤胞に比べ PGDH 活性が強いことを観察し、着床遅延胚盤胞では PG の生理活性が低下していると推察している。しかし、着床遅延胚盤胞について PG の存在を実証した報告はみられず、着床を遅延させた場合、胚盤胞の PG 含量にどのような変化が現れるのかについては不明である。

本研究は、マウスの Day 4 の胚盤胞と着床遅延胚盤胞 (Day 13, Day 23 および Day 33) について PGE₂ を免疫組織化学的に検出し、胚盤胞の PGE₂ 含量が着床を遅延させることによってどのように変化するかを調べるとともに、estradiol を投与して着床を誘起させた着床遅延胚盤胞 (Day 13) について PGE₂ の

検出を行い、PGE₂含量に変化が現れるかどうかについても検討したものである。

材料および方法

供試動物として ICR 系の成熟マウスを用いた。飼育は 24°C に調節した室内で行い、点灯は午前 4 時から午後 6 時までの 14 時間とした。これらの雌 50 匹に PMSG (セトロロビン、帝国臓器) と hCG (ゴナトロビン、帝国臓器) それぞれ 5 IU ずつを 48 時間間隔で腹腔内に注射して過排卵を誘起し、hCG 注射後直ちに同系統の成熟雄と交配させた。なお、翌朝陰栓を確認し、妊娠の Day 1 とした。

これらの雌は、Day 4 の胚盤胞を採取する場合を除き、すべて Day 3 の午後に卵巣を除去し、その翌日から 1 mg の progesterone (プロゲホルモン、持田製薬) を毎日皮下注射して着床遅延を誘起した。

Day 4 の胚盤胞は hCG 注射後 96 時間に、無処置マウスの子宮をリン酸緩衝塩類溶液²⁷⁾ (PBS, pH 7.4) でかん流して採取した。一方、着床遅延胚盤胞は Day 13, Day 23 および Day 33 に、卵巣除去・プロジェクトロン注射マウスの子宮を PBS でかん流して採取した。なお、Day 13 の着床遅延胚盤胞を採取するにあたり、胚盤胞採取の 16 ないし 18 時間前に 0.1 μ g の estradiol (オバホルモンベンツァート、帝国臓器) を注射して着床を開始させた着床遅延胚盤胞も併せて採取した。

採取した着床遅延胚盤胞はいずれもハッチングしたものであったが、Day 4 の胚盤胞には透明帯が存在していたので、プロナーゼを 0.2 % 含む PBS で溶解させた。胚盤胞に含まれる PGE₂ の検出は間接蛍光抗体法を用いて行った。すなわち、これらの胚盤胞をウサギ抗 PGE₂ 血清 (Transformation Research, U. S. A.) に 4°C で一晩浸漬した。使用した抗血清は PBS で 400 倍に希釈したものである。なお、抗 PGE₂ 血清の交差性は PGE₂ が 100 %, PGA₁ が 6.0 %, PGA₂ が 3.0 %, PGF₂ が 2.0 %, PGB₂ が 2.0 %, PGD₂ が 0.4 %, PGE₁ が 0.4 %, PGI₂ が 0.4 % で、これら以外の PGE および PGF の代謝産物とは 0.3 % 未満の交差性しか有していないものである。一次抗体処置を施した胚盤胞は PBS で 60 分間洗浄し、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Cappel, U. S. A.) 中に室温で 30 分間浸漬した。FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG は PBS で 64 倍に希釈して使用した。対照として、ウサギ抗 PGE₂ 血清のかわりに正常ウサギ血清で処置した胚盤胞、または FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG のみの処置を施した胚盤胞を使用した。処置した胚盤胞はあらかじめメワセリン・パフフィンのスポット

をカバーガラスの四隅に位置するように置いたスライドガラスの中央に移し、カバーガラスをかぶせて静かに押し、落射蛍光顕微鏡装置 (オリンパス光学) で観察した。

結 果

Day 4 の胚盤胞はほぼ円形を呈し、透明帯を有していた。一方、着床遅延胚盤胞はいずれの時期のものも長楕円形で、透明帯は消失していた。また、estradiol を注射して着床を誘起した着床遅延胚盤胞は、estradiol を注射していないものに似ていたが、やや大型であった。

これらの胚盤胞について、ウサギ抗 PGE₂ 血清と FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG の処置を行うと、Day 4 の胚盤胞では栄養膜と内細胞塊の各細胞の細胞質に蛍光が出現した (Fig. 1)。一方、着床遅延胚盤胞で

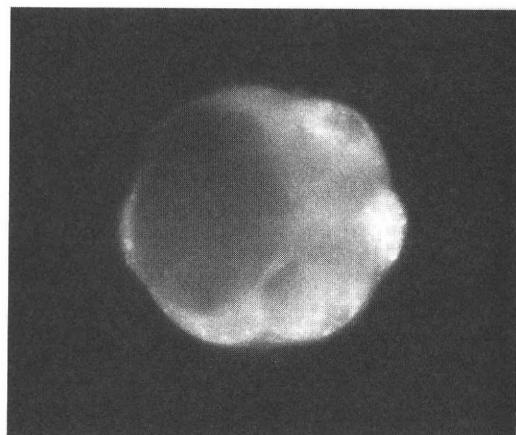


Fig. 1 Fluorescence showing the presence of PGE₂ in a mouse blastocyst on Day 4. $\times 400$.

は栄養膜細胞の細胞質には蛍光がみられたが、内細胞塊細胞には蛍光は観察されなかった (Fig. 2)。なお、この蛍光はウサギ抗 PGE₂ 血清のかわりに正常ウサギ血清で処置した胚盤胞、または FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG のみの処置を施した胚盤胞では認められなかった (Fig. 3)。

Day 4 の胚盤胞、着床遅延胚盤胞および estradiol を投与して得た着床遅延胚盤胞における PGE₂ の存在を示す蛍光の強さは Table 1 に示した通りである。すなわち、PGE₂ の存在を示す蛍光は Day 4 の胚盤胞では中等度であったが (Fig. 1)、着床遅延胚盤胞ではどの遅延期間のものも弱かった (Fig. 2)。また、estradiol を投与して着床を誘起した着床遅延胚盤胞でも蛍光は弱いままで、estradiol を投与しないものと相違はなかった。



Fig. 2 Fluorescence showing the presence of PGE₂ in a delayed implanting mouse blastocyst on Day 33. $\times 400$.

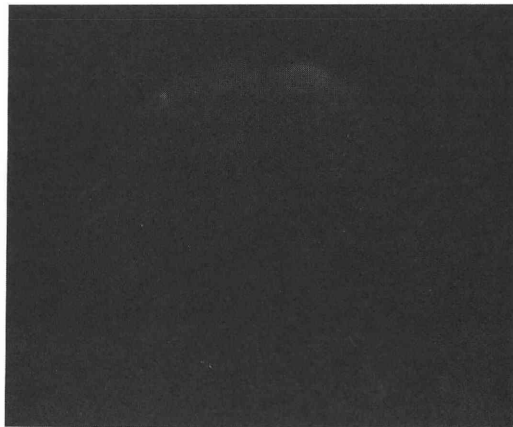


Fig. 3 A delayed implanting mouse blastocyst on Day 33, treated only with the FITC-conjugated anti-rabbit IgG (control). $\times 400$.

Table 1. The intensity of fluorescence showing the presence of PGE₂ in delayed implanting mouse blastocysts

	Normal blastocysts		Delayed implanting blastocysts			
	Day 4		Day 13	Day 13*	Day 23	Day 33
No. of blastocysts examined	35		30	39	35	27
Intensity of fluorescence	Inner-cell-mass		—	—	—	—
	Trophoblast		+	+	+	+

*Estradiol benzoate (0.1 μ g) was subcutaneously injected into delayed implanting mice 16 to 18 hrs before obtaining their blastocysts.

— None, + weak, ++ moderate

考 察

マウスの着床遅延胚盤胞について PGDH 活性を組織化学的に検出して、PG 代謝を調べた三善らの報告²⁵⁾によると、Day 10 の着床遅延胚盤胞では PGE₁、PGE₂ および PGF₂ α を基質にした PGDH の活性は Day 4 の胚盤胞の活性に比べ明らかに強かったという。また、Day 4 の胚盤胞では、どの種類の PG を基質に用いても PGDH 活性は栄養膜と内細胞塊の細胞に弱度に認められたが、着床遅延胚盤胞では栄養膜細胞にのみ出現し、内細胞塊細胞では陰性であったと報告している。

本実験において、着床遅延胚盤胞について PGE₂ の検出を行ったところ、Day 13 の着床遅延胚盤胞の PGE₂ 含量は Day 4 の胚盤胞より減少していることが確かめられたが、さらに着床を遅延させても PGE₂ 含量は変化しなかった。また、Day 4 の胚盤胞では PGE₂ は栄養膜と内細胞塊の各細胞に検出されたが、着床遅延胚盤胞の PGE₂ は内細胞塊細胞では消失していた。本実験の PG 含量の結果と三善らの PGDH 活性

の結果²⁵⁾とを合わせ考えると、着床遅延胚盤胞における PG 含量の減少は、PGDH 活性の上昇によっておこることが推察された。

哺乳動物胚に含まれる PG の生理的役割については、胚盤胞のハッチング²⁸⁻³⁰⁾、胚盤胞の子宮内におけるスペーシング³¹⁾、着床部位における子宮内膜の血管透過性の亢進³²⁻³⁴⁾などがいわれており、PG は着床の過程に重要な役割を果たしていると考えられている。また、マウスでは PGE₂ を投与することによって着床を誘起できるといわれている³⁵⁾。したがって、マウス胚盤胞に含まれる PGE₂ が着床のために何らかの作用を及ぼしていることがうかがわれる。しかし、本実験において estradiol を投与して着床を誘起した着床遅延胚盤胞について PGE₂ の検出を行ったが、PGE₂ 含量は estradiol を投与しない着床遅延胚盤胞のものと同様とみられなかった。一方、estradiol を投与した着床遅延胚盤胞の PGDH 活性は、estradiol を投与しないものと変わらなかったといわれており²⁵⁾、着床遅延胚盤胞の PG の代謝は着床を誘起しても変化しないことが示唆されている。したがって、現在

までの研究では、胚盤胞に含まれる PGE_2 がどのように着床に関与しているのかについては明らかにできなかったため、今後、別の面から究明する必要がある。

文 献

- 1) Dickmann, Z. and Spilman, C. H.: Prostaglandins in rabbit blastocysts, *Science*, 190: 997, 1975
- 2) Dey, S. K., Chien, S. M., Cox, C. L. and Crist, R. D.: Prostaglandin synthesis in the rabbit blastocyst, *Prostaglandins*, 19: 449, 1980
- 3) Pakrasi, P. L. and Dey, S. K.: Blastocyst is the source of prostaglandins in the implantation site in the rabbit, *Prostaglandins*, 24: 73, 1982
- 4) Harper, M. J. K., Norris, C. J. and Rajkumar, K.: Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits, *Biol. Reprod.*, 28: 350, 1983
- 5) Hyland, J. H., Manns, J. G. and Humphrey, W. D.: Prostaglandin production by ovine embryos and endometrium in vitro, *J. Reprod. Fert.*, 65: 299, 1982
- 6) Lacroix, M. C. and Kann, G.: Comparative studies of prostaglandins $\text{F}_2\alpha$ and E_2 in late cycle and early pregnant sheep: in vitro synthesis by endometrium and conceptus effects of in vivo indomethacin treatment on establishment of pregnancy, *Prostaglandins*, 23: 507, 1982
- 7) Davis, D. L., Pakrasi, P. L. and Dey, S. K.: Prostaglandins in swine blastocysts, *Biol. Reprod.*, 28: 1114, 1983
- 8) Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon, N. and Hansel, W.: Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts, *J. Reprod. Fert.*, 56: 181, 1979
- 9) Pakrasi, P. L. and Dey, S. K.: Catechol estrogens stimulate synthesis of prostaglandins in the preimplantation rabbit blastocyst and endometrium, *Biol. Reprod.*, 29: 347, 1983
- 10) Racowsky, C. and Biggers, J. D.: Are blastocyst prostaglandins produced endogenously? *Biol. Reprod.*, 29: 379, 1983
- 11) Harper, M. J. K., Jones, M. A., Norris, C. J. and Woodard, D. S.: Prostaglandin synthesis by day-6 rabbit blastocysts in vitro, *J. Reprod. Fert.*, 86: 315, 1989
- 12) Marcus, G. J.: Prostaglandin formation by the sheep embryo and endometrium as an indication of maternal recognition of pregnancy, *Biol. Reprod.*, 25: 56, 1981
- 13) Lewis, G. S. and Waterman, R. A.: Metabolism of arachidonic acid in vitro by ovine conceptuses and endometrium recovered during early pregnancy, *Prostaglandins*, 30: 263, 1985
- 14) Lewis, G. S.: Indomethacin inhibits the uptake of ^{22}Na by ovine trophoblastic tissue in vitro, *Prostaglandins*, 31: 111, 1986
- 15) Watson, J. and Patek, C. E.: Steroid and prostaglandin secretion by the corpus luteum, endometrium and embryos of cyclic and pregnant pigs, *J. Endocr.*, 82: 425, 1979
- 16) Lewis, G. S. and Waterman, R. A.: Metabolism of arachidonic acid in vitro by porcine blastocysts and endometrium, *Prostaglandins*, 25: 871, 1983
- 17) Stone, B. A., Seemark, R. F., Kelly, R. W. and Deam, S.: Production of steroids and release of prostaglandins by spherical pig blastocysts in vitro, *Aust. J. Biol. Sci.*, 39: 283, 1986
- 18) Lewis, G. S., Thatcher, W. W., Bazer, F. W. and Curl, J. S.: Metabolism of arachidonic acid in vitro by bovine blastocysts and endometrium, *Biol. Reprod.*, 27: 431, 1982
- 19) Lewis, G. S. and Waterman, R. A.: Effects of endometrium on metabolism of arachidonic acid by bovine blastocysts in vitro, *Prostaglandins*, 25: 881, 1983
- 20) Lewis, G. S.: Effects of superovulation, arachidonic acid or endometrium on release of prostaglandins and synthesis of proteins by bovine trophoblast, *Prostaglandins*, 32: 275, 1986
- 21) Niimura, S. and Ishida, K.: Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E_2 in preimplantation mouse embryos, *J. Reprod. Fert.*, 80: 505, 1987
- 22) Niimura, S. and Ishida, K.: Immunohistochemical detection of prostaglandins in preimplantation embryos of hamsters, rats and rabbits, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35: 222, 1989
- 23) 新村末雄, 石田一夫: ハムスター卵子における Prostaglandin dehydrogenase の組織化学的研究, *家畜繁殖誌*, 24: 16, 1978
- 24) 新村末雄, 岡崎正幸, 石田一夫: ICR マウスの発生初期胚におけるプロスタグランジン脱水素酵素の組織化学的検出, *日畜会報*, 58: 845, 1987
- 25) 三善隆広, 小泉攻, 石田一夫: 着床遅延マウス胚盤胞におけるプロスタグランジン脱水素酵素の組織化学的研究, *家畜繁殖誌*, 30: 154, 1984
- 26) 新村末雄, 石田一夫: ブタ胚のトロホプラストにおける prostaglandin dehydrogenase の組織化学的研究, *家畜繁殖誌*, 25: 79, 1979
- 27) Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *J. exp. Med.*, 99: 167, 1954
- 28) Biggers, J. D., Leonov, B. V., Baskar, J. F. and Fried, J.: Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by prostaglandin antagonists, *Biol. Reprod.*, 19: 519, 1978
- 29) Baskar, J. F., Torchiana, D. F., Biggers, J. D.,

- Corey, E. J., Andersen, N. H. and Subramanian, N.: Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by various prostaglandin antagonists, *J. Reprod. Fert.*, 63: 359, 1981
- 30) Chida, S., Uehara, S., Hoshiai, H. and Yajima, A.: Effects of indomethacin, prostaglandin E₂, prostaglandin F₂ α and 6-keto-prostaglandin F₁ α on hatching of mouse blastocysts, *Prostaglandins*, 31: 337, 1986
- 31) Harper, M. J. K.: Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E., Neill, J. D., Ewing, L. L., Greenwald, G. S., Markert, C. L. and Pfaff, D. W. eds., 103, Raven Press, 1988
- 32) Kennedy, T. G.: Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation, *Aust. J. biol. Sci.*, 36: 531, 1983
- 33) Hodgen, G. D. and Itskovits, J.: Recognition and maintenance of pregnancy. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E., Neill, J. D., Ewing, L. L., Greenwald, G. S., Markert, C. L. and Pfaff, D. W. eds., 1995, Raven Press, 1988
- 34) Weitlauf, H. M.: Biology of implantation. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E., Neill, J. D., Ewing, L. L., Greenwald, G. S., Markert, C. L. and Pfaff, D. W. eds., 231, Raven Press, 1988
- 35) Holmes, P. V. and Gordashko, B. J.: Evidence of prostaglandin involvement in blastocyst implantation, *J. Embryol. exp. Morph.*, 55: 109, 1980

Immunohistochemical detection of prostaglandin E₂ in delayed implanting mouse blastocysts

Sueo Niimura and Kazuo Ishida

Department of Animal Science,
Faculty of Agriculture, Niigata University,
Niigata 950-21, Japan

Antiserum to prostaglandin (PG) E₂ and indirect immunofluorescence were used to immunohistochemically demonstrate the presence of PGE₂ in mouse blastocysts on Day 4, in delayed implanting ones on Days 13, 23 and 33, and in delayed implanting ones on Day 13 but 16 to 18 hrs after the administration of estradiol.

In the blastocysts on Day 4, a moderate intensity of fluorescence showing the presence of PGE₂ was observed in the cytoplasm of both trophoblast cells and inner-cell-mass cells. In the delayed implanting blastocysts, however, the fluorescence was always restricted within the cytoplasm of only trophoblast cells, and the intensity was weak throughout their delayed periods showing the decrease of the amount of PGE₂. The administration of estradiol induced no difference in the intensity nor in the location of the fluorescence in the delayed implanting blastocysts on Day 13.

(受付: 1989 年 12 月 8 日)

妊娠初期マウス子宮内膜間質細胞の脱落 膜化についての超微形態学的検討 —predecidualization, decidualization にともなう形態変化—

Ultrastructural Observation on Mouse Predecidualized and Decidualized Endometrial Stromal Cells

東北大学医学部産科婦人科学教室

上原 茂樹 円谷 隆 倉林 由美代
Shigeki UEHARA Takashi TSUMURAYA Yumiyo KURAHAYASHI
岡村 州博 高林 俊文 矢嶋 聰
Kunihiro OKAMURA Toshifumi TAKABAYASHI Akira YAMJIMA

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

Predecidualization, decidualization にともなう子宮内膜間質細胞の変化をマウスを用いて超微形態学的に検索した。検体は、卵巣摘出、非妊娠、妊娠第1日、妊娠第4日、妊娠第6日の5種の各条件下のマウスより得て、その上皮下部、筋層近接部の2部位を観察した。その結果、妊娠第4日群では、細胞断面の形状、細胞の配列、細胞形、細胞内小器官の分布において、卵巣摘出、非妊娠、妊娠第1日の各群と差異をみた。しかもその差異は上皮下部でも筋層近接部でも認められたことから、predecidualization は卵巣に由来する性ステロイドによる間質細胞の変化であると示唆された。また、妊娠第6日群では、妊娠第4日群と比較してさらに異なった細胞形態をとり、胚との距離によってその形態も変化を示した。これより decidualization は胚自体による直接作用が関与する間質細胞の分化であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 455—463, 1990)

緒 言

妊娠成立のためには、子宮内膜間質細胞（以下間質細胞と略す）が脱落膜化する必要がある。この現象は、胞胚の着床に伴う間質細胞の分化と考えられており¹⁻³、その特徴としてDNA合成⁴・RNA合成^{4,5}・蛋白合成⁶の変化が報告されているほか、最近では形態的に細胞内のintermediate filamentの増加^{7,8}、生化学的にはintermediate filamentの構成物質であるdesminの増加^{9,10}が報告されている。しか

し、間質細胞は性ステロイド受容体を有しており、progesteroneの作用を受けて、着床前にすでに細胞径の増大などの形態変化を起こしていること^{11,12}も報告されている。ヒトでは分泌期後期に脱落膜細胞に似たlaminin陽性細胞が出現すること¹³、また、prolactin産生がみられること¹⁴も報告されている。従って、間質細胞より脱落膜細胞へ分化する以前に、predecidualizationの時期が設定でき、predecidualized stromal cellの存在が規定できよう。しかし、この点についての超微形態学的検討はこれまであま

りなされておらず、何を predecidualization とするか、また、decidualization とするかは判然としない。そこで本研究では、卵巢摘出群、非妊娠群（無処置群）、妊娠第 1 日群、妊娠第 4 日群、妊娠第 6 日群の 5 種の条件下でマウス間質細胞を超微形態観察し、間質細胞より predecidualized stromal cell へ、さらに脱落膜細胞へと進行する一連の分化現象を検討するとともに、間質細胞の胚や上皮との関係についても言及した。

方 法

1) マウス子宮の摘出

ICR 系雌マウス（8-16 週齢）を用い、両側卵巢摘出群、非妊娠群、妊娠第 1 日群、妊娠第 4 日群、妊娠第 6 日群の 5 群（各群 2-3 匹）を作製し、これらを ether 麻酔下、頸椎脱臼にて屠殺し子宮を摘出した。卵巢摘出群における手術は ether 麻酔下にて行い、2 週間以上の間隔をおいて子宮摘出を施行した。また、各妊娠群は、自然交配下に、翌朝陰栓形成を認めたものを妊娠第 1 日群とし、以後の経日をもって妊娠第 4 日群、妊娠第 6 日群を得た。

2) 透過型電子顕微鏡（以下電顕と略す）観察法

妊娠第 6 日群のマウスは、着床後のため子宮の肥大が顕著で、着床部を目標として細切すると原形が不明瞭となることから、経大動脈的に灌流固定（2.5 % glutaldehyde）を行った後に子宮を摘出した。

摘出子宮は各子宮角につき中央部より 2 mm 幅の横断切片を 5-6 個得て、4℃下、2.5 % glutaldehyde (0.1M cacodylate buffer) に 2-6 時間浸漬し前固定とし、次いで、0.1M cacodylate buffer 中で overnight の洗浄後、4℃下、1 % osmium tetroxide (0.1M cacodylate buffer) 中で 2 時間の後固定を行った。その後アルコール系列により脱水後、propylene oxide にて置換し、Epon 樹脂に包埋した。超薄切片作製は DuPont 社製 MT-5000 型 ultramicrotome を用いて、酢酸ウラン、クエン酸鉛にて電子染色をした後、日立製作所製 H-600 型透過電顕にて観察した。

観察部位は、着床側である反間膜側子宮内膜に限定し、子宮内膜表層として上皮下部を、また深層として筋層近接部を設定した。なお、妊娠第 6 日群では、着床部と非着床部を区別して観察したが、筋層近接部については着床部深層の観察にとどめた。

各条件、各部位の細胞形態比較を容易にするため、観察倍率を X 4000 とし写真撮影した。

結 果

1) 間質細胞（脱落膜細胞）の形状・大きさの変化（表 1）

i) 上皮下部間質細胞について（写真 1-9）

各群の細胞断面の形状・細胞径に明確な差が見られた。

細胞断面の形状を表す因子として細胞表面の凹凸および細胞体の尾のような突起状伸展の 2 つがあげられた。卵巢摘出群では凹凸が顕著で、いびつな形状を示し、突起状の細胞体伸展を有した。このような形状は、非妊娠群、妊娠第 1 日群でも認められたが、妊娠第 4 日群になると細胞表面は平坦化し、突起状伸展も消退、断面は一部に紡錘形の細胞が整然と配列しているのが特徴的で、また立方形に近いものも一部にあった。妊娠第 6 日群の観察によると上皮の消失がみられ、胚細胞と紡錘形をとった間質細胞（脱落膜細胞）が密接し、また細胞間に junction があり細胞間隙がほとんど認められない第 1 層が観察され、それより僅かに深い部分では junction を有するものの細胞間隙を認める接し方を示す第 2 層があり、次いで大きい細胞間隙を有して細胞が network 状に突起により接し、そこに junction を形成している第 3 層が認められた。毛細血管は第 2 層より深い部分にみられた。また非着床部の間質細胞では、細胞間隙が広くあいており、楕円あるいは立方体に近い細胞断面を呈し、junction を有した細胞接着が散在性にみとめられた。この形態は着床部の各細胞群のどれとも大きく異なっていた。上皮下部の細胞間隔は筋層近接部に比較してある程度密であった。

細胞径の比較では、非妊娠群を基準とすると、卵巢摘出群の細胞はそれより小さく、妊娠第 1 日群も増大傾向は認められなかった。しかし、妊娠第 4 日群では一部の上皮下で増大傾向がみられ、妊娠第 6 日群では、着床部でさらにその傾向が増したが、非着床部の細胞径は妊娠第 4 日群と大きい差はなかった。

ii) 筋層近接部間質細胞について（写真 11-15）

この部位の細胞においても、各群において形状・大きさの点で差をみた。形状の差としては、胞体の突起状伸展が妊娠第 4 日・第 6 日各群で小さくなり、紡錘状を呈するものが増加することがあげられた。ただ、妊娠第 4 日群で上皮下部間質細胞の間隔は狭くなったのに対し、この部位ではその傾向は観察されなかった。また、妊娠第 6 日群のこの部位の細胞に junction の形成がないことも上皮下部細胞との相異点としてあげられた。細胞間隔は上皮下部に比較

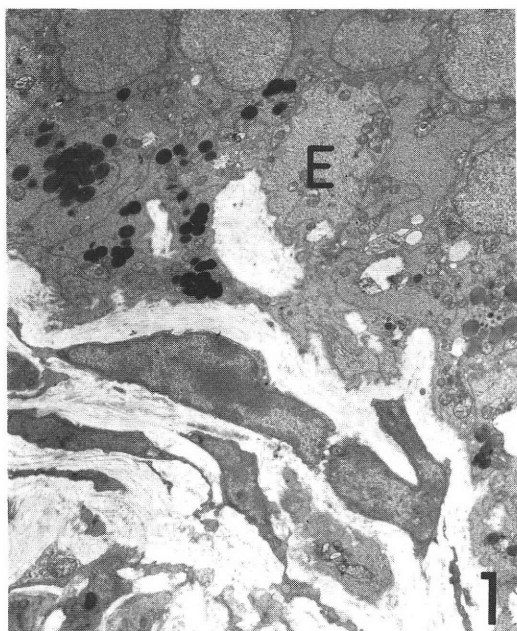


写真1 卵巣摘出群の上皮下部間質細胞
(×4000) E:子宮内膜上皮

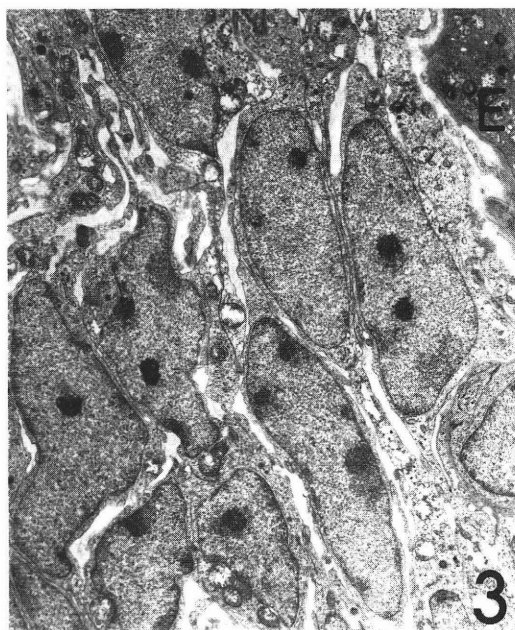


写真3 妊娠第1日群の上皮下部間質細胞
(×4000) E:子宮内膜上皮

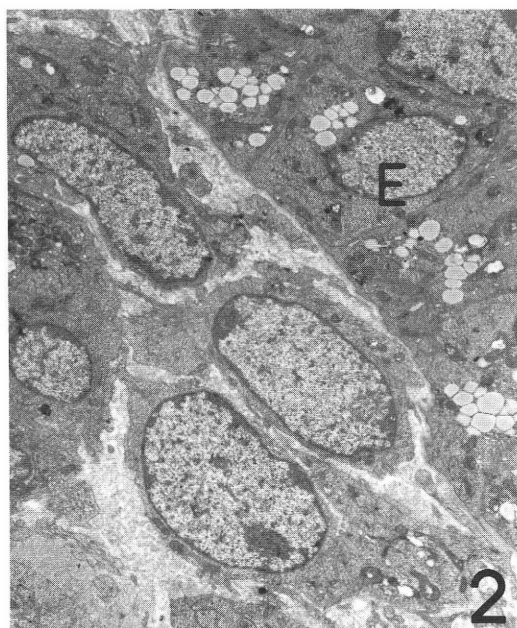


写真2 非妊娠群の上皮下部間質細胞
(×4000) E:子宮内膜上皮

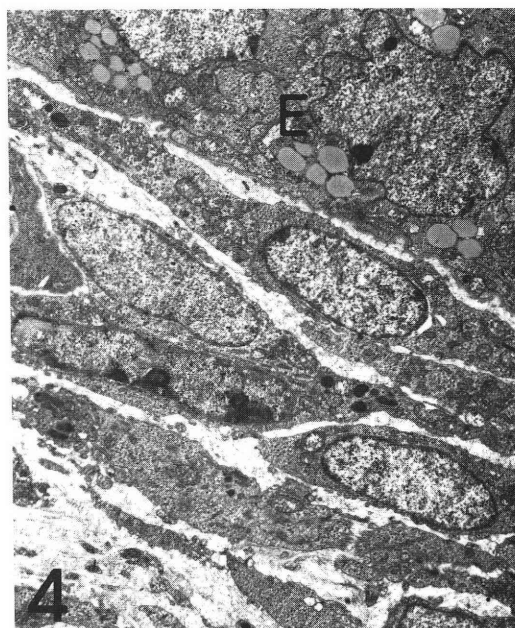


写真4 妊娠第4日群の上皮下部間質細胞
(×4000) 紡錘形の細胞が顕著な部位
E:子宮内膜上皮

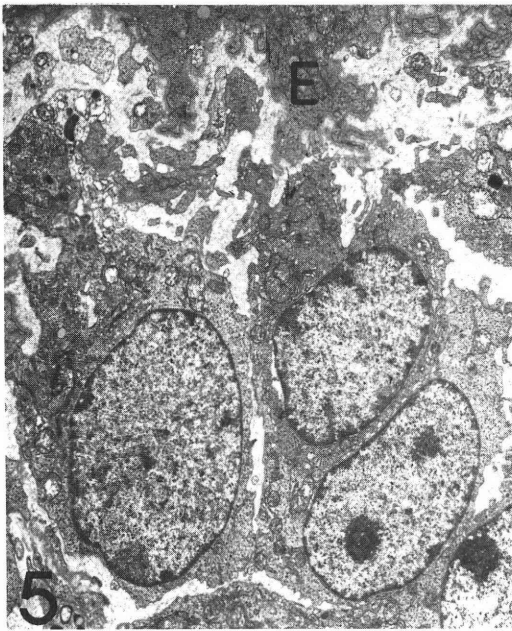


写真5 妊娠第4日群の上皮下部間質細胞
($\times 4000$) 立方形に近い、径の増大した細胞が顕著な部位
E: 子宮内膜上皮

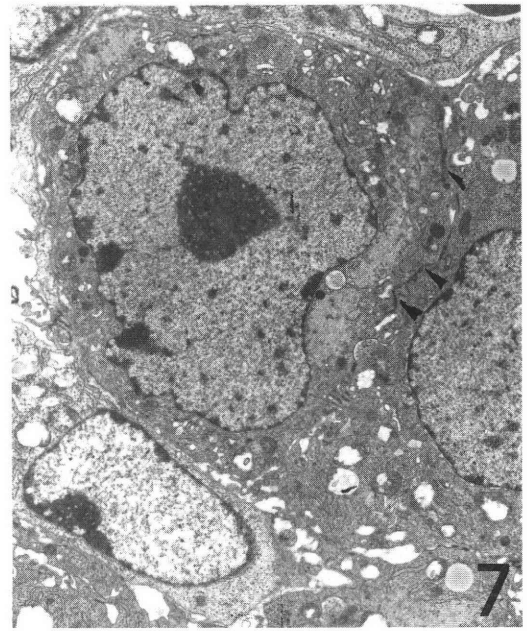


写真7 妊娠第6日群の着床部間質(脱落膜)細胞
($\times 4000$) 第1層につづく第2層にあたる部分、mitochondriaの膨化junction (arrow head)の形成がある。

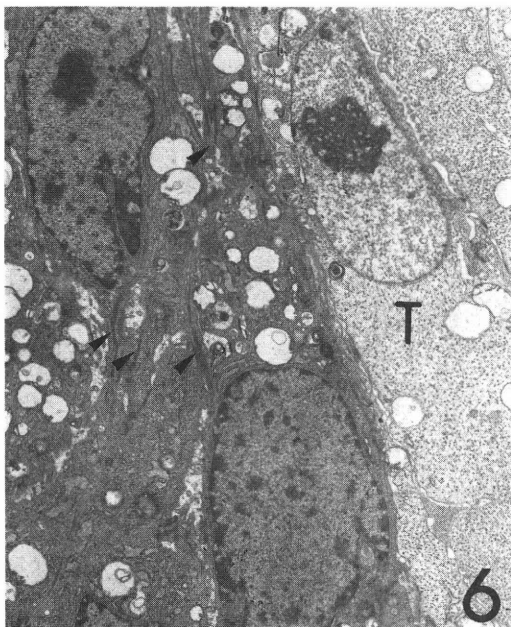


写真6 妊娠第6日群の着床部間質(脱落膜)細胞
($\times 4000$) 胚に接する部分で第1層にあたる部分、mitochondriaの膨化がある細胞がjunctionを形成して密接している。
arrow head: junction, T: trophoblast



写真8 妊娠第6日群の着床部間質(脱落膜)細胞
($\times 4000$) 第3層、networkを形成するように突起の豊富な細胞がjunction (arrow head)をもって接している。

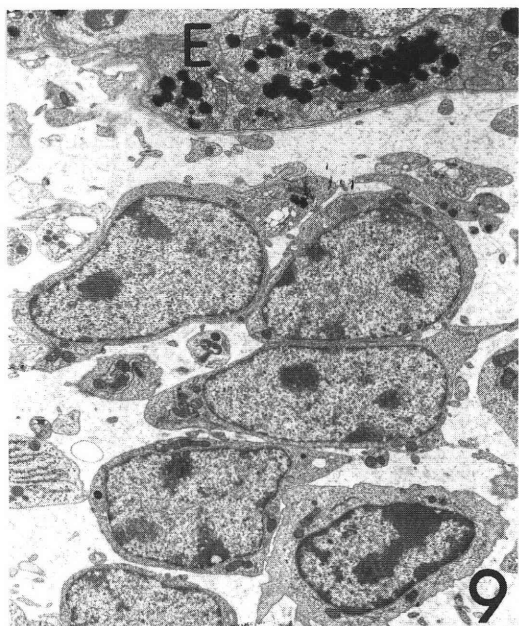


写真9 妊娠第6日群の非着床部上皮下部間質細胞 (×4000)

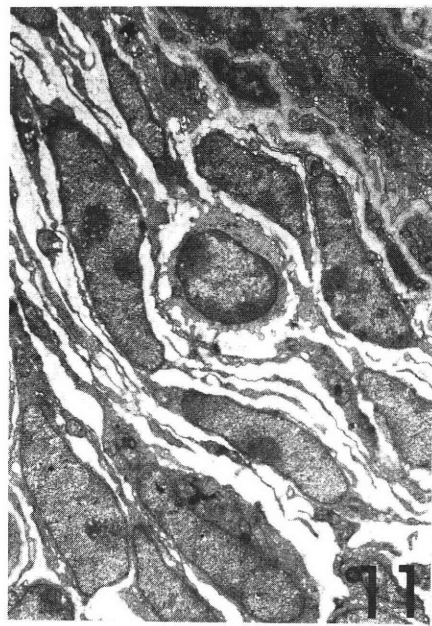


写真11 卵巣摘出群の筋層近接部間質細胞 (×4000)

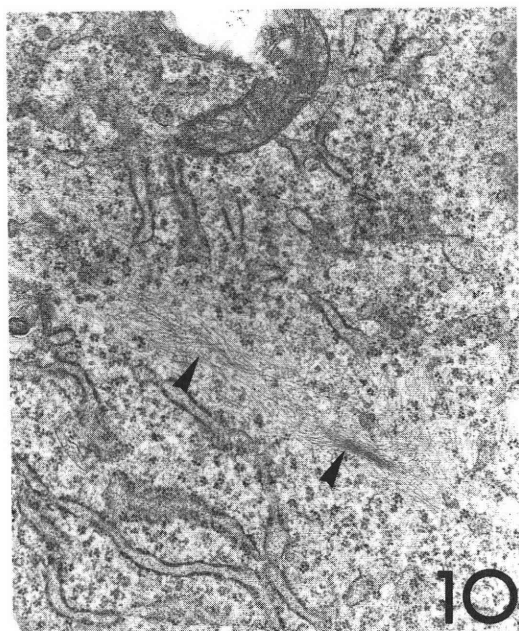


写真10 妊娠第6日群の着床部間質(脱落膜)細胞 (×20000) 第2層の脱落膜細胞にみられた intermediate filament (arrow head).

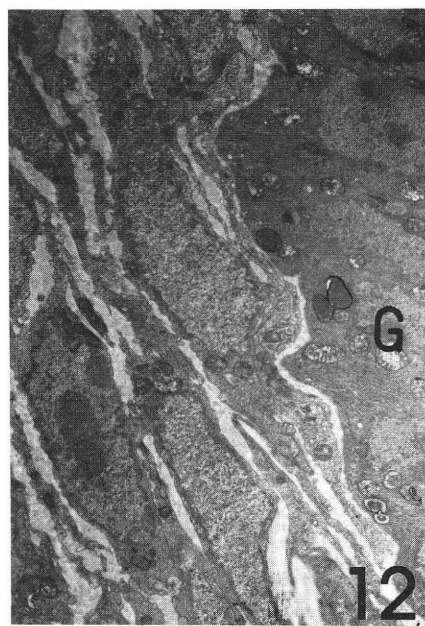


写真12 非妊娠群の筋層近接部間質細胞 (×4000)
G:分泌腺上皮

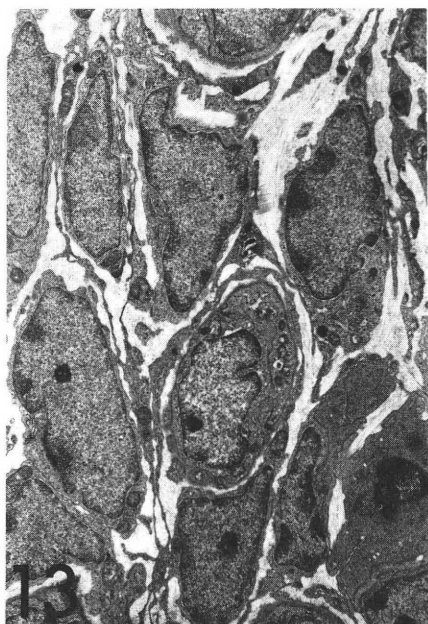


写真 13 妊娠第 1 日群の筋層近接部間質細胞
($\times 4000$)

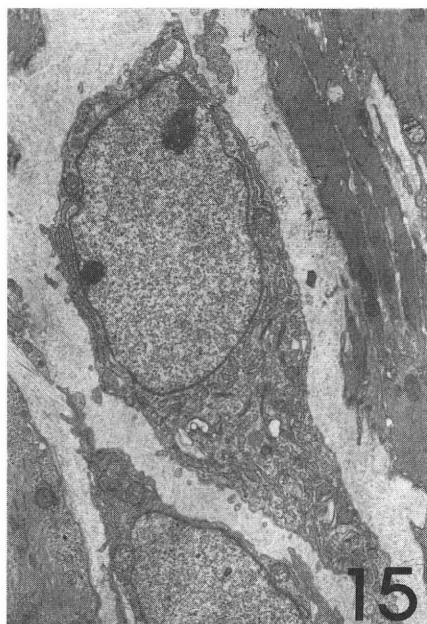


写真 15 妊娠第 6 日群の筋層近接部間質細胞 (着床部の深層に相当する) ($\times 4000$)

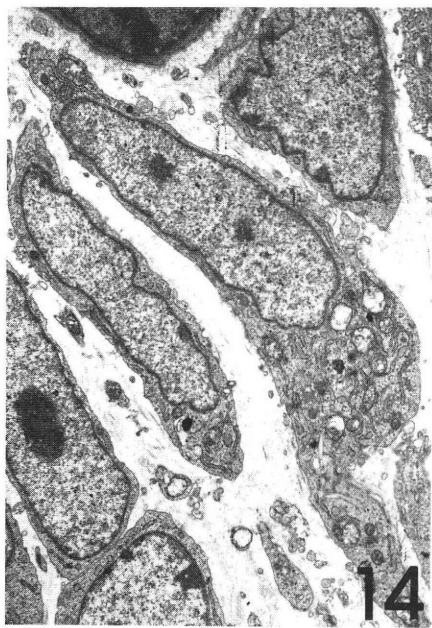


写真 14 妊娠第 4 日群の筋層近接部間質細胞
($\times 4000$)

して広い傾向にあった。さらにまた細胞径の変化は上皮下部間質細胞で観察された傾向と同様であった。2) 間質細胞 (脱落膜細胞) の小器官の変化 (表 2) i) 上皮下部間質細胞について (写真 1-10)

。卵巣摘出群では、少数の mitochondria や endoplasmic reticulum (以下 ER と略す) が認められるのみで、極めて乏しい小器官を有するにすぎなかった。また、細胞質も少なく、相対的に大きい N/C 比をとった。一部には分泌顆粒を有する細胞が認められた。非妊娠群では、小器官は卵巣摘出群より多くなるものの、N/C 比は依然大きかった。一部には Golgi 体の出現がみられたほか、分泌顆粒を有する細胞も観察された。妊娠第 1 日群は、ほとんど非妊娠群と同様の細胞内小器官像を呈した。しかし、妊娠第 4 日群になると、小器官の増加が顕著となり、mitochondria, ER をはじめとして、Golgi 体、分泌顆粒の出現頻度が増した。また、細胞質も拡大し、N/C 比は前 3 群よりかなり減少した。さらに着床の完了した妊娠第 6 日群において、着床部では小器官はなお増加し、極めて豊富な mitochondria, ER, Golgi 体、分泌顆粒を有するようになった。そして intermediate filament 様の構造が出現し、胚に密接する細胞の mitochondria の膨化が特徴的であった。非着床部では、妊娠第 4 日群の小器官と比較して大きい差異はみられなかった。

ii) 筋層近接部間質細胞について (写真 11-15)

表 1 細胞の形状・大きさの変化

	上皮下部間質細胞		筋層近接部間質細胞	
	断面の形状	細胞径	断面の形状	細胞径
卵巣摘出群	凹凸・いびつ 突起状伸展	小	凹凸・いびつ 突起状伸展	小
非妊娠群	凹凸 突起状伸展	中	凹凸 突起状伸展	中
妊娠第 1 日群	同 上	同 上	同 上	同 上
妊娠第 4 日群	一部紡錘形・立方形に近い。 突起状伸展は減少	一部大	紡錘形・立方形に近い 突起状伸展は減少	大
妊娠第 6 日群	上皮消失			
着床部	3 種に区別できる細胞層 の形成 junction の形成	さらに大	紡錘形・立方形に近い。	さらに大
非着床部	楕円一立方形に近い junction の形成	妊娠第 4 日群 と同様	—————	—————

表 2 細胞内小器官、N/C 比の変化

	上皮下部間質細胞		筋層近接部間質細胞	
	小器官	N/C	小器官	N/C
卵巣摘出群	少数の M. ER	大	少数の M. ER	大
非妊娠群	卵巣摘出群より 増加 G	大	卵巣摘出群より 増加 G	大
妊娠第 1 日群	非妊娠群と同程度	大	非妊娠群と同程度	大
妊娠第 4 日群	増加	減少	増加	減少
妊娠第 6 日群				
着床部	さらに増加 intermediate junction の形成	さらに減少	妊娠第 4 日群と 同程度	妊娠第 4 日群と 同程度
非着床部	妊娠第 4 日群と 同程度	妊娠第 4 日群と 同程度	—————	—————

M : mitochondria ER : endoplamic reticulum G : Golgi apperatus

卵巣摘出群、非妊娠群、妊娠第 1 日群、妊娠第 4 日群とも、上皮下部細胞における一連の変化と同様の傾向を示した。しかし、妊娠第 6 日群では、着床部の上皮下部間質細胞と比較すると小器官はそれより少なく、非着床部上皮下部細胞と似た形態をとったが、ER は著明に多く存在した。

考 察

子宮内膜は性ステロイドの作用を受けて、その時々で異なった機能の形態を示す。また、胚の着床によっても、その局所作用で大きく変化する¹⁻³⁾。これら

の刺激が、間質細胞を predecidualization, decidualization という一連の変化に導くわけであるが、この点を超微形態学的に検討した報告は少なく、predecidualization, decidualization を規定する形態因子が明瞭とはいえない。

本研究において指摘できることは、性ホルモンの作用がない卵巣摘出群の間質細胞は、形態面でも、また、その小器官の分布より類推できる機能面でも極めて貧弱であることである。しかも、非妊娠群、妊娠第 1 日群の間質細胞が、卵巣摘出群のそれと大きく異なっているとは言えず、性周期内における間

質細胞の変化は著しいものではないことも指摘できる。それに較べて妊娠第4日群になると、間質細胞は大きさ、形状、小器官とも様変わりする。このことは Welsh & Enders の報告¹²⁾に一致する。しかし上皮下部でも一部は紡錘形をとり、また一部は肥大するという不均一な変化であった。妊娠第4日目は着床前期で、胚は子宮内に浮遊した状態で存在するが、胚より分泌される性ステロイドやプロスタグランジンの局所作用が間質細胞に及ぶ可能性も考えられる。だが、この時期に得られた変化が、筋層近接部においてもほぼ同様に認められるためむしろ卵巣由来の性ステロイドに起因するものと言い得ると考える。そして子宮内膜のホルモン感受性の差が部位による形態の差の原因になっていると推測される。ここまでの一連の変化、すなわち卵巣由来の性ステロイドによって惹起される間質細胞の肥大、変形、小器官の発達を predecidualization と呼べよう。それにより、間質細胞にエネルギー代謝、タンパク質合成能の活性化がなされていることは小器官の発達からみて明らかと推測できる。

妊娠第6日群における胚隣接部の細胞の形態は、妊娠第4日群の上皮下部間質細胞と大きく異なっていた。この変化は decidualization にともなうものと言えよう。ただこの時期でも筋層近接部の細胞、非着床部上皮下部細胞では、そのような顕著な変化が観察されず、decidualization は胚の子宮内膜に対する直接作用に起因すると考えられた。ただ脱落膜細胞群は、胚に近い部分より第1層、第2層、そして第3層と明瞭に異なる形態をとる細胞層によって構成されていた。この形態差は胚のおよぼす直接作用の強さの差によるものと考えられ、作用の強弱が細胞の分化に差異を与えていることが示唆された。

卵巣摘出群を除く妊娠各群における上皮下部細胞と筋層近接部細胞の相異点として、細胞間隔の広さがあり、さらに妊娠第4日目に特異的に認められた上皮下の紡錘形の細胞の存在があげられた。この結果は、間質細胞が上皮下に集合し、また、特徴ある形態分化をすることを示唆しているが、ただ間質深層に存在する分泌腺上皮下にもある程度の間質細胞の集合がみられたことも考慮すると、何らかの細胞遊走作用を持つ物質や分化を促進させる物質が上皮より分泌されている可能性が推測された。また、妊娠第4日群の上皮下部細胞の大きさ、形態の部分差も上皮からの影響の差により生じている可能性を考慮する必要があると考えられた。

結 語

卵巣摘出群、非妊娠群、妊娠第1日群、妊娠第4日群、妊娠第6日群で子宮内膜間質細胞を超微形態観察し、predecidualization, decidualization に伴う形態変化について検討するとともに、それによって推測できる間質細胞の胚および上皮との関連、また機能について考察した。

文 献

- 1) Krehbiel, R. H.: Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata, *Physiol. Zool.*, 10: 212, 1937
- 2) Bloch, S.: Contributions to research on the female sex hormones, The implantation of the mouse egg, *J. Endocrinol.*, 1: 399, 1939
- 3) DeFeo, V. J.: Decidualization, 191, North Holland Publishing Co., 1967
- 4) Tachi, C., Tachi, S. and Lindner, H. R.: Modification by progesterone of oestradiol induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus, *J. Reprod. Fert.*, 31: 59, 1972
- 5) Lundkvist, O.: Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol induced implantation after an experimental delay, *Biol. Reprod.*, 18: 306, 1978
- 6) Reid, R. T. and Heald, P. J.: Uptake of ³H-leucine into proteins of rat uterus during early pregnancy, *Biochem. Biophys. Acta*, 204: 278, 1970
- 7) O'Shea, J. D., Kleinfeld, R. G. and Marrow, H. A.: Ultrastructure of decidualization in the pseudopregnant rat, *Am. J. Anat.*, 166: 271, 1983
- 8) Tachi, S., Tachi, C. and Lindner, H. R.: Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in the rat, *J. Reprod. Fert.*, 21: 37, 1970
- 9) Glasser, S. R. and Julian, J. A.: Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal decidualization, *Biol. Reprod.*, 35: 463, 1986
- 10) Glasser, S. R., Lampelo, S., Munir, M. I. and Julian, J. A.: Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells, *Differentiation*, 35: 132, 1987
- 11) Bell, S. C.: Decidualization, 220, Oxford University Press, 1983
- 12) Welsh, A. O. and Enders, A. C.: Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration, *Am. J. Anat.*, 172: 1, 1985

- 13) Wewer, U. M., Faber, M., Liotta, L. A. and Albrechtsen, R.: Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells, *Lab. Invest.*, 53: 624, 1985
- 14) Riddik, D. H. and Kusmick, W. F.: Decidua: A possible source of amniotic fluid prolactin, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127: 187, 1977

Ultrastructural Observation on Mouse Predecidualized and Decidualized Endometrial Stromal Cells

Shigeki Uehara, Takashi Tsumuraya,
Yumiyo Kurahayashi, Kunihiro Okamura,
Toshifumi Takabayashi and Akira Yamjima

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

In order to analyze the morphological change of endometrium accompanying with predecidualization or decidualization, we have ultrastructurally

observed the endometrial stromal cell obtained from the ovariectomized, the non-pregnancy, the pregnancy day 1, the pregnancy day 4 and the pregnancy day 6 mice. The stromal cell just under the epithelium and it near the muscular layer were observed in each uterine sample.

The stromal cell of the pregnancy day 4 uteri differed from it of the ovariectomized, the non-pregnancy and the pregnancy day 1 uteri in shape, arrangement, size and distribution of organella. Such morphological difference was recognized both on the stroma under the epithelium and on it near the muscular layer. Therefore, it is indicated that the differentiation of the pregnancy day 4 stroma, predecidualization, was the phenomenon induced with the effect of ovarian sex steroids. In the pregnancy day 6 uteri, the stromal cell near the implanting embryo was furthermore differentiated from it of pregnancy day 4 uteri. However, the stromal cell away from the embryo and it near muscular layer showed no sign of the differentiation. It is, therefore, indicated that the morphological change showed by the stromal cell near the embryo, decidualization, was the phenomenon induced with the direct action of embryo itself.

(受付: 1989 年 11 月 27 日)

MONOZYGOTIC TWIN FORMATION IN MOUSE EMBRYOS FOLLOWING FERTILIZATION *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Satoru CHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Christian-Albrechts-University Hospital,
Kiel 2300, Federal Republic of Germany
(Director: Prof. Dr. Kurt Semm)

Department of Obstetrics and Gynecology,
Suzuki Memorial Hospital, Iwanuma 989-24, Japan

(Director: Dr. Masakuni Suzuki)

Abstract: The incidence of human identical twins after *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) is higher than the commonly accepted incidence after conception *in vivo*. However, how and when the monozygotic twin embryos are formed *in vivo* after IVF-ET is not known. This paper reports that eight mouse blastocysts which had double inner cell masses in 261 blastocysts (3.1%) were identified after fertilization *in vitro* and they developed into trophoblastic outgrowth formation with two inner cell masses. In contrast, it was observed only three monozygous double inner cell masses in 526 blastocysts (0.6%) which were fertilized *in vivo* and cultured from 2-cell stage *in vitro*. It is therefore possible that fertilization *in vitro* predisposes to twinning.

It was also observed that some single inner cell mass blastocysts, which were fertilized *in vivo* and *in vitro*, were subdivided after hatching and attachment on the plastic dishes, and that they grew into double inner cell masses formation. However, such subdivisions were seemed artificial and it usually does not occur *in vivo*.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 464—468, 1990)

Introduction

It is unknown why the incidence of human identical twins after *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) is higher than the commonly accepted incidence after conception *in vivo*³⁾. The conditions of embryonic growth *in vitro* might influence the incidence of identical twinning. The fissioning of embryos during the early cleavage stages from 2-cell to morula stage, and the surgical fissioning of inner cell mass at blastocyst stage result in the formation of

identical twins^{6,7,8,9)}. However, how and when monozygotic twin embryos are formed after IVF is not known. It was observed that eight mouse blastocysts which had double inner cell masses were identified after *in vitro* fertilization. Further, half of them hatched and developed to trophoblastic outgrowth with two inner cell masses after 48 hours in culture.

The present study reports the correlation between IVF and the presence of double inner cell masses in blastocysts.

Materials and Methods

Female CB6F1 mice (Charles River Wiga, Sulzfeld, FRG) superovulated with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) were sacrificed 15 hours after hCG injection and the oocyte-cumulus complex were collected from the ampullae of oviducts. Sperms were obtained from the vas deferens of CB6F1 males. After preincubation for 1 hour, sperms (8×10^5 cells/ml) were added to the medium containing eggs. At 24 hours later, 2-cell embryos were collected and transferred into fresh media. Two-cell stage embryos fertilized *in vivo* were collected from the oviducts of 2-day pregnant females which were superovulated with PMSG and hCG, and mated with males. After 3 days of culture from 2-cell stage, the number of blastocysts was evaluated and the formation of inner cell mass was observed carefully under the light microscopy.

Ham's F-10 (Flow Labs.) for insemination was supplemented with 2.2 mg/ml NaHCO_3 , 0.25 mg/ml calcium lactate and 30 mg/ml bovine serum albumin (BSA). Medium for embryo culture was the same, but lacked in BSA. Further, apparently normal blastocysts were transferred into 4 well plastic dishes (Nunc) with CMRL-1066 (Gibco) supplemented with 2.2 mg/ml NaHCO_3 , 1 mM L-glutamine and 10% fetal calf serum (Boehringer Mannheim) at 37°C with 5% CO_2 in air. After 48

hours in culture, trophoblastic outgrowth and formation of inner cell mass were observed.

Results

The rates of blastocyst development from 2-cell embryos fertilized *in vivo* and *in vitro* were 85.3% and 70.0%, respectively. Eight monozygous double inner cell masses in 261 blastocysts fertilized *in vitro* (3.1%) were identified, although only three monozygous double inner cell masses were observed in 526 blastocysts fertilized *in vivo* (0.6%) (Table 1).

Further, six of 11 blastocysts which were recognised as putative double inner cell masses attached to the surface of the plastic culture dish after hatching, and developed into trophoblastic outgrowth formation with two inner cell masses on day 2 of culture (Fig. 1).

The rates of attachment of single inner cell mass blastocysts fertilized *in vivo* and *in vitro* were 73.5% and 41.0%, respectively. Six embryos which had two inner cell masses in trophoblastic outgrowth were observed in total 444 attached single inner cell mass blastocysts fertilized *in vivo* and *in vitro* (Fig. 2) (Table 2).

Statistical significance was estimated by chi-square test with Yates correction.

Discussion

It has been demonstrated that one inner cell mass of a mouse blastocyst subdivided after hat-

Table 1. Number of monozygous double inner cell masses blastocysts after fertilization in vitro and in vivo.

Fertilization	No. blasrocysts	No. double inner cell masses	No. trophoblastic outgrowth with double inner cell masses
	No. 2-cell embryos	No. blastocysts	No. double inner cell masses blasocysts
in vivo	526/617(85.3%)	3/526(0.6%)	2/3
in vitro	261/373(70.0%)	8/261(3.1%)	4/8

* $P < 0.025$ by chi-square test.

Table 2. Number of monozygous double inner cell masses formation in trophoblastic outgrowth after the attachment of single inner cell mass blastocysts.

Fertilization	No. blastocyst attachment	No. double inner cell masses formation
	No. single blastocysts	No. blastocyst attachment
in vivo	346/471(73.5%)	4/346(1.2%)
in vitro	98/239(41.0%)	2/ 98(2.0%)

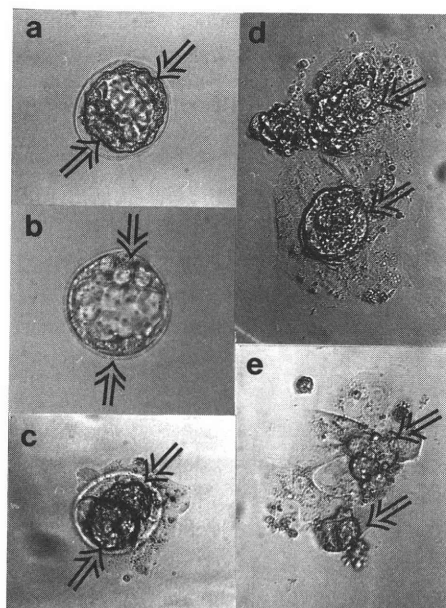


Fig. 1 a) Monozygous double inner cell masses in the blastocyst. b) Expanded blastocyst with double inner cell masses. c) Hatching blastocyst showing attachment to the surface of the plastic culture dish. d) After 48 hours in culture of blastocysts. Trophoblastic outgrowth and developed two inner cell masses are observed. e) Poor differentiation of double inner cell masses in trophoblastic outgrowth formations ($\times 300$).

ching and attachment to the plastic dish, and each subdivision grew into two independent egg cylinders at the ratio of nearly 1:100⁴⁾. The cause of this twin formation is dependent on the symmetric attachment to the plastic substrate and bilateral outgrowing of egg cylinder. Also in this study, six blastocysts of total 444 single blastocysts were splitted into two inner cell masses in same way. However, such a type of subdivision is artificial monozygotic twin formation and it usually does not occur *in vivo* (Fig. 2).

Development of the murine single-cell or 2-cell stage to blastocysts has been used as a means for the quality-control of medium and culture conditions employed in human IVF-ET programmes^{1,2,5)}. However, no statements have been made with regard to the possible propensity for the monozygous double inner cell masses in mouse embryos developing *in vitro*^{12,13)}. In this

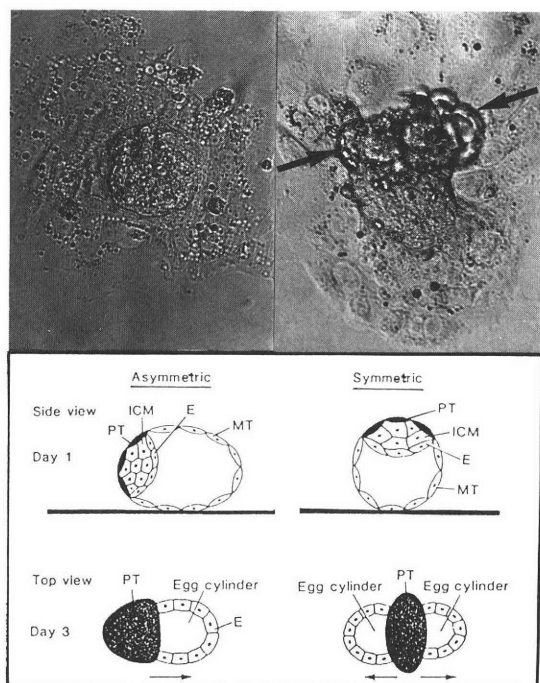


Fig. 2 Trophoblastic outgrowth formations after 48 hours in culture of single inner cell mass blastocysts. Two inner cell masses are observed in right embryo ($\times 300$). ICM: inner cell mass, MT: mural trophoblast, PT: polar trophoblast, E: endoderm

experiment, I also found only 3 monozygous double inner cell masses (0.6%) in 526 blastocysts fertilized *in vivo*. But 8 monozygous double inner cell masses were observed in 261 blastocysts (3.1%) fertilized *in vitro*. It is suggested that the conditions of *in vitro* fertilization influence the incidence of double inner cell masses.

Cases of human identical twins following IVF-ET are described as twins within a monochorionic, diamniotic placental and membrane configuration^{10,11)}. It indicates that the splitting of embryos occurred in the blastocyst stage either before or after hatching (Fig. 3). It is therefore considered that human monozygotic twin may be caused by double inner cell masses in blastocyst fertilized *in vitro*^{12,13)}.

Acknowledgments

The helpful discussion of Prof. Dr. L. Mettler

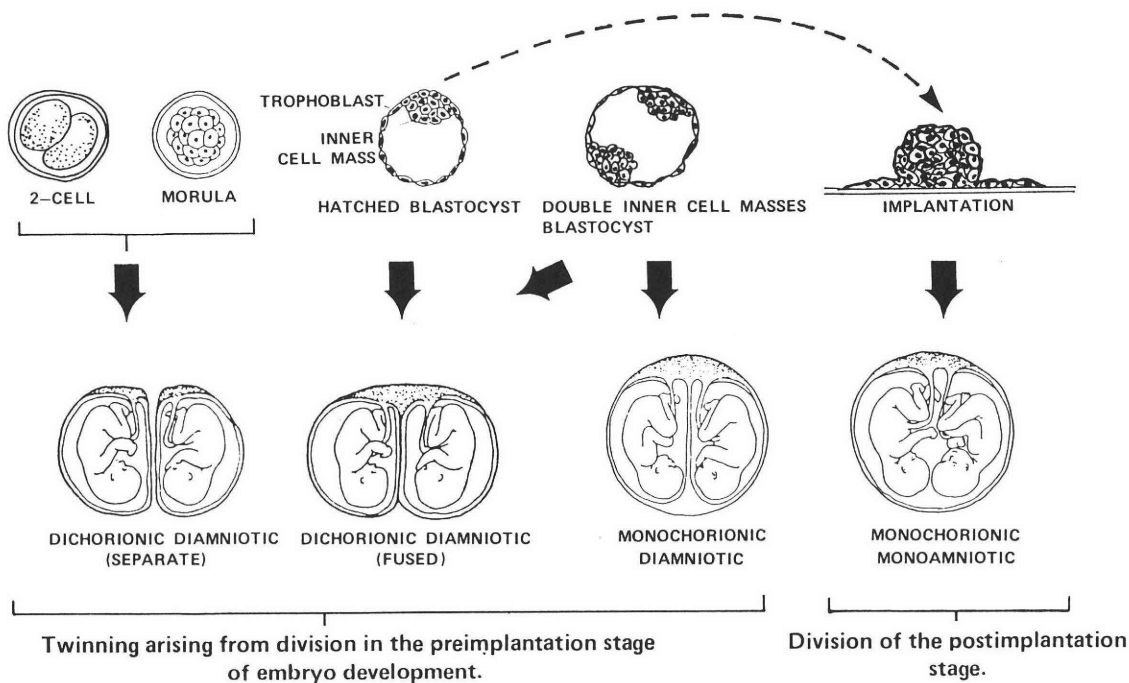


Fig. 3 Twinning arising from division in the pre and post implantation stages of embryo development.

and editorial assistance of Dr. A. Stevenson are appreciated. This work was supported by a grant from the "Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research" in Japan and the "Alexander von Humboldt Foundation" in Federal Republic of Germany.

References

- 1) Arny, M., Nachtigall, L. and Quagliarello, J.: The effect of preimplantation culture conditions on murine embryo implantation and fetal development, *Fertil. Steril.*, 48: 861, 1987
- 2) Condon-Mahony, M., Wortham, Jr. J. W. E., Bundreu, J. C., Witmyer, J. and Shirley, B.: Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture materials with a mouse in vivo fertilization system, *Fertil. Steril.*, 44: 521, 1985
- 3) Edwards, R. G., Mettler, L. and Walters, D. E.: Identical twins and in vitro fertilization, *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 3: 114, 1986
- 4) Hsu, Y. C. and Gonda, M. A.: Monozygotic twin formation in mouse embryos in vitro, *Science*, 209: 605, 1980
- 5) Ogawa, T. and Marrs, R.: The effect of protein supplementation on single-cell mouse embryos in vitro, *Fertil. Steril.*, 47: 156, 1987
- 6) Seidel, F.: Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Säugetierei, *Naturewissenschaften*, 39: 355, 1952
- 7) Tarkowski, A. K.: Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs, *Nature*, 184: 1286, 1959
- 8) Tsunoda, Y. and McLaren, A.: Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres, *J. Reprod. Fert.*, 69: 315, 1983
- 9) Willadsen, S. M.: A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins, *Nature*, 277: 298, 1979
- 10) Yovich, J. L., Stanger, J. D., Grauaug, A., Barter, R. A., Lunay, G., Dawkins, R. L. and Mulcahy, M. T.: Monozygotic twins from in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 41: 833, 1984
- 11) Yovich, J. L., Stanger, J. D., Grauaug, A., Lunay, G., Hollingsworth, P. and Mulcahy, M. T.: Fetal abnormality (Goldenhar syndrome) occurring in one of triplet infants derived from in vitro fertilization with possible monozygotic twinning, *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 2:

27, 1985

- 12) Chida, S.: Monozygous double inner cell masses in mouse blastocysts following fertilization in vitro and in vivo, J. In Vitro Fert. Embryo Transfer, 7: 177, 1990
- 13) Chida, S. and Mettler L.: Monozygote Zwillingsembryoblasten-entwicklung von Mausembryonen nach in vitro und in vivo Fertilisation, Zuchthygiene (in press)

体内および体外受精後 に発生する一卵性双胎について

Kiel 大学産婦人科
(現)スズキ病院産婦人科

千田 智

ヒト体外受精胚移植 (IVF・ET) 後に発生する一卵性双胎の頻度は体内受精妊娠より高いと報告されているが、原因は不明である。マウスにおいて、体外受精卵と体内受精卵を 3 日間培養後胞胚の内細胞塊を観察すると、2 個の内細胞塊をもつ胞胚への発生頻度が体外受精卵において高率であり、これらは Hatching 後 2 個の egg cylinder へと発生した。これまでのヒト IVF・ET における一卵性双胎の報告では 1 絨毛 2 羊膜であり Hatching 前後における双胎発生を示唆しており、体外受精後に発生する 1 胞胚内 2 内細胞塊卵がその原因と思われた。

(受付: 1989 年 12 月 9 日)

マウス 2 細胞期以後の胚発育に及ぼす SOD 添加低酸素下培養の効果

The Effects of SOD Added Low Oxygen Culture on Mouse Embryos after the First Cell Cycle

京都大学医学部婦人科学産科学教室

馬 岡 陽 野 田 洋 一 森 崇 英
Yoh UMAOKA Yoichi NODA Takahide MORI

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

これまで我々は SOD 添加低酸素下で前核期胚を培養すると、マウス 2-cell block 現象が解除されることを報告してきた。本研究では、2-cell block 以後のマウス胚発育における SOD 添加低酸素濃度下培養の有効性を、in vivo における胚発育の効率と比較検討した。過排卵処理を行なった in vivo 胚の発育を時間を追って検討したところ、各時刻における個々の胚の発育効率にばらつきがみられ、着床直前と思われる hCG 後 114 時間には、孵化胞胚率 67.3 %、拡張胚盤胞率 25.0 %、胚盤胞率 7.7 % と個々の胚に発育のずれが認められた。一方 SOD 添加低酸素下培養で前核期胚から培養した場合は、hCG 後 114 時間に回収した胚に比較し明らかに発育が遅延した。同様に後期 2 細胞期胚から培養した場合は、孵化胞胚率 53.7 %、拡張胚盤胞率 22.2 %、胚盤胞率 20.4 % が得られ、hCG 後 114 時間後に回収した in vivo 胚と比べ、その発育効率に有意差がなかった。このように SOD 添加低酸素濃度下培養で、後期 2 細胞期胚が in vivo に匹敵する発育効率を示したことより、また同時に SOD がもつ O_2^- の消去作用から考えて、2 細胞期以後の胚発育にも酸素毒性に対する配慮が必要であることを示していると理解される。これらの事実は、SOD 添加低酸素培養の安全性が証明されれば将来ヒト体外受精にも応用可能であることを示唆している。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 469—474, 1990)

序 論

マウス 2-cell block が superoxide dismutase (SOD) により解除されることを報告した¹⁻⁴⁾。更に低酸素濃度下培養でもマウス 2-cell block が解除されること^{5,6)}、SOD 添加低酸素濃度下培養で、極めて高い胚盤胞率が得られ⁵⁻⁷⁾、得られた胚盤胞は超微形態的に異常を認めないこと⁶⁾を既に明らかにしている。これらの事実はマウス 2-cell block に酸素毒性が関与していることを示唆している。本研究では、このようにマウス 2-cell block 現象に及ぼす酸素毒性の

影響という観点から解析を行なった。本法を将来ヒト体外受精胚培養に応用する観点から、2 細胞期胚以後の in vitro 胚発生の過程においても酸素毒性が重大な影響を与えるかどうかを検討する目的で、SOD 添加低酸素濃度下培養系において 2-cell 以後のマウス胚培養を行なった。

方 法

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置を行ない、hCG 投与後に同系雄と同居させ、翌朝

腔栓を確認し妊娠1日目とした。hCG投与後18から114時間に頸椎脱臼法にて屠殺し、卵管子宮還流法にて胚を回収、変性卵を除外し実験に供した。

培養液にはMilli-Q装置で作製した超純水を用い、0.3% Bovine Serum Albumin (BSA) を添加したBWV液⁸⁾を基本培養液とした。各実験12時間前に基本培養液を調整し、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、各々約10個の胚を500 μ lの培養液に移して実験に供した。

基本培養条件は、基本培養液中で、37°C、5% CO₂ in airの気相下において、hCG投与114時間まで連続培養した。

低酸素濃度下で採卵から培養までを一貫して行なう目的で、アトム社インファントウオーマを改裝し、外気との交通を遮断するため可能な限り各所を密封した装置内部に実体顕微鏡、恒温板、培養チェンバーを設置した低酸素下採卵培養装置を考案、作製した^{6,7)}。100%窒素ガスを急速注入し酸素濃度を低下させた後、酸素濃度計(アトム社:OX 30)を用い、酸素濃度(%)を連続測定しながら混合ガスを注入し、装置内の気相を5%酸素、5%二酸化炭素、90%窒素に安定させた。大気中でマウスを屠殺し、直ちに酸素濃度5%の装置内に移した後開腹し、実体顕微鏡下で形態正常胚を回収した。回収した胚は、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内⁶⁾の培地に移し連続して培養を

行ない、これを低酸素濃度下培養とした。

酸素毒性が胚発育に及ぼす影響を評価するために活性酸素の消去系酵素SOD^{9,11~13)}のうち、Recombinant human Cu·Zn-superoxide dismutase (r-hSOD¹⁰⁾)を基本培養液に500 μ g/mlを加え、SOD添加培養とした。

以上の基礎条件を設定し、酸素濃度とよびSODが2細胞期以後の胚発育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 (図1)

過排卵処理後の生体内(In vivo)での胚発育状況を把握するために、4週齢雌マウスに過排卵処理を行ない、同系雄マウスと交配させた。妊娠3日目hCG後60時間から妊娠4日目114時間まで4時間から12時間毎に卵管子宮灌流法により胚を回収し、それぞれの時刻に回収された40~216個の初期胚について検討した。胚発育の段階を形態学的に観察し、変性卵を除外して分類した。

実験2 (図2)

SOD添加低酸素濃度下培養におけるマウス前核期胚が示す2細胞期以後の発育効率を、in vivoにおける胚発育、低酸素濃度下培養およびSOD (500 μ g/ml)添加高酸素濃度(大気、20%酸素)下培養における成績と比較した。hCG後18時間で回収した前核期胚を、SOD添加低酸素濃度下培養、SOD添加高酸素濃度下培養および低酸素濃度下培養の3群でhCG後114時間まで連続して培養し、hCG後114時間で

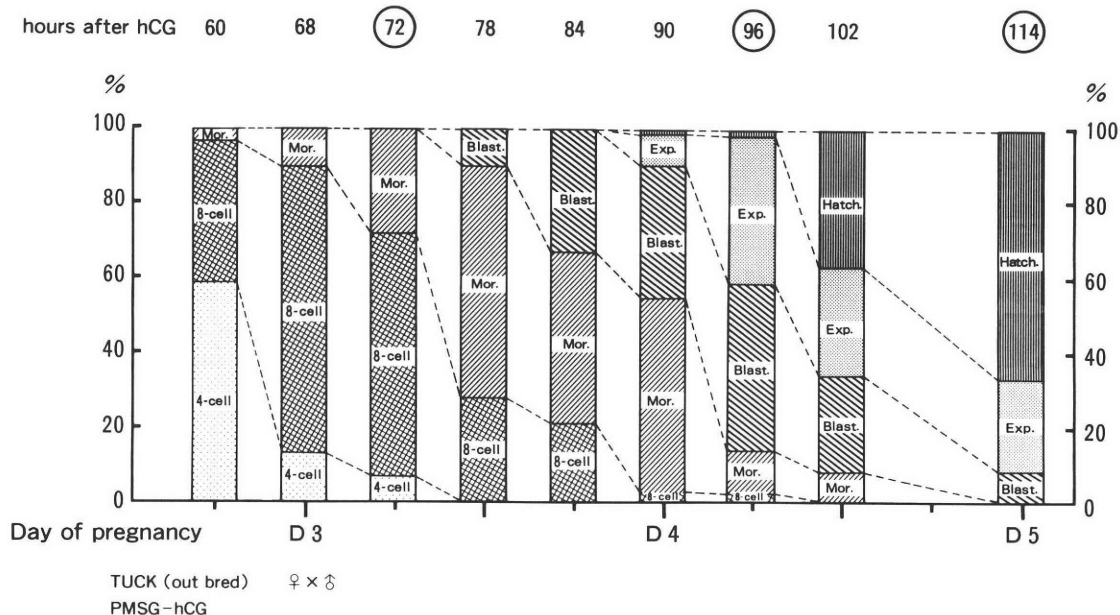


図1 in vivoにおける経時的な胚 stage 分類

in vivo より回収した胚の示す胚盤胞率および孵化胞胚率と比較した。

実験3 (図3)

2細胞期胚以後に in vivo より回収した胚に対する SOD 添加低酸素濃度下培養の効果を知るために、hCG 後 48, 72 および 96 時間に大気中で採卵し、高酸素濃度下基本培養液中で培養し、hCG 後 114 時間で胚盤胞および孵化胞胚の率を算定した。同様に hCG 後 48 時間で回収した後期 2細胞期胚を SOD 添加低酸素濃度下培養に供し、hCG 後 114 時間で in vivo より回収した胚の示す胚盤胞率および孵化胞胚率と比較した。

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、各実験の結果は χ^2 test を用い有意差検定を行なった。

結 果

実験1 (図1)

各時刻に回収した初期胚のうち、未受精卵および前核期胚で発生が停止した胚を含めた変性卵の占める割合は各々3%以下であった。hCG 投与後 60 時間に回収した初期胚は、桑実胚 (2.3%) から4細胞期胚 (59.1%) まで分布していた。それ以後発育が進行するにつれて胚の発育段階の分布が拡大し、hCG 投与後 96 時間に回収した胚は、孵化胞胚 (Hatched Blastocyst) 2.3%、拡張胚盤胞 (Expanded Blastocyst) 39.4%、胚盤胞 (Blastocyst) 40.7%、桑実胚 (Morula) 15.7%、および8細胞期胚 (8-cell Embryo) 1.9%と、多様な形態分布を示し、個々の胚の発育効率に差が認められた。hCG 投与後 114 時間に回収した胚は、67.3%が孵化胞胚に、25%が拡

張胚盤胞に、7.7%が胚盤胞に達していた。

実験2 (図2)

SOD 添加低酸素濃度下培養、SOD 添加高酸素濃度下培養および低酸素濃度下培養における胚発育は、hCG 後 114 時間において in vivo より回収した胚に比べて明らかに遅延を示していた。しかし3群の体外培養条件の間にも明らかに発育効率に有意差が認められ、SOD 添加低酸素濃度下培養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、in vivo の孵化胞胚率が 67.3% (35/52) であったのに比べ、SOD 添加低酸素濃度下培養では 12.2% (50/411) にしか満たなかったことに顕著に現れている。しかし2-cell block 解除効果が知られている SOD 添加高酸素濃度下培養および低酸素濃度下培養の孵化胞胚率は各々2.0% (4/200)、0.8% (2/265) と著しく低値であることから、体外培養における SOD 添加低酸素の有用性が実証された。

実験3 (図3)

2細胞期以後の胚培養において、胚盤胞率は全ての群で in vivo 群と有意差が認められなかった。しかし基本培養群では採卵時間が遅くなるほど孵化胞胚率が上昇するが、妊娠4日目に採卵しても in vivo 群の孵化胞胚率との間には依然として有意差が認められた。しかし妊娠2日目に採卵し SOD 添加低酸素濃度下で培養すると、その孵化胞胚率は 53.7% (29/54) で、in vivo 群の孵化胞胚率 67.3% (35/52) との間に有意差がなく、妊娠2日目の基本培養群の孵化胞胚率 31.7% (13/41) との間に有意差を認めたことより、SOD 添加低酸素培養系は、後期2細胞期以後の胚発育に対しても促進的に作用することが示された。

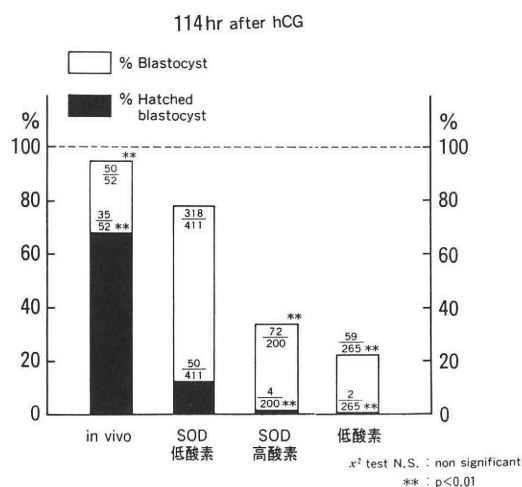


図2 各種培養条件における前核期胚からの培養成績

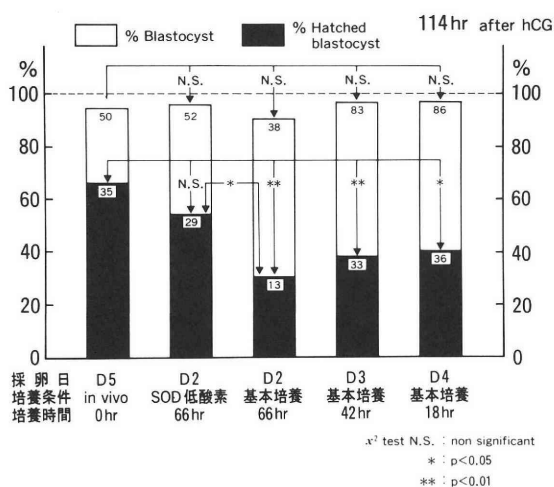


図3 各種培養条件における胚培養成績

考 察

本研究において SOD 添加低酸素濃度下で胚培養を行ない、*in vivo* から回収した胚發育効率と比較することによって、以下の幾つかのことが判明した。

実験1の結果が示すように過排卵処理後の初期胚發育は *in vivo* であっても、8細胞期胚以後の胚發育は完全に同調している訳ではなく、個々の胚における發育効率に差が生じていることが明らかとなった。とりわけ着床直前の時期に相当する妊娠5日目昼間(hCG投与後114時間)でも、一部の胚はまだ桑実胚から初期胚盤胞に留っており、孵化胞胚率は67.3%にしか達していないことも判明した。これまで既に着床前の哺乳類胚が *in vitro* で發育する場合、*in vivo* におけるそれと比べて発生が遅延すること^{14,15)}が知られているが、今回の研究で明らかとなった如く *in vivo* でも個々の胚の發育の様子は一樣ではなく、*in vivo* から回収した胚の一部に、前核期から *in vitro* で培養した胚のうちの發育が良好な群と比べて、明らかに發育が遅延しているものが少なからず存在することが明らかとなった。

実験2で示されたように SOD 添加低酸素濃度下での前核期胚からの連続培養では、マウス2-cell blockを高率に解除したが、*in vivo* に匹敵しうほどの發育促進効率を得られているわけではなかった。しかし実験3の結果が示すように、2細胞期以後の胚にも發育促進効果があることが証明された。特に hCG 後114時間まで培養した時にみられる胚盤胞率および孵化胞胚率が、*in vivo* から回収した時にみられた率と有意差が認められなかったことは驚くべきことで、後期2細胞期胚以後の胚培養について、*in vivo* の發育効率に近い胚培養条件が設定できるようになったことを意味している。

以上より、低酸素濃度下培養および SOD 添加培養の結果から、酸素毒性が種々の發育段階の胚の発生に対して有害な作用を及ぼしていることが実証された。換言すれば、2細胞期以後の胚發育に対しても、酸素毒性の影響があり、同時に酸素毒性からの保護が必要であることを意味している。

従来、低酸素濃度下培養の有用性に関する報告が、ウシ^{18,19)}、ヒツジ¹⁸⁾の家畜およびマウス^{16,17,20~22)}の初期胚で報告されている。例えば Auerbach ら¹⁶⁾は、マウス2細胞期胚から胚盤胞まで低酸素下(O_2 : 0.5% から1.7%) および無酸素下で連続培養を行ない、1%酸素でも胚發育が可能であり無酸素下では發育が阻害されることを報告した。その後 Whitten¹⁷⁾は、マウス(hybrid)前核期胚を用い、各種酸素濃度(O_2 :

0%, 5%, 10%, 20%, 40%)で胚盤胞まで培養し、5%酸素濃度が至適培養環境であることや、高酸素(O_2 : 20%) および無酸素下では胚盤胞まで發育せず、光顕での形態学的観察で細胞膜に障害を及ぼすこと、割球形成に酸素濃度が関与する可能性を示唆している。Tervit ら¹⁸⁾はヒツジ8細胞期胚を各種酸素濃度(O_2 : 0%, 5%, 10%, 20%)で培養し、5%酸素濃度での培養は *in vivo* から回収した胚發育効率に劣るが、その他の酸素濃度下培養の胚發育成績より優り、その培養胚を子宮内移植すると低酸素濃度下の副作用もなく着床すると述べている。同様に Tervit ら¹⁸⁾は、ウシ8細胞期胚から5%酸素下培養すると、*in vivo* に匹敵する胚發育効率を示すこと、および子宮内移植実験で *in vivo* と同程度の着床率が得られることも報告している。ウシに関しては Wright ら¹⁹⁾も、5%酸素下培養は6細胞期以後の胚發育で大気中培養に比較し良好な成績が得られたことを報告しており、Tervit ら¹⁸⁾の成績と同様な傾向が得られている。その後もマウスに関してはより詳細な報告が行なわれている。

Quinn ら²⁰⁾は、F1 hybrid 胚を用い、各種酸素濃度(O_2 : 0%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 40%)で培養を行ない、次のような結果を報告している。前核期胚から胚盤胞までの全てのステージの胚培養で、5%酸素濃度の培養が最も良好な成績を示すこと、桑実期胚以後はたとえ40%酸素下および無酸素下でも24時間の培養で、70%以上が胚盤胞まで達し、酸素の影響が少ないと述べている。本邦でも竹内ら²¹⁾が、マウスF1 hybrid で体外受精を行ない、以後5%および20%酸素下で胚盤胞まで培養を行ない、高酸素の影響は前核期胚から4細胞期胚での發育段階で悪影響を及ぼすことや2-cell block 現象に酸素分圧が関与している可能性を示唆した。

しかしこれらいずれの報告も、低酸素下培養によって得られる胚發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されていないことが共通している。近年 Pabon ら²²⁾は、マウスF1 hybrid の前核期胚を用い、大気中に1時間被曝させることにより胚盤胞までの發育が阻害されることを、低酸素下培養における成績と比較して報告し、順調な胚發育を得るためには前核期胚を高酸素被曝させないことを提唱しており、我々⁷⁾の実験結果と一致している。また初めて酸素毒性に観点を向け、仮説として O_2 による悪影響の可能性を報告している。

また Iannaccone ら²³⁾は、マウス胚盤胞を回収して NADPH を含む培養条件で共培養した場合、胚盤胞が *in vivo* で障害を受けること、そして抗酸化剤であ

る butyl hydroxy toluene (BHT) で一部障害から保護され、更に低濃度の SOD 添加により完全に保護されることを報告し、SOD の持つ触媒作用が極めて特異的に O_2^- の消去反応に作用することを考慮して、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^- によると推論している。

以上今までの諸家の報告を概説したが、我々の SOD 添加低酸素濃度下培養実験の結果⁵⁻⁷⁾と比較検討すると、初期胚培養における至適酸素濃度は5%前後であり、高酸素濃度が前核期からの最初の数十時間の発育において悪影響を与えていること、すなわち低酸素濃度下初期胚培養が、哺乳類胚発生に良い影響を与えることで一致している。

マウス 2-cell block を含めた哺乳類胚培養での発育阻止および遅延の詳細な機序は、今日に至るまでなお不明である。我々は酸素毒性の観点から SOD 添加低酸素下培養系を用いて、マウス初期胚培養に及ぼす影響を検討し、2-cell block を解除すると共に、後期 2 細胞期以後で *in vivo* に匹敵する発育効率を得ることに成功した。SOD の持つ触媒作用から考えて、酸素毒性からの保護がその効果を示していると解釈できる。一方 *in vivo* では他の多くの未知の要因が胚発育に関与しており、今回設定した培養条件で、前核期胚からの発育効率が *in vivo* に比して有意に遅れていることがそれを裏づけている。

以上述べたことを要約すれば、*in vitro* 胚培養条件を改善するためには、まず 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必要があることになる。今後ヒト体外受精胚移植 (IVF-ET) に SOD 添加低酸素濃度下胚培養系を臨床応用するには、培養胚の子宮内移植実験で *in vivo* に匹敵する生存胎仔が得られ、継代繁殖により奇形、発育遅延および生殖能力低下等の異常がないことを動物実験で確認し、SOD 添加低酸素濃度下培養による影響を否定する必要があるだろう。

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) により補助をうけた。

文 献

- 1) 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 臨時増刊: 334, 1989
- 2) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dis-

mutase によるマウス 2-cell block の解除, 日産婦会誌, 41: 751, 1989

- 3) 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
- 4) 松本 央, 野田洋一, 馬岡 陽, 森 崇英: Superoxide Dismutase によるマウス 2-cell block の解除について, 日不妊会誌, 35: 54, 1990
- 5) 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
- 6) 馬岡 陽, 野田洋一, 松本 央, 成本勝彦, 都倉隆, 辰巳賢一, 森 崇英: 低酸素濃度培養系におけるマウス 2-cell block の解除, 日本受精着床会誌, 7: 154, 1989
- 7) 馬岡 陽, 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: マウス前核期胚培養における酸素毒性の影響, 日本不妊会誌, 35: 285, 1990
- 8) Bigger, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos *in vitro*: In: Methods in mammalian embryology, J. C. Daniel, Jr. ed. Freeman Co., 86, 1971
- 9) Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutase, *Accts. Chem. Res.*, 5: 321, 1972
- 10) 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
- 11) McCord, J. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, 224: 6049, 1969
- 12) 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
- 13) 浅田浩二: 酸素毒性, 生化学, 48: 226, 1976
- 14) Davis, D. and Day, B. N.: Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*, *J. Anim. Sci.*, 46: 1043, 1978
- 15) Wright, R. J. Jr. and Bondioli, K. R.: Aspects of *in vitro* fertilization and embryoculture in domestic animals, *J. Anim.*, 43: 702, 1981
- 16) Auerbach, S. and Brinster, R. L.: Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos, *Nature*, 217: 465, 1968
- 17) Whitten, W. K.: Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*; In *Advances in the Biosciences* 6. G. Raspe, ed, Pergamon Press, 129, 1970
- 18) 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
- 19) 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

- 20) 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
- 21) 竹内一浩, 山元慎一, 森 明人, 永田行博: 酸素濃度の初期胚に及ぼす影響(2-cell block との関連について), *日不妊会誌*, 34: 26, 1989
- 22) 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
- 23) Iannaccone, P. M.: Microsomal mediated embryo toxicity due to superoxide radicals, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 6: 237, 1986

The effect of SOD added low oxygen culture of mouse embryos after the first cell cycle

Yoh Umaoka, Yoichi Noda,
Takahide Mori

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

We previously reported that the 2-cell block phenomenon in mouse embryos was abolished by the addition of superoxide dismutase (SOD) to the culture medium, and that the effect was remarka-

bly enhanced when pronuclear stage embryos were cultured under low oxygen tension (5%). In this study, we examined the effects of SOD treatment combined with low oxygen tension using late 2-cell mouse embryos, and results were compared to that in vivo.

