ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

# JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

*Vol. 36* No.3

July
1991

# 日本不妊学会雑誌

第36巻 第3号

平成3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36回日本不妊学会総会および学術講演会

# (第　3　回　予　告)

第36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**

学術講演会　　1991年11月20日（水)・21日（木）　名古屋国際会議場
理事会・幹事会　1991年11月19日（火）　名古屋ヒルトンホテル
総会・評議員会　1991年11月20日（水）　名古屋国際会議場
総懇親会　　1991年11月20日（水）　名古屋国際会議場

名古屋国際会議場（白鳥センチュリープラザ)
〒456 名古屋市熱田区西町1-1　　TEL　052-683-7711
名古屋ヒルトンホテル　〒451 名古屋市中区栄町1-9-1　　TEL　052-212-1111

**学術講演会**

I　招請講演

1.「世界不妊学会の歴史より学ぶ」
坂元　正一　　国際不妊学会（IFFS）会長
座長　水野　正彦　教授（東京大学　産科婦人科)

2.「細胞同志は認識し合う」
岡田　節人　　前岡崎国立共同研究機構機構長
座長　飯塚　理八　　日本不妊学会理事長

II　特別講演

1.「重症排卵障害における内分泌動態」
花田　征治　助教授（名古屋市立大学　分娩部)
座長　中西　正美　教授（愛知医科大学　産婦人科)

2.「微小穿刺法による生殖管内アンドロジェン微小環境の解明」
山本　雅憲　助手（名古屋大学　泌尿器科)
座長　大島　博幸　教授（東京医科歯科大学　泌尿器科)

3.「哺乳動物生殖系列細胞核の全能性と多能性」
角田　幸雄　教授（近畿大学農学部　畜産学)
座長　入谷　　明　教授（京都大学農学部　畜産学)

III　シンポジウム

「配偶子および初期胚異常の成因をめぐって」
座長　三宅　弘治　教授（名古屋大学　泌尿器科)
廣井　正彦　教授（山形大学　産婦人科)

1. 精巣上体の精子成熟と妊孕能　　三浦一陽（東邦大学　泌尿器科)
2. 精漿と妊孕能　　岩本晃明（聖マリアンナ医科大学　泌尿器科)
3. 精子および卵子の細胞遺伝学的解析　　岡田節男（名古屋市立大学　産科婦人科)
4. 卵子の成熟と環境因子　　菅沼信彦（名古屋大学　産婦人科)
5. 受精卵の染色体異常発現のメカニズム　　佐藤文彦（山形大学　産婦人科)

IV　ワークショップ

『生殖医学の新しい展開』

1.「生殖免疫の最近の知見」
司会　森　崇英　教授（京都大学　婦人科産科)

1) 配偶子の免疫　　香山浩二（兵庫医科大学　産婦人科）
2) 子宮内膜の免疫　　神崎秀陽（京都大学　婦人科産科）
3) 流産の免疫　　青木耕治（名古屋市立大学　産科婦人科）

2.「不妊と最近の感染症」
司会　守殿　貞夫　教授（神戸大学　泌尿器科）
1) 男性不妊と感染症　　岡田　弘（神戸大学　泌尿器科）
2) 膿精液症―多核白血球による精子運動性障害―
前原郁夫，折笠精一（東北大学　泌尿器科）
3) 女性不妊と感染症　　保田仁介（京都府立医科大学　産婦人科）
4) パーコール法による細菌の分離とAIH
佐藤博久（国家公務員共済組合立川病院　産婦人科）

3.「乏精子症／精子無力症の治療」
司会　片山　喬　教授（富山医科薬科大学　泌尿器科）
1) 薬物療法について　　丸田　浩（札幌医科大学　泌尿器科）
2) 精索静脈瘤との関係について　伊藤　晴夫（帝京大学市原病院　泌尿器科）
3) α－ブロッカー療法　大橋　輝久（岡山赤十字病院　泌尿器科）
特別発言　　山本　雅憲（名古屋大学　泌尿器科）
4) 精巣上体精子の応用　寺田　為義（富山医科薬科大学　泌尿器科）

4.「不妊と卵管－新しいアプローチ」
司会　河上　征治　教授（藤田保健衛生大学　産婦人科）
1) 経子宮腔的卵管疎通障害の治療　　長田尚夫（日本大学　産婦人科）
2) 子宮鏡下卵管内人工授精法（HIT法）　杉村和男（慶応義塾大学　産婦人科）
3) 経子宮腔的卵管内視鏡　　澤田富夫（藤田保健衛生大学　産婦人科）
4) 経腟超音波断層法による卵管疎通性の診断　千石一雄（旭川医科大学　産婦人科）

V　一般演題

一般演題の申込みは，1991年7月10日をもちまして締め切らせていただきました．多数のご応募有り難うございました．

演題の採否は会長にご一任願います．

参加申込方法

学会当日会場にて受け付けます．

学会参加費　7,000円
総懇親会費　7,000円

1991年7月

第36回日本不妊学会
会長　八　神　喜　昭

連絡先　　名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室内
第36回日本不妊学会本部
〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
TEL　052-851-5511　内線　2220
FAX　052-842-2269（担当　生田克夫）

（なお，第2回予告の文中，演題送付先：㈱MAコンベンションコンサルティングの電話番号に誤りがあり，ご迷惑をおかけしたことをお詫びいたします）

※ご宿泊，航空券の申込みは本誌第36巻2号の巻末綴じ込み頁をご覧下さい．

日本不妊学会誌

第36巻　第3号

平成3年7月1日

## ——目　　次——

**原　著**

発生初期におけるマウス胚表面のレクチン結合の組織化学的観察……新井吉典・他 …… 1
ラットのセルトリ細胞におけるプロスタグランジン$E_2$の
　免疫組織化学的研究……新村末雄・他 …… 7
ラット胚への大腸菌の付着と着床への影響……田中嘉文・他 …… 11
ラット培養黄体細胞における Gonadotropin-releasing hormone の
　細胞内代謝応答機構……渡辺広史・他 …… 18
Growth hormone のラット卵胞に於けるステロイド産生能（英文）　……臼杵　悊 …… 26
最も簡便，迅速な LH surge 確認テスト
　—クリアプランワンステップテストと視床下部機能検査への応用—……柳沼　悊・他 …… 32
LH・ダイナパック，FSH・ダイナパックの検討と臨床応用 ……竹下茂樹・他 …… 39
ラット卵巣顆粒膜細胞に対する FSH，ジエチルスチルベステロール，
　2－ハイドロキシエストラジオールの作用……伊豫正人 …… 45
黄体中期における血清 CA 125 測定の臨床的意義……永田裕子・他 …… 52
子宮内膜における複合糖質の分布に関する検討……黄　宏駿・他 …… 56
不妊症診療における子宮造影法と子宮鏡検査併用の意義……大高　究 …… 64
シアル酸含有量の異なる2種類の HMG 製剤の臨床効果の比較　……合阪幸三・他 …… 73
Clomiphene 排卵周期における卵胞の形態的変化と内分泌変動との
　関連について—自然排卵周期との比較から—……廣田　穣・他 …… 80
対外受精・胚移植におけるブセレリン併用の意義……谷　啓光・他 …… 87
当院における体外受精・胚移植成績—妊娠・分娩および出生児についての
　検討—……千田　智・他 …… 94
IVF-ET による子宮外妊娠の診断　……山下正紀・他 …… 99
男性不妊患者の体外受精における受精能予測の為の各種精液
　パラメーターの有用性……松井俊彦・他 ……103
多嚢胞性卵巣症候群の治療法に関する考察；bromocriptine は
　多嚢胞性卵巣症候群に有効か……辻　泰二・他 ……110
Polycystic Ovary Syndrome に対する Buserelin-hMG-hCG 療法の
　臨床効果について……竹田　省・他 ……120
多嚢胞性卵巣症候群婦人にみられる糖代謝異常の特徴……木下俊彦・他 ……127
反復流産患者における抗カルジオリピン抗体（抗 CL 抗体）の測定と
　その臨床的意義－抗 CL 抗体測定試薬（MESACUP カルジオリピン
　テスト）を用いて—……青木耕治・他 ……133
Microprolactinoma の長期手術成績
　—不妊患者に対する治療効果について—……広畑泰三・他 ……139

不妊症治療ならびに安胎薬として漢方方剤を投与した分娩200例の予後の
　臨床的研究……假野隆司・他 ……144
幼若雌ラットにおける温経湯の視床下部内LH-FSH，下垂体内LH, RHに
　及ぼす影響について（英文）……小山嵩夫・他 ……153
幼若雌ラットにおける温経湯の卵巣機能への効果について（英文）……下地祥隆・他 ……158
アルコール依存症を伴う無月経婦人のホルモン動態（英文）……石　明寛・他 ……162
男性不妊症の評価におけるSperm Penetration Assayの有用性に
　関する検討……福田　勝・他 ……168
特発性乏精子症患者における精細管内テストステロン濃度の臨床的検討……大枝忠史・他 ……174
視床下部―下垂体―精巣系の老化　第一報：視床下部機能の老化の研究……三熊直人・他 ……180
精子自動分析装置による精液検査……始関吉生・他 ……187
前立腺機能の指標としての前立腺液中polyamine濃度の検討 ……立木　仁・他 ……192
男子不妊症における9番染色体腕間逆位について（英文）……松田公志・他 ……198
男子不妊症患者における加水分解曲線解析法を用いた精子DNAの検討
　―第二報：妊孕力評価の試み―……山本秀和・他 ……204
Y:Y転座［46,X,t(Y;Y)］を認めた尿道下裂の一例 ……谷村正信・他 ……209
男子不妊症に対するツムラ補中益気湯の効果……真鍋文雄・他 ……215
前立腺感染症による男性生殖付属腺の分泌能低下が
　妊孕性に及ぼす影響（英文）……ニコラオス・ソフィキティス・他 ……222
**地方部会講演抄録**……232

Japanese Journal of Fertility and Serility

(Vol. 36, No. 3, 1991)

Japan Society of Fertility and Sterility

# CONTENTS

**Originals**

Histochemical Observations of Lectin-bindings on the Cell-surfaces of Preimplantation Mouse Embryos ····· *Y. Arai, I. Yotsutani, S. Niimura & K. Ishida* ····· 1

Immunohistochemical Studies of Prostaglandin $E_2$ in Rat Sertoli Cells ····· *S. Niimura, I. Yotsutani & K. Ishida* ····· 7

Adherence of *Escherichia coli* to Rat Embryo and its Effect on Implantation ····· *Y. Tanaka, T. Fukuyasu & K. Ashida* ····· 11

Mechanism of Phospholipase $A_2$ Activation Mediated through the Gonadotropin-releasing Hormone Receptor in Cultured Rat Iuteal Cells ····· *H. Watanabe, H. Fukue, H. Yamamoto, T. Endo, S. Tanaka & M. Hashimoto* ····· 18

Direct Effect of Growth Hormone on Steroidogenesis by Ovarian Follicles ····· *S. Usuki* ····· 26

Detection of LH Surge by Clearplan One Step— the Easiest and Most Rapid Method ····· *T. Yaginuma, T. Okamura, O. Nishii & T. Takeuchi* ····· 32

Clinical Application of LH and FSH DAINAPACK ····· *S. Takeshita, T. Ohkawa, K. Itabashi, S. Yoshimura, T. Murase, S. Okinaga & K. Arai* ····· 39

The Effect of FSH, Diethylstilbesterol and 2-Hydroxyestradiol on Steroidogenesis in Cultured Rat Granulosa Cells ····· *M. Iyo* ····· 45

Clinical Significance of the Measurement of Serum CA 125 During Midluteal Phase ····· *H. Nagata, K. Takahashi, K. Yoshino, T. Shirai & M. Kitao* ····· 52

Glycoconjugate Distribution in Normal Human Endometrium ····· *H. J. Huang, A. Fujishita, M. Kawano, T. Ishimaru & T. Yamabe* ····· 56

Combination of Hysterography and Hysteroscopy for Sterility Investigation ····· *K. Ohtaka* ····· 64

Comparison of Clinical Effect of the Two Types of Human Menopausal Gonadotropins (HMG) Which Contain Different Quantities of Sialic Acid ····· *K. Aisaka, S. Kaneda, H. Tsuzuki, Y. Toriya, M. Nojima, K. Kokuho & K. Yoshida* ····· 73

Relationship between Hormonal Dynamics and Follicle Growth in Patients Treated with Clomiphene Citrate —Comparison with Normal Ovulatory Cycles— ····· *Y. Hirota, T. Yoshimura, M. Shiraki, T. Kamiya, T. Sawada, S. Kawakami, M. Fukushima & Y. Yoshimura* ····· 80

Significance of the Routine Use of Buserelin in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer ····· *H. Tani, K. Shichiri, H. Hirasawa, T. Kurabayashi, K. Oda, O. Arakawa & K. Tanaka* ····· 87

Perinatal Outcome after IVF-ET at Our Hospital ···*S. Chida, Y. Odawara, S. Mori, M. Hiruta, S. Iida, M. Suzuki, I. Tachibana & N. Takeda* ····· 94

A Diagnosis of Ectopic Pregnancy from IVF-ET ····· *M. Yamashita, E. Takashima, Y. Kitaoka, Y. Noda & T. Mori* ····· 99

Value of the Semen Characteristics for Predicting Fertilizing Capacity in In Vitro Fertilization in Patients with Male Infertility ····· *T. Matsui, H. Kodama, M. Kato, K. Sekine, S. Takeda & M. Maki* ·····103

A Study of the Treatment of the Poly-Cystic Ovary Syndrome (PCOS); Whether Bromocriptine is Effective for the PCOS or not ? ····· *T. Tsuji, M. Nishida & H. Iwasaki* ·····110

Buserelin-hMG-hCG Therapy for Ovulation Induction in Infertile Women with Polycystic Ovary Syndrome ····· *S. Takeda, Y. Iinoh, K. Kinoshita & S. Sakamoto* ·····120

Characterization of Carbohydrate Metabolism with Polycystic Ovarian Syndrome ····· *T. Kinoshita, J. Kato* ·····127

Anti-cardiolipin Antibody in Patients with Recurrent Fetal Loss; Measured by Mesacup cardiolipin test ····· *K. Aoki, Y. Hayashi, Y. Hirao, Y. Ozaki, S. Kajiura, M. Mizuno, T. Mizuno, M. Yoshikawa, T. Kimbara & Y. Yagami* ·····133

Surgical Results of Microprolactinoma —On Surgical Outcome of Infertile Patients— ····· *T. Hirtohata, T. Uozumi, K. Mukada, T. Yano & J. Onda* ·····139

Clinical Study of Prognosis of 200 Deliveries after Kampo-treatment for Ovarian Dysfunctional Infertilities and Tocolysis ····· *T. Kano, C, Ito, H. Kasamatsu & Y. Miyawaki* ·····144

Effect of Unkeito on Hypothalamic LH-RH, Pituitary LH and FSH in Immature Female Rats ····· *T. Koyama, Y. Shimoji, M. Ohara, T. Yaguchi & T. Aso* ·····153

Effect of Unkeito on Ovarian Function
in Immature Female Rats ····· *Y. Shimoji, T. Koyama, M. Ohara, T. Yaguchi & T. Aso* ·····158
Hormones in Amenorrheic Women
with Alcoholics ····· *M. Seki, K. Yoshida & Y. Okamura* ·····162
Sperm Penetration Assay in Evaluation for Male Infertility ····· *M. Fukuda, M. Iida, H. Takeuchi & M. Takada* ·····168
A Clinical Study on Intratubular Testosterone Levels in Patients
with Idiopathic Oligozoospermia ····· *T. Oheda, S. Yamane, M. Yoshida, H. Ohmori, A. Nagai, T. Ohashi, Y. Yamashita & S. Irie* ·····174
The Aging of Hypothalamo-Pituitary-Testicular Axis, I:Hypothalamic
Function in Male Senescence ····· *N. Mikuma, Y. Kumamoto & H. Maruta* ·····180
Semen Analysis using an Automated Semen Analyzer ····· *Y. Shiseki, H. Sumiya, M. Takahara, T. Kotake & J. Shimazaki* ·····187
Prostatic Fluid Polyamine Levels as a Marker
of Prostatic Function ····· *H. Tachiki, Y. Kumamoto, A. Nanbu, N. Itoh, N. Mikuma, Y. Takagi, T. Tsukamoto, H. Maruta & N. Ohsawa* ·····192
Pericentric Inversion of Chromosome 9 in Male Infertility ····· *T. Matsuda, Y. Horii, M. Nonomura, O. Yoshida & K. Hayashi* ·····198
A Study of Sperm DNA in Infertile Men Using Hydrolysis
Curve Analysis Method —The Second Report:
Application to Evaluate Fertility — ····· *H. Yamamoto, K. Naito, H. Hisazumi, K. Hashimoto, N. Miyoshi & M. Fukuda* ·····204
A Case of Y; Y Translocation Mosaicism
with Hypospadia ····· *M. Tanimura, M. Morioka, Y. Sen, Y. Yamamoto, Y. Fujita & Y. Shiraishi* ·····209
Effect of Tsumura Hochuekitoh on Male Infertility ····· *F. Manabe, S. Yoshii, H. Ishikawa & K. Koiso* ·····215
Secretory Dysfunction of the Male Accessory Genital Glands Due
to Prostatic Infections and Fertility; a Selected Review
of the Literature ····· *N. Sofikitis & I. Miyagawa* ·····222

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 発生初期におけるマウス胚表面のレクチン結合の組織化学的観察

# Histochemical Observations of Lectin-bindings on the Cell-surfaces of Preimplantation Mouse Embryos

新潟大学農学部畜産学科

新井吉典 Yoshinori ARAI　四谷伊公子 Ikuko YOTSUTANI　新村末雄 Sueo NIIMURA

石田一夫 Kazuo ISHIDA

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

胚盤胞期までのマウス胚についてレクチン結合を組織化学的に観察し，胚表面における複合糖質の発生過程に伴う変化を調べた．

ＬＰＡの結合はいずれの時期の胚表面にもみられなかったが，PNA, GS-Ⅰ, DBA, SBA, BPA, MPA, WGA およびCon Ａの結合は，すべての時期の胚表面に弱度から強度に認められた．ＧＳ-Ⅱの結合は，桑実胚期までの胚表面には認められたが，胚盤胞の表面ではみられなかった．また，ＵＥＡ-Ⅰの結合は，８細胞胚と桑実胚の表面および胚盤胞の栄養膜細胞の表面にのみ弱く観察された．

以上の結果から，発生初期のマウス胚表面には常にガラクトース，Ｎ－アセチルガラクトサミン，Ｎ－アセチルグルコサミンあるいはマンノースを含む複合糖質が存在しているが，シアル酸を含むものは存在せず，また，フコースを含有するものは８細胞期から胚盤胞期までの胚に存在することが推察された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 469—474, 1991)

## 緒　言

一般に，哺乳動物の細胞表面にはタンパク質あるいは脂質と結合した複合糖質が存在しており，細胞の保護や物質の取り込みに役割を果たしていると考えられていた．しかし近年，細胞表面の複合糖質は，細胞の分化，加齢および悪性化の過程で変化することがレクチン，糖鎖に対する抗体などを用いた研究で明らかにされ，細胞間の認識や組織形成などにも役割を果たしているといわれている[1~5]．したがって，細胞表面の複合糖質は従来考えられていた以上に重要な細胞生理学的役割を果たしているものと思われる．

レクチンは，特定の糖と特異的に結合する部位を複数有するタンパク質で[6]，これに蛍光色素，フェリチンあるいは酵素などを標識したものを用いて，細胞表面の複合糖質の変化を調べることが組織化学的に可能になってきている[1~5]．哺乳動物の発生初期胚においても，胚表面の複合糖質の変化がレクチンを用いてハムスター[7]とマウス[8~19]で組織化学的に調べられている．すなわち，ハムスター[7]ではCon A, RCA-ⅠおよびWGA の結合が，マウス[8~19]ではPNA, DBA, SBA, SJA, BPA, WFA, VVA, HPA, Con A およびWGA の結合が胚の発生過程（１細胞期から胚盤胞期まで）で強さに変化はみられるものの，常に観察されることが報告されている．さらに，マウスでは，LTA と FBP は８細胞期から胚盤胞期までの胚に[15~17,19]，ＬＰＡは受精未分割卵と胚盤胞に[18,19]それ

ぞれ結合するという．また，発生過程を通して観察されてはいないが，マウス胚ではRCA-I，RCA-II，MPAおよびGS-IIの結合も認められるといわれている[12,13,19]．しかし，マウス胚において，GS-IとUEA-Iについては研究者によって結合が認められる発生時期が異なっており[11,15~19]，特にＧＳ－Ｉでは発生過程を通して全く結合が観察されなかったと述べている研究者もいる[11]．また，ＤＢＡについては研究者間で結合の強さに相違がみられる[10,13,14,16,17]．

このように，初期胚の表面にみられる複合糖質の変化が多くの種類のレクチンを用いて調べられているが，従来の観察では，胚をそのまま用いて蛍光色素を標識したレクチンによって結合の変化を調べているものが多い[7,8,10~18]．しかし，この方法では多くの割球からなる分割胚や胚盤胞について，レクチン結合の局在と強さを正確に把握することは難しい．また従来は，胚盤胞の内細胞塊細胞のレクチン結合は，免疫外科的に胚盤胞から分離して観察されている[14~16]．したがって，同じ胚盤胞の栄養膜細胞と内細胞塊細胞のレクチン結合については現在までのところ調べられていない．

本研究は，マウスの卵と胚のパラフィン切片について，パーオキシダーゼを標識したPNA, GS-Ⅰ, DBA, SBA, BPA, WGA, Con A, UEA-ⅠおよびLPAを用いて，未受精期から胚盤胞期までの卵と胚の表面におけるこれらレクチンの結合を組織化学的に観察し，さらに発生過程を通しては調べられていないGS-IIとMPAの結合についても観察したものである．

## 材料および方法

供試動物として，ＩＣＲ系の成熟マウス50匹を使用した．マウスの飼育は24℃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．これらの雌に，PMSG（セロトロピン，帝国臓器）とhCG（ゴナトロピン，帝国臓器）それぞれ5 I.U.を48時間間隔で腹腔内に注射して過排卵を誘起し，1細胞卵（未受精期）採取の場合を除き，hCG注射後直ちに同系統の成熟雄と交配させた．

観察した卵と胚の発生時期とhCG注射後の時間は次の通りである．すなわち，1細胞卵（未受精期）はhCG注射後24時間，2細胞胚は48時間，4細胞胚は60時間，8細胞胚は67時間，桑実胚は80時間，胚盤胞は96時間のものである．

卵と胚におけるレクチン結合を観察するために，各発生時期の卵あるいは胚が入っている卵管と子宮をそれぞれの時間に採取し，ブアン液で固定後パラフィンに包埋して7 μmの連続切片を作成した．レクチン結合の観察は，これらのパラフィン切片について，パーオキシダーゼを標識したレクチンを用いて直接法で行った．すなわち，切片からパラフィンを除去した後，0.1％のウシ血清アルブミン（BSA, Sigma, U. S. A.）を含むリン酸緩衝塩類溶液[20]（PBS, pH7.4)(BSA-PBS）に室温で30分間浸漬した．次いで，切片をPBSで洗浄し，BSA-PBS 1ml中に100μgのレクチンを含む液に室温で30分間浸漬した．使用したレクチンは，PNA, GS-Ⅰ, DBA, SBA, BPA, MPA, GS-II, WGA, Con A, UEA-ⅠおよびLPAで，いずれもE-Yラボラトリーズ（U. S. A.）から購入したものである．浸漬切片はＰＢＳで洗浄し，0.02％のジアミノベンチジン（ＤＡＢ，半井化学）を含むＰＢＳ（DAB-PBS）に室温で10分間浸漬した後，さらに，5％$H_2O_2$を100 μl含む100mlのDAB-PBSに室温で10分間浸漬した．一方対照として，レクチンを含むBSA-PBSのかわりにBSA-PBSのみで処置した切片と，0.2 Mの阻害糖を含む液で前処置した後0.2 Mの阻害糖とレクチンを含むBSA-PBSに浸漬した切片を用いた．なお阻害糖として，PNAとGS-Ⅰに対してはD-ガラクトース（Fluka Biochemika, Switzerland），DBA, SBA, BPAおよびMPAに対してはN-アセチル-D-ガラクトサミン（和光純薬），ＧＳ－ⅡとＷＧＡに対してはN-アセチル-D-グルコサミン（和光純薬），Con Aに対してはα-メチル-D-マンノシド（Fluka Biochemika），ＵＥＡ－Ⅰに対してはL-フコース（Fluka Biochemika），ＬＰＡに対してはN-アセチルノイラミン酸（ナカライテスク）をそれぞれ使用した．このように処置した切片は脱水後バルサムで封入し，光学顕微鏡下で観察した．

## 結　果

パーオキシダーゼを標識したPNA, GS-Ⅰ, DBA, SBA, BPA, MPA, GS-II, WGA, Con AあるいはUEA-Ⅰでマウスの卵と胚のパラフィン切片を処置してＤＡＢ液に浸漬すると，これらのレクチンの結合を示すベンチジンの褐色反応産物が卵と胚の表面に認められたが（図1，2），ＬＰＡで処置してＤＡＢ液に浸漬しても反応産物は全く観察されなかった．反応産物はレクチンを含まないBSA-PBSで処置した卵と胚では全くみられなかった．さらに，阻害糖を含む液で処置した卵と胚では，反応産物は全くみられないか，著しく少なかった（図3）．したがって，これらのレクチン結合は特異的であり，反応産物の量がレクチン結合の強さを示していることが確かめられた．

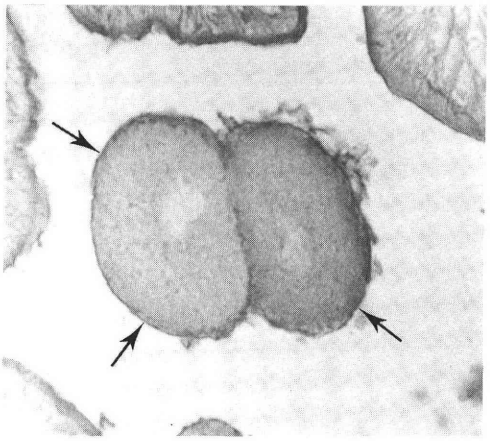


Fig. 1 A 2-celled mouse embryo treated with WGA. Brown products (arrows) showing lectin-bindings are seen on the cell-surface of each blastomere. ×400.

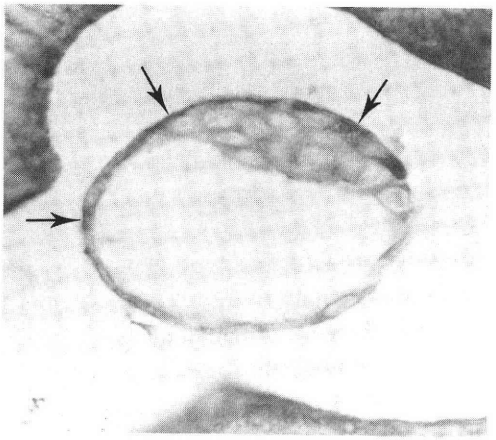


Fig. 2 A mouse blastocyst treated with BPA. Brown products (arrows) are seen on the cell-surfaces of trophoblast cells, but not on those of inner-cell-mass cells. ×400.

未受精期から胚盤胞期までのマウスの卵と胚の表面において，レクチン結合の強さを示す成績は表1の通りである．すなわち，PNA, GS-I, SBA および WGA の結合は，桑実胚期までの卵と胚および胚盤胞の栄養膜細胞の表面では強かったが(図1)，胚盤胞の内細胞塊細胞の表面では弱かった．DBAの結合は，上記のレクチンに似た変化を示したが，胚盤胞の栄養膜細胞の表面では弱かった．BPAとMPAの結合は，8細胞期までは強かったが，桑実胚で弱まり，胚盤胞では栄養膜細胞にのみ弱く認められた(図2)．Con A の結合は，桑実胚期までの卵と胚および胚盤胞の栄養膜細胞では弱かったが，内

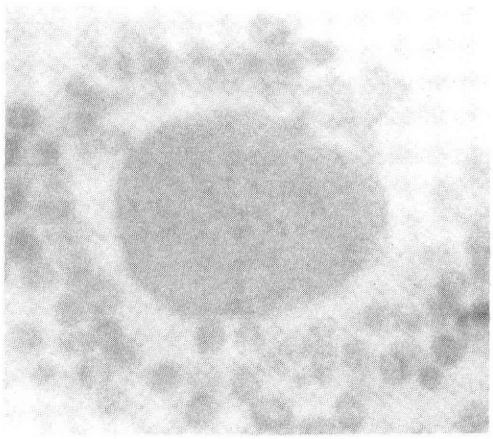


Fig. 3 A control 1-celled mouse egg treated with both GS-II and its inhibiting monosaccharide, N-acetyl-D-galactosamine. No brown products are seen on the surface of an egg. ×400.

細胞塊細胞にはみられなかった．GS-IIの結合は，4細胞期までは弱かったが，8細胞胚では強くなり，桑実胚で再び弱くなって，胚盤胞では観察されなくなった．UEA-Iの結合は，4細胞胚まではみられなかったが，8細胞胚，桑実胚および胚盤胞の栄養膜細胞に弱く観察され，内細胞塊細胞にはみられなかった．LPAの結合はいずれの発生時期においてもみられなかった．

## 考　察

これまでに，マウスの初期胚表面については RCA-I, RCA-II, PNA, GS-I, MPA, DBA, SBA, SJA, BPA, WFA, VVA, HPA, Con A, WGA, GS-II, LTA, UEA-I, FBP および LPA の結合が組織化学的に調べられている[8~19]．これらの観察は多数の研究者によって試みられているが，結合がみられる発生時期や結合の強さに関して研究者間で相違がみられる．本実験の結果を従来の報告と比較すると，PNA, SBA および Con A については，結合の強さに相違はあるが，発生過程における結合の変化には相違がなかった．しかし，GS-I, DBA, BPA, WGA, UEA-I および LPA については，発生過程における結合の変化に若干相違がみられた．MPA と GS-II については，本実験において初めて発生過程を通して結合が観察されたが，MPAの結合は，未受精卵から8細胞胚まで強かったが桑実胚では弱まり，胚盤胞では栄養膜細胞にのみみられた．また，GS-IIの結合は，未受精卵から4細胞胚までは弱かったが8細胞胚では強まり，桑実胚で再び弱まって胚盤胞では消失し

Table 1　Intensity of lectin-bindings in the surfaces of preimplantation mouse embryos.

| Lectins | Developmental stages | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Blastocyst | |
| | 1-Cell | 2-Cell | 4-Cell | 8-Cell | Morula | Trophoblast cell | Inner-cell-mass cell |
| PNA | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| GS-I | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| SBA | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| WGA | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| DBA | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + |
| BPA | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | − |
| MPA | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | − |
| Con A | + | + | + | + | + | + | − |
| GS-II | + | + | + | ++ | + | − | − |
| UEA-I | − | − | − | + | + | + | − |
| LPA | − | − | − | − | − | − | − |

−：Negative, ＋：weak, ＋＋：strong

た．このMPAとGS-IIの結合についても，4細胞期から桑実胚期までのマウス胚で蛍光色素を標識したレクチンを用いて観察したKimber and Birdの結果[13]と比べると，結合の強さに相違がみられた．従来，結果の相違の原因については，使用したレクチンの調整法の不備やマウスの系統の相違によるものであろうと考察されているが[8,19]，それらよりはむしろレクチンに標識した物質の違いによるものと考えられる．すなわち，本実験でレクチンの標識に用いたパーオキシダーゼの方が，従来の蛍光色素に比べ局在や強さをより正確に把握できるものと思われる．

本実験において，初期発生の過程では結合の強さに変化がみられたが，PNA, GS-I, DBA, SBA, BPA, MPA, WGAおよびCon Aの結合は常に認められたことから，マウスの初期胚の表面には，ガラクトース，N-アセチルガラクトサミン，N-アセチルグルコサミンあるいはマンノースを常に含む複合糖質が存在することが示唆される．なお，WGAと同様にN-アセチルグルコサミンに親和性のあるGS-IIは，WGAと異なり胚盤胞には結合しなかったので，胚盤胞ではN-アセチルグルコサミンを含んでいる複合糖質でもレクチンに対する親和性に相違のあることが推察される．また，8細胞期から胚盤胞期までの胚にはUEA-Iが結合したことから，この時期の胚表面には上述の複合糖質のほかに，フコースを含む複合糖質も存在していることが推察された．一方，LPAの結合は全くみられなかったので，マウス胚表面にはシアル酸を含む複合糖質は存在しないことがうかがわれた．

これまでに，哺乳動物の胚盤胞の内細胞塊細胞におけるレクチン結合の観察は，免疫外科的に胚盤胞から分離したものを用いて行われているのみで[9,14~16]，同一胚盤胞について栄養膜細胞と内細胞塊細胞のレクチン結合を調べた報告はみられない．したがって，本実験において，栄養膜細胞と内細胞塊細胞におけるレクチン結合を初めて同一マウス胚盤胞について観察したことになるが，GS-IIとLPAはどちらの細胞にも結合しなかったが，BPA, MPA, Con AおよびUEA-Iは栄養膜細胞のみに，PNA, GS-I, DBA, SBAおよびWGAはどちらの細胞にも結合した．また，PNA, GS-I, DBA, SBAおよびWGAにおいては，DBAの結合の強さは両種細胞の間に相違はなく，ともに弱かったが，それ以外のレクチンの結合は，すべて内細胞塊細胞に比べ栄養膜細胞の方が強かった．これらのことから，マウス胚盤胞の内細胞塊細胞の表面にはガラクトース，N-アセチルガラクトサミンあるいはN-アセチルグルコサミンを含む複合糖質が存在することが示唆されたが，マンノース，フコースおよびシアル酸を含むものは存在しないことが推察された．また，内細胞塊細胞表面に存在するこれらの複合糖質の量は，栄養膜細胞の表面のものに比べると少ないことが推定された．これらの結果は，胚盤胞を構成する2種類の細胞，すなわち栄養膜細胞と内細胞塊細胞の相違が表面の複合糖質のレベルでも起こっていることを示している．

従来，胚盤胞から分離したマウスの内細胞塊細胞

には，GS-I，DBA, SJA, BPA, WFA, VVA, HPA, Con A, WGA, LTA およびFBPが結合することが報告されている[9,14~16]．本実験では，内細胞塊細胞にPNA, GS-I，DBA, SBA およびWGAが結合することが確認され，BPA およびCon Aの結合は栄養膜細胞ではみられたが，内細胞塊細胞では全くみられなかった．このBPA とCon Aについての結果の相違については，免疫外科的に分離した内細胞塊細胞の表面には溶解した栄養膜細胞の残存物が付着しているといわれているので[19]，これがBPA とCon Aの結合を生じさせたものと思われる．

哺乳動物の初期胚の表面に存在する複合糖質は，胚のコンパクションや胚盤胞の着床に役割を果たしていると考えられている．すなわち，マウスの8細胞胚の表面にはガラクトース，N-アセチルグルコサミンおよびフコースを含む複合糖質（SSEA-I）が出現し[21]，これが内因性の受容体と結合することによって，割球同士が認識し合い，コンパクションが起こると考えられている[22]．本実験において，ガラクトース，N-アセチルグルコサミンおよびフコースに親和性のあるPNA, GS-I，GS-II, WGA, UEA-Iのうち，GS-IIは8細胞胚で結合が強まり，UEA-Iは8細胞胚に結合がみられるようになった．このことから，マウスの8細胞胚では，N-アセチルグルコサミンを含む複合糖質の増加と，フコースを含む複合糖質の出現が示唆される．ガラクトースを含む複合糖質の変化は認められなかったが，N-アセチルグルコサミンまたはフコースを含む複合糖質が8細胞期で顕著な変化を示すことは，従来いわれているように，この複合糖質がその後に起こるコンパクションに関与していることがうかがわれる．

一方，胚盤胞の表面に存在するN-アセチルガラクトサミンを含む複合糖質は，桑実胚期までの胚に比べると減少しており，着床直前のものにはみられなくなるが，着床を遅延させた胚盤胞では再現するといわれている[23]．したがって，胚盤胞の着床には，胚表面の複合糖質からN-アセチルガラクトサミンが消失するか遮蔽されることが必要であると考えられている[23]．本実験の胚盤胞においても，SBAの結合は桑実胚までと変わらなかったが，DBA, BPA およびMPA の結合が低下したことから，胚盤胞表面におけるN-アセチルガラクトサミンを含む複合糖質の減少は，着床に対する準備のための変化と推察される．

## 文　献


1）平野　寛，川上速人：レクチン，実験組織化学，横山正夫，川生　明，平野　寛編，500，丸善，1987

2）平野　寛：細胞膜の構造とトランスメンブラン・コントロール，最新医学，35：724，1980

3）箱守仙一郎：細胞表面複合糖質と細胞認識，細胞認識と動物レクチン，大沢利昭編，1，講談社，1982

4）入村達郎：レクチンの組織化学的応用，レクチンと細胞生物学，大沢利昭編，128，講談社，1985

5）入村達郎，中島元夫：レクチンの腫瘍生物学への応用，レクチンと細胞生物学，大沢利昭編，171，講談社，1985

6）Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N.: What should be called a lectin? Nature, 285: 66, 1980

7）Yanagimachi, R. and Nicolson, G. L.: Lectin-binding properties of hamster egg zona pellucida and plasma membrane during maturation and preimplantation development, Exp. Cell Res., 100: 249, 1976

8）Brownell, A. G.: Cell surface carbohydrates of preimplantation embryos as assessed by lectin binding, J. Supramol. Struct., 7: 223, 1977

9）Konwinski, M., Vorbrodt, A., Solter, D. and Koprowski, H.: Ultrastructural study of Concanavalin-A binding to the surface of preimplantation mouse embryos, J. Exp. Zool., 200: 311, 1977

10）Fujimoto, H., Muramatsu, T. and Urushihara, H.: Receptors to *Dolichos biflorus* agglutinin. A new cell surface marker common to terato carcinoma cells and preimplantation mouse embryos, Differentiation, 22: 59, 1982

11）Wu, T.-C., Wan, Y.-J. and Damjanov, I.: Fluorescein-conjugated *Bandeiraea simplicifolia* lectin as a marker of endodermal, yolk sac, and trophoblastic differentiation in the mouse embryo, Differentiation, 24: 55, 1983

12）Wu, T.-C., Lee, M.-C., Wan, Y.-J. and Damjanov, I.: Lectin binding sites of the mouse ovary, intraovarian and ovulated ova, Histochemistry, 80: 527, 1984

13）Kimber, S. J. and Bird, J. M.: Cell surface changes in preimplantation mouse embryos during compaction investigated using FITC conjugated lectins after proteolytic enzyme treatment, Roux's Arch. Dev. Biol., 194: 470, 1985

14）Sato, M. and Muramatsu, T.: Reactivity of five N-acetylgalactosamine-recognizing lectins with preimplantation empryos, early post implantation embryos, and teratocarcinoma cells of the mouse, Differentiation, 29: 29, 1985

15）Sato, M., Yonezawa, S., Uehara, H., Arita, Y., Sato, E. and Muramatsu, T.: Differential distribution of receptors for two fucose-binding lectins in embryos and adult tissues of the mouse, Differentiation, 30: 211, 1986

16) Dealtry, G. B. and Sellens, M. H.: Lectin receptors on the peri -and early post-implantation mouse embryo, Roux's Arch. Dev. Biol., 196: 59, 1987
17) Dealtry, G. B., Curry, M. R. and Sellens, M. H.: Fucosylated glycoconjugates appear on mouse embryos during blastocyst formation, J. Exp. Zool., 243: 163, 1987
18) Lee, S. H., Ahuja, K. K., Gilburt, D. J. and Whittingham, D. G.: The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization, Development, 102: 595, 1988
19) Kimber, S. J.: Glycoconjugates and cell surface interactions in pre- and peri-implantation mammalian embryonic development, Int. Rev. Cytol., 120: 53, 1990
20) Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, J. exp. Med., 99: 167, 1954
21) Solter, D. and Knowles, B. B.: Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1), Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 5565, 1978
22) Bird, J. M. and Kimber, S. J.: Oligosaccharides containing fucose linked $\alpha$ (1-3) and $\alpha$ (1-4) to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae, Dev. Biol., 104: 449, 1984
23) Chavez, D. J. and Enders, A. C.: Lectin binding of mouse blastocysts: Appearance of *Dolichos* biflorus binding sites on the trophoblast during delayed implantation and their subsequent disappearance during implantation, Biol. Reprod., 26: 545, 1982

## Histochemical observations of lectin-bindings on the cell-surfaces of preimplantation mouse embryos

Yoshinori Arai, Ikuko Yotsutani, Sueo Niimura and Kazuo Ishida

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

Histochemically to demonstrate the lectin-bindings on the cell-surfaces of preimplantation mouse embryos, peroxidase-conjugated lectins were applied to the glycoconjugates on the cell-surfaces of the embryos and the changes were examined at each developmental stage.

Treated with PNA, GS-I, DBA, SBA, BPA, MPA, WGA or Con A, brown products showing lectin-bindings came to be observed on the cell-surfaces of all the eggs and embryos at the stages of unfertilized 1-cell through blastocyst, but those showing LPA-binding did not appear. The brown products showing GS- II bindings were observed limitedly on the cell-surfaces of the eggs and embryos at the stages of unfertilized 1-cell through morula, and those showing of UEA-I bindings at the stages of 8-cell through blastocyst.

These results suggest that glycoconjugates on the cell-surfaces of mouse eggs and embryos always contain galactose, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine or mannose, but no sialic acid. Aside from the above mentioned monosaccharides, fucose was found optionally to exist at the stages of 8-cell through blastocyst.

(受付：1990年12月3日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# ラットのセルトリ細胞における プロスタグランジン$E_2$の免疫組織化学的研究

# Immunohistochemical Studies of Prostaglandin $E_2$ in Rat Sertoli Cells

新潟大学農学部畜産学科
新村末雄　四谷伊公子　石田一夫
Sueo NIIMURA　Ikuko YOTSUTANI　Kazuo ISHIDA

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

生後0，10，20，30および60日のウイスター系ラットの精巣から分離したセルトリ細胞について，プロスタグランジン（PG）$E_2$の検出を間接蛍光抗体法を用いて免疫組織化学的に行い，セルトリ細胞における$PGE_2$の存在について調べた．また，培養したセルトリ細胞を用いてこの細胞のPG合成能を検討した．

各日齢のラットから分離したセルトリ細胞において，$PGE_2$の存在を示す特異蛍光はすべての細胞の細胞質全域に弱く観察された．また，インドメサシンを含まない培養液で培養したセルトリ細胞においては，$PGE_2$の蛍光は分離直後の細胞のものと同様に弱く出現したが，75 $\mu$Mのインドメサシンを含む培養液で培養したセルトリ細胞では，$PGE_2$の蛍光は著しく弱まるか，または消失した．

これらのことから，出生直後から生後60日までのラットのセルトリ細胞は常に$PGE_2$を含有しており，この$PGE_2$はセルトリ細胞自身が合成したものであることが推察された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 475—478, 1991)

## 緒　言

哺乳動物の精巣にプロスタグランジン（PG）が存在することは，CarpenterとWiseman[1]によって1970年に初めて報告された．すなわち，彼らはラット精巣が$PGE_1$と$PGF_{2\alpha}$を含有することを生化学的に確かめ，これらのPGは精巣で合成されたものであろうと推察した．その後，ブタ精巣[2]には$PGE_1$，$PGE_2$，$PGF_{1\alpha}$および$PGF_{2\alpha}$が，ラット精巣[3]には$PGE_1$と$PGF_{2\alpha}$のほかに$PGE_2$も存在することが生化学的に確かめられている．また，精巣におけるPGの合成能についてはEllisら[4]が調べており，6ないし8週齢のラット精巣のホモゲネート中にPG合成酵素活性が存在することを確かめている．

一方，精巣セルトリ細胞におけるPGの存在と合成能については，CooperとCarpenter[5]およびCooperとRatzlaff[6]が1980年と1984年にそれぞれ調べている．すなわち，CooperとCarpenter[5]は生後20日のラット精巣から分離したセルトリ細胞がPGEと6-keto-$PGF_{1\alpha}$を含有しており，インドメサシンを含む培養液で培養したセルトリ細胞のPG含量は著しく低いことをラジオイムノアッセイ（RIA）を用いて調べている．また，CooperとRatzlaff[6]は生後20日と成熟ラットの精巣から分離したセルトリ細胞を用いて，PG合成能をRIAによって調べている．その結果，生後20日と成熟ラットの精巣から分離したセルトリ細胞では，アラキドン酸から$PGE_2$を合成すること，また，成熟動物のものでは$PGE_2$のほかに$PGF_2$と$PGI_2$も合成することを確認している．また，彼ら[6]は，これらのPGの合成能は生後20日のラットに比べ成熟ラットが10倍高いことも報告している．

このように，セルトリ細胞が各種のＰＧを含有しており，その合成能も持っていることが研究されているが，これまでにＰＧが検出されているセルトリ細胞は上述のように生後20日と成熟ラットの精巣から分離されたもののみで，出生直後から生後20日までのラットのセルトリ細胞がＰＧを含有しているかどうかは不明である．

本研究は，出生直後から生後60日までのラットの分離直後のセルトリ細胞について，ＰＧＥ$_2$の検出を間接蛍光抗体法を用いて免疫組織化学的に行い，セルトリ細胞におけるＰＧＥ$_2$の存在を調べるとともに，培養セルトリ細胞を用いてこの細胞のＰＧ合成能を検討したものである．

## 材料および方法

供試動物として，ウイスター系雄ラットを用いた．ラットの飼育は24℃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．

セルトリ細胞は生後0，10，20，30および60日のラットの精巣からSteinbergerらの方法[7]に準じて分離した．なお，出生直後と生後10日のラットの精巣については，上述のSteinbergerらの方法[7]からトリプシン処理を除いた方法でセルトリ細胞を分離した．また，セルトリ細胞におけるＰＧ合成能を検討するために，上述の方法によって分離した各日齢のセルトリ細胞の一部を，75 $\mu$Mのインドメサシン(Sigma, U. S. A.）を含むイーグルのＭＥＭ（日水製薬）を用いて，37℃でＣＯ$_2$ 5％，空気95％の気相下で8日間培養した後，ＰＧＥ$_2$の検出を試みた．なお，対照としては，インドメサシンを含まずエタノールを0.1％含むＭＥＭで8日間培養したセルトリ細胞を用いた．このような分離直後と培養したセルトリ細胞は，リン酸緩衝塩類溶液[8] (PBS, pH7.4）で洗浄した後，10％のホルマリンを含むＰＢＳで室温で60分間固定した．

ＰＧＥ$_2$の検出は間接蛍光抗体法を用いて行った．すなわち，固定したセルトリ細胞をＰＢＳで洗浄した後，ＰＢＳで400倍に希釈したウサギ抗ＰＧＥ$_2$血清（Transformation Research, U. S. A.）に4℃で一晩浸漬した．使用した抗ＰＧＥ$_2$血清の交差性は，ＰＧＥ$_2$が100％，ＰＧＡ$_1$が6.0％，ＰＧＡ$_2$が3.0％，ＰＧＦ$_{2\alpha}$とＰＧＢ$_2$が2.0％，ＰＧＤ$_2$，ＰＧＥ$_1$およびＰＧＩ$_2$が0.4％で，これら以外のＰＧのＥとＦ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セルトリ細胞はＰＢＳで洗浄し，ＰＢＳで64倍に希釈したFITC標識ヤギ抗ウサギIgG（Cappel, U. S. A.）に室温で30分間浸漬した．対照として，ウサギ抗ＰＧＥ$_2$血清のかわりに正常ウサギ血清で処置したセルトリ細胞，およびFITC標識ヤギ抗ウサギIgGのみの処置を施したセルトリ細胞を使用した．処置したセルトリ細胞はグリセリン・ＰＢＳで封入し，落射蛍光顕微鏡装置（オリンパス光学）で観察した．

## 結　果

生後0，10，20，30および60日のラットから分離したセルトリ細胞は，いずれも球形で，単独あるいは数個が塊状をなして分散していた．また，8日間培養したセルトリ細胞はいずれの日齢の動物から分離したものもスライドグラスに付着して，細胞質突起を長く伸ばし，線維芽細胞様の形態を呈していた．

分離直後のセルトリ細胞とインドメサシンを含まない培養液で培養したセルトリ細胞について，ウサギ抗ＰＧＥ$_2$血清とFITC標識ヤギ抗ウサギIgGの処置を行うと，分離直後および培養後のセルトリ細胞のいずれにも細胞質全域に弱い蛍光が観察された(Fig. 1a)．なお，抗ＰＧＥ$_2$血清のかわりに正常ウサギ血清で処置したセルトリ細胞，およびFITC標識ヤギ抗ウサギIgGのみの処置を施したセルトリ細胞には蛍光は出現しなかったので(Fig. 1b)，この蛍光がＰＧＥ$_2$の存在を示していることが確かめられた．

一方，インドメサシンを含む培養液で8日間培養したセルトリ細胞をウサギ抗ＰＧＥ$_2$血清とFITC標

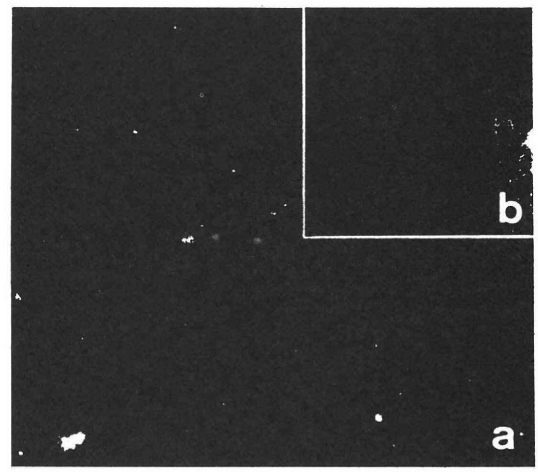



Fig. 1 Cultured Sertoli cells separated from 10-day-old rats. Fluorescence showing the presence of PGE$_2$ in the cytoplasm of each cell (a), and its absence in control cells treated with normal rabbit serum instead of the rabbit anti-PGE$_2$ serum (b). ×250

識ヤギ抗ウサギIgGで処置すると，$PGE_2$の存在を示す特異蛍光は著しく弱まるか，または消失した．

## 考　察

先に述べたように，生後20日と成熟ラットから分離したセルトリ細胞は，各種のPGを含んでおり，その合成能も持っていることがRIAによって調べられている[5,6]．また，これらのセルトリ細胞のPG合成能を調べたCooperとRatzlaff[6]によると，成熟ラットのセルトリ細胞におけるPG合成能は未成熟ラットのものと比べ10倍高かったと述べている．本実験において，成熟ラットおよびこれまでPGの存在が確かめられていない出生直後から生後20日までのラットから分離したセルトリ細胞について，$PGE_2$の免疫組織化学的検出を行ったところ，いずれの日齢の動物から分離したセルトリ細胞においても$PGE_2$の存在を示す蛍光が弱く観察された．また，各日齢のラットから分離して8日間培養したセルトリ細胞においても，$PGE_2$の蛍光は分離直後の細胞と同様に検出されたが，PG合成の阻害剤であるインドメサシンを添加した培養液で培養したセルトリ細胞では，$PGE_2$の蛍光は著しく弱まることが確かめられた．したがって，出生直後から生後60日までのラットのセルトリ細胞は常に少量の$PGE_2$を含有しており，この$PGE_2$はセルトリ細胞自身で合成されたものであることが推察される．なお，本実験ではいずれの日齢のラットから分離・培養したセルトリ細胞でも$PGE_2$の蛍光の強さに変化はみられず，常に弱いものであった．この培養セルトリ細胞における本実験の結果は，CooperとRatzlaffの結果[6]とは異なっていたが，これはPG検出のために用いた方法，すなわちRIAと間接蛍光抗体法の感度の差によることが考えられる．

一般に，黄体などのステロイド合成細胞において，cyclic AMPはゴナドトロピンのmediatorとしてステロイド合成に役割を果たすといわれているが，PGもステロイド合成のmediatorとしての作用を有しているといわれている[9~11]．なお，その作用はPGのなかでもEシリーズが著しいという[9]．一方，ラットのセルトリ細胞がステロイドの合成能を持っており[12~20]，とくに培養セルトリ細胞では出生直後から生後60日までのラットから分離されたものでステロイド合成能の存在が示唆されている[20]．また，セルトリ細胞のステロイド合成はFSHによって制御されていることも*in vitro*の実験によって確かめられている[12~15]．これらのことから考えると，本実験で検出された$PGE_2$は，セルトリ細胞のステロイド合成のmediatorとしての役割を担っていることがうかがわれる．

## 文　献


1) Carpenter, M. P. and Wiseman, B.: Prostaglandins of rat testis, Fedn. Proc., 29: 248, 1970
2) Michael, C. M.: Prostaglandins in swine testes, Lipids, 8: 92, 1973
3) Carpenter, M. P.: Prostaglandins of rat testis, Lipids, 9: 397, 1974
4) Ellis, L. C., Sorenson, D. K. and Buhrley, L. E.: Mechanisms and interactions in testicular steroidogenesis and prostaglandin synthesis, J. Steroid Biochem., 6: 1081, 1975
5) Cooper, D. R. and Carpenter, M. P.: Prostaglandin production by Sertoli cells from rat testis, Fedn. Proc., 39: 433, 1980
6) Cooper, D. R. and Ratzlaff, D.: Arachidonate turnover and prostanoid synthesis in rat Sertoli cell function, Diss. Abstr. Internat., 44: 2732B, 1984
7) Steinberger, A., Heindel, J. J., Elkigton, J. S. H., Sanborn, B. M. and Steinberger, E.: Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells, Endocr. Res. Commun., 2: 261, 1975
8) Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, J. exp. Med., 99: 167, 1954
9) Kuehl, F. A. Jr., Cirillo, V. J., Ham, E. A. and Humes, J. L.: The regulatory role of the prostaglandins on the cyclic 3', 5' -AMP system, Adv. Biosci., 9: 155, 1973
10) Kuehl, F. A. Jr.: Prostaglandins, cyclic nucleotides and cell function, Prostaglandins, 25: 325, 1974
11) Silver, M. J. and Smith, J. B.: Prostaglandins as intercellular messengers, Life Sci., 16: 1635, 1975
12) Dorrington, J. H. and Armstrong, D. T.: Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17$\beta$ synthesis in cultured Sertoli cells, Proc・Nat. Acad. Sci., 72: 2677, 1975
13) Welsh, M. J. and Wiebe, J. P.: Sertoli cells from immature rats: in vitro stimulation of steroid metabolism by FSH, Biochem. Biophys. Res. Commun., 69: 936, 1976
14) Tcholakian, R. K. and Steinberger, A.: In vitro metabolism of testosterone by cultured Sertoli cells and the effect of FSH, Steroids, 33: 495, 1979
15) Tilbe, K. S. and Wiebe, J. P.: Sertoli cell capacity to metabolize progesterone: variation with age and the effect of follicle-stimulating hormone, Endocrinology, 108: 597, 1981
16) Wiebe, J. P.: Isolated Sertoli cells from immature rats produce 20$\alpha$-hydroxypregn-4-en-3-

one from progesterone and 3$\beta$, 20$\alpha$-dihydroxy-5$\alpha$-pregnane from pregnenolone, Biochem. Biophys, Res. Commun., 84: 1003, 1978
17) Tcholakian, R. K., Berkowitz, A. S. and Newaz, S. N.: Metabolism of ($^3$H)5 $\alpha$-androstane-3$\alpha$, 17$\beta$-diol by cultures of isolated rat Sertoli cells and the effect of LH and FSH, Steroids, 43: 457, 1984
18) 田中雅治，石田一夫：ラット精巣，とくにセルトリ細胞におけるヒドロキシステロイド脱水素酵素の組織化学的観察，日畜会報，58：568，1987
19) 新村末雄，石田一夫：ラットの培養セルトリ細胞におけるヒドロキシステロイド脱水素酵素の組織化学的検出，家畜繁殖誌，35：101，1989
20) 神崎　展，新村末雄，石田一夫：出生時から60日齢までのラットから分離・培養したセルトリ細胞におけるステロイド代謝の組織化学的観察，新大農研報，43：121，1991

## Immunohistochemical studies of prostaglandin $E_2$ in rat Sertoli cells

Sueo Niimura, Ikuko Yotsutani and Kazuo Ishida

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

An antiserum to prostaglandin (PG) $E_2$ and indirect immunofluorescence were used immunohistochemically to demonstrate the presence of $PGE_2$ in Sertoli cells separated from the testes of Wistar rats at 0, 10, 20, 30 and 60 days of age, and the ability of PG synthesis in those also was examined using a culture system.

Weak fluorescence showing the presence of $PGE_2$ was always observed in the cytoplasm of Sertoli cells regardless of the supplier's age. Weak fluorescence was demonstrated also in cultured Sertoli cells from 0- to 60-day-old rats. However, when Sertoli cells were cultured in a medium containing 75$\mu$M indomethacin, an inhibitor of PG synthesis, the fluorescence was markedly diminished.

We therefore presume that Sertoli cells from 0- to 60-day-old rats contain PG $E_2$, and that they have synthesized the $PGE_2$ in themselves.

(受付：1990年12月27日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# ラット胚への大腸菌の付着と着床への影響

# Adherence of *Escherichia coli* to Rat Embryo and its Effect on Implantation

麻布大学獣医学部衛生学第2講座
田中嘉文　福安嗣昭　芦田淨美
Yoshifumi TANAKA　Tsuguaki FUKUYASU　Kiyomi ASHIDA

Department of Animal Health II, School of Veterinary Medicine,
Azabu University, Kanagawa 229, Japan

非病原性大腸菌のラット胚への付着と菌数について調べた．また，偽妊娠4日目のラット子宮内に大腸菌付着胚を移植し，着床への影響を検討した．

胚への大腸菌の付着は容易であり，しかも，付着した大腸菌は胚から容易に遊離せず，7回洗浄後の胚1個あたりの付着大腸菌数は平均11.7個であり，胚1個に付着できる大腸菌の数にも限界があった．

ラット10例の子宮内に胚を移植した結果，10例全てに着床が認められた．また，移植した胚81個中70個が着床し，着床率は86.4％であった．

ラット10例の子宮内に大腸菌付着胚を移植した結果，5例に着床が認められた．また，個体ごとの着床率は30.8％（78個中24個）であった．大腸菌付着胚移植群の着床率は胚移植群に比べ有意に低く，胚に付着した大腸菌は移植卵の着床を抑制した．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 479—485, 1991)

## 緒　言

ラットにおいて一次的に体外にとり出した胚をその生殖器の外陰部，膣に常在する非病原性細菌と同時に子宮内に注入すると，胚の着床に著しい影響があり[1,2]，また，胎児の発育が阻害され，奇形形成を伴うことが認められている[3]．家畜においては，外科的に取り出した豚の胚をオーエスキー病ウイルス，豚パルボウイルスおよび豚エンテロウイルスなどの培養細胞に暴露した後に，電子顕微鏡によって調べた結果，ウイルスの種類によって多少異なるが，胚の透明帯の表面にこれらのウイルスが付着し，透明帯表面の細孔に侵入あるいは精子侵入軌道に吸着することなどが報告されている[4]．動物における着床前後の胚と非病原性あるいは病原性微生物との動態については不明の点が多い．

本研究においては，ラット胚に対する非病原性大腸菌の付着性を検討し，さらに，この大腸菌付着胚をラット子宮に移植して着床の有無を検討した．

## 材料と方法

1．供試動物

膣垢像検査により規則正しい性周期を示す成熟未経産のJcw・Wister系ラット（10～15週齢，体重180～220 g）20匹を用いた．また，Jcw・Wister系雄ラット（4～6月齢，体重260～300 g）5匹を用いた．

2．供試細菌と培地

雌ラットの膣内より分離，同定した大腸菌をリファンピシン耐性マーカーを付与して用いた．すなわち，膣粘液をマッコンキー寒天平板培地に塗抹し，37℃，24時間培養を行って発育した赤色集落を釣菌

した．分離菌株はグラム陰性桿菌，乳糖分解（＋），硫化水素産生（－），ガス産生（－），クエン酸塩の利用能（－）の各種生化学的性状を検査し大腸菌と同定した．この大腸菌をトリプトソイ液体培地で37℃，18時間培養後，遠心処理（3000rpm，20分間）した沈査をリファンピシン（50μg/ml）加ハートインフュージョン寒天平板培地に塗抹し，37℃，48時間培養した．発育した集落をリファンピシン耐性大腸菌とした．

また，大腸菌付着胚作成用の菌液は，リファンピシン耐性大腸菌をハートインフュージョン寒天平板培地に37℃，24時間培養し，使用30分前に，その湿菌10mgを37℃に保温した滅菌灌流液1ml中に浮遊（平均菌数$2\times10^9$/ml）して用いた．

3．灌流液

若杉[5]のPB$_1$液に準拠したが，大腸菌への影響を考慮してペニシリンは添加しなかった．また，PB$_1$液は，使用前一週間以内に作成し冷蔵庫内に保存して，使用直前にミリポアフィルターを用いて濾過滅菌し，精子検査用恒温器（恒温器）で37℃に加温して用いた．

4．レシピエントラットの作成

雌ラットの腟垢像を毎日午後4～5時に観察し，性周期が規則正しく4日または5日周期の雌ラットを用いた．腟垢像が発情前期の雌ラットを同日午後6～7時と翌日午後5時の2回，子宮頸管部を電気刺激（10 V，30秒間通電，10秒休止を3回）して偽妊娠を誘起した．2回目の電気刺激を行った日を偽妊娠1日目とし，偽妊娠4日目の雌ラットを胚移植時のレシピエントとして用いた．

5．ドナーラットの作成と胚の採取

腟垢像が発情前期を示す雌ラットを同日午後6～7時に雄ラットと一夜同居させた．翌日，腟栓と腟垢中精子の有無により交尾の有無を判定した．

交尾を確認した日を妊娠1日目とし，妊娠5日目のラットを胚移植および大腸菌付着胚移植のドナーとして用いた．

胚の採取は，子宮灌流法によた実施した[5]．すなわちドナーラットをエーテルにより安楽死させて開腹した．2本の眼科ピンセットで子宮の卵管近位部と子宮腟部を把持し，眼科剪刀でそれぞれ切断した．滅菌キャピラリーを卵管近位部から子宮腟に挿入し，約1 mlの滅菌灌流液（37℃）を流出させて滅菌時計皿に胚を回収した．

回収した胚を倒立顕微鏡で鏡検し，正常に発育している胚盤胞期の胚を選別した．この胚は，移植または大腸菌の付着を実施するまで37℃恒温器で加温した時計皿中に静置した．

6．胚への大腸菌の付着法

採取した胚6～10個を，ヘマトクリット毛細管を加工（同毛細管を弱い炎の中で回転，柔らかくし，鋭く引き伸ばした後，静かに2本に切断した），滅菌し，吸引チューブに装着後，約5 μlの滅菌灌流液（37℃）で吸引した．その後，37℃恒温器で加温した菌液（0.2ml）と滅菌灌流液（1.8ml）の混合液（2.0ml）中に1～18個の胚を注入し10分間静置した．静置後，胚を約5 μl中に吸引し，新しい滅菌灌流液（2.0ml，37℃）に移した．この操作を5～7回繰り返し，胚に付着していない大腸菌を除き，これを大腸菌付着胚とした．

洗浄後の各段階の灌流液中の大腸菌の有無は，それぞれ約5 μlをトリプトソイ液体培地に注入，37℃，18時間培養により確認した．また，胚への付着菌数の算出は，7回洗浄後の灌流液中の胚1個，2個および5個を約5 μlの灌流液で吸引し，1 mlの滅菌生理食塩水にそれぞれ注入し，ホモジナイズを行った液を原液とし，その原液0.1mlを0.9mlの滅菌生理食塩水に加え10倍希釈した．この原液0.1mlおよび0.5mlと10倍希釈液0.1mlおよび0.5mlをリファンピシン（50 μg/ml）加ハートインフュージョン寒天平板培地に滴下し，ガラスコンラージ棒により塗抹し，37℃，24時間培養した後，発育集落数により胚への大腸菌の付着菌数を算出した．

7．レシピエンドラットへの胚および大腸菌付着胚の移植法

レシピエントラットの腹腔内にネンブタール（ペントバルビタールナトリウム50 μg/ml）を4 ml/kgの用量で麻酔後，腹位保定した．70％アルコールで背中を消毒後，最後肋骨から寛骨へ約1 cmの左右背側部を切開し，両側の卵巣，卵管および子宮角を露出し黄体を確認した．その後，子宮卵管接合部付近の子宮腔にそれぞれ灌流液中の選別した3～5個の胚を2～3 μlの灌流液とともに滅菌したマイクロシリンジ（10 μl, KROHEN）を用いて注入した．注入後卵巣，卵管および子宮角を腹腔内に戻し切開部を縫合した．

8．剖検および細菌検索

胚移植群および大腸菌付着胚移植群のラットは，移植後10日目にエーテルにより安楽死させ開腹した．胚移植後のラットは，開腹後胎盤により着床数を算出した．

大腸菌付着胚移植群のラットは，開腹後速やかに子宮頸管部を結紮し，子宮外側を70％アルコールにて消毒後，切開した左右それぞれの子宮内腔から子

Table 1. Adherence of *E. coli* to blastocysts and *E. coli* in the flushing fluid.

| Total number of blastocysts used | | Frequency of washing and existence of *E. coli* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | Blastocyst | + | + | + | + | + | · | · |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | − | | |
| 2 | Blastocyst | + | + | + | + | + | · | · |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | − | | |
| 4 | Blastocyst | + | + | + | + | + | · | · |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | − | | |
| 8 | Blastocyst | + | + | + | + | + | · | · |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | + | | |
| 6 | Blastocyst | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | + | − | − |
| 7 | Blastocyst | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | + | − | − |
| 8 | Blastocyst | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | + | − | − |
| 9 | Blastocyst | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | + | − | − |
| 10 | Blastocyst | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flushing fluid | + | + | + | + | + | − | − |

(Notice) + : existence of *E. coli*, − : no existence of *E. coli*, · : No test

宮内液および分泌物を採取し，トリプトソイ液体培地に移し，37℃，24時間培養した．次いで，細菌の発育の認められたものは，リファンピシン加寒天平板培地で培養（37℃，24時間）し，発育の認められたものを付着大腸菌陽性とした．同時に，胚の着床を胎盤により確認した．また，子宮の腫脹，充血，子宮内の分泌物などの肉眼的検査を行った．

## 成　績

1．胚への大腸菌の付着およびその付着菌数について

胚への大腸菌の付着は，大腸菌液(0.2ml，平均菌数$2\times10^9$/ml）と滅菌灌流液（1.8ml）の混合液（10倍希釈液)2.0mlに1～10個の胚を入れ，大腸菌を付着させた後，2.0mlの滅菌灌流液により5および7回洗浄し，胚の大腸菌の付着と洗浄液中大腸菌の有無を調べた．その結果をTable 1に示した．

胚1個，2個，4個および8個について5回の洗浄を行なった結果，胚1個，2個および4個では，5回目の洗浄により希釈洗浄液中には大腸菌は認められず，胚のみに大腸菌が認められた．しかし，胚を8個と多くした場合，希釈洗浄液中と胚に大腸菌が認められた．そこで，洗浄回数を7回に増し胚6～10個の全ての場合で，洗浄6および7回において希釈液中には認められず，胚のみに大腸菌が認められた．

Table 2. Adherent numbers of *E. coli* to blastocyst.

| Total number of blastocysts | Total number of *E. coli* adherent to blastocysts | Adherent number of *E. coli* per blastocyst |
|---|---|---|
| 1 | 14 | 14 |
| 2 | 22 | 11 |
| 5 | 50 | 10 |

胚への大腸菌の付着菌数は，7回洗浄後の灌流液中の大腸菌付着胚1個，2個および5個について大腸菌の発育集落数により算出し，その結果をそれぞれTable 2に示した．

胚への付着大腸菌数は，胚1個で14個，胚2個で22個および胚5個で50個であった．したがって，胚1個あたりの付着大腸菌数は，胚1個，2個および5個においてそれぞれ14個，11個および10個となり，胚1個あたりの平均付着大腸菌数は約11.7個であった．

2．胚移植群および大腸菌付着胚群の着床について

偽妊娠4日目のラットの左右子宮にそれぞれ3～5個の胚のみを移植した胚移植群および胚へ大腸菌を付着させた後，移植した大腸菌付着胚移植群の成績をそれぞれTable 3に示した．それぞれ10例のラッ

Table 3. Implantation of *E. coli*-free and *E.coli*-adherent blastocysts in pseudopregnant rats.

| Transplantation groups | No. of rats | Number of transplanted blastocysts | | | Number of placenta | | | Rate of implantation (%)[2] | Implantation in each rat | Macroscopical finding of uterine horns | | Isolation of bacteria | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | L[1] | R | Total | L | R | Total | | | L | R | L | R |
| *E. coli*-free blastocysts | 1 | 3 | 5 | 8 | 1 | 5 | 6 | 75.0 | + | No changes | No changes | ·[3] | · |
| | 2 | 5 | 5 | 10 | 5 | 3 | 8 | 80.0 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 3 | 4 | 5 | 9 | 4 | 5 | 9 | 100.0 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 4 | 3 | 4 | 7 | 3 | 3 | 6 | 85.7 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 5 | 5 | 3 | 8 | 5 | 2 | 7 | 87.5 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 6 | 4 | 3 | 7 | 3 | 3 | 6 | 85.7 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 7 | 4 | 4 | 8 | 4 | 4 | 8 | 100.0 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 8 | 4 | 4 | 8 | 4 | 3 | 7 | 87.5 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 9 | 4 | 4 | 8 | 3 | 4 | 7 | 87.5 | + | No changes | No changes | · | · |
| | 10 | 4 | 4 | 8 | 3 | 3 | 6 | 75.0 | + | No changes | No changes | · | · |
| | Total | | | 81 | | | 70 | 86.4 | 10/10(100%) | | | | |
| *E. coli*-adherent blastocysts | 11 | 3 | 3 | 6 | 2 | 0 | 2 | 33.3 | + | Congestion Severe swelling | Congestion Severe swelling | − | − |
| | 12 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | − | Congestion Swelling | Congestion Swelling | − | − |
| | 13 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | − | Secretion Swelling | Secretion Swelling | − | − |
| | 14 | 5 | 4 | 9 | 5 | 4 | 9 | 100.0 | + | Severe Congestion | Severe Congestion | − | − |
| | 15 | 3 | 4 | 7 | 3 | 4 | 7 | 100.0 | + | Severe Congestion | Severe Congestion | + | + |
| | 16 | 3 | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | − | No changes | No changes | − | − |
| | 17 | 4 | 4 | 8 | 2 | 2 | 4 | 50.0 | + | Congestion | Congestion | − | − |
| | 18 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | − | Congestion Swelling | Congestion Swelling | − | − |
| | 19 | 3 | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | − | No changes | No changes | − | − |
| | 20 | 5 | 5 | 10 | 2 | 0 | 2 | 20.0 | + | Congestion | Congestion | − | − |
| | Total | | | 78 | | | 24 | 30.8 | 5/10(50%) | | | | |

1) L : Left uterine horn, R : Right uterine horn

2) Rate of implantation = Number of placenta/Number of transplanted blastocysts × 100

3) No test

トを試験に供した結果，胚移植群では，ラット10例のうち10例（100％）全てに着床が認められた．大腸菌付着胚移植群では，ラット10例のうちラット5例（50％）に着床が認められた．この2群の着床率をフィッシャーの直接確立計算法による $x^2$ を行った結果，2群の着床率は危険率5％で有意な差が認められた．

個体別の移植胚の着床率では，胚移植群で，No. 3ラット（9個着床／9個移植）およびNo. 7ラット（8個着床／8個移植）の100％が最も高く，No. 1ラット（6個着床／8個移植）およびNo. 10ラット（6個着床／8個移植）の75％が最も低かった．胚の総移植数81個中，着床した胚は70個であり，その着床率は86.4％であった．また，大腸菌付着胚移植群では，No. 12ラット，No. 13ラット，No. 16ラット，No. 18ラットおよびNo. 19ラットの5例は，胚の着床が全く認められなかった．しかし，他の5例では胚着床が見られ，それらの着床率は，No. 14ラット（9個着床／9個移植）およびNo. 15ラット（7個着床／7個移植）の100％が最も高く，No. 20ラット（2個着床／10個移植）の20％が最も低かった．大腸菌付着胚の総移植数78個中，着床した胚は24個であり，その着床率は30.8％であった．胚移植群および大腸菌付着胚移植群の個体別着床率をフィッシャーの直接確率計算法による $x^2$ 検定を行った結果，2群の個体別着床率は危険率1％で有意な差が認められ，大腸菌付着胚移植群の個体別着床率が有意に低かった．

これらラットの子宮内の肉眼的所見は，胚移植群では特に著変は認められなかった．しかしながら，

大腸菌付着胚移植群では増菌法でNo. 15ラットの左右子宮に大腸菌が検出された．また，No. 16ラットおよびNo. 19ラットを除く8例のラットの左右子宮全体に充血または腫脹が認められた．そのなかでも，No. 11ラットの左右子宮全体に強度の腫脹がみられ，No. 14ラット，No. 15ラットの左右子宮全体に強度の充血が認められた．さらに，No. 13ラットの左右子宮全体に軽い腫脹を伴う水様性分泌物が認められた．

## 考　察

近年，家畜において胚移植に伴う病原微生物による水平感染あるいは垂直感染が注目されるようになった．また，胚移植による疾病制御が示唆され始めた．すなわち，オーエスキー病抗体陽性豚から採取した胚をＳＰＦ農場内で飼養しているのべ189頭のレシピエント豚に移植し，3週間後に行ったレシピエント豚のオーエスキー病抗体検査では全て陰性であった．さらに，これらの胚から発育した産子のオーエスキー病抗体は陰性であったと報告されている[17]．胚移植技術を利用すると垂直感染する疾病に罹患している雌豚からもＳＰＦ豚を作出することができることが推察される．

一方，豚の胚とオーエスキー病のウイルスを2～24時間混合培養した後，数回洗浄を行ったが，胚の透明帯に付着したウイルスを除去することができなかった[4]と報じられているが，今回の試験では，胚を10分間，大腸菌液に浸漬したのみであるが洗浄によって，胚に付着した大腸菌を取除くことができなかった．すなわち，移植に用いる時期の胚1～10個を大腸菌液中に入れ，胚への大腸菌の付着の有無を試験した結果，全ての胚に大腸菌の付着が認められた．また，胚1個あたりの胚付着大腸菌数は発育集落数により算出したところ，平均11.7個であった．このことは，大腸菌が容易にラット胚に付着してしまうと同時に，一度ラット胚へ付着した大腸菌は，7回の洗浄後にもかかわらずラット胚から容易に遊離することがなく，大腸菌のラット胚への付着力はかなり強いと思われた．また，単純にラット胚の表面と大腸菌の大きさから比較すると[6,7]，かなりの数の大腸菌が胚の表面に付着出来ると思われるが，大腸菌液中に同時に胚を1個，2個あるいは5個浮遊させ大腸菌を付着させた場合，胚1個あたりの付着大腸菌数が約12個であったことから，ラット胚1個に付着できる大腸菌の数には限界があると思われる．

次に，ラット胚のみの移植（胚移植群）と大腸菌をラット胚へ付着させた後，大腸菌付着胚としての移植（大腸菌付着胚移植群）を偽妊娠4日目のラット子宮内に試みた．その結果，胚移植群の着床率は86.4％であり，一般に70～80％とされているラットにおける胚の子宮内の着床率をやや上回る結果となった[8]．しかし，大腸菌付着胚移植群の着床率は30.8％であり，胚移植群の着床率と比べ著しく低かった．この着床率は，大量の大腸菌とラット胚を子宮内に同時移植した場合の着床率29.8％[2]とほぼ同じであった．このことより，移植時の子宮内の大腸菌が少量でも，移植胚の着床に影響を与えると考えられる．

ラットにおける偽妊娠黄体の機能的寿命は14日であり[9]，その時期の子宮内膜にはグリコーゲンが卵胞期よりも増加することが知られている[10,11]．このグリコーゲンが加リン酸分解酵素であるPhosphorylaseによって$\alpha$-D-グルコース1リン酸に分解される[12～16]．大腸菌は，この$\alpha$-グルコースを加水分解する$\alpha$-Glucocidaseを保有している[2]．また，黄体期の子宮は子宮動脈の発達が少ないため，血液中の食細胞が子宮内に滲出しにくくなっている．さらに，胚が着床するまでに必要なエネルギー源の1つであるグルコースを大腸菌が消費してしまうことで，多少なりとも胚の代謝に影響を与えると思われる．これらのことより大腸菌が子宮内に定着，増殖し，子宮内膜の生理的変化や移植胚の発育に影響を与え，移植胚の着床を妨げたものと考えられる．

一方，大腸菌付着胚移植群で，10例中5例のラットにおいて移植卵の着床が見られた．また，興味深いことに，No. 14ラットおよびNo. 15ラットにおいては着床率は100％であった．さらに，No. 15ラットでは左右子宮内より大腸菌が分離された．このことは，大腸菌が胚の着床に影響するものの，その影響はラット個体により異なるのかも知れない．すなわち，ラット個体により大腸菌の影響が，胚および子宮内膜に対して以外に少なく，移植胚の着床が見られたラットの左右子宮内では，移植胚の子宮内膜への接触による刺激で脱落膜が形成され，その後，子宮内膜および移植胚が順次変化し，移植胚が母体の血液から栄養を吸収できる状態，つまり，移植胚の着床が成立[18,19]したためと思われる．一方，偽妊娠4日頃の子宮内膜にはマクロファージの滲出が最も多いと言われている[20,21]が，移植胚の着床過程で形成される脱落膜[18,19]の内部にはマクロファージが全く認められないことが報告されている[21]．これらのことから，子宮内から大腸菌が検出され，しかも，全ての移植胚の着床が認められたNo. 15ラットでは，極微量の大腸菌を移植胚の表面に付着したまま着床することにより，脱落膜の内部で大腸菌が定着し，一過

性に増殖したと考えられる．しかし，その大腸菌も，マクロファージ以外の好中球などの食細胞によって貪食されるはずであり，しかも，移植後10日目にもかかわらず大腸菌が分離されたのは，ラット個体によっては，子宮内において大腸菌の増殖性が異なり，全ての大腸菌が貪食されていない状態であったためと考えられる．

大腸菌付着胚が着床し，大腸菌分離が陰性のラットは4例であった．これは，着床直前の胚が，ハッチングまたは栄養膜あるいは子宮分泌液に由来する酵素により透明帯から脱出する[18]，その直前に，マクロファージが透明帯の周囲に集り，接着することが報告されている[8,20～22]．移植胚に接着したマクロファージが移植胚を効果的に保護し，大腸菌を消失させたためと考えられる．

## 文　献


1) 内山保浩，福安嗣昭，芦田淨美：ラットにおける受精卵の着床に及ぼす非病原性細菌の影響について，日不妊誌，33：425，1988
2) Akaike, M., Fukuyasu, T. and Ashida, K.: The effect of intrauterine bacterial infection on implantation of fertilized ova in rats, Jap. J. Fertil. Steril., 34: 36, 1989
3) 高野　修：受精卵移植ラットの分娩に及ぼす大腸菌の影響，麻布大学獣医学修士論文，1988
4) Bolin, S. R., Turek, J. J., Runnels, L. J. and Gustafson, D. P.: Pseudorabies virus, porcine parvovirus, and porcine enterovirus interactions with the zona pallucida of the porcine embryo, Am. J. Vet. Res., 44: 1036, 1983
5) 若杉　昇：実験動物の胚の採取法および凍結保存法，リプログクション実験マニュアル，飯塚理八ら編，116，講談社，1985
6) 星　修三，山内　亮：生殖器の構造と性細胞，家畜臨床繁殖学，42，朝倉書店，1982
7) 今井信実，田淵　清：腸内細菌科，獣医細菌学，128，啓明出版，1982
8) 舘　　鄰，横山峰介，舘　澄江：初期胚の移植，哺乳動物の初期発生―基礎理論と実験法―，妹尾左知丸ら編，257，理工学社，1981
9) 猪　貴義：排卵と黄体形成，実験動物学，150，養賢堂，1982
10) 芦田淨美：性周期及び性ホルモン給与に伴う子宮内膜グリコーゲンの消長について，家畜繁殖誌，5：53，1959
11) 山内　亮，芦田淨美，三船亮介，中原達夫：子宮内膜炎の発生機転に関する研究，家畜繁殖誌，1：45，1955
12) Conn, E. E. and Stumpf, P. K.: 9 炭水化物の嫌気的代謝，コーン・スタンプ生化学，田宮信雄，八木達彦訳，167，東京科学同人，1971
13) Martin, D. W., Mayes, P. A. and Rodwell: 15 糖質の代謝，ハーパー・生化学，大沢利明訳，三浦義彰監修，169，丸善，1982
14) 今井　陽：糖質の酸化，生化学入門，187，朝倉書店，1974
15) Harris, R. A.:第7章糖質の代謝Ⅰ,Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations デブリン生化学（上）―臨床との関連―，飯田静夫訳，上代淑人監修，241，哲学出版，1983
16) 菅原七郎：卵子の採取，受精卵の移植と凍結保存および顕微鏡操作，実験動物学ラット，石橋正彦ら編，346，講談社，1984
17) 小栗紀彦：オーエスキー病の現状と対策，受精卵移植による正常化，日本養豚学会シンポジウム，1988
18) 鈴木秋悦，北井啓勝，三浦麗子：受精卵の分化と着床前の動態，哺乳類の発生工学，大沢伸昭ら編，226，ソフトサイエンス社，1984
19) 吉田吉信：脱落膜の動態と機能，日産婦誌，39：1807，1987
20) 舘　　鄰，舘　澄江：ラットおよびマウス胚盤胞とmacrophagesのin vitroにおける相互作用，動物学雑誌，89：142，1980
21) 舘　　鄰，舘　澄江：着床―マクロファージの関与について―，実験生殖生理学の展開，鈴木善祐編，224，ソフトサイエンス社，1982
22) 舘　　鄰，舘　澄江：着床と胎盤，哺乳類の発生工学，大沢伸昭ら編，235，ソフトサイエンス社，1984


## Adherence of *escherichia coli* to rat embryo and its effect on implantation


Yoshifumi Tanaka, Tsuguaki Fukuyasu and kiyomi Ashida

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



Effect of adherence of Escherichia coli (E. coli) to the rat embryo (blastocyst) on implantation was examined by transplantation of E. coli-free and E. coli-adherent blastocysts to the uterine horns of pseudopregnant rats. The E. coli-adherent blastcysts were produced by dipping of the blastcysts in the E. coli suspension for 10 min. Separation of the E. coli from the blastocyst was attempted by repeated washing with flushing fluid. The average number of adherent E. coli amounted to 11.7 cells per blastocyst after 7th washing.