Mouse embryos were obtained at 18 hr or 48 hr after administration of hCG and cultured at 37°C, under reduced oxygen tension (5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂) in BWW medium containing bovine serum albumin (BSA, 3mg/ml) and SOD (500μg/ml). At 114 hr after hCG, embryos developed to the hatched blastocysts or expanded blastocysts were counted.

Embryos obtained from the uterus using tube-uterine flushing method consisted of 67.3% (35/52) hatched blastocysts, 25.0% (13/52) expanded blastocysts and 7.7% (4/52) expanding blastocysts. After the same interval, 77.4% (318/411) blastulation with 12.2% (50/411) hatched blastocysts were observed when the embryos were subjected to culture at 18 hr after hCG. This finding was significant difference from that in vivo. In contrast, 96.3% (52/54) blastulation with 53.7% (29/54) of hatched embryos were noted when culture was started 48 hr after hCG. The efficiency observed in 2-cell culture was not statistically different to that in vivo.

These observations suggested that after the first cell cycle, protection of embryos from oxygen radicals is necessary for increasing in vitro culture efficiency, and that SOD added low oxygen culture method may be useful to human IVF-ET program in future.

(受付: 1989 年 12 月 28 日特掲)

IS INDUCTION OF DNA POLYMERASE α ACTIVITY IN IMMATURE RAT OVARIES BY GROWTH HORMONE INDEPENDENT OF SOMATOMEDIN C/INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1?

Satoshi USUKI, Sayuri KUBOTA and Sohei MIYAKAWA

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

Abstract: To examine the effects of growth hormones on cell proliferation and cell division in ovaries, the deoxyribonucleic acid (DNA) polymerase activities, DNA content and somatomedin C/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) levels were determined in ovaries, incubated *in vitro*, of immature rats treated with 10 IU of pregnant mare's serum gonadotropin (PMS) and immature hypophysectomized rats. Ovine growth hormone significantly enhanced the DNA polymerase α activity, the optimum dose being 2.0 $\mu\text{g/ml}$, in ovaries of rats primed with PMS for 24 and 48 hours or immature hypophysectomized rats, while the ovarian DNA polymerase β activity, DNA content and IGF-1 level showed no significant changes. The administration of GH to immature hypophysectomized rats *in vivo* increased the DNA polymerase α activity, DNA content and IGF-1 level in the ovaries. In contrast, the DNA polymerase β activity showed no significant change. These results suggest that growth hormones cause the induction of DNA polymerase α activity in conjunction with DNA synthesis through growth hormone-mediated events independent of IGF-1 or *via* an intraovarian mediator IGF-1 during cell proliferation in the ovaries of immature rats.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 475—482, 1990)

Introduction

Pituitary growth hormone has recently been reported to participate in ovarian differentiation directly¹⁻³⁾ or via an intraovarian mediator peptide, IGF-1⁴⁾. However, very few studies showing further metabolic pathways leading to DNA replication and cell proliferation during ovarian growth have been reported. Recently, Usuki et al.⁵⁻⁷⁾ found that follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing-hormone (LH) or estrogen

causes an increase in DNA polymerase α , a replicative enzyme in eukaryotic cells, activity per cell *in vivo* or *in vitro* in the rat ovary. This increase in activity is accompanied by DNA synthesis, which leads to cell proliferation and ovarian growth⁸⁾. In the present study we attempted to determine whether or not growth hormone (GH) enhances the DNA polymerase α activity, leading to DNA replication in immature rat ovaries.

Materials and methods

Hormones, animals and treatments

Ovine growth hormone (NIADDK-oGH-12, AFP-4015A, bio-potency=1.5 IU/mg, as determined in hypophysectomized female rats by means of the weight gain bioassay; FSH potency of less than 1% by weight, LH potency of less than 2% by weight, prolactin potency of less than 2% by weight and TSH potency of less than 2% by weight) was kindly provided by Drs. S. Raiti (University of Maryland, Baltimore, MD, U. S. A.) and A. F. Parlow (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, U. S. A.).

Immature female rats of the Wistar-Imamichi strain, obtained from the Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama, Japan), were maintained in an environment with daily illumination from 0800 to 2000.

The rats were divided into the following experimental groups. Group 1 consisted of rats injected subcutaneously with 10 IU of PMS (pregnant mare's serum gonadotropin; Teikokuzoki Co., Ltd., Tokyo, Japan) on day 27 of age, and this group was divided into two further groups: the ovaries were resected 1) 24 hours and 2) 48 hours after the PMS injection. Group 2 consisted of rats hypophysectomized at 21 days of age *via* the parapharyngeal approach, and this group was treated daily with 2.0 and 20 μ g/day of GH in saline, subcutaneously, beginning at 25 days of age, i. e., 4 days after the hypophysectomy, and continued until autopsy at 29 days of age. In the first experiments, the animals were killed by decapitation under ether anesthesia 24 or 48 hours after the PMS injection and 4 days after hypophysectomy. In the second experiments, GH-treated or -untreated rats were decapitated at 29 days of age. After autopsy, the ovaries were quickly resected and the periovarian bursa was stripped off. The ovaries in the first experiments were subjected to further incubation *in vitro*. The ovaries in both the first and second experiments were used for enzyme activity, DNA and IGF-1 measurements.

Incubation study

A synthetic medium, TC-199 (Chiba Serum Institute, Chiba, Japan), containing 1% glucose and 0.2% NaHCO₃, pH 7.4, was continually saturated with a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%). In the first experiments, one ovary was placed in a chamber and then incubated at 37°C at 120 oscillations/minute for 2 hours in 2.0 ml of the synthetic medium containing 0.02 to 20 μ g/ml of GH following 1 hour-preincubation in 2.0 ml of the medium without a stimulating substance. In the control groups, the medium alone was incubated. After 2 hour-stimulant incubation, the DNA polymerase activities, nuclear DNA content and IGF-1 level in the ovaries were determined.

Measurement of the DNA polymerase activities and DNA content in ovaries

Unlabelled deoxyribonucleoside 5'-triphosphates [deoxyadenosine 5'-triphosphate, deoxycytidine 5'-triphosphate, deoxyguanosine 5'-triphosphate and deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP)] and 2', 3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate were obtained from Boehringer-Mannheim (Mannheim, West Germany). [Methyl 1', 2' -³H] dTTP (96.8 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear (Boston, MA, U. S. A.). Aphidicolin was a gift from Dr. S. Ikegami (Hiroshima University, Japan). N-Ethylmaleimide was a product of Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). Calf thymus DNA was donated by Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U. S. A.).

The ovaries were homogenized in 100 μ l of 1.0% Triton x-100, 0.25 M sucrose, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.9), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1.0 M NaCl and 2 mg/ml bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.) for about 20 minutes at 0°C. The homogenate was centrifuged at 15,000 xg for 30 minutes. Fifty μ l of the supernatant was then mixed with 25 μ l of 90% glycerol. Aliquots (0.5-2.0 μ l) of the supernatant were assayed for DNA polymerase α and β activity, as described previously⁵⁾. At the same time, the ovaries were treated and centrifuged as described for the assaying of DNA polymerase α and β . The precipitate was treated as described previously⁵⁾ and then assayed as to the DNA content accord-

ing to the method of Burton⁸⁾.

Measurement of the somatomedin C/insulin-like growth factor 1 level in ovaries

The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) level in the ovaries was measured by a radioimmunoassay, a modification of the method of Furlanetto et al.⁹⁾ IGF-1 was kindly donated by Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan. The IGF-1 preparation was synthesized by means of recombinant DNA technology. Ovaries were homogenized in 500 μ l of phosphate buffer saline at 4°C in an

ice-cold water bath and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C, and the resultant supernatants were used for assaying IGF-1. 100 μ l aliquots of the supernatants were extracted with 900 μ l ethanol and 1N HCl (9:1, v/v), mixed for 5 minutes with a stirrer and then centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C. A 100 μ l aliquot of each supernatant was mixed with 400 μ l of IGF-1 assay buffer (Nicholas Institute, San Juan, CA, U. S. A.). Fifty μ l aliquots of diluted samples, blanks or IGF-1 standards (0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 and 1,000 pg) were preincubated with 250 μ l of the

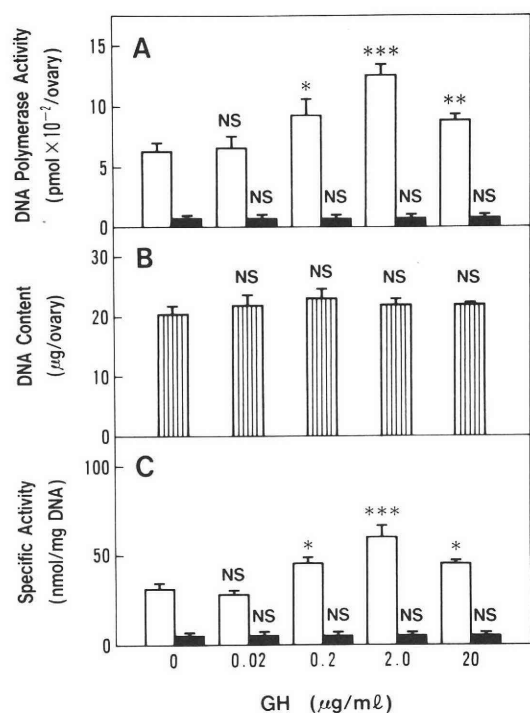


Fig. 1 Effects of GH on DNA polymerase activity (A), DNA content (B) and specific activity (C) in immature rat ovaries incubated *in vitro*. Twenty-seven-day old rats were injected subcutaneously with PMS (10 IU) and sacrificed 24 hours later, and then the resected ovaries were incubated with GH as described under Materials and methods. After incubation, the DNA polymerase activities and DNA content in the ovaries were measured as described in the text. $\square$, DNA polymerase α ; $\blacksquare$, DNA polymerase β ; and |||| , DNA content. Each value is the mean $\pm$ SEM (vertical bars) for five ovaries. Significance of difference *versus* controls (ovaries incubated with medium alone): *, $p < 0.05$; **, $p < 0.02$; ***, $p < 0.01$; NS, not significant.

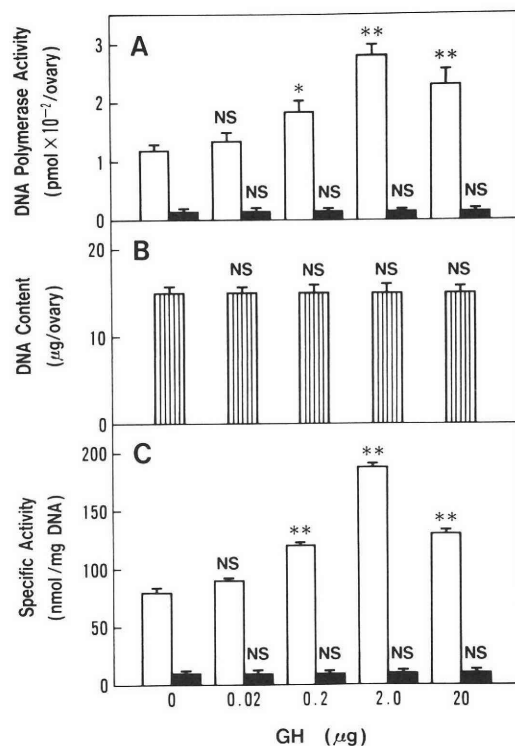


Fig. 2 Effects of GH on DNA polymerase activity (A), DNA content (B) and specific activity (C) in immature hypophysectomized rat ovaries incubated *in vitro*. Hypophysectomized rat ovaries were incubated *in vitro* with GH as described under Materials and methods. After incubation, the DNA polymerase activities and DNA content in the ovaries were measured as described in the text. $\square$, DNA polymerase α ; $\blacksquare$, DNA polymerase β ; and |||| , DNA content. Each value is the mean $\pm$ SEM (vertical bars) for ten ovaries. Significance of difference *versus* controls (ovaries incubated with medium alone): *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$; NS, not significant.

assay buffer and 100 μ l of IGF-1 antiserum for 1 hour at room temperature. Rabbit antiserum to IGF-1 was prepared by immunizing rabbits with a mixture of IGF-1 and ovalbumin emulsified in Freund's adjuvant and it did not cross-react with insulin-like growth factor II. 100 μ l of [125 I] IGF-1 was added at the end of the preincubation, followed by incubation for 16 hours at 4°C. To each tube was added 50 μ l of goat anti-rabbit gamma globulin (a double antibody), followed by incubation for 1 hour at 4°C. 20 μ l of normal rabbit serum (a precipitation agent) was added, followed

by incubation at 4°C, and 1 hour later, the mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant fraction was discarded and then radioactivity counting was performed for 2 minutes with a gamma scintillation counter. The inter-assay and intra-assay coefficients of variation for IGF-1 were 7.5 and 8.9%, respectively. The mean extraction efficiency for IGF-1 was 93%. Data were expressed as pg/mg ovarian wet weight.

Other methods

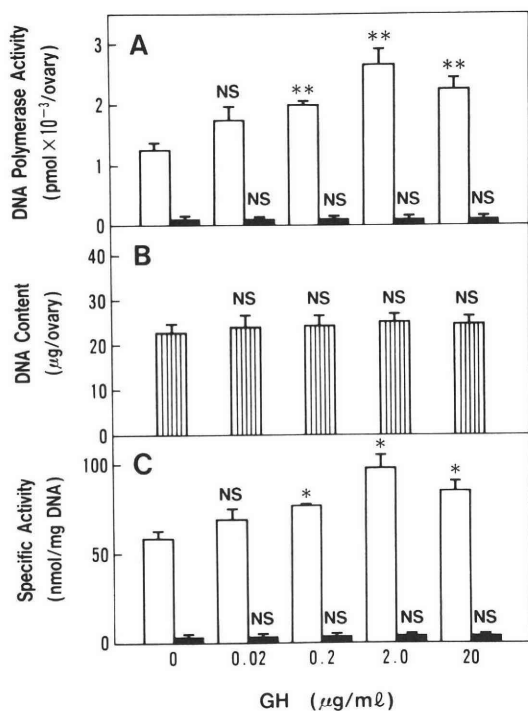


Fig. 3 Effects of GH on DNA polymerase activity (A), DNA content (B) and specific activity (C) in immature rat ovaries incubated *in vitro*. Twenty-seven-day old rats were injected subcutaneously with PMS (10 IU) and sacrificed 48 hours later, and then the resected ovaries were incubated with GH as described under Materials and methods. After incubation, the DNA polymerase activities and DNA content in the ovaries were measured as described in the text. □, DNA polymerase α ; ■, DNA polymerase β ; and ▨, DNA content. Each value is the mean $\pm$ SEM (vertical bars) for five ovaries. Significance of difference *versus* controls (ovaries incubated with medium alone): *, $p < 0.02$; **, $p < 0.01$; NS, not significant.

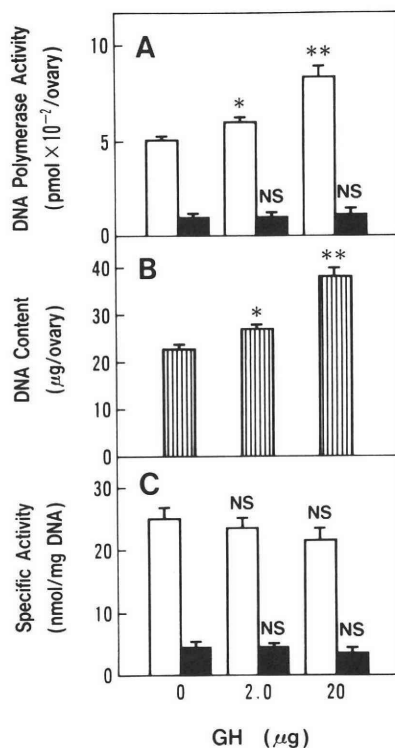


Fig. 4 Effects of GH on DNA polymerase activity (A), DNA content (B) and specific activity (C) in hypophysectomized rat ovaries. Hypophysectomized rats were injected daily with GH (2.0 or 20 μ g/day) as described under Materials and methods. Five days after the injections were begun, the DNA polymerase activities and DNA content were measured as described in the text. □, DNA polymerase α ; ■, DNA polymerase β ; and ▨, DNA content. Each value is the mean $\pm$ SEM (vertical bars) for ten ovaries. Significance of difference *versus* controls (ovaries incubated with medium alone): *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; NS, not significant.

Student's *t* test was used for statistical analysis.

Results

In ovaries, incubated *in vitro*, of rats primed with PMS for 24 hours (Fig. 1) or immature hypophysectomized rats (Fig. 2), 0.2 to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GH, the optimum dose being 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, significantly enhanced the activity and specific activity (activity per μg DNA) of DNA polymerase α (Figs. 1 and 2, A and C). However, no significant increase in the nuclear DNA content or DNA

polymerase β activity was observed on GH injection (Figs. 1 and 2, A, B and C). The specific activity of DNA polymerase α at 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GH was 2-fold that in GH-untreated ovaries (Figs. 1 and 2, C).

In ovaries with more mature follicles, incubated *in vitro*, of rats primed with PMS for 48 hours, the DNA polymerase α activity increased with 0.2 to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GH, the optimum dose being 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 3, A). The specific activity of DNA polymerase α was also enhanced by 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GH, being 1.4-fold that in untreated ovaries (Fig. 3, C). In contrast, GH caused no significant increase in the nuclear DNA content or DNA polymerase β activity (Fig. 3, A, B and C).

In the second experiments, the effects of GH on the enhancement of the ovarian DNA content and DNA polymerase activities were examined *in vivo* in hypophysectomized rats (Fig. 4). Two to 20 $\mu\text{g}/\text{day}$ of GH significantly enhanced both the ovarian DNA content and DNA polymerase α activity in hypophysectomized rats (Fig. 4, A and B). However, no significant increase in the DNA polymerase β activity or the specific activities of DNA polymerases α and β was observed (Fig. 4, A and C).

To investigate the presence of activators or inhibitors of DNA polymerases in the ovarian extracts in the first and second experiments, mixing experiments were performed. The DNA polymerase activities were additive and no significant stimulation or inhibition was detected (data not shown).

Successively, the enhancing effect of GH on the ovarian IGF-1 level was examined in PMS-primed or immature hypophysectomized rats (Fig. 5).

In ovaries, incubated *in vitro*, of rats primed with PMS for 24 or 48 hours or immature hypophysectomized rats in the first experiments, no significant increase in the level of somatomedin C/IGF-1 was observed (Fig. 5, A). Also, somatomedin C/IGF-1 was not detected in media after incubation (data not shown). On the other hand, the administration of 2.0-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GH *in vivo* significantly increased the ovarian tissue IGF-1 level in immature hypophysectomized rats in the second experiments (Fig. 5, B). In addition,

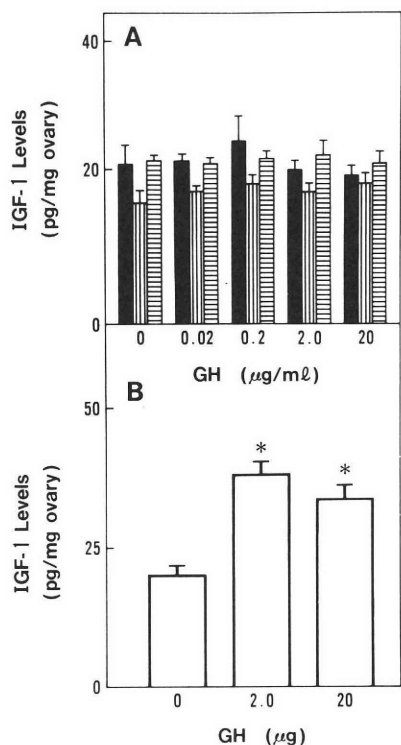


Fig. 5 Effects of GH on the IGF-1 level in immature rat ovaries (A) and hypophysectomized rat ovaries (A and B). Ovarian tissue IGF-1 levels were measured in ovaries, incubated *in vitro*, of PMS-primed or hypophysectomized rat ovaries, as described under Materials and methods. ■, ovaries of rats primed with PMS incubated for 24 hours; ▨, ovaries of rats primed with PMS incubated for 48 hours; □, ovaries incubated 4 days after hypophysectomy; □, ovaries of hypophysectomized rats treated with GH (2.0 and 20 $\mu\text{g}/\text{day}$). Each value is the mean $\pm$ SEM (vertical bars) for five animals. Significance of difference versus non-treated ovaries: *, $p < 0.01$.

this increase in ovarian IGF-1 was 1.7 times higher than that in blood (data not shown).

Discussion

Of the activities of the two DNA polymerases, α and β , only that of DNA polymerase α (an essential component for DNA replication) in the ovaries changed due to the stimulation of GH (Figs. 1, 2, 3 and 4).

In ovaries, incubated *in vitro*, of PMS-primed immature rats or immature hypophysectomized rats, the activity and specific activity of DNA polymerase α increased significantly with GH administration compared with in the case of the non-treated controls. However, there was no significant increase in the nuclear DNA content with the hormone treatment. Since no activator or inhibitor was present in these extracts, this increase in activity seems to be caused by an increase in the number of enzyme molecules. Recently, Usuki et al.^{5,6,7,10)} found that DNA polymerase α participates in DNA synthesis in immature rat ovaries and that the activity is supposedly induced before DNA synthesis. Therefore, we assume that GH stimulated certain processes which lead to ovarian DNA synthesis during development of the ovaries, but this stimulation was not sufficient to completely initiate the processes required for DNA synthesis, because of the conditions *in vitro*, like in the case of FSH⁶⁾. So, we propose that GH functions in such a manner that it induces DNA polymerase α before DNA synthesis in the ovary.

In the subsequent study, the administration of GH *in vivo* enhanced the induction of DNA polymerase α activity with a simultaneous increase in the DNA content in ovaries of immature hypophysectomized rats, in which DNA polymerase α activity decreases⁵⁾. This result suggests that GH enhances the enzyme activity *in vivo* in immature rat ovaries.

However, the specific activity of DNA polymerase α did not change significantly in these hypophysectomized rat ovaries. Therefore, this GH-induced DNA polymerase α activity seems to depend on the number of cells which contain the enzyme. This mechanism is apparently different

from that in the case of LH or FSH⁵⁾. However, further studies are required to clarify this.

These results suggest that GH causes the induction of DNA polymerase α activity accompanied by DNA synthesis in ovarian cell proliferation and division. Since DNA polymerase β activity was not induced by GH, the induction seems to be specific for polymerase α . These results suggest that the enzymes which participate in DNA replication are induced.

The present study was carried out with whole ovaries. It is difficult to determine which ovarian cells responded as to the induction of DNA polymerase α activity. However, rat granulosa cells have receptors for GH²⁾. Furthermore, DNA synthesis due to GH is consistent with granulosa cell proliferation in this case (our unpublished data). So, DNA polymerase α in granulosa cells may be sensitive to GH.

Recently, Davoren and Hsue⁴⁾ reported that GH may act in the rat ovary to increase local levels of somatomedin C/IGF-1, a major mediator of the growth-promoting action of GH. In addition, IGF-1 has been recently shown to be produced by porcine granulosa cells¹¹⁾, to stimulate rat granulosa cell cytodifferentiation^{4,12)} and bovine granulosa cell replication¹³⁾ *in vitro*, and to increase the granulosa cell number and DNA synthesis^{14,15)}. Furthermore, IGF-1 also plays a role in rat ovarian thecal-interstitial cell differentiation¹⁶⁾.

In the present study, treatment of hypophysectomized rats with GH *in vivo* caused an increase in the level of ovarian tissue IGF-1, presumably due to local production and not blood contamination, as suggested previously^{4,11,17)}. These results suggest that GH enhances the ovarian IGF-1 level in hypophysectomized, immature female rats and may enhance DNA polymerase α activity in conjunction with DNA synthesis *via* an intraovarian mediator IGF-1.

On the other hand, no significant increase in the ovarian IGF-1 level was detected in ovaries, incubated *in vitro*, of PMS-primed rats or hypophysectomized, immature rats. Therefore, it is also assumed that the stimulation of GH was not sufficient to completely initiate the processes

required for ovarian IGF-1 production, presumably due to the short-term incubation conditions, *in vitro*. This result also suggests that GH may cause the induction of DNA polymerase α activity before DNA synthesis *via* possible GH receptor-mediated events independent of IGF-1⁴⁾. However, confirmation of this awaits further studies.

We conclude from these results that GH functions in such a manner that it induces DNA polymerase α activity in conjunction with DNA synthesis during follicular growth in immature rat ovaries and may act through GH receptor-mediated events independent of IGF-1, or by increasing the intraovarian IGF-1 level.

The physiological significance of the direct action of GH in the ovary is also a very intriguing problem that should be investigated, from both basic and clinical aspects. The results of such a study may provide unique models for understanding the mechanism of the GH action in cellular proliferation during ovarian follicular growth.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs. S. Raiti, University of Maryland, Baltimore, Maryland, and A. F. Parlow, Director, Pituitary Hormones and Antisera Center, Torrance, California, U. S. A., for providing us with the ovine GH, and Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan for providing us with the pure somatomedin C/IGF-1 produced by recombinant DNA technique.

We also wish to thank Miss Y. Hayasaka, Miss S. Kanzaki and Mrs S. Kawamura for their technical assistance, and Mrs K. Nakagawa for her skillful typing of this paper.

This work was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, the University of Tsukuba Research Project, and the University of Tsukuba Special Research Project on Metabolism.

References

- 1) Advis, J. P., Smith, W. S. and Ojeda, S. R.: Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat, *Endocrinology*, 108: 1343, 1981
- 2) Hsueh, A. J. W. and Jones, P. B. C.: Direct hormonal modulation of ovarian granulosa cell maturation: effect of gonadotropin-releasing hormone. In *Follicular Maturation and Ovulation*, Edited by Rolland, R. Van-Hall, E. V., McNatty, K. P., Schoemaker, J., Excerpta Medica, 19, 1982
- 3) Jia, X. C., Kalmijin, J. and Hsueh, A. J. W.: Growth hormone enhances follicle-stimulating-hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells, *Endocrinology*, 118: 1401, 1986
- 4) Davoren, J. B. and Hsueh, A. J. W.: Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I *in vivo*, *Endocrinology* 118: 888, 1986
- 5) Usuki, S. and Shioda, M.: Follicle-stimulating hormone and estrogen elevate deoxyribonucleic acid α -nucleotidyltransferase activity in relationship to deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovaries, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 155: 447, 1987
- 6) Usuki, S. and Usuki, Y.: Follicle-stimulating hormone induces deoxyribonucleic acid polymerase α before deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovarian follicles perfused *in vitro*, *Obstet. Gynecol.*, 71: 307, 1988
- 7) Usuki, S.: Stimulatory action of estradiol-17 β on deoxyribonucleic acid α -nucleotidyltransferase activity in immature hypophysectomized rat ovaries. In *Preservation of Tubo-ovarian Function in Gynecologic Benign and Malignant Diseases*, Edited by K. Ichinoe, S. J. Segal, L. Mastroianni. Raven Press, 48: 295, 1988
- 8) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem. J.*, 62: 315, 1956
- 9) Furlanetto, R. W., Underwood, L. E., Van-Wyk, J. J. and D'Ercole, A. J.: Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay, *J. Clin. Invest.*, 60: 648, 1977
- 10) Usuki, S., Usuki, Y., Sakamoto, K. and Shioda, M.: LH-RH stimulates inducement of DNA polymerase α prior to DNA synthesis in immature rat ovaries. In *Neuroendocrinology of Reproduction*, Edited by R. Rolland, M. J. Heineman, N. Naaktgeboren, J. Schoemaker, H. Vemer, W. Willemsen. Excerpta Medica, ICS., 751: 51, 1987
- 11) Hammond, J. M., Baranano, J. L. S., Skaleris, D., Knight, A. B., Romanus, J. A. and Rechler, M. M.: Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells, *Endocrinology*, 117:

2553, 1985

- 12) Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Svoboda, M. E., and Van-Wyk, J. J.: A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of the ovarian granulosa cell, *Endocrinology*, 115: 1227, 1984
- 13) Savion, N., Lui, G. M., Laherty, R. and Gospodarowicz, D.: Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium, *Endocrinology*, 109: 409, 1981
- 14) Adashi, E. Y., Resnick, C. E., D'Ercole, A. J., Svoboda, M. E. and Van-Wyk, J. J.: Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function, *Endocr. Rev.*, 6: 400, 1985
- 15) Baranao, J. L. S. and Hammond, J. M.: Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124: 484, 1984
- 16) Cara, J. F. and Rosenfield, R. L.: Insulin-like growth factor 1 and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells, *Endocrinology*, 123: 733, 1988
- 17) D'Ercole, A. J., Stiles, A. D., and Underwood, L. E.: Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 935, 1984

Growth hormone の卵巣 DNA 合成および somatomedin C/insulin-like growth factor 1 レベルに及ぼす影響について : In vitro および in vivo 実験における検討

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 愼 窪田早百合 宮川創平

Growth hormone (GH) の卵巣 DNA polymerase 活性, DNA 量および somatomedin C/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) に及ぼす影響について, ラットを用いて *in vitro* および *in vivo* での検討を行った。

Wistar-Imamichi 系雌ラットを用いた。 *In vitro* 実験としては, 27 日齢に PMS 10 i. u. を皮下投与, ないし 21 日齢に下垂体摘出したラット卵巣を種々の濃度の GH でインキュベーションした。 *In vivo* 実験としては, 21 日齢の下垂体摘出ラットに GH を投与した。

エーテル麻酔下で断頭屠殺したラットの卵巣を摘出し, 卵巣組織中の DNA polymerase 活性, DNA 量および IGF-1 量を Usuki らの方法 (1988) で測定した。

In vitro 実験において, DNA polymerase α 活性は有意な増加を示したが, DNA polymerase β 活性, DNA 量および IGF-1 レベルには変化が認められなかった。一方, *in vivo* 実験では, DNA polymerase α 活性, DNA 量および IGF-1 レベルとも有意な増加を示したが, DNA polymerase β 活性には変化が認められなかった。

以上の事実は, GH が IGF-1 と dependent ないし independent に卵巣細胞の増殖に関わっていることを示唆している。

(受付: 1989 年 4 月 10 日)

不妊症症例の妊娠例における TRH 負荷試験の検討

The TRH Loading Test of Pregnant Case of Infertile Case

岡山大学医学部産科婦人科学教室

新谷 恵司	吉田 信隆	白河 一郎
Keiji SHINTANI	Nobutaka YOSHIDA	Ichirou SHIRAKAWA
片山 隆章	多賀 茂樹	占部 清
Takaaki KATAYAMA	Shigeki TAGA	Kiyoshi URABE
	関場 香	
	Kaoru SEKIBA	

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

当科不妊外来を受診し昭和61年2月より63年5月までの間に妊娠した症例に対して、TRH負荷試験を行っていた57例についてプロラクチンの分泌動態の検討をおこなった。その結果、1)妊娠したその周期にTRH負荷試験を行った8例の症例の検討結果からプロラクチン値の正常域の判定基準は前値30 ng/ml以下、負荷後の最高値（ピーク値）150 ng/ml以下と設定できた。2)TRH負荷試験の負荷後の120分までの値はピーク値と相関関係があることから、TRHに対するプロラクチンの反応性は負荷前とピーク値の2つの値で判定が可能である。3)TRH負荷試験のより簡便な方法として症例の大部分にピークを示す負荷後15分の測定が良い。4)妊娠時の治療との関係を検討した結果、TRH負荷試験の結果からは治療法としてプロモクリプチンの使用についての判定はできない、という事が示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 483—486, 1990)

はじめに

高プロラクチン血症のスクリーニングには基礎値の測定が主として行われている。しかし最近、その検査で正プロラクチン血症と診断されても、夜間に血中のプロラクチン値の上昇する症例などが報告され、それが排卵障害や黄体機能不全を伴っている報告がなされ、それに対して治療としてはプロモクリプチンの投与が有効であると考えられている。一方、月経中や夜間に高プロラクチン血症を示さない一部の正プロラクチン血症の症例に対してもプロモクリプチンの投与が有効であるとの報告もある。プロモクリプチンの有効性と検査値との間の関係を見いだすためにTRH負荷試験が一般に行われている。そしてそのTRH負荷試験の反応性によりプロラクチン分

泌の状態の判定と、治療法の選択が行われている。しかしその判定基準には未だに満足すべきものがない。そこで今回我々は妊娠例におけるTRH負荷試験の結果と、妊娠時の治療法と基礎体温上の黄体期の長さについて検討を行い、TRH負荷試験の判定基準の設定、および治療法との関係について検討してみた。

対象および方法

対象は当科不妊外来を受診し、昭和61年2月より昭和63年5月までの間に妊娠した症例の内、TRH負荷試験を施行している57例とした。なお、TRH負荷試験は月経開始1日目から5日目の間の、午前9時から11時の間に行った。TRH負荷試験の方法としては、まず採血を行い、その後TRH 500 μ gを静

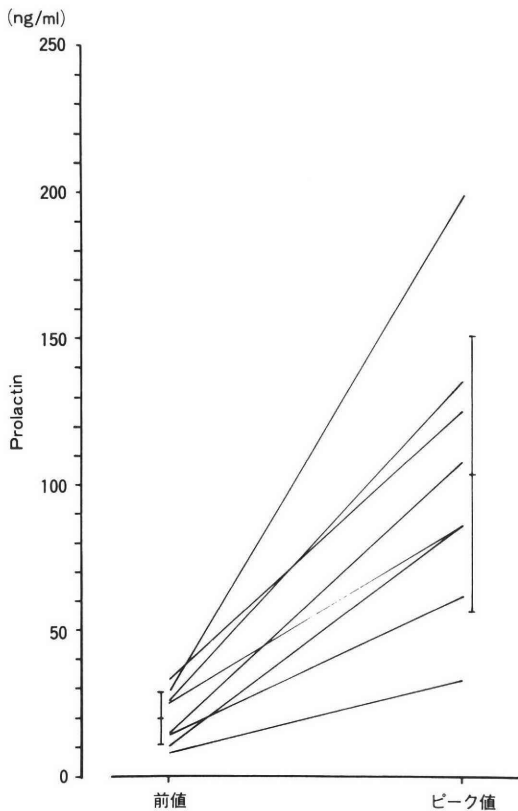


図1 妊娠周期のTRH負荷試験の結果

表1 各測定値間の相関係数

	前値	15分値	30分値	60分値	120分値
前 値	—	0.367	0.567	0.446	0.665
15 分 値	—	—	0.866	0.816	0.754
30 分 値	—	—	—	0.885	0.894
ピーク値	0.509	0.935	0.966	0.912	0.887

注しその後15, 30, 60, 120分に採血を行った。血液は遠心し、血清分離後、測定まで -20°C に保存した。血清中のプロラクチンはプロラクチンキット“第一”IIを用いて測定した。またTRH静注前の血清プロラクチン値を前値、TRH静注後15, 30, 60, 120分後の血清中のプロラクチン値をそれぞれ15分値、30分値、60分値、120分値とし、15分値から120分値中で一番高値を示した値をピーク値とした。また黄体期の長さはTRH負荷試験施行前の無治療時の基礎体温上での黄体期の持続日数より算定した。

結 果

対象57症例の平均年齢は29.2歳、またそのうち原発不妊は46例で平均年齢は29.3歳、続発不妊は11例でその平均年齢は28.8歳であった。

TRH負荷試験の各測定値の相互の関係を検討してみた(表1)。その結果、前値とそれ以外の値の間には $r=0.367$ から 0.665 とあまり強い相関は認められなかった。しかしピーク値と15分値以後の各値との間には $r=0.887$ から 0.966 と強い相関を示した。一方、ピークは今回の57例中54例において15分に、また残りの3例は30分に示した。このことからTRH負荷試験は前値とピーク値を用いて検討するのが適当であると考えられた。

妊娠例のうち、プロモクリプチンの投与をしておらず、さらに妊娠した同一周期にTRH負荷試験をおこなった8例のTRH負荷試験の前値は 20.1 ± 8.7 ng/ml またピーク値は 104 ± 47 ng/mlであった(図1)。この前値およびピーク値のmean+SDを求めると、前値は約30 ng/ml以下、またピーク値は150 ng/ml以下となった。この8例は妊娠同一周期に検査を行っており、また、無治療であるためにこの値はTRH負荷試験の正常例の判定基準となると考えられた。

そこでこの正常例の判定基準をもとに、その他の例の妊娠時の治療法および黄体期の長さの係につ

表2 TRHテストと治療法の関係

TRH テストピーク値 (ng/ml)	妊 娠 時 の 治 療				黄体期の長さ (日)
	Bromocriptine 使用あり		Bromocriptine 使用なし		
150以上	9		7		11.8±1.3
	+clomid	4	+clomid	3	
	+sexovid	1	+sexovid	3	
150以下	9		29		11.9±1.6
	+clomid	3	+clomid	14	
	+sexovid	4	+sexovid	6	
			+clomid, hMG	2	

($P < 0.05$) (mean $\pm$ SD)

いて検討を行った。まず、今回定めた判定基準によって前値は正常でピーク値が150 ng/ml以上の例と以下の例とに分け、それぞれの妊娠時の治療法およびTRH 負荷試験検査前の黄体期の長さについて検討した(表2)。その結果、ピーク値150 ng/ml以下の場合にはプロモクリプチンを使用しないで妊娠した例が38例中29例(76%)とピーク値150 ng/ml以上より多く認められた。しかしその他のクロミフェン等をもちいた治療法についてはピーク値が150 ng/ml以上の群でも150 ng/ml以下の群でも特に差は認められなかった。さらにTRH ピーク値が150 ng/ml以上の症例でもその黄体期の平均は11.8日と150 ng/ml以下の症例の黄体期と差は認められなかった。

考 察

不妊症の内、高プロラクチン血症に対してプロモクリプチンを投与する治療が行われているが、最近プロモクリプチンの投与の対象は高プロラクチン血症だけでなく、夜間に一過性にプロラクチンの高くなる潜在性高プロラクチン血症やさらには正プロラクチン血症の一部に対しても行われている。これらの治療対象の選択には様々な検査法や、判定基準が用いられている^{1,2)}が一般的にはTRH 負荷試験が判定法としてよく用いられている。しかし血中プロラクチン値には日内変動³⁾が認められ、また測定方法も主にRIA法が用いられているが、その用いるキットによっても多少の差が認められている^{4,5)}。さらにプロラクチン値の異常を示す例では黄体機能不全を伴うことが多いとされ⁶⁾、これらの点を含めて検討した。

まずTRH 負荷試験の実施の条件については、全例午前10時から午後1時の間に行われており、また月経周期の時期も月経開始5日目以内に行っている。またその測定法はRIAを用い、測定キットはよく使用されているプロラクチンキット“第一”IIを用いており、今回検討したTRH 負荷試験はほぼ標準的方法であると思われた。

次にTRH 負荷試験の判定は現在主に前値と負荷後の反応性によって行われている^{3,7)}。そして今回の各測定値間の相関性の検討の結果より、前値とその後の反応性の間には一定の関係がないことがわかった。そこでプロラクチンの分泌能がTRH 負荷試験の反応性に現れるならば、従来から言われているように⁸⁾負荷を行わない血中プロラクチンの1回のみの測定ではプロラクチンの分泌能の判定には不十分であると思われた。

次に各測定値の相関関係の検討をおこなった結果ピーク値がもっともよく他の値を反映している事が

わかった。そのためTRH 負荷試験の判定には前値とピーク値の2つを用いて検討するのが一番よいと思われた。一方、ピークは今回の検討では負荷後30分までに出現しているため、TRH 負荷試験はTRH 負荷後30分までの測定で十分であると思われた。さらにTRH 負荷後15分まででほとんどの症例でピークを示したために、負荷後15分までの測定でも判定は可能であり、簡便な方法となりうると思われた。

さらに今回検討した症例の内、妊娠同一周期にTRH 負荷試験を行った例の検討から正常域の判定基準としてMean+SDをとると前値30 ng/ml以下、ピーク値は150 ng/ml以下と設定できることがわかった。さらに前値30 ng/mlは高プロラクチン血症の判定基準であり、従来からの基準と比較してやや高値を示している⁹⁾。この違いは、従来の基準は正常月経周期を有するいわゆる正常婦人を対象として設定しているためであると思われた。しかし不妊症の治療を行う場合の基準は、妊娠例を基準とすべきであり、多少高めではあるが今回の検討結果を用いた方がよいと考えられた。

次にTRH 負荷試験の反応性と治療法との関係を検討した。その結果からピーク値が150 ng/ml以下であればプロモクリプチンを使用しなくても妊娠できる可能性が高い事がわかった。反対にピーク値が150 ng/ml以上でも16例中7例がプロモクリプチンを使用しないで妊娠しており、この事はピーク値が150 ng/ml以上の場合でもプロモクリプチンの投与が絶対的に必要なものではない事を示していると思われた。さらに150 ng/ml以上の例にもTRH 負荷試験前の黄体期に短縮がみられず、従来の報告とは異なっていた⁶⁾。

これら今回の検討の結果が従来の報告と違う原因としては、基準値を設定するための対象が従来の報告ではいわゆる正常婦人であり、今回の検討のように妊娠例ではないことによると思われる。しかし妊娠例を対象とした今回の検討こそが不妊治療としてのプロモクリプチン投与の判定基準となりうるものと思われた。従って、TRH 負荷試験からはプロモクリプチンの投与の判定は不可能であると思われた。

文 献

- 1) 合阪幸三, 安藤三郎, 国保健太郎, 金田幸枝, 多和田哲郎, 吉田浩介, 森 宏之: 潜在性高prolactin血症の診断法としてのTRHおよびMetoclopramide 負荷テストの意義, 日内会誌, 63: 853, 1987
- 2) 杉並 洋, 伊藤孝徳, 浜田雄行, 矢野浩史, 松浦俊平: 正プロラクチン正無排卵症における睡眠時

および Metoclopramide 負荷時の血中 PRL 値の推移および Bromocriptine による排卵誘発, 日産婦会誌, 38:728, 1986

- 3) 森 宏之, 合阪幸三, 松岡 良, 木川源則: 正プロラクチン血症性排卵障害におけるプロラクチン分泌予備能とプロラクチンの日内変動との相関, 日産婦会誌, 37:287, 1985
- 4) 青野敏博, 小泉 清, 池上博雅: プロラクチンのRIA におけるキット間および施設間の測定値の比較, ホと臨, 34:203, 1986
- 5) 森 宏之, 合阪幸三, 松岡 良: プロラクチン測定値の評価, 産と婦, 53:1208, 1986
- 6) 合阪幸三, 安藤三郎, 国保健太郎, 吉田浩介, 森宏之: いわゆる潜在性高プロラクチン血症患者における prolactin 分泌予備能の検討, 日内会誌, 62:662, 1986
- 7) 山本稔彦, 中 義尚, 豊田長康, 浜口元昭, 西山真人, 中 淳, 山脇孝晴, 野村浩史, 杉山陽一: 正プロラクチン血症不妊患者における Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) 負荷試験の意義, 日不妊会誌, 33:346, 1988
- 8) 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, 55:1145, 1988
- 9) 松岡 良, 森 宏之, 友成廉平, 陳 欣栄, 木川源則, 合阪幸三: Prolactin 分泌予備能判定による潜在性高 prolactin 血症の診断, 日産婦会誌, 39:586, 1987

The TRH loading test of pregnant case of infertile case

Keiji Shintani, Nobutaka Yoshida,
Ichirou Shirakawa, Takaaki Katayama,
Shigeki Taga, Kiyoshi Urabe and Kaoru Sekiba

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

We investigated the results of the Thyroxin Releasing Hormone (TRH) loading test which have been carried out in 57 cases of pregnancy. 1) From the results of 8 cases of TRH loading test which was just pregnant cycle, we can clarify the normal range that the basal level than 30 ng/ml and peak level was less than 150 ng/ml. 2) There were relationship between each levels of after loading and peak level. From these results, TRH loading test can be judged from the basal level and peak level. 3) TRH loading test can be judged more simpler which use basal level and the level of 15 min. after loading. 4) We cannot find the significant relationship between the results of TRH loading test and the therapy at the pregnancy cycle.

(受付: 1989 年 12 月 4 日)

TRH 負荷試験を指標とした Prolactin 関連卵巣機能障害に対する Bromocriptine 漸増投与法の検討

Bromocriptine Gradual Increase Trial
According to the TRH test;
To Decide the Adequate Dosage of Bromocriptine
for the Treatment of Dysfunctional Ovaries
Related Secretion of Prolactin.

筑波大学臨床医学系産婦人科 (主任: 岩崎寛和教授)

辻 泰二 西田 正人 岩崎 寛和
Taiji TSUJI Masato NISHIDA Hirokazu IWASAKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Institute of Clinical Medicine,
Tsukuba University, Ibaraki 305, Japan
(Director: Prof. Hirokazu Iwasaki)

PRL (prolactin) 関連卵巣機能障害が疑われた 191 症例 (22~42 歳・平均 30.1 歳) を対象として、TRH 負荷試験により PRL の抑制程度を確認しつつ bromocriptine を増量する bromocriptine 漸増投与法を施行し、症例各個に維持内服量を決定した上で予後を確認した。対象は維持内服量により、内服不要群、2.5 mg/日内服群、5.0 mg/日内服群、7.5 mg/日内服群の 4 群に分類され、7.5 mg/日を越えた症例は存在しなかった。内服例は、維持内服量に達するまで高 PRL 状態が抑制されず、内服開始以前の TRH 負荷試験では維持内服量を予測しえなかった。維持内服量下の妊娠率は内服量に関係無く一様で、内服不要群とも有意な差は無く、各内服群で十分な治療効果があったと判断できた。症例毎に維持内服量が異なる原因として bromocriptine の作用発現に個人差があるためと推察した。本法は bromocriptine の適切な維持内服量を決定する方法として、有意義であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 487-494, 1990)

緒 言

bromocriptine は、prolactin (以下 PRL と略す) の研究と深く関わり並行しながら開発の進められた薬剤の一つである。

1954 年に Shelesnyak¹⁾ が麦角アルカロイド中に PRL 分泌を抑制する物質があることを報告した事が始まりであった。1968 年には、Flückiger et. al.⁴⁾ が 2-Br- α -ergocryptine-mesylate (CB-154) にラットの

乳汁分泌抑制作用があることを報告した。一方、PRL の研究は、1971 年の Hwang et. al.⁶⁾ のヒト PRL の RIA 測定法樹立を契機に飛躍的に進歩した。PRL 分泌の異常と乳汁分泌・無月経・不妊症等の間に深い関係があることがわかるようになってきたのである。そして、1972 年に Besser et. al.²⁾ や Varga et. al.¹³⁾ が相次いで、CB-154 は PRL 分泌を抑制することにより乳汁分泌不全や無月経・不妊症に有効であることを報告した。以来、CB-154、すなわち bromocriptine

は、広く臨床応用される様になったのである。

しかし、現在に至るも bromocriptine や PRL の全てを理解できた訳ではなく、臨床上いくつかの壁が存在している。そのような壁の一つに bromocriptine の理想的な用法がある。bromocriptine には強い悪心・嘔吐と言った副作用もあり、適切な適応や投与法の確立が待ち望まれているが未だにこれらに関する定説、特に症例毎の用量の決定法に定説は無い。

現状では、我々産婦人科領域では、高 PRL 血症、潜在性高 PRL 血症、乳漏症、黄体機能不全に対して、諸家各々の方針に従って、一律 2.5 mg/日とか 5.0 mg/日などという用量で投与されているのが一般的である。

ところが、実際臨床において、2.5 mg/日では効果がなかった症例において、5.0 mg/日に増量したことにより効果が発現することはよく経験する。このことは、投与対象とした高 PRL 血症等の病態が症例個々になんらかの特性を保持しているために投与量を一律に決定しえないことを意味していると思われる。

今回著者らは、患者個々の特性を考慮した「bromocriptine 漸増投与法」なる維持内服量決定法を考案試行し、特に不妊症領域において、その有用性について検討したので報告する。

対 象

筑波大学付属病院産婦人科不妊外来を受診し、高 PRL 血症や潜在性高 PRL 血症が疑われ、検査・治療が施行された 191 症例（22 歳～42 歳・平均年齢 30.1 歳）を対象とした。甲状腺機能異常や下垂体腺腫と診断された症例は除外した。

方法 (bromocriptine 漸増投与法)

各症例の bromocriptine の維持内服量は次の方法で決定した。

まず、月経周期低温相中期に、TRH 500 μ g を筋注負荷し、負荷前及び、負荷後 15 分、30 分、60 分の血中 PRL 値を RIA にて測定する TRH 500 μ g 負荷試験を施行した。その結果、

①負荷前血中 PRL 基礎値 20 ng/ml 以上

②負荷後血中 PRL 頂値 100 ng/ml 以上

という基準のいずれかを満たした場合、bromocriptine 投与対象とし、最低量の 2.5 mg/日を月経周期中連続投与した。

次周期に bromocriptine 内服下で同様に TRH 500 μ g 負荷試験を再検し、再び前述の基準を満たせば、まだ PRL が高い状態にあると判断して 2.5

mg/日を追加し、計 5.0 mg/日を連続投与した。

これを繰り返し、前述の基準を満たさなくなった bromocriptine 内服量をもって、その症例の維持内服量とし、予後を観察した。以下この方法を bromocriptine 漸増投与法と呼ぶ。

この bromocriptine 漸増投与法を対象 191 例に施行し、血中 PRL 値と bromocriptine 内服量との関係及び予後の比較を行った。

結 果

(1) データの分布特性

対象 191 例の初回 TRH 負荷試験における負荷前の血中 PRL 基礎値及び負荷後の血中 PRL 頂値の分布特性は、図 1 に示すように対数正規分布が仮定し

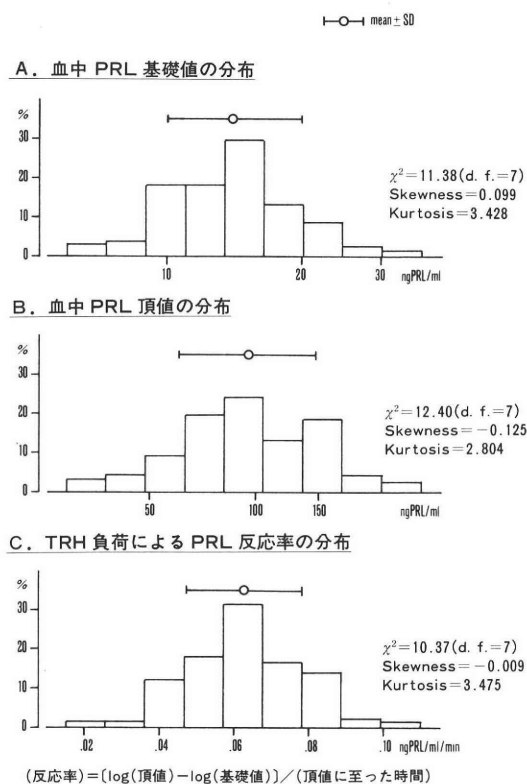


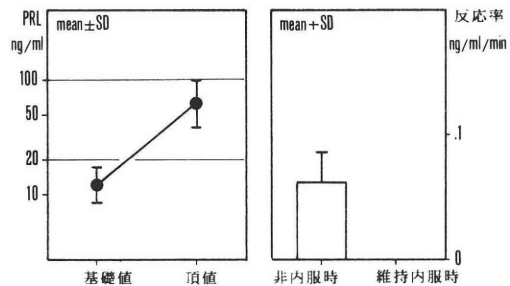
図1 TRH 負荷試験における血中 PRL 基礎値・頂値：反応率の分布

えたので、本研究においては、統計学的検定をするにあたって、各 PRL 値を対数変換して処理した。分布の検定は、既に示した如く¹⁾、 χ^2 適合度検定、歪度尖度の検定により行った。ちなみに、各々の 95 %信頼区間は、

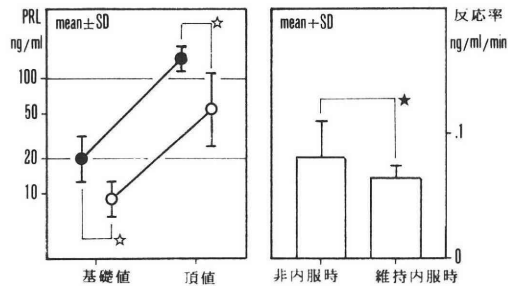
基礎値：8.16～24.1 [ng/ml]

頂 値：45.7～199.9 [ng/ml]

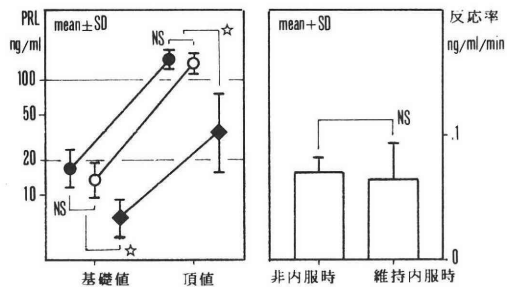
A. 内服不要群 (116例)



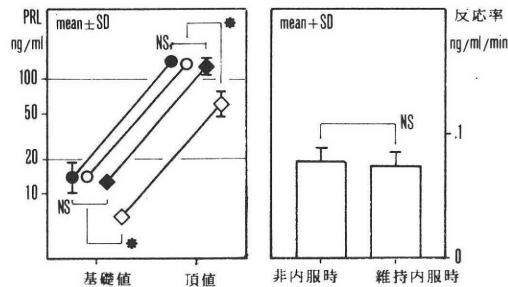
B. 2.5mg/日内服群 (53例)



C. 5.0mg/日内服群 (20例)



D. 7.5mg/日内服群 (2例)

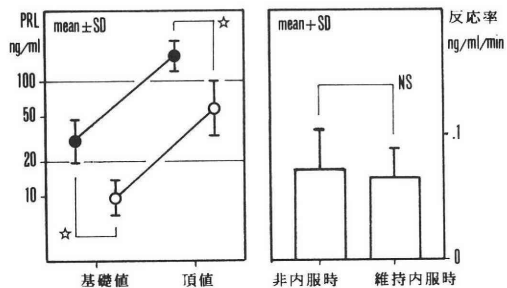


● 非内服時 ○ 2.5mg/日 ◆ 5.0mg/日 ◇ 7.5mg/日

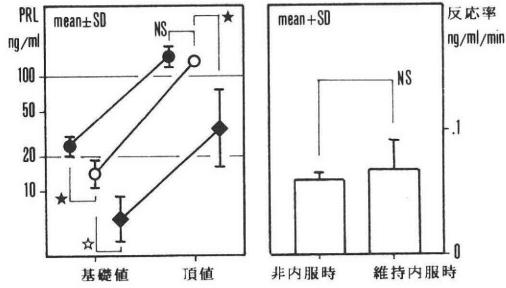
● $p < 0.05$ ★ $p < 0.01$ ☆ $p < 0.001$ NS Not Significant

図 2 bromocriptine 漸増投与法試行各群の TRH 負荷試験の結果

A. 2.5mg/日内服群 (22例)



B. 5.0mg/日内服群 (8例)



● 非内服時 ○ 2.5mg/日 ◆ 5.0mg/日

★ $p < 0.01$ ☆ $p < 0.001$ NS Not Significant

図 3 bromocriptine 漸増投与法試行各群の TRH 負荷試験の結果
(基礎値 ≥ 20 ngPRL/ml)

であった。

一方、各症例毎の TRH に対する PRL の反応性、すなわち PRL 分泌予備能を検討する意味で、

反応率 = $(\log [\text{頂値}] - \log [\text{基礎値}]) / (\text{頂値に至った時間})$

の検討も行った。初回 TRH 負荷試験における反応率の分布も図 1 に示した通り、同様の検定により正規分布を仮定できた。95 %信頼区間は、

0.0367~0.0891 [ng/ml/min]

であった。

(2)各症例で決定された維持内服量

表 1 対象内訳

内服不要群	116/191 (60.7%)
2.5mg/日内服群	53/191 (27.7%)
5.0mg/日内服群	20/191 (10.5%)
7.5mg/日内服群	2/191 (1.1%)

検討を加えた 191 例は、決定された bromocriptine の維持内服量によって、表 1 に示した如く、内服不要群 116 例 (60.7 %), 2.5 mg/日内服群 53 例 (27.7 %), 5.0 mg/日内服群 20 例 (10.5 %), 7.5 mg/日内服群 2 例 (1.1 %) の 4 群に分類でき、全例が 7.5 mg/日以内の投与量で血中 PRL 値が基準値に回復することが判った。

検討を行なった症例の中には、いわゆる高 PRL 血症とされる PRL 基礎値の高い症例と TRH 負荷により高反応を示す潜在性高 PRL 血症が混在している訳だが、基礎値の高い症例に限った場合に結果が異なる可能性がないかを見るために、血中 PRL 基礎値が 20 ng/ml 以上であった症例を別に取り上げて同様の検討を加える事も試みた。表 2 に PRL 基礎値が 20 ng/ml 以上であった症例の内訳を示したが、2.5 mg/

表 2 血中 PRL 基礎値 20ng/ml 以上であった症例の内訳

2.5mg/日内服群	22/53 (41.5%)
5.0mg/日内服群	8/20 (40.0%)
7.5mg/日内服群	0/2 (0.0%)

bromocriptine 内服必要例中に占める割合

30/75 (40.0%)

日内服群に 22 例 (41.5 %) 存在し、5.0 mg/日内服群に 8 例 (40.0 %) 存在した。一方、7.5 mg/日内服群には存在しなかった。bromocriptine 投与を要すると判断された症例の 40.0 %が PRL 基礎値の高い症例であったことになる。

(3)各群における TRH 負荷試験の結果

図 2 に示した如く、各群とも、血中 PRL 基礎値及び血中 PRL 頂値は、維持内服量に至って初めて有意な抑制が認められた。しかし、反応率は、非内服時と維持量内服時で有意な差は認められない傾向にあった。

血中 PRL 基礎値が 20 ng/ml 以上であった症例に限ってみても同様の結果が得られた。(図 3)

(4)各群の初回 TRH 負荷試験の結果の比較

各内服群の維持内服量が初回の TRH 負荷試験の結果から予測できるかを検討した。その結果、図 4

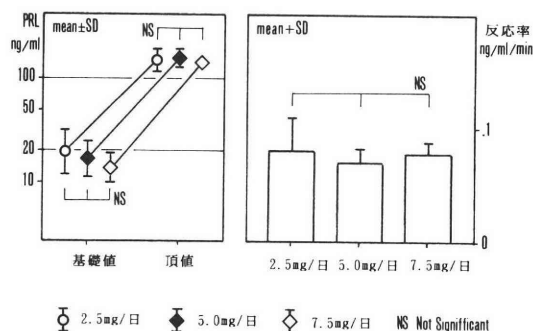


図 4 各 bromocriptine 内服群の初回 TRH 負荷試験の比較

に示した如く、各内服群間の血中 PRL 基礎値、血中 PRL 頂値、及び反応率とも有意な差は認められず、初回の TRH 負荷試験で維持内服量は予測できないと考えられた。

血中 PRL 基礎値が 20 ng/ml 以上であった症例においても、各々の値に有意な差は認められなかった。(図 5)

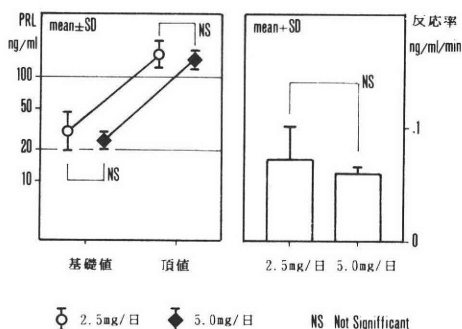
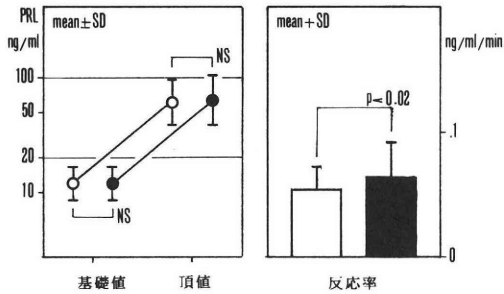


図 5 各 bromocriptine 内服群の初回 TRH 負荷試験の比較
(基礎値 ≥ 20 ngPRL/ml)

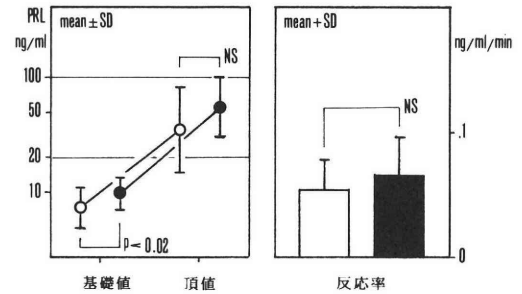
(5)各群の予後 (妊娠) の比較

各群の妊娠率を表 3 に示した。内服量に関わらず、妊娠率に有意な差は認められず、またその症例にと

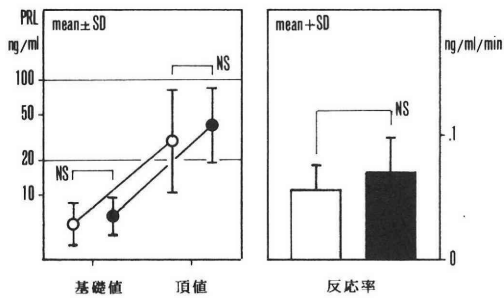
A. 内服不要群 (116例)



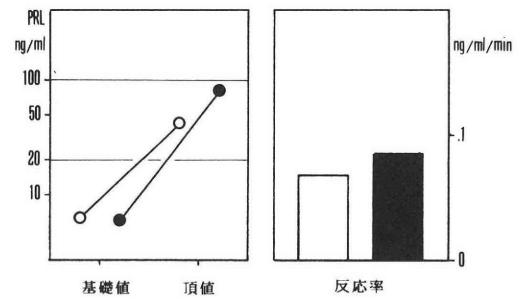
B. 2.5mg/日内服群 (53例)



C. 5.0mg/日内服群 (20例)



D. 7.5mg/日内服群 (2例)



妊娠



非妊娠



妊娠



非妊娠

NS Not Significant

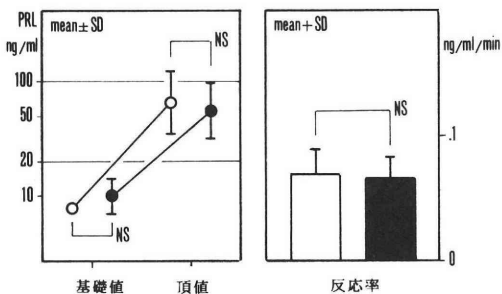
図 6 bromocriptine 漸増投与法施行各群の維持内服量における妊娠例・非妊娠例の比較

って適切と判断された投与量が維持された環境下では、その内服量が異なるからと言って、妊娠率に差は無かった。このことは、今回の基準に沿って bromocriptine を投与した場合に各群に内服不要群と有意

差のない妊娠率を挙げると言うことであり、各群とも十分な治療効果を得られたと言える。

図 6 に、各群の維持内服量における妊娠例・非妊娠例間の TRH 負荷試験の結果の比較を示した。血中

A. 2.5mg/日内服群 (22例)



妊娠



非妊娠

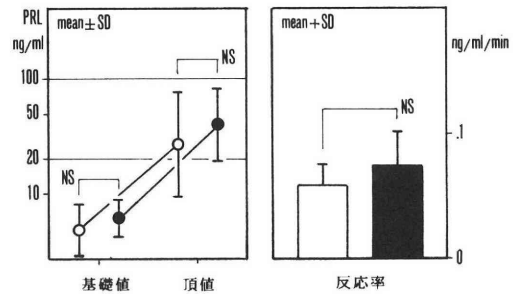


妊娠



非妊娠

B. 5.0mg/日内服群 (8例)



NS Not Significant

図 7 bromocriptine 漸増投与法施行各群の維持内服量における妊娠例・非妊娠例の比較 (基礎値 ≥ 20 ng PRL/ml)

表3 bromocriptine 漸増投与法試行各群の妊娠率の比較

	全 体	PRL 基礎値 $\geq 20\text{ng/ml}$
内 服 不 要 群	41/116(35.3%)	—
2.5mg/日内服群	10/ 53(18.9%)	2/22(9.1%)
5.0mg/日内服群	6/ 20(30.0%)	3/ 8(37.5%)
7.5mg/日内服群	1/ 2(50.0%)	—
	58/191(30.4%)	5/30(16.7%)
	not significant	not significant

PRL 基礎値・頂値及び反応率共に、妊娠例・非妊娠例間で有意な差を認めなかった。

血中 PRL 基礎値 20 ng/ml 以上の症例においても同様の結果が得られた。(図7・表3)

((3)(4)(5)の結果から、血中 PRL 基礎値の高い、いわゆる高 PRL 血症と呼ばれている病態を、今回の対象から分けて考察する必要はないと考えられた。)

(6)使用した統計学的検定法

(3)：対応のあるデーターの比較であるから paired-t test を用いた。

(4)：等分散が仮定されたデーター間の比較には Student's t test を用い、等分散が否定されたデーター間の比較には Welch-t test を用いた。

(5)：妊娠率の比較はカテゴリカルデーターの比較として検定し、例数に応じて χ^2 検定と Fisher 直接確率計算法を使い分けた。妊娠例と非妊娠例の比較には、等分散が仮定された場合に Student's t test を、否定された場合に Welch-t test を用いた。

考 察

著者らが今回の bromocriptine 漸増投与法を考案・試行したのは次のような理由による。

すなわち、

(1)不妊原因として高 PRL 血症と共に潜在性高 PRL 血症の発見・治療の重要性が指摘されているが、潜在性高 PRL 血症の診断が無月経・無排卵という症状ではスクリーニングできない。

(2)一方、治療面では潜在性も含めた高 PRL 血症に対して bromocriptine が極めて有効とされている。

(3)しかし、bromocriptine の至適な投与量の決定法というものは未だに作られておらず、一般的には一律 2.5 mg/日 或いは 5.0 mg/日 を服用させることが多い。

(4)また、bromocriptine の強い副作用を考慮すれば、必要最低限の投与量という点を忘れてはいけない。

以上の点から、なんらかの方法によって至適 bromocriptine 投与量を決定する必要があると考えた訳である。

そこで、今回の検討では、bromocriptine 継続投与

中に TRH 負荷試験を施行して次期 bromocriptine 投与量を決定していくことにより、bromocriptine の至適投与量を決定することを試みたものである。

TRH の PRL 分泌促進機序と bromocriptine の PRL 分泌抑制機序は、PRL 産生細胞において c-AMP を介して拮抗すると考えられている^{8,9)}が、両者を同時に投与した場合どのように拮抗し合うか、具体的には未だに理解されていない。しかしながら結果として bromocriptine 投与前に異常であった TRH 負荷試験の結果が、bromocriptine を投与することによって正常化されるということがまず判明した。

この値を指標とする限り、今回の結果では、ほとんどの症例が 5.0 mg/日 以下の投与量で TRH 負荷試験が正常化されており、 7.5 mg/日 を要したものはわずかに2例(対象全例の 1.05% 、内服例の 2.67%)に過ぎず、これを越える投与量を必要とした症例はなかった。

この様に決定した維持内服量で症例を分類した場合、仮に TRH 負荷試験正常例を正常群、異常例を異常群とすれば、bromocriptine 2.5 mg/日 投与によって正常化するものは軽症であり、 7.5 mg/日 を要するものは重症と考えたくなる。一方、血中 PRL 値を指標とした場合には PRL 基礎値・反応頂値或いは反応率が高いほど「重症」との考えも成立する。ところがこの両重症度判定は全く一致しなかった。すなわち、TRH 負荷試験異常群の中で、bromocriptine 2.5 mg/日 投与で正常化される軽症群と 7.5 mg/日 を要する重症群の間には、PRL 基礎値・頂値・反応率共に有意差が無かったのである。この理由は以下の様な説明によりある程度可能である。

本来ならば、基礎値や頂値が高ければ、それを正常化させるにはより多くの薬剤が必要なはずである。それなのに、PRL の値は、それを正常化させるに必要な bromocriptine 量が全く無関係であったということは、bromocriptine の効果発現に個人差があるためと考えられる。換言すれば、効果が高く発現する症例では、 2.5 mg/日 の内服でかなりの PRL 高値を正常化するが、効果が低い症例ではやや高程度度の PRL

値であっても正常化させるのには7.5 mg/日の内服を要する、とうことである。今回の結果でも、2.5 mg/日内服群、5.0 mg/日内服群、7.5 mg/日内服群間で妊娠率に差がなく、PRL環境が正常と考えられる内服不要群の妊娠率との間にも有意な差がなかった。このことは、各々の内服量ではじめてPRL環境が正常化したことの裏付けであり、妊娠成立の目的を達しうるものと言えよう。

bromocriptineの効果発現に個人差があるなら、その原因が、bromocriptineの作用機序と深く関わっていることは容易に想像が付く。

bromocriptineはドーパミンのagonistの一つである2-Br- α -ergocryptine-mesylateを成分としている。内服した場合、十二指腸を中心として吸収され、主として胆汁・糞中に排泄されると考えられている^{3,10)}が、通常の治療目的で内服する量は極めて微量であるため、in vivoにおける薬理学的な検討はやや後れているのが現状である。

その作用機序は、ドーパミンのPRL分泌抑制(PIF効果)作用機序と類似していることもあり、ある程度解明されつつある。すなわち、視床下部には種々のドーパミン伝達係が存在するが、PRL分泌抑制系は、正中隆起部に存在するドーパミン神経繊維を中心に形成されており、この神経繊維は下垂体門脈周囲に末端を持ち、ここで分泌されたドーパミンが下垂体へ到達し、PRL産生細胞のドーパミン受容器と結合してPRL分泌を抑制すると考えられている。

bromocriptineは、下垂体門脈を経て、下垂体PRL産生細胞のドーパミン受容器と結合することによって、PRL産生細胞中のc-AMPの増加を抑制し^{7,12)}、これによってPRLの細胞外への分泌を抑制する^{5,14)}。一方、c-AMPの抑制により、PRL遺伝子の転写も抑制を受け、PRLの合成自体も抑制される⁸⁾。この様にして、bromocriptineの投与により、PRLの分泌と合成に抑制が掛かり、血中PRL値が低下すると理解されている。

この様なbromocriptine作用機序を踏まえて、bromocriptineの作用に個人差が生じる理由として、以下の2説を考えてみた。

第1は、効果の低い症例においては、ドーパミン受容器の感受性閾値が高いとするものである。ドーパミンとbromocriptineが同一機序で作用するとするならば、この様な症例では、少量のbromocriptine投与では、治療効果が認められないと考えられる。

第2は、重症例においては、ドーパミン受容器の閾値に差はほとんど無いが、消化管におけるbromocriptineの吸収率が低いとするものである。bromo-

criptineの吸収が悪ければ、当然bromocriptineの血中濃度は上昇せず、作用を発揮するには、多量のbromocriptine摂取を必要とすることになる。

これらの仮説は、PRL関連卵巣機能障害と診断され、bromocriptineを投与した症例のbromocriptine投与量とその血中濃度、及び、その時の臨床効果を比較することによって、ある程度検証できるものと考えられる。現時点では、健常婦人の吸収動態に関する研究はある程度進んでいるものの高PRL血症患者においてどうかという研究は皆無に近い状態である。この点の解明については、今後の課題としたい。

以上、今回得られた結果に著者らの推論を加えて、現時点で下記のような結論に達した。

① bromocriptine漸増投与法を施行したことにより、PRL血症や潜在性高PRL血症の別無く、PRL分泌亢進症例には、bromocriptine投与量を指標とした重症度の差が存在する事が判明した。

② 重症度は、bromocriptine投与前の血中PRL値と無関係で、むしろbromocriptineの作用の個人差によるものと考えられた。

③ このbromocriptineの作用の個人差は、個体毎のドーパミン受容器の感受性(閾値)の差か、消化管におけるbromocriptine吸収率の差か、いずれかに起因するものと考えられた。

④ したがって、このbromocriptine作用の個人差は、内服治療開始前のPRLの基礎値や、TRH負荷試験における反応頂値・反応率のみから推測することはできず、今回著者らが実施したbromocriptine漸増投与法によって決定しうると考えられた。

⑤ 以上からこのbromocriptineの作用の個人差を無視して投与量を一律に設定することは誤りであると考えられた。

⑥ このbromocriptine漸増投与法に基づいてbromocriptineを投与した症例では一様の妊娠率を期待できることから、PRL分泌異常に起因すると考えられる不妊症の治療法として本法は有意義であると考えられる。

(本論文骨子は第32回日本不妊学会総会及び、第40回日本産科婦人科学会総会にて発表した)

文 献

- 1) 辻 泰二, 西田正人, 久保武士, 岩崎寛和: 血中Gonadotropin, Prolactin値の数値分布の検討, 日不妊誌, 35: 111, 1990
- 2) Besser, G. M., Parke, L., Edwards, C. R., Frosyth, I. A., McNeilly, A. S.: Galactorrhea: Successful treatment with reduction of plasma prolactin levels by brom-ergocryptine, Br. Med.

- J., 3: 669, 1972
- 3) Eckert, H., Kiechel, J. R., Rosenthaler, J., Schmidt, R., Schreier, E.: Biopharmaceutical Aspects. in Handbook of Experimental Pharmacology, 49: Ergot Alkaloids and Related Compounds (ed. Berde, B., Schild, H. O.), 719, Springer Verlag, 1978
 - 4) Flückiger, E., Wagner, H. R.: 2-Br- α -Ergokryptin: Beeinflussung von Fertilität und Laktation bei der Ratte, *Experientia*, 24: 1130, 1968
 - 5) Häusler, A., Rohr, H. P., Marbach, P., Flückiger, E.: Changes in prolactin secretion in lactating rats assessed by correlative morphometric and biochemical methods, *J. Ultrastruct. Res.*, 64: 74, 1978
 - 6) Hwang, P., Guyda, H., Friesen, H.: A radioimmunoassay for human prolactin, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 68: 1902, 1971
 - 7) Kimura, H., Calabro, M. A., McLeod, R. M.: Suppression of prolactin secretion and cAMP accumulation by dopamine in the pituitary, *Fed. Proc.*, 35: 305, 1976
 - 8) Maurer, R. A.: Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP, *Nature*, 294: 94, 1981
 - 9) Maurer, R. A.: Relationship between estradiol, ergocryptine and thyroid hormone; Effect on prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid levels, *Endocrinology*, 110: 1515, 1982
 - 10) Price, P., Debono, A., Parkes, J. D., Marsden, C. D.: Plasma bromocriptine levels, clinical and growth hormone responses in parkinsonism, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 6: 303, 1978
 - 11) Shelesnyak, M. C.: Ergotoxine inhibition of decidual formation and its reversal by progesterone, *Am. J. Physiol.*, 179: 301, 1954
 - 12) Tam, S. W., Dannies, P. S.: The role of adenosine 3', 5'-monophosphate in dopaminergic inhibition of prolactin release in anteropituitary cells, *Endocrinology*, 109: 403, 1981
 - 13) Varga, L., Lutterbeck, P. M., Pryor, J. S., Wenner, R., Erb, H.: Suppression of puerperal lactation with an ergot alkaloid: A double-blind study, *Br. Med. J.*, 2: 743, 1972
 - 14) Yanai, R., Nagasawa, H.: Effect of 2-Br- α -

Ergocryptine on pituitary synthesis and release of prolactin and growth hormone in rats, *Hormone Res.*, 5: 1, 1974

**Bromocriptine gradual increase trial
according to the TRH test:
To decide the adequate dosage
of bromocriptine for the treatment
of dysfunctional ovaries
related secretion of prolactin**

Taiji Tsuji, Masato Nishida
and Hirokazu Iwasaki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Institute of Clinical Medicine,
Tsukuba University, Ibaraki 305, Japan
(Director: Prof. Hirokazu Iwasaki)

To decide the adequate dosage of bromocriptine, we tried the method of "Bromocriptine Gradual Increase Trial." We performed the TRH test as the parameter decision making of suppression of inadequate secretion of prolactin. This study included 191 patients suspected hyperprolactinemia or occult hyperprolactinemia, who were treated at the sterility clinic in Tsukuba University Hospital. The procedure of this method was as follows: The dosage of bromocriptine was increased gradually by 2.5 mg/day until serum prolactin levels were suppressed to less than 20 ng/ml basal and to less than 100 ng/ml at peak after TRH 0.5 mg im. In the result, 116 patients did not need bromocriptine, 53 needed 2.5 mg/day, 20 needed 5.0 mg/day, and 2 needed 7.5 mg/day. The decided dosage could not be prognosticated by the primary TRH test in each case. This suggested to us that the variation of the dosage reflected the individual difference in the absorption of bromocriptine in the intestine or in the sensitivity of the dopaminergic receptor. We concluded that "Bromocriptine Gradual Increase Trial" was compatible with the treatment of dysfunctional ovaries related abnormal secretion of prolactin.

(受付: 1989 年 11 月 8 日)

GnRH agonist を用いた 各種過排卵刺激法の比較検討

The Effect of GnRH Agonist on Various Types of Controlled Ovarian Hyperstimulation

順天堂大学医学部産婦人科学教室

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

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

Gnadtropine Releasing Hormone Agonist (GnRHa) を用いた3種類の過排卵刺激法について比較検討を行い、以下の結果をえた。

1. long protocol においては、GnRHa を黄体期、卵胞期いずれから投与しても FSH の低下に先行して E_2 の低下が認められた。このことから、GnRHa が下垂体 gonadotroph の desensitization 以外の機序によっても作用することが示唆された。
2. long protocol における E_2 50 pg/ml 以下という hMG 投与の基準は、GnRHa を卵胞期から投与するプロトコールには適しているが、黄体期から投与するプロトコールについては更なる検討が必要であると考えられた。
3. 3つのプロトコールの最終 hMG 投与日における、発育卵胞数、 E_2 値には各群間で有意差を認めなかった。
4. いずれのプロトコールを採用しても一長一短があり、症例に応じ適切な投与方法を用いることが今後の課題である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 495—500, 1990)

緒 言

In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET), gamete intrafallopian transfer (GIFT) の普及に伴って、多数の卵胞を発育させるために clomiphene や hMG を用いた Controlled Ovarian Hyperstimulation (COH) が行われている¹⁻³⁾。しかしながら、従来の clomiphene や hMG、その両者の併用に

よる COH では、early luteinization や low response などの失敗例が予想以上に多いことが明らかになってきた^{4,5)}。これらを予防するため、COH に gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) を併用する方法が試みられている⁶⁻¹⁰⁾。GnRHa の反復投与により下垂体 gonadotroph の desensitization が起こり、ゴナドトロピンの分泌が抑制され、卵巣機能の低下が起こる。この下垂体に

対する desensitization により, medical hypophysectomy の状態にして, 外来性の hMG を投与すると synchronize した卵胞の発育が得られる⁶⁾.

GnRHa と hMG の併用による COH には, GnRHa の投与時期, 期間によりいくつかのプロトコルがあり, それぞれ良好な成績が報告されている⁶⁻¹⁰⁾. 今回, GnRHa の投与法について 3 種類のプロトコルを作成し, その経過をホルモン値, 並びに超音波検査による卵胞計測によって追跡して, 各プロトコルにおける GnRHa の作用機序について検討を行った.

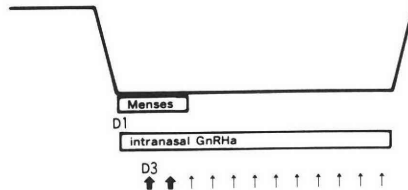
対象と方法

1) 対象

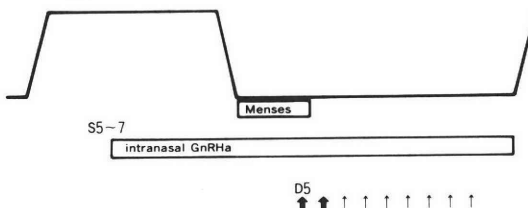
当教室の不妊外来で, artificial insemination with husband's semen (AIH), GIFT 施行予定の 23 歳から 42 歳の患者 39 例を対象とした. 対象の不妊期間は 2~17 年であり, 不妊原因は卵管性不妊 9 例, 機能性不妊 21 例, 男性因子によるもの 19 例であった.

2) プロトコル

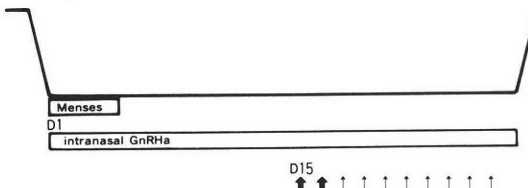
1. short protocol



2. long protocol



3. long protocol



↑ 日研 hMG 300 IU

↑ Pergonal 150 IU

図1 GnRHa を用いた COH のプロトコル

3 種類のプロトコルを図 1 に示す. short protocol (S) では, 月経第 1 日目より GnRHa を投与し, 月経第 3 日目から hMG の投与を開始した(10 例). long protocol 1 (L 1) では, 黄体期中期(高温相 5~7 日目)より GnRHa を投与し, 月経発来後第 5 日目から hMG の投与を行った(10 例). long protocol 2 (L 2) では, 月経第 1 日目より GnRHa を 14 日間投与し, 第 15 日目から hMG の投与を行った(19 例). L 1, L 2 においては, それぞれ月経第 5 日目, 月経第 15 日目の E_2 が 50 pg/ml 以下を示すもののみ hMG の投与を行った. GnRHa には Buserelin (Hoechst Japan) を使用し, 900 μ g/day を nasal spray で投与した. hMG は各プロトコルとも, 原則として, 最初の 2 日間は FSH/LH 比の高い日研 hMG (日研科学) 300 IU を皮下注射し, 3 日目からは Pergonal (帝国臓器) 150 IU を皮下注射した. hMG に対する反応が不良な症例では, Pergonal の量を 225~300 IU に増量した. 最大卵胞径が 20 mm を越え, 直径 12 mm の卵胞 1 個当りの血中 E_2 値が 200 pg/ml 以上となった時点で hMG の投与を中止し, その 36 時間後に HCG 10,000 IU を皮下注射した. COH の評価に当り, premature luteinization とは hMG 投与中に LH の値が基礎値の 2 倍以上に増加するもの, low responder とは発育卵胞数が 2 個以下, または E_2 値が 500 pg/ml 以上に増加しないものと定義した.