The implantation rate of the E. coli-free blastcyst

was 100% (10/10 rats). Of the total 81 transplanted blastocysts in this group, 70 blastocysts (86.4%) were implanted. In the group of E. coli adherent blastcyst, on the other hand, the implantation rate was 50% (5/10 rats). Of the total 78 transplanted blastocysts, 24 blastcysts (30.8%) were implanted. The implantation rate in the E. coli-adherent blastocyst group was significantly lower than that in the E. coli-free blastocyst group.

Macroscopical examination of the uterus revealed no changes in the rats of the E. coli-free blastocyst group. However, uterine congestion and swelling of almost of the rats were found in the E. coli-adherent blastocyst group. Also, E. coli was isolated from the uterine horns in one of the rats of the latter group. When the E. coli-adherent blastocysts are transplanted into the uterus, the E. coli influences the implantation of blastocysts even in a small amonunt of the bacterial infusion. However, the E. coli necessarily did not inhibit the implantation of blastocyst.

(受付：1990年12月7日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# ラット培養黄体細胞における Gonadotropin-releasing hormone の細胞内代謝応答機構

# Mechanism of Phospholipase $A_2$ Activation Mediated through the Gonadotropin-releasing Hormone Receptor in Cultured Rat Iuteal Cells

札幌医科大学産婦人科学講座

渡辺広史 Hiroshi WATANABE　福江ひろみ Hiromi FUKUE　山本弘 Hiroshi YAMAMOTO
遠藤俊明 Toshiyaki ENDO　田中昭一 Shoichi TANAKA　橋本正淑 Masayoshi HASHIMOTO

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

ラット培養黄体細胞を用いて，GnRH と $PGF_{2\alpha}$ の刺激がアラキドン酸（AA）遊離とイノシトールリン脂質（IPs）の水解反応を引起こすかどうかを検討し，さらに細胞代謝応答の機構に関して phospholipase $A_2$ の活性化が phospholipase C による phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate（$PIP_2$）の加水分解に続いて起こる二次的な反応であるか否かも検討した．

1日齢黄体では GnRH と $PGF_{2\alpha}$ の刺激は IPs 放出と AA 遊離を有意に増加させた．5日齢では GnRH は IPs 放出を起こさなかったが，AA遊離を有意に増加させた．つまり phospholipase $A_2$ の活性化は $PIP_2$ の分解は必要でないと思われた．

これらの結果は，GnRH の受容体には phospholipase C を介して情報伝達する経路と phospholipase $A_2$ を介して情報伝達する経路の少なくとも二種類が存在すること，そしてこの2つの情報伝達系は独自に発現しうることを示している．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 486—493, 1991)

## 緒　言

黄体機能の維持と退縮には種々の因子が関与し，刺激因子と退縮因子によって調節されているが，黄体寿命の直接の調節因子としては，退縮因子がより重要とされている[1]．

ラット黄体に対し退縮作用を持つものとして gonadotropin-releasing hormone (GnRH) や Prostaglandins (PG) などがある[2~7]．また，これら因子の受容体がラット黄体細胞に存在することが証明されており[8,9]，さらに GnRH がラット黄体に直接作用してイノシトールリン脂質の代謝回転を亢進することが報告されている[10~12]．

われわれはラット黄体細胞で，phospholipase $A_2$ の作用により主にホスファチジルコリン（PC）とホスファチジルイノシトール（PI）からアラキドン酸が遊離することを報告し[13]，さらにホルボールエステル（PMA）と $Ca^{2+}$ イオノフォア A 23187（A 23187）の組合わせがアラキドン酸遊離を促進することを報告した[13]．これらのことは Phospholipase C によりイノシトールリン脂質が最初に分解し，その結果アラキドン酸遊離が二次的に起こる可能性を示唆する．

今回，われわれはラット黄体単層培養細胞を用いて，黄体退縮作用を持つといわれる GnRH の刺激が，アラキドン酸遊離とイノシトールリン脂質の水解反

応を引起こすかどうかを検討し，さらに細胞代謝応答の機構に関して phospholipase $A_2$の活性化が phospholipase Cによる phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ($PIP_2$)の加水分解に続いて起こる二次的な反応であるか否かも検討した．

## 研究材料および方法

### 試薬

Myo-[2-$^3$H]イノシトール(15.8 Ci/mmol)，[5，6，8，9，11，12，14，15-$^3$H]アラキドン酸(83.6 Ci/mmol)および[2-$^{14}$C]グリセロール(15.0 mCi/mmol)は New England Nuclear 社より購入した．199 培地，Eagle's MEM 培地は日水製薬社製，$Ca^{2+}$ free MEM，牛胎仔血清（ＦＢＳ）は GIBCO 社製，パーコールは Pharmacia 社製，Type Ⅰ dispase は合同酒精社製を使用した．Type Ⅰ collagenase, fatty acid-free 牛血清アルブミン（ＢＳＡ），Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), quinacrine dihydrochloride (mepacrine)は Sigma 社,$Ca^{2+}$イオノウォア A23187 は Calbiochem-Behring 社,Guanosine-5'-0-(3-thiotriphosphate)tetralithium salt は Boehringer Mannheim Yamanouchi, [D-Ala$^6$, Des-Gly$^{10}$] -GnRH ethyl amide (GnRHa), [D-Phe$^2$, Pro$^3$, D-Phe$^6$] -Gnrh (GnRH antagonist I), [D-pGlu$^1$, D-Phe$^2$, D-Trp$^{3,6}$] -GnRH (GnRH antagonist II),は Peninsula Laboratories, Inc.より,pertussis toxin(islet activating protein; IAP) は科研製薬より購入した．$PGF_2\alpha$ は小野薬品より，血清性性腺刺激ホルモン（セロトロピン），human chorionic gonadotropin(hCG,ゴナトロピン)は帝国臓器社より提供を受けた．コールドキャリヤーに用いたリン脂質は，当教室でラット肝臓，肺臓より調整したものを用いた．その他の試薬は市販の特級を用いた．

### ラットの黄体細胞の分離・培養

26 日齢の Sprague-Dawley 系幼若雌ラットにＰＭＳＧを 50 ＩＵ皮下注し多数の卵胞を発育させ，64 時間後に hCG を 25IU 皮下注射し過排卵させた．hCG 投与 2 日目には黄体が認められ，この日を黄体 1 日齢とした．hCG 投与後 2 日目と 6 日目に無菌的に黄体化した卵巣を摘出した．既報の方法[13]のごとく，黄体を細切し，collagenase と dispase 処理を行い細胞を分離した．

分離した細胞で細胞浮遊液を作製し，この細胞浮遊液から黄体細胞を分離するため不連続パーコール密度勾配遠心法を行った．Medium(M)199 の培養液で $3.0\times10^5$cells/dish になるように調整し，35mm culture plates (Corning, Glass Work, NY) に単層培養した．培養条件は 5 % $CO_2$/95 % air, 37℃ とした．培養液は 48 時間毎に交換した[13]．

0.5 % trypan blue 生体染色による培養細胞の生存率は，実験期間中つねに 90 %以上であった．また細胞数は 0.25 %トリプシン＋0.02 % EDTA 溶液で細胞を dish から剥離しカウントした．培養細胞数は培養日数とともに増加し，培養 4 日目にほぼ confluent (約 90 %) に達し $7.0\times10^5$cells/dish であった．

3$\beta$-hydroxysteroid dehydrogenase 活性を有する細胞の割合いは 70～80 %であった．

本研究で用いた培養黄体細胞の 5 日齢黄体とは黄体 1 日齢（ゴナドトロピン投与後 2 日目）で培養に移し更に 4 日間培養した場合であり，9 日齢黄体とは黄体 5 日齢に培養に移し更に 4 日間培養した場合とした．

### 黄体細胞への fura-2 の取込みと蛍光測定

細胞質内遊離 $Ca^{2+}$濃度 ([$Ca^{2+}$] i) は Grynkiewiz の方法[14]に準じて suspended cell で fura-2/AM を用い，日立製の 650-10 型分光光度計を使用し，二波長励起蛍光法によって測定した．

### [$^3$H]イノシトール，[$^{14}$C]グリセロール及び[$^3$H]アラキドン酸による培養黄体細胞の標識

培養 2 日目の黄体細胞を 5$\mu$Ci/ml の myo[2-$^3$H]イノシトールを含む 10 % FBS M 199 培地で 2 日間標識した．[$^3$H]アラキドン酸を少量のエタノールに溶解して培養液に添加し 4 時間標識した．培養液中のエタノール濃度は 0.1 %以下とした．

グリセロール標識は 0.1Ci/ml の [$^{14}$C] グリセロールを培養液に添加し 2 日間標識した．

### 標識黄体細胞の neomycin, PMA 及び mepacrine 処理

myo-[2-$^3$H] イノシトール標識黄体細胞は上記の方法で標識後 0.1 %ＢＳＡおよび 10mM LiC ℓ を含む Hepes-buffered saline (HBS) で，また [$^3$H] アラキドン酸標識細胞の場合は 0.1%BSA fatty-acid free (FAF) HBS で 3 回洗浄し，細胞に取込まれていない [$^3$H] イノシトール，あるいは [$^3$H] アラキドン酸を除去した後，種々の刺激物質を培養液中に添加した．

刺激物質は 0.1 % BSA-HBS (LiC ℓ) に溶解させた $PGF_2\alpha$, GnRHa をイノシトール代謝実験に，また 0.1%BSA (FAF) HBS に溶解した $PGF_2\alpha$, GnRHa をアラキドン酸代謝実験に用いた．Neomycin (1mM)

は15分間, PMA (200nM) は30分間, mepacrineは30分間, 同様の培地に加えてそれぞれ前処理した. 上記の刺激物質溶解1.0mlをdishに加えて反応を開始させ, 37℃でインキュベートした. 一定時間後dishから刺激物質を吸引除去し, dishを氷水中で冷却することにより反応を停止した. 対照は刺激物質を加えないものを用いた. アラキドン酸はクロロホルム／メタノール (2：1, V/V) によるFolch法[15]にて抽出した. 刺激後蓄積した [$^3$H] イノシトールリン酸 ($IP$, $IP_2$, $IP_3$の場合) 濃度はHasegawa-Sasakiらの方法[16]に準じ, AG1-X8カラムによるクロマトグラフィーにて分離した.

細胞脂質の抽出と分析

単層培養黄体細胞にメタノールを1.0ml加えた後ラバーポリスマンで剝離, この剝離細胞とメタノールの混液にクロロホルムを加えクロロホルム／メタノール (2：1, V/V) としFolch法[15]にて全脂質を抽出した. 脂質抽出後にコールドキャリヤー脂質を加えた後, 個々のリン脂質は二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した[17]. 展開終了後, ヨウ素蒸気で各脂質を検出し, スポット部位のゲルを掻きとり, バイヤルに移しACS-II 10mlを加えた後, 放射活性を測定した.

## 結　果

$PGF_2\alpha$ およびGnRHa刺激によるイノシトールリン酸の産生

1．イノシトールリン酸産生の基礎的検討

[$^3$H] イノシトール標識5日齢黄体細胞におけるイノシトールリン酸産生に対する$PGF_2\alpha$, GnRHaの濃度依存性を検討した (Fig. 1, A). $PGF_2\alpha$, GnRHa刺激で両者とも10nM以上の濃度において有意な全イノシトールリン酸 ($IP$, $IP_2$, $IP_3$) 放射活性の産生を認めた. さらに$PGF_2\alpha$ 100nM, GnRHa 100nMでそれぞれ刺激した時イノシトールリン酸の産生は刺激時間5分で有意に増加し, 30分でその産生はプラトーに達した (Fig. 1, B).

2．$PGF_2\alpha$, GnRHa刺激によるイノシトールリン酸産生に対するneomycin, PMA及び細胞外$Ca^{2+}$の影響

黄体培養細胞4日目にphospholipase C活性を抑制することが知られているneomycin (1mM) で15分間前処理し, $PGF_2\alpha$, GnRHaによるイノシトールリン酸の産生を見たが, 抑制は見られなかった. また, PMA (200nM) で30分間前処理した場合も$PGF_2\alpha$, GnRHaによるイノシトールリン酸産生作用には抑制が見られなかった.

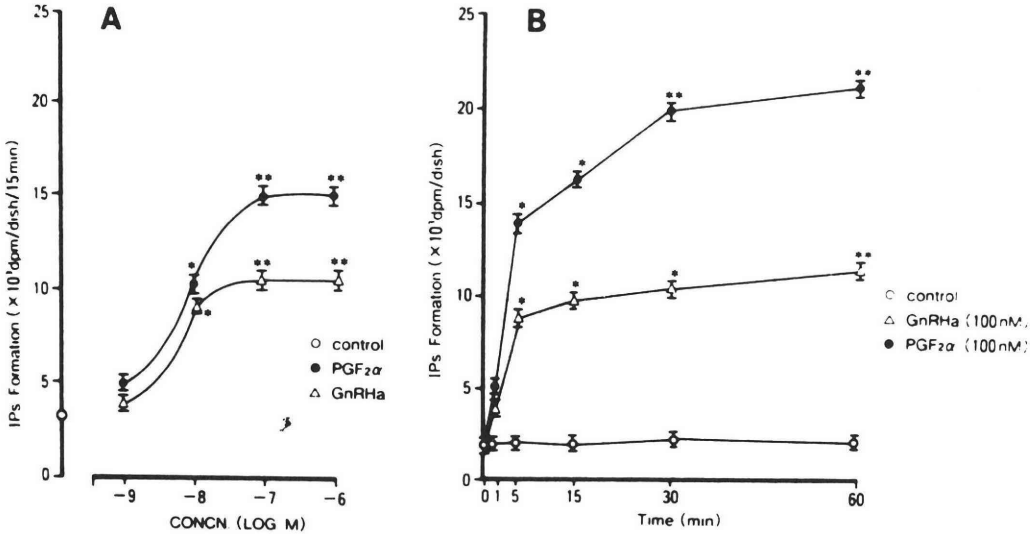



Fig. 1 Effect of the concentration of $PGF_2\alpha$ (A) and time course (B) on the formation of inositol phosphates in cultured rat luteal cells.
The values shown are means±S. E. M. of tripllcates.
*$p<0.01$ vs Control　**$p<0.001$ vs Control

細胞外 $Ca^{2+}$ の影響を検討するため，細胞外 $Ca^{2+}$ free 液を作製しイノシトールリン酸の産生を検討したが，細胞外 $Ca^{2+}$ free の状態でも，黄体細胞は $PGF_2\alpha$, GnRHa の刺激に対してイノシトールリン酸を産生した．

$PGF_2\alpha$, GnRHa 刺激によるアラキドン酸の放出

1．アラキドン酸放出の基礎的検討

[$^3$H]アラキドン酸標識黄体細胞からのアラキドン酸放出における $PGF_2\alpha$, GnRHa, GnRH antagonist の濃度依存性を検討した (Fig. 2, A)．アラキドン酸の放出増加は三者ともに 10nM で対照に対して有意となり，100nM でプラトーになった．次に $PGF_2\alpha$ 100nM, GnRHa 100nM, GnRH antagonist 100nM で刺激した時に放出されるアラキドン酸は Fig. 2, B のごとく刺激時間 15 分で有意に増加し，その後徐々に 60 分まで上昇傾向を示した．また $PGF_2\alpha$, GnRHa をそれぞれ 100nM で 15 分間 [$^3$H] アラキドン酸標識黄体細胞を刺激すると，両刺激により細胞外に放出される [$^3$H] 活性の 92～94 %がアラキドン酸で，$PGE_2$, $PGF_2\alpha$ などのアラキドン酸代謝産物への交換は非常に少なかった．

2．$PGF_2\alpha$, GnRHa 刺激によるアラキドン酸放出に対する PMA, mepacrine の影響

培養黄体細胞に phospholipase $A_2$ 活性抑制物質として知られている mepacrine (100$\mu$M) で 30 分間前処理した黄体細胞の培養液に $PGF_2\alpha$ (100nM), GnRHa (100nM). GnRH antagonist (100nM) をそれぞれ添加し 15 分間インキュベートするとアラキドン酸の放出は全ての場合で mepacrine 処理により有意に抑制された (Fig. 3)．

3．[$^{14}$C] グリセロール標識黄体細胞の $PGF_2\alpha$, GnRHa 刺激によるリゾ型リン脂質の変化

[$^{14}$C] グリセロール標識黄体細胞を培養液のみでインキュベートした時の PC, PE, PI 値をそれぞれ対照として比較した時，$PGF_2\alpha$, GnRHa 刺激で PC, PI は減少し，Lys-PC, Lys-PI が増加した (Fig. 4) この結果から，$PGF_2\alpha$, GnRHa の刺激により phospholipase $A_2$ が活性化され，主に PI と PC よりアラキドン酸が遊離されたことが示唆された．

$PGF_2\alpha$ 及び GnRHa の刺激による細胞内遊離 $Ca^{2+}$ の動員

Fig. 5 に示すように 5 日齢黄体では $PGF_2\alpha$

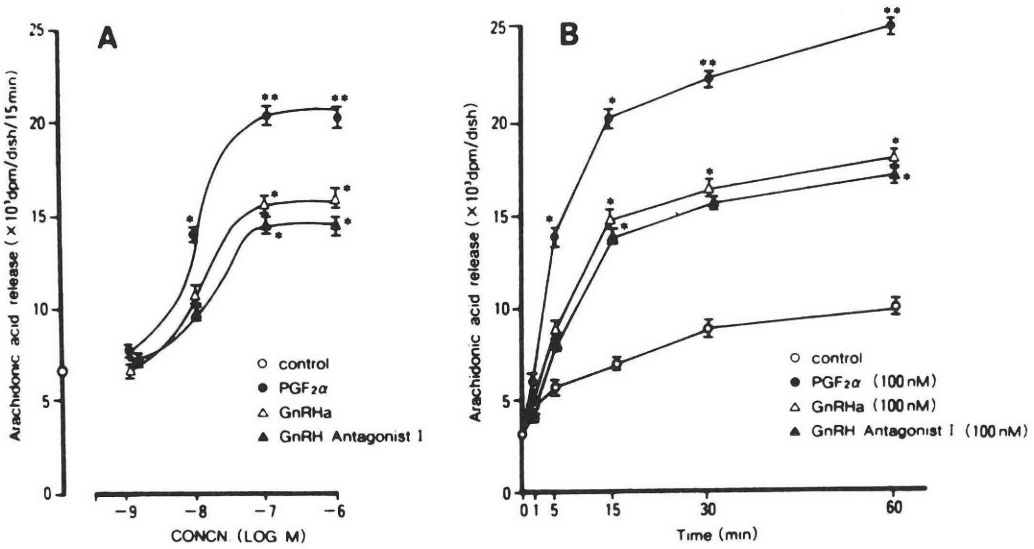



Fig. 2 Effect of the concentration of $OGF_2\alpha$, GnRHa or GnRH antagonistl (A) and time course (B) on release of [$^3$H] arachidonic acid from cultured rat luteal cells.
The values shown are means±S. E. M. of trlpllcates.
*p<0.01 vs Control　**p<0.001 vs Control

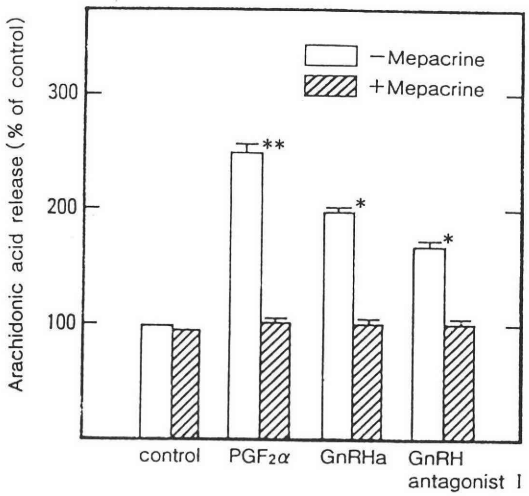



Fig. 3 Effect of mepacrine (200$\mu$m) on the release of prachidonic acid. Values are means ± SEM (n=3) expressed in percent of the control values (8402 ± 123 d. p. m./dish), which were obtained in the incubation without mepacrine and hormones. *p<0.01, **p<0.001 as compared with identical incubation without hormones.

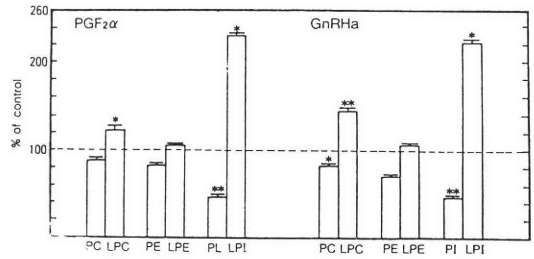



Fig. 4 The relative radioactivity found in phospholipids at 15 min after addition of $PGF_{2\alpha}$ (100nM) or GnRHa (100nM). The radioactivity in each phospholipid obtained from cells incubated in the absence of hormone is taken as 100%. *p<0.01, **p<0.001 as compared with contiol.

(100nM), GnRHa (100nM) に反応して明らかに蛍光強度の上昇が認められた (Fig. 5-A, B. C) が，9日齢黄体では5日齢黄体で見られたこのGnRHaの反応が認められなかった (Fig. 5-D)．しかし，これにA 23187を添加すると蛍光強度は著しく上昇した．

GnRHa, GnRH antagonistの刺激によるphospholipase Cとphospholipase $A_2$活性化の相違

Table 1に示すように5日齢黄体細胞を用いた時，イノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出は

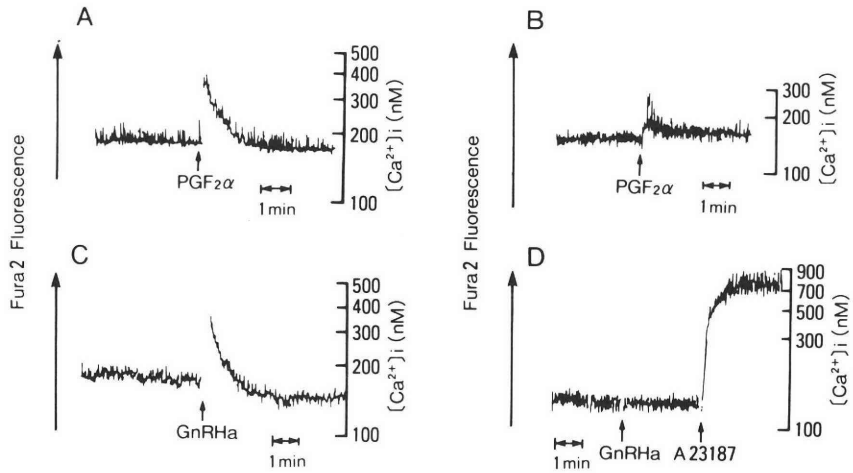



Fig. 5 Effects of $PGF_{2\alpha}$ (A, B) and GnRHa (C, D) on the increase in $[Ca^{2+}]$ i. Day 5 luteal cells (A, C) or day 9 luteal cells (B, D) were suspended in 1 ml HBS at 37°C. To the suspension ($1\times10^6$ cells/ml) 100mM of each hormone was added at indicated time.

Table 1. Effects of $PGF_{2\alpha}$, GnRHa and GnRH antagonists on IPs formation and arachidoinc acid release in luteal cells obtained from one-day-old corpora lutea (day 5 luteal cells) or-5-day-old corpora lutea (day 9 luteal cells).

| | Treatment | Total [$^3$H] IPs[a] | AA release[b] |
|---|---|---|---|
| | | % of control | % of control |
| Day 5 luteal cells | $PGF_{2\alpha}$ (100nM) | 342.1±2.3** | 249.2±3.2** |
| | GnRHa (100nM) | 162.9±2.1** | 201.5±3.7** |
| | GnRH antagonist I (100nM) | 79.1±1.5* | 171.8±1.1** |
| | GnRH antagonist II (100nM) | 80.6±1.0* | 161.9±4.1* |
| | GnRHa (100nM) + GnRH antagonist I (100nM) | 79.3±1.5* | 213.5±5.3* |
| Day 9 luteal cells | $PGF_{2\alpha}$ (100nM) | 238.5±1.2** | 203.5±8.4* |
| | GnRHa (100nM) | 82.9±6.8 | 232.6±1.3** |

a Results are calculated from the sum of [$^3$H] IPs ($IP+IP_2+IP_3$) and expressed as percentages of the control (n = 3).

b Results are expressed as percentages of the control (n = 3). Control values for IPs are 5069±10 d.p.m./dish in day 5 luteal cells, and 9847±118 d.p.m./dish in day 9 luteal cells. Control values for arachidonic acid release are 8402±123 d.p.m./dish in day 5 luteal cells, and 6041±20 d.p.m./dish in day 9 luteal cells. *$P<0.01$, **$P<0.001$ as compared with control.

$PGF_{2\alpha}$ (100nM) あるいは GnRHa(100nM) の細胞刺激でともに有意に上昇した．しかし、GnRH antagonist I, II の刺激ではイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出に異なった反応が認められた．すなわち，両 antagonist でイノシトールリン酸の産生はともに抑制されたがアラキドン酸の放出は有意に上昇した．この結果は phospholipase C の活性化によるイノシトールリン酸の産生が起こらなくても phosphilpase $A_2$が活性化されてアラキドン酸放出が起こることを示している，一方5日齢黄体ではイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸の放出がともに認められた GnRHa(100nM) の作用が，9日齢黄体ではイノシトールリン酸の産生はないが，アラキドン酸産生は有意に上昇することが認められた．この結果は9日齢黄体細胞の GnRHa 受容体を介する phospholipase $A_2$の活性化が phospholipase C と独立して発現していることを示唆している．またこの実験から GnRH 受容体には phospholipase C に情報を伝達しているものと phospholipase $A_2$に情報伝達を行うものの少なくとも二種類が存在することも判明した．

## 考　察

ラット黄体細胞を $PGF_{2\alpha}$, GnRH で刺激すると，両者は細胞の受容体に結合し，phospholipase C の活性化が起り，$PIP_2$が分解されて $IP_3$の産生が起こることが分った (Fig. 1)．$IP_3$は小胞体膜から $Ca^{2+}$を遊離せしめ，細胞内 $Ca^{2+}$の上昇をもたらすといわれている．細胞内 $Ca^{2+}$濃度の上昇は，単独でカルモジュリン依存性キナーゼを，またジアシルグリセロール (DG) とともにプロテインキナーゼCを活性化する[20,21]．さらに phospholipase C 活性化による細胞内 $Ca^{2+}$濃度の上昇は，キナーゼCを活性化すると同時に phospholipase $A_2$を活性化することも報告されている[22]．われわれはラット培養黄体細胞において PMA はキナーゼCを介して phospholipase $A_2$を活性化している可能性を示した[13]．しかし一方，phospholipase $A_2$の活性化は phospholipase C の活性化と独立して発現する例も報告[23]されている．Neomycin は PI-特異的 phospholipase C 活性を抑制し，エイコサノイド合成に影響を与えずに選択的に $PIP_2$の分解を抑制すると報告されている[24]．しかしラット黄体細胞において neomycin は $PGF_{2\alpha}$, GnRH による刺激反応に対しイノシトールリン酸の産生を抑制しなかった．この結果は neomycin が phospholipase C 活性を抑制しなかったとする報告[22]で示されたと同じく，培養黄体細胞では neomycine が生体膜を通過出来ないためと考えられている．PMA は phospholipase C に対して抑制的に作用することが報告[25]されている．PMA 前処理黄体細胞を $PGF_{2\alpha}$, GnRHa で刺激すると，イノシトールリン酸の産生抑制はみられなかった．血管平滑筋細胞において，アラジオテンシンIIによる phospholipase C 活性化は PMA で抑制されるが，血小板由来増殖因子による phospholipase C 活性化は PMA で抑制されない[26]．したがってキナーゼCによる phospholipase C への影響には，抑制的

に働く場合と全く抑制しない場合の二つの型があることが，報告されている．ラット黄体細胞の場合は後者の型に属する反応と考えられる．ラット黄体におけるアラキドン酸の遊離はphospholipase $A_2$の作用によることを，われわれは既に報告した[13]．本研究においても$PGF_2\alpha$, GnRHa 刺激によるアラキドン酸の放出はphospholipase $A_2$作用によって，主にPC, PIからもたらされることが分った（Fig. 4）．

さらにGnRH受容体を介するphospholipase Cとphospholipase $A_2$の活性化機構はともに発現せず，ある条件で異なった発現を示すことも判明した．

$PGF_2\alpha$ 刺激は5日齢，9日齢ラット黄体で，ともに細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇（Fig. 5）およびイノシトールリン酸産生（Table 1）を引起こした．しかしGnRHa 刺激では5日齢ラット黄体では同時に反応するが，9日齢になると細胞内$Ca^{2+}$の上昇（Fig. 5）およびイノシトールリン酸の産生（Table 1）も引起こさないという結果が得られた．しかしGnRHa 刺激によりイノシトールリン酸の産生を引起こさなくなった9日齢黄体においても，アラキドン酸放出の促進は認められた．つまりphospholipase $A_2$の活性化には$PIP_2$の分解は必要ではないと思われた．このことは9日齢でGnRH受容体からphospholipase $A_2$への情報伝達は維持されるが，phospholipase Cへの情報伝達は遮断されることを意味している．また，GnRHa 刺激でイノシトールリン酸の産生とアラキドン酸放出の両反応が明らかに起こる5日齢黄体細胞において，二種類のGnRH antagonist はいずれもイノシトールリン酸産生促進を抑制した．しかし，この時アラキドン酸放出の促進作用は抑制せずに維持された．この結果からGnRH刺激によるphospholipase Cの活性化とphospholipase $A_2$の活性化とは独立して起こる反応であることが強く示唆された．

以上よりGnRHの受容体にはphospholipase Cを介して情報伝達する経路とphospholipase $A_2$を介して情報伝達する経路の少なくとも二種類が存在すること，そしてこの2つの情報伝達系は独自に発現し得ることを示していると考えられた．

## 文　献


1）高木耕一郎：黄体退縮における$PGF_2\alpha$の作用機序に関する研究，日内分泌誌，64：1024，1988

2）Behrman, H., Yoshinaga, K. and Greep, R.: Extraluteal effects of prostaglandins, Ann. NY. Acad. Sci., 180: 426, 1971

3）Baird, D. T.: Prostaglandin $F_2\alpha$ and ovarian blood flow in sheep, J. Endocr., 62:413, 1974

4）Thomas, J. P., Dorflinger, L. J. and Behrman, H.: Mechanism of the rapid antigonadotropic action of prostaglandins in cultured luteal cells, Acad. Sci. USA., 75: 1344, 1978

5）Clayton, R. N., Harwood, J. P. and Catt, K. J.: Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production, Nature, 282: 90, 1979

6）Harwood, J. P., Clayton, R. N. and Catt, K. J.: Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function, Endocrinology, 107: 407, 1980

7）Behrman, H. R., Preston, S. L. and Hall, A. K.: Cellular mechanism of the antigonadotropic action of luteinizing hormone-releasing hormone in the corpus luteum, Endocrinology, 107: 656, 1980

8）Leung, P. C. K.: Mechanisms of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin action on luteal cells, Can. J. Physiol. Pharmacol., 63: 249, 1985

9）Pieper, D. R., Richards, J. S. and Marshall, J. C.: Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: Characterization, distribution and induction by GnRH, Endocrinology, 108: 1148, 1981

10）Lahav, M., West, L. A. and Davis, J. S.: Effects of prostaglandin $F_2\alpha$ and a gonadotropin-releasing hormone agonist on inositol phospholipid metabolism in isolated rat corpora lutea of Various age, Endocrinology, 123: 1044, 1988

11）Leung, P. C. K., Raymond, V. and Labrie, F.: Stimulation of phosphatidic acid and phospatidylinositol labeling in luteal cells by luteinizing hormone releasing hormone, Endocrinology, 112: 1138, 1983

12）Raymond, V., Leung, P. C. K., Veilleux, R., Lefevre, G. and Labrie, F.: LHRH rapidly stimulates phosphatidylinositol metabolism in enriched gonadotrophs, Mol. Cell Endocrinol., 36: 157, 1984

13）山本　弘，田中昭一，林　秀紀：ラット黄体細胞のアラキドン酸遊離におけるホルボールエステルの影響，札幌医誌，56：755，1987

14）Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.: A new generation of $Ca^{2+}$ indicators with greatly improved fluorescence properties, J. Biol. Chem., 260: 3440, 1985

15）Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipis from animal tissues, J. Biol. Chem., 227: 497, 1957

16）Sasaki, T. and Hasegawa-Sasaki, H.: Breakdown of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in a T-cell leukaemia line stimulated by phyto-

haemagglutinin is not dependent on $Ca^{2+}$ mobilization, Biochem. J., 227: 971, 1985
17) 長尾正人：関節軟骨の脂質代謝に関する研究第3報，関節軟骨におけるプロスタグランジンの産生とその起源，札幌医誌，55：421，1986
18) Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Schulz, I.: Release of $Ca^{2+}$ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-triphosphate, Nature, 306: 67, 1983
19) Cheung, W. Y.: Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase, Biochem, Boiphys. Res. Commun., 38: 533, 1970
20) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion, Nature, 308: 693, 1984
21) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y.: Unsaturated diacylgoycerol as possible messanger for the activation of calcium-activated, phospholipid-depent protein kinase system, Biochem. Biophys. Res. Commun., 91: 1218, 1979
22) Jaffe, E. A., Grulich, J., Weksler, B. B., Hampel, G. and Watanabe, K.: Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol triphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells, J. Biol. Chem., 262: 8557, 1987
23) Kaya, H., Patton, G. M. and Hong, S. L.: Bradykinin-induced activation of phospholipase $A_2$ is independent of the activation polyphosphoinositide-hydrolyzing phospholipase, J. Biol. Chem., 264: 4972, 1989
24) Slivka, S. R. and Insel, P. A.: Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in Madin-Danine canine kidney cells, J. Biol. Chem., 262: 4200, 1987
25) Zavoico, G. B., Halenda, S. P., Sha'afi, R. I. and Feinstein, M. B.: Phorbol myristate acetate inhibits thrombin-stimulated $Ca^{2+}$ mobilization and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis in human platelets, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82: 3859, 1985
26) Kawahara, Y., Kariya, K., Araki, S., Fukuzaki, H. and Takai, Y.: Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides in vascular smooth muscle cells-different sensitivity of PDGF-and angiotensin II-induced phospholipase C reactions to protein kinase C-activating phorbol esters, Biochem. Biophys. Res. Commun., 156: 846, 1988

## Mechanism of phospholipase $A_2$ activation mediated through the conadotropin-releasing hormone receptor in cultured rat luteal cells.

Hiroshi Watanabe, Hiromi Fukue, Hiroshi Yamahoto, Toshiaki Endo , Shoichi Tanaka and Masayoshi Hashinoto

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

We studied whether arachidonic acid (AA) release and inositol phospholipid (IPs) formation are induced by stimulation of Prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ and [D-$Ala^6$-Des-$Gly^{10}$] gonadotropin-releasing hormone ethylamide (GnRHa) using rat luteal cells of primary culture, and further studied whether the activation of phospholipase $A_2$ is a consequence of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ($PIP_2$) following the activation of phospholipase C.

In cells obtained from one-day-old corpora lutea, $PGF_{2\alpha}$ and GnRHa significantly increased IPs formation and AA release. In cells obtained from 5-day-old corpora lutea, GnRHa failed to stimulate IPs formation, but significantly stimulated AA release.

These results suggest that GnRH activates phospholipase A, and C through two independent pathways.

(受付：1990年10月17日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# DIRECT EFFECT OF GROWTH HORMONE ON STEROIDOGENESIS BY OVARIAN FOLLICLES

Satoshi USUKI

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

**Abstract:** To examine the possible effects of growth hormone (GH) on ovarian steroidogenesis by preovulatory follicles, the expressed granulosa cells and remaining portion of ovarian follicles from pregnant mare's serum gonadotropin (PMS)-treated immature rats were incubated *in vitro* with ovine NIH-GH for 3 h. GH significantly stimulated progesterone and estradiol-17$\beta$ production, with a predominant stimulation of progesterone, by granulosa cells, while testosterone production was not stimulated. In the remaining portion of the follicle, GH also significantly stimulated progesterone, testosterone and estradiol-17$\beta$ production. The stimulatory effect of GH was stronger on progesterone than on testosterone and estradiol-17$\beta$ production. Concentrations of immunoreactive IGF-1 were undetectable in the medium of the expressed graunlosa cells and remaining tissue incubated with GH. These results suggest that GH has a potent, direct stimulatory effect on steroidogenesis, especially progesterone production, by rat preovulatory follicles which is independent of the mediation of IGF-1.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 494—499, 1991)

## Introduction

The serum level of GH increases during the onset of puberty in the female rat[1~3]. During this period there are marked increases in ovarian progesterone and estradiol-17$\beta$[4], thereby indicating the possible relationship between ovarian differentiation and the serum elevation of GH. While the actions of pituitary gonadotropins in ovarian differentiation have been well elucidated[5~7], there have been few studies concerning the role of GH in ovarian differentiation. In intact female rats, suppression of serum GH delays the onset of puberty and reduces ovarian steroidogenic responsiveness to gonadotropin[8,9]. GH administered to GH-deficient animals increases the ovarian steroidogenic response to gonadotropin and restores the normal onset of puberty[3,8,10]. In addition, GH enhanced gonadotropin-stimulated differentiation of rat ovaries[9,11~13]. IGF-1 gene expression has been detected in the rat ovary[14], and GH also increases intraovarian IGF-1[15]. It is also now well established that IGF-1 has a potent stimulatory effect on estradiol-17$\beta$ production by granulosa cells *in vitro*[16~18]. Further, Mason et al.[19] also reported that biosynthetic GH has a potent, direct stimulatory effect on production of estradiol-17$\beta$ by the human ovary which is independent of the effect of FSH or IGF-1.

These findings suggest a direct ovarian effect of GH. The present study was undertaken to determine whether or by which cells GH can directly modulate ovarian steroidogenesis by the preovulatory follicles of rat ovaries.

## Materials and Methods

*Animals and animal treatments*

Immature female Wistar-Imamichi rats, obtained from the Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama), were housed five to a cage in an environment in which the temperature and lighting (lights on at 0800 h and off at 2000 h) were controlled and were fed pellet food and water *ad libitum*. Animals were immature rats 48 h after a sc injection of 10 IU PMS on day 27 of age. The animals were sacrificed by decapitation under mild anesthesia at the age of 29 days, and the ovaries were shelled from their bursae and dissected free of oviducts and adhering fat under aseptic conditions.

*Preparation and incubation of granulosa cells*

Granulosa cells were obtained from mainly large preovulatory follicles removed under the dissecting microscope. The cells were then collected by puncturing surface follicles at random with a fine needle, with the aid of a dissecting microscope, and sqeezing gently with a blunt probe and agitating the follicles to express the cells into modified medium 199. The granulosa cells, released into the medium, were recovered by centrifugation at 1,000 rpm for 10 min, washed, centrifuged, and resuspended in the medium 199. One-milliliter aliquots of the cell suspension were distributed amongst incubation vessels, and incubated at 37 ℃ for 3 h. Incubations were performed in triplicate at 37℃ with approximately 2 million viable cells each, in a final volume of 2ml modified medium 199 under an atmosphere of 95%$O_2$-5% $CO_2$.

Viability (50-80%) was assessed by observing the exclusion of trypan blue. The residual portion of follicles after experssion of granulosa cells were also incubated. After an initial 15-min incubation period, the addition of the GH was followed, and the incubations were continued for 3 h. At the end of each incubation, the combined granulosa cells and medium were centrifuged at 3, 000 rpm for 10 min, and then the supernatant fractions were assayed for subsequent analysis for steroid content. Further details of the experimental incubations are given in the text and figure legends.

*Progesterone, testosterone and estradiol-17β assay*

At the ent of each incubation, samples following centrifugation of the combined granulosa cells and medium or medium after removal of the residual tissue were extracted and assayed for progesterone, testosterone and estradiol-17$\beta$ by specific RIA as described previously[20].

*Somatomedin C/IGF-1 measurement*

Concentrations of immunoreactive IGF-1 in the medium were measured by specific RIA according to the method of Usuki et al.[13].

*Hormones*

Ovine NIH-GH was donated by the National Institute of Arthritis, Metabolism, and Digestive Diseases, of the National Institutes of Health (Baltimore, MD, U. S. A.). A purified preparation of ovine GH (NIADDK-oGH-12, AFP-4015A, biopotency=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 provided by Dr. A. F. Parlow, Director, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, U. S. A.. PMS was kindly supplied by Teikokuzoki Co. (Tokyo).

*Presentation and analysis of data.*

The data are presented as the mean±SEM of fifteen samples. Student's t tests were carried out. Comparisons with $P>0.05$ were considered not significant.

## Results

*Effect of GH treatment on progesterone, testosterone and estradiol-17β production by granulosa cells*

PMS-primed granulosa cells were incubated with increasing concentrations of ovine GH (2-2, 000 ng/ml) for 3 h.

Two hundred and 2,000 ng/ml of ovine GH significantly ($p<0.01$ and $p<0.01$, respectively), but not dose-dependently, stimulated progesterone production, with a maximum increase of 1. 4-fold at 200 ng/ml, compared with in the control group (Fig. 1A), while the medium testosterone concentration was not significantly increased (Fig. 1B). Similar to progesterone production, a

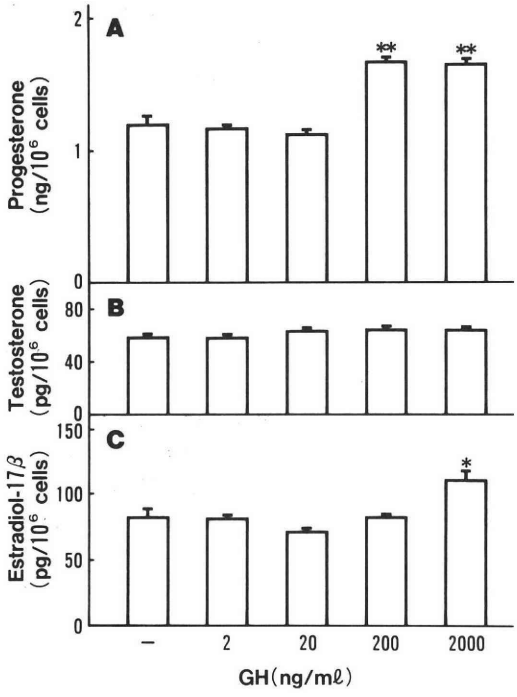



Fig. 1 Effect of GH treatment on (A) progesterone, (B) testosterone and (C) estradiol-17$\beta$ production by rat granulosa cells.
Granulosa cells were incubated for 3 h with increasing concentrations of ovine GH. At the end of the incubation, medium progesterone, testosterone and estradiol-17$\beta$ levels were measured by RIA. Results represent the mean±SEM of fifteen determinations.
The data are expressed as ng or pg/$10^6$ cells.
＊ P＜0.05；＊＊ P＜0.01

high dose (2,000 ng/ml) of GH significantly ($p < 0.05$) stimulated estradiol-17$\beta$ production (Fig. 1C). The stimulatory effect was stronger on progesterone than on estradiol-17$\beta$ production.

*Effect of treatment with GH on progesterone, testosterone and estradiol-17β production by the remaining portion of follicles after expression of granulosa cells*

To determine whether or not granulosa cells alone respond to GH as to steroidogenesis, the residual portion of the follicle after expression of granulosa cells was incubated with 200 and 2,000 ng/ml of GH for 3 h.

GH significantly ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) stimulated progesterone production, with a

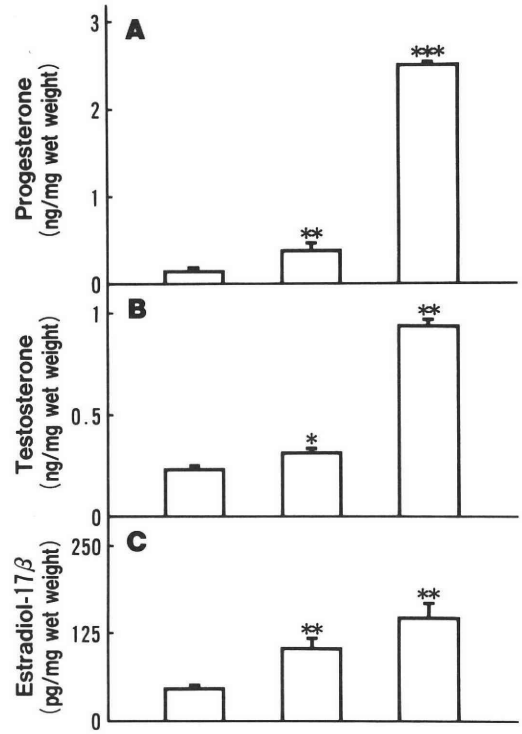



Fig. 2 Effect of treatment with GH on (A) progesterone, (B) testosterone and (C) estradiol-17 $\beta$ production by residual follicular tissue after expression of granulosa cells. The residual follicular tissue was incubated for 3 h with increasing concentrations of ovine GH. At the end of the incubation, medium progesterone, testosterone and estradiol-17$\beta$ levels were measured by RIA. Results represent the mean±SEM of fifteen determinations. The data are expressed as ng or pg/mg ovarian wet weight.
＊ P＜0.05；＊＊ P＜0.01；＊＊＊ P＜0.001

maximum increase of 18.6-fold at 2,000 ng/ml (Fig. 2A). Testosterone production was also significantly stimulated ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively), with a maximum increase of 4.1-fold at 2,000 ng/ml (Fig. 2B). In addition, estradiol-17$\beta$ production was significantly ($p<0.01$ and $p<0.01$, respectively) increased by 3.2-and 2.2-fold, respectively (Fig. 2C). The stimulatory effect of GH was most remarkable on progesterone production. The findings observed on the light microscopy showed the theca cell compartment and cells of membrana granulosa lying in a stratified manner

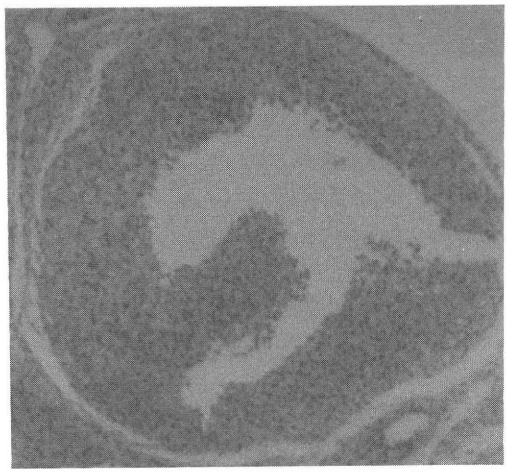


Fig. 3 The residual portion of the ovarian follicle after expression of granulosa cells. ×100.

along the glassy membrane (Fig. 3).

*Effect of GH treatment on medium IGF-1 concentration*

Concentrations of immunoreactive IGF-1 were undetectable in the incubation medium of the expressed granulosa cells and remaining portion of follicles.

## Discussion

We[11~13,15,21] have previously demonstrated that GH elevates DNA polymerase $\alpha$ activity in relationship to DNA synthesis and stimulated progesterone, testosterone and estradiol-17 $\beta$ production by rat ovarian follicles at the organ level, thereby indicating the possible direct gonadotropic effect of GH on cell proliferation and developmental changes in the ovary. We now provide evidence for a modulatory action of GH on the regulation of ovarian function at the cellular level. The present data indicate that 1) ovine GH stimulates progesterone and estradiol-17$\beta$ production by rat granulosa cells *in vitro*; 2) GH also stimulates progesterone, testosterone and estradiol-17$\beta$ production by the residual portion of follicles after expression of granulosa cells *in vitro*; 3) the predominant steroid produced on GH stimulation is progesterone; and 4) concentrations of IGF-1 in the medium are, however, undetectable. While the actions of GH on the reproductive function have been revealed[1,9], the mechanism by which GH acts in the ovary is not well understood. Suppression of endogenous GH is known to delay the onset of puberty and to decrease ovarian steroidogenic responsiveness to gonadotropins in immature female rats[22] . GH replacement increases ovarian steroidogenic responsiveness[1,22]. In GH-deficient dwarf mice with a reduced ovarian steroidogenic response to human GH, GH treatment stimulates the ovarian progesterone response to gonadotropins[10]. Recently, GH has been shown to exert a direct effect on the ovary to regulate ovarian differentiation[7~9,22]. In addition, biosynthetic human GH (Norditropin ® ) had an additive effect on the function of rat ovaries in combination with gonadotropins (Pergonal ® or Metrodin ® )[23], and the human GH has a potent, direct stimulatory effect on production of estradiol-17$\beta$ by the human granulosa cells which is independent of the effect of FSH or IGF-1[24].

This study provides evidence that GH has a direct effect on the granulosa cells and the remaining cells of preovulatory follicles, because when 27-day-old animals were treated with PMS and then their cellular components were incubated *in vitro*, the latter produced more steroids in response to GH than those of GH-untreated controls. PMS, in which the predominant gonadotropin is FSH, administered to immature female rats induces the first estrous cycle and an LH surge occurs at approximately 55 h after the PMS injection[25]. Therefore, GH stimulates steroidogenesis by preovulatory follicles before the LH surge, thereby confirming our previous reports[13].

As for the follicular tissue compartments, the remaining tissue contained the cells of membrana granulosa lying in a stratified manner along the glassy membrane.

Therefore, it is difficult to determine whether or not the theca tissue compartment except for cells of membrana granulosa directly respond as to steroidogenesis. Furthermore, IGF-1 was found not to be detected in the medium with GH treatment, being consistent with the observations that IGF-1 mRNA[26,27] or immunoreactive IGF-1[12,19] is undetectable after GH treatment. This finding also suggests the possible direct effect of GH on

steroidogenesis by the follicle which is independent of the mediation of IGF-1.

So, we propose that GH modulates the developmental change of preovulatory follicles before the LH surge in such a manner that it stimulates ovarian steroidogenensis partially without mediation of IGF-1.

The mechanism by which GH modulates ovarian differentiation is an interesting problem as to the control of follicular maturation to be solved, and this study might provide information which will lead to an understanding of the mechanism underlying the GH action in cellular differentiation during follicular growth.

## Acknowledgements

The generous supply of purified ovine GH given by the National Pituitary and Hormone Distribution Program, NIADDK, NIH (Bethesda, MD, U. S. A.) is greatly acknowledged. Thanks are also extended to Mrs. N. Furuya for her help in typing the manuscript. The excellent technical assistance of Miss J. Tanaka, Mrs. H. Nakamura, Mrs. Y. Hayasaka and Mrs. S. Kanzaki is also appreciated. This work was supported in part by grants from the University of Tsukuba Special Research Project on Metabolism, the University of Tsukuba Research Project and the Japan-China Medical Association, Li Shi Zhen Awards, and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (62570741, 02670731).

## References

1) Dickerman, E., Dickerman, S. and Meites, J.: Influence of age, sex and estrous cycle on pituitary and plasma GH levels in rats. In Growth and Growth Hormone, Edited by A. Pecile, E. E. MÜller, Excerpta Medica, 252, 1972
2) Eden, S., Albertsson-Wikland, K. and Isaksson, O.: Plasma levels of growth hormone in female rats of different ages, Acta Endocrinol. (Copenh.), 88: 676, 1978
3) Ojeda, S. R. and Jameson, H. E.: Developmental patterns of plasma and pituitary growth hormone (GH) in the female rat, Endocrinology, 100: 881, 1977
4) Advis, J. P., Andrews, W. W. and Ojeda, S. R.: Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat, Endocrinology, 104: 653, 1979
5) Goldenberg, R. L., Vaitukaitis, J. L. and Ross, G. T.: Estrogen and follicle-stimulating hormone interactions on follicle growth in rats, Endocrinology, 90: 1492, 1972
6) Hsueh, A. J. W., Adashi, E. Y., Jones, P. B. C. and Welsch, Jr. T. H.: Hormonal regulation of the differentiation of cultured granulosa cells, Endocr. Rev., 5: 76, 1984
7) Richards, J. S. and Midgley, Jr. A. R.: Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development, Biol. Reprod., 14: 82, 1976
8) Advis, J. P., White, S. S. and Ojeda, S. R.: Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat, Endocrinology, 108: 1343, 1981
9) Jia, X. C., Kalmijn, J. and Hsueh, A. J. W.: Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells, Endocrinology, 118: 1401, 1986
10) Bartke, A.: Histology of the anterior hypophysis, thyroid and gonads of two types of dwarf mice, Anat. Rec., 149: 225, 1964
11) Usuki, S.: Study on mechanism of Action of Growth Hormone in Ovaries, Report of Research, Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, 1-129, 1990
12) Usuki, S.: Role of growth hormone in ovarian physiology, Proceedings of the 2nd Sapporo International Symposium on Ovarian Function, Raven Press, in press, 1991
13) Usuki, S.: Growth hormone enhaces ovarian cytodifferentiation *in vitro*, Jpn. J. Fertil. Steril., 36: 118, 1991
14) Hernandez, E. R., Roberts, C. T. Jr., LeRoith, D. and Adashi, E.: Rat ovarian insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation, Endocrinology, 125: 572, 1989
15) Usuki, S.: Is induction of DNA polymerase $\alpha$ activity in immature rat ovaries by growth hormone independent of somatomedin C/insulin-like growth factor 1, Jpn. J. Fertil. Steri., 35: 475, 1990
16) Adashi, E. Y., Resnick, C. E., D'Ercole, A. J., Svoboda, M. E. and von Wyk, J. J.: Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function, Endocr. Rev., 6: 400, 1985
17) Steinkampf, M. P., Mendelson, C. R. and Simp-

son, E. R.: Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells, Mol. Cell Endocrinol., 59: 93, 1988
18) Erickson, G. F., Garzo, G. and Magoffin, D. A.: Insulin-like growth factor-1 regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells, J. Clin. Endocrinol. Metab., 69: 716, 1989
19) Mason, H. D., Margara, R., Winston, R. M. L., Beard, R. W., Reed, M. J. and Franks, S.: Inhibition of oestradiol production by epidermal growth factor in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries, Clin. Endocrinol., 33: 511, 1990
20) Usuki, S., Kubata, S. and Miyakawa, S.: Growth hormone elevates deoxyribonucleic acid polymerase $\alpha$ activity in conjunction with deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovaries, Biomed. Res., 10: 267, 1989
21) Usuki, S. and Shioda, M.: Growth hormone elevates DNA polymerase-$\alpha$ activity related to DNA synthesis in ovaries of hypophysectomized immature rat, Horm. Met. Res., 21: 455, 1989
22) Ramaley, J. A. and Phares, C. K.: Delay of puberty onset in female due to suppression of growth hormone, Endocrinology, 106: 1989, 1980
23) Jorgensen, K. D. and Nowak, J.: Interaction of human growth hormone and gonadotrophins in the function of rat ovaries, Pharmacol. Toxicol., 65: 278, 1989
24) Mason, H. D., Martikainen, H., Beard, R. W., Anyaoku, V. and Franks, S.: Direct gonadotrophic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cells in vitro, J. Endocrinol., 126: R 1, 1990
25) Rarker, C. R., Costoff, A., Muldoon, T. G. and Mahesh, V. B: Actions of pregnant mare serum gonadotropin in the immature female rat: correlative changes in blood steroids, gonadotropins and cytoplasmic estradiol receptors of the anterior pituitary and hypothalamus, Endocrinology, 98: 129, 1976
26) Ramasharma, K. and Li, C. H.: Human pituitary and placental hormones control human insulin-like growth factor II secretion in human granulosa cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 2643, 1987
27) Voutilainen, R. and Miller, W.L.: Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P 450ssc, in human steroidogenic tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A., 84: 1590, 1987

## Growth hormone のラット卵胞に於けるステロイド産生能

筑波大学臨床医学系産婦人科

臼杵 悊

Growth hormone (GH) の Preovulatory follicles (POF) におけるステロイド産生能をラットを用いて検討した.

出生27日齢の Wistar-Imamichi 系雌ラットに PMS10 IU を皮下投与し, 48時間後に卵巣を摘出し, 卵胞を取り出した後, Granulosa cells (GC) と残りの組織 (RT) に分け, GHで3時間インキュベーションし, Progesterone, Testosterone, Estradiol-17$\beta$ 及び IGF-1 を RIA にて測定した.

GHは, GC群において Progesterone と Estradiol-17$\beta$ の産生を促進させ, RT群においては Progesterone, Testosterone 及び Estradiol-17$\beta$ の産生を促進させた. GHの刺激作用は Progesterone で著名であった.

メジウム中の IGF-1 濃度には有意な変化は認められなかった.

以上の事実は, GH が POF の Steroidogenesis に直接作用することを細胞レベルからも示唆している.

(受付：1990年11月19日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 最も簡便，迅速なLH surge確認テスト——クリアプランワンステップテストと視床下部機能検査への応用

# Detection of LH Surge by Clearplan One Step— the Easiest and Most Rapid Method

東京大学医学部附属病院分院産婦人科
柳沼 忞　岡村 隆　西井 修
Tsutomu YAGINUMA　Takashi OKAMURA　Osamu NISHII
竹内 亨
Toru TAKEUCHI

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

クリアプラン　ワンステップは一操作のみで可能な尿中ＬＨの半定量法であり，この種の方法の中では最も簡便であり迅速（３分以内）である．しかも尿中ＬＨの変動を正確に追跡することができる．結果は－，±，＋，＋＋と判定され，各々０，20，80と160mIU/mlに相当する．これによりLH surgeの有無を知ることができる．したがって尿中エストロゲンの迅速測定法を併用することにより視床下部性無月経を正確に診断することができ，排卵日の予想が可能であるので，この方法は無月経や不妊症の診療上極めて有用である．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 500—506, 1991)

## はじめに

排卵を起こすための，中枢－視床下部の機能のうちで最も重要なものは，LHRHの間欠的な放出(pulse状放出）とestrogen positive feedbackである．LHRHがpulse状に放出される（1.5～２時間に１回)ことにより下垂体からFSHとLHがpulse状に放出されて卵巣は適度に刺激されて，卵巣からestradiolが大量に分泌される．これはLHRH放出に対して視床下部にpositiveに働き，LHRHは一時的に大量に分泌されてＬＨが一時的に多量に放出される（LH surge)．LH surgeの開始から平均約36時間後に排卵が起こる．

したがって，LH surgeを知ることは，中枢－視床下部－下垂体の機能の正常性を知ることと排卵の時期を知るうえで極めて重要である．

特に排卵の時期を知るためには，ＬＨの測定が迅速であり，どこにおいても施行しうることが必要である．

「クリアプラン　ワンステップ」(Unipath－富士製薬・三井製薬）はこのために開発されたものであり，この有用性について報告する．

## 材　料

自然排卵あるいはclomiphene citrate（クロミッド®）による排卵の予想日前後の尿を，不妊症婦人に採取せしめた．尿は，このまま次の試験に供した．一部は冷凍庫に保存後に使用した．

## 方　法

A）富士製薬－三井製薬から提供された，尿中ＬＨ測定器具である「クリアプラン　ワンステップ」を使用した．

１）アルミ包装されたテストスティック（図１）

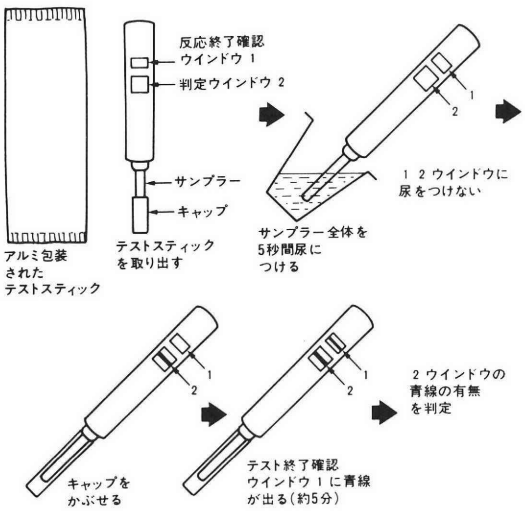



図１　クリアプランワンステップの操作

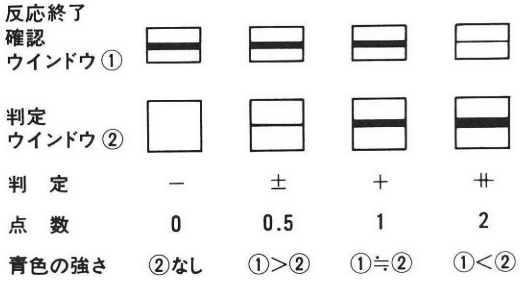



図２　クリアプランワンステップの判定法

を開封して取り出す．

２）キャップをはずし，テストスティックを下に向けサンプラー全体を少なくとも５秒間、尿につける．②のウィンドウの下端に尿が上昇してきたのが見えるまで尿にサンプラーをつけておけば確実である．

３）尿からサンプラーをはずし，サンプラーを下に向けたままキャップをかぶせる．

４）反応終了確認のウィンドウ①に青い線が見えることにより反応の終了が確認される．反応時間は約３分である．ウィンドウ①に青線が見えないときは，サンプラーに尿が十分に浸透していないことが多いので，再度３）を行う．

５）反応の終了が確認された時に，判定ウィンドウ②の青線の有無と濃淡を図２のように判定する．

B)クリアプラン　ワンステップ　テストの原理(図３)

サンプラーから吸収された尿は，接続した膜を通って反応終了確認ウィンドウ①まで達する．尿がパッドを通過する時に、この中に含まれる青物質も同時に運ばれる．尿中にＬＨが含まれている時には，このＬＨは青物質に結合している抗ＬＨ抗体Ｉと結合して運ばれて，判定ウィンドウ②に達し，ここに

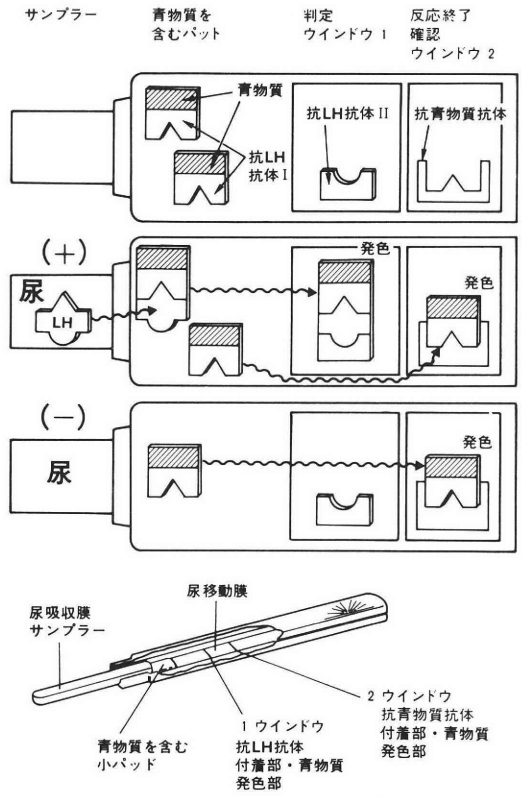



図３　クリアプランワンステップの原理

表１　クリアプランワンステップの感度(製薬会社提供)

| | LH mIU/ml | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 10000 |
| テスト判定 | － | － | － | ± | ＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| | － | － | － | ± | ＋ | ＋＋ | |
| | － | － | ± | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | |
| | － | － | ± | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | |
| | － | － | ± | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | |

表２　クリアプランワンステップの HCG との反応
(製薬会社提供)

| | HCG mIU/ml | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| テスト判定 | － | ± | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| | － | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| | － | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |

附着する抗ＬＨ抗体Ⅱに捕捉されて留まり，青物質は発色する．ＬＨに結合していない青物質は反応終了確認ウィンドウ①に達してここに附着する抗青物質抗体に捕捉されて留まり発色する（ＬＨ陽性）．

尿中にＬＨが含まれていない時には青物質は判定ウィンドウ②に留まることなく反応終了確認ウィンドウ①に達して捕捉されて発色する（ＬＨ陰性）．

C）同じ尿を使用して，この中のＬＨを「ハイツインクロンＬＨ（栄研）」により半定量した．結果は，5，10，20，40，80と160mIU/mlによって示された[1]．

D）製薬会社から提供された資料によると，クリアプラン　ワンステップのＬＨ測定感度は±以上を陽性とすると30mIU/mlであり，20mIU/mlでも陽性となることがある（表1）．

E）クリアプラン　ワンステップはＨＣＧとも反応する(表2)．製薬会社から提供された資料によるとHCGが10mIU/ml以上の場合に陽性となる．

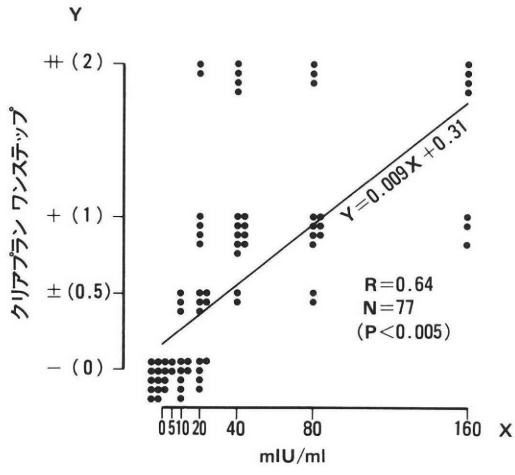



図4　クリアプランワンステップの感度

| XmIU/ml | 20 | 40 | 80 | 160 |
|---|---|---|---|---|
| Y | 0.49 | 0.67 | 1.03 | 1.75 |

## 結　果

1）クリアプラン　ワンステップ　テストの操作は，極めて容易であり，しかも約3分以内で完全に終了することができる．反応終了確認ウィンドウ①に明瞭な青線が出るので反応の終了を容易に確認することができる．

ある濃度以上のＬＨが尿中に存在する時に，判定ウィンドウ②の青線も容易に確認することができる（図1）．

反応終了確認ウィンドウと判定ウィンドウの両者に青線がでる場合に，両者の青線は近接し平行しているために濃淡の比較が容易である（図1，2）．したがって，図2に示した判定を正確にすることができる．

これらの操作中、尿の容器の外壁に尿がついていない限り，手が尿で汚れることは全くない．

2）クリアプラン　ワンステップの感度と特異性を調べるために77検体をこの方法とハインツインクロンＬＨにより測定した(図4)．両者の方法による測定結果の間の相関は0.64（$P<0.005$）であり，両者の関係は$Y=0.009X+0.31$の式により示される(X：ハイツインクロンＬＨ®，Y：クリアプラン　ワンステップ)．したがって，X＝20，40，80と160mIU/mlは各々Y＝0.49，0.67，1.03と1.75に相当する．

表3　クリアプランワンステップの信頼性（図4から計算）

| | ±以上を10mIU/ml以上とした場合 | ±以上を20mIU/ml以上とした場合 | ±以上を40mIU/ml以上とした場合 |
|---|---|---|---|
| sensitivity | 68.7% | 76.7% | 83.6% |
| specificity | 88.5% | 79.3% | 57.5% |
| false positive rate | 0% | 5.2% | 20.3% |
| false negative rate | 31.6% | 16.1% | 0% |

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{true positives (TP)}}{\text{(TP)}+\text{false negatives (TN)}}$$

$$\text{specificity} = \frac{\text{true negatives (TN)}}{\text{false positives (FP)}+\text{TN}}$$

$$\text{false positive rate} = \frac{\text{FP}}{\text{TP}+\text{FP}}$$

$$\text{false negative rate} = \frac{\text{FN}}{\text{FN}+\text{TN}}$$

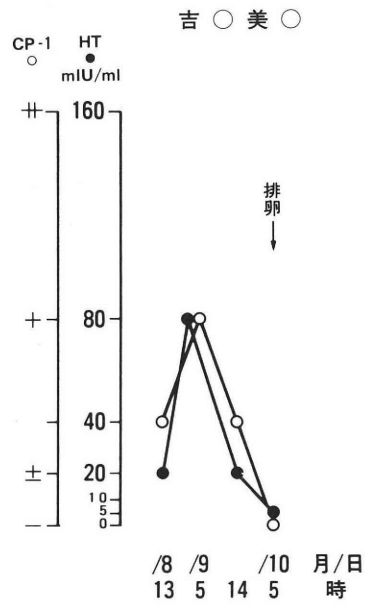



図５　○ＣＰ-1　クリアプランワンステップ
　　●ＨＴ　　ハイツインクロンＬＨ

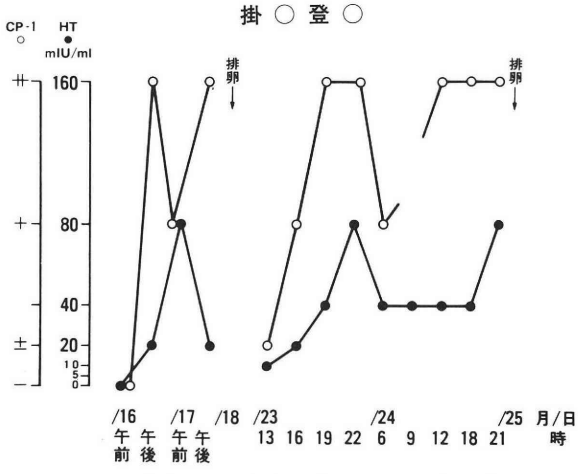



図６　○ＣＰ-1　クリアプランワンステップ
　　●ＨＴ　　ハイツインクロンＬＨ

ハイツインクロンＬＨ® により０と５ mIU/ml に判定された検体のすべては，クリアプラン　ワンステップによって陰性（０）であった．

「クリアプラン　ワンステップにおいて±（0.5）以上の場合は，10，20，あるいは40　mIU/ml 以上を示す」とした時の信頼性の指標を表３に示した．Sensitivity と specificity そして false positive rate と false negative rate を考慮すると，「±以上を 20 mIU/ml 以上の LH の存在」と考えるのが最も妥当である．

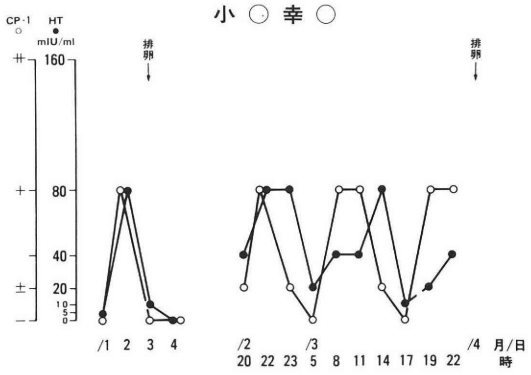



図７　○ＣＰ-1　クリアプランワンステップ
　　●ＨＴ　　ハイツインクロンＬＨ

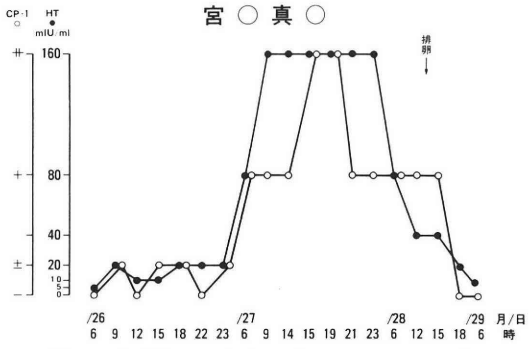



図８　○ＣＰ-1　クリアプランワンステップ
　　●ＨＴ　　ハイツインクロンＬＨ

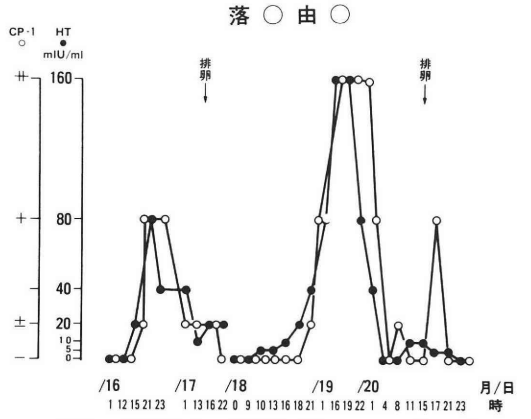



図９　○ＣＰ-1　クリアプランワンステップ
　　●ＨＴ　　ハイツインクロンＬＨ

３）５症例の 77 検体は，２時間から 24 時間間隔に採取されたものである．これらの検体中のＬＨのクリアプラン　ワンステップとハイツインクロンＬＨ® による測定結果の，時間の経過による変化の平行性を検討した．図５，６，７，８および９に示したごとく，両者の測定の結果の

時刻による推移は，良い平行性を示した．
これらは，クリアプラン　ワンステップにより，尿中ＬＨの日内変動と月日による変化を知ることができることを示している．

4）5症例（図5，6，7，8および9）における8回の排卵（ＢＢＴの上昇によって示された）日は，クリアプラン　ワンステップによって＋以上が示された翌日あるいは翌々日であった．

## 考　察

今回の治験により，クリアプラン　ワンステップについて次のようなことが分かった．

1）操作が極めて容易である．サンプラーを尿につけるだけの文字通りワンステップ操作である．さらに，操作中尿によって手指はもちろんであるが，その他の部分も汚染されることがない．操作後もサンプラーのキャップがあるので，サンプラー部分の尿が他に触れることはない．これまでに発売されてきた，この種の測定法（少なくとも3操作を必要とし手指が尿に触れることがある）の中では最も簡便であり，患者自身が誤りなく操作することができる．

2）結果の判定は操作開始から3分以内に可能であり，同種類の他の方法にほぼ等しい．結果の青色の強さは，少なくとも1週間はそのまま残るので患者の判定をチェックしうる．

3）最も著しい特徴は，このワンステップ操作のみで，－，±，＋と＋＋の4段階を区別しうることである．
図4に示したように，これらをハイツインクロンＬＨ® によって測定した0から160mIU/mlまでに対応させると，比較的高い相関が得られ，両者の関係はＹ＝0.009 Ｘ＋0.31（Ｙ：クリアプラン　ワンステップ，Ｘ：ハイツインクロンＬＨ®）によって示される．したがって，クリアプラン　ワンステップの判定結果は，おおよそ次のようなＬＨ濃度を示す．

| － | ± | ＋ | ＋＋ | |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 20 | 80 | 160 | mIU/ml |

4）クリアプラン　ワンステップが測定しうる最低濃度は，sensitivity と specificity そして false positive rate と false negative rate を総合的に考慮すると，20mIU/mlであると考えるのが妥当である（表3）．これは標準ＬＨをテストした結果（表1）とほぼ一致する．

5）上述のように，クリアプラン　ワンステップは操作が簡便であり，陰性から＋＋までの結果判定も容易であるので，これにより尿中ＬＨ濃度の変化を追跡することができると考えられる．これを実際に示したのが図5，6，7，8と9である．すなわち、尿中ＬＨ濃度の時間的そして月日による変化が正確に示されている．

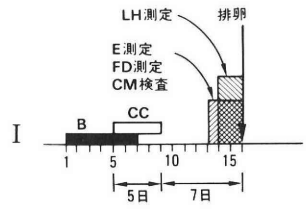
6）クリアプラン　ワンステップはＨＣＧとも反応することが示されているので（表2），このテストを行う時には予め妊娠を否定しておくことが必要である．これは基礎体温，ＨＣＧ特異的妊娠反応や超音波画像診断法による卵胞や子宮の観察による．

7）排卵日を予測したりあるいは下垂体－卵巣機能（排卵）を調節する視床下部機能を検査しようとする場合には，超音波画像法による卵胞の大きさや迅速法による尿中エストロゲン測定値と組み合わせて，クリアプラン　ワンステップを行うことが合理的である．
卵胞径が15mmあるいは尿中エストロゲンが80ng/mlになった時点から，少なくとも1日2回（朝，夕），クリアプラン　ワンステップテストを行う．このようにして「±」あるいは「＋」が得られた時には，さらに朝に続いてあるいは翌朝から3時間毎程度に少なくとも2回採尿してテストを行い，LH surgeの立ち上がりをとらえることが最も適切である．
このLH surgeの立ち上がりの日の翌日あるいは翌々日が排卵日である（図5，6，7，8と9）．始めから「＋＋」が得られた時には，この約30時間後を排卵日とする．
さて，無月経は表4のごとく分類するのが最も合理的である[2]．この分類は正確にはLH pulseの有無とestrogen positive feedback (Epf) の有無によりなされる．しかしclomiphene citrate (CC)（クロミッド®）の投与によっても大体知ることができる（図10）．
図10－Ⅰのごとくクロミッドを投与し尿中エストロゲンとＬＨを迅速法で測定して排卵日を予想する．
図10－ⅡはＣＣによりエストロゲン分泌が急増しEpfが発生してLH surgeが起こり排卵する場合である．これは視床下部機能の正常性と卵巣機能の軽度低下性を示すものである．
図10－ⅢはEpf機能の欠如を示す視床下部機能軽度低下症であり，当然のことながら図のごとくＨＣＧを補うことが合理的治療である．エストロゲン分泌が不十分な時にはＨＭＧを加える．
図10－ⅣはＣＣが全く効かない場合であり，こ

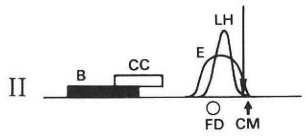
表4　無月経の新分類と治療法[2)]

| 障害部位 | 検査結果 LHp | Epf | LHRH反応 | $E_2$ | 主要な治療法 |
|---|---|---|---|---|---|
| 視床下部 | | | | | |
| 視床下部機能 | | | | | |
| 軽度低下 | − | + | + | ↓ | LHRH pulse |
| 視床下部機能 | | | | | |
| 高度低下 | − | − | + | ↓↓ | HMG-HCG |
| 下垂体 | ／ | ／ | − | 0 | HMG-HCG |
| 卵巣 | | | | | |
| 卵巣機能 | | | | | |
| 軽度低下 | + | + | + | ↓ | Clomiphene citrate |
| 卵巣機能 | | | | | |
| 高度低下 | + | + | + | 0 | Pill又はPremarin |

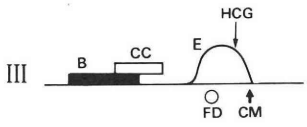
LHp：LH pulse, Epf：estrogen positive feedback




診断　卵巣機能軽度低下性無月経
治療　CC療法
排卵予想日に性交あるいはAIH




診断　視床下部機能軽度低下性無月経
治療　CC-HCG療法
CC-HMG-HCG療法
HCG日に性交又はAIH




診断　視床下部機能高度低下性無月経
治療　HMG-HCG療法
LHRH間欠注入
(-HCG)療法
HCG日に性交又はAIH




図10　クリアプランワンステップの利用法－無月経の診断と治療

B：月経又は消退出血，　CC：clomiphene citrate(クロミッド®)
E：エストロゲン，　FD：卵胞径，　CM：頸管粘液

CCはBの5日目から1日100mgを5日間投与する。
CC終了後7日目が排卵日となる。

LH測定をクリアプラン ワンステップで行う。
無月経は高ゴナドトロピン性のものを除く。

のような時にはLH pulseが認められない．すなわち高度の視床下部機能低下症であり，HMG-HCG療法やLHRH間欠注入（－HCG）療法が妥当である．

8）総括すると，クリアプラン　ワンステップによる尿中LH測定は，極めて簡便で迅速であり，したがって患者自身が使用することが可能である．さらに尿中LH濃度の変動を追跡することができる．かくて，排卵日が予想され，尿中エストロゲン濃度の迅速測定法あるいはその指標(卵胞径や頸管粘液)と組み合わせることにより無月経の種類を適切に診断しうるので，無月経やこれによる不妊症を正確に診断することができる．

## 文　献

1）岡村　隆，気賀沢和子，柳沼　忞：新しい尿中LH判定量キットの検討，産婦人科の世界，41：423，1989
2）柳沼　忞，西井　修：「視床下部」性無月経の再検討，日本産婦人科雑誌，40：1777，1988

## Detection of LH surge by Clearplan One Step— the easiest and most rapid method

Tsutomu Yaginuma, Takashi Okamura, Osamu Nishii and Toru Takeuchi

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

Sudden pituitary release of luteinizing hormone (LH) causes ovulation in the mature follicle. The

time of ovulation is in the 2 to 3 days following the beginning of the LH surge. Clearplan One Step can determine the amount of LH in the urine through only one procedure within 3 minutes, urine sampling continuosly being followed by binding LH to blue material, this complex bound with anti-LH antibody adhered to the membrane and blue developed. The amount of LH is expressed as −, ±, + and ++ or 0, 0.5, 1 and 2, respectively. Correlation between results determined by this method (Y) and High Twinclon LH (X) is shown by $Y=0.009X+0.31$ and $R=0.64$ ($P<0.005$). Thus, −, ±, + and++ are approximately equivalent to 0, 20, 80 and 160mIU/ml, respectively. Therefore, +and++are suggested to indicate the presence of LH surge. Indeed, this method could follow accurately changes in the amount of LH in the urine in periovulatory period and detect LH surge. Thus, Clearplan One Step is the easist and most rapid method for detecting LH surge. Further, the simple method for investigating hypothalamic function in amenorrhea using Clearplan One Step is discussed.