3) ホルモン測定並びに超音波検査

下垂体および卵巣機能の評価は, 隔日に採血し LH, FSH, E_2 を測定することにより行った. E_2 , progesteron および S, L 1 の LH, FSH は第一ラジオアイソトープ社の RIA kit で測定し, L 2 の LH, FSH は, ブーツセルテック社の RIA kit により測定を行った. 第一ラジオアイソトープ社とブーツセルノ社の LH, FSH の測定値は良好な相関を示したが, LH はブーツセルノ社のキットで高値を示し, FSH は第一ラジオアイソトープ社のキットで高値を示すため, 測定値を同一に評価するのは困難であった. 超音波検査は, Aloka SSD 620 の経腔プローブによって行った. また, 推計学的処理は, Student's t 検定によって行った.

結 果

S における各種ホルモン値の推移を図 2 に示す. GnRHa の投与による LH, FSH の一過性上昇 (flare up) のため, 月経第 3 日目の LH, FSH はやや高値を示し, 月経第 5 日目の LH, FSH は hMG の投与によりさらに増加したが, LH は次第に低下し, FSH はやや低下した後高値を維持した. E_2 は, hMG の投

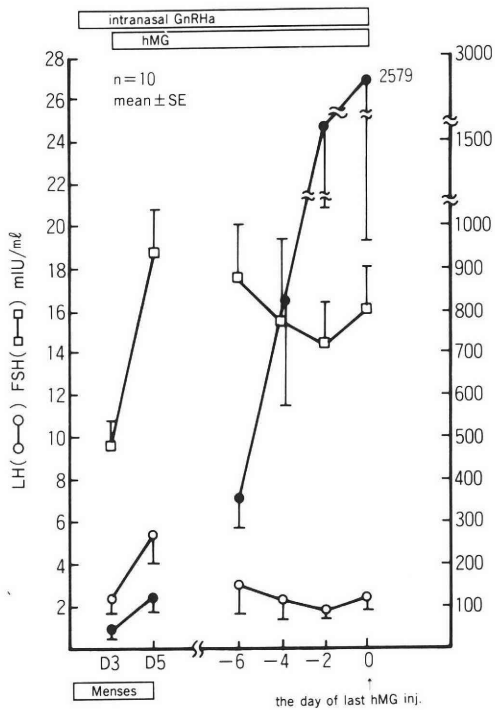


図2 Short protocol における各種ホルモン値の推移

与に随い hMG 投与最終日まで増加した。10 例中 1 例に、hMG 投与中 LH が 1.5mIU/ml から 5.3mIU/ml に増加した premature luteinization が認められた。

L 1 におけるホルモン値の推移を示したものが図 3 である。投与対象者 10 例全例が月経第 5 日目の E_2 値が 50 pg/ml 以下を示した。黄体期中期からの GnRHa 投与により、LH、FSH とともに投与 2 日目にピークをとり、LH は 6 日目には投与前値より低下したが、FSH は投与前値以下には下降しなかった。 E_2 はゆるやかに漸増した後低下したが、GnRHa の投与による有意な増加は認めなかった。P は、投与 3 日目に 21 ng/ml のピークをとった後、黄体期後期になるに従って減少した。P の変化は LH とほぼ同調していた。月経発来後、LH は GnRHa 投与前より低下し、hMG 投与終了まで低値を持続した。FSH は、hMG 投与 3 日目に著増し、漸減した後 16 mIU/ml まで増加した。 E_2 は hMG 投与当日に最低値となった後、hMG 投与最終日の 4 日前より著増し、最終投与日にピークを示した。10 例のうち 2 例が、hMG 投与最終日の発育卵胞数が 2 個の low responder であった。

L 2 における hMG 投与にいたるまでのホルモン値の推移を図 4 に示す。この 15 例は GnRHa 投与 13 日

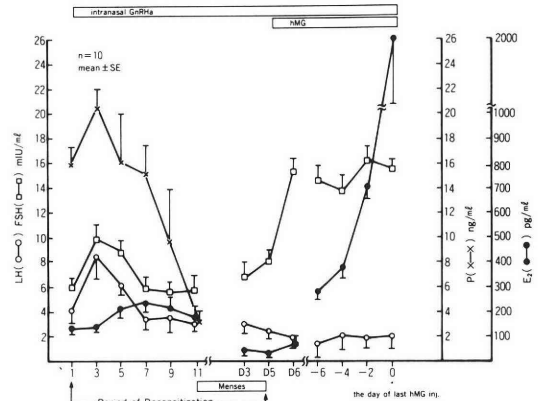


図3 long protocol 1 における各種ホルモン値の推移

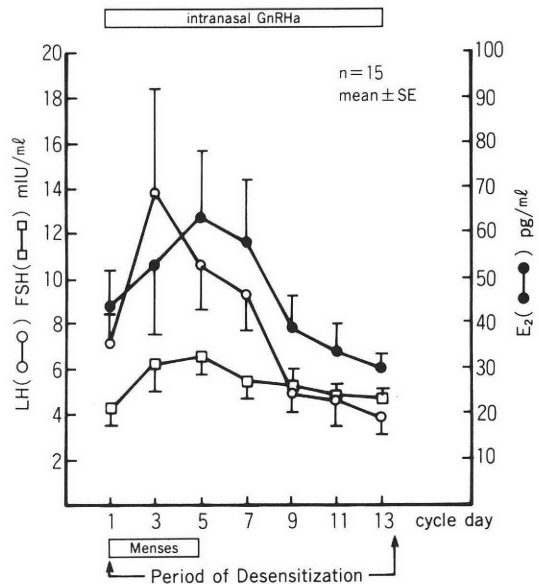


図4 long protocol 2 における desensitization までの各種ホルモン値の推移

目の E_2 値が 50 pg/ml 以下を示したものであり、残りの 4 例は投与 13 日目の E_2 が平均 585 pg/ml と著増しており、1～3 個の発育卵胞を認めたので除外した。LH は、GnRHa 投与 3 日目にピークを示し、以後漸減して 9 日目には投与前値以下となった。FSH は、GnRHa 投与 5 日目まで比較的ゆるやかに増加し、以後漸減するものの投与 13 日目に至っても投与前値以上を示した。 E_2 は、FSH と同様に GnRHa 投与 5 日目まで増加傾向を示した後漸減し、投与 13 日目までには投与前値以下となった。

L 1 と L 2 の GnRHa 単独投与期間のホルモン値を比較検討すると、LH は両者とも投与 3 日目にピークを形成し、L 1 では投与 6 日目以降、L 2 では 9

日目に降に投与前値以下に低下した。FSH は、L 1 では 3 日目に、L 2 では 5 日目にピークを示した後漸減したが、両者ともに投与前値以下にはならなかった。E₂ は、L 1 では明らかな上昇は認めず、L 2 では FSH と同調して 5 日目に小さなピークを作った後漸減した。

表 1 long protocol 1 における自然周期と GnRHa 投与周期の高温相の期間

	GnRHa (+)	GnRHa (-)
duration of secretory phase (days)	15.2±0.4	13.1±0.2
n = 10 P < 0.01		

L 1 では、GnRHa 投与開始周期の高温相が延長する傾向が認められた。各症例における GnRHa 非投与周期の高温相の持続日数と比較した成績を表 1 に示した。GnRHa 投与開始周期の高温相は自然周期に比べ延長する傾向が認められた (P < 0.01)。

L 2 においては GnRHa 投与により E₂ の上昇および卵胞の発育が起こり、hMG の投与を中止した症例が 4 例あったが、L 1 では hMG 投与開始時に E₂ が 50 pg/ml 以上を示した症例は 1 例もなかった。一般に、卵胞期初期は各ホルモン値が低値をとる時期である。S、L 2 の GnRHa 投与当日、L 1 の hMG 投与当日における LH、FSH、E₂ を示したものが表 2 である。いずれの値も各群間に有意差は認めなかった。卵胞期初期における E₂ は、GnRHa の黄体中期からの投与がなくても 50 pg/ml 以下を示すものと考えられた。

表 2 各プロトコルにおける卵胞期初期のホルモン値

	short (D3)	long 1 (D5)	long 2 (D1)
LH mIU/ml	2.4±0.6	3.0±0.7	—
FSH mIU/ml	9.7±1.2	6.8±1.2	—
E ₂ pg/ml	48.3±7.6	44.4±10.3	47.0±7.8

表 3 各プロトコルにおけるホルモン値、卵胞発育の状態と hMG 投与量

	short protocol	long protocol 1	long protocol 2
number of patient	10	10	15
age	34.1±1.2	36.4±1.1 ^a	31.5±1.2 ^a
LH levels at the last hMG injection (mIU/ml)	2.7±0.8	2.0±0.5	—
FSH levels at the last hMG injection (mIU/ml)	16±2.1	15.6±0.7	—
E ₂ levels at the last hMG injection (pg/ml)	2759±1237	2090±592	—
Preovulatory follicles at the last hMG injection	6.6±1.4	6.1±1.0	7.8±1.3
administrated hMG units (IU)	2407±314	1845±138	1870±163

^aP < 0.05

(mean ± SE)

各プロトコルにおける hMG 投与最終日の各種ホルモン値および卵胞の状態を表 3 に示す。L 1 の平均年齢が L 2 よりも高い傾向がある (P < 0.05) 以外、LH、FSH、E₂、発育卵胞の数、hMG の所要量に各群間で有意差は認められなかった。

考 察

GnRHa を用いた COH には、使用する GnRHa の種類、投与方法(鼻腔内噴霧、皮下注、持続皮下注)、投与開始時期、投与期間などにより様々なプロトコルが報告されている⁶⁻¹⁰⁾。それらは、GnRHa を一定期間投与し、下垂体の desensitization により medical hypophysectomy をおこなったのち hMG を投与する long protocol⁶⁾と卵胞期初期から GnRHa と hMG をほぼ同時に投与し、GnRHa 投与初期に見られる FSH の flare up を卵胞刺激に利用しつつ、投与経過とともに起こる LH の抑制により premature luteinization を予防する short protocol⁹⁾に大別される。long protocol には、GnRHa を前周期の黄体期から投与する方法と過排卵誘発周期の卵胞期初期から投与する方法がある。著者らは、投与開始時期、投与期間の異なる 3 つのプロトコルを作成し、ホルモン動態を中心に検討した。

Palermo⁹⁾らは、黄体中期から buserelin 600μg/day を nasal spray で投与した場合、FSH は LH に先行して投与 3～6 日以内に投与前値の 10～20 % にまで低下したと報告している。正岡ら¹¹⁾も、endometriosis の患者に卵胞期初期から buserelin 200μg/day を持続皮下注したところ、同様に FSH は LH よりも急速に低下し、投与 4 週間後に最低値を示

し、以後その値を持続したと報告している。我々の検討では、long protocol においては、GnRHa を黄体期、卵胞期のいずれの時期から投与しても LH の低下は FSH に先行して起こり、2 週間程度の投与では FSH の低下は認められなかった。L 1, L 2 において、FSH の低下が認められないにもかかわらず、 E_2 の低下が起こるということは、GnRHa の作用が下垂体 gonadotroph の desensitization により LH, FSH の分泌を低下させて発現するという従来からの考えでは説明が困難である。最近、LH, FSH は α -subunit と β -subunit から形成され、リセプターを認識し結合するには β -subunit の 1 次構造が重要であるが、リセプターと結合した後の生物活性の発現には α -subunit に特有な糖鎖が重要であることが解明されてきた。糖鎖は、硫酸基やシアル酸の結合によりトリミングされ、生理活性をもったホルモンが産生される。また、LH と FSH の分子多様性の存在が知られており、これらは糖鎖のシアル酸と硫酸基に由来し、結合シアル酸が多くなると蛋白の酸性化が起こり、bioactivity が低下する¹²⁾。Dahl ら¹³⁾は、GnRHa analog を hypogonadal women に投与すると FSH の immunoreactivity の減少に比べ、bioactivity の著明な減少が起こることを報告した。これは、bioactivity の低い酸性化した FSH が産生され、また、この FSH の一部は In vitro における granulosa cell の estradiol 産生を抑制することによって起こるものである。Meldrum ら¹⁴⁾が、endometriosis および PCO の患者に GnRHa を投与し、投与前と投与 28 日後に採血して検討したところ、LH の immunoreactivity は GnRHa 投与前よりも増加していたが、bioactivity は有意に減少していた。これは、GnRHa により LH の α -subunit が著しく増加するが、 β -subunit は測定感度以下まで減少するためである。

一方、GnRHa の投与直後には bioactivity の高い塩基性分画が分泌される。我々の成績でも、黄体期中期からの GnRHa 投与では、投与初期の LH の上昇に同期して progesterone の増加が起こり、GnRHa 非投与周期に比べ有意な黄体期の延長がおこったことは、この事実を裏づけるものと思われる。GnRHa の下垂体 gonadotroph に対する作用は、GnRHa receptor の desensitization による immunoreactive な LH, FSH の分泌抑制の作用以外に post receptor にも作用し、LH, FSH の糖鎖構造を変化させたり、subunit の産生に影響を与えることが明らかになってきた。

L 2 においては、19 例のうち 4 例には E_2 の低下がみられず、逆に有意な増加が認められた。しかし、

E_2 の低下がみられた 15 例には low responder が 1 例もなかった。L 1 の 10 例は、hMG 投与開始時に E_2 が 50 pg/ml 以上であったのは皆無であったが、卵胞の発育が 2 個以下の low responder が 2 例あった。卵胞期初期の E_2 は一般に低値を示し、我々の成績でも GnRHa 投与前の S, L 2 の E_2 は、L 1 と有意差を認めず、50 pg/ml 以下を示した。以上のことから、L 1 における GnRHa の効果を hMG 投与開始時の E_2 が 50 pg/ml 以下であることのみで判定するのは不十分であると考えられた。

3 種類のプロトコールにおける COH の効果を検討すると、発育卵胞数と E_2 に関しては各群間に有意差を認めなかった。long protocol においては、黄体期からの投与では low responder の発生がみられ、卵胞期からの投与では hMG の投与を断念した症例があった。一方、short protocol においては、1 例に premature luteinization が認められた。GnRHa を COH に使用する場合、いずれのプロトコールを採用しても一長一短があり、症例に応じ適切な方法を用いることが今後の課題であると思われる。

文 献

- 1) Jones, H. W., Jones, G. S., Andorews, M. C., Acosta, A. A., Bundren, C. G. J., Sandow, B., Veeck, L., Wiles, C., Witmyer, J., Wartham, J. E., Wright, G.: The program for in vitro fertilization at Norfolk, Fertil. Steril., 38: 14, 1982
- 2) Matson, P. L., Yovich, J. M., Bootsma, B. D., Spittle, J. W., Yovich, J. L.: The in vitro fertilization of super numerary oocytes in a gamete intrafallopian transfer program, Fertil. Steril., 47: 802, 1987
- 3) Lopata, A.: Concepts of human in vitro fertilization and embryo transfer, Fertil. Steril., 40: 289, 1985
- 4) Kerin, J. F., Warnes, G. M.: Monitoring of ovarian response to stimulation in in-vitro fertilization cycles, Clin. Obstet. Gynecol., 29: 158, 1986
- 5) Vagyas, J. M., Morente, C., Shangold, G., Marrs, R. P.: The effect of different methods of ovarian stimulation for human in vitro fertilization and embryo replacement, Fertil. Steril., 42: 745, 1984
- 6) Palermo, R., Rosenwaks, Z., Amodeo, G., Cittadini, E., Navot, D.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple follicles, Fertil. Steril., 49: 290, 1988
- 7) Serafini, P., Batzofin, J., Stone, B., Quinn, P.,

Kerin, J., Marrs, R.: An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responders" pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog, *Fertil. Steril.*, 49: 90, 1988

- 8) Fleming, R., Coutts, J. R. T.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women endogenous gonadotropin suppression, *Fertil. Steril.*, 45: 226, 1986
- 9) Frydman, R., Forman, R., Allart, J. B., Hazout, A., Parnix, I., Testart, J.: Comparison between flare up and down regulation effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists in an in vitro fertilization program, *Fertil. Steril.*, 50: 471, 1988
- 10) Droesch, K., Simonetti, S., Muasher, S. J., Liu, H. C., Brzyski, R. G., Rosenwaks, Z., Jones, G. S.: Value of suppression with gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 51: 292, 1989
- 11) 正岡 薫, 北沢正文, 渡部秀哉, 熊坂高弘: GnRH Agonist の持続皮下注法: 子宮内膜症に対する有効投与量ならびに hMG 併用時の卵巣の反応性について, *日産婦誌*, 41: 729, 1989
- 12) 福岡秀興, 神保利春: 性腺刺激ホルモン (LH, FSH), *日本臨床*, 47: 72, 1989
- 13) Dahl, K. D., Bicsak, T. A., Haueh, A. J. W.: Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog, *Science*, 239: 72, 1988
- 14) Meldrum, D. R., Tsao, Z., Monroe, S. E., Braunstein, G. D., Sladek, J., Chang, R. J., Vale, W., Rivier, J., Judd, H. L., Lu, J. K. H.: Stimulation of LH fragment with reduced bioactivity following GnRH agonist administration in women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58: 755, 1984

The effect of GnRH agonist on various types of controlled ovarian hyperstimulation

Hiroyuki Takeuchi, Satoshi Ito,
Masaru Fukuda and Michio Takada

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

A comparative study was performed on three types of controlled ovarian hyperstimulation using gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa), and following results were obtained.

1. In the long protocol, a decrease in E_2 preceding a decrease in FSH was seen when GnRHa was administered from either the secretory phase or the proliferative phase. This suggested that GnRHa acted by some mechanism other than desensitization of pituitary gonadotroph.

2. The hMG administration after E_2 values of 50pg/ml or less in the long protocol was appropriate for the protocol where GnRHa administration was from the proliferative phase. However this criterion was not appropriate for the protocol administered GnRHa from the secretory phase.

3. On the final day of administration of hMG in all three protocols, no significant differences were seen in the number of developing follicles and E_2 values among the groups.

(受付: 1989 年 12 月 7 日)

経膣超音波断層法による卵胞計測と 卵子成熟度および受精・分割率の検討

Correlation of Transvaginal Ultrasound Measurement of Follicular Size with Oocyte Maturity and Fertilization and Cleavage Rates.

旭川医科大学産婦人科学教室

千石 一雄 玉手 健一 菊川 美一
Kazuo SENGOKU Kenichi TAMATE Yoshiichi KIKUKAWA
石川 睦男 清水 哲也
Mutsuo ISHIKAWA Tetsuya SHIMIZU

Department of Obstetrics and Gynecology,
Asahikawa Medical College, Asahikawa 078, Japan

体外受精・胚移植施行症例を対象として経膣超音波ガイド下採卵時の超音波卵胞計測値と卵子成熟度および受精・分割率との相関を検討し、以下の結果を得た。

(1)成熟卵, 中間卵, 未成熟卵採取卵胞の平均卵胞径は各々17.4 mm, 15.3 mm, 12.0 mmを示し卵胞径と卵子成熟度との間に相関を認めた。

(2)卵胞径 16 mm以上の卵胞から採取した卵の 60.4 %が成熟卵であるのに対し, 10 mm以下の卵胞からは 54.2 %に未成熟卵が採取された。

(3) 16 mm以上, 11~15 mm, 10 mm以下の卵胞卵の受精・分割率は各々81.0 %, 92.6 %, 70.0 %, 82.1 %, 41.7 %, 60.0 %を示し, 卵胞の大きさと受精・分割率は正の相関を示した。

以上より経膣超音波断層法による採卵時の卵胞計測は成熟卵胞評価法として優れた指標であり, さらに卵胞径 11 mm以上の卵胞から採取した卵の発育能が高いことを明らかにしたものと考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 501-505, 1990)

緒 言

ヒト体外受精・胚移植 (IVF-ET) の成功率向上には多数の成熟卵の採取が重要な point の一つであり, そのため各種の排卵刺激法が用いられている。このような排卵誘発症例では, 卵胞間の gonadotropin への感受性の相異により卵胞間非同調 (interfollicular asynchrony) が生じ, 様々な大きさの卵胞が混在するため, その内でどの卵胞から成熟度の高い卵子が採取可能かという卵胞の評価法が重要な問題となる。卵胞成熟の評価法として卵胞の大きさの測定は簡便性, 即時性の面からも良い指標であり, これまで間

接的指標である卵胞液量または腹腔鏡直視下の卵胞計測値と卵子成熟度との相関に関し検討がなされ, 卵胞の大きさと卵子成熟度との間に正の相関が報告されている^{1,2)}。一方, 直接的測定法といえる超音波卵胞計測値と卵子成熟度に関しても種々報告が認められるが大部分は経腹走査法による測定値の検討であり, しかも hCG 投与時つまり採卵 34~36 時間前の卵胞径との比較であり, 採卵直前の卵胞計測値と比較検討した報告は少ない³⁾。そこで近年, 臨床に普及し, より正確な卵胞の観察が可能であり, しかも採卵法の主流を占めるに至った経膣プローブを用いた経膣採卵直前の超音波卵胞計測値と卵子-放射冠-

卵丘細胞 (OCCCs) の形態による卵子成熟度との相関ならびに受精・分割率に関し検討を加えた。

対象および方法

1988 年 9 月より 1989 年 4 月までに当教室で IVF を施行した症例のうち男性因子を有する患者を除外した 35 症例 51 周期を対象とした。卵巣刺激法としては hMG-hCG 法を用い月経周期 3 日目より原則として hMG (pergonal 帝国臓器) 150 単位を連日投与し、Day8 より連日尿中エストロゲンおよび血中 estradiol (E_2), LH 測定ならびに経腔超音波断層法による卵胞数・卵胞径の測定により卵胞発育モニタリングを行なった。血中 E_2 値 300 pg/ml/卵胞、卵胞径 16 mm 以上の卵胞が 2 個以上認められ、LH surge が開始していないことを基準とし hCG 5,000~10,000 単位投与、hCG 投与 34~36 時間後に卵胞径を計測後、経腔採卵を施行した。卵胞径は 2 方向計測値の平均値とし、採卵は個々の卵胞を吸引し 1 卵胞より 2 個以上採卵された卵胞は対象より除外した。採取した卵は直ちに実体顕微鏡下で成熟度を判定し卵胞径と比較検討した。卵成熟度判定は Veeck⁴⁾らの分類を基本とし、卵丘細胞がほとんど認められない卵を未成熟卵、中等度以上の卵丘細胞塊が存在し放射冠が十分に拡散し各卵丘細胞間の結合が疎なものを成熟卵、その中間を中間卵に分類した。成熟度判定後卵は成熟度と無関係に一律 4~5 時間前培養後媒精した。精液は液化後 2 回遠沈 (1,500 回転, 5 分間) その後 swim up し運動良好精子 $5 \sim 10 \times 10^4$ /ml に調整し媒精に用いた。媒精後 16~18 時間後に機械的に卵丘細胞を除去し 2 個の極体、雌雄前核の有無により受精を確認、その後 growth medium 中にて 24 時間培養し受精および分割率と卵胞径との相関を検討した。培養液は Ham's F10 を基本とし前培養には 10%, growth medium には 15% の患者非働化血清を添加して用い、培養条件は 5% O_2 , 5% CO_2 , 90% N_2 , 37°C である。使用した超音波装置は横河 RT-3600, 経腔プローブ (transducer 5MHz) で、統計処理は student's t test および χ^2 検定により危険率 5% 以下を有意とした。

成 績

51 周期で成熟卵 101 個 (49.3%), 中間卵 80 個 (39.0%), 未成熟卵 24 個 (11.7%), 総計 205 個の卵が採取され、1 周期当りの平均採取卵数は 4.0 個であった。超音波卵胞計測値と卵成熟度との関係は表 1 に示すように成熟卵採取卵胞径は 9~31 mm に分布し平均卵胞径は 17.4 ± 3.9 mm, 中間卵採取卵胞は

表 1 卵子成熟度と超音波卵胞計測値

卵子成熟度	卵子数	卵胞径 (mm)	
		M $\pm$ SD	Range
成 熟	89	17.4 ± 3.9^a	9—31
中 間	87	15.3 ± 2.6^b	8—21
未 成 熟	29	12.0 ± 2.7^c	6—18

a vs b and c $p < 0.001$

b vs c $p < 0.01$

8~21 mm に分布を認め平均 15.3 ± 2.6 mm, 未成熟卵採取卵胞は 6~18 mm に分布し平均 12.0 ± 2.7 mm で、卵の成熟度が進むにつれ卵胞径は有意に増大した。つぎに卵胞径を 16 mm 以上, 11~15 mm, 10 mm 以下の 3 群に分類し卵胞径別の卵成熟度分布を検討した成績を図 1 に示す。16 mm 以上の卵胞より採取した卵の

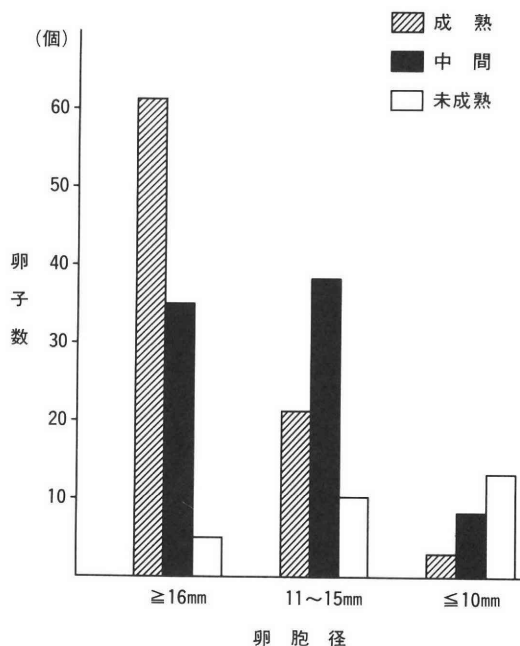


図 1 超音波卵胞計測値と卵子成熟度との相関

60.4% (16/101) が成熟卵で、未成熟卵が 5.0% (5/101) であった。これに対し 11~15 mm の卵胞では各々 31.3% (25/80), 13.7% (11/80), 10 mm 以下の卵胞では各々 12.5% (3/24), 54.2% (13/24) であった。この成績から 16 mm 以上の卵胞からは有意に高頻度で成熟卵の採取が可能で、逆に 10 mm 以下の小卵胞から採取された卵の大部分が未成熟であることが示された。卵胞径別に採取された卵の受精・分割率の結果を表 2 に示す。16 mm 以上の卵胞卵の受精率は

表2 卵胞径と卵子成熟度・受精率・分割率

卵胞径 (mm)	卵 子 成 熟 度			受精卵数(%)	分 割 卵 数	
	成熟卵数(%)	中間卵数(%)	未成熟卵数(%)		2細胞(%)	3～8細胞(%)
≥16	61(60.4) ^a	35(34.6)	5(5.0) ^c	81(80.2) ^f	29(35.8)	46(56.8) ⁱ
11～15	25(31.3) ^b	44(55.0)	11(13.7) ^d	56(70.0) ^g	25(44.6)	21(37.5) ^j
≤10	3(12.5) ^b	8(33.3)	13(54.2) ^e	10(41.7) ^h	6(60.0)	0(0) ^k
総 計	89(43.4)	87(42.4)	29(14.2)	147(71.7)	60(40.8)	67(45.6)

※ a vs b ($p < 0.001$), c vs d ($p < 0.05$), c and vs e ($p < 0.001$), f vs h ($p < 0.01$),
g vs h ($p < 0.05$), i vs j ($p < 0.05$), i vs k ($p < 0.01$), j vs k ($p < 0.05$)

80.2% (81/101)で11～15 mmの卵胞卵の70.0% (56/80)と有意差は認めないが、10 mm以下の卵胞卵41.7% (10/24)に比し有意に高い受精率を示した。また分割率は16 mm以上の卵胞卵92.6% (75/81), 11～15 mmの卵胞卵82.1% (45/56), 10 mm以下の卵胞卵60% (6/10)で、さらに3細胞期以上に分割した卵の頻度は各々56.8%, 37.5%, 0%と卵胞の大きさと相関して分割率は向上し、特にviabilityが高いと考えられる分割速度の速い卵の採取率は卵胞径と有意な正の相関を示す結果であった。

考 察

IVF-ETの最初の関門はいかにして多数の成熟卵子を採取するかであり、そのためには成熟卵胞の正確な評価が重要である。成熟卵胞評価法として現在内分泌学的な検索と卵胞の大きさの測定が主に用いられている。しかし、血中 E_2 値は发育卵胞数の影響を受けるためにhMG-hCG法のように多数の卵胞が発育する場合は E_2 値から卵胞成熟の評価は困難であり、卵胞径の計測が実用的であるといえる。卵胞の大きさと卵子成熟度・受精・分割率との関係は卵胞液量、腹腔鏡直視下の卵胞径ならびに超音波卵胞計測値を卵胞の大きさの指標として用い種々検討されている。Quigley⁵⁾らはClomiphene citrate周期で卵胞径20 mm以上の卵胞はそれ未満の卵胞より卵採取率、受精・分割率が高いと報告し、Woodら²⁾も腹腔鏡下で直径1.5 cm以上の卵胞の卵採取率、受精率が高値であると述べている。またSimonetti¹⁾らはhMG-hCG刺激周期の卵胞液量との検討で、成熟卵採取卵胞液量の平均は2.7 mlと未成熟卵採取卵胞液量1.0 mlより有意に大きく、さらに卵胞液量2.0 ml以上の卵胞からの成熟卵採取率は50%以上であり、しかも採取された卵からの正常妊娠率が高いことを報告している。しかしながら卵胞液量は吸引時の卵胞液漏出により実際の卵胞より小さく測定される可能性が強く、また腹腔鏡による計測は卵巣表面に突出した卵胞の一

部のみを測定している可能性があり、いずれにしても卵胞の大きさの測定法としての精度に問題がある。その点、超音波による卵胞計測はより直接的であるが、従来の多くの報告は経腹走査によるものであり、しかもhCG投与時つまり実際の採卵の34～36時間前の計測値から検討しているにすぎず、測定値の信頼性は乏しいものと考えられる。一方、近年開発された経腔超音波断層法は卵巣が腔円蓋部に近接しているなどの解剖学的利点からも高周波数の探触子の使用が可能で、したがって高解像度の明瞭な卵胞画像が得られ、経腹走査に比し正確な卵胞計測が可能である⁶⁻⁷⁾。そこで本研究では経腔超音波による採卵直前の卵胞径と卵子成熟度、受精率、胚発育率との相関を検討した。今回の検討では成熟卵採取卵胞の卵胞径は中間卵、未成熟卵採取卵胞に比し有意に大きく、また卵胞径16 mm以上の卵胞から採取された卵の60.4%が成熟卵で、しかも成熟卵の97%近くが卵胞径11 mm以上の卵胞より採取されており、卵胞径と卵子成熟度との間に明らかな相関が認められた。各卵胞の卵採取率に関しては検討していないが、10 mm以下の卵胞よりの採取卵数は24個であるのに対し11 mm以上の卵胞からは181個の卵が採取可能であったことを考慮すれば、10 mm以下の小卵胞の卵採取率は低値であるものと推定される。Scottら⁸⁾も同様に経腔超音波ガイド下採卵時の最大卵胞径と卵子核成熟度との検討から、12 mm以上の卵胞からの卵採取率は11 mm以下の卵胞と比較し高率で、特に18～20 mmの卵胞からの卵採取率が最も高値を示したと報告している。さらに卵胞径14 mm以上の卵胞から採取された卵の50%以上がMetaphase IまたはIIであったのに対し、11 mm以下の卵胞卵のわずか9%にのみMetaphase IまたはIIを認めたと述べており、本研究と卵胞径測定法、卵成熟度判定法など方法論に相違が認められるが近似した結果であった。一方、受精・分割率に関しては16 mm以上の卵胞卵の受精率は81.0%で中間卵と有意差は認めないが、10 mm以下の

小卵胞卵と比較し有意に高値を示した。また分割率も卵胞の大きさに相関して高値を示し、特に3細胞期以上の発育率の検討では、16 mm以上の卵胞卵の56.5%が3細胞期以上の分割を認め中間卵に比し有意に高値で、さらに10 mm以下の卵胞卵では3細胞期以上の発育は認められず、卵胞の大きさと受精後の卵の発育能に高い相関が認められた。この結果はQuigley ら⁵⁾の20 mm以上の大卵胞卵の正常分割率が72%を示し、それ以下の卵胞卵が14%であったとする報告や、Edwards ら³⁾の17.5 mm以上の卵胞卵の受精率は46%で、17.5 mm以下の20%に比し有意に高値を示したとする報告と一致している。本研究では卵成熟度の判定はOCCCSの形態を指標としたが、Laufer ら⁹⁾は特にhMG-hCG周期ではOCCCSから成熟卵と判定した卵の39%にのみ第一極体を認め、14%の卵はgerminal vesicleを保有しておりOCCCSの形態と実際の卵成熟度との間に相違(intrafollicular asynchrony)が存在すると報告しており、必ずしもOCCCSの形態と卵子成熟度とは一致しない可能性が示唆されている。しかしながらVeeck ら⁴⁾はOCCCSの形態により卵成熟度を分類し成熟群の受精率は76.4%で、そのうち100%が分割し、未成熟群の受精率は59.5%、分割率は79.5%とOCCCSの形態と卵発育能に高い相関を認めている。さらに今回の検討でも成熟卵が高率に採取された卵胞卵の受精率、胚発育率が有意に高率であったことを考慮すれば、OCCCSによる卵子成熟度判定は現在のところ容認できるものであり、著者らの判定基準も妥当なものと推定される。

以上、本研究の検討から経腔超音波断層法を用いた採卵直前の卵胞計測は成熟卵胞評価法として簡便性・即時性の面からも優れた指標となることを明らかにした。さらに16 mm以上の卵胞からは高率に成熟した高い発育能を有する卵が採取可能であり、逆に10 mm以下の小卵胞卵のqualityは低く、採卵の安全性、採卵時間の短縮という点からも、少なくとも11 mm以上の卵胞からの採卵が望ましいことを明らかにしたものと考えられる。

文 献

- 1) Simonetti, S., Veeck, L. L. and Jones, H. W.: Correlation of follicular fluid volume with oocyte morphology from follicles stimulated by human menopausal gonadotropin, *Fertil. Steril.*, 44: 177, 1985
- 2) Wood, C., Leeton, J., Talbot, J. M. and Trounson, A. O.: Technique for collecting mature human oocyte for in vitro fertilization, *Br. J.*

- Obstet. Gynecol.*, 88: 756, 1981
- 3) Edwards, R. G.: Conception in the human female, Academic Press, 343, 1980
- 4) Veeck, L. L., Wortham, J. W. E. Jr., Witmyer, J., Sandow, B. A., Acosta, A. A., Garcia, J. E., Jones, G. S. and Jones, H. W. Jr.: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 39: 594, 1983
- 5) Quigley, M. M., Wolf, D. P., Maklad, N. F., Dandekar, P. V. and Sokoloski, J. E.: Follicular size and number in human in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 38: 678, 1982
- 6) 清水哲也, 千石一雄, 石川睦男, 高田久士: 卵胞発育モニタリング, 産婦実録, 38: 171, 1989
- 7) Musoles, F., Pardo, G., Perez-Gil, M., Serra, V. and Pellicer, A.: Abdominal ultrasonography versus transvaginal scanning: Accuracy in follicular development evaluation and prediction for oocyte retrieval in stimulated cycles, *J. Clin. Ultrasound*, 17: 469, 1989
- 8) Scott, R. T., Hofmann, G. E., Muasher, S. J., Acosta, A. A., Kreiner, D. K. and Rosenwaks, Z.: Correlation of follicular diameter with oocyte recovery and maturity at the time of transvaginal follicular aspiration, *J. in vitro Fertil.*, 6: 73, 1989
- 9) Laufer, N., Tarlatzis, B. C., DeCherney, A. H., Masters, J. T., Haseltine, F. P., MacLusky, N. and Naftolin, F.: Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 42: 366, 1984

Correlation of transvaginal ultrasound measurement of follicular size with oocyte maturity and fertilization and cleavage rates.

Kazuo Sengoku, Kenichi Tamate,
Yoshiichi Kikukawa, Mutsuo Ishikawa
and Tetsuya Shimizu.
Department of Obstetrics
and Gynecology, Asahikawa Medical College,
Asahikawa 078, Japan

The correlation between follicular size as measured by transvaginal ultrasound at the time of oocyte retrieval and oocyte maturity, fertilization and cleavage rates were studied in 35 patients undergoing in vitro fertilization.

The results were as follows.

- 1) A total of 205 oocytes in 51 cycles was examined. The average follicular diameter was 17.4 mm in the 89 follicles with mature oocytes, 15.3 mm in the 87 follicles with intermediate oocytes and 12.0 mm in the 29 follicles with immature oocytes.
- 2) Large follicles ≥ 16 mm had a significantly higher proportions of mature oocytes (60.4%) than the smaller follicles ≤ 10 mm (12.5%).
- 3) There was no difference between the fertilization rates of oocytes obtained from follicles $\geq$

16 mm or 10-15 mm, whereas, oocytes that were obtained from small follicles ≤ 10 mm showed a significantly lower rate of fertilization. Furthermore, follicles ≥ 16 mm had a significantly higher percentage of oocytes cleave to the 3 to 8 cell stage relative to the two smaller groups.

These results suggested that assessment of follicular size by transvaginal ultrasound seemed to be more accurate parameter for follicular maturation and oocyte maturity, and that oocytes from large follicles ≥ 16 mm might be of better quality.

(受付: 1989 年 12 月 18 日)

MEASUREMENT OF URINARY ESTROGEN CONCENTRATION WITH LATEX AGGLUTINATION INHIBITION METHOD IN PATIENTS TREATED WITH GONADOTROPINS

Katsuyoshi SEKI and Ichiro NAGATA

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

Abstract: Urinary total estrogen was measured using a latex agglutination inhibition method in patients treated with gonadotropins. The method was simple, precise and specific, and yielded results very rapidly. Urinary total estrogen concentrations determined by this method correlated well with those determined by a hemagglutination inhibition method. In all patients who ovulated with gonadotropin therapy, urinary total estrogen concentrations increased to 100 ng/ml or more. However, they did not exceed 100 ng/ml in patients who failed to ovulate.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 506—509, 1990)

Introduction

Recently, a rapid, simple hemagglutination inhibition method (Hi-Estrotec) for determining urinary total estrogens has been developed. Urinary total estrogen concentrations measured by this method correlated well with serum estradiol (E_2) levels determined by radioimmunoassay in patients treated with human menopausal gonadotropin (hMG)¹⁾. It was also demonstrated that the kit Hi-Estrotec was sensitive enough to monitor follicular maturation in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer²⁾. Although the kit Hi-Estrotec yields relatively rapid results, it requires approximately 2.5 hours for testing, including the time for reaction and operational procedures. More recently, an extremely rapid method (Hi-Monitor E) for determining urinary total estrogens has been developed by Teikoku Hormone Mfg. Co. Ltd., Japan. The time required for reaction is only 2

min. In the present study, we evaluated the clinical value of this method by comparing urinary total estrogen concentrations determined by the kit Hi-Monitor E with those determined by the kit Hi-Estrotec in patients treated with hMG.

Materials and Methods

The subjects in this study were 23 infertile women with ovulatory disorders. Out of 23 patients, 1 suffered from primary amenorrhea, 9 secondary amenorrhea, 6 oligomenorrhea, 5 anovulatory cycle, and 2 luteal phase defect. All amenorrheic women failed to show uterine bleeding after progesterone administration. The infertile patients received hMG-clomiphene-human chorionic gonadotropin (hCG) or hMG-hCG therapy.

The patients were asked to bring the first morning urine specimens, which were obtained at approximately 0700 h before breakfast in the morning of clinic visit.

Urinary total estrogen was measured by the kit Hi-Monitor E. The kit contains all the necessary materials: vials of latex particles sensitized with monoclonal antibody against estriol (E_3)-16-glucuronide, latex particles binding with E_3 -16-glucuronide, and urine diluent. First, serial dilutions of the urine sample were made in the urine diluent. The diluted urine sample (100 μ l), latex

particles sensitized with monoclonal antibody against E_3 -16-glucuronide (35 μ l) and latex particles coated with E_3 -16-glucuronide (35 μ l) were delivered on the reaction slide, mixed and left for 2 min at room temperature.

The principle of the assay is a latex agglutination inhibition reaction. If there is sufficient estrogen in the urine sample being tested, the latex particles are not agglutinated. Consequently, a positive reaction is seen as nonoccurrence of agglutination on the reaction slide. Being the sensitivity of the assay 2 ng/ml, the estrogen concentration in the urine sample was calculated by the following equation. Estrogen concentration in the urine tested = $N \times 2$ ng/ml (N = the maximal dilution of the urine sample which showed a positive reaction). The kit was reactive to estrone (E_1), E_2 , E_3 , 16- and 17-conjugates of estrogens, but not to 3-conjugates of them nor to any other steroid hormone (Table 1). Therefore, the kit measures total estrogens in urine. Neither human serum albumin nor glucose affected the assay, and the recovery was 100% when known amounts of E_2 -17 β -glucuronide were added to the urine sam-

Table 1. Cross-reactivity of various steroids to Hi-Monitor E

Steroids	Per cent Cross-reaction
E_1	100
E_2 -17 β	100
E_3	100
E_2 -17-glucuronide	100
E_2 -17-sulfate	100
E_3 -16-glucuronide	100
E_3 -17-glucuronide	100
E_1 -3-glucuronide	<0.002
E_2 -3-glucuronide	<0.002
E_3 -3-glucuronide	<0.002
Progesterone	<0.002
Pregnanediol-3-glucuronide	<0.002
Testosterone-17-glucuronide	<0.002
Dehydroepiandrosterone sulfate	<0.002
Cortisol	<0.002

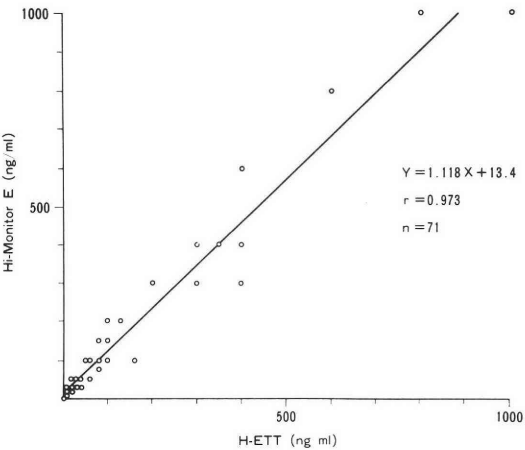


Fig. 1 Correlation between urinary total estrogen concentrations determined by latex agglutination inhibition method (Hi-Monitor E) and those determined by hemagglutination inhibition method (Hi-Estrotec, H-ETT).

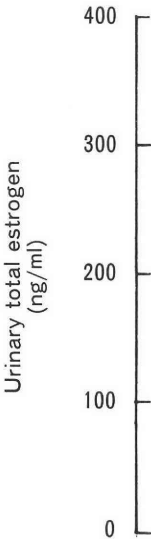


Fig. 2 Preovulatory levels of urinary total estrogen (●) determined by latex agglutination inhibition method in 13 patients who ovulated with gonadotropins therapy, and the highest levels of urinary total estrogen (○) during gonadotropins therapy in 2 patients who failed to ovulate.

ple.

Urinary total estrogen was also determined by the kit Hi-Estrotec as previously described¹⁾. Statistical analysis were performed using linear regression and Fisher's exact test.

Results

Urinary total estrogen concentrations determined by Hi-Monitor E significantly correlated with those determined by Hi-Estrotec ($p=0.01$, 2/2 vs 0/13, Fisher's exact test) (Fig. 1). In 15 patients treated with hMG-clomiphene-hCG or hMG-hCG therapy, urinary total estrogen concentration was measured during therapy. Out of the 15 patients, 13 patients ovulated and 2 patients failed to do so. Hyperstimulation occurred in none of them. In all 13 patients who ovulated, urinary total estrogen concentrations determined by Hi-Monitor E increased to 100 ng/ml or more before ovulation (Fig. 2). However, urinary total estrogen concentrations did not exceed 100 ng/ml during therapy in the 2 patients who failed to ovulate (Fig. 2).

Discussion

The latex agglutination inhibition method used in the present study was accurate and specific to urinary estrogens. The advantage of this method is its rapidity and simplicity. It requires only 2 min for reaction, whereas the hemagglutination inhibition method (Hi-Estrotec) requires 2 hours. Although it is a little less sensitive than the hemagglutination inhibition method, it was sensitive enough to measure urinary estrogen in patients treated with gonadotropins. Circulating E_2 levels are considered to reflect follicular maturation accurately³⁾. Tredway et al.⁴⁾ reported that a good correlation existed between the levels and patterns of urinary total estrogen and serum E_2 in patients treated with human gonadotropins. We have previously shown that urinary total estrogen levels in random urine samples measured by the hemagglutination inhibition method closely parallel serum E_2 levels determined by radioimmunoassay at specific times.¹⁾ In the present study, urinary total estrogen concentrations measured by the latex agglutination inhibition

method correlated well with those determined by the hemagglutination inhibition method. Accordingly, urinary total estrogen measured by the latex agglutination inhibition method may be used in appraising ovarian response to gonadotropic stimulation.

In all patients who ovulated with gonadotropins therapy, urinary estrogens concentrations increased to 100 ng/ml or more before ovulation. And therefore, hCG may be administered when urinary estrogen levels become 100 ng/ml or more. However, it may be premature to define the exact levels of urinary estrogen suitable for successful induction of ovulation, since the number of subjects evaluated was relatively small.

The hemagglutination inhibition method was reported to be sensitive enough to monitor follicular maturation in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer.²⁾ The latex agglutination inhibition method may also be useful for in vitro fertilization and embryo transfer, since estrogen levels determined by this method correlated with those determined by the hemagglutination inhibition method.

In conclusion, it was demonstrated that evaluation of follicular maturation could be made almost instantaneously by measuring urinary total estrogen concentrations by the latex agglutination inhibition method. Further investigation should be undertaken to establish the levels and patterns of urinary total estrogen concentrations suitable for successful induction of ovulation.

References

- 1) Seki, K., Seki, M. and Kato, K.: Correlation between urinary oestrogen levels determined by haemagglutination inhibition reaction and serum oestradiol levels determined by radioimmunoassay, *Acta Endocrinol.*, 110: 130, 1985
- 2) Hoshiai, H., Uehara, S., Tsukui, A., Hirose, Y., Momma, T. and Suzuki, M.: Measurement of urinary estrogen with the urinary estrogen micrometry method in in vitro fertilization and embryo transfer therapy, *Fertil. Steril.*, 42: 204, 1984
- 3) Garcia, J. E., Jones, G. S., Acosta, A. A. and Wright, G. L.: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin for follicular maturation for oocytes aspira-

tion: phase II, 1981, Fertil. Steril., 39: 174, 1983

- 4) Tredway, D. R., Goebelsman, U., Thorneycroft, I. H. and Mishell, D. R.: Monitoring induction of ovulation with human menopausal gonadotropin by a rapid estrogen radioimmunoassay, Am. J. Obstet. Gynecol., 120: 1035, 1974

gonadotropin 療法施行患者における

尿中 estrogen のラテックス

凝集阻止法による測定

防衛医科大学校産科婦人科

関 克義 永田一郎

gonadotropin 療法を行った患者において、尿中 total estrogen をラテックス凝集阻止法によって測定した。本法は簡便、正確で、尿中 total estrogen を特異的に短時間で測定することができた。本法で測定した尿中 total estrogen 濃度は赤血球凝集阻止法で測定した値とよく相関した。gonadotropin 療法で排卵したすべての患者において尿中 total estrogen は 100 ng/ml あるいはそれ以上に増加した。排卵失敗例で尿中 total estrogen は 100 ng/ml を越えなかった。

(受付: 1989 年 10 月 26 日)

AID の妊娠成功例と不成功例の解析による LH カラーの有用性と限界

Usefulness and Limitation of LH-Color Based on the Analysis of the Pregnancy Rate Following AID

假野クリニック

假 野 隆 司
Takashi KANO

Kano Clinic, Osaka 542, Japan

卵管が正常で排卵時期が一定しない 20 例 39 周期の AID 症例にオルガノン LH カラー（一日二回、三日間）による排卵予知を行ない、治療成績を他の排卵予知法で AID を行なった治療成績と比較することで LH カラーの有用性と限界を検討した。この結果、39 周期中 26 周期（66.7%）で排卵が予知できた。また、LH カラーを用いた症例の妊娠成立までの AID 治療周期はその他の方法で排卵を予知した症例の三分の一近くに短縮された。妊娠不成功例 30 周期を retrospective に検討すると、AID 実施時期が不適切だった症例はわずか 4 例（13.3%）に過ぎなかったのに対し、卵胞機能不全症、黄体機能不全症は 70%以上に達した。以上の事実から LH カラーは排卵予知には極めて有用であるが、自然の LH サージで排卵する卵が必ずしも成熟卵とは言えないので、AID（AIH）の治療成績向上のためには排卵日の正確な予知だけでなく、排卵に至る卵の成熟度のモニタリングと卵胞賦活、さらに黄体賦活療法が必要不可欠であることが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 510—515, 1990)

緒 言

AIH や AID の治療成績向上に排卵日の正確な予知が必要不可欠であることはいうまでもない^{1,2)}。従来から排卵予知の手段として、基礎体温、頸管粘液、膣スメアー、尿中エストロゲンの半定量、超音波断層法による卵胞径の測定、HCG の交叉反応を利用したハイゴナビスによる LH の半定量測定等が行なわれてきたが、いずれもすべての症例で正確な検査とは言えなかった。

この点、ゾル粒子免疫測定法（SPIA: Sol Particle Immunoassay）による尿中 LH 測定法（LH カラー、日本オルガノン）は LH を特異的に測定して LH サージ³⁾を捉えることで排卵を予知する試薬で不妊診療に極めて有用性が高いと報告^{2,4,8)}されている。しかし、

卵胞成熟が不安定で排卵日が大きくバラつく症例では保健診療上の制約で十分にその価値を発揮できないことが危惧される。

そこで卵管に異常が認められない排卵が不定な AID 症例に保健診療の範囲内で排卵予知を試み、さらに妊娠例と妊娠不成功例を retrospective に内分泌学的ならびに超音波学的に解析して同検査の有用性と限界を検討したので報告する。

対象と方法

数回の精液検査で無精子症、睾丸の生検で精子形成不全と診断され、夫婦の完全な合意に基づいて AID を施行中の症例のなかで、子宮卵管造影、通気検査に異常なく、当該周期の最終通水圧が 60 mmHg 以下で、過去一年の最短排卵と最長排卵（BBT 0Day で

算定)の差が5日以上、25歳から40歳(平均34.5歳)の20例39周期を対象とした。これらの症例は過去1年間に少なくとも一周期以上卵胞機能の異常が認められたため全例、漢方薬⁹⁾、Clomiphene、ないしHMGによる卵胞機能賦活療法(漢方薬のみ18例、Clomiphene 1例、HMG 19例、Clomiphene-HMG 1例)を行なっている。

対象患者の過去1年間の基礎体温の最も早い低温最終日の1日前から、早朝尿、深夜尿で3日間連続してLHカラー検査を施行し、判定は以下の基準⁵⁾で行なった。

陰性(−)：濃い赤紫色(色調の変化がない)
陽性(+)：薄い赤紫色(色調が脱色化するもの)
強陽性(++)：青灰色(短時間に色調が変化し始め、透明に近くなるまで変化するもの)

AIDは(+)あるいは(++)が初めて認められた当日あるいは翌日とその翌々日の午前中に2回施行した。3日間連続して(−)の場合はLHカラーが終了した翌日、すなわち最初の日から起算して4日目に1回目のAIDを施行した。

AID施行日にアロカ社製UST-946P-5経膈プローベによる超音波断層法(本体SSD-650)による首席卵胞の最大長径の計測と5mm以上の卵胞の個数を算定、1回目のAID時にestradiolを、BBT+5~8DayにProgesterone¹⁰⁾をRIAで測定した。

結果はM±SDで示し、平均値の有意検定はStudent's t-testで、百分率の有意検定は χ^2 -testで行なった。

結 果

20例の排卵日の差は最短5日、最長14日、平均7.9日であった。

過去2年間で排卵日に5日以上差があり、かつ卵管障害がなく、LHカラー以外の方法(主として基礎体温、経腹的超音波断層法による首席卵胞の最大直径の計測、頸管粘液の測定)で排卵を予知してAIDを隔日二回施行、妊娠が成立、生児分娩を確認した20例のAID施行周期は最低1周期、最高20周期、平均9.7周期であった。

これに対して、LHカラーで排卵予知を試みて妊娠が成立、生児分娩を確認したのは7例(LHカラー陽性；6例)であり、AID施行周期は最低1周期、最高7周期、平均3.7周期で明らかにLHカラー施行例の方が妊娠成立までのAID施行周期が少なかった(Table. 1)。

Table 1. AID cycles to pregnancy classified LH color enforced or not.

	症例数	平均 AID 施行周期
LH カラー非施行例	20	9.7
LH カラー施行例	7	3.7
LH 陽性例	6	3.8

3日間6回のLHカラー検査中に陽性反応が認められたのは39周期中26周期(66.7%)で(Table. 2)、初めて陽性が認められたのは1日目早朝1周期、深夜3周期、2日目早朝2周期、深夜4周期、3日目早朝8周期、深夜8周期と3日目が最も多かった。この26周期はその後全て排卵していることを超音波断層法、progesteroneの測定、基礎体温で確認した。

この26周期中8例(30.8%；流産2例を含む)に妊娠が成立した。陽性反応が認められなかった1例(7.7%)でも妊娠が成立した(Table. 2)。

一回目のAID施行時の首席卵胞最大径はHMG周期1例、Clomiphene-HMG周期1例を除いた24周期では首席卵胞と次席卵胞の差は明らかで、排卵直前と考えられるLHカラーが陽性例では1.4から2.6cmに分布、1.6から1.8cmが最も多かったが、1.5cm以下が5周期に(19.2%)認められた。妊娠例は全て1.6cm(1.6cmの2例は流産)以上であった(Fig. 1)。

一回目のAID時に卵胞が認められた25例中22例で二回目のAID施行時には一回目の首席卵胞が認められなかった。二回目に首席卵胞と考えられる卵胞が認められた3例中2例はHMGをかなり大量に使用しているためOHSSの傾向があり、首席卵胞と判断した卵胞は残留卵胞の可能性もある一方排卵していないとも断言できなかった(Tabl. 3)。いずれに

Table 2. Number of patients and pregnancy classified LH color reaction.

	症 例 数	妊娠数(含流産)
LH 陽性	26/39(66.7%)	8/26(30.8%；対LH陽性) 8/9(88.9%；対LH陽性)
LH 陰性	13/39(33.3%)	1/13(7.7%；対LH陰性) 1/9(11.1%；対妊娠)
無排卵	3/13(23.1%)	—

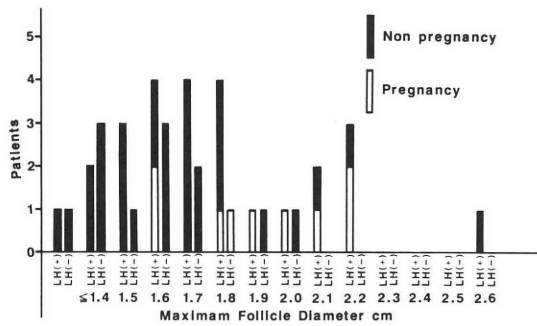


Fig. 1 Maximum follicle diameter at first AID.

Table 3. The cases who had been confirmed existence of chief follicle in LH positive patient.

	AID 一回目	AID 二回目
総 数	25/26 (96.2%)	3/26 (11.5%)
前 日 早 朝	2/26 (7.7%)	0/26 (0.0%)
前 日 深 夜	15/26 (57.7%)	1/26 (3.8%)
当 日 早 朝	9/26 (34.6%)	2/26 (7.7%)
(HMG 使用例)		(2/26 (7.7%))

しても、二回目の AID 時 (LH カラーが陽性に転じてから三日後) には 88.5 % から 96.2 % の症例で排卵が終了していた。

AID 施行一回目の血中 estradiol 値は LH 陽性例では分娩例は妊娠不成功例に対して有意 ($P < 0.001$) に高く、妊娠不成功例では LH 陽性例と LH 陰性例との間に有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

BBT + 5 から + 8 day の progesterone 値は LH 陽性の分娩例では妊娠不成功周期に比較して有意 ($P < 0.001$) に高く、妊娠不成功例では LH 陽性例と LH 陰性例との間に有意な差はなかった (Fig. 2)。

首席最大卵胞径と estradiol 値および progesterone 値を二元的に解析すると分娩例は最大卵胞直径が大きく estradiol 分泌が多い、両因子がともに良好な症例が多かった。流産例には分娩例と妊娠不成功例の中間の傾向が認められた。Estradiol 値と首席最大卵胞径の関係を分析すると、全例、妊娠例ともに有意な相関関係はなかった。Progesterone は妊娠例では高分泌例が多く、首席最大卵胞径との間には全例、分娩例ともに有意な正の相関関係 ($P < 0.05$) が認められた (Fig. 3)。

過去 2 年間の AID を含まない分娩例と流産例の妊娠周期の BBT-3 から 0 day の estradiol 値¹⁰⁾と BBT + 5 + 8 day の progesterone 値を分析すると estradiol が 100pg/ml 以下あるいは progesterone

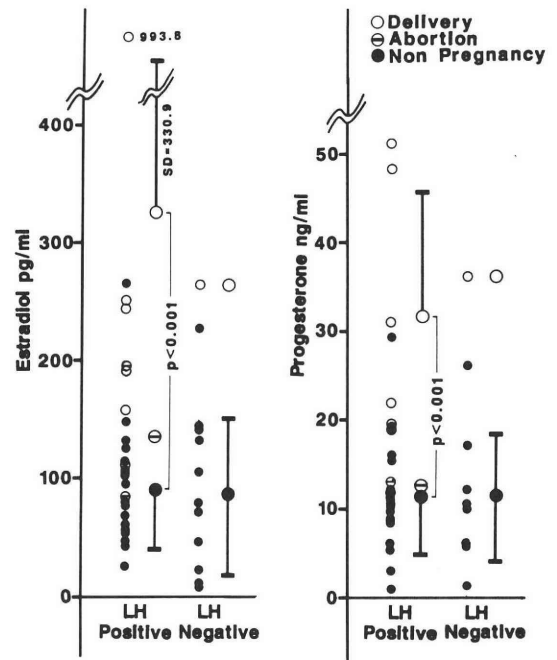


Fig. 2 Serum estradiol levels at first AID and progesterone levels at BBT+5~+8 day.

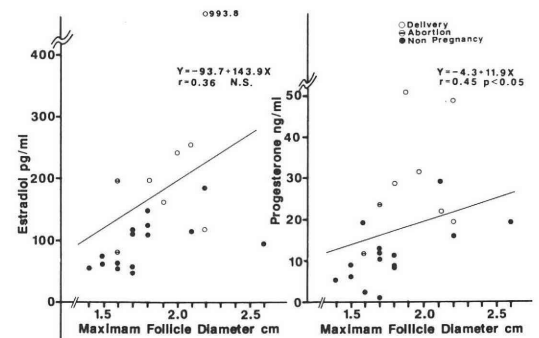


Fig. 3 Correlation between maximum follicle diameter and serum estradiol or progesterone levels on LH positive cases at first AID.

10ng/ml 以下では流産の比率が有意 ($P < 0.01$) になり、2 因子が同時に満たされるとさらに有意性が高まった。また、分娩例、流産例とも estradiol と progesterone との間に有意な正の相関関係 (分娩例; $Y = 0.13 X - 9.7$, $r = 0.46$, $P < 0.01$, 流産例; $Y = 0.20 X - 21.8$, $r = 0.51$, $P < 0.01$ が認められた (Fig. 4)。

LH が陽性を示してから基礎体温が高温相に転じるまでの時間は早朝に陽性を呈してあくる朝に上昇した場合は 24 時間後、深夜陽性を呈して翌朝上昇した

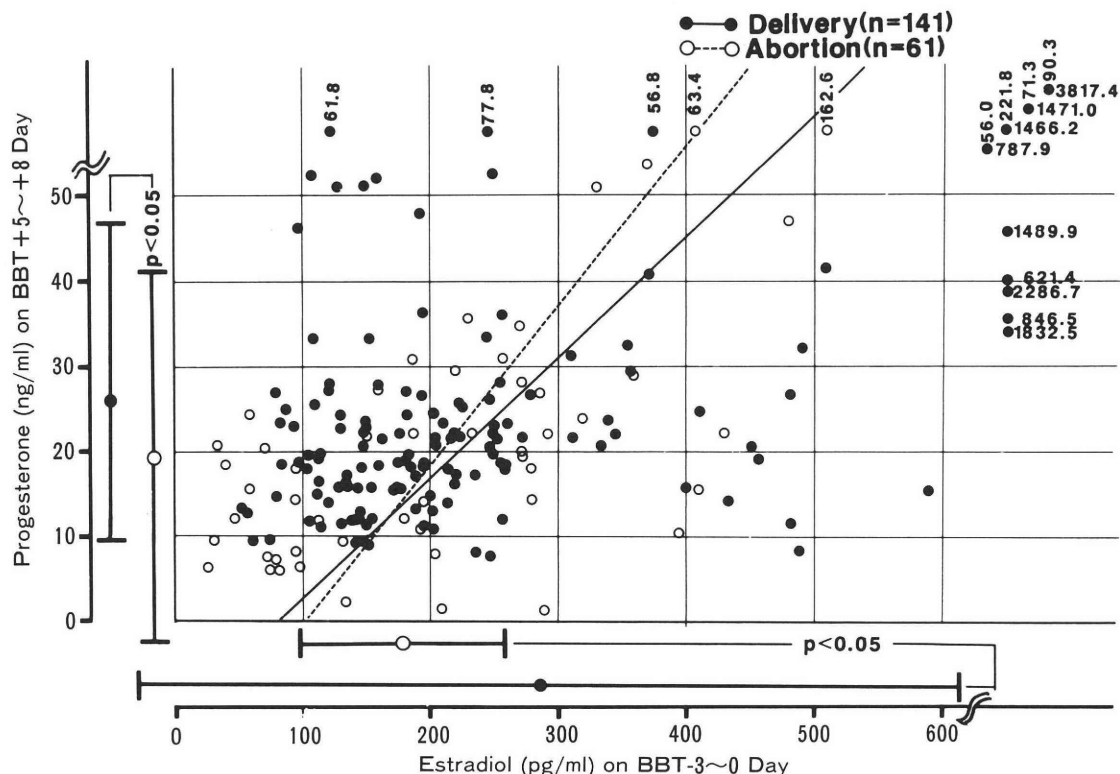


Fig. 4 Serum estradiol levels at BBT-3~0 day and progesterone levels at BBT+5~+8 day on pregnant cycle except AID cases (delivery; $Y = 0.13X - 9.7$, $r = 0.46$, $P < 0.01$, abortion; $Y = 0.20X - 21.8$, $r = 0.51$, $p < 0.01$).

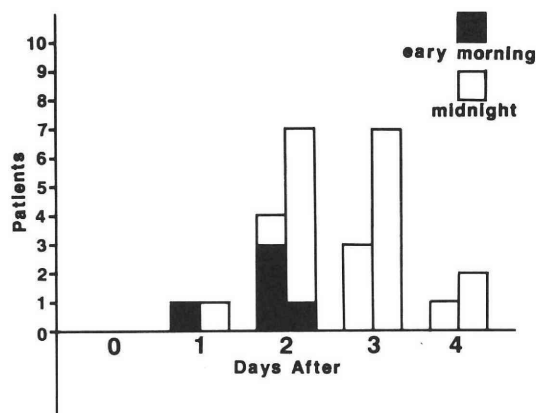


Fig. 5 Days of BBT+1 day after LH positive reaction.

場合は12時間後とすると、全例では53.1時間後、すなわちおよそ2日後、強陽性を示した場合は40.8時間後、すなわち、これもおおよそ2日後に基礎体温が上昇することが明らかになった (Fig. 5)。この

事実から LH カラーが陽性を示した26例は全て基礎体温が低温期に排卵が起こったと推測された。

考 察

オルガノン LH カラーは免疫反応の標識物質として LH 抗体をコーティングした金ゾル粒子を用いた特異的 LH 測定キットである。LH が抗体に結合すると金ゾル粒子が凝集し、粒子に対する光線の反射、伝達状況が変化して脱色することで色調が変化する仕組みになっている。尿中の LH 含量が LH サージ開始の 50 mIU/ml 以上⁸⁾になると濃い赤紫色から薄い赤紫色、さらに 100 mIU/ml 以上²⁾に LH 濃度が上がると青灰色へと変化する。一日二回の検査で平均 2.5 回陽性を示し²⁾、LH サージ以外では PCO 症例で血中高 LH を反映して陽性を示したり^{4,6)}、生理的な一時的 LH 上昇にともなって陽性を示したり^{4,8)}、clomiphene⁶⁾あるいは LH 含量が多い HMG⁷⁾を使用した時に陽性を示すことが報告されているが、そ

の排卵予知率は 72.7⁸⁾%から 100 %²⁾に及ぶと報告されている。

本法は反応時間が 30 分と短く、再現性に優れ、患者も経験によって自ら検査、結果判定できるために、卵胞成熟が周期ごとに不安定で排卵時期がバラつく卵胞機能不全症例の AIH, AID の妊娠率向上に役立つことが期待される。しかし、保険診療では使用に制限（一日二回、三日間程度）がありその有用性が限定されることが心配される。

そこで、排卵日が 5 日以上変動する症例の過去一年の最も早い排卵日の前日早朝から LH カラーを開始、最初に陽性を呈した時点から 3 日以内に排卵が起こる事実⁸⁾を踏まえて、初めて陽性を確認した当日あるいは翌日と、その翌々日の二回 AID を施行、LH カラー以外の方法で排卵予知を行ない隔日二回 AID を施行した症例の成績と比較した。

この結果、39 周期中 9 周期に妊娠（生児分娩例 7 例、流産例 2 例）が成立した。このなかで LH カラーで排卵を予知できたのは 26 周期（66.7 %）で、8 例に妊娠が成立、生児分娩は 6 例であった。この 6 例の妊娠成立までの平均 AID 実施周期は 3.7 周期で、他の排卵予知法で妊娠が成立、生児分娩した 20 例の 9.7 周期の約三分の一であった。以上の結果から、LH カラーは保険診療の枠内でも極めて優れた排卵予知試薬であると言える。とはいえ、さらなる使用期間の延長が許されるなら排卵予知率の向上と並行に成績が向上することはまちがいない。

しかしながら、排卵日の正確な予知が AID や AIH の治療成績を向上する唯一の方策ではない。自然の LH サージで排卵する卵が必ずしも受精可能な成熟卵とはいえない可能性があるからである。

今回の対象のように卵管に異常が認められない AID 症例で LH カラーで排卵日が予知できたにもかかわらず妊娠が成立しなかった原因は主として卵の成熟あるいは排卵後の黄体機能に問題があると考えるのが合理的である。そこで、妊娠が成立しなかった 30 周期の卵胞、黄体機能を retrospective に検討して妊娠不成功の原因を推測した。

現時点で卵の成熟度を示す指標として臨床的に最も信頼されているのは経膈プローベ超音波断層法による最大卵胞径の測定¹¹⁾と血中 estradiol の測定¹⁰⁾である。しかし、そのいずれか一方では充分でなく両者を同時に測定すべきである。

何故なら、大きな首席卵胞（多くの場合、正円形ではない）を認めるにもかかわらず estradiol 分泌が低い症例や、逆に、首席卵胞が小さいにもかかわらず estradiol 分泌が高い症例が存在するからである。

前者は卵胞の成熟に問題があり、後者は首席卵胞の成熟に問題があっても次席卵胞以下の卵胞の数の力によって estradiol を多く分泌していると考えられる。

いずれにしても大きな最大径を有して高い estradiol 分泌を示す卵胞が成熟卵である。黄体機能不全（Progesterone 分泌不全）に関しても、小さな首席卵胞の排卵後の分泌不全と大きな首席卵胞の排卵後の分泌不全の 2 型がある¹⁰⁾。首席最大卵胞径と progesterone は有意な正の相関が認められることから、前者の黄体機能不全は未熟卵胞の排卵に起因する黄体形成不全が原因であり、後者は排卵後の下垂体からの LH 分泌不全あるいは黄体の LH に対する反応不全といった黄体機能賦活不全が原因と考えられる。

一方、流産例を検討すると、首席最大卵胞径、血中 estradiol, progesterone 値は分娩例と妊娠不成功例の中間の値を示し、AID 以外での分娩例と流産例の retrospective な解析結果と一致している。すなわち、妊娠不成功例よりは卵胞機能、黄体機能（いずれかあるいは両者とも）がよいが分娩例ほどはよくない例が多い。

しかし、両値が良好な流産例も少なからず存在する。このなかの子宮や卵管に異常がない症例中にはいわゆる免疫学的流産¹²⁾が高率に存在する可能性が高い。

Table 4. Speculation of etiology of failure of pregnancy.

原 因	症例数(%)
卵胞(黄体)機能不全	16/30(53.3%)
黄 体 機 能 不 全	7/30(23.3%)
施 行 時 期 不 適 切	4/30(13.3%)
不 明	3/30(10.0%)

以上の考え方で卵胞機能の指標として estradiol 100pg/ml 以上、首席最大卵胞径 1.6 cm 以上、黄体機能の指標として progesterone 10ng/ml 以上を正常と認識して今回妊娠が成立しなかった 30 周期の妊娠不成功の原因を考察すると、LH カラー陽性を確認しないで AID を実施、その後の卵胞機能、黄体機能が正常な AID 実施時期不適切と考えられた症例はわずか 4 周期（13.3 %）に過ぎないのに対して、卵胞機能、黄体機能に問題があったケースは 70 %以上の多さを占めた。原因不明は 3 例（10.0 %）のみであった（Table. 4）。

以上の結果から、AID や AIH はもちろんのこと、不妊症の妊娠率を向上、さらに流産率を減少させるためには単に排卵日の正確な予知だけでなく排卵に

至る卵のモニタリングと卵胞賦活, さらに黄体賦活療法が必要不可欠であると考えられた。

文 献

- 1) 飯塚理八: 着床の研究, 第23回日本産科婦人科学会宿題報告, 東京, 1971年
- 2) 田辺清男, 田村 勉, 角ゆかり, 飯塚理八: 尿中LH簡易検出試薬「オルガノン LH カラー」の基礎的ならびに臨床的検討, 日不妊誌, 33: 760, 1988
- 3) Lopata, A.: In vitro fertilization and embryo transfer in the treatment of infertility, Organorama., 18: 3, 1981
- 4) 吉松 淳, 合阪幸三, 友成廉平, 多和田哲雄, 金田幸枝, 国保健太郎, 吉田浩介: 排卵予知におけるLHカラーの臨床的有用性の検討, 日不妊誌, 34: 425, 1985
- 5) 田中 温, 戸枝通保, 長沢 敢, 山本 勉, 石上園子, 砂川 進, 小松朋子, 小崎繁昭: 尿中LH検出試薬「オルガノン LH カラー」の排卵時期のモニタリングとしての有用性に関する臨床的検討, 産と婦, 55: 1975, 1988
- 6) 大井嗣和, 深谷孝夫, 星合 晃, 矢嶋 聰: Clomiphene投与時の排卵予知における尿中LH測定(SPIA法: LHカラー)の有用性, 産婦世界, 41: 695, 1989
- 7) 高崎彰久, 上田一之, 田村晴代, 山下裕幸, 中村康彦, 猪口博臣, 新田 豊, 杉野法広, 宮内文久, 加藤 紘: 尿中LH測定キット「LHカラー」を利用した尿中LHの定量, 日不妊誌, 34: 420, 1989
- 8) 山元慎一, 堂地 勉, 福元清吾, 竹内一浩, 永田行博: LHカラーによる排卵予知, 産婦治療, 58: 412, 1989
- 9) 假野隆司: 卵巣機能不全不妊症に対する漢方療法, 日不妊誌, 33: 617, 1988
- 10) Kano, T. and Nishikawa, K.: Etiological study on hyposecretion of progesterone in the aspect of echographically measured follicle diameter and estradiol and progesterone in the patient categorized by BBT patterns, Jap. J. Fertil. Steril., 30: 5, 1985
- 11) 堂地 勉, 竹内一浩, 福元清吾, 森 明人, 山元慎一, 有馬直見, 永田行博: 体外受精・胚移植に

- おける採卵法の検討, 産と婦, 7: 1365, 1988
- 12) 八神喜昭, 青木耕治: 原因不明習慣流産の免疫学的背景と免疫療法, 日産婦誌, 39: 702, 1987

Usefulness and limitation of LH-color based on the analysis of the pregnancy rate following AID

Takashi Kano
Kano Clinic, Osaka 542, Japan

LH-Color was used twice a day for three days for prediction of ovulation in 20 patients with normal fallopian tubes but irregular ovulation time for 39 cycles to evaluate its usefulness and its limitations by comparing the result of AID using other methods for prediction of ovulation. The result of the study showed that prediction of ovulation was possible in 26 out of 39 cycles (66.7%).

The numbers of AID treatment cycles up to occurrence of pregnancy in those cases in which LH-Color was used were reduced to one-third of those in which other methods for prediction of ovulation was used. A retrospective study of the 30 cycles of unsuccessful pregnancies revealed that the timing of AID was not appropriate in only 4 cases (13.3%) whereas follicular insufficiency and luteal insufficiency were observed in 70% of the cases. Based on the result of this study LH-Color is extremely useful for prediction of ovulation, but since not all follicle which are ovulated during the natural LH-surge may not be matured follicles, not only a more accurate prediction of ovulation but also monitoring of the maturity of the follicle, follicle stimulating therapy and luteal stimulating therapy would be indispensable.

(受付: 1989年12月20日)

正プロラクチン (PRL)
血性不妊症に対する Bromocriptine
(BRC) 併用療法の検討
——妊娠例 123 例の転帰——

Bromocriptine (BRC) Therapy
for the Normoprolactinemic Infertile Women
—Outcome of 123 Cases of Pregnancy—

徳山中央病院産婦人科

山下三郎 小林正幸 成松昭夫
Saburo YAMASHITA Masayuki KOBAYASHI Akio NARIMATSU

林公一 伊東武久
Kimikazu HAYASHI Takehisa ITO

Division of Obstetrics & Gynecology,
Tokuyama Central General Hospital
Yamaguchi 745, Japan

1986年1月～1988年12月までの3年間に正PRL血性不妊症例263例(内訳;遅延排卵症(D群)77例,正常排卵性不妊症(N群)66例,黄体機能不全症(L・I群)24例,無排卵周期症(ANC群)59例,第I度無月経症(AN 1°群)28例,第II度無月経症(AN 2°群)9例)に対し,first choiceの治療法としてBRC単独療法(BRC法)を行ない,無効または効果不十分の場合には,BRC法にclomiphene併用(BRC+CL法)または,clomiphene+hMG併用(BRC+CL+HMG法)を行なった.この結果123例の妊娠例(妊娠率46.4%)を得た.

妊娠例の転帰について検討し,以下の結論を得た.1)自然流産は8例(6.5%)に認めた.治療法は,BRC法にて5例,BRC+CL法で2例,BRC+CL+HMG法で1例であった.早産は4例(3.3%)に認められ,妊娠成立時の治療法は,BRC+CL法1例で,ほかの3例は,BRC+CL+HMG法であった.2)多胎妊娠およびその予後;双胎は9例(7.3%)であり,その治療法はBRC法1例,BRC+CL法1例,BRC+CL+HMG法による7例であった.このうち1例は,妊娠25週2日で早産し,2児とも死亡した.また胎児はAN 1°群(BRC+CL+HMG法)で1例認められた.新生児奇形については,N群でBRC法による1例に先天性エプーリスが認められた.以上,BRCおよび併用療法の検討では,多胎妊娠率が自然排卵後の妊娠例のそれに比して高いものの,流産率・早産率・奇形率等については,差を認めず,その高い妊娠率からも,有用な治療法と思われた.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 516—523, 1990)

緒 言

BRC療法が高PRL血性排卵障害のみならず,広

く正PRL血性不妊症例に対しても有効との報告がなされ,現在広く行なわれている¹⁻⁵⁾.

我々も⁶⁾,正プロラクチン血性不妊症例に対して

BRC 療法および併用療法を行い、その有用性を報告してきた。今回は最近3年間に得られた123例の妊娠例について各症例毎に排卵障害の種類、妊娠時の治療法、さらに、妊娠の転帰を分析し若干の知見が得られたので報告する。

対象および方法

表1 対象症例

種	類	対象例数	妊娠例	妊娠率
1)	遅延排卵症	77	33	42.9%
2)	無排卵周期症	59	33	55.9%
3)	第I度無月経症	28	16	57.1%
4)	第II度無月経症	9	3	33.3%
5)	正常排卵性不妊症	66	22	33.3%
6)	黄体機能不全症	24	16	66.7%
		263	123	46.8%

1986年1月～1988年12月までの3年間に表1に示す正PRL血性不妊症例263例に対し、図1に示した方法⁶⁾により、BRC法またはBRC+CL法、またはBRC+CL+HMG法を行なった。

内訳は、卵胞期日数19日以上⁷⁾の遅延排卵症77例、卵胞期日数18日以内に排卵が認められたものの2年以上妊娠に至らない不妊症（機能性不妊症および、妻には異常を認めないが夫が乏精子症のためAIH施行が必要な症例を正常排卵性不妊症とする）66例、黄体機能不全を示す不妊症24例、無排卵周期症59例、第I度無月経症28例、第II度無月経症9例であった。BRCは、原則として、連続投与（維持量は5.0

mg/日）とし妊娠反応陽性・Gestational sac 確認の時期までとした。

結 果

①妊娠周期の治療法

BRC および併用療法を含む各群の妊娠率は、先述の表1の如く、第II度無月経症の33.3%から、黄体機能不全症の66.7%であり、平均46.8%と良好な成績であった。この中で、BRC法だけの妊娠率をみると表2の如くである。すなわち、BRC法による妊娠率は遅延排卵症（妊娠率54.5%）、正常排卵性不妊症（54.5%）および黄体機能不全症（37.5%）等の軽症排卵障害のgroupに多く、一方BRC+CL法あるいはBRC+CL+HMG法による妊娠例は無排卵周期症、第I度無月経症、第II度無月経症など、排卵障害のすすんだgroupに多い傾向を認めた。また、図2に示す如く、妊娠に至るまでの治療期間は、最短は第II度無月経症の平均2.3周期から、最長は黄体機能不全症の平均6.7周期に分布していた。

②治療法とその妊娠予後

表3に予後と治療法を示した。双胎の9例中8例、品胎の1例は、いずれもBRC+CL+HMGによる妊娠例（既報⁶⁾に示す如く、いずれもPCOの症例）であったことは特徴的と思われる。

③多胎妊娠の予後

表4に双胎妊娠の予後をまとめた。ここでは、BRC単独療法をBRC、BRC+CLをB-C、BRC+CL+HMGをB-C-Hと略記した。37週以後の正期産は9例中6例であった。その他、33週0日が1例、

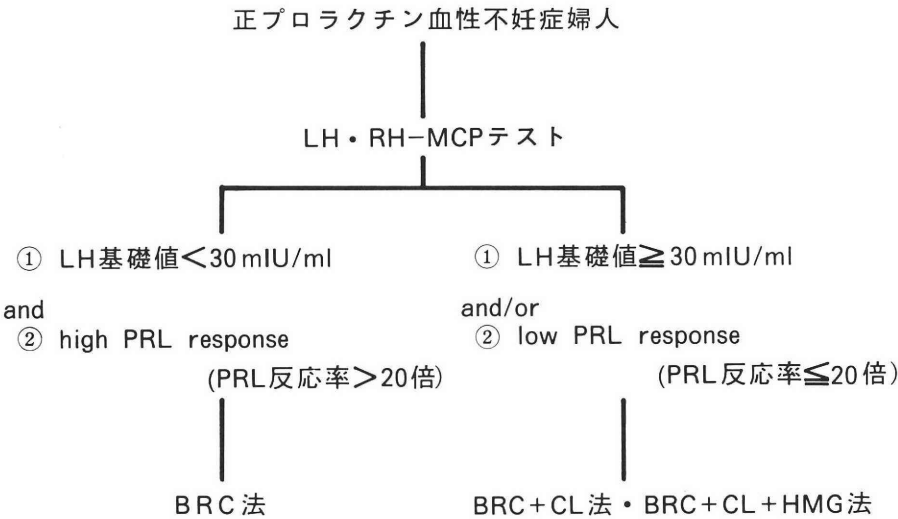


図1 治療方針

表 2 妊娠周期の治療法

	BRC 単独	BRC+CL	BRC+CL+HMG
1) 遅延排卵症 (33例)	18 (54.5%)	7 (21.2%)	8 (24.2%)
2) 無排卵周期症 (33例)	5 (15.2%)	13 (39.4%)	15 (45.5%)
3) 第Ⅰ度無月経症 (16例)	1 (6.3%)	9 (56.3%)	6 (37.5%)
4) 第Ⅱ度無月経症 (3例)	0 (0.%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)
5) 正常排卵性不妊症 (22例)	12 (54.5%)	6 (27.3%)	4 (18.2%)
6) 黄体機能不全症 (16例)	6 (37.5%)	8 (50.0%)	2 (12.5%)

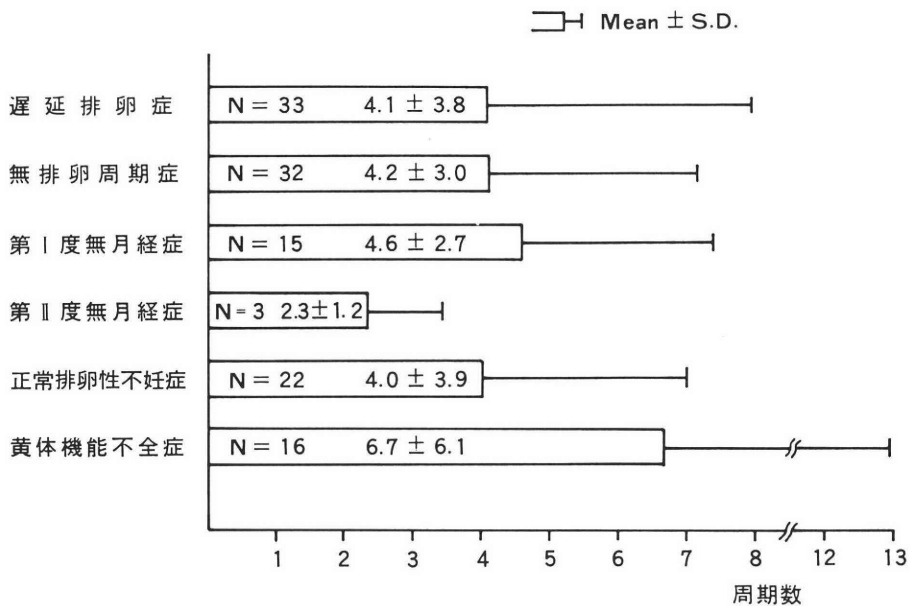


図2 妊娠成立までの治療周期数

30週4日が1例, 25週2日が1例であった。

この中で, 33週0日の1例では fetal distress の徴候を認めたため, 緊急帝王切に 1886 g および 1594 g の女児2名を分娩した。また, 30週4日の1症例では片方の男児が胎児水腫で胎内死亡を起こしたため緊急手術を行ない, 1280 g の女児の生児を得た。その予後は良好である。

また, 25週2日の1例は PROM にて経膈分娩となり, 男女1名ずつ分娩されたが, 両児とも死亡した。正期産6例中5例は経膈分娩であったが, 残りの1例は胎位異常 (hanging) のため, 帝王切開分娩となった。胎胎は, 1例認められたが, 他院に転院し妊娠25週2日で早産し3児とも死亡した。

④全妊娠例の予後

表5に妊娠予後・例数・妊娠周期の治療法について整理した。この中で以下の3点が特徴と思われた。i) 流産の8例中5例が BRC 単独による。ii) 双胎・胎胎は10例中8例が BRC+CL+HMG による。iii) 正常分娩例の男女比は 1:0.7 と男児が多かった。

考 察

従来, BRC 療法により, 排卵, 妊娠に成功した症例の妊娠転帰に関する報告は, 主として, 高 PRL 血性排卵障害を伴う不妊症例についてのものが多くなされてきた⁸⁻¹⁰⁾。例えば Turkalj¹³⁾は 1410 妊娠について, Griffith¹⁴⁾は 448 妊娠について, Thorner¹⁵⁾は 92 妊娠について, Maureen¹⁶⁾は 92 妊娠について報告している。

表 3 妊娠例の予後・治療法

妊娠予後		例数	BRC 単独	BRC+CL	BRC+CL+HMG
流産		8	5	2	1
早産		4	0	1	3
双胎		9	1	1	7
品胎		1	0	0	1
子宮外妊娠		2	0	0	2
胞状奇胎		1	1	0	0
子宮内胎児死亡		3	0	0	3
新生児奇型(先天性エプーリス)		1	1	0	0
正常分娩		74	28	27	19
LFD(妊娠中毒症)		1	0	0	1
臍帯脱出*		1	0	1	0
他施設紹介		8	4	2	2
妊娠継続中**		14	3	8	3
		127	43	42	42

*緊急帝王切・児生存

**全例妊娠後期

表 4 双胎の内訳

氏名	年齢	診断名	原発・続発	不妊期間	AIH	治療法	治療期間	分娩様式	性別	予後
Y・K	37	D群	原	3Y0M	(+)	B-C-H	6 周期	33W0d C/S	♀1886g ♀1594g	生存 生存
M・H	23	D群	原	0Y8M	(-)	B-C-H	5 周期	25W2d PROM	♂ ♀	死産 死亡
Y・N	34	D群 (筋腫合併)	続	3Y0M	(+)	B-C-H	7 周期	30W4d C/S	♂2156g ♀1280g	胎児水腫で死亡 生存
Y・S	24	ANI°群	原	1Y1M	(-)	B-C	7 周期	38W4d C/S(hanging)	♀2512g ♀3278g	生存 生存
S・U	39	ANC 群	続	0Y10M	(+)	B-C-H	3 周期	37W1d Vag	♂2548g ♂2540g	生存 生存
Y・K	26	ANC 群	続	0Y7M	(-)	B-C-H	4 周期	40W0d Vag	♀2126g ♀2380g	生存 生存
M・N	22	ANC 群	原	0Y3M	(-)	BRC	3 周期	37W4d Vag	♀2370g ♀2530g	生存 生存
K・S	27	ANC 群	続	1Y1M	(-)	B-C-H	1 周期	39W1d Vag	♂3012g ♂2966g	生存 生存
M・Y	27	N群	原	3Y1M	(+)	B-C-H	5 周期	39W2d Vag	♀2448g ♀2882g	生存 生存

Vag：経膈分娩

C/S：帝王切開分娩

PROM：前期破水

表5 疾患別, 妊娠の予後

患 者	項 目	例数	治 療 法		
			BRC	BRC+CL	BRC+CL+HMG
遅 延 排 卵 症 (33例)	流 産	4	3	1	0
	早 産	3	0	0	3
	双 胎	3	0	0	3
	子 宮 外 妊 娠	1	0	0	1
	胞 状 奇 胎	1	1	0	0
	正 常 分 娩	18	12	4	2
	子宮内胎児死亡	1	0	0	1
	他 院 紹 介	2	0	2	0
無 排 卵 周 期 症 (33例)	双 胎	4	1	0	3
	子宮内胎児死亡	2	0	0	2
	正 常 分 娩	18	2	8	8
	他 院 紹 介	4	2	2	0
	妊 娠 継 続	5	0	2	3
第 I 度 無 月 経 症 (16例)	流 産	1	0	0	1
	双 胎	1	0	1	0
	品 胎	1	0	0	1
	子 宮 外 妊 娠	1	0	0	1
	正 常 分 娩	10	1	6	3
	妊 娠 継 続	2	0	2	0
第 II 度 無 月 経 症 (3 例)	正 常 分 娩	2	0	1	1
	他 院 紹 介	1	0	1	0
正 常 排 卵 性 不 妊 症 (22例)	流 産	2	1	1	0
	双 胎	1	0	0	1
	正 常 分 娩	16	10	3	3
	妊 娠 継 続	3	2	1	0
黄 体 機 能 不 全 (16例)	流 産	1	1	0	0
	早 産	1	0	1	0
	正 常 分 娩	10	3	5	2
	妊 娠 継 続	4	2	2	0

我国では倉智ら⁸⁾により昭和54年1月から12月までの1年間でBRCにより妊娠した89例の妊婦につき, その転帰を詳細に分析した報告がなされた。また同じく倉智ら^{9,10)}により昭和58年12月までにBRC療法をうけて妊娠し, その後出産に至った434例の母体と出産された448例の新生児を調査対象として生後1年までの心身の発育状態の追跡調査がなされた。

これら国内外の報告では, BRC療法は, 現在の使用法によれば, 胎児に対しても安全な薬剤であり, かつ, 出生児の運動機能, 知能, 感覚機能の発達についても正常範囲の成長をとげ, BRCが生後発達に

対してもほとんど影響しないことが確認された。

最近BRCは高PRL血性排卵障害のみならず, 正常PRL血性不妊症にも有効との報告が数多く認められる¹⁻⁶⁾。我々も⁶⁾BRC療法および併用療法(BRC+CL, BRC+CL+HMG)を正常PRL血性不妊症例に対しておこない, 1980年1月から1988年12月までの3年間に123例の妊娠例を得ることが出来た。

既報⁶⁾に示す如く, 軽症排卵障害(機能性不妊症, 遅延排卵症, 無排卵周期症)に対しては, BRC単独療法の有効性が高いが, PCO症例に対しては, BRC単独療法の有効性が低く, BRCにclomiphene (BRC+CL) またはclomiphene+hMG (BRC+

CL+HMG)の併用療法を加える頻度が高くなる。これらのことより、今回我々は、BRC療法を行なった場合の排卵障害の程度および妊娠周期の治療法(BRC単独か、または併用療法か)について、各症例毎に分析し、その妊娠の転帰を検討した。

表5にまとめた妊娠例の予後にもとづいて検討を加える。まず、流産率については123例中8例(6.5%)に認められた。内訳は遅延排卵症で4例、第1度無月経症で1例、正常排卵性不妊症の1例であった。妊娠周期の治療法についてみると、BRC単独にて5例、BRC+CL療法で2例、BRC+CL+HMG療法にて1例であった。

我々のdataを諸家の成績と比較してみる。Griffithら¹⁴⁾は448妊娠中10.9%、Turkaljら¹³⁾は1410妊娠中11.1%、Thornerら¹⁵⁾は18.5%、倉智ら⁸⁾は10.1%と報告している。今回の我々の自然流産率6.5%は倉智ら⁸⁾が報告した自然排卵後の自然流産率7.5%と同様の成績であり、BRCが流産率を上昇させないという倉智ら⁸⁾の報告を支持するものである。

今回のBRC療法(およびBRC+CL、BRC+CL+HMGの併用を含む)による妊娠例の流産率を他の排卵誘発剤使用によるそれと比較する。まず、clomiphene療法について倉智ら⁸⁾は1034例中13.8%、McGregor¹⁷⁾は2196例中17.0%と報告しており、BRCによる流産率に比し、やや高率と思われる。一方、HMG-HCG療法による流産率は我国では、倉智らの全国調査²⁰⁾では506例中22.0%と高率に認められ、外国文献でもThompson & Hansen²¹⁾は334例中25%と報告しており、BRCによる流産率に比して高率である。

早期産についてみると、遅延排卵症3例、黄体機能不全症で1例の計4例(3.3%)であり、その妊娠周期の治療法は遅延排卵症では3例とも、BRC+CL+HMGであり、また黄体機能不全症ではBRC単独が1例であった。倉智ら⁸⁾の報告には、早期産の頻度は89妊娠中単胎4例、品胎1例の計5例(5.6%)と我々と同様の頻度であった。このうち品胎例では、34週4日の早期産であったと報告している。

今回、我々の双胎例は遅延排卵症3例、第1度無月経症1例、無排卵周期症4例、正常排卵性不妊症1例の計9例(7.3%)であり、妊娠時の治療法は、BRC単独1例、BRC+CL1例、BRC+CL+HMG7例であった。即ち、9例中8例はclomipheneあるいはhMGとの併用による結果であり、BRC単独では123例中1例(0.8%)となる。これは、倉智ら⁸⁾が報告した如く、調査全体としての多胎妊娠は2.2%であったが、これはすべてclomiphene併用例であり、

BRC単独では0%という報告とほぼ一致する。文献にはGriffithら¹⁴⁾は448例中1.6%、Thornerら¹⁵⁾はclomiphene併用を含み92例中3.3%、Turkaljら¹³⁾は1.8%と報告しているが、いずれにしてもこれらの数字は、clomipheneによる多胎率4.0%²²⁾、HMG-HCG療法による多胎率20.2%²⁰⁾に比べて明らかに低率であり、自然排卵による多胎率に比しても高率ではなかった。表4に双胎の内訳を示した。9例中3例が早期産であり、表5に示した品胎も妊娠24週2日で早産の転帰をとったことと考えあわせても、正常児を得るためには多胎妊娠を防ぐ一層の努力が必要と思われる。

新生児の性比は、男：女=1：0.7で男子が多く認められた。倉智ら⁸⁾も127：100、Thornerら¹⁵⁾も7：3で男児が多いと報告している。一方、clomipheneによる妊娠例²²⁾も、男女比で130：100と男子が多いとされていたが、一方、HMG-HCG療法²⁰⁾では101：100と差が認められていない。このように排卵誘発剤により種々の報告が認められるが、BRCによる妊娠例で果して有意に男子が多いのか否か、などの疑問に関しては更に多数の報告を分析する必要があると思われる。最後に外表奇形については我々は1例(0.8%)に歯肉の腫瘍である先天性エプーリス(congenital epulis)が認められたのみであった。

倉智ら⁸⁾は、大奇形0.7%、小奇形1.5%の合計2.2%に奇形を認めたが、これは同じ施設で同じ時期に調査した自然排卵群の奇形率2.0%と有意差はなく、かつ特定の奇形が多発する傾向もなかったと報告した。BRCによる妊娠例の解析では、Griffithら¹⁴⁾は大奇形0.5%、小奇形2.4%の合計2.9%、Turkaljら¹³⁾は大奇形1.0%、小奇形2.5%の合計3.5%と報告している。

以上BRCおよびclomiphene、またはclomiphene+hMGとの併用療法による妊娠例の検討を行ない、次の結論を得た。①今回の我々の成績ではclomipheneあるいはhMGの併用のためと思われるが、多胎妊娠率が自然排卵時の妊娠例に比し高かった。②流産率、早産率、奇形率については、自然排卵時の妊娠のそれと差を認めなかった。③BRCの正プロラクチン血性不妊症例に対する有効性については異論はないが、多胎妊娠例について早期産が多い傾向を認めるため、我々は今後とも多胎妊娠を避ける一層の工夫を行ない、健康な正期産児の出生率をさらに高める努力が必要と思われる。

なお、本論文の概要は、第34回日本不妊学会(1989年、旭川市)にて発表した。

文 献

- 1) 田村 貴, 水上尚典, 玉田太朗: 正常プロラクチン血性無排卵症における CB-154 の排卵誘発効果, 日内分泌会誌, 58: 49, 1982
- 2) 水口弘司, 植村次雄, 白須和裕, 他: 正常プロラクチン血性排卵障害の Bromocriptine 療法, 産婦の実際, 36: 187, 1987
- 3) 浅井光興, 市川弥生, 吉川史隆, 他: 正常プロラクチン血性卵巣機能不全患者に対するプロモクリプチン療法, 産と婦, 2: 271, 1986
- 4) 越田光伸, 林 国城, 岡村 均, 他: 正常プロラクチン性無排卵症のプロモクリプチン療法は有効か, 臨産, 40: 50, 1986
- 5) 永田一郎, 古谷健一, 関 克義, 他: 正常 Prolactin 血症性続発性無月経に対する Bromocriptine の効果と適応, 基礎と臨床, 20: 3793, 1986
- 6) 山下三郎, 伊東武久, 木梨憲夫, 矢壁昭人, 他: 正プロラクチン (PRL) 血性排卵障害に対するプロモクリプチン (BRC) 単独及び併用療法, 日不妊会誌, 33: 697, 1988
- 7) Yamashita, S., Ito, T., Yakabe, A., et al.: Endocrinological profile and treatment for patients with delayed ovulation, Jpn. J. Fertil. Steril., 32: 30, 1987
- 8) 倉智敬一, 青野敏博, 小池浩司, 他: Bromocriptine 療法による妊娠の転帰, 産と婦, 50: 1446, 1983
- 9) 倉智敬一, 青野敏博, 橋本正淑, 他: Bromocriptine 投与により出生した 448 例の新生児所見および生後発育, 産と婦, 53: 1758, 1986
- 10) 倉智敬一, 青野敏博, 小池浩司, 他: Bromocriptine 治療により出生した児の追跡調査, 産と婦, 50: 126, 1983
- 11) 倉智敬一, 青野敏博, 五十嵐正雄, 他: 妊娠中にプロモクリプチンの投与を受けたプロラクチノーマを主とする下垂体腫瘍症例における妊娠の転帰と新生児所見, 産と婦, 10: 1689, 1985
- 12) 福永友明, 中村幸雄, 飯塚理八: 高プロラクチン血症の排卵障害に対する Bromocriptine 療法, 日不妊会誌, 25: 257, 1980
- 13) Turkalj, I., Braun, P., and Krupp, P.: Surveillance of bromocriptine in pregnancy, JAMA March 19, 247 (11): 1589, 1982
- 14) Griffith, R. W., Turkalj, I. and Braun, P.: Outcome of pregnancy in mothers given bromocriptine, Br. J. Clin. Pharmacol., 5: 227, 1978
- 15) Thorner, M. O., Edwards, C. R. W., Charlesworth, M.: Pregnancy in patients presenting with hyperprolactinaemia, Br. Med. J., 2: 771, 1979
- 16) Hack, M., Brish, M., Serr, D. M. et al.: Outcome of pregnancy after induced ovulation, JAMA, June 5, 220: 1329 1972
- 17) Krupp, P. and Monka, C.: Bromocriptine in pregnancy: Safety aspects, Klin. Wochenschr., 65: 823, 1987
- 18) Weil, C.: The safety of bromocriptine in hyperprolactinaemic female infertility: a literature review, Current Medical Research and Opinion, 10 (3): 172, 1986
- 19) Macgregor, A. H., Johnson, J. E. and Bunde, C. A.: Further clinical experience with clomiphene citrate, Fertil. Steril., 19: 616, 1968
- 20) 倉智敬一, 鈴木雅洲, 小林拓郎, 他: HMG (Humegon) - HCG 療法による排卵誘発効果と妊娠の転帰, 産と婦, 47: 1146, 1980
- 21) Charles, R., Thompson, M. A., Laura, M. and Hansen, B. S.: Pergonal (menotropins): a summary of clinical experience in the induction of ovulation and pregnancy, Fertil. Steril., 21: 844, 1970
- 22) 倉智敬一, 青野敏博, 南川淳之祐, 他: Clomiphene 療法により出生した新生児の奇形に関する全国調査成績, 日不妊会誌, 27: 454, 1982

Bromocriptine (BRC) therapy for the treatment of normoprolactinemic infertile women

—Outcome of 123 cases of pregnancy—

Saburo Yamashita, Masayuki Kobayashi,
Akio Narimatsu,
Kimikazu Hayashi and Takehisa Ito

Division of Obstetrics & Gynecology,
Tokuyama Central General Hospital
Yamaguchi 745, Japan

We performed BRC therapy (B method) for the treatment of normoprolactinemic infertile women, including delayed ovulation (77 cases), sterility with normal ovulation (66 cases), luteal insufficiency (24 cases), anovulatory cycle (59 cases), grade 1 amenorrhea (28 cases), and grade 2 amenorrhea (9 cases).

When the BRC method was ineffective, we performed B method+clomiphene (B-C method) or clomiphene+hMG (B-C-H method).

Pregnancy rates were 123/263 (46.8%) in total cases, including 42/123 (34.1%) by BRC method, 45/123 (36.6%) by B-C method, 36/123 (29.3%) by B-C-H method.

Abnormal courses of pregnancy included 8 cases of miscarriage (6.5%), 4 premature labour (3.2%), 9 cases of twins (7.3%), one case of triplet (0.8%), one case of hydatidiform mole (0.8%), one case of

平成 2 年 7 月 1 日

山下 他

(523) 91

ectopic pregnancy (0.8%) and one case of neonatal abnormality with congenital epulis (0.8%).

The ratio of male and female birth was 1:0.7.

Thus, BRC and its combined therapy would be a useful treatment for the infertile women.

(受付：1990 年 2 月 7 日特掲)

多嚢胞性卵巣症候群に対する 超音波ガイド下経腔的卵胞穿刺術 の効果に関する検討

Studies about the Clinical Efficacy of Transvaginal Ultrasonically Guided Follicular Puncture in Polycystic Ovarian Disease

聖隷浜松病院産婦人科

大谷 嘉明
Yoshiaki OOTANI

岡田 久
Hisashi OKATA

青木 智
Satoru AOKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Seirei Hamamatsu Hospital
Shizuoka 430, Japan

クロミッド単独では排卵せず、過剰卵胞発育や卵巣過剰刺激症候群を発生する多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovarian disease, PCOD) 6例に対し、卵胞期後期に超音波ガイド下経腔的卵胞穿刺術による排卵誘発を試み、その臨床的效果について検討を加えた。

(1) 卵胞穿刺術により、それまで必要であったプレドニゾン投与を中止、HMG投与を中止あるいは減量することが可能となった。

(2) 卵胞穿刺術前にみられた過剰卵胞発育を抑制する点で有効であった。

(3) 6例中2例に妊娠が成立した (妊娠率33%)

(4) 穿刺術後のLH-RHテストにおいてLHの基礎値高値・過剰反応の正常化が認められた。

以上、本法はPCODに対して侵襲の極めて少ない外科的療法のひとつとして有用であることが確認された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 524-527, 1990)

緒 言

難治性排卵障害を伴う不妊患者のなかで、多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovarian disease, PCOD) のしめる位置は大きく、従来より種々の薬物療法や外科的療法が試みられてきた。しかし、その治療抵抗性や、過剰卵胞発育・卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) の発生など、いまだ多くの問題を含んでいる。最近、前田ら^{1,2)}は薬物療法に反応しないPCODに対し新たに、治療的超音波ガイド下卵胞穿刺術による排卵誘発を試み、良好な成績を報告している。今回我々は6例のPCODに対し、卵胞期後期に超音波ガイド下経腔的卵胞穿

刺術を施行し、その臨床的效果について検討を加えたので報告する。

対象ならびに方法

対象は当科不妊外来通院中の、不妊期間3-12年 (平均6.8年)、年齢27-42歳 (平均35.3歳) の内分泌学的にPCODと診断された、難治性排卵障害患者6例である。なお、PCODの内分泌学的診断基準は、青野³⁾のそれに拠った。6例全例とも、クロミフェン単独では排卵を認めず、また6例中5例にOHSSの既往があった。方法は、クロミフェンおよびゴナドトロピン療法などにより卵巣刺激を行い、卵胞期後期、超音波ガイド下経腔的卵胞穿刺を両側卵巣の

数か所に施行した。卵胞液は可能な限り吸引・除去した。さらに卵胞穿刺術施行前後でLH-RHテストを実施し、下垂体性ゴナドトロピン分泌パターンの変化を検討するとともに、臨床的な効果について検討を加えた。

結 果

(1) 卵胞穿刺術前後のLH-RHテストの成績

6例の卵胞穿刺術施行前のLH-RH負荷に対するLHの投与前、30分後、60分後、120分後の値はそれぞれ24.8, 245.2, 177.1, 84.1 mIU/mlと基礎値の上昇及び過剰反応を示したが、穿刺術後はそれぞれ12.6, 74.5, 55.0, 32.7 mIU/mlと有意に低下し、正常範囲となった(図1)。一方、FSH値においては卵胞穿刺術前後で有意な変化は認められなかった(図2)。

(2) 卵胞穿刺術前後の臨床成績

① 排卵誘発に要した薬物治療内容の変化

6例すべてに薬物療法により排卵が認められていたが、いずれも長期にわたるプレドニゾロンの投与やHMGの使用が必要であった。しかし穿刺術後は5例中4例にプレドニゾロン投与を中止、4例中3例にHMGを中止あるいは減量することが可能であった(表1)。

② 排卵誘発時の過剰卵胞発育の抑制

排卵直前における直径1.8 cm以上の卵胞数を穿刺術前後で比較すると、穿刺術後は明らかにその数が減少した(表2)。

③ 穿刺術後の臨床経過

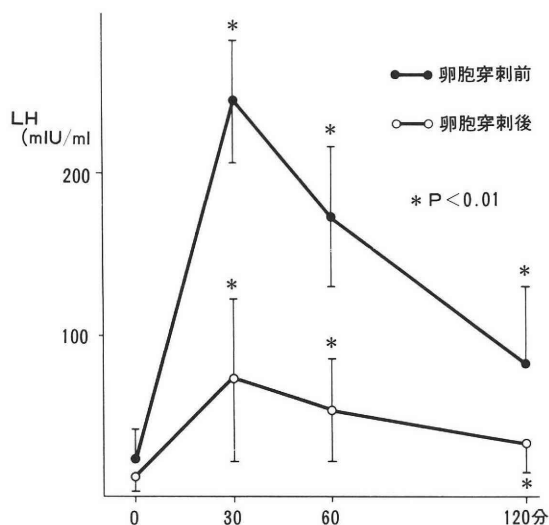


図1 卵胞穿刺術前後のLH-RHテストの成績 (M±SD)

2例において、穿刺術後それぞれ2周期目3周期目に妊娠が成立した。妊娠が成立しなかった4例においては、1～5周期後には穿刺術前と同様の薬物治療が排卵誘発に必要であった(表3)。

考 察

排卵障害を伴う不妊症患者のなかでPCODは重要な位置をしめているが、その病態生理は複雑で、いまだ一定の取扱い基準は確立されていない。排卵誘発を目的とした治療法としては種々の薬物療法と外科的療法が中心に行われてきた。薬物療法としては、クロミフェン単独、クロミフェン+プレドニゾロン、クロミフェン+プロモクリプチン、芍薬甘草湯などの内服薬や、HMG-HCG、FSH-HMG-HCGなどの注射薬が一般に用いられてきたが、内服薬のみでは排卵率に差があることや、その効果に限界があること、注射薬の使用時には過剰卵胞発育及び過剰排卵(多胎妊娠)・OHSSの発生のほかに、患者に対する身体的、経済的な負担は無視できないものと思われる。最近、本症に対してGnRH律動投与⁴⁾やHMGの律動的皮下投与⁵⁾による排卵誘発の試みがなされているが、前者はその効果に一定の傾向が認められず、また後者は高い排卵率と多胎発生率の低下が期待され、画期的と思われるが、長期間注入ポンプを携帯しなければならない、また相当量のHMG投与が必要で、頻回の通院を要するという負担が考えられる。

一方、外科的療法としては従来より行われてきた楔状切除術があり、高い排卵率・妊娠率が報告されているが、侵襲の大きさや、手術術式に種々の工夫がなされても術後の卵管周囲癒着などの問題は残されており^{6,7)}、またその効果も永久的ではない。腹腔鏡下での楔状切除術やレーザー焼灼も腹腔鏡を施行しなければならないという、患者に対する侵襲の大きさはあまり軽減するとは言えない。前田ら^{1,2)}はゴナドトロピン療法に反応せず卵巣楔状切除の対象と

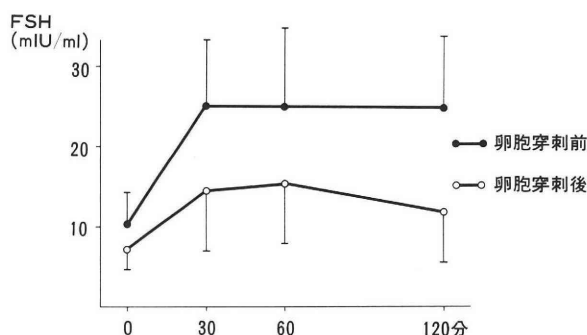


図2 卵胞穿刺術前後のLH-RHテストの成績 (M±SD)

表 1 排卵誘発に要した薬物治療内容の変化

	卵巣穿刺前 1 周期	卵巣穿刺後 1 周期
No.1	クロミッド+プレドニン+芍薬甘草湯	クロミッド
No.2	クロミッド+プレドニン+HMG8A	クロミッド+HMG6A
No.3	クロミッド+プレドニン+芍薬甘草湯+パーロデル	クロミッド
No.4	クロミッド+プレドニン+芍薬甘草湯+HMG24A	クロミッド+プレドニン+芍薬甘草湯
No.5	クロミッド+プレドニン+芍薬甘草湯+HMG8A	クロミッド+HMG12A
No.6	クロミッド+HMG6A	クロミッド+HMG2A

表 2 卵巣穿刺術施行前後での排卵誘発時の直径 1.8cm 以上の卵胞数

	施行前 1 周期目	施行後 1 周期目
No.1	2 個	3 個
No.2	6 個	1 個
No.3	2 個	2 個
No.4	4 個	1 個
No.5	8 個	1 個
No.6	8 個	1 個
平均	5 個	1.5 個

 $P < 0.05$

考えられる症例に対し、黄体期後期に卵巣穿刺術を施行し、極めて良好な成績であったことを報告している。今回、我々が対象とした 6 例の PCOD は、クロミフェン+プレドニゾロン療法あるいはコナドトロピン療法により、排卵を惹起することはできるものの、OHSS の発生をみたり過剰排卵による多胎妊娠の不安を有する長期不妊症患者である。超音波ガイド下卵巣穿刺術は外科的療法のひとつに位置づけられるが、その術式は IVF-ET や GIFT のための採卵法として安全性が確立しており⁸⁾、患者への侵襲もきわめて少ない。我々も、静脈麻酔 (NLA 変法) 下に施行し、半日の入院のみで帰宅可能であった。その様な点で、本法はかなり less invasive な外科的療法といえる。しかもその臨床効果は非常に高く、今回の我々の成績においても、100 % の排卵率、33 % の妊娠率が得られ、また過剰排卵・OHSS 発生を防ぐ点でもかなり有効であった。

PCOD に対する本法の奏功機序としては楔状切除術の奏功機序と同様に、局所因子としての、卵巣白膜の抵抗減弱・androgen 産生部位の減少⁹⁾のほかに、卵胞液中の inhibin 除去¹⁰⁾が考えられており、卵巣穿刺時期は卵胞期後期でも黄体期後期と同様の成績が得られた。また前田ら^{1,2)}と同様に、本法実施後に LH-RH テストに対する LH 分泌反応の正常化が認め

表 3 卵巣穿刺術が有効であった周期数

No.1	妊娠成立
No.2	妊娠成立
No.3	3 周期
No.4	3 周期
No.5	1 周期
No.6	5 周期

られたことから、中枢因子の関与も予想される。本法は反復施行が容易であり、安全かつ簡便ではあるが、その有効期間が比較的短いことが問題であり、穿刺及び内容液を排除する卵胞数が少ないほどその傾向は著明であった。しかし、臨床的效果が高いこと、侵襲の少ないことより本法は、薬物療法が無効の場合はもちろんのこと、薬物療法が有効であっても過剰排卵・OHSS を繰り返したり、遠隔地のため頻回の外来通院が困難である難治性 PCOD に対して、有効な治療手段のひとつであると考えられた。

稿を終えるに望み、御指導・御校閲をいただきました鳥取大学産科婦人科学教室、前田一雄教授・見尾保幸講師に深謝いたします。

本論文の要旨は第 34 回日本不妊学会学術総会で発表した。

文 献

- 1) 前田一雄, 見尾保幸, 戸田稔子, 原田省: 多嚢胞性卵巣症候群に対する治療的超音波ガイド下卵巣穿刺術による排卵誘発の試み, 産婦の実際, 38: 1649, 1989
- 2) 戸田稔子, 岩部富夫, 関島秋男, 大野原良昌, 谷川正浩, 寺戸博文, 原田 省, 見尾保幸, 前田一雄: 多嚢胞性卵巣症候群に対する治療的超音波ガイド下卵巣穿刺術による排卵誘発の試み, 日不妊会誌, 34: 407, 1989
- 3) 青野敏博: PCO ホルモン動態と診断基準, 産婦, 42: 846, 1988
- 4) 正岡 薫, 北沢正文, 渡部秀哉, 熊坂高弘: GnRH 律動投与による排卵誘発: 多嚢胞性卵巣と視床下

部性無排卵症における比較, 日不妊会誌, 34: 783, 1989

- 5) 中村幸雄, 山田春彦, 吉田圭子, 生方良延, 南野智徳: hMGの律動的皮下投与法による排卵誘発—多胎妊娠の可能性の少ない排卵誘発法, 臨産婦, 43: 7, 1989
- 6) Buttram, V. C. Jr. and Vaquero, C.: Post ovarian wedge resection adhesive disease, Fertil. Steril., 26: 874, 1975
- 7) 田中俊誠, 藤本征一郎, 大河内俊洋, 及川 衛, 山本 律, 桜木範明, 守谷修而, 佐藤春美, 山口辰美, 佐藤 博, 津村宣彦, 中島敬和, 相原稔彦, 平島功二, 一戸喜兵衛: 多嚢胞性卵巣症候群を有する婦人に対する卵巣楔状切除について, 産婦の実際, 36: 219, 1987
- 8) 見尾保幸, 岩部富夫, 関島秋男, 谷川正浩, 寺戸博文, 戸田稔子, 和田 省, 岩本好吉, 菊川章仁, 前田一雄: 経膈探触子を用いた超音波採卵の有用性に関する検討, 日不妊会誌, 33: 378, 1988
- 9) Yen, S. S. C.: Chronic anovulation caused by peripheral endocrine disorders. In Yen SSC, and RB Jaffe (eds), Reproductive Endocrinology (II nd ed.), W. B. Saunders Company, 441, 1986
- 10) 森 崇英, 泰井俊造: PCO 成因と病態, 臨産婦, 42: 836, 1988

**Studies about the clinical efficacy of
transvaginal ultrasonically guided
follicular puncture in polycystic
ovarian disease**

Yoshiaki Ootani, Hisashi Okata
and Satoru Aoki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Seirei Hamamatsu Hospital, Shizuoka 430, Japan

Six patients with polycystic ovary disease (PCOD), who had no ovulation with clomiphene and had ovarian hyperstimulation syndrome or excessive ovulation with gonadotropin, received transvaginal ultrasonically guided follicular puncture on the late-follicular phase. The clinical and endocrinological effects were as follows

- (1) It was possible to stop or reduce the administration of prednisolone and human menopausal gonadotropin after the follicular puncture.
- (2) The tendency of multiple follicular growth and ovulation, seemed to be reduced after this procedure.
- (3) Two of six patients became pregnant after this method.
- (4) Serum LH values, which had been elevated and hyperreactive previously, normalized after follicular puncture.

These results indicated that follicular puncture therapy, which was done even in the late-follicular phase, was very useful for the treatment of the patient with PCOD.

(受付: 1989年12月20日)

EFFECTS OF OBESITY AND PLASMA TESTOSTERONE LEVELS ON THE REACTION TYPE OF LH-RH TEST IN PATIENTS WITH A NORMAL OVULATORY CYCLE AND POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Kazuo YOSHINO, Kentaro TAKAHASHI, Takaaki SHIRAI,
Arata NISHIGAKI, Yoshimi EDA and Manabu KITAO

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

Abstract: To investigate effects of obesity and plasma testosterone levels on the response to LH-RH test, we evaluated the pattern after LH-RH stimulation in 91 patients with a normal ovulatory cycle and polycystic ovary syndrome (PCOS). The obesity index was calculated according to the body mass index (BMI). The results were as follows: 1) The delayed reaction-type with a peak on and after 90 minutes in the LH-RH test accounted for 22.0% of 91 subjects received the LH-RH test. 2) The plasma testosterone levels, LH/FSH ratio and LH peak after LH-RH administration of PCOS were significantly higher than those with normal ovulatory cycles. 3) The rate of obesity in the delayed reaction-type was higher than that of normal reaction type and a very high rate (37.5%) was recognized in patients with PCOS. 4) The plasma testosterone levels of delayed reaction-type in PCOS were particularly high.

Therefore, it is suggested that the delayed reaction-type in the LH-RH test is connected with obesity and that there is a relationship among the delayed reaction-type, obesity and high plasma testosterone levels in patients with PCOS.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 528—532, 1990)

Introduction

The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) test has been widely used and luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) levels usually have peaks at 30 and 60 minutes respectively, after LH-RH administration. But the LH level rarely peaks on and after 90 minutes¹⁾. Takahashi et al²⁾ called this the "delayed reaction-type" and reported that this type was observed in 35% of infertile women.

Ovulatory disturbances have frequently been

observed in obese women^{3,4)} and it was reported that the delayed reaction-type in the LH-RH test was closely connected with obesity in polycystic ovary syndrome (PCOS)⁵⁾. Polycystic ovary syndrome is a very frequent LH-dependent hyperandrogenic syndrome leading to chronic anovulation⁶⁾. Paradisi et al⁷⁾ emphasized the role of body weight in the development of polycystic ovarian disease obese females, and elevated circulating androgen levels have been found in women with PCOS⁶⁾.

On the other hand, there is a correlation with an

organic lesion in the hypothalamus system⁸⁾ and a relation to an abnormal electroencephalograph⁹⁾ in patients with the delayed reaction-type in the LH-RH test. Therefore, to investigate the effects of obesity and plasma testosterone levles on the LH-RH test, we examined the pattern after LH-RH stimulation in patients with a normal ovulatory cycle and PCOS.

Materials and methods

Ninety-one Japanese (63 with a normal ovulatory cycle and 28 with PCOS), aged 22-39 year (mean 27year), were the subjects of this study. The polycystic ovary was recognized using ultrasonography¹⁰⁾.

These women were given 100μg LH-RH i. v. on day 10 after initiation of menstruation and any time in the amenorrhea subjects. Blood samples were collected before and 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after the LH-RH administration and were assayed for serum LH and FSH by the radioimmunoassay (RIA) method. The basal plasma testosterone levels were assayed, using RIA. The classification of the reaction patten in the LH-RH test in our clinic include 7 types²⁾. The delayed reaction-type was the type of the peak of LH observed on and after 90 minutes.

Body mass index (BMI) was calculated in each patient, using the following formula:

BMI= weight (kg) / height² (m²)

We studied the effects of obesity and plasma testosterone levels on the reaction of the LH-RH test, especially the delayed reaction-type.

Table 1. The number of the reaction in the LH-RH test with the patients with a normal ovulatory cycle and polycystic ovary syndrome

	Normal ovulatory cycles	Polycystic ovary syndrome	Total
Normal range	37(8)	1(1)	38(9)
Middle type-high FSH group	5(3)	2(1)	7(4)
Middle type-low FSH group	21(1)	25(6)	46(7)
Total	63(12)	28(8)	91(20)

(): No. of the delayed reaction type

Results

The delayed reaction-type accounted for 22.0% of 91 subjected to the LH-RH test, 19.0% of a normal ovulatory cycle and 28.6% of PCOS. In the pattern of the LH-RH test, the incidences of the delayed reaction-type in normal range, middle type-high FSH group and middle type-low FSH group were 23.7%, 57.1% and 15.2%, respectively (Table 1). The clinical data and hormonal profiles of patients with a normal ovulatory cycle and PCOS are given in Table 2. The BMI of PCOS was higher than that of the normal ovulatory cycles, but there were no statistically significant difference. The plasma testosterone levels, LH/FSH ratio and LH peak after LH-RH administration of PCOS were significantly higher than those in cases of normal ovulatory cycles in the normal

Table 2. Clinical data and hormonal profiles of patients with a normal ovulatory cycle and polycystic ovary syndrome (mean±S.D.)

Subjects		N	BMI	testosterone (ng/dl)	LH/FSH ratio	LH peak (mIU/ml)
Normal ovulatory cycles	normal reaction	51	20.8±3.0	64.0±28.9	2.1±0.6	97.7± 57.1
	delayed reaction	12	20.3±1.6	57.9±20.6	2.2±0.5	211.8±127.3
	total	63	20.7±2.8	62.8±25.9	2.1±0.6	138.6± 88.4
Polycystic ovary syndrome	normal reaction	20	22.3±2.5	134.9±40.2	3.5±1.7	224.4±102.9
	delayed reaction	8	23.7±5.1	137.5±41.5	3.7±1.4	278.1±160.8
	total	28	22.7±3.5	135.6±40.6	3.2±1.6	239.7±124.6

reaction-type, delayed reaction-type and total, respectively. Ninety-one patients were divided into two types, the first group had a normal body weight (BMI: 19.1-25.0) and the second group were obese (BMI: >25.0). The rate of obesity was 8.8% in all patients and the rate of PCOS (17.9%) was higher than that of normal ovulatory cycles (4.8%). In the delayed reaction-type of LH-RH test, there was no obese patient with normal ovulatory cycles, but the rate of obesity (37.5%) in case of

PCOS was the highest (Table 3).

Fig. 1. shows the plasma testosterone levels of patients with a normal ovulatory cycle and PCOS in reaction-type of LH-RH test. The plasma testosterone levels of PCOS were higher than those of a normal ovulatory cycle. In particular, the plasma testosterone levels of the delayed reaction-type in PCOS (173 ± 34 ng/dl) were significantly higher than those of the normal reaction-type in PCOS.

Table 3. Number of patients with a normal ovulatory cycle and polycystic ovary syndrome in case of normal body weight and obesity

		BMI : 19.1-25.0	BMI : > 25.0	Total
Normal ovulatory cycles	normal reaction	48(94.1)	3(5.9)	51
	delayed reaction	12(100.0)	0(0)	12
	total	60(95.2)	3(4.8)	63
Polycystic ovary syndrome	normal reaction	18(90.0)	2(10.0)	20
	delayed reaction	5(62.5)	3(37.5)	8
	total	23(82.1)	5(17.9)	28
Total	normal reaction	66(93.0)	5(7.0)	71
	delayed reaction	17(85.0)	3(15.0)	20
	total	83(91.2)	8(8.8)	91

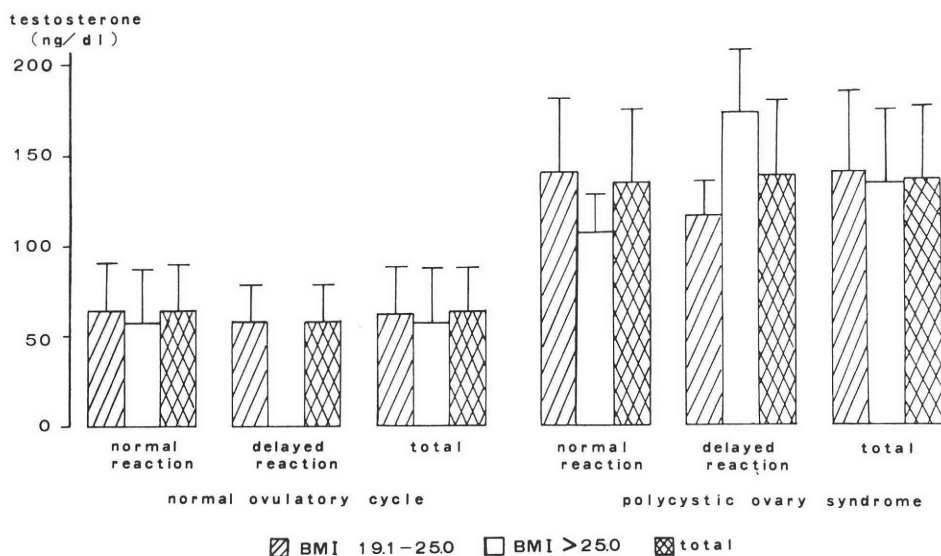


Fig. 1 Plasma testosterone levels of patients with a normal ovulatory cycle and polycystic ovary syndrome in the reaction type of the LH-RH test. The plasma testosterone levels of the delayed reaction-type in polycystic ovary syndrome (173 ± 34 ng/dl) were significantly higher than those of the normal reaction-type in polycystic ovary syndrome.

Discussion

We obtained evidence that the delayed reaction-type of the LH-RH test was closely related to obesity and high plasma testosterone levels, in patients with PCOS. The delayed reaction-type of the LH-RH test was frequently observed in patients with normal menstrual cycles and ovulatory disturbances²⁾. We reported a relationship between the body weight and ovulatory disorders in infertile patients⁴⁾. Takahashi et al.⁵⁾ suggested that the delayed reaction-type in the LH-RH test was closely connected with obesity and that there was a correlation between the delayed reaction-type and PCOS. In present study, the rate of the delayed reaction-type was seen in 22.0% of patients with a normal ovulatory cycle and PCOS. The obesity rate of the delayed reaction-type (15.0%) was higher than that of the normal reaction-type (7.0%).

Polycystic ovarian disease (PCOD) is a common ovulatory disorder with high levels of LH, low to normal levels of FSH and an abnormal LH/FSH ratio¹¹⁾. It was reported that body weight represents a discriminative factor among the various clinical entities of PCOD⁷⁾. In our data, the obesity rate (BMI: > 25.0) in case of PCOS was higher than that in cases of normal ovulatory cycles and a very high rate (37.5%) was evident in the delayed reaction-type in PCOS. On the other hand, the plasma testosterone levels of PCOS were significantly higher than those of the normal ovulatory cycles and especially in case of the plasma testosterone levels of delayed reaction-type with a BMI above 25.0 in PCOS, the levels of plasma testosterone were higher. Therefore, the present study suggests that the delayed reaction-type in the LH-RH test is linked to obesity and that a relationship exists between the delayed reaction-type, obesity and high plasma testosterone levels in patients with PCOS.

References

- 1) Kurachi, K.: Differential diagnosis of the region of ovulatory disturbances: Induction of ovulation (Nakano, R, ed), Kanahara-Shuppan, 63, 1980 (in Japanese)

- 2) Takahashi, K., Nishigaki, A., Nagata, H., Shirai, T., Yoshino, K., Shibukawa, T. and Kitao, M.: Clinical studies on the LH-RH test for patients with ovulatory disturbance-A consideration for the delayed reaction-type, Jap. J. Fert. Ster., 31: 455, 1986
- 3) Bates, G. W., Whitworth, N. S. and Bates, S. R.: Effects of body weight control on reproductive function, Fertil. Steril., 35: 248, 1981
- 4) Yoshino, K., Shibukawa, T., Araki, Y., Shirai, T., Takahashi, K. and Kitao, M.: Obesity and ovulatory disorders in infertile Japanese, Shimane J. Med. Sci., 10: 24, 1986
- 5) Takahashi, K., Yoshino, K., Shirai, T., Nishigaki, A., Araki, Y. and Kitao, M.: Correlation between the reaction-type of LH-RH test and obesity in infertile women, Jap. J. Fert. Ster., 32: 428, 1987
- 6) Yen, S. S. C.: The polycystic ovary syndrome, Clin. Endocrinol., 12: 177, 1980
- 7) Paradisi, R., Venturoli, S., Pasquali, R., Capelli, M., Porcu, E., Fabbri, R. and Flamigni, C.: Effects of obesity on gonadotropin secretion in patients with polycystic ovarian disease, J. Endocrinol. Invest., 9: 139, 1986
- 8) Kurokawa, H.: Clinical assessment of ovulatory disorder with LH-RH test, Acta Obst. Gynaec. Jpn., 26: 621, 1974
- 9) Kaneda, K., Yoshiga, T., Sawahara, M., Tagashira, T., Mio, Y., Iba, N., Iwasa, Y. and Maeda, K.: The studies on LH-RH test with respect to abnormal electroencephalographic findings in anovulatory women, Yonago Acta, Medica., 23: 1, 1979
- 10) Matsunaga, I., Hata, T. and Kitao, M.: Ultrasonographic identification of polycystic ovary, Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol., 11: 227, 1985
- 11) Hurwitz, A., Rosenn, B., Palti, Z., Ebstein, B., Har-Nir, R. and Ron, M.: The hormonal response of patients with polycystic ovarian disease to subcutaneous low frequency pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone, Fertil. Steril., 46: 378, 1986

正常月経周期婦人及び 多嚢胞卵巣症候群婦人における LH-RH テストに対する肥満と 血中 testosterone の影響について

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 白井孝昭
西垣 新 江田芳美 北尾 学

LH-RH テストの反応に対する肥満と血中 testosterone の影響を調べる為に 63 名の正常月経周期婦人と 28 名の多嚢胞卵巣症候群婦人を対象として LH-RH テストのパターンを検討した。結果として 1) LH-RH テストにおいて LH のピークが 90 分以降にみられる遅延型は全体で 22.0 % に認められた。2) 多嚢胞卵巣症候群の血中 testosterone, LH/FSH 比, LH-RH 投与後の LH のピーク値は正常月経周期に比べて有意な高値を示

した。3) LH-RH テストの遅延型での肥満の占める割合は正常反応群の肥満に比べて高い値であり、特に多嚢胞卵巣症候群ではより高い値 (37.5 %) であった。

4) 多嚢胞卵巣症候群において LH-RH テストの遅延型での血中 testosterone は特に高い値であった。以上のことより、LH-RH テストにおける遅延型は肥満と関係があり、多嚢胞卵巣症候群では LH-RH テストの遅延型、肥満そして高 testosterone 血症には関連があることが示唆された。

(受付: 1989 年 6 月 19 日)

SERUM CA-125 AS A MARKER FOR FOLLOW-UP THE RESPONSE TO DANAZOL TREATMENT IN PATIENTS WITH EXTERNAL ENDOMETRIOSIS

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

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

Abstract: To confirm that serum CA-125 is an effective marker to follow-up the response to danazol treatment in patients with external endometriosis, we serially measured serum levels of CA-125 in 35 patients with advanced external endometriosis who were treated with 400mg/day of danazol for 16 weeks. Patients were categorized into good responders and poor responders depending on the results of the second-look laparoscopy 8 weeks after danazol therapy. Changes in the CA-125 pattern were analyzed. Pattern of marker response were classified into 5 types. The changing pattern in the good-response case differed from that in the poor-response. By making use of these pattern, we can assess the response of patients with advanced endometriosis and on danazol treatment and predict a relapse.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 533—536, 1990)

Introduction

Endometriosis is a common cause of infertility. Early diagnosis and follow-up of the disease still represent a difficult challenge to the gynecologists. In endometriosis, it is often necessary to follow-up the course of disease after surgical or during hormonal therapy. Until now, laparoscopy remains to be the best method for evaluating and monitoring endometriosis. Recently, measurement of serum CA-125, a tumor marker of epithelial ovarian carcinoma, have been reported to be of potential usefulness in diagnosing¹⁻³⁾ endometriosis and in monitoring its treatment response⁴⁾.

In this study, serum levels of CA-125 in 35 patients with external endometriosis on danazol treatment were assayed for long term changes in the CA-125 pattern using the pattern we previous-

ly reported⁴⁾. We reconfirm that serum CA-125 is an effective marker to follow-up the response to danazol treatment in patients with external endometriosis.

Patients and Methods

Thirty-five Japanese women with external endometriosis (18 operated cases and 17 non-operated cases) were examined. The ages of these women ranged from 21-48 years (mean 31.6 years). All patients were diagnosed by bimanual examination, ultrasound and laparoscopy. Twenty patients were staged as stage III and 15 patients as stage IV according to the Revised American Fertility Society (Revised AFS) classification, and 400 mg/day of danazol was prescribed for 16 weeks. All were followed by ultrasound every 4 weeks for 24-40 weeks and laparoscopy was performed 8 weeks after discontinuation of danazol

therapy. Twenty four of the 35 patients classified as good-response subjects based on either complete absence of endometriosis or if there was improvement with the persistent endometriosis score less than stage III by the second-look laparoscopy. The other 11 patients had no objective improvement and no change in the endometriosis score. They were considered to have a poor-response.

Serum sampling was performed once every 4 weeks in almost all cases. The longest interval was once every 8 weeks.

Serum CA-125 levels were measured using CA-125 Radioimmunoassay Kits (Centocor, Inc., Malvern, Pa, USA). The normal range of serum CA-125 was set at under 40 U/ml, using a standard value in our clinic. Significant differences were determined by Student's t-test. Changes in patterns of serum CA-125 were analyzed.

Results

Serum CA-125 levels in all 35 patients with external endometriosis before treatment ranged from 42 to 120 U/ml; and the mean CA-125 level ($\pm$ S. D.) was 66.9 ± 20.8 U/ml. The mean CA-125 level ($\pm$ S. D.) in the 24 patients classified as a good-response and in the classified as a poor-response before treatment was 66.8 ± 21.6 U/ml and 67.3 ± 18.6 U/ml, respectively, with no significant difference. Serum CA-125 levels showed positive values (≥ 40 U/ml) in all women before treatment (Fig. 1).

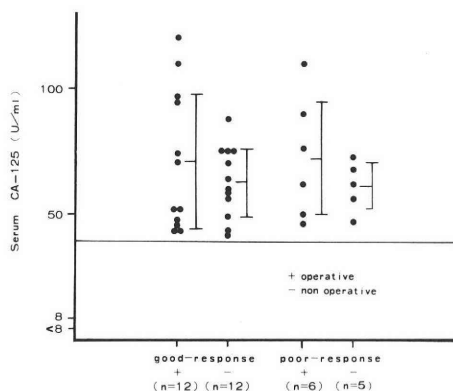


Fig. 1 Distribution of serum CA-125 levels in patients with external endometriosis before treatment.

Changes in serum CA-125 levels in 35 women with external endometriosis after the initiation of danazol therapy were found to be of 5 types, as shown in Fig. 2.

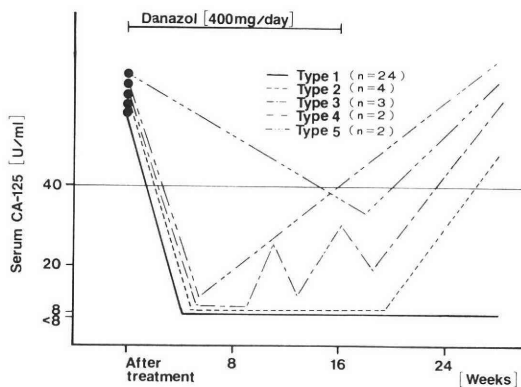


Fig. 2 A schematic picture of the changes of serum CA-125 levels in patients with external endometriosis after the beginning of danazol administration.

Before danazol administration, the serum CA-125 levels (mean $\pm$ S. D.) in Type 1, Type 2, Type 3, Type 4 and Type 5 were 66.8 ± 21.6 U/ml, 63.5 ± 16.3 U/ml, 64.7 ± 10.9 U/ml, 78.5 ± 31.5 U/ml, and 67.5 ± 5.5 U/ml, respectively.

After danazol administration, the serum CA-125 levels for almost patients rapidly decreased and was below 20 U/ml at 4-8 weeks after the initiation of therapy. The level remained low (within the range of under 10 U/ml) for over 8 consecutive weeks after cessation of danazol administration for all 24 patients with a good response (Type 1). This was not the case for the patients with a poor response. In the Type 2 pattern, as seen in 4 patients, there is an early trend toward increase to over 40 U/ml after cessation of danazol treatment. Type 3 pattern (seen in 3 patients) is typified by a transitory but repetitive increase (with the range of over 20 U/ml) in serum CA-125 and is indicative of a poor response. Type 4 pattern occurs when the serum CA 125 immediately begins to increase (after the initial decline) reaching over 40 U/ml. Type 4 was observed in only 2 patients. In Type 5 pattern (seen in only 2 patients), the serum CA-125 level do not decrease to either under 50% of the pretreatment level or

under 40 U/ml at 8 weeks after the initiation of therapy.

Discussion

Administration of danazol is an effective treatment for endometriosis, but relapse of the disease due to progress of the change a morbid state and difference of the individual sensibility to danazol is the point at issue.

Dmowski et al.⁵⁾ reported that the relapse of consciousness and internal examination condition were 39% and 33%, respectively, and Andrews et al.⁶⁾ also reported the relapse was observed on 50% of the patients treated with danazol. As a matter of course, interpretation of the efficacy for the treatment at an early stage is an important role.

We have been using CA-125 as the parameter for the prognosis of the danazol treatment and have reported⁴⁾ that it is an useful method the monitoring of the relapse. As mentioned in our preceeding report⁷⁾, the relapse cases indicated a characteristic pattern in serum CA-125 levels in the analysis of individual patients with the passage of time. But, it was realized in our continuous study that some cases showed poor response and/or sensibility to danazol, although the patients were not the relapse cases.

We, therefore, considered that the addition of a new pattern to the CA-125 changes is needed in this paper. In short, the patients who have poor efficacy of the treatment, or who have risk of the relapse, indicate four characteristic pattern of serum CA-125 levels in the course of danazol treatment, therefore, the monitoring of CA-125 in sera during and immediately after the treatment would be effective for prognosis of endometriosis patients treated with danazol.

In summary, if the serum level of CA-125 remains under 20 U/ml for 8 weeks or more after discontinuation of danazol, then a good response can be predicted. In contrast, if CA-125 levels show a tendency to increase after discontinuation of danazol therapy and indeed exceeds 40 U/ml, then poor-response or relapse should be suspected and re-treatment may become necessary. With Types 3, 4 and 5 patterns, the treatment can be

expected to be ineffective and it is desirable to prolong the duration of treatment with danazol and to increase the dose. Indeed, the patient with Type 4 and Type 5 patterns may not respond to danazol and other method of treatment should probably be considered.

References

- 1) Takahashi, K., Kijima, S., Yoshino, K., Shibukawa, T., Murao, F. and Kitao, M.: Differential diagnosis between uterine myoma and endometriosis using CA 125 as a tumor marker of ovarian carcinoma, *Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol.*, 12: 99, 1986
- 2) Takahashi, K., Yamane, Y., Kijima, S., Yoshino, K., Shibukawa, T. and Kitao, M.: CA 125 antigen is an effective diagnostic for external endometriosis, *Gynecol. Obstet. Invest.*, 23: 257, 1987
- 3) Takahashi, K., Kijima, S., Yoshino, K., Shibukawa, T. and Kitao, M.: Serum CA 125 as a marker for patients with external endometriosis, *Int. J. Fertil.*, 34: 143, 1989
- 4) Takahashi, K., Yoshino, K., Nagata, H., Kusakari, M. and Kitao, M.: CA-125 is an effective marker for patients with external endometriosis and on danazol: case reports, *Fertil. Steril.*, 50: 173, 1988
- 5) Dmowski, W. P. and Cohen, M. R.: Antigonadotropin (Danazol) in the treatment of endometriosis. Evaluation of post treatment fertility and three year follow up data, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 130: 41, 1978
- 6) Andrews, W. C. and Larsen, G. D.: Endometriosis: Treatment with hormonal pseudo-pregnancy and/or operation, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 118: 643, 1974
- 7) Takahashi, K., Yoshino, K., Kusakari, M., Katoh, S., Shibukawa, T. and Kitao, M.: Prognostic potential of serum CA 125 levels in danazol-treated patients with external endometriosis: a preliminary study, *Int. J. Fertil.*, (in press)

血清 CA 125 を用いた ダナゾール療法の効果判定

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 吉野和男 草刈万寿夫
内田昭弘 北尾 学

外性子宮内膜症患者におけるダナゾール療法の効果判定に血清 CA 125 が有用であるかどうかを確認するために、ダナゾール 400 mg/日を 16 週間投与した 35 名の外性子宮内膜症患者で血清 CA 125 値を分析した。なお、治療終了後 8 週目での腹腔鏡検査の結果により、

効果良好症例と不良症例とに分類した。その結果、血清 CA 125 の変化は 5 つのタイプに分類可能であり、効果良好症例の反応パターンは不良症例のパターンと明らかな差異が認められた。以上より、ダナゾール治療において血清 CA 125 の経時的な変動パターンを観察する事は、その効果判定に役立つと思われる。

(受付：1989 年 12 月 2 日)

排卵誘発時の性ステロイドホルモンと血中 ハプトグロビン値の相関性について

Correlation between Sex Steroid Hormones and Serum Haptoglobin Levels during Follicular Stimulations

東邦大学医学部第1産婦人科学教室

久保 春海

Harumi KUBO

臼井 彰

Akira USUI

安部 裕司

Yuji ABE

片山 進

Susumu KATAYAMA

雀部 豊

Yutaka SASABE

黄 傳益

Chuang-Yi HUANG

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

東邦大学医学部免疫学教室

森田 香

Kaoru MORITA

Department of Immunology,
Toho University School of Medicine

不妊症患者20例を対象としIVF-ET/GIFT施行前周期に卵胞刺激をおこない、その反応性を調べるために、各性ステロイドホルモンとともに血清中ハプトグロビン (Hp) を測定した。これにより、卵胞成熟と血中 Hp 値に相関性が認められるかどうかを性周期各期に分けて検討した。さらに、排卵誘発時の過剰刺激や採卵操作による卵巣癌や腹腔内感染などのリスクに対する予知マーカーとして Hp の意義を検討した。

E₂ と Hp 値の間には卵胞期中期から排卵期にかけて、それぞれ $r = -0.674$ と $r = -0.564$ と負の相関関係が認められたが、排卵期初期および黄体期では相関関係は得られなかった。T と Hp 値の間には卵胞期中期と黄体期にそれぞれ $r = -0.5858$ と $r = -0.6598$ と負の相関関係が認められたが、排卵期初期および排卵期には相関関係は得られなかった。また、P と Hp 値の間には全周期を通して相関関係は認められなかった。

血中 Hp 値は卵胞期中期から排卵期にかけて、E₂ 値の増加と負の相関を示すことから、排卵誘発時の卵胞成熟マーカーとしての可能性が示唆された。

Hp 高値 (250 mg/dl) 群に炎症や悪性腫瘍などのリスク発生は6カ月の予後観察では認められなかったが、さらに長期予後を検討中である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 537-541, 1990)

緒 言

ハプトグロビン (Hp) は α_2 グロブリン分画に属するヘモグロビン (Hb) 結合性蛋白であり、主に赤血球異化作用の円滑化をつかさどる血漿蛋白成分である。Hp は α -鎖の構造上の差異によって、3 型に分類されており、血清中における型別の Hp 含有率には個人差が著しいことが知られている。Hp は肝臓内で合成されることから、肝障害があると Hp が減少するであろうことは容易に推測できる。また、種々の感染症や悪性腫瘍において病態の推移と共に血清中 Hp 量が増加することも報告されており^{1,2)}、その診断上役だっている。血清中 Hp 量の性差は 15 歳未満の若年女性ではやや高値を示す傾向があるといわれているが、成熟婦人では男性と比較して有意差は認められない。これは成熟婦人の場合、血清中 Hp 量は性周期により変動するためと考えられている。Nyman は血中 Hp 量が排卵期に低下し、月経期に上昇するところから性ステロイド、特にエストロゲンの環境下における合成代謝系の支配があることを示唆した³⁾。そこで、今回われわれは各種の排卵誘発法を施行している不妊症例を対象として、排卵誘発時における性周期各期の血清中エストラジオール (E_2)、プロゲステロン (P)、テストステロン (T) 量を測定して、これらのステロイドホルモン量と Hp 値の相関関係を検討した。また、近年、体外受精における採卵時の排卵誘発によって合併症とくに卵巣癌やその他の性器癌のリスクが危惧されている⁴⁾。そこで排卵誘発時の Hp 量の変動がこれらのリスクに対する予知マーカーとなり得るかどうかの可能性も併せて検討した。

対象および方法

対象は当科不妊外来患者で IVF-ET, GIFT 法などを施行予定症例 20 例を対象とし、排卵誘発法の検討のための卵胞発育の反応性を観察した周期における各卵胞期初期、中期、排卵期、黄体期に採血した血清を測定用試料とした。排卵誘発法はクロミッド-hMG-hCG 10 例、クロミッド-hCG 6 例、hMG-hCG 4 例である。対象症例の主な不妊原因は卵管性不妊 8 例、重症子宮内膜症 5 例、高度乏精子症および精子無力症 4 例、原因不明不妊 3 例の計 20 症例であった。

Hp の測定には、血漿蛋白定量用免疫拡散板 (パルチゲンプレート, Hoechst) による single radial immunodiffusion (SRID) 法を用いた。すなわちヒト Hp と特異的に反応する抗血清を均等に含有するアガロースゲルプレートの抗原孔に蛋白標準血清および

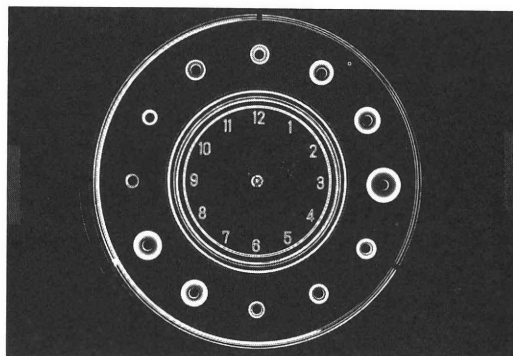


写真1 パルチゲンプレートによる沈降輪

被検血清を各々 5μ ずつ添加した。反応時間は室温にて 48 時間振動を避け、水平状態で静置後、拡散により形成された沈降輪の直径をパルチゲン測定器で 0.1 mm の単位まで実測した。Hp には遺伝的に異なる 3 種の型があり Hp を正確に定量するためには型別の補正が必要である。このため、Hp 型、1-1 型、2-1 型、2-2 型のそれぞれの実測値に対応して、それぞれ、0.6, 1.3, 1.5 の係数を乗じることによって補正值とした。性ステロイドの測定は同一試料を用いて 2 抗体 RIA 法によって行なった。すなわち E_2 分画の測定に際しては相互の特異性が低いため、Sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィーにより E_2 部分を分画採取し、1/2 量に E_2 -H³10,000 dpm を添加して N₂ ガス下で蒸発乾固した。抗血清は E_2 -6-オキシム BSA 抗体を 1 : 5×10^4 倍に希釈して用い、50 % 硫酸 0.25 ml を添加後 10 分間室温放置、4℃、3,000 RPM、10 分間遠心して B 部分と F 部分を分離した。この上層 B 部分 0.2 ml に対しジオキサンシンチレーター 8 ml を加え、液体シンチレーションカウンターで dpm をカウントした。dpm 測定値を Emmet の式にもとずいて血漿 1 ml 中の非結合型 E_2 濃度として算定した。この測定方法による回収率変動係数は 9.7 % 以下であり信頼性は充分であった。

成 績

図 1 における星印は卵胞期初期群 ($n = 22$ 周期) の E_2 と Hp 値を示している。 E_2 平均値は 58.8 ± 33.6 pg/ml ($m \pm SD$) と低値を示したのに対して、Hp 値は 120.0 ± 82.1 mg/dl と変動が大きく、この時期における血中 E_2 -Hp 両値間には Nyman が指摘したような負の相関関係は成立していなかった。この時期における血中 T 値は 0.56 ± 0.14 ng/ml、血中 P 値 0.86 ± 0.24 pg/ml であり E_2 と同様に Hp との負相関

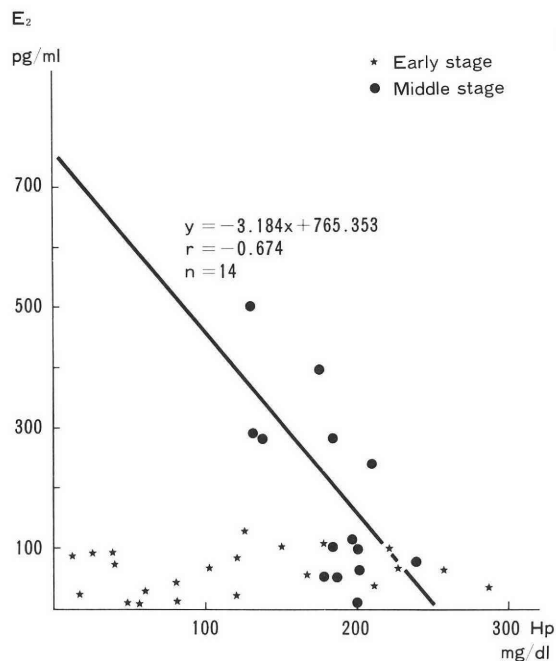


Fig. 1 The correlation of serum haptoglobin and estradiol levels in follicular phase.

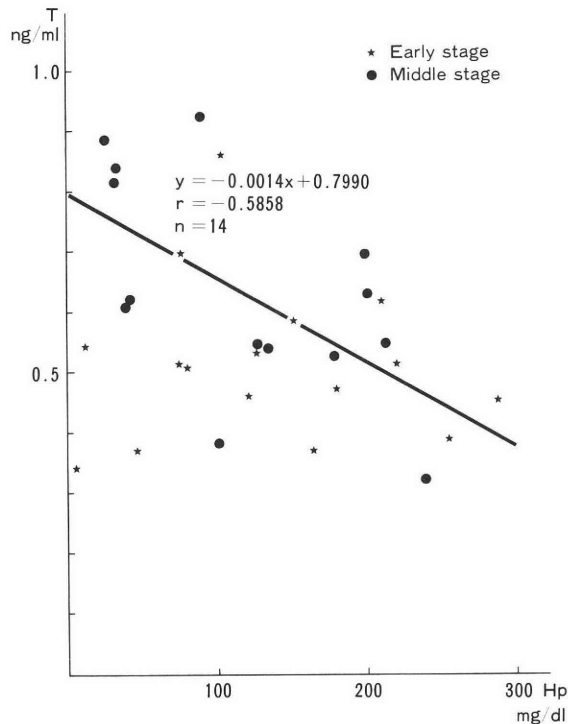


Fig. 2 The correlation of serum haptoglobin and testosterone levels in follicular phase.

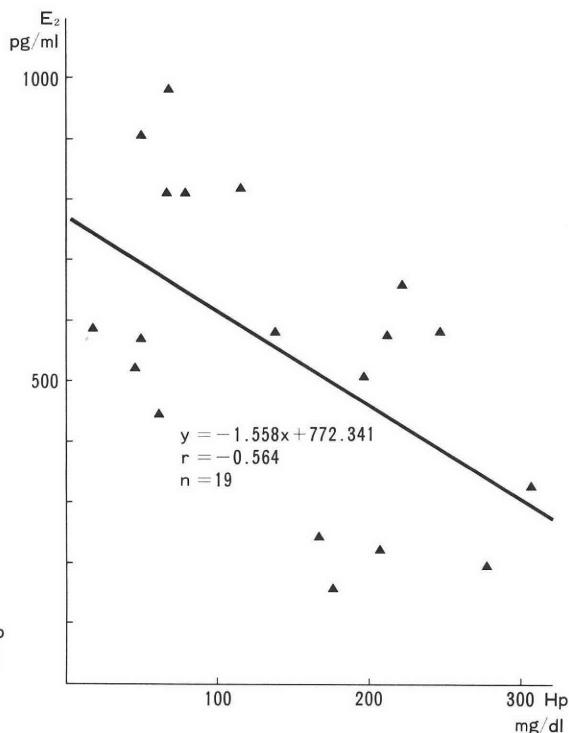


Fig. 3 The correlation of serum haptoglobin and estradiol levels in ovulatory phase.

は認めなかった。これにたいして卵胞期中期群（黒丸●印、14周期）では E_2 平均値 183.4 ± 148.3 pg/ml, Hp 平均値 181.9 ± 31.6 mg/dl であった。この両者間に対して $r = -0.674$ と比較的高い負の相関が認められた (Fig. 1)。また、血中 Hp と T 値間においても同様に $r = -0.586$ と負の相関が認められた (Fig. 2)。しかし、血中 P 値 (1.8 ± 1.5 ng/ml) と Hp 値間には卵胞期初期群と同様に相関関係は認められなかった。

つぎに排卵期群 ($n = 19$ 周期) における E_2 平均値は 670.1 ± 165.0 pg/ml であり、Hp 平均値 111.2 ± 77.6 mg/dl との間に $r = -0.564$ とやはり負の相関が認められた (Fig. 3)。しかし、血中 T-Hp 値間には負の相関関係は消失しており (Fig. 4)、血中 p-Hp 値間にも負相関は認められなかった。

黄体期群 ($n = 18$ 周期) においては E_2 -Hp 両値間の相関係数は $r = -0.269$ と極めて低く、負の相関は認められなかった (Fig. 5)。これに対して血中 T-Hp 値間には $r = -0.660$ ($n = 16$) と排卵期に消失した負の相関関係が再び認められた (Fig. 6)。P-Hp 値間では P 値 12.7 ± 17.1 ng/ml と高値を取り変動が著しかったが、相関性は認められなかった。

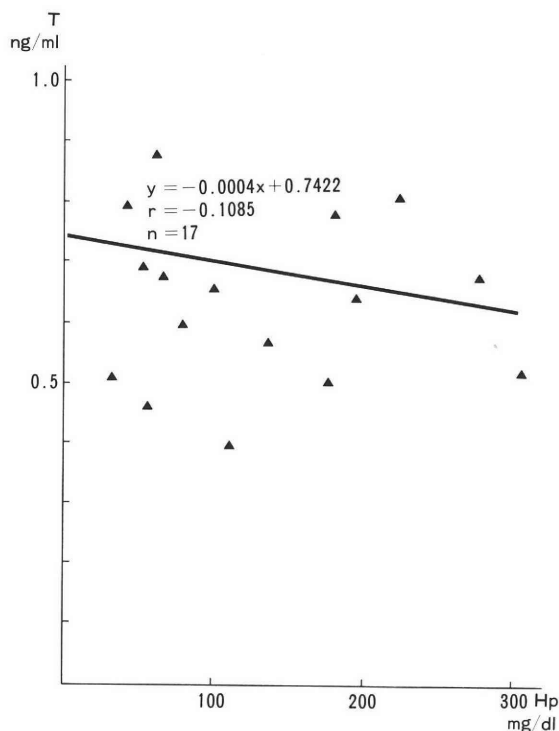


Fig. 4 The correlation of serum haptoglobin and testosterone levels in ovulatory phase.

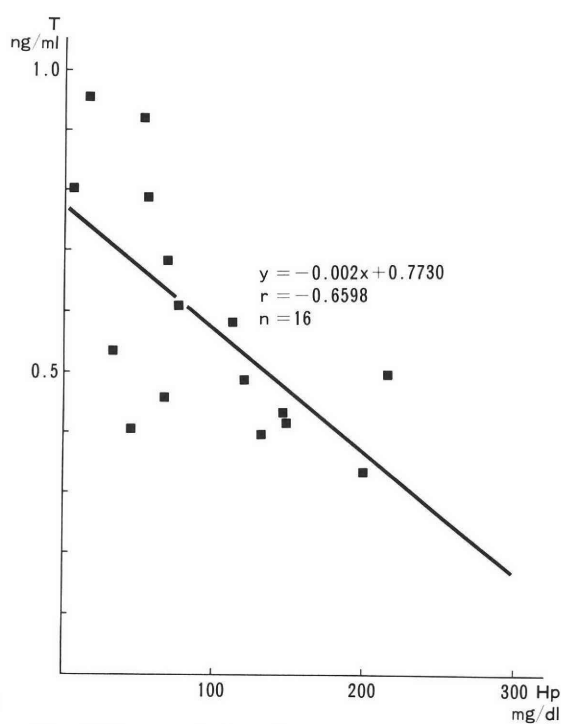


Fig. 6 The correlation of serum haptoglobin and testosterone levels in luteal phase.

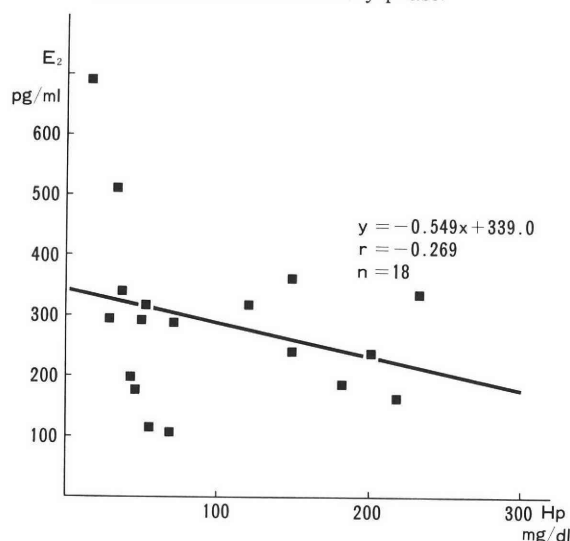


Fig. 5 The correlation of serum haptoglobin and estradiol levels in luteal phase.

考 察

血清中の Hb 結合性蛋白質である Hp は 1938 年に Polonovski et al⁵⁾ によって発見された α_2 -globulin に属する糖蛋白である。 α -鎖, β -鎖の 2 種類のポリペプチド鎖から成っており, そのうち α -鎖の組成

の違いにより電気泳動による移動度が異なる α^1 , α^2 , α^3 鎖に分けられ, それら 3 種の組合せにより 1-1, 2-1, 2-2 の 3 型に分類されている。その多型性の存在によって, 臨床医学のみにとどまらず法医学などの分野にも広く応用されている。血中 Hp は新生児期にはほとんど検出できない程度であるが, 成長するにしたがって産生部位である肝臓機能の成熟にともない順次増加する。生後 3~12 カ月には成人値にまで達し, その後は年齢とともにやや増加するといわれている⁶⁾。しかし, 血清中 Hp 量には個体差があり, 正常日本人の Hp 量は報告者により 30~190 mg/dl (村井⁷⁾), 100.9~227.1 mg/dl (大城⁸⁾), 79.1~223.7 mg/dl (森田⁹⁾) とかなりの幅が認められる。性差については Nyman は男性 113 ± 43 mg/dl, 女性 90 ± 30 mg/dl と男性がやや高値を示していると述べている。しかし, 森田らは正常健康日本人を若年群 (15 歳未満), 成人群 (15 歳以上) とに分けて Hp 値を検討した結果, 成人群では男性 186.1 ± 57.1 mg/dl ($n=30$), 女性 175.4 ± 71.6 mg/dl ($n=32$), $P>0.1$ と有意差を認めなかったのに対して, 若年群では男性 103.7 ± 48.7 ($n=31$), 女性 140.7 ± 79.7 mg/dl ($n=31$) $P<0.05$ と女性の方がむしろ高値を示した。Nyman によれば女性の Hp 値は性周期に関連して 20~40 mg/dl の間で変動し, 特に血中

エストロゲン値と負の相関性を示すと述べている。このことからすれば思春期以前の若年女性においてHp値が男性に比較して高値をとるのは血中エストロゲン低値のためとも考えられる。今回われわれが検討した不妊患者の排卵誘発時における血中Hp値と各ステロイドとの相関性については比較的高値をとる卵泡期中期から排卵期にかけてE₂値とHp値の間に負の相関関係があることを認めた。この結果Nymanの女性Hp値は性周期に関連し、E値と負の相関を示すという報告と部分的には一致したが、彼がステロイドホルモンの減少と同時に子宮内膜の組織崩壊が起こりHp値が上昇すると主張した卵泡期初期(月経期)および黄体期の成績とは一致しなかった。一方、血中Tは Δ^4 -pathwayの終末産物で、E₂への前駆物質であり、卵泡期から排卵期にかけてやや増加するものの女性では血中濃度は微量である。このためHpとの安定した相関関係は得られずE₂と同様に卵泡期初期で認められなかったが卵泡期中期での負の相関関係が認められたものの排卵期においては相関性が得られず、黄体期において再び負の相関が認められた。以上の結果から血中エストロゲン量が著増する卵泡期中期から排卵期にかけてHp量は減少するという負相関が明らかことから、排卵誘発時において、卵泡成熟モニターの血中マーカーとすることが可能である。また血清Hpの増加傾向を示す疾患としては悪性腫瘍、急性骨髄性白血病、膠原病、炎症性疾患等があげられている。悪性腫瘍での高Hp血症は生成亢進や組織破壊によるものと考えられ、炎症性疾患におけるHp増加は急性相における反応物質として一過性の生成亢進状態を示唆している。IVF/GIFTなどにおける採卵時に正常卵巣に対する過剰な卵泡刺激は時として高エストロゲン血症を誘発し、卵巣癌など悪性腫瘍発生のリスクが高いといわれている。このためわれわれは今回Hp量が250 mg/dlを越えた3症例について、細胞診、超音波断層法、血中腫瘍マーカーを追跡調査中であるが、6カ月以上経過した症例にも現在異常を認めない。今後、症例を増やすことによってHp高値が悪性化予測マーカーとなり得るかどうか検討する予定である。

文 献

- 1) 大石孝, 野村雪光, 斎藤勝: 胎児, 新生児感染の早期発見, 特にそのスクリーニングについて, 臨産, 35: 256, 1981
- 2) 星田昌博: 諸疾患における血清 Haptoglobin 量の変動, 慶応医学, 40: 203, 1963
- 3) Nyman, M.: Serum haptoglobin, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 11: 1, 1959
- 4) Wagner, M. G., St-Clair, P. A.: Are in-vitro fertilization and embryo transfer of benefit to all? Lancet ii, 1027, 1989
- 5) Polonovski, M. and Jayle, M. F.: Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine, C. R. Soc. Biol., 129: 457, 1938
- 6) Jayle, M. F. and Boussier, G.: Les seromucoides du la substance fondamentale du tissu conjonctif, Exp. Ann. Biochim. Med., 17: 157, 1955
- 7) 村井京子: Haptoglobin 型に関する遺伝学的研究, 人類遺伝誌, 5: 205, 1960
- 8) 大城孟: 血漿蛋白とその異常 E: ハプトグロビン, 日本血液学全書新版 8, 血漿蛋白と免疫グロブリン, 71, 新版日本血液学全書刊行委員会編, 丸善, 1981
- 9) 森田香, 水落勝明, 佐藤重雄: 正常ならびに病的状態におけるハプトグロビン値について, 日法医誌, 38: 177, 1984

Correlation between Sex Steroid Hormones and Serum Haptoglobin Levels during Follicular Stimulations

Harumi Kubo, Akira Usui Yuji Abe,
Susumu Katayama, Yutaka Sasabe,
and Chuang-Yi Huang

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

Kaoru MORITA
Department of Immunology
Toho University

Twenty cases undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) were studied for the correlation between sex hormones and serum haptoglobin level. There was negative correlation between estradiol and haptoglobin level in middle follicular and ovulatory phases ($r = -0.674$ and -0.564 respectively), whereas no correlation in early follicular and luteal phases. Negative correlation between testosterone and haptoglobin level was present in middle follicular and luteal phases ($r = -0.5858$ and -0.6598 respectively) but absent in early follicular and ovulatory phases. No correlation between progesterone and haptoglobin level was found throughout the cycles. Our data suggest that the fluctuation of haptoglobin level deserve further study as possible marker of follicular maturity during ovarian stimulation.

(受付: 1989年11月24日)

子宮卵管造影剤としてのイソビストの使用効果

Isovist as a Contrast Agent for Hysterosalpingography

京都府立医科大学産婦人科学教室

大野 洋 介	田 村 秀 子	北 脇 城
Yohsuke OHNO	Hideko TAMURA	Jo KITAWAKI
田 村 尚 也	福 岡 正 晃	伊 藤 良 次
Takaya TAMURA	Masaaki FUKUOKA	Ryoji ITOH
	岡 田 弘 二	
	Hiroji OKADA	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of
Medicine, Kyoto 602, Japan

非イオン性水溶性 6 ヨード X 線造影剤であるイソビストを、不妊症婦人を中心に 20 例の子宮卵管造影検査に用い、その有用性、安全性について検討した。

造影効果については従来の水溶性造影剤であるエンドグラフィンに劣らず、全例においてそのコントラストは診断に十分と考えられた。また腹腔鏡検査を行ないえた症例での診断は、造影による診断とほとんど同一であった。検査中の腹痛は 5 例に、また検査後の腹痛が 3 例にみられた。これらの症例はなんらかの婦人科疾患を有するか、または卵管疎通性に問題のある症例であった。検査後の発熱が 2 例にみられたが、一過性であった。臨床検査値にも使用前後で異常値はみられなかった。

以上よりイソビストは子宮卵管造影剤として有用であり、またその安全性についても十分な観察下にあれば問題はないと考えられた。

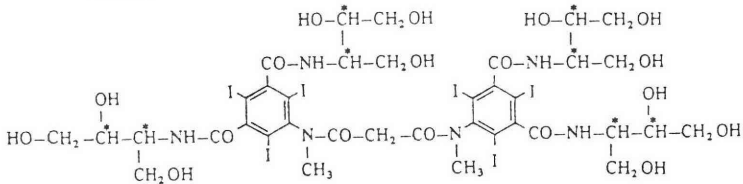
(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 542—546, 1990)

緒 言

当科における不妊症婦人の卵管因子の占める割合は全不妊原因の 11.9 % (1986 年) から 16 % (1987 年), 20 % (1988 年) と増加傾向にあり、排卵障害、男性因子に次いでいる。もちろん卵管疎通性検査としての腹腔鏡検査の頻度増加にともなう診断技術の向上が、当科における卵管因子診断の増加の一因でもあるが、STD や子宮内膜症による卵管性不妊症の増加も関与していると考えられる。子宮卵管造影検査 (HSG) は不妊症患者の卵管疎通性検査として現在最も多用されている。しかしながら HSG は検査中、検査後に疼痛や発熱を伴うことがある。これは主に

造影剤に起因すると考えられ、特に現在多くの施設で用いられている水溶性ヨード造影剤エンドグラフィンは高浸透圧性造影剤であるため、検査後に激しい腹痛と発熱を訴える例があることが知られている。今回検討した造影剤イソビスト (一般名イオトロラン) は非イオン性水溶性 6 ヨード X 線造影剤で、2 量体構造のため高濃度水溶液 (300mgI/ml) でも高浸透圧を示さず血液とほぼ等張である。この等張性に着目し、子宮卵管造影剤としての応用が試みられている。われわれはこのイソビストを、主に挙児希望婦人の卵管疎通性検査としての HSG に応用し、その安全性、有用性について検討したので報告する。

表1 使用造影剤

製 剤 名	イソビスト300
一 般 名	iotrolan
組 成 (mg/ml)	640.75
使 用 剤 型	10ml バイアル
ヨード含量 (1 ml 中)	300mg
粘 度 (cp. 37°C)	9.2
浸透圧比 (対生食比)	約 1
pH	6.5～8.0
構 造 式	・ 不斉炭素 

方 法

平成元年3月から7月までの間に、挙児希望婦人18例と子宮筋腫、卵巣嚢腫の各1例を対象としHSGを実施した。子宮腔内にFoley 8号バルーンカテーテルを挿入し、約1.5mlの滅菌生理食塩水にてバルーンをふくらませ、これを通して造影剤を透視下に用手的に注入した。使用造影剤はイソビスト300で本剤は1ml中にヨードとして300mgを含有している(表1)。造影効果の判定はそれぞれ子宮、卵管および腹腔(拡散像)の各部位について、+++：コントラストが良く、診断が可能なもの、++：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、診断が可能なもの、-：コントラストが悪く、診断不可能なもの、x：判定できず、の判定基準により評価した。腹痛については、検査中は被験者の訴えを、また検査後の腹痛発現状況については自己記録表を持ち帰らせ記入させた。自己記録表には同時に検査日の夕食後、就寝前、翌日の起床後、そのほか、熱ぼく感じた時の体温を記録させた。従来当科ではHSGの前処置として、ブスコパン1Aの投与を、また撮影後は鎮痛剤および抗生物質の内服を処方していた。しかしながら今回の検討では原則として前投薬は行なわず、また撮影後の内服処方を行なうものの、被験者には耐えがたい腹痛の出現した場合のみ鎮痛剤を服用するように指示した。

成 績

表2に対象症例の背景および造影剤の総使用量、

表2 背景

症 例 数	20
性 別	女 20
年 齢	20～29 5 30～39 10 40～44 4 52～ 1
	平均±S.D. 34.15±6.41 Min～Max 27～52
体 重	平均±S.D. 50.55±6.38 (kg) Min～Max 43～64
合 併 症	無 18 有 2
既 往 歴	無 14 有 6
アレルギー歴	無 16 有 4
総 使 用 量	平均±S.D. 9.38±2.42 (ml) Min～Max 2.5～15
前 投 薬	無 17 有 3
鎮 痛 剤	無 16 有 4

前投薬の有無，検査後鎮痛剤の服用の有無についてまとめた。イソピストの造影効果は子宮，卵管および腹腔内のいずれも診断が可能であり，総合評価においても 20 例中 19 例が++以上と，その診断が容易であった(表 3)。対象症例中の不妊症婦人 3 例に

表 3 造影効果

	+++	++	+	-	×	計
子 宮	11	8	1			20
卵 管	10	7	3			20
腹 腔 内	9	8	1		2	20
総 合	10	9	1			20

+++：コントラストが良く，診断が容易なもの

++：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，診断が可能なもの

－：コントラストが悪く，診断不可能なもの

×：判定できず（卵管閉塞など造影剤以外の原因のため）

後日腹腔鏡検査が行なわれている。この 3 例について，HSG 所見および腹腔鏡所見を比較してみた。

症例 1 は HSG にて両側卵管はコントラストも良く造影されており，左卵管からは腹腔内への拡散像も観察されていた。しかしながら右卵管は膨大部付近まで造影されているが腹腔内への拡散がみられなかった(写真 1)。HSG 後の診断は右卵管通過障害，

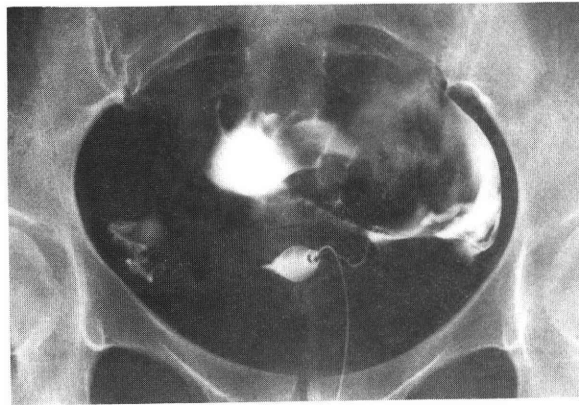


写真 1 症例 1 の HSG

同周囲癒着の疑いであった。本症例の腹腔鏡所見は通色素検査にて右卵管不通過，卵管や子宮に癒着所見なく，子宮内膜症もみられなかった。

症例 2 は左卵管妊娠の既往があり，HSG にて左卵管欠損，右卵管通過障害の診断であった(写真 2)。腹腔鏡検査にても同様に左卵管は欠損し，右卵管不



写真 2 症例 2 の HSG

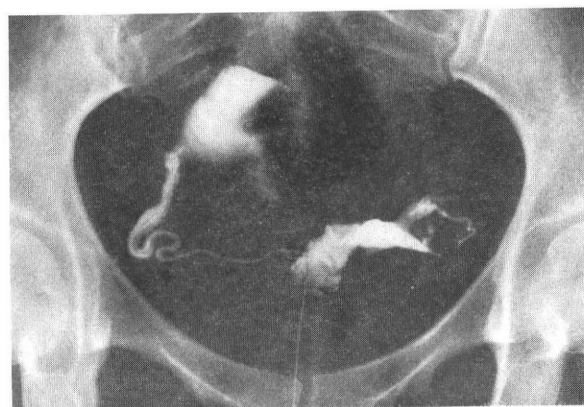


写真 3 症例 3 の HSG

通過の所見がみられた。

症例 3 は虫垂切除術の既往があったが，HSG にて子宮，卵管に異常を認めず，卵管の疎通性も良好と考えられた症例である(写真 3)。不妊期間が長く，年齢も 34 歳であることから腹腔鏡検査を行なった。腹腔鏡所見は HSG 所見と同様，子宮や卵管に異常を認めず，卵管の疎通性も良好であった。このように HSG 所見は腹腔鏡所見とほとんど変わらず，イソピストによる造影診断における有用性を示していた。検査中の腹痛は中等度の腹痛を訴えたものが 5 例見られた。このうち 2 例は卵管通過性に異常が見られ，1 例は子宮筋腫，1 例は子宮内膜症で，造影剤との関連を疑わせたのは，残る 1 例のみであった。検査後の腹痛も 17 例が無し，または軽度腹痛のみで，鎮痛剤を服用したのは 3 例のみであった(表 4)。検査後の腹痛にて鎮痛剤を服用した症例は，検査中の腹痛を訴えた 5 例のうちの 3 例で，子宮筋腫，子宮内膜症の各 1 例が含まれていた。造影後の副作用について表 5 にまとめた。投与前後の血液一般検査，血液生化学検査についても検討したが，異常値を認め

表4 腹痛

	な し	軽度疼痛	中等度疼痛	激しい疼痛	計
造影剤注入中	7	8	5		20
検査後	8	9	1	2	20

[検査後腹痛の判定基準]

軽度疼痛：薬の必要を全く感じなかったもの

中等度疼痛：薬を飲んだが、寝込むほどのものでないもの

激しい疼痛：薬を必要とし、寝込むか病院に連絡したもの

表5 副作用

症 例 数	20
発 現 例 数	5
種	
腹 痛	4
発 熱	2
頭 痛	1
類	
下 痢	1

た症例はなかった。

考 察

子宮卵管造影検査（HSG）は不妊症婦人における卵管疎通性検査として現在もっとも頻繁に用いられている。しかしながらHSGにたいする不妊症婦人の評判は、検査中や検査後の腹痛、発熱などの副作用により、決してよいものではない、われわれも検査中の疼痛を少しでも軽減させるべく、注入器具のバルーンカテーテルへの変更、透視下注入操作による造影剤使用量の低減などを試みてきた。また一方では新しい卵管疎通検査としての超音波観察下の通水検査法の開発^{1,2)}や、不妊症婦人にたいする腹腔鏡検査の積極的な導入等によって、HSGの実施回数を減少させる努力も行ない、それなりの効果もあげてきた²⁾。しかしながら超音波通水法はやはりその診断能ではHSGに劣るといわざるをえない。腹腔鏡検査についても、これを卵管疎通性検査のスクリーニング検査とするのは現在のところ不可能である。

そこで造影剤による副作用を少しでも軽減させるべく、現在脊髓撮影に用いられているイソピストの子宮卵管造影への応用について、今回不妊症婦人のHSGを中心に検討した。造影効果については、従来使用していたエンドグラフィンとなんら変わりなく、造影効果が悪く診断が不可能な症例は1例もなかった。また粘度の違いによる使用上の問題もみられなかった。問題の疼痛については検査中の腹痛が5例、検査後の腹痛が3例にみられた。これらの症例について検討すると1例を除き、なんらかの婦人科疾患

を有するか、または卵管疎通性に問題のある症例であった。残る1例はすでにバルーン挿入時より痛みを訴えていた症例で、本症例の造影剤使用量は2.5mlと少なく、造影剤による疼痛か、バルーンの挿入によるものか明らかでなかった。同期間に卵管疎通性のスクリーニング検査としての超音波通水（HSGと同様にバルーンを使用）が35例に対し行なわれているが、検査中に中等度の痛みを訴えたものはわずかに3例で、また検査後の腹痛や発熱を訴えた症例はみられなかった。このことからやはりイソピスト使用中または使用後の腹痛や発熱はイソピストとの関連が疑われた。

本剤はその浸透圧が低いことが特徴のひとつで、このことが検査中、後の腹痛の減少を期待する根拠でもある。しかしながら低浸透圧造影剤がこれらの腹痛軽減に効果があるのかどうかよくわかっていない³⁾。百瀬らはイソピスト使用によるHSGの副作用は1例もなかったとしているが⁴⁾、我々の検討では腹痛、発熱、頭痛、下痢といった造影剤によると思われる副作用が5例にみられた。発熱例は2例とも一過性で、うち1例は腹痛もあったために解熱鎮痛剤を服用した。この数字がエンドグラフィンに比して多いか、少ないのかこれだけの症例で論ずることはできない。しかしながら今回の検討では予防的な鎮痙剤や鎮痛剤の投与を原則として行なわなかったにもかかわらず、患者の腹痛、発熱といった副作用の発現頻度が少なく、またその副作用も一過性で軽度なものであった。被験婦人における訴えも少なく、全体を通じての使用感も好ましい印象であった。

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) Winfield, A. C., Maxson, W. S., Harding, D. R., Diggs, J. and Wentz, A. C.: Hexabrix as a

contrast agent for hysterosalpingography, Invest. Radiol., 19: S389, 1984

- 4) 百瀬和夫, 古川隆正, 松島弘充, 町沢一郎, 竹下直樹: 子宮卵管造影, 最近の進歩, 臨放, 33: 1507, 1988

Isovist as a contrast agent for hysterosalpingography

Yohsuke Ohno, Hideko Tamura, Jo Kitawaki,
Takaya Tamura, Masaaki Fukuoka,
Ryoji Itoh, and Hiroji Okada

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University
of Medicine, Kyoto 602, Japan

A non-ionic water-soluble hexa-iodinated contrast medium Isovist was used for hysterosalpin-

gography mainly in women with infertility to examine its usefulness and safety. The visualization effect was comparable to that of the conventional water-soluble contrast medium Endografin. The contrast was considered to be sufficient for diagnosis in all cases. In patients in whom laparoscopy could be performed, the findings were nearly consistent with those by Isovist. Abdominal pains during and after examination were complained of by five and three cases, respectively. These cases had any gynecological disease or had tubal stenosis. Fever occurred in two cases after examination, either of which was transient. No abnormal clinical test finding was observed before and after examination.