(受付：1990年12月25日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# LH・ダイナパック，FSH・ダイナパックの検討と臨床応用

## Clinical Application of LH and FSH DAINAPACK

帝京大学医学部産婦人科学教室

竹下茂樹 Shigeki TAKESHITA
大川とみ Tomi OHKAWA
板橋きよ美 Kiyomi ITABASHI
吉村幸子 Sachiko YOSHIMURA
村瀬隆之 Takayuki MURASE
冲永荘一 Shoichi OKINAGA
荒井清 Kiyoshi ARAI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University, School of Medicine, Tokyo 173, Japan

モノクローナル抗体を用いたEIAにより血中LH, FSHを自動測定するLH, FSHダイナパックについて検討した．原理はLH, FSHをマイクロパーティクルに固定化した抗LH, FSHマウスモノクローナル抗体とアルカリフォスファターゼ標識抗LH, FSH抗体でサンドイッチ型の結合物を形成し基質を加えて分解生成物に365nmの励起光をあて蛍光強度の変化率を測定するものである．測定内変動は低，中，高濃度で検討したところLHで3.4％，3.5％，3.4％FSHで3.6％，3.0％，3.2％，測定間変動はLHで5.6％，4.3％，6.2％，FSHで3.3％，2.8％，3.5％であった．またLH，FSH共に良好な希釈直線が得られた．回収率はLHで101.8～105.0％，FSHで98.7～102.2％であった．Two step sandwich RIA法との相関はLHでr＝0.991（n＝40）FSHでr＝0.981（n＝40）と良い相関性が得られた．正常月経周期，正常婦人，各種婦人科疾患症例についての検討は従来の報告と同様であった．以上より本測定系の臨床応用への価値は高いと思われた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 507—512, 1991)

### 緒　言

下垂体前葉から分泌されるLuteinizing hormone (LH) とFollicle stimulating hormone (FSH) は卵巣機能を調節する重要な因子である．無月経，卵巣機能不全，PCO (polycystic ovarian disease), POF (premature ovarian failure)，更年期障害，不妊症などの婦人科内分泌疾患についてその血中値の測定やLH-RH負荷試験はこれらの病態を把握し視床下部－下垂体－性腺系の障害部位の診断および治療方針を決定する上で欠くことのできない検査法である．LH, FSHの測定は従来から二抗体法ＲＩＡによる測定がなされ各種簡便測定キットが汎用されている．しかしながらこれらのＲＩＡ法は，放射性物質を使用すること，迅速性に欠けることなどの問題点がある．今回我々は，サンドイッチ法を利用したEIAにより血中LH, FSHを自動測定するLH, FSHダイナパックを用いて基礎的検討および臨床応用について検討した．

### 方　法

（1）キットの内容

IMxアナライザー（図1）で行う測定用試薬

1．キャリブレーター

(LH: 0, 2, 10, 25, 100, 250mIU/ml)

(FSH: 0, 1, 10, 50, 100, 150mIU/ml)

LHはWHO lst IRP 68/40, FSHはWHO 2nd IRP 78/549により検定されている．

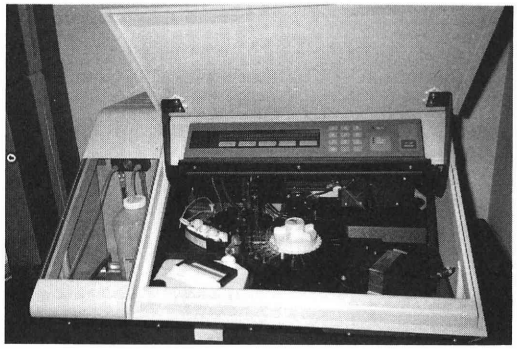


図1　IMx アナライザー（装置内部）

2．IMx LH・コントロール
　L (5mIU/ml) M (40mIU/ml) H (80mIU/ml)
3．IMx FSH・コントロール
　L (5mIU/ml) M (25mIU/ml) H(75mIU/ml)
4．抗 LH, FSH マウスモノクローナル抗体固定化マイクロパーティクル
5．アルカリフォスファターゼ標識抗 LH, FSH ヤギ抗体
6．4－メチルウンベリフェリルリン酸 (1.2mM)
7．モード1キャリブレーター
　(LH 25mIU/ml, FSH 10mIU/ml)

（2）測定原理

検体中の LH, FSH はマイクロパーティクルに固定化した抗 LH, FSH マウスモノクローナル抗体に結合し，グラスファイバーディスクでマイクロパーティクルを吸着後アルカリフォスファターゼ標識抗 LH, FSH 抗ヤギ抗体を加えサンドイッチ型の結合物を形成する．さらに4－メチルウンベリフェリルリン酸を加えアルカリフォスファターゼにより分解された4－メチルウンベリフェロンに 365nm の励起光をあてて発する蛍光強度の変化率を測定する．

（3）操作法

キャリブレーション

1．IMx EIA 用カローセル（以下カローセル）の1～15にリアクション・セルをセットし，ロックする．
2．各2本の IMx LH, FSH・キャリブレーター（A～F），各1本の IMx LH, FSH・コントロール (L, M, H) 各々3滴をリアクション・セルのサンプルカップに滴下する．
3．試薬パック各ビンのキャップを開け，試薬パックごと IMx にセットする．
4．カローセルを IMx にセットする．
5．ドアを閉め MODE キーで CAL モードを選択し，RUN キーを押す．
6．ディスプレイで測定項目を確認する．

検体の測定

検体を測定するときは，コントロールを同時に測定する．

1．カローセルに，リアクション・セルをセットし，ロックする．
2．カローセルの1（もしくは1と2）の位置のリアクション・セルのサンプルカップにモード1キャリブレータ3滴を滴下する．
3．コントロール3滴または検体 100 μl 以上をリアクション・セルのサンプルカップに分注する．
4．試薬パック各ビンのキャップを開け，試薬パックごと IMx にセットする．
5．カローセルを IMx にセットする．
6．ドアを閉めＲＵＮキーを押す．
7．ディスプレイで測定項目を確認する．

結果は，測定後プリントアウトされる．

（4）基礎的検討

基礎的検討としては測定内，測定間変動，添加回収率，希釈直線，さらに two step sandwich 法に基づく LH, FSH RIABEAD（ダイナボット株式会社）との相関について検討した．

（5）臨床応用

臨床応用として正常排卵周期1例につき1周期測定，LH-RH テストを卵胞期2例，黄体期4例，男性3例，各種月経異常患者10例において実施した．基礎値の決定には正常性成熟婦人の卵胞期7例と黄体期10例，男性9例，各種婦人科疾患14例，閉経後婦人5例および卵巣摘除婦人5例について検討した．採血は原則として午前10時に行い LH-RH テストは負荷前および合成 LH-RH100 μg（田辺製薬）を静注後15，30，60，120分後に採血した．採血した血液は4℃，3000rpm，20分間遠心して血清分離し測定まで－20℃で保存した．

## 結　果

基礎的検討

（1）再現性

本法の測定内変動を低，中，高濃度で検討したところＬＨで各々3.4％，3.5％，3.4％，ＦＳＨで3.6％，3.0％，3.2％であった．測定間変動はＬＨで低，中，高濃度各々5.6％，4.3％，6.2％，ＦＳＨで3.3％，2.8％，3.5％であり再現性に優れていた（表1）．

（2）希釈直線

4種類の血清をキャリブレーターA（0 mIU/ml）を使用して2～16倍まで希釈して測定したところ図

表1　ダイナパックの測定内、測定間変動

| | | 平均値 mIU/ml | 測定内変動 % | (n) | 測定間変動 % | (n) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LH | a | 5.0 | 3.4 | (4) | 5.6 | (11) |
| | b | 39.8 | 3.5 | (4) | 4.3 | (11) |
| | c | 79.2 | 3.4 | (4) | 6.2 | (11) |
| FSH | a | 4.9 | 3.6 | (4) | 3.3 | (11) |
| | b | 24.7 | 3.0 | (4) | 2.8 | (11) |
| | c | 74.4 | 3.2 | (4) | 3.5 | (11) |

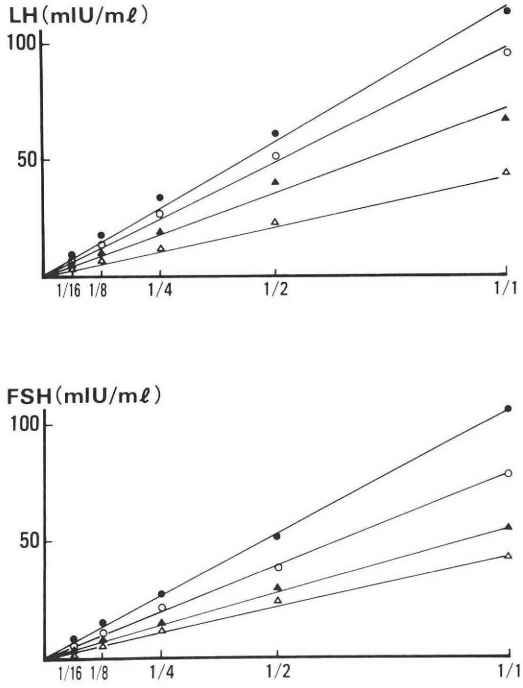



図2　希釈直線

2に示すようにLH, FSH両方とも良好な希釈直線が得られた.

(3) 添加回収試験

血清に既知量のキャリブレーターを添加して求めた回収率は表2に示すようにLHで101.8～105.0%, FSHで98.7%～102.2%で十分満足の行く結果であった.

(4) RIA法との相関

モノクローナル抗体を使用したtwo step sandwich法に基づくLH FSH RIABEADと本法の相関を図3の散布図に示した (X軸にRIABEAD, Y軸にダイナパックの測定値). 相関係数はLHでr＝0.991 (n＝40) FSHでr＝0.981 (n＝40) といずれも高い相関関係を示した. 回帰直線の係数はLH(ダイナパック)＝0.91×LH (RIABEAD)＋9.75,

表2　ダイナパックの添加回収試験

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| LH | | | | |
| 添加濃度 (mIU/ml) | 0.0 | 5.0 | 12.5 | 50.0 |
| 測定値* (mIU/ml) | 2.5 | 7.6 | 15.5 | 55.0 |
| 回収率 (%) | | 101.8 | 104.5 | 105.0 |
| FSH | | | | |
| 添加濃度 (mIU/ml) | 0.0 | 5.0 | 25.0 | 50.0 |
| 測定値* (mIU/ml) | 2.5 | 7.7 | 27.8 | 51.9 |
| 回収率 (%) | | 102.2 | 101.0 | 98.7 |

＊3重測定

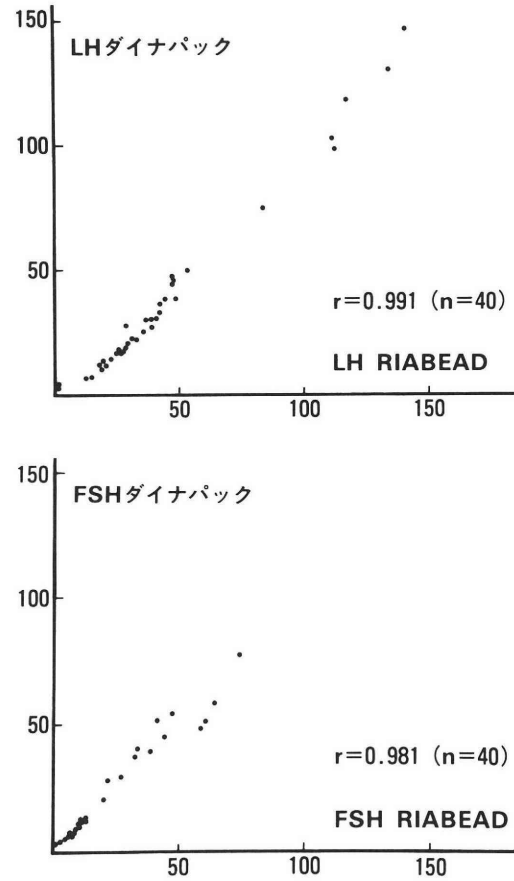



図3　ダイナパックとRIABEADの相関

FSH(ダイナパック)＝0.98×FSH (RIABEAD)＋0.70であった.

臨床検討

(1) 正常排卵周期

正常排卵周期を有する健常婦人1例について本測定法で血中LH, FSHを測定したところ図4に示すようにLHサージは月経周期中間にピークとなりFSHも同様にピークを示した. また基礎体温とも

良く相関した．

（2）LH-RH テスト

健常人（卵胞期，黄体期，男性）の LH-RH テストの結果を図5に示す．血中LHは，卵胞期，黄体期，男性のいずれも LH-RH 負荷後 30 分でピークを示しその増加率は卵胞期 414 %，黄体期 764 %，男性 898 %であり，成熟婦人では卵胞期に比べ黄体期の反応性が高い結果となった．FSHは卵胞期で 60 分，黄体期で 120 分で最大値となりその増加率は 158 %，191 %であった．男性は 60 分でピークとなり 210 %の増加率であった．

月経異常患者の LH-RH テストの結果を図6に示す．1例を除き LH-RH 負荷に反応して血中LHの上昇が認められたが2症例はLH基礎値の上昇，LH/FSH＞3.0，LH の過剰反応と FSH の低反応から PCO が疑われた．1症例は LH，FSH の反応性が不良で下垂体性の無月経による不妊症であると診断した．

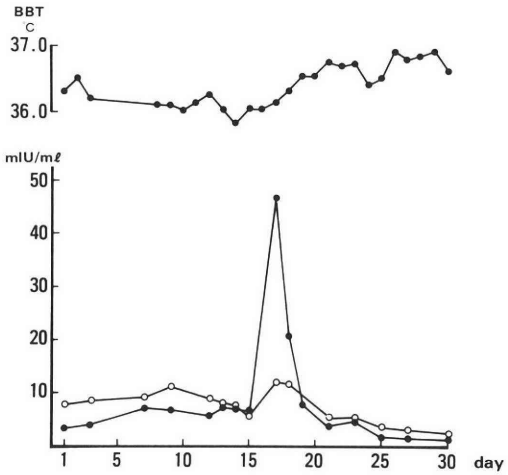



図4　正常排卵周期における血中 LH，FSH 値

●——● LH　○——○ FSH

（3）LH，FSH基礎値

健常人，月経異常症例の LH，FSH 基礎値を表3に示す．健常婦人の血中LH値は，平均値で卵胞期 6.56 mIU/ml，黄体期 5.07 mIU/ml，FSHは卵胞期 6.91 mIU/ml，黄体期 3.46 mIU/ml で卵胞期の FSHは黄体期に比べて高値を示した（$P<0.01$）．閉経婦人，卵巣摘出患者の LH，FSH は高値を示した．

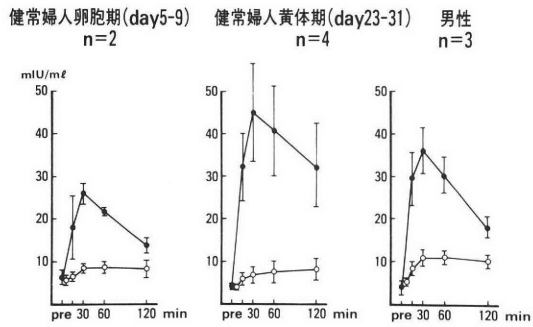



図5　健常人の LH-RH テスト ●——● LH　○——○ FSH

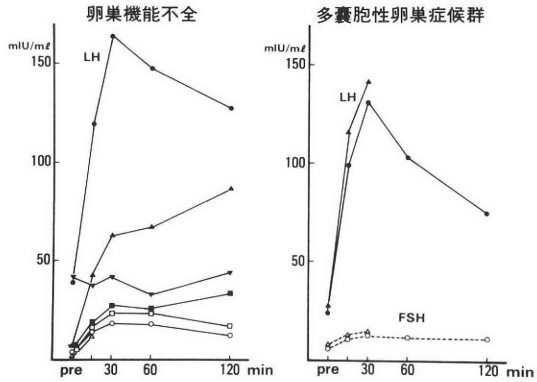



図6　各種月経異常症例の LH-RH テスト

表3　健常人，各種月経異常症例の LH，FSH 基礎値

| 症　例 | 例数 | 平均年齢 | LH (mIU/ml) | FSH (mIU/ml) |
|---|---|---|---|---|
| 卵胞期 | 7 | 28.7 | 6.56±0.91* | 6.91±0.96 |
| 排卵期 | 4 | 27.0 | 23.70±5.73 | 7.41±0.33 |
| 黄体期 | 10 | 26.8 | 5.07±1.03 | 3.46±0.45 |
| 男　性 | 9 | 34.0 | 4.28±0.60 | 5.34±0.83 |
| 卵巣機能不全 | 7 | 25.2 | 6.42±0.87 | 5.34±0.99 |
| 多嚢胞卵巣 | 2 | 21.5 | 25.50±2.00 | 7.71±1.56 |
| 閉　経 | 5 | 63.8 | 33.00±5.90 | 73.50±10.67 |
| 両側卵巣摘出 | 5 | 40.8 | 26.92±3.82 | 68.60±7.64 |
| その他の婦人科疾患 | 5 | 28.0 | 6.96±0.84 | 5.90±0.97 |

＊　mean±SE

## 考　察

今回検討を行ったLH, FSHダイナパックは基礎的検討において十分に満足の行く結果が得られた．特に再現性に優れ測定内，測定間変動いずれも十分に低値であり低，中，高いずれの濃度に関しても変動係数は安定していた．以前我々が報告した結果[2]等と比較するとRIABEADでは低濃度の測定間変動がLH 7.4，FSH 6.0％であったのに対してダイナパックでは各々5.6，3.3％と十分に低値で，中，高濃度についてもばらつきが少なく安定していた．

本測定系はIMxを使用した完全自動測定系であるため操作は著しく簡便で，かつ分注や反応時間および温度を完全に制御することにより再現性，精度が向上すると考えられた．従って，日常の臨床応用に際しては検体の2重測定は必ずしも必要でなく1重測定で十分と思われる．

最近はLH, FSHの測定はモノクローナル抗体を用いた二抗体RIAの各種簡便測定キットが汎用されているが，それらはRIを使用するために特別な施設を必要とし，測定結果が出るまでに時間がかかること等問題点がみられる．現在不妊症，各種内分泌疾患症例に対してLH，FSHの測定は必須の検査となっているが診断，治療を進めていくためにはこれらの結果を短時間で知ることが望まれる．特に血中LHは排卵直前にサージを形成することによりもっとも信頼のおけるパラメーターであり，迅速かつ短時間で結果を知る必要がある．本測定系は1重測定の場合，1回の測定で最大24検体が処理可能で約40分で測定でき，また検量線は2週間使用できるなど迅速性，経済性の点からも優れている．

種々の文献[1,2]で述べられているようにRIA, EIAいずれの測定系においても標準品は下垂体ゴナドトロピンにより検定されたものが主流を占めるが，従来の尿性ゴナドトロピンを基準としたものも使われている．本測定系は前者にあたりHMGを基準とした測定を行っている施設では導入にあたって検定標準品に由来する測定値の差について留意する必要がある．またダイナパックとtwo step sandwich法によるLH, FSH RIABEADとの相関関係は結果で示した如く極めて良好であり従来から汎用されているRIA法に匹敵する測定法であると思われる．

本測定法で測定した健常人のLH, FSH基礎値については，LHに関しては卵胞期，黄体期で差は認められなかったが，FSHに関して卵胞期では黄体期に比して有意に高値を示した．その他閉経婦人，男性症例における測定結果も従来の検討とほぼ等しい結果を得た．また今回少数であるが月経異常症例について検討したところ2例の卵巣機能不全患者でLH基礎値の増加とLH-RHテストで過剰反応，FSHの低反応，LH/FSH＞3.0と内分泌診断基準のPCO[3]を疑わせる症例を認めた．

以上の成績よりLH, FSHダイナパックの臨床応用への価値は高いと思われた．

(稿を終るにのぞみLHダイナパック，FSHダイナパックを提供していただいたダイナボット株式会社に深謝いたします)

## 文　献

1）落合和徳，平間義昭，北原慶幸，窪田尚弘，横瀬行雄，寺島芳輝：モノクローナル酵素抗体サンドイッチ法を利用したEIA kit—センシビーズhLH，センシビーズFSH—の基礎的検討，産婦人科の実際，38：1163，1989

2）竹下茂樹，大川とみ，小林美和子，荒川聡子，吉村幸子，神戸川明，冲永荘一，荒井　清：Two step sandwich法に基づくLH・RIABEAD　FSH・RIABEADの検討と臨床応用，日本不妊学会雑誌，33：316，1988

3）森　崇英：多嚢胞性卵巣症候群－概念の整理と最近の治療，日本内分泌学会誌，63：1449，1987

## Clinical application of LH and FSH DAINAPACK

Shigeki Takeshita, Tomi Ohkawa, Kiyomi Itabashi, Sachiko Yoshimura, Takayuki Murase, Shoichi Okinaga and Kiyoshi Arai

Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University, School of Medicine, Tokyo 173, Japan

We evaluated the clinical applicability of the LH and FSH DAINAPACK, an enzyme immunoassay (EIA) kit. LH or FSH in the specimen binds to the monoclonal antibody fixed on microparticles, then to the alkalinephosphatase-labelled antibody. For measurement, the velocity of enzyme reaction was monitored by fluorescence under excitation by 365 nm light. Intra-assay variance in low, middle and high doses was 3.4, 3.5 and 3.4% for LH, and 3.6, 3.0 and 3.2% for FSH. Inter-assay variance in low, middle and high doses was 5.0, 4.3 and 6.2% for LH, and 3.3, 2.8 and 3.5% for FSH. The curves obtained from series of diluted samples showed a good linearity in both cases. Recoveries of added standards ranged 101.8-105.0% for LH, and 98.7-102.2%

for FSH. Correlation of these assays to two-step sandwich RIAs was significant (LH: r=0.991, n=40), (FSH: r=0.981, n=40). The above mentioned results as well estimated levels of LH and FSH in various physiological and pathological conditions suggest that this new measurement system is useful for the clinical applications.

(受付：1990年12月10日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# ラット卵巣顆粒膜細胞に対するFSH，ジエチルスチルベステロール，2－ハイドロキシエストラジオールの作用

# The Effect of FSH, Diethylstilbesterol and 2-Hydroxyestradiol on Steroidogenesis in Cultured Rat Granulosa Cells

帝京大学医学部産婦人科学教室（指導：荒井　清教授）
伊　豫　正　人
Masato IYO

Department of Obstethics and Gynecology,
Teikyo University, School of Medicine, Tokyo 173, Japan

ラット卵巣顆粒膜細胞のcAMP，プロゲステロン，エストラジオール生合成に対するジエチルスチルベステロール（DES），2－ハイドロキシエストラジオール（2-OH-$E_2$）の作用について検討した．下垂体摘出未成熟ラットより卵巣顆粒膜細胞を分離し，各種ホルモン，抗エストロゲン剤を添加し48時間培養，培養液中のcAMP，プロゲステロン量をRIAで測定した．また，エストラジオール産生量は上記の培養後，$\Delta_4$-androstenedioneを含んだ培養液で更に5時間培養し培養液中のエストラジオールをRIAで測定した．DESはFSHによるcAMP，P産生を促進し，この作用は抗エストロゲン剤によって抑制された．2-OH-$E_2$も同様にcAMP，P産生を促進し，この作用は抗エストロゲン剤により抑制され，2-OH-$E_2$の作用はエストロゲンレセプターを介している事が推測された．以上より，2-OH-$E_2$はラット卵巣顆粒膜細胞においてlocal hormoneとして卵巣機能の調節に関与していることが推測された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 513—519, 1991)

## 緒　言

卵巣は視床下部・下垂体系の調節下で周期的に性ステロイドの生合成分泌および排卵を行なっているが，この機序については古くから諸家により研究されている．卵巣顆粒膜細胞の単層培養系でFollicle Stimulating Hormone（FSH）は顆粒膜細胞のdifferentiation惹起する[1～4]．またFSHは細胞膜で2次メッセンジャーとしてのcyclicAMP (cAMP) 産生を刺激して，プロゲステロン，エストラジオール等の性ステロイド生合成を促進するほか，LHレセプター形成を誘導することが知られている[2,5~7]．卵巣で生合成されたエストラジオールは視床下部，下垂体系のみならず，卵巣顆粒膜細胞自身にautocrine的に作用し自己の増殖，性ステロイド分泌を調節するが[5,6,8,9]，その機序の詳細は必ずしも明確ではない．このエストロゲン作用は核のエストロゲンレセプター(ER) を介して特異的な遺伝子を調節することにより発現するとされている[10~12]．

また，エストロゲンの代謝物であるカテコールエストロゲンが視床下部，下垂体で生合成され，排卵機構に関与していることが報告されているが[13~18]，その卵巣での作用も近年注目されている[19~21]．

本研究は下垂体摘出未成熟ラットの卵巣顆粒膜細胞単層培養系を用いて，ジエチルスチルベステロール(DES)，カテコールエストロゲンの卵巣への直接作用について検討を行なったので報告する．

## 実験材料および方法

Ⅰ．実験動物

23日齢Sprague-Dawley雌ラットの下垂体を摘出し，DES 0.5mg/dayを5日間皮下投与して卵胞を成

熟させた.

II. 顆粒膜細胞の採取方法

下垂体摘出後6日目にラットを断頭, 屠殺し, 無菌的に開腹して卵巣を摘出した.

これを1% BSA, 0.4%コラゲナーゼ (SIGMA, USA), deoxyribonuclease I (DNase: SIGMA, USA) 10 μg/ml を含んだ Hank's calucium Magnesium free (HCMF: GIBCO, USA) 液に浮遊させ37℃, 90分間 incubate した後, 800rpm 5分間遠沈し顆粒膜細胞を採取した. この細胞を1% BSA HCMF 液で更に3回洗浄し生存顆粒膜細胞が $1\times10^5$個/ml となるよう培養液で調整した. 細胞の生存率は0.4% trypan blue (半井化学薬品) により検討した.

III. 培養液

培養液は4 mM L-glutamine (半井化学製品), Penicillin 100units/ml (明治製菓), Streptomycin sulfate 100μg/ml (明治製菓) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (NISSUI, 東京) を用いた.

IV. 培養方法

培養液で生存細胞数 $1\times10^5$個/ml に調整した後, その各1 ml を CELL WELL (CORNING, USA) に分注し, FSH (porcine, SIGMA, USA), DES, 2水酸化エストラジオール (2-OH-$E_2$), Clomiphene citrate (CC), Keoxifene (K) (Elli Lily, USA) 等を添加して5% $CO_2$, 95%空気下 Dubnoff 型インキュベターで48時間培養を行なった. エストラジオール産生能試験に際しては, 以上の前培養後 $10^{-8}$M $\triangle_4$-androstenedione を添加して, 更に同条件下で5時間追加培養した. 培養終了後, 培養液をシオノギストックチューブに採取し測定まで−20℃で凍結保存した.

V. cAMP の測定

培養液中の cAMP の測定はサイクリック AMP キット「ヤマサ」(ヤマサ醤油株式会社, 東京) [22]を用いて RIA で測定した.

VI. プロゲステロン (P) の測定

特異性の高い抗血清を用いて RIA で測定した[23].

VII. エストラジオール ($E_2$) の測定

顆粒膜細胞を, FSH, DES とともに48時間培養し細胞を培養液で洗浄後, $10^{-8}$M $\Delta_4$-an-drostenedione を含む培養液で, 5時間更に培養を行なった. 培養後, 培養液を採取, シオノギストックチューブに分注し−20℃で測定まで凍結保存した[24].

VIII. 有意差検定

student's T test を用いた.

## 結　果

I. FSH stimulated cAMP 産生, P産生に対する DES の影響

FSH 30ng を添加して顆粒膜細胞を48時間培養すると, 培養液中の cAMP 産生量は0.85±0.30 pmol/ml から16.39±1.51 pmol/ml に増加した ($P<0.001$). FSH 30ng に DES $10^{-7}$M を同時に添加して培養すると cAMP は19.31±1.35 pmol/ml に増加した ($P<0.01$, Fig. 1).

また, この時のP産生量は FSH 単独では2.38±0.02 ng/ml, DES を加えると3.89±0.14 ng/ml と有意に増加した ($P<0.01$, Fig. 2).

II. FSH stimulated cAMP 産生, P産生に対する抗エストロゲン剤の影響

FSH 30ng, DES $10^{-7}$M と同時に抗エストロゲン剤を添加して培養を行なった. 抗エストロゲン剤は triphenylethylene 系の clomiphene citrate (CC) と benzothiophene 系の keoxifene (K) を用いた.

DES により増強された FSH stimulated cAMP 産生は Fig. 1 に示すように抗エストロゲン剤により量依存的に抑制された.

FSH stimulated P 産生も Fig. 2 に示すように抑制した ($P<0.01$).

III. FSH stimulated $E_2$産生に対する DES の影響

FSH 30ng 単独で培養後 $10^{-8}$M $\Delta_4$-androstenedione を添加した時の $E_2$産生量 329±19.2 pg/ml に比し, FSH と DES との同時添加培養後では460.3±21.3 pg/ml と増加した ($P<0.01$, Fig. 3).

抗エストロゲン剤の中, Keoxifene 添加時には量依存的に培養液中のエストラジオール濃度が減少した.

IV. FSH stimulated cAMP 産生, P産生に対する抗エストロゲン剤の影響

FSH 単独, 或いは2-OH-$E_2$を同時添加し48時間培養を行ない, 培養液中の cAMP 産生量, P産生量を測定した.

FSH 30ng に2-OH-$E_2$を $10^{-8}$〜$10^{-6}$Mまで同時添加した時の cAMP 産生量を Fig. 4 に示した. FSH 30ng 単独添加では9.9±1.1 pmol/ml であったが, 2-OH-$E_2$の同時添加で量依存的に cAMP 産生を促進した. また DES 添加後も量依存的に cAMP の上昇をみた (Fig. 4). しかし, 2-OH-$E_2$単独では DES と同様に cAMP 産生には影響を与えなかった.

また, この時のP産生は FSH 30ng 単独での2.04±0.40 ng/ml に比し 2-OH-$E_2$ $10^{-7}$, $10^{-6}$M同時添加で各々2.96±0.31, 3.63±0.36 ng/ml と増加を示した

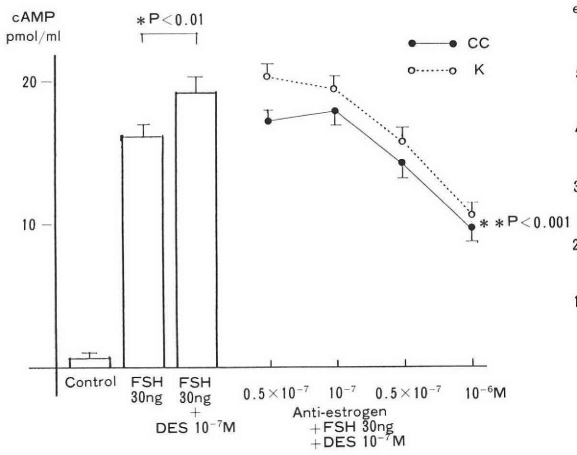



Fig. 1 cAMP ACCUMULATION IN MEDIUM
cAMP concentration in the media was further increased by the addition of DES. The anti-estrogenic agents decreased the FSH-stimulated cAMP levels in a dose dependent manner. Each point represents the mean± SEM. (＊P<0.01　＊＊P<0.001)

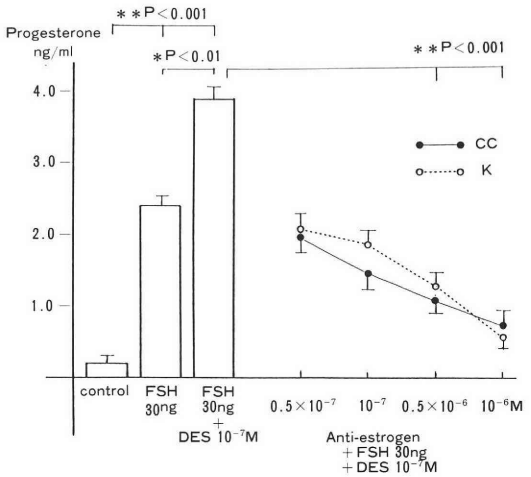



Fig. 2 PROGESTERONE CONCENTRATION IN MEDIUM
Progesterone concentration in the media was further increased by the addition of DES. The anti-estrogenic agents decreased the FSH-stimulated progesterone levels in a does dependent manner. Each point represents the mean±SEM.

(Fig. 5, P<0.01).

V. 抗エストロゲン剤のカテコールエストロゲンの影響

FSH 30ng に 2-OH-$E_2$ と抗エストロゲン剤 (CC, K) を同時に添加して 48 時間培養を行ない，培養液中の cAMP，P 産生量を測定した．

FSH 30ng に 2-OH-$E_2$ $10^{-6}$M を同時添加して 48 時間培養した時の cAMP 産生量 17.4±1.5 p mol/

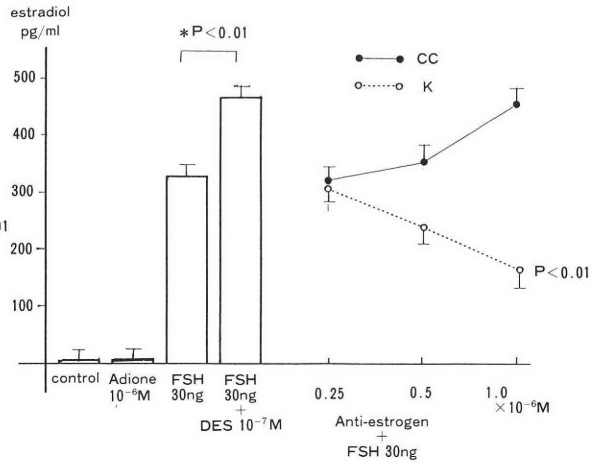



Fig. 3 ESTRADIOL CONCENTRATION IN MEDIUM
Estradiol concentration in the media was further increased by the addition of DES. Of the anti-estrogenic added, Keoxifene decreased the estradiol levels in a dose dependent manner.
Androstenedione was added as a substrate. Each point represents the mean±SED.

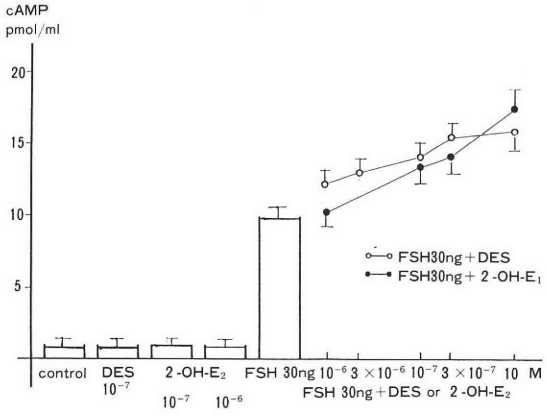



Fig. 4 EFFECT OF DES AND 2-OH-$E_2$ ON cAMP ACCUMULATION
The cAMP concentration in the media augmented by 30ng of FSH was further increased by the additional use of 2-OH-$E_2$ in a dose dependent manner. DES showed a similar effect.
Each point represents the mean±SED.

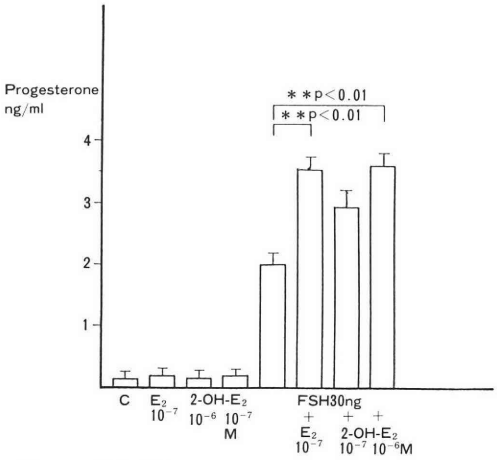



Fig. 5　EFFECT OF DES AND 2-OH-$E_2$ ON PROGESTERONE CONCENTRATION
The progesterone concentration in the media augmented by 30ng of FSH was further increased by the additional use of $10^{-7}$ M of DES. A dose dependent increase of the progesterone concentration was demonstrated as $10^{-7}$ to $10^{-6}$ M of 2-OH-$E_2$ were added.
Each point represents the mean±SED.

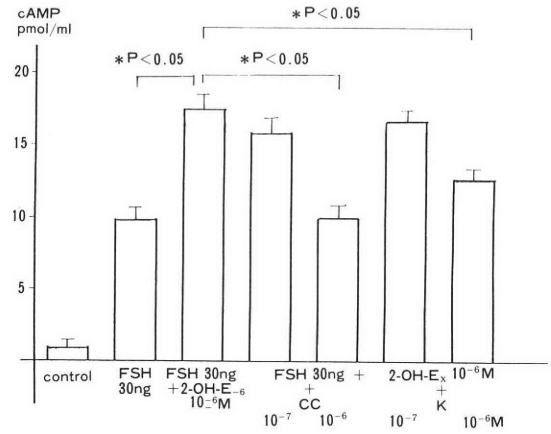



Fig. 6　EFFECT OF ANTI-ESTROGENS ON cAMP ACCUMULATION
The cAMP concentration in the media augment by a combined use of FSH and 2-OH-$E_2$ was significantly suppressed by $10^{-7}$ to $10^{-6}$ M of eigher clomiphene citrate or keoxifene.
Each points represents the mean ±SED.

ml に比し $10^{-7}$, $10^{-6}$Mの CC を同時に添加して培養すると各々15.6±2.0 pmol/ml, 10.2±0.8pmol/ml (P<0.05) と抑制がみられた. また, $10^{-7}$, $10^{-6}$M のKを同時に添加して培養した時も各々16.4±0.9pmol/ml, 12.5±0.6pmol/ml (P<0.05) と抑制

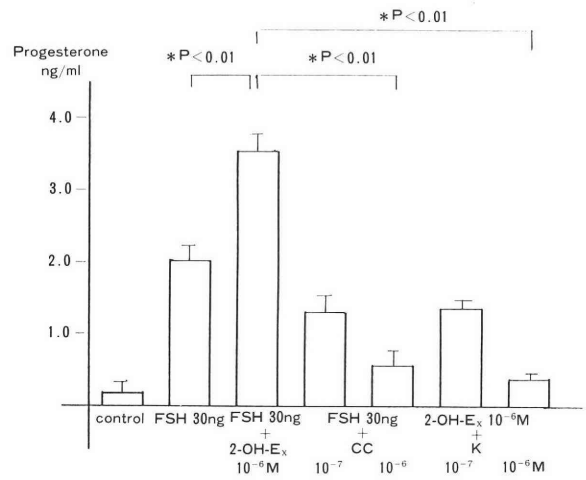



Fig. 7　EFFECT OF ANTI-ESTROGENS ON PROGESTERONE CONCENTRATION
The progesterone level augment by combined use of FSH and 2-OH-$E_2$ was significantly suppressed by $10^{-7}$ to $10^{-5}$ M of eigher clomiphene or keoxifene.
Each point represents the mean±SED.

がみられた (Fig. 6).

P産生は, FSH 30ng に 2-OH-$E_2$ $10^{-6}$ Mを同時添加すると 3.54±0.65ng/ml であった. この時 CC を $10^{-7}$, $10^{-6}$M同時に添加して培養すると各々1.24±0.09ng/ml, 0.56±0.02ng/ml とP産生の抑制がみられ (P<0.01), またK $10^{-7}$, $10^{-6}$Mを同時に添加すると各々1.26±0.10ng/ml, 0.35±0.02ng/ml と有意の抑制 (P<0.01) がみられた (Fig. 7).

## 考　察

ラットの卵巣顆粒膜細胞の単層培養系を用いた卵巣のステロイド生合成の研究は Shueh. A. J. W.ら[19]により報告されている. 本研究は卵巣におけるエストロゲンの autocrine 作用やカテコールエストロゲンの直接の作用について抗エストロゲン剤を用いて検討してみた.

顆粒膜細胞がFSHにより刺激されプロゲステロンやエストロゲン等の性ステロイド生合成を起こすこと, ならびに細胞膜で2次メッセンジャーとしてcAMPが働いていることは諸家により報告されている[1~7]. また, adenyl cyclase に直接作用, 活性化する forskolin で cAMP 産生を増加させ, かつプロゲステロン, エストラジオール生合成が増加することから[25,26], 顆粒膜細胞におけるステロイド生合成も cAMP を介していることが考えられた. 細胞内では

cAMP以外に$Ca^{2+}$やphosphatidylinositolの性ステロイド生合成への関与が報告されている[27,28]．

顆粒膜細胞で生合成されたエストロゲンは卵巣顆粒膜細胞自身にautocrine的に作用することが知られている[5,8,9,19]．FSHと同時にDES, 2-OH-$E_2$を添加して培養するとcAMP産生は量依存的に促進された．また，プロゲステロン産生も同時添加によって量依存的に促進された．この促進作用を検討するために抗エストロゲン剤を用いて同様の培養を行なったが，抗エストロゲン剤の同時添加によってcAMP産生ならびにプロゲステロン産生が抑制された．DES処理未成熟ラットの顆粒膜細胞にエストロゲンレセプターが依存することは既に報告がある[29]．本レセプターと特異的に結合しその作用を抑制する抗エストロゲン剤によってエストロゲンのFSH作用が抑制されることが判明した．

本研究ではアンドロゲンを基質としたエストラジオールの合成から顆粒膜細胞のアロマターゼ活性を推定したが，FSHとDES同時添加の前培養によってエストラジオールの合成がFSH単独の前培養時に比し促進された．この促進作用は抗エストロゲン剤のKによって抑制された．したがって，DESが顆粒膜細胞のアロマターゼ活性を促進する可能性が示唆された．

今回使用した抗エストロゲン剤はtriphenylethylene系のCCとbenzothiophene系のKの2種類の薬剤である．CCはFSH stimulated cAMP，P生合成に抑制的に作用したが，$E_2$産生に対しては抑制がみられずむしろ促進的に作用した．CCの作用機序はAsemら[30]の報告によればcholesterol side-chain clevage enzymeを抑制することにある．一方KはcAMP，P生合成を抑制し，かつアロマターゼ活性も，抑制することが示唆された．このことは，CCが抗エストロゲン作用と共にエストロゲン作用も有している為，アロマターゼ活性に対してはアゴニストとして作用した結果と推定出来よう．一方，Kはラットの卵巣顆粒膜細胞に対してもアゴニスト作用の殆どないより純粋な抗エストロゲン剤として注目されており[31~33]，本研究においてもアゴニスト作用をしめさなかった．

抗エストロゲン剤を増量すると、添加したDES作用を打ち消すのみでなく，更にFSH作用を抑制したが，これは顆粒膜細胞に内在するエストロゲンとFSHとの相互作用に干渉した為なのか，あるいは別の作用機序によるのか，今後解明すべき問題である．

カテコールエストロゲンはエストロゲンの代謝物であり，視床下部や下垂体等の中枢組織で証明されている[16]．また，ラット卵巣にはestradiol 2-hydeoxylase enzyme activityがあり，卵胞液中に2-OH-$E_2$が証明されていることより[34]卵巣において直接的に作用していることが推測される．本研究では2-hydroxylaseによって水酸化されたエストロゲンより産生された2-OH-$E_2$を用いて，卵巣顆粒膜細胞に対する直接作用について検討した．その結果，本ステロイドは顆粒膜細胞に対して直接的に作用し，FSHと共同でcAMP産生を増加，P産生を促していることが証明された．また，この作用が抗エストロゲン剤により抑制されたことよりエストロゲンレセプターを介していることが推測された．カテコールエストロゲンは卵巣でカテコラミンレセプターを介して作用していると報告されているが，本研究からむしろエストロゲンレセプターを介していることが示唆された．この場合にもP産生の際，添加した2-OH-$E_2$によるFSH増強作用を上回る抗エストロゲン剤の作用があり，そのメカニズム解明には今後の研究によらねばならない．

## 結　論

1）ラット卵巣顆粒膜細胞培養においてDESはエストロゲンレセプターを介して，FSH-stimulated cAMP産生を促進し，P，$E_2$の生合成を促進した．

2）同様にエストロゲンの主要代謝物である2-OH-$E_2$もFSH-stimulated cAMP産生を促進，P産生を促進した．この作用は抗エストロゲン剤で抑制されたことからエストロゲンレセプターを介していることが示唆された．

3）2-OH-$E_2$はエストラジオールと同様に，卵巣機能のautocrine調節に関与していることが推測された．

## 謝　辞

稿を終えるに臨み，ご御指導とご校閲を賜わりました荒井清教授に深謝いたします。あわせて終始直接ご指導頂きました神戸川明助教授，多方面にわたり援助下さいました研究室各位に感謝いたします。

## 文　献

1）Dorrington, J. H. and Armstrong, D. T.: Effects of FSH on gonadal function, Recent Prog. Horm. Res., 35: 301, 1979

2）Erickson, G. F., Wang, C. and Hsueh, A. J. W.: FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultures in chemically defined medium, Nature, 279: 336, 1979

3）Knecht, M., Amsterdam, A. and Catt, K. J.: The regulatory role of cyclic AMP in hormon-

induced granulosa cell differentiation, J. Biol. Chem., 256: 10628, 1981
4) Mondschein, J. S., Schomberg, D. W.: Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures, Science, 211: 1179, 1981
5) Amsterdam, A., Knecht, M. and Catt, K. J.: Hormonal regulation of cytodifferentiation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78: 3000, 1981
6) Hudson, K. E. and Hillier, S. G.: Catecholoestradiol control of FSH-stimulated granulosa cell steroidgenesis, J. Endocrinol, 106: R1, 1985
7) Knecht, M., Ranta, T. and Catt, K. J.: Granulosa cell differentiation in vitro: Induction and maintenance of follicle-stimulating hormone receptops by adenosine 3', 5'-monophosphate, Endocrinology, 113: 949, 1983
8) A dashi, E. Y. and Hsueh, A. J. W.: Estrogens augument the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells, J. Biol. Chem., 257: 6077, 1982
9) Fanjul, L. F., Ruiz-De-Galarreta, C. M. and Hsueh, A. J. W.: Estrogen regulation of progestin biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells, Biol. Reproduction, 30: 903, 1984
10) Chan, L., Means, A. R. and O' Malley, B. W.: Rates of induction of specific translatable messenger RNAs for ovalbumin and avidin by steroid hormones, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 1870, 1973
11) Schimke, R. T., McKnight, G. S., Shapio, D. J., Sullivian, D., Palacios, R.: Hormonal regulation of ovalbumin synthesis in the chick oviduct, Recent Prog. Horm. Res., 31: 175, 1975
12) Wetekam, W., Mullinix, K. P., Kronenberg, H. M., Eldridge, J. D., Meyers, M., Goldberger, R. F.: Effects of estrogen on gene expression: purification of vitellogen in messenger RNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3364, 1975
13) Ball, P. and Knuppen, R.: Catecholoestrogens (2-and 4-hydroxyoestrogens), Acta Endocrinologica 93, supplement 232: 1, 1980
14) Davis, I. J., Naftolin, F. K. J., Fishman, J. and Sin, J.: The affinity of catecholestrogens for estrogen receptors in the pituitary and anterior hypothalamus of the rat, Endocrinology, 97: 554, 1975
15) Fishman, J.: Role of 2-hydroxyestrone metabolism, J. Clin. Endocrinol. Metab., 23: 207, 1963
16) Fishman, J. and Nerton, B.: Catecholestrogens formation in the central nervous system of the rat, Endocrinology, 96: 1054, 1975
17) Fishman, J.: Biological action of catecholestrogen, J. Endocrinol., 89: supplement, 59, 1981
18) 岡谷裕二，相良祐輔：Catecholestrogenのpreovulatory LH Surge抑制機序に関する検討，日本産婦人科学会雑誌，39：1961，1987
19) Hsueh, A. J. W., Adashi, E. Y., Jones, P. B. C. and Welsh, T. H.: Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells, Endocr. Rev., 5: 76, 1984
20) Spicer, L. J. and Hammond, J. M.: -Hydroxyestradiol modulates a facilitative action of eatecholamines on porcine granulosa cells, Endocrinology, 120: 2367, 1987
21) Spicer, L. J. and Hammond, J. M.: Mechanim of action 2-hydroxyestradiol on steroidogenesis in ovarian granulosa cells: Interactions with catecholamines and gonadotropins involve cyclic adenosine monophosphate, Biol. Reprod., 40: 87, 1989
22) Honma, M., Sato, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small volume sample blood and tissue, Biochem. Med., 18: 257, 1977
23) 吉田孝雄，田　根培，向井久晴，野田正和，高木繁夫，牧野拓雄，神戸川明：性ステロイドホルモンのRadioimmunoassey. プロゲステロンのRadioimmunoassey，ホルモンと臨床，21：979，1973
24) 牧野拓雄：性ステロイドホルモンのRadioimmunoassey，日本内分泌学会誌，49：629，1973
25) Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J. W.: Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells, Proc. Natl. Sci. USA, 78: 3363, 1981
26) Asem, E. K. and Hertelendy, F.: Effects of progesterone and cyclic adenosine monophosphate production in avian granulosa cells, Biol. Reprod., 29: 1098, 1983
27) Carnegie, J. A. and Tsang, B. K.: Follicle-stimulating hormone-regulated granulosa cell steroidogenesis: Involvement of the calcium-calmodulin system, Am. J. Obstet. Gynecol., 145: 223, 1983
28) Tsang, B. K., Carnegie, J. A.: Caluciumdependent regulation of progesterone production by isolated rat guranulosa cells: Effects of the calucium ionophore A23187, prostaglandin $E_2$, dl-isoproterenol and cholera toxin, Biol. Reprod., 30: 787, 1984
29) Richards, J. S.: Contact of nuclear estradiol receptor complex in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropin, Endocrinology, 97: 1174, 1975
30) Asem, E. M. and Hertelendy, F.: Clomiphene and tamoxifen inhibit the cholesterol side-chain clevage activity in hen granulosa cells, J.

Reprod. Fertil., 77: 153, 1986
31) Kessel, B. and Hsueh, A. J. W.: Keoxifene (LY156758) inhibits follicle-stimulating hormone induced defferentiation of cultured rat granulosa cells, Life Sciences, 40: 1089, 1987
32) Knecht, M., Chon-hwa, Tsai-Morris and Catt, K. J.: Estrogen dependence of luteneinzing hormone receptor expression in cultured rat granulosa cells: Inhibition of granulosa cell development by the antiestrogens Tamoxifen and Keoxifene, Endocrinology, 116: 1165, 1985
33) Simard, J. and Labrie, F.: Keoxifene shows pure antiestrogenic activity in pituitary gonadotrophs, Mol. Cell. Endocrinol., 39: 141, 1985
34) Silberzahn, P., Almahboli, G. H., Dehennnin, L. and Merouane, A.: Estrogen metabolites in equine ovarian follicles: Gaschromatographic-mass spectrometric determination in relation to follicular ultrastructure and progestin contect, J. Steroid. Biochem., 22: 501, 1985

## The effects of diethylstilbesterol and 2-hydroxyestradiol on steroidogenesis in culutured rat granulosa cells

Masato Iyo

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University, School of Medicine
Tokyo 173, Japan
(Director: Prof. Kiyoshi Arai)

The effect of diethylstilbesterol and catecholestrogen (2-hydroxyestradiol) on cyclic AMP (cAMP) accumulation, the production of progesterone and estradiol under FSH stimulation was examined. Granulosa cells were isolated from immature rats, which had been hypophysectomized and injected with 0.5mg of DES for 5 days. $1 \times 10^5$ viable cells were incubated with appropriate hormones in 1ml culture medium for 48 hours at 37℃ in a humidiffed incubater under the atmosphere of 95% air 5% $CO_2$. We determined the accumulation of cAMP and the production of progesterone in the culture medium by specific RIA. Estradiol formed from $\Delta_4$-androstenedione was measured by specific RIA. DES increased the FSH-stimulated cAMP accumulation and the progesterone production. And this effect was inhibited by anti-estrogens. 2-hydroxyestradiol also had a similar effect; it increased the FSH-stimulated cAMP accumulation and the progesterone production. Again this effect was inhibited by antiestrogens suggesting that the effect might be mediated by the estrogen receptor. From these results it may well be speculated that 2-hydroxyestradiol regulates the ovarian function as a local hormone.

(受付：1991年2月20日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 黄体中期における血清CA 125測定の臨床的意義

# Clinical Significance of the Measurement of Serum CA 125 During Midluteal Phase

島根医科大学医学部産科婦人科学教室（主任：北尾　学教授）
永田裕子　高橋健太郎　吉野和男
Hiroko NAGATA　Kentaro TAKAHASHI　Kazuo YOSHINO
白井孝昭　北尾　学
Takaaki SHIRAI　Manabu KITAO

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

黄体機能は着床期内膜と着床した妊卵の初期発育のための脱落膜反応と考えられる．内膜間質の脱落膜化と共に産生，分泌されるCA 125は脱落膜形成不全の臨床的に有力なマーカーとなりうる報告があるが，黄体中期におけるCA 125測定の意義については未だ明らかでない．今回，各種排卵誘発周期において黄体中期（高温相6－9日目）に血中progesterone（P），estradiol-17β（$E_2$），P/$E_2$比，CA 125を測定し，比較検討した．排卵誘発周期の内訳はclomiphene 10例，clomiphene＋human chorionic gonadotropin（hCG）9例，human menopausal gonadotropin (hMG)＋hCG 11例で自然排卵周期25例をコントロール群とした．P値の10 ng/ml以上の群と10 ng/ml未満の群間およびP/$E_2$比100以上の群と100未満の群間でCA 125値を比較したところ，黄体機能の評価の両インデックスの高低によるCA 125値の有意差は認められなかった．全症例のP値とCA 125値との相関関係は認められなかったが，P/$E_2$比はCA 125値と弱い負の相関が認められた．よって，黄体中期のCA 125の測定は黄体機能の評価にはならないが，hCG投与群，特にhMG-hCG群で高値であることより女性生殖期の周期性変化により何らかの変化が認められるものと推察された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 520—523, 1991)

## 緒　言

卵巣癌の腫瘍マーカーであるCA 125は婦人科良性疾患である子宮内膜症でも上昇し[1,2]，また，月経周期に伴い変化することが知られており[3,4]，女性生殖器官の周期性変化とも密接な関わりがあると報告されている．よってCA 125の血中濃度を測定することにより，黄体期における脱落膜形成不全の診断が可能であるという報告[5]も認められる．また，ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) の時も上昇し[6]，CA 125の測定はもはや卵巣癌のマーカーというより，婦人科領域において必須の測定項目になろうとしている．そこで今回，黄体中期の血清CA 125を測定し，その診断的意義，また，OHSSとの関連性について検討したので報告する．

## 研究対象および方法

研究対象は島根医科大学医学部附属病院産科婦人科不妊・内分泌外来を受診した不妊症患者55例とし，腹腔鏡または臨床的に子宮内膜症が否定的である症例とした．これらを排卵誘発群と自然排卵周期群に分け，自然排卵周期群をコントロールとし比較検討

表1　各群における P, $P/E_2$ 比, CA125 の比較 (mean±SD)

| | P (ng/ml) | $P/E_2$ 比 | CA125 (U/ml) |
|---|---|---|---|
| control 群 | 11.9± 6.0[a] | 109.5±68.7[e] | 18.1±10.7[i] |
| CL 群 | 18.1± 8.5[b] | 66.7±28.7[f] | 14.9± 6.9[j] |
| CL-hCG 群 | 49.7±28.3[c] | 92.3±40.9[g] | 27.6±21.3 |
| hMG-hCG 群 | 45.3±35.5[d] | 45.2±40.4[h] | 52.4±38.1[k] |

a-b, a-d, b-c, b-d, e-f, e-h, i-k, j-k：$p<0.05$
a-c, g-h：$p<0.01$

表2　基準値以上の CA125 の割合

| | CA125 ≧ 40 (U/ml) の割合(%) |
|---|---|
| control 群 | 5.6[a] |
| CL 群 | 0[b] |
| CL-hCG 群 | 28.6 |
| hMG-hCG 群 | 63.6[c] |

b-c：$p<0.01$
a-c：$p<0.001$

表3　Progesterone 値による CA125 の比較 (mean±SD)

| | CA125 (U/ml) | |
|---|---|---|
| | P (ng/ml) < 10 | P (ng/ml) ≧ 10 |
| control 群 | 24.8±15.5 | 16.2± 7.3[a] |
| CL 群 | 8 | 15.9± 6.3[b] |
| CL-hCG 群 | — | 27.6±21.3 |
| hMG-hCG 群 | — | 52.4±38.1[c] |

a-c, b-c：$p<0.05$

した．排卵誘発群は clomiphene 投与群 (CL 群) 10 例，clomiphene+hCG 投与群 (CL-hCG) 9 例，hMG+hCG 投与群 (hCG-hCG 群) 11 例とした．clomiphene は月経開始5日目から 100mg/day，5日間の投与とし，hMG は HMG『日研』150IU/day を月経開始3～6日目から開始し，それぞれ leading follicle が 18～20 mm，尿中エストロゲンが 60ng/ml-100ng/ml となった時点で，hCG『持田』5000 IU に切り換え，以後 hCG『持田』5000 IU を隔日に計3回筋注した．また，コントロール群としての自然排卵周期群 25 例は全例正常月経周期を有し，基礎体温上2相性を示し，超音波断層法で排卵が確認できたものとした．

研究方法は各群とも黄体中期(高温相6～9日目)に肘静脈より採血し，血中 progesterone (P)，estradiol-17$\beta$ ($E_2$)，$P/E_2$ 比および CA 125 を測定し比較検討した．P，$E_2$，CA 125 は radioimmunoassay で測定した．統計学的検討は student's t-test により行った．

表4　$P/E_2$ 比による CA125 の比較 (mean±SD)

| | CA125 (U/ml) | |
|---|---|---|
| | $P/E_2$ 比 < 100 | $P/E_2$ 比 ≧ 100 |
| control 群 | 22.7±12.6 | 13.6±5.0 |
| CL 群 | 13.0± 4.4[a] | 28 |
| CL-hCG 群 | 34.4±19.6 | 10.5±5.0 |
| hMG-hCG 群 | 49.0±36.4[b] | 86 |

a-b：$p<0.05$

## 結　果

1）各群における血中 progesterone，$P/E_2$ 比および CA 125 の比較

表1に示すようにP値はコントロール群の 11.9±6.0 (mean±S. D.) ng/ml に比較して各排卵誘発群が有意に高値を示し，誘発群の中でも CL 群よりは CL-hCG 群および hMG-hCG 群の方が高値を示した．逆に $P/E_2$ 比は hMG-hCG 群が 45.2±40.4 と最も低値を示し，CL-hCG 群およびコントロール群に比較して有意に低値であった．CA 125 は hMG-hCG 群が 52.4±38.1U/ml と CL 群，コントロール群に比較して有意に高値を示した．また，CL-hCG 群は有意差はないものの CL 群，コントロール群に比較して，高値を示した．

2）基準値以上の CA 125 の割合

コントロール群の CA 125 の平均値が 18.1±10.7U/ml なので本群の mean+2S. D.値すなわち 40U/ml を cut off 値 (基準値) として検討すると，基準値以上の割合が CL 群では0％，コントロール群では5.6％，CL-hCG 群では 28.6％，hMG-hCG 群では 63.6％と，CL 群と hMG-hCG 群，コントロール群と hMG-hCG 群に有意差が認められた(表2)．また，CL-hCG 群は有意差はないものの 28.6％と高値を示した．

3）progesterone 値による CA 125 の比較

progesterone 値 10ng/ml 以上の群と 10ng/ml 未満の群で CA 125 を比較検討すると，progesterone 値が 10ng/ml 以上では hMG-hCG 群が 52.4±38.1U/

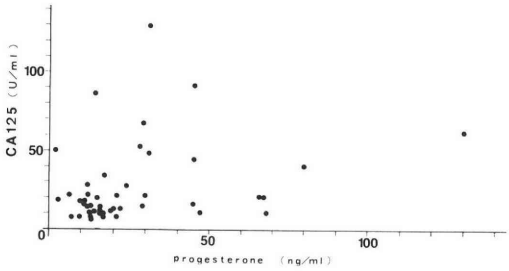



図1　Progesterone と CA 125 との関係

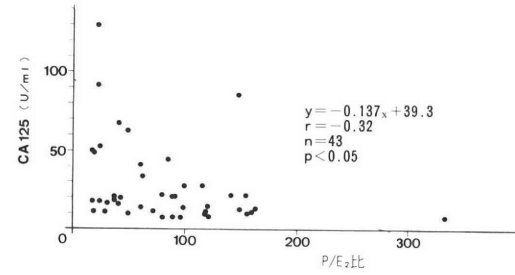



図2　$P/E_2$比と CA 125 との関係

ml とコントロール群および CL 群と比較して有意に高値を呈した（表3）．また，コントロール群での，progesterone が 10ng/ml 以上の群と未満の群では CA 125 値に統計学的有意差は認められなかった．

4）$P/E_2$比による CA 125 の比較

$P/E_2$比のコントロール群の平均が 109.5 なので，便宜上 $P/E_2$比を 100 以上と 100 未満に分け，CA 125 を比較すると（表4），$P/E_2$比が 100 未満では hMG-hCG 群の CA 125 が 49.0±36.4U/ml と最も高値を示した．また，コントロール群および CL-hCG 群では $P/E_2$比が 100 未満の群のほうで CA 125 が高値を示す傾向にあるが有意差は認められなかった．

5）progesterone と CA 125 との関係

全症例の progesterone と CA 125 との関係を図1に示す．両者に相関関係は認められなかった．

6）$P/E_2$比と CA 125 との関係

図2に示すように $P/E_2$比と CA 125 には相関係数 0.32 の弱い負の相関が認められた．

## 考　察

黄体機能は着床期内膜と着床した妊卵の初期発育のための脱落膜化反応で，その診断には黄体持続時間，血清P値，$P/E_2$比，子宮内膜日付診等，多くの診断法がある[7]がその総合的評価は未だ確立されていない．卵巣癌の腫瘍マーカーである CA 125 は子宮内膜間質の脱落膜化とともに産生，分泌されるので脱落膜化形成不全の臨床的マーカーとなりうるという報告があるが[5]，着床期におけるマーカーとなるか否かの報告は我々の知る限りにおいては未だない．今回は脱落膜様細胞の認められる排卵後第10日目以前の黄体中期に各排卵誘発周期に分け，血清P値，$P/E_2$比を測定し，それらの値と比較検討し，CA 125 が黄体中期，特に着床期機能の評価が出来るかについて検討した．結果はP値の正常値を 10ng/ml[7]とし，Pが 10ng/ml 以上の群と未満の群に分け CA 125 を比較したところ，自然排卵周期群では両群間に有意差は認められなかった．また子宮内膜の腺と間質のバランスの評価の $P/E_2$比を用いて CA 125 を比較したところ，CL-hCG 群，自然排卵周期群ともに有意差はないものの $P/E_2$比 100 未満の群の方が高値を示す傾向が認められた．また，$P/E_2$比と CA 125 との関係は弱い負の相関も認められた．よって，むしろ黄体中期の機能の評価として，CA 125 は脱落膜化反応とは反対に高値の方が機能不全を示す傾向があるが，$P/E_2$比との相関も弱いことから，着床期の評価にはあまり有用でない事が示唆された．一方，hCG 投与群で CA 125 は高値を示し，基準値以上（CA 125≧40U/ml）の割合も hCG 投与群が高値を示すことから，直接，黄体中期機能の評価とは結びつかないが，hCG 投与と CA 125 に何らかの関連性があることが示唆された．このことは妊娠初期に CA 125 が高値を示す[8]ことと関連して，やはり CA 125 が脱落膜化反応の指標としての重要性が高いことを示唆している．しかし，同様な量の hCG を使用しても hMG-hCG 群の方が CL-hCG 群の方よりも CA 125 が高値を示すこと，OHSS の時に高値を示す[7]ことから，単に子宮内膜の脱落膜化だけでなく，正常卵巣組織の生理的状態を越えた増殖と関連性があることが示唆された．以上の事から，黄体中期の CA 125 の測定はその絶対値のみでは黄体機能の評価は困難であるが，CA 125 が女性生殖期の周期性変化と関連していることから，今後の検討が必要であるものと推察される．

## 文　献

1）高橋健太郎，木島　聡，吉野和男，渋川敏彦，森山政司，岩成　治，沢田康治，松永　功，村尾文規，北尾　学：新しい卵巣腫瘍マーカーCA 125 を利用した子宮平滑筋腫と子宮腺筋症の鑑別，日産婦誌，37：591，1985

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., Yoshino, K., Araki, Y., Nishigaki, A., Shirai, T., Shibukawa, T. and Kitao, M.: Alternation in levels of CA 125 during the menstrual cycle, Jap. J. Fert. Ster., 31, 392, 1986
4) Jäger, W., Sauerbrei, W., Meier, C., Lang, N. and Wildt, L.: CA-125 serum concentrations during the menstrual cycle, Fertil. Steril., 50, 223, 1988
5) 森　崇英：黄体機能の調節とその異常，日不妊会誌 (supple)，33：884，1988
6) Jäger, W., Diedrich, K. and Wildt, L.: Elevated levels of CA-125 in serum of patients suffering from ovarian hyperstimulation syndrome, Fertil. Steril., 48: 675, 1987
7) Andrews, W. C.: Luteal phase defects, Fertil. Steril., 32: 501, 1979
8) Takahashi, K., Yamane, Y., Yoshino. K., Shibukawa, T., Matsunaga, I. and Kitao, M.: Studies on serum CA 125 levels in pregnant women, Acta Obst. Gynaec. Jpn., 37: 1931 , 1985

## Clinical significance of the measurement of serum CA 125 during midluteal phase

Hiroko Nagata, Kentaro Takahashi, Kazuo Yoshino, Takaaki Shirai and Manabu Kitao

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

CA 125, which serves as a tumor marker in patients with ovarian cancer, is reported to be elevated in late luteal phase of the menstrual cycle (period of pseudodecidual changes). In the present study, we evaluated the clinical significance of the measurement of CA 125 in midluteal phase. Ten patients were treated with clomiphene citrate (CL), 9 with CL+human chorionic gonadotropin (hCG) and 11 with human chorionic menopausal gonadotropin (hMG)+hCG. Twenty-five untreated patients served as controls. Serum CA 125, progesterone (P), estradiol-17$\beta$ ($E_2$) and $P/E_2$ ratio in the midluteal phase were assessed in every group. High values of serum CA 125 were observed in the hMG+hCG group. There was no correlation between P and CA 125 and there was no significant difference in serum CA 125 in patients with high P and those with low P. A weak negative correlation between $P/E_2$ ratio and CA 125 was noted; however, there was no significant difference in CA 125 between patients with high $P/E_2$ and those with low $P/E_2$ ratio. In conclusion, measurement of serum CA 125 is not useful in the evaluation of midluteal function, although CA 125 seems to be dependent on the cyclic changes in the female genital tract.