To conclude, Isovist is useful as a contrast medium for hysterosalpingography and considered to be safe if patients are put under sufficient observation by a doctor.

(受付: 1989 年 11 月 10 日)

卵管性不妊症と Chlamydia trachomatis 感染に関する検討

Tubal Infertility in Relation to Previous Chlamydia Infection

愛知医科大学産婦人科学教室

野口昌良 岡本俊充 稗田茂雄
Masayoshi NOGUCHI Toshimichi OKAMOTO Shigeo HIEDA
正橋鉄夫 藪下廣光 中西正美
Tetsuo MASAHASHI Hiromitsu YABUSHITA Masami NAKANISHI

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

不妊症治療の目的で受診中の患者 67 名の抗クラミジア IgG, IgA, IgM 抗体を測定した。IgG については 1280 倍陽性と高値を示すものまで広いばらつきを認め、卵管閉塞例に多く、IgM, IgA に関しては、ばらつきは少ないものの同様に卵管異常例が高値を示した。

対照とした結婚後速やかに妊娠に至った 133 名の妊娠 30 週前後の妊婦に関しては、抗クラミジア IgG 抗体価陽性例は 13.5 %, IgA 抗体価陽性例は 8.3 % であった。これに対して不妊症群は卵管に異常のないものも対照に比べて有意に高く、卵管周囲癒着と卵管閉塞例に関しては、ともにさらに高値を示した。この結果、卵管の障害による不妊症がクラミジア感染による PID (Pelvic inflammatory disease) の後遺症として発生することが多く、PID の治療が不妊症の発生予防に大きな意味をもつことになり、たとえ軽症であっても PID と診断された場合には、クラミジア感染をも考慮して治療に当たることが必要であることが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 547-551, 1990)

はじめに

1980 年代初めに Chlamydia trachomatis 感染症に対する検出技術が急速な進歩をみせ、その結果これによる呼吸器感染症とともに性行為により伝播する疾患の一つとして、この Chlamydia trachomatis 感染の実態が明らかにされるようになった¹⁻³⁾。当初は泌尿器科領域から男性を中心にこの感染状況が解明されはじめ、非淋菌性の尿道炎として注目されたため、女性においても淋菌感染と同様に頸管炎を中心に検索が進められた⁴⁾。その結果、淋疾同様に性感染症として女性にも数多くの患者が存在することが明らかになってきた。しかし、比較的発見が遅れた理由の一つには、男性における淋菌感染が激症であるのに比べ、非淋菌性尿道炎と総称された中でもこ

のクラミジアによる尿道炎は症状が軽く、そのため注目されないままに過ぎ、その上、女性の頸管炎に関してはさらに症状が軽く、宿主が気が付かないままに長く見過ごされていることもまれではなかった。そのため一つの疾患というよりはむしろ常在菌として扱ってもよいとの見解すら初めには出されることさえあったのが現実である。

しかしながら本邦においてわれわれ⁵⁾が最初に報告した子宮付属器炎もしくは骨盤腹膜炎の中に、実は多数のクラミジア感染が原因となっている症例が含まれていること、あるいは急性腹症のため開腹されたものの中からも Chlamydia 感染が確認されることがしばしば報告されるに至り、この Chlamydia 感染が次第に婦人科領域においても軽視すべからざる疾患として注目されるようになった⁶⁻⁸⁾。

その後、動物実験によりわれわれはChlamydia 感染が卵管留水腫や卵管閉塞症を形成することの確証をし報告をしたが、卵管性不妊症だけではなく、不妊症患者には非不妊症患者に比べChlamydia 感染の既往が極めて高頻度に存在することの確証をつかむに至ったので、ここに報告する。

対 象

愛知医科大学産婦人科学教室などで不妊症を主訴としてその治療の目的で受診中の患者 67 名をこれにあてた。この対象はそれぞれ腹腔鏡もしくは開腹手術により卵管およびその周辺の状況が確認されている。卵管とその周辺の状態は表 1 のように分類した。その内訳は卵管とその周辺に全く癒着を証明できない卵管因子正常群 21 例と、卵管閉塞は認めないが卵管あるいはその周辺の癒着の存在するもの 7 例に加えて明らかに一方もしくは双方の卵管の閉塞を示す 39 例である。対照として妊娠 30 週前後の妊婦 133 名をこれにあてた。

Table 1. Groups of Infertile Women According to Tubal Findings

Groups	Appearance of Fallopian Tubes	No.
Normal tubes	Subjects without evidence of tubal obstruction or peritubal adhesions	21
Peritubal and/or periovarial adhesions	Subjects without evidence of tubal obstruction but with peritubal and/or periovarial adhesions	7
Tubal occlusion	Subjects with obstruction of at least one fallopian tube	39

Table 2. Chlamydial Serology in Women with Tubal Infertility

Group	No.	Chlamydial Serology		
		IgG ≥ 10	IgM ≥ 10	IgA ≥ 10
Pregnant	133	18(13.5%)	—	11(8.3%)
Normal tubes	21	8(38.1%)*	1(4.8%)	5(23.8%)*
Tubal adhesions	7	4(57.1%)*	3(42.9%)	4(57.1%)*
Tubal occlusion	39	26(66.7%)*	11(28.2%)	20(51.3%)*

* compared with the pregnant group, the differences are statistically significant. ($P < 0.05$)

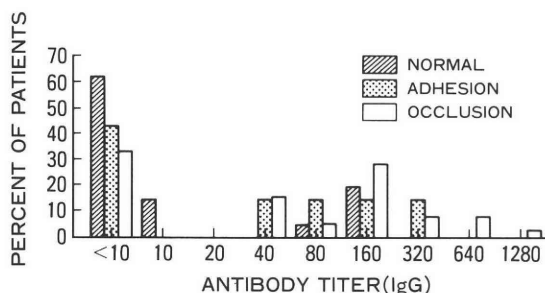


図2 Serologic Titers for Chlamydia (IgG)

方 法

血清Chlamydia IgG, IgM, IgA 抗体価をChlamydia trachomatis L₂株を用いたEIA 法(SRL社)により測定した。この方法ではIgG, IgM, IgAともに10 倍をもって陽性とされている(図1)。

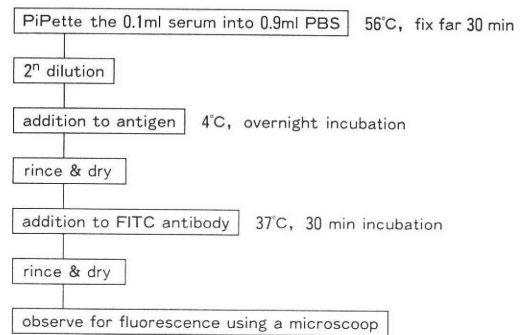


図1 Assay Procedure for Chlamydial antibodies

結 果

Chlamydia IgG 抗体価に関しては図2に示すように1280 倍と高値を示すものもあり、その値の広がりにはばらつきが認められた。これは感染ののちIgG 抗体は長期にわたり存在し続けることもあるためと理解されるが、表2に示すように対照妊婦の13.5%に対して卵管因子に異常を認めない21 例も含めて、いずれも対照群とは有意にChlamydia IgG 抗体価はいずれの群に関しても高値であった。

Chlamydia IgM 抗体価は急性期の感染時に出現し速やかに消失することが知られているが、わずかに10 倍の境界領域において数例が認められたが、ごく少数であった (図3)。

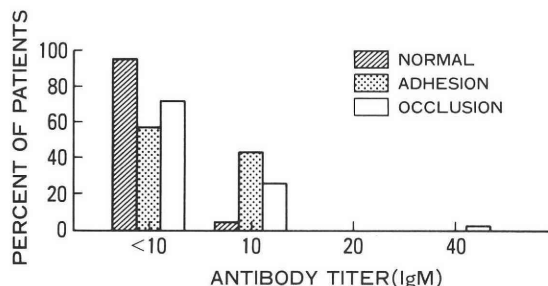


図3 Serologic Titers for Chlamydia (IgM)

Chlamydia IgA 抗体価に関してはIgM ほどではないが、やはり有意に陽性例が対照群と比べ高値であった (図4, 表2)。このIgA 抗体価陽性ということは、極めて近い時期に感染があるか、いまなお感染状況にあるかを示すものであり、たとえ症状に乏しくともなお腹腔内にChlamydia 感染が現存していることを示すことにもなり、全ての不妊症としての治療より以前にChlamydia trachomatis の感染の治療が優先されなければならないという重大な意味をもつことを示している。

以上のことから不妊症患者においては、卵管因子

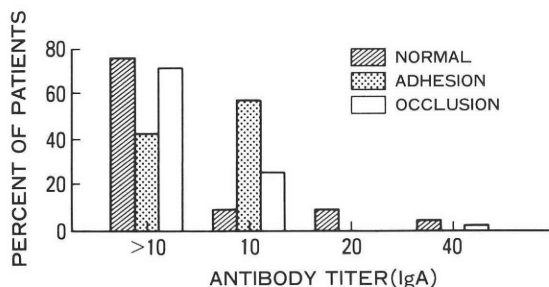


図4 Serologic Titers for Chlamydia (IgA)

によるものばかりか、卵管因子以外の原因により不妊症となっているものであっても、Chlamydia 感染の既往があるものが有意に多いことが示唆された。

考 案

Chlamydia trachomatis の蔓延とその病態の広がり本邦においても明らかになりつつあるが^(11,12)、産婦人科領域においては頸管炎としてのとらえ方からこの感染が目目されたため、産道感染による垂直感染が頸管炎の次には重要視されるところとなった^(13,14)。

しかしながらその後子宮付属器炎としての報告や急性腹症を示す骨盤腹膜炎なども少なからず存在することが明らかとなった。このことは、著者ら卵管不妊症についての検討を続けるグループにとってはその原因としてChlamydia trachomatis の存在に留意するきっかけとなった。その結果本邦における著者らのChlamydia trachomatis による実験的卵管炎と実験的卵管閉塞症の証明^(9,10)だけではなく、Pattonら⁽¹⁵⁻¹⁷⁾の検討によっても確認されている。

このような実験的立証に加えて、臨床的にもChlamydia による急性腹症の報告^(7,8)があるにもかかわらず、Chlamydia 感染は多くが軽度の臨床症状しか示さず、場合によっては自覚症状のないままいわゆるSilent PIDといわれる病態のまま経過しているものが多いことが明らかになってきた⁽¹⁸⁾。これは動物実験の結果対象の家兎が著変のないまま1年以上を過ぎてもなおその腹腔内からChlamydia 抗原を検出されることから裏付けられることとなった⁽¹⁹⁾。

これらの事実を踏まえて考えると、不妊症とりわけ卵管因子による不妊症患者の治療、例えばマイクロサージェリーによる卵管周囲癒着の剝離術や卵管開口術、卵管吻合術など行なっても、その患者の腹腔内にChlamydia trachomatis が生棲中のままでは、再び卵管周囲癒着や卵管閉塞症を速やかに生じ、手術が無駄なものになってしまうのは明白である⁽¹⁹⁾。そのためわれわれは卵管不妊手術の施行前には全例にChlamydia 抗原とChlamydia 抗体の検出を行なうことにしている⁽²⁰⁾。これらの対象の中で抗原が検出されたものは少数例に過ぎなかったが、抗体陽性例は、極めて高率であったので、ここに報告した。

Chlamydia trachomatis 感染の存在を確認するためには抗原検出が最も確実である⁽²¹⁾。しかしながら女性からの抗原検出は例外を除いては頸管からに限られる。従って感染後時間が経過し、すでに頸管にはChlamydia trachomatis が存在せず腹腔内のみ侵入生棲しているとすれば、当然正しい結果は得られない。従って血清学的判断の有用性が期待される。しかし血清学的診断法は実際のその時点の感染を正確に反映しているか否かという点で問題があるわけである。

近年Sarov^(22,23)は、Chlamydia trachomatis の感染の指標としては特異的血清IgA 抗体が有用性ありとの報告をしている。また同じIgM 抗体は初感染の初期に産生されるが早期に消失し再感染によっては産生されないとしている。またIgG 抗体は感染後、極めて長期間検出されるため、必ずしも活動感染の立証にはなり得ないと考えられる。以上のような観点

から林、熊本ら²⁴⁾はChlamydia IgA, IgG 抗体の二者を測定することによる疫学的調査を行い、以下の報告をして注目されている。

未治療のまま放置された感染患者からは抗原が消失せず、IgA 抗体は陽性のまま長期間存在し感染が持続するとしている。

このように感染が持続し、しかも症状が不明確なままであり、それが不妊症を主訴とする挙児希望の婦人においては全ての治療に優先してChlamydia 感染の治療を行うべきである。このことは今回の不妊症患者とりわけ卵管に原因があると思われる不妊患者の血清学的検討から明らかになったものと思われる。

文 献

- 1) Sweet, R. L.: Chlamydial salpingitis and infertility, *Fertil. Steril.*, 38: 530, 1982
- 2) Punnonen, R., Terho, P., Nikkanen, V., Meurman, O.: Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence, *Fertil. Steril.*, 31: 656, 1979
- 3) Gump, D. W., Gibson, M., Ashikaga, T.: Evidence of prior pelvic inflammatory disease and its relationship to Chlamydia trachomatis antibody and intrauterine contraceptive device use in infertile women, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 146: 153, 1983
- 4) Oriel, J. D., Johnson, A. L., Barlow, D.: Infection of the uterine cervix with Chlamydia trachomatis, *J. Infect. Dis.*, 137: 443, 1978
- 5) 野口昌良, 秋田敏行, 山崎 健, 稗田茂雄, 鈴木正利, 石原 実: Chlamydiazyme 法による産婦人科領域における骨盤腹膜炎を中心としたChlamydia trachomatis 感染症の検討, *産婦の世界*, 38: 459, 1986
- 6) Ripa, K. T., Svennson, L., Treharne, J. D.: Chlamydia trachomatis infection in patients with laparoscopically verified acute salpingitis: results of isolation and antibody determinations, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138: 960, 1980
- 7) 細井延行, 樋口和宏, 保科真二, 牧野一郎, 堀悟, 稲葉芳一, 石古博昭, 橋口則重, 清水良昭: Chlamydia trachomatis による両側卵管留膿腫の1例—産婦人科領域におけるクラミジア感染症の現況—, *産婦の世界*, 39: 467, 1987
- 8) 菅生元康, 南澤 豊, 郭 宗明, 藤原敏博, 小泉佳男: 右上腹部痛をともなったChlamydia trachomatis 頸管炎, *日産婦誌*, 39: 1675, 1987
- 9) 野口昌良, 稗田茂雄, 秋田敏行, 山崎 健, 石原実: Chlamydia trachomatis による実験的卵管炎の検討, *日不妊会誌*, 31: 415, 1986
- 10) 野口昌良, 稗田茂雄, 山崎 健, 秋田敏行, 上野直樹, 畔柳純一, 石原 実: Chlamydia trachomatis による卵管閉塞症成立に関する実験的検討, *日不妊会誌*, 32: 441, 1987
- 11) 野口昌良, 岡本俊充, 秋田敏行, 稗田茂雄, 石原実: 産婦人科領域におけるChlamydia trachomatis 感染症に関する臨床的検討, *日産婦誌*, 40: 452, 1988
- 12) Noguchi, M., Okamoto, T., Itoh, N., Hieda, S., Yabushita, H., Ishihara, M.: Chlamydia trachomatis infection in female patients, *Curr. Ther. Res.*, 44: 461, 1988
- 13) Schachter, J., Holt, J., Goodner, E.: Prospective study of chlamydial infections in neonates, *Lancet*, 2: 377, 1979
- 14) Frommell, G. T., Rothenberg, R., Wang, S. P.: Chlamydial infections of mothers and their infants, *J. Pediatr.*, 95: 28, 1979
- 15) Patton, D. L., Halbert, S. A., Wang, S. P.: Experimental salpingitis in rabbits provoked by Chlamydia trachomatis, *Fertil. Steril.*, 37: 691, 1982
- 16) Patton, D. L., Halbert, S. A., Kuo, C. C., Wang, S. P., Holmes, K. K.: Host response to primary Chlamydia trachomatis infection of the fallopian tube in pig-tailed monkeys, *Fertil. Steril.*, 40: 829, 1983
- 17) Patton, D. L., Kuo, C. C., Wang, S. P., Halbert, S. A.: Distal tubal obstruction induced by repeated Chlamydia trachomatis salpingeal infections in pig-tailed macaques, *J. Infect. Dis.*, 55: 1292, 1987
- 18) Patton, D. L., Moore, D. E., Spadoni, L. R., Soules, M. R., Halbert, S. A., Wang, S. P.: A comparison of the fallopian tube's response to overt and silent salpingitis, *Obst. Gynecol.*, 73: 622, 1989
- 19) 野口昌良: 実験的卵管炎と周囲癒着に関する研究, *産婦人科マイクロサージェリー学会雑誌*, 2: 57, 1989
- 20) 野口昌良: PIDの現状とその対策, *産婦人科マイクロサージェリー学会雑誌*, 3: 11, 1990
- 21) Noguchi, M., Okamoto, T., Aoyama, N., Hieda, S., Yabushita, H., Nakanishi, M.: Rapid diagnosis of Chlamydia trachomatis infection in obstetrics and gynecology; evaluation of Chlamydia teat pack, *Curr. Ther. Res.*, 46: 462, 1989
- 22) Sarov, I., Insler, B., Cevenini, R., Rumpianesi, F., Donati, H., Kleiman, D., Piura, B., Lieberman, J., Kimmel, N., Frideman, M., Plac, M.: Specific serum IgA antibodies in the diagnosis of active viral and chlamydial infections, 157, *New horizons in microbiology*, Elsevier biomedical Press, 1987
- 23) Cevenini, R., Sarov, I., Rampaianesi, F., Donati, M., Melega, C., Varotti, C., Placa, L. M.: Serum specific IgA antibodies to C. trachomatis in

patients with chlamydial infections detected by ELISA and immunofluorescence test, J. Clin. pathol., 37: 686, 1984

- 24) 林 謙治, 熊本悦明, 酒井 茂, 広瀬崇興, 恒川 琢司, 佐藤隆志, 横尾彰文: Chlamydia trachomatis 感染症の診断および疫学調査における特異血清 IgA, IgG 抗体測定に関する検討, 感染症学雑誌, 62: 355, 1988

Tubal infertility in relation to previous Chlamydia infection

Masayoshi Noguchi, Toshimichi Okamoto,
Shigeo Hieda, Tetsuo Masahashi,
Hiromitsu Yabushita and Masami Nakanishi

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

Sixty-seven patients seen at our clinic with infertility were the subjects for the present study.

Serum IgG, IgM, and IgA antibodies to Chlamydia trachomatis were measured by EIA method Chlamydia trachomatis L. cell line.

The titer for anti-chlamydial IgG antibody varied widely among the subjects. This antibody was positive even at 1280 times dilution in one case. The IgG was positive in more patients having tubal occlusion than without it. The same tendency was demonstrated with IgM and IgA but the variation in titer was slight. The incidence of positive cases was higher among patients with tubal abnormality.

Of 133 control women, who had become pregnant early after marriage, 13.5% were positive for anti-chlamydial IgG. The rate for IgA was 8.3%. These percentages are significantly lower than the corre-

sponding rates for the infertile patients without tubal obstruction.

The incidence of infection of genital organs with Chlamydia trachomatis has been rising in Japan to the level comparable to those in Western countries. When the microorganisms are transmitted from men to women, they affect the oviduct, causing inflammation or salpingitis. Then, the causative agents spread to deeper parts of the genital tract to involve the peritoneum. This is a condition called pelvic inflammatory disease. The fact that the antigen is positive at high rates among outpatients with pelvic inflammatory disease supports such an estimation of route of spreading as described above. Most of patients with infection with Chlamydia trachomatis are asymptomatic or have only mild symptoms, complaining of little. This suggests that infection would have occurred far before the visiting of infertile clinic and remained asymptomatic for a long period, a period of so-called silent pelvic inflammatory disease. The infection would have become chronic and caused organic change of the tube, despite the lack of symptoms. The findings as described above are consistent with this speculation, demonstrating the righteousness. Namely, Infertility due to tubal obstruction is a sequel of pelvic inflammatory disease for which infection with Chlamydia trachomatis is responsible. Therapy for pelvic inflammatory disease is important so as to prevent subsequent infertility.

In case pelvic inflammatory disease is diagnosed, even if it is mild, treatment must be given by taking possible involvement of infection with Chlamydia trachomatis into consideration.

(受付: 1990年1月29日掲)

子宮腔癒着症の術後妊孕性に関する検討

Fertility After Treatment of Intrauterine and Cervical Uterine Adhesion

鹿児島大学医学部産婦人科学教室

沖 利 通 森 明 人 山 元 慎 一
Toshimichi OKI Akito MORI Sinichi YAMAMOTO

福 元 清 吾 竹 内 一 浩 堂 地 勉
Seigo FUKUMOTO Kazuhiro TAKEUCHI Tsutomu DOUCHI

有 馬 直 見 永 田 行 博
Naomi ARIMA Yukihiro NAGATA

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

子宮腔癒着症は、分娩や流産時に行なう過度の搔爬術によって起こる疾患であり、Ashermanにより報告されて以来、様々の報告がなされ、最近ではほとんど注目されなくなっている。しかし、本症の原因・部位（ことに頸部癒着）や程度と術後妊孕性の回復との関係は必ずしも明確ではない。そこで、我々は過去5年間に経験した13例の子宮腔癒着症について retrospective に検討を加えた。

子宮腔癒着症の原因は人工妊娠中絶術が最も多かった。子宮頸部癒着8例中、過少月経を示す例は3例と月経異常を示す例は少なかった。治療後、13例中10例（76.9%）が妊娠し、子宮頸部癒着の8例では子宮頸管拡張処置のみにより7例（87.5%）が妊娠した。妊娠した子宮頸部癒着7例は平均2.5年の不妊期間の後、治療後から月経周期にして2周期以内に7例中5例（71.4%）が妊娠に至った。以上から、月経異常を伴わない僅かの子宮頸部癒着でも不妊の原因となりうることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 552—556, 1990)

はじめに

子宮腔癒着症は、分娩や流産時に行なう過度の搔爬術によって起こる疾患で、1894年にFritish¹⁾により最初に報告され、Ashermanがその原因・臨床像・治療法など詳細な報告²⁾をして以来注目されるようになった。その後の様々な報告により治療法がほぼ確立された感があり、最近ではほとんど注目されなくなっている。しかし、本症の原因・部位（ことに頸部癒着）や程度と術後の妊孕性の回復との関係は必ずしも明確ではない。そこで、我々は過去5年間に経験した子宮腔癒着症について retrospective に検討し若干の知見を得たので報告する。

方 法

過去5年間に鹿児島大学医学部付属病院産婦人科不妊外来を受診し、子宮卵管造影法（HSG）で子宮腔癒着症と診断された13例について癒着の原因・部位・程度と月経異常などについて retrospective に検討を加えた。

なお当科においては、子宮体部・角部あるいは広範囲癒着例は子宮鏡下癒着剝離を施行後、IUDを挿入しKaufmann療法を2—3周期行ない、消退出血後IUD抜去の方針をとっている。また、子宮頸部癒着例ではヘガール拡張・ラミナリア挿入を行ない、癒着剝離を行なっている。

表1 子宮腔癒着症13例の内訳

No.	症例	年齢 (歳)	妊娠歴 (0 G 0 P)	不妊期間 (年)	月経異常	癒着の原因	術後から妊娠ま での月経周期数	癒着部位	合併症
1		23	2-0	3	過少	中絶術	1	角部	—
2		27	1-0	2	—	中絶術	2	角部	—
3		28	1-0	1	過少	中絶術	3	頸部	—
4		33	1-0	13	—	中絶術	×	体部	—
5		28	1-0	3	—	中絶術	2	頸部	—
6		32	1-0	3	過少	中絶術	1	頸部	高 PRL
7		31	2-0	1	過多	流産手術	5	角部	子宮筋腫
8		28	0-0	4	過少	内膜診	×	体部	乏精子症
9		35	1-0	2	—	中絶術	2	頸部	—
10		30	1-0	1	—	流産手術	1	頸部	—
11		36	4-1	1	過少	中絶術	×	頸部	排卵障害
12		29	1-0	5	—	中絶術	1	頸部	高 PRL
13		40	3-0	2	—	反復流産	10	頸部	免疫性

結 果

昭和59年から昭和63年に鹿児島大学産婦人科不妊外来を受診し、子宮卵管造影法(HSG)で子宮腔癒着症と診断された13例の詳細を表1に示す。13例は全て挙児希望を主訴として来院した。無月経を訴えた例はなかった。続発性不妊は13例中12例(92.3%)、原発性不妊は1例(7.7%)であった。対象患者の年齢分布は、20歳代が6例、30歳代が6例、40歳代が1例であった(表2)。

表2 子宮腔癒着13例の年齢分布

年 齢	症例数
20～24	1
25～29	5
30～34	4
35～39	2
40～	1
計	13

子宮腔癒着の原因としては、人工妊娠中絶術が9例、不全流産のための子宮内搔爬術3例、子宮内膜日付診のための子宮内膜生検が1例であり、人工妊娠中絶が原因として最も多かった(表3)。なお、子宮内膜日付診の後、癒着が起こったと判定した例は、月経は28日型で経過し基礎体温は二相性、内分泌学的検査で異常なく、月経血培養は陰性であり、子宮内操作は子宮内膜日付診のための生検以外に既往はなかったことから判定した。

癒着部位と月経異常の関係をみると、頸部癒着で37.5%(3/8)・子宮角部癒着で33.3%(1/3)・子宮体部癒着で50.0%(1/2)が過少月経を伴い、必ずしも全例が月経異常を伴ってはいなかった(表4)。しかし、子宮腔癒着の範囲が広いほど過少月経の頻度が高い傾向にあった。

表3 子宮腔癒着の原因

人工妊娠中絶術	9例
流産手術	3例
子宮内膜生検	1例

表4 癒着部位と月経異常

癒着部位	過少月経の割合
子宮頸部	3/8(37.5%)
子宮角部	1/3(33.3%)
子宮体部	1/2(50.0%)

癒着剝離治療後13例中10例(76.9%)が妊娠成立をみ、子宮頸部癒着例では頸管拡張処置のみで8例中7例(87.5%)、子宮角部癒着では3例中3例(100%)妊娠したが、子宮体部癒着2例には妊娠をみなかった(表5)。

妊娠しなかった3例は、子宮体部広範囲癒着2例、子宮頸部癒着1例であった。子宮体部癒着2例のうち、1例(症例No. 4)については子宮ゾンデ診上、癒着の改善を見たが妊娠成立せず現在治療は行っていない。もう1例(症例No. 8)は同様にHSG上、

表5 癒着部位と術後妊娠率

癒着部位	術後妊娠率
子宮頸部	7/8 (87.5%)
子宮角部	3/3 (100.0%)
子宮体部	0/2 (0.0%)
合計	10/13 (76.9%)

癒着は改善したが乏精子症(精子濃度 $30 \times 10^6/\text{ml}$)も合併しており現在通院治療中である。子宮頸部癒着の症例(No11)は子宮ゾンデ診上、癒着の改善がみられたが、視床下部性の排卵障害も合併しており、クロミフェン投与し治療中である。また、妊娠した子宮頸部癒着7例の不妊期間は平均2.5年であったが、術後2周期以内に5例(71.4%)が妊娠した(表6)。

表6 子宮頸部癒着妊娠例の術後から妊娠までの月経周期数

月経周期数	症例数
1回	3
2回	2
3回以上	2

次に、頸管癒着剝離術が奏効したと考えられる典型的子宮頸部癒着例(No10)を示す。

患者は、30歳、1経妊0経産、主訴は挙児希望。既往歴には特記すべきことなし。現病歴は、初経以来、月経周期は30~40日型で不規則に経過し、昭和58年に結婚、昭和57年、妊娠2カ月時、不全流産で子宮内膜掻爬術を受ける。以後、昭和61年4月まで避妊し、過少月経などの月経異常も認めなかったが妊娠しないため、昭和61年11月に当科を受診した。内診上、子宮は鶏卵大、可動性は良好。両側付属器・傍子宮結合織に異常を認めず。検査では、基礎体温

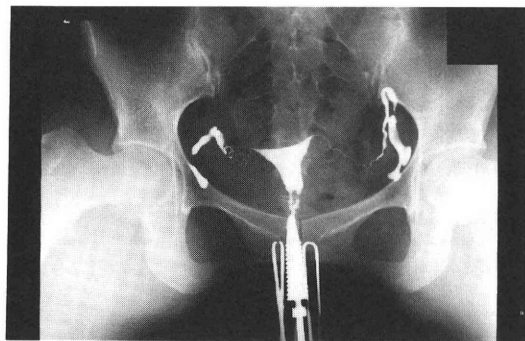


写真1 HSG

は二相性で、月経血培養で異常を認めず、LH: 30.7mIU/ml, FSH: 10.9mIU/ml, Estradiol: 45.2pg/ml, Prolactin: 13.7ng/ml, Progesterone: 1.2ng/mlと内分泌検査には異常はなかったが、昭和62年5月HSGを施行し子宮頸部の癒着を指摘される(写真1)。昭和62年6月、7月にHegar拡張を行ない、同年7月15日を最終月経として自然妊娠した。妊娠中は性器出血などの異常を認めず、順調に経過し、昭和63年5月5日妊娠40週で吸引分娩にて男児3120g (Apgar 9)を娩出した。

考 察

子宮腔癒着症は1950年にAshermanがその詳細について報告²⁾して以来注目されるようになり、1960~1970年代を中心にその原因・治療法・症状・妊娠予後について数々の報告がなされてきた。このAsherman症候群は、特に続発性不妊症の原因として重要な位置を占める。しかし、最近では、診断、治療法も確立され、さほど注目されなくなってきており、本症における報告は少ない。

本症の原因としては、Foix (1966)³⁾らは107例の子宮腔癒着症の中で人工妊娠中絶によるもの、不全流産後の子宮内膜掻爬がそれぞれ52例、47例で、両者で92.7%と大部分を占めると報告している。最近では、Marchら(1978)⁴⁾が子宮鏡・HSGで診断した66例について人工妊娠中絶、不全流産後、子宮内膜組織診目的、産褥期の出血のための子宮内膜掻爬がそれぞれ22例、28例、6例、3例であったとしている。すなわち、子宮腔癒着症の原因としては人工妊娠中絶術、不全流産後などの子宮内膜掻爬術と関連したものが最も多い。今回の我々の検討でも子宮内膜組織診の1例を除き、すべて人工妊娠中絶術、不全流産後の子宮内膜掻爬が原因であり、諸家の報告と同様であった。いずれの報告でも妊娠と関係した子宮内膜掻爬が癒着の原因の大部分を占めるが、その理由として妊娠子宮はその性格上、非妊娠子宮に比較して脆弱なため、子宮内膜再生に必要な基底層を破壊されやすく、癒着を起こしやすいと考えられている。しかし、Marchら(1978)⁴⁾は子宮腔癒着症と診断した66例中、子宮内膜組織診が原因と考えられる例が6例あると報告されているように、子宮内膜組織診でも子宮腔癒着症の原因になることがあるので、このことに注意して検査する必要がある。

子宮内膜掻爬の回数と本症の頻度に関する報告は、百瀬ら(1978)⁵⁾は掻爬回数1回で3.5%、2回で7.2%、3回で10.9%、4回で11.7%、5回以上で19.5%に子宮腔癒着症が発生したとしている。仲村(1971)⁶⁾

も同様の結果を報告しており、掻爬回数が多くなるにしたがい癒着の可能性は高くなると結論している。すなわち、掻爬回数が多くなれば前述したごとく子宮内膜の再生に必要な基底層を破壊されやすく癒着が発生しやすいことを示唆する。しかし、我々の症例では、4回人工妊娠中絶術を経験している1例を除いては1回しか掻爬を受けていないものが大部分であったため、手術手技も関係するものと思われる。

本症の頻度は、Siegel (1962)⁷⁾が子宮卵管造影を施行した468例中5例(1.1%)、Sweenyら(1964)⁸⁾は2,500例中25例(1.2%)、我が国では、仲村(1971)⁹⁾が1254例中67例(5.3%)、百瀬ら(1973)⁹⁾が4,000例中74例(5.0%)、田中ら(1979)⁹⁾が705例中14例(5.0%)と1~5%との報告が多い。我々の報告でも、過去5年間にHSGを施行した412例中13例(3.2%)に癒着があったことにより、ほぼ同様の頻度といえる。

子宮腔癒着症と月経異常の関係に関しては、Marchら(1978)⁴⁾は本症66例について検討し、子宮内腔の癒着の程度と月経量はほぼ比例すると述べており、田中ら(1975)⁹⁾も子宮腔癒着面積と月経血量とは相関していると報告している。また、Lourosら(1968)¹⁰⁾は本症の60例中、無月経8例、過少月経29例、正常23例(38.3%)と報告し、杉本(1972)¹¹⁾は、85例中、無月経14例、過少月経40例、正常31例(36.5%)、田中ら(1975)⁹⁾は14例中無月経0例、過少月経8例、正常6例(42.9%)と月経異常を示さない子宮腔癒着症が存在することもあるようである。

今回の我々の検討でも子宮腔癒着の程度と月経血量はほぼ相関すると思われ、また、13例中7例(53.8%)は月経異常を認めず、そのほとんどは軽微な癒着のみであった。すなわち、月経異常を示さない僅かの子宮腔癒着例が比較的多くあったといえる。

子宮腔癒着症の治療の原則は癒着の除去・再癒着の防止である。癒着剝離の方法としては、従来から子宮ゾンデ・ラミナリア・ヒステロスコープ等の試用とほぼ確立された方法がとられている。一方、再癒着防止に関しては、卵管¹²⁾・子宮内膜¹³⁾・卵膜¹²⁾¹⁴⁾の移植から最近ではIUD挿入・ホルモン療法・抗生物質の併用と多くの報告がなされてきた。杉本(1972)¹¹⁾は本症85例中47例のIUD挿入による治療を報告し、その他Lourosら(1968)¹⁰⁾、Walther(1971)¹⁵⁾、Oelsnerら(1974)¹⁶⁾、Marchら(1975)⁴⁾、田中ら(1975)⁹⁾、飯田(1973)¹⁷⁾の報告があり、癒着の治療率が90%前後で、特に体部・角部癒着例に対する有用性が強調されている。

我々は、子宮体部・角部ではその有用性が認めら

れているIUDを最低2クール併用する方法をとり、まずまずの妊娠率であったことはこの方法が妥当であることを示す。子宮角部癒着の2例は妊娠していない。子宮体部癒着の2例は広範囲の癒着を認め、1例は術後の子宮ゾンデ診上、癒着も改善し、月経量の増加もみたが妊娠せず、1例は乏精子症も合併しており、それが原因で妊娠していないと思われる。

子宮腔癒着症は、治療後の癒着の改善率は前述のように比較的高いが、治療後妊娠しても流産・早期産・前置胎盤などの合併が多いとする報告¹⁸⁾もある。しかし、今回の調査で治療後の妊娠経過を確認できた2例ではいずれも満期産であり、必ずしも妊娠中の異常とは関係ないかも知れない。

子宮体部・子宮角部を含む子宮腔癒着と術後妊娠能について報告したものが多く、子宮頸部癒着と妊娠能に関する報告は少なく、子宮頸部癒着がどのように妊娠性の低下と関係あるかは必ずしも明確ではない。我々は、子宮頸部癒着例に対して、ラミナリア挿入・ヘガール拡張などの頸管拡張処置しか行なわなかったが、その結果平均2.5年の不妊期間の後87.5%が妊娠し、しかも術後月経周期にして2周期以内に72.5%が妊娠した。このことは、月経異常を伴わない僅かの子宮腔癒着症でも不妊の原因となりうることを示唆する。すなわち、その機序としては、子宮頸部癒着によって頸管粘液を分泌するといわれる頸管腺の破壊により頸管粘液分泌不全を呈する場合、癒着周辺部の子宮内膜の機能の変化による着床障害、単なる頸管狭窄による精子通過障害などの可能性が考えられるであろう。しかし、このことは推測であり今後の研究が待たれるところである。

まとめ

1. 子宮腔癒着症の原因は人工妊娠中絶術9例、不全流産後の子宮内膜掻爬3例、子宮内膜生検1例で、人工妊娠中絶術が最も多かった。
2. 子宮腔癒着の程度が強いほど過少月経の頻度が高い傾向にあり、子宮頸部癒着例では37.5%とやや少なかった。
3. 治療後76.9%(10/13)が妊娠した。子宮頸部癒着例では、子宮頸管拡張処置により87.5%(7/8)と高い妊娠率を示した。
4. 妊娠した子宮頸部癒着7例の不妊期間は平均2.5年であったが、治療後から月経周期にして2周期以内に71.4%(5/7)が妊娠した。このことから、月経異常を伴わない僅かの子宮頸部癒着でも不妊の原因となりうることを示唆する。

文 献

- 1) Fritish, J.: Einfall von völligen Schwund der Gebärmutterhöhle nach Auskratzung, Zentralbl. Gynaekol., 52: 337, 1894
- 2) Asherman, J.: Traumatic intrauterine adhesions, Obst. Gynec. Brit. Emp., 57: 892, 1950
- 3) Foix, A. M.: The pathology of postcurettage intrauterine adhesions, Am. J. Obst. Gynec., 96: 1027, 1966
- 4) March, C. M., Israel, R., March, A. D.: Hysteroscopic management of intrauterine adhesions, Am. J. Obst. Gynec., 130: 653, 1978
- 5) 百瀬和夫, 田中リナ, 柴田直秀: 外傷性子宮腔癒着症, 日不妊誌, 20: 342, 1973
- 6) 仲村健一: 外傷性子宮腔癒着症に関する研究, 日不妊誌, 16: 347, 1971
- 7) Siegler, A. M.: Synechiae of the uterine cavity after curettage, Am. J. Obst. Gynec., 83: 1595, 1962
- 8) Sweeny, W. J.: Intrauterine Synechiae, Obst. Gynec., 27: 284, 1966
- 9) 田中昭一, 西島 毅, 岡部泰樹, 福島道夫, 光部啓一, 水元修治: 外傷性子宮腔内癒着症の検討, 日不妊誌, 20: 425, 1975
- 10) Louros, N. G., Danezis, J. M., Potifix, G.: Use of intrauterine devices in the treatment of intrauterine adhesion, Fertil. Steril., 19: 509, 1968
- 11) 杉本 修: Hysteroscopy (外傷性子宮腔癒着症の診断と予後追跡), 産婦治療, 24: 457, 1972
- 12) Behrman, S., Kistner, R. W. Eds.: Progress in Infertility (ed. 1), Little, 129, 1968
- 13) Jones, H., Jones, G.: Editorial Comment, Obst. Gynec. Survey, 25: 93, 1970
- 14) Carmichael, D. E.: Asherman's syndrome, Obst. Gynec., 36: 922, 1970
- 15) Walther, C.: 第7回国際不妊学会抄録集, 68, 1971
- 16) Oelsner, G., David, A., Insler, V., Serr, M. D.: Outcome of pregnancy after treatment of intrauterine adhesions, Obst. Gynec., 44: 341, 1974
- 17) 飯田和貴: 不妊と子宮腔癒着症, 日不妊会誌, 18: 75, 1973
- 18) Jewelewicz, R. et al.: Obstetric complication after treatment of intrauterine synechiae., 47: 701, 1976

Fertility after treatment of intrauterine and cervical adhesion

Toshimichi Oki, Akihito
Mori, Shinichi Yamamoto,
Seigo Fukumoto, Kazuhiro Takeuchi,
Tsutomu Douchi, Yukihiro Nagata.

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

Intrauterine adhesion is caused by vigorous intrauterine curettage performed after incomplete abortions or for the purpose of artificial abortion. Since Asherman described intrauterine adhesion as Asherman's syndrome, a lot of literatures have been reported. Recently, this syndrome has lost importance. However, the relationship between causes, portion of adhesion and fertility rates after treatment of intrauterine adhesion, especially cervical adhesion, is still unclear. We therefore investigated the fertility in 13 patients with intrauterine adhesion from 1985 to 1989, retrospectively. 8, patients showed intrauterine adhesion in cervical canal. There were only 3 patients, who showed who showed hypomenorrhea. 7 patients became pregnant after treatment of cervical dilatation alone. And 5 of 7 patients conceived within two menstrual cycles. From these results, we suggest that minimal intrauterine adhesion in the cervix without hypomenorrhea can be responsible for infertility.

(受付: 1989 年 10 月 19 日)

子宮外妊娠症例に対する少量 ametopterin 製剤(methotrexate, MTX) 投与療法に関する検討

Conservative Treatment of Ectopic Pregnacy with Individualized Reduced Dose of Methotrexate

福井県立病院産婦人科

生 水 真紀夫
Makio SHOZU

高 橋 義 弘
Yoshihiro TAKAHASHI
飯 田 和 質
Kazutada IIDA

原 田 丈 典
Takenori HARADA

Fukui Prefectural Hospital, Fukui 910, Japan

金沢大学産婦人科 (主任: 西田悦郎教授)

上 野 浩 久
Hirohisa UENO

窪 田 興 志
Yoshi KUBOTA

赤祖父 一 知
Kazutomo AKASOFU

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan

尿中 hCG 値が比較的低値を示した子宮外妊娠症例に対し、MTX 少量投与 (1 日 5 mg, 5 日間連続筋注を 1 クールとする) による保存的治療を試み、15 例中 13 例の治療に成功した。治療成功例における治療前の尿中 hCG 値は 665 ± 995 (16-3200) IU/L であり、治療日数は 11.9 ± 6.6 (2-24) 日、MTX 総投与量は 38 ± 13 (25-50) mg であった。治療後に子宮卵管造影検査 (HSG) を 4 症例に施行し、いずれも両側卵管の通過性を確認した。治療後に挙児希望のあった 5 症例中 3 症例で子宮内妊娠を確認した。

治療開始前の血中 hCG 値および血中 β hCG 値は尿中 hCG 値に比し MTX 総投与量や治療日数と良い相関を示した。

全身状態が良好で尿中 hCG 活性が比較的低い子宮外妊娠症例では、妊孕性温存の要否にかかわらず MTX 少量投与療法が有効な治療法となる可能性があるものと思われた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 557-563, 1990)

緒 言

近年の免疫学的測定法の進歩は、低単位の hCG を迅速かつより正確に定量することを可能にした。また、超音波検査法、腹腔鏡検査法などの進歩・普及

もあって、より早期に子宮外妊娠を診断することが可能となってきた。さらに、従来診断の困難だったいわゆる chronic ectopic pregnancy などの診断も比較的容易なものとなりつつある。したがって、hCG 活性の低い子宮外妊娠症例に接する機会が最近

増加してきており、これらの症例に対する保存的治療法として、MTX 投与の有用性が報告されてきている。

今回、われわれは主として hCG 活性の低い子宮外妊娠症例を対象として、MTX 投与による保存的療法を施行し、その臨床効果について検討した。この際、1 クール当たりの MTX 投与量を少なくすることにより、MTX 総投与量の削減を試みたので、若干の考察を加えて報告する。

対象および方法

1987 年 4 月から 1989 年 7 月までに福井県立病院産婦人科で治療を行った子宮外妊娠の疑診および確診症例のうち、原則として尿中 hCG が比較的低単位であり、腹腔内出血が軽度で、待機的に加療をしても生命の危険が少ないと判断された 15 症例を対象とした。MTX 療法施行に際しては、患者とその家族に十分説明を行ない了解を得た。なお、全例治療を開始する前に肝機能検査を行ない、重篤な肝障害のないことを確認したが、1 例(症例 8)で脂肪肝によると思われる軽度のトランスアミナーゼ値の上昇が認められた。

子宮外妊娠の診断は、臨床症状(続発性無月経・下腹部痛・不正性器出血など)、内診所見(有痛性付属器腫瘍)、子宮内膜掻爬(絨毛欠如)、経腹的および経腔的超音波所見(腹腔内出血・付属器腫瘍・子宮外胎嚢像など)、ダグラス窩穿刺などの補助診断の結果を総合して行なった。今回の症例には腹腔鏡によって診断されたものは含まれていない。

各症例の治療所見の概要は、表 1 に示した。15 症例の平均年齢は 31.9 ± 5.2 (25-42) 歳で、未妊未産婦 4 例(内 2 例は不妊症加療中に妊娠したもの)が含まれていた。診断時の推定妊娠週数は、7 週 0 日 $\pm$ 13 日(5-11 週)、尿中 hCG 値は 1777 ± 4055 (16-16000) IU/L であった。

15 例のうち、5 例が右卵管妊娠、8 例が左卵管妊娠、1 例が右間質部妊娠、1 例が左間質部妊娠と診断された。なお、症例 1 は多嚢胞性卵巣の診断でブレドニゾン・クロミフェン・hMG-hCG 療法を実施し、卵巣過剰刺激症候群を来したもので、両側卵巣腫大の軽減した時点で子宮外妊娠が疑われた症例である。症例 2 は、尿中 hCG 値が高値であったが、患者の希望が強く本療法を実施した症例である。症例 9 は、反復子宮外妊娠症例である。

診断時の症状としては、下腹部痛が最も多く、軽症例と初診時以前に既に症状のあったものを含めると 11 例に下腹痛が認められた。15 例中 8 例で、経腹

的あるいは経腔的超音波検査により胎嚢様構造が子宮腔外に認められた。また、症例 2 では胎芽心拍が確認された。

MTX は、1 日あたり 5 mg 1 回筋注、5 日間連日投与を 1 クールとし、投与後連日ないし 5 日目毎に尿中 hCG・血中 hCG・血中 β hCG 値を測定した。投与終了後の尿中 hCG 値が指数関数的に低下すればそのまま経過を観察し、低下の遅延(5 日以上同一 hCG 値を示した場合など)が認められた場合はさらに MTX を追加投与した。尿中 hCG 値は、原則として早朝第 1 尿を用いゴナビス、ニューゴナビスライド、ハイゴナビス(以上、持田製薬)、ハイツインクロン-hCG(栄研)を組み合わせる半定量を行った。血中 MTX 濃度の測定は FPIA 法(TDX システム、ダイナボット社)を用いて行った。

結 果

各症例の治療経過の概要を表 2 に、尿中 hCG 推移を図 1、2 に示した。

1. 15 例中 13 例で MTX による保存的療法が有効であった。胎芽心拍陽性の間質部妊娠例(症例 2)では、MTX 投与 3 日目に間質部破裂及び大量の腹腔内出血を来したため緊急手術(間質部楔状切除)を施行した。また、右卵管妊娠の 1 例(症例 10)では、MTX 投与 3 日目より発熱を来し、MTX 1 クール投与後 4 日目に付属器膿瘍の診断で開腹手術(右卵管切除およびダグラス窩膿瘍の切開排膿)を行なった。症例 6 では、治療開始後早期に腹腔内出血の増量が見られたため、ダグラス窩穿刺を行ない約 100 ml の血液を吸引除去した。いずれの症例でも治療開始時に超音波断層法によって認められたダグラス窩の血液や血腫は、治療開始後尿中 hCG の消失より遅れて縮小ないし消失した。

2. 保存的治療が成功した 13 症例における治療前尿中 hCG 値は 665 ± 995 (16-3200) IU/L で、血中 β hCG 値は 6.05 ± 6.67 (0.2-17.6) ng/ml、血中 hCG 値は 357 ± 615 (12-1450) IU/L であった。また、これらの症例の治療開始時の推定妊娠週数は 6 週 5 日 $\pm$ 13 日(5-11 週)であった。治療に要した MTX 総投与量は 25 mg が 6 例、50 mg が 7 例であった。尿中 hCG 値が LH level に達するのに要した日数(治療日数)は 11.9 ± 6.6 (2-24) 日であった。

3. 治療後 4 例で HSG 検査が施行された。その結果、4 症例とも両側卵管の疎通性が確認された。挙児希望のあった 5 症例中 3 例が治療後に妊娠したが、いずれも子宮内妊娠であった。1 例(症例 1)は、治療後 3 か月目に妊娠して妊娠 10 か月で健康な女児

表1 治療前所見の概要

症例 No.	年齢 結婚	経妊 経産	診断時 の推定 週数	治療開始前の 尿中 hCC (血中 β hCG) (血中 hCG)	主 訴 既往歴など	入院時診断	掻爬所見	超音波検査所見
1 ■	27歳 既婚	0 妊 0 産	5 週	200IU/L (3.2ng/ml)	左下腹部痛 不妊症加療中 (PCO)	左子宮外妊娠	絨毛なし 脱落膜なし	子宮腔内G S (-)
2 ■	42歳 離婚後	5 妊 3 産	6 週	16000IU/L (110ng/ml)	なし	右間質部妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	子宮内G S の偏在 胎児心拍陽性
3 ■	29歳 未婚	0 妊 0 産	6 週	800IU/L (6.6ng/ml)	左下腹部痛	左卵管妊娠	施行せず	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
4 ■	29歳 既婚	3 妊 2 産	5 週	2000IU/L (12.2ng/ml)	下腹部痛 不正性器出血	左卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
5 ■	33歳 既婚	4 妊 2 産	9 週	200IU/L	下腹部痛 不正性器出血	右卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	右付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
6 ■	25歳 既婚	0 妊 0 産	5 週	1600IU/L (17.6ng/ml) (1450IU/L)	下腹部痛 不正性器出血 不妊症加療中	左卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜なし	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
7 ■	36歳 既婚	5 妊 2 産	6 週	3200IU/L (15.5ng/ml)	下腹部痛 不正性器出血	左卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+) 腹腔内G S (+) 腹腔内G S 様 (+)
8 ■	38歳 既婚	4 妊 4 産	11週	16IU/L (0.4ng/ml) (31IU/L)	下腹部痛 不正性器出血 挙児希望	左卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜なし	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
9 ■	33歳 既婚	4 妊 2 産	5 週	50IU/L (2.7ng/ml) (101IU/L)	下腹部痛 不正性器出血 右子宮外妊娠 手術の既往あり	左卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
10 ■	27歳 既婚	3 妊 1 産	9 週	2000IU/L (11.3ng/ml) (1260IU/L)	下腹部痛 不正性器出血	右卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	右付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+) 腹腔内G S 様 (+)
11 ■	31歳 既婚	3 妊 3 産	7 週	32IU/L (0.5ng/ml)	下腹部痛 不正性器出血	右卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	右付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
12 ■	29歳 既婚	2 妊 2 産	9 週	64IU/L (0.9ng/ml)	下腹部痛	右卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜なし	右付属器血腫 子宮腔内G S (-)
13 ■	26歳 既婚	0 妊 0 産	6 週	200IU/L	下腹部痛 不正性器出血	左卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜なし	左付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)
14 ■	40歳 既婚	3 妊 2 産	8 週	256IU/L (3.4ng/ml) (191IU/L)	不正性器出血	左間質部妊娠	絨毛なし 脱落膜なし	子宮内G S の偏在
15 ■	34歳 既婚 (夫と 別居中)	3 妊 1 産	8 週	32IU/L (0.2ng/ml) (12IU/L)	下腹部痛 不正性器出血	右卵管妊娠	絨毛なし 脱落膜あり	右付属器血腫 子宮腔内G S (-) 腹腔内出血 (+)

表 2 治療経過と転帰

症例	MTX 総投与量	治療日数	細胞効果	肝機能	末梢血所見	治療後の転帰
1	25mg	7	なし	GOT18→17 GPT10→15	WBC4800→5000 RBC339→340 Hb10.3→10.4 Plts223→220	治療後 3 か月目に妊娠し、妊娠10か月で女児を分娩
2	15mg			GOT18 GPT32	WBC4700 RBC433 Hb13.7 Plts211	治療開始後 3 日目に間質部の破裂を来したため、緊急手術
3	50mg	12	あり	GOT16→14 GPT11→13	WBC6100→5100 RBC432→383 Hb13.1→12.0 Plts255→218	
4	25mg	12	なし	GOT20→24 GPT10→22	WBC7100→5800 RBC402→387 Hb12.2→11.8 Plts194→165	治療後 5 か月で妊娠したが、妊娠 3 か月で自然流産
5	25mg	11	あり	GOT33→63→23 GPT44→133→57	WBC4400→5300 RBC373→365 Hb11.5→11.4 Plts345→343	
6	50mg	24	あり	GOT17→19 GOT8→12	WBC6900→4700 RBC304→258 Hb9.8→8.0 Plts245→410	直径 4 cm の付属器血腫残存、約 5 か月で消失
7	50mg	16	なし	GOT24→23 GPT24→17	WBC7700→7700 RBC299→236 Hb10.1→7.8 Plts303→266	
8	25mg	5	あり	GOT58→81→13 GPT76→73→15	WBC8800→7100 RBC479→472 Hb13.2→13.4 Plts347→359	
9	50mg	6	なし	GOT17→24 GPT15→25	WBC6900→6300 RBC370→330 Hb11.4→10.1 Plts273→168	
10	25mg			GOT19 GPT42	WBC7800 RBC479 Hb13.2 Plts347	付属器膿瘍を形成したため 4 日目に開腹手術施行
11	25mg	6	なし	GOT28→15 GPT20→12	WBC5600→5700 RBC394→364 Hb11.2→10.8 Plts259→223	
12	50mg	19	なし	GOT21→33 GPT10→25	WBC5800→5100 RBC389→395 Hb9.7→10.9 Plts287→326	
13	50mg	16	あり	GOT17→24 GPT15→25	WBC6900→6300 RBC370→330 Hb11.4→10.1 Plts273→168	治療後 2 か月目に妊娠し現在妊娠継続中
14	50mg	19	なし	GOT16 GPT8	WBC4700 RBC405 Hb11.9 Plts252	
15	25mg	2	なし	GOT32→19 GPT16→14	WBC10500→6100 RBC342→350 Hb10.2→10.1 Plts325→297	

WBC/mm³
RBC × 10⁴/mm³
Hb g/dl
Plts × 10³/mm³

を分娩した。また、1例（症例4）は治療後5か月目に妊娠し、妊娠3か月で自然流産となった。他の1例（症例13）は、現在妊娠3か月で妊娠継続中である。

4. MTX 投与に関連した副作用としては、1例（症例6）で軽度の食欲不振と全身倦怠感を、1例（症

例5）で一過性のトランスアミナーゼ値の上昇を認めたのみであった。症例8では、治療前より軽度の脂肪肝によると思われるトランスアミナーゼ値の上昇があったが、MTX 投与後に増悪を認めなかった。

5. MTX 投与後、13例中5例で一過性の尿中hCG 値の上昇（細胞効果）が認められた。細胞効果

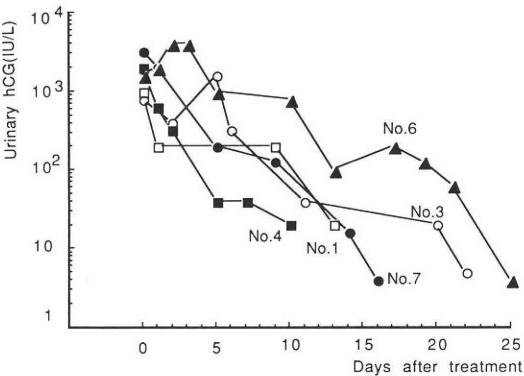


図 1 hCG 値の推移

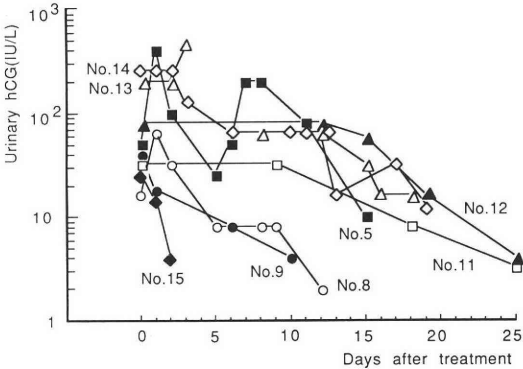


図 2 hCG 値の推移

を認めた症例と認めなかった症例とを比較したところ、妊娠週数、尿中 hCG・血中 β hCG 値のいずれにも有意差は認められなかった (表 3)。

6. 治療開始前の妊娠週数や尿中あるいは血中 hCG、 β hCG 値から、MTX 総投与量や治療日数を治療開始前に予測できるか否かを調べるために Spearman 相関係数などを用いて検討を行なった (表 3)。治療開始前の尿中 hCG 値は、MTX 総投与量との間には有意の相関を示さなかったが、治療日数との間には有意の相関を示した (表 3)。また、治療開始前の血中 hCG 値および血中 β hCG 値は、MTX 総投与量および治療日数と有意の相関を示した。治療開始

前の血中 hCG 値および血中 β hCG 値、尿中 hCG 値の間には有意の相関が認められるものの、治療開始前に MTX 総投与量や治療日数を予測するには、尿中 hCG 値より血中 hCG 値あるいは血中 β hCG 値のほうがよい指標となるものと考えられた。

7. 症例 14 および症例 15 における血中 MTX の濃度変化を図 3 に示した。MTX 筋注投与後、血中 MTX 濃度は 15-60 分以内にピーク値に達し、その後は半減期約 75 分でゆっくりと下降するものと思われた。

表 3 Spearman 順位相関係数

	診断時 妊娠週数	治療前 尿中hCG	治療前 血中 β hCG	治療前 血中hCG	細胞効果	入院日数	治療日数	MTX 総投与量
診断時 妊娠週数		-0.404	-0.375	-0.624*	-0.007	-0.019	-0.234	-0.078
治療前 尿中hCG			+0.900#	+0.942**	+0.114	+0.172	+0.706*	+0.489
治療前 血中 β hCG				+1.000#	-0.125	+0.600	+1.000**	+0.875#
治療前 血中hCG					+0.030	+0.133	+0.758*	+0.636#
細胞効果						+0.199	+0.041	+0.196
入院日数							+0.521#	+0.271
治療日数								+0.738*
MTX 総投与量								

** P < 0.01
* P < 0.05
P < 0.1

考 案

子宮外妊娠症例に対する従来の手術療法 (salpingoectomy) は、その後の妊孕性の低下を招くことが明らかにされており、妊孕性の温存を目的として様々な子宮外妊娠の治療法が工夫されつつある。観血的療法としては、腹腔鏡下あるいは顕微鏡下に linear salpingostomy や segmetal salpingoectomy などの保存的手術療法が試みられており、術後の妊孕性は若干の改善を見ている¹⁾。非観血的療法としては、MTX などの薬物を用いる治療法が現在検討されている。

MTX 療法は、これまで反復子宮外妊娠症例や頸管妊娠例などで、観血的療法を避ける必要のある症例を対象として検討されてきたが、最近では、妊孕性の温存にこだわらず、未破裂の子宮外妊娠症例を対象とする報告も見られるようになってきている^{2,3)}。今回、われわれは挙児希望のない症例も含め、hCG 活性が比較的低く、腹腔内出血も軽度で特に緊急手術の適応のない症例を MTX 療法の対象とした。これらの症例は、従来準緊急開腹手術の適応と考えられてきたものである。その結果、これらの症例を対象とした場合では、少量 MTX 療法は子宮外妊娠の治癒という観点から見て有効性が高く、比較的安全な治療法であることが確認された。また、副作用も軽微なものであることが示された。今後、尿中 hCG 値が比較的低く、腹腔内出血が少量で、全身状態の良好な子宮外妊娠症例に対しては、妊孕性の温存の必要性にかかわらず積極的に少量 MTX 療法を試み、その治療効果についてさらに検討を重ねたいと考えている。なお、今回対象となった症例の尿中 hCG 値は、32-3200 IU/L の範囲であったが、どの程度の尿中 hCG 値を示すものを少量 MTX 療法の適応の上限

とすべきかについては、投与方法・投与量などの問題も含め今後さらに検討する必要がある。

子宮外妊娠に対する MTX 療法としては、これまでのところ絨毛性疾患に準じた MTX の投与量・投与方法を採用している報告が多い²⁻⁵⁾。しかしながら、MTX の副作用などの点からみて、その投与量は有効かつ最低必要量にとどめることが望ましく、腫瘍性の疾患である絨毛性疾患に対する投与基準を採用することは必ずしも適当とはいえない。MTX 投与に伴う副作用軽減のために、インスリンの併用投与により MTX の作用増強を計り全身投与量を減らす方法や、MTX を絨毛内に局所的に投与することにより投与量の削減や全身投与を回避する方法が検討されつつある。後者は、腹腔鏡下に胎嚢を穿刺して局所に MTX を投与する、あるいは、超音波ガイド下に経腔的に胎嚢を穿刺・吸引した後、胎嚢内に MTX を投与するものであり、これらの方法によれば、MTX 全身投与法では治療が困難であった絨毛活性の高い症例をも治療対象となしうる可能性があり、その治療に要する期間も短縮されると考えられている^{6,7)}。

一方、今回われわれは、1 クールあたりの MTX 投与量を少量とし、臨床症状、尿中 hCG 値などの推移を考慮して個別的に追加投与する治療方式を試みることににより MTX 全身投与量の削減を計った。その結果、尿中 hCG 活性が 16-3200 (665±995) IU/L を示す 13 症例に対し、MTX を総量 25-50 mg 投与することにより保存的治療に成功したが、この投与量は、従来の報告^{2-4),8,9)}に比しかなり少ないものであった。この投与量の違いは、今回の検討対象が主に比較的低単位の尿中 hCG 活性を示した症例であったことに起因するものと考えられるが、尿中 hCG 値が 3200 IU/L および 2000 IU/L の症例においても、それぞれ 50 mg, 25 mg という少量の MTX 投与により緩解している点は注目されてよいと思われる。

いずれの症例でも、診断後直ちに MTX による治療を開始しているため、自然緩解過程にあった症例も含まれている可能性があるものと考えられる。MTX 療法は慢性の経過をたどる子宮外妊娠症例の治癒過程を促進するものとも考えられ、このような少量 MTX 投与でも治癒に至る症例が存在するものと推測される。自然治癒過程をとった子宮外妊娠症例では、高率に腹腔内の癒着が見られ、妊孕性が明らかに低下することが知られており、MTX 療法の眼目は、いかに少量の MTX 投与によって、早期にかつ安全に治癒に導くか、およびこの際いかに効率良く妊孕性を温存させるかという点にあるといえる。今回のわれわれの検討では、少数例ではあるが挙児希望症例 5

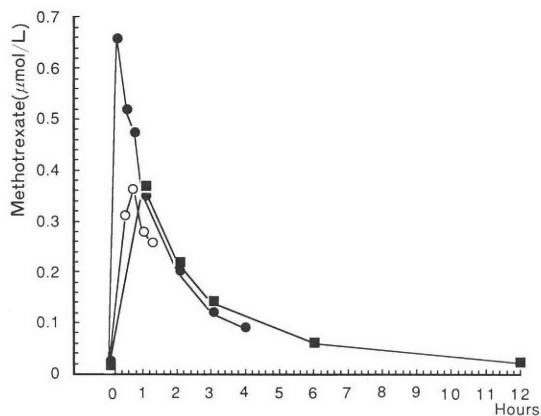


図3 MTX の血中濃度

例中3例において治療後子宮内妊娠が成立しており、他の報告に比べても遜色のない成績であった。

今回の検討では、治療開始前の尿中hCG値からあらかじめMTX総投与量を予測することは困難であったが、治療開始前の血中hCGあるいは β hCG値からMTX総投与量のある程度予測することができた。今後、血中hCGおよび β hCG値が迅速に測定できるようになることが望まれる。

どのような症例をMTX療法の対象症例とすべきか、あるいはその際投与量をどのように決めるべきかについては、今後さらに検討を要するものの、症例によっては初回の投与量を1日5mg、5日間という少量とし、その後の尿中hCG値の推移や臨床症状などを見て追加投与量を決定していくという方法が、MTX投与量を減少させるための1方法として有用である可能性が示唆された。

本論文の要旨の一部は、第23回日本不妊学会北陸地方部会（金沢市、昭和62年12月）において発表した。

文 献

- 1) Vermesh, M.: Conservative management of ectopic gestation, *Fertil. Steril.*, 51: 559, 1989
- 2) 相良祐輔, 浅井政房: メソトレキセートによる子宮外妊娠の保存的治療法, 産婦の実際, 37: 423, 1988
- 3) 宮崎幸雄, 椎名美博, 和気徳夫, 岡田雄一, 宇野洋一, 一戸喜兵衛: 卵管妊娠の非観血的治療法, 産婦治療, 46: 265, 1983
- 4) Ory, S. J., Villanueva, A. L., Sand, P. K. and Tamura, R. K.: Conservative treatment of ectopic pregnancy with methotrexate, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154: 1299, 1986
- 5) Sauer, M. V., Gorrill, M. J., Rodi, I. A., Yeko, T. R., Greenberg, L. H., Gunning, J. E. and Buster, J. E.: Nonsurgical management of unruptured isthmic ectopic pregnancy: preliminary experience, *Int. J. Fertil.*, 33: 116, 1988
- 6) Feichtinger, W. and Kemeter, P.: Conservative treatment of ectopic pregnancy by transvaginal aspiration under sonographic control and methotrexate injection, *Lancet*, 1: 381, 1987
- 7) Leeton, J. and Davison, G.: Nonsurgical management of unruptured tubal pregnancy with intra-amniotic methotrexate: preliminary report of two cases, *Fertil. Steril.*, 50: 167, 1988
- 8) Stovall, T. G., Ling, F. W. and Buster, J. E.: Outpatient chemotherapy of unruptured ectopic pregnancy, *Fertil. Steril.*, 51: 435, 1989
- 9) Sauer, M. V., Greengerg, L. H., Gorrill, M. J.,

Bustillo, M., Todi, I. A., Gunning, J. E., Yeko, T., R. and Buster, J. E.: Nonsurgical management of unruptured ectopic pregnancy: and extended clinical trial, *Fertil. Steril.*, 48: 752, 1987

Conservative treatment of ectopic pregnancy with individualized reduced dose of methotrexate

Makio Shozu, Yoshihiro Takahashi,
Takenori Harada, Kazutada Iida
Fukui Prefectural Hospital, Fukui 910, Japan

Hirohisa Ueno, Yoshi Kubota, Kazutomo Akasofu
Department of Obstetrics and
Gynecology, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan
(Director: Prof. Etsuro Nishida)

Fifteen women with ectopic pregnancy, producing relative low hCG with one exception, were treated conservatively by individualized, reduced dose of methotrexate injection (5mg intramuscular, every 5 days per course). One course of the treatment induced resolution of the ectopic pregnancy in 6 cases, and two courses in 7 cases. Complete resolution (urinary hCG less than 20 IU/L) was achieved within 2-24 days (mean 13 days). Treatment failed in two patients. Another woman of interstitial ectopic pregnancy, in which fetal cardiac movement was demonstrated by ultrasonography and urinary hCG titer was highest in this series, experienced tubal rupture 3 days after the initiation of methotrexate injection. Another woman was operated 4 days after the first course of methotrexate treatment because of a complicated tubal abscess. Tubal patency was demonstrated by following hysterosalpingography in all 4 women tested after the therapy. In Three of five women who desired pregnancy, a intrauterine pregnancy succeeded by the treatment. Using the reduced dosing described in this series, there were only minor side effects, and no major side effects.

It seems that this methotrexate therapy could facilitate the spontaneous regression process of a tubal pregnancy in selected cases, in which this therapy may improve future fertility. Regardless of future fertility, this reduced dose of methotrexate therapy may be used safely to some cases of hemodynamically stable ectopic pregnancy, although there is a need to establish criteria for patient selection.

(受付: 1989年11月13日)

ビタミン B₁₂ 欠乏症の一例 —不妊との関連において—

Vitamin B₁₂ Deficiency and Infertility —A Case Report—

宮崎医科大学産婦人科学教室

渡 辺 裕 之 池 田 智 明 山 口 昌 俊
Hiroyuki WATANABE Tomoaki IKEDA Masatoshi YAMAGUCHI
森 憲 正
Norimasa MORI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Miyazaki Medical College, Miyazaki 889-16, Japan

ビタミン B₁₂ (Vit. B₁₂) の欠乏が悪性貧血を起こすことは知られた事実であるが、また、不妊の原因になると言われている。今回 Vit. B₁₂ 吸収障害を補充療法により治療し、2 回の妊娠分娩に至った症例を経験したので報告する。症例は 29 歳、美容師、24 歳で健康男子と結婚、避妊はしていないが妊娠しなかった。27 歳時貧血のため当院内科受診。精査の結果 Vit. B₁₂ 吸収障害による巨赤芽球性貧血が疑われ、Vit. B₁₂ の補充療法半年後に妊娠。以後 2 回、妊娠、分娩し、非妊娠時は 3 か月に一回、妊娠中は 1 か月に一回、Vit. B₁₂ 500 μ g の補充を行った。悪性貧血の不妊患者 8 例のうち 7 例が Vit. B₁₂ の補充療法後 1 年以内に妊娠したという Jackson らの報告が示す様に、本症例も Vit. B₁₂ の欠乏が不妊の原因になったものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 564—567, 1990)

はじめに

ビタミン B₁₂ (Vit. B₁₂) は、DNA 合成に必要な補酵素であり、その欠乏は悪性貧血に代表される大球性、高色素性貧血像を呈し、亜急性連合脊髄変性症とよばれる神経障害や舌炎、胃炎、白髪など特異な臨床症状を呈する。食糧事情が良くなった我が国においてその欠乏をみることはまれである。Jackson ら¹⁾によると Vit. B₁₂ の欠乏はまた不妊の原因になるといわれている。今回我々は、悪性貧血に類似の検査成績を呈した Vit. B₁₂ 吸収障害による欠乏症で補充療法後 2 回の妊娠・分娩した症例を経験したので報告する。

症 例

29 歳。未婚妊。美容師。

家族歴：父母に高血圧がみられたが、同胞には特記すべき疾患なく、血族結婚もない。

月経歴：初経 12 歳 5 か月。月経周期は 28—56 日で不整。持続は 7 日間。経時障害は軽度の腰痛を訴えている。

既往歴：幼少時より疲れやすく、体育の授業を休むことが多かった。

24 歳で健康男子と結婚。以後特に避妊をしていないが妊娠しなかった。

昭和 61 年 2 月初旬 (27 歳) に動悸、息切れ、全身倦怠感を自覚し某内科を受診、貧血 (Hb 6.3g/dl、赤血球 162 万) を指摘され、鉄剤投与等の治療を受

けたが症状の改善をみなかった。当院内科に紹介され入院した。

内科入院時全身所見：

身長 156.4 cm, 体重 36.2 kg

Broca 指数 -36.8%, Kaup 指数 14.8

体温 37.0°C, 脈拍 84, 血圧 106/50 mmHg.

眼瞼結膜は著明な貧血状, 眼球結膜に黄疸は認められなかった。

下肢に日内変動のある筋力低下を認めた。

入院時検査所見は表1に示す様に, 大球性, 正色素性の貧血を認め, LDH は 2352 IU/ℓ と高値を示し, そのアイソザイム分画では I, II が優位であり無効造血を思わせた。血中葉酸値は, 2.6 ng/ml であり正常範囲にあったが, 血中 Vit. B₁₂ は, 78.2 pg/ml で低値を示した。以上の所見より貧血の原因は Vit. B₁₂ の欠乏によるもので, 内因子の欠乏による悪性貧血

表1 内科入院時所見

尿 検 査：	蛋白(-), 糖(-), ケトン(-)
糞 便 検 査：	虫卵(-), 潜血反応(-)
血 液 検 査：	血型 A型 Rh+
血算：	WBC 3100, RBC 155万, Hb 6.2,
	Hct 17.8, Plt 18.6万, MCV 113, MCH 38.4,
	MCHC 33.0
生化学検査	
TP	6.84, A/G 1.69
尿素窒素	10.0, Cクレアチニン
GOT	28, GPT 13, LDH 2352
LDH アイソザイム	LDH1 53.9, LDH2 36.5
	LDH3 6.6, LDH4 1.7, LDH5 1.3
Na	142, K 4.2, Cl 108
Fe	144 (70-150 μg/ml)
TIBC	150 (290-355 μg/ml)
フェリチン	211.8 (10-80 ng/ml)
Vit B ₁₂	78.2 (300-960 pg/ml)
Folate	2.6 (2-10 ng/ml)
免疫学検査：	HBsAg(-) Ab(-) TPHA(-)
特殊検査：	
胃 液 検 査	
胃液最高分泌量 (MSVR)	126 (62-182 ml/h)
最高酸分泌量 (MAO)	9.26 (4.8-17.6 mEq/h)
抗胃壁抗体	< 5 倍, 抗内因子抗体(-)
Schilling test	
Vit. B ₁₂ のみ	3.1% (11-28%)
Vit. B ₁₂ + 内因子	4.4% (12-30%)
テンシロンテスト	陽性
筋電図	waning 現象(-)

を強く疑い, radio-active Vit. B₁₂ 吸収試験 (Schilling test) が行われた。Vit. B₁₂ の経口投与のみでは, その尿中への移行は 3.1% で低く, 内因子付加後も 4.4% の低値を示し, 内因子の欠乏よりも, Vit. B₁₂ の吸収障害を示唆した。

また両下肢に筋力低下が認められ, テンシロンテスト陽性であり, 重症筋無力症の合併が考えられたが, 胸腺腫は認められなかった。

骨髓穿刺検査では, 大型で核網の繊細かつ幼若な巨赤芽球が多数出現し赤芽球系細胞の過形成像を呈していた。(写真1)

診断：Vit. B₁₂ 欠乏による巨赤芽球性貧血および重症筋無力症の合併

治療：Vit. B₁₂ の補充療法を開始した。治療経過は図1のように Vit. B₁₂ 投与 (500 μg 筋注) 後から, ヘモグロビン, 赤血球数は急速に改善し, LDH 値も急速に低下した。また全身倦怠感などの症状も消失した。重症筋無力症症状は, 貧血の改善とともに消失した。

結婚後3年間不妊であったが, とくに不妊症の検査は行っていない。Vit. B₁₂ の補充療法6ヶ月後, 昭和61年に初めて妊娠した。

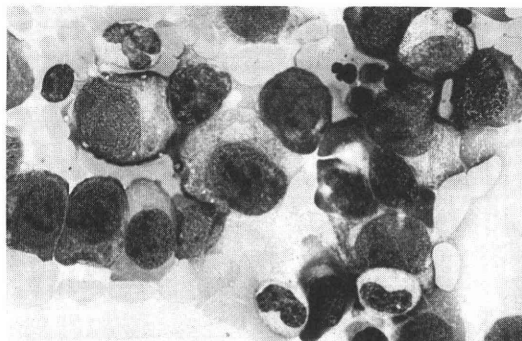
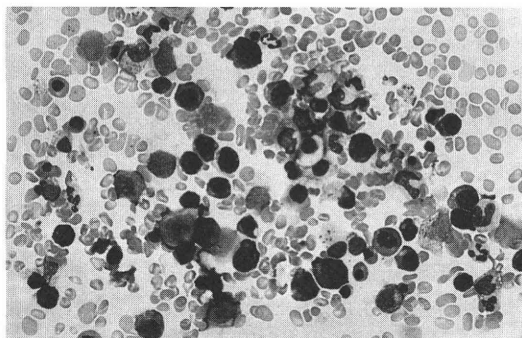


写真1 本症例の骨髓所見
上段 ×400
下段 ×1000

初回の妊娠・分娩経過：

昭和 61 年 9 月 25 日から 6 日間の月経を最終月経として妊娠、妊娠 30 週までは他医で管理されていたが、昭和 62 年 5 月 1 日に当科を受診した。初診時の Hb は 11.8 g/dl であり貧血は認められなかったが、血中 Vit. B₁₂ は 169.8 pg/ml で低値を示した。妊娠中は毎月 1 回 Vit. B₁₂ 500 μ g の筋注を行った。妊娠経過中はとくに貧血の悪化もなく、他に合併症も認められなかった。妊娠 40 週に自然陣痛発来し、経膣分娩した。分娩時間 19 時間 15 分、出血量 175 g であった。新生児は 3,830 g の女児で、Apgar score 1 分後 7 点、5 分後 9 点であり、外変奇形等の異常は認められなかった。産褥経過は特に異常なく、以後 Vit. B₁₂ を 3 か月に 1 回投与した。

第 2 回目の妊娠・分娩経過：

昭和 63 年 5 月 9 日から 7 日間の月経を最終月経として以後無月経となった。7 月 8 日に、妊娠 8 週 3 日と診断した。妊娠後再び Vit. B₁₂ 投与を 1 か月に 1 回 500 μ g に増量した。妊娠経過中軽度の鉄欠乏性貧血 (Hb 9.3 g/dl) を認めたが、鉄剤投与により妊娠後期には回復した。妊娠 38 週 5 日に自然陣痛発来し、経膣分娩した。分娩時間 6 時間 12 分、出血量 177 g であった。

新生児は 3,276 g の女児で、Apgar score は 1 分後 9 点、5 分後 9 点であった。母児ともに分娩後の経過は良好であった。

2 回の妊娠、分娩中、産褥期とも重症筋無力症の再発、増悪、クレーゼは認められなかった。

考 案

本症例は Vit. B₁₂ 吸収障害による巨赤芽球性貧血に、重症筋無力症を合併したものと考えられた。Vit. B₁₂ 吸収障害は、胃液中の内因子の分泌低下あるいは消失により Vit. B₁₂ の腸管からの吸収が不良となる

悪性貧血や、胃全摘出後、Vit. B₁₂ の吸収部位である回腸末端部の切除後、菜食主義や慢性アルコール中毒による Vit. B₁₂ 欠乏食などが原因になる。しかし、本症例では手術歴もなく食餌性因子も考えにくく、腸管内細菌、寄生虫感染も否定的であり、骨髓所見、舌乳頭萎縮、重症筋無力症の合併などの所見から内因子の低下もしくは欠乏による悪性貧血が強く疑われた。内因子の付加による Vit. B₁₂ の吸収改善をみるため、Schilling test を行ったが、内因子を付加しても改善は認められず、悪性貧血の確定診断はできず、Vit. B₁₂ 吸収障害と診断した。

悪性貧血では貧血の一般症状のほか、神経・精神症状(亜急性性連合脊髄変性症)、無酸症、萎縮性胃炎、まれに黄疸、白髪化、他の自己免疫疾患との合併をみることが多いとされ、本症例でも舌乳頭萎縮、自己免疫疾患として内科での精査により、重症筋無力症の合併を認めた。さらに 2 回目の妊娠では抗胃壁細胞抗体を母体血、臍帯血ともに認めた(10 倍)が、内因子抗体は認めなかった。神経、精神症状は呈さなかった。

Vit. B₁₂ の欠乏は男子では精子の運動性の障害、女性では月経の異常、排卵障害等を引き起こし、不妊の原因になる^{1-2,8)}と言われているが、その機序は明らかでない。Jackson¹⁾によると、悪性貧血合併の不妊症患者を 8 例報告しているが、うち 7 例が Vit. B₁₂ 投与による治療後 1 年以内に妊娠したと報告している。そのなかの数例は悪性貧血の診断がつく以前の Hb 値は正常にもかかわらず妊娠しておらず、貧血自身が不妊の原因ではないと述べている。また Parr²⁾も悪性貧血の不妊症例を 1 例報告しているが、その機序に関しては述べられていない。

不妊症以外でも Vit. B₁₂ の低値の症例では、月経周期の異常や流産の頻度も高い⁸⁾とされ、本症例でも Vit. B₁₂ 投与による貧血の治療前には不整であった月経も整順となった。

動物実験では、Vit. B₁₂ の低下は催奇形性がある^{3,5)}とされ、無脳症との関連⁵⁾も報告されており、無脳症の児の羊水中 Vit. B₁₂ 濃度は正常児に比べ有意に低かったと Baker らは述べている。Vit. B₁₂ は active transport により児に移行⁹⁾、その濃度は母体血に比べ胎児では有意に高く⁴⁾、その重要性が示唆され、本症例でも臍帯血濃度は、母体血の約 3 倍の高値を示しており、Vit. B₁₂ が胎児の細胞分裂、器官形成過程で深く関わっていることが示唆された。

以上の様に Vit. B₁₂ は、DNA 合成に関する補酵素であるという本質から細胞分裂や胎児発育に必要であり、不妊の原因に関しては、卵の分割に及ぼす影

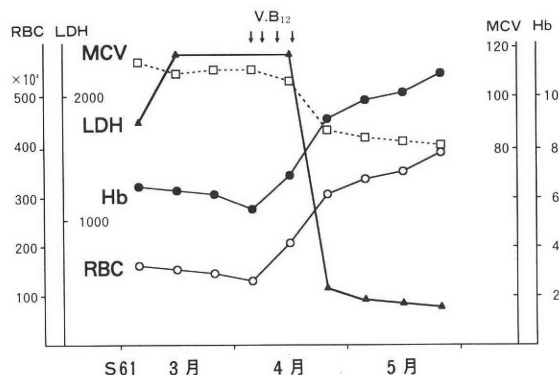


図 1 本症例の治療経過

響、月経、ホルモン動態の異常から排卵に及ぼす影響など複雑に関与しているものと思われるが、その詳細に関しては明らかにされていない。

近年男性不妊症に対して、Vit. B₁₂の投与により、精子数、運動率の改善をみたとの報告⁶⁻⁷⁾もあり、Vit. B₁₂が妊娠の成立、維持に深く関わっていると考えられ、今後その病態解明が求められるとともに、女性不妊症患者においても治療への応用の可能性が考えられる。

文 献

- 1) Jackson, I. M. D., Doig, W. B. and McDonald, G.: Pernicious anemia as a cause of infertility, *Lancet*, 2: 1159, 1967
- 2) Parr, J. H. and Ramsay, I.: The presentation of osteomalasia in pregnancy. Case report, *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, 91: 816, 1984
- 3) Gardiki, K. P. and Sellar, M. J.: Amniotic fluid forate, vitamin B₁₂ and transcobalamin in neural tube defect, *Clin. Genet.*, 33: 411, 1988
- 4) Baker, H., Ziffer, H., Pasher, I. and Sobotka, H.: A comparison of maternal and foetal folic acid and vitamin B₁₂ in pregnancy at perturbation, *Brit. Med. J.*, 1: 978, 1958
- 5) Shepard, T. H.: Catalog of teratogenic agent, ed 3. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 348, 1980
- 6) 押尾茂, 毛利秀雄, 尾崎寛, 大川功, 田島鉄弥: 実験的精巣障害マウスの精巣機能に及ぼすメコバラミンの影響, *日不妊会誌*, 33: 174, 1988
- 7) 大橋輝久, 永井淳, 入江伸, 大橋洋三, 古川雅人, 山下良孝, 東条俊司, 武田克治, 大森弘之: 突発性男子不妊症に対するMethylcobalaminの検討 精漿内 Vitamin B₁₂濃度を中心として, *日不妊会誌*, 32: 200, 1987
- 8) 小宮正文: 貧血症, : 77, 永井書店, 1976
- 9) Luhby, A. L., Coopman, J. M., Donnenfeld, A. M., Herrero, J. M., Teller, D. N. and Wenig, J. B.: Observation on transfer of vitamin B₁₂ from

mother to fetus and newborn, *Am. J. Dis. Child.*, 96: 532, 1958

Vitamin B₁₂ deficiency and infertility -A case report-

Hiroyuki Watanabe, Tomoaki Ikeda
Masatoshi Yamaguchi and Norimasa Mori

Department of Obstetrics and Gynecology,
Miyazaki Medical College,
Miyazaki 889-16, Japan

Vitamin B₁₂ (Vit. B₁₂) deficiency is rare disorder. In the gynecological area, it is reported to relate with sterility. However, treatment of Vit. B₁₂ related sterility with Vit. B₁₂ is effective to achieve pregnancy.

We report a case of successful pregnancy, who was treated with Vit. B₁₂. She married at 24 years of age. Her menstrual cycle was irregular since menarche. She has not been pregnant without contraception. At 27 years of age, she was pointed out macrocytic hyperchromatic anemia. Radioactive Vit. B₁₂ absorption test showed low Vit. B₁₂ absorption. Administration of the intrinsic factor did not restore Vit. B₁₂ absorption. From these results it was suggested that anemia of this patient was caused by disturbance of Vit. B₁₂ absorption. Administration of the Vit. B₁₂ rapidly recovered the anemia. After six months, she became amenorrhea. She was diagnosed pregnancy 27 weeks. This pregnancy passed uneventfully with a monthly administration of 500 µg of Vit. B₁₂. She was delivered of a normal female baby. Administration of Vit. B₁₂ was continued. Two years later, she became pregnant again. The second pregnancy was also uneventful except mild iron deficiency anemia. In this case, deficiency of Vit. B₁₂ was considered to cause ovarian dysfunction and sterility.

(受付: 1989年12月20日)

男性不妊症における膿精液症 (pyospermia) の診断と治療について

Diagnosis and Treatment of Pyospermia in Infertile Men

東北大学医学部泌尿器科学教室 (主任：折笠精一教授)

佐藤 和宏	折笠 精一	前原 郁夫
Kazuhiro SATOH	Seichi ORIKASA	Ikuo MAEHARA
佐藤 滋彰	高橋 勝	平松 正義
Sigeaki SATOH	Masaru TAKAHASHI	Masayosi HIRAMATSU

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

男性不妊症における膿精液症の診断と治療に関する問題点について述べた。

精液中白血球の染色法は、精子の生死の判定に汎用されているエオジン染色が適当と思われた。膿精液症の定義として我々は $WBC \geq 10/\text{hpf}$ semen としたが、これはおよそ $WBC \geq 1.0 \times 10^6/\text{ml}$ に相当し、無精子症を除外した不妊症 670 名中 72 名 (10.8%) があてはまった。

膿精液症の治療として doxycycline を中心とした薬物療法を 72 名に施行した。その結果精液中白血球は 70.8% で減少し、精子運動能は 43.1% で改善した。このことから膿精液症に対する今回のような薬物療法は有用であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 568—572, 1990)

緒 言

膿精液症とは、精液中に一定数以上の白血球を認める病態を指し、不妊症のひとつの原因と考えられている。しかしその診断、治療にあたっては、いまだ不明な点も多く今後の検討課題も多い。我々は末梢血白血球は精子運動性を抑制し、その原因物質のひとつとして顆粒球 elastase が関与している事を実験的に明らかにしてきた¹⁾。今回は男性不妊症における膿精液症の診断および治療の実際についてのべてみたい。

膿精液症の診断などについて

1) 精液中白血球の染色法について：

我々は 0.5% エオジン染色を中心にしてトリパンブルー染色、ギムザ染色も併用している。エオジン染色は精子の生死を判定するのに一般的に用いられ、

若干の慣れを要するが白血球の認識も可能である。この場合 live leucocyte は黄緑色に、dead leucocyte はピンク色に染色される。トリパンブルー染色は白血球の生死の判定に、ギムザ染色は白血球の種類の鑑別に有用であるが、一般的にはエオジン染色のみで充分である。図 1, 2, 3 にこれら 3 方法による精液中白血球像をしめす。精液中白血球認識の際に問題となるのは、精液中に出現する immature germ cell との鑑別であり、この点については後述する。

2) 膿精液症の定義について：

1987 年の WHO の manual によれば²⁾、 $WBC \geq 1 \times 10^6/\text{ml}$ を膿精液症としているが、これは Thomas の計算盤の 5 小分画中に WBC が 1 個以上見られるものをさす。この定義では実際上かなりの割合の不妊症が膿精液症の範疇にはいつてしまう。そこで我々は検鏡 400 倍視野で 10 個以上 ($WBC \geq 10/\text{hpf}$) を

膿精液症と定義したところ、当科不妊外来を受診した者の内無精子症を除く、670名72名、10.8%が膿精液症と診断された¹⁾。尚この判定量法(a法)の他に定量法として血球計算板上で末梢血白血球算定法と同様に(b法)、また精子算定法と同様の方法(c法)にて精液中白血球を算定した。b法(/mm³)とc法(/ml)は単位の違いのみであり、a法とc法は実測値を比較することにより、これら3法の関係は $a \times 10^6 \div b \times 10^3 = c / \text{ml}$ となり、 $\text{WBC} \geq 10 / \text{hpf}$ は大体 $\text{WBC} \geq 10 \times 10^6 / \text{ml}$ となる。我々の臨床統計では、膿精液症群72名中精子運動能(SMEI)が50未満のものは40名(55.6%)であり、正常群535名中SMEI 50未満の81名(15.1%)と比べ推計学的に有意の差が認められた($P < 0.01$)¹⁾。即ち膿精液症では精子の直進運動性が減弱している傾向がみられた。

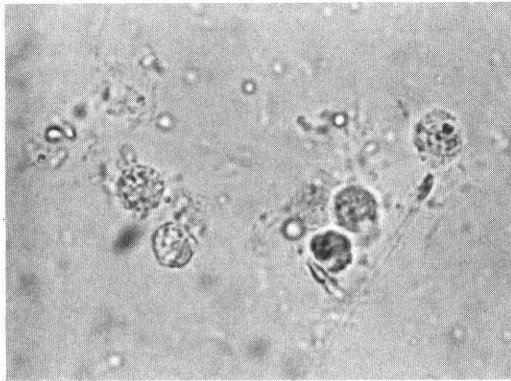


図1 エオジン染色。live leucocyteは黄緑色に、dead leucocyteはピンク色に染色される。



図2 トリパン・ブルー染色。live leucocyteは黄緑色に、dead leucocyteは青紫色に染色される。

膿精液症の治療について

膿精液症は分割射精などの結果から、無症状の慢性前立腺炎に起因すると思われる¹⁾。慢性前立腺炎の治療法にも種々議論がみられるが、今回は一般的治疗法に準じて抗菌薬、抗炎症剤を用いた。以下その内容について触れる。対象は精液中白血球数により $5 \leq \text{WBC} < 10$ の境界群47名、 $\text{WBC} \geq 10$ 個以上の膿精液症群25名の計72名である。これら72名のSMEI別分類は、70以上(正常)22例、 $50 \leq < 70$, 16例、 $30 \leq < 50$, 16例、30未満(精子無力症)18例であった(表1)。薬剤は表2のごとくdoxycycline群51例(牛車腎気丸併用22例、小柴胡湯併用16例、その他併用4例、単独9例)その他の抗菌薬投与群21例(CPFX, OFLX, ST etc.)である。投与期間は2カ月以上6カ月未満を原則とした。薬効判定基準は表1のように精液中WBC数、SMEI値を各々3段階、4段階に分け治療前後の比較で2段階以上の改善は著明改善、1段階の改善の改善は改善、同じ段階は不変、1段階以上の悪化は悪化とした。

結果を表4、5、6に示す。今回の結果から抗菌薬を主体とした薬物療法を継続する事により70~80%の症例でWBCの減少、40~60%の症例でSMEIの上昇が見られることが判明した。ことに最も症例



図3 ギムザ染色。白血球の分画を知るのに有用である。

表1 効果判定基準

投与前後のWBC数、SMEI値を検討する。WBC数、SMEI値を以下の如く各々3段階、4段階にわけて、2段階以上改善は著明改善、1段階の改善は改善、同じ段階は不変、1段階以上の悪化は悪化とした。

WBC: $0 \leq < 5$, $5 \leq < 10$, 10以上

SMEI: 70以上, $50 \leq < 70$, $30 \leq < 50$, 30未満

WBC, SMEIを上記の如く分類し、投与前後で判定した。

数の多かった doxycycline+牛車腎気丸の組み合わせでは WBC, SMEI の改善以上が各々 77.3%, 59.1% と良い成績であった。妊娠例も経験しているが、今回はアンケート調査などは施行していない。

考 察

膿精液症 (Pyospermia) が男性不妊症の一つの原因であるか否かについては議論の多いところである。精液中白血球の認識の方法、膿精液症の定義、膿精液症が精子に与える影響についての検討、治療及びその薬効の検討方法などに検討の余地がある。

精液中白血球の染色法としてはエオジン、トリパンプルー、ギムザ染色のほかに Peroxidase 染色、Bryan-Leishman 染色²⁾、単クローン抗体を用いた染色法³⁾などがある。Peroxidase 染色は白血球と精細

胞の識別に、Bryan-Leishman 染色は精細胞の種類の識別に、単クローン抗体を用いた方法は、白血球の種類の識別に有用とされる。膿精液症では白血球とともに immature germ cell が精液中に多く出現することが知られており⁴⁾、従って白血球と immature germ cell の識別が必要とされる。エオジン染色は簡便で、精子の生死の判定に常用されている方法であるが、白血球と immature germ cell との鑑別には若干の慣れを要する。Peroxidase 染色以下の方法は目的とする細胞の染色には良いが、やや複雑であり日常の検査にはなじまない面もある。今回はエオジン染色を主にトリパンプルー、ギムザ染色も併用したが、より簡便で鋭敏な染色法が望まれる。

表 3 投与薬剤別症例数。doxycycline 群 51 例、その他の抗菌剤投与群 21 例

	例数		例数
doxycycline 群 (vibramycin [®])	51	牛車腎気丸併用	22
		小柴胡湯併用	16
		その他併用	4
		単独	9
そ の 他	21	CPFX (ciproxan [®])	
		OFLX (Tarivid [®])	
		ST (Baktar [®])	
		等	

表 2 72 例の WBC 別、SMEI 別分類
白血球 1 視野 10 個以上 (膿精液症群)、5 個以上 10 個未満 (境界群) の 72 名を対象とした。

● WBC 別分類 (/hpf)	
10 以上	25 例
5 ≤ < 10	47 例
● SMEI 別分類	
70 以上	22 例
50 ≤ < 70	16 例
30 ≤ < 50	16 例
30 未満	18 例

表 4 結果 (全症例)。WBC の改善以上は 70.8%, SMEI の改善以上は、43.1% であった。

評価項目	著明改善	改 善	不 変	悪 化	合 計	累積改善率 (%)	
						著明改善以上	改善以上
WBC	12	39	18	3	72	16.7	70.8
SMEI	10	21	28	11	72	13.9	43.1

表 5 結果、doxycycline+牛車腎気丸群。WBC の改善以上は 77.3%, SMEI の改善以上は 59.1% であった。

評価項目	著明改善	改 善	不 変	悪 化	合 計	累積改善率 (%)	
						著明改善以上	改善以上
WBC	2	15	5	0	22	9.0	77.3
SMEI	7	6	6	3	22	31.8	59.1

表 6 結果、doxycycline+小柴胡湯群、WBC の改善以上は 81.3%, SMEI の改善以上は 50% であった。

評価項目	著明改善	改 善	不 変	悪 化	合 計	累積改善率 (%)	
						著明改善以上	改善以上
WBC	3	10	3	0	16	18.9	81.3
SMEI	0	8	6	2	16	0	50

膿精液症の定義としてはWHOは $WBC \geq 1 \times 10^6 / \text{ml semen}$ をpyospermiaと定義し、またComhaireら⁵⁾は膿精液症または不妊に関連した男性副性器感染症の診断基準として以下の5つの条件のうち、2つ以上を満たすものとしている。即ち1. 精液中白血球数が $10^6 / \text{ml}$ 以上、2. 精液培養で $10^3 / \text{ml}$ 以上の病原菌又は $10^4 / \text{ml}$ 以上の非病原菌を認める3. 前立腺液、精囊液の機能低下4. 尿路副性器感染症の既往5. 前立腺マッサージ後の分泌液又は尿に白血球数が各々40個以上、15個以上認める事。今回我々はより簡便で精液中白血球の条件を厳しくした $WBC \geq 10 / \text{hpf}$ (およそ $WBC \geq 10 \times 10^6 / \text{ml}$ に相当する)を膿精液症の定義とした。この定義による頻度は不妊症(無精子症は除外)の10.8%であり、WHOの定義に準じたComhaireらは⁵⁾2871名中5.6%、Rogers⁷⁾は243名の不妊症者中 $WBC 3 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上が55.0%、 $10 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上が17.3%としている。膿精液症の頻度が報告者によって異なるのは、精液中白血球の染色法、膿精液症の定義が異なるためと思われる。

膿精液症が精子に及ぼす影響を与えるかについても意見は二分されている。本邦においてはこの問題に対する検討は少ないが、欧米では1970年代から種々議論がみられ、最近ではEl-Demiryら⁸⁾は膿精液症は精子の質に影響を与えず、従って不妊症との因果関係はなとい述べている。これに対しRogers⁷⁾は膿精液症に対し、swim up法や抗菌薬投与により精液中白血球が減少した場合のSPA (sperm penetration assay)値が上昇することより、膿精液症は不妊症の一要因である可能性を指摘している。我々の検討結果¹⁾からは臨床統計的にも実験的にも膿精液症は精子運動性に影響を与え、不妊の原因の一要因であると考えられた。

治療について

膿精液症の原因としては慢性非細菌性前立腺炎がまず挙げられる。一般に前立腺炎は4つ分類され、慢性非細菌性前立腺炎はC. trachomatisやUreaplasma urealyticum感染は否定できないものの病原菌感染はなく、前立腺マッサージ後の分泌液(EPS)や尿(VB 3)に白血球の出現をみるものである¹⁾。治療としてはテトラサイクリン系抗生剤がfirst choiceとされるが、治療効果は一進一退で実際の臨床の場で泌尿器科医が悩まされる疾患のひとつである。膿精液症の場合には会陰部不快感などの症状は殆どなく¹⁾、その意味で不顕性の慢性非細菌性前立腺炎が原因と思われたが、治療は一般の慢性非細菌性前立腺

炎に準じて施行した。

欧米の報告では1975年Harrisonら¹⁰⁾はdoxycycline 100mg/dayを28日間30組の夫婦に投与し、28組のplacebo投与群、30組の未治療群と比較検討した。その結果doxy.投与群ではmycoplasmaは消失するが、妊娠率に群間の差はみられなかった。またBakerら(1984)¹¹⁾はerythromycine群、placebo群共に運動率の上昇が見られ、群間に有意差が見られなかったことを報告している。Comhaireら⁶⁾はdoxy.を用いた検討でBakerらと同様の結果を得ているが、白血球の減少と運動率の上昇が並行して起こることから膿精液症と精子運動率には何か関係があるかもしれないと述べている。一方こうした懐疑的、あるいは消極的評価に対し、Giamarellou¹²⁾らはST合剤、doxycycline, erythromycineなどを6~8か月長期に投与することで前立腺炎症状、精子の質の改善、妊娠率の上昇が見られたと報告している。更にRogers⁷⁾はST合剤を、3か月投与することで精液中白血球の減少とSPAの上昇が見られたと報告している。このように膿精液症に対する薬効評価も一定ではないが、今回の我々の検討結果からは精液中白血球の減少が約70~80%、精子運動能の改善が40~60%の症例にそれぞれ見られたことからdoxycyclineを中心とした薬物療法は、膿精液症に対しある程度有用であることが示唆された。最近のニューキノロン系薬剤も同様の効果があることが推定されるが、今後これらの薬剤を用いたdouble blind testが施行されればより客観的結果が得られることと思われる。

結 語

男性不妊症における膿精液症の診断と治療についてのべた。診断に関しては精子中白血球の染色法、定義などに検討の余地があることを述べた。治療に関してはdoxycycline系薬剤を中心とした薬物療法が精液中白血球の減少、精子運動能の改善に有用であることを述べた。

(本論文の要旨は、日本アンドロロジー学会第8回学術大会(札幌, 1989)において発表した。稿を終えるにあたり御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) 佐藤滋彰, 佐藤和宏, 折笠精一, 前原郁夫, 高橋勝, 平松正義: 男性不妊症における膿精液症(pyospermia)に関する基礎的、臨床的検討, 日泌尿会誌, 81: 170, 1990
- 2) WHO: WHO laboratory manual for the exami-

nation of human semen and semen-cervical mucus interaction, Cambridge University Press, 1987

- 3) Wolff, H. and Anderson, D. J.: Immunohistologic characterization of leucocyte subpopulations in human semen, *Fertil. Steril.*, 49: 497, 1988
- 4) 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5報, 膿精液症および正常者の精子, 精子細胞などの微細構造について, 日不妊会誌, 35: 263, 1990
- 5) Comhaire, F., Verschraegen, R. and Vermeulen, L.: Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility, *Int. J. Androl.*, 3: 32, 1980
- 6) Comhaire, F. H., Rowe, P. J. and Farley, T. M. M.: The effect of doxycycline in infertile couples with male accessory gland infection: a double blind prospective study, *Int. J. Androl.*, 9: 91, 1986
- 7) Rogers, B. J.: Clinical application of the sperm penetration assay (SPA) in diagnosing and treating male infertility, *Int. J. Androl. suppl.*, 6: 59, 1986
- 8) El-Demiry, M. I. M., Young, H., Elton, R. A., Hargreave, T. B., James, K., and Chisholm, G. D.: Leucocyte in the ejaculate from fertile and infertile men, *Brit. J. Urol.*, 58: 715, 1986
- 9) Harrison, J. H., Gittes, R. F., Perlmutter, A. D., Stamey, T. A. and Walsh, P. C.: *Cambell's Urology*, ed 4, 509, W. B. Saunders Co., 1979
- 10) Harrison, R. F., Louvois, J., Blades, M. and Hurley, R.: Doxycycline treatment and human infertility, *The Lancet*, 15: 605, 1975
- 11) Baker, H. W., Straffon, W. G. E., McGowan, M.

P., Burger, H. G., de-Kretser, D. M. and Hudson, B.: A controlled trial of the use of erythromycin for men with asthenospermia, *Int. J. Androl.*, 7: 383, 1984

- 12) Giamarellou, H., Tympanidis, K., Bitos, N. A., Leonidas, E. and Daikos, G. K.: Infertility and chronic prostatitis, *Andrologia*, 16: 417, 1984

Diagnosis and treatment of pyospermia in infertile men

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

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

The diagnosis and treatment of pyospermia in infertile men was discussed.

The leucocytes in ejaculates, stained by 0.5% eosin, were calculated and the semen with WBCs above 10/hpf was defined as pyospermia. Then, 10.8% of 670 infertile men's semen, excluding the cases of azoospermia, were diagnosed as pyospermia.

72 infertile men with pyospermia were given drug (mainly doxycycline plus herb medicine) for 2-6 months. After the therapy, sperm progressive motility showed improvement in 43% of the cases and WBCs in the semen reduced in 70% of the cases.

It is suggested that the treatment of pyospermia is effective in the improvement of semen quality.

(受付: 1989年9月26日)

Adriamycin 投与ラットにおける 造精機能障害に関する内分泌学的, 組織学的検討

Endocrinological and Histological Studies on Spermatogenic Dysfunction in the Rat Treated with Adriamycin

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

永井 敦	大橋 輝久	大橋 洋三
Atsushi NAGAI	Teruhisa OHASHI	Yozo OHASHI
山下 良孝	小浜 吉照	大枝 忠史
Yoshitaka YAMASHITA	Yoshiteru KOHAMA	Tadashi OEDA
山根 享	吉田 光宏	大森 弘之
Susumu YAMANE	Mitsuhiro YOSHIDA	Hiroyuki OHMORI

Department of Urology, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director: Prof. H. Ohmori)

Adriamycin 投与ラットにおいて, 精巣障害および精細管内 androgen 濃度に対する影響を観察した. control 群には生食 1 ml/kg, ADR 群には ADR 0.3 mg/kg を週 3 回, 7 週間皮下注射した. 精細管壁の厚さは control 群 1.41 ± 0.24 (M $\pm$ SD) μ m, ADR 群 2.32 ± 0.42 μ m と ADR 群で著明な肥厚が認められた. Germ cells/Sertolic cells (Sg/Se) 比は Sg/Se 比では control 群 2.66 ± 0.55 , ADR 群 0.70 ± 0.27 , Sc/Se 比, St/Se 比はそれぞれ, control 群 4.42 ± 0.75 , 10.56 ± 1.63 , ADR 群 0.46 ± 0.25 , 1.13 ± 0.93 であった. 血中 T, LH level に関しては投与前後で両群間に差を認めず, FSH については ADR 群に有意の上昇を認めた. 精細管内 T 濃度は control 群 213.7 ± 83.5 ng/g. t. w., ADR 群 222.0 ± 98.3 ng/g. t. w., 精細管内 DHT 濃度は control 群 7.4 ± 2.1 ng/g. t. w., ADR 群 7.0 ± 2.3 ng/g. t. w. と有意差は認めず, ADR 投与によるラットの精巣障害作成モデルにおいては精細管内 androgen 濃度は影響を受けないことが判明した.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 573—577, 1990)

緒 言

Adriamycin (ADR) 投与により, ラットやマウスにおいて, その造精機能に障害が与えられることが判明している^{1)–2)}. これを利用し, 不妊病態モデルとして種々の検討がなされている^{3)–4)}. ADR は精祖細胞および精母細胞の分裂時における DNA 合成を障害すると推察されているが⁵⁾, ADR 投与時における内分泌学的動態について不明な点が多い. 今回, 我々は ADR 投与ラットにおいてその精巣障害を組織学的に

検討するとともに, 血中 Testosterone (T), LH, FSH の推移ならびに精細管内 androgen 濃度に対する影響を観察したので報告する.

対象並びに方法

I. 対象および実験方法

実験には 10 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した. 薬剤投与スケジュールは, control 群には生食 1 ml/kg, ADR 群には ADR 0.3 mg/ml/kg を週 3 回, 7 週間, 計 21 回皮下注射した. 使用した

ラット数は、control 群、ADR 群ともに各 7 匹である。最終皮下注射後 3 日期間をおき、その後屠殺し、精巣、副性器を摘出した。採血は投与前および 3 週目には尾静脈より、屠殺時には下大静脈より行なった。

II. 測定方法

1. 精細管内 androgen 濃度測定

精細管は穂坂ら⁶⁾により報告された方法に従い、コラゲナーゼと No. 100 メッシュを用いる two step incubation system にて分離した。

精細管内 T および 5α -dihydrotestosterone (DHT) 濃度はわれわれが既に報告した Sephadex LH-20 microcolumn chromatography による分画抽出法を用いた RIA 法にて測定した⁷⁾。

2. ラット血清 T, LH, FSH 濃度測定

血清 T は RIA 二抗体法にて測定し、LH, FSH に関しては、National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIADDK) より提供を受けた rat LH, FSH 測定用 RIA キットにより、RP-2 スタンダードを用いて測定した。

結 果

I. 精巣、副性器重量

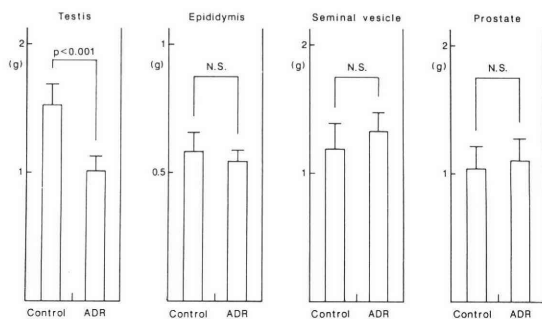


Fig. 1 Effect of ADR on reproductive organ weight

摘出した精巣、副性器重量を Figure 1 に示す。精巣重量は control 群が 1.53 ± 0.16 (mean $\pm$ S. D.) g, ADR 群が 1.01 ± 0.11 g であり、ADR 群で有意に精巣重量の低下を認めた。精巣上位に関しては control 群が 0.58 ± 0.07 g, ADR 群が 0.54 ± 0.04 g であり、有意差を認めなかった。精囊腺、前立腺重量に関してはそれぞれ control 群が 1.19 ± 0.20 g, 1.03 ± 0.17 g, ADR 群が 1.33 ± 0.15 g, 1.10 ± 0.13 g であり、ともに有意差を認めなかった。

II. 血中ホルモン濃度

血中 T, LH, FSH 濃度の推移を Figure 2 に示す。T 濃度に関しては ADR 群で投与後に若干の低下傾向

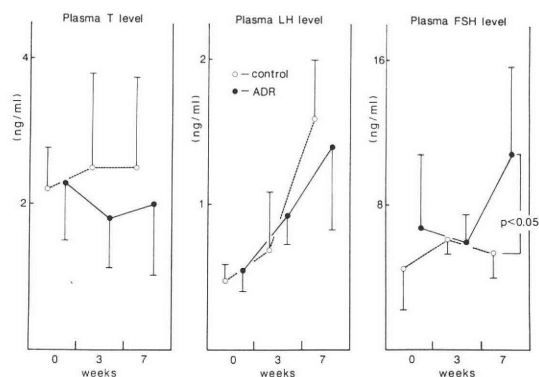


Fig. 2 Change of plasma T, LH and FSH levels by ADR administration

を認めたが、統計学的には control 群とは有意差を認めなかった。LH 濃度に関しては週齢にともなって上昇傾向を認めたが、各群間では有意差は認めなかった。FSH 濃度に関しては、投与 3 週目では差を認めなかったが、7 週目では両群間で有意の差を認めた。

III. 組織学的効果

精細胞障害の程度を見る指標としては Germ cells 数と Sertoli cells 数の比 (Sertoli cell ratio) を求めた⁸⁾。1 精巣で 50 以上の精細管を観察し、control 群は Stage VI の精細管、ADR 群は Stage の同定が困難なため Stage I~VII の精細管で求めた。

各精細管における Sertoli cell ratio は Spermatogonia で control 群 2.66 ± 0.55 , ADR 群 0.70 ± 0.27 , Spermatocyte で control 群 4.42 ± 0.75 , ADR 群 0.46 ± 0.25 , Spermatid で control 群 10.56 ± 1.63 , ADR 群 1.13 ± 0.93 であり、いずれの精細管においても ADR 群で著明な精細胞数の減少を認めた (Figure 3)。

精細管壁の厚さに関しては control 群 1.41 ± 0.24 μ m (n=50), ADR 群 2.32 ± 0.24 μ m (n=69) で、

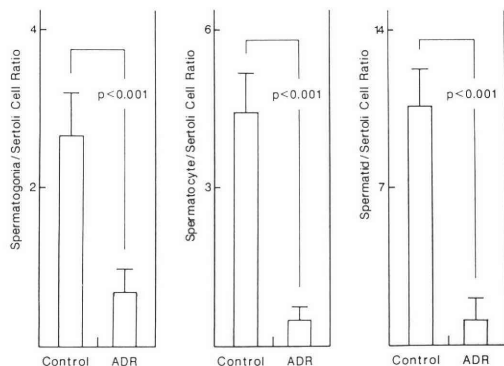


Fig. 3 Effect of ADR on Sertoli cell ratio

ADR 群に有意に精細管壁の肥厚が認められた。また、精細管直径の測定では control 群 $316.7 \pm 20.4 \mu\text{m}$ ($n=94$), ADR 群 $240.7 \pm 23.2 \mu\text{m}$ ($n=108$) で、ADR

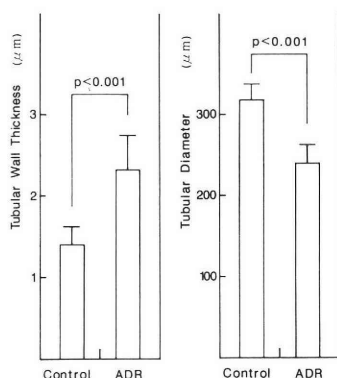


Fig. 4 Effect of ADR on tubular wall thickness and tubular diameter

群で著明な精細管の萎縮が認められた (Figure 4).

IV. 精細管内 androgen 濃度

精細管内 T 濃度は control 群 $213.7 \pm 83.5 \text{ ng/g.t.w.}$, ADR 群 $222.0 \pm 98.3 \text{ ng/g.t.w.}$, 精細管内 DHT 濃度は control 群 $7.4 \pm 2.1 \text{ ng/g.t.w.}$, ADR 群 $7.0 \pm 2.3 \text{ ng/g.t.w.}$ であり、精細管内 androgen 濃度

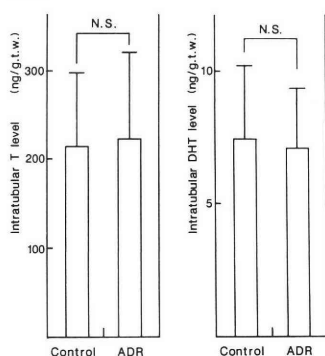


Fig. 5 Effect of ADR on intratubular T and DHT levels

に関しては有意差は認めなかった (Figure 5).

考 察

ADR による造精機能障害は精祖細胞および精母細胞の分裂時における DNA 合成を障害すると推察されているが⁵⁾, ADR 投与時における内分泌学的動態については不明点が多い。男子不妊症を研究する上で、この ADR 投与による不妊ラットモデルは欠かすことのできない対象であるが、その内分泌学的動態を知ることは今後の研究に大いに参考となると考え

られる。したがって、今回われわれは、精細管内 androgen 濃度測定を含め、その内分泌学的、組織学的検討を行なった。ADR 投与量および期間については既報に準じ³⁾⁴⁾⁵⁾, 可逆的造精機能障害ラットとして適当であると判断し、前述のように決定した。

まず精巣においては有意に ADR 群でその重量の低下が認められ、尾崎⁵⁾らの報告と同様であったが、精巣上体に関してはその報告と異なり、有意差は認めなかった。また、前立腺、精囊腺に関しては有意差を認めず、ADR は生殖器官に対しては精巣へは明らかに影響を与えるが、androgen 依存性臓器である精巣上体、精囊腺、前立腺には影響を与えにくいと考えられた。

血中 T 濃度の推移を見ると、control 群と ADR 群間で統計学的有意差はなく、これより、今回の検討量の ADR では内因性 T に影響は与えないことが判明した。LH の推移は週齢に従って上昇傾向にあるが、その程度は control 群、ADR 群とも同等であり、以上より ADR の Leydig cell の機能に対する影響はないものと考えられる。FSH に関しては 3 週目では差を認めなかったが 7 週目では ADR 群が control 群に比して有意の上昇を示した。このことは ADR により Sertoli cell を含む精細管障害が惹起され、FSH の上昇をきたしたと考えられる。

次に精細管障害の程度を表わす指標として Sertoli cell ratio を求めたが、ADR 群では著明に精細胞数の減少を認め、木村³⁾らの報告とはほぼ同程度の減少率であった。さらに、精細管壁の厚さに関しても ADR 群で有意に壁の肥厚が認められる。

精細管内 androgen 濃度の測定に関しては、T, DHT ともに control 群、ADR 群間に有意差は認めていない、すなわち、ADR 投与は精細管内 androgen 濃度には影響を与えないことが判明した。

ラットを用いた検討で、精子形成に対し、精細管内 androgen、特に T が重要な役割を果たすことは判明している⁹⁾¹⁰⁾が、その精細管内 T 濃度は Leydig cell から分泌される内因性 T に由来しており¹¹⁾, passive transport によって精細管内に入ることにより、一定レベルに維持されている⁹⁾。つまり、先の血中 LH 濃度での検討で Leydig cell の機能に対する影響はないことが示唆されたが、さらに、ADR は Leydig cell より内因性 T に関しても影響は与えないことが示唆される。精細管壁の肥厚がよほど著明にならない限り、T の passive transport に影響することがないのはすでにわれわれがヒトにおける検討で報告した¹²⁾が、今回の検討でも ADR により精細管壁の肥厚が惹起されても精細管内 T 濃度が一定であることよりも

証明される。

今回の検討によって、ADR は精細管障害不妊ラットモデルの作成には適しているが、精細管内 androgen 濃度にはなんら影響を与えないことより、ホルモン依存性の不妊モデルとしては不適当と考える。したがって、メコバラミンのような非ホルモン剤の治療効果を確認するには適しているが、ホルモン療法に対する効果を検討するにはさらに異なった方法にて不妊ラットモデルを作成することが必要であると考えられる。

結 語

Adriamycin (ADR)投与ラットにおいて内分泌学的、組織学的検討を行ない、以下のごとく結果を得た。

- 1) 血中T濃度、LH濃度に変化は認めなかったが、FSH濃度に関してはADR群がcontrol群に比して有意の上昇を示した。
- 2) Sertoli cell ratioはADR群で著明に低下し、精細胞数の減少を認め、精細管壁の厚さに関してもADR群で有意に壁の肥厚が認められた。
- 3) 精細管内 androgen 濃度は、T、DHTともにcontrol群、ADR群間に有意差は認められず、ADR投与は精細管内 androgen 濃度には影響を与えないことが判明した。

稿を終えるにあたり、御協力いただいた帝京大学医学部産婦人科神戸川明助教授、ならびにエーザイ研究所、尾崎 覚、大川 功両氏に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は日本アンドロロジー学会第7回学術大会にて発表した。

また、本研究の一部は文部省科学研究費(62570726)の援助により行なわれたものである。

文 献

- 1) Parvinen, L. M. and Parvinen, M.: Biochemical studies of the rat seminiferous epithelial wave: DNA and RNA syntheses and effects of adriamycin, *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18: 585, 1978
- 2) Lu, C. C. and Meistrich, M. L.: Cytotoxic effects of Chemotherapeutic drugs on mouse testis cells, *Cancer Res.*, 39: 3575, 1979
- 3) 木村正一, 折笠精一: 制癌剤投与ラットの Spermatogenesis に対する Mecobalamin の効果, 基礎と臨床, 18: 127, 1984
- 4) 押雄 茂, 毛利秀雄, 尾崎 覚, 大川 功, 田島鉄弥: 実験的精巣障害マウスの精巣機能に及ぼすメコバラミンの影響, 日不妊会誌, 33: 174, 1988
- 5) 尾崎 覚, 大川 功, 加藤義則, 田島鉄弥, 木村

正一, 折笠精一: 実験的造精機能障害ラットの作製ならびにその障害におよぼす Mecobalamin の効果, 日薬理誌, 91: 197, 1988

- 6) 穂坂正彦, 西村隆一, 高井修道, 原田昌興: ヒト分離精細管における testosterone の代謝, 日不妊会誌, 28: 143, 1983
- 7) 入江 伸, 大橋輝久, 大橋洋三, 古川雅人, 永井敦, 山下良孝, 大森弘之: 精細管内 Androgen 濃度の研究 第一報, 日不妊会誌, 33: 236, 1988
- 8) Rowly, M. J. and Heller, C. G.: Quantitation of the cells of the seminiferous epithelium of the human testis employing the Sertoli cell as a constant, *Z. Zellforsch.*, 115: 461, 1971
- 9) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis, published by American Physiological Society, *Physiological Reviews*, 51: 1, 1971
- 10) Rivarola, M. A. and Podesta, E. J.: Metabolism of testosterone-¹⁴C by seminiferous tubules of mature rats: Formation of 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol-¹⁴C, *Endocrinology*, 90: 618, 1972
- 11) Comhaire, F. H. and Vermeulen, A.: Testosterone concentration in the fluids of seminiferous tubules, the interstitium and the rete testis of the rat, *J. Endocr.*, 70: 229, 1976
- 12) 大橋輝久, 入江 伸, 大橋洋三, 古川雅人, 山下良孝, 永井 敦, 大森弘之: 精細管内 androgen 濃度の研究 第二報, 日不妊会誌, 33: 651, 1988

Endocrinological and histological studies on spermatogenic dysfunction in the rat treated with adriamycin

Atsushi Nagai, Teruhisa Ohashi, Yozo Ohashi, Yoshitaka Yamashita, Yoshiteru Kohama, Tadashi Oeda, Susumu Yamane, Mitsuhiro Yoshida and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology, Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan
(Director: Prof. H. Ohmori)

To assess the effect of ADR on spermatogenesis and intratubular androgen levels, mature male Sprague-Dawley rats were treated for 7 weeks by a subcutaneous injection of adriamycin (0.3mg/kg) 3 times a week (ADR group) and saline injection (control group).

The tubular wall thickness in the ADR group increased significantly compared to that in the control group. To evaluate the damage of germinal epithelium, the germ cells/sertoli cells (Se) ratio

was also investigated. The ADR group showed the lower ratio than the control group.

There were no significant difference between both groups in plasma testosterone and LH levels, but FSH levels elevated significantly in the ADR group at 7 week. There were also no significant difference between the ADR group and the control

group in the intratubular testosterone and DHT levels.

Therefore, it was proved that ADR induced the spermatogenic damage without Leyding cell dysfunction in the mature male rats.

(受付：1989 年 10 月 27 日)

実験的精索静脈瘤の下垂体—精巣系 におよぼす内分泌学的影響

Endocrinological Effect of Surgically Induced Varicocele on Pituitary-Testicular Axis

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎）

石 津 和 彦	瀧 原 博 史	植 野 卓 也
Kazuhiko ISHIZU	Hiroshi TAKIHARA	Takuya UENO
林 田 英 嗣	磯 山 理 一郎	馬 場 良 和
Hidetsugu HAYASHIDA	Ri-ichiro ISOYAMA	Yoshikazu BABA
酒 徳 治 三 郎		
Jisaburo SAKATOKU		

Department of Urology, Yamaguchi
University School of Medicine, Ube 755,
Japan (Director: Prof. J. Sakatoku)

今回、われわれは片側性索静脈瘤による血中テストステロン、LH、FSH濃度に及ぼす影響を調べる目的で基礎的研究を行ない、以下の結果を得た。

1. 一固体の造精機能の指標とし考案した Bil. (T. W. $\times$ %IC) すなわち一側精巣重量 $\times$ 同側の percentage of haploid cells の左右両側の和において varicocele 群 (n=10) では Sham operation 群 (n=10) に比べ有意に低値を示した ($p<0.01$)。

2. 血中テストステロン、LH および FSH 濃度は両群間において有意の差はみとめず、varicocele 群においてこれらのホルモン値と Bil. (T. W. $\times$ %IC) との間に有意の相関は示さなかった。

以上の結果から、本実験モデルにおいて片側性精索静脈瘤は一固体の造精機能を障害するが、血中テストステロン、LH、FSH 濃度には有意の影響を及ぼさないと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 578—583, 1990)

緒 言

精索静脈瘤は主に臨床的経験より男子不妊の原因の1つと考えられてきた。しかし、精索静脈瘤が単独で男子不妊を惹起するかは完全に解明されていない疑問であった¹⁾。その疑問に対して、われわれは新たな工夫を加えて実験的精索静脈瘤を作製し両側精巣の造精機能を検討した結果、片側性精索静脈瘤は両側精巣の造精機能を障害し、その障害の程度は患側に強いことが示唆されたことを報告してきた。^{2,3)}

造精機能に加えて、精索静脈瘤による血中テストステロン、LH、FSH濃度に及ぼす影響についても一定の見解は得られていない。すなわち、精索静脈瘤患者においては、これらの血中ホルモン濃度に有意差はみられないとする説^{4,5,6)}がある一方、テストステロンが低下しているという説⁷⁾、LHが上昇しているという説^{8,9)}およびFSHが上昇しているという説^{8,10)}がみられる。今回、われわれは精索静脈瘤による内分泌学的影響を調べる目的で、以前に報告した精索静脈瘤モデルの血中テストステロン、LH、FSH濃度

を測定し検討した。

方 法

実験材料は10週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。左精索静脈瘤作製方法は以前報告²⁾した通りで、左腎静脈を左内精静脈合流部より下大静脈側で外径1mmに部分結紮し、さらに左内精静脈と下大静脈の間の側副路を結紮することにより、腎静脈血の精巣への逆流を有利にさせ、精索静脈瘤作製を試みた(Fig. 1)。

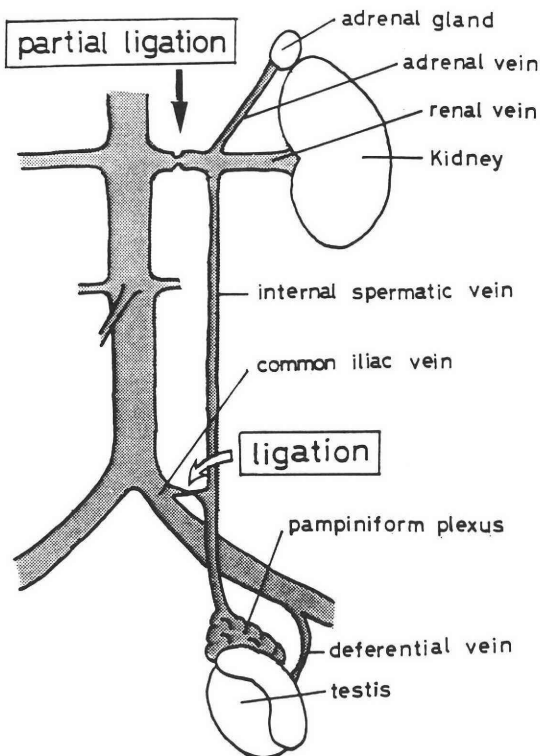


Fig. 1 Procedure of surgically inducing varicocele.

そのうち、術後5週で左内精静脈から下大静脈あるいは総腸骨静脈へ新たに太い側副路が生じ、かつ左内精静脈直径が全長にわたり術前の3倍以上に拡張したラット10匹だけを varicocele 群とした。Sham operation 群の10匹は、開腹のみを行ない、結紮は全く行なわなかった。

両群のラットは術後5週にエーテル麻酔下に心臓より採血し、血中ホルモン値測定に供するため遠心分離し、血清部分を -20°C にて測定日まで冷凍保存した。血中テストステロン、LH、FSH濃度は、2抗体法によるRIAにて二重測定した。

さらに今回われわれは一固体の造精機能を示す指標として、 $\text{Bil. (T. W.} \times \%1\text{C)} = \text{左側精巣重量} \times \text{左側精巣内の percentage of haploid cells} + \text{右側精巣}$

重量 $\times$ 右側精巣内の percentage of haploid cells を新たに考案し算出した。精巣内の percentage of haploid cells (spermatid の割合) は当科からすでに報告¹¹⁾している検体処理後に flow cytometry を用いて測定した。

結 果

1) Bil. (T. W. $\times$ %1C) (Fig. 2)

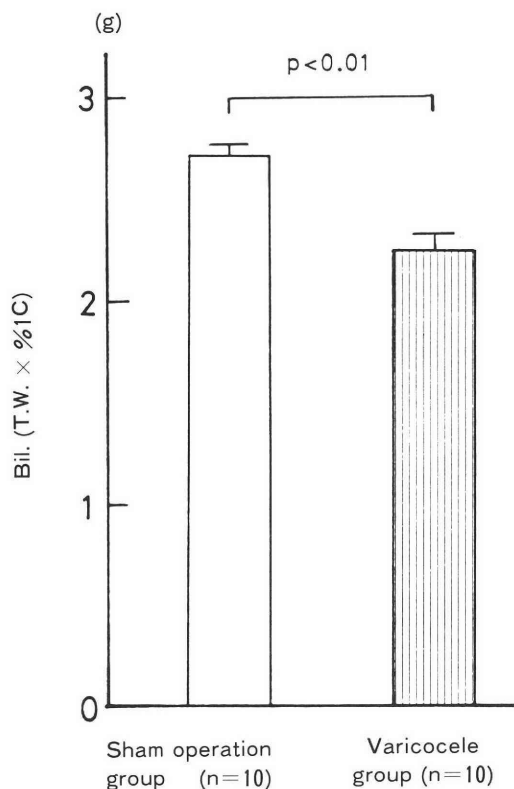


Fig. 2 Bil. (T. W. $\times$ %1C) (Mean $\pm$ S. E.) of the sham operation group and the varicocele group: Bil. (T. W. $\times$ %1C) = (left testicular weight) $\times$ (percentage of haploid cells in left testis) + (right testicular weight) $\times$ (percentage of haploid cells in right testis)

sham operation 群では 2.71 ± 0.06 g (mean $\pm$ S. E., 以下略す.), varicocele 群では 2.24 ± 0.09 g で、varicocele 群は sham operation 群に比べ有意に低値を示した ($p < 0.01$).

2) 血中テストステロン濃度 (Fig. 3)

sham operation 群では 3.12 ± 0.56 ng/ml, varicocele 群では 2.73 ± 0.57 ng/ml で、varicocele 群は sham operation 群に比べ低値を示したが、有意の

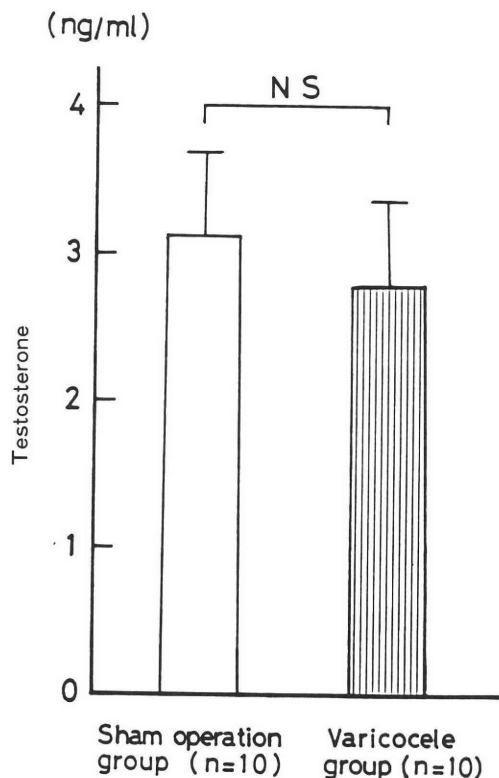


Fig. 3 Serum testosterone levels (Mean±S. E.) of the sham operation group and the the varicocele group.

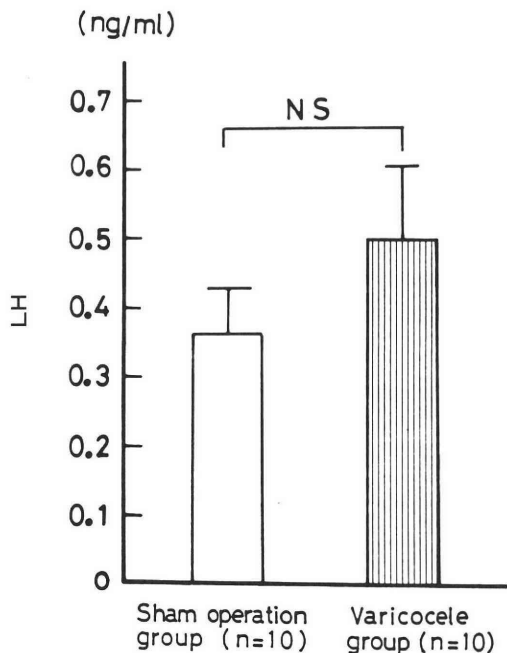


Fig. 4 Serum LH levels (Mean±S. E.) of the sham operation group and the varicocele group.

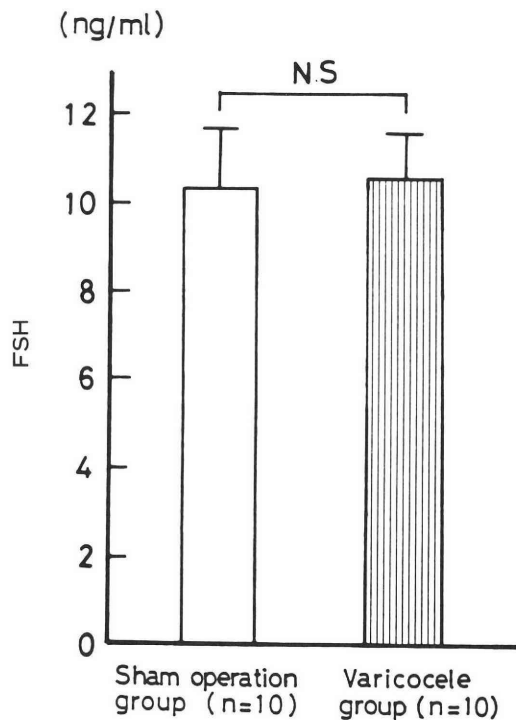


Fig. 5 Serum FSH level (Mean±S. E.) of the sham operation group and the varicocele group.

差をみとめなかった。

3) 血中 LH 濃度 (Fig. 4)

sham operation 群では 0.50 ± 0.11 ng/ml, varicocele 群では 0.36 ± 0.06 ng/ml で, varicocele 群は sham operation 群に比べ高値を示したが, 有意の差をみとめなかった。

4) 血中 FSH 濃度 (Fig. 5)

sham operation 群では 10.33 ± 0.98 ng/ml, varicocele 群では 10.57 ± 1.36 ng/ml で, varicocele 群は sham operation 群に比べ高値を示したが, 有意の差をみとめなかった。

5) Bil. (T. W. × %1C) と各ホルモン値との相関 (Fig. 6)

両群とも Bil. (T. W. × %1C) と血中テストステロン, LH, FSH 濃度の間に有意の相関はみとめられなかった。

考 察

精索静脈瘤は主に臨床的経験より男子不妊の原因の1つと考えられている。しかし、精索静脈瘤の臨床データは主に不妊患者から得られたものであり、妊孕力を保持した精索静脈瘤症例も多く経験されている。そのため、精索静脈瘤が単独で男子不妊を惹

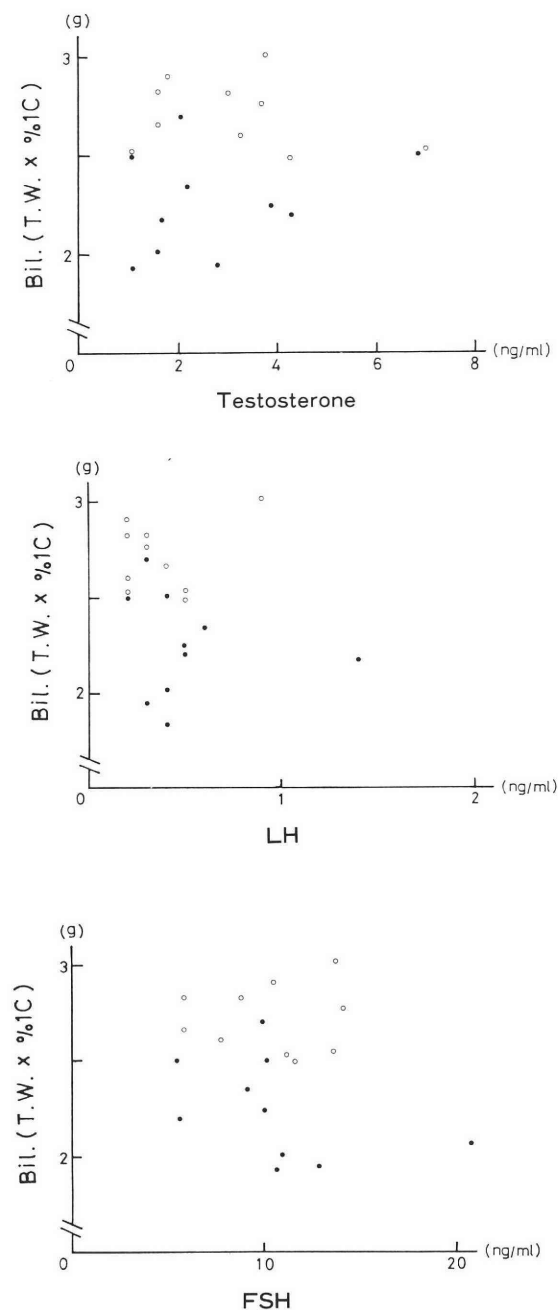


Fig. 6 Relationships between Bil. (T. W. $\times$ %1C) and testosterone (A), LH (B), FSH (C) in the sham operation group (○) and the varicocoe group (●): No significant correlation between the Bil. (T. W. $\times$ %1C) and T, LH, FSH was found in both group.

起するかは完全には解明されていない疑問であった¹⁾。その疑問に対し、われわれは新たな工夫を加え実験的片側性精索静脈瘤を作製し両側精巣の造精機能を精巣重量、平均精細管直径および精巣内 DNA 量分布から検討し、片側性精索静脈瘤は両側精巣の造精機能を障害し、その障害の程度は患者側に強いことが示唆され、その結果がわれわれが以前に左精索静脈瘤のある患者の精巣体積、Johnsen's mean score および精巣内 DNA 量分布から得た臨床結果¹²⁾とよく一致したことを報告してきた^{2,3)}。

造精機能に加えて、精索静脈瘤による血中テストステロン、LH および FSH 濃度に及ぼす影響についても一定の見解は得られていない。すなわち、精索静脈瘤患者においてはこれらのホルモン濃度に有意差のないという説^{4,5,6)}がみられる一方、テストステロンが低下しているという説⁷⁾、LH が上昇しているという説^{8,9)}および FSH が上昇しているという説^{8,10)}がみられる。このように精索静脈瘤患者におけるこれらの血中ホルモン濃度に関して諸説がある原因の1つとして、精索静脈瘤患者の臨床データが主に不妊患者から得られていることに加えて、それと比較する対照が不妊患者であったり、あるいは正常人であったりし、対照群が一定していないことが考えられる。そのため、われわれは精索静脈瘤による血中テストステロン、LH、FSH 濃度に及ぼす影響を調べる目的で、以前報告した精索静脈瘤実験モデルの血中テストステロン、LH、FSH 濃度を測定し、内分泌学的検討を行なった。

これまで、精索静脈瘤の動物モデルを対象とした血中テストステロンレベルの検討はサルを用いた実験のみであり、それでは末梢血テストステロンにおいて精索静脈瘤動物と正常動物の間に有意の差はなかったと報告されている¹³⁾。われわれのラットを用いた実験でも、同様に、血中テストステロンは varicocoe 群と sham operation 群の間に有意の差はみとめられなかった。ヒトにおいては、精索静脈瘤患者の血中テストステロンは正常人に比べ有意に低いという報告⁷⁾もみられるが、有意の差をみとめないという報告が多い。

しかし、われわれが精巣部深部温測定を行なった結果、精索静脈瘤患者では特に立位で両側精巣に明らかな高温をみとめた¹²⁾こと、および高温環境下では精巣内酵素活性レベルでテストステロン生成が阻害される¹⁴⁾ことを考慮すれば、理論的には精索静脈瘤が両側精巣のテストステロンの生成を阻害することも考えられる。事実、実験的精索静脈瘤モデルにおいて両側精巣内の 17, 20-desmolase および 17α -

hydroxylase 活性が低下していることが報告されている¹⁵⁾。また、ヒト精索静脈瘤患者は血中テストステロンにおいて対照群と有意差はみとめられなかったが、精巣内酵素活性の in vitro 実験においては両側精巣の Leydig 細胞機能が障害されていることも報告されている⁸⁾。片側精索静脈瘤実験モデルにおいて両側の精巣温度が上昇していることが報告されている¹⁶⁾ことおよび本実験では有意ではないが、varicocele 群では sham operation 群に比べ血中テストステロンが全体として低値を示したことは、本実験精索静脈瘤モデルにおいてもテストステロン値の血中レベルでは明らかでないが、精巣内酵素活性レベル¹⁷⁾ではテストステロン生成が阻害されている可能性も否定できない。

実験的精索静脈瘤モデルにおいては血中 LH, FSH 濃度を測定した結果はいままで報告されていない。一方、ヒト精索静脈瘤において血中 LH, FSH 濃度に関しては前述したように一定した見解は得られていない。そこで、本実験において血中 LH, FSH 濃度を検討したところ、varicocele 群と sham operation 群の間に有意の差をみとめなかった。

しかし、精索静脈瘤患者の中には血中 LH, FSH 濃度は正常であるが gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 負荷により血中 LH, FSH 濃度が過剰に上昇するものがあり、この GnRH 負荷へ過剰に反応する精索静脈瘤患者 34 例中 23 例に精索静脈瘤切除後に精液所見の改善がみとめられたのに対して、反応が正常な精索静脈瘤患者 22 例は全例とも静脈瘤切除後に精液所見の改善がみとめられなかったと報告されている¹⁸⁾。精索静脈瘤切除後に精液所見の改善がみとめられた症例においてのみ、精索静脈瘤が造精機能障害の原因の一つとなっていると仮定するならば、精索静脈瘤が造精機能障害の原因と考えられる本実験モデルにおいて、血中 LH, FSH 濃度は有意に上昇していなかったが、下垂体でのこれらのホルモンの分泌予備能は亢進している可能性もあると考えられる。

次に、本実験における片側性精索静脈瘤モデルにおける造精機能と血中テストステロン, LH, FSH 濃度の相関についても検討した。先に報告したように本実験における片側精索静脈瘤モデルにおいては左右精巣の造精機能が異なるために、精巣の造精機能を反映すると報告した量的因子である percentage of haploid cells (spermatid の割合)²⁰⁾より Bil. (T. W. × %1C) = (左側精巣重量) × (左側精巣内の percentage of haploid cells) + (右側精巣重量) × (右側精巣内 percentage of haploid cells) を考案算出し、一固体の造精機能の指標と仮定した。その結果、

本実験における片側性精索静脈瘤モデルにおいて Bil. (T. W. × %1C) と血中テストステロン, LH, FSH 濃度の間に有意の相関はみとめられなかった。この結果は、ヒト精索静脈瘤患者においては精子濃度、総精子数と血中 LH, FSH, テストステロン/LH との間に有意の相関をみとめなかったという報告⁶⁾と矛盾しない結果であった。

以上、本実験モデルにおいて片側性精索静脈瘤は造精機能は障害するが、血中テストステロン, LH, FSH 濃度には有意の影響を及ぼさないと考えられた。

文 献

- 1) Turner, T. T.: Varicocele: still an enigma, *J. Urol.*, 129: 695, 1983
- 2) 石津和彦: 片側性精索静脈瘤による両側精巣の造精機能障害—実験的研究—, 日不妊会誌(投稿中)
- 3) 石津和彦, 瀧原博史, 植野卓也, 林田英嗣, 磯山理一郎, 馬場良和, 酒徳治三郎: 実験的片側性精索瘤の精巣機能, 日不妊会誌, 34: 648, 1989
- 4) Swerdloff, R. S. and Walsh, P. C.: Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele, *Fertil. Steril.*, 26: 1006, 1975
- 5) Rege, N., Phadke, A., Bhatt, J., Khatri, N., Sheth, A., Joshi, U. and Vaidya, R.: Serum gonadotropins and testosterone in infertile patients with varicocele, *Fertil. Steril.*, 31: 413, 1979
- 6) 河原弘之: 精巣機能と精索静脈瘤, 西日泌尿, 49: 389, 1987
- 7) Raboch, J. and Starka, L.: Hormonal testicular activity in men with a varicocele, *Fertil. Steril.*, 22: 152, 1971
- 8) 吉田謙一郎: 精索静脈瘤患者の Leydig 細胞機能の検討, 西日泌尿, 48: 1123, 1986
- 9) Nagao, R. R., Plymate, S. R., Berger, R. E., Perin E. B. and Paulsen, C. A.: Comparison of gonadal function between fertile and infertile men with varicoceles, *Fertil. Steril.*, 46: 930, 1986
- 10) Freire, F. R. and Nahoum, C. R. D.: Endocrine evaluation in infertile men with varicocele, *Andrologia*, 13: 395, 1981
- 11) 橋本治: Flow Cytometry (FCM) によるラット睾丸 DNA 量の測定, 西日泌尿, 46: 533, 1984
- 12) 瀧原博史, 植野卓也, 石津和彦, 山口政俊, 磯山理一郎, 馬場良和, 酒徳治三郎: 精索静脈瘤, 病理と臨床, 7: 311, 1989
- 13) Kay, R., Alexander, N. J. and Baughman, W. L.: Induced varicoceles in rhesus monkeys, *Fertil. Steril.*, 31: 195, 1979
- 14) Bedrak, E., Samoiloff, V., Sod-Moriah, U. A. and Goldberg, S.: Synthesis of androgens in vitro by testes of rats acclimatized to a hot

- environment, *J. Endocrinol.*, 51: 489, 1971
- 15) Rajfer, J., Turner, T. T., Rivera, F., Howards, S. S. and Sikka, S. C.: Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats, *Biology of Reproduction*, 36: 933, 1987
- 16) 柳重行, 寺田為義, 片山喬: ラットにおける実験的精索静脈瘤の睪丸におよぼす影響, *日不妊会誌*, 29: 97, 1984
- 17) 川井修一, 瀧原博史, 酒徳治三郎: Leydig 細胞機能—Steroid 生合成について—, *西日泌尿*, 49: 372, 1987
- 18) Hudson, R. W.: The endocrinology of varicocele, *Fertil. Steril.*, 49: 199, 1988
- 19) Takihara, H., Cosentino, M. J., Sakatoku, J. and Cokett, A. T. K.: Significance of testicular size measurement in andrology: II. correlation of testicular size with testicular function, *J. Urol.*, 137: 416, 1987
- 20) 川井修一: Flow cytometry による睪丸内精子形成能の評価, 第2報: 男子不妊症患者の精子形成能の評価, *泌尿紀要*, 31: 87, 1985

Endocrinological effect of surgically induced varicocele on pituitary-testicular axis

Kazuhiko Ishizu, Hiroshi Takihara, Takuya Ueno,
Hidetsugu Hayashida, Ri-ichiro Isoyama,
Yoshikazu Baba and Jisaburo Sakatoku

Department of Urology, Yamaguchi University
School of Medicine, Ube 755, Japan
(Director: Prof. J. Sakatoku)

In order to investigate the effect of varicocele on the levels of serum testosterone (T), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), the endocrinological study of the varicocele, which was surgically induced in rats, was performed. We postulate $(\text{left testicular weight}) \times (\text{percentage of haploid cells in left testis}) + (\text{right testicular weight}) \times (\text{percentage of haploid cells in right testis}) = \text{Bil. (T. W.} \times \%1\text{C)}$, as the index of total spermatogenesis. The following results were obtained.

1. In the varicocele group ($n=10$), the Bil. (T. W. $\times \%1\text{C}$) was significantly lower than that of the sham operation group ($n=10$).

2. No significant differences in levels of serum T, LH and FSH were observed between the varicocele group and the sham operation group. No significant correlations between the Bil. (T. W. $\times \%1\text{C}$) and T, LH, FSH were found in the varicocele group.

These results showed that the serum T, LH and FSH levels were not affected in spite of impaired spermatogenesis in those surgically induced varicocele rats.

(受付: 1989年11月6日)

操作手順を簡略化した 精子不動化試験とその成績

A Simple Sperm Immobilization Test and its Result

京都大学医学部婦人科学産科学教室

辰 巳 賢 一 野 田 洋 一 江 見 信 之
Kenichi TATSUMI Yoichi NODA Nobuyuki EMI
森 崇 英
Takahide MORI

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

体外受精・胚移植法により、これまで妊娠の可能性が殆ど無かった抗精子抗体強陽性婦人にも妊娠のチャンスが訪れ、これに伴い不妊婦人に対する抗精子抗体測定の実用性が増してきた。抗精子抗体測定法の中でも特に不妊と相関するのが礒島らの精子不動化試験であるが、この方法にはやや複雑な面がありルチン検査として我々が日常臨床の合間に行うのは難しいと考えられる。そこで我々は礒島らの方法の一部を変更した簡便な精子不動化試験を考案し、同法により当科の抗精子抗体未検患者229名の精子不動化抗体を測定したところ、14名(6.1%)が陽性となった。本検査は本質的には礒島らの方法と同様であり、他院において陽性と診断された症例は本検査でもすべて陽性となったこと、礒島らの報告とほぼ同頻度に陽性例が見られたこと、精子不動化値の高い例に妊娠例の見られないこと等から、本検査は抗精子抗体のスクリーニング検査として有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (1), 584—588, 1990)

緒 言

抗精子抗体測定法には、精子凝集試験^{1,2)}、精子不動化試験³⁾をはじめとして各種の方法があるが、なかでも礒島らの精子不動化試験³⁾により検出される抗体は不妊症とよく相関すると報告されている^{4,5)}。しかし礒島らの精子不動化試験にはホルモット血清を用意する必要があり、また検査結果の判定もやや複雑であるため、我々が臨床の合間にこの試験を行うのは現実的に難しいと考えられる。一方最近、精子不動化抗体強陽性患者も体外受精・胚移植法を用いることにより妊娠が可能となり⁶⁾、精子不動化試験の実用性はますます大きくなりつつある。今回我々は礒島らの方法にいくつかの工夫を加え、精子不動化試験をより簡便に行う方法を考案し、この方法により

432名の患者の精子不動化抗体を測定した。

方 法

1. 患者血清の調整：当科妊孕外来の初診患者全員、前回の検査で精子不動化抗体陽性であった患者、および前回の検査で陰性であってもその後のPost Coital Test (PCT)が陰性である患者の肘静脈より5mlの採血を行い、約3時間の静置により凝血させた後、2500rpm、10分間の遠沈を行い血清を採取し、クライオチューブに移し-20℃のフリーザーに保存した。検査日に解凍し、water bathで56℃、30分間の非動化を行い検査に供した。なお一回に約50検体の検査を行った。
2. 精子浮遊液の調整：妊孕性の確認されている男性より、4日間の禁欲の後、用手法により精液を回

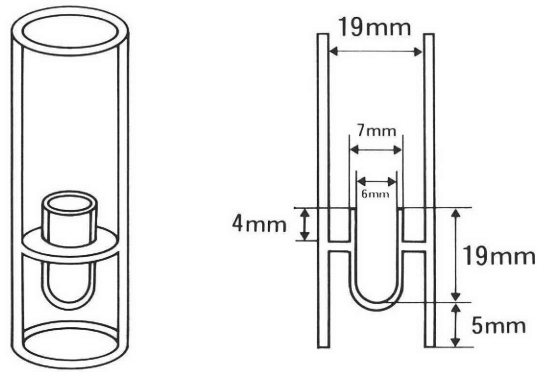


図 1 大型 MS 管

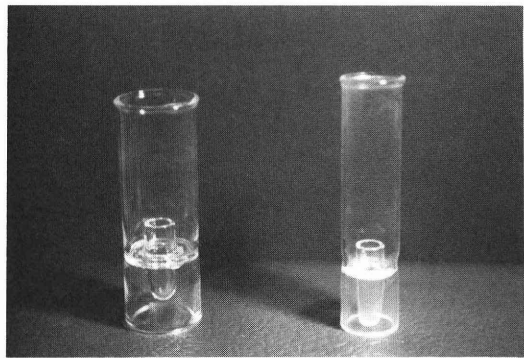


図 2 大型 MS 管 (左) と Tea らの MS 管 (右)

収し、30 分間室温で液化した後、マクラー精子計算盤で精子濃度、運動率を測定した。図 1. および図 2. に示す我々の設計した大型 MS 管を 3 本用意し、すでに我々の報告した方法で⁷⁾、各 MS 管の内管の外側と外管の内側の間の溝に精液をパスツールピペットにより 1ml ずつ分注し、次いで内管の底より生理的食塩水 (大塚) または Ham's F-10 (Flow) 溶液をパスツールピペットにより 3ml ずつ静かに注入して精液上に重層した。これらの MS 管を 37℃ (Ham's F-10 溶液を用いる場合には 37℃, 5 % CO₂) のインキュベーター内に静置し、2 - 3 時間後、内管の底よりパスツールピペットにより 0.2ml ずつの精子浮遊液を回収、混和により 0.6ml とし、Maklar 精子計算盤により精子濃度および運動率を測定した後、精子濃度 1000 万 - 2000 万/ml となるように希釈し検査に供した。

3. 補体の調整：乾燥補体 (阪大微研) 1 バイアルを 1ml の生理的食塩水、または Ham's F-10 溶液で溶解し、補体溶液とした。

4. 精子浮遊液 0.5ml と補体溶液 0.25ml をよく混和し、ELISA 用 96 穴平底マイクロプレート (Sumilon) の各 well に、この補体添加精子浮遊液 15 マイクロリットルずつを注入した。倒立顕微鏡によりマイクロプレート内の精子を観察し、補体の精子に対する毒性により精子の運動率が低下していないことを確認した後、各 well に解凍、非働化した被検血清および

表 1 大型 MS 管による運動精子の回収

試験 No.	原 精 液		回収精子浮遊液		運動精子 回 収 率 (%)
	量 精子濃度 (×10 ⁶ /ml) 運 動 率 (%)	注入運動精子数 (×10 ⁶)	量 精子濃度 (×10 ⁶ /ml) 運 動 率 (%)	回収運動精子数 (×10 ⁶)	
1	2.7	230	0.45	34.7	15
	105		78		
	81		99		
2	4.5	81.9	0.6	31.2	38
	78		52		
	35		100		
3	1.5	18	0.4	9.5	53
	15		24		
	80		99		
4	3.6	29.6	0.6	9.5	32
	17		16		
	58		99		
5	3.0	48	0.6	10.7	22
	32		18		
	50		99		

ネガティブコントロールとしてあらかじめ精子不動態作用のないことを確認した未婚女性血清, ポジティブコントロールとしてこれまでの検査で sperm immobilization value (SIV)³⁾が無限大である血清をそれぞれ 50 マイクロリットルずつ注入し, よく混和した. このマイクロプレート を 37°C のインキュベーター内で 30 分間静置した後, 倒立顕微鏡 100-200 倍で各 well を観察し, 50 の精子を数え, ネガティブコントロールの運動精子数/各 well の運動精子数を SIV とし, SIV 2.0 以上を精子不動態抗体陽性とした.

結 果

1) 精子浮遊液: 大型 MS 管による精子回収率を表 1 に示した. 運動精子回収率は 15% - 53% であり, 回収した精子浮遊液の運動率は常に 99% 以上であった. 精子濃度 1700 万/ml, 運動率 58% と最も精子の quality の悪かった試験 No. 4 の精液からも, 精子濃度 1600 万/ml, 運動率 99% と精子不動態抗体検査に可能な精子浮遊液を作成できた.

2) 精子不動態試験: 生理的食塩水と 37°C インキュベーターとの組み合わせと, Ham's F-10 と 37°C, CO₂ インキュベーターとの組合せを用いた場合とで, 精子回収率, SIV に差を認めなかった. 補体を添加することにより精子浮遊液の精子運動率が低下することはない, ネガティブコントロールにおける精子運動率が 90% 以下になることはなかった.

3) 精子不動態試験結果: 我々は本法による精子不動態抗体検査を昭和 63 年 1 月より開始し, 平成元年 7 月までに表 2 に示すように当科外来患者 233 名 239 検体の SIV を測定した. その結果 18 名, 7.7% が SIV $\geq$ 2.0 の精子不動態抗体陽性であったが, 陽性例のうち 4 名は, 他院にてすでに抗精子抗体陽性と判定されており, 当科で初めて精子不動態抗体陽性と診断された患者は 14 名, 6.1% であった. SIV で症例を分けると, SIV 1.0-1.4 は 211 名, SIV 1.5-1.9 は 4 名, SIV 2.0-9.9 は 6 名, SIV 10 以上は 12 名であった.

他院で抗精子抗体陽性と診断され当科に紹介された患者は 4 名であったが, いずれも本法によっても精子不動態抗体陽性となった. また, 2 回以上の検査を受けている患者で陰性から陽性となった例や,

陽性から陰性となった症例は無かった.

本法により精子不動態抗体陽性と診断された患者 18 名のうち, SIV 2.0 の患者 1 名が自然妊娠したが流産となり, SIV 2.0 の患者 1 名 (3 周期) および SIV 無限大の患者 1 名 (2 周期) に体外受精・胚移植法を行った結果 SIV 無限大の患者に妊娠が成立した. 他の患者は現在, 体外受精・胚移植法の順番待ちであり, AIH 等を施行している.

また一方, 関係病院より, 精子不動態試験を依頼された検体が 199 検体あり, うち 11 検体 5.5% が精子不動態抗体陽性であった.

考 察

抗精子抗体検査は, 最近の体外受精・胚移植法の成績の向上に伴い, その必要性が急に高まってきた. これまで不妊婦人の血中の抗精子抗体が検出された場合には反復 AIH⁸⁾や, コンドームによる一定期間の避妊⁹⁾, ステロイド療法¹⁰⁾等が行われていたが, 特に抗体価の高い症例においてはこれらの治療によっても殆ど妊娠に結び付かず, そのためか, 抗精子抗体検査を積極的に行う施設は少なかった. しかし体外受精・胚移植法の登場により, 抗精子抗体陽性患者にも妊娠のチャンスがもたらされ⁶⁾, 当科においてもこれまでに精子不動態抗体陽性を適応として 6 名 (20 周期) の患者に体外受精・胚移植法を行った結果, 4 名が妊娠, うち 3 名は出産し, 1 名は流産, しかも妊娠した 4 名のうち 3 名が SIV 無限大の患者であった. 一方卵管因子等を適応として, 体外受精を行った結果, 良い卵と良い精子が得られたにもかかわらず受精しない, との事で当科に紹介された患者に強い精子不動態抗体が検出されたこともある. 精子不動態抗体は, 子宮頸管における精子の通過を障害するのみならず, 精子の透明帯の貫通をも抑制することが報告されており^{11,12)}, 体外受精・胚移植法を施行する前の検査としても抗精子抗体検査は必須のものである.

抗精子抗体検査法としては以前より精子凝集試験^{1,2)}, 精子不動態試験³⁾が行われており, また最近では RIA 法¹³⁾, ELISA 法¹⁴⁾, Immunobeads 法¹⁵⁾等が開発されてきたが, このうち磯島らの精子不動態試験がとくに不妊症と関係が深いとされているため,

表 2 症例の SIV 値

SIV	1.0~1.4	1.5~1.9	2.0~9.9	10.0~	計
当科の症例	211	4	6	12	233
他院の症例	188	0	7	4	199
計	399	4	13	16	432

不妊患者の抗精子抗体のスクリーニングテストとしては精子不動化試験を行うべきであろう。しかし磯島らの方法は、実際、臨床家がルチーンに自分で行うのは難しい点がある。例えば補体としてはモルモット血清を用いることになっているが、我々が日常臨床の合間にモルモットを飼育し、血清を調整する等は実際上不可能に近い。そこで今回我々は磯島らの方法を下記のごとく改変し、手軽な精子不動化抗体測定法の開発を試みた。今回我々が行った方法は本質的には磯島らの方法であるが、以下の点が異なっている。1) 磯島らは精子洗浄または swim-up 法により精子浮遊液の調整を行っているが、我々は、MS 法を用いることにより精子運動率ほぼ 100 % の精子浮遊液を調整し検査に供した。2) 磯島らは補体源としてモルモット血清を用いているが、我々は市販の乾燥補体を用いた。3) 磯島らはインキュベーションの温度を 32 度としているが、我々は 37°C とした。4) 磯島らは、血清、補体添加精子浮遊液のインキュベーションを試験管内で行い、判定は試験管内の補体、血清添加精子浮遊液をスライドグラス上に移して検鏡することにより行っているが、我々は 96 穴マイクロプレート内で血清、補体添加精子浮遊液のインキュベーションを行い、このマイクロプレートをそのまま倒立顕微鏡で鏡検することにより判定を行った。以上の点を変更することにより、磯島らの方法より手順が簡単で判定も容易な精子不動化試験となり、手軽に行うことができるようになった。また磯島らの変法として報告されているマイクロチェンバーを用いた微量精子不動化試験¹⁶⁾も行ってみたが、これはスモールスケールすぎて操作が難しく、判定も我々の方法の方が容易であった。

今回精子浮遊液の調整に 1 本あたり 1ml の精子を処理できる大型 MS 管を設計し用いてみたが、表 1 に示すように Tea らの MS 管¹⁷⁾同様、処理した全運動精子の 15-53 % を回収することができ、更に回収精子の運動率は 99 % 以上となった。精子不動化試験の精子調整法としては理想的なものであり、また今後 AIH や GIFT 法のための精子調整法としても有望であると考えられた。また運動率 99 % 以上の精子浮遊液を用いることにより、ネガティブコントロールの well の精子運動率も 90 % 以上となったため、結果の判定が非常に容易になった。

我々は市販の乾燥補体を用いたが、磯島らは市販の補体を用いてはならないとしている¹⁶⁾。これは市販の補体が精子に対して毒性を持つ可能性があるという点と、補体の力価不足のため false negative がでる可能性があるということではないかと思われる。

しかし我々の経験では、市販の補体を精子浮遊液に加えることにより精子浮遊液の運動率が低下したことはなく、また我々の施設における精子不動化抗体陽性率が、後述するように、ほぼこれまでの報告と同程度かやや高いこと、さらに、他院より抗精子抗体陽性例として紹介されてきた患者の全てが我々の検査で精子不動化抗体陽性となったこと、等を考え合わせると false negative が多く存在するとは考えにくい。これらの理由で我々は市販の乾燥補体を用いることに問題はないと考えている。更に我々の検査法で精子不動化抗体陽性と判定した患者のうち、SIV 2.0 の患者が 1 名妊娠したのみで、他の 17 名は体外受精・胚移植法以外の方法では妊娠に至らないという臨床的事実からみても、精子不動化試験を臨床的スクリーニングを目的として施行する場合には、我々の方法で充分であると考えられる。ただし定量的精子不動化試験や研究目的に精子不動化試験を行う場合には磯島ら方法に忠実に行う必要があらう。

また今回の精子不動化試験は陽性、陰性がはっきりしている検査であり、表 2 に示すごとく SIV が 1.5-1.9 の陽性に近い陰性例は陰性例 215 例中 4 例のみで残りの 211 例は SIV 1.4 以下の明らかな陰性例であり、また陽性例 18 例中 10 例は SIV 無限大と陽性・陰性の判定に困ることは殆ど無かった。

当科において本法により精子不動化抗体陽性と診断された例は 6.1 % (14/229) であり、この値は磯島らの報告による 5.7 % (26/455)¹⁶⁾、鎌田らの報告による 5.0 % (8/159)¹⁸⁾ とほぼ同程度であり、香山の報告による 3.3 % (51/1530)¹⁹⁾ よりやや高い頻度である。当科において精子不動化抗体陽性例で、体外受精・胚移植法を用いずに妊娠に至ったのは SIV の低い少数例にすぎないのに対し、体外受精・胚移植法を用いた場合には前述したように 67 % (4/6) もの症例が妊娠した。この事実からみても不妊患者にはできるだけ早い段階で精子不動化抗体のスクリーニングを行い²⁰⁾ 約 5 % ある精子不動化抗体陽性患者を選び出し、特に SIV の高い症例に対しては、いたずらに時期を遅らすことなく体外受精・胚移植法を行う必要があると考えられた。

稿を終えるにあたり、本検査に協力していただいた松瀬琴美氏ならびに発生学研究室の諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Kibrick, S., Belding, D. L., Merrill, B.: Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa, II. A gelatin agglutina-

- tion test, *Fertil. Steril.*, 3: 430, 1952
- 2) Franklin, R. R., Dukes, C. D.: Antispermatozoal antibody in unexplained infertility, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 89: 6, 1964
 - 3) Isojima, S., Li, T. S., Ashitaka, Y.: Immunologic analysis of sperm-immobilizing factor found in sera of women with unexplained sterility, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 101: 677, 1968
 - 4) Jones, W. R., Ing, R. M. Y., Kaye, M. D.: A comparison of screening tests for antisperm activity in the serum of infertile women, *J. Reprod. Fert.*, 32: 357, 1973
 - 5) Worham, J. W. E., Ackerman, S. B., Acosta, A., Swanson, R. J., Taylor, M. K.: Antisperm antibodies in sera of subfertile men and women: Comparison of Kibrick, Franklin and Dukes and Isojima assays, *Infertility*, 4: 115, 1981
 - 6) Yovich, J. L., Stanger, J. D., Boettcher, B.: In vitro fertilization of oocytes from women with serum antibodies, *Lancet* Feb., 18: 369, 1984
 - 7) 辰巳賢一, 野田洋一, 松本 央, 馬岡 陽, 矢野樹理, 福田愛作, 江見信之, 高井一郎, 泰井俊造, 神崎秀陽, 森 崇英: Migration-Gravity Sedimentation Method を利用した運動精子回収法, 及び同法の A I H への応用, *日不妊会誌*, 33: 645, 1988
 - 8) 磯島晋三: 妊孕現象に関する免疫学的研究, *日産婦誌*, 23: 719, 1971
 - 9) Franklin, R. R., Dukes, C. D.: Further studies on sperm-agglutinating antibody and unexplained infertility, *JAMA.*, 190: 682, 1964
 - 10) Alexander, N. J., Sampson, J. H., Fulgham, D. L.: Pregnancy rates in patients treated for antisperm antibodies with prednisone, *Int. J. Fert.*, 28: 63, 1983
 - 11) Tsukui, S., Noda, Y., Yano, J., Fukuda, A., Mori, T.: Inhibition of sperm penetration through human zona pellucida by antisperm antibodies, *Fertil. Steril.*, 46: 92, 1986
 - 12) Tsukui, S., Noda, Y., Fukuda, A., Matsumoto, H., Tatsumi, K., Mori, T.: Blocking effect of sperm immobilizing antibodies on sperm penetration of human zonae pellucidae, *J. Vitro Fert. Embryo Transfer*, 5: 123, 1988
 - 13) Hill, L. A., Hampton, J. K.: Detection of spermatozoal antibodies by radioassay: A comparative evaluation, *Fertil. Steril.*, 33: 302, 1980
 - 14) Harel, W. and Nelken, D.: An enzyme immunoassay for the detection of antisperm antibodies, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 8: 137, 1985
 - 15) Clarke, G. N., Stojanoff, A., Cauchi, M. N.,

Johnston, W. I. H.: The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 7: 143, 1985

- 16) 磯島晋三, 香山浩二, 鎌田敏雄: 不妊と免疫, 産婦治療, 32: 17, 1976
- 17) Tea, N. T., Jondet, M., Sholler, R.: A "migration-gravity sedimentation" method for collecting human motile spermatozoa, *Pathol. Biol.*, 31(8): 688, 1983
- 18) 鎌田正晴, 苛原 稔, 長谷部宏, 山野修司, 木下恒夫, 野田洋一, 森 崇英: 免疫性不妊症, 臨産婦, 38: 629, 1984
- 19) 香山浩二: 免疫学的女性不妊, 免疫と疾患, 8: 203, 1984
- 20) 森 崇英, 野田洋一, 辰巳賢一: 我が教室における不妊症の検査法について, 産婦治療, 58: 461, 1989

A simple sperm immobilization test and its result

Kenichi Tatsumi, Yoichi Noda,
Nobuyuki Emi, and Takahide Mori

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

As the recent progress in IVF-ET program has given the chance of pregnancy to women with anti-sperm antibodies, the need for a proper screening test for anti-sperm antibodies is keenly felt. Among several tests for anti-sperm antibodies, Isojima's sperm immobilization test is reported to be the most reliable one. However, as Isojima's test is somewhat complicated, it is not suitable for a routine screening test for infertility.