(受付：1990年11月21日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 子宮内膜における複合糖質の分布に関する検討

# Glycoconjugate Distribution in Normal Human Endometrium

長崎大学医学部産科婦人科学教室
黄　宏駿　藤下　晃　河野雅洋
Hung June HUANG　Akira FUJISHITA　Masahiro KAWANO
石丸忠之　山辺　徹
Tadayuki ISHIMARU　Tooru YAMABE

Dept Ob/Gyn School of Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan

ビオチン化lectinを用い，正常月経周期内膜，妊娠内膜および閉経後萎縮内膜における複合糖質の分布について検討した．7種類のレクチンを使用したが，Con A, WGAおよびRCA-1反応はすべての内膜に陽性所見を認め，Con AおよびWGA反応は分泌後期および妊娠内膜に強陽性を示した．RCA-1反応では，すべての内膜において一様の反応強度がみられた．しかし，閉経後萎縮内膜において3種類のレクチン反応はすべて弱陽性で，腺上皮に限局していた．UEA-1反応は妊娠内膜のごく一部の腺上皮にのみ弱陽性を示した．PNA反応ではすべての内膜に陽性であるが，分泌期に強く，妊娠初期でさらに著明であった．DBAおよびSBA反応は増殖期および分泌初期に陰性，分泌後期および妊娠初期に強陽性を呈していた．なお，PNA, DBAおよびSBA反応は腺上皮または分泌物に限って認められた．Con A反応のみは細胞質にびまん性に広がって認められたが，他のすべてのレクチン反応は腺腔側細胞膜にみられた．この結果から，子宮内膜における複合糖質のうち，一部の糖鎖は月経周期に伴って変動することが認められた．またDBAやSBA反応は分泌内膜のひとつのマーカーになると思われ，さらにDBAまたはSBAと結合する複合糖質は妊卵の着床または機能的変化に関与するものと考えられる．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 524—531, 1991)

## 緒　言

細胞には多様の複合糖質が存在し，これら複合糖質の末端糖鎖構造は細胞の増殖，分化，加齢，細胞相互間の認識または悪性化などの過程で変化することが知られている[1]．このような変化は糖鎖と特異的に結合するlectinをもって把握することができるといわれる[1]．

一方，子宮内膜は卵巣の性ステロイドにより形態的および機能的に変化する周期性を有し，とくに黄体期に細胞質内にglycogenの蓄積が認められる糖代謝が旺盛となる．そこで，子宮内膜における複合糖質の分布について，糖特異性の異なる7種のlectinを用いて組織化学的に検討した．

## 対象と方法

子宮内膜試験掻爬または初期の人工妊娠中絶術により得られた材料のうち，増殖後期5例，分泌初期3例，分泌後期4例，妊娠初期4例および閉経後萎縮内膜3例，合計19例を対象とした．

Table 1　実験に用いたレクチンの特性

| Lectin | Source | Simple sugar specificity |
|---|---|---|
| Dolichos biflorus agglutinin (DBA) | Horse gram (Dolichos biflorus) | α-D-GalNAc |
| Soybean agglutinin (SBA) | Soybean (Glycine max) | α-D-GalNAc[a] |
| | | β-D-GalNAc[a] |
| | | α-D-Gal |
| Wheat germ agglutinin (WGA) | Triticum vulgare | β-D-GlcNAc[a] |
| | | Neu5Ac |
| Peanut agglutinin (PNA) | Arachis hypogaea | β-D-Gal (1-3) GalNAc[a] |
| | | α-D-Gal |
| Ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1) | Gorse seed (Ulex europaeus) | α-L-Fuc |
| Concanavalin A (Con A) | Jack bean (Canavalia ensiformis) | α-D-Man[a] |
| | | α-D-Glc |
| | | α-D-GlcNAc |
| Ricinus communis agglutinin (RCA-1) | Castor bean (Ricinus communis) | β-D-Gal |

Abbreviations : GalNAc, N-acetylgalactosamine ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acetylglucosamine ; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid ; Fuc, fucose ; Man, mannose ; Glc, glucose

[a]Main sugar specificitiy

Table 2　腺上皮におけるレクチン結合

| Type of endometrium | PNA | DBA | SBA | ConA | RCA-1 | WGA | UEA-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Menopausal | +[1] | − | − | ±[2] | ±[1] | ±[1] | − |
| Proliferative | +[1] | − | − | +[2] | ++[1] | +[1] | − |
| Early secretory | ++[1] | − | − | +[2] | ++[1] | +[1] | − |
| Late secretory | ++[1] | ++[1] | ++[1] | ++[2] | ++[1] | ++[1] | − |
| Early pregnancy | +++[1] | ++[1] | ++[1] | ++[2] | ++[1] | ++[1] | ±[1] |

1　Only apical portions of the cells

2　Mostly intraluminal

閉経後萎縮内膜の3例の年齢は55～62歳で，他は22～38歳であった．採取された内膜組織はformalin固定，paraffin包埋後，4 μmの薄切標本を作製し，HE染色と同時に隣接切片にレクチン染色を行った．

Xylene・alcohol系統で脱paraffinした後，0.3％$H_2O_2$・MeOHで内因性peroxidaseを不活性化し，ビオチン標識lectinと室温で30分間反応させた．さらにABC法で染色を行い，Mayerのhematoxylinで核染色を施した．なお使用したlectinは，PNA, DBA, SBA, Con A, RCA-1, なおWGAおよびUEAの7種であり，各時期の内膜におけるそれぞれの糖特異性を検討した(表2)．また対照実験として，Con Aに0.2Mα-methyl-D-mannose，WGAには0.2MN-acetyl-D-glucosamine，RCA-1には0.2MD-galactose, PNAには0.1M galactose, SBAとDBAには0.1M N-acetyl-D-galactosamine，UEA-1には0.2Mα-L-fucoseをそれぞれ加え，種々のlectinの糖残基に対する特異性を確認した（表1）．

## 結　果

1．Con A

増殖期内膜の腺上皮では，細胞質は弱陽性を示したが，細胞膜は陰性であった．また一部の間質細胞も陽性であったが，血管内皮および赤血球は陰性であった．

分泌初期では，核上細胞質は陽性，核下空胞は陰性を呈し，間質細胞も陽性であった．分泌後期の腺上皮では，細胞質における反応度は分泌初期に比べて増強し，腺腔分泌物も陽性を呈した．また間質における反応度は分泌初期に類似していた．妊娠初期では，腺上皮および間質の染色性はさらに増強し，一部の細胞膜に陽性反応がみられることもあった．しかし血管および赤血球はやはり陰性であった．

一方，萎縮内膜では，腺上皮の細胞質は陰性に転じ，細胞膜が陽性を示した．また間質も陰性であった（図1）．

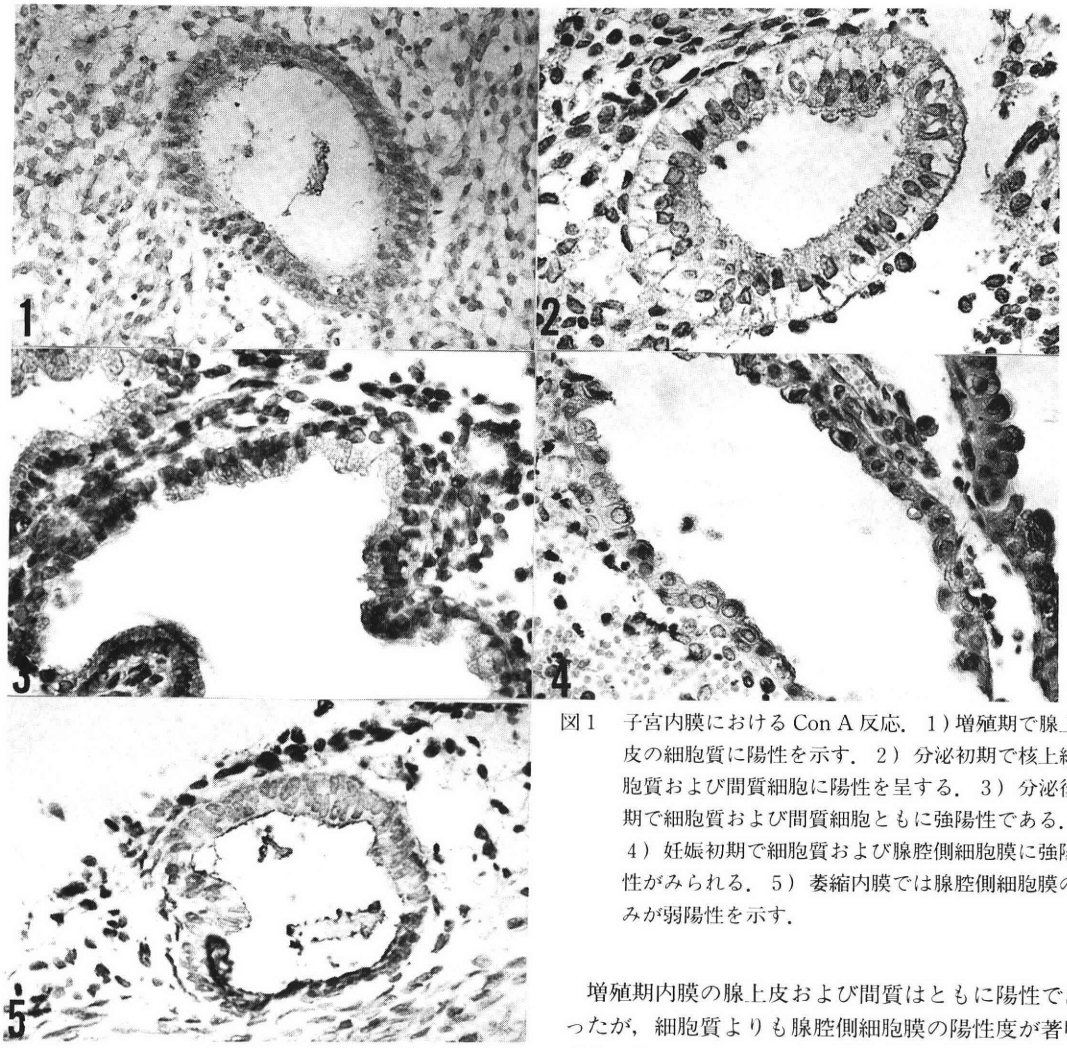



図1　子宮内膜におけるCon A反応．1）増殖期で腺上皮の細胞質に陽性を示す．2）分泌初期で核上細胞質および間質細胞に陽性を呈する．3）分泌後期で細胞質および間質細胞ともに強陽性である．4）妊娠初期で細胞質および腺腔側細胞膜に強陽性がみられる．5）萎縮内膜では腺腔側細胞膜のみが弱陽性を示す．

2．WGA

増殖期内膜では，腺上皮の腺腔側細胞膜および間質は陽性，血管および赤血球は陰性であった．

分泌初期内膜の腺上皮では，腺腔側細胞膜および核上細胞質は陽性で，その反応度は増殖期内膜と同程度であった．また一部の血管および赤血球に陽性反応がみられた．分泌後期では，腺腔側細胞膜および分泌物はともに強陽性を呈したが，細胞質は陰性に転じていた．なお，間質も陽性所見を示した．妊娠初期内膜においては，分泌後期の反応度に類似し，腺腔側細胞膜のみが陽性所見を認めた（図2）．

萎縮内膜では，腺上皮細胞の腺腔側細胞膜のみが弱陽性を呈し，細胞質および間質はともに陰性であった．

3．RCA-1

増殖期内膜の腺上皮および間質はともに陽性であったが，細胞質よりも腺腔側細胞膜の陽性度が著明であった．

分泌初期では，腺腔側細胞膜および核上細胞質が陽性を呈したが，分泌後期に移行するにつれて腺腔側細胞膜のみが陽性となり，しかも反応度はや増強した．妊娠初期内膜では，分泌後期と同様，腺腔側細胞膜のみが陽性であった．間質では，分泌初期，分泌後期および妊娠初期の内膜においてすべて陽性であった（図3）．

萎縮内膜では、腺上皮の腺腔側細胞膜のみが陽性を呈し，その染色性は増殖期内膜に比べて弱く，また細胞質および間質はともに陰性であった．

4．PNA

いずれの内膜においても，反応は腺上皮の腺腔側細胞膜にのみ認められた．その反応度は増殖期内膜より分泌初期にかけて漸次増強し，分泌後期および妊娠初期内膜では強陽性となった．萎縮内膜では，

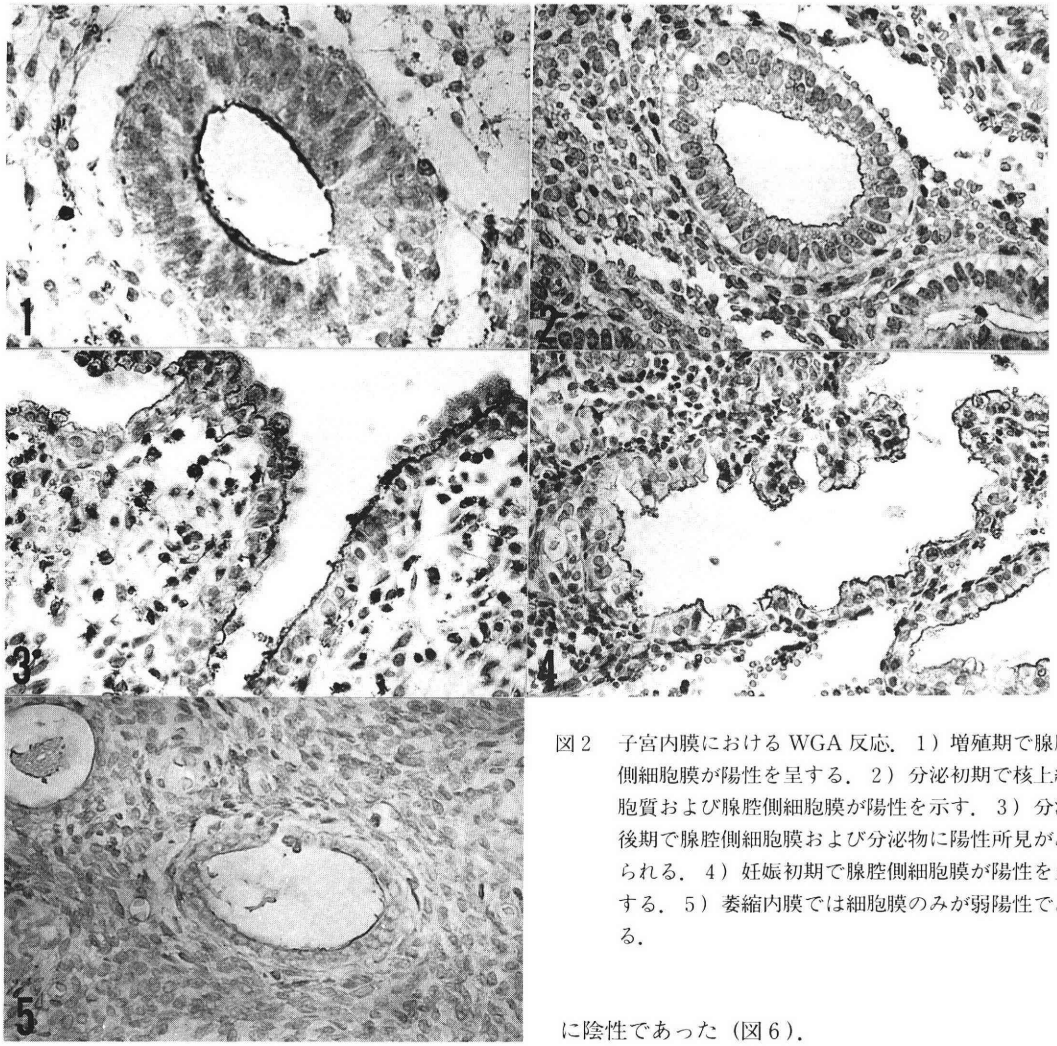


図2　子宮内膜におけるWGA反応．1）増殖期で腺腔側細胞膜が陽性を呈する．2）分泌初期で核上細胞質および腺腔側細胞膜が陽性を示す．3）分泌後期で腺腔側細胞膜および分泌物に陽性所見がみられる．4）妊娠初期で腺腔側細胞膜が陽性を呈する．5）萎縮内膜では細胞膜のみが弱陽性である．

増殖期内膜に比べて陽性の程度は減弱していた（図4）．

5．DBA

増殖期内膜および分泌初期内膜では，ともに陰性で，分泌後期および妊娠初期内膜において，腺腔側細胞膜および分泌物がともに強陽性を示し，間質は陰性であった(図5)．萎縮内膜では，腺上皮および間質ともに陰性であった．

6．SBA

増殖期内膜は陰性であり，分泌初期内膜では，一部の腺上皮のみが弱陽性を呈していた．分泌後期および妊娠初期内膜では，腺上皮および分泌物はともに強陽性を示し，また反応は腺腔側細胞膜にのみ認められた．一方，すべての内膜において，間質は陰性であり，萎縮内膜でも，腺上皮および間質はともに陰性であった（図6）．

7．UEA-1

妊娠初期内膜のごく一部の腺上皮に弱陽性の反応が認められたが，他の内膜ではすべて陰性であった．

## 考　察

ビオチン化lectinを用いることにより，子宮内膜における複合糖質の分布および一部の末端糖鎖が月経周期に随伴して変化する所見が認められた(表2)．さらに妊娠内膜においては，非妊時に比べて，種々のlectin反応が増強していた．すなわち各lectinと特異的に結合する末端糖鎖の合成能は妊娠により増量するが，この現象は妊娠時に出現する種々のhormoneや増殖因子により促進されるものと考えられる．一方，閉経後萎縮内膜では，細胞老化のためか，増殖内膜に比べて，すべてのlectin反応が減弱していた．

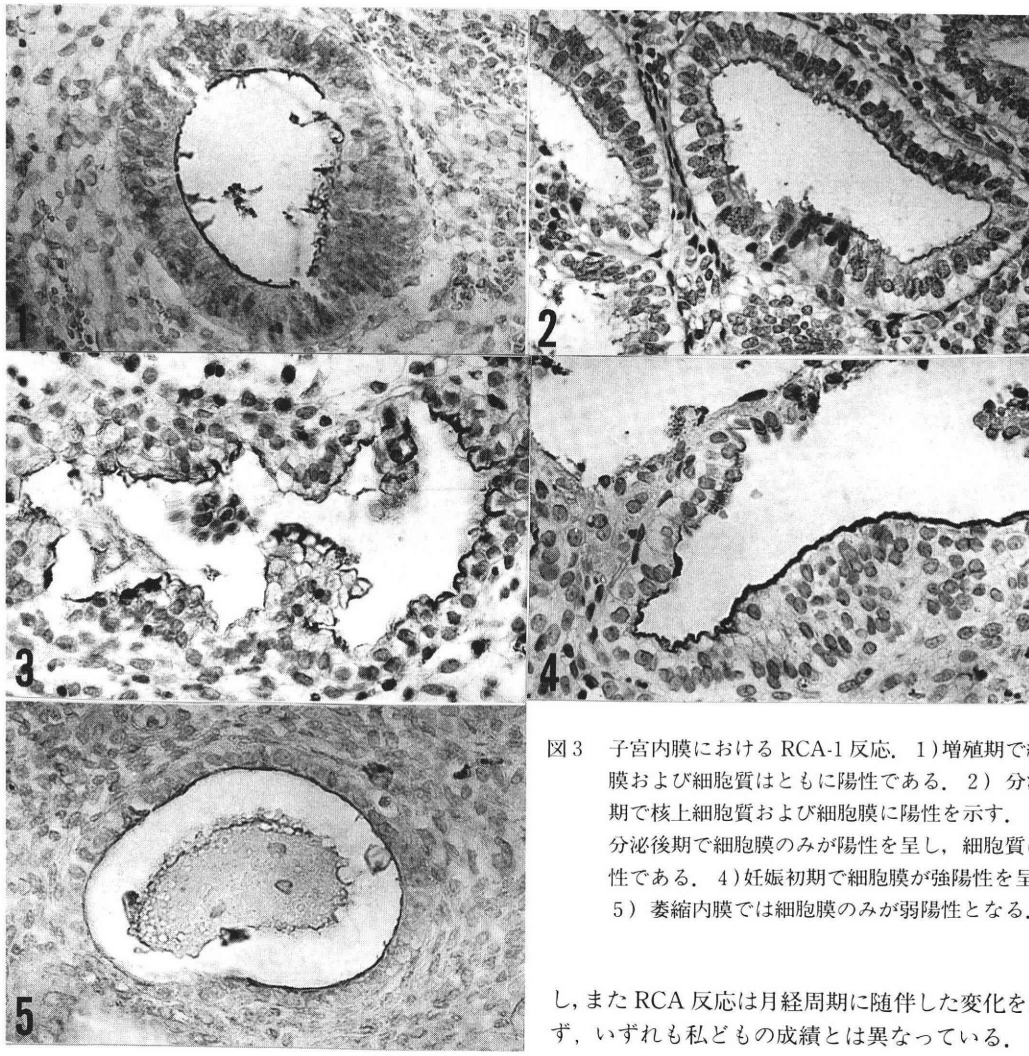



図3　子宮内膜におけるRCA-1反応．1）増殖期で細胞膜および細胞質はともに陽性である．2）分泌初期で核上細胞質および細胞膜に陽性を示す．3）分泌後期で細胞膜のみが陽性を呈し，細胞質は陰性である．4）妊娠初期で細胞膜が強陽性を呈す．5）萎縮内膜では細胞膜のみが弱陽性となる．

Con A, WGA およびRCA-1反応はすべての内膜腺上皮細胞に証明され，それぞれのlectinと結合する糖鎖のD-mannose, N-acetyl-D-glucosamine およびD-galactoseはいずれの月経周期内膜および妊娠内膜にも存在していることが認められた．また分泌後期さらに妊娠初期に移行するほど，lectin反応度が増強し，この時期における糖鎖合成能は亢進しているものと思われる．Bychkov & Toto[2]は私どもと同様の成績を示したが，Lee & Damjanov[3]は凍結切片に蛍光標識lectinを応用し，Con A, WGAまたはRCA-1反応は妊娠内膜および増殖期内膜のいずれにおいても同様の反応度を示したと記載している．またSöderstrom[4]はparaffin切片に蛍光標識lectinを反応させたところ，Con Aは分泌後期に移行するほど反応度は増強し，WGA反応は分泌中期より減弱し，またRCA反応は月経周期に随伴した変化を示さず，いずれも私どもの成績とは異なっている．

一方，閉経後萎縮内膜におけるCon A, WGAおよびRCA-1の反応度は低下していながら，弱陽性を呈することから，それぞれのlectinと結合する糖鎖の合成能に卵巣の性ステロイド以外の因子が関与する可能性が多分に考慮される．

UEA-1反応では，妊娠内膜のごく一部においてのみ見られた．妊娠内膜における$\alpha$-L-fucose合成には，非妊時より高濃度の卵巣性ステロイドや妊娠に関与する非ステロイド因子を要すると考えられる．しかし，Lee & Damjanov[3]は妊娠内膜でもUEA-1反応は陰性，Duncan[5]は分泌後期および妊娠内膜で弱陽性，またBychkov & Toto[2]はすべての内膜は弱陽性で，妊娠内膜においてのみ反応度が増強するとし，それぞれ異なった結果を示している．

PNA反応では，増殖後期および分泌初期に比べて，分泌後期および妊娠内膜における反応度は亢進

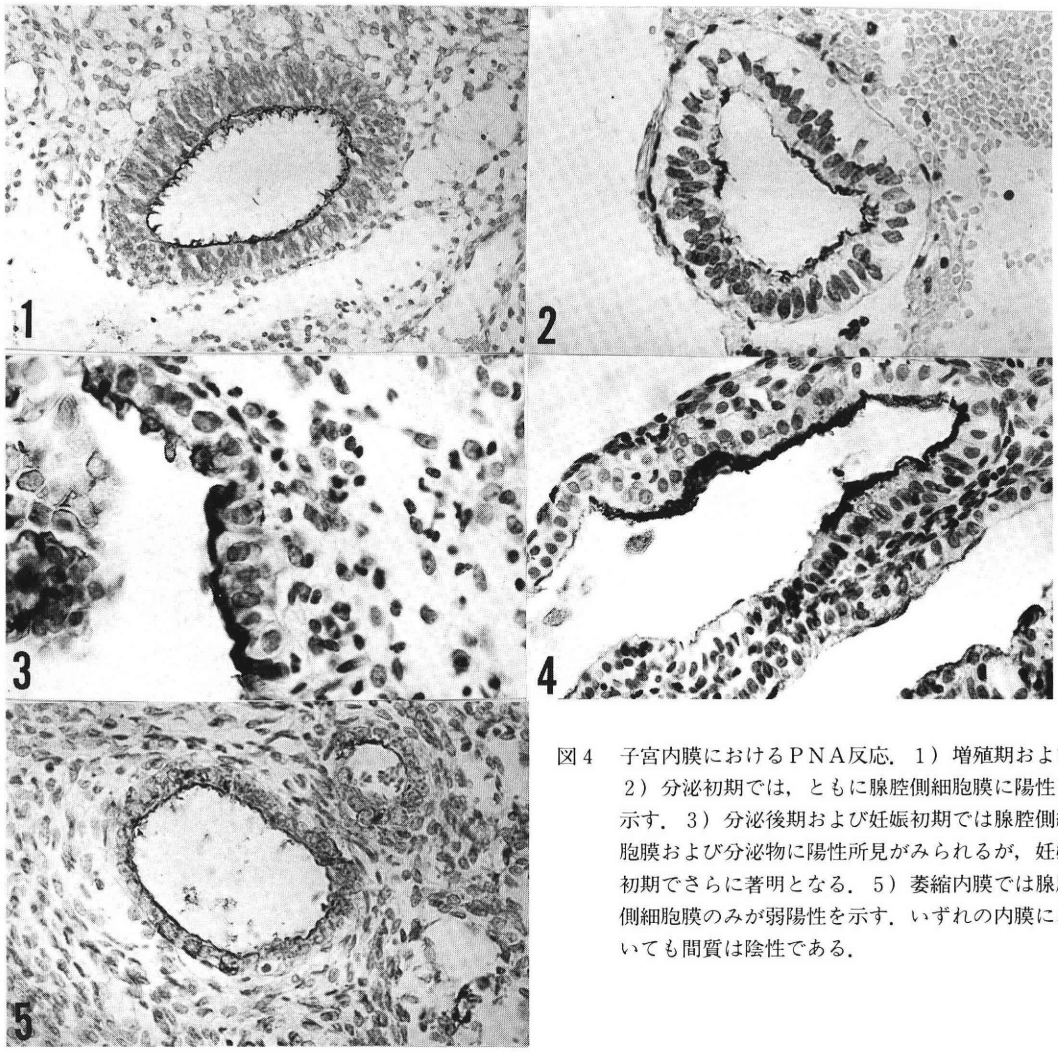



図4　子宮内膜におけるＰＮＡ反応．1）増殖期および2）分泌初期では，ともに腺腔側細胞膜に陽性を示す．3）分泌後期および妊娠初期では腺腔側細胞膜および分泌物に陽性所見がみられるが，妊娠初期でさらに著明となる．5）萎縮内膜では腺腔側細胞膜のみが弱陽性を示す．いずれの内膜においても間質は陰性である．

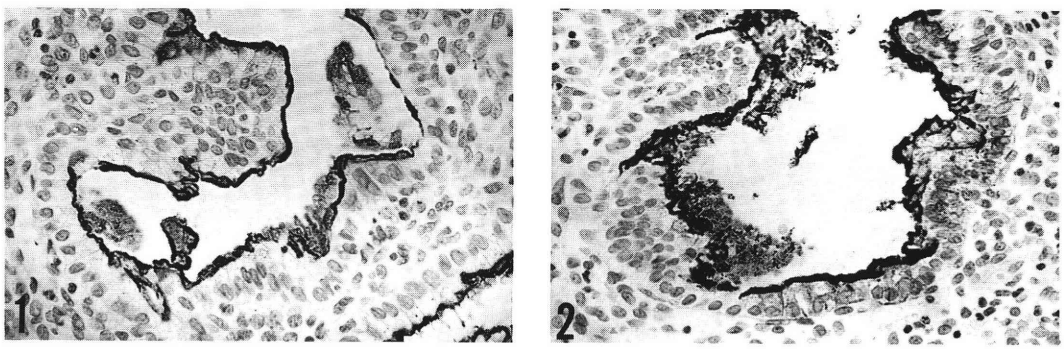



図5　子宮内膜におけるDBA反応．1)分泌後期および2）妊娠初期において腺腔側細胞膜および分泌物にともに強陽性がみられ，間質は陰性である．

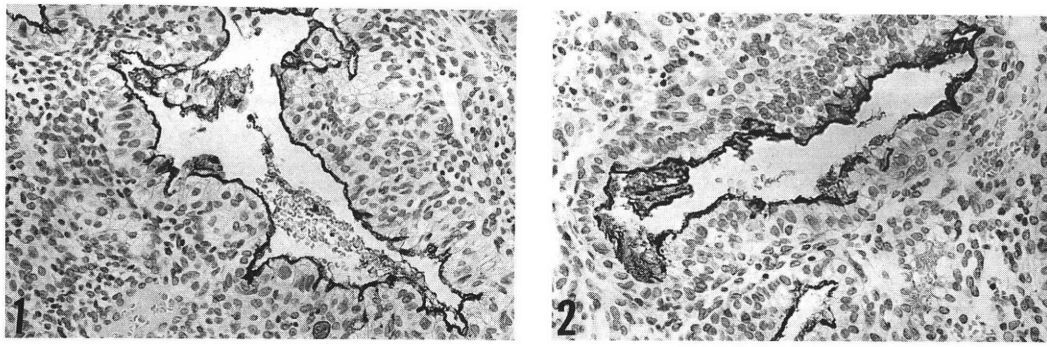


図6　子宮内膜におけるSBA反応．1）分泌後期および2）妊娠初期では，腺腔側細胞膜および分泌物はともに強陽性を示し，間質は陰性である．

表3　間質におけるレクチン結合

| Type of endometrium | PNA | DBA | SBA | ConA | RCA-1 | WGA | UEA-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Menopausal | − | − | − | − | − | − | − |
| Proliferative | − | − | − | + | + | + | − |
| Early secretory | − | − | − | + | + | + | − |
| Late secretory | − | − | − | ++ | + | ++ | − |
| Early pregnancy | − | − | − | ++ | ++ | ++ | − |

していた．これは黄体ホルモンの作用によりsialyl-transferase活性が高まり，galactose β-(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine合成が促進されたためと解される．一方，DBAまたはSBA反応は分泌後期および妊娠内膜にのみ陽性を呈し，N-acetyl-D-galactosamine合成は黄体ホルモン作用により亢進したglycosyl-transferase活性によって促進されたものと思われ[6]，妊卵の着床および初期胚の発育に関与し，内膜分泌能の成熟度に関する良いマーカーになり得るものと考える．しかし，Duncan[5]は分泌後期内膜でPNAおよびSBA反応はともに陰性であったといい，私どもの成績とは異なってる．

従来，内膜腺上皮のような分泌細胞は，よく発達した粗面小胞体またはGolgi装置をもち，糖蛋白質の糖鎖はそこで生合成されるとみなされている．そしてtransferaseの作用下で蛋白質と結合して分泌小胞へ移行し，細胞膜近くまで運ばれて，細胞膜と融合し，膜結合性糖蛋白質となるか，または細胞膜外へ分泌型の糖蛋白質として分泌されると考えられている[7~9]．私どもの成績では，Con A除くすべてのlectin反応は細胞膜または分泌物に限局してみられたが，Con A反応のみが細胞質にびまん性に広がっており，Con Aと結合するmannose糖鎖が細胞質に集積するためと思われる．

間質におけるlectin反応では，いずれの内膜においてもPNA, SBA, DBAおよびUEA-1反応は陰性であった（表3）．一方，WGA, RCA-1およびCon A反応は，閉経後萎縮内膜を除いて，すべての内膜にみられた．しかしその反応度に周期的変化は示さず，生理的意義も不明である．またlectin反応は主として間質顆粒球に認められたが，Con A反応は脱落膜細胞にもみられた．この所見はMazurら[10]，Duncan[5]およびBychkov & Toto[2]と同様の成績であった．

このような間質顆粒球に関する発生機序は不明であるが，一般に末梢血好中球または間質より分化したものと考えられている[10~12]．末梢血好中球では，WGAやRCA-1反応が陰性であることから[6]，むしろ間質由来と考えるのが妥当であろう．

上記の成績から，lectinの組織化学的手法は子宮内膜の発育または分化に伴う糖鎖の変化を検索するのに適した方法であるといえる．また子宮内膜分泌能は卵巣の性ステロイド依存性であり，estrogenによりglycogenの生合成が惹起され，progesteroneはその生合成を維持させながら腺腔への分泌を誘導する[13~16]．しかし内膜糖蛋白質にはprogesterone不応性およびprogesterone反応性のものが存在していることから[13]，月経内膜における種々のlectinの反応度に多様性がみられた．そのうち，SBAおよびDBA反応は卵巣の性ステロイド依存性であるとみなされ

た.

本研究では，7種類の lectin を用いたが，さらに多種類の lectin を用いて他の糖鎖の変化を含めた検討が必要であろう.

## 文　献


1) Hsu, S. M. and Raine, L.: Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotinperoxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections, J. Histochem. Cytochem., 30: 157, 1982
2) Bychkov, V. and Toto, P. D.: Lectin binding to normal human endometrium, Gynecol. obstet. Invest., 22: 29, 1986
3) Lee, M. C. and Damjanov. I.: Pregnancy-related changes in the human endometrium revealed by lectin histochemistry, Histohemistry, 82: 275, 1985
4) Söderstrom, K. O.: Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections of human endometrium, Int. J. Gynecol. Pathol., 6: 55, 1987
5) Duncan, D. A., Mazur, M. T. and Younger, J. B.: Glycoconjugate distribution in normal human endometrium: A lectin histochemical study, Int. Gynecol. Pathol., 7: 236, 1988
6) Rothman, J. E.: The compartmental organization of the Golgi apparatus, Sci. Am. 253 (3): 84, 1985
7) Bennett, G., Leblond, C. P. and Haddad, A.: Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by autoradiography after labelled fucose injection into rats, J. Cell Biol., 60: 258, 1974
8) Schachter, H.: Coordination between enzyme specificity and intracellular compartmentation in the control of protein-bound oligosaccharide biosynthesis, Biol. Cell, 51: 133, 1984
9) Spiro, R. G.: Glycoproteins: their biochemistry, biology and role in human disease, N. Engl. J. Med., 281: 991, 1969
10) Mazur, M. T., Duncan, D. A. and Younger, J. B.: Endometrial biopsy in the cycle of conception: histologic and lectin histochemical evaluation, Fertil. Steril., 51: 764, 1989
11) Cardell, P. R., Hisau, F. L. and Dawsen, A. B.: The fine structure of granular cells in the uterine endometrium of the Rhesus monkey (Macaca mulatta) with a discussion of the possible function of theses cells in relaxin secretion, Am. J. Anat., 124: 307, 1969
12) Press, M. F. and King, W. H.: Distribution of peroxidase and granulocytes in the human uterus., Lab. Invest., 54: 188, 1986
13) Endo, M. and Yoshizawa, Z.: Study on the uterine mucosubstances accompanying the infertility effect of an intrauterine device, Clin. Chim. Acta, 42: 29, 1972
14) Endo, M. and Yoshizawa, Z.: Hormonal effect on glycoproteins and glycosaminoglycans in rabbit uteri, Arch Biochem. Biophys, 156: 397, 1973
15) Jansen, R. P. S., Turner, M., Johanisson, E., Landgren, M. B. and Diczfalusy, E.: Cyclic changes in human endometrial surface glycoproteins: a quantitative histochemical study, Fertil. Steril., 44: 85, 1985
16) Joshi, S. G. and Ebert, K. M.: Effects of progesterone on labelling of soluble proteins and glycoproteins in rabbit endometrium, Fertil. Steril., 27: 730, 1976


## Glycoconjugate distribution in normal human endometrium


Hung June Huang, Akira Fujishita, Masahiro Kawano, Tadayuki Ishimare and Tooru Yamabe

Dept Ob/Gyn school of Medicine
Nagasaki University,
Nagasaki 852, Japan



A lectin histochemistry has been developed to detect alterations in glycoconjugate distributions of human endometrium during the menstrual cycle, early pregnancy and postmenopause using 7 biotinylated lectins. The binding of Con A and WGA increased during the progression of the endometrium from the proliferative to the secretory phase and early pregnancy. RCA-1 show persistent binding to the endometrium during menstrual cycle and in early pregnancy. These three lectins exhibit weak binding in postmenopausal atrophic endometrium. UEA-1 show weak binding in early pregnancy but not in cyclic endometrium. PNA exhibit weak binding in proliferative phase and postmenopause, but increases its affinity in secretory phase, particularly in early pregnancy. DBA and SBA express strong binding in late secretory phase and in early pregnancy, but not in others. Among the lectins used, only Con A bound uniformly to the cytoplasm, all other lectins bound to apical surface of glandular cells. The results indicate that DBA and SBA are useful for detection of hormone-related changes of normal human endometrium, and suggest that these glycoconjugates play a role in endometrium for nidation.


(受付：1991年1月31日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 不妊症診療における子宮造影法と子宮鏡検査併用の意義

# Combination of Hysterography and Hysteroscopy for Sterility Investigation

東邦大学医学部第1産婦人科学教室（主任：百瀬和夫教授）
大　高　　究
Kiwamu OHTAKA

lst. Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University, School of Medicine, Tokyo 143, Japan
(Director: Prof. Kazuo Momose)

子宮造影法および子宮鏡検査を受けた不妊患者108例を対象とし，両検査の所見を比較検討した．

108例の子宮造影法による診断はポリープ状欠損33例，外傷性子宮腔癒着症30例，粘膜下筋腫17例，辺縁不正12例，中隔子宮11例，弓状子宮4例，子宮内異物1例であった．子宮造影法でポリープ状欠損と診断された33例の子宮鏡診断は内膜ポリープが21例，内膜増殖症5例，粘膜下筋腫3例，外傷性子宮腔癒着症1例，異常所見なし3例であり，両検査の一致率は78.8％であった．子宮造影法で外傷性子宮腔癒着症と診断された30例のうち，子宮鏡検査でも子宮腔癒着が認められた症例は25例あり，その一致率は83.3％であった．108例全体として，両検査所見の一致率は78.7％であった．

子宮鏡検査の後，子宮鏡直視下手術を行なったところ，その38例(35.2％)が1年以内に妊娠した．各疾患の妊娠率は，外傷性子宮腔癒着症40.7％，内膜ポリープ39.3％，内膜増殖症35.7％などが高率であり，中隔子宮23.1％，粘膜下筋腫18.8％などが低率であった．子宮腔異常の診断において，子宮造影法と子宮鏡検査を併用することは，異常の原因，部位，性状，色調を明確にし，的確な治療法の選択を可能にする．さらに，処置後に高い妊娠率が得られたことより，不妊症治療における直視下手術の有用性が確認された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 532—540, 1991)

## 緒　言

不妊症診断において子宮卵管造影法は，卵管の疎通性や子宮腔内の状態など，多くの情報を提供する優れたルーチン検査であり，広く普及している．一方，子宮鏡検査は子宮腔内を直視下に観察することが可能であり，子宮腔内異常に対する有用な検査法として最近盛んに行なわれるようになってきた．しかし，各々の単独検査では異常所見の性状，程度などを十分に把握することは難しく，的確な治療が行なわれるか否か疑問の残る場合もある．そこで今回，子宮腔内異常の正確な診断と治療を目的に，子宮造影法で子宮腔内異常を示した症例に対し子宮鏡検査を追試し，両検査所見を比較検討した．

## 対象および方法

1983年1月より1989年12月までの7年間に，当院で子宮造影検査を行ない，子宮腔内異常が認められた症例に対し，さらに子宮鏡検査を施行した不妊症患者108例を対象とした．

1．子宮造影法

子宮造影法は原則として月経周期第7～10日目に行なった．患者を砕石位として腔内を洗浄後，子宮腟部をMartin氏単鉤鉗子で把持し，軽く牽引して子

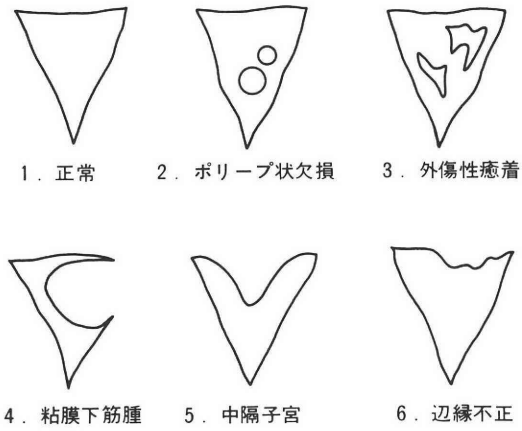



図1　子宮X線像

宮の偏位をできるだけ補正し（子宮像をフィルムに平行にする），金属製らせん状カニューレを頚管に挿入して造影剤を注入した．造影剤には親水性で粘膜にも付着しやすい水溶性造影剤(エンドグラフィン，イソビスト300)を使用した．また，造影剤注入中は目盛り付きガラス管，またはトーイツ式自動注入装置により子宮内圧を継続的に測定し，300mmHgを越えないように留意した．さらに，造影剤の注入はモニターテレビで透視画像を監視しながら行ない，陰影の微細な変化を観察するとともに造影剤の過量注入を防止した[1~4]．

2．子宮鏡検査

子宮造影検査後，第1回目の月経終了後に子宮鏡検査，および子宮鏡下手術を施行した．麻酔法にはNLA変法（ディアゼパム，ペンタゾシン静注）を使用し，腹腔鏡を併用した際には気管内挿管吸入麻酔とした．患者を砕石位とし，腟内を洗浄後，ゾンデ診にて子宮腔の方向を確かめ，頚管をHegar拡張器7～9号まで拡張した．この際，出血を最少限にとどめるため，頚管拡張はできるだけ穏やかに行なった．頚管拡張の後，子宮鏡を挿入して子宮腔内を観察し，異常の形態，部位，程度等を把握した後，鋏み鉗子あるいはYAGレーザーを用いた子宮鏡下手術を行なった．子宮鏡は杉本式子宮鏡とEder社製の手術用子宮鏡を使用し，子宮腔内灌流液には生食水および低分子デキストラン液を使用した．なお，子宮鏡下手術は全例モニターテレビによる監視下に行なった[5,6]．

3．子宮X線像の読影法（図1）

a．ポリープ状欠損

比較的小型で辺縁正な円形の陰影欠損像として認められ，造影剤注入中に欠損像が子宮腔内を微かに動揺するさまがモニターテレビで観察される場合もある．

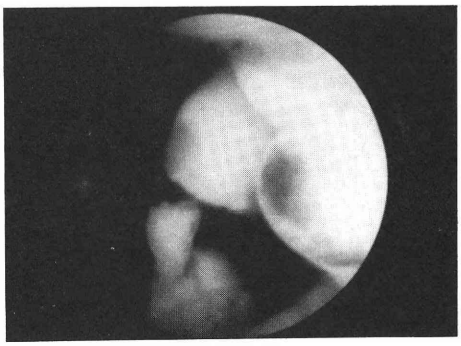


写真1　内膜ポリープ
子宮側壁の数個のポリープ．先端に出血斑が見える．

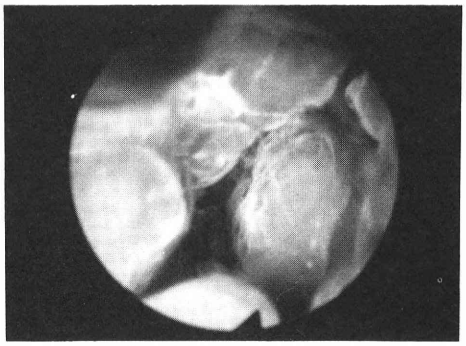


写真2　子宮内膜増殖症
内膜が全体的にポリープ状に肥厚．腺開口が見える．

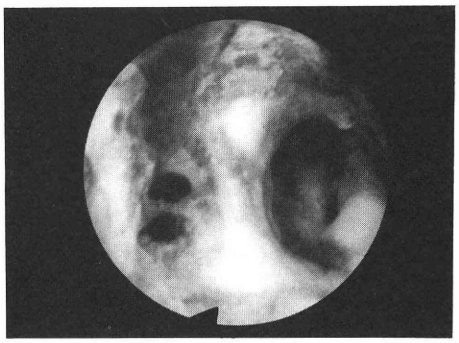


写真3　外傷性癒着
子宮腔前壁から後壁にかけての結合織性の癒着．

b．外傷性癒着

辺縁の不規則な凹凸像や内腔に単数あるいは複数の濃淡不正な多様形陰影欠損像として認められる[1,4,7]．

c．粘膜下筋腫

欠損像は比較的大型円形で辺縁が比較的シャープ

であり，単数のことが多い[4,8~10]．

d．弓状・中隔子宮

子宮底部に突出像が認められ，突出の程度により弓状子宮，中隔子宮を判別する．双角子宮との鑑別には腹腔鏡の併用による子宮漿膜面の観察を必要とする[1,11]．

e．辺縁不正

子宮腔の輪郭が滑らかでなく，ゆるやかな凹凸の不正像を呈する．

f．子宮内異物

以上のいずれにもあてはまらない糸状の陰影欠損像が1例に認められ，子宮内異物とした．

4．子宮鏡所見の判定法

a．内膜ポリープ・内膜増殖症

灌流液中を浮遊する周囲の内膜と同様な色調の，辺縁滑らかなポリープ状隆起で，しばしば表面に白斑状の腺開口部が観察される．子宮内膜が全体的に肥厚し，ポリープ状を示している場合を内膜増殖症とした（写真1，2）．

b．外傷性癒着

子宮腔中央あるいは側壁の前壁から後壁にかけての索状物．その色調や性状から内膜性癒着，結合織性癒着，筋性癒着に分類される[12]（写真3）．

c．粘膜下筋腫

表面平滑な球状の隆起で白色調を呈し，表面に樹枝状の血管が観察される．多くは広基性で，時に有茎性のこともある[8~10]（写真4）．

d．弓状・中隔子宮

子宮底は手前に突出して認められる．子宮鏡は体軸方向の観察であるため，突出程度を正確に判断するのは困難であり，弓状子宮と中隔子宮は区別していない[8,13~15]（写真5）．

## 結　果

異常子宮X線像の結果を表1に示す．その内訳はポリープ状欠損33例，外傷性癒着症30例，粘膜下筋腫17例，辺縁不正12例，中隔子宮11例，弓状子宮4例，子宮内異物1例の合計108例である．引き続き行なった子宮鏡検査所見を表1に対比する．子宮造影法においてポリープ状欠損を示した33例は子宮鏡検査では内膜ポリープ21例，内膜増殖症5例，粘膜下筋腫3例，異常所見なし3例，外傷性子宮腔

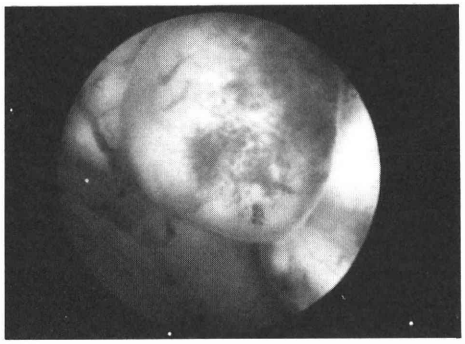


写真4　粘膜下筋腫
子宮底部の粘膜下筋腫．表面滑らかで，樹枝状血管が見える．

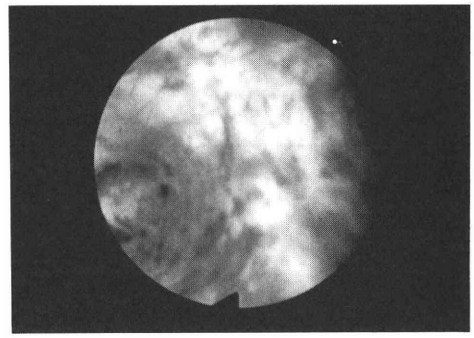


写真5　中隔子宮
広基性の子宮中隔．左右に分かれた子宮腔が見える．

表1　子宮X線像と子宮鏡所見の比較

| 子宮X線像 | | 子宮鏡所見 | | | | | | 一致率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 内膜ポリープ | 外傷性癒着 | 粘膜下筋腫 | 中隔・弓状子宮 | 内膜増殖症 | 異常所見なし | |
| ポリープ状欠損 | 33 | 21 | 1 | 3 | | 5 | 3 | 78.8% |
| 外傷性癒着 | 30 | 3 | 1 | 25 | | | 1 | 83.3% |
| 粘膜下筋腫 | 17 | 3 | 12 | 1 | | | 1 | 70.6% |
| 辺縁不正 | 12 | | | | | 9 | 3 | 75.0% |
| 中隔子宮 | 11 | 1 | | | 10 | | | 90.9% |
| 弓状子宮 | 4 | | | | 3 | | 1 | 75.0% |
| 子宮内異物 | 1 | | | | | | 1 | 0.0% |
| 合計 | 108 | 28 | 27 | 16 | 13 | 14 | 10 | 78.7% |

癒着症1例と診断され，内膜ポリープ，および内膜増殖症と診断された例を所見一致としたところ，両所見の一致率は78.8％（26/33）であった．子宮腔内癒着像を示した30例は子宮鏡検査で外傷性癒着症25例，内膜ポリープ3例などと診断され，一致率は83.3％(25/30)であった．子宮造影法で粘膜下筋腫と診断された17例中12例は子宮鏡検査でも粘膜下筋腫と診断され，その一致率は70.6％（12/17）であった．子宮造影法で辺縁不正を認めた12例は子宮鏡検査では9例が内膜増殖症で3例は異常所見が認められなかった．辺縁不正の原因が増殖症による内膜の凹凸として矛盾なく，これを所見一致としたところ，その一致率は75.0％(9/12)であった．中隔・弓状子宮はそれぞれ11例中10例(90.9％)，4例中3例（75.0％）に所見の一致を見た．全体としての両検査所見の一致率は78.7％（85/108）であった．

子宮鏡下処置の内訳と処置後の妊娠率を表2に示す．内膜ポリープ28例に対しては内膜掻爬，レーザーによる切除，鉗子捻除を行ない，それぞれ6例(27.3％)，2例（100.0％），3例（75.0％）例が妊娠した．外傷性癒着症27例に対する処置として子宮鏡体，キュレット，レーザーによる剝離術を施行し，それぞれ12例中5例（41.7％），9例中5例（55.6％），4例中1例（25.0％）に妊娠が成立した．粘膜下筋腫16例は内膜掻爬，レーザー，鉗子により摘除し，レーザー切除の4例中2例(50.0％)，鉗子捻除の4例中1例（25.0％）が妊娠した．中隔・弓状子宮13例には6例にレーザーによる中隔切除術，5例に鋏み鉗子による切除術を施行し，レーザー切除の6例中2例（33.3％），鉗子切除の5例中1例（20.0％）に妊娠が成立した．内膜増殖症の14例全例および異常所見の認められなかった10例中5例にキュレットによる内膜掻爬を行ない，それぞれ5例（35.7％），4例（80.0％）が妊娠した．粘膜下筋腫の4例およ

表2　子宮鏡下処置

| 子宮鏡所見 | 子宮鏡下処置 | | | | | | 妊娠率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 内膜掻爬 | 鏡体剝離 | レーザー | 鉗子捻除 | 鋏み鉗子 | 処置なし | |
| 内膜ポリープ　28 | 22（6） | | 2（2） | 4（3） | | | 39.3% |
| 外傷性癒着　27 | 9（5） | 12（5） | 4（1） | | 2（0） | | 40.7% |
| 粘膜下筋腫　16 | 4（0） | | 4（2） | 4（1） | | 4（0） | 18.8% |
| 内膜増殖症　14 | 14（5） | | | | | | 35.7% |
| 中隔・弓状子宮　13 | 2（0） | | 6（2） | | 5（1） | | 23.1% |
| 異常所見なし　10 | 5（4） | | | | | 5（1） | 50.0% |
| 合　計　108 | 56（20） | 12（5） | 16（7） | 8（4） | 7（1） | 9（1） | 35.2% |

表3　処置後経過と妊娠予後

| 診断 | 処置 | 妊娠数 | 処置から妊娠まで（月数） | 妊娠予後 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 正常分娩 | 帝王切開 | 流産 | 妊娠中 | その他 |
| 内膜ポリープ | 内膜掻爬 | 6 | 5.3±1.1 | 4 | | 2 | | |
| | レーザー | 2 | 6.0±2.0 | 2 | | | | |
| | 鉗子切除 | 3 | 7.3±3.4 | 2 | 1 | | | |
| 外傷性癒着症 | 内膜掻爬 | 5 | 6.8±2.0 | 4 | | 1 | | |
| | 鏡体剝離 | 5 | 5.8±1.3 | 4 | | | 1 | |
| | レーザー | 1 | 7 | 1 | | | | |
| 内膜増殖症 | 内膜掻爬 | 5 | 8.2±3.6 | 2 | | 1 | 2 | |
| 粘膜下筋腫 | レーザー | 2 | 6.5±1.5 | 2 | | | | |
| | 鉗子切除 | 1 | 3 | | 1 | | | |
| 中隔・弓状子宮 | レーザー | 2 | 7.5±5.1 | 1 | | 1 | | |
| | 鉗子切除 | 1 | 5 | 1 | | | | |
| 異常所見なし | 内膜掻爬 | 4 | 8.5±5.9 | 2 | | | 1 | 1 |
| | 処置なし | 1 | 6 | 1 | | | | |
| 合　計 | | 38 | 6.8±3.1 | 26 | 2 | 5 | 4 | 1 |

び異常所見の認められなかった5例に対しては子宮鏡下の処置は行なわなかったが，異常所見の認められなかった症例の内1例が妊娠に至った．全体としての妊娠率は108例中38例，35.2％であり，妊娠率の高かった疾患は外傷性癒着症(40.7％)，内膜ポリープ（39.3％）であり，粘膜下筋腫（18.8％），中隔・弓状子宮（23.1％）は低率であった．

妊娠症例の処置後の経過と妊娠の予後を表3に示す．処置後から妊娠までの期間は平均で6.8±3.1カ月であった．各疾患や処置法の間に有意差は認められず，ほぼ全例が1年以内に妊娠している．妊娠後の予後は正常分娩26例，帝王切開2例（帝切率7.1％），自然流産5例(流産率14.7％)，現在妊娠継続中4例，妊娠中期での胎内死亡1例であった．

## 考　察

子宮造影法は不妊症や不正性器出血患者を対象に，子宮腔内の異常の有無を把握する目的で広く行なわれており，簡便で患者に与える侵襲も比較的少ない優れたルーチン検査である．子宮X線像は子宮腔の輪郭を明瞭に，また，子宮腔内の異物を陰影欠損像として描出する[1,2,4,7]．しかし，その辺縁不正や陰影欠損の原因疾患を正確に診断するのが困難な場合もある．子宮造影法の診断率を高めるためにはモニターテレビの使用が望ましく，陰影の変化を経時的に観察することにより異常陰影がダイナミックに把握されるとともに，造影剤の過量投与に伴う陰影の不明瞭化を防止することができる[1,2]．しかし，異常部位の色調や性状を把握するためにはさらに子宮鏡検査の追試が必要な症例もある．

子宮鏡は子宮腔内を直視下に観察するため円形の陰影欠損が粘膜下筋腫か，内膜ポリープによるものか，あるいは癒着であるかを診断するのは容易であるが，子宮腔を体軸方向に観察するため遠近感に乏しく，中隔の突出程度や，基底部の広さ，粘膜下筋腫の大きさなどを正確に判定することは難しい。そこで，子宮腔内異常の症例に対しては子宮造影法のみならず子宮鏡検査との併用により鑑別を確実なものにする必要がある[5]．

子宮鏡検査により子宮腔内の観察を十分に行なうために子宮腔拡張剤の役割は重要である．生理的食塩水，ブドウ糖液では拡張力はやや劣るが，内膜表面の微細な血管構築や色調などを正確に観察するのに適している．一方，デキストラン液は粘ちょう性が高いため子宮腔の拡張に優れ，細部の観察にはやや不向きではあるが，多少の子宮内出血があっても観察が可能になる．Taylor et al.[16]は拡張剤としてデキストランと炭酸ガスを比較し，デキストランを使用した場合により多くの子宮腔内異常が観察されたと報告している．不妊症例に子宮鏡検査を行なう場合，多くの症例は未妊未産婦であり，頸管拡張が必要となるが，この際に出血させてしまうことが多く，デキストラン液の使用が有効である．著者らは出血が見られない症例には生食水を用い，出血が視野を妨げる場合にはデキストラン液を使用するのが妥当であると考えている．

子宮造影法と子宮鏡検査所見を比較検討した結果，両所見の一致率は全体としては78.7％であった．子宮造影法と子宮鏡検査による所見の比較については種々の報告があるが，両所見の一致率は40～80％と幅が広い[8~10,17,18]．このばらつきは両所見の判定があくまで判定者の主観によることや，各施設により一致率の判定法が異なることによるものと考えられる．我々は原則として各検査を各々の熟練者が担当し，テクニカルエラーを防止し，検査を施行した医師がその場で判定することにより，より正確な診断を得るように努めている．今回の検討では78.7％と比較的高い両検査所見の一致率を得たが，内膜ポリープや粘膜下筋腫など両検査併用による鑑別が不可欠な症例も多く，両検査法の併用により診断は確実なものとなり，適切な処置法を選択し得た．処置後の妊娠率は35.2％であったが，これを疾患別に検討すると外傷性子宮腔癒着症では40.7％，内膜ポリープでは39.3％と高い妊娠率が得られ，粘膜下筋腫(18.8％）や中隔・弓状子宮（23.1％）では低率であった．

子宮内膜ポリープは不正出血や不妊患者にしばしば見られる疾患であり，子宮X線像では輪郭整の円形あるいは楕円形の陰影欠損像として認められ，単発性のこともあれば多発性の場合もある．大きい単発性の欠損像では粘膜下筋腫との鑑別が困難であり，子宮鏡検査の追試が必要となる．子宮鏡では周囲の子宮内膜と同色のポリープ状隆起として観察され，その表面に腺開口部や出血斑を認めることもあり，粘膜下筋腫との鑑別は比較的容易である．また，外傷性子宮腔癒着症でも子宮造影により辺縁正の円形の陰影欠損像を呈し，内膜ポリープとの鑑別が困難な症例もあるが，子宮鏡検査によりその判別は容易である．

今回の検討において子宮X線像で内膜ポリープと診断された33例中，子宮鏡では21例が内膜ポリープ，5例が内膜増殖症と診断され，両検査所見の一致率は78.8％（26/33）であった．不一致所見としては1例が外傷性子宮腔癒着症，3例が粘膜下筋腫，3例が異常なしと診断された．Kessler et al.[8]の報

告では子宮X線像で内膜ポリープと診断された40例中33例(82.5%)が子宮鏡検査では異なる診断が下されており，そのほとんどは外傷性子宮腔癒着症と異常所見なしの症例であった．子宮鏡検査で異常所見の見られなかった症例では，子宮造影の際に，造影剤とともに混入した気泡をポリープ状欠損と判定した可能性が考えられ，慎重な手技が望まれる．

子宮内膜ポリープの治療として盲目的なキュレットを行なうと組織がこなごなになってしまい，形態的にポリープと確認することが困難になる場合もある．Englund et al.[19]は盲目的なキュレット後に子宮鏡を施行した結果，多くの内膜遺残を認めており，内膜ポリープが疑われた場合には子宮鏡による診断と治療を勧めている．われわれは小型のポリープや子宮内膜増殖症に対してはキュレットによる掻爬を，大型のものに対してはレーザー切除や鉗子捻除を行ない，正常内膜をできるだけ傷つけないようにしている．ポリープ症例の術後の妊娠率は39.3%であるが，キュレット掻爬例(27.3%)に対しレーザー切除例(50.0%)，鉗子捻除例(75.0%)において高い妊娠率が得られた．内膜損傷を最少限に抑えることが妊娠率の向上につながると考える．

外傷性子宮腔癒着症は自然流産や人工妊娠中絶時における子宮内の外科的操作後に生じ，続発性不妊の原因となる[20]．その子宮X線像は多様な不正形の陰影欠損尊を呈し，内膜ポリープや粘膜下筋腫，ポリープ状欠損との鑑別が困難な場合もあるが，その独特で奇異な欠損像より鑑別は比較的容易である．外傷性癒着の子宮鏡所見は，子宮腔前壁から後壁にかけて索状あるいは円柱状の癒着像として認められる．さらに癒着の性状や色調を直視下に観察することにより内膜性癒着，結合織性癒着，筋性癒着のいずれかを判別することが可能であり，治療法の決定において重要なポイントとなる．子宮造影法単独でもかなりの正診率を得られるが，その後の適切な治療を行なうためには子宮鏡検査を併用し，その性状を詳細に把握することが望ましい．今回，子宮X線像で外傷性子宮腔癒着症と診断された30例中，子宮鏡でも外傷性子宮腔癒着症と診断された症例は25例であり，3例が内膜ポリープ，1例が粘膜下筋腫で，1例は異常所見が認められなかった．Kessler et al.[8]の報告では外傷性子宮腔癒着症における子宮X線像と子宮鏡像の両所見の一致率は36.3%であり，子宮X線像で外傷性子宮腔癒着症と診断された症例の中に子宮鏡検査により内膜ポリープ，粘膜下筋腫，子宮内膜増殖症と診断された症例がそれぞれ17.1%，8.6%，11.4%認められている．一方，Fayez et al.[9]によると両者の一致率は85.4%と，対照的に高率であった．われわれの検討でも83.3%と，Fayez et al.と同様に高い一致率が得られた．不一致例はKessler et al.[8]同様，内膜ポリープ，粘膜下筋腫であった．これらは小ポリープや筋腫核が多発していた症例であり，子宮X線像で複雑な不正形の陰影欠損像を呈したものであった．外傷性子宮腔癒着症と診断され，子宮鏡検査で異常が認められなかった症例では，繊維性の癒着をヘガール拡張器の挿入中に剝離してしまった可能性も考えられる[4]．頚管拡張はできるだけ穏やかに行ない，最少限にとどめるべきである．

子宮鏡により内膜性癒着と診断された場合は子宮鏡体やキュレット鉗子により容易に剝離されるが，結合繊維，筋性癒着では鋏み鉗子やレーザーによる剝離法が必要になる[6,21]．盲目的な掻爬では剝離が不十分であったり，思わぬ多量出血を見ることがある．Valle et al.[20]は子宮鏡的に癒着をmild, moderate, severeに分類して剝離後の妊娠率を検討したところ，妊娠率は癒着の程度に相関し，severeな症例の妊娠率31.9%に対し，mild typeでは81.3%と高い妊娠率を得たと報告している．われわれの検討でも内膜性癒着に対するキュレットによる掻爬例とスコープによる剝離例においては47.6% (10/21) であるのに対し，結合織性，筋性癒着に対するレーザー剝離，鋏み鉗子剝離例においては16.7% (1/6) と，癒着の程度と治療後の妊娠率の間には有意差($P<0.01$)が認められた．結合織性，筋性癒着では剝離術後も正常内膜が欠如している部分が多く，低妊娠率の原因になるものと思われる．癒着の性状を把握して最も適した治療法を選択し，できるだけ正常内膜を傷つけないように癒着部分だけをていねいに剝離することが術後の妊娠率の向上につながると考える．

粘膜下筋腫は子宮造影法により円形の陰影欠損像を呈し，内膜ポリープとの鑑別に苦慮する症例もある．しかし，子宮鏡検査では表面平滑な白色～黄色調の隆起として認められ，表面の樹枝状血管などから診断は容易である．今回，子宮X線像で粘膜下筋腫と診断された17例の内，子宮鏡検査でも粘膜下筋腫と診断された症例は12例のみであり，他の5例中3例が内膜ポリープと診断された．子宮鏡で外傷性子宮腔癒着症と診断された1例は，子宮X線像で子宮底部に円形の大きな陰影欠損が認められ粘膜下筋腫と診断したが，子宮鏡検査で子宮底から側壁にかけての広範囲な癒着が判明した症例である．さらに子宮鏡で異常が認められなかった1例は，子宮X線像で混入した気泡を粘膜下筋腫と読んだものと思われる．Kessler at al.[8]は子宮X線像で粘膜下筋腫と

診断された40例中10例に子宮鏡では異常が認められなかったと報告しているが，これは子宮造影の際の手技に問題があると考えざるを得ない．

粘膜下筋腫は極小型のものを除けば盲目的なキュレットでは摘出不可能であり，鋏鉗子，レゼクトスコープ，レーザーを用いた子宮鏡下手術が必要である[6,22]．われわれはYAGレーザーを用いた筋腫切除術を子宮鏡下に行なっているが，この際，子宮穿孔を回避するため腹腔鏡による観察を併用している[6]．YAGレーザーは止血能に優れ，周辺組織への侵襲も少なく，不妊症治療には有効である[21]．今回の検討でも粘膜下筋腫における各処置群の中で，レーザー使用例は比較的高い妊娠率(50.0％)が得られている．

子宮造影法で辺縁不正像を示した12例中，子宮鏡診断では9例が内膜増殖症であった．異常所見が認められなかった他の3例は，月経終了後とは言え，部分的に増殖し始めた内膜により辺縁不正を呈した可能性が考えられる．両検査とも子宮内膜増殖による影響を最小限に抑えるために月経終了直後に施行するのが理想であるが，同時に行なわない限り同じ条件下での結果であるとは言い難い．子宮鏡検査で内膜増殖症と診断した14例には全例に内膜掻爬を行ない，5例(35.7％)が妊娠に至った．本症例に対しては子宮鏡による観察と内膜掻爬を繰り返し，たえず正常な内膜を保つことが重要であろう．

弓状子宮や中隔子宮はMüller管の癒合不全により生じるさまざまな子宮奇形の1型であり，不妊や流早産の原因となる[11]．子宮X線像において子宮底部の突出と2分された子宮腔が認められ，その突出程度から弓状子宮，中隔子宮に分類される．今回，子宮造影で11例が中隔子宮，4例が弓状子宮と診断され，子宮鏡でもそれぞれ10例，3例が同様の診断であり，合わせて86.7％(13/15)と高い一致率を得た．Fayez et al.[9]も子宮奇形における両検査所見の高い一致率(92.9％)を報告している．今回，不一致の症例は1例が内膜ポリープ，1例が異常なしであった．内膜ポリープの症例は子宮底中央部にポリープが認められたが，このような例では子宮X線像で中隔子宮ととらえられる可能性のあることが示された．子宮鏡検査では子宮中隔先端部の観察は可能であるが，突出の程度を把握するのは困難な場合もあり，この点において子宮造影法の診断性が勝っていると思われる．また，双角子宮との鑑別には筆者らも行なっているように腹腔鏡検査による子宮漿膜面の観察が必要となるが[5,11]，今回の検討では双角子宮の症例は見られなかった．

中隔・弓状子宮の治療は，従来より開腹下にStrassman手術やJones & Jones手術が行なわれている．最近では鋏鉗子，レーザー，レゼクトスコープによる中隔切除術が盛んに行なわれており[23~25]，開腹手術に比べて患者に与える侵襲も少なく，筋層切開や漿膜面の癒着形成が避けられるなど利点も多い．Fayez[24]は開腹手術と子宮鏡下手術の成績を比較検討し，開腹術後の妊娠率(71％)に対し，子宮鏡下手術後の高い妊娠率(84％)を報告し，さらに，その手術時間の短さ，出血量の少なさ，入院期間の短縮などの利点を強調している．われわれは腹腔鏡による観察下にレーザー，鋏鉗子を用いた子宮鏡下手術を行なっており[6,26]，術後全例にほぼ正常の子宮腔が形成され，33.3％の妊娠率を得ている．子宮鏡下手術ではJones & Jones手術と異なり，切開された中隔部分が子宮腔内に残ることとなるが，中隔部分は血行に乏しく，着床には適さないとされている．我々も諸家の報告[22,27,28]と同様に内膜の再生を促す目的でホルモン療法(Estrogen-Progesterone経口投与)を行ない，再癒着防止のためにIUDを挿入している．しかし，ホルモン投与やIUD挿入は，これらを用いなかった症例と比較しても術後の妊娠率に有意な効果が得られなかったとの報告もあり[29]，子宮鏡下中隔切除術に関しては今後更に検討が必要である．

今回の検討において妊娠した症例は処置後平均6.8±3.1カ月で妊娠に至っている．術後のFD-1挿入やホルモン療法の期間を差し引けば比較的短期間で妊娠が成立していると言えよう．この内，満期産に至った例は82.4％(28/34)と比較的高率であった．また，帝切率は7.1％(2/28)であり，一般の妊娠経過に比べても特に高率とは言えず，子宮鏡下処置の有用性が示唆された．しかし，流産率は14.7％(5/34)とやや高率であり，術中の内膜損傷，術後の内膜再生の促進，ホルモン補充など，今後検討すべき項目も多い．

子宮腔異常の診断は不妊症治療のスタートである．子宮造影法と子宮鏡検査はそれぞれ利点を有した優れた検査法であるが，いずれも単独検査のみでは子宮腔内異常を完全に把握するのは困難である．両検査を併用することにより，子宮腔内異常の形態，部位，程度の診断は正確なものとなり，適切な治療法の選択が可能になる．今回，両検査併用のもとに子宮腔内異常を診断し，適応があると判断された症例には子宮鏡直視下手術を施行したところ高い妊娠率が得られ，不妊症治療法としての有用性が示唆された．今後さらに子宮腔内異常の診断率を高め，適切な処置を施し，妊娠率を向上させるよう検討を続けたい．

(稿を終えるにあたり，御指導御校閲頂いた百瀬和夫教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究に終始直接の御指導を頂きました小島栄吉講師に厚く御礼申し上げます．

本論文の要旨は第75回日産婦関東連合地方部会総会(1988，東京)，第33回日本不妊学会総会(1988，京都)，第34回日本不妊学会総会（1989，旭川）で発表した．)

## 文　献

1) 百瀬和夫：子宮卵管造影法，産婦人科MOOK，41：241，1988
2) 百瀬和夫，池永秀幸，川島夕美：子宮卵管造影法，日独医報，31：67，1986
3) 百瀬和夫，星合　昊，水野正彦，五味淵秀人，梁善光，山村秀夫：子宮卵管造影法におけるイソビスト300の応用，産婦の世界，42：75，1990
4) Siegler, A. M.: Hysterosalpingography, Fertil. Steril., 40: 139,1983
5) 大高　究，小島栄吉，百瀬和夫：子宮造影法と子宮鏡の併用について，産婦治療，58：427，1989
6) 小島栄吉，大高　究，油田啓一，百瀬和夫：子宮鏡下のレーザー治療，臨婦産，42：519，1988
7) 百瀬和夫，小島栄吉：外傷性子宮腔癒着症，産婦の実際，27：849，1978
8) Kessler, I. and Lancet, M.: Hysterography and hysteroscopy: a comparison, Fertil. Steril., 46: 709, 1986
9) Fayez, J. A., Mutie, G. and Schneider, P. J.: The diagnostic value of hysterosalpingography and hysteroscopy in infertile investigation, Am. J. Obstet, Gynecol., 156: 558, 1987
10) Snowden, E. U., Jarrett, J. C. and Dawood. M. Y.: Comparison of diagnostic accuracy of laparoscopy, hysteroscopy, and hysterosalpingography in evaluation of female infertility, Fertil. Steril., 41: 709, 1984
11) The American Fertility Sosiety: The American Fertility Sosiety classification of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, Müllerian anomalies and intrauterine adhesion, Fertil. Steril., 49: 944, 1988
12) Valle, R. F. and Sciarra, J. J.: Intrauterine adhesions: Hysteroscopic diagnosis, classification, treatment, and reproductive outcome, Am. J. Obstet. Gynecol., 158: 1459, 1987
13) Blackwell, R. E.: The Infertility workup and diagnosis, J. Reprod. Med., 34: 81, 1989
14) Kliger, B. E.: Evaluation, therapy, and outcome in 493 infertile couples, Fertil. Steril., 41: 40, 1984
15) Sϕrensen, S. S.: Hysteroscopic evaluation and endocrinological aspects of women with müllerian anomalies and oligomenorrhea, Int. J. Fertil., 32: 445, 1987
16) Taylor, P. J. and Goswmy, R. K.: Hysteroscopy in infertility and habitual abortion, Human Reprod., 4: 13, 1989
17) Randolph, J. R. Jr., Ying, Y. K., Maier, D. B., Schmidt, C. L. and Riddick, D. H.: Comparison of real-time ultrasonography, hysterosalpingography, and laparoscopy/hysteroscopy in the evaluation of uterine abnormalities and tubal patency, Fertil. Steril., 46: 828, 1986
18) Taylor, P. J.: Correlation in infertility: Symptomatology, hysterosalpingography, laparoscopy, and hysteroscopy, J. Reprod. Med., 18: 339, 1977
19) Englund, G., Ingleman-Sundberg, A. and Westin, B.: Hysteroscopy in diagnosis and treatment of uterine bleeding, Gynaecologia, 143: 217, 1975
20) Asherman, J.: Traumatic intrauterine adhesion and their effects on fertility, Int. J. Fertil., 2: 49, 1957
21) 大高　究，矢野義明，森田峰人，柳堀　厚，油田啓一，武井成夫，小島栄吉，平川　舜，百瀬和夫：子宮鏡下YAGレーザー治療とround tip fiberの検討，日レーザー医会誌，9：263，1988
22) Brooks, P. G., Loffer, F. D. and Serden, S. P.: Resectoscopic removal of symptomatic intrauterine lesions, J. Reprod. Med., 34: 435, 1989
23) Valle, R. F. and Sciarra, J. J.: Hysteroscopic treatment of the septate uterus, Obstet. Gynecol., 67: 253, 1986
24) Fayez, J. A.: Comparison between abdominal and hysteroscopic metroplasty, Obstet. Gynecol., 68: 399, 1986
25) DeCherney, A. H., Russell, J. B., Graebe, R. A. and Polan, M. L.: Resectoscopic management of müllerian fusion defects, Fertil. Steril., 45: 726, 1986
26) 小島栄吉，大高　究，油田啓一，武井成夫，椎名一雄，金子慶賛，前田光士，平川　舜：子宮鏡下YAGレーザーによる中隔子宮の手術，日レーザー医会誌，6：545，1986
27) Newton, J. R., Mackenzie, W. E., Emens, M. J. and Jordan, J. A.: Division of uterine adhesions with the Nd-YAG laser, Br. J. Obstet. Gynecol., 96: 102, 1989
28) Darney, P. D.: Sonographyically guided extraction of a submucous myoma, Obstst. Gynecol., 66: 731, 1985
29) Vercellini, P., Fedele, L., Arcaini, L., Rognoni, M. T. and Candiani, G. B.: Value of intrauterine device insertion and estrogen administration after hysteroscopic metroplasty, J. Reprod. Med., 34: 447, 1989

# Combination of hysterography and hysteroscopy for sterility investigation

Kiwamu Ohtaka

lst. Dept. of Obstetric & Gynecology,
School of Medicine, Toho University,
Tokyo 143, Japan
(Director: Kazuo Momose)

Hysterosalpingography (HSG) is the most routinely used method for sterility investigation. Hysteroscopy has performed also widely for sterile patients recently. A comparison between the findings of these two procedures was carried out. One hundred and eight sterile patients were invesigated with HSG and hysteroscopy. HSG revealed 33 endometrial polys, 30 adhesion, 17 submucous myoma, 12 irregular cavity, 11 septate uterus, 4 arcuate uterus, and 1 intrauterine foreign body. In these patients, hysteroscopy was performed subsequently. Of 33 patients who had diagnosed polyp on HSG, 21 were polyp, 5 hyperplasia, 3 submucous myoma, 1 adhesion, and 3 normal uterus on hysteroscopic findings. Findings are in agreement with the rate of 78.8%. Of 30 patients diagnosed as adhesion on HSG, 25 were adhesion, 3 polyp etc. In whole cases, agreement rate was 80.6%.

For each case, various surgical treatment were followed under hysteroscopy. We obtained high pregnancy rate on adhesion (40.7%) and polyp patient (39.3%).

Combination of hysterography and hysteroscopy is an effective method for sterility investigation.

(受付：1991年2月18日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# シアル酸含有量の異なる2種類のHMG製剤の臨床効果の比較

# Comparison of Clinical Effect of the Two Types of Human Menopausal Gonadotropins (HMG) Which Contain Different Quantities of Sialic Acid

賛育会病院　産婦人科

合阪幸三　Kohzo AISAKA
金田幸枝　Sachie KANEDA
都築浩雄　Hiroo TSUZUKI
鳥谷葉子　Yohko TORIYA
野島美知夫　Michio NOJIMA
國保健太郎　Kentaro KOKUHO
吉田浩介　Kohsuke YOSHIDA

Department of Obstetrics & Gynecology,
San-ikukai Hospital, Tokyo 130, Japan

15例の排卵障害患者（下垂体性：2例，黄体機能不全：6例，内分泌学的PCO：7例）に対して，シアル酸含有量の多いヒュメゴン® (16周期，A群）と少ないパーゴナル® (19周期，B群）およびフェルティノーム® (11周期，C群）を周期毎に交互に用い，臨床効果，血中各種ホルモン動態を検討し，以下の成績を得た．

1）HMG総投与量はA群で有意に減少した（$P<0.01$）．
2）卵胞期の血中FSH値はA，C群でB群に比べて有意に高値を示した（$P<0.05$，$P<0.01$）．
3）成熟卵胞の個数，OHSS発生頻度は3群間で有意の差はなかった．
4）妊娠率もA，B，Cでそれぞれ18.8，15.8，9.1％で推計学的に有意差はなかった．
5）製剤中に含まれるシアル酸はヒュメゴン® 1単位あたり1.46±0.16 μg検出されたが，他の2剤中には検出できなかった．

以上のことから，ヒュメゴン® はシアル酸含有量が多いためFSH活性が低下しにくく，このことが卵胞発育に有利に作用する可能性が示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 541—547, 1991)

## 緒　言

HMG製剤は，今日，排卵障害の治療に巾広く用いられている．発売当初は製剤の量に限りがあったこともあり，下垂体機能不全の症例にのみ限定して用いられていたが，最近は比較的軽症の排卵障害患者や[1]，男女ともに明らかな不妊因子の特定できない，いわゆる機能性不妊婦人に対しても，過排卵を惹起して着床率を向上させるといった目的にも使用されつつある[2]．さらに，IVF-ET (in vitro fertilization and embryo transfer) に伴う卵成熟の観点から，より良好な卵子を得るために，HMG製剤に含まれるFSH/LHの生物学的活性によるバランスが問題提起され[3~5]，FSH活性の極めて高い“pure” FSH製剤による排卵誘発も行われるようになり，優れた治療成績が報告されている[6~8]．

一方，gonadotropin製剤は，その構造上，シアル酸 (sialic acid) をある程度含有しているが，シアル

酸がはずれた場合，そのgonadotropinの肝における代謝が促進され，生体内での半減期も短縮されると報告されている[9~13]．このことから，各種HMG製剤中に含まれるシアル酸の量（正確にはgonadotropinに結合しているシアル酸の量）により，投与された際の生体内の半減期に変化を生じ，これが卵胞の発育や血中の各種ホルモン値に影響を及ぼす可能性が示唆される．

本研究では，シアル酸含有量の異なる2種類のHMG製剤（ヒュメゴン®，パーゴナル®）および“pure” FSH製剤（フェルティノーム®）を各種排卵障害患者に投与し，その臨床効果，副作用の発生，血中各種ホルモン動態について比較検討したので報告する．

## 研究対象および研究方法

下垂体機能不全2例，黄体機能不全6例，および内分泌学的PCO 7例の計15例を対象とした．各疾患は以下のように定義した[1,14]．

下垂体機能不全：LH-RH負荷テストにより low-poor responseを示すもの．

黄体機能不全：BBT高温相11日間以下，黄体中期血中estradiol　200pg/ml未満，progesterone 10ng/ml未満の全てを満たすもの．

内分泌学的PCO: LH/FSH≧1（第一ラジオアイソトープ社製の新キットによる）で，LH-RH負荷テストによりLHのhyper responseを示すもの．

これら15症例にヒュメゴン，パーゴナルおよびフェルティノームをそれぞれ16，19，11周期（合計46周期）投与し，ＨＣＧ切り替え時までの総投与量，成熟卵胞発育数（経腟超音波断層法により最大直径20 mm以上のもの），卵巣過刺激症候群（ovarian hyper stimulation syndrome, OHSS）の発生頻度，妊娠率，および血中FSH, LH, estradiolの動態について比較検討した．

また，今回使用した各HMG製剤について，それぞれ5アンプルずつを任意に抽出し，2 mlの生食水で溶解し，各アンプル内に含有するFSH, LH, HCGおよびシアル酸の量を測定し，HMG 1単位内に含まれるこれらの物質の量について各製剤間で比較した．この際の各製剤のロット番号は，ヒュメゴン（150単位）：900405-010，パーゴナル（150単位）：B 038，フェルティノーム（75単位）：07301019であった．

各種ホルモンの測定は，SRL社に依頼し，FSH, LHに関しては第一ラジオアイソトープ社のSPAC-S®キットを用いIRMA法により，estradiolに関しては第一ラジオアイソトープ社のキットを用いRIA法により，HCGに関してはHCG-CTP®（C-terminal peptide）によるEIA法により行われた．また，シアル酸はシアリレート20®を用い酵素法により測定した．各種ホルモンおよびシアル酸のintraおよびinter assay varianceは，FSH, LH, HCGおよびシアル酸は5％未満，estradiolは10％未満と満足すべき値であった．

推計学的処理は，Studentのt検定によった．

## 研究成績

1．HMG総投与量の比較

まず全症例において，HMGの総投与量を比較したところ，ヒュメゴン：1873.5±216.2，パーゴナル：2124.7±247.6，フェルティノーム：2024.3±412.6単位（M±S. D.,以下同様）と，ヒュメゴン投与群がパーゴナル投与群に比べて有意に減少していることが明らかとなった（図1，$P<0.01$）．この点について，PCO症例についてのみさらに検討したところ，図2に示すように，パーゴナルに比較して，ヒュメゴン，フェルティノームのいずれもHMG総投与量

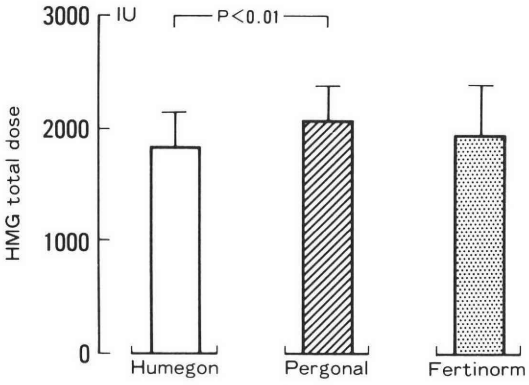



図1　HMG総投与量の比較
（全症例）

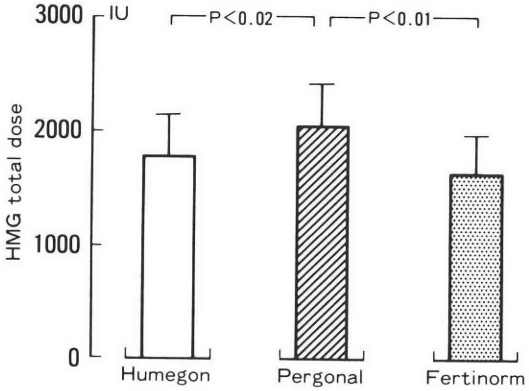



図2　HMG総投与量の比較
（ＰＣＯのみ）

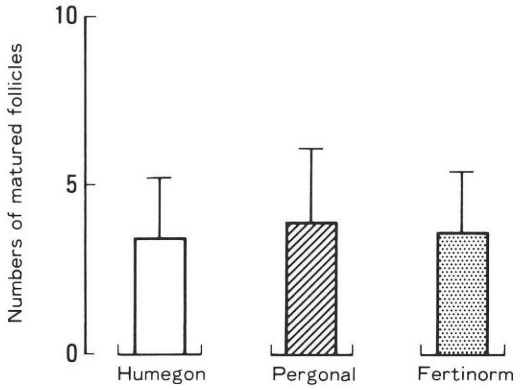



図3　成熟卵胞数の比較
(HCG 切り替え時，全症例)

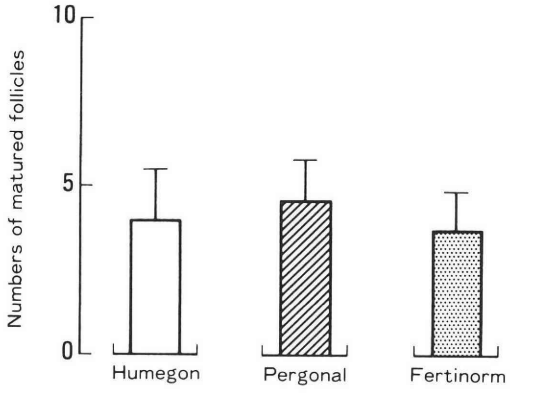



図4　成熟卵胞数の比較
(HCG 切り替え時，PCO のみ)

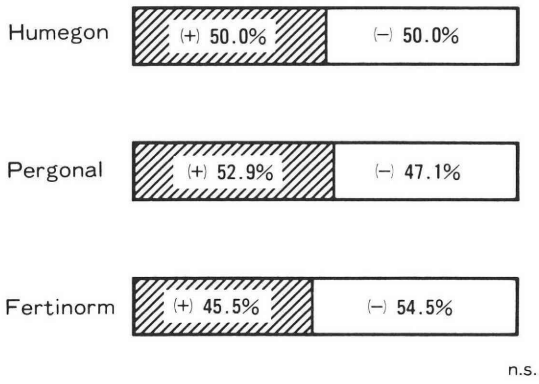



図5　OHSS 合併頻度
(全症例)

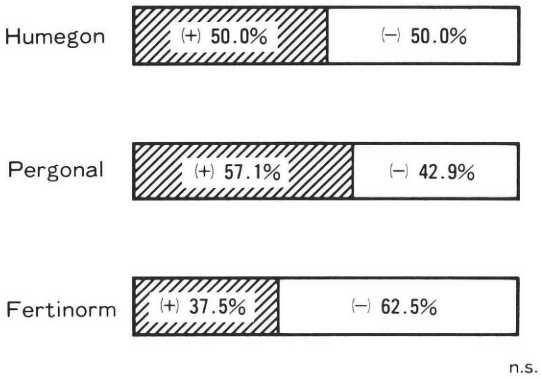



図6　OHSS 合併頻度
(PCO のみ)

が有意に減少していることが明らかとなった（ヒュメゴン：1770.2±207.4，パーゴナル：2165.3±263.8，フェルティノーム：1700.7±234.2 単位，図2）．すなわち，ヒュメゴンはパーゴナルに比べて，HCG 切り替え時までの総投与量を有意に減少させ得ることが明らかとなり，特に PCO ではフェルティノームとほぼ同等の効果を示すことが判明した．

2．成熟卵胞数の比較

超音波断層法により観察し得た成熟卵胞（最大直径≧20 mm）の個数を各群で比較したが，図3に示すようにいずれも有意の差は認められなかった（ヒュメゴン：3.4±1.8，パーゴナル：3.9±2.2，フェルティノーム：3.6±1.8，図3）．PCO のみで比較しても，図4のように有意の差はなかった(それぞれ，4.0±2.1，4.7±1.8，3.8±1.6，図4)．

3．OHSS 発生頻度

今回の検討では，超音波断層法により卵巣全体の大きさが直径 70 mm 以上を示し，明らかな臨床症状(下腹痛，下腹部膨満感など)を伴うものを OHSS と定義した．その結果，PCO のフェルティノーム使用群において，OHSS の発生頻度が低下する傾向を認めたものの，いずれも有意の差はないことが明らかとなった（図5，6）．

4．血中各種ホルモン値の変化

各種 HMG 製剤投与中に採血を行い，血中 FSH，LH，estradiol および HCG 値を測定した．採血は HMG 投与中の follicular phase に行い(午前 10～11 時)，HMG 投与前に施行した．

血中 FSH 値はヒュメゴン，パーゴナル，フェルティノームで，それぞれ，13.7±3.2，11.2±3.5，15.3±4.0 mIU/ml と，ヒュメゴン，フェルティノームでパーゴナルに比較して有意に高値を示した（$P<0.05$，$P<0.01$，図7）．しかし，血中 LH 値（それぞれ，10.3±4.6，11.0±4.7，10.8±4.4 mIU/ml），estradiol 値（それぞれ，1762.5±337.6，1710.3±405.2，1779.6±358.4pg/ml）に関しては，有意の変化はみられなかった（図8，図9）．

一方，血中の HCG 値に関しては，それぞれ 3.1±

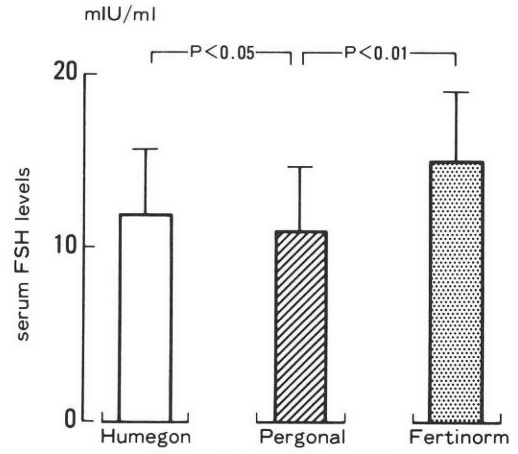



図7　血中FSH値の比較
(卵胞期)

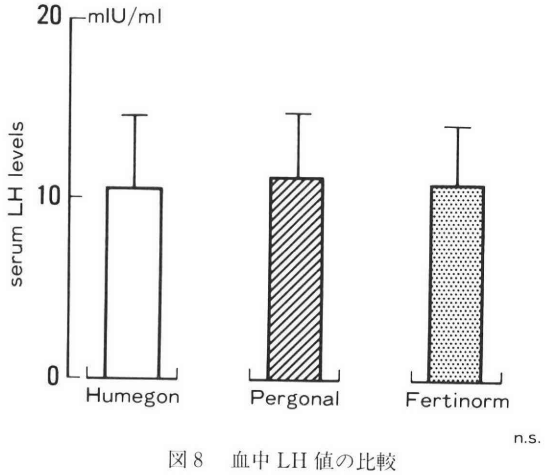



図8　血中LH値の比較
(卵胞期)

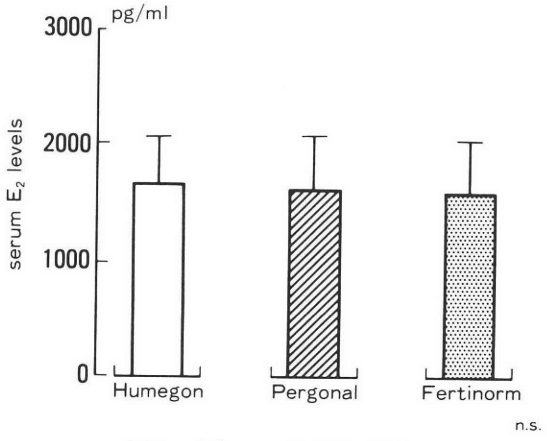



図9　血中estradiol値の比較
(卵胞期)

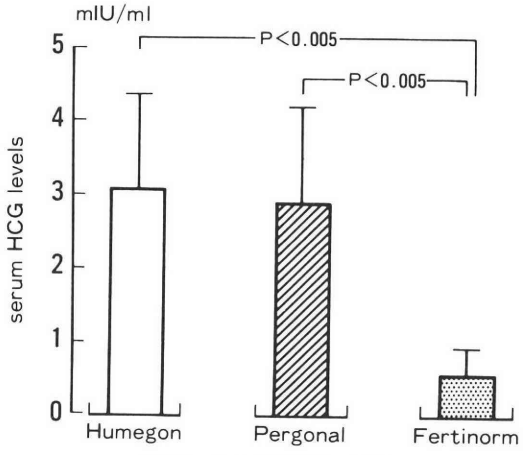



図10　血中HCG値の比較
(卵胞期)

1.3，2.9±1.4，0.7±0.2mIU/mlと，他の2種類のHMGに比べてフェルティノームで有意に低値を示した(P<0.005，P<0.005，図10)．これは，ヒュメゴン，パーゴナルに添加されているHCGによるものと考えられた．

5．各種HMG製剤に含まれるgonadotropinおよびシアル酸の量

HMG製剤は，フェルティノームを除いてそのFSH，LHの生物学的活性が1：1となるように調整されている．また，生物学的製剤というその性質から，各薬剤によって含有されるgonadotropinの免疫学的活性は当然異なっているものと思われる．そこで本研究では，3種類のHMG製剤に含まれるFSH，LH，HCGおよびシアル酸の量を免疫学的方法（IRMA，EIAおよび酵素法）により測定した．各製剤は前述したように同一ロット番号のものをそれぞれ5バイアルずつ抽出して行った．その結果，表1に示すように，ヒュメゴンでは，FSHの含有量が他の2製剤に比較して有意に多いことが明らかとなった（P<0.005)．LHはパーゴナルに多く含まれており，フェルティノームでは極く少量であった．HCGはヒュメゴン，パーゴナルに含有されていることが明らかとなったが，その量に関しては両者で有意差はなかった．フェルティノームにも極めて少量ではあるがHCGが検出された．シアル酸はヒュメゴンにのみ検出されたが，他の2製剤には検出されなかった．

以上のことから，今回の研究でヒュメゴンの方がパーゴナルに比べて，血中FSH値が高値を示した理由として，含有されているFSHの免疫学的活性が高いこと，およびシアル酸の量が多いため，肝における代謝が低下したことによるものと推察された．

6．妊娠症例の検討

表1　各HMG製剤1単位あたりに含有されるFSH, LH, HCGおよびシアル酸の量

| | | ヒュメゴン | パーゴナル | フェルティノーム |
|---|---|---|---|---|
| FSH | (mIU) | 263.36±29.73* | 153.71±12.62** | 192.02±19.50*** |
| LH | (mIU) | 39.34±2.47* | 66.40±3.00** | 1.1 ±0.00 |
| HCG | (mIU) | 50.68±2.62* | 47.20±2.51** | 0.0562±0.0016*** |
| シアル酸 | (μg) | 1.46±0.16 | N.D. | N.D. |

FSH：＊～＊＊＊：$P < 0.005$, ＊＊～＊＊＊＊：$P < 0.01$, ＊～＊＊＊：$P < 0.005$
LH：＊～＊＊＊：$P < 0.005$
HCG：＊～＊＊＊：n.s., ＊～＊＊＊：$P < 0.005$, ＊＊～＊＊＊＊：$P < 0.005$
N.D.：not detectable

本研究期間中，ヒュメゴン16周期中に3例(18.8%)，パーゴナル19周期中に3例（15.8%）およびフェルティノーム11周期使用中に1例（9.1%）の計7例に妊娠が成立した．全例単胎妊娠で胎児心拍も検出され，現在のところ順調に経過中である．妊娠症例の内訳は，下垂体機能不全2例中1例（50.0%），黄体機能不全6例中4例（66.7%），内分泌学的PCO 7例中2例（28.6%）であった．

## 考　察

HMG製剤が本邦で保険薬として認可され，一般臨床に導入されるようになったのは1975年のことである．以来，近年に至るまでいずれの製剤もその組成は生物学的活性でFSH: LH≒1：1となるよう調整されてきた．しかし最近になり，血中のgonadotropinの動態がmonoclonal抗体により正確に測定可能となり[15]，さらにIVF-ETの普及により卵の成熟，質という観点から，卵胞期（とくにその初期）にはFSH優位の方が好ましいとする報告がなされ[3~5,16,17]，それをふまえてFSHの生物活性の極めて高い“pure” FSH製剤（フェルティノーム）が開発され，一般の臨床施設でも使用可能となった[6~8]．

一方，生体に投与されたgonadotropinは，肝や腎において代謝され不活化されるが，それにはgonadotropinに含有されるシアル酸が大きく関与するとされている[9~13]．シアル酸はFSHでその乾燥重量の5.2%，LHで0.7～2.0%，HCGでは最も多く12%程度を占めるとされており[11]，脱シアル化によりそのgonadotropinの半減期は急速に短くなるが，これは脱シアル化されることにより肝での分解が促進されるためであるとされている[12]．

以上の事から考えると，HMG製剤の臨床効果を論じる際には，その製剤中に含まれるシアル酸の量を考慮することが重要なキーポイントとなるものと思われる．そこで今回，我々はシアル酸の含有量の異なる代表的な二種類のHMG製剤であるヒュメゴンとパーゴナルを同一症例に対して交互に使用し，血中各種ホルモン動態や臨床効果にどのような差が生じるかを検討した．

その結果，ヒュメゴンの方がパーゴナルに比較して，HMG総投与量は低下し，逆に血中のFSH値は上昇していることが明らかとなった．しかしながら，成熟卵胞の個数，OHSS発生頻度および妊娠率には有意の差がみられなかったことから，今回の成績でみる限り，この両者には臨床効果において顕著な差はないものと思われた．なお，今回は“pure”-FSH製剤として，少数例ではあるがフェルティノームについても同様の検討を加えたが，PCOにおいてOHSSの発生頻度が低下傾向を示した以外は，ヒュメゴンとほぼ同様の成績が得られた．

一方，各製剤中のFSH, LH, HCGの免疫学的活性を測定したところ，今回検討したロットでみる限り，HMG 1単位あたりのヒュメゴンのFSH活性はパーゴナルより有意に高く，逆にLH活性は有意に低値を示すことが判明した．HMG製剤は冒頭にも述べたように閉経期婦人の尿より生成される生物学的製剤であり，製造段階でFSH, LHの生物学的活性が1：1となるよう調製されるので，この成績のみでヒュメゴンの方が卵胞発育に有利であるとは言い難いが，血中のFSH値が高値を示した理由のひとつと考えてもよいであろう．もうひとつの重要な点は，各製剤に含有されていたHCGとシアル酸である．LHとHCGは構造，生理作用が極めて類似しており，臨床的にもLH surgeの代用にHCGの注射が施行されている．したがって，HMGの製造段階で，FSH/LHのバランスをとるためにLHの代りにHCGが添加されており，それが最近のmonoclonal抗体を用いた鋭敏なassayにより検出されたものと思われる．しかし，その半減期は，LHではfirst component：20分，second component：3時間，HCGではfirst component：6～8時間，second component：24～36時間と報告されており[11,12]，このことを考慮すると長期

間のHMG投与によりHCG成分が蓄積され，卵胞発育に好ましくない影響を及ぼす可能性が示唆される．

シアル酸に関しては，今回の我々の測定ではヒュメゴンにのみ検出され，パーゴナルやフェルティノームには検出されなかった．これは原料の差や，製造工程の違いによるものが最も考えられる．HCG中には乾燥重量比で約12％のシアル酸が含まれているが[11]，ヒュメゴン，パーゴナルでHCGの添加量にほとんど差が認められなかったことから，HCG由来のものとは考え難い．このシアル酸が実際にFSHとどの程度結合していたかは不明であるが，今回の成績でヒュメゴン投与例においてHMG総投与量が有意に減少し，血中FSH値が高値を示した原因のひとつとして，ヒュメゴンに多く含まれるシアル酸がFSHの活性を長期間持続させたことが考えられた．

本研究の結果，HMG製剤に含有されるシアル酸の臨床的重要性が明らかとなった．今回の検討では症例数も少なく，断定的なことは言い難いが，卵胞期初期にはFSH優位の環境が卵の成熟に好ましい影響を与えるとされているので[3~5]，この時期にはシアル酸含有量の多いヒュメゴン（もしくは“pure”FSH製剤であるフェルティノーム）を使用した方がその後の卵および卵胞の発育に有利に作用する可能性が示唆された．

本論文の要旨は，第35回日本不妊学会総会(1990年11月，幕張）において発表した．

血中および薬剤中の各種ホルモンおよびシアル酸の測定に御協力を賜ったSRL社に深謝する．

## 文　献

1）合阪幸三，金田幸枝，都築浩雄，鳥谷葉子，野島美知夫，國保健太郎，吉田浩介：排卵障害の原因別分類とその治療，日不妊会誌，35：650，1990
2）合阪幸三，友成廉平，多和田哲雄，吉松　淳，安藤三郎，國保健太郎，佐々木静子，吉田浩介，金田幸枝，森　宏之：いわゆる機能性不妊婦人に対するHMGを用いた過排卵療法の試み，日産婦会誌，41：196，1989
3）Hodgen, G. D.: The dominant ovarian follicle, Fertil. Steril., 38: 281, 1982
4）Scott, R. T. and Hodgen, G. D.: The ovarian follicle: Life cycle of a pelvic clock, Clin. Obstet. Gynecol., 33: 551, 1990
5）Bernardus, R. E., Jones, G. S., Acosta, A. A., Garcia, J. E., Liu, H. C. and Zev Rosenwaks, D. L. J.: The significance of the ratio in follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in induction of multiple follicular growth, Fertil. Steril., 43: 373, 1985
6）Russell, J. B., Polan, M. L. and DeCherney, A. H.: The use of pure follicle stimulating hormone for ovulation induction in normal ovulatory women in an in vitro fertilization program, Fertil. Steril., 45: 829, 1986
7）五十嵐正雄，他：各種排卵障害婦人に対する高純度FSH製剤，SJ-1001の排卵誘発成績，産と婦，56：501，1989
8）五十嵐正雄，他：PCOに対する高純度FSH製剤，SJ-1001の効果とその投与法の検討，産と婦，56：511，1989
9）Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J. and Ashwell, G.: The role of sialic acid in detetmining the survival of glycoproteins in the circulation, J. Biol. Chem., 246: 1461, 1971
10）Catt, K. J. and Pierce, J. G.: Gonadotropic hormones of the adenopophysis. In Reproductive endocrinology, physiology, pathophysiology and clinical management, 2nd ed., p75, Philadelhpia, W. B. Saunders, 1986
11）Hsueh, A. J. W., Bicsak, T. A., Jia, X., Dahl, K. D., Fauser, B. C. J. M., Galway, A. B., Czekalk, N., Pavlou, S. N., Parkoff, H., Keene, J. and Boime, I.: Granulosa cells as Hormone Target: The role of biologically active follicle stimulating hormone in reproduction, Recent progress in hormone research, 45:209, 1989
12）LaBarbera, A. and Rebar, R. W.: Reproductive peptide hormones: Generation, degradation, reception and action, Clin, Obstet. Gynecol., 33: 576, 1990
13）斎藤英和，佐藤文彦，沼崎政良，小池数与，椎名有二，斉藤隆和，広井正彦：シアル酸含有量の異なるhMG製剤使用によるホルモン変動の検討，産婦世界，42：771，1990
14）合阪幸三，金田幸枝，都築浩雄，多和田哲雄，國保健太郎，鳥谷葉子，野島美知夫，吉田浩介，森宏之：内分泌学的PCO症例の臨床的背景およびbromocriptineの効果に関する研究，日内分泌会誌，66：101，1990
15）LH･FSH研究会（代表：青野敏博）：下垂体性ゴナドトロピン標準品を用いたLHおよびFSHのImmunoradiometric測定法（スパック－S LH，スパック－S FSH)の多施設における臨床的検討，ホと臨床，36：1087，1988
16）浜田雄行，杉並　洋，松浦俊平：種々のHMG製剤中に含有されるFSHおよびLHの免疫学的活性と生物学的活性，日不妊会誌，33：297，1988
17）合阪幸三，多和田哲雄，友成廉平，國保健太郎，金田幸枝，吉松　淳，佐々木静子，鳥谷葉子，吉田浩介：FSH，LH含量の異なる2種類のHMG製剤の臨床効果の検討，産と婦，56：1440，1989

# Comparison of clinical effect of the two types of human menopausal gonadotropins (HMG) which contain different quantities of sialic acid

Kohzo Aisaka, Sachie Kaneda, Hiroo Tsuzuki, Yohko Toriya, Michio Nojima, Kentaro Kokuho and Kohsuke Yoshida

Department of Obstetrics & Gynecology, San-ikukai Hospital, Tokyo 130, Japan

Recently, it was reported that the quantities of sialic acid affected the plasma half-time of gonadotropins. Present study was performed to elucidate the effect of sialic acid which was contained in the HMG on serum FSH or LH levels, and on the numbers of the matured follicles or the pregnancy rate. Fifteen patients who had the ovulatory disturbances (pituitary type: 2 cases, luteal phase defect: 6 cases, and PCO: 7 cases) were subjected. Then, two types of the HMG (Humegon ®: containing higher level of sialic acid, 16 cycles, group A, and Pergonal ®: containing lower level of sialic acid, 19 cycles, group B) was administered to the subjects in every menstrual cycle by turns. The "pure" FSH (Fertinorm ®: 11 cycles, group C) was also administered in some cases. The total dose of the HMG was significantly decreased in the group A compared to that of the group B (1873.5±216.2vs. 2124.7±247.6IU, $p<0.01$). And also the serum levels of FSH in the follicular phase were significantly higher in the group A and C than in the group B (13.7±3.2, 15.3±4.0, respectively, vs. 11.2±3.5mIU/ml, $p<0.05$, $p<0.01$). There was no significant change in the numbers of the matured follicles, in the incidences of the ovarian hyperstimulation syndrome, or in the pregnancy rate. The amount of sialic acid which was contained in one international unit of Humegon ® was 1.46±0.16μg, while no sialic acid was detectable in Pergonal ® and Fertinorm ®. From these results, it was suggested that the serum levels of FSH continued higher range by the treatment of Humegon ® due to its higher content of sialic acid, and also suggested that these conditions might be profitable for the follicular growth.

(受付：1991年2月20日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# Clomiphene 排卵周期における卵胞の形態的変化と内分泌変動との関連について—自然排卵周期との比較から—

# Relationship between Hormonal Dynamics and Follicle Growth in Patients Treated with Clomiphene Citrate —Comparison with Normal Ovulatory Cycles—

藤田保健衛生大学産科婦人科学教室

廣田 穣 Yutaka HIROTA
吉村俊和 Toshikazu YOSHIMURA
白木 誠 Makoto SHIRAKI
神谷貴之 Takayuki KAMIYA
澤田富夫 Tomio SAWADA
河上征治 Seiji KAWAKAMI
福島 穣 Minoru FUKUSHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fujita Health University, School of Medicine, Aichi 470-11, Japan

杏林大学産科婦人科学教室

吉村泰典 Yasunori YOSHIMURA

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

自然排卵周期例と Clomiphene 排卵周期例を比較検討し，以下の結果を得た．

Clomiphene 投与群では，

1．成熟卵胞数（≧15 mm）は，50 mg/day：1.38±0.14 個，100mg/day：2.14±0.2 個と用量反応性に増加し（$P<0.001$），自然群 1.04±0.02 個との間にもそれぞれ有意差を認めた（$P<0.001$）．

2．LH peak の−3 day から 0 day における卵胞径は，自然群より 2～4 mm 増加しており（$P<0.05$～$0.001$），LH peak 当日に 27.3±0.8 mm と最大径を示した．またその発育速度は，LH peak 当日に急激に停滞（1.5mm/day）するのが特徴的であった．

3．尿中 Estrogen 濃度は，−3 day (98.8ng/ml) より順次上昇したが，−1 day～0 day にかけ plateau (170ng/ml) となった．LH peak 前の尿中 Estrogen 濃度は，自然群の 1.5 倍～2 倍の高値を示し（$P<0.001$），Estrogen 優位の内分泌環境が確認された．

4．因子分析の結果，Clomiphene 投与量，尿中 Estrogen peak 値，成熟卵胞数に強い共通性が推定されたが，最大卵胞径はこれら 3 者と同一次元で考えるべきでない事が示唆された．

Clomiphene 投与に際しては，上記のごとき卵胞の形態的変化と内分泌変動とを十分熟知した上で，卵胞管理を考える必要があるものと考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 548—554, 1991)

## 緒　言

Clomiphene citrate (以下 Clomiphene) は，無排卵周期症および第Ⅰ度無月経症例に対して高い排卵率を示すことから，日常臨床で最も汎用されている排卵誘発剤の一つである．しかし，ヒトにおける排卵誘発機序については不明な点も多く，また一方では Clomiphene の anti-estrogen effect が妊娠率の低下に結びついているという speculation[1,2]からも，その運用に関しては細心の注意が必要と思われる．そこで今回我々は，Clomiphene 排卵周期婦人の月経周期にともなう卵胞発育と内分泌変動を自然排卵周期婦人と比較検討したので報告する．

## 対象および方法

対象は，Clomiphene 排卵周期婦人13例（無排卵周期症10例，第Ⅰ度無月経3例）－38周期，自然排卵周期婦人32例－128周期の計166周期である（表1）．尿中 hormone 測定は，自然排卵周期婦人では月経周期10日目より，また Clomiphene 排卵周期婦人では Clomiphene 服用後より開始し，midluteal phase まで以下の方法を用い連日測定した．尿中 Estrogen 値は，競合的赤血球凝集阻止反応を用いた尿中微量 Estrogen 測定キット（Hi-Estrotec：持田製薬）により，また尿中 LH 値は，赤血球凝集反応による尿中 hCG キット（Hi-Gonavis：持田製薬）を用い測定した．被検尿は，随時尿と早期第一尿における精度と実用性を検討した結果より[3]，早期第一尿を検体として採用した．超音波断層装置は，セクター方式 3.5MHz（SONOLAYER-V SSA-90A：東芝）を用い膀胱充満下に経腹走査を行い，卵胞数，卵胞径に関し経日的な観察（dominant follicle の最大径≧15 mm からは超音波上の排卵確認まで連日測定）を行った．なお超音波断層法は，同一検者，同一条件により行ない再現性の追求に努めた．得られた data は Mean±SEM で表記し，一部 data は多変量解析（相関・重回帰・因子分析：社会情報サービス，PC9801-RA: NEC）による統計学的分析を行った．

## 結　果

1．自然排卵周期と Clomiphene 排卵周期の比較（表2）

Clomiphene 排卵周期例（以下 CC 群）での成熟卵胞数（最大卵胞径 15 mm 以上）は，50 mg/day 投与群 1.38±0.14 個，100mg/day 投与群 2.14±0.22 個

表1　研究対象

| | 症例数 | 周期数 | 年　齢(歳) | 月経周期(日) | 不妊期間(月) |
|---|---|---|---|---|---|
| 自然排卵周期 | 32 | 128 | 29.3±0.3 | 29.2±0.4 | 30.0±1.9 |
| Clomiphene 排卵周期 | 13 | 38 | 28.4±0.4 | 30.5±0.4 | 40.1±2.9 |

Mean±SEM

表2　自然排卵周期と Clomiphene 排卵周期の比較

| | 成熟卵胞数 (n) | 最大卵胞径 (mm) | 尿中 Estrogen peak 値 (ng/ml) |
|---|---|---|---|
| 自　然　群 (n = 128) | $1.04\pm0.02^{a1-3}$ | $23.5\pm0.3^{c1-3}$ | $127.3\pm4.0^{d1-3}$ |
| Clomiphene 群 | | | |
| 50mg/日 (n = 21) | $1.38\pm0.14^{a1,b}$ | $27.6\pm0.8^{c1}$ | $194.0\pm9.5^{d1}$ |
| 100mg/日 (n = 17) | $2.14\pm0.22^{a2,b}$ | $27.9\pm0.7^{c2}$ | $202.4\pm12.7^{d2}$ |
| Total (n = 38) | $1.68\pm0.14^{a3}$ | $27.8\pm0.6^{c3}$ | $197.8\pm7.8^{d3}$ |

Mean±SEM

a1－3：$p < 0.001$
b　　：$p < 0.001$
c1－3：$p < 0.001$
d1－3：$p < 0.001$

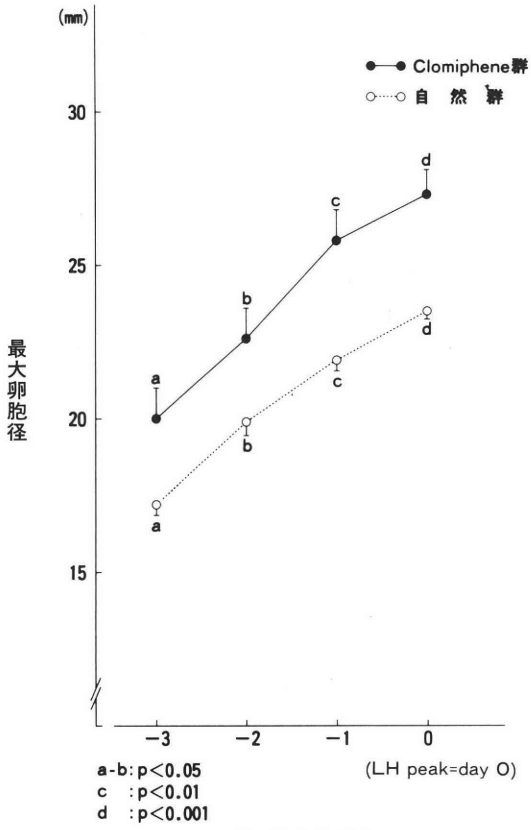



図1　経日的卵胞発育

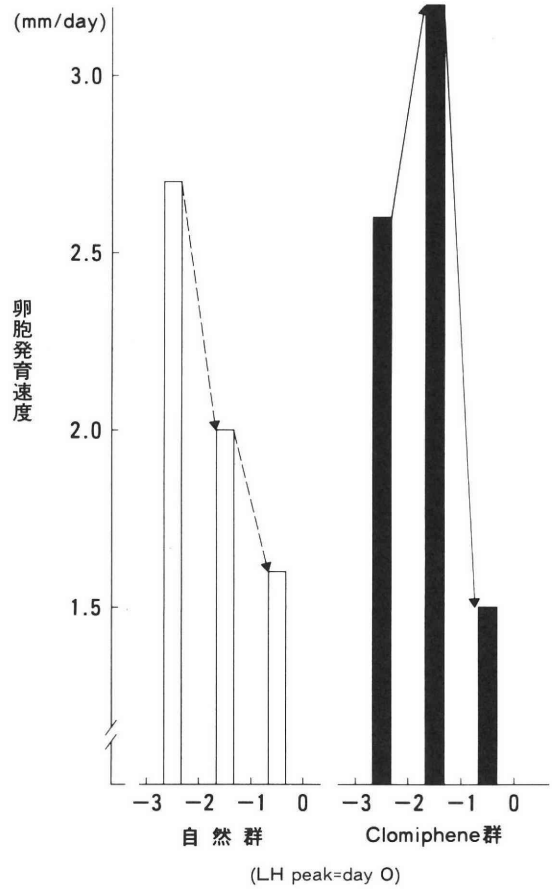



図2　卵胞発育速度

と用量反応性に成熟卵胞数の増加が確認され（P＜0.001），自然排卵周期例(以下自然群)の1.04±0.02個との間にもそれぞれ有意差を認めた(P＜0.001)．最大卵胞径は，自然群23.5±0.3 mm，CC群27.8±0.6 mmと約4 mmの差を認めたが（P＜0.001），Clomiphene投与量による差異は認めなかった．尿中Estrogen peak値は，自然群127.3±4.0ng/ml，CC群197.8±7.8ng/mlと有意の増加を示したが（P＜0.001)，Clomiphene投与量による差は認めなかった。

2．LH peak（day 0）から見た卵胞発育（図1）

dominant follicleの最大径の推移を両群間で比較した．LH peakの−3 dayの卵胞径は自然群17.2±0.4mm，CC群20.0±1.0mmであり，LH peakに向かい卵胞径は順次増加し，LH peakの当日にそれぞれ23.5±0.3mm，27.3±0.8mmと最大径を示した．経日的な卵胞径推移は両群とも同様のpatternを示したが，両群間には図1のごとき有意差（P＜0.05〜0.001）が認められ，Clomipheneの特出した卵胞成熟促進作用が表徴された．

3．LH peak（day 0）から見た卵胞発育速度（図2）

次に，経日的な卵胞の発育速度を両群間で比較した．自然群での卵胞発育速度は，−3 dayから−2 dayにかけ2.7mm/dayの発育を示したが，LH peakに向かい発育速度は次第に低下し，LH peakの当日には1.6mm/dayとなっていた．ところが，CC群では−2 dayから−1 dayにかけ発育速度は3.2mm/dayと急増し，LH peakの当日に1.5mm/dayと急激にその速度が停滞するのが特徴的であった．LH peakの−3 dayからpeak当日までの平均発育速度は，自然群2.1mm/day，CC群2.4mm/dayであったが，両群間の卵胞発育速度には興味ある差異が認められた．

4．経日的な尿中Estrogen値推移（図3）

両群における尿中Estrogen濃度を，LH peakの前後で比較した．CC群でのEstrogen濃度は，−3 day（98.8±12.9 ng/ml）より順次上昇し，−1 day（173.1±9.8ng/ml)からLH peak当日(170.3±10.4 ng/ml)にかけplateauとなり，以後漸減した．自然群では−3 day（40.0±2.3ng/ml）から上昇し，LH peak当日に108.0±4.4ng/mlの頂値に達し，その後

漸減し，+2 day で−3 day の値に復帰した．特に LH peak 前での尿中 Estrogen 濃度は，CC 群が自然群の 1.5～2倍の高値となっており（$P<0.001$），CC群における Estrogen 優位の内分泌環境が確認された．

5．Clomiphene の卵胞成熟に及ぼす影響の統計学的解析（表3）

Clomiphene の投与がヒトの卵胞成熟と Estrogen 動態にどのように関わっているのかを数学的手法を用い解析した．すなわち，Clomiphene 投与例に対し，1）Clomiphene 投与量，2）尿中 Estrogen peak 値，3）最大卵胞径，4）成熟卵胞数を変量とした因子分析を適応した．第Ⅰ因子には Clomiphene 投与量（0.7362）と成熟卵胞数（0.5613）が，第Ⅱ因子には尿中 Estrogen peak 値（0.7249）と成熟卵胞数（0.5332）が高い正の因子負荷量を持っていた．特に成熟卵胞数は，第Ⅰ・第Ⅱ因子共通の変量となっており，Clomiphene 投与量，尿中 Estrogen peak 値，成熟卵胞数との間に強い共通性が推定された．つまり，Clomiphene 投与例での Estrogen 高値は，Clomiphene 投与による成熟卵胞数の増加により二次的に惹起された結果と考えられた．また最大卵胞径は第Ⅲ因子に単独で負の因子負荷量（-0.4800）を示し，上記3変量とは別の因子として位置ずけられており，Estrogen 動態と最大卵胞径を同一次元で考えるべきではない事が示唆された．

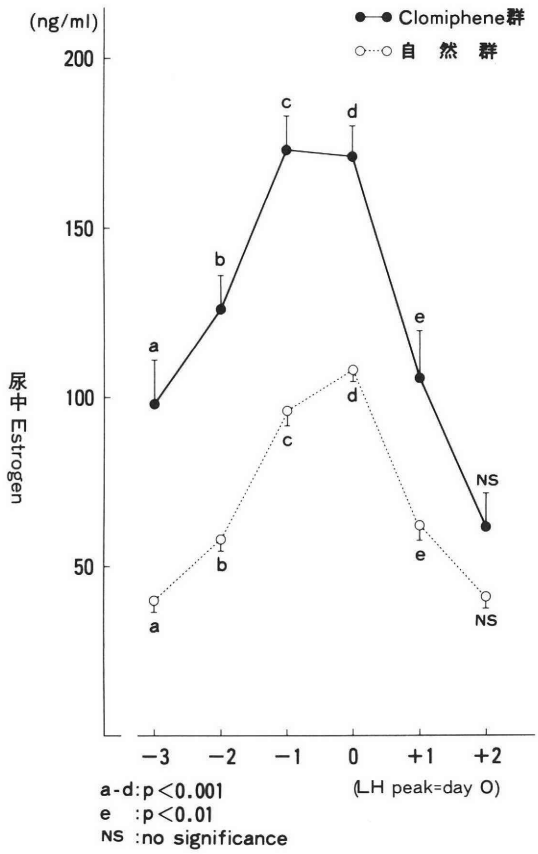



図3　尿中 Estrogen 値推移

## 考　察

従来，卵胞発育と排卵時期の推定は，Radioimmunoassay（RIA）法などの hormone 測定でのみ可能であった．ところが，1970年代後半に Hackelöer ら[4]が超音波断層法を導入し，卵胞発育と血中の Estradiol との関係を明らかにして以来，血中 Estrogen 値が卵胞発育の有用な parameter になることはよく知られており，また血中の LH surge に至っては，排卵を予測する最も重要な parameter であることに異論はない．しかし，不妊外来患者全員に血中 hormone を測定し，臨床に供することは実際上不可能であることから，日常臨床においては，尿中の hormone 測定と超音波断層法による卵胞の形態的変化とから卵胞発育の monitoring を考えていくことが合目的な手順と思われる．そこで，今回著者らは，最も実用的な尿中 hormone 測定と超音波断層法とから Clomiphene の卵胞成熟に及ぼす影響を検討した．

自然排卵周期で成熟卵胞が2個以上観察される頻度は，Testart ら[5]は2.9％と述べているが，我々の症例では4.6％に認められ，正常月経周期においても3～4％の頻度で複数の成熟卵胞が観察されるものと考えられた．一方，Clomiphene 投与例における成熟卵胞数の増加は，諸家の報告[5,6]と一致するところではあるが，それ以外に Clomiphene の投与量（用

表3　Clomiphene 群の因子分析結果　　（バリマックス回転）

| 変　量 | Ⅰ因子 | Ⅱ因子 | Ⅲ因子 | 共通性 |
|---|---|---|---|---|
| Clomiphcne 投与量 | 0.7362 | 0.1082 | −0.0692 | 0.5214 |
| 尿中Estrogen peak値 | 0.1321 | 0.7249 | −0.1462 | 0.5138 |
| 最大卵胞径 | 0.0491 | 0.1860 | −0.4800 | 0.2451 |
| 成熟卵胞数 | 0.5613 | 0.5332 | 0.0871 | 0.5214 |
| 寄与率 | 34.2% | 10.5% | 5.2% | |

量反応性）により，成熟卵胞数が有意の増加を示したことは（P＜0.001），Clomipheneの複数卵成熟促進作用を立証するものとして興味深い結果であった．

排卵前の最大卵胞径は報告者により異なっているが[6~13]，これらを総括すると自然排卵周期では20～25 mm，Clomiphene排卵周期では21～29 mmという結果になろう．自然排卵周期とClomiphene排卵周期では最大卵胞径に差がないという報告もみられるが[9,11]，我々の検討ではCC群で最大卵胞径に4 mmの差を認め，Clomiphene投与例で2～4 mm卵胞径が増大しているとする報告[6,7,10,13]と一致する結果であった．特に，尿中LH peakをday 0としたClomiphene投与例での経日的な卵胞径推移に関しては，飯塚ら[7]の報告（−3 day: 20.4mm → 0 day: 28.6mm）と近似していた（図1参照）．また最大卵胞径を評価する場合（特に排卵誘発周期においては），排卵のtriggerとなるLH surgeが内因性のLH surgeによるものなのか外因性のhCGの投与によるものかを考慮すべきであり，この違いにより最大卵胞径に当然差が生ずるものと考えられた．今回の症例（CC群）は前者によるものであり，Clomiphene単独投与例では，自然排卵周期よりも卵胞径が2～4 mm増大していると考えた方が妥当であろうと考えられた．また一般に，Clomiphene投与例での卵胞発育は自然排卵周期よりrapid growthを示すといわれており，O'Herliyら[9]は排卵前2日よりのその立ち上がりの急峻なことを指摘している．我々も−2 dayから−1 dayにかけ，CC群で3.2mm/dayの急激な卵胞発育を観察したが，LH peak当日には自然群，CC群とも1.5mm/day前後の発育速度を示すのみであった．したがって，卵胞の形態的変化より排卵日の予測を行う場合には，個体差の大きい最大卵胞径によるより，この卵胞発育速度の停滞という現象からこれを論じた方がより排卵日予測の正確性が増すものと考えられた．

Clomiphene投与例でのEstrogen優位の内分泌環境は諸家の報告するところであるが[11~13]，我々の尿中Estrogen濃度比較においても同様の結果が得られた（P＜0.001）．しかし尿中の経日的な推移には，自然群とCC群で若干の差異が認められた．すなわち，自然群ではLH peakに向かいEstrogen濃度は順次上昇したが，CC群では-1 dayからpeak当日にかけEstrogen濃度は停滞を示した．この点に関しては，金子ら[14]も排卵の2日前より尿中のEstrogen濃度が横ばい現象を示すことを報告しており，我々の結果と一致していた．これは先に述べた，CC群での卵胞発育速度に関係があるものと思われた．つまり，CC群では-2 dayから-1 dayにかけ急速に卵胞が発育し，これに呼応するように尿中のEstrogenも急激な上昇を示すが，LH peak当日には急激な卵胞発育の停滞を示し，尿中のEstrogen濃度もplateauとなった．これらの結果は，ヒトにおいて卵胞は最大径が25 mm前後になるとEstrogen産生能が極限に達するものと思われ，McNattyら[15]の卵胞径とsteroidogenesisに関わる報告を傍証する結果となった．また，卵の過熟，luteinized unruptured follicle syndrome（LUF）の発生などを考慮した場合，Clomiphene投与例では適切な時期での外因性のhCGのsupportが必要となるcaseもあるのではなかろうかと類推された．言いかえれば，Clomiphene投与例での卵胞管理においては，尿中Estrogen濃度が120ng/ml前後，dominant follicleの最大径が22 mm前後になった時点でLH surgeが発来するのが理想的なものと思われ，外因性にhCGを投与する場合には，これらを一つの基準にすると良いものと考えられた．

大野ら[16]はClomiphene投与例に主成分分析を用い，排卵前の卵胞観察所見と尿中Estrogen動態に一定の傾向を見いだせなかったことを報告しているが，我々の行った因子分析においては，成熟卵胞数と尿中Estrogen濃度との深い関わりが示唆され，Clomiphene投与例におけるEstrogen優位の内分泌環境は成熟卵胞数に起因することが統計学的にも証明された．これは，Vargyasら[12]もClomiphene投与例で成熟卵胞数と血中Estradiol値との密接な関係を示唆しており，具体的に成熟卵（≧18 mm）1個あたりの血中Estradiol値を460pg/ml/follicleと算出していることからも首肯されよう．

以上，Clomipheneの卵成熟に及ぼす影響を自然群と比較し検討を加えたが，両群間には，興味ある卵胞の形態的変化と内分泌変動とが観察され，Clomiphene投与例の卵胞管理にあたってはこれらの点に十分留意し，卵の成熟を考えていく必要があるものと思われた．またOvarian hyperstimulation syndrome（OHSS），多胎妊娠などの排卵誘発剤の合併症予防やClomipheneのanti-estrogen effectを含む生殖生理上のadverse effectを考えた場合[1,2]，個々の症例に即したClomiphene投与量（minimum dose）の決定が臨床上重要な点であろうと考えられた．

稿を終えるに臨み，本研究に終始御協力を戴いた臨床検査部の柿野和子氏に深謝致します。

本論文の要旨の一部は，第34回日本不妊学会総会（旭川）において発表した．

## 文　献


1) Yoshimura, Y., Atras, S. J. and Wallach, E. E.: Effects of clomiphene citrate on in vitro ovulated ova, Fertil. Steril., 45: 800, 1986
2) Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Atras, S. J., Adachi, T., Santull, R. and Wallach, E. E.: Estradiol ($E_2$) reverses the limiting effects of clomiphene citrate (CC) on early development in the in vitro perfused rabbit ovary, Fertil. Steril., 48: 1030, 1987
3) 廣田　穣，白木　誠，館山祐子，神谷貴之，澤田富夫，吉村泰典，河上征治，福島　穣：自然排卵周期婦人における卵胞成熟の内分泌学的検討，東海産婦誌，25：25，1988
4) Hackelöer, B. J., Fleming, R., Robinson, H. P., Adam, A. H. and Coutts, J. R. T.: Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development, Am. J. Obstet. Gynecol., 87: 613 1980
5) Testart, J. and Frydman, R.: Minimum time lapse between luteinzing hormone surge or human chorionic gonadotropin administration and follicular rupture, Fertil. Steril., 37: 50, 1982
6) 富岡　恵，山本貴雄，辻　雅路，大野洋介，岡田弘二：排卵誘発剤使用時における卵胞発育の超音波診断，日不妊会誌，30：322，1985
7) 飯塚理八，小林俊文，神野正雄，飯田悦朗，杉村和男：体外受精の卵胞管理への尿中エストロゲン微量測定法の応用，産婦の世界，37：1057，1985
8) Kerin, J. F., Edmonds, D. K., Warnes, G. M., Cox, L. W., Matthews, C. D., Young, G. B. and Baird, D. T.: Morphological and functional relations of graafian follicle growth to ovulation in women using ultrasonic, laparoscopic and biochemical measurements, Br. J. Obstet. Gynecol., 88: 81, 1981
9) O' Herlihy, C., Pepperell, R. J. and Robinson, H. P.: Ultrasound timing of human chorionic gonadotropin administration in clomiphene-stimulated cycles, Obstet. Gynecol., 59: 40, 1982
10) Queenan, J. T., O' Bien, G. D., Bains, L. M., Simpson, J., Collins. W. P. and Campbell, S.: Ultrasound scanning of ovaries to detect ovulation in women, Fertil. Steril., 34: 99, 1980
11) Smith, D. H., Picker, D. H., Sinosich, M. and Saunders, D. M.: Assessment of ovulation by ultrasound and estradiol levels during spontaneous and induced cycle, Fertil. Steril., 33: 387, 1980
12) Vargyas, J. M., Marrs, R. P., Kletzky, O. A. and Mishell, D. R.: Correlation of ultrasonic measurement of ovarian follicle size and serum estradiol levles in ovulatory patients following clomiphene citrate for in vitro fertilization, Am. J. Obstet. Gynecol., 144: 569. 1982
13) Ylostalo, P., Ronnberg, L. and Jouppila, P.: Measurement of the ovarian follicle by ultrasound in ovlation induction, Fertil. Steril., 31: 651, 1979
14) 金子　均，久保田俊郎，鎌田周作，陶守敬二郎，西　望，斉藤　幹：排卵誘発時における尿中微量エストロゲンの推移に関する検討，産と婦，55：1084，1988
15) Mcnatty, K. P., Smith, D. M., Makris, A., Osathanondh, R. and Ryan, K. J.: The microenvironment of the human antral follicle: Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro, J. Clin. Endocrinol. Metab., 49: 851, 1979
16) 大野洋介，富岡　恵，辻　雅路，山元貴雄，岡田弘二：超音波卵胞観察からみた排卵誘発時尿中エストロゲン測定の意義，日不妊会誌，30：330，1985


## Relationship between hormonal dynamics and follicle growth in patients treated with clomiphene citrate —Comparison with normal ovulatory cycles—


Yutaka Hirota, Toshikazu Yoshimura, Makoto Shiraki, Takayuki Kamiya, Tomio Sawada, Seiji Kawakami and Minoru Fukushima

Department of Obstetrics and Gynecology, Fujita Health University, School of Medicine, Aichi, 470-11, Japan

Yasunori Yoshimura

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



Both hormonal dynamics and follicle growth at preovulatory phase were compared between patients treated with clomiphene citrate (CC) and normal ovulatory patients. Number of preovulatory follicles (≧15mm in diameter) in CC-treated cycles was signficantly ($p<0.001$) greater than that in normal ovulatory cycles, and increased in a dose-dependent manner. Follicle diameter in CC-treated cycles was also significantly ($p<0.001$) greater than that in normal ovulatory cycles. Although the maximal diameter of dominant follicles in CC-

treated cycles reached 27.3±0.8mm at LH surge, the growth of preovulatory follicle appeared to stagnate between -1 day and 0 day. Urine concentrations of estrogen in both cycles increased as ovulation approached. However, the levels of estrogen in CC-treated cycles was significantly higher ($p<0.001$) than that found in normal ovulatory cycles. A significant communality (ies) among the amount of CC, peaked levels of urinary estrogen, and number of preovulatory follicles was observed in the factory analysis. Maximal diameter of dominant follicles did not correlate with those three parameters.

These data demonstrate that both hormonal dynamics and follicle growth in CC-treated cycles are different from those in normal ovulatory cycles.

(受付：1990年9月13日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 体外受精・胚移植における ブセレリン併用の意義

# Significance of the Routine Use of Buserelin in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer

新潟大学医学部産科婦人科教室（主任教授：田中憲一）

谷　啓光　七里和良　平沢浩文
Hiromitsu TANI　Kazuyoshi SHICHIRI　Hirohumi HIRASAWA
倉林　工　織田和哉　荒川　修
Takumi KURABAYASHI　Kazuya ODA　Osamu ARAKAWA
田中憲一
Kenichi TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of medicine, Niigata University, Niigata 951, Japan
(Director: Prof. K. Tanaka)

体外受精・胚移植においてブセレリン（ブ剤）併用の意義を検討するため，(1)非併用周期で失敗した25症例にブ剤を併用し，同一症例間での成績を比較した．(2)体外受精・胚移植で全例ルーチンにブ剤を併用することの有用性を検討するため，ブ剤併用61周期（ブ群）と非併用129周期（非群）との成績を比較した．

(1)同一症例間の検討では，ブセレリン併用により，採卵中止率，LHサージ抑制，採卵数，妊娠成績及び着床率が改善され，移植胚数も増加傾向にあった．よって，通常の卵巣刺激法で予後の悪い症例はブ剤の併用が有用であることが示された．

(2)非群に比し，ブ群では採卵中止率が低く，LHサージや早発黄体化が抑制された．また，採卵数，妊娠率，胚の着床率も良好であった．また，ブ剤投与による特記すべき副作用は認めなかった．したがって，体外受精・胚移植では，成績向上のためにブ剤併用を全例ルーチンに行う意義があると考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 555—561, 1991)

## 緒　言

体外受精・胚移植では，胚を複数移植することにより妊娠率の向上が得られることから，成熟卵を多数採取するために排卵誘発剤による卵巣刺激法を施行することが一般的に行われている．しかし，これに対する反応は患者により大きく異なり，なかには，卵胞発育が少数しか得られなかったり，卵胞成熟以前のpremature luteinizationやLH上昇のために正常な卵胞発育が障害され，妊娠成績が低下する場合のあることが指摘されている[1,2]．これらの問題を解決するために，前回の体外受精・胚移植が成功しなかった症例に対して，ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ(Gonadotropin releasing hormone analog, GnRHa)を併用した卵巣刺激法が試みられ，その有用性が指摘されている[3~5]．著者らもGnRHaのひとつであるブセレリン（スプレキュア，ヘキスト・ジャパン社）を併用した体外受精・胚移植を行い，こ

の意義についてすでに報告した[6]．しかし，体外受精・胚移植において，GnRHaの併用を全例ルーチンに行うべきか，あるいは，前回失敗例やLHサージ陽性例等，選択された一部の症例だけに行うべきかについて検討した報告は少ない．

今回，体外受精・胚移植におけるGnRHaの有用性について，特に，1．前回挙児失敗例に対してブセレリンを併用し，同一症例間において同剤が体外受精・胚移植の成績に及ぼす影響について検討した．さらに，2．体外受精・胚移植においてGnRHaを全例ルーチンに使用することの意義について多数例の成績検討から分析を行ったので，文献的考察を加えて報告する．なお，生児を得た妊娠のみを妊娠として検討したことを付け加えておく．

## 対象および方法

1988年2月より1989年6月までの間に当科で体外受精・胚移植を施行した症例を対象とした．本期間中，ブセレリンを併用しなかった周期で挙児に失敗した症例（採卵中止例を含む）に，次回，ブセレリンを併用した卵巣刺激法を施行し，HMG投与量，採卵中止率，採卵数，受精率，移植した胚の数，及び妊娠率等を比較し，ブセレリン併用が体外受精・胚移植の成績に及ぼす影響を同一症例間で検討した．また，本期間中の症例を，ブセレリンを併用した群（ブセレリン併用群）と，ブセレリンを併用しなかった群（非併用群）とに分け，retrospectiveに同様な比較を行い，体外受精・胚移植においてブセレリンを全例ルーチンに併用することの意義について検討した．

表1　初期胚形態学的分類

| |
|---|
| グレード4：4細胞期以上に卵割。各胞体は同じ大きさで，ブレブはない。 |
| グレード3：わずかなブレブを認める。 |
| グレード2：さらにブレブの増えた状態。胞体の大きさの不均一。 |
| グレード1：卵割しない，あるいはフラグメンテイションで胞体が判別できない。 |

当科における体外受精・胚移植の方法の詳細はすでに報告した[6]．すなわち，ブセレリン併用群では，刺激周期の前周期高温相7日目からブセレリン300$\mu$gを1日3回経鼻投与した（1日投与量900$\mu$g）．月経発来後，月経周期3および4日目にHMG（HMG日研，日研化学）300単位，以後150単位を連日投与した．非併用群では月経周期3日目よりHMG150単位を連日投与した．両群とも月経周期8日目より連日1回経腟的超音波断層法による卵胞径計測，血中LH値測定（Stratus, Baxter Healthcare社）を行った．主席卵胞16～18mm以上，またはLHサージ開始をもってHMGの投与を中止した．LHサージは前日値の1.8倍以上の上昇により診断した[7]．LHサージを認めない場合は，最終のHMG投与より34～58時間後にHCG（HCGモチダ，持田製薬）10000単位を投与し，その36時間後に採卵術を施行した．また，LHサージを認めた場合は直ちにHCG10000単位を投与して，その12～36時間後に採卵術を施行した．ただし，発育卵胞が2個以下の症例，またはLHサージが開始した症例の一部では採卵術を中止した．

HCG投与日に採血し，血清を－20℃にて保存，後日，エストラジオールおよびプロゲステロンをラジオイムノアッセイ法（日本DPCコーポレション社）にて測定した．

両群とも経腟プローブを用いた超音波ガイド下経腟採卵法にて採卵した．培養液としてHTFを用いた．採卵4時間後に媒精し，14～18時間後，受精の確認を行った．さらに24時間培養後，胚移植を施行した．また，胚のqualityを検討するため，胚移植時の胚の形態学的正常性を，最良4，最低1としてグレード化し，比較した（表1）．黄体支持療法として，プロゲステロン（ルテウム，帝国臓器）を採卵日に50mg，その後13日間30mg投与した．生児を得た症例数をもって妊娠数とした．

すべての値は平均値±標準偏差で表し，統計学的

表2　対象患者の不妊原因

| 不妊原因 | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 卵管因子 | 30(49.2%) | 57(44.2%) | 87(45.8%) |
| 男性因子 | 14(23.0%) | 33(25.6%) | 47(24.7%) |
| 子宮内膜症 | 8(13.1%) | 10( 7.8%) | 18( 9.5%) |
| 免疫性因子 | 1( 1.6%) | 5( 3.9%) | 6( 3.2%) |
| 原因不明 | 6( 9.8%) | 22(17.1%) | 28(14.7%) |
| その他 | 2( 3.3%) | 2( 1.6%) | 4( 2.1%) |
| 合　計 | 61(100%) | 129(100%) | 190(100%) |

表3　同一症例におけるブセレリン併用の有無と卵巣刺激法の成績

| | ブセレリン併用周期 | ブセレリン非併用周期 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| 刺激周期数 | 25 | 31 | |
| 平均年齢 | 34.3±3.77 | 33.6±3.67 | |
| 採卵中止周期数 | 1(4.0%) | 10(32.3%) | $p<0.01$ |
| 採卵周期数 | 24(96.0%) | 21(67.7%) | $p<0.01$ |
| HMG投与量(IU) | 1347±310.5 | 1036±176.9 | $p<0.01$ |
| LHサージ | 0(0%) | 7(26.7%, n=26) | $p<0.01$ |

(平均値±標準偏差)

表4　同一症例におけるブセレリン併用の有無と採卵，受精および妊娠成績

| | ブセレリン併用周期 | ブセレリン非併用周期 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| 平均採卵数 | 5.96±3.75 | 4.0±3.75 | $p<0.05$ |
| 受精率(a) | 71.8±22.0% | 60.5±32.1% | なし |
| 胚移植術数 | 19 | 15 | |
| 移植胚数／移植術 | 2.67±1.97 | 2.14±1.88 | なし |
| 臨床的妊娠(b) | 5 | 0 | |
| 妊娠率 | | | |
| 刺激周期当り | 20% | 0% | |
| 採卵術当り | 20.8% | 0% | |
| 胚移植術当り | 26.3% | 0% | |

(a)：男性不妊症例は除く。　(平均値±標準偏差)

(b)：生児を得た妊娠数。このうち1例は双胎分娩であった。

表5　同一症例におけるブセレリン併用の有無と着床率

| | ブセレリン併用周期 | ブセレリン非併用周期 |
|---|---|---|
| 移植胚数 | 51 | 32 |
| 着床数[a)] | 6 | 0 |
| 着床率 | 11.8% | 0% |

a)：生児1人を着床1と数える。したがって，双胎分娩の場合は着床2である。

有意差検定にはStudent T検定，カイ自乗検定を用いた．

## 結　果

1．対象患者（表2）

本期間中，体外受精・胚移植を目的に190周期に卵巣刺激を行った．このうちブセレリン併用群は61周期，非併用群は129周期であった．両群の不妊原因の分布に有意差を認めなかった．

2．同一症例間においてブセレリン併用が体外受精・胚移植の成績に及ぼす影響に関する検討

ブセレリン非併用周期にて挙児できなかった25症例31周期を，ブセレリン併用の卵巣刺激法にて各症例1周期ずつ合計25周期に体外受精・胚移植を施行した．

これらの卵巣刺激法の結果を表3に示す．採卵中止率は，非併用周期が32.3%であったが，併用周期では4.0%と有意に低率であった．非併用周期では26.7%にLHサージが認められたが，併用周期ではLHサージを認めず，LHサージが有意に抑制された．併用周期24，非併用周期21に採卵術を施行した．

採卵，受精および妊娠成績を表4に示す．採卵数は併用周期で有意に多数であった（併用周期5.96±3.75，非併用周期4.0±3.75，$p<0.05$）．胚移植術当りに移植した胚の数には有意差はないもののブセレリン併用周期に多数である傾向を認めた．これらの結果，ブセレリンを併用することにより，前回挙児できなかった25症例中5例に生児を得た(1例は双胎，他の4例は単胎であった)．刺激周期当りの妊娠率は20.0%であった．

移植した胚のうち生児として分娩したものだけを着床として数えると（単胎は1，双胎は2として数える)，ブセレリン非併用周期で着床の得られなかった症例に対して合計51個の胚を移植し，6個の着床を得た（表5）．

3．ブセレリン併用群と非併用群とにおける体外受

表6　ブセレリン併用の有無と卵巣刺激法の成績

| | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| 刺激周波数 | 61 | 129 | |
| 平均年齢 | 33.8±3.60 | 33.5±3.51 | なし |
| 採卵中止周期数 | 3( 4.9%) | 30(23.3%) | $p < 0.01$ |
| 採卵周期数 | 58(95.1%) | 99(76.7%) | $p < 0.01$ |
| HMG投与量(IU) | 1322±254.4 | 1134±328.0 | $p < 0.01$ |
| LHサージ | 0( 0%) | 29(25.0%, n = 116) | $p < 0.01$ |

(平均値±標準偏差)

表7　ブセレリン併用の有無とHCG投与日の性ホルモン値

| | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| エストラジオール(pg/ml) | 1069±649.1 | 1135±984.3 | なし |
| プロゲステロン(ng/ml) | 0.48±0.39 | 0.68±0.65 | $p < 0.05$ |

(平均値±標準偏差)

表8　ブセレリン併用の有無と採卵，受精および妊娠成績

| | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| 採卵周期数 | 58 | 99 | |
| 平均採卵数 | 5.97±3.87 | 4.10±3.21 | $p < 0.01$ |
| 受精率(a) | 67.8±26.1% | 63.0±36.6% | なし |
| 採卵術 | 48 | 64 | |
| 移植胚数／移植術 | 3.25±1.66 | 2.55±1.17 | $p < 0.05$ |
| 臨床的妊娠(b) | 15 | 5 | |
| 妊娠率 | | | |
| 刺激周期当り | 24.6% | 3.9% | $p < 0.01$ |
| 採卵術当り | 25.9% | 5.1% | $p < 0.01$ |
| 胚移植術当り | 31.3% | 7.8% | $p < 0.01$ |

(平均値±標準偏差)

(a)：男性不妊症例は除く。

(b)：生児を得た妊娠数。このうちブセレリン併用群2例，非併用群1例が双胎分娩であった。

精・胚移植の成績の比較検討

ブセレリン併用群61周期および非併用群129周期の平均年齢に差を認めなかった．これらの卵巣刺激法の結果を表6に示す．併用群および非併用群の採卵中止率はそれぞれ4.9%，23.3%で，ブセレリン併用群では有意に低率であった（$P < 0.01$）．採卵術を施行したブセレリン併用群58周期および非併用群99周期の，卵胞成熟に要したHMG総投与量はそれぞれ1322±254.4単位，1134±328.0単位で，ブセレリン併用群が有意に多量であった（$P < 0.01$）．ブセレリン併用群ではHCG投与前のLHサージ開始は皆無であったが，非併用群では25.0%にLHサージを認め，併用群ではLHサージが有意に抑制された（$p < 0.01$）．また，ブセレリンの使用によると考えられる特記すべき副作用は認められなかった．

表7に両群のHCG投与日における血中エストラジオール値，血中プロゲステロン値を示す．両群間の血中エストラジオール値に差を認めなかったが，血中プロゲステロン値はブセレリン併用群で有意に低値であった（$P < 0.05$）．

ブセレリン併用の有無による採卵，受精および妊娠成績を表8に示す．採卵術当りの採卵数はブセレリン併用群5.97±3.87個，非併用群4.10±3.21個でブセレリン併用群で有意に多数であった（$p < 0.01$）．正常受精率（男性不妊症例を除く）には差を認めなかった．胚移植術当りに移植した胚の数はブセレリン併用群が多かった（併用群3.25±1.66，非併用群2.55±1.17，$p < 0.05$）．これらの結果，ブセレリン併

表9　ブセレリン併用の有無と胚の形態学的グレードによる胚の分布

| 胚の形態学的正常性 | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| グレード4 | 49個(20.0%) | 41個(20.4%) | なし |
| 3 | 107個(43.7%) | 93個(46.3%) | なし |
| 2 | 66個(26.9%) | 46個(22.9%) | なし |
| 1 | 23個( 9.4%) | 21個(10.4%) | なし |
| 合　計 | 245個 | 201個 | |

表10　両群における着床率

| | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| 移植胚数 | 158 | 163 | |
| 着床数[a)] | 17 | 6 | |
| 着床率 | 10.9% | 3.7% | $p < 0.05$ |

a)：生児1人を着床1と数える。したがって，双胎分娩の場合は着床2である。

表11　両群の移植した胚の数別の妊娠数

| 移植胚数 | ブセレリン併用群 | ブセレリン非併用群 | 有意差 |
|---|---|---|---|
| 1 | 2/8 (25.0%) | 0/14( 0%) | $p < 0.05$ |
| 2 | 2/9 (22.2%) | 1/19( 5.3%) | なし |
| 3 | 4/9 (44.4%) | 0/14( 0%) | $p < 0.05$ |
| 4 | 4/13(30.8%) | 3/14(21.4%) | なし |
| 5 | 3/8 (37.5%) | 1/3 (33.3%) | なし |
| 6 | 0/1 ( 0%) | 0/0 | |

各数値は，生児を得た妊娠数／胚移植術数(%)にて表示した。

用群15周期(単胎13，双胎2)，非併用群5周期(単胎4，双胎1例)で生児を得た．妊娠率は，刺激周期当り，採卵術当りおよび胚移植術当りのいずれもブセレリン併用群が有意に良好であった($p < 0.01$)．また，両群とも得られた生児には先天異常を認めなかった．

表9に示すように，両群に胚の形態学的正常性の差は認められなかった．

移植した胚のうち生児として分娩したものだけを着床として数え(単胎は1，双胎は2として数える)，この着床数を移植した胚の数で除したものを着床率とすると，着床率は，ブセレリン併用群が10.9%，非併用群が3.7%で，ブセレリン併用群が有意に良好であった($p < 0.05$)(表10)．

両群の妊娠成績を，移植した胚の数別に検討した(表11)．移植胚数が1個および3個の際，ブセレリン併用群の妊娠率が有意に良好であった($p < 0.05$)．有意ではないものの移植胚数が2個および4個の際にもブセレリン併用群の妊娠率が高い傾向にあることが認められた．移植胚数が5個以上になると，両群の妊娠成績に差はみられなかった．

## 考　察

GnRHaを併用した場合，成熟卵が多数得られること[4]，内因性LHが抑制されて卵の発育にとって好ましくないLH上昇やpremature luteinizationが阻止されること[3~6]，さらに，LH刺激による夾膜細胞由来のandrogen上昇が抑制されて卵胞発育への悪影響[1]が阻止されることなど，いくつかの利点が指摘されている．

ブセレリン非併用周期にて挙児できなかった症例にブセレリンを併用することにより，採卵中止率，LHサージ抑制，採卵数，妊娠成績及び着床率の改善を得ることができた．また，有意差はないものの，移植した胚の数も増加傾向にあった．以上のことから，諸家の報告[3~5]するように，通常の卵巣刺激法で予後の悪い症例はブセレリンの併用が極めて有用であることが確認された．しかし，体外受精・胚移植において，ブセレリン投与を全例ルーチンに行うべきか，あるいは，前回失敗例やLHサージ陽性例等，選択された症例のみに行うべきかについて検討した報告は少ない．今回，retrospectiveではあるが，多数例の検討によりこれに関する分析を行った．

今回の成績では，ブセレリン併用群は非併用群よりHMG投与量が約190単位増加するものの，採卵中止率が減少した上に，1回の採卵術当りの採卵数が増加し，ブセレリンの投与により採卵術の成績が向上された．

HMG刺激周期では，約20%にLHサージがみられることが報告されているが[1]，これらLHサージ陽性周期では採卵術や妊娠成績が低下することが明らかにされている[1,2]．今回の成績でも，非併用群では26.9%にLHサージが認められた．この有害なLHサージは，ブセレリンを併用することにより全症例に抑制された．また，HCG投与日のプロゲステロン値

も有意に低値であり，premature luteinization も抑制されたと推察される．以上のことから，ブセレリン併用により，卵の発育に有害とされる内分泌環境が抑制されたことが示された．

今回，非併用群では卵巣刺激周期当りわずか3.9％にしか生児が得られなかったのに対し，ブセレリン併用群では刺激周期当り24.6％という高い挙児率が得られた．この機序を考える上で，体外受精・胚移植の妊娠成立に影響を与える3つの因子，すなわち，1．移植した胚の数，2．卵の quality，3．胚の着床に対する子宮の受容性から検討する必要がある．

体外受精・胚移植の妊娠率を高めるためにはより多数の胚を移植することが有効であることが知られている[8]．ブセレリン併用群では，非併用群に比較し1回の移植術当りに移植した胚の数が有意に多数であった．したがって，ブセレリン併用群では，この胚の数の増加が妊娠成績向上に関与していることが推察される．しかし，著者らの成績では，ブセレリン併用群では移植した胚1個あたりの着床率が有意に高率であった．加えて，移植した胚の数別の妊娠率は，移植胚数が1個および3個の際，ブセレリン併用群が非併用群より有意に良好であり，2個および4個の際にもブセレリン併用群が良好な傾向にあった．すなわち，移植した胚が同数であってもブセレリン併用群は非併用群より妊娠率が良好であることが示された．このことから，妊娠成績の向上は，移植した胚の数の増加だけではないのは明らかで，他に，卵自体の quality や着床に対する子宮の受容性の向上も存在するものと考えられる．このため，卵の quality 向上の有無を評価する目的で胚の形態学的正常性をグレード化して検討したが，ブセレリン併用群と非併用群の間に胚の形態学的正常性の差を認めることはできなかった．しかし，形態学的観察だけで卵の quality を評価することは不適切である．前述のように，GnRHa を併用した際の卵に対する好影響がいくつか指摘されており，卵の quality 向上が関与している可能性を否定できない．本研究では，卵の quality や着床に対する子宮の受容性に関してこれ以上言及することはできないが，これらの因子に関して今後の検討が期待される．

著者らの成績では，1．母児共にブセレリン投与に伴う特記すべき副作用をみとめなかったこと，2．ブセレリン併用に伴い HMG 投与量が増加したが，その量は約190単位で臨床上大きな問題にはならないこと，3．ブセレリン併用により採卵成績の向上や内分泌環境の改善，さらに大幅な妊娠成績の向上が得られることが示された．このことから，体外受精・胚移植では，前回挙児失敗例のみならず，初回施行例から，症例を選択せずに全例ルーチンにブセレリンを併用することが成績向上に極めて重要であることが示唆された．さらに，ブセレリン併用による採卵数の増加は移植後の余剰胚の増加をも意味する．今後，胚の凍結保存とその移植の進歩と普及により，さらに余剰卵を凍結保存し，患者の妊娠の機会を増やすことができる可能性のあることを考えると，ブセレリンを初回施行例から全例ルーチンに併用することは体外受精・胚移植の成績の向上に大きな役割を果たすと考えられる．

本論文の要旨は第34回日本不妊学会学術講演会（旭川）にて発表した．

## 文　献

1) Stanger, J. D., Yovick, J. L.: Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during follicular phase, Br. J. Obstet. Gynaecol., 93: 385, 1985

2) Eibschitz, I., Belaisch-Allart, J. C., Frydman, R.: In vitro fertilization management and results in stimulated cycles with spontaneous luteinizing hormone discharge, Fertil. Steril., 45 (2): 231, 1986

3) Fleming, R., Coutts, J. R. T.: Induction of multiple folliclar growth in normally menstruating women with endogeneous gonadotropin suppression, Fertil. Steril., 45 (2): 226, 1986

4) Palermo, R., Rosenwaks, Z., Amedeo, G., Cittadini, E., Navot, D.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple follicles, Fertil. Steril., 49 (2): 290, 1988

5) Neveu, S., Arnal, F., Heden, B., Humeau, C., Bringer, B., Cristol, P., Chincole, J. M. and Viala, J. L.: Ovarian stimulation by a cmbination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization, Fertil. Steril., 47 (4): 639, 1987

6) 谷　啓光，佐藤芳昭，織田和哉，七里和良，荒川修，竹内正七：ブセレリンを併用した卵巣刺激法による体外受精・胚移植の試み，日不妊会誌，34：413，1989

7) Testart, J., Frydman, R., Feinstein, M. C., Thebault, A., Roger, M., Scholler, R.: Interpretation of plasma luteinizing hormone assay for the collection of mature oocytes from women: definition of a luteinizing hormone surgeinitiating rise, Fertil. Steril., 36: 50, 1981

8) Speirs, A. L., Lopata, A., Gronow, M. J., Kellow, G. N., Johnston, W. H.: Analysis of the benefits and risks of multiple embryo transfer, Fertil. Steril., 39 (4): 468, 1983

## Significance of the routine use of Buserelin in in vitro fertilization and embryo transfer

Hiromitsu Tani, Kazuyoshi Shichiri, Hirohumi Hirasawa, Kazuya Oda, Osamu Arakawa and Kenichi Tanaka

Department of obstetrics and Gynecology, School of medicine, Niigata University, Niigata 951, Japan
(Director: Prof. K. Tanaka)

The aim of this study was to analyse the significance of the Buserelin administration in an IVF-ET program.

25 patints, whose previous treatment cycles failed, were stimulated with Buserelin and HMG-HCG. With Buserelin use, cancelling rate of oocyte retrival (OR), number of oocyte recovered, suppression rate of LH surge, pregnancy rate and implantation rate were improved. The use of Buserelin in patints, whose previous cycles failed, is of significance.

Records of 190 treatment cycles were reviewed. 61 cycles were given Buserelin and stimulated with HMG-HCG (group A). Comparing with 129 cycles without Buserelin treatment (group B), results of IVF-ET were analyzed.

(1) The dose of HMG used for stimulation was higher in group A (1322±254.4IU) than in group B (1134±328.0IU).

(2) 23.3% of group B were cancelled at OR, on the other hand, only 4.9% of group A were cancelled.

(3) Serum progesterone on the day of HCG administration was lower in group A (0.48±0.39ng/ml) than group B (0.68±0.65ng/ml).

(4) No LH surge was detected in group A, whereas in 25.0% of group B, LH surge was observed.

(5) Oocytes collected per aspiration in group A (5.96±3.87) was more than those of group B (4.10±3.21) in number.

(6) Pregnancy rate (with live birth) per embryo transfer was higher in group A (31.3%) than that in group B (7.8%).

(7) Implantation rate of embryo transferred was higer in group A (10.9%) than in group B (3.7%).

(8) No particular complication of Buserelin administration was observed.

With Buserelin administration, LH surge and premature luteinization were successfully suppressed, and results of OR, pregnancy rate, implantation rate were significantly improved. With Buserelin use, The dose of HMG required increased only about 190 IU, and no particular side-effect was observed, it is indicated that the routine use of Buserelin is of value to improve the outcome of IVF-ET.

(受付:1990年10月8日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 当院における体外受精・胚移植成績
## —妊娠・分娩および出生児についての検討—

# Perinatal Outcome after IVF-ET at Our Hospital

医療法人社団スズキ病院産婦人科

千田 智 Satoru CHIDA
小田原靖 Yasushi ODAWARA
森 滋 Shigeru MORI
蛭田益紀 Masunori HIRUTA
飯田修一 Shuichi IIDA
鈴木雅洲 Masakuni SUZUKI

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

同臨床検査部

立花郁雄 Ikuo TACHIBANA
武田信好 Nobuyoshi TAKEDA

Laboratory of Biology, Suzuki Hospital, Miyagi 989-24, Japan

当院で，1990年12月31日までに実施した体外受精・胚移植（IVF・ET）708例（514名）において161件の妊娠を認め70件の分娩を終了し以下の結果を得た．

1）妊娠率は胚移植あたり22.7％，患者あたり31.3％，流産率は30.4％であった．

2）分娩70件（単胎58件，双胎12件）における計82名の出生児において，平均分娩週数38.2±2.1，出生児体重2788±525（g），男女比1.3であり，自然妊娠群（対照群）と比較して差を認めなかった．

3）双胎群において子宮内胎児発育遅延14名，早産4件を認め，平均出生体重も2419±307（g）と低く，多胎妊娠は周産期における危険因子のひとつと考えられた．

4）帝切率は，IVF群全体で48.6％（双胎群50.0％，単胎群48.3％）と高頻度であった．

以上の結果より，当院のIVF・ETの成績は先進諸国と比較して遜色のないことがわかった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 562—566, 1991)

## 緒 言

1978年，ロンドン市オルダム病院にて，ステプトー・エドワーズのグループにより世界初のヒト体外受精・胚移植（IVF・ET）が成功し，同グループはケンブリッジ郊外にボーンホールセンターを設立した．そこではすでに2千数百名の児が誕生している[5]．我国にても1983年，東北大学，鈴木雅洲のグループが日本初のIVF・ETを成功させ現在の当病院へ引き継がれている．その他，多数の施設でもIVF・ETは施行されており確実に不妊症治療のひとつとして定着し，国内の妊娠数も年々増加している．しかし，IVF・ETによる妊娠後の分娩，出生児についての報告は現在までのところない．そこで当院のIVF・ETの成績および出生児82名についてまとめ，検討したので文献的考察を加えて報告する．

## 方　法

当院におけるIVF・ET実施患者514名(平均年齢33.5歳，卵管因子61.1％，男性因子16.6％，子宮内膜症3.9％，免疫因子を含む原因不明不妊18.4％)を対照とした．排卵誘発は月経周期4日目よりHMGまたはpure FSHを連日投与．8日目より卵胞径計測，尿中エストロジェン測定，頚管粘液検査を施行．最終HMG投与より56時間後にHCG 1万単位筋注し，32～34時間後に経腟的採卵をしている．近年では月経周期2日目よりBuserelinを併用している．胚移植にはシリコン製ファイコンカテーテルを使用．黄体期補充療法としてプロゲステロン50mg，5日間，さらにプロゲステロンデポー250mgを5日おきに3回追加投与している．HCGは採卵後3日目，5日目，8日目，10日目に5千単位投与しているが，卵巣過剰刺激が予想される時には中止としている．

胚移植実施708件より妊娠161件，分娩70件(単胎58件，双胎12件，1990年12月31日現在)，出生児82名について検討した．また，IVF群における妊娠36週以降の単胎分娩57例について，当院で分娩となった30歳以上の自然妊娠高齢初産78例(単胎)を対照群として平均分娩週数，平均出生児体重，男女性比，帝王切開分娩率について比較検討した．

## 成　績

総患者数514名に708回胚移植(凍結胚移植17回を含む)を施行した．平均採卵数は5.9個，平均移植胚数は2.8個(最高4個までとしており余剰卵は凍結保存している)であり161例の妊娠を得た．この中には凍結胚移植後3例，免疫療法併用後3例を含んでいる．免疫療法は，IVF・ETにて妊娠するも枯死卵にて流産を繰り返した例に用いている．妊娠率は胚移植あたり22.7％，患者あたり31.3％であった．自然流産49例(30.4％)，子宮外妊娠4例(2.5％)を認めた(Table 1)．年齢別妊娠率は20歳台が30.0％と40歳以上の妊娠率7.1％と比較して有意に($p<0.05$)高かったが流産率については差を認めなかった(Table 2)．

分娩70件については，単胎58件，双胎12件であり，出生児82名，男児46名，女児36名，男女比は1.3と男児が高い．子宮内胎児発育遅延(IUGR)は単胎群で5例，双胎群で14例，また37週未満の早産は単胎群で3件，双胎群で4件認めた．平均分娩週数(mean±SD)は，単胎群，双胎群で各々38.5±2.1(週)，36.8±1.4(週)．平均出生児体重は各々2959±513(g)，2419±307(g)であった(Table 3)．

Table 1　Results of IVF-ET Program from January 1987 to December 1990

| | |
|---|---|
| No. of patients | 514 |
| No. of embryo transfer[a] | 708 |
| Oocytes/pick up | 5.9 |
| Embryos/transfer[b] | 2.8 |
| Pregnancies[c] | 161 |
| Abortions[d] | 49(30.4%) |
| Ectopic pregnancies[e] | 4( 2.5%) |
| Ongoing[f] | 38 |
| Deliveries[g] | 70 |
| Singletons | 58 |
| Twins | 12 |
| Pregnancy/transfer | 22.7% |
| Pregnancy/patient | 31.3% |

a. Including 17 replacements of IVF frozen embryos
b. Maximum 4 embryos replacement at once
c. Including 3 pregnancies after replacement of IVF frozen embryos and 3 pregnancies following immunotherapy
d. Spontaneous abortion rates are expressed as a percent of all pregnancies
e. Ectopic pregnancy rates are expressed as a percent of all pregnancies
f. More 8 weeks' gestation under the confirmation of fetal heart beat
g. One perinatal death which was born at 26th week gestation (500g)

Table 2　Maternal ages of all pregnancies and abortions

| Age group (years) | No. pregnancy / No. embryo transfer | No. abortion* / No. pregnancy |
|---|---|---|
| 20—29 | 27/90 (30.0%)** | 7/27 (25.9%) |
| 30—34 | 64/285(22.5%) | 24/64 (37.5%) |
| 35—39 | 67/291(23.0%) | 21/67 (31.3%) |
| 40 or more | 3/42 ( 7.1%)** | 1/3 (33.3%) |
| Total | 161/708(22.7%) | 53/161(32.9%) |

＊Including 4 ectopic pregnancies
＊＊$p < 0.05$ chi-square test

妊娠26週新生児死亡を除くIVF単胎群57例における平均出産年齢，平均分娩週数，平均出生児体重(mean±SD)は，33.4±3.8(歳)，38.7±1.2(週)，3002±405(g)であり，自然妊娠群の31.8±2.5(歳)，39.3±1.2(週)，3115±455(g)と比較して有意差を認めなかった(t検定)．また男女比も1.3と1.6で

有意差を認めなかった（$\chi^2$検定）.

帝王切開分娩については，IVF 単胎群で 48.3 %と自然妊娠群の 17.9 %と比較して有意に高率（$P < 0.05$, $\chi^2$検定）であり，双胎群では 50.0 %に達し，IVF 群全体で 48.6 %であった（Table 4）.

単胎群 58 例中，新生児死亡が 1 例あり，妊娠 26 週，子宮内胎児発育遅延胎児仮死にて帝切分娩した 500 g の女児であった．また生後 4 ヶ月頃より原因不明の精神発育遅延を 1 例認めており，39 歳の双胎自然分娩後の男児であり現在精査および経過観察中である．

Table 3　Perinatal Outcome of 82 Born Babies after IVF-ET

| | Singleton | Twin | Total |
|---|---|---|---|
| No. baby | 58 | 24 | 82 |
| No. delivery | 58 | 12 | 70 |
| Sex (Male : Female) | 1.2(32 : 26) | 1.4(14 : 10) | 1.3(46 : 36) |
| No. IUGR | 5(8.6%)* | 14(58.3%)* | 19(23.2%) |
| No. premature delivery | 3(5.2%) | 4(33.3%) | 7(10.0%) |
| Weeks of gestation | 38.5±2.1 | 36.8±1.4 | 38.2±2.1 |
| (Mean+SD) | (38.7±1.1)** | | |
| Birthweight (g) | 2959±519 | 2419±307 | 2788±525 |
| (Mean±SD) | (3002±405)** | | |

*P < 0.005 chi-square test

**Expecting one perinatal death at 26th week gestation

Table 4　Fetal Outcome of Singletons after IVF-ET compared with non-IVF pregnancies at least 36 weeks' gestation

| | IVF-ET (n = 57) | non-IVF (n = 78) |
|---|---|---|
| Age | 33.4±3.8 | 31.8±2.5 |
| Weeks of gestation | 38.7±1.2 | 39.3±1.2 |
| Birthweight (g) | 3002±405 | 3115±455 |
| Sex (Male/Female) | 1.3(32/25) | 1.6(49/30) |
| Cesarean section | 28 | |
| Singletons (n = 58) | 28/58(48.3%)* | 14/78(17.9%)* |
| Twins (n = 12) | 6/12(50.0%) | |
| Total (n = 70) | 34/70(48.6%) | |

*p < 0.005 chi-square test

## 考　察

1988 年度における米国の集計では[1]，年間 2 百回以上の IVF・ET をしている 14 施設において，胚移植あたりの妊娠率 17 %，自然流産率 25 %，子宮外妊娠率 5 %であり，また西欧でも[3]，妊娠率 16.4 %，流産率 26.0 %，子宮外妊娠率 4.9 %と同様の数字である．1985 年までの豪州での統計では[2]，妊娠率 16.6 %，流産率 24.3 %，子宮外妊娠 4.3 %となっており時期的にも差を認めない．以上より当院の成績は世界のトップレベルに達していると言える．多胎分娩率は米国で 25.2 %[1]，西欧で 20.0 %[3]，豪州で 21.4 %（双胎 18.7 %）[2]であり，当院の 17.1 %（双胎のみ）と差をみない．

Bourn Hallam の報告[5]では，単胎の 14 %，双胎の 56 %，品胎の 92 %は早産となり，また単胎の 14 %，双胎の 53 %，品胎の 92 %は 2500 g 以下の低体重児であり，さらに品胎の 22 %は 1500 g 以下であった．豪州でも単胎の 15.5 %，双胎の 57.1 %，品胎の 95.5 %が 2500 g 以下の低体重児である[2]．多胎妊娠分娩は，子宮内胎児発育遅延，早死産，子宮内胎児死亡等周産期における危険率は高く，特に品胎以上は絶対避けるべきであろう．Bourn Hallam では移植胚は 3 個以内としている[5]．当院では 4 個以内としているが，品胎 1 例妊娠中である．近年は受精卵の凍結保存技術が進み，移植胚は 3 ～ 4 個にとどめ，他は保存する方法が一般的となっている．特に，IVF・ET を受ける患者の多くは高齢初産となることを考慮すべきであり，高齢多胎初妊娠を避けるためにも，

IVF・ETの施設では凍結保存技術は必須のものであろう．

当院にては，IVF単胎群と自然妊娠単胎群とにおいて，分娩週数，出生児体重の間において差をみなかった．西独，ハンブルグではIVF群での平均出生児体重3070 gであったが，14.4 %が2500 g以下の子宮内胎児発育遅延であったというが，対照群との間に有意差は認めていない[4]．各国同様のようであり，単胎妊娠については高齢初産以外に問題はない．

IVF群での帝王切開分娩率が有意に高いが，豪州では46.3 %(単胎群で41.8 %，双胎群で55.9 %，品胎群で100 %)であり[2]，当院の成績と同様である．貴重児のため帝切率は高くならざるをえない．性比についても各国同様に差を認めていない．

IVF・ET後の出生児についての先天性の異常や奇形，その後の発育等についての詳細な統計報告はない．これは妊娠後の周産期および出生児の管理は他施設で行うため追跡調査が難かしいためであり，当院でも苦労している点である．豪州のレポートには1985年までの出生児1138例に26例(2.3 %)の異常を認めている[2]．そのうち11例は子宮内胎児死亡，新生児死亡，または人工妊娠中絶となっている．心奇形，染色体異常，口唇口蓋裂，尿道下裂，水頭症等，様々列記されているが，IVF・ETとの因果関係は不明であり特別な傾向もない．ただし，10例は多胎妊娠であり，平均出産年齢は34.2歳．35歳以上は12例であり，高齢初産多胎妊娠がここでも問題になりそうである．

体外受精・胚移植法が広く行われるようになり，新たな発見とともに問題も出てきている．精子異常の高度な症例での顕微受精法の必要性，囲卵腔に精子が入っても受精しない症例でのDonar Spermの使用，卵巣欠如（摘出）や採卵不可能なPremature Ovarian FailureでのOvum Donation，子宮欠如や子宮内腔異常等の為，着床不可能な症例でのGestational Mother（代理子宮への受精卵移植）等の方法にて妊娠可能となるが，これらには倫理上の問題が多くある．諸外国においては倫理上の検討は終了し臨床に試みられており，成績の報告も多いが我々は現時点での日本の環境において患者の期待に沿えるよう技術の向上をはかり，妊娠，出生率(take home baby)を上げなくてはならない．

## 謝　辞

稿を終えるにあたり，当院での体外受精・胚移植による妊娠の分娩・新生児管理をしていただいた諸施設の先生方に感謝致します．なお，本論文の一部は平成2年度日本不妊学会東北支部総会，及び第43回日本産科婦人科学会総会において発表した．

## 文　献

1) The American Fertility Society: In vitro fertilization-embryo transfer in the United States: 1988 results from the IVF-ET Registry, Fertil. Steril., 53: 13, 1990
2) Fertility Society of Australia: In vitro fertilization pregnancies Australia and New Zealand 1979-1985, National Perinatal Statistics Unit, Sydney, 1987
3) Cohen, J. and Mouzon, J.: Outcome of IVF pregnancies in Europe. European Society of Human Reproduction and Embryology, 2nd Joint Meeting, Milan, Abstructs: 35, 1990
4) Fisher, R., Bohnet, H. G., Naether, O., Baukloh, V. and Kern, P.: Pregnancy outcome after IVF/ET treatment at the IHF Hamburg. Europian Society of Human Reproduction and Embryology, 2nd Joint Meeting, Milan, Abstructs: 87, 1990
5) Rizk, B., Rainsbury, P. A., Doyle, P., Betts, J., Brinsden, P. R. and Edwards, R. G.: Perinatal outcome of 2,278 babies born after IVF. Europian Society of Human Reproduction and Embryology, 2nd Joint Meeting, Milan, Abstructs: 37, 1990

## Perinatal outcome after IVF-ET at Our hospital

Satoru Chida, Yasushi Odawara,
Shigeru Mori, Shuichi Iida,
Masunori HIRUTA and Masakuni Suzuki

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

Ikuo Tachibana and Nobuyoshi Takeda

Laboratory of Biology, Suzuki Hospital,
Miyagi 989-24, Japan

The in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program at Suzuki Hospital which is a first private hospital for infertility in Japan was initiated in January 1987 and 708 embryo transfers have been operating in 514 women. 161 pregnancies, including 3 pregnancies after replacement of IVF frozen embryos and 3 pregnancies following immunotherapy for habitual abortion after IVF-ET, were achieved till December 1990. 70 of these pregnancies already ended with a life-birth (58 single-

tons, 12 twins), 38 pregnancies are ongoing and 53 pregnancy losses (49 spontaneous abortions and 4 ectopic pregnancies) were recognized.

The etiologies for infertility in the patients were tubal (61.1%), male factor (16.6%), endometriosis (3.9%) and unexplained (18.4%). However, cleaved and pregnancy rates were similar in patients as etiological factors.

The median duration of pregnancy for the 82 born babies was 38.7±1.2 weeks. Premature delivery before the 37th week occurred in 5.2% (3/58) of the singletons and 33.3% (4/12) of the twins. The median birth-weight of the singletons was 2959±519g. The ratio of male and female was 1.3 (46/36). There were no differences significantly between IVF group and a control group of non-IVF pregnancies. However, the ratio of cesarean section in IVF group (48.6%) was higher than the control group (17.9%). One perinatal death which was born at 26 the week (500g) and a couple of mental retarded twin babies of unknown origin after normal vaginal delivery were recognized. All the other babies have no problems and no abnormalities.

(受付:1990年10月15日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# IVF-ETによる子宮外妊娠の診断

# A Diagnosis of Ectopic Pregnancy from IVF-ET

神戸市立中央市民病院
山下正紀　高島英世
Masanori YAMASHITA　Eisei TAKASHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe City General Hospital, Kobe 650, Japan

京都大学医学部産婦人科
北岡有喜　野田洋一　森　崇英
Yuuki KITAOKA　Yoichi NODA　Takahide MORI

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

IVF-ETの治療周期に起こる子宮外妊娠は，自然妊娠におけるよりは遙かに高い頻度のようであり，IVF-ETを行なう上で無視出来ない重要な副作用の一つであるといえる．今回IVF-ETによる妊娠が子宮外妊娠ではないかとの疑いを持ちながらも，未破裂のまま妊娠8週になるまで診断を確定出来なかった症例を経験した．強力な卵巣刺激法および黄体賦活法により両側の卵巣は採卵後も腫大したままで，採卵の対象とならなかった残存卵胞が多数認められたため，この腫大した卵巣と子宮外妊娠による付属器腫瘤や子宮外GSとを鑑別することが困難であったことが原因と考えられた．IVF-ETによる妊娠の初期には，子宮外妊娠や内外同時妊娠の可能性に充分注意して管理する必要があると考える．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 567—570, 1991)

## 緒　言

体外受精胚移植法（IVF-ET）は，近年開発されたTVプローブを用いた採卵法やGnRH併用の卵巣刺激法の導入によって，プログラムの設定が以前に比して容易に行なえるようになってきた．その結果，一般臨床病院のレベルにおいても十分に対応可能な治療法となり，本邦においても急速に普及しつつある．ちなみに日本産婦人科学会の調査でも1988年末までにこの治療法の登録を済ませた施設は92か所にものぼり，現在も増加し続けているものと考えられる[1]．このような状況の中で，我々も1988年9月よりIVF-ETによる不妊治療を開始した[2]．今回IVF-ETにより成立した妊娠が早期より子宮外妊娠ではないかと疑いながらも妊娠8週まで診断を確定出来なかった症例を経験した．この症例を提示しIVF-ET周期の子宮外妊娠の診断について考察を加える．

38歳．夫41歳，1妊0産，続発性不妊症
家族歴，特記することなし
月経歴，初経14歳；29日周期で整，持続期間6日間
妊娠歴，31歳で結婚，同年妊娠するも自然流産に終わる．
不妊治療歴，1985年両側卵管閉塞症の診断のもとに両側卵管開口術をうけた．その後のHSGにて再度両側卵管留水症が認められ，IVF-ETの適応と判断された．1987年より他院にて3回のIVF-ETを受けたが妊娠に到らなかった．
現病歴，1989年8月22日より当院にてIVF-ETによ

る治療目的でGnRH (Suprecur: Hoechst) 900μg／日の投与を開始した．IVF-ETのprotocolおよび臨床経過は図1に示す．8月31日，月経3日目より6日間hMG150単位／日の投与を追加した．同9月6日月経周期9日目にhCG5000単位投与，その36時間後の9月8日に超音波ガイド下に経腟的採卵を行ない，7個の卵を得た．

9月10日分割の確認された5個の胚をファイコンETカテーテル（富士システム社）を用いて30μlの移植用培養液とともに子宮底より1 cm頚部よりの子宮腔内に移植した．胚移植後17日目にTestPackが陽性となり，以後尿中hCG値は急激に上昇し続け，胚移植29日後2×10⁴IU/L，36日後6×10⁴IU/Lとなった．その間，性器出血や腹痛等の異常は認められず，自覚症状としては軽度の悪心のみであった．

経腟的超音波法にて子宮内に胎児心拍や典型的なGS像を認めなかったが，輪郭のやや不鮮明なhypoechogenicな像が認められた．両側付属器部分は腫大し，それぞれ複数個の嚢胞が認められたが，子宮外GSとの確証が得られず，またダグラス窩の液貯留像も認められなかった(写真1)．胎児心拍動が認められない状態としては尿中hCGが高値であったため，子宮外妊娠を疑ったが診断の確定が出来なかった．

経過観察中，10月23日，胚移植後43日目の経腟的超音波法による子宮腔内の所見に，一見胞状奇胎を思わせる小嚢胞の散在が認められた．胞状奇胎の疑いにて直ちにD＆Cを行ったが，肥厚した脱落膜様組織の排出のみで，子宮腔内の着床の形跡は認められなかった．

同日の超音波再検査でようやく右付属器部分の嚢胞の中の1つに心拍動が確認され，右卵管妊娠の診

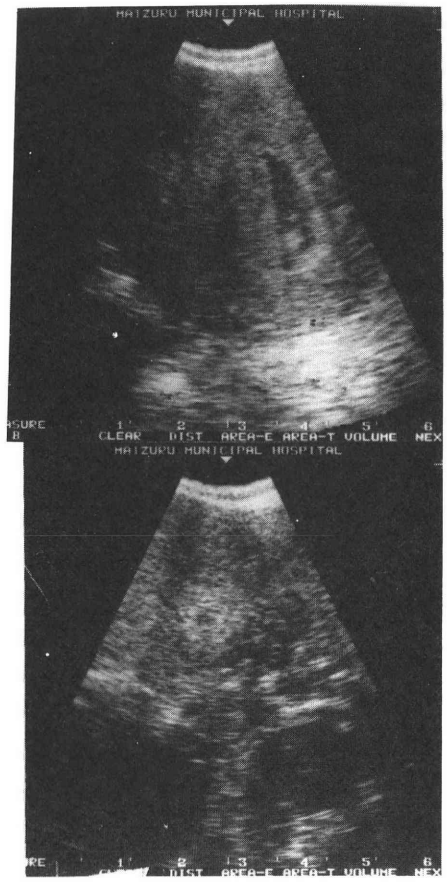



写真1　胚移植29日後の超音波断層所見上部はpseudo-GS，下部には付属器部分に嚢胞が認められる。

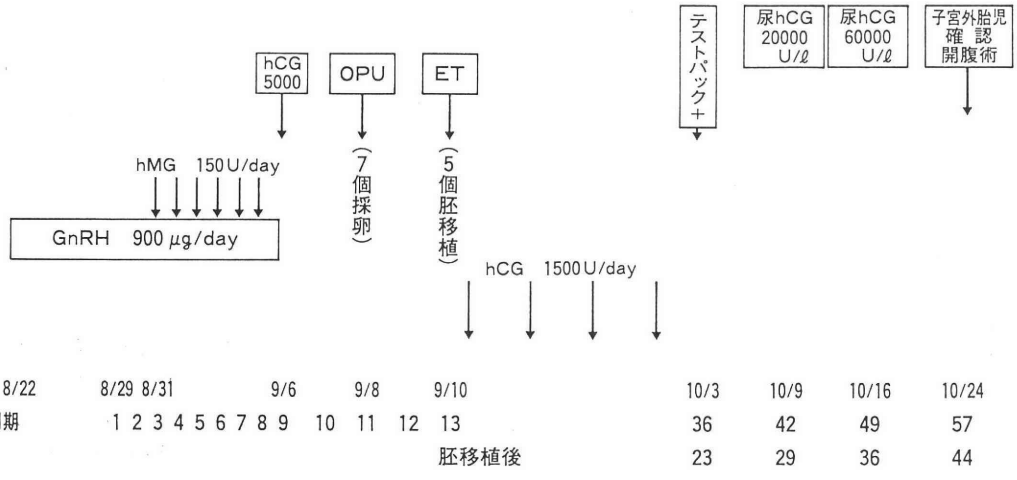



図1　臨床経過

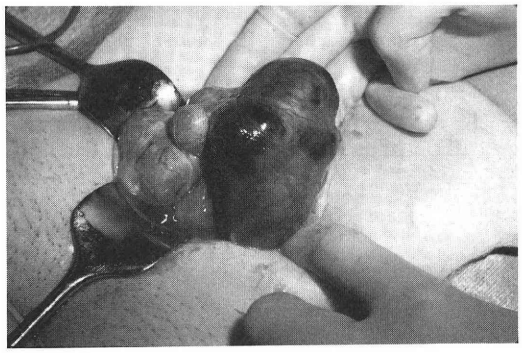


写真2　開腹時所見：右付属器は一塊となり卵巣及び卵管の判別が困難であった。

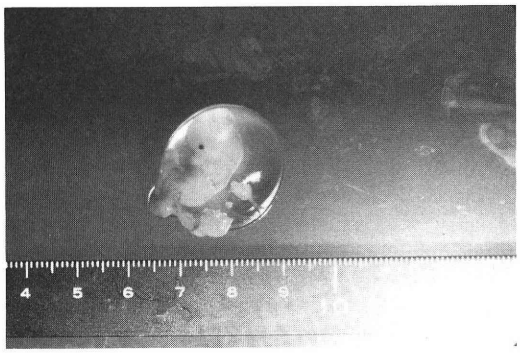


写真3　右卵管内より摘出した胎児及び付属物。胎児はCRL 15mmで8週に相当する。

断にて開腹術を施行した．写真2に示す通り，腹腔内に出血は認められなかったが，右付属器は手拳大に腫大し一塊となり，卵巣および卵管の判別も困難であった．術中超音波断層法により切除すべき卵管を確定した後卵管切除術を行なった．切除された腫大卵管膨大部内には写真3に示すごとく，CRL 15mm，8週相当に成長した胎児が認められた．またD＆Cにて得られた組織の病理検査ではchorionの存在は認められなかった．術後の合併症はなく，11月4日退院となった．

## 考　察

IVF-ETによる人類初の妊娠は子宮外妊娠であったと報告されている[4]．その後もIVF-ET周期の子宮外妊娠の報告は数多く認められている．自然妊娠全体に占める子宮外妊娠はおよそ1％であるとされている．一方IVF-ETの治療周期に起こる子宮外妊娠は妊娠成立の5～10パーセント程度であるとの報告が多く，自然妊娠に起こるよりは遙かに高い頻度である[5]．また一旦子宮外妊娠を起こせば開腹術が必要となり，また重篤な事態を招くこともあることより，子宮外妊娠はIVF-ETを行なう上で無視出来ない重要な副作用の一つであるといえる．今回はIVF-ETによる妊娠が子宮外妊娠ではないかとの疑いを持ちながらも，未破裂のまま妊娠8週になるまで診断を確定出来なかった．妊娠成立を期待するあまり妊娠の初期に認めた子宮内のpseudo-GSをGSと判断してしまったことや，その後も子宮外で成長を続けていたGSを残存卵胞と区別出来なかったことが診断を遅らせた原因と考えられた．無症状の子宮外妊娠を診断するためには，まず超音波断層法が必須の検査であり，この際子宮外妊娠を示唆する超音波断層所見は1．子宮外着床部の証明．2．子宮腔内GCを認めない．3．付属器腫瘤を認める．4．ダグラス窩貯留液の存在．等であるとされている[3]．とくに近年経腟プローブの登場でこれらの所見をより正確に捉えられるようになり，正常妊娠では妊娠4週後半には子宮内GSが確認できるとされる程であり，Ilan et al.はこの方法により卵管妊娠の早期診断が容易であるとしている[6]．しかしながら，今日行われているIVF-ETによる子宮外妊娠の場合には必ずしも診断が容易でない場合もある．その理由は第1にIVF-ETのプログラムでは一般に非常に強力な卵巣刺激法が用いられること，第2に複数個の胚が移植されることなどである．両側の卵巣は採卵後も腫大したままで，採卵の対象とならなかった残存卵胞が多数認められることが通常である[7]．この残存卵胞を含む腫大した卵巣と子宮外妊娠による付属器腫瘤や子宮外GSとを鑑別することは困難であることが少なくない．また卵巣刺激周期には腹水の貯留も希でなくダグラス窩貯留液の存在も有意の所見とはなり得ない．さらには自然妊娠では30000例に1例しか起こらないとされている子宮外同時妊娠の頻度もEssam et al.が2.9％と報告しているように相当に高いようである[8]．従って子宮内GSの確認された例でも子宮外妊娠の可能性は決して否定できた訳ではないことを念頭に入れておく必要があろう．報告されている症例にも破裂後初めて診断のついた例が多くみられる[9,10]ことから考えてもIVF-ET周期の子宮外妊娠の診断は自然に成立する子宮外妊娠に比して容易でない場合が少なからず存在すると思われる．IVF-ET周期の妊娠を取り扱う際には経腟超音波所見，hCG値の推移等に細心の注意を払い子宮外妊娠の可能性を十分に念頭にいれて管理する必要があると思われる．

## おわりに

疑いながらも妊娠8週まで診断できなかったIVF-ETによる子宮外妊娠例を経験した．自然妊娠に比べ

IVF-ET 周期の子宮外妊娠の頻度は遙かに高いとされており且つ診断が困難と考えられる．IVF-ET 周期に成立した妊娠の取扱いは子宮外妊娠の可能性を十分考慮にいれるべきであろう．

## 文　献


1) 森　崇英：生殖医学の登録に関する委員会報告，日産婦誌，42：393，1990
2) 山下正紀，高島英世，北岡有喜，野田洋一，森　崇英：当院における IVF-ET の試み，日不妊会誌，投稿中
3) 上妻志郎，岡井　崇，水野正彦：子宮外妊娠の診断，産婦人科の実際，38：145，1989
4) Steptoe, P. C. and Edowards, R. G.: Reimplantation of human embryo with subsequent tubal pregnancy, Lancet, 1: 880, 1976
5) Trounson, A. and Francisca, M.: An analysis of factors associated ectopic pregnancy in a human in vitro fertilization program, Fertil. Steril., 45: 79, 1986
6) Timor-Tritsch, I. E. and Rottem, S.: Transvaginal ultrasonograhic study of the fallopian tube, Obstet. Gynecol., 70: 424, 1987
7) Yovich, J. L., Matson, P. L., Turner, S. R. and McColm, S. C.: Heterotopic pregnancy from in vitro fertilization, J. IVF/ET, 2: 146, 1985
8) Dimitry, E. S., Milis, M., Margara, R., Subak-Sharpe, R., Winston, R.: Nine cases of heterotopic pregnancies in 4 years of in vitro fertirization, Fertil. Steril., 53: 107, 1990
9) Goldman, B., Rudak, E., Dor, J., Nebel, L., and Mashiach, S.: Unilateral tubal twin pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer, Fertil. Steril., 42: 297, 1984
10) Smith, D. H., Saunders, D. M., Picker, I., Tucker, M., Sinosich, M. J., Kemp, J. F. and Picker, R. H.: Tubal pregnancy occuring after successful in vitro fertilization and embryo transfer, Fertil. Steril., 38: 105, 1982


## A diagnosis of ectopic pregnancy from IVF-ET


Masanori Yamashita, Eisei Takashima

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe City General Hospital,
Kobe 650, Japan

Yuki Kitaoka, Yoichi Noda
and Takahide Mori

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



It seems that the possibility of ectopic pregnancy is higher in IVF-ET cycle than in normal pregnancy, which is significant side-effect we should not neglect. Recently the diagnosis of ectopic pregnancy was delayed until 8 weeks of gestation remaining unraptured, although we had doubt of the possibility of it. It was difficult to identify adnexal mass or extrauterine gestational sac associated with ectopic pregnancy, distinguishing from enlarged ovaries, because strong ovarian stimulation and luteral support had kept ovaries swollen with many follicles even after OPU.

In the early stage of pregnancy from IVF-ET, patients should be treated carefully considering the possiblity of ectopic pregnancy or heterotopic pregnancy.


(受付:1990 年 12 月 25 日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 男性不妊患者の体外受精における受精能予測の為の各種精液パラメーターの有用性

# Value of the Semen Characteristics for Predicting Fertilizing Capacity in In Vitro Fertilization in Patients with Male Infertility

秋田大学産科婦人科学教室

松井俊彦 Toshihiko MATSUI
児玉英也 Hideya KODAMA
加藤充弘 Mitsuhiro KATO
関根和子 Kazuko SEKINE
武田志保 Siho TAKEDA
真木正博 Masahiro MAKI

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

当科で施行した体外受精症例のうち，WHOの男性不妊の診断基準に該当する41例を対象とした．それらを受精率正常群（受精率50％以上）11例，受精率低値群（受精は成立するが，受精率50％未満）13例，受精不能群17例の3群に分類し，各種精液パラメーターの受精能予測の有用性について検討した．その結果，精子濃度は各群間に有意差なく，運動率は正常群と低値群間のみで有意差（$P<0.05$）が認められた．一方，正常形態精子の出現率は正常群と低値群間（$P<0.05$），正常群と不能群間（$P<0.01$）で有意差が認められた．正常形態精子の頻度において10％以上を受精成立例と予測すると，sensitivityは86％（16/21），specificityは81％（13/16）と高値であった．また塗抹標本上，未分化細胞あるいは多核白血球が一定数以上出現した症例においては，受精の可能性が著しく低下した．以上より，男性不妊において受精能を予測する上で，形態学の検討は他のパラメーターと比較して重要と思われた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 571—577, 1991)

## 緒　言

体外受精への男性不妊の応用は，通常では受精の場である卵管膨大部まで到達し得ない精子でも卵子に到達させることが可能となり，受精に必要な精子数も極端に少なくてすむという理論[1]により始められ，良好な成績が期待された[2]．しかし，そのような期待に反し，多くの男性不妊の精子は受精能力そのものに問題があり，十分な濃度で媒精しても受精に至らないことが明らかとなった[3]．近年の卵巣刺激法の進歩によって，成熟卵の採取は以前と比較して容易なものとなっている．したがって，受精の成立は，卵巣の反応が極めて不良で成熟卵子が採取されにくい患者や抗精子抗体が問題となる例を除くと，ほとんどの場合が精子のqualityに依存している．そして，多くの施設において，男性不妊の患者が治療に抵抗して取り残される結果となっている．

しかし一方で，かなり重度の男性不妊と予測された症例でも，体外受精により良好な受精能力が証明される例が少なくない．そこで，男性不妊患者の体外受精の可能性をいかに予測するかが重要な問題となっており，それはまた男性不妊の本質的な問題を理解する糸口とも考えられている．また，最近では，受精能力に乏しい精子をmicrofertilizationの技術により受精させる試みが行われており，本邦での臨床応用も近いものと思われる．そのような現状から，

現時点での男性不妊における体外受精の限界と問題点を正しく認識する必要があると思われ，当科の男性不妊に対する体外受精の治療成績を retrospective に分析し，各種精液パラメーターの受精能予測法としての有用性について考察した．

## 研究方法

1）研究対象

1988年10月より1989年12月までに当科で施行した体外受精症例117例のうち，精液検査結果がWHOの男性不妊の診断基準[4]に該当する41例を対象とした．すなわち，精子濃度2000万/ml以下，運動率50％以下（高速で直進する精子では25％以下），奇形率50％以上のうちの少なくとも一つの要素を満足する症例である．また，男性側または女性側に抗精子抗体が認められた症例は除外した．これら対象患者の平均年齢は32.2歳，平均不妊期間は6.9年であった．女性側にも不妊原因が認められた例が13例存在し，その内訳は卵管因子が6例，子宮内膜症が7例であった．41例の患者に合計52回の体外受精を施行した．

2）体外受精の方法

卵巣刺激法は，hMG単独周期またはlong protocolによるGnRH agonist（ブセレリン，ヘキストジャパン）併用周期にて行った．hMG（パーゴナル，帝国臓器またはHMG日研，日研化学）の初回投与量は，患者の反応に合わせて150から300IUを使用した．超音波断層法及び血中LH値にてモニタリングし，最大卵胞径18mm以上でhCGに切り替え，その34時間後に超音波断層法を用いて経腟的に採卵を行った．精液は液化後，Makler chamberにて精子濃度と精子運動率を算定し，その後，運動良好精子をswim up法にて回収した．通常の体外受精では運動精子で5万/mlの濃度で媒精しているが，男性不妊の例においては，10万～50万/mlの媒精濃度とした．swim-up不良例では，沈渣に存在する精子もあわせて使用した．受精及び胚発育は，10％非働化母体血清加human tubal fluid (HTF)の培養液を用いて，37℃，5％$CO_2$，5％$O_2$，90％$N_2$の気相下で行った．媒精後16～18時間で受精を確認した後，その翌日に子宮内に移植した．当科における体外受精の手技の詳細については，以前に報告した[5,6]．

3）精子の奇形率の算定

体外受精時の精液の一部をスライドグラスに塗布し，アルコール固定しておき，パパニコロー染色による精液塗抹標本を作製後，光顕（400倍）にて観察し，奇形率等の判定を行った．頭部が楕円状で先体がやや淡く染色されており（頭部の直径は5～6 μm，短径は2.5～3.5μmで，先体は頭部の40～70％を包む），頸部から中間部にかけて屈曲や腫大（cytoplasmic droplet）等の異常が認められないものを正常形態精子とした[7]（Table 2: a）．奇形精子はその程度により，軽度奇形と重度奇形の二つに分類した．前者は正常な先体を認めるが頭部がやや細いかあるいは軽度の核形の不整を認めるもの（Table 2: b），後者は先体を認めない（Table 2: c）か重度の核形の不整を認めるもの（Table 2: d-細長い，e-円形，f-核が認められない，g-大型多形性），あるいは頸部の腫大を認めるもの（Table 2: h）とした．奇形率の算定と共に，プレパラートに混在してくる多核白血球および未分化細胞の出現頻度も同時に算定した．

## 研究結果

検討期間中に当科で施行した体外受精治療周期の全周期の受精率（受精卵子数／明らかな変性卵および透明帯が破砕した卵子を除いた採卵数）を，患者の適応別にFig. 1に示す．この期間の全周期の平均採卵数は6.8±3.6個（mean±S. D.，以下同様）であり，男性不妊患者の平均採卵数は8.0±4.8個であった．また男性不妊患者の平均受精率は24.9±32.7％で，男性因子や抗精子抗体が認められない純粋な卵管因子の適応患者の受精率71.9±23.5％と比較して有意に（$P<0.01$）低率であった．しかし，男性不妊患者の中には，卵管因子の患者と同様の良好な受精率を示す症例も少なくなかった．そこで，男性不妊の症例を，卵管因子の患者とほぼ同様な50％以上の受精率を示した受精率正常群（normal fertilization

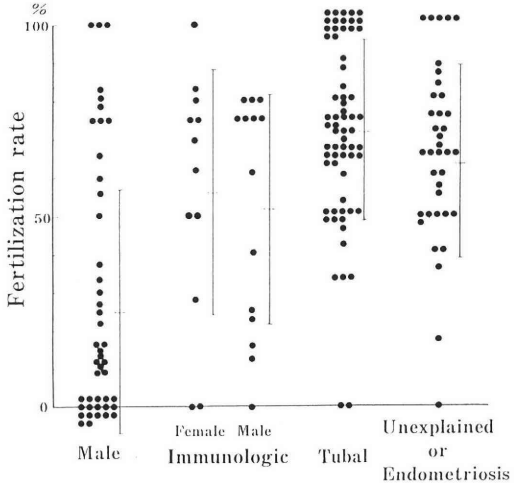



Fig. 1　Distribution (Mean±SD) of fertilization rate according to indication for IVF

rate group) 11例，受精は成立したものの受精率が50％未満であった受精率低値群 (low fertilization rate group) 13例，全く受精が認められなかった受精不能群 (no fertilization group) 17例の3群に分類し，以下の検討を行った．なお，2回以上体外受精を行った場合はその受精率の平均により分類した．

(1) 各群の体外受精の成績

Table 1に各群の体外受精の成績を示した．平均

Table 1　Outcome of IVF in the three different groups

| | No fertilization group | Low fertilization rate group | Normal fertilization rate group |
|---|---|---|---|
| Patients | 17 | 13 | 11 |
| Aspirations | 19 | 17 | 16 |
| Oocytes per aspiration* | 6.5±4.7 | 12.2±3.8 | 5.4±2.7 |
| Fertilized oocytes* | 0 ± 0 | 2.1±1.8 | 3.6±1.9 |
| Fertilization rate* | 0 ± 0 % | 16±12% | 67±26% |
| Transfers | 0 | 14 | 15 |
| Embryos per transfer* | 0 ± 0 | 2.5±1.5 | 3.6±1.5 |
| Pregnancy rate per as. | 0 % | 18%(3/17) | 44%(7/16) |
| per tr. | 0 % | 21%(3/14) | 47%(7/15) |
| Miscarriage rate | — | 33%(1/3) | 14%(1/7) |

＊mean±standard deviation.

Table 2　Classification of the sperm morphology and the incidence of each category in the three groups

| | no fertilization group (%) | low fertilization rate group (%) | normal fertilization rate group (%) |
|---|---|---|---|
| (a) | 9.1±9.3 | 14.7±9.7 | 22.6±6.2 |
| | (※1) | (※3) | |
| (b) | 32.3±13.0 | 39.4±16.5 | 42.7±4.6 |
| | (※2) | | |
| (c) | 23.2±16.9 | 18.0±9.1 | 16.2±7.3 |
| (d) | 13.2±9.2 | 9.4±5.1 | 9.5±5.4 |
| (e) | 11.0±5.6 | 4.5±3.4 | 5.3±3.8 |
| | (※1) | (※1) | |
| (f) | 0.3±0.5 | 0.1±0.3 | 0.0±0.0 |
| | (※1) | | |
| (g) | 1.2±1.5 | 0.2±0.6 | 0.5±0.5 |
| | (※4) | | |
| (h) | 1.4±2.9 | 1.0±1.2 | 0.6±0.9 |
| その他 (i) | 0.2±0.5 | 0.1±0.3 | 0.2±0.4 |

(※1)　$p < 0.01$　　(※2)　$p < 0.02$　　(※3)　$p < 0.05$　　(※4)　$p < 0.10$

受精率は受精不能群で0％，受精率低値群で16％，受精率正常群で67％であった．採卵当りの妊娠率は受精率低値群18％，受精率正常群44％で，移植当りの妊娠率は，受精率低値群21％，受精率正常群47％であった．流産率（流産例数／妊娠例数）は受精率低値群33％（1/3），受精率正常群14％（1/7）であった．

また，受精率低値群の採卵数は，他の2群と比較して有意に（$p<0.01$）高かった．

（2）各群の各種精液パラメーターの比較

Fig. 2に各群の精液検査所見および精子形態と受精成績との関係を比較して示した．精子濃度の比較では3群間に差は認められなかった．運動率に関しては，低値群と正常群との間に有意差（$p<0.05$）が認められたが，不能群と低値群との間に差は認められなかった．精子の形態においては，正常の形態をもつ精子（Table 2: a）の割合は受精不能群と正常群との間で（$p<0.01$），低値群と正常群との間で（$p<0.05$）有意差が認められた．正常＋軽度奇形率（Table 2: a＋b）は，不能群と正常群間で有意差（$p<0.01$）が認められ，受精率低値群及び正常群では1例を除いて40％未満なのに対して，不能群では1例を除いて全て60％以下の値を示した．

（3）各群の精子形態の詳細な比較

Tabel 2に精子の個々の奇形（b～i）の出現率を示した．（b），（e），（f），（g）の奇形が，2群あるいは3群間で有意差を認めた．

（4）各群の多核白血球，未分化細胞の出現率の検討

精液塗抹標本中には精子の他に，多核白血球や，まだ精子に十分分化していないと考えられる細胞質

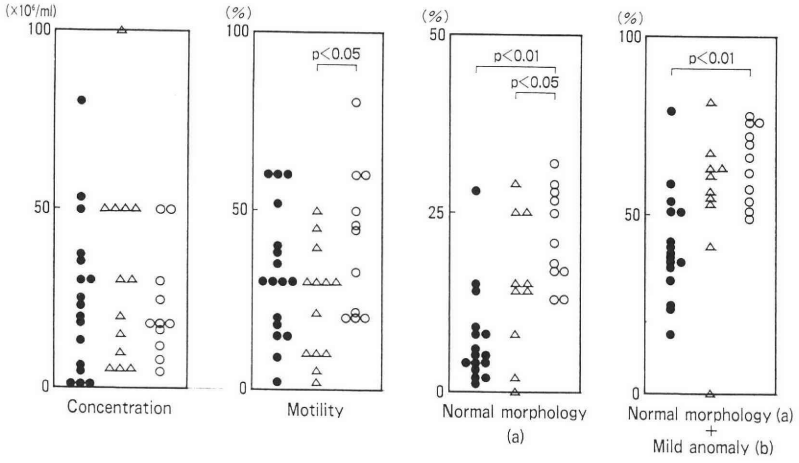



Fig. 2　Sperm concentration, motility and morphology in groups with no fertilization (●), low fertilization rate (△) and normal fertilization rate (○)

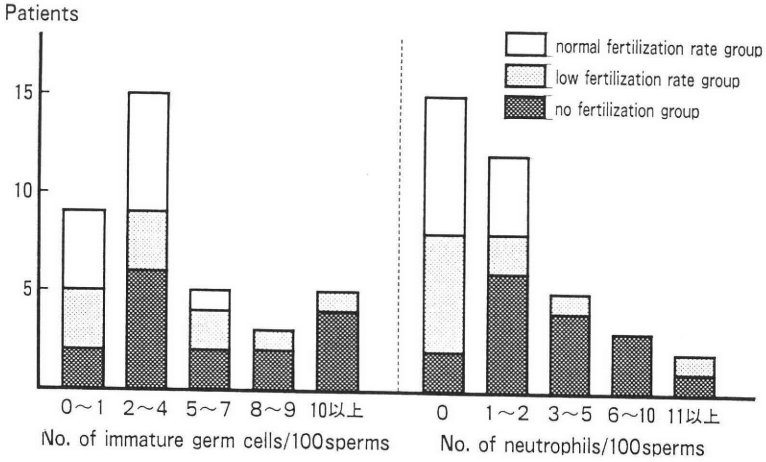



Fig. 3　The number of immature germ cells and neutrophils in semen in the three groups

を有する比較的核の大きな未分化な細胞が観察される．この2種類の細胞の出現頻度を100精子毎に検討した．Fig. 3は未分化細胞及び多核白血球の出現頻度と受精成績を示した．未分化細胞が100精子当り8個以上出現した症例で，受精が成立した症例は8例中2例で，その2例はいずれも受精率低値群であった．多核白血球においては，6個以上出現した症例のうち受精したのは5例中，受精率低値群の1例のみであった．

## 考　察

今回は，男性不妊患者を受精率の面から3群に分けて検討を行った．単純に男性不妊患者を受精成立例と受精不能例に分けることも考えられたが，実際には受精能力は低下しているものの受精を低率に認め得る症例が存在すると考え，それを独立の群とした．この受精率低値群は，採卵数が他の2群より多いことから，本来は受精不能例に分類されるべき症例であったが，採卵数の増加にともなって受精のチャンスが増加したため受精の成立をみた症例が含まれているものと考えられる．また，受精率が正常な男性不妊患者は真の意味では男性不妊では無いとも考えられ，実際にこの群の患者の配偶者11人中6人に卵管因子，2人に子宮内膜症が認められ，女性側に不妊因子が存在する頻度が高かった．結局，WHOの判定基準による男性不妊患者の約3/4に受精能力の低下が認められ，その約1/2弱は受精が成立しなかったことになる．また，男性不妊患者の特に精子奇形症の患者においては，受精したとしても流産率が高いと報告されている[8]が，当科の男性不妊患者の流産率（2/10＝20％）は，同期間の男性不妊以外の適応患者の流産率（7/31＝23％）と比較して高いものではなかった．

男性不妊患者の精子機能を評価する上で，精子濃度および精子運動率は最も一般的な指標である．しかし，体外受精を施行していると，かなり重度の乏精子症や精子無力症の患者でも受精の成立をみることがよく経験される．我々の成績でも，運動精子で最低10万/mlの症例で受精の成立が認められ，また運動率が10％以下でも，精子の運動速度が比較的速い場合は受精の成立が認められる症例が存在した．実際問題としてこれらのパラメーターでどれだけ受精の可能性を予測できるかが問題となるわけである．

精子濃度についての諸家の報告では，Alperら[9]は受精群の平均精子濃度は非受精群と比較して有意に高く（$P<0.05$），直接に受精能に関係していると報告している．またMahadevanら[10]は精子濃度1000万/ml以上では影響しないが，1000万/ml未満では有意に受精率が減少するとしている．しかし受精率と精子濃度の相関については，対象患者の基準が異なることも関連するが，今回の我々の検討結果のように否定的な報告が多い．Talbertら[11]は精子濃度と受精率との間に相関は認めなかったとしており，Cohenら[1]は運動精子が500万/ml以下でも7回の妊娠が成立しており，精子濃度は体外受精の予後にはそれほど影響しないと述べている．またJeulinら[12]は低受精率群（受精率≦33％）と高受精率群（受精率≧66％）とで精子濃度の比較を行ったが，有意差を認めなかったとしている．

運動率に関しては，Mahadevanら[10]は運動率が受精率を左右する最も重要なパラメーターであり，運動率が20％未満の場合は受精は認められなかったと述べている．しかし，今回の運動率の検討では20％未満でも受精した症例は少なくはなく，受精不能群と他の2群との間には差が認められなかった．Talbertら[11]は特に前進運動の速い精子の割合が受精能を最も予測し得るとしている．Jeulinら[12]は運動率に関して低受精率群（受精率≦33％）と高受精率群（受精率≧66％）との間に有意差を認めなかったが，頭部の振幅運動の距離を計測したところ有意差を認めたとしている．このように精子の運動を単純な運動率で評価するのは限界があると思われるが，最近ではその運動速度や運動形態に注目した指標が検討されている．

精子形態に関しては，Alperら[9]は正常形態精子の出現率は受精群，非受精群間で有意差が認められないとしており，Hirschら[13]も形態学的特徴と受精能との間に有意な相関は認められないと述べている．一方，Mahadevanら[10]は奇形率が高くなれば受精率は低下するが，60％以上の奇形率でも媒精された卵の1/3が受精したとしている．Rogersら[14]は正常形態精子の出現率と受精率は他のパラメーターよりも強い相関を示したと述べている．このように精子の形態学についての評価が報告によって異なる原因の一つは，精子の形態を評価する上での統一された基準が存在しないことも一因となっている．そこでKrugerら[7,15]は，精子頭部と頸部の詳細な形態学的基準を設定して検討を行った．その結果，精子形態は精子濃度や運動率よりも受精能を反映しており，正常形態精子の出現率は受精群と非受精群の間で明かな差（$P<0.0001$）が認められたと報告している．我々も精子奇形を既述のごとく分類し算定したところ，正常の形態を持つ精子の割合が受精不能群と正常群，及び低値群と正常群との間でそれぞれ有意差

が認められ，受精能との密接な関連性が示唆された．

今回の成績から，正常形態を有する精子の頻度10％以上を受精成立例と予測すると，sensitivityは86％ (16/21)，specificityは81％ (13/16) であった．また正常＋軽度奇形精子において，同様に40％以上を指標とすると，sensitivityは74％ (20/27)，specificityは90％ (9/10) であった．これより，正常＋軽度奇形精子40％以上という値は受精の必要条件と考えてよいと思われた．精子頭部の奇形のパターンでは，先体が明瞭でなく頭部が円形の精子(Table 2: e)が受精不能群と低値群，及び不能群と正常群との間でそれぞれ有意差が認められ，男性不妊における特徴的な精子奇形と考えられた．頸部（および中間部）奇形については，受精との関連は少ないと思われ，先体と核の形態が受精能に関連する重要な因子と思われた．

Marshら[16]は精子形態の異常はspermatogenesisの異常を反映している可能性があるとし，Abramssonら[17]は染色体異常との関連性を示唆している．またZamboni[18]は電顕でさらに詳細に精子を観察し，核におけるクロマチンの凝集不良の所見は染色体異常と相関すると述べている．電子顕微鏡を導入することによりさらに詳細な精子の形態を分析することが，受精と精子の形態学的な関係をさらに明確にするものと考えられる．

また，精液塗抹標本には精子の他に円形の細胞が見られることがあり，それらはおもに精子に成熟する以前の未分化細胞（精祖細胞，精母細胞，精子細胞）や多核白血球である．我々の成績ではこれらの細胞の出現頻度が高い精液は受精能が低いことが明らかとなり，未分化細胞10個以上/100精子，多核白血球6個以上/100精子では受精への影響が顕著と考えられた．多核白血球の出現に関しては，副性器感染症との関連が示唆され，さらに今後の検討が必要と思われる．

以上，各種精液パラメーターを比較検討した．精子濃度はあまり有用なものではなく，運動率はその運動性状まで考慮すれば有効な指標となる可能性はあると思われるが，その客観的な判定方法を検討する必要がある．その点，形態学は標本として残るために複数の人間が異なった時間に検討し得るという利点があり，また精子濃度や運動率と比較してより有効なパラメーターであった．男性不妊患者の受精能を予測する上で，形態学の検討は重要であり，今後はさらに電顕による詳細な分析が必要と思われた．

## 文　献


1) Cohen, J., Edwards, R., Fehilly, C., Fishel, S., Hewitt, J., Purdy, J., Rowland, G., Steptoe, P. and Webster, J.: In vitro fertilization: a treatment for male infertility, Fertil. Steril., 43: 422, 1985

2) Awadalla, S. G., Friedman, C., Schmidt, G., Chin, O. and Kim, M. H.: In vitro fertilization and embryo tranfer as a treatment for male factor infertility, Fertil. Steril., 47: 807, 1987

3) 井上正人，小林善宗，本田育子，淡路英雄，松山毅彦，津田明男，藤井明和：配偶子操作による不妊症の診断，治療，臨婦産，43：825，1989

4) World Health Organization: Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, p27, Singapore, Press Concern, 1980

5) Kodama, H., Kato, M., Fukuda, J., Sekine, K. and Maki, M.: Initial experience of in vitro fertilization at Akita University, Akita J. Med., 16: 631, 1989

6) Kodama, H., Kato, M., Sekine, K., Matsui, T. and Maki, M.: Efficacy of a gonadotropin-releasing hormone against treatment for in vitro fertilization, Jpn. J. Fertil. Steril., 36: 389, 1991

7) Kruger, T. F., Swanson, R. J., Acosta, A. A., Matta, J. F., Simmons, K. F. and Oehninger, S.: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization, Fertil. Steril., 49: 112, 1988

8) Oehninger, S., Swanson, R. J., Acosta, A. A., Simmons, K., Morshedi, M., Rosenwaks, Z. and Veeck, L.: Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities, Fertil. Steril., 50: 283, 1988

9) Alper, M. M., Lee, G. S., Seibel, M. M., Smith, D., Oskowitz, S. P., Ransil, B. J. and Taymor, M. L.: The relationship of semen parameters to fertilization in patients participating in a program of in vitro fertilization, J. In Vitro Fert. Embryo Transfer, 2: 217, 1985

10) Mahadevan, M. M., Trounson, A. O.: The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization, Fertil. Steril., 42: 400, 1984

11) Talbert, L. M., O'Rand, M., Hammond, M. G., Fryer, J. G., Halme, J. and Ekstrom, R. D.: Semen parameters and fertilization of human oocytes in vitro: a multivariable analysis, Fertil. Steril., 48: 270, 1987

12) Jeulin, C., Feneux, D., Serres, C., Jouannet, P., Guillet-Rosso, F., Belaisch-Allart, J., Frydman,

R. and Testart, J.: Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization, J. Reprod. Fertil., 76: 735, 1986
13) Hirsh, I., Gibbons, W. E., Lipshultz, L. I., Rossavik, K. K., Young, R. L., Roindexter, A. N., Dodson, M. G. and Findley, W. E.: In vitro fertilization in couples with male factor infertility, Fertil. Steril., 45: 659, 1986
14) Rogers, B. J., Bentwood, B. J., Van-Campen, H., Helmbrecht, G., Soderhahl, D. and Hale, R. W.: Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity, J. Androl., 4: 119, 1983
15) Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S. H., Lombard, C. J., Vand-der-Merwe, J. P., van-Zyl, J. A. and Smith, K.: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, Fertil. Steril., 46: 1118, 1986
16) Marsh, S. K., Bolton, V. N. and Braude, P. R.: The effect of morphology on the ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster oocytes, Human Reprod., 2: 499, 1987
17) Abramsson, L., Beckman, G., Duchek, M. and Nordenson, I.: Chromosomal aberration and male infertility, J. Urol., 128: 52, 1982
18) Zamboni, L.: The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality, Fertil. Steril., 48: 711, 1987

## Value of the semen characteristics for predicting fertilizing capacity in in vitro fertilization in patients with male infertility

Toshihiko Matsui, Hideya Kodama, Mitsuhiro Kato, Kazuko Sekine, Siho Takeda and Masahiro Maki

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

In vitro fertilization and embryo transfer was attempted in 41 couples whose male partners were judged as male infertility by criteria of the WHO guidelines. They were divided into three groups; 11 patients in normal fertilization rate group (F group, fertilization rate≧50%), 13 patients in low fertiliation rate group (LF group, fertilization was achieved, but fertilization rate was<50%) and 17 patients in no fertilization group (NF group). Each of semen characteristics was compared among the three groups. Consequently, there was no significant difference in the sperm concentration among the three groups, and in motility, significant difference was observed only between F and LF group. In the sperm morphology, there were significant differences between F and LF group ($p<O.O5$), and between F and NF group ($p<0.01$). When the achievement of fertilization was predicted by percentage of normal sperm morphology≧10%, the sensitivity was 86% (16/21) and the specificity was 81% (13/16). When the number of immature germ cells or neutrophils containing in the semen was high, the possibility of fertilization was reduced. We conclude that the sperm morphology is more important characteristic as compared with other semen characteristics for predicting fertilizing capacity of sperm in male infertility.

(受付:1990年9月25日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 多嚢胞性卵巣症候群の治療法に関する考察：bromocriptineは多嚢胞性卵巣症候群に有効か

# A Study of the Treatment of the Poly-Cystic Ovary Syndrome (PCOS): Whether Bromocriptine is Effective for the PCOS or not ?

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, University of Tsukuba,
Ibaraki 305, Japan(Director: Prof. Hirokazu Iwasaki)

近年，多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）の発生原因としてdopamine伝達系の異常やprolactin（PRL）の性ホルモン代謝への影響が注目され，PCOSが疑われる症例でbromocriptine（Br）が有効な場合があることが報告されている．著者らはPCOSに対するBrの有効性につき再検討した．対象は，筑波大学付属病院婦人科不妊外来においてTRHおよびLH-RH負荷試験を施行後加療した卵管因子や男性因子を認めない381例である．この対象を，TRH負荷試験により高PRL分泌群と正常群に，LH-RH負荷試験によりPCOS群と非PCOS群に分類し，この組合せによる4群に対し無作為な治療法を施し，その予後を確認した．その結果，TRH負荷試験の結果に関わらずLH-RH負荷試験がPCOS型を示す症例に対してはclomiphene＋predonisolone併用療法が有効で，BrはLH-RH負荷試験でPCOS型を示さない高PRL血症及び潜在性高PRL血症に対してのみ有効であった．つまり，BrはPCOSに対して有効ではないことが示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 578—587, 1991)

## 緒　言

多嚢胞性卵巣症候群（以下PCOSと略す）は，未だその原因・病態生理も定かでなく，診断方法も流動的で，未解明の部分の多い疾患概念である．

原因として内分泌学的失調や自己免疫疾患説があるが，結論は出ていない．診断面でも，本邦では肥満・高血圧・男性化・両側卵巣の腫脹といった症状を示すいわゆるStein-Leventhal症候群は稀であると言われており，内視鏡的診断法を除けば，内分泌学的に高LH血症，LH-RH負荷によるLH過剰反応とほぼ正常なFSH分泌動態などから診断を下しているのが現状である．治療法は，卵巣楔状切除術などの古典的な観血的方法もあるが，現在では，clomiphene citrate（以下CCと略す）やhMG等の排卵誘発剤，およびpredonisolone（以下PSLと略す）等の副腎皮質ホルモンの併用が有効とされ，多く用いられている．

近年，PCOSに対してbromocriptine(以下Brと略す)が有効であった症例の報告が相次ぎ，PCOSの原因として，dopamine系の異常やprolactin（以下PRLと略す）系との関連が注目されるようになってきた．

Brは元来高PRL血症や潜在性高PRL血症といったPRL関連卵巣機能障害に有効な薬剤である．著者らは，Brの至適投与量決定法[6]や投与期間と効果との関係[7]につき検討し発表してきたが，今回，PCOSはBrの適応疾患になりうるのか否かについて，新たに検討したので報告する．

## 対　象

対象は，筑波大学付属病院婦人科不妊外来においてTRH負荷試験およびLH-RH負荷試験を施行後加療した卵管因子や男性因子を認めない381例で，年齢分布は22歳～39歳，平均年齢は29.9歳であった．また，甲状腺機能異常や下垂体腫瘍と診断された症例は除外した．

## 検討方法

対象全例に，基礎体温の低温相中期に，原則として同一周期でTRH負荷試験とLH-RH負荷試験を施行した．当科では各負荷試験は次の様に実施していた．(本研究実施当時．現在は測定キットが変更されている．)

(1) TRH負荷試験

TRH 500$\mu$gを筋注負荷し，負荷前および負荷後15分，30分，60分に採血し，第一RI社製RIAキットにて血中PRL値を測定．

(2) LH-RH負荷試験

LH-RH 100$\mu$gを筋注負荷し，負荷前および負荷後30分に採血し，第一RI社製RIAキット(2抗体法)にて血中LHおよびFSH値を測定．

更に不妊症一般検査後，できるだけ無作為に選択した治療法によって加療し，少なくとも6ヶ月間追跡し予後を確認した．

そしてTRHおよびLH-RH各負荷試験の結果と予後の関係を検討し，どのような反応パターンの場合にどの治療法が有効だったかを判断した上で，Brが有効なのはどのような場合かを判断した．

また血中testosterone(以下Tと略す)濃度も測定し，androgen分泌状態の目安とした．

## 結　果

(1)血中PRL・LH・FSH・T値の分布

対象381例について，各負荷試験の際の血中PRL基礎値・反応頂値，血中LH・FSHの基礎値・30分値，および血中T値の数値分布を図1に示した．既に示した如く[5]，$\chi^2$適合度検定，歪度・尖度の検定により，これらの数値が対数正規分布に従うことが導かれたため，本研究において各数値の統計学的検定は，対数変換をした後に実施した．

ちなみに各数値の95％信頼区間は，

PRL基礎値：　7.1～　37.5 ng/ml
PRL頂値　：48.5～252.7 ng/ml
LH基礎値　：　7.4～　47.0 mIU/ml
LH30分値　：20.5～319.6 mIU/ml
FSH基礎値：　7.3～　21.8 mIU/ml
FSH30分値：11.8～　51.3 mIU/ml
T値　　：　0.3～　1.6 ng/ml

であった．

(2)各負荷試験による対象の分類

対象381例を次の2組の基準により4群に分類した．

① TRH負荷試験による分類基準

［Ⅰ群］血中PRL基礎値20ng/ml以上ないし血中PRL頂値100ng/ml以上

［Ⅱ群］Ⅰ群の基準を満たさないもの

② LH-RH負荷試験による分類基準

［A群］血中LH基礎値30mIU/ml以上ないし血中LH30分値150mIU/ml以上，かつ血中LH基礎値/FSH基礎値比2以上

［B群］A群の基準を満たさないもの

Ⅰ群とはPRL値の高い，いわゆるPRL関連卵巣機能障害型，つまり高PRL型の反応パターンであり，A群とはいわゆるPCOS型反応パターンである．

これらの基準により分類した結果を表1に示した．$\chi^2$検定により，ⅠA群，ⅠB群，ⅡA群，ⅡB群の出現比率に一定の傾向はないことが判明した．このことは，高PRL型の反応とPCOS型の反応は独立して発生している可能性を示唆している．

一方，図2に各群のT値の分布を示したが，PCOS型反応を示した群では，T値の分布は有意に高かった．つまり，PCOS型反応を示す症例では，androgen過剰分泌が生じており，PCOS型反応をもって，PCOSの診断がつく可能性が高いことが確認された．

(3)各症例で選択された治療法

(2)で分類した各群ごとに実施された治療法を表2に示した．CC単独療法やCC・PSL併用療法，Br単独療法など延べ12の治療法が採用された．表2に示すごとく，各治療法は均等に分散し，偏り無く選択されていたと評価できる．

(4)各群・各治療法間の負荷試験の結果の比較

各群において治療法の優劣を見るに当たっては，異なる治療を選択した症例間でデータに偏位があってはならない．つまり，同一基準で分類された症例であっても治療法Aを選択した症例と治療法Bを選

表1　対象内訳

| | A　群 | B　群 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| Ⅰ群 | 70(18.4%) | 187(49.1%) | 257(67.5%) |
| Ⅱ群 | 29( 7.6%) | 95(24.9%) | 124(32.5%) |
| 合計 | 99(26.0%) | 282(74.0%) | 381( 100%) |

(not significant)

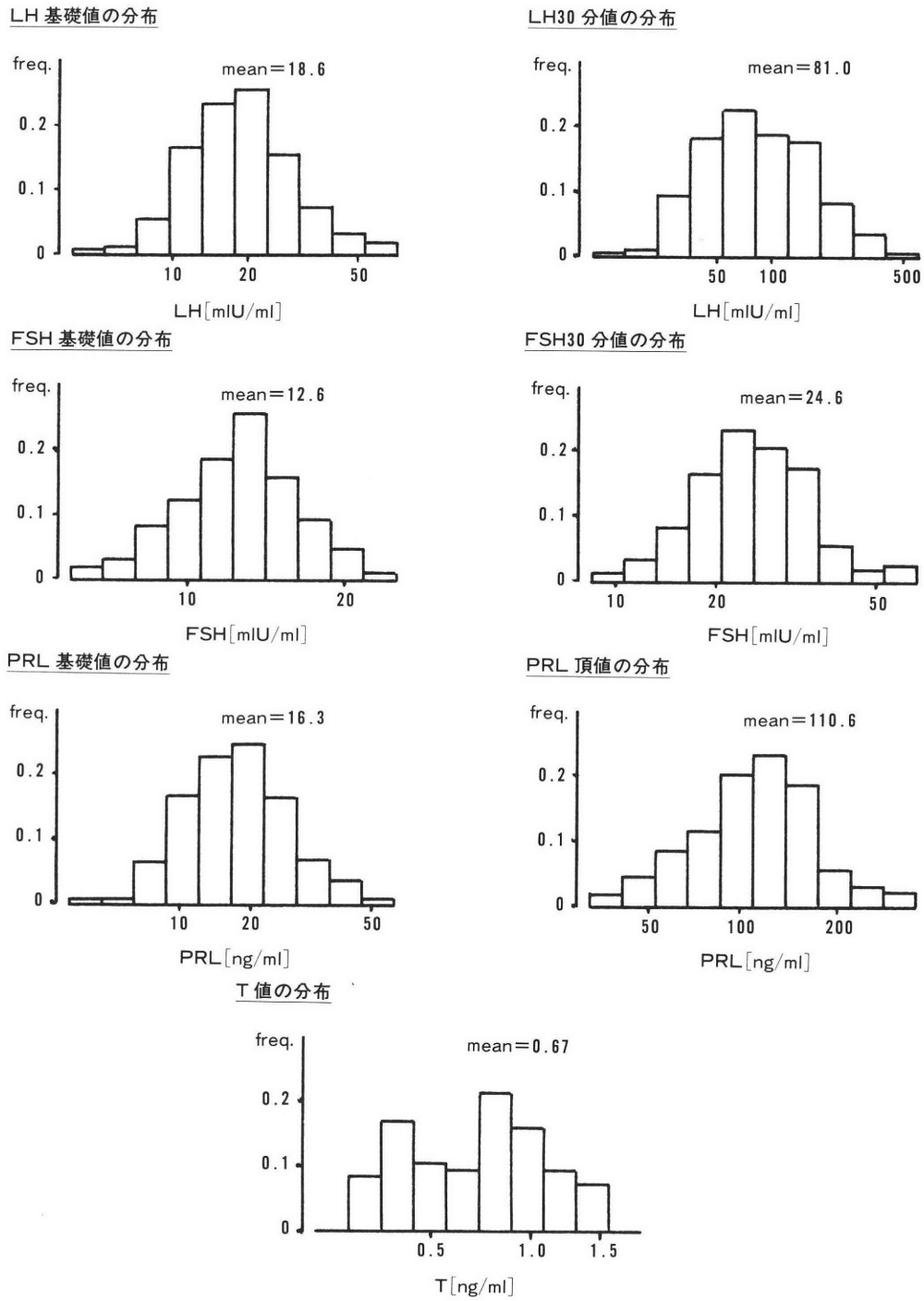



図1　各血中ホルモン値の数値分布

択した症例間にデータの偏位があるなら，予後によってAとBに優劣を付けられない．同一と判断できる症例に対して，片や治療法Aを，片や治療法Bを選択した結果，Aを選択した症例の予後が優れていればAはBより優ると初めて言える訳である．

そこで，図3・4に各群で，同一治療法を選択した症例を1つの治療群としてまとめ，各治療群毎のTRHおよびLH-RH負荷試験の結果を図示した．そ

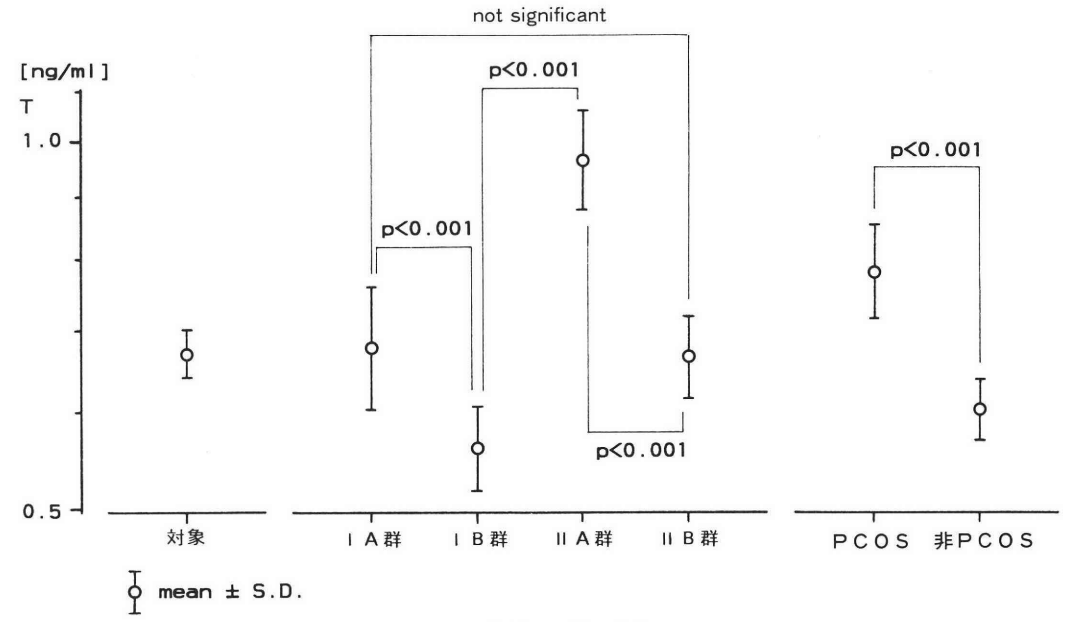



図2　各群のT値の分布

表2　各群で施行した治療法

| | I A 群 | I B 群 | II A 群 | II B 群 | 合　計 |
|---|---|---|---|---|---|
| 単独療法 | | | | | |
| Clomiphene Citrate [CC] | 6( 8.6) | 28(15.0) | 5(17.2) | 25(26.3) | 64(16.8) |
| hMG+hCG [hMG] | 6( 8.6) | 2( 1.1) | 2( 6.9) | 5( 5.3) | 15( 3.9) |
| Bromocriptine [Br] | 14(20.0) | 79(42.2) | 5(17.2) | 9( 9.5) | 107(28.1) |
| Predonisolone [PSL] | 1( 1.4) | 1( 0.5) | 1( 3.4) | | 3( 0.8) |
| 併用療法 | | | | | |
| CC+hMG | 2( 2.9) | | | 1( 1.1) | 3( 0.8) |
| CC+Br | 5( 7.1) | 19(10.2) | | 6( 6.3) | 30( 7.9) |
| CC+PSL | 5( 7.1) | | 9(31.0) | 4( 4.2) | 18( 4.7) |
| hMG+Br | 1( 1.4) | 1( 0.5) | | 1( 1.1) | 3( 0.8) |
| CC+hMG+Br | | | | 1( 1.1) | 1( 0.3) |
| CC+hMG+PSL | 2( 2.9) | | 1( 3.4) | | 3( 0.8) |
| CC+Br+PSL | 9(12.9) | 4( 2.1) | 1( 3.4) | 1( 1.1) | 15( 3.9) |
| その他 | | | | | |
| | 19(27.1) | 53(28.3) | 5(17.2) | 42(44.2) | 119(31.2) |
| | 70( 100) | 187( 100) | 29( 100) | 95( 100) | 381( 100) |

単位：例数（%）

の結果，各治療群間に負荷試験の結果の差はないことが判明した（検定方法：分散分析法）．すなわち，予後の比較により，各治療法の優劣が類推できると考えられた．

⑸各群・各治療法の予後の比較

表3・4に各群・各治療法の排卵および妊娠成立に関する予後を示した．各群別に分けると症例数の少ない治療法もかなりあるが，$\chi^2$検定及びFisherの直接確率計算法により次の結果が導かれた．

①ⅠA群：CC・PSL併用療法は，Br単独療法に比し，有意に妊娠率が高かった（$P<0.005$）．また，Br非使用群は，Br使用群に比し，有意に妊娠率が高かった（$P<0.05$）．

②ⅠB群：Br単独療法は，hMG療法，CC単独療

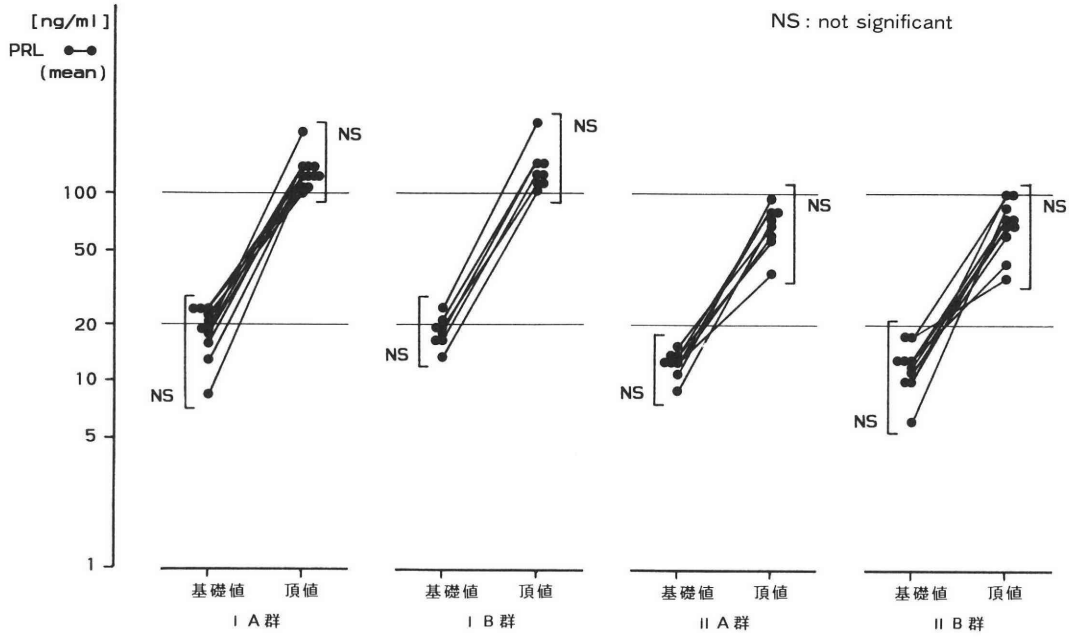



図3　各群における治療法毎のTRH負荷試験の結果

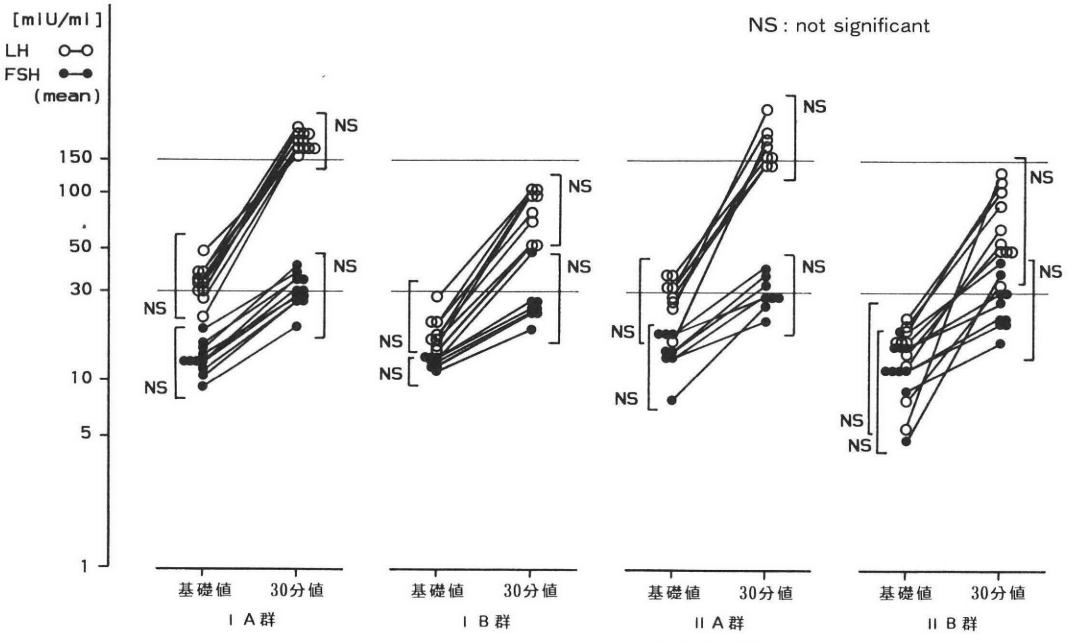



図4　各群における治療法毎のLH-RH負荷試験の結果

法に比し，有意に排卵率が高かった（$p<0.05$, $p<0.01$）．また，Br使用群は，Br非使用群に比し，排卵率が高い傾向があった．

③II A群：Br非使用群は，Br使用群に比し，妊娠率が高い傾向にあった．

④II B群：治療法の差異と予後に一定の傾向は認められなかった．

すなわち，まとめると，次の様になる．

(a) PCOS症例では，TRH負荷試験の結果に関わらず，Br投与は，排卵率においても，妊娠率においても，有効ではなかった．

(b) PCOS症例では，TRH負荷試験の結果に関わら

表3　各群における各治療法の成績

| | I A 群 | | I B 群 | | II A 群 | | II B 群 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CC | 6 | 4(66.7) | 28 | 23(82.1)† | 5 | 2(40.0) | 25 | 17(68.0) |
| | | 3(50.0) | | 11(39.3) | | 2(40.0) | | 7(28.0) |
| hMG | 6 | 5(83.3) | 2 | 1(50.0)* | 2 | 1(50.0) | 5 | 4(80.0) |
| | | 3(50.0) | | 1(50.0) | | 0( 0.0) | | 2(40.0) |
| Br | 14 | 12(85.7) | 79 | 78(98.7)*† | 5 | 4(80.0) | 9 | 7(77.8) |
| | | 2(14.3)‡ | | 38(48.1) | | 1(20.0) | | 1(11.1) |
| PSL | 1 | 1( 100) | 1 | 1( 100) | 1 | 1( 100) | | |
| | | 0( 0.0) | | 1( 100) | | 1( 100) | | |
| CC+hMG | 2 | 2( 100) | | | | | 1 | 1( 100) |
| | | 1(50.0) | | | | | | 1( 100) |
| CC+Br | 5 | 5( 100) | 19 | 18(94.7) | | | 6 | 5(83.3) |
| | | 2(40.0) | | 7(36.8) | | | | 4(66.7) |
| CC+PSL | 5 | 5( 100) | | | 9 | 8(88.9) | 4 | 3(75.0) |
| | | 5( 100)‡ | | | | 7(77.8) | | 2(50.0) |
| hMG+Br | 1 | 1( 100) | 1 | 1( 100) | | | 1 | 1( 100) |
| | | 1( 100) | | 0( 0.0) | | | | 1( 100) |
| CC+hMG+Br | | | | | | | 1 | 0( 0.0) |
| | | | | | | | | 0( 0.0) |
| CC+hMG+PSL | 2 | 2( 100) | | | 1 | 1( 100) | | |
| | | 2( 100) | | | | 1( 100) | | |
| CC+Br+PSL | 9 | 8(88.9) | 4 | 3(75.0) | 1 | 1( 100) | 1 | 1( 100) |
| | | 3(33.3) | | 1(25.0) | | 0( 0.0) | | 1( 100) |
| 合　計 | 70 | 61(87.1) | 187 | 175(93.6) | 29 | 23(79.3) | 95 | 76(80.0) |
| | | 31(44.3) | | 82(43.9) | | 15(51.7) | | 38(80.0) |

(*－*…$p<0.05$　†－†…$p<0.01$　‡－‡…$p<0.005$)

表記：症例数　排卵成功例数(排卵率)

妊娠成立例数(妊娠率)

表4　各群における Bromocriptine 使用・非使用と予後の関係

| | I A 群 | | I B 群 | | II A 群 | | II B 群 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Br 使　用 | 29 | 26(90.0) | 103 | 100(97.1) | 6 | 5(83.3) | 18 | 14(77.8) |
| | | 8(27.6)* | | 46(44.7) | | 1(16.7)☆ | | 7(38.9) |
| Br 非使用 | 41 | 35(85.4) | 84 | 75(89.3) | 23 | 18(78.3) | 77 | 62(80.5) |
| | | 23(56.1)* | | 36(42.9) | | 14(60.9)☆ | | 31(40.3) |
| 合　計 | 70 | 61(87.1) | 187 | 175(93.6) | 29 | 23(79.3) | 95 | 76(80.0) |
| | | 31(44.3) | | 82(43.9) | | 15(51.7) | | 38(40.0) |

(*－*…$p<0.05$　☆－☆…統計学的に有意ではないが差の傾向がある。)

表記：症例数　排卵成功例数(排卵率)

妊娠成立例数(妊娠率)

ず，CC・PSL 併用療法が有効であった．

(c)潜在性のものを含めた高 PRL 血症では，LH-RH 負荷試験で PCOS 型反応を示さない場合，Br が有効であった．

(d) PCOS でも高 PRL 血症でもない症例においては，治療法間に，一定の傾向を見出せなかった．

## 考　察

PCOSにBrが有効であるという報告がある一方で，実際にPCOSを疑う症例にBrを投与したが奏効しなかったという印象を持つ臨床医は意外に多い．著者らも例外ではなく，PCOSは本当にBrの適応の一つになるのか，という疑問を常に抱いていた．

またBrが有効であるとするなら，高PRL血症や，潜在性高PRL血症とPCOSに関連があるということなのか，ひいてはPCOSの病因を考える上でdopamine系の異常が重要な鍵となるのかという疑問も抱いていた．

それらの答えを得るべく今回の研究を計画した．すなわちLH-RH負荷試験でPCOS型反応を示すか否か，TRH負荷試験で高PRL型反応を示すか否かという結果と，できるかぎり無作為に実施した治療法の間で，一定の傾向が得られれば，それが解明の糸口になるのではないかと考えたのである．

もちろんLH-RH負荷試験でPCOS型反応を示すからといって，PCOSの診断が付くわけではない．あくまでも疑診の範囲内であり，確定診断を下すには卵巣の組織所見を必要とするのが一般的な考え方である．しかし，臨床的には内分泌学的にPCOSを診断し治療しているのが一般的であり，今回の研究においても，LH-RH負荷試験でPCOS型反応を示す場合，それをPCOSと考えることとした．木下らは，単独高LH血性排卵障害という呼称を用いることによりPCOSの概念や診断法を整理する試みを行なっている[1]．木下らの言うように，PCOSという呼称自体に，概念を混乱させている種があることは否定できない．森[8]を始めとして，PCOSという疾患概念を整理しようとする試みは数多くなされているが，診断法を始めとして，未だに混乱は続いており，様々な問題を抱えていることは，今更言及するまでもない．

BrがPCOSに有効であるとする研究者がその理由として唱えている説の一つに，PCOSは中枢のdopamine機構の失調に原因がある，とする説がある[2,3,9,12~14,16,18~20,23]．視床下部におけるdopamine欠乏が，LH-RH系を介してLH過剰分泌を促すのだとし，Brを投与し，dopamine欠乏を補うことにより，病態が改善するのだという．この説を支持する研究者の多くは，LH-RH系に関与するdopamine系は，PRL分泌系に関与する系とは異なる機構であると考えており[9,13,14,20]，PRL濃度に関わらず，全てのPCOSにBrは有効であるとしている．

一方，PRLが副腎皮質でのdehydroepiandrosterone sulfate（以下DHEASと略す）合成に関与しているため，BrはPRL分泌抑制によってDHEAS合成を抑制し，PCOSに有効に作用するという説もある[12,21]．この説においても，PRL濃度に関わらずBrは有効であるとされている．

これに対し，PCOSには，Brが有効である群と，有効とはいえない群の2群に分けられると唱えている研究者もいる．

その中の一つの説に，BrはPRL濃度が高いPCOSに有効であるとする説がある[17]．この説ではLH-RH系とPRL分泌系に関与するdopamine機構は同一であり，高PRL血症を伴うPCOSは視床下部におけるdopamine機構の失調が原因にあるので，Brは有効であると説明している．この考え方からすると，PCOSは視床下部のdopamine機構の失調を原因とするものとそうでないものに分かれることになる．

一方，DHEAS濃度が低い症例にBrが有効であるとする説がある[4,22]．DHEAS濃度が低いPCOSとは，androstenedione濃度のみが高い，つまり卵巣優位のandrogen過剰分泌が生じていると考えられているPCOSである．（androgenの過剰分泌が副腎皮質優位か卵巣優位かで，PCOSを副腎型と卵巣型に分類する試みもなされている[4]．）この卵巣型PCOSにBrが有効であるとする説では，Brの作用点は，中枢ではなく，卵巣に直接作用し，androgen過剰分泌を抑制すると説明している[4]．しかし前述したように，副腎型PCOSにBrを投与するとPRLと同時にDHEAS濃度も低下するという報告[12,21]もあり，不明の点は多い．

もちろん，BrはPCOSに有効とは言えないとしている研究者も存在する[10,11,15]．その中でも，Buvat et al.[10]はBrがPCOSに有効であるとする報告では，実験系や評価計画の立案そのものに問題があり，実際に二重盲検試験等により追試してみると，Brは何の影響も与えていなかったと報告している．

ではここで，今回の著者らの結果について考察する．研究方法や成績の評価に関しては，前述した様に慎重に検討した上で決定しており，完璧とまでは行かないかも知れないが，まず問題はなかったと考えられる．評価という点で付け加えるなら，今回の研究では，「有効」という判定を，排卵誘発成功ということだけで無く，妊娠成立まで確認して下した．これはBrの連用が，本来の卵巣機能が必要とする生理的PRL濃度をも抑制し，かえって逆に妊娠を阻害する可能性があるからである[7]．排卵誘発は成功するが妊娠はしなくなる，と言うことでは，不妊症臨床では有効な薬剤とは言えず，妊娠成立をもって有効とした今回の判定は，他のPCOS治療論と比較して，

本研究の特徴であると言える.

その上で今回得た結果は, PCOS 症例では TRH 負荷試験の結果に関わらず Br は有効ではなく, CC・PSL 併用療法が有効であった, ということと, Br は, LH-RH 負荷試験で PCOS 型反応を示さない高 PRL 状態に対して有効であった, ということであった.

すなわち, TRH 負荷試験の結果に関わらず PCOS 症例に対して Br が有効ではなかったということから以下のことが考えられた.

① LH-RH 系と PRL 分泌系に関与する dopamine 機構が一致するか否かを別にして, PCOS は視床下部の dopamine 機構の失調により引き起こされるものではないだろう.

②卵巣優位な androgen 過剰分泌を示す PCOS, すなわち卵巣型 PCOS に対して Br が有効であると仮定しても, 今回の著者らの成績では大部分の PCOS 症例に対して Br が有効ではなかった. この結果は, 卵巣型 PCOS は PCOS 全体のごく一部でしかない可能性を示唆する.

③ Br が DHEAS 濃度を低下させ, 副腎型の PCOS にも Br が有効であると仮定しても, やはり今回の著者らの成績では, 大部分の PCOS 症例に対して Br は有効ではなかった.

この様に, PCOS を卵巣型, 副腎型いずれと考えても Br は有効ではなかったと結論せざるを得ない.

次に, TRH 負荷試験の結果に関わらず PCOS 症例に対しては CC・PSL 併用療法が有効であるということからは,

① PSL は, 副腎皮質の androgen の過剰分泌を抑制することで, 卵巣において卵胞の閉鎖を防いだり, 過剰な androgen が惹起した estrone/estradiol 合成比の崩壊を正常化することなどから排卵を誘発すると考えられている. したがって, PRL 濃度に関わらず, PCOS 型反応を呈する症例で PSL 併用が有効であるということは, PCOS の病態の中心が副腎皮質における androgen 過剰分泌にあるためと考えられる. この考えは, 副腎型 PCOS には PSL が有効であるとする説[4]に一致する.

②高 PRL 状態を伴う PCOS 症例に対して CC・PSL 併用療法により PRL 過剰分泌が抑制されることが証明できれば, PCOS 症例での高 PRL 状態は, PCOS の病態によって2次的に発来している可能性を示唆できるが, 今回の研究では, その点に絞ったデータを集積していないので私見の域を出ない.

③ PSL が卵巣での androgen 過剰分泌を抑制する可能性は現状で否定し切れない. したがって, PSL は卵巣型の PCOS にも有効である可能性もあるが, 今回の研究では androgen に関しては T のみの計測でしかなく, この点についても, 現時点では言及できない.

このように考えてくると, PCOS の病態に関する次のような推論を導くことができる. すなわち, 何らかの誘因によって副腎皮質で androgen の過剰分泌が起きる. 過剰に分泌された androgen は, 卵巣で卵胞の閉鎖・多嚢胞化や白膜の厚化を惹起すると共に, 性 steroid 代謝系で estrone/estradiol 合成比を崩す. 崩れた estrogen 比は feedback を介して中枢へ作用し, LH やひいては LH-RH の過剰分泌を惹起する. 過剰に分泌された LH-RH は, これを抑制する作用を持つ視床下部の dopamine 機構を刺激する. その結果, 内因性 dopamine の欠乏が生じると, 高 PRL 状態を招くことがある. すなわち, PCOS の病因として, 副腎説に注目したい. しかし, 今回の結果でも, PCOS 症例の中に Br が有効であった症例が皆無ではなかった（表3および表4参照）ことを考えれば, Br が卵巣型 PCOS には有効であるという説を無視できず, 今推論した副腎型 PCOS と別の機序で発症する PCOS が存在する可能性も否定はできない.

一方, 今回の研究結果で, Br が有効であると統計学的に言えるのが PCOS 型反応を示さない高 PRL 状態のみということからは,

① Br は潜在性のものを含めた高 PRL 血症に対して有効である.

② 1次的に発来した高 PRL 状態は, 副腎皮質を介す事なく排卵障害などの病態を発現する.

といった, 従来の考えを確認することができた.

今回の研究では DHEAS 濃度について検討していないので, 対象とした症例中に卵巣型 PCOS と副腎型 PCOS がどのような比率で存在したのかは不明であり, CC・PSL 併用療法が有効であった PCOS 症例が本当に副腎優位な androgen 過剰分泌を伴った症例であったか否かは確認できない. 現在, DHEAS 濃度やそのほかの androgen 濃度にも着目して追試中であり, 本研究で導いたいくつかの推論に対する答えや, PCOS 本態に関する知見を得る努力をしているところである.

## まとめ

(1)本研究は, データを公正に扱い, 評価に偏りの無いものと考えられる.

(2)高 PRL 血症や潜在性高 PRL 血症に対しては Br

は有効である.

(3)しかし，PCOSに対しては，Brは，その効果を発揮できず，有効とは言えない.

(4) PCOSの原因を視床下部のdopamine機構の失調に求める考えには，疑問の余地がある.

(5) PCOSに対しては，CC・PSL併用療法が極めて有効であり，PCOSのほとんどは，副腎皮質におけるandrogen過剰分泌が病態の中心にあることが予想された.この副腎皮質での病態が2次的に高PRL状態を発来する可能性があることも示唆された.

(6)卵巣でのandrogen過剰分泌が病態の中心である卵巣型PCOSに対してBrが有効である可能性はあるが，全PCOSに占める卵巣型PCOSの割合は低いことが予想された.

(7) PCOSに対する治療法としては，妊娠成立の目標からも，CC・PSL併用療法が第1選択であると考えられた.

(本論文の骨子は，第33回日本不妊学会総会，および，第41回日本産科婦人科学会総会において発表した.)

## 文　献


1) 木下俊彦，武谷雄二，水野正彦：単独高LH血性排卵障害例の臨床的特徴，産と婦，52：1349，1985

2) 久保田俊郎，鎌田周作，生山　博，都築浩雄，西望，斎藤　幹：Clomiphene無効の多嚢胞性卵巣症候群におけるBromocriptine-Clomiphene-Gonadotropin併用療法の検討，日産婦誌，40：323，1988

3) 黄　宏駿，石丸忠之，山辺　徹：多嚢胞性卵巣症候群の内分泌環境に及ぼすbromocriptineの影響について，日内分泌誌，64：265，1988

4) 武谷雄二，石川弘子，木下俊彦，水野正彦：多嚢胞性卵巣の分類とbromocriptineの有用性の検討，日産婦誌，38：1697，1986

5) 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

6) 辻　泰二，西田正人，岩崎寛和：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，日不妊誌，35：487，1990

7) 辻　泰二，西田正人，久保武士，岩崎寛和：Bromocriptine療法における投与期間と効果に関する検討，日不妊誌，36：372，1991

8) 森　崇英：多嚢胞性卵巣症候群－概念の整理と最近の治療，日内分泌誌，63：1449，1987

9) 森　宏之，合阪幸三，松岡　良，木川源則：高LH・正プロラクチン性排卵障害に対するBromocriptineの効果，日内分泌誌，61：48，1985

10) Buvat, J., Buvat-Herbaut, M., Marcolin, G., Racadot, A., Fourlinnie, J. C., Beuscart, R., Fossati, P.: A double blind controlled study of the hormonal and clinical effects of bromocriptine in the polycystic ovary syndrome, J. Clin. Endocrinol. Metab., 63: 119, 1986

11) Chapman, A. J., Wilson, M. D., Obhrai, M., Sawers, R. S., Lynch, S. S., Royston, J. P., Clayton, R. N.: Effect of bromocriptine on LH pulsatility in the polycystic ovary syndrome, Clin. Endocrinology, 27: 571, 1987

12) El-Tabbakh, G. H., Loutfi, I. A., Azab, I., Rahman, H. A., Aleem, F. A., Southern, A. L.: A controlled clinical trial for the effect of bromocriptine on the adrenal contribution in polycystic ovarian disease, Acta Endocrin., 114: 161, 1987

13) El-Tabbakh, G. H., Loutfi, I. A., Azab, I., Rahman, H. A., Southern, A. L., Aleem, F. A.: Bromocriptine in polycystic ovarian disease: A controlled clinical trial, Obst. Gynec., 71: 301, 1988

14) Falaschi, P., Rocco, A., del-Pozo, E.: Inhibitory effect of bromocriptine treatment on luteinizing hormone secretion in polycystic ovary syndrome, J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 348, 1986

15) Murdoch, A. P., McClean, K. G., Watson, M. J., Dunlop, W., Taylor, P. K.: Treatment of hirsutism in polycystic ovary syndrome with bromocriptine, British J. Obst. Gynec., 94: 358, 1987

16) Pehrson, J. J., Vaitukaitis, J.: Bromocriptine, sex steroid metabolism, and menstrual patterns in the polycystic ovary syndrome, Ann. Internal Med., 105: 129, 1986

17) Polson, D. W., Mason, H. D., Franks, S.: Bromocriptine treatment of women with clomiphene-resistant polycystic ovary syndrome, Clin. Endocrinol., 26: 197, 1987

18) Prelevic, G. M., Würzburger, M. I., Peric, L. A.: Acute effects of L-dopa and bromocriptine on serum PRL, LH and FSH levels in patients with hyperprolactinemic and normoprolactinemic polycystic ovary syndrome, J. Endocrinnol. Invest., 10: 389, 1987

19) Seibel, M. M., Oskowitz, S., Kamrava, M., Taymor, M. L.: Bromocriptine response in normoprolactinemic patients with polycystic ovary disease: A preliminary report, Obst. Gynec., 64: 213, 1984

20) Spruce, B. A., Kendall-Taylor, P., Dunlop, W., Anderson, A. J., Watson, M. J., Cook, D. B., Gray, C.: The effect of bromocriptine in the polycystic ovary syndrome, Clin. Endocrin., 20: 481, 1984

21) Steingold, K. A., Lobo, R. A., Judd, H. L., Lu, J.

K. H., Chang, R. J.: The effect of bromocriptine on gonadtropin and steroid secretion in polycystic ovarian disease, J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 1048, 1986
22) Suginami, H., Kuroda, G., Yano, K., Kitagawa, H., Matsuura, S.: Bromocriptine treatment in anovulation with decreased ratio of follicle stimulating hormone to luteinizing hormone and with hyperandrogenism, Endocrinol. Japon., 35: 47, 1988
23) Surico, N., Porcelli, A., Crivello, T., Tavassoli, K., Ferraris, G.: Effects of bromocriptine treatment in polycystic ovary syndrome, Pan. Med., 29: 313, 1987

## A Study of the Treatment of the Poly-Cystic Ovary Syndrome (PCOS): Whether Bromocriptine is Effective for the PCOS or not ?

Taiji Tsuji, Masato Nishida
and Hirokazu Iwasaki

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

Some investigators had reported that bromocriptine was a promising drug in the treatment of the poly-cystic ovary syndrome (PCOS). This study examined whether or not the PCOS was really one of the best indications for bromocriptine therapy. The study included 381 patients in the reproductive age who were treated for ovulatory disorders in the sterility clinic of the Tsukuba University Hospital. These patients were divided into 4 groups as follows: Group1A had both the hyperprolactinemia (including the occult one) and the PCOS, Group1B had the hyperprolactinemia without the PCOS, Group2A had the PCOS without the hyperprolactinemia, and Group2B had neither the hyperprolactinemia nor the PCOS. The patients in each group were treated over a minimum period of 6 menstrual cycles with a method which was randomly chosen from the following 12 methods: clomiphene citrate (CC) only, CC and predonisolone (P), CC and hMG-hCG, CC and bromocriptine (B), CC and P and B, CC and hMG-hCG and B, P only, P and B, hMG-hCG, only, hMG-hCG and B, B only and others. The effectiveness was measured by the success of ovulation and pregnancy. The results showed that in Group1A and -2A, the "CC and P" therapy was more effective than the "B only" therapy, and any tharapy which included B was not effective. In Group1B, the "B only" therapy was the most effective and generally the therapies which included B were more effective than therapies which did not include B. This suggests that bromocriptine is effective for the hyperprolactinemia, but not effective for the PCOS. The authors conclude that the PCOS is not an adequate indication for bromocriptine therapy.

(受付:1990年10月8日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# Polycystic Ovary Syndromeに対するBuserelin-hMG-hCG療法の臨床効果について

# Buserelin-hMG-hCG Therapy for Ovulation Induction in Infertile Women with Polycystic Ovary Syndrome

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科
竹田 省 Satoru TAKEDA
飯野好明 Yoshiaki IINOH
木下勝之 Katuyuki KINOSHITA
坂元正一 Shouichi SAKAMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Saitama Medical Center, Saitama Medical School,
Saitama 350, Japan

PCOと診断された不妊症患者11例21周期に対して，buserelin-hMG-hCG療法を施行した。Buserelin投与法は1200μg/日でshort protocol 7周期，long protocol 14周期であった．以下に成績を示す．

1）排卵率は95.2％であり，OHSSは33.3％に認められた。妊娠は6例（54.5％）であり、6クール以内に妊娠に至った（short protocol 2例，long protocol 4例）．流産例はなく，多胎は3例であった．

2）同一症例でのhMG-hCG療法との比較ではhMG総投与量，hCG投与日数，OHSS発生頻度には差は認められなかった．

3）long protocolではbuserelin投与により血中FSH, LH, testosterone, free testosterone値は有意に低下した．

以上よりbuserelin-hMG-hCG療法はPCO症例のホルモン環境を改善し，不妊症治療に有用と考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 588—594, 1991)

## 緒　言

Polycystic Ovary Syndrome (PCO)に対する排卵誘発法はclomipheneが第一選択薬であるが，clomiphene抵抗性のことも多く，この場合hMG-hCG療法が試みられてきた．しかし，PCOに対するhMG-hCG療法は排卵率の割に妊娠率が低いこと，早期黄体化が認められること，さらに卵巣過剰刺激症候群（OHSS）や多胎が多いなど依然問題点も多い。

近年，PCO症例に特徴的な高LH状態，高アンドロゲン血症をLH-RH analogueで是正した上で排卵誘発を行う方法が試みられ，今まで以上に良い成績が報告[1,3]されはじめた．そこで，今回その一つであるbuserelin-hMG-hCG療法でPCO症例の排卵誘発を行い，血中各種ホルモン動態の変化と臨床効果を検討したので報告する．

## 対象および方法

1989年1月から1990年9月までに当科でPCOと診断された不妊症患者11例21周期に対してbuserelin-hMG-hCG療法を施行した．年齢は23～39歳であり，いずれもclomiphene抵抗性の排卵障害もしくはhMG-hCG療法でも妊娠しない症例である．PCOの診断は，1）第Ⅰ度無月経または持続性無排

卵周期症，2）LH-RH testでLHのhigh-well response (45mIU/ml以上となるもの)，FSHの正常パターン，3）LH基礎値8.1mIU/ml以上（旧LH，FSH標準品での測定値に換算するとLH基礎値30mIU/ml以上，LH/FSH比2.5以上を満たすもの）の3条件を満たすものとした．その他total，free-testosterone (T, Free-T)値，Androstenedione ($\Delta^4$A)値，血中$E_1/E_2$比が1.0以上，超音波断層所見などを参考にした．

投与方法は1）Short protocol（7周期）：月経初日よりbuserelin (Suprecur®, Hoechst Japan) 1200$\mu$g/日をhCG投与前日まで使用し，hMG(パーゴナル®，75単位／アンプル，帝国臓器)を月経3～5日より連日投与した(図1)．Short protocolの適用は，hMG-hCG療法のpoor responderもしくはhMGの投与量が225～300IU/日以上を要する症例とした．

2）Long protocol（14周期）：月経初日よりbuserelin 1200$\mu$g/日を2～3週間使用し，hMGをその後併用した(図1)．Buserelinはhcg投与前日まで使用した．Short protocolとlong protocolの両者を試みた症例が1例あった．いずれの症例もhCGの切り換えは経腟超音波断層検査にて最大卵胞径が19mmになったところで行った．hCGは5,000～10,000単位使用し，3日後，7日後に3,000～5,000単位追加投与した．Long protocol症例のみbuserelin投与前，hMG開始時，hCG投与前に採血し，血中各種ホルモンを測定した．血中LH，FSH，prolactin (PRL), T, Free-T,$\Delta^4$A, estrone ($E_1$)，estradiol($E_2$), dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S), 17$\alpha$-hydroxyprogesterone (17-OH-P)は各測定キットを用いて行った．OHSSの重症度はWHOの診断基準を用いた．有意差検定はstudent's $t$ テスト，$\chi^2$検定を用いた．

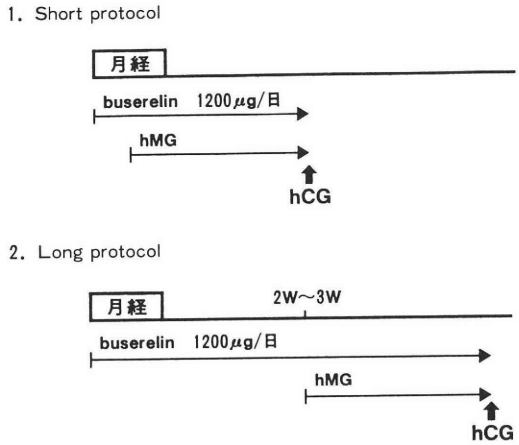



図1　投与方法

## 成　績

1．不妊外来受診時所見およびLH-RH test，各種ホルモン検査値

症例の平均年齢，平均体重はそれぞれ29.6歳，54.3kgであった．11例中9例は原発性不妊症であり，2例は続発性不妊症であった．平均診療期間は3.5年であった．治療開始前のLH-RH testのLH値(mean±SE)は前18.6±2.4mIU/ml，15分後107.6±22.0mIU/ml，30分後165.8±29.3mIU/mlであり，FSH, PRL値(mean±SE)は各々，前8.7±0.9mIU/ml，15.2±5.6ng/ml，15分後16.4±3.1mIU/ml，63.0±9.4ng/ml，30分後20.0±3.1mIU/ml，51.6±8.1ng/mlであった．T値（正常0.9ng/ml以下）は1.2±0.1ng/ml，Free-T値（正常値2.0pg/ml）は2.1±0.3pg/mlであった．

2．臨床成績

排卵率は95.2％でありlong protocolに1周期排卵しない症例が認められた．黄体機能不全は5.0％でshort protocolに1周期認められた．II°以上のOHSSは7症例63.6％に，周期別では7周期33.3％に認められた．7周期中5周期は妊娠症例であった．OHSSの発生にはprotocolの違いは認められなかった．

妊娠例は6例(54.5％)であり，short protocol 2例，long protocol 4例であった．男性不妊合併症例2例を除くと妊娠率は66.7％であり，6クール以内に全例妊娠に至った．流産例はなかったが，多胎は3例(50％)であり，short protocolの双胎1例，品胎1例およびlong protocolの品胎1例であった(表1)．

3．同一症例でのhMG-hCG療法との比較

同一症例においてhMG-hCG療法とbuserelin-hMG-hCG療法を施行した6症例において，hMG総投与量とhCG投与日数，OHSS発生頻度を比較してみると，hMG総投与量，hMG投与日数とも両治療群間に差は認められなかった．OHSS発生頻度はhMG群では12.5％でありbuserelin-hMG群では有意差はないが28.3％と高い傾向にあった．しかし，buserelin-hMG群のOHSS 4例中3例は妊娠周期にOHSSとなった（表2）．

4．妊娠症例の検討

6例の妊娠例につき検討すると先行治療はhMG-hCG療法を施行しているものが5例認められ，いずれも妊娠には至っていない．

Buserelin-hMG-hCG 療法 6 cycle 目 (Long protocol) で妊娠に至った症例 6 を除き，いずれも 1～2 cycle 目の早期に妊娠に至っている．Short protocol の妊娠は 2 例，long protocol の妊娠は 4 例であった．6 例中 5 例に 2 度以上の OHSS を認めた．多胎は 50％（3／6 例）に認められ，品胎 2 例，双胎 1 例であった．Short protocol で双胎，品胎となった 2 例はいずれも hMG 平均アンプル数が 33A, 28A と大量を要した症例であった（表 3）．

5．Buserelin-hMG-hCG 療法 (Long protocol) における各種ホルモン値の推移

Long protocol における buserelin 投与開始時，hMG 投与開始時，hCG 投与時の LH 値 (mean±SD) は各々7.5±4.4mIU/ml, 2.1±1.1 mIU/ml, 1.5±1.1mIU/ml と buserelin 投与前値に対して hMG 投与開始時，hCG 投与時の LH 値は有意に低下し ($P<0.005$)，全て正常範囲内に入った (図 2)．hCG 投与時の LH 値は hMG 開始時の値に比し有意差はなく，hMG 投与による LH 値の上昇は認められなかった．FSH 値 (mean±SD) は同様に buserelin 開始時，hMG 開始時，hCG 投与時と各々8.9±2.1mIU/ml, 5.5±2.1mIU/ml, 11.9±3.1mIU/ml であり，hMG 投与時の値は buserelin 開始前より有意に低下し ($P<0.005$)，hCG 投与時には有意に増加した ($P<0.005$) (図 2)．PRL 値 (mean±SD) は各々5.6±2.5ng/ml, 6.5±3.8ng/ml, 9.4±6.0ng/ml と buserelin, hMG により一定の傾向を示さなかった．

$E_1$ 値 (mean±SD) は各々56.4±19.0pg/ml, 51.8±25.3pg/ml, 1634.4±1889.0pg/ml と buserelin 投与により有意な変化を示さず，hMG 投与により有意に上昇した ($P<0.005$) (図 3)．$E_2$ 値 (mean±SD) は各々85.5±20.7pg/ml, 129.5±136.9pg/ml, 2810.6±2304.6pg/ml と buserelin 投与により有意な変化を示さず，hMG 投与により有意に上昇した ($P<0.01$)．$E_1$, $E_2$ 値共，妊娠例においても buserelin 投与によりその値は有意な変化を示さなかった (図 3)．T 値 (mean±SD) は各々1.2±0.2ng/ml, 0.8±0.2ng/ml, 1.3±0.6ng/ml と buserelin 投与により有意に低下し ($P<0.005$)，hMG 投与によりやや上昇する傾向にあった (図 4)．Free-T 値 (mean±SD) は各々2.1±

表 1　臨床成績

| | 症　例 | 周　期 |
|---|---|---|
| 治療数 | 11 | 21 |
| short protocol | 3 | 7 |
| long protocol | 9 | 14 |
| 排卵 | 10( 90.9%) | 20( 95.2%) |
| short protocol | 3(100.0%) | 7(100.0%) |
| long protocol | 8( 88.9%) | 13( 92.9%) |
| 黄体機能不全 | 1( 10.0%) | 1/20( 5.0%) |
| short protocol | 1/3 ( 33.3%) | 1/7 ( 14.3%) |
| long protocol | 0/8 ( 0.0%) | 0/13( 0.0%) |
| OHSS (II°以上) | 7/11( 63.6%) | 7/21( 33.3%) |
| short protocol | 2/3 ( 66.7%) | 2/ 7( 28.6%) |
| long protocol | 5/8 ( 62.3%) | 5/14( 35.7%) |
| 妊娠 | 6 ( 54.5%) | 6( 28.6%) |
| (男性不妊合併例を除く) | 6/9 ( 66.7%) | 6/17( 35.3%) |
| short protocol | 2( 66.7%) | 2( 28.6%) |
| long protocol | 4( 44.4%) | 4( 28.6%) |
| (男性不妊合併例を除く) | 4/7 ( 57.1%) | 4/10( 40.0%) |
| 流産 | 0 | 0 |
| short protocol | 0 | 0 |
| long protocol | 0 | 0 |
| 多胎 | 3/6 ( 50.0%) | |
| short protocol | 2/2 (100.0%) | |
| long protocol | 1/4 ( 25.0%) | |

表2　同一症例でのhMG-hCG療法とbuserelin-hMG-hCG療法の比較検討

| | hMG-hCG療法 | | | | buserelin-hMG-hCG療法 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均hMG総投与量(A) | 平均hMG投与日数 | OHSSの頻度 | 周期数 | 平均hMG総投与量(A) | 平均hMG投与日数 | OHSSの頻度 | 周期数 |
| 1 | 21.4 | 9.8 | 0% | 5 | 15.0 | 7.5 | 50.0%<br>(II度) | 2<br>(long protocol) |
| 2 | 21.8 | 11.0 | 16.7%<br>(II度) | 6 | 24.0 | 12.0 | 100.0%<br>(III度, 妊娠周期) | 1<br>(long protocol) |
| 3 | 17.5 | 8.8 | 25.0%<br>(II度) | 4 | 18.0 | 9.0 | 100.0%<br>(II度, 妊娠周期) | 1<br>(short protocol) |
| 4 | 11.7 | 6.3 | 0% | 3 | 15.5 | 8.5 | 0% | 2<br>(long protocol) |
| 5 | 37.0 | 12.0 | 0% | 3 | 33.0 | 11.0 | 0% | 2<br>(short protocol) |
| 6 | 28.0 | 9.3 | 33.3%<br>(II度) | 3 | 29.0<br>29.5 | 9.0<br>11.0 | 0%<br>50.0%<br>(II度, 妊娠周期) | 4<br>(short protocol)<br>2<br>(long protocol) |
| 総計 | 22.4±7.9 | 9.7±2.1 | 12.5% | 24 | 24.6±7.4 | 9.7±1.6 | 28.6%<br>9.1%<br>(非妊娠時) | 14 |

表3　妊娠例の治療経過

| 症例 | 年齢<br>経妊経産 | 排卵障害<br>不妊歴 | 先行治療 | buserelin-hMG-hCG療法 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 治療(hMG平均アンプル数) | OHSS | 妊娠 |
| 1 | 27<br>0 G 0 P | 第I度無月経<br>不妊歴2年 | ① Clomid 3 cycle<br>long follicular phase<br>② hMG-hCG 3 cycle (36A)<br>follicle発育不良, OHSS II° 1回 | short protocol<br>2 cycle<br>(33A) | (−) | 双胎 |
| 2 | 35<br>3 G 0 P | 第I度無月経<br>不妊歴4年 | ① Clomid 6 cycle<br>long follicular phase<br>② hMG-hCG 1 cycle<br>follicle発育不良 | short protocol<br>1 cycle<br>(28A) | III° | 品胎 |
| 3 | 26<br>0 G 0 P | 持続性無排卵症<br>不妊歴2年 | ① Clomid 2 cycle<br>無効<br>② hMG-hCG 3 cycle (17.5A) | long protocol<br>1 cycle<br>(18A) | II° | 品胎 |
| 4 | 27<br>0 G 0 P | 持続性無排卵症<br>不妊歴5年 | ① Clomid 3 cycle<br>② hMG-hCG 6 cycle (21.8A)<br>OHSS II° 1回 | long protocol<br>1 cycle<br>(24A) | II° | 単胎 |
| 5 | 23<br>2 G 0 P | 稀発月経, 無排卵症<br>Jones & Jones<br>手術後不妊歴1年 | ① Clomid 3 cycle | long protocol<br>1 cycle<br>(18A) | III° | 単胎 |
| 6 | 27<br>0 G 0 P | 持続性無排卵症<br>DM<br>(インシュリン使用)<br>不妊歴3年 | ① Clomid 無効<br>② hMG-hCG 9 cycle<br>6 cycleは排卵せず (16.3A)<br>3 cycleは排卵 (28A) | short protocol<br>4 cycle (29A)<br>long protocol<br>2 cycle (29.5A) | II° | 単胎 |

0.3pg/ml, 1.3±0.3pg/ml, 2.5±1.4pg/ml とT値と同様 buserelin 投与により有意に低下し (P<0.01), hMG 投与により有意に上昇した(P<0.005) (図4).

$\Delta^4$A 値 (mean±SD) は 0.9 ±0.2ng/ml, 0.8±0.2ng/ml, 2.3±1.1ng/ml と buserelin 投与により有意な変化はなかったが hMG 投与により上昇した(P<0.025). DHEA 値 (mean±SD) は各々5.4±1.4ng/ml, 5.0±1.7ng/ml, 5.8±2.5ng/ml であり, DHEA-S 値は各々2111.2±673.3ng/ml, 1795±415.8ng/ml, 2410±705.0ng/ml と共に buserelin, hMG の投与により有意な変化を示さなかった. Pおよび17-OH-P値は buserelin, hMG 投与により変動せず, いずれも0.9ng/ml 以下を示した. Premature luteinization を起こした症例はなかった.

## 考　察

PCO 症例の排卵誘発法上の種々の問題点を解決すべく新しく試みられている方法の一つとして LH-RH analogue-hMG-hCG 療法がある. Fleming らが 1985 年に最初に報告[2]し, clomiphene 抵抗性 PCO 症例 8 例中 7 例が治療開始 1 ～ 2 周期以内に妊娠したと報告し, その後, 症例を増加し, hMG-hCG 療法の 38 %に比し 34 例中 27 例, 81.5 %の高率で妊娠が成立したと報告している. 我々の成績でも高い排卵率のみならず 11 例中 6 例, 54.5 %(男性不妊症合併例 2 例を除くと 66.7 %) が妊娠に至った. しかも治療開始 6 周期以内に全例妊娠に至っており, 5 例は 1 ～ 2 周期以内である. 高い排卵率, 妊娠率, 治療早期の

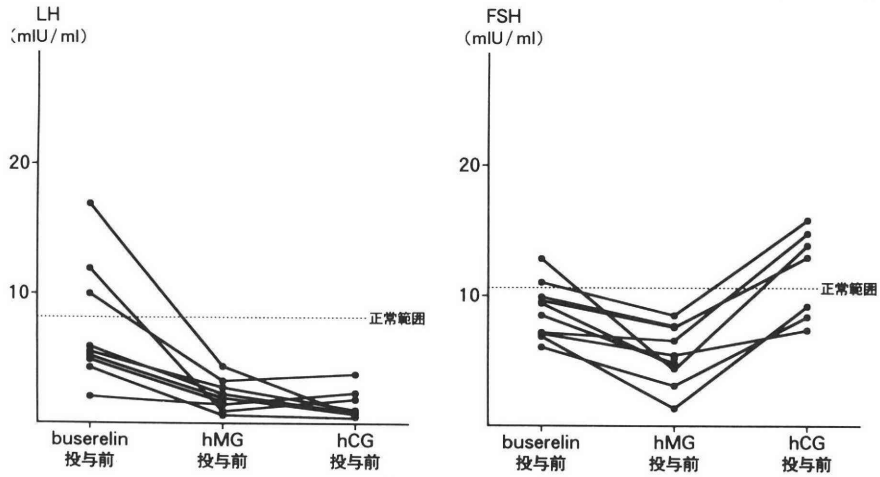



図2　血中 LH, FSH 値の推移

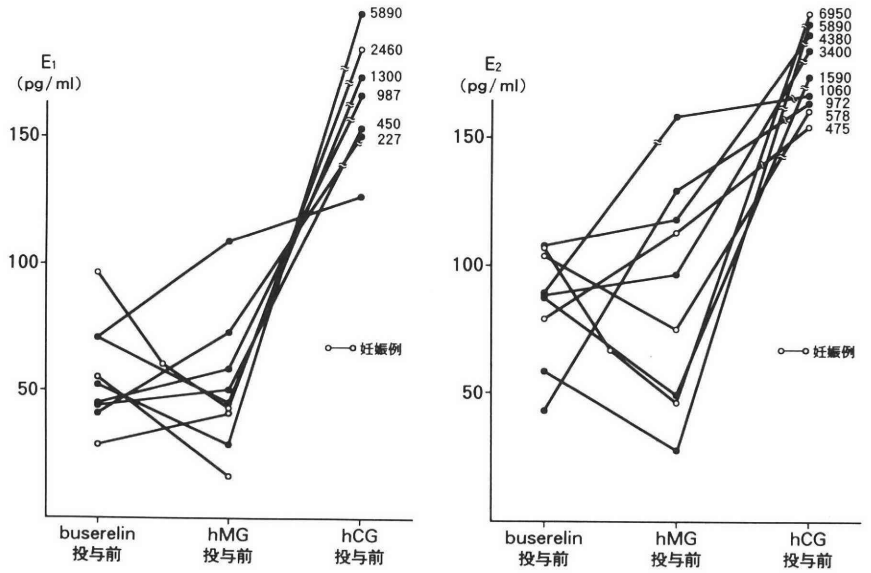



図3　血中 $E_1$, $E_2$値の推移

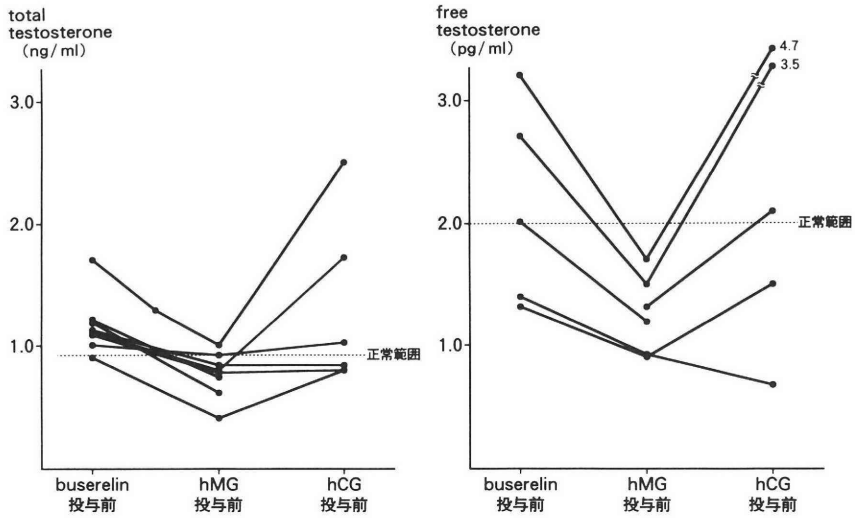



図4　血中 total, free testosterone 値の推移

妊娠から PCO に対する buserelin-hMG-hCG 療法は優れた治療法であると思われる．一方 buserelin-hMG-hCG 療法では short luteal phase になりやすいと報告[3]されているが，我々の hCG 3回投与法(hCG5,000～10,000IU 投与，3日後，7日後 3,000～5,000IU 投与) では黄体機能不全は1例のみしか認められなかった．また，LHRH analogue (leuprolide)併用療法は使用する hMG 量が増加することが指摘[4)5)]されており卵巣への直接作用による hMG の反応性の低下として説明されている[5]．しかし buserelin 1200$\mu$g/日では short protocol, long protocol とも hMG-hCG 療法に比し hMG 投与量，hMG 投与日数には差は認められず，LHRH analogue の力価や種類の違いもあると思われた．

OHSS の頻度は妊娠症例が多く含まれているとはいえ，33.3％と高く，また従来の hMG-hCG 療法との比較でもその頻度は変わらず，本療法は OHSS の防止にはならないと思われた．また多胎も 50％にみられ，特に short protocol では2例中2例が多胎であった．Short protocol 症例はその適応上，hMG 投与量が多く必要な poor responder であるため，このような結果になったと思われた．Long protocol でも4例中1例に品胎が認められ OHSS と同様，多胎もこの治療法では防げないと思われた．

また LHRH analogue 併用療法での卵胞数は従来の hMG 療法の卵胞数に比べて変化しないか，むしろ増加する報告もあり，PCO 症例に限れば本療法は OHSS，多胎の防止にはならないと思われた．本療法の高い妊娠率の背景には IVF-ET の成績の向上理由と同様，early luteinization が防止されることは一致するところであるが，さらに下垂体の desensitization が PCO 特有のホルモン環境を是正し，卵管，子宮内膜の状態や卵の quality の改善につながり妊娠に結びつくと考えられる．Long protocol では buserelin 2週間投与により LH, FSH, T, Free-T 値は有意に低下し正常化した．しかし，T値が非常に高い症例では2週間の buserelin の投与では正常化しない症例もあり，このような症例では今後 buserelin の投与量の増加や投与期間を延長する必要があろう．

$E_1$, $E_2$値はこの投与期間では一定の傾向を示さず，また $E_2$が buserelin 投与にて上昇した症例でも妊娠していることから妊娠には $E_1$, $E_2$値の変化よりむしろ LH, FSH, T, Free-T 値の低下が重要と考えられた．高 LH は卵の quality に悪影響を及ぼし，IVF-ET の成績を悪化させることが知られている．PCO での high LH の是正が buserelin 併用によりなされ，妊娠成立に至ると考えられた．また FSH 値の低下や T, Free-T 値の正常化も妊娠成立には必要であると思われた．$\Delta^4$A, DHEA, DHEA-S, PRL 値には buserelin 投与により有意な変化は認められなかった．他の報告例では LHRH analogue 投与により $\Delta^4$A はT値と同様に下降し，$E_2$値も2～3週後には低下するとされている．本研究では LHRH analogue は buserelin を使用し，投与期間は2週間がほとんどであるため，$E_1$, $E_2$値は低下傾向を示さなかったと思われた．今回 short protocol のホルモン測定成績がないため LH, FSH, androgen の推移は不明であるが，IVF-ET 成績では short protocol でも下垂体 desensitization が起こることから，LH が下降している可能性があり，妊娠率向上に結びついていると思われた．

いずれにしろPCO症例に対して本療法はLH, FSH, 高アンドロゲン血症を改善し, 妊娠率を高めることが判明した. しかし, OHSS, 多胎は防止することができず, 今後buserelinの投与量, 投与期間, さらには併用FSH製剤等の種類 (pure FSH等) によりこの問題が解決するかどうかさらに検討を加える必要があろう.

## 文　献


1) Fleming, R.: Gonadotropin down-regulation in gynecological practice, 401, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986
2) Fleming, R., Haxton, M. J., Hamilton, M. P. R., McCune, G. S., Black, W. P., Macnaughton, M. C. and Coutts, J. R. T.: Successful treatment of infertile women with oligomenorrhoea using a combination of a LHRH agonist and exogenous gonadotropgins, Bri. J. Obstet. Gynecol., 92: 369, 1985
3) Hompes, P. G. A., van-Weissenbruch, M. M., Burger, C. W., Schoemaker, J.: Gonadotropin down-regulation in gynecologioal Practice, 391, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986
4) Dodson, W. C., Hughes, C. L., Whitesides, D. B. and Haney, A. F.: The effect of Leuprolide acetate on ovulation induction with human menopausal gonadotropins in polycystic ovary syndrome, J. Clin. Endocrinol. Metab., 65: 95, 1987
5) Nader, S., Berkowitz, A. S. and Winkel, C. A.: Ovarian response to human menopausal gonadotropin after therapy with the gonadotropin-releasing hormone agonist Leuprolide, Am. J. Obstet. Gynecol., 158: 403, 1988


## Buserelin-hMG-hCG therapy for ovulation induction in infertile women with polycystic ovary syndrome


Satoru Takeda, Yoshiaki Iinoh, Katuyuki Kinoshita and Shouichi Sakamoto

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Saitama 350, Japan



The efficacy of buserelin-hMG-hCG therapy for ovulation induction was examined in 11 infertile patients with polycystic ovary syndrome. The patients of poor responders received hMG a few days after 1200$\mu$g/day of buserelin administration in 7 cycles, whereas the remainders were given hMG 2～3 weeks after the buserelin treatment in 14 cycles.

This combined regimen resulted in a 95.2% ovulation rate and no premature luteinization was noted. The ovarian hyperstimulation syndrome was recognized in 33.3% of all cycles. The pregnancy rate was 54.5% and there was no pregnancy loss. In 6 pregnant cases, all patients conceived within 6 cycles after the initiation of this treatment. There were one twin and two triplet pregnancies in pregnant cases.

In the patients who failed to concieve by hMG-hCG treatment, the total dose of hMG, administrating periods of hMG and OHSS rate in buserelin-hMG-hCG treatment were not defferent, compared to those in hMG-hCG treatment.

In the regimen, in which buserelin was given prior to hMG, FSH, LH, testosterone and free testosterone values were significantly inhibited 2～3 weeks after the buserelin started.

This results shows that this combined therapy improves a characteristic endocrine profile of elevated LH levels and elevated androgen levels and is usefull for the induction of ovulation in infertile women with PCO.


(受付:1991年2月14日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 多嚢胞性卵巣症候群婦人にみられる糖代謝異常の特徴

# Characterization of Carbohydrate Metabolism with Polycystic Ovarian Syndrome

山梨医科大学産婦人科教室
木下俊彦　加藤順三
Toshihiko KINOSHITA　Junzo KATO

Department of Obstetrics and Gynecology
Yamanashi medical college, Yamanashi 409-38, Japan

本邦婦人の多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の病態における糖代謝異常の関与，ならびにその特徴を検討するために，PCOS患者15名に75g糖負荷試験を施行し，インスリン分泌動態と糖代謝を解析したところ以下の結果を得た．

(1) インスリン基礎値はPCOSと対照群との間に差を認めなかったが，インスリン反応はPCOSにおいて有意に抑制されていた．

(2) PCOSの63％に軽度の耐糖能障害がみられた．

(3) インスリン値は肥満例においてのみ高値をしめす傾向にあった．

(4) PCOSの治療効果とインスリン分泌および糖代謝とのあいだに相関はみられなかった．

これらの成績より，本邦婦人のPCOSの病態においても糖代謝異常の関与が示唆されたが，インスリン分泌は抑制されていることが特徴的であった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 595—600, 1991)

## 緒　言

インスリンは卵巣機能調節因子の一つとして知られ，特に近年，欧米においては高アンドロゲン血症には高インスリン血症が合併することが多いことが報告されている[1]．いわゆる多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic ovary syndrome, PCOS) においても，しばしば高アンドロゲン血症を伴うために，高インスリン血症がみられることが推察されるが，事実欧米の報告では高インスリン血症を合併することが多いとされる[2,3]．しかし，インスリンとPCOSの関連性についてはいまだ不明な点が多く，特に本邦のPCOSにおけるインスリン動態について言及したものは数少ない[4,5]．そこで今回，本邦PCOSにおけるインスリン動態の一端を明らかにする目的で以下の研究を行ったところ，興味ある成績を得たので報告する．

## 対象および方法

過去2年間に無月経または排卵障害を主訴として来院した23から34歳までの婦人から，表1に示した条件のもとに症例を抽出し対象とした(PCOS群，n＝15)．さらに，正常月経を有する婦人5名をコントロールとして用いた．

コントロール群とPCOS群間には，平均年齢，平均身長，および平均体重において有意差を認めなかった．また，肥満度の指標としてBody Mass Index (BMI＝体重 (Kg)／身長 (cm)$^2$) を求めたが，これも両群間に有意差は示さなかった (表2)．

PCOS群とコントロール群に当日絶飲食，絶飲水の条件下でブドウ糖75gを経口投与し，負荷前と負荷後30, 60, 90, 120分に採血をおこない，採血後直ちに血糖およびインスリン値を測定した．

血糖値の判定は日本糖尿病学会（1982年）による判定基準に基づき行った．

測定方法

卵胞期初期あるいは消退出血後に採血し，直ちに血清分離し−20℃にて凍結保存した．血中LH, FSHおよびPRLは第一ラジオアイソトープキットによるRIA（二抗体法）にて測定した．

血糖はglucose oxidase法により，またインスリンは二抗体法によるRIAにより測定した．

表1　PCOSの診断基準

(1) 臨床症状
　初経以来の月経異常
　（肥満，多毛など）
(2) 内分泌所見
　ＬＨの比較的高値とＦＳＨ値正常
　ＬＨ/ＦＳＨ比 ＞ 2.5
　ＬＨ-ＲＨ試験に対するＬＨの過剰反応
　高androgen血症
(3) 形態学的所見
　卵単の多嚢胞性変化
　組織学的特徴
　・白膜肥厚
　・内莢膜細胞層の肥厚，増殖
　・間質の増生とルテイン化など

表2　PCOSの臨床所見

| | PCOS (n = 15) | Controls (n = 5) |
|---|---|---|
| Age (Y) | 27.6±1.5 | 29.0±2.0 |
| Height (cm) | 155.1±1.1 | 156.3±1.8 |
| Weight (kg) | 57.6±4.7 | 55.8±5.4 |
| BMI | 22.6±1.5 | 20.3±2.3 |
| LH (mIU/ml) | 37.5±2.7 | 12.8±3.2 |
| FSH (mIU/ml) | 12.0±0.8 | 10.2±1.1 |
| PRL (ng/dl) | 11.2±1.6 | 10.7±1.9 |

(M±SE)

## 成　績

(1) 75g糖負荷に対する血糖およびインスリン値の反応

インスリンはPCOSにおいて基礎値7.8μu/mlであり，コントロール群の7.1μu/mlとの間には有意差を認めなかった．120分間のインスリン総分泌量は281.6μu/mlであり，やはりコントロール群との間には有意差が認められなかった．

一方，糖負荷後30分のインスリン値はPCOSにおいて54.3±10.5μu/mlとコントロール群の107.8±25.6μu/mlに比べて明らかに低値であり（P＜0.01），また負荷後の頂値は120分値にみられ遅延していた．

血糖値に関しては，基礎値はPCOS群88.2±2.6mg/dl，コントロール群が86.4±4.7mg/dlであり有意差は認められなかった．また，各測定時の値でも有意差は認められないものの，PCOSでは120分間の総量が高い傾向が見られた（643.8 vs 585.8mg/dl）（表3）．さらに，PCOS11例の糖負荷後の血糖値を分析したところ，7例（63％）が境界型に分類された．しかし，糖尿病型に分類されたものは認められなかった．対照群には境界型と糖尿病型を含めて，

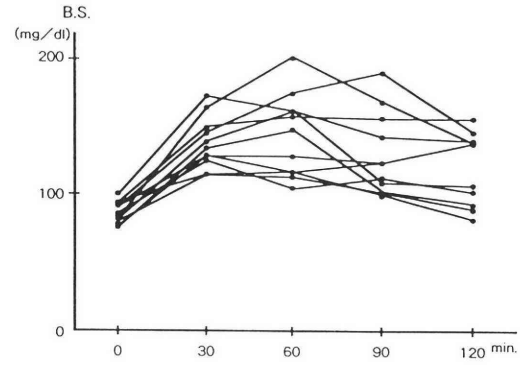



図1　PCOS例におけるOGTT

表3　PCOSにおけるインスリン値と血糖値

| Group | Fasting | 30min | 60min | 90min | 120min | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Insulin (μU/ml) | | | |
| Control | 7.1±0.7 | 107.8±25.6 | 48.2±15.7 | 58.3±14.7 | 46.9±7.7 | 271.7±35.8 |
| PCOS | 7.8±1.7 | 54.3±10.5① | 67.8±9.1 | 76.0±10.6 | 79.9±14.9 | 281.6±41.8 |
| | | | Glucose (mg/dl) | | | |
| Control | 86.4±4.7 | 139.2±11.0 | 125.0±1.4 | 135.4±15.8 | 120.0±12.3 | 585.8±47.1 |
| PCOS | 88.2±2.6 | 142.6±6.1 | 149.8±10.1 | 136.2±10.3 | 127.2±8.5 | 643.8±30.5 |

M±S.E

① P ＜ 0.01 vs control

耐糖能異常を示す例はみられなかった（図1）.

(2) インスリン分泌能

インスリン分泌能を比較検討するために，糖負荷後30分後のインスリンと糖の上昇量の比，すなわちInsulinogenic Indexを求めた．その結果，PCOSでは1.0±0.2であるのに対して、対照群では4.5±1.4であり，PCOSにおいてはインスリン分泌が抑制されていることが明らかになった（表4）.

(3) PCOSにおける肥満度とインスリン分泌

BMI 24以上の肥満例がPCOSにおいて4例認められた．この4例のインスリン基礎値は，平均11.4±2.8$\mu$/mlと非肥満PCOSに比べて有意に高値であった．しかしながら，対照群との間には有意差は認められなかった．糖負荷後の各測定時点でも肥満例では非肥満例に比べてインスリン値は高値をとる傾向が見られたが，統計的に有意ではなかった．Insulinogenic Indexは非肥満PCOSにおいては，肥満PCOSに比べて有意に低値を示した（表4，5）.

(4) Clomipheneに対する反応性と血糖およびインスリン反応（表4，6）

PCOSをClomiphene投与に対して排卵がみられなかった群（Group A n=7）と，排卵した群（Group B n=4）に分類した．Group Aにおいては LH値が，Group Bに比べ高い傾向にあった．インスリン値は，いづれの測定時点でもGroup Bに比べ高値をとった．一方，血糖値は両群間に全く差を認めなかった．

インスリン反応はgroup AがGroup Bに比べて，やや低値を示したが有意差は認められなかった．

また，耐糖能異常を示した例はGroup A，B共に分布しており，とくに偏りはみられなかった．

なお，血中のLH, testosterone, DHEA-S値はインスリン基礎値及びInsulinogenic Index値のいづれとも相関性を認めなかった．

## 考　察

初めて高アンドロゲン血症とインスリン値の間に正の相関性を認めて，それを報告したのはBurghenらである[6]．それ以後諸家の報告により，高アンドロゲン血症を伴うPCOSにおいても高インスリン血症がみられることが裏付けられている[7]．

しかし，本研究によりPCOSではインスリン値は対照群と有意差がみられず，必ずしも高インスリン血症は伴わないことが示された．さらに糖負荷後のインスリン反応は抑制されていた．インスリン分泌は血糖値によって強く影響をうけるので，インスリン値は絶対値のみならず血糖値との関連において検討する必要がある．そこで糖負荷後の血糖値上昇量とインスリン上昇量の比（Insulinogenic Index）を参考としインスリン分泌能の比較をしたところ，インスリン分泌能はPCOSにおいて低下していた．こ

表4　PCOSとInsuliongenic Index

(1) PCOSと対照

Insulinogenic Index
($\Delta$IRI/$\Delta$BS, 30min)

| | | |
|---|---|---|
| (1) | Control | 4.5±1.4 |
| | PCOS | 1.0±0.2 |

(M±SE)
(P < 0.05)

(2) 非肥満例との関連性

Insulinogenic Index in PCOS
($\Delta$IRI/$\Delta$BS, 30min)

| | | |
|---|---|---|
| (2) | non-Obese | 0.6±0.2 |
| | Obese | 1.4±0.4 |

(M±SE)
(p < 0.05)

(3) クロミフェンの効果との関連性

Insulinogenic Index in PCOS
($\Delta$IRI/$\Delta$BS, 30min)

| | | |
|---|---|---|
| (3) | Group A | 1.1±0.3 |
| | Group B | 1.7±1.1 |

(Group A does not respond to clomiphene.
Group B responds to clomiphene.)

表5　肥満度インスリン値および血糖値（PCOS例）

| Group | Fasting | 30min | 60min | 60min | 120min |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Insulin ($\mu$U/ml) | | |
| non-ob | 5.0±1.4① | 43.9±17.8 | 62.6±13.7 | 63.5±10.6 | 76.7±24.8 |
| ob | 11.4±2.8① | 64.8±12.9 | 75.6±13.5 | 94.7±21.1 | 84.8±16.8 |
| | | | Glucose (mg/dl) | | |
| non-ob | 84.8±3.8 | 146.3±8.9 | 153.8±14.8 | 129.5±11.5 | 122.2±9.3 |
| ob | 93.3±1.2 | 137.0±9.3 | 143.8±16.8 | 146.3±22.3 | 134.8±19.2 |

M±SE
① P < 0.05

表6　クロミフェンに対する効果とインスリン値および血糖値

| Insulin (μU/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Group | Fasting | 30min | 60min | 90min | 120min | Total |
| A (n = 7) | 8.4±2.8 | 60.4±13.6 | 76.3±10.0 | 81.0±14.4 | 84.3±20.3 | 310.8±52.6 |
| B (n = 4) | 5.4±1.2 | 47.8±10.9 | 50.4±12.8 | 64.2±10.9 | 68.0 ±16.7 | 248.5±62.9 |
| Glucose (mg/dl) | | | | | | |
| Group | Fasting | 30min | 60min | 90min | 120min | Total |
| A | 88.4±3.8 | 139.4±8.4 | 145.0±9.6 | 134.3±14.1 | 124.9±12.9 | 632.6±43.4 |
| B | 85.8±2.8 | 141.8±7.3 | 148.8±25.6 | 131.8±16.0 | 123.0±10.3 | 631.0±52.1 |

(M±S.E.)

(Group A does not respond to clomiphene.
Group B responds to clomiphene.)

れらは耐糖能低下の存在をうかがわせるものであるが，事実，境界型に分類される耐糖能障害が63％の症例にみられた．またPCOSにおけるインスリン分泌の抑制については，従来は全く報告されておらず，今回はじめて明らかになったものである．

Dunaifら[8]によれば，PCOSの20％に耐糖能障害が併存していることを報告しているが，いづれもインスリン値は高く，高血糖はインスリンレセプターにおけるインスリン抵抗性によってもたらされたものと推定している．これに反し，今回の検討結果からはインスリン抵抗性の存在を疑わせる所見はみられず，本邦PCOSのインスリン動態は欧米の症例との間に相違があることが予想される結果であった．PCOSのcriteriaが完全には明確にはなされていない．現時点では，criteriaの相違が検討結果を左右している可能性も高い．しかしながら我々の用いたcriteriaは，PCOSのcriteriaとしては一般的であり，criteriaの相違がインスリン動態に影響しているとは判断し難い．一方，インスリン抵抗性の有無にかかわらずPCOSに耐糖能異常が併存していることは我々の検討と共通しており，PCOSの病態に糖代謝異常が関与している可能性は高いといえよう．

今回の検討では著明な高アンドロゲン血症と高インスリン血症はともにみとめとられず，アンドロゲンとインスリンの間に相関性は認められなかった．また，高アンドロゲン血症の改善によってもインスリン値の低下はみられないとの報告から[9]，むしろインスリンが卵巣におけるアンドロゲン産生を亢進させているとの考えが注目されている．Barbieriら[10]によればin vitroにおいて高アンドロゲン血症婦人の卵巣をインスリン共存下にインキュベーションしたところ，明らかにテストテスロンの分泌を促進したことから，高インスリン血症は特に卵巣からのアンドロゲン分泌を促進し，高アンドロゲン血症の原因になると述べている．元来，本邦PCOSには著名な高アンドロゲン血症が少ないことが知られているが，我々の結果のごとく，高インスリン血症も少ないとすれば，彼等の説からその機序を説明し得ることになる．従って，アンドロゲンとインスリンの関係は，今後もさらに検討すべき問題であろう．

一方，PCOSを肥満度から分類してインスリン反応及びインスリン分泌を検討したところ，肥満したPCOSではインスリン値が高く血糖値も高い傾向にあった．Insulinogenic Indexは非肥満例のほうがより低下していたことから，肥満例ではインスリン分泌は保たれていることが示唆され，非肥満PCOSと肥満したPCOSでは糖代謝異常の機序に異なる点があると考えられた．元来，肥満には軽度の耐糖能異常が伴うことが知られており，肥満者にインスリン抵抗性が存在することも報告されている[11]．また肥満者の単球のインスリン受容体の減少，肝臓でのインスリン除去率の低下などが肥満者における高インスリン血症と高血糖を助長させることが考えられている．今回の肥満PCOS例においてもインスリン値が軽度ではあるが上昇していたことは，肥満によるインスリン抵抗性が耐糖能異常に関与している可能性が高いのではないかと推察される．Jialalら[12]をはじめ欧米におけるPCOS症例では，肥満ではないPCOSにおいても高インスリン血症を伴うことが報告されているが，本研究の結果からは本邦PCOSにおいては，そういった傾向はなく，PCOSにおいても肥満度とインスリンの関係に注目すべきであると考えられた．

一方，PCOSの臨床像とインスリン値あるいは糖

代謝異常との関連性は不明であった．今回クロミッドに対する反応性からPCOSを2つのsubgroupにわけ，各々のインスリン動態を検討したが，クロミッドに無反応な例ではインスリン値が高値であった．逆にインスリン反応はクロミッドに反応した例が良好であった．従って，排卵障害の程度とインスリンの間に関連性があるものと考えられるが，PCOSにおいてクロミッドが無効である場合の機序としては中枢因子とともに排卵因子をも考慮する必要があり，インスリンがどの因子に関与しているかは不明である．

OGTTにおいて境界型を示した症例を肥満度やクロミッドに対する反応性の違いから分類しても，各群に境界型を示す症例は分布した．従って，PCOSにおける糖代謝異常は広く分布しており，PCOSの病態に関与しているものと考えられる．しかし欧米のPCOSに深く関与しているインスリン抵抗性との関連性は，今回の研究からは否定的である．また，多毛，黒色表皮腫をともなったKahnらのいうインスリンレセプター異常症A型ないし，その亜型と思われる所見を持つことが多いように報告されているが[6,7,8]，この疾患もわが国においては極めてまれな疾患である．こういった事実からは，PCOSはいくつかの病態，病因の集合体であり，本邦と欧米においてその集合体の構成が一致していないことが推察され，これは今後本邦PCOSに対しての病因および病態を検討する際に考慮すべき重要な点になるものと考えられる．

## 文　献


1) Kahn, C. R., Flier, J. S., Bar, R. S., Archer, J. A., Gorden, P., Martin, M. M., Roth, J.: The syndrome of insulin resistance and acantosis nigricans, N. Engl. J. Med., 294: 739, 1976
2) Burghen, G. A., Givens, J. R., Kitabchi, A. E.: Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease, J. Clin. Endocrinol. Metab., 50: 113, 1980
3) Pasquali, R., Ventruoli, S., Paradis, R., Capelli, M., Parenti-Meichionda, N.: Insulin and C-peptide levels in obese patients with polycystic ovaries, Horm. Metab. Res., 14: 284, 1982
4) 幸村信行，片山和明，望月眞人：糖代謝と無月経に関する研究－特に多嚢胞性卵巣症候群における臨床的解析－，日不妊会誌，32：268，1987
5) 武谷雄二，石川弘子，木下俊彦，水野正彦：多嚢胞性卵巣に黒色表皮腫およびインスリン抵抗を合併した症例，産婦人実際，34：1259，1985
6) Burgen, G. A., Givens, J. R., Kitabchi, A. E.: Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinemia in polycystic ovarian disease, J. Clin. Endocrinol. Metab., 50: 113, 1980
7) Barbieri, R., Ryan, K. J.: Hyperandrogenism insulin resistance, and acanthosis nigricans syndrome: A common endocrinopathy with distinct pathophysiologic features, Am. J. Obstet. Gynecol., 147: 90, 1983
8) Dunaif, A., Graf, M., Mandeli, J., Laumas, V., Dobrjansky, A.: Characterization of Group of Hyperandrogenic Women with Acanthosis Nigricans, Impaired Glucose Tolerance, and/or Hyperinsulinemia, J. Clin. Endocrinol. Metab., 65: 499, 1987
9) Mitchell, E., Geffner-Solomon, A., Kaplan, Noelle-Bersch, David, W., Gokde-Elliot, M. L. and Jeffery-Changd, R.: Persistence of Insulin Resistance in Polycystic Ovarian Disease after Inhibition of Ovarian Steroid Secretion, Fertil. Steril., 45: 327, 1986
10) Robert, L. B., Anastasia-Makris, Rebecca, W., Randall-Gilbert-Daniels, Robert, W. K. and Kenneth, J. R.: Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of human ovarian stroma and theca, Obstet. Gynecol., 64: 73S 1984
11) Evans, D. J.: Relationship between skeletal muscle insulin resistance, insulinmediated glucose disposal, and insulin binding effects of obesity and body fat topography, J. Clin. Inveet., 74: 1515, 1984
12) Jialal, I., Naiker, P., Reddi, K., Moodley, J. and Joubert, S. M.: Evidence for Insulin Resistance in Nonobese Patients with Polycystic Ovarian Disease, J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1066, 1987


## Characterization of carbohydrate metabolism with polycystic ovarian syndrome


Toshihiko Kinosita and Junzo Kato

Department of Obstetrics and Gynecolgy
Yamanashi mecical college,
Yamanashi 409-38, Japan



Fasting insulin concentration and the insulin response to an oral glucose tolerance test were measured in 15 Japanese women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and 5 weight-matched normal women. The fasting insulin concentrations were not inceased in PCOS in comparison to normal women. Insulin response to an oral glucose test was significantly decreased ($p<0.05$) in PCOS at 30 min, although 63% of these women had mild

impairment of glucose tolerance. The glucose response did not differ between the obese PCOS patients and those with nonobesity. No correlations were demonstrated between the fasting serum insulin concentrations and insulin response at 30 min, and both androgens and the luteinising hormone.

These findings suggest that (1) hyperinsulinemia is not a feature of PCOS in Japan; (2) only obese PCOS patients have a tendency of abnormalities in insulin secretion; (3) it is evident that PCOS represents an inadequately characterized disorder of insulin action and a novel paradigm in which to investigate the relationship between reproductive functions and carbohydrate metabolism.

(受付:1990年12月3日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 反復流産患者における抗カルジオリピン抗体(抗CL抗体)の測定とその臨床的意義—抗CL抗体測定試薬(MESACUPカルジオリピンテスト)を用いて—

# Anti-cardiolipin Antibody in Patients with Recurrent Fetal Loss; Measured by Mesacup cardiolipin test

名古屋市立大学医学部産科婦人科

青木耕治 Koji AOKI
林弥生 Yayoi HAYASHI
平尾有希恵 Yukie HIRAO
尾崎康彦 Yasuhiko OZAKI
梶浦詳二 Shoji KAJIURA
水野昌彦 Masahiko MIZUNO
水野俊彦 Toshihiko MIZUNO
吉川真奈美 Manami YOSHIKAWA
金原敏弘 Toshihiro KIMBARA
八神喜昭 Yoshiaki YAGAMI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagoya City University Medical School, Nagoya 467, Japan

反復流産の原因のひとつとして抗リン脂質抗体(抗PL抗体)が最近注目されている．今回我々は，抗PL抗体のひとつであるIgG抗カルジオリピン抗体(抗CL抗体)を測定するキット，MESACUP. カルジオリピンテストについて，その臨床的有用性の有無を検討した．

本キットは，定量値に希釈直線性があり，同時再現性CV＝5.4～6.9％，日差再現性CV＝8.1～8.7％と充分な測定精度を有していた．正常妊婦血清125例を用いて算出したIgG抗CL抗体正常値(mean＋3S. D.)は，4.92u/mlであった．本キットによる反復流産患者血清のIgG抗CL抗体測定結果は，標準ELISA法によるIgG，IgM各6種類の抗PL抗体測定結果と全体で85％(22／26)一致し，抗核抗体陽性例，APTT延長例で有意($P<0.05$)に高値を示した．さらに，治療により生児が得られた反復流産患者において，治療後に測定値が正常化する傾向がみられた．

よって，反復流産患者における抗PL抗体測定の代表的なひとつとして，本キットによるIgG抗CL抗体測定は，日常臨床検査として有用であると考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 601—606, 1991)

## 緒　言

抗カルジオリピン抗体(抗CL抗体)を代表とする抗リン脂質抗体(抗PL抗体)が不育症の原因の一つとして，近年注目をされている[1,2]．

抗PL抗体は，カルジオリピン(CL)，ホスファチジルセリン(PS)，ホスファチジルイノシトール(PI)，ホスファチジルグリセロール(PG)，ホスファチジン酸(PA)，ホスファチジルエタノールアミン(PE)などのリン脂質と反応する自己抗体の総称であり，イムノグロブリンクラスとしてIgG, IgA,IgMが知られている[3]．

我々は.すでにエンザイムイムノアッセイ(ELISA)法による抗 PL 抗体測定法(自験法)を確立し[4], IgG, IgM 両クラスの上記6種類のリン脂質に対する抗 PL 抗体を測定している。その結果,反復流産患者243例中31例(13％)に何らかの抗 PL 抗体を見出している[5]. また，我々の最近の検討では，抗 PL 抗体陽性の反復流産患者を、妊娠成立前後よりプレドニゾロン，アスピリン治療を行った群と未治療群の2群に分けた場合，その後の妊娠帰結において，流産，胎内死亡は，治療群では25％(20例中5例)であったのに対して，未治療群では、81％（32例中26例）という結果であった[6]. また，未治療群の32例において抗 PL 抗体が高力価の症例はその後の妊娠帰結において，ほぼ100％の確率で流産や胎内死亡に終わっていることより,抗 PL 抗体測定の重要性が示唆されている.

しかしながら,本邦において抗 PL 抗体測定法は統一されておらず，測定する施設間の測定結果にかなりの不一致が見られるとの報告がある[7]. また,現在,国内には抗 PL 抗体測定キットの市販品はなく,抗 PL 抗体測定は広く実用化されるに至っていない.

今回，我々は MBL 社で開発された IgG クラスの抗 CL 抗体測定キット,MESACUP カルジオリピンテストについてその基礎的検討を行うとともに,我々の確立した抗 PL 抗体測定法(自験法)と比較し，その臨床的有用性について検討したので，ここに報告する.

## 対象および方法

対象は，当科を受診した反復流産患者26例で，標準 ELISA 法による IgG, IgM 各6種類の抗 PL 抗体測定法である自験法で何らかの抗 PL 抗体陽性21例と陰性5例とした. 抗 PL 抗体陽性21例は，治療としてプレドニゾロン,アスピリン治療を行っている. また，正常域を設定する目的で正常妊婦血清125例も用いた.

MBL 社より提供された IgG 抗 CL 抗体測定キット，MESACUP カルジオリピンテストは，マイクロカップにカルジオリピンを固相化し，酵素標識抗体に抗ヒト IgG モノクロナール抗体を用いた，IgG クラスの抗 CL 抗体を特異的に測定する ELISA 法のキットである．なお，基準物質は，E. N. Harris らより供与された抗リン脂質抗体標準血清を用いている。

キットの操作法は以下の手順である.

操作法

1）被検血清を，検体希釈液を用いて101倍希釈する。

2）6濃度の IgG 抗 CL 抗体標準液および，希釈した被検血清を 100ul/well 分注する.

3）室温，1時間静置する.

4）予め調整した洗浄液を用いて4回洗浄する.

5）酵素標識抗体を 100ul/well 分注する.

6）室温，1時間静置する.

7）4）と同様に洗浄する.

8）酵素基質溶液を 100ul/well 分注する.

9）室温，30分間静置後，反応停止液を 100ul/well 分注する.

10) マイクロプレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定し,IgG 抗 CL 抗体標準血清の濃度と吸光度より標準曲線を作成し，被検血清の IgG 抗 CL 抗体価を U/ml で算出する.

## 結　果

1　IgG 抗 CL 抗体測定の基礎的検討

MESACUP カルジオリピンテストの IgG 抗 CL 抗体標準曲線は，図1に示すようになめらかな曲線を描いた. IgG 抗 CL 抗体高値を示す3血清について希釈試験を実施し，図2のごとく良好な希釈直線性を有することが示された. 再現性は, IgG 抗 CL 抗体低，中，高値3検体を用いて検討した．結果は表1に示すように，同時再現性 CV＝5.4～6.9％，日差再現性 CV＝8.1～8.7％と良好であった．また，各ステップでのタイムコースを図3に示す.

2　正常値

正常妊婦125例の IgG 抗 CL 抗体測定値の平均値および標準偏差 (S. D.) はそれぞれ 0.64u/ml および 1.43u/ml となった．正常値を平均値＋3 S. D. として算出すると，4.92u/ml となり，正常妊婦125例中124例（99.2％）が 4.92u/ml 以下となった.

3　臨床成績

プレドニゾロン，アスピリン療法の影響を除くため，治療施行以前に採取した反復流産患者血清のうち自験法で何らかの抗 PL 抗体陽性21例と，陰性5例を用いて,MESACUP カルジオリピンテストによる IgG 抗 CL 抗体測定結果を比較検討すると，表2のようになった.

自験法で陰性の5例は，本キットの IgG 抗 CL 抗体測定で全例陰性と判定されたが，自験法で陽性の21例中4例が本キットで陰性と判定された．この判定不一致4例中2例は,自験法で IgM クラスの抗 PL 抗体のみ陽性で,IgG クラスの抗 CL 抗体を特異的に測定する MESACUP カルジオリピンテストでは検出し得ないと考えられた．他の2例は，自験法で，カルジオリピン以外のリン脂質に対するる IgG クラス

表1　再現性　　(U/ml)

| | 同時再現性 (n = 12) | | | 日差再現性 (n = 5) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sample | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Mean | 9.80 | 33.8 | 58.4 | 10.0 | 35.3 | 56.1 |
| S.D. | 0.88 | 1.81 | 3.88 | 0.86 | 3.07 | 4.55 |
| C.V.(%) | 6.9 | 5.4 | 6.6 | 8.6 | 8.7 | 8.1 |

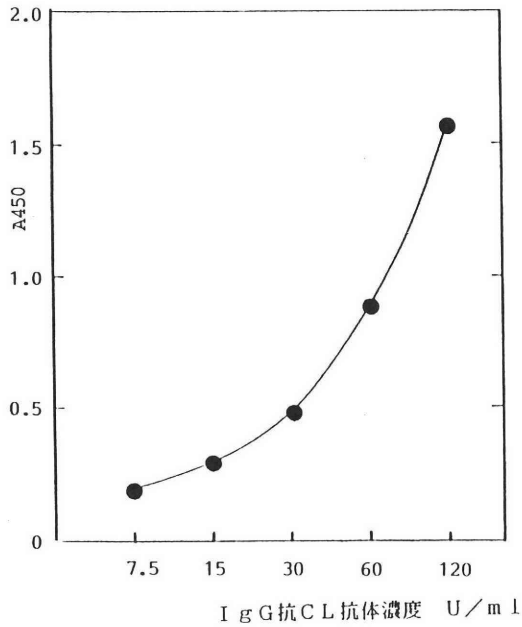



図1　IgG抗CL抗体標準曲線

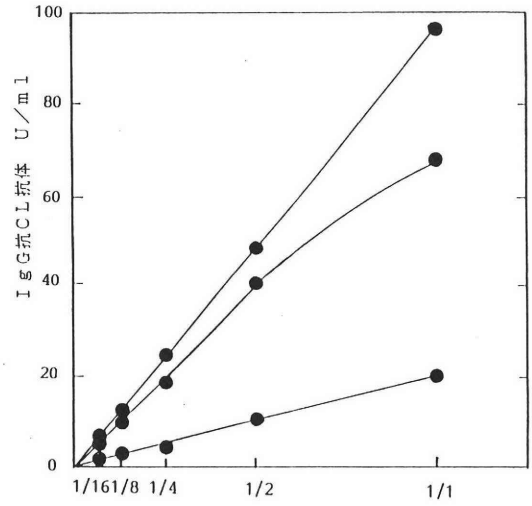



図2　希釈試験

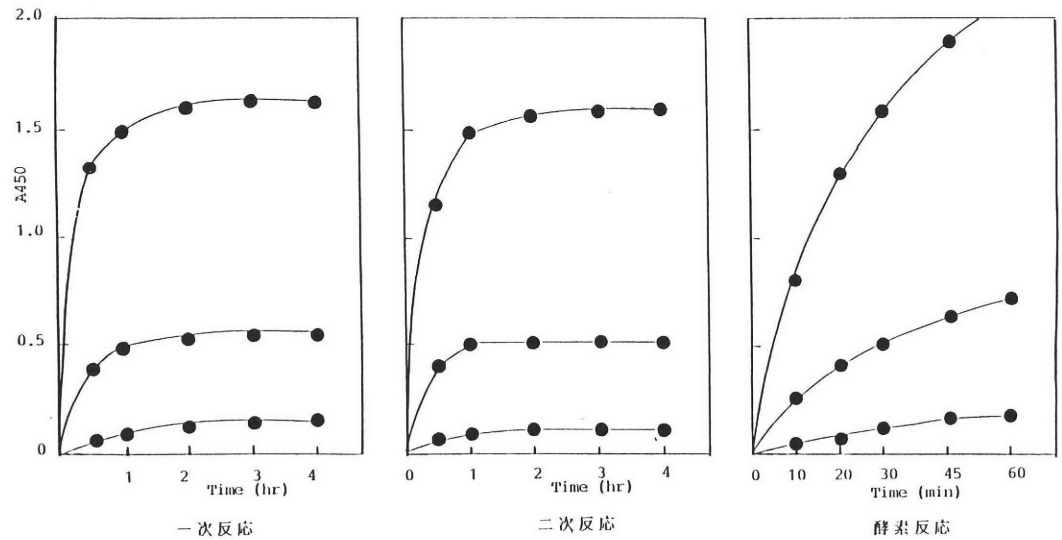



図3　タイムコース

表2　自験法とMESACUPカルジオリピンテストの抗リン脂質抗体測定結果の比較

| | | MESACUPカルジオリピンテスト(IgG抗CL抗体) | 陽性例 | 陰性例 | 一致率 |
|---|---|---|---|---|---|
| 自験法※ | 陽性例 | IgG抗CL抗体 | 17 | 0 | 100% |
| | | IgG抗PL抗体 | 17 | 2 | 89% |
| | | IgM抗PL抗体 | 0 | 2 | 0% |
| | 陰性例 | | 0 | 5 | 100% |
| 全症例での一致率85%(22/26) | | | | | |

※我々の研究室における標準ELISA法によるIgG, IgM各6種類の抗PL抗体測定法

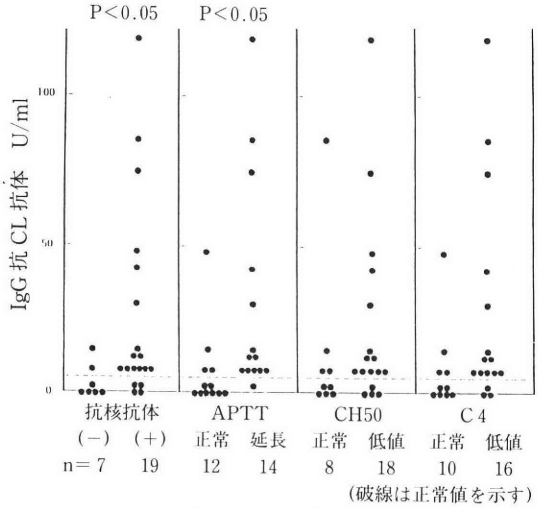



図4　IgG抗CL抗体U/mlと他の検査結果との関連性

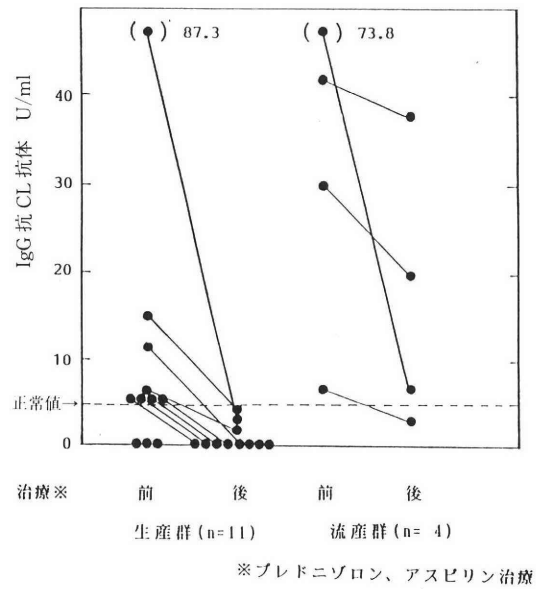



図5　治療効果とIgG抗CL抗体

の抗体が検出されている症例であった. 自験法でIgG抗CL抗体陽性の17例は, 本キットでも全例陽性と判定された. また, 26例中22例が一致しており, 全症例での一致率は85%であった.

検討した反復流産患者26例についてMESACUPカルジオリピンテストで測定したIgG抗CL抗体価とその他の検査結果との関連性をみると, 抗核抗体陽性例, APTT延長例においてIgG抗CL抗体価が有意に($P<0.05$)高値を示し, 血清補体因子(CH50, C4)の低値例にIgG抗CL抗体が高値を示す傾向がみられた(図4).

プレドニゾロン, アスピリン療法施行前後の血清を測定し得た15例について, 治療により初めて生児を得られた11例(生産例)と治療後も再度流産に終わった4例(流産例)に分け測定値の変動を比較すると, 生産例では治療後の測定値がすべて正常値の範囲まで低下していた(図5).

## 考　察

抗リン脂質抗体は梅毒血清反応(抗カルジオリピン抗体)として古くから知られていた[8]. さらに, 梅毒血清反応にみられる生物学的疑陽性(BFP)やリン脂質依存性の凝固検査を阻害するループス・アンチコアグラント(LAC)もリン脂質に対する抗体であることが明らかにされている[9]. 1983年, E. N. Harrisらにより抗カルジオリピン抗体のラジオイムノアッセイ(RIA)による測定法が報告され[10], リン脂質に対する抗体が直接的でかつ鋭敏に測定することが可能となり, 抗PL抗体と動静脈血栓症や反復流産, 血小板減少症との関連が示される様になった.

1986年には, G. R. V. Hughes, E. N. Harrisらにより抗カルジオリピン抗体症候群という, 抗CL抗体をメルクマールとした多くの疾患を包含する新しい疾患概念が提唱され[11], その後の研究で, カルジオリピン以外のリン脂質に対する抗体についてもその重要性が認められることから, 1988年に「抗リン脂質抗体症候群：Antiphospholipid antibody syndrome」と呼ばれるようになった[12]. さらに, 産科領域においても自己免疫異常に起因すると考えられる異常生殖現象をひとつの疾患概念として捕らえようとする試みが, 1988年, Gleicherらによって報告されている[13]. 彼らは病的自己抗体, 特に抗PL抗体と一部の不育症, 一部の妊娠中毒症, 一部の原因不明不妊症および子宮内膜症との密接な関係を証明した後, これを一括して「Reproductirve Autoimmune Failure Syndrome; RAFS」と命名している.

一方, 抗PL抗体は, おもに陰性荷電をもつリン脂

質と交差反応すると考えられているが, D. W. Branch らは, PS が LAC と最も密接に関連していると報告しており[14], リン脂質間の反応性に差がある可能性を示唆している. IgM クラスの抗 PL 抗体については, その臨床的意義には不明な点が多く, 今後の検討が待たれる[15,16]. また, E. N. Harris らにより抗 CL 抗体測定法の標準化が提案されているが[17], 彼らの方法を用いた測定施設間の測定値にかなりの変動がみられることから, 測定法の改良と標準化が叫ばれている. 最近, リン脂質の抗原性に共役する Cofactor (Apolipoprotein H/$\beta$ 2-glycoprotein 1) の存在がオーストラリアとオランダの2つのグループより報告され, 抗 PL 抗体測定に関して新たな局面を迎えている[18,19]. すなわち, 抗 PL 抗体は, リン脂質のみには反応せず, リン脂質と Cofactor の複合体と反応するため, ブロッキング液, 検体希釈液中および検体中の Cofactor 濃度の違いにより, 測定値に変動が生じることが容易に推定し得る. この問題を解消すれば, 前述のごとく反復流産での抗 PL 抗体測定の臨床的意義は非常に高いため, この抗体の測定が広く普及し, 種々の臨床例が蓄積されていくことと考えられる.

今回検討した MESACUP カルジオリピンテストは, 抗 PL 抗体の代表として IgG クラスの抗 CL 抗体を測定するキットとして市販されるもので, 図1, 2, 表1のごとく定量性, 再現性とも満足できるキットであり, 正常妊婦 125 例の測定値から, 正常値域は 4.92U/ml 以下となり E. N. Harris らを中心とした KAPS (Kingston Anti-Phospholipid Antibody Symposium) の提唱している 5GPL/Unit (=5U/ml) とほぼ一致していた[20].

本キットは, IgG クラスの抗 CL 抗体のみを検出するシステムであることから, IgM クラス抗 PL 抗体単独陽性例の検出ができず, IgG, IgM 各6種類の抗 PL 抗体を測定する自験法と比べ検出率が低いことが予測されたが, 全症例での一致率は 85 % (22／26) とほぼ満足できる結果であった.

また, MESACUP カルジオリピンテストの IgG 抗 CL 抗体測定値は, 図4の通り抗核抗体陽性, APTT 延長例で有意に高値を示し, 低補体例で高値を示す傾向がみられ, 従来の報告と一致していた. 更に, 治療により生児を得た症例において IgG 抗 CL 抗体価が治療後正常値の範囲まで低下しており, 臨床的に有意義なキットであると考えられた.

また, 本キットは, 検体希釈液中にリン脂質の抗原性に共役する Cofactor の粗精製物が過剰量加えられており, 検体中の Cofactor 濃度に影響されない安定した測定結果が得られるものと考えられる.

以上のように今回の検討で, MESACUP カルジオリピンテストによる IgG 抗 CL 抗体測定は, 臨床的に充分有用である可能性が示唆された. すなわち, 本来抗 PL 抗体の測定は多種類の抗 PL 抗体を測定すべきであるが, 自験法のように 12 項目の抗 PL 抗体を測定することは, 一般施設では困難であり, よって日常検査として抗 PL 抗体測定に MESACUP カルジオリピンテストによる IgG 抗 CL 抗体測定を用いることは有意義であると考えられた.

## 文　献


1) Branch, D. W.: Immunologic disease and fetal death, Clin. Obst. Gyncol., 30: 295, 1987
2) Harris, E. N., Chan, J. K. H., Asherson, R. A., Aber, V. R., Gharavi, A. E. and Hughes, G. R. V.: Thombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia, Arch. Intern. Med., 146: 2153, 1986
3) Gharavi, A. E., Harris, E. N., Asherson, R. A., et al.: Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specifcity, Ann. Rheum. Dis., 46: 1, 1987
4) Hayashi, Y., Aoki, K., Kunimatsu, M., Sasaki, M. and Yagami, Y.: A sensitive assay for antiphosphatidyl ethanolamin antibody in patients with recurrent fetal loss, Acta. Obst. Gynaec. Jan., 42: 1565, 1990
5) 八神喜昭, 青木耕治：抗リン脂質抗体症候群と不育症, 産婦の世界, 42：417, 1990
6) 青木耕治：自己免疫疾患の評価, 臨婦産, 45：59, 1991
7) 橋本博史, 他；多施設共同研究による抗リン脂質抗体の臨床的検討一第一報, 厚生省特定疾患系統的脈管傷害調査研究班平成元年度合同シンポジウム報告書, 26, 1990
8) Moore, J. E., Mohr, C. F.: Biologically false positive serologic test for syphilis, J. Am. Med. Assoc., 150: 467, 1952
9) Harris, E. N., Gharavi, A. E.,Hughes, G. R. V.: Antiphospholipid antibodies, Clin. Rheum. Dis., 11: 591, 1985
10) Harris, E. N., Gharavi, E. A., Boey, M. L., et al.: Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thromb osis in systemic lupus erythematosus, Lancet, 2: 1211, 1983
11) Hughes, G. V. R., Harris, E. N., Gharavi, E. A.: The anticardiolipin syndrome, J. Rheumatol., 13: 486, 1986
12) Harris, E. N., Hughes, G. V. R., Gharavi, A. E.: Antiphospholipid syndrome, J. Rheum., 26: 324, 1988
13) Gleicher, N., El-Roeiy, A.: Reproductive

autoimmune failure syndrome, Am. J. Obstet. Gynecol., 159: 223, 1988
14) Branch, D. W., Rote, N. S., Dostal, D. A., et al.: Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine, Clin. Immunol. Immunopathol., 42: 63 1987
15) Harris, E. N., Chan, J. K. H., Asherson, R. A., et al.: Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopeneia: predictive value of the anticardiolipin antibody test, Arch. Intern. Med., 146: 2153, 1986
16) Meyer, O., Piette, J. C., Bourgeois, P., et al.: Antiphospholipid antibodies: a disease marker in 25 patient with antinuclear antibody negative systemic lupus erythematosus (SLE). Comparison with a group of 91 patients with antinuclear antibody positive SLE, J. Rheumatol., 14: 502, 1987
17) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Patel, S. P., et al.: Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1988, Clin. Exp. Immunol., 68: 215, 1987
18) Galli, M., Comfurius, P., Maassen, C., Hemker, H. C., et al.: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor, Lancet, 30: 1544, 1990
19) Mcneil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N. and Krills, S. A.: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: B2-Glycoprotein I (apolipoprotein H), Proc. Natl. Acod. Sci. USA. 87: 4120, 1990
20) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Hughes, G. R. V., et al.: Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization, (letter) Arthritis Rheum 30: 835, 1987

## Anti-cardiolipin antibody in patients with recurrent fetal loss: measured by mesacup cardiolipin test

Koji Aoki, Yayoi Hayashi,
Yukie Hirao, Yasuhiko Ozakl,
Shoji Kajiura, Masahiko Mizuno,
Toshihiko Mizuno, Manami Yoshikawa,
Toshihiro Kimbara and Yoshiaki Yagami

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagoya City University Medical School,
Nagoya 467, Japan

In recent years, anti phospholipid antibody (anti PL antibody) is paid attention to as a cause of recurrent fetal loss. We got a test kit named MESACUP CARDIOLIPIN TEST for detecting IgG anti cardiolipin antibody (anti CL antibody) as one of anti PL antibody. In this report we will show the clinical significance of the kit.

This kit had sufficient dilution liniarity and good reproducibility; i. e. C. V.=5.4～6.9% in intraassay and C. V.=8.1～8.7% in interassay respectively. Normal range of IgG anti cardiolipin antibody, mesured by this kit using 125 samples from normal pregnant women, was less than 4.92U/ml. The result about the patients with recurrent fetal loss agreed with our results of 6 IgG anti PL antibodies and of 6 IgM anti PL antibodies by 85% in total (22/26), antibodies which we mesured by standard ELISA system. In case of antinuclear antibody (ANA) positive or delayed APTT, it showed higher value significantly ($p<0.05$). Furthermore, it seemed that the anti CL antibody value, in the patients with recurrent fetal loss who could get a baby by the treatment, tend to go down until normal range after treatment. Therefore, this kit was clinically available to mesure the anti CL antibody (as one of anti PL antibody) value in patients with recurrent fetal loss.

(受付:1991年2月28日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# Microprolactinomaの長期手術成績
## —不妊患者に対する治療効果について—

# Surgical Results of Microprolactinoma
## —On Surgical Outcome of Infertile Patients—

広島大学脳神経外科
広畑泰三　魚住徹　向田一敏
Taizo HIRTOHATA　Tohru UOZUMI　Kazutosi MUKADA
矢野隆　恩田純
Takasi YANO　Jun ONDA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Hiroshima University, Hiroshima 734, Japan

我々は47例のmicroprolactinomaを有する不妊患者に対する経蝶形骨洞手術の長期手術成績を検討した(追跡期間57カ月)．術後排卵性月経の回復は38例(81％)に認められ，回復までの期間は平均5.6ヵ月であった．そして，38例中32例は最終追跡時にも規則的月経が続いた．術後血中PRL値が正常化した29例(62％)においては28例に自然妊娠が成立し，26例に分娩が達成できた．正常化しなかった18例(38％)でも，6例に自然妊娠が成立し，5例に分娩が達成できた．また，ブロモクリプチン投与により7例に妊娠が成立し，6例に分娩が達成できた．全症例中6例はいまだ妊娠が成立していない．下垂体前葉機能の障害は半数以上で追跡中に正常化が認められた．microprolactinomaを有する不妊患者に対して，経蝶形骨洞手術だけでも十分な長期間にわたる治療効果が得られることが確認された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 607—611, 1991)

### 緒　言

直径1 cm以下のいわゆるプロラクチン産生下垂体微小腺腫(microprolactinoma)を有する不妊患者に対して，ブロモクリプチン(BC)による治療は，腺腫を根治こそできないものの高率に高プロラクチン(PRL)血症を是正して治療目的を達成できる普遍的な治療となっている．一方経蝶形骨洞手術は唯一腺腫の根治が可能な治療法であるが，言わば機能的手術として位置付けられるべきものであり，第一に心掛けなければならない問題は下垂体前葉機能の温存である．下垂体前葉機能の温存がなければ，治療目的は達成されない．しかし，手術治療の合併症である下垂体前葉機能の障害の程度や治療目的である術後の妊娠分娩の達成についての検討が少ないため，患者を紹介する側である産婦人科医の信頼に十分応えていないと思われる．そこで今回我々は，手術療法の最大の利点である治療の根治性を中心に，microprolactinomaを有する不妊患者に対して行った手術成績を長期追跡により検討したので報告する．

### 対象と方法

1979年4月から1989年12月までの過去約10年間に当施設で手術を施行したmicroprolactinomaは70例である．このうち術後1年以上追跡できた47例の不妊患者を対象とした．追跡期間は術後12ヶ月から117ヶ月までであり，平均追跡期間は57.0±4.6ヶ月(Mean±SE)である．対象症例の年齢は19歳か

ら37歳までであり，平均年齢は28.8±0.6歳である．

手術後の血中PRL値の正常化の判定は，術後第1日目から10日目までの間に複数個（2－10個）測定された早朝空腹時の血中PRL値のいずれもが25ng/ml以下の場合のみを術後正常化と判定した．また，原則として魚住らの方法に従い[1]，術前，術後10日から14日目の間，1ヵ月，3ヵ月，6ヵ月，1年，以後は1年毎にわたり下垂体前葉機能負荷試験を行った．

47症例のうち術後血中PRL値が正常化した29例(62％)をgroup A，正常化しなかった18例(38％)をgroup Bと分類して検討した．

## 結　果

1）術前症状

全例無月経であったが，40例は未妊婦であり，7例は第1子分娩後の無月経であった．無月経の期間は4ヵ月から216ヵ月であり，平均46.5±5.5ヵ月であった．術前血中PRL値は80ng/mlから620ng/mlで，平均230.8±19.6ng/mlであった．

2）術後血中PRL値

47症例の術後血中PRL値の平均値は42.7±11.5ng/mlであった．正常化したgroup A 29例の術後血中PRL値の平均値は9.7±1.2ng/mlであり、正常化しなかったgroup Bの術後血中PRL値の平均値は95.9±25.7ng/mlであった．

3）排卵性月経の回復

排卵性月経の自然回復は47例中38例（81％）に得られた．これらの術直後血中PRL値は平均17.7±3.1ng/mlであった．BCによる回復は8例（28％）であった．これらの術直後血中PRL値は平均109.3±26.3ng/mlであった．

術後より月経の自然回復までの期間は，1ヵ月から25ヵ月までであり，平均5.6±0.9ヵ月であった．

4）妊娠分娩の達成

(1)group Aにおける妊娠分娩の達成と最終追跡時の月経（Fig. 1）

術後血中PRL値が正常化したgroup A 29例では，すべてに月経の自然回復を認めた．このうち自然妊娠が成立したのは28例（97％）であり，26例において分娩が達成できた．しかし，1例においては，今だ妊娠が成立していない．追跡時の最終月経では，25例に規則的月経が続いており，分娩直後のため3例が月経異常をきたしている他は，不規則月経となったのは1例のみであった．

(2)group Bにおける妊娠分娩の達成と最終追跡時の月経（Fig. 2）

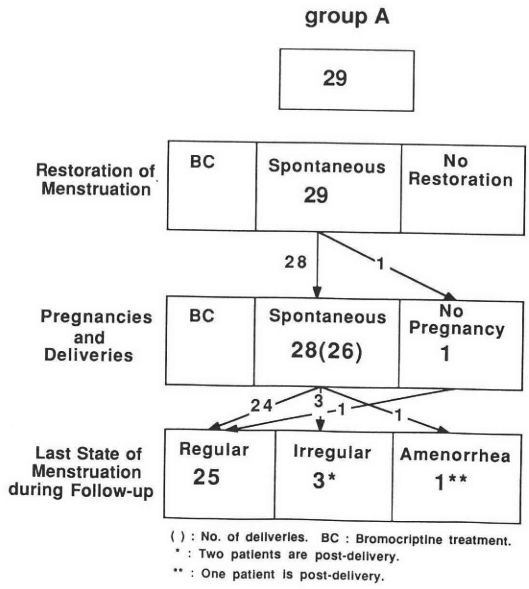



Fig. 1 Flowchart outlining postoperative course and selection of group A patients.
Group A (n=29) consists of patients with normalization of PRL levels after surgery.

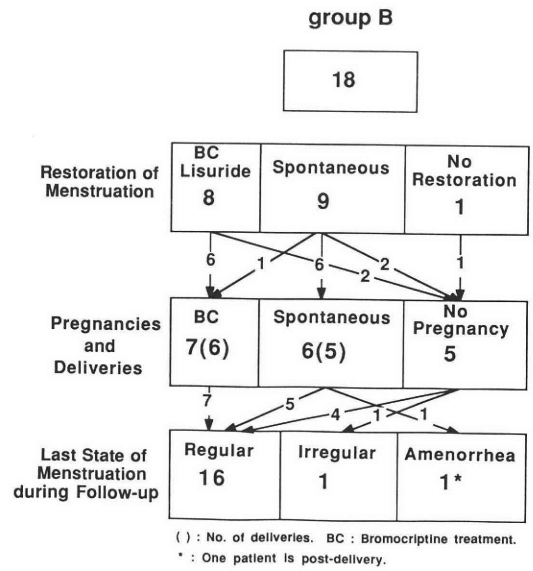



Fig. 2 Flowchart outlining postoperative course and selection of group B patients.
Group B (n=18) consists of patients with persistent hyperprolactinemia after surgery.

術後血中PRL値が正常化しなかったgroup B 18例では，9例に月経の自然回復を認め，8例がBC(Lisurideによる1例を含む)により回復を認め，1

例は副作用のためBCを投与できずに回復を認めなかった．自然回復を認めた9例のうち，6例は引き続いて妊娠が成立し，5例に分娩が達成できた．1例は妊娠成立のためにBCが必要となり分娩を達成した．残り2例はいまだ妊娠が成立していない．BCにより月経が回復した8例では，6例において引き続き妊娠が成立し5例に分娩が達成できたが，残り2例はいまだ妊娠を達成していない．追跡時の最終月経では，16例において規則的月経が続いているが，BC (Lisurideによる1例を含む)により月経の回復をみたが妊娠していない2例と，BCにより妊娠が成立した7例の合計9例は，BCなしでは月経異常が再発するため，BCから離脱できていなかった．

以上の結果より挙児希望者47例のうち，手術のみで術後月経が自然回復し，かつ自然妊娠分娩まで達成できたのは31例(66％)であり，術後BCを使用することにより47例中37例（79％）に妊娠分娩が達成できた．妊娠総数は64回，分娩総数は53回であった．また，術後排卵性月経の自然回復の認められた38例のうち，3例(group A 1例，group B 2例）は妊娠していないが規則的月経が続いており，29例（group A 24例，group B 5例）は，複数の妊娠分娩を経過した後にも規則的月経が続いていた．従って，全症例でみると，手術だけで月経の自然回復がみられた後にも規則的月経が続いていたのは47例中32例（68％）であった．

5）下垂体前葉機能

下垂体機能の障害の推移を検討するため，術後3ヵ月以上にわたり下垂体前葉機能で推移が追跡できた41例につき検討した．

(1）術前から障害されていたホルモンの推移

(Table 1)

術前から障害されていた下垂体前葉ホルモンの頻度を見ると，GH (growth hormone)11個，LH (leutenizing hormone) 5個，Cortisol 4個，TSH (thyroid stimulating homone) 2個，FSH (follicle stimulating hormone) 2個の順に多く認められた．このうち追跡中に正常化したのは，GH 6個(55％)，LH 4個（80％)，Cortisol 4個（100％)，TSH 2個（100％)，FSH 2個（100％）であり，24個中18個（75％）が追跡中に正常化を認めた．GHでは，術前からの障害が術後においても改善が悪かった．

(2）術後新たに障害されたホルモンの推移

(Table 2)

術後新たに障害された下垂体前葉ホルモンの頻度を見ると，GH12個，LH 8個，TSH 4個，Cortisol 2個の順に多く認められた．このうち追跡中に正常化したのは，GH 7個（58％)，LH 7個（88％)，TSH 2個（50％)，Cortisol 2個（100％）であり，26個中16個（62％）が追跡中に正常化を認めた．GHとTSHでは，術後新たに生じた障害の改善も悪かった．

以上の結果から，個々のホルモンで検討すると前葉機能の障害は，術前からの障害，術後からの障害を問わず，GHが一番多く，しかも術後長期追跡して

Table 1　Changes of disturbed hormones before surgery

| | No. of disturbed hormones (%) | |
|---|---|---|
| | Disturbed before surgery | Normalized during follow-up |
| GH | 11 | 6 ( 55) |
| Cortisol | 4 | 4 (100) |
| TSH | 2 | 2 (100) |
| LH | 5 | 4 ( 80) |
| FSH | 2 | 2 (100) |
| | 24 | 18 ( 75) |

Table 2　Changes of disturbed hormones after surgery

| | No. of disturbed hormones (%) | |
|---|---|---|
| | Disturbed after surgery | Normalized during follow-up |
| GH | 12 | 7 ( 58) |
| Cortisol | 2 | 2 (100) |
| TSH | 4 | 2 ( 50) |
| LH | 8 | 7 ( 88) |
| FSH | 0 | 0 |
| | 26 | 16 ( 62) |

Table 3　The patients with disturbed anterior pituitary functions

| No. of disturbed hormones | | | No. of patients | |
|---|---|---|---|---|
| before surgery | | after surgery | | |
| 0 | → | 1 | 3 | Deteriorated 21% |
| 2 | → | 1 | 3 | Improved |
| 3 | → | 2 | 1 | 29% |
| 1 | → | 1 | 6 | No change |
| 2 | → | 2 | 1 | 50% |
| | | | 14 | |

も改善しにくいことが判明した.

(3) 症例別にみた障害ホルモンの推移

(Table 3)

47症例のうち,10例では術前後の障害された下垂体前葉ホルモンがなかった.23例では術前後で障害された下垂体前葉ホルモンがあったが,追跡中に正常化が認められた.14例では障害された下垂体前葉ホルモンが残存した.Table 3に示したように,術後悪化した症例(術前後で障害されたホルモン数が増えたもの)は21%,改善したものは29%,不変だったものは50%であった.また14例中12例(86%)では,残存した障害ホルモン数は,わずか1個にすぎなかった.下垂体機能低下のため補充療法を必要とした症例は1例もなかった.

## 考　察

現在,不妊を主訴としたmicroprolactinoma患者に対しては,BCを中心とした薬物療法のみで治療するのが主流になりつつある[2].その第1の理由は,BC療法のもつ治療効果の即効性と確実性である.早く挙児を得たい患者に対して,誰が行なっても比較的早く確実に高PRL血症を是正できる.第2の理由は,治療の安全性である.手術療法で問題となる下垂体前葉機能がおこる心配がないこと,BC投与により妊娠した場合,投与を中止しても妊娠中の腺腫の増大の可能性がほとんどないこと[3],妊娠中のBC投与による催奇形の危険性は現在のところないとされていることなどである[4].第3の理由は,治療継続の意義が薄らいでいることである.即ち,microprolactinomaの自然経過が徐々に解明されてきて,未治療の腺腫が増大する可能性は少なく[5],未婚者とは違って,不妊患者においてmicroprolactinomaを完治させる必要性に疑問が生じてきたことである.

一方,手術療法もすぐれた治療効果をもたらすことが報告されてきたが,その多くが治療効果を術後血中PRL値の正常化をもって判断されており,手術療法の最大の長所である根治性について,詳細な長期追跡から検討した報告は少ない[6〜8].現在の所,microprolactinomaが将来増大するかどうか見極める方法がなく,また,長期間の高PRL血症が生体に及ぼす悪影響について解釈されていないため,根治の必要性についても今一度考え直す必要があると思われる.

自験例での検討では,microprolactinoma患者に対する手術治療により術後血中PRL値正常化が62%に得られた.また,排卵性月経の自然回復は47例中38例(81%)に得られたが,BCによる排卵性月経の自然回復率と比較しても遜色がないものと思われる.

次に不妊患者の妊娠分娩の成立状況であるが,手術のみで術後月経が自然回復し,かつ自然妊娠分娩まで達成できたのは66%であり,術後BCを使用することにより79%において妊娠分娩が達成できた.また,術後排卵性月経が自然回復した38例中32例は,複数回の妊娠分娩を経過した後にも規則的月経が続いており,全体として47例中32例(68%)が手術だけで根治したものと考えられる.手術療法において問題とされる下垂体前葉機能の障害に関しても,術前術後を通して障害されているホルモンは半数以上が正常化しており,残存した障害ホルモン数も大半が1個のみであり,障害の程度は軽度であった.

## 結　論

経蝶形骨洞手術を施行した47例の不妊を主訴としたmicroprolactinoma患者の術後の追跡調査を行ない以下の結論を得た.

1) 術後血中PRL値の正常化は62%に得られた.

2) 術後排卵月経の自然回復は81%に得られた.

3) 経蝶形骨洞手術だけで68%に根治が得られた.

4) 手術合併症としての下垂体前葉機能の障害の程度は軽度であった.

5) microprolactinomaを有する不妊患者に対して経蝶形骨洞手術だけでも,充分に治療目的を達成でき,長期間にわたる治療効果が期待できる.

## 文　献

1) 魚住　徹,森信太郎,渡辺　優,滝本　昇,最上平太郎,大西利夫,橋本琢磨,宮井　潔,熊原雄一:下垂体およびその近傍腫瘍の内分泌学的検討(第3報),脳外,4:143,1976

2) Molitch, M. E.: Pregnancy and the hyperprolactinemic woman, N. Engl. J. Med., 312: 1364, 1985

3) Gemzell, C., Wang, C. F.: Outcome of pregnancy in women with pituitary adenoma, Fertil. Steril., 31: 363, 1989

4) Turkalj, I., Braun, P., Krupp, P.: Surveillance of bromocriptine in pregnancy, JAMA, 247: 1589, 1982

5) Weiss, M. H., Teal, J., Gott, P., Wycoll, R., Tadley, R., Apuzzo, M. L., Giannotta, S. L., Kletzky, O., March, C.: Natural history of microprolactinomas: Six-year follow-up, Neurosurg., 12: 180, 1983

6) Laws, E. R., Fode, N. C., Randall, R. V., Aboud, C. F., Coulam, C. B.: Pregnancy following

transsphenoidal resection of prolactin-secreting pituitary tumors, J. Neurosurg., 58: 685, 1983
7) Landolt, A. M.: Surgical treatment of pituitary prolactinomas: postoperative prolactin and fertility in seventy patients, Fertil. Steril., 35: 620, 1981
8) Woolsey, R. E., King, J. S., Talbert, L.: Prolactin-secreting pituitary adenomas: Neurosurgical management of 37 patients, Fertil. Steril., 37: 54, 1982

## Surgical results of microprolactinoma —On surgical outcome of infertile patients—

Taizo Hirohata, Tohu Uozumi, Kazutosi Mukada, Takasi Yano and Jun Onda

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Hiroshima University, Hiroshima 734, Japan

We reviewed long term surgical results in 47 infertile patients with microprolactinoma who had undergone transsphenoidal surgery. Mean follow-up period was 57 months. Spontaneous restoration of menstruation was noted in 38 (81%) patients, and mean duration of restoration after surgery was 5.6 months. 33 patients had regular menstrual cycles during the follow-up period. Of 29 (62%) patients with postoperative normalization of PRL levels, 28 became pregnant, of whom 26 had subsequent delivery by surgery alone. Of 18 (38%) patients with non-normalized PRL, 6 became pregnant and 5 had subsequent delivery by surgery alone, and 7 became pregnant using Bromocriptine, and of whom 6 had subsequent delivery. 6 of all patients did not become pregnant. Over half of the disturbed anterior pituitary hormones became normalized during follow-up. Transsphenoidal surgery alone provides satisfactory long-term cure for infertile patients with microprolactinoma.

(受付:1990年9月7日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 不妊症治療ならびに安胎薬として漢方方剤を投与した分娩200例の予後の臨床的研究

# Clinical Study of Prognosis of 200 Deliveries after Kampo-treatment for Ovarian Dysfunctional Infertilities and Tocolysis

医療法人 假野クリニック
假野隆司
Takashi KANO

Kano Clinic, Osaka, 541, Japan

市立枚方市民病院産婦人科
伊藤親昭　笠松源　宮脇義隆
Chikaaki ITO　Hajime KASAMATSU　Yoshitaka MIYAWAKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hirakata City Hospital, Hirakata, 573, Japan

卵巣機能不全不妊症に随証療法を行ない，妊娠が成立，少なくとも18週まで安胎薬として当帰芍薬散を処方，分娩までの経過が把握できた200例の妊娠年齢，分娩週数，出生時体重，男女比率ならびに妊娠後期の合併症について同時期に分娩した妊娠中にいかなる漢方薬の投与も受けていない自然妊娠200例をコントロールとして比較検討した．

妊娠時の年齢は漢方妊娠安胎薬群が有意に高齢であった．漢方妊娠安胎薬群の流産率(19例，8.7％)は自然妊娠群（21例，9.5％）と有意差なかった．漢方妊娠安胎薬群のSFD出生率（1例，0.5％），妊娠貧血（28例，14.1％），妊娠中毒症（5例，2.5％）の発症率はいずれも自然妊娠群と比較して有意に低率であった．この結果，1）卵巣機能不全不妊症の薬物療法は漢方方剤をfirst choiceとし，その運用は随証療法を原則とすべきである．2）妊娠初期から中期にかけて投与した当帰芍薬散は胎児発育に好影響を与え流産，早産，SFDを予防するとともに妊娠後期合併症である妊婦貧血，妊娠中毒症を予防する安胎薬効果があると結論された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 612—620, 1991)

## 緒　言

漢方薬が卵巣機能不全不妊症に有効なことは臨床的に広く認知[1~3]されるとともに，作用機序の西洋医学的解明[4~8]も進んできた．また同時に安胎薬としての当帰芍薬散の有効性も明らかになってきた．

もともと不妊症妊娠は自然妊娠に比して流産が多いなど予後が悪いことは経験的に知られており，婦人の晩婚化が進む社会的状況のなかで必然的に不妊症患者も高齢化，流産，早産，妊娠後期の合併症のリスクがさらに高まり，不妊症治療薬ならびに安胎薬としての漢方薬への期待が高まっている．

しかし，不妊症治療薬として漢方薬を投与して妊娠が成立，その後続けて安胎薬として当帰芍薬散を処方した症例の妊娠の予後や妊娠後期の合併症に対する報告は皆無といっていい．

假野クリニックでは1984年の開院以来，卵巣機能不全不妊症に漢方方剤を投与して妊娠が成立，引続

いて安胎薬として当帰芍薬散を投与，分娩までの経過を把握できた症例が200例を数えたので，同時期に分娩した自然妊娠200例をコントロールとして，妊娠の予後ならびに妊娠後期合併症の発症率について臨床的な検討を行った．また妊娠初期に偶発した疾病に対して漢方方剤を投与した例の予後も併せて検討した．

## 対象と方法

1984年3月から1990年3月までに卵巣機能不全不妊症（卵管異常や造精機能障害を含み唯一の不妊の原因とは限らない．ただし両側卵管完全閉鎖例や無精子症は除外）の診断で卵胞機能賦活を目的として，体形体格，腹診，自覚症状，便通などから「証」[2]を決定して随証漢方療法を行ない，妊娠が成立，その後，少なくとも妊娠18週まで(里帰り分娩の21例は31週まで，さらに20例は分娩主治医の許可を得て分娩入院前日まで服用．71例は感冒をはじめとする偶発症に対して各種漢方方剤を投与した）安胎薬として当帰芍薬散を投与，その後の妊娠経過ならびに分娩経過が完全に把握できた200例を対象として分娩週数，出生時体重，性別，妊娠中毒症，貧血の合併を調査，同時期に市立枚方市民病院産婦人科で分娩した妊娠中に如何なる漢方方剤の投与も受けなかった無作為抽出の自然妊娠200例と比較した．

漢方方剤はツムラエキス顆粒を原則として7.5gを毎食30分前に投与した．

以上の400例は妊娠以前に腎疾患，高血圧，貧血の既往はない．妊婦貧血の診断基準はヘモグロビン濃度11.0g/ml未満[9]とし，妊娠中毒症は浮腫，蛋白尿，高血圧の一徴候以上を認める症例とした．

卵巣機能不全症は黄体機能不全症（BBT＋5～＋8 dayの血中Progesteroneが10ng/ml未満[10]），卵胞黄体機能不全症（BBT－3～0 Day[10]あるいはLHカラーが始めて陽性になった日[11]の血中estradiolが100pg/ml未満[10,11]ないし，最大卵胞径が15mm未満[11]，BBT＋5～＋8 Dayの血中Progesteroneが10ng/ml未満），無排卵周期症，第Ⅰ度無月経，第Ⅱ度無月経に分類した．

有意性の検定は，平均値はStuden's t-test百分率は$\chi^2$-testで行った．

## 結　果

妊娠例と同時期に卵巣機能不全不妊症に随証漢方療法を行ったのは885例であった．885例の「証」の分布は加味消遥散の470例（53.2％）が最も高率で，ついで当帰芍薬散，桂枝茯苓丸，温経湯，人参湯，柴胡桂枝乾姜湯の順であった（図1）．

885例中280例（31.6％）が妊娠したが，その内訳は満期生児分娩例が196例(70.0％)，早産，死産は4例（1.4％），流産は80例（28.6％）であった．流産の診断根拠は経腟プローベ超音波断層法でHeart beatを確認したのが4例(5.0％対流産)，GSを認めたもののHeart bestの確認に至らなかったのが10例(12.5％)，Normotex®が陽性を示したもののGSの確認までは至らなかったのが5例（6.3％）で，残りの61例（76.3％）はLuteal supplyの目的で1週間以内にHCG製剤の注射を受けていないにもかかわらず基礎体温の高温が16日以上持続し，基礎体温高温16日目にHCG-Testpack陽性か，10mIU/ml以上の血中HCG[12]を確認したのみの症例である（図2）．分娩例と同時期の自然妊娠群の流産は21例，(9.5％)であった．これらの妊娠の最低診断基準はスライド式HCG HAR test陽性であった．

方剤別の分娩率で最も高率であったのは当帰芍薬散28.6％で，次いで桂枝茯苓丸，人参湯，加味消遥散，柴胡桂枝乾姜湯と続き，温経湯が5.4％と最も低率であった．流産率は温経湯の16.2％が最も高率で，次いで柴胡桂枝乾姜湯，加味消遥散，人参湯，桂枝

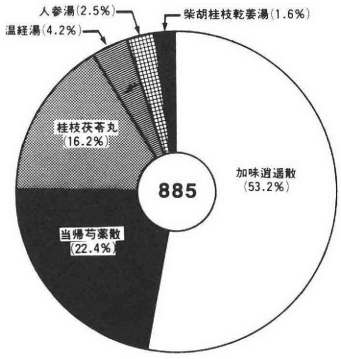



図1　卵巣機能不全不妊症の「証」の分布

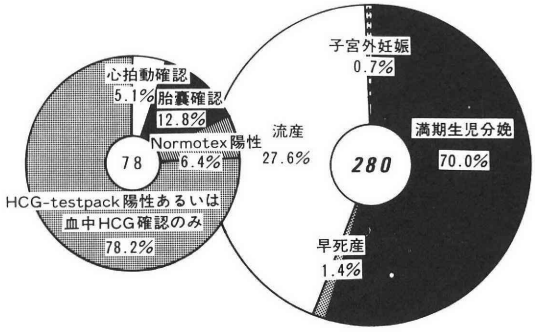



図2　漢方妊娠の予後

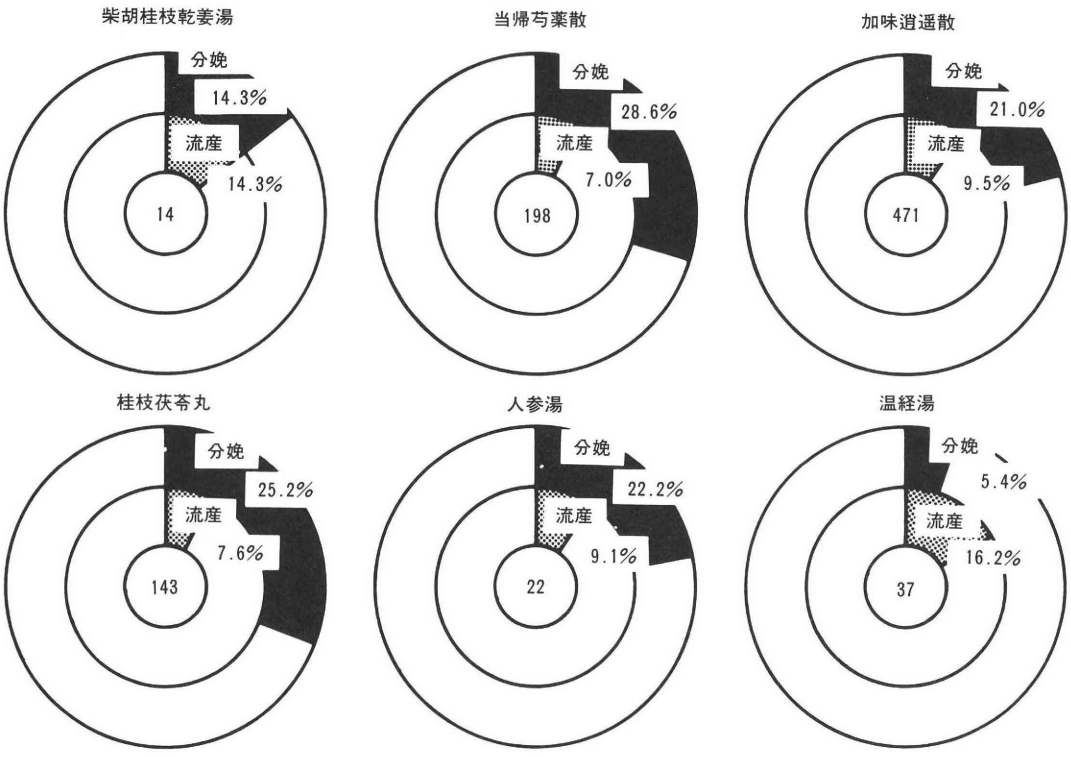



図3　方剤別分娩率と流産率

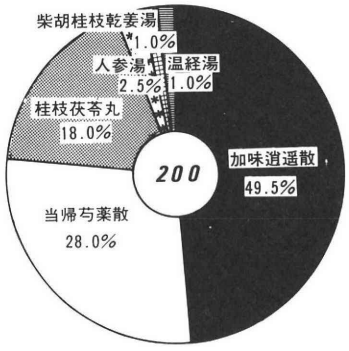



図4　分娩例に処方した漢方方剤

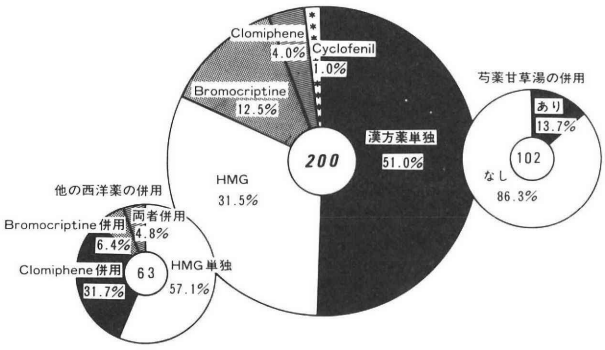



図5　卵胞機能賦活目的で漢方薬と併用した西洋薬

茯苓丸と続き，当帰芍薬散が7.0％と最も低率であった（図3）．

分娩例に処方した方剤は加味消遥散が99例（49.5％）と最も多く，以下，当帰芍薬散，桂枝茯苓丸，人参湯，柴胡桂枝乾姜湯，温経湯の順であった（図4）．

漢方薬単独は102例（51.0％）を占め，さらにこのうち14例は高Prolactin血症ないし潜在的高Prolactin血症[6]を合併したためBromocriptine療法を試みたものの悪心，嘔吐等の副作用のために同療法を断念，代用薬として芍薬甘草湯を併用している．西洋薬の併用はHMGが最も高率で，以下，Bromocriptine, Clomiphene, Cyclofenilの順であった（図5）．

方剤と卵巣機能不全の重症度との関係では，寒虚証に重症例が多く分布する傾向を認め，当然のこととして西洋薬，特にHMGの併用例が多かった．また高プロラクチン血症は寒虚証に高率で，Bromo-

criptine，芍薬甘草湯の併用例も多かった．

卵巣機能不全別の併用西洋薬は当然，重症になるに従いHMGの併用頻度が高率になったが，第Ⅰ度無月経に1例，第Ⅱ度無月経に3例漢方薬単独例が存在した．この4例はHMG療法を試みたがアレルギー（筋注局部の発赤，頭痛等）のため同療法を断念した症例である．

次に分娩例を検討すると，漢方妊娠安胎薬群の妊娠成立時の年齢は最年少19歳，最年長41歳，M±SDは31.9±4.2歳で，35歳以上が65例，32.5％を占めた．自然妊娠群は28.6±4.8歳で，漢方妊娠分娩群が有意（P＜0.01）に高齢であった（表1）．

漢方妊娠安胎薬群の原発続発別は原発69.0％，続発31.0％で，、続発の既往妊娠は分娩例が23例で，他は全て流産（最高7回）であった．

漢方妊娠安胎薬群の分娩週数は38.8±2.0週で，37.8±1.5週の自然妊娠群と有意差なかった（表1）．

漢方妊娠安胎薬群の出生時体重は3053±690gで，方剤別では当帰芍薬散証は桂枝茯苓丸，人参湯証と比較して有意に高値であった．男女比は男54.0％，女46.0％であった．自然妊娠群は3091±570g，男50.5％，女49.5％で，漢方妊娠安胎薬使用群と比較して有意差なかった（表1，図6）．

漢方妊娠安胎薬群の196例が満期分娩で，4例が早産（桂枝茯苓丸証2例，加味消遥散証2例）であった．このうち1例（桂枝茯苓丸証）は突然，心停止をきたした死産(29週，1100g，女児，外表奇形なし，当帰芍薬散は18週まで服用)であったが残り3例と全ての満期産例は本論文執筆時に発育順調であることを確認している．満期産の1例（桂枝茯苓丸証）に軽度の口蓋破裂を認めた（表1，図6）．

自然妊娠群では早産死産は存在しなかった．SFDは漢方妊娠安胎薬使用群では1例（0.5％）で自然妊娠群の8例（4.0％）と比較して有意（P＜0.05）に低率であった（表1）．

また，漢方妊娠群の治療期間と早産，死産，奇形との間に有意な関係は認められなかった．妊娠後期の合併症は，自然妊娠群の妊婦貧血は45例(22.5％，2例は入院治療を必要とした)，妊娠中毒症は31例

表1　漢方妊娠安胎薬群と自然妊娠群の分娩週数，男女比率，流産率，早死産率ならびにSFD出生率

| | 漢方妊娠安胎薬群 | 自然妊娠群 |
|---|---|---|
| 妊娠年齢 | 31.9±2.0歳** | 28.6±4.8歳 |
| 分娩週数 | 38.8±2.0週 | 37.8±1.5週 |
| 出生時体重 | 3050±690ｇ | 3091±570ｇ |
| 男女比率 | 男：54.0％<br>女：46.0％ | 男：50.5％<br>女：49.5％ |
| 流産率 | 19/219(8.6％) | 21/221(9.5％) |
| 早死産率 | 4/200(2.0％) | 0/200(0.0％) |
| ＳＦＤ出生率 | 1/196(0.5％)* | 8/200(4.0％) |

M±SD　＊：P＜0.05　＊＊：P＜0.01

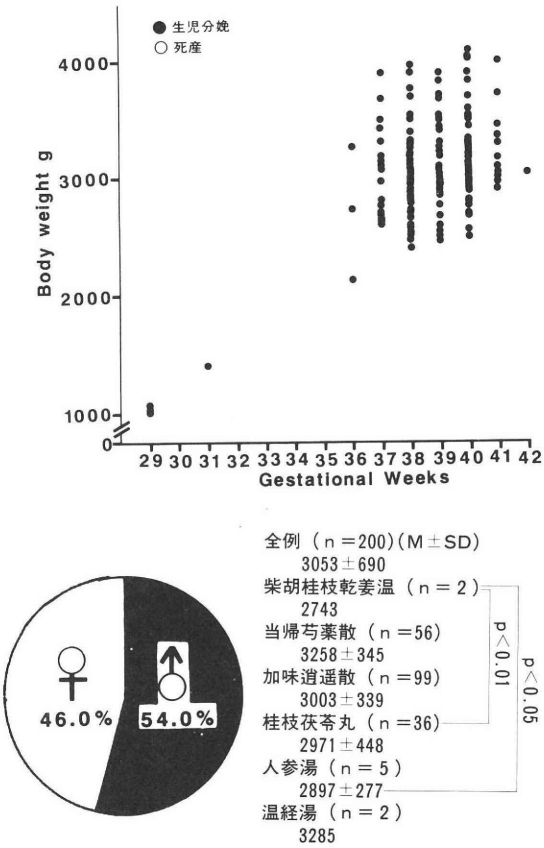



図6　漢方妊娠安胎薬群の生下時体重ならびに男女比率

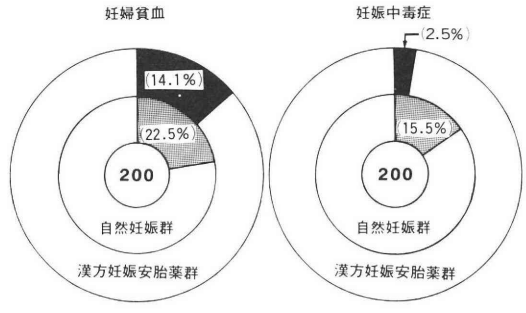



図7　漢方妊娠安胎薬群と自然妊娠群における妊婦貧血と妊娠中毒症の合併率

(15.5％，高血圧合併10例，5例は入院治療を必要とした）に認められたのに対して漢方妊娠安胎薬群は妊婦貧血は28例(14.1％,19週以上投与群は4例，9.7％)，妊娠中毒症は5例(2.5％，高血圧合併1例，19週以上投与群は1例，2.4％)で，ともに有意(P<0.05)に低率であった．入院治療を必要とする症例は存在しなかった（図7）．

妊娠偶発症に処方した方剤は葛根湯(感冒)，乙字湯（痔疾)，安中散（胃炎)，五苓散（妊娠悪阻，頭痛)，小青竜湯(感冒)，小半夏加茯苓湯(妊娠悪阻)，麦門冬湯(感冒)，猪苓湯(膀胱炎)，大黄甘草湯(便秘)，竹筎温胆湯(感冒)，桔梗湯(感冒)，小柴胡湯加桔梗石膏（感冒）であった．このなかで，小柴胡湯加桔梗石膏1例（20.0％)，大黄甘草湯2例（11.8％）がその後早産に至った（図8）．

## 考　察

最初に卵巣機能不全不妊症治療薬としての漢方方剤の効能を考察する．

漢方方剤の卵巣機能不全症に対する作用機序の西洋医学的解明は着実に進んできた．列挙すると，瘀血の改善による骨盤内循環動態の改善に基づくgonadotropine receptor responseの増加（当帰芍薬散，加味消遥散，桂枝茯苓丸）[1,2]．心因性反応の改善による間脳－下垂体系機能の賦活（加味消遥散）[1,2]．LH-RH分泌促進[4]，FSHの基礎値の増加およびLHパルスの回復[7](温経湯)．Suppressorとしてのtestosterone(芍薬甘草湯)[5]，prolactin分泌抑制（芍薬甘草湯，当帰芍薬散）[5,7]．低下した胃腸の消化吸収能を高め妊孕能アップに必要な物質の吸収の促進（人参湯）[2]などである．

それらの作用はいずれも排卵誘発剤と一括される西洋医学的卵胞機能賦活薬と比較すれば弱いが，homeostasisの改善を通じて妊孕性を向上する作用故，例えば，卵巣機能不全症のfirst choiceの薬物であるClomipheneのように頚管粘液を減少させHühner-testを悪化させるとか，子宮内膜の増殖を抑制して着床に不利な状況を生むとかいった，卵胞機能を回復させた結果新たな不妊の原因を作ってしまうといったマイナス作用がなく，また，「証」が合った症例には副作用がほとんどないといったように総合的に優れた薬物と考えられる．

しかし，西洋医学的に作用機序が明らかになってきたとはいっても「証」が合っていない症例では卵巣機能改善作用が大幅に低下することは疑う余地はなく[1~3]，その運用はあくまでも随証的になさればならない．

ところで，古来から不妊症には瘀血寒虚証の当帰芍薬散が代表的な方剤であったが，「傷寒論」，「金匱要略」の時代とは食料事情が大幅に好転，飽食の時代をむかえ，加えて文明の発達に伴ってストレスの質がこれまた大幅に変わった現代の日本にあっては精神活動を含めた体質は大幅に変化したと考えざるを得ず，不妊症には当帰芍薬散といったような画一

| 併用の有無 | 方剤名 | 症例数 | 早産死産奇形発生数 |
|---|---|---|---|
| なし 129/200(64.5%) | —— | —— | 2/129( 1.6%) |
| あり 71/200(35.5%) | 葛根湯 | 7/71( 9.9%) | 0/7( 0.0%) |
| | 乙字湯 | 2/71( 2.8%) | 0/2( 0.0%) |
| | 安中散 | 1/71( 1.4%) | 0/1( 0.0%) |
| | 五苓散 | 4/71( 5.6%) | 0/4( 0.0%) |
| | 小青竜湯 | 10/71(14.1%) | 0/10( 0.0%) |
| | 小半夏加茯苓湯 | 13/71(18.3%) | 0/13( 0.0%) |
| | 麦門冬湯 | 12/71(16.9%) | 0/12( 0.0%) |
| | 猪苓湯 | 2/71( 2.8%) | 0/2( 0.0%) |
| | 潤腸湯 | 5/71( 7.0%) | 0/5( 0.0%) |
| | 大黄甘草湯 | 17/71(23.9%) | 2/17(11.8%) |
| | 竹筎温胆湯 | 1/71( 1.4%) | 0/1( 0.0%) |
| | 桔梗湯 | 1/71( 1.4%) | 0/1( 0.0%) |
| | 小柴胡湯加桔梗石膏 | 5/71( 7.0%) | 1/5(20.0%) |

図8　漢方妊娠安胎薬群における妊娠初期の偶発症に服用した漢方方剤と早死産奇形発症率

的な「証」決定を現代の不妊症に当てはめるのは問題がある．すなわち，不妊症の「証」を現代的視点でいま一度再検討する必要に迫られているのである．となると，現代の卵巣機能不全不妊症はいかなる「証」を有する症例が多いのだろう？　今回の研究対象の885例では，腹診で胸脇苦満，瘀血圧痛，自覚症状では不眠，神経質，易興奮，鬱症状を訴える加味消遥散が圧倒的で，過半数の53.2％を占め，ついで瘀血寒虚証の当帰芍薬散，瘀血実熱証の桂枝茯苓丸と続く結果が得られた．

ところで，近年，間脳－下垂体系への作用で注目されている温経湯が低率であるのは当帰芍薬散と「証」が殆ど同じであるのに加えて，著者の過去の報告[2]で同方剤は妊娠率が低く流産率が高かったため，当帰芍薬散に変方したところ妊娠が成立した症例が相次いだため，当帰芍薬散を優先使用している事情のためである．

以上の「証」の分布から，現代の卵巣機能不全不妊症は寒虚証ではなく体力は比較的良好でストレス社会を反映して神経症的傾向を有する症例が過半数を占めることが明らかになった．

しかしながら，治療成績は加味消遥散は当帰芍薬散に劣った．我々はこの結果を「証」決定が誤っていたためと考えない．なぜなら，寒虚証の病態を改善（瘀血の改善による骨盤内の循環動態の改善[1,2]）すれば卵巣機能が正常化する当帰芍薬散証より間脳－下垂体系の異常の存在を推測せしめる加味消遥散証の方が卵巣機能不全の成因が複雑で重症であると考えるからである．HMG併用例が多かった事実もこの推測を裏付ける．したがって，このような症例では例え他の方剤に変方したとしても妊娠率が向上するとは考えにくい．

桂枝茯苓丸証が少ないのは卵巣機能不全不妊症は現代においても基本的に不妊症は寒虚証が多いという先人達の診断の正しさを支持しているといえよう．瘀血実熱証に桃核承気湯が有効との報告[3]があるが，著者はクリニック開設以前に桃核承気湯（8例），通導散（12例）を処方した経験を持つが，前者では妊娠が成立せず，後者では3例に妊娠が成立したが全て流産に終わった．桂枝茯苓丸に変方したところ，前者で2例，後者で3例（1例は流産）で妊娠が成立，生児を得た．不妊症は基本的には補剤という古来からの認識と以上の事実を考え併せると強力な瀉剤は不妊症には適さず，実熱症には桂枝茯苓丸までの運用でよいと考えられた．

ところで，先にも述べたように温経湯の間脳―下垂体系への作用が明らかになってきたため，時にはfirst choiseの漢方薬として使用される機会が多いと見聞するが，今回の研究でも分娩率が低く流産率が高かった．さらに同証に第II度無月経が有意に多い事実は認められなかったことから瘀血寒虚証の卵巣機能不全不妊症に前記の報告を根拠にあえて温経湯を処方する臨床的，漢方的必然性はなく同方剤をfirst choiseとすることは不妊臨床医としては賢明ではない．厳密な温経湯証を示す症例以外の瘀血寒虚証には当帰芍薬散を優先して処方すべきである．

「証」の分布が圧倒的に高率で妊娠率も当帰芍薬散と遜色ない加味消遥散がともすれば当帰芍薬散，桂枝茯苓丸，温経湯の影に隠れて不妊症治療薬として重要視されていないのはいかなる理由からであろうか？

現代の漢方医は大別して現代漢方派，日本伝統漢方派，中医派の三派に分れる．この中で日本伝統漢方派は「傷寒論」，「金匱要略」に重きをなす古方派と金元医学に重きをなす後世派に大別される．加味消遥散は後者の方剤である．我々は加味消遥散が軽んじられてきた理由としてエキス顆粒製剤が健保適応される以前は不妊症の漢方治療が主として古方派の漢方医によって展開されてきたことと関係が深いと考える．

いずれにしても，ストレスの渦の中の今日において，一種の現代病とも考えられる不妊症の漢方療法は今後，加味消遥散を中心に展開されるであろうし，これに当帰芍薬散，桂枝茯苓丸を加えた三方剤の随証運用で卵巣機能不全不妊症の大半はカバーされるだろう．つぎに安胎薬としての当帰芍薬散の効果について考察する．

安胎薬は妊娠中の流産，早産，妊娠悪阻，妊娠貧血，妊娠中毒症などの妊娠中の諸病を予防ないし治癒せしめ，妊娠の苦痛を除去し，母子共に良好な健康状態を維持して正常な出産に誘導させる薬物を意味するが，西洋薬にはこの全ての条件を満たす安胎薬は存在しない．

当帰芍薬散は金匱要略に「婦人懐妊，腹中疙痛，当帰芍薬散主之」と書かれ，古来より前述の条件を満たす安胎薬として頻用され，その効能は歴史的治験の風雪に耐えてきただけでなく，西洋医学的にも基礎[13]，臨床[14~18]両面でその効果が実証され始めている．

まず，安胎薬作用の中で流早産予防効果を考えると，当帰芍薬散は妊娠子宮収縮の抑制作用，$\beta_2$-stimulantのritodrineとの協同作業，さらにritodrineの副作用である頻脈の抑制作用を通じて流産，早産を予防する作用を有することが知られている[17]．ところで，自然妊娠の流早産の4週以降では流産は一般的

には全妊娠の10～15％程度[19~22]で不妊症妊娠は多くのケースで流産に対する治療が行なわれているにもかかわらず15～20％の高率[20,23]と報告されている．

今回の研究では自然妊娠では9.5％であったのに対し漢方妊娠安胎薬群では28.6％と明らかに高率であった．しかし，内容を詳細に検討すると，漢方妊娠安胎薬群の大半はHCGテストパックの垂直方向線の濃度が水平線と同等かそれ以下，あるいは100mIU/ml未満の血中HCGを確認したのみの従来では診断不可能だった超早期流産[12]で，従来からの一般的な妊娠診断基準であるスライド式HAR test陽性例，胎嚢確認，胎児心拍確認例は19例で，全妊娠を219例とすると，流産率は8.7％となり，自然妊娠群と有意差はなかった．

さらに，妊娠初期の流産は胎児心拍が確認されず，胎児心拍が証明されたその後の流産は1.3～3.7％と報告[23]され，初期流産は着床周辺期での胎芽の死亡が主体であると考えられている．今回の研究対象の胎児心拍確認例は4例で流産率は1.8％で，諸家の報告と差はない．いずれにしても今後は着床の事実を疑問視する考えからchemical pregnancy[24]とさえ称される超早期流産に対する対策が必要であろう．

早産の観点から考えると今回の研究では分娩週数および出生時体重には両群に有意な差は認められなかったものの，漢方妊娠安胎薬群では1例の死産を含む4例の早産が認められたのに対して，自然妊娠群では早死産は存在しなかった．したがって，早産予防という面で安胎薬効果がなかったように考えられるが，個々の症例を詳しく考察すると漢方妊娠安胎薬群の妊娠の予後が悪いとはいえない．なぜなら，もともと不妊症妊娠は自然妊娠に比較して予後が悪く流産が高率であることは先に述べたが，加えて今回の研究対象は自然妊娠群に比較して年齢が有意に高いため二重のリスクを背負っていたと考えられる．さらに，早産3例の基礎体温高温16日目の血中HCG値が140mIU/ml，177mIU/ml，192mIU/mlと200mIU/ml未満であった．200mIU/ml未満では流産に至る例が多いことは著者がすでに報告している[25]．

死産に至った1例も高温16日目の血中HCG値は170mIU/mlとこれまた200mIU/ml未満で，加わうるに子宮卵管造影で子宮腔内に鋸歯状の陰影欠損が認められた症例でprospectiveに着床の時点で予後が悪いことが予想される症例であった．以上の点を思慮すれば，当帰芍薬散は安胎薬として作用しなかったと考えるより，むしろ流産を阻止したという点で安胎薬としての機能を果たしたと積極的に評価してもよいだろう．

いずれにしても，今回の研究結果の中で当帰芍薬散の安胎薬としての効果を端的に証明したのは漢方妊娠安胎薬群で満期産未熟児が自然妊娠群の8分の1と有意に低率であった事実と以下に述べる妊婦貧血と妊娠中毒症予防作用であろう．

全ての妊婦は胎児胎盤系の鉄需要の増加と循環血液量の増加に基づく血液希釈によって鉄欠乏性貧血の傾向にあると考えられているが[26]，その病的限界を米国鉄欠乏委員会の勧告[9]であるヘモグロビン濃度11.0g/ml未満と定めると，いわゆる妊婦貧血は全妊婦の30％に達する[27]と考えられている．市立枚方市民病院における妊婦貧血の発症率は22.5％とそれより低率であったが，漢方妊娠安胎薬群では14.1％とさらに有意に低率であった．同群では入院を必要とする重症例は存在しなかった．

以上の事実から当帰芍薬散には妊婦貧血を予防する効果があり，その作用機序は同方剤が他の方剤と比較してFe含量はむしろ少量[28]であるため瘀血の改善に伴う胎児－胎盤系の循環動態の改善，ならびに電解質調整を基本としたhomeostasisの改善にあると推測される．一方の代表的妊娠後期の合併症である妊娠中毒症は全妊娠の約10％程度に認められるとされ，高血圧を伴うタイプは4～5％程度と考えられている[20,30]．今回の自然妊娠群では15.5％とやや高率であったが，漢方妊娠群ではわずか2.4％と有意に低率で，なかでも高血圧を伴った症例はわずか1例のみであった．さらに，入院治療を必要とした症例は自然妊娠群では5例存在したのに対して存在しなかった．

以上の事実から当帰芍薬散に妊娠中毒症を予防ないし治療する作用が存在することは明白である．

妊娠中毒症は漢方医学的には脾虚に生じやすく消化吸収が弱く，気や血が不足して体内に病的に水分を滞留偏在させやすくなって水毒症状を呈すると考えられている[16]．一方，西洋医学的には妊娠中毒症の病態の一つとして血液レオロジーの面から妊婦の生理的血液希釈障害が考えられているが[16]，このような状況のなかで安易に利尿剤を投与すると浮腫は改善されるものの循環血液量の現象とヘマトクリック値の上昇を助長し血液を濃縮させてかえって病態を悪化させる可能性が指摘されている．したがって，同方剤が駆瘀血作用と利水作用（利尿ではない！）を有する構成生薬が多いことから考えて水分電解質調節，循環動態を生理的方向に改善することで妊娠中毒症の発症を防いでいると思われる．

最後に妊娠偶発症に対する漢方方剤の安全性について考えてみる．

妊婦が感冒に罹患すると非妊婦より難治性であり，特に妊娠初期の治療は胎児に対する影響を恐れて大変困惑する．西洋薬の感冒薬ではピリン，非ピリン系，サリチル酸系の鎮痛解熱薬は胎児の消化器系，血液，血管に障害を生ずる可能性がありさらに骨格系の異常，無眼球症，口蓋破裂，小腎症の危険も指摘されている．抗ヒスタミン剤も動物実験で口蓋裂が発生する報告[31]があり，抗生物質も特有の催奇形性が報告されているし，鎮咳剤も安心とはいえない．

一方，漢方薬については香蘇散，桂枝湯，葛根湯，麻黄湯，柴胡桂枝湯，麦門冬湯，参蘇散等を妊娠初期に投与した場合その後の妊娠経過に異常がないと報告されている[32]．

今回の結果では小柴胡湯加桔梗石膏（扁桃炎に投与）で1例の早産が認められた以外には早産，死産は存在しなかった．早産例にしても先に述べたように着床の時点で問題があったと考えられ感冒に投与した漢方方剤が早産，死産と因果関係が合ったとは考えにくい．

また，便秘症は妊婦に高率に合併するが，大黄甘草湯に2例の早産が存在した．この件に関しても因果関係は見出せない．しかし，以上の2方剤は瀉剤であり，古来より妊婦には瀉剤の使用は慎重を期すと考えられてきたので，さらなる安全を期して妊娠偶発症の漢方治療法は自覚症状の「証」を重視した上で補剤を中心に運用すべきものと考えられた．

以上の結果より以下の結論が得られた．

1）卵巣機能不全不妊症の薬物療法は漢方方剤をfirst choiceとし，その運用は随証療法を原則とすべきである．

2）妊娠初期から中期にかけて投与した当帰芍薬散には胎児発育に好影響を与え流産，早産，SFDを予防し，妊娠後期の妊婦貧血，妊娠中毒症を予防する安胎薬効果がある．

3）感冒を初めとする妊娠初期の偶発症においては漢方療法の安全性は高いが，慎重を期して補剤を中心に運用すべきである．

## 文　献


1）假野隆司，西川　潔：更年期様不定愁訴を有する卵巣機能不全不妊症に対する漢方療法，日不妊誌，30：367，1985

2）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

3）河野高明：不妊症における漢方療法による妊娠成功例の検討，漢方診療，9：59，1990

4）三宅　侃，田坂慶一，大塚志郎，吉本泰弘，青野敏博，谷沢　修：間脳－下垂体連続還流システムによる温経湯のLH分泌機構の検討，日産婦誌，37：2821，1985

5）柳沼　忞，岡村　隆，竹内　享，西井　修，小林拓郎，福島峰子，藤盛亮寿，荒川　修，佐藤芳昭，竹内正七，岡村　泰，小林俊文，飯塚理八，北川浩明，桑原慶紀，水野正彦，飛鳥井邦夫，植村次雄，水口弘司，大沢雅己，成田　収，青野敏博，谷沢　修，玉舎輝彦，岡田弘二，森　宏之，木川源則，谷口一郎，肥田木孜：芍薬甘草湯(S-K)の高testosterone血症性婦人における血中androgens濃度の低下作用，排卵誘発効果と安全性－多施設協同研究，日不妊誌，33：606，1988

6）假野隆司，古殿正子：高プロラクチン血症および潜在的高プロラクチン血症に対する芍薬甘草湯療法，和漢医薬誌，6：530，1989

7）後山尚久，坪倉省吾，井本広済，山下英俊，岡崎　審，杉本　修：排卵障害例に対する温経湯の投与による内分泌変動について－ゴナドトロピンの律動性分泌を含めて－，日不妊誌，35：80，1990

8）假野隆司：芍薬甘草湯と比較した当帰芍薬散，加味消遙散，桂枝茯苓丸の高プロラクチン血性卵巣機能不全不妊症に対する作用，日不妊誌，36：414，1991

9）Comittee on Iron Deficiency: Iron Deficiency in the United States, JAMA, 203: 403, 1968

10）Kano, T.: 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. Fertail. Steril., 30: 5, 1985

11）假野隆司：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，日不妊誌，35：510，1990

12）假野隆司：筋注HCG製剤の血中HCG値およびHCGテストパックに及ぼす影響，日不妊誌，35：345，1990

13）油田正樹，秋山喜彦，市尾義昌，中村　厚，市川信男：当帰芍薬散のラットにおける催奇形性試験，応用薬理，23：981，1982

14）吉元昭治：当帰芍薬散の産科的治療－特にその安胎効果について－，産と婦，45：1720，1978

15）田川清和，小川郷美，河野　実，高木繁夫：妊娠貧血に対する当帰芍薬散の使用経験，産婦の世界，31：1010，1979

16）江口勝人，高知利勝，和田志保子，早瀬良二，関場　香：妊娠中毒症に対する当帰芍薬散の応用，産と婦，47：1157，1980

17）千村哲郎，北篠昌知，森崎伸之，太田　宏，船山達，島貫洋利，宮田禮輔，国井兵太郎，金杉　浩，立花義史，佐藤　聡，木原香織：切迫早産に対する当帰芍薬散の投与効果，産婦の世界，41：727，1989

18）関場　香，江口勝人，米沢　優：妊娠中毒症，産婦の世界増刊－新産婦人科の漢方－，P118，1990

19）倉智敬一：現代産婦人科大系，17A“流早産”，p21，中山書店，1974

20) 星　和彦，渡部清彦，佐藤　章：不妊治療後の妊娠と流産，産婦治療，56：280，1988
21) Alan D., Mary, L. P.: Evaluation and management of habitual abortion, Br. J. Hos. Med., 261, 1984
22) 浜田政男，中野仁雄：不育症とその原因，産婦治療，56：255，1988
23) 白水　巧，鈴木直行，植村次雄，塩島令儀：不妊外来妊娠成功例の妊娠，分娩経過の検討，日不妊誌，23：193，1978
24) Howard, W. J. Jr., Jeanne, M., Anibal, A. A., Bruce, A. S., Mason, C. A., Lucinda, V., Jario, E. G., Thera, W. W., Georgeanna, S. J., Charles, A. W., Themis, M. and George, L. W. Jr.: What is a pregnany? A quetion for program of in vitro fertilization, Fertil. Steril., 40: 728, 1983
25) 假野隆司，出馬淳名，伊藤正尚：BBT 高温16日の HCG 値による妊娠およびその予後の判定，日不妊誌，33：330，1988
26) 寺尾俊彦，真木正博：妊婦の貧血に対するクエン酸第一ナトリウム製剤の治療成績，産婦世界，40：863，1988
27) 古谷　博：妊婦の貧血に関する研究，第17回日本産科婦人科学会総会宿題報告要旨，P 69，1975
28) 田中　熟：妊娠貧血の漢方療法と微量元素，和漢医薬誌，6：528，1989
29) 鈴木雅洲：異常妊娠，産科学入門第6版，P 94，南山堂，1989
30) 荒井　清：異常妊娠，産科学改訂第2版，P 105，南山堂，1989
31) 森山豊監修：妊婦と薬－その影響と注意－，日本母性保護医協会編，南山堂，P 46，1978
32) 野口和夫：妊婦のかぜ症候群に対する漢方薬の使用経験，漢方診療，2：61，1983

## Clinical study of prognosis of 200 deliveries after kampo-treatment for ovarian dysfunctional infertilities and tocolysis

Takashi Kano

Kano Clinic, Osaka, 541, Japan

Chikaaki Ito, Hajime Kasamatsu and Yoshitaka Miyawaki

Department of Obstetrics and Gynecology, Hirakata City Hospital, Hirakata, 573, Japan

We gave Kampo-preatment to cases, diagnosed by "Zheng" with ovarian dysfunctional infertilities and conducted a comparison study of 200 deliveries in which pregnancy was established and TOUKI-SHAKUYAKUSAN as tocolytic drug, with 200 spontaneouly pregnant deliveries as the control. Age at pregnancy was significantly higher in the Kampo-treated group. There was no significant difference in abortion rate between the Kampo-pregnant group (19 cases, 8.7%) and the spontaneouly pregnant group (21 cases, 9.5%). The Kampo-tregnant group showed a significantly lower SFD birth rate (1 case, 0.5%), anemia of pregnancy (28 cases, 14.1%) and toxemia of pregnancy (5 cases, 2.5%) than did the spontaneously pregnant group. Those results indicated (1) that Kampo-agents should be first choice in pharmacotherapy for ovarian dysfunctional infertilities and (2) that the usage should be according to Kampo-treatment diagnosed by "Zheng" as a rule. It was concluded that TOUKISHAKUYAKUSAN administrated from early pregnancy to middle stage of pregnancy has the effect of a tocolytic drug to favorably influence the growth of the fetus and to prevent anemia and toxemia of pregnancy, which are complications at later stages of pregnancy, as well as abortion, premature labor, and SFD.

(受付:1990年11月17日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# EFFECT OF UNKEITO ON HYPOTHALAMIC LH-RH, PITUITARY LH AND FSH IN IMMATURE FEMALE RATS

Takao KOYAMA, Yoshitaka SHIMOJI, Motohiro OHARA,
Teruhito YAGUCHI and Takeshi ASO

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

**Abstract:** Sixty-two immature female rats were treated with Unkeito beginning at 23 days of age (1 g/kg of body weight per day by using feeding tube) and continuing during experimental sessions. Presence of tubal ova, LH-RH level in hypothalamus, LH and FSH levels in pituitary gland were examined on the morning of 29, 30 and 31 days of age. Unkeito treatment brought about ovulation at 30 days of age (30%) and at 31 days of age (40%), on the other hand no ovulation was observed in the control. No significant difference existed between level of hypothalamic LH-RH in control and that in Unkeito treatment; however, significant decrease of pituitary LH and FSH levels was recognized at 30 and 31 days of age in Unkeito treatment as compared with those in control. These evidences suggest that Unkeito may hasten onset of puberty through pituitary gland, i. e. may release LH and FSH from pituitary and induce ovulation in rats.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 621—625, 1991)

## Introduction

Japanese Kampo medicine (herbal medicine) has been widely used and evaluated by using contemporary scientific procedure during recent ten years in Japan[1~5]. In modern medicine, once the cause of the disease has been determined, measures are taken to remove the pathogen from the body or return the body from a pathological state to its normal stage[1] . On the other hand, in kampo medicine, drugs don't always act directly on target organ, but usually act first on patient's whole body, then improve pathologic conditions utilizing patient's autodefense mechanism for the disease[1,2,6]. With understanding above mentioned concept it is important to explore mechanism of action of Kampo medicine in recent technique being beyond empiricism[1,2].

Unkeito has been available for over two thousands years in China, Korea and Japan, and has been one of most popular herbs which is applied for treatment for women who are suffering from ovarian insufficiency, sterility and climacteric disturbances[7] . Unkeito has been understood to activate hypothalamic-pituitary ovarian axis, then improve ovarian function[8,9].

We performed the following experiment to explore effects of Unkeito on hypothalamic pituitary area in immature female rats.

## Materials and Methods

Sixty-two Sprague Dawley immature female rats were purchased from Sankyo Lab., Inc., Tokyo, Japan and were used for this study. Rats were housed in 14 hours light and 10 hours darkness (light on at 5 a. m. and light off at 7 p. m.).

Thirty rats were used for Unkeito (UKT, TJ-106, Tsumura Inc., Tokyo, Japan, lot # 87010600IPO) treatment. Five grams of UKT contains 2.0 g of dried powdered extract of following combination of herbs; Ophiopogonis tuber 4.0 g, Pinelliae tuber 4.0 g, Angelicae radix 3.0 g, Glycyrrhizae radix 2.0 g, Cinnamomi cortex 2.0 g, Paeoniae radix 2.0 g, Cnidii rhizoma 2.0 g, Ginseng radix 2.0 g, Moutan cortex 2.0 g, Evodiae fructus 1.0 g, Zingiberis rhizoma 1.0 g, Asini gelatinum 2.0 g. UKT (1g/kg of body weight) was given everyday orally with feeding tube beginning at 23 days of age through the experimental session. Another 32 rats were used for control group with no treatment. Rats were decapitated at 29, 30 and 31 days of age. Entire tissues of hypothalamus and pituitary gland were resected and were homogenized in 2ml of buffer solutions containing 0.1 mole of HCl, and 0.1 mole of NaCl, respectively. The homogenate was centrifuged at 15 minutes at 4℃ at 1000×g, and the supernatant was stored at −80℃ until determination of the level of LH-RH in hypothalamus and LH, FSH in pituitary gland. Bilateral tubes of each rat were also resected and ova in tubes were searched under light microscope at 29, 30 and 31 days of age.

Level of LH-RH in hypothalamus was assayed-by a specific radioimmunoassay (RIA) which was reported previously[10] (LH-RH standard: Peptide Institute Inc., Osaka, Japan, antibody: R-TV-417, Institute of Endocrinology, Gunma University, Japan, antigen: IM-181, Amersham). LH and FSH assays were carried out by a double-antibody method[11,12] with RIA kits supplied by the Rat Pituitary Hormone Program, NIDDK, NIH (LH standard: NIDDK-rLH-RP-2, antibody: NIDDK-anti-rLH-S-10, antigen: NIDDK-rLH-I-6; FSH standard: NIDDK-rFSH-I-5, antibody: NIDDK-anti-rFSH-S-11, antigen: NIDDK-rFSH-I-5). Unpaired Student's t-test was used for the statistical analysis, and a p value of less than 5% was considered significant.

## Results

*Rate of ovulation*

Presence of tubal ova was shown in table 1. Thirty percent of rats was ovulated at 30 days of age and forty percent of rats was ovulated at 31 days of age in UKT treated group. No rat was ovulated in control group.

*Level of hypothalamic LH-RH*

No Significant difference was observed between control and UKT treated group, and was observed during UKT treated period (table 1).

*Levels of pituitary LH and FSH*

Significant increase of level of pituitaryLH was observed between 29 days of age and 31 days of age in control rats, however significant decrease was observed in UKT treated rats (table 2). No significant difference was observed between pituitary LH level in control and that in UKT treated rats at 29 days of age, however, pituitary LH levels of 30 and 31 days of age in UKT treated rats were significantly lower than those in control rats.

On level of pituitary FSH no significant change was observed between 29 days of age and 31 days of age in control rats, however significant decrease was observed in UKT treated rats. No significant difference was observed between pituitary FSH level in control and that in UKT treated rats at 29 days of age, however, pituitary FSH

Table 1 Effect of UKT treatment on ovulation in immature female rats

| Experimental Design | Days of age at Treatment | Nos of Rats Ovulated (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 29* | 30* | 31* |
| Control** | none | 0/11(0)*** | 0/11(0) | 0/10(0) |
| UKT | 23−28 | 0/10(0) | 3/10(30) | 4/10(40) |

* : days of age at ovulation examined

** : no treatment

*** : 0/11 means no rat was ovulated in 11 rats that were examined

levels of 30 and 31 days of age in UKT treated rats were significantly lower than those in control rats (table 2).

## Discussion

Sprague-Dawley rats used in this study usually begins vaginal opening, an index of the onset of puberty in the rat, around 38 days of age[13], and previous study has demonstrated that the rat by 25 to 30 days of age is suitable period for activation of ovarian function by treatment[14]. The evidence that presence of tubal ova observed in 30% of rats at 30 days of age and in 40% at 31 days of age infers that UKT may hasten the onset of puberty in these rats[13,15].

Although the decline of FSH-RF activity in the hypothalamus of rats at puberty was reported[16], no significant change was observed in level of hypothalamic LH-RH in this study.

During prepubertal period from 25 to 30 days of age in female rat increase of pituitary LH and decrease of pituitary FSH have been reported[17~19]. Significant decrease of pituitary LH and FSH were observed during UKT treatment in this study. This evidence indicates that an amount of pituitary LH and FSH may be released by UKT treatment, then these LH and FSH may stimulate ovary and may induce ovulation[20~22]. In vitro study it is suggested that UKT increase LH release from the pituitary in a sequential double-chamber perifusion system of rat pituitary in sequence with the mediobasal hypothalamus[8]. An another study has demonstrated that UKT stimulates the synthesis and release of both LH and FSH, and inhibits the release of prolactin from cultured pituitary cells in rats[9].

It has been demonstrated that pituitary FSH drops markedly between 33 and 39-40 days of age just before onset of puberty in female rat[23,24]. Results obtained in this study suggest that UKT treatment may hasten onset of puberty through pituitary gland. On level of hypothalamic LH-RH and levels of pituitary LH and FSH, these were not paralleled in this study. Therefore, further study will be necessary before understanding a role of hypothalamus on this matter.

## Acknowledgemant

We gratefully acknowledge the generous gift of RIA kits for rat LH and FSH by NIDDK, NIH. LH-RH RIA was done at Hormone Assay Center, Institute of Endocrinology, Gunma University, Maebashi, Japan and we also acknowledge to Dr K. Wakabayashi of this Institute for advising LH-RH RIA.

Table 2 Effect of UKT treatment on level of hypothalamic LH-RH and levels of pituitary LH and FSH in immature female rats

| Experimental Design | Days of age at Treatment | Hypothalamic LH-RH (ng/ml) | | | Pituitary LH and FSH ($\mu$g/ml) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 29* | 30* | 31* | 29* | 30* | 31* |
| | | | | | LH | | |
| Control | none | 113.3 (±10.3) | 108.1 (±12.0) | 104.8 (±14.9) | 775.6 (±61.4) | 1058.2** (±104.6) | 1375.7** (±116.2) |
| | | | | | FSH | | |
| | | | | | 201.6 (±22.3) | 235.6 (± 10.1) | 248.6 (± 15.3) |
| | | | | | LH | | |
| UKT | 23−28 | 89.6 (±8.5) | 100.3 (±14.7) | 70.5 (±10.2) | 674.9 (±67.8) | 466.6** (± 53.5) | 346.7** (± 66.6) |
| | | | | | FSH | | |
| | | | | | 164.0 (±18.1) | 90.3** (± 13.6) | 81.2** (± 17.1) |

* : days of age examined, Dada : mean±SE

** : Significant difference ($P < 0.05$) was observed between control and UKT treatment.

## References


1) Yamamura, Y.: The history of Kampo medicine and its development in modern Japan. Recent Advances in the pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines, edited by E. Hosoya and Y. Yamamura, Excerpta Medica, Tokyo International Congress Series, No. 854, pp3—16, 1988
2) Hosoya, E.: Scientific reevaluation of Kampo prescriptions using modern technology. Recent advances in the Pharmacology of Kampo Medicines, edited by E. Hosoya and Y. Yamamura, Excerpta Medica, Tokyo International Congress Series, No. 854, pp17—29, 1988
3) Hiramatsu, M., Haba, K., Edamatsu, R., Hamada, H., Mori, A.: Increased choline acetyltransferase activity by Chenese herbal medicine Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to in aged rat brain, Neurochemical Research, 14: 249, 1989
4) Koyama, T., Hagino, N., Cothron, A. W., Saito, M.: Neuroendocrine effect of Toki-shakuyaku-san on ovulation in rats, Am. J. Chinese Medicine, 17: 29, 1989
5) Macek, C.: East meets west to balance immunologic yin and yang, JAMA, 251: 433, 1984
6) Cyong, J. C.: The therapeutic basis of Kampo prescriptions in immunological disorders. Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicines, edited by E. Hosoya and Y. Yamamura, Excerpta Medica, Tokyo International Congress Series, No. 854, pp38—43, 1988
7) Koyama, T., Ohara, M., Ichimura, M., Saito, M.: Effect of Japanese Kampo medicine on hypothalamic-pituitary-ovarian function in women with ovarian insufficiency, Am. J. Chinese Medicine, 16: 47, 1988
8) Miyake, A., Lee, J. W., Tasaka, K., Ohtsuka, S., Aono, T.: Wen-Jing-Tang, a traditional Chinese herbal medicine increases luteinizing hormone release in vitro, Am. J. Chinese Medicine, 14: 157, 1986
9) Taketani, Y., Kuga, K., Hayashi, N., Mizuno, M.: Action of Unkeito on cultured rat pituitary cells. Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicines, edited by E. Hosoya and Y. Yamamura, Excerpta Medica, Tokyo International Congress Series, No. 854, pp184 —196, 1988
10) Asai, T., Wakabayashi, K.: Changes of hypothalamic LH-RF content during the rat estrous cycle, Endocrinol. Japon, 22: 319, 1975
11) Wakabayashi, K