Based on Isojima's method, we developed a simpler sperm immobilization test, and examined the serum of 229 patients. Fourteen patients (6.1%) were found to have anti-sperm antibodies by our test. As the principle of our sperm immobilization test is the same as that of Isojima's one, our test is simpler than that of Isojima, and the incidence of women with anti-sperm antibodies detected by our test is similar to that obtained by Isojima's method, our new sperm immobilization test is considered to be useful as a routine screening test for antisperm antibodies.

(受付: 1989 年 11 月 21 日)

精子運動能と Caffeine-cell soft system による解析

Influence of Caffeine on Movement Characteristics of Human Spermatozoa-Analysis by the Cell Soft System

香川医科大学泌尿器科学教室（主任：竹中生昌教授）

杉 元 幹 史 野 村 伊 作 松 岡 則 良
Mikio SUGIMOTO Isaku NOMURA Noriyoshi MATSUOKA
小 林 勲 勇 竹 中 生 昌
Isao KOBAYASHI Ikumasa TAKENAKA

Department of Urology, Kagawa Medical School
Kagawa 761-061, Japan

精子運動能と Caffeine-cell soft system による解析 杉元幹史、野村伊作、松岡則良、小林勲勇、竹中生昌（香川医大泌尿器科学教室）精子の運動を高める stimulants の1つとして Caffeine は以前より著明な促進効果を有することが知られているが、今回精子自動解析装置（cell soft system）を用いることにより、運動をいくつかのパラメーターにわけ、その質について検討したので報告する。正常男子 20 人を対象に 4 日以上禁欲期間ののち精液採取し、BWW のみの群（control 群）と 7.5 mM の caffeine を加えた群（caffeine 群）にわけそれぞれ検索した。解析は運動率、速度、直線性、頭部振幅、頭部拍動回数の 5 つのパラメーターについて行った。caffeine 群は control 群に比べ運動率、頭部振幅が大きく、また速度、頭部拍動回数の経時的減少が抑制された。しかし直線性はすべての観察時間を通じて caffeine 群は低かった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 589—593, 1990)

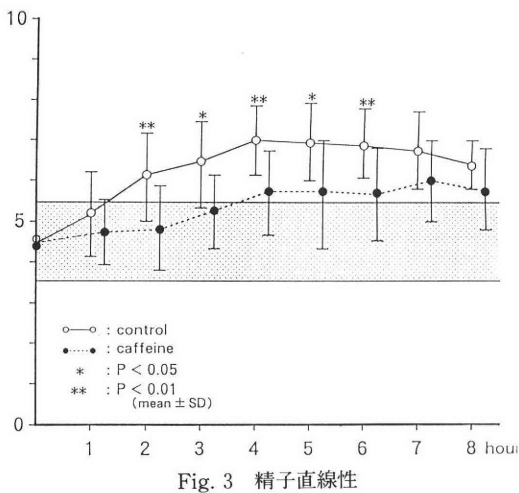
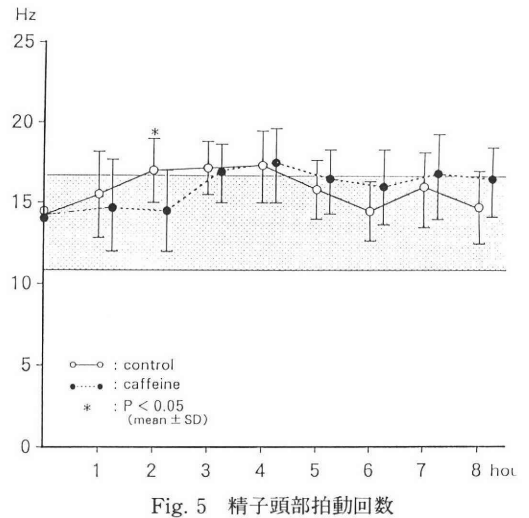
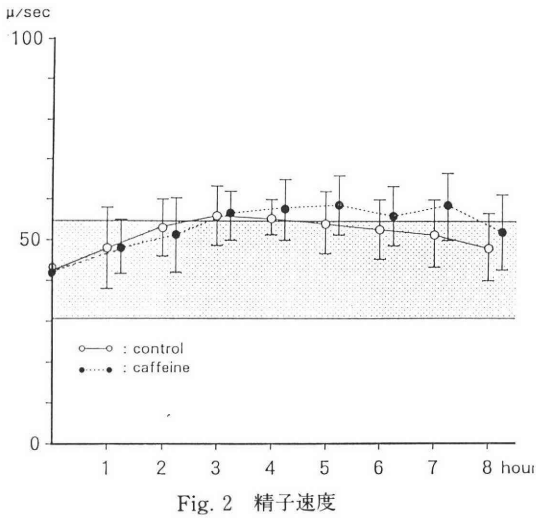
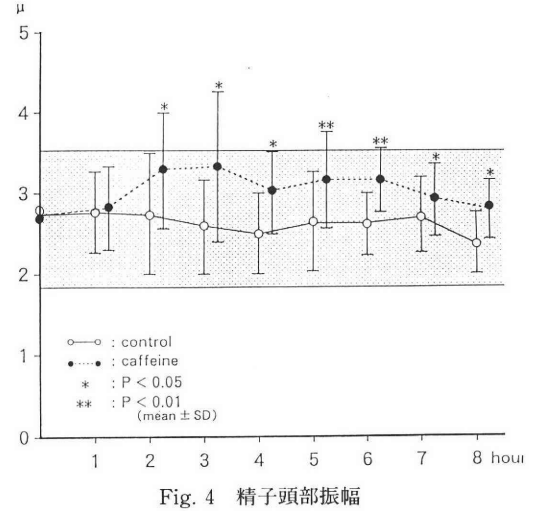
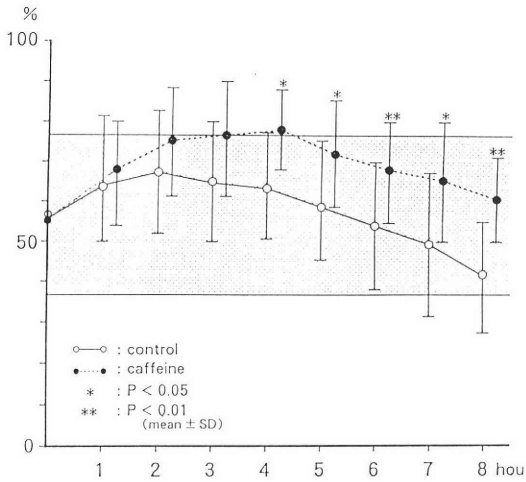
緒 言

妊娠に関する男性側の要因として、精子濃度よりむしろ運動能に起因するとの見解が最近多くなっている。運動能を高める物質としてカフェイン、テオフィリン、カリクレインなど種々の薬剤が用いられてきているが、中でもカフェインは細胞内の c=AMP 濃度を上昇せしめ精子の運動率を高める stimulants として知られている。¹⁻⁷⁾しかしそれは主に運動率を観察したものであって運動の個々の性質にまで言及したものは殆どない。われわれは正常健康男子精子についてビデオイメージとコンピューターを組み合わせた cell soft system (CRYO RESOURCE 社)を用い、運動の質をいくつかのパラメーターにしてとらえすでに報告している⁸⁾が、今回カフェイン添加による精子運動能の変化について検討したので報

告する。

対象と方法

対象は正常健康男子 20 例、年齢は 25 歳から 35 歳、平均 28.5 歳である。なお精液は 4 日以上禁欲期間の後に用手法にて採取した。室温にて 20 分静置、液化ののち modified BWW medium (BWW⁹⁾+3% Human Serum Albumin)に精子濃度 $30 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整しこれをコントロールとした。さらにこれにカフェインを 7.5 mM 加えたものをカフェイン添加群とした。それぞれに 100 U/ml の penicillin G を加え、室温下に置き、精子運動能の経時変化を 1 時間から 8 時間まで Cell Soft System にて解析を行った。測定項目は精子の運動率、速度、直線性、頭部振幅、頭部振動回数についてであり、今回は精子濃度 $60 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 50 %、速度 $40 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、



直線性 4, 頭部振幅 $2 \mu\text{m}$, 頭部振動回数 11 hz 以上を正常とした。測定は Maklar の counting chamber に培養精液を入れ、室温下、200 倍の対物レンズにて施行した。また得られた数値についての推計学的処理は Wilcoxon-Whitney-Mann の U 検定によりおこなった。

結 果

1) 精子運動率 (Fig.1)

コントロール群では $56.3 \pm 20.4\%$ から 2 時間目で $69.6 \pm 14.4\%$ (mean $\pm$ SD) とピークを示した後漸減したのに対し、カフェイン添加群では初めから漸増し 4 時間目で $76.2 \pm 10.0\%$ とピークを示した。その後減少したが、対象群に比べ推計的にも有意差をもって運動率の上昇は長く持続した。

2) 精子速度 (Fig.2)

実験開始時 $42.2 \pm 11.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ を示し、時間とともに僅かに上昇を認めたが、コントロール群では 3 時間目以降減少した。しかしカフェイン添加群とコントロール群との間には推計学的には有意差はなかったが、7 時間目においてコントロール群 $52.4 \pm 8.4 \mu\text{m}/\text{sec}$ であったのに対しカフェイン添加群では $58.0 \pm 8.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ と精子速度の持続が認められた。

3) 精子直接性 (Fig.3)

初回 4.4 ± 0.9 であった直線性は時間と共に増加し、4 時間目で 7.0 ± 0.7 とピークを示し、以下僅かに減少した。一方カフェイン添加群では早期においては直線性の増加は乏しく、4 時間目よりやや高値を示したのみであった。またコントロール群に比べ低値で、2 時間から 6 時間は推計学的にも有意差を認めた。

4) 精子頭部振幅 (Fig.4)

$2.7 \pm 0.9 \mu\text{m}$ を示した精子頭部振幅はコントロール群では時間と共にやや減少傾向を示し、4 時間目で 2.5 ± 0.4 、8 時間目では 2.4 ± 0.3 と低下した。カフェイン添加群はすべての時間において頭部振幅が増加し、2 時間目 $3.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 、3 時間目 $3.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$ とピークに達し、その後徐々に低下したが、2 時間から 8 時間においては推計学的にもコントロール群に比べ有意であった。

5) 精子頭部搏動回数 (Fig.5)

初回 $14.0 \pm 2.5 \text{ Hz}$ を示した搏動回数は、コントロール群において 4 時間目までは僅かに上昇し、 $16.5 \pm 1.4 \text{ Hz}$ とピークを示した後 7 時間目を除いて減少傾向にあった。一方カフェイン添加群では 2 時間目までは上昇はみられなかったが、その後増加し、4 時間目で $17.1 \pm 1.8 \text{ Hz}$ とピークに達した後、7 時間目を除いて減少した。しかし両群においてカフェイン添加による推計学的な有意差は、2 時間目のみで、ほとんど差は認められなかった。

考 察

近年男性不妊症の一因として、精子濃度あるいは運動能の不足が指摘され、原因究明が進められているが、末だそのメカニズムは十分明らかにされておらず、各種薬剤を用いた種々の試みも十分な効果は上がっていない。

精液所見の妊娠成功に至る条件として、精子濃度の増加よりも精子運動率あるいは精子運動能の改善が重要であることが指摘¹⁰⁾されて以来、より客観的に精子の運動能を評価できる Cell Soft System の開発がおこなわれ、臨床的にもその有用性が認められて

いる。われわれもすでに健康成人の精子運動能について本装置を用いて検討し、その有用性がきわめて高いことをすでに報告⁸⁾しているが、今回 *in vitro* で投与したカフェインによる運動能への影響を検討した。カフェインの効果については精子細胞中の $c = \text{AMP}$ 濃度の上昇¹¹⁻¹²⁾、それに伴う酸素消費量の増加¹³⁾による精子の酸素代謝の好転、さらには phosphodiesterase inhibitor が精子を活性化すること¹⁴⁻¹⁵⁾などがあげられている。しかし経時的にみると短時間で著明に上昇するが、5 時間目以降には急激に低下するとの報告もある²⁾。また運動の質に関して報告されているものでは運動の質は変化しないというもの³⁾、速度は上昇させるが直線性には影響しないというもの⁶⁾、速度を低下させるというもの、速度は変化しないというもの¹⁶⁾とさまざまで一致した見解は得られていない。

そこでわれわれも精子運動能の改善を期待してカフェイン 7.5 mM を添加した所、すでに述べたように運動率、頭部振幅を増加させ、さらに速度、頭部拍動回数を持続させたが、直線性は低下した。カフェインの効果は dose-dependent であると認められて^{3,16)}いるが、逆に 60 mM もの高濃度になると toxic effect をもたらす^{1,14)}ことも報告されている。そこで Moussa¹⁾らによる 6 mM 以下の濃度で著明な上昇効果を認めたとの報告、さらにわれわれの予備実験においても 7.5 mM において同様の効果を認めたので、今回この濃度を採用したものである。これによって精子のいわゆる運動能の向上が得られ、精子と卵子の接着する機会は頸管内条件を無視すれば、より増加するものと考えられる。しかし妊娠のための必要条件としては、精子が卵子外膜を貫通しなければならぬ。この点については、卵子への精子侵入率が上がり前核形成までであったとするもの¹⁷⁾子宮頸管粘液貫通性が上がり妊娠能も上昇させたとするもの^{3,17)}もあるが逆に、ハムスター卵貫通性はコントロールと変わらなかったとするもの⁵⁾、人工授精において妊娠能は代わらなかったとするもの⁵⁾などがありこれも統一した見解は得られていない。われわれの実験結果ではカフェインは精子運動能を上昇させる成績が得られ、さらにカフェイン添加により形態的变化はなかったとする報告もある¹⁵⁾が、光顕、電顕レベルにて奇形精子が増加し催奇形性の危険性もある¹⁸⁾との報告もみられており即、臨床応用については慎重に検討しなければならない。

結 語

in vitro でのカフェインの精子の運動能におよぼす

影響を正常健康男子 20 例の精子を用いて, Cell Soft System にて 1 時間から 8 時間まで経時的に測定, 検討し以下のような結果を得た.

- 1) 精子運動率はカフェイン添加群は観察時間を通してコントロール群より上昇しており, また持続時間も長かった.
- 2) 精子速度は有意差はなかったものの, カフェイン添加群では経時的な低下が抑えられた.
- 3) 精子直線性はカフェイン添加群は観察時間を通してコントロール群より低かった.
- 4) 精子頭部振幅はカフェイン添加群は観察時間を通してコントロール群より大きかったが, 両群とも経時変化は少なかった.
- 5) 精子頭部拍動回数はカフェイン添加群において持続時間が長かったが, 推計学的に有意差はほとんどなかった.

文 献

- 1) Moussa, M. M.: Caffeine and sperm motility, *Fertil. Steril.*, 38: 845, 1983
- 2) 小川 肇, 田代博紹, 吉田英機, 今村一男: 男性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, *日不妊会誌*, 33: 244, 1988
- 3) 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
- 4) Singh, S. D., Ansari, M. R. and Benjamin, B. R.: Effect of Caffeine on Motility of Buffalo Spermatozoa in vitro, *Andrologia*, 18:33, 1986
- 5) Margalioth, E. J., May, J. Y., Navot, D., Laufer, N., Ovadia, J. and Schenker, J. G.: Effect of caffeine on human sperm penetration into zona-free hamster ova, *ARCH. ANDROL.*, 14: 139, 1985
- 6) Ruzich, J. V., Arsdalen, K. V., Gill, Hypolite, J., Wein, A. J., Levin, R. M.: Objective assessment of the effect of caffeine on sperm motility and velocity, *Fertil. Steril.*, 48: 891, 1987
- 7) 羽間 稔: Multiple exposure photography method による精子運動の研究, *泌尿紀要*, 28: 649, 1982
- 8) 安元章浩, 野村伊作, 香川賢一, 杉元幹史, 松岡則良, 竹中生昌: 精子自動解析装置による成人男性精子運動能の検討, *西口泌尿器科*, 投稿中
- 9) 星 和彦, 斎藤 晃, 京野広一, 対木 章, 桃野耕太郎: ハムスター卵子を用いた精子の受精能検査, *細胞工学*, 3: 595, 1984
- 10) 守殿貞雄: 男性不妊症の臨床—最近の話題を中心に—, *臨牀*, 40: 7, 1986
- 11) Bhatnagar, S. K., Chaudhary, P. S. and Anand, S. R.: Adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase of buffalo spermatozoa, *L. Reprod. Fert.*, 56: 133, 1979
- 12) Amelr, R. D., Dubin, L., Schoenfeld: Sperm motility, *Fertil. Steril.*, 34: 197, 1980
- 13) Garbers, D. L., First, N. L., Sullivan, J. J. et al.: Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine, *Biol. Reprod.*, 5: 336, 1971
- 14) Read, M. D. and Schneiden, H.: Effect of two methylxanthine derivatives and four prostaglandins on the motility of spermatozoa from volunteers and oligozoospermic patients, *Int. J. Androl.*, 1:220, 1978
- 15) Barkey, J., Bartoov, B., Ben-Ezra, S., Lngsam, J., Feldman, E., Gordon, S., Zukerman, H.: The influence of in vitro caffeine treatment on human sperm morphology and fertilizing capacity, *Fertil. Steril.*, 41: 913, 1984
- 16) Makler, A., Makler, E., Itzkovitz, J., 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
- 17) Fraser, L. R.: Accelerated mouse sperm penetration in vitro in the presence of caffeine, *J. Reprod. Fert.*, 57: 377, 1979
- 18) Harisson, R. F., Sheppard, B. L. and Kalszer, M.: Observations on the motility, ultrastructure and elemental composition of human spermatozoa incubated with caffeine, II. A time sequence study, *Andrologia*, 12: 434, 1980

Influence of caffeine on movement characteristics of human spermatozoa-Analysis by the cell Soft System

Mikio Sugimoto, Isaku Nomura,
Noriyoshi Matuoka,
Isao Kobayashi,
and Ikumasa Takenaka

Department of Urology,
Kagawa Medical school, Kagawa 761-07, Japan

The effects of a caffeine, one of the stimulants on sperm movement characteristics were studied using of the automatic sperm analyser (Cell Soft System). caffeine was added to human semen offered by 20 normal volunteers at the final concentration 7.5 mM in B. W. W. (caffeine group). As the control

平成 2 年 7 月 1 日

杉元 他

(593)161

group, it was only B. W. W. without caffeine. we divided the sperm movement characteristics into five parameters: percent motile, velocity, linearity, amplitude of lateral head displacement and beat cross frequency. The caffeine group was superior to the control group on percent motile, amplitude of lateral head displacement, and also

continued the velocity and beat cross frequency. But on the linearity the caffeine group was lower than the control group all through the time.

(受付：1989 年 11 月 30 日)

特発性男子不妊症の精巣の形態学的研究 ——精細管基底膜の肥厚と 血中ホルモンとの関係について——

Histological Studies on Testes
from Patients with Idiopathic Male
Infertility Correlation between the
Thickness of Seminiferous Basement
Membrane and Serum Hormonal Levels

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	辻 克 和
Hidenori TAKABA	Tatsuya NAGAI	Yoshikazu TSUJI
	三 宅 弘 治	
	Koji MIYAKE	

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

特発性男子不妊症 40 例の精巣生検組織から精細管の光顕的基底膜の肥厚と精液所見, 精巣組織所見, および血中ホルモン値との関係を検討した。光顕的基底膜の肥厚している群は, 肥厚していない群と比較して精巣容量, 精細管直径, 基底膜の厚さ, 精細管直径/基底膜の厚さの比, Johnsen's score, FSH, LH において有意差を認めた。また精細管の光顕的基底膜の厚さと血中ホルモン値の相関関係の検討では, FSH と相関関係を認めたが, LH, プロクラチン, テストステロンとは相関関係を認めなかった。

以上の検討により精細管の光顕的基底膜の肥厚が特発性男子不妊症における造精機能障害や血清ゴナドトロピンの異常に関与していることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 594—600, 1990)

緒 言

原因不明の造精機能不全を示す特発性男子不妊症においても, 血清ゴナドトロピンやテストステロンの異常が報告されている¹⁻⁸⁾。一方特発性男子不妊症の光顕的に造精機能不全を示す精巣の組織所見の特徴の一つに, 光顕的精細管基底膜の肥厚が認められている。また間質の Leydig 細胞の増加も指摘されている。電顕的には, 精細管の電顕的基底膜周囲の結合組織の増加や変化も報告されている⁹⁻¹³⁾。しかし,

男子不妊症のなかで最も多く, 原因不明とされている特発性男子不妊症の造精機能障害の病態生理については, ほとんど解明されていない。

今回, 特発性男子不妊症患者における精巣生検組織の検討から, 精細管の光顕的基底膜の肥厚の程度の差により症例を分類し, 精液所見, Leydig 細胞数などの精巣組織所見, および血中ホルモン値について比較検討した。また精細管の光顕的基底膜の厚さを測定し, 血中ホルモン値との相関関係を検討した。

なお, 本研究では電顕的基底膜とこれに続く緻密

な結合組織（固有層 tunica propria と呼ぶことがあり、間質部のゆるい結合組織から明瞭に境されている部分）を含めて、従来、精細管壁と呼称してきた部分を精細管の光顕的基底膜と定義した (Fig. 1).

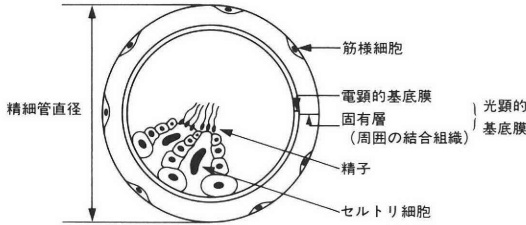


Fig. 1 Schema of the seminiferous tubule.

対象および方法

1. 対象

1987 年 4 月より 1989 年 3 月までの間に、名古屋大学泌尿器科不妊外来を受診し、特発性男子不妊症と診断された患者のうち、評価可能な 40 例を対象とした (Table 1).

Table 1. Patients with idiopathic male infertility.

精液所見	精細管基底膜の状態		
	硝子化	肥厚のみ	肥厚なし
乏精子症	7	9	10
無精子症	5	5	4

2. 方法

患者の精液所見は、4 日間以上禁欲後に採取し、3 回の平均値で示した。精巣容量は山口大式の Orchimeter にて測定した。

精巣生検は、1%リドカインの局所麻酔下で Charny¹⁴⁾の方法に準じて右側精巣について行なった。生検組織を採取後、直ちに Bouin 液に常温で約五時

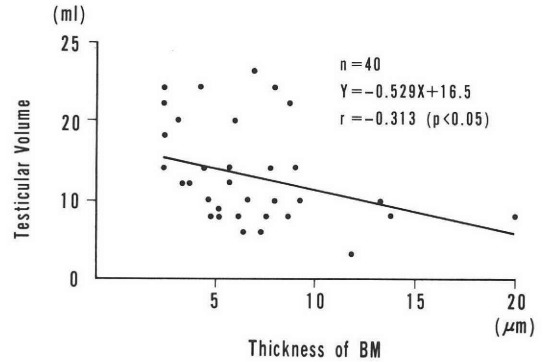


Fig. 2 Correlation between testicular volume and the thickness of the seminiferous basement membrane (Thickness of BM).

間固定後、アルコール系列にて脱水、パラフィン包埋、ミクロトームにて 3 μm に薄切した、HE 染色を施行し光学顕微鏡で観察した。

各症例において、平均 Johnsen's score¹⁵⁾を測定した。さらに光顕的精細管基底膜の厚さ (W) と精細管直径 (T) (精細管基底膜を含めて計測) を計測した (Fig. 1)。計測はマイクロメーターを用い、光学顕微鏡にて 400 倍で精細管のできる限り完全な横断面と思われる部分で計測し、10 個以上の精細管についての平均を求め、さらに T/W 比を算出した。また Leydig 細胞の定量は Weiss ら¹⁶⁾の方法に従い、精細管断面 1 個あたりの平均 Leydig 細胞数を Leydig cell index とした。

血中ホルモン (LH, FSH, テストステロン、プロラクチン) は、午後 1 時に肘静脈より採血し、北里ラボラトリーに依頼し 2 抗体法で測定した。

精液所見 (精液量、精子濃度、精子運動率)、精巣容量、平均 Johnsen's score、Leydig cell index、平均精細管基底膜の厚さ (W)、平均精細管直径 (T)、T/W 比、LH、FSH、プロラクチン、テストステロン、FSH/LH、テストステロン/LH の値を各症例の

Table 2. Semen findings and testicular histological conditions compared between the group of thickened seminiferous basement membranes and non-thickened ones

精細管基底膜の状態	精液量 (ml)	精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	精子運動率 (%)	精巣容量 (ml)	平均 Johnsen's score	Leydig cell index	精細管直径 (T) (μm)	基底膜の厚さ (W) (μm)	T/W 比
非肥厚群 (n=14)	3.79 ±1.42	5.55 ±5.54	20.6 ±25.9	15.1 ±6.40	6.86 ±2.85	5.16 ±3.13	178.5 ±15.3	3.72 ±1.69	24.1 ±8.85
肥厚群 (n=26)	3.51 ±1.68	5.96 ±1.07	21.9 ±24.2	12.1 ±5.93	4.81 ±2.77	6.97 ±4.88	144.6 ±27.7	7.78 ±3.66	11.0 ±5.8

* p < 0.01 ** p < 0.05

不妊パラメーターとして統計処理した。また平均精細管基底膜の厚さとその他の不妊パラメーターとの相関関係を検討した。有意差検定は Wilcoxon の順位和検定で行なった。

結 果

1) 精細管基底膜の状態による検討

精巣生検像より、特発性男子不妊症の患者は基底膜の肥厚の状態により以下の3群に分類できた。

a) 硝子化した閉塞精細管を持つ精巣（ほとんどの精細管が硝子化した Klinefelter 症候群のような組織像を持つ症例を言うのではなく、いわゆる精子形成のモザイク像と称され、一部に硝子化して閉塞した精細管を持つ症例も含まれる）。

b) 硝子化閉塞した精細管はみられないが精細管基底膜の肥厚した精巣。

c) 精細管基底膜は肥厚していないが精子形成の障害されている精巣。

全症例を精細管基底膜の肥厚を示す肥厚群（a + b）と示さない非肥厚群（c）の2群とし、それぞれの不妊パラメーターについて比較検討を行なった。

精液量、精子濃度、精子運動率は両群間に有意差を認めなかった。精巣容量は、肥厚群 12.1 ± 5.93 ml (Mean $\pm$ SD)、非肥厚群 15.1 ± 6.40 ml と肥厚群が有意に ($P < 0.05$) 小さかった。平均 Johnsen's score は、肥厚群 4.81 ± 2.77 、非肥厚群 6.86 ± 2.85 と肥厚群が有意に ($P < 0.05$) 悪かった。Leydig cell index は有意差を認めなかった。平均精細管基底膜の厚さは、肥厚群 7.78 ± 3.66 μ m、非肥厚群 3.72 ± 1.69 μ m と肥厚群が有意に ($P < 0.01$) 厚く、平均精細管直径は、肥厚群 138 ± 29.7 μ m、非肥厚群 156 ± 19.5 μ m と肥厚群が有意に ($P < 0.05$) 小さかった。T/W比は、肥厚群 11.6 ± 5.8 、非肥厚群 24.1 ± 8.85 と有意差 ($P < 0.01$) を認めた (Table 2)。

血中ホルモン値の検討では、FSH は肥厚群 27.0 ± 14.8 mIU、非肥厚群 14.4 ± 8.76 mIU ($P < 0.01$)、

LH は肥厚群 30.1 ± 25.9 mIU、非肥厚群 16.0 ± 6.99 mIU ($P < 0.05$) と肥厚群が有意に上昇していた。しかしプロラクチン、テストステロン、FSH/LH、テストステロン/LH では有意差を認めなかった (Table 3)。

さらに基底膜肥厚精細管群を硝子化精細管群 (a) と肥厚のみの群 (b) に分類して、各パラメーターについて比較検討したが、この両群間では有意差を認めなかった。

2) 精細管基底膜の厚さと各パラメーターとの相関関係

精細管基底膜の厚さは、精液所見（精液量、精子濃度、精子運動率）と相関関係を認めなかった。しかし精巣容量とは相関係数 -0.313 ($P < 0.05$) で有意の負の相関関係を認めた (Fig. 2)。

Johnsen's score とは相関係数 -0.397 ($P < 0.05$) で有意の負の相関関係を認めた (Fig. 3)。しかし Leydig cell index とは有意の相関関係を認めなかった。平均精細管直径とは相関係数 -0.607 ($P < 0.01$)

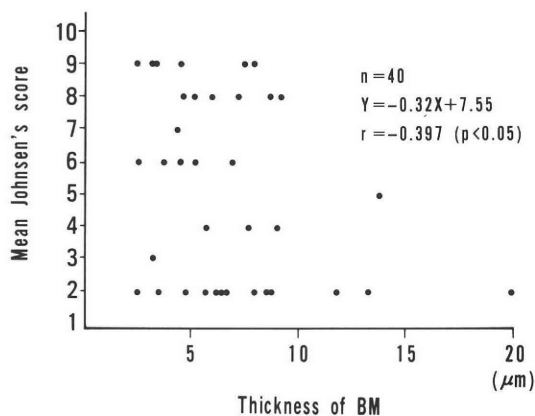


Fig. 3 Correlation between mean Johnsen's score and the thickness of the seminiferous basement membrane.

Table 3. Serum hormonal levels compared between the group of thickened basement membranes and non-thickened ones.

精細管基底膜の状態	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	プロラクチン (ng/dl)	テストステロン (ng/dl)	FSH/LH	テストステロン/LH
非肥厚群 (n = 14)	14.4 $\pm$ 8.76	16.0 $\pm$ 6.99	13.3 $\pm$ 7.79	508 $\pm$ 399	0.899 $\pm$ 0.368	35.1 $\pm$ 22.7
肥厚群 (n = 26)	27.0 $\pm$ 14.8	30.1 $\pm$ 25.5	16.5 $\pm$ 8.58	479 $\pm$ 232	1.11 $\pm$ 0.526	27.1 $\pm$ 28.0

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

で、またT/W比とは相関係数 -0.802 ($P < 0.01$)で、それぞれ有意の負の相関関係を認めた (Fig. 4, 5)

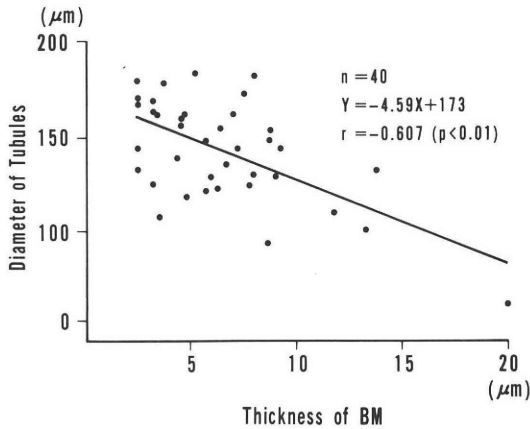


Fig. 4 Correlation between diameter of seminiferous tubule and the thickness of the seminiferous basement mambrane.

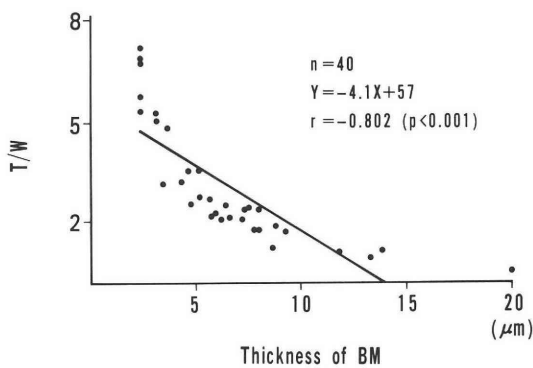


Fig. 5 Correlation between T/W ratio and the thickness of the seminiferous basement membrane.

血清ホルモン値との検討では、精細管基底膜の厚さはFSHとは相関係数 0.470 ($P < 0.01$)で有意の正の相関係数を認めたが、LH、プロラクチン、テストステロン、FSH/LH、テストステロン/LHとは有意の相関関係は認めなかった (Fig. 6, 7).

考 察

近年、特発性男子不妊症において、精細管基底膜とその周囲の結合組織の異常が、造精機能障害や血中ゴナドトロピン値の異常に関与していることが示唆されてきた。従来から形態学的な面からのアプローチにより、その機能異常が推論されてきたが、現在なお特発性男子不妊症の造精機能障害の解明は不

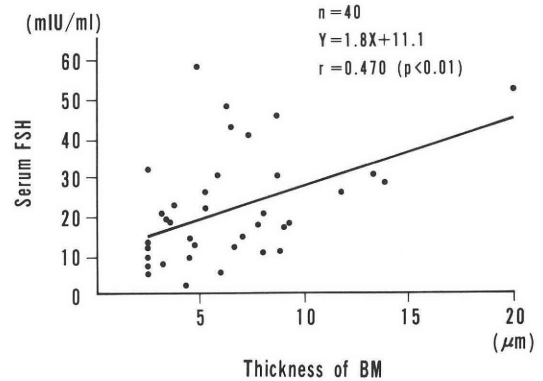


Fig. 6 Correlation between serum, FSH and the thickness of the Seminiferous basement membrane.

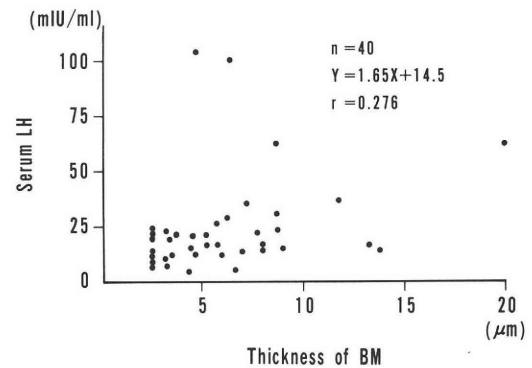


Fig. 7 Correlation between serum LH and the thickness of the seminiferous basement mambrane.

十分である。

特発性男子不妊症の精巣では、HE染色、PAS反応、AZAN染色などによる光顕的観察で精細管基底膜の肥厚が認められている。電顕的観察では、精細管の光顕的基底膜の肥厚の本態が電顕的基底膜の多層化とその外側の結合組織におけるコラーゲン繊維の異常増加であることは諸家により報告されている⁹⁻¹³⁾。

今回の検討では精細管の光顕的基底膜の厚さは、精巣容量および精細管直径と負の相関関係を認めた。これは光顕的基底膜の肥厚が進行するにつれて、精細管が狭小化し精巣が小さくなることを示している。特発性男子不妊症においては精巣容量が小さくなるほど妊孕性の低くなることが認められており、基底膜の肥厚を来している例では精巣組織の萎縮が起こっていると考えられている。精細管基底膜の肥厚や精細管の硝子化、間質結合組織成分の異常増加を示す組織像から推察すると、特発性男子不妊症の精巣組織内では、結合組織の代謝異常などによる精巣組

織の結合組織化が発生している可能性が考えられる。この結合組織の変化が精細管内における精子形成に影響を及ぼしていることが推察される。

精細管の光顕的基底膜（電顕的基底膜とその周囲の結合組織）は精細管支持機能のみでなく、多くの重要な機能を有することが近年あきらかになってきている。基底膜が、間質と精細管内の精上皮細胞や Sertoli 細胞との間のホルモンや栄養物質や生理的活性物質の通過の調節に関与していることが示唆されている。Setchell ら¹⁷⁾は、動物実験で精細管基底膜には物質に対する能動および受動的輸送機構があることを示し、Chakraborty ら¹⁸⁾も、ヒト精巣の電顕による検討で、電顕的基底膜の protrusion が精細管の内外の物質の通過に関与するものであることを示唆した。また精上皮細胞や間質の Leydig 細胞が性ホルモンの調節を受けているのと同様に、電顕的基底膜とその周囲結合組織の成熟、周囲結合組織内に存在する筋様細胞の分化も性ホルモンによって調節されていることが明らかになってきた¹⁹⁻²¹⁾。これらの電顕的基底膜と周囲結合組織の機能が、特発性男子不妊症においては異常を来していることが考えられる。

特発性男子不妊症の血清ゴナドトロピン値については幾つかの報告がある。FSH については無精子症¹⁻⁵⁾、Sertoli cell only 症候群^{6,7)}、無精子症と乏精子症の両方⁸⁾で有意に上昇したという報告がある。しかし FSH の上昇は二次的なものであり、精細管の変化と相関すると考えられている²²⁾。

FSH の受容体は Sertoli 細胞に証明される。また Sertoli 細胞はインヒビンを分泌し、インヒビンは下垂体前葉にフィードバックして FSH の分泌を抑制する。精細管基底膜とその周囲結合組織が肥厚すれば、精細管の内外における物質の輸送が当然妨げられることが予想される。FSH やインヒビンも精細管周囲の結合組織の壁によりその移動が障害されるであろう。精細管の光顕的基底膜が肥厚するにつれて血中 FSH が高くなる原因を推察すると、1) 下垂体から分泌された FSH が、精細管周囲の結合組織の壁の肥厚のため精細管内に入れないこと、2) Sertoli 細胞から分泌されたインヒビンも精細管の外に出ることができないこと、3) そのために高くなった FSH に対してインヒビンによるフィードバックがかからず、さらに FSH が高くなるという仮説が考えられる。

LH についても男子不妊症においては有意の上昇を認める報告^{1-4,6,7)}が多い。テストステロンについては正常と有意差を示さないとする報告^{1,4,6,8)}と、無精子症において有意に低下するという報告²⁾がある。無精

子症例の Leydig 細胞の電顕的検討において Livni ら²³⁾、Camatini ら²⁴⁾は、血中ゴナドトロピンの上昇および血中テストステロンの減少と Leydig 細胞のミトコンドリアの膨化との関連性を示唆した。橋本ら²⁵⁾は特発性男子不妊症の精巣について、Leydig 細胞のミトコンドリアのクリステの発達の悪いことを指摘したが、乏精子症と無精子症で有意差を認めることができなかった。橋本ら²⁵⁾は、精巣の循環障害、間質の線維化などが原因となり、個々の Leydig 細胞の機能が低下し、下垂体への negative feedback により LH 分泌が増加するのではないかと推論している。

精巣組織においては、生成された生理活性物質がそのまま組織液を介し、あるいは直接、隣接する細胞に到達して作用するパラクリン調節も行なわれている。Leydig 細胞で生成分泌されたテストステロンは精細管内の諸細胞に作用する。筋様細胞は Sertoli 細胞の分化と機能発現を促進させる蛋白を分泌するが、その分泌はテストステロンによって調節されている。また FSH は Sertoli 細胞を刺激し、LH に対する感受性を高める蛋白の分泌を増加させることにより、Leydig 細胞の成熟を促す。これらのパラホルモンのパラクリン調節が精細管基底膜と周囲結合組織の肥厚により阻害される可能性が考えられる。しかし LH やテストステロンは精細管の光顕的基底膜の肥厚と統計学的に有意に相関しなかった。これは単純に説明のつく問題ではないが、パラクリン調節が複雑に関係していることも要因と考えられる。また LH とテストステロンは精巣組織内におけるその働きの主座が Leydig 細胞にあり、直接精細管基底膜を通過することなく大循環系に入ることも一つの要因であると考えられる。

特発性男子不妊症では精細管基底膜の変化が、特発性男子不妊症の造精機能障害やホルモン値の異常に関与していることは明らかである。精細管基底膜と周囲結合組織に変化の起きるメカニズムと、その肥厚による管内栄養状態の低下が精子形成不全の原因であるとする仮説は今後さらに追究されるべき課題であると思われる。

結 語

1. 精細管の光顕的基底膜の肥厚の有無により特発性男子不妊症の患者を分類し、その精液所見、精巣組織所見、血中ホルモン値を比較検討した。

精液容量、Johnsen's score、精細管直径(T)、基底膜の厚さ(W)、T/W比は有意差を認めた。しかし、精液所見、Leydig cell index は有意差を認めなかった。また血中ホルモンについては、FSH、LH は

有意差を認めたが、テストステロン、プロラクチンには有意差を認めなかった。

2. 精細管光顕の基底膜の厚さと精液所見、精巣組織所見の各パラメーター、および各ホルモン値との相関関係を検討した。

基底膜の厚さは精液所見と相関関係を認めなかった。一方、精巣容量、精細管直径、T/W比、およびJohnsen's scoreとは相関関係を認めた。FSHとは相関関係を認めたが、LH、テストステロン、およびプロラクチンとは有意な相関関係を認めなかった。

この研究の一部は昭和62年度文部省科学研究補助金(一般研究(C) No.62570721)によるものである。

文 献

- 1) 内島 豊, 平賀聖悟, 駒瀬元治, 根岸壮治: 男子不妊症の血中ホルモン動態と造精機能に関する検討, 日不妊会誌, 27: 127, 1982
- 2) Urry, R. L., Dougherty, K. A. and Cockett, A. T. K.: Correlation between follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone and 5-hydroxyindole acetic acid with sperm cell concentration, J. Urol., 116: 322, 1976
- 3) 小松洋輔, 友吉唯夫, 永山洋一: 乏精子症および無精子症の血中FSHとLH, 泌尿紀要, 19: 457, 1973
- 4) 谷風三郎: 男性不妊に関する内分泌学的研究, 泌尿紀要, 26: 947, 1980
- 5) Leonard, J. M., Leach, R. B., Couture, M. and Paulsen, C. A.: Plasma and urinary follicle-stimulating hormone levels in oligospermia, J. Clin. Endocrinol. Metab., 34: 209, 1972
- 6) Ishida, H., Isurugi, K., Aso, Y., Takayasu, H. and Tamaoki, B.: Endocrine studies in Sertoli-cell-only syndrome, J. Urol., 116: 56, 1976
- 7) de-Krester, D. M., Burger, H. G., Fortune, D., Hudson, B., Long, A. R., Paulsen, C. A. and Taft, H. P.: Hormonal, histological and chromosomal studies in adult males with testicular disorders, J. Clin. Endocrinol. Metab., 35: 392, 1972
- 8) Rosen, S. W. and Weintraub, B. D.: Monotropic increase of serum FSH correlated with low sperm count in young men with idiopathic oligospermia and aspermia, J. Clin. Endocrinol. Metab., 32: 410, 1971
- 9) 近藤猪一郎: 睾丸間質の形態学的研究, 日泌尿会誌, 53: 869, 1962
- 10) 湯沢純治: 精細管周囲組織の電子顕微鏡的研究, 日泌尿会誌, 59: 294, 1968
- 11) Bustos-Obregon, E. and Holstein, A. F.: On the structural patterns of the lamina propria of human seminiferous tubules, Z. Zellforsch., 141: 413, 1973
- 12) 古屋聖児: 睾丸機能の研究 第5報 精子発生不全睾丸における精細管壁の変化に関する電顕的研究, 日泌尿会誌, 66: 809, 1975
- 13) Miyake, K., Maseki, Y., Mitsuya, H., Kitamura, H. and Yamada, K.: Ultrastructural changes in basement membrane of seminiferous tubules in the testes from patients with idiopathic male infertility and boys with cryptorchidism, 結合組織, 14: 11, 1982
- 14) Charny, C. W.: Testicular biopsy. Its value in male sterility, JAMA, 115: 1429, 1940
- 15) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count: a method for registration of spermatogenesis in human testis, Normal values and results in 335 hypogonadal males, Hormones, 1: 2, 1970
- 16) Weiss, D. B., Rodriguez-Rigau, L., Smith, K. D., Chowdhury, A. and Steinberger, E.: Quantitation of Leydig cells in testicular biopsies oligospermic men with varicocele, Fertil. Steril., 30: 305, 1978
- 17) Setchell, B. P., Voglmayer, J. K. and Waites, G. M.: A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph, J. Physiol., 200: 73, 1969
- 18) Chakraborty, J., Nelson, L., Jhunjhunwala, J., Young, M. and Kropp, K.: Basal lamina of human seminiferous tubule-its role in material transport, Cell Tiss. Res., 174: 261, 1976
- 19) Bressler, R. S. and Ross, M. H.: Differentiation of peritubular myoid cells of the testis; Effects of intratesticular implantation of newborn mouse testes into normal and hypophysectomized adults, Biol. Reprod., 6: 148, 1972
- 20) Hovatta, O.: Effects of androgens and antiandrogens on the development of the myoid cells of the rat seminiferous tubule (organ culture), Z. Zellforsch., 131: 299, 1972
- 21) de-Krester, D. M.: The fine structure of the immature testis in hypogonadotropic hypogonadism, Virchows Arch. Abt. B, 1: 283, 1968
- 22) 三宅弘治: 精巣生検よりみた特発性男子不妊症, 泌尿紀要, 29: 991, 1983
- 23) Livni, N., Palti, Z., Segal, S. and Laufer, A.: Fine structure of Sertoli and Leydig cells in azospermic human testis, Arch. Pathol. Lab. Med., 101: 442, 1977
- 24) Camatini, M., Franchi, E., Anelli, G. and Chiarra, F.: Morphological changes of Leydig cells in men with altered plasma testosterone and gonadotropin levels, J. Submicrosc. Cytol., 13: 703, 1981
- 25) 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細胞の定量化およびその超微細構造について—, 泌尿紀要, 34: 1995, 1988

**Histological studies on
testes from patients
with idiopathic male infertility
—correlation between the thickness
of seminiferous basement membrane
and serum hormonal levels—**

Hidehori Takaba, Tatsuya Nagai,
Yoshikazu Tsuji and Koji Miyake

Department of Urology,
Nagoya University School of Medicine,
Nagoya 466, Japan (Director: Prof. K. Miyake)

To determine if the thickness of the seminiferous basement membrane is associated with semen

findings, testicular histological conditions and serum hormonal levels, 40 patients with idiopathic male infertility were examined using specimens obtained by testicular biopsy. Quantitative analysis of the testicular volume, mean thickness of the basement membrane (W), mean seminiferous tubular diameter (T), T/W ratio, Johnsen's score, serum LH and FSH demonstrated significant differences between the group of thickened seminiferous basement membranes and nonthickened ones. The thickness of the seminiferous basement membrane was significantly correlated with testicular volume, mean seminiferous tubular diameter, T/W ratio, Johnsen's score and serum FSH.

Thus, thickening of the seminiferous basement membrane may affect hypospermatogenesis and related to disorders of serum gonadotropins in patients with idiopathic male infertility.

(受付：1990 年 3 月 7 日特掲)

男子不妊症に対する hCG-hMG 療法の臨床的検討

Clinical Evaluation of hCG-hMG Combined Therapy in Patients with Male Infertility.

岡山大学医学部泌尿器科学教室

(主任：大森弘之教授)

山下良孝	永井敦	大枝忠史
Yoshitaka YAMASHITA	Atsushi NAGAI	Tadashi OHEDA
小浜吉照	大橋輝久	大森弘之
Yoshiteru KOHAMA	Teruhisa OHASHI	Hiroyuki OHMORI

Department of Urology, Okayama University
Medical School, Okayama 700, Japan
(Director: Prof. Hiroyuki Ohmori)

男子不妊症 47 症例（無精子症 9 例，特発性乏精子症 35 例，精索静脈瘤術後乏精子症 3 例）に対し hCG (Gonotropin®) 2000 IU，LH として hMG (Humegon®) 150 IU を，週 1 回筋注で 12 週以上 24 週まで継続投与する，hCG-hMG 療法を行なった結果，12 週 9.3%，24 週 5.4% の全般改善率を得た。妊娠例は 2 例（4.3%）に認められた。

治療前精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の高度乏精子症では治療効果が低く，無精子症には治療効果を認めなかった。治療前 LH，FSH 高値例では，治療効果が低い傾向にあった。治療前 LH-RH 負荷テストでは LH 4 倍以上，FSH 2 倍以上の増加を示す症例では治療効果を認めなかった。

副作用は 1 症例に軽度の女性化乳房を認めたのみであった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 35 (3), 601—606, 1990)

緒言

男子不妊症に対する薬物療法として現在まで色々の薬物の投与が試みられているが，未だ確立された治療法はない。LH が Leydig 細胞に作用し Testosterone (T) の生成を促進すること，FSH が Sertoli 細胞に作用し Androgen Binding Protein の産生を促進し Germ Cell の分化を促進することより，男子不妊症に対する hCG-hMG 療法が行なわれ，すでにその有効性が報告されている。今回我々は男子不妊症に対して hCG-hMG 療法を行ない，その臨床的有用性を検討したので報告する。

対象および方法

対象は昭和 61 年 7 月から昭和 62 年 7 月までに不

妊を主訴に当科を受診した男子不妊症 47 例である。その内訳は無精子症 9 例，特発性乏精子症 35 例，精索静脈瘤術後乏精子症 3 例である。患者の年齢は 26 歳～40 歳（平均 33.3 歳）である。治療前 37 例に精巢生検を行ない，J. S. C. は 2.0～8.7（平均 7.4）であった。投与方法は FSH として hCG (Gonotropin®) 2000 IU，LH として hMG (Pergonal®) 150 IU を，週 1 回筋注で 12 週以上 24 週まで継続投与し治療前 12 週後 24 週後に精液検査を行ない治療効果を判定した。同時に血中ホルモン濃度の測定も行ない治療前後の変化を検討した。治療効果の判定に際しては，Methyl-B₁₂用量比較試験の際使用された判定基準を用いた（表 1）。

表 1 評価方法

- 1) 精子数改善度 (投与前値が $40\times 10^6/\text{ml}$ 以下のものに対して判定する)
- (1) 著明改善

精子数が治療前値より $20\times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの
- (2) 改 善

精子数が治療前値より $10\times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの
- (3) 不 変

精子数が治療前値と比較して $\pm 10\times 10^6/\text{ml}$ 未満の変動のもの
- (4) 悪 化

精子数が治療前値より $10\times 10^6/\text{ml}$ 以上減少したもの
- 2) 運動率改善度 (投与前値が50%以下のものに対して判定する)
- (1) 著明改善

運動率が治療前値に比べ、20%以上改善したもの
- (2) 改 善

運動率が治療前値に比べ、10%以上改善したもの
- (3) 不 変

運動率が治療前値と比較して、10%未満の変動のもの
- (4) 悪 化

運動率が治療前値に比べ、10%以上悪化したもの
- 3) 全般改善度
- 精子数および運動率に対する治療効果を総合的に判定し、5段階で判定する。
1. 著明改善 2. 改 善 3. やや改善 4. 不 変 5. 悪 化

表 2 治療効果一覧

層 別	週	総計	著明改善	改 善	やや改善	不 変	悪 化	改 善 率
精 子 濃 度	12	43	2	1	—	40	0	7.0%
改 善 度	24	37	2	0	—	35	0	5.4%
運 動 率	12	43	8	7	—	15	13	34.9%
改 善 度	24	37	6	4	—	14	13	27.0%
全 般	12	43	2	2	13	26	0	9.3%
改 善 度	24	37	2	0	8	27	0	5.4%

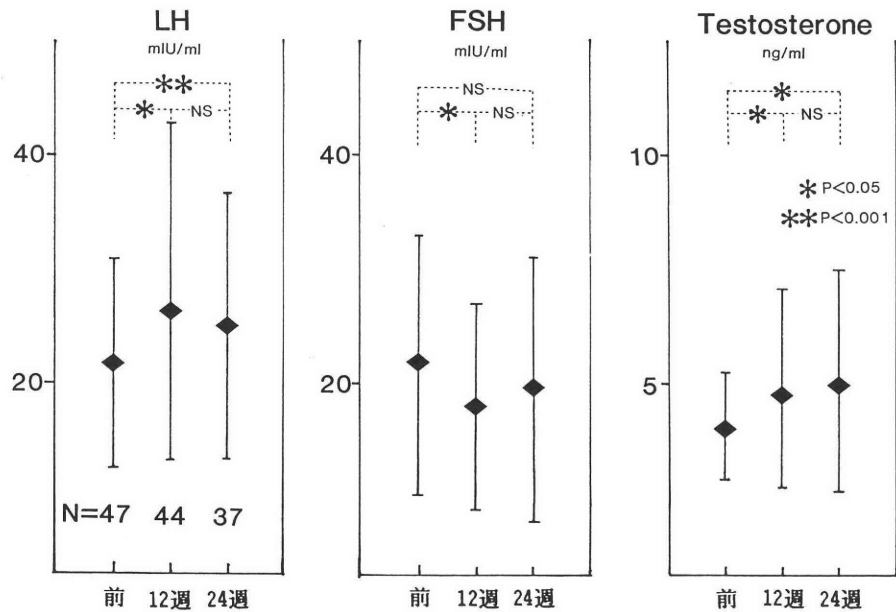


図 1 治療前後血中ホルモン濃度変化

表 3 治療前精子濃度別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改 善	やや改善	不 変	悪 化	改 善 率
10×10 ⁶ /ml 以上	12	6	1	1	3	1	0	33.3%
	24	6	2	0	2	2	0	33.3%
10×10 ⁶ /ml 未満	12	29	1	1	9	18	0	6.9%
	24	23	0	0	6	17	0	0 %
無 精 子 症	12	8	0	0	1	7	0	0 %
	24	8	0	0	0	8	0	0 %

表 4 治療前精子運動率別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改 善	やや改善	不 変	悪 化	改 善 率
20%未満	12	21	0	0	8	13	0	0 %
	24	20	0	0	5	15	0	0 %
20%以上	12	22	2	2	5	13	0	18.2%
	24	17	2	0	3	12	0	11.8%

表 5 治療前 LH 濃度別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改 善	やや改善	不 変	悪 化	改 善 率
15mIU/ml 未満	12	17	1	2	7	7	0	17.6%
	24	16	2	0	2	12	0	12.5%
15以上 30未満	12	14	1	0	2	11	0	7.1%
	24	16	1	0	2	13	0	6.3%
30mIU/ml 以上	12	12	0	0	4	8	0	0 %
	24	11	0	0	2	9	0	0 %

表 6 治療前 FSH 濃度別治療効果

層 別	週	総計	著明改善	改 善	やや改善	不 変	悪 化	改 善 率
10mIU/ml 未満	12	8	0	1	4	3	0	12.5%
	24	6	0	0	2	4	0	0 %
10以上 20未満	12	14	1	1	4	8	0	14.3%
	24	13	2	0	2	9	0	15.4%
20mIU/ml 以上	12	21	1	0	5	15	0	4.8%
	24	17	0	0	4	14	0	0 %

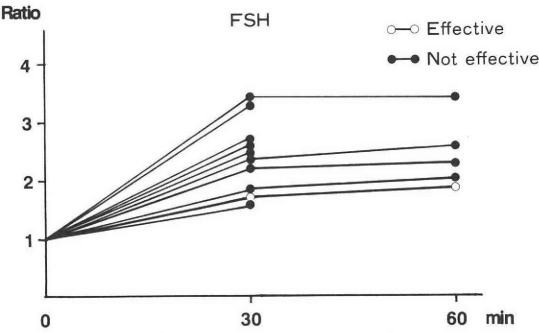


図 2 治療前 LH-RH 負荷テスト成績 (FSH)

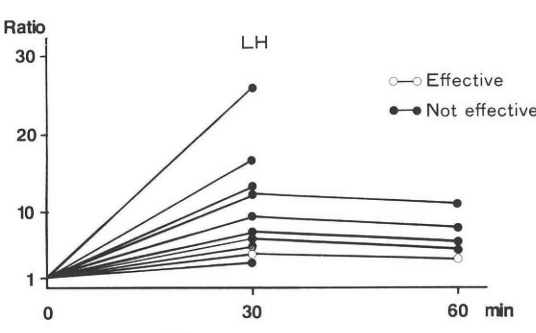


図 3 治療前 LH-RH 負荷テスト成績 (LH)

成 績

治療前 12 週後 24 週後の血中ホルモン濃度の推移については図 1 に示した。LH, T は治療前に比較して 12 週後 24 週後有意に上昇した。FSH は 12 週後では有意の低下を認めたが、24 週後では治療前に比較して有意差を認めなかった。

治療効果の一覧を表 2 に示す。精子濃度の改善度は、12 週では、著明改善 2 例、改善 1 例、不変 40 例、悪化は認めず、12 週の著明改善と改善を合わせた改善率は 7 % であった。24 週では著明改善 2 例で、改善率は 5.4 % であった。運動率改善度は 12 週で著明改善 8 例、改善 7 例、不変 15 例、悪化 13 例で、改善率は 34.9 % であった。24 週では著明改善 6 例、改善 4 例、不変 14 例、悪化 13 例で改善率 27 % であった。このように、精子濃度に対するよりも、運動率に対する治療効果の方が良好であった。全般改善度は、12 週で著明改善 2 例、改善 2 例、やや改善 13 例、改善率 9.3 %、24 週では著明改善 2 例、やや改善 8 例、改善率 5.4 % であった。また、2 例 (4.3 %) に妊娠の成立を認めた。その内訳は 12 週で精子濃度運動率ともに著明改善を認めた 1 例、および運動率のみ改善を認めた 1 例とともに治療開始後 16 週目に妊娠の成立を見た。

次に治療前精子濃度、精子運動率、LH 濃度、FSH 濃度別に治療効果を検討した。

治療前精子濃度については、精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上群、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満群、無精子症群の 3 群別に全般改善率を比較検討した。

$10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上群 12 週では著明改善 1 例、改善 1 例、やや改善 3 例、不変 1 例、改善率は 33.3 % であり、24 週では著明改善 2 例、やや改善 2 例、不変 2 例、改善率 33.3 % であった。 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満群では、12 週著明改善 1 例、改善 1 例、改善率は 6.9 % であった。 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満群の 24 週、無精子症群では著明改善、改善はなく、改善率は 0 % で、高度乏精子症に対しては治療効果が低く、無精子症に対しては治療効果を認めないことが判明した (表 3)。

同様に治療前精子運動率では精子運動率 20 % 以上群、20 % 未満群の 2 群別に治療効果を検討した。20 % 未満群では 12 週 24 週の著明改善、改善例は認めず、改善率 0 % であった。20 % 以上群では 12 週の著明改善 2 例、改善 2 例、改善率 18.2 %、24 週の著明改善 2 例、改善率 11.8 % であった。治療前運動率においても精子濃度同様治療前低値の症例では治療効果が低い傾向であった (表 4)。

治療前 LH 濃度については $15\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群、

$15\text{mIU}/\text{ml}$ 以上 $30\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群、 $30\text{mIU}/\text{ml}$ 以上群の 3 群別に検討した。 $15\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群では、12 週の改善率 17.6 %、24 週では 12.5 %、15 以上 30 未満では、12 週の改善率 7.1 %、24 週の改善率 6.3 % で、 $30\text{mIU}/\text{ml}$ 以上群では 12 週 24 週ともに改善率は 0 % で、LH 濃度が高値になるにしたがって治療効果も低くなる傾向であった (表 5)。

治療前 FSH 濃度については $10\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群、 $10\text{mIU}/\text{ml}$ 以上 $20\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群、 $20\text{mIU}/\text{ml}$ 以上群の 3 群別に検討した。 $10\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群では 12 週の改善率 12.5 %、24 週では 0 %、 $10\text{mIU}/\text{ml}$ 以上 $20\text{mIU}/\text{ml}$ 未満群では 12 週の改善率 14.3 %、24 週の改善率 15.4 %、 $20\text{mIU}/\text{ml}$ 以上群では 12 週の改善率 4.8 %、24 週の改善率 0 % で LH 同様 FSH 高値の症例でも治療効果の低い傾向であった (表 6)。

治療前 LH-RH 負荷テストを施行した 10 症例について治療効果との関係を検討した。LH, FSH の基礎値は、LH $4.4 \sim 20.6\text{mIU}/\text{ml}$ (平均 $13.0\text{mIU}/\text{ml}$)、FSH $3.4 \sim 32.7\text{mIU}/\text{ml}$ (平均 $14.4\text{mIU}/\text{ml}$) と、正常範囲内であった。負荷後の増加率と治療効果との関係を見ると、有効例は 1 症例にしか認められなかった。LH 4 倍以上 FSH 2 倍以上の増加を示す症例では治療効果を認めなかった (図 2, 3)。

副作用については重篤なものは認められず、1 症例に軽度の女性化乳房を認めたのみであった。

考 察

Steinberger ら¹⁾の FSH, LH の造精能に及ぼす作用についての報告以来、男子不妊症に対する hCG-hMG 療法の報告は本邦でもいくつかなされている。その治療効果については有効率 25 %²⁾、26 %³⁾、44.6 %⁴⁾、50 %⁵⁾、66 %⁶⁾、68 %⁷⁾、妊娠率については 8.9 %²⁾、12.5 %⁴⁾、15 %³⁾、16 %⁵⁾と報告されている。また、欧米の報告については、Scill⁸⁾の集計では、439 例の精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の高度乏精子症に対しては、 $11 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ に改善したもの 112 例 (25.5 %)、 $30 \times 10^6/\text{ml}$ を超える改善を見たもの 78 例 (18 %)、妊娠例は 37 例 (8 %) である。また、 $11 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ の乏精子症 241 例に対する効果では、 $30 \times 10^6/\text{ml}$ を超える改善を見たもの 80 例 (33 %)、妊娠例は 35 例 (14.5 %) である。効果判定基準の差はあるが、今回の我々の成績はこれらに比較して明らかに低いものであった。この原因としては、第一に今回の検討で判明したごとく、高度乏精子症では治療効果が低く無精子症には治療効果が認められない事より、無精子症 8 例、治療前精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の高

度乏精子症 29 例を治療対象群に含んでおり、治療対象の選定に問題があったためと考えられる。第二に hCG, hMG 投与量が十分でなかった事が考えられる。

治療対象としてどのような症例を選ぶべきであるかについては、LH-RH 負荷テストが有用であるとの報告がある。すなわち、Lunenfeld⁹⁾らは FSH の基礎値が低く LH-RH 負荷テストで FSH が 2 倍以上に上昇しない症例が適応であると述べている。水谷²⁾らの報告では有効例では LH, FSH の反応が相対的に低く、特に FSH が 3 倍以上に上昇したものでは治療効果を認めていない。我々の検討でも LH 4 倍以上 FSH 2 倍以上の増加を示す症例では治療効果を認めなかった。一方、Schill¹⁰⁾らは、そのような LH-RH 負荷テストの有用性は認められていと報告している。また、並木⁷⁾らは精巣内の FSH レセプターを測定し、High affinity レセプターを認めた症例では有効率 68%，認められない症例では有効率 7% と、レセプターの有無が hCG-hMG 療法の適応を決定する上で極めて有用であることを報告している。これらの報告および我々の経験より臨床的には、無精子症、高ゴナドトロピン血症を伴う高度乏精子症、LH-RH 負荷テストで高反応を認めるものには適応がないものと考えられる。

hCG, hMG の至適投与量については投与量と治療効果との関係から臨床的に検討された報告が多い。我々はこれらの報告より投与量を、hCG2000IU, hMG150IU と決定した。この投与量が適切なものであるかを知るには、FSH については FSH レセプター測定はあるものの安川³⁾らの言うように、現在のところ臨床的に簡便で客観的な指標はない。しかし、hCG についてはその作用として Lydig 細胞を刺激し、内因性テストステロンを増加させることより¹¹⁾、hCG 負荷下に精細管内のテストステロンを測定することにより検討することができるものとする。以上より、hCG-hMG 療法に関する基礎的検討については、さらに詳細な検討の必要性が示唆される。

結 語

- 1) 男子不妊症 47 症例に対し hCG-hMG 療法を行なった結果、12 週 9.3%，24 週 5.4% の全般改善率を得た。また、2 例 (4.3%) に妊娠の成立を見た。
- 2) 高度乏精子症では治療効果が低く無精子症には治療効果を認めなかった。
- 3) 治療前 LH, FSH 高値例では治療効果が低い傾向であった。
- 4) LH-RH 負荷テストで LH 4 倍以上、FSH 2 倍

以上の増加を示す症例では治療効果を認めなかった。

- 5) 副作用は 1 症例に軽度の女性化乳房を認めたのみであった。

(本論文の要旨は、第 25 回日本不妊学会中国四国支部総会、第 194 回日本泌尿器科学会岡山地方会で発表した。)

文 献

- 1) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis, *Physiol. Rev.*, 51: 1, 1971
- 2) 水谷雅巳, 森山浩之, 三田憲明, 藤原英祐, 山崎彰彦, 米田健二, 相模浩二: 特発性男子不妊症に対する HCG-HMG 併用療法について, *泌尿紀要*, 33: 51, 1987
- 3) 安川明廣, 中原 満, 久米 隆, 室本哲男, 水谷雅巳: 特発性男子不妊症における hCG/hMG 剤の併用について, *泌尿紀要*, 30: 279, 1984
- 4) 羽間 稔, 森殿貞夫, 石神襄次, 熊本悦明, 丸田浩, 大野一典, 志田圭三, 山中英寿, 大島博幸, 根岸壯治, 竹内信一, 今村一男, 吉田英機, 岩動孝一郎, 園田孝夫, 奥山明彦, 酒徳治三郎, 清水芳幸, 川井修一: 特発性男子不妊に対する hMG-hCG 併用療法の臨床評価, *日不妊誌*, 29: 315, 1984
- 5) 奥山明彦, 水谷修太郎: 男子不妊症の治療経験, 第一報: HCG/HMG 剤の併用について, *泌尿紀要*, 26 (5): 563, 1980
- 6) 奥山明彦, 園田孝夫, 水谷修太郎: 男子不妊症の治療経験, 第二報: HCG, HMG 各剤の投与量と妊娠性の予後について, *泌尿紀要*, 27: 355, 1981
- 7) 並木幹夫, 中村正弘, 奥山明彦, 園田孝夫, 土井裕, 松井孝之, 藤末 洋, 竹山政美, 藤岡秀樹, 林 知厚: 特発性男子不妊症に対する hMG-hCG 療法の有効性と精巣 FSH レセプターの相関について, *泌尿紀要*, 34: 957, 1988
- 8) Schill, W. B.: *Infertility Male and Female*: edited by Vaclav Insler and Bruno Lunenfeld, 544, Churchill Livingstone, 1986
- 9) Lunenfeld, B., Olchovsky, D., Tadir, Y. and Glezerman, M.: Treatment of male infertility with human gonadotrophins: Selection of cases, management and results, *Andrologia*, 11: 331, 1979
- 10) Schill, W. B., Jüngst, D., Unterburger, P. and Braun, S.: Combined hMG/hCG treatment in subfertile men with idiopathic normogonadotrophic oligozoospermia, *Int. J. Androl.*, 5: 467, 1982
- 11) 大橋輝久, 入江 伸, 大森弘之, 伊藤昭夫: 精細管内 androgen と精子形成との関係, *ホルモンと臨床*, 34: 1119, 1986

**Clinical evaluation of hCG-hMG
combined therapy in patients
with male infertility.**

Yoshitaka Yamashita, Atsushi Nagai,
Tadashi Oheda, Yoshiteru Kohama,
Teruhisa Ohashi and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology, Okayama University
Medical School, Okayama 700, Japan
(Director: Prof. Hiroyuki Ohmori)

Clinical study of hCG-hMG combined therapy were performed in 47 infertile men. The patients, including 9 with azoospermia, 35 with oligozoospermia and 3 with oligozoospermia after high ligation of internal spermatic vein for left varicocele, were

treated by intramuscular injection with hCG (2000IU) and hMG (150IU) weekly for 12 to 24 weeks. General improvements of the sperm density and the sperm motility were noted in 9.3% at 12 weeks and 5.4% at 24 weeks after the therapy. Pregnancies were achieved in 2 cases (4.3%). There was a little clinical effect in patients with high grade oligozoospermia and elevated plasma gonadotropin levels.

No clinical effect was observed in patients with azoospermia. The response of LH and FSH to LH-RH revealed clinical usefulness on indication for this therapy. Patients who showed over 4-fold response of LH or over 2-fold response of FSH to LH-RH had no clinical efficacy.

There was no severe adverse effect except for mild gynecomastia in one patient.

(受付: 1989 年 11 月 18 日)

地方部会講演抄録

平成元年度 日本不妊学会東北支部総会学術講演会

日 時：平成元年11月4日（土）

会 場：秋田キャッスルホテル

1. 不妊患者におけるクラミジア抗体価測定の意義

武田志保・松井俊彦・加藤充弘
児玉英也・関根和個・真木正博
(秋田大産婦)

当科で施行した腹腔鏡症例88例について、その血清中クラミジアIgG抗体価、IgM抗体価を測定した。腹腔鏡で卵管因子の認められた症例のIgG抗体陽性率は68.2%で、子宮内膜症群で50%、その他の不妊因子群で25%であった。3群間に有意差は認めなかったが、卵管因子や子宮内膜症といった女性の腹腔内に異常のある症例で、抗体陽性率50%以上と高率であった。IgM抗体価とIgG抗体価の間に相関は認められなかった。さらに体外受精症例のクラミジアIgG抗体価を測定したが、抗体陽性群の平均採卵数は7.4個、受精率63.5%、胚移植数3.9個であり、抗体陰性群のそれぞれの成績に比べても減少は認めなかった。抗体陽性群の妊娠率は6例であった。以上よりクラミジア抗体の有無は、採卵卵子のqualityや着床の過程、成立に影響を及ぼさず、体外受精の成績を左右しないと考えられた。

2. 頸管内クラミジア抗原、血清IgG抗体と、腹腔鏡所見との関連について

中谷一夫・木村芳孝

(釜石市民病院産婦)

クラミジア頸管内感染例(Chlamydiazyme: C-zyyme), および同抗体のみを有する例(microimmunofluorescence: MIF)の腹腔鏡所見から、クラミジア感染と不妊との関連の原因について検討を加えた。

C-zyyme陽性例(A群: 8例, 15付属器)とC-zyyme陰性・MIF陽性例(B群: 17例, 34付属器)を感染群とし、C-zyyme陰性・MIF陰性例(12例, 24付属器)を対照群とした。

[結果] (1) A, B両群間にpfa, pta, tubal occlusionの頻度に差はなかったが、感染群では、いずれの所見の頻度も対照群に比べて高い傾向が認めら

れた(n. s.)。 (2) 閉塞の部位には一定の傾向はなかった。

[結論] 抗体のみ陽性例にも、抗原陽性例と同頻度により、かつ対照群よりは高頻度に卵管の異常が発見されることから、クラミジア抗体検査は、潜在する卵管異常の予知の手段として有用と思われる。

3. 子宮内避妊器具装着婦人に見られた放線菌感染

利部輝雄・西谷 巖

(岩手医大産婦)

小林 高 (小林産婦人科)

女性性器の放線菌症は稀な疾患である。放線菌は口腔内、扁桃陰窩、消化管内に常在するが、女性性器には通常見出されない。しかし、1967年以降、IUD装着婦人の放線菌症症例の報告は増加傾向にある。

過去10年間に岩手県内で報告された女性性器放線菌症は2例であり、ともにIUD使用中の婦人であった。IUD装着期間は11年、12年と長期に亘っていたが、2-3年毎に交換が行われていた。両例とも右卵巣卵管の炎症性腫瘍であった。

そこで、IUD装着例の放線菌感染を調査するため、1978年1月から1988年12月までに、岩手医科大学産婦人科および森岡市小林産婦人科をIUD交換を希望して訪れた婦人612例を対象に、IUD装着子宮内膜および診査搔爬により採取された子宮内膜を組織学的に検索し、7例の放線菌感染を発見した。そのなかの2例に放線菌によると考えられる子宮内膜炎を認めたので、その概要を報告する。

4. 子宮外妊娠における卵管保存と反復外妊

渡辺美佳・岡村けい子・永井 宏

(向仁会永井病院)

子宮外妊娠の診断は腹腔鏡検査の導入により、早期に、また、的確に行なわれるようになった。これにより、若年者や挙児希望例に対し、卵管保存手術が可能となってきた。しかし、卵管保存手術は、反復子宮外妊娠を引き起こす可能性があるなど、問題点も指摘されている。今回、当院にて、昭和61年4月より平成元年9月までに経験した卵管妊娠24例について検討を加えた。

腹腔鏡施行例では非施行例に比べ、保存手術可能

例が多く、卵管妊娠の早期診断に腹腔鏡が有効であることを示している。また、保存手術施行 11 例中、反復卵管妊娠となった例が 2 例あり、どちらも保存手術施行例の卵管に発生していた。なお、2 例とも保存手術後の卵管通過性は確認できなかった。

今日、卵管保存手術を施行する事が増加しつつあるが他側卵管が健存する場合、保存手術を行なうか、卵管摘出術を行なうかの選択が問題となる。

5. 血中 LH, progesterone 値と

基礎体温の関係について

菊地順子・高屋りさ・高橋克幸
(国立仙台病院産婦)

黄体期不全；LPD の臨床的診断法としては基礎体温表の判断が一般的であるが、今回、我々は LPD 患者における BBT の上昇と血中 LH, progesterone 値との量的相関を調査した。

対象は当科外来を受診した LPD 患者 31 例であり、コントロール群として健全女性 5 例について検討した。

その結果、LPD 患者群では、黄体期を通じてコントロール群に比べ著しく低い progesterone 値を示し、LH 値は 2 グループ間で著しい差は認められなかった。BBT との関連においては、LPD 患者において、黄体初期を除く中期以降で progesterone と BBT の上昇との間に直線的な相関性が認められた。一方、LH 値は、初期に BBT と逆相関し、中期以降には相関性が認められなかった。以上より、LPD 患者において、BBT の上昇は黄体初期には LH の影響を受け、中期以降は progesterone の分泌を反映するものと思われる。

6. 子宮内膜症に対する LH-RH アゴニストと ダナゾールの併用療法

戸澤秀夫・大井嗣和・萬代泰男
深谷孝夫・星合 晃・矢嶋 聡
(東北大産婦)

7 名の子宮内膜症患者に対して LH-RH アゴニストデポーとダナゾールの併用療法を試み、治療中の血中ホルモン動態等について検討した。併用療法中の血中エストラジオールの抑制についてデポー剤単独療法の場合と比較すると、抑制の程度が弱い傾向が認められたが、これは併用療法におけるデポー剤投与量が少ないことによると思われる。LH-RH アゴニストデポー投与の初期にはエストラジオールの一過性上昇が見られるが、ダナゾールを 4 週前から投与すると、この上昇は抑制された。血管運動症状な

どの更年期類似症状はデポー剤単独の場合に比べて少ない傾向であったが、これは前述のエストラジオール動態と関連していると考えられる。ステロイド性の副作用はダナゾールを単独で用いた場合と同程度に認められた。血中ゴナドトロピンの抑制についてはデポー剤単独投与の場合とほぼ同様であった。腹腔鏡による治療効果の評価では従来の治療法と同等と思われた。

7. RU486 のラットの妊娠中絶および

分娩誘起に及ぼす効果

梅津元昭・石井伸一・相沢弘章
宮野博明・川田建二・正木淳二
(東北大農学部家畜繁殖学研究室)

RU486 はフランスで開発された合成ステロイドで、子宮のプロゲステロン (P) レセプターに強く結合し、妊娠中絶および分娩誘起効果を持つことが知られている。中絶効果 (ラット) については本誌ですでに報告したが、今回は RU486 による中絶と回復過程についての観察および分娩誘起効果について検討した。

(方法) ゴマ油に溶かした RU486 (5 mg/kg bw) を妊娠 18 日齢のラットに単一皮下注射し、その後の中絶状態、子宮重量、血中 P 値、LH 値の変化を自然分娩のものと比較した。また、同量の RU486 を妊娠 20 日 (17:00)、21 日 (10:00) に注射し、分娩誘起効果を調べた。

(結果) 妊娠 18 日処理では、すべて 19 日で中絶し、子宮重量、血中 P 値も有意な減少を示していた。

中絶後の子宮の回復状態は自然分娩後のそれと変化がなかった。20 日齢ラット (5 例) では、分娩は誘起されたが、全て間もなく新生子は死亡し、21 日齢処理では 4 / 5 例で 22 日の 17:00 頃に分娩が誘起され全て新生子は哺育された。

8. マウス 2 細胞期胚の凍結保存における

細胞障害と生存率

渡辺清彦・鳴瀬 淑・佐々木宏子
星 和彦・佐藤 章
(福島大産婦)

体外受精・胚移植法の普及により受精卵および未受精卵の凍結保存が新たな検討課題となっており、我々はより安全で効率のよい凍結保存・融解法を確立するため基礎的研究を進めている。今回、マウス受精卵 2 細胞期胚の凍結・融解時の細胞障害の程度と生存率に差がどの程度あるのかを検討したので報告する。

凍結剤、希釈剤を問わず、2 cell intact の場合が 1 cell intact の場合に比し有意の高生存率を認めた。耐凍剤・希釈剤間に生存率の差は認められなかった。

凍結媒液としては、できる限り 2 cell intact の数の多いものが適しており、また 1 cell intact でも 2 cell intact に比べ、1/2～1/3 程度の生存率ではあるが、移植に供し得るものと思われた。

9. 無血清培地での牛顆粒膜細胞の増殖と 体外成熟卵子の体外発生成

高木優二・富沢宗高・松本浩道
菅原七郎・正木淳二
(東北大学農学部家畜繁殖学教室)

目的：演者らは、無血清培地で牛卵胞卵子を体外成熟・体外受精および体外発生で胚盤期まで発生することを初めて報告した(日畜 82 回大会)。しかし、その発生率は血清添加培地に比べ著しく低かった(15% vs 1%)。本研究では、その原因を解明するために、顆粒膜細胞の増殖と胚の発生能との関係について検討した。

方法：体外成熟・受精・発生は、前報告に準じて行なった。また、顆粒膜細胞は、collagen 処理あるいは未処理の 24 穴マルチプレートに 1×10^4 /well になるように播種し、5 日間培養を行なった。用いた培養液は、TCM199 に FCS を① 10%、② 5%、③ 0% および④ FSA (3 mg/ml) なるように添加した。また、insulin, EGF, transferrin を⑤ TCM199 および⑥ RITC807 に添加した。

結果：共培養する細胞の増殖が良い条件で卵子を培養した試験区で、分割率および発生率が高かった。以上のことより、共培養する細胞の増殖が卵子および胚の発生に影響を与えていることが示された。

10. 経腔採卵後に急性腹症を発症した 2 例

古橋信之・河野秀昭・田村みどり
高山和人・渡辺英子 (太田西ノ内病院)
幸野良一 (臨床検査科)
伊藤 潔 (東北大産婦)

1988 年 10 月より IVF-ET を開始し 60 周期に施行した。経腔採卵した 58 周期中、全麻を主とした SERIES-1；では 16 周期中 2 周期、外来レベルの採卵を主とした SERIES-2；では 24 周期中 2 周期、今回の症例を経験した後変更した SERIES-3；では 20 周期中 4 周期に妊娠を認めた。SERIES-2；の内 2 例に術後 23 日目、37 日目に急性腹症 (PID) を生じ開

腹を要した。2 例ともトップ社製 30 cm, long venula を使用し、症例-1 では無麻酔、症例-2 では局麻であった。また 2 症例とも子宮内膜症例(症例-1, r-AFS 3 期、症例-2, 4 期)を認め、採卵は疼痛のため、やや困難であった。採卵後 2 日間、経口抗生剤を投与したが、両例とも卵巣血腫、膿瘍を来し、片側付属器の摘出を要した。

以上超音波下といえども経腔採卵は非直視下の操作であり、血腫、感染に対して十分な配慮が必要と思われた。

11. 胚発育不良周期に関連する因子について

児玉英也・加藤充弘・関根和子
松井俊彦・真木正博
(秋田大産婦)

体外受精の予後は、移植する胚の形態学によく反映されると考えられている。当科における体外受精胚移植においては、移植胚の中に fragmentation がほとんど認められず、均等な分割を示した良好胚が存在した場合の妊娠率は、26/64 (40.6%)、最も良好な胚移植においても fragmentation が認められるが、それが細胞質の 1/4 以下である場合の妊娠率は 5/22 (22.7%)、すべての移植胚に細胞質の 1/4 以上の fragmentation が認められた胚発育不良周期の妊娠率は 0/15 (0%) であった。

胚発育不良周期の発生要因として、卵巣の反応性、採卵の卵子の quality、卵胞期後期のホルモン動態(特に血中 HL について)、growth medium 中の endotoxin の量について比較検討したが、明らかな原因は見いだされなかった。胚発育不良周期は、同一患者に反復して認められる傾向があること、男性不妊の患者に少ない傾向が認められ、特定の夫婦に特異的な何らかの要因が関与しているとも考えられる。

12. 前核期胚の子宮内移植の試み

椎名有二・小池数与・斉藤隆和
沼崎政良・佐藤文彦・斉藤英和
広井正彦 (山形大産婦)

体外受精・胚移植において、胚移植の時期に関して種々の検討がなされている。一つは生理的に胚が卵管から子宮に移行してくる桑実期や胞胚期に胚移植を試みようとする方法と、体外で長く培養すると培養条件が全く体内と同じ程度に良好ではないので、胚に何らかの障害を与えるとの考えより、できるだけ短時間のみ体外で培養する方法との 2 通りの考えがある。

今回我々は従来よりは短時間の体外培養である前

核期胚移植を試みた。216 胚の移植を従来の採卵後 2 日目に行なうと、29 胚が着床 (13%)、9 胚 (31%) が流産し、20 胚 (9%) が妊娠継続した。132 胚に前核期移植し、18 胚 (14%) に着床、3 胚 (17%) が流産、15 胚 (11%) が妊娠継続した。これを周期別でみると、従来の方法 104 周期中 23 周期 (22%) に着床、9 周期 (39%) 流産、14 周期 (14%) 妊娠継続であり、前核期移植では 60 周期中 14 (23%) に着床、2 (14%) 流産、12 (20%) 妊娠継続し、前核期移植の方が勝れていた。

13. 胚移植後の安静の必要性の検討

斉藤英和・椎名有二・小池数与
 斉藤隆和・沼崎政良・佐藤文彦
 広井正彦 (山形大産婦)

体外受精・胚移植では成績向上のため種々の手法が考えられている。胚移植後の安静についても各施設においてまちまちであり、長い例では胚移植後 1 晩という施設もある。今回我々は当科で従来施行されている胚移植後 2 時間ベット上安静法と比較して胚移植後直ちに歩行開始法を考え、この両者による安静度の必要性について検討した。

個々の胚あたりの成績では、安静あり群では 132 胚を胚移植し 18 胚 (14%) が着床し、3 胚 (17%) が流産、15 胚 (11%) が妊娠継続した。これに対して安静なし群では 129 胚を胚移植し、14 胚 (11%) が着床し、5 胚 (36%) が流産し、9 胚 (7%) が妊娠継続した。また周期あたりの成績では、安静あり群で 60 周期に胚移植し、14 周期 (23%) に着床し、2 周期 (14%) に流産し、12 周期 (20%) が妊娠継続した。安静なし群で 61 周期に胚移植し、14 周期 (23%) に着床し、5 周期 (36%) に流産し、9 周期 (15%) が妊娠継続した。安静群の法が妊娠継続例が多いが、有意の差ではなかった。

14. PENETRAK よる精子運動性と受精能

古橋信之・河野秀昭・田村みどり
 高山和人・渡辺英子
 (太田綜合病院太田西ノ内病院産婦)
 幸野良一・高久田美江
 (臨床検査科)
 伊藤 潔 (東北大産婦)

精子の妊孕性に対する臨床的な評価については不明な点が多い。今回我々は牛頸管粘液を用いた PENETRAK を IVF-ET 患者精子に施行し、受精との関係を検討した。IVF-ET の第 1 適応として、男性因子のもの 10 例、卵管 6 例、原因不明 2 例、子宮内

膜症 1 例の計 19 例で、媒精の後、1 個でも卵の分割を認めたものを受精群、分割を認めなかったものを非受精群とした。

受精群は 11 例、非受精群は 8 例で PENETRAK 値は受精群で 41.0 mm、非受精群で 30.1 mm であり、若干の差は認めたが、統計的には有意の差は認めなかった。

種々の精液検査の中で有意の差を認めたものは、HOST のみで 17.6% と 9.6% であった。しかし今回の症例の中で妊娠例に対する検討では、精子濃度、PENETRAK、HOST の値に差が認められた。また今回の data では卵の成熟度に対する検討をしていないため、必ずしも適切な精子の評価を出すことはできないが、少なくとも PENETRAK 値で 30 mm 以上あれば受精能がある可能性が示唆された。

15. 男性不妊患者の精子の形態学的異常と受精能力

○松井俊彦・児玉英也・加藤充弘
 関根和子・真木正博
 (秋田大産婦)

〔目的〕男性不妊患者の精子形態の詳細な分析が、体外受精における受精能予測の parameter となりうるかについて検討する。

〔方法〕体外受精症例のうち男性因子適応症例 24 例 (受精成立群 9 例、不能群 15 例) を対象とし、それぞれの精子形態を Papanicolaou 染色による顕微鏡的所見、および一部透過電顕所見で分析した。抗精子抗体の保有例は除外した。顕微鏡的に精子奇形の形態学的分類を行ない、頭部と頸部の異常・未分化細胞について精子 100 個当りの各異常の出現率を受精の有無別に算定した。

〔成績〕顕微鏡的に重度奇形の出現率が受精成立群では、すべて 50% 以下なのに対し、不能群では 2 例を除き 40% 以上であった。未分化細胞が 100 精子当り 8 個以上出現した症例では、受精例を認めなかった。精子濃度、運動率が正常の精子でも、顕微鏡的に高頻度に異常が認められる症例が存在した。

〔結論〕電顕を含めた精子の形態学的検討により、受精の限界を予測するのは可能と思われた。

16. 微量培養環境における体外受精の検討

鳴瀬 淑・星 和彦・吉松宣弘
 会田都美子・佐藤 章
 (福島医大産婦)

IVF-ET の成績は飛躍的に向上しているが、依然として重症乏精子症での成績は不良である。微量培養

環境における体外受精は、極端に少ない精子数でも卵子と精子との接触の機会を増やすことが可能であり、重症乏精子症や重症精子無力症に対して有効な方法と思われ、我々は新しい微少培養環境法を検討した。

方法；ペニューラ注射針外筒を培養器として用い0.01~0.02 mlの培養液を入れてハムスターテストを行ない、ペトリ皿を用いた従来法（培養液0.3 ml）と比較した。さらにIVF-ETにも応用した。

成績；必要精子数をハムスターテストで1/15~30, IVF-ETでは2/50~100に減らすことが出来た。ハムスターテストの成績は、精子侵入率89.1%, 平均精子侵入数3.14で、従来法の71.4%, 2.49を上回っていた。IVF-ETにおける本法での受精率は80%で良好であった。

考察；今回検討した微少環境培養法は基礎的検討でも臨床応用も従来法と比べ良好な成績を示し、利用すべき方法と考えられた。

シンポジウム

「精子の機能評価とその治療」

座長 平野睦男

I 精子の機能評価へのアプローチ

1. 抗精子抗体（自己抗体）からみた精子の機能評価

加藤充弘（秋田大産婦）

男性側抗精子抗体（自己抗体）生物作用である、精子不動化、精子凝集、受精障害作用について immunobead test を用いて抗体の精子への結合様式を検討し、精子の機能の評価してみた。精子不動化作用発現において精子尾部への抗体の結合は重要と考えられた。また、十分な量の抗体が結合している場合には、精子不動化、精子凝集両方の生物作用が発現すると考えられた。これら2つの作用は精液所見とは関連性を認めず、妊娠の予後は共に不良であった。

体外受精施行101組の検討の結果、自己抗体陽性者14例の中で6例に受精率の低下（成熟卵子の受精率が50%未満）が認められた。受精障害は、IgAとIgG抗体の結合がある場合に顕著であると考えられた。受精成立13例の胚移植後6例に妊娠が成立し、受精卵の分割や着床に関しては抗体の影響は少ないと考えられた。

以上より、それぞれの生物作用は抗体の結合様式の違いから異なって発現してくると考えられた。

2. 先体酵素活性からみた精子の機能評価

長谷川剛志（山形県立河北病院産婦）

先体酵素は受精に不可欠であり精子機能評価上も重要と思われる。今回、acrosin proteolytic activity (APA) および hyaluronidase activity (AH) を測定しうる gelatin substrate slide test および hyaluronic acid substrate slide test を開発し、臨床的検討を加えた。

(1) ヒト体外受精における受精率、卵分割率と APA の相関の検討では、APA が低いと受精率、卵分割率も低値をとり、このことより APA は精子機能評価の1つの指標となりうる事が示唆された。

(2) 男性不妊患者58名の精子濃度、運動率と APA, HA の比較検討では、精子濃度が低い程 APA, HA は低値を示し、 20×10^6 /ml 未満群が最も低値を示した。運動率も低い程 APA, HA は低値を示し40%未満群が最も低値を示した。以上より乏精子症、精子無力症では APA, HA 共に有意に低下していることが示唆された。

(3) APA と HA との相関では、両者間に高い正の相関がみられ、このことより、ある先体酵素活性が障害されている精子では他の先体酵素活性も同程度に障害されている可能性が示唆された。

3. 運動パターン（hyperactivation）

からみた精子の機能評価

月川 奏（福島医大産婦）

受精に対する精子側の条件としては Capacitation, Acrosome reaction, Motility の3つが必要である。培養液中における精子の尾部の動きを顕微ハイスピードビデオを用いて録画し、再生画像の分析より4タイプに分類し、その中でも尾部全体を波をうつようにダイナミックに動き速度も速いタイプDへの変化をヒト精子の hyperactivation ととらえ、これが受精に深く関与している。また培養液に移してから5時間位のタイプDの割合が30%以上を示す事が受精に必要なこともわかった。しかし特殊装置が必要であり外来臨床応用には問題な点もある。そこでウシ頸管粘液を用いたヒト精子の頸管粘液貫通テストである PENETRAX を用いて、精液分析法の各パラメーターとの相関を調べてみたが、hyperactivation と強い相関を示すことがわかり、十分代用可能な事もわかった。次に培養液に含まれている電解質が精子の motility に影響するかどうかの実験を行ない、 Ca^{++} は motility を低下させ Mg^{++} , K^{+} はほとんど影響しないことがわかった。

4. ハムスターテストおよび

その関連手技からみた精子の機能評価

深谷孝夫 (東北大産婦)

精子の評価法としては、一般的に数・運動率・奇形率などが用いられている。しかし、体外受精法の臨床応用により、従来の検査法による精子の評価と、実際の受精現象が必ずしも一致せず、受精とより密接に関連する精子機能評価法が検討されてきた。

今回、精子受精能と関連を有するハムスター試験ならびに先体反応・精子膨化試験・ペネトラックなどの機能評価を施行し、これらの成績と従来の検査法との関連性を検討した。

精子濃度・運動率別に検討した精子機能評価成績では、平均値において関連性が認められたが、測定値の範囲が大きく従来の検査成績で受精能を予測することは困難であった。実際の受精と各種機能評価の関連においても同様で、平均値では関連性があるものの、個々の症例を検討すると必ずしも一致しない。従って、治療方針を決める際には種々の評価法を総合的に判断し、人工授精あるいは体外受精等を考慮すべきであると推測された。

5. 精子形態からみた精子の機能評価

佐藤和宏 (東北大産婦)

精子尾部の構造と精子運動性について述べた。まず精子尾部の基本的構造と運動機構についてふれた。次に正常人 10 名について 1 例平均 65 個の精子を電顕的に検討した結果について述べた。精子尾部の主な構造異常は、双微細管の欠損、過剰および中心微細管の欠損であり、その割合は 19.5~39.5%，平均 28.9% にみられた。精子無力症者(精子運動能指数: SMEI<30)27 名の精子の微細構造を検討した。その結果 11 例は、短尾、多尾精子症、ダイニン腕の欠損、中間部の欠損や異常伸長、軸糸の欠損等の特異的構造異常であり、14 例は正常人でも見られたような構造異常の割合が高い、いわば非特異的構造異常であった。前者は先天性、後者は後天的要因が原因と推定されたが、更に検討を要する。後者の内、膿精液症の例に運動性減弱がみられる原因について、液性因子、構造因子両面から検討した結果を報告した。

II. 精子の機能異常に対する治療

1. 薬物療法を主体とした集約的治療

太田博孝 (秋田組合総合病院産婦)

男性不妊症の大多数を占める構造機能低下症の治療は難しい。我々は本症に有効とされる種々の薬剤

を用い、精液所見、ステロイド分泌への効果を、さらに体外受精時の受精率に与える効果も検討した。使用した薬剤は八味地黄丸(HJ)、補中益気湯(HE)、芍薬甘草湯(SK)、牛車腎気丸(GZ)、プロモクリプチン(BC)である。

精液所見のうち精子濃度に対しては $GZ > HJ > SK, BC > HE$ の順に、精子運動率に対しては $BC > SK > HE > HJ$, GZ の順に有効であった。さらに高度造精機能低下症(運動率 20%未満かつ総運動精子数 2×10^6 未満)の 4 症例(6 周期)で IVF-ER, PROST 施行時の受精率を検討した。卵子あたりの受精率、分割率はそれぞれ $24/39$ (61.5%), $5/7$ (71%) であった。

以上より、造精機能低下症に対する薬物療法は極めて有効で、病態に応じた薬剤選択の重要性が示唆された。

2. Microfertilization

斉藤英和 (山形大産婦)

体外受精・胚移植は不妊症の治療法として重要な位置を占めており、卵管性不妊、男性因子による不妊、免疫性不妊、長期原因不明不妊等に臨床応用されているが、男性因子の原因による不妊に対する体外受精・胚移植の成績は、他の因子に比較して低い。特に重症の精子減少症や精子無力症の症例では受精さえしない場合が多い。

今回、以前 1 回以上体外受精を施行したが、1 個の卵も受精しなかった症例に対して顕微受精を試みた。Zona opening 法では 20 個の卵に試み 1 個が受精した。Zong drilling 法には 15 個の卵を用い 13 個に受精を認めたが、2 前核であったのは 1 個であった。囲卵腔内精子注入法では 60 個中 10 個に受精を認め、すべて 2 前核であった。卵細胞質内精子注入法では 3 個の卵を使用し、うち 1 個に 2 前核形成を認めた。

これより、顕微受精は通常の体外受精の媒精法にて受精しない重症の男性因子でも受精を認め、臨床応用への可能性が示された。

地方部会講演抄録

第34回 日本不妊学会九州支部総会

日 時：平成元年11月12日（日）
会 場：パシフィックホテル沖縄

1. 先天性腔欠損症に対するS状結腸法と遊離皮膚弁移植法との比較

谷口洋三・内海善夫・池田景子
和泉秀隆・窪田孝明・白川光一
(福岡大産婦)
神代龍之介 (同外科II)
大慈彌裕之 (同薬理)

Rokitansky-Hauser-Küstner syndrome とは胎生期における Müller 管の発育分化異常を原因とする先天性腔欠損症である。本症候群では乳房や外陰部の発育、発毛などは正常であるため、思春期後期に原発性無月経を訴えて受診し、確診されることが多い。

その治療法としては人工造腔術による性交能の賦与に尽きるといって過言ではない。その術式としては数種類のものがあるが、種々の面からみて長短がある。我々は最近経験した2症例において、第1例にはS状結腸法を、第2例には遊離皮膚弁移植法を施行し、両術式の比較を行なう機会を得たので報告する。

前者は手術侵襲が大であり、腹部に大きい瘢痕を残し、後者は新腔の狭小化を来たしやすいために長期間にわたるプロテーゼ挿入が必要であるなどが挙げられる。したがって術式の選択にあたっては、外陰部の所見や患者の置かれている社会的状況等々、種々の要素を考慮のうえ、慎重に決定されるべきである。

2. 子宮外妊娠例における血中クラミジア抗体の測定

土岐一宏 (新日鉄八幡病院)
佐野正敏・松口博之・渡辺良嗣
角沖久夫・中村元一・中野仁雄
(九州大産婦)

(目的) クラミジア (*Chlamydia trachomatis*) は性行為感染症の病原体のひとつであり、子宮頸部や内膜および卵管等から検出されるが、細胞内寄生性病原体であることから診断のためのクラミジア抗原の

検出が難しい。今回、我々は、*C. trachomatis* L₂株を用いた間接蛍光抗体法により、患者血清中のクラミジアに特異的な Immunoglobulin G, M および A 抗体を測定し、子宮外妊娠例と子宮内妊娠例の血中抗体価を比較検討した。

(結果) 対象は昭和63年11月から平成元年7月までに当科で治療した卵管妊娠例のうち、抗体価を測定できた21例および当科で検診中の妊婦より無作為に抽出した38例であった。血中クラミジア抗体は卵管妊娠21例中15例(71%)および対照妊婦38例中17例(45%)に検出され、子宮外妊娠群との間で有意差 ($p < 0.05$) があった。また、抗体陽性症例におけるクラミジア特異 IgG 抗体価は子宮外妊娠群においてより高値であった。

(考察) 女性生殖器におけるクラミジア感染症は卵管炎や骨盤腹膜炎を併発するが、今回の結果から、クラミジアによる卵管の障害が卵管妊娠の原因のひとつであった可能性が考えられる。

3. 妊娠早期における経腔プローブによる超音波画像診断の有用性

—特に妊娠診断薬との関連性において—

本村 聡・平井ひろみ・岩永成晃
畑瀬哲郎・薬師寺道明
(久留米大産婦)

妊娠の診断において従来より尿中 hCG の半定量法に加え経腹的超音波断層法が用いられてきた。近年、経腔プローブ (transvaginal probe, TV プローブ) の開発に伴い、より近から、また異なる角度より骨盤内の臓器にアプローチが可能となり、妊娠初期の正常妊娠、および異常妊娠像がとらえられるようになってきた。

我々は、1988年7月より SONOVISTA-SL MODEL MEU-1557 (持田) に経腔プローブを装着し外来診療に活用している。そこで本装置を用いて当科不妊外来患者における妊娠成功例の GS, CRL 出現の時期、FHB 確認の時期等の検討を行なった。更に市販の各種妊娠診断薬を用いて行なった hCG 半定量値との関連性、および異常妊娠 (子宮外妊娠) となった症例における超音波像も併せて検討し、経腔プローブによる超音波画像診断の長所、欠点およびその限界について報告したい。

4. 加齢がヒト卵管上皮細胞培養に及ぼす影響

沖 利通・竹内一浩・山元慎一
森 明人・堂地 勉・永田行博
(鹿児島大産婦)

(目的) 近年, 着床・妊娠における卵管の役割が重要視され, 我々は既に有経婦人における卵管上皮細胞の培養を確立し, 報告してきた。今回, 閉経婦人における卵管上皮細胞の培養も行ない, 加齢が卵管上皮細胞に及ぼす影響を検討した。

(方法) 患者の同意のもとに, 手術時無菌的に卵管を採取し, collagenase 処理後, 卵管上皮細胞浮遊液を調整し Medium-199 (10 % FCS) で培養した。培養後 7 日目位に位相差顕微鏡下で細胞数を測定した。

(成績) 培養後 7 日目で細胞の存する割合は, 20~30 歳・40~50 歳・60 歳以上でそれぞれ, $5/9$ (55.6 %)・ $5/10$ (50.0 %)・ $3/3$ (100 %) であり, 一方, confluent な状態になる割合は, 20~30 歳・40~50 歳・60 歳以上でそれぞれ, $3/9$ (33.3 %)・ $1/10$ (10.0 %)・ $0/3$ (0 %) であった。以上より, 卵管上皮細胞の培養において培養細胞の生着自体に加齢は影響しないが, 培養細胞の増殖には卵管採取時の年齢が強く関与することが示唆された。

5. 排卵側卵巣に関する検討

布施正樹・岡本純英・石丸忠之
山辺 徹 (長崎大産婦)

従来より, ヒトにおける排卵は左右の卵巣より交互に起こるとされていたが, 最近では, 超音波断層法 (US) による検討から, 異論が出されている。そこで, 自然排卵周期および人工排卵周期における排卵側卵巣について US を用いて検討した。

(対照と方法) AIH を施行した 29 例を I 群; 自然排卵周期 14 例 (56 周期) および II 群; クロミフェンによる排卵周期 15 例 (72 周期) に分けて検討した。排卵側卵巣の測定は, 尿中 LH 値と US による卵胞の発育と消失を確認することにより行なった。

(結果) I 群では, 56 周期のうち 21 周期は右側卵巣, 35 周期は左側卵巣からの排卵で, II 群では 72 周期のうち 43 周期は右側, 29 周期は左側卵巣からであった。また同側より連続して排卵していたのは, I 群 4 例 (19 周期) および II 群 5 例 (17 周期) であった。

6. 早発卵巣不全患者における内分泌学的および免疫学的検討

小池弘幸・金子政時・野田俊一
渡辺裕之・内村利博・森 憲正
(宮崎医大産婦)
宮川勇生 (大分医大産婦)

早発卵巣不全 (Premature ovarian failure: POF) は, 40 歳以前に月経が閉止してしまう状態で, 内分泌学的には hypergonadotropic hypogonadism で表現される続発無月経である。また, 1967 年に Irvine らが Addison 病患者の POF を報告して以来, 少なくとも本症の一部が自己免疫疾患と関連性があることが次第に明らかになってきた。治療面では, estrogen-progesterone cyclic therapy (EPCT) の他に, LH-RH analogue を用いて排卵・妊娠に成功したとの報告もみられるようになり, 我々も 1988 年, EPCT で妊娠に成功した 2 症例を報告した。

今回, 昭和 52 年 10 月より昭和 63 年 9 月までの過去 11 年間に当科内分泌外来を受診した患者のうち, 40 歳以前に続発無月経を来とし内分泌学的成績が hypergonadotropic hypogonadism を示した POF 患者 18 名を対象とした。内分泌学的診断基準として血中 FSH > 40 mIU/ml, 血中 LH > 60 mIU/ml を hypergonadotropic とした。その成績に考察を加えて報告する。

7. GnRH agonist 療法が有効であった 原発性卵巣不全 (POF) の 2 症例

角沖久夫・中村元一・松口博之
佐野正敏・中野仁雄
(九州大産婦)

hypergonadotropic hypogonadism, いわゆる原発性卵巣不全 (POF) における排卵誘発は困難で, hMG-hCG 療法にも反応しにくく, 稀に Kaufmann 療法が有効なことがある。我々は POF と思われる 2 例に対して, 内因性 gonadotropin を押さえる目的で GnRH agonist (buserelin) を使用し, 排卵誘発に成功したので報告する。

症例は 33 歳と 29 歳の原発不妊患者で, 無月経 II 度, 治療前の血中 LH, FSH は共に高値を示し, E_2 は低値であった。同症例に対し消退出血後 buserelin 900 μ g/day を 3~4 週間投与したところ, 前者では, 血中 LH, FSH の低下と共に E_2 の上昇が見られ, 超音波上も卵胞の成熟が確認された。卵胞径 20 mm にて hCG 10,000 単位筋注により排卵誘発に成功した。また後者では, buserelin と共に hMG を少量併用する

ことにより排卵に至った。

従来、POF に対する GnRH agonist 療法の報告は少なく、その有効性ならびに作用機序について考察を加えたい。

8. 子宮筋腫に対する Zoladex の効果の検討

飯尾一登・堂地 勉・永田行博
(鹿児島大産婦)

Gn-RH analogue はその強力な E_2 抑制作用によりエストロゲン依存性の子宮筋腫への有用性が報告されている。今回我々は新しい Gn-RH analogue のデポー剤 Zoladex を子宮筋腫患者に投与し、その結果を検討したので報告する。

対象は32歳から55歳までの子宮筋腫患者で、3.6 mg投与群5例、7.2 mg投与群4例の9例である。それぞれ4週毎に腹部に皮下投与し、投与期間は6カ月とした。

投与中血中 E_2 は3.6 mg群、7.2 mg群とも4週目には完全に抑制され、去勢レベル以下まで低下した。また血中 DHEA-S, T_4 , Prolactin, GH は投与期間中変化がなく、Zoladex が下垂体-卵巣系を選択的に抑制することがわかった。子宮の大きさは、投与後16週で3.6 mg群で平均42.8%, 7.2 mg群で55.2%にまで縮小、24週ではそれぞれ30.3%, 46.1%にまで縮小したが両群間に有意差はなかった。

以上より新しい Gn-RH analogue である Zoladex は3.6 mg投与により子宮筋腫の治療に有効であることがわかった。

9. Gn-RH analog を応用した治療困難な

機能性子宮出血の2例

江上りか・中村元一・松口博之
佐野正敏・中野仁雄

(九州大産婦)

高田大陸・浜崎康夫

(三信会原病院産婦)

機能性子宮出血の治療には性 steroid の投与が一般的であるが、無効であったり、合併症等のため使用禁忌のことがある。我々はこのような症例に Gn-RH analog を応用したので報告する。

(症例1) 35歳G4P0僧帽弁狭窄症にて warfarin による抗凝固療法中。僧帽弁交連切開術予定なるも、繰り返す機能性出血のため貧血となる。danazol を投与するも強度の湿疹で中止。

(症例2) 23歳G0P0慢性腎不全で透析中。機能性出血のため輸血を繰り返す。混合ホルモン剤 danazol にてコントロール可能であったが肝障害にて中止。

排卵誘発も成功せず。

上記2症例に対して、buserelin 1日90 μ g を点鼻投与した。一過性の gonadotropin 上昇によると思われる少量の出血はあったが、以後投与中、出血は認められなかった。Gn-RH analog は下垂体抑制による低 estrogen 状態により子宮内膜の萎縮を引き起こすと考えられ、機能性子宮出血の治療に対しても有用性が高いと考えられた。

10. IVF-ET における GnRH analogue を

用いた卵巣刺激法の検討

佐久本哲郎・山城一也・新崎盛雄
前浜俊之・佐久川政男・東 政弘
中山道男 (琉球大産婦)

近年 IVF-ET における卵巣刺激の方法として GnRH analogue (GnRHa) をゴナドトロピン療法に併用して妊娠率が上昇したとの報告がある。しかしながら GnRHa の用法には種々あり、どの方法が効果的かは十分解明されていない。今回我々は GnRHa の使用開始時期について2種類の卵巣刺激法を行ない比較検討した。

対象は IVF-ET を施行した39例40周期である。GnRHa (ブセレリン) は1200 mg/日投与した。GnRHa を月経初日から7日目まで投与した群(A群)と前周期の黄体中期から7日目まで投与した群(B群)にわけて検討した。また両群とも hMG を月経周期3日目から連日投与し、平均卵胞径が18 mm以上の卵胞が2個以上認めた時 hCG に切り換えて採卵した。A群とB群における採卵数はそれぞれ 1.7 ± 0.5 個、 4.3 ± 1.0 個、受精卵数は 1.3 ± 0.3 個、 3.1 ± 0.8 個、妊娠数は1例(5%), 5例(25%)といずれもB群で有意に高かった。以上より GnRHa は前周期の黄体中期から用いるのがより効果的と思われる。

11. 体外受精・胚移植の際の卵巣刺激法に関

する1考察

—Buserelin 投与による卵胞の嚢胞化について—

岡本純英・黄 宏駿・出口博隆
河野雅洋・山下隆則・山口敦巳
布施正樹・重松 潤・梶村秀雄
石丸忠之・山邊 徹

(長崎大産婦)

最近、体外受精・胚移植において内因性 LH rise の抑制を目的とした Buserelin の応用が検討されている。しかしながら、Buserelin によって卵胞の嚢胞化を認め、かえって Buserelin を用いない HMG HCG

法で良好な採卵結果と妊娠の成立をみた例を経験した。

35歳の卵管閉塞症の婦人で、第1治療周期はBuserelin HMG HCG法を行なったが、Buserelin投与後、estrogen下降が遷延し、卵胞嚢胞を認めた。

HMG投与により3個の卵胞を穿刺し2個の卵を得て、1個の4分割胚を移植したが妊娠しなかった。第2治療周期もBuserelin投与により卵胞嚢胞が出現したため治療を中止した。第3治療周期はHMG HCG法に変更したところ、7個の卵胞を穿刺でき4個の卵を得て、4個とも4分割胚に達し、3個の胚を移植して単胎妊娠が成立した。

症例によっては、Buserelin投与で卵胞嚢胞を形成することがあり、適切な刺激法の選択が必要である。

12. 当院における体外受精-胚移植の成績

田中 温・戸枝通保・田中威づみ
吉田一郎・田中壮介
(田中産婦人科医院)

1989年4月より8月までの間の当院における体外受精-胚移植の成績について報告する。排卵誘発はGnRH analogues(黄体期または月経初日より)900 $\mu\text{g}/\text{day}$ +HMG 150単位(月経7日目または15日目より)を連日投与、血清 E_2 値が上昇傾向を示し、主席卵胞の直径が20~22mmの時点でHCG 6000単位を投与、その37~38時間後に経腔的に採卵した。妊娠率は対周期当たり38%(24/63)、対ET当たり46%(24/52)であった。平均採卵数は6.5個であり、分割率は72%であった。流産率は25%(6/24)、子宮外妊娠発生率は8%(2/24)、多胎妊娠発生率は17%(4/24)で、双胎が2例、品胎が2例認められた。症例は両側卵管閉塞またはGIFT不可能な両側卵管周囲癒着例を対象とした。採卵時の麻酔はケタールまたは無麻酔で行ない、ETは子宮の位置により胸膝位または背臥位とした。ET後の安静は3~5時間とした。採卵およびETは外来ベースで行なった。

13. IVF-ET周期に舌下神経麻痺様症状を呈した1例

古木 義弘・松浦講平・本田賀裕
山本勢津子・西村宏祐・松井幹夫
岡村 均 (熊本大産婦)

IVF-ET目的で行なった過排卵刺激によりOHSSを発症し、舌下神経麻痺様症状を呈した例を経験したので報告する。

症例は29歳で、両側卵管閉塞を適応として、月経

周期2日目より、ブセレリン900 $\mu\text{g}/\text{日}$ を併用してhMG hCGによる過排卵刺激を行なった。hMGは1050 IU投与後、hCGに切り替え、超音波下に経腔採卵を行なった。採卵数14個のうち4個の受精卵のETを行なった。ET後2日目より腹部膨満感と腹水が認められ、ET後5日目に腹水2,200 mlを吸引した。出血・凝固系検査は正常範囲内であった。ET後6日目の夕方に突然、構音障害と舌の運動障害が出現したが、MRIでは軽度の脳浮腫と右側頭葉にhigh intensity lesionを認めたものの神経症状(舌下神経麻痺)と一致する異常所見ではなかった。ET後9日目にはこの神経症状も自然消失した。卵巣直径は全経過を通じて10 cm以下であった。PG合成阻害剤・抗ヒスタミン製剤の投与により、OHSSの症状は改善されたが、ET後15日目に月経が発来した。

14. 現在までのGIFTの成績

戸枝通保・田中 温・田中威づみ
吉田一郎・田中壮介
(田中産婦人科医院)

我々は少なくとも1側の卵管が通過している不妊症の治療法としてGIFTを1985年開発、さらに卵胞卵の前培養の重要性を動物実験で確認し、New-GIFTを1986年に開始した。現在までに325例のNew-GIFTを施行した。今回、この325例のGIFT法の臨床成績について報告する。

①妊娠率は対周期当たり36%(117/325)、対患者当たり37%(117/316)、流産率は12%(14/117)、子宮外妊娠発生率は2%(2/117)、多胎妊娠発生率は2%(2/117)で、双胎12例、品胎6例、四胎2例であった。分娩数は61例、新生児数は78例、男児51例、女児27例であった。

分娩した新生児に染色体異常および奇形は1例も認めなかった。

②妊娠例における平均採卵数は 5.8 ± 1.2 、液化精液中の精子数・運動率は $48.2 \pm 30.8 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $46.2 \pm 21\%$ 、媒精時における精子数・運動率は $24.3 \pm 24.8 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $59.3 \pm 20\%$ であった。最少精子数は $8 \times 10^4/\text{ml}$ 、精子運動率は15%であった。

③不妊原因としては男性不妊42%、卵摂取障害28%、原因不明25%などであった。

15. 当科における HIT 法の試み

森 明人・竹内一浩・山元慎一
沖 利通・デニス・デミルタシ
福元清吾・堂地 勉・永田行博
(鹿児島大産婦)

IVF-ET, IVF-ETR, GIFT 法等, 近年の不妊症治療技術の進歩には目をみはるものがある。しかし, これらの治療技術をもってしても重症の乏精子症では, なかなか妊娠に至らないのが現状である。ところで最近, 乏精子症症例に対する新しい治療法として子宮鏡下で卵管内へ直接精子を注入する子宮鏡下卵管内人工授精法(HIT 法)が注目されている。我々も HIT 法(FUJINON HYS-FT 使用)を試みたので報告する。

対象は卵管の通過性良好な乏精子症3例と機能性不妊症2例の計5例である。当科のIVF-ETのスケジュールにしたがって排卵のmonitoringを行ない, 精子をHTF(Human Tubal Fluid)にて洗浄し, $1 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度に調整した後inseminationした。精子注入は排卵の予測される卵胞が存在する側の卵管に行なった。現在のところ妊娠例はないが, 手技的にも比較的容易で患者の負担も少なく, 今後検討を重ねることにより充分高い妊娠率をあげることが期待できると考える。

16. AIH による妊娠率の向上のための改良

吉田一郎・戸枝通保・田中 温
田中威づみ・田中壮介
(田中産婦人科医院)

不妊症治療の中でAIHは最も基本的な治療法であるが, その妊娠成功率は十分なものであるとはいえない。今回我々はAIH妊娠率を向上させるために改良を加え, 臨床上有用であると思われる結果を得たので報告する。

①排卵時間を正確に予知するために, 尿中LH濃度をオルガノンLHカラーで1日3回(早朝尿, 夕方, 夜)測定した。各々の時点におけるLH濃度よりAIHのタイミングを決定した。LHカラーが陽性となった時点より12~16時間の間にAIHを全例施行した。

②液化後の精液を検鏡し, 精子運動率, 精子数の所見より, パーコール4層の種類を決定した。分離した良好精子をさらに10%血清加HTFで洗浄しAIHに供した。

③AIH針は子宮腔内に挿入しやすく, 出血の少ないように特注した塩化ビニール製の針を使用した。

以上の改良点を加えることによりAIH妊娠率は周期当たり5%から10%に, 对患者当たり16%から22%に上昇した。

17. 当科における精液処理とAIHの工夫 —ツムラハ味地黄丸, 補中益気湯による 強精効果を含めて—

吉田耕治・大塚治夫・岡村 靖
(産業医大産婦)

男性不妊の診療は泌尿器科の領域に属すると思われるが, 実際には婦人科で取り扱わざるを得ないことが多い。

精子輸送路の障害による男性不妊の1例で泌尿器科で精液摘形成術を行ない, 得られた精子でAIHを行なったが, 妊娠には至らなかった。余分の精子はKS保存液を保護剤に用い, 液体窒素中に保存するようにしている。AIHを行なう例はすべてHMG・HCGによる過排卵刺激によりAIHのタイミングを決定している。その他, 乏精子症では2段分画射精や精液を遠沈して良好精子を分離後AIHを行なっているが, 妊娠率は必ずしも良くないのが現状である。最近ではファイバー子宮鏡下に精子を卵管内に注入する方法(HIT)を試行しつつある。

内服剤や注射薬による男性の強精にも種々の薬剤が用いられているが, 効果は不十分である。今回はツムラハ味地黄丸, 補中益気湯の効果も検討したので合わせて報告する。

18. 男性不妊症に対する漢方薬投与法および その改善効果に関する検討

田中威づみ・田中 温・戸枝通保
吉田一郎・田中壮介
(田中産婦人科医院)

我々はAIH, GIFT, IVF-ETにおける男性不妊症(精子減少症および精子無力症)に対し, 積極的に漢方薬投与を行なってきた。従来は疾患に対し, 同じ薬剤を画一的に投与するという方法をとってきたが, その効果は十分とはいえなかった。漢方薬投与は患者の体質によりその効果が異ってくる点に重点をおき, 今回は患者との問診を十分に行ない, 体質, 体格, 精神状態などの点より薬物の種類, 投与量を決定し投与した。薬剤としては味地黄丸, 牛車腎気丸, 桂枝加竜骨牡蛎湯, 柴胡加竜骨牡蛎湯および清心蓮子飲をベースとし, コウジン末(オタネニンジン), スッポン末, ハンピ末, ビタミンEなどを混合した。

以上の投与方法により精液性状が改善される症例も認められ, その結果について発表する。

講演抄録地方部会

第 101 回 日本不妊学会関東地方部会

日 時：平成 2 年 2 月 3 日（土）
場 所：サンド薬品本社講堂

1. 全月経周期にわたり子宮頸部より大量の
頸管粘液様物質を分泌せる
稀有な嚢胞腺腫（境界例）の 1 例

安藤 索・中村幸雄・山田春彦
生方良延・鈴木正彦

（杏林大産婦）

子宮頸管粘液の増加はエストロゲン分泌活性の指標となり、排卵期の予測に役立つ有力な所見の 1 つである。月経全周期にわたり、多量の頸管粘液様物質を分泌する子宮頸部嚢胞腺腫の 1 例を経験したので報告する。

症例は 45 歳主婦で、約 10 年前から粘液性帯下の増加が認められるも放置していた。膀胱炎にて近医受診し、卵巣嚢腫およびホルモン異常の疑いにて当科紹介となった。無排卵、頸管腺の分泌異常、ホルモン産生腫瘍による粘液増加が疑われたが、基礎体温は 2 相性で、頸管粘液は常に 0.4 ml 以上流出していた。増殖期、分泌期の血中ホルモン検査、子宮内膜および頸管腺組織診は著変を認めず、頸管造影、子宮卵管造影にて子宮頸部と交通をもつ腫瘍が認められた。CT、MRI によっても同様の所見が得られ、この腫瘍から頸管粘液様物質が産生されていると考えられた。腹式単純子宮全摘出術を施行し、子宮頸部のムチン性嚢胞腺腫、境界例と診断し、外来管理中である。

2. 寝床温度による基礎体温の推定

三村美香子・鎌田周作・久保田俊郎
麻生武志（東京医歯大産婦）
周 鑑心・田村俊也・戸川達男
（同 医用器材研究所計測機器部門）

基礎体温の測定は、女性の性周期・排卵の確認や卵巣機能を簡便に知り得る点で、不妊症や月経異常などの診断・治療に不可欠である。一般に毎朝覚醒時の口腔温を測定しているが、真の基礎体温は覚醒前の安静・臥床状態で測定される値である。そこで、就寝中の寝床温度を自動的に測定・記録するシステ

ムを開発し、その温度が基礎体温の指標になるかを検討した。15 本の温度センサで人体背部中央を横切る位置の寝床温度を測定する。その測定値を電気信号に変換して RAM カードに記録し、パソコンにて解析する。軀幹直下のセンサにおいて最高床温が得られ、その経時変化は同時に測定した腹部皮膚温の経時変化とほぼ一致した。また、口腔温による基礎体温変化に対応する低温期・高温期が示され、ホルモデータから想定される排卵日が、最高床温によっても推定可能であった。以上より、室温に極端な変動がなければ、最高床温が基礎体温の指標になることが期待される。

3. 当院不妊患者の妊娠例の予後の検討

瀬戸山琢也・安達知子・松尾明美
吉井大介・武田佳彦

（東京女子医大産婦）

岩下光利・坂元正一

（同 母子センター）

1984 年 10 月から、1989 年 12 月までの不妊外来患者妊娠例の予後について検討した。習慣性流産を除く不妊患者 1151 例のうち 314 名、333 回の妊娠を認め、妊娠率は 27.3 % であった。

妊娠例の不妊原因別分類では重複ありで卵管因子が最も多く、次いで排卵障害、排卵障害を除く内分泌因子、男性因子、頸管因子、子宮因子であった。なお卵管因子は今回の検討では卵管疎通性検査後半年以内に妊娠した症例総てを含んだが、このうち器質的機能的異常を認めたものは約 1/5 であった。

妊娠 333 例のうち 57 例（17.1 %）に流産を認め、この流産率は不妊期間（3 年以内、以上）、年齢分布、各不妊因子別百分率に差を認めず、また当院母子センターの対照群と比較し有意差はなかった。また奇形は 1 例も認めなかった。不妊患者妊娠例の分娩時週数および児発育は対照に比べ有意差を認めなかったが、37 週以降の帝切率は有意に高く、これは子宮因子（子宮筋腫、双角子宮）の影響のためと考えられた。

4. 排卵障害の原因別分類とその治療

合阪幸三・金田幸枝・都築浩雄
鳥谷葉子・國保健太郎・野島美知夫
吉田浩介 (賛育会病院産婦)

当科不妊外来にて排卵障害ありと診断された患者に対し、各種排卵誘発療法を施行し、その効果を比較検討した。

[対照]過去5年間に当科を受診し、種々の内分泌学的検査により排卵障害ありと診断された323例で、内訳はプロラクチン関連疾患187例、内分泌学的PCO症例70例、黄体機能不全(前2疾患を合併するものは除外)45例、下垂体機能不全17例、卵巣性無排卵4例であった。

[成績]プロラクチン関連疾患、PCOにはプロモクリプチンが排卵誘発率、妊娠率とも良好であった。黄体機能不全でこれら2疾患を合併したものを除外すると、クロミフェンの排卵誘発効果が優れていたが、妊娠率はHMG療法に比べると劣っていた。下垂体機能不全にはHMG-MCG療法が有効であったが、卵巣性無排卵症には有効な治療法はなかった。

[結論]排卵障害の原因としてはプロラクチン関連疾患が多数を占めることが明らかとなり、原因別に排卵障害の背景を把握し治療方針を決定することが大切と思われた。

5. 奇形子宮と妊孕性

張 素瑛・百瀬和夫
(東邦大第1産婦)

胎生期にMüller管の形成障害で様々の奇形子宮が発生する。1975年から88年までの14年間、当教室で収集した516例の奇形子宮を対象として、不妊症、不育症との関連および治療後の妊孕性を検討し、妊娠症例ではその転帰についてfollowした。

原発不妊率は41.9%と高く、なかでも単角子宮の不妊率は有意に高値であった。不妊治療後の累積妊娠率は36.1%でCremerの予想妊娠模型と比べ大幅に低率である。自然流産率は33.2%であり、双角単頸子宮は有意に高く、習慣性流産は7.8%であり、不完全中隔子宮が高い傾向にあった。子宮の形、着床部位および子宮内膜症の影響が考えられ、子宮形成術で児獲得率は3.6から88.9%に改善された。

子宮奇形の妊孕性を向上させるには不妊、流早産原因の再追求と治療方法の再検討が必要であろう。

6. 習慣流産と子宮奇形

梅内正勝・牧野恒久・中田浩一
飯塚理八 (慶応大産婦)

当院不育症外来に受診した850名の中で、子宮卵管造影法により子宮奇形と診断された患者は125名であった。その患者を、子宮中隔の内腔への突出度に着目した我々独自のXM ratioを用いて分類すると、弓状子宮が81例、部分中隔子宮が33例、完全中隔子宮が8例、その他が3例であった。また我々は55例の子宮形成術を行なったが、その内訳は、弓状子宮が23例、部分中隔子宮が27例、完全中隔子宮が4例、その他が1例であり、術後35例の妊娠中、正期産は26例、現在妊娠中が4例で、生児獲得率は78.4%であった。その中で弓状子宮で手術を受け生児を得た症例が16例もあった。

近年提唱されたAFSの分類においても弓状子宮と部分中隔子宮の区別は明確でなく、また過去の文献においても、弓状子宮は妊娠率また流産率に大きな影響を与えないとされているが、我々は他に原因が発見できない不育症の患者で弓状子宮を有する患者には手術を行なうべきであると考えた。

7. パーコールAIH妊娠例の検討

清水 篤・大倉史也・長塚正晃
木村武彦・荒木日出之助・関谷雅博
(共立蒲原病院産婦)

精子数2000万/ml以下もしくは運動率60%以下の乏精子症、精子無力症、膿精子症、頸管粘液不良例やHuhner試験不良例、免疫性不妊、高齢や長期不妊の原因不明不妊等37人201周期にPercoll AIHを施行し、5回以内に流産、子宮外妊娠各1例を含む12例が妊娠した。乏精子症、精子無力症27例中6例、高齢および長期不妊7例中3例、Huhner試験不良例3例中3例、および免疫性不妊の疑われるもの3例中1例、对患者妊娠率32.4%、対周期妊娠率5.9%と普通のAIHより良好であった。乏精子症の妊娠可能限界は500万/mlであった。27週1052gの男児早産1例を除く満期産では分娩様式、分娩時間、Apgar scoreなどは自然分娩と変わらず、奇形児は見られず、Percoll AIH妊娠例の挙児率は80%以上であった。また同様のPercoll AIHによる関連施設の妊娠分娩例を含めた男女比は、妊娠中で超音波診断にて女児と判定された2例を含んで22対20と差が認められなかった。

8. 当院における精子洗浄 AIH 妊娠例の検討

隅田能雄・莊隆一郎・田瀬土志夫
真田利男・山口禎章

(総合太田病院産婦)

小堀 清

(小堀病院)

当院不妊外来 AIH 患者精液を射精直後の精液性状により分類し、妊孕力向上を目的として各種精子洗浄法を選択し、同法を施行、AIH に供した。

結果は 338 症例中 147 の妊娠 (43%) を得た。施行周期数は、1~57 回 (平均 12 回) で、1 回施行で 39 例の妊娠が成立した。しかし、5 回以内施行での妊娠時の精液性状は平均して液化状態良好、ゲル状沈殿物質が少ない、前進運動精子回収率が上昇と条件がおおむね良好であった。16 回以上施行の症例による精液性状は概して悪く、精子洗浄法に工夫の余地が認められた。

現在、私共は液化状態不良例に対して簡易ハンクスーカリクレイン精子洗浄法を施行し、同法で不十分な場合、さらに攪拌密度勾配遠心法を併用している。精子洗浄法を精液性状により選択、あるいは組み合わせることで施行することにより、精液性状の改善をはかることが可能であり、妊孕力向上が考えられる。

9. 超音波による連続周期観察例における
排卵の検討

朴 俊英・田辺清男・佐野陽子
郡山 智・李 鐘龍・齊城綾子
飯塚理八 (慶応大産婦)

慶応健康相談センター婦人科外来の AIH, AID 患者で、連続 3 回以上の自然排卵周期、および Clomiphene citrate 排卵周期の排卵側、ならびに発育卵胞数について検討した。使用した超音波は 5 MHz の経膈プローブが付いた横河 RT-3600 で、期間は 1988 年 10 月から 16 カ月間とした。症例は自然周期が 67 人、348 周期 (平均 5.98 周期) で、Clomiphene 服用周期が 34 人、192 周期 (平均 5.65 周期) であった。

結果は、1) 1 周期の平均卵胞数は自然周期 (1.15) より Clomiphene の方 (1.44) が多かった。2) 左と右からの卵胞発育率は両周期ともほぼ同じであった。3) 卵胞が左右同時に発育した周期数は Clomiphene の方が明らかに多かった。4) 一側の卵巣から 2 つ以上の卵胞が発育した周期数は Clomiphene 服用周期で多かったが (3.16% vs 6.25%)、統計学的には有意差がなかった。5) 同側変化と対側変化に関しては両周期とも有意差がなかった。

10. 超音波による子宮内膜所見と
各ホルモン値についての検討

五味淵秀人・藤井直美・三橋洋一
貝原 学 (帝京大市原病院産婦)

(対象および方法) 不妊外来受診中で筋腫などの子宮因子を認めない 54 症例について超音波 (経腹的) にて卵胞期最終日と黄体期中期の子宮内膜の厚さを計測、同時に血中 E_2 、 P_4 を測定した。検定は STAX を用い相関係数と回帰直線を求め、さらに t 検定を用い相関係数の検定を行なった。対象例は 29.6 ± 3.7 歳で、自然周期 38 例、clomid 投与周期 11 例、HMG-hCG 周期 5 例であった。

(結果) 卵胞期内膜の厚さは卵胞期 E_2 および黄体期 E_2 と相関が認められた。しかし、相関係数は 0.531, 0.421 であった。黄体期内膜の厚さは各ホルモン値との間に相関はなく、卵胞期内膜とも相関しなかった。clomid 投与周期では各内膜の厚さとも E_2 、 P_4 と相関関係はなかった。

(まとめ) 経腹的超音波を用いて子宮内膜の厚さを計測し各ホルモン値との間の相関を求めた。卵胞期内膜は血中 E_2 値と相関が見られたが、ホルモン値を正確に推定するには本法のみでは不十分と思われた。

11. 子宮内膜日付診断の正確性に関する
比較検討

安藤一道・水沼英樹・山田清彦
伊吹令人・五十嵐正雄 (群馬大産婦)
中里洋一 (同第 1 病理)

子宮内膜日付診断において、内膜採取日を最終低温日・次回月経開始日および尿中 LH サージ日の 3 つの方法で決定し、各々の診断的正確性を比較検討した。

対象・方法：高温相持続期間 ≥ 11 日、黄体中期血中 Progesterone ≥ 10 ng/ml を満たす 35 例の不妊婦人を対象とし、主に黄体期中期に子宮内膜組織診を施行した。尿中 LH の測定はオルガノン LH カラー (オルガノン社) を用い、LH カラー (2+) 日を尿中 LH サージ日とした。

結果：内膜採取日と組織学的日付診断日との相関係数 (R) は、最終低温日を用いた場合、腺について $R = 0.41$ ($P < 0.01$)、間質について $R = 0.46$ ($P < 0.001$)、次回月経開始日の場合には、各々 $R = 0.61$ ($P < 0.001$)、 $R = 0.64$ ($P < 0.001$)、尿中 LH サージ日の場合には、各々 $R = 0.75$ ($P < 0.001$)、 $R = 0.71$ ($P < 0.001$) であった。

結論：子宮内膜日付診断の正確性を高めるためには、尿中 LH の測定などより正確な排卵日診断に基づいた内膜採取日の決定が必要であると思われる。

12. 精液所見と血中ホルモンの相関

中島敬和・宇津木利雄・伊吹令人
五十嵐正雄 (群馬大産婦)

男性不妊患者の造精機能を見る目的で Inhibin を含めた血中ホルモン値を測定し、一般精液所見との関係について各相関を検討した。

その結果 1) Sertoli cell で産生分泌される Inhibin は、精子濃度、全運動率等、精液所見との相関関係は認められなかったが、Testosterone と正の相関 ($R_s=0.26$, $P<0.01$)、年齢と負の相関 ($R_s=-0.256$, $P<0.01$) があった。 2) Leydig cell で産生される Testosterone は、精子濃度、全運動率など精液所見と相関はなかったが、Inhibin および E_2 と正の相関 ($R_s=0.469$, $P<0.001$) を認めた。 3) LH と FSH は精子濃度と強い負の相関関係を認めた ($R_s=-0.33$, $P<0.001$ および $R_s=-0.34$, $P<0.001$) が、全運動率とは相関がなかった。 LH および FSH の異常高値は、造精機能低下の結果と考えられ Oligozoospermia をみた場合、LH、FSH 値の高値より分類して取り扱うべきことが示唆された。

13. Hemi Zona Assay による精子受精能の判定

許山浩司・小田原靖・後藤 誠
川勝雅秀・宏江育代・楠原浩二
寺島芳輝 (慈恵医大産婦)

〔目的〕IVF-ET における精子受精能を、prospective に判定する事が可能か否か、IVF で得られた未受精卵を用い、Zona と精子の接着能検査 (Hemi Zona Assay) の有用性について検討した。

〔方法〕IVF で得られた卵で受精に至らなかった Metaphase II の卵を、Yanagimachi らの方法により高塩基溶液で保存し、この salt stored egg を実体顕微鏡下に 27 G 針で半切し、Zona の半分は good sperm と、他の半分は poor sperm と、それぞれ媒精し、それぞれの接着数を調べた。また IVF での受精率と同一症例の Zona との接着についても検討した。〔結果〕精子接着数は poor sperm が good sperm に比べ有意に低かった。精子接着数と精子数、運動率の間には正の相関を認めた。接着数 50 以上であった症例は IVF での受精率は 60 % 以上であった。

14. 精索静脈瘤手術の臨床的検討

国武 剛・簗和田滋・篠原 充
西古 靖・阿曾佳郎

(東京大泌尿器)

最近4年間に精索静脈瘤高位結紮術を行なった10例の患者について報告する。

術前の検査結果では、精巣重量の左右差がある者7例、乏精子症の者3例、低運動率の者5例、血清 LH の上昇がある者4例、患側陰嚢温度の上昇がある者7例であった。

術後の検査結果では、精子濃度の著明改善3例、改善1例、運動率の著明改善2例、改善1例、血清 LH の低下6例、患側陰嚢温度の低下4例であった。また、1例で妊娠の成立が確認された。

以上より、高位結紮術は有効な治療法であると考えた。今回は少ない症例であったが、今後も症例を重ね検討を続けたいと考える。

15. 男性不妊症患者に対する

牛車腎気丸の効果

大橋正和・石川博義・橘 政昭
田崎 寛 (慶応大泌尿器)

特発性男子不妊症に対する薬物療法には限界があり、近年漢方療法の有効性が認められつつある。今回牛車腎気丸を、精子数 2,000 万/ml 以下の乏精子症例 20 例を含む男子不妊患者 40 例に 12 週間投与し、精液所見、ホルモン値の変動について検討した。なお、この間に薬剤による明らかな副作用は認められなかった。

結果として特に乏精子症例の精子濃度が、推計学的有意差をもって増加した。各々の症例の治療効果判定では、精子濃度は全症例、乏精子症例ともに 25 % に改善を認めたが、全症例では 10 % が悪化しており、精子濃度 2,000 万/ml 以上では変動が大きいと考えられた。一方運動率では改善例、悪化例が同数認められ、かなりバラツキのある結果となった。薬剤投与前後のホルモン値の変動は認められなかった。

以上より牛車腎気丸は、特に乏精子症例の精子濃度を増加させる事において有効であることが示唆された。

16. 頸管粘液内の精子運動能の検討

—コンピューターアナライザーによる

Huhner テストの試み—

山内 宏・岡本 一・西田正人
岩崎寛和 (筑波大産婦)

頸管粘液は腔内に射精された精子が会う第1の関門で、精子運動能との関連が妊娠成立にあたって重要であることはいうまでもない。我々はコンピューターアナライザー(Cryo Resources 社製 Cell Soft シリーズ 3000)を用い、頸管粘液中の精子運動能を測定し、同じく精液検査で得られた値と比較検討した。

対象は当院不妊外来通院患者で投薬等の治療をうけていないもので、頸管粘液検査およびBBTから排卵日を推定し、Coitus指導した、400倍視野中20個以上の運動精子を認めたもの21例をコンピューターアナライザーで測定した。頸管粘液内の精子の平均速度は精液中より遅く、直進性は良好で、ともに有意差が得られた。

17. 正常婦人および無月経婦人における cortisol の dopamine antagonist に対応する反応

石川尚顕・関 克義・永田一郎
(防衛医大産婦)

メトクロプラミド(MCP)投与後、コルチゾールの分泌増加が認められることがあり、この作用は、抗ドーパミン機構を介すると推測されている。今回、我々は、正常婦人において、MCPに対するACTHおよびコルチゾールの反応、また、下垂体microadenomaを有する高プロラクチン血症性および視床下部性無月経婦人において、MCPに対するコルチゾールの反応を検討した。

MCPの投与によって、正常婦人の卵胞期でのACTHとコルチゾールは変化しなかったが、黄体期でのACTHとコルチゾールは有意に増加した。また、MCPの投与によって、高プロラクチン血症性および視床下部性無月経婦人のコルチゾールは有意に増加した。

以上、正常婦人の黄体期、下垂体microadenomaを有する高プロラクチン血症性および視床下部性無月経婦人において、内因性ドーパミンによる、ACTH分泌抑制の亢進が示唆された。

18. GnRH agonist の下垂体—卵巢系に
対する反応の2型性岡部親宜・武内裕之・豊成由香
伊藤 哲・福田 勝・高田道夫
(順天堂大産婦)

〔目的〕GnRH agonist (GnRHa)を卵胞期初期から投与し、下垂体、卵巢、子宮内膜の状態を経時的に追跡検討した。

〔方法〕不妊外来を受診した19例に対し、月経周期1日目よりGnRHa 900 μ gをnasal sprayで投与し、隔日に血中LH、FSH、 E_2 の測定、経腔超音波法による卵胞および子宮内膜の形態観察を行ない、周期14日目には子宮内膜組織診を施行した。

〔成績〕月経周期14日目の血中 E_2 値が50 pg/ml未満のものをA群(n=15)、 E_2 値が50 pg/ml以上のものをB群(n=4)とした。A群では血中LH、FSHは一過性の上昇の後漸減したが、14日目のFSHは投与前値の約3倍を示した。子宮内膜の超音波像は線状であり、組織診では増殖期初期像を示した。B群では、LH、FSHともに投与前値以下となったが、 E_2 は前値の10倍以上と高値で、木葉状の超音波像を示し、増殖期後期から分泌期初期の内膜組織像を示した。

〔結論〕GnRHaは、下垂体—卵巢系に抑制的にも促進的にも作用することが明かとなった。

19. Hypergonadotropic hypogonadism 症例
におけるブセレリン投与の臨床的効果渡辺研一・石塚文平・丸岡 充
近藤俊彦・大野祐子・堀越裕史
栗林 靖・斎藤寿一郎・浜田 宏
(聖マリアンナ医大産婦)

Hypergonadotropic hypogonadism (h. h) 症例に対し、estrogen療法は、排卵誘発効果があるという報告が散見される。今回、我々はHMG-HCG療法で卵胞発育を認めなかった3症例にブセレリンを投与、ゴナドトロピン分泌を一定期間抑制したところ、1症例に、反跳的に自然の卵胞発育および黄体化が認められた。

症例は39歳の原因性不妊症例で、35歳より無月経となり、h. h像(LH 78.4mIU/ml、FSH 95.2mIU/ml、 E_2 14.8pg/ml)を呈していた。消退出血後12日目よりブセレリン(900ng/day)を45日間連続投与し、ゴナドトロピン分泌を抑制したところ、投与後16日目に卵胞径16×14mm、子宮内膜厚8mmとなり、以降BBTは高温相となった。血中ホルモン値は、

ブセレリン投与中は、LH15.6mIU/ml、FSH14.9mIU/ml、 E_2 16.6pg/mlとなっていたが、投与終了後16日では E_2 416pg/ml、LH167.6mIU/mlとサージが出現、その後プロゲステロンが上昇、高温中期で12ng/ml以上となり、ほぼ自然の排卵周期の血中ホルモン推移をたどった。

20. Kaufmann 療法の効果とその限界

秋山芳晃・安江育代・許山浩司
川勝雅秀・小田原靖・楠原浩二
寺島芳輝 (慈恵医大産婦)
海原純子
(海原メディカルクリニック)

Kaufmann 療法は、むしろ古典的な方法で、近年あまり用いられていないようである。今回、我々は、22例の排卵障害症例に対して、Kaufmann 療法を行ない、7例(31.8%)の有効例を認めた。有効の判定としては、①第2度無月経から第1度無月経に変化した症例 ②Kaufmann 療法後、排卵を認めた症例 ③治療前 clomid に無反応であったが clomid に反応するようになった症例の3項目とした。

有効例の排卵障害の内訳は、視床下部一下垂体性すなわち中枢性排卵障害2例、PCO 3例およびPOF 2例すなわち卵巣性排卵障害が5例であった。卵巣性排卵障害の有効例では、LHの著明な低下とエストラジオールの上昇が認められ、ゴナドトロピンの充分な抑制と、卵胞の成熟が示唆された。

未婚婦人の排卵障害、特に卵巣性排卵障害に対して Kaufmann 療法はある程度、有効であり、試みる価値のある治療法と思われる。

21. PCO における糖代謝異常

木下俊彦・加藤順三
(山梨医大産婦)

(目的) PCO における高インスリン(I)血症が報告され、PCOの病態との関連が注目されている。本邦PCOにおいてはI動態の評価が未確立であるため、これを明らかにするため検討を加えた。

(方法) PCO患者に75g糖負荷試験を行ない、同時にI値を測定した。負荷前の血中 Δ^4 、DHEA-S、PRLを測定した。

(成績) ①I基礎値はPCOと対照群間に有意差を認めなかった。②PCOにおけるIの頂値は明らかに低く、かつ反応は遅延した。③PCOではI反応が明らかに低下し、36%は軽度の耐糖能障害を有していた。血中 Δ^4 、DHEA-S、LH/FSH比、PRL値はいずれもI値との相関性を認めなかった。

(結論) 検討したPCOでは高I血症は認められなかった。PCOの病態にIの直接的関与は少ないが、I反応の低下と耐糖能障害のみられたことから、糖代謝との関連性が示唆された。Iの動態に欧米との間に相違がみられたが、これはPCOが広い spectrum を有することを裏付けるものである。

22. 多嚢胞性卵巣症候群(PCO)における 卵胞液除去の内分泌学的

近藤俊彦・石塚文平・丸岡 充
渡辺研一・大野祐子・堀越裕史
栗林 靖・斉藤寿一郎・浜田 宏
(聖マリアンナ医大産婦)

PCOに対する手術的排卵誘発法として、侵襲の少ない経腔的卵胞穿刺術(FP)の有効性が注目されており、FPの排卵誘発効果およびその背景となるゴナドトロピン、性ステロイド分泌への急性効果を知る目的で以下の検討を行なった。

対象は、クロミッド、HMG-hCG療法無効な、不妊PCO症例4例で、FP周期6日目よりhMG 150~300 IU連日または、隔日投与、卵胞径20mm、6個以上で経腔超音波ガイド下FPを施行した(摂取量30~200 IU、FP直前および翌日に血中 E_1 、 E_2 、androstenedion (Δ^4)、DHEA-S、testosterone (T)を、またFP前後サイクルでGn-RH testでLH、FSHを測定した。1例を除いて卵胞初期LH値高値、LH-RH testでは、LHの過剰反応を示した。FP後のLH正常化、LH-RH testでは全例LH反応の正常化傾向を示した。4例中2例は、治療後早期妊娠成立、他2例も排卵が見られた。FP直前、翌日の性ステロイド値の比較としては、 E_2 のみ有意に低下した。FPはPCO不妊症例において治療効果を示唆した。

23. 術後炎症物質としてのロイコトリエン

田中純也・石田芳典・五十嵐俊夫
可世木久幸・荒木 勤
(日本医大産婦)

(目的) ロイコトリエン(LT)はアラキドン酸から生成される生理活性物質である。その作用は血管透過性が強く、炎症物質と考えられている。本研究では、LTが術後炎症の指標となりうるか、また、手術器具の違いによる炎症程度の比較を検討した。

(方法) hMG、hCGの投与後、性周期がそろったマウス子宮に、縦切開を約1.5cm加えた。切開部位から、3cm離れた子宮組織を採取し、そのLT濃度をRIA法によって測定した。

(結果) 子宮組織LTはレーザー切開後、2~6時間

において直線的増加を示した。また、レーザー、電気メス、メスによる切開 6 時間後の子宮 LT 濃度を比較した結果は各々、458, 713, 56 pg/g であり、レーザーによるものが最も少なかった。(電気メス対レーザー: $P < 0.05$, レーザー対メス: $P < 0.1$)

〔考察〕LT は術後炎症の指標となることが示唆された。また、レーザーによる術後炎症程度は低いことが示唆された。

24. 2 度にわたるマイクロサージェリーによって妊娠に至った卵管留膿症の 1 例

山田祐士・長田尚夫・津端捷夫
佐藤和雄 (日本大産婦)

今日、体外受精による胚移植が盛んに行なわれているが、しかしマイクロサージェリーによる卵管形成術は、妊娠率も高く、その成立が自然であることから、卵管性不妊症の治療には理想的である。しかしその適応や術式等、残された課題も多い。

卵管形成術のなかでも卵管留水症に行なう卵管開口術は、他の術式に比べ術後の妊娠率も低いために、一般に体外受精による胚移植が行なわれている。

今回われわれは、卵管留膿症に対し、マイクロサージェリーを施行したにもかかわらず、再癒着を併発し再度マイクロサージェリーを施行して妊娠に至った症例を経験したので報告する。

症例は 32 歳の未妊未産婦で、下腹部痛と発熱を訴え来院。精査の結果、卵管留膿症を認めるも、挙児希望が強く、開腹排膿後、卵管開口術を施行するも、再度卵管留水症を認め、再マイクロサージェリーによる卵管開口術を施行、その後妊娠に到った。

25. 卵管間質部閉塞に行なう子宮卵管吻合術の予後と術式の改良について

長田尚夫・山田祐士・早川康仁
中村陽行・佐藤和雄 (日本大産婦)

この 7 年間に当院不妊外来を訪れた患者 2021 例の不妊原因は、卵管因子によるものが 38.8 % と最も多い。これらがマイクロサージェリーによる卵管形成術や IVF&ET の適応となる。

我々は、特に卵管閉塞の診断に従来の子宮卵管造影法に加え、選択的卵管造影法や子宮鏡下卵管形成術を開発し行ってきた。その結果、一旦卵管閉塞と診断された症例の約半数が再疎通することを認め報告してきた。また我々は、卵管間質部閉塞に対し子宮卵管吻合術を開発実行してきた。この子宮卵管吻合術は、子宮内膜に直接、卵管断端を吻合するが、

その際、子宮漿膜欠損部や卵管漿膜欠損部に、生物学的接着剤を用いる腹膜移植を行なった。今回腹膜移植を行なわなくても済む子宮卵管吻合術を試みたので報告する。

本法は卵管間質部に割面を深く入れ間質部卵管を露出後、間質部閉塞卵管を摘出、子宮卵管吻合術を行なう。講演では、これらを具体的に述べる。

26. カラー Doppler 法を用いた超音波卵管疎通性検査の試み

堀越裕史・石塚文平・丸岡 充
近藤俊彦・渡辺研一・栗林 靖
斉藤寿一郎・佐賀正彦・浜田 宏
(聖マリアンナ医大産婦)
永江 学 (臨床検査部)

画像上に、流体の存在をカラー表示するカラー Doppler 法を用いた超音波卵管疎通性検査を開発し、その有用性を検討した。11 例の不妊症例に試み、疎通性の有無に関して、子宮卵管造影法 (HSG) 所見と比較して 78.9 %、腹腔鏡下および開腹下の色素通水法と比較して 70.6 % の高い一致率を得た。X 線被曝・ヨード過敏症の心配がなく、簡便で、外来で反復して施行できるという、従来の超音波卵管疎通性検査の利点に加えて、流体の方向がカラー表示され、リアルタイムで鮮明な画像が観察でき、乱流の状態により、部位診断や卵管留水症の診断にも有用なことから、本法は、卵管疎通性検査のスクリーニング検査として、また、卵管手術等のフォローアップの手段として有用であると思われる。

27. 不妊症例におけるヒステロファイバースコープの有用性

塩津英美・梁 善光・大須賀穰
三橋直樹・水野正彦
(東京大産婦)

ヒステロファイバースコープ (以下 HYS) は直視下に子宮内膜が観察できるため、微小な内膜病変を伴う症例に対し非常に有用である。今回我々は不妊外来において使用したので、その有用性につき報告する。

対象は 1986 年 10 月から 1989 年 12 月までの不妊外来患者のうち、HYS を施行した延べ 73 回 60 症例で、その HYS 所見の内訳は、子宮筋腫 16 例、子宮内腔癒着症 8 例、内膜ポリープ 5 例、内膜増殖症 5 例、異常なし 25 例、その他 3 例で、HSG 所見との一致率は 34/45 (75.6 %) であり、特に内腔癒着症や内膜増殖症などの内膜病変の所見に食い違いが多

く、HYSの有用性が示唆された。また、内膜病変の治療効果についても外来で反復検査が可能であり、非常に有用であると考えられた。

しい展開ならびに下垂体機能調節機序解明へのアプローチについても解説を試みたい。

特別講演

1. 精索静脈瘤

石川博通 (筑波大泌尿器)

病態生理が複雑なため優れた治療法の少ない男子不妊症の分野で、精索静脈瘤に対する手術は妊娠につながる最も有力な手段である。この理由から精索静脈瘤は臨床上忘れてはならない疾患となってきた。

これは主に内精静脈の逆流により蔓状静脈叢が拡張して形成されるが、解剖学的理由から左側に多い。

この存在により Leydig 細胞および Sertoli 細胞機能が障害され、造精機能障害、もしくは男性不妊につながることは、いろいろな手段で証明されているが、なぜこの病態がこのような障害を起こすかについては、(1)陰嚢内温度上昇説、(2)酸素分圧低下説、(3)有毒物質逆流説があり、(1)が最も有力とされているが、結論には到っていない。

この疾患の治療は、通常、高位結紮術により行なわれ、妊娠率は25—55%である。今後さらなる病態生理の解明、また他の治療との併用により妊娠率の向上に努めるべきと考える。

2. 排卵の誘発と抑制

—GnRH 療法を中心に—

麻生武志・西 望・久保田俊郎
(東京医歯大産婦)

生理的な下垂体 gonadotropin の分泌パターンが pulsatile であることを基にして、視床下部機能障害による無排卵症患者に GnRH の pulsatile infusion を行なって排卵誘発し、また強力かつ持続的な作用を持つ agonist による排卵抑制は今日一般臨床で行なわれている。本講演ではこれら治療法が開発されるに至った背景を概説し、視床下部性無月経と多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) などの自験例から提起されたこれら治療法の問題点と対応について検討してみた。

さらに GnRH agonist の腔内低容量持続投与を PCOS 症例に行なった場合の下垂体・卵巣機能に対する影響を分析した結果、LH/FSH 比が正常化し、妊娠が成立した症例での臨床内分泌学的所見と、下垂体 gonadotroph と lactotroph との間に作動すると考えられる paracrine system での GnRH の関与についての実験成績を報告し、GnRH 療法の今後の新

地方部会講演抄録

第 32 回 日本不妊学会北海道地方部会総会・学術講演会

日 時：平成 2 年 2 月 3 日（土）

場 所：札幌医科大学講堂

1. 女児外陰形成術の経験

浅野嘉文・野々村克也・小柳知彦
（北海道大泌尿器）

最近 5 年間に当科において女児 ambiguous genitalia 9 例（2・3 歳：5 例，10～16 歳：4 例）に対し外陰形成術を行なった。術前に腔・尿道造影，内視鏡にて腔・尿道の位置関係を確認，陰核形成は dorsal neurovascular bundles を温存する Spence and Allen の方法で，腔形成は Hecker の方法に準じた flap vaginoplasty を主に用いた，6 例は陰核・腔形成術を同時に行なった，2 例は 3・4 歳時に一度陰核・腔形成術を受けている症例で，13・16 歳で再度腔形成術を行ない，このうち 1 例は同時に腔中隔を内視鏡的に切除した，Vaginalstent は平均 4 日留置，抜去後微温湯による坐浴を行なった，腔ブジーは，幼少児には術後 2～3 か月目から半年～1 年毎に主に金属ブジーにて行ない，年長児には自己指ブジーを指導している，8 例とも経過順調である，残り 1 例には skin graft vaginoplasty を行なったが腔腔長が 3 cm しか得られず再手術を考えている。

2. 男子不妊症症例の Clomiphene Citrate

投与による精漿中 transferrin の推移について

高木良雄・伊藤直樹・南部明民
立木 仁・三熊直人・赤壘圭吾
丸田 浩・熊本悦明
（札幌医大泌尿器）

クエン酸クロミフェン（以下 CL）投与による Sertoli 細胞機能の変化について検討するため，この薬剤で治療した 36 例の男子不妊症症例について治療前後の精漿中 transferrin（以下 TF）を測定し精子数の変化を比較した，CL は 1 日 25 mg を 3 か月以上連日経口投与した，治療後に TF が 1.5 倍以上上昇した症例では 6 例中 4 例（66.7%）で精子数の改善が認められた，TF が 1.5 倍未満の上昇しか認められない症例では 30 例中 12 例（40%）で精子数の改善が認められた，以上より CL 投与により精子数が改善する症

例では FSH の上昇によって Sertoli 細胞機能が刺激され賦活化することが示唆された。

3. マウス胚盤胞の急速凍結における

グリセリンとショ糖の濃度，平衡時間

および平衡温度の影響

岸 昌生・菱沼 貢・高橋芳幸
金川弘司

（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

マウス初期胚盤胞および胚盤胞についてグリセリンとショ糖を併用し急速凍結を行なった，凍結保護剤には，2，3 および 4 M のグリセリン，0～0.5 M のショ糖および 5% の子牛血清を含む PBS を使用した，胚を凍結保護剤で 0.5～10 分間平衡し，液体窒素ガス中に 2 分間放置後，液体窒素に浸漬して凍結保存した，融解後の胚の生存率は，胚盤胞に比べ初期胚盤胞で有意に生存率が高かった，初期胚盤胞および胚盤胞において，ショ糖濃度 0.125 および 0.25 M で他のショ糖濃度に比べて高い生存率が得られ，平衡時間の延長に従い生存率の減少する傾向がみられた，胚盤胞においては，2 および 4 M のグリセリンでは 3 M に比べて生存率が低く，平衡温度 3℃ で 25℃ に比べ高い生存率が得られた。

4. ウシ体外受精における精子・卵子の共培養

時間および卵管上皮との共培養の検討

犬飼史朗・菱沼 貢・高橋芳幸
金川弘司

（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

卵子の成熟培養 20.0 時間と精子の前培養 3.0 時間，卵子の成熟培養 26.5 時間と精子の前培養 3.0 および 5.0 時間を行なった 3 つの実験グループについて，体外受精を行ない，分割卵を卵管上皮細胞の単層と共培養した。

卵子の成熟培養 20.0 と 26.5 時間では，受精率および分割率は 26.5 時間で高かった。

卵子の成熟培養 26.5 時間では桑実胚および胚盤胞への発育は共培養した場合のみで認められたが，発育率は低かった（桑実胚：2.6～14.3%，胚盤胞：0～9.5%），卵子の成熟培養 20.0 時間では共培養を行なわなくても，桑実胚および胚盤胞への発育がみられた（桑実胚：42.1%，胚盤胞：26.3%）。

以上のように、本実験では、卵子の成熟培養時間による影響が大きい、精子の前培養時間および卵管上皮細胞との共培養の効果はあまりみられなかった。

5. 当科における最近2年間の不妊症統計

田熊直之・千石一雄・玉手健一

菊川美一・石川睦男・清水哲也

(旭川医大産婦)

今回我々は1987年1月より1988年12月までの最近2年間に当科不妊外来に新規登録された216例(一般的不妊検査終了者194例)について統計的解析を行なったので報告する。

原発性不妊、続発性不妊は各々130名(60.2%)、86名(39.8%)で、平均初診時年齢は30.2歳、平均不妊期間は4年1ヵ月であった。

主な不妊因子は、原発性不妊では卵巣内分泌因子(34.2%)、男性因子(30.8%)が多く、続発性不妊では卵管因子(35.0%)、機能性不妊(31.2%)が多かった。妊娠例は1989年12月現在で56例であり、修正妊娠率は28.9%であった。そのうち排卵誘発剤のみによるものが19例、自然周期妊娠が21例に認められた。

他にAIHにより9例の妊娠が成立した。

6. 当科における昭和61, 62年度の不妊統計

○東口篤司・森若 治・高階俊光

神谷博文 (斗南病院産婦)

昭和61年、62年度に不妊を主訴として当科外来を受診した280例を対象に不妊統計を試み、次の結果を得た。対象280例のうち130例(46.6%)が妊娠した。他施設の報告に一致して妊娠成功例のほとんどは治療期間2年以内であり、3年目に入ると妊娠は例外的(3.7%)となった。下腹部開腹手術の既往の有無では妊娠率に差はなかった。Rubin testにおける諸型と妊娠率には差がなく、正緊張通過型および閉塞型の妊娠率は各々54%、53%であり、Rubin testにはほとんど診断的価値はないと思われた。一方HSGは正常に近い妊娠率が高く、有用であった。Huhner test 不良群の中にも妊娠例を多数認めた。内膜検査として血中progesteroneは日付診より妊娠率との一致が高かった。排卵誘発法としてはclomid(単独)の妊娠率(9%)に比して、HMG-HCG(14.8%)、sexovid(18.4%)、HCG(25.8%)が高かった。これらの所見の他に若干の知見を得たので報告し批評を仰ぎたい。

7. 当教室におけるGIFT法の成績

桜田芳弘・林 宏・室城宸一・林 正路

工藤隆之・田中俊誠・藤本征一郎

(北海道大産婦)

1989年5月1日より同年12月31日までに施行した配偶子卵管内移植法(GIFT法)の成績について報告したい。

原発不妊(n=15)、続発不妊(n=10)の25名に施行し、現在までに4例の妊娠成功例を得ている。

それらの例における排卵誘発からの臨床経過について詳細に報告する。

8. 当院におけるIVF-ET, GIFTの現況

南 邦弘・岡部泰樹・野村靖宏

山本哲三・金上宣夫・洞口 堯

(育愛会 札幌東豊病院)

体外受精胚移植(IVF-ET)および配偶子卵管内移植(GIFT)は難治性不妊の治療法として広く普及してきた。我々は1987年より臨床応用してきたが、今回1989年1月より12月までに施行した29症例、36周期(IVF 22周期、GIFT 13周期)の成績を報告する。

排卵誘発法はClomid+HMG+HCG, HMG+HCG, Buserelin+HMG+HCG, 超音波下経腔採卵、採卵率対周期97.2%、対穿刺卵胞64.8%、1周期平均3.3個。精子調整はパーコール遠沈法で良好精子選別。

IVF: 分割率対周期50%(修正64.7%)、対培養卵33.3%(修正44.2%)、妊娠例0。

GIFT: 前培養した卵と調整した精子を移植、開腹6例、腹腔鏡下7例、3例妊娠、1例流産、1例妊娠中、1例分娩した。

9. 排卵は左右の卵巣で交互に起きるのか?

宿田孝弘・林 卓宏・金谷美加

藤井美穂・遠藤俊明・幡 洋

田中昭一・橋本正淑

(札幌医大産婦)

左右に卵巣を持ち正常性周期を有する成熟期婦人では、排卵は左右の卵巣で交互に起きるといわれている。しかし、このことについて実際に調べた論文は見あたらない。

今回我々は、経腔超音波断層法を用いて、左右の卵巣を観察し、卵胞成熟、排卵が左右の卵巣においてどのような順序で起こるかについて検討した。

対象は、左右に卵巣を持ち、排卵誘発剤の使用に

正常性周期を示す成熟期婦人とした。

52 症例の 194 周期の観察では、排卵はまったく左右不規則に起こった。つまり、排卵は左右の卵巣で交互に起きるのではないこと、そして前周期の卵胞成熟、排卵、黄体形成等は、今周期の卵胞成熟および排卵が左右どちらの卵巣で起こるかについては影響を与えないことが示された。

10. cAMP および LDL の正常月経周期内変動について

計良光昭・日下真純・工藤正尊
佐藤広文・岩城雅範・田中俊誠
藤本征一郎 (北海道大産婦)

正常月経周期における cAMP および LDL の変動を明らかにする目的で、正常排卵周期を有する婦人 (n=11) より 30 日間以上、2~3 日に 1 度採血した。cAMP、LDL はそれぞれ cAMP キット「ヤマサ」、BLF 栄研キットを用いて測定した。

cAMP は卵胞期初期 (EFP) において最低値、卵胞期中期 (MFP) および黄体期中期 (MLP) において高くなった。LDL は EFP においてもっとも高く、排卵期で低くなり、黄体期後期で最低値となった。

今回得られた成績の正常月経周期における意義についても報告したい。

11. 子宮内膜症における異所性子宮内膜の組織像

藤井美穂・幡 洋・遠藤俊明
金谷美加・田中昭一・橋本正淑
(札幌医大産婦)

子宮内膜症における異所性子宮内膜の月経周期変化については①正常子宮内膜と同様月経周期変化をもつ、②常に増殖期にあり分泌期に移行しない、③増殖期と分泌期が同一標本に混在する、などの報告があり、明らかでない点が少なくない。そこで今回当科にて得られた子宮内膜症組織における月経周期変化について検討した。

〔対象〕30 例の開腹手術した 20~50 歳の子宮筋症、endothelioma、腹膜の blue berry spot の症例から異所性内膜の HE 標本を作成し、月経周期との関連につき検討した。

〔結果〕月経周期にかかわらず全例に増殖期と分泌期の内膜腺が同時に認められた。さらに同一内膜腺内においても増殖期にある腺細胞と分泌期にある腺細胞が混在している症例もあった。

12. トータルならびにフリー・テストステロンの正常月経周期内変動について

○林 正路・桜田芳弘・古田伊都子
松山倫子・田中俊誠・藤本征一郎
(北海道大産婦)

正常月経周期におけるトータルテストステロン (t-T) ならびにフリーテストステロン (f-T) の変動を明らかにする目的で、正常排卵周期を有する婦人 (n=19) から 30 日以上、2~3 日に 1 度採血した。

t-T は抽出方と無抽出法キットで測定し、f-T は無抽出法キットで測定した。

t-T は、LH サージ日を day 0 とした場合、day -2~day +2 で最も高くなった。卵胞期は黄体期より高値であった。

f-T は、t-T 程は著明でなかったが、day 0 で最も高くなった。

今回得られた成績の正常月経周期における意義についても報告したい。

特別講演

1. リプロダクションにおける体腔内走査画像の意義

千石一雄 (旭川医大産婦)

2. 月経黄体機能の調節機構について

遠藤俊明 (札幌医大産婦)

関連学会のお知らせ

第 13 回アジア オセアニア産科婦人科学会

(XIIIth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology)

会期：1991 年 2 月 10 (日) ～ 2 月 15 日 (金)

会場：Central Plaza Hotel and Bangkok Convention Center

プログラム内容演題申込用紙登録用紙等詳細は(社)日本不妊学会事務局 (03-272-7077) にもご用意してございます。

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 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

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 日をもちまし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

日本医学会だより

1990年4月 No.3

1. 日本医学会役員改選

去る、第56回日本医学学会定例評議員会において役員の選挙が行われ、会長に太田邦夫、福会長に森亘（基礎部門）・小泉明（社会部門）・阿部正和（臨床部門）の3氏が重ねて選出された。任期は1990年4月1日から1992年3月31日迄である。

また、幹事の半数改選が行われ、中尾眞・影山圭三・近藤東郎・本間光夫・石川浩一・佐野圭司・水野正彦の7氏が選出された。（任期1990年4月1日～1994年3月31日）。なお、任期1992年3月31日までの幹事は、伊藤良雄・大越正秋・三浦祐晶・石田名香雄・飯島宗一・井村裕夫・森武貞・井口潔の8氏である。

2. 第23回日本医学学会総会の準備状況

第23回日本医学学会総会は、1991年4月5、6、7日の3日間、京都において開催される。「転換期に立つ医学と医療—創造と調和と信頼—」をメインテーマとして、着々と準備中である。

登録は、1990年4月から開始しており、医師・大学院生・コメディカルの多数の参加を要望している。

学術プログラムは、医師の生涯教育の場としての意義を重視し、「癌、老化、脳と神経、生命倫理、環境」などの15項目にわたり準備し、会場に、国立京都国際会館、宝ヶ池プリンスホテル、京都会館等を予定している。

展示は、学術、機器、薬品、医療情報、医療サービス、医学史展示の6部門を計画し、総合展示にみられなかったテーマをとりいれ、会場に、国立京都国際会館イベントホール、京都博物館、京都府総合見本市会館等の6ヶ所を予定している。

3. 日本医学会総会あり方委員会報告

日本医学会総会あり方委員会報告が、中尾眞委員長から太田会長に2月27日に答申された。

次のとおり、6項目にわたって審議検討された内容が含まれている。今後、総会およびこれに関係する本学会の活動に大きな示唆をあたえるものである。

①総会の目的・意義：1. 社会的デモンストレーション、2. 諸分野の最先端を総合し、倫理、自然環境との調和を図り、さらに医学の将来の動向を模索する、3. 生涯教育があげられている。

②規模と参加者の構成：従来の総会では、参加の大部分の医師会経由に依存していたが、若い世代の研究者等の参加を一層考慮することによって、今後の総会の活性化に資することが重要である。これには、分科会からの多数の参加が要望される。

③開催地、開催間隔、企画・運営等：4年間隔の4大都市での開催については、現状では、已むを得ない。

④「中間総会」の提案：開催地の地域特性を生かすとともに、生涯教育の性格を強めたものを2日間程度で、4大都市以外で開催することが考えられる。

⑤総会に対して日本医学会ならびに各分科会が果たす役割等：各分科会は、総会開催に協賛して費用を負担するなどの積極性が期待される。

⑥外国人の参加：外国人の参加は、歓迎する。しかし、会議は、日本語をもって意思を十分に伝えることが大切である。

4. 日本医学会シンポジウム

シンポジウム企画委員会において、5名の委員により課題が企画検討されたのち選定される。

第88回日本医学会シンポジウムは、次のとおりで、参加希望者は、本会まで予め申込み下さ

い、参加費は無料。

第 88 回日本医学会シンポジウム

主題：受容体と情報変換—最近の進歩と臨床への波及—

日時：1990 年 7 月 13 日 (金) 9:30~17:30

場所：日本医師会館

組織委員：遠藤 實 (東大・薬理)

尾形悦郎 (東大分院・内科)

宇井理生 (東大薬学部・生化学)

なお、シンポジウムの記録集を刊行している。第 85 回シンポジウム「血管内皮細胞の機能と障害」、第 86 回シンポジウム「前癌病変」を希望の方は、本会まで、葉書で申込み下さい。無料頒布。

5. 医学用語管理委員会

草間委員長、開原副委員長の下で、委員の献身な努力により医学用語辞典欧和版の初校が進行中である。また、医学用語上、問題のある①略語について、②訳語のなかの数字の書き方について、③類似語の取り扱いについてなどの意見統一を図った。

6. 認定医制についての三者懇談会

日本医学会は、学会認定医制協議会と日本医師会とともに認定医制についての三者懇談会を

開催している。

懇談会では、認定医表示の基本科目について、細部にわたって検討がおこなわれ、第 2 段階の専門科目については、各学会において引続き検討中である。また、草川議長から学会認定医制協議会の加盟学会に要望した 4 項目のひとつである日本医師会の生涯教育と各学会の認定医制との整合性を図ることについては、学会認定医制協議会と日本医師会との間で協議が進められている。

7. 日本医師会医学賞・医学研究助成費選考委員会

1989 年度より、日本医学会が日本医師会から医学賞、医学研究助成費の選考を委託され審査を行っているが、1990 年度も引続きこれにあたる。推薦は、5 月上旬に、日本医学会分科会長、大学医学部長・医科大学長、大学附属研究所長(医系)、その他研究所長に依頼、7 月上旬に推薦を締切る。被推薦者は日本医師会員に限る。

8. 移転

日本医学会は、下記のとおり平成 2 年 2 月に移転した。

日本医学会

〒113 東京都文京区本駒込 2-28-16

日本医師会内 TEL 03-946-2121(代表)

FAX 03-946-6295

第 35 回日本不妊学会総会および 学術講演会ご参加の皆様へ

第 35 回日本不妊学会総会・学術講演会への皆様のご参加を心よりお慶び申し上げます。
日本不妊学会事務局では、本講演会ご出席の皆様のご便宜をおはかりするため、宿泊の
お世話をさせていただくことになりました。

期間中は、宿泊可能な施設が限られておりますので、お早めにお申し込みくださいますようお願い申し上げます。

1. 宿泊のご案内

ランク	予定ホテル名	ルームタイプ	料 金
A	シェラトングランデ ホテル&タワーズ	ツイン	28,900(11/15) 朝食付 36,000(11/16, 17) 朝食付
		シングル	24,500(11/15) 朝食付 33,000(11/16, 17) 朝食付
B	ホテルニューツカモト	ツイン	16,500
		ダブル	12,100
		シングル	8,800
C	サンガーデン千葉	シングル	7,500
D	千葉グランドホテル	ツイン	11,000
		シングル	6,000

*上記料金は、1室1泊料金です。

*3-6%の消費税がチェックアウト時に加算されます。

*食事料金は含まれておりません。(シェラトングランデホテル&タワーズは朝食付きとなります。)

2. お申し込み締切日：平成2年10月20日(土)

3. お申し込み・お問い合わせ先

(株)日本不妊学会事務局「(株)アイシーエス企画」

〒103 東京都中央区日本橋2-14-9 加商ビル2F

TEL：03-272-7077

担 当：小松，島村

*お電話をいただき次第、折り返し申込用紙兼用振替用紙をお送り致します。

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、原則として未発表のものに限る。
3. 1 論文は、原則として刷り上り 6 ページ以内とし、超過は 4 ページ(計 10 ページ)までを認める。超過ページならびに特に費用を要する図、表、写真は実費を著者負担とする。
4. 原著、総説、論説、臨床報告などは必ず、400 字以内の和文抄録ならびに、ダブルスペース 2 枚以内の欧文抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付する。
5. 図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。
6. 記述は和文または欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。
 - a. 雑誌の場合
著者名：題名、誌名、巻数：ページ数、年次
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。誌名は規定または慣用の略名に従うこと。特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に括弧で囲む、すなわち
著者名：題名、誌名、巻数(号数)：ページ数、

年次

- 例 1. Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy, Amer. J. Obstet. Gynec., 25: 104, 1933
2. 足高善雄, 竹村 喬, 美並義博: 最近 1 カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察, 日不妊会誌, 4: 13, 1956
- b. 単行本の場合
著者名：著書名、ページ数、発行所、年次
例 1. Rovinsky, J. J. and Guttmacher, A. F.: Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy, 68, Williams & Wilkins Co., 1965
9. 同一著者による論文の掲載は同一号に 1 編のみとする。
10. 著者校正は原則として初校のみ 1 回とする。なお、校正は字句の訂正にとどめる。
11. 原稿の採否、掲載順位その他、編集に関する事項は編集会議で決定する。掲載は原則として受付順にする。
12. 特別掲載を希望する論文は、受付順序によらず、速やかに掲載される。この場合は掲載に要する実費は全額著者負担とし、かつ特別掲載料を納付する。
13. 掲載原稿に対しては、別刷 30 部を贈呈する。これ以上を必要とする場合は、原稿に別刷総部数を朱記する。なお、30 部を越す分についての実費は著者負担とする。
14. 投稿先および諸費用の送付先は、東京都中央区日本橋 2 丁目 14 番 9 号 加商ビル(株)アイシーエス企画内 社団法人 日本不妊学会 事務局とする。

編集会議からのお知らせ

原稿用紙は B 5 判横書き 400 字詰のものを使用し、組版に差支えないよう清書して下さい。ワープロを使用しても結構です。(昭和 62 年 9 月)

ランニング・タイトル(和文で 25 字以内、英文では 40 letters 以内)を記載してください。(昭和 63 年 1 月)

編 集 委 員

百 瀬 和 夫 (委員長)

味 香 勝 也	石 島 芳 郎	遠 藤 克
小 林 俊 文	佐 久 間 勇 次	白 井 将 文
平 川 舜	穂 坂 正 彦	

EDITORIAL BOARD

Kazuo MOMOSE (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA

Yoshiro ISHIJIMA

Tuyoshi ENDO

Toshihumi KOBAYASHI

Yuzi SAKUMA

Masafumi SHIRAI

Shun HIRAKAWA

Masahiko HOSAKA

事務局からのお知らせ

日本不妊学会の業務委託をしている(株)国際会議事務局の社名が(株)アイシーエス企画と変わりました。従って日本不妊学会事務局の住所は下記のとおりになります。

社団法人 日 本 不 妊 学 会

〒103 東 京 都 中 央 区 日 本 橋 2-14-9

加商ビル (株) アイシーエス企画内

(Tel. 03-272-7077)

日本不妊学会雑誌 35巻 3号

1990 年 6 月 25 日 印 刷

1990 年 7 月 1 日 発 行

編集兼発行者 百 瀬 和 夫

印 刷 者 安 永 修

東京都文京区関口 1-43-5

有 限 会 社 ル ー プ 社

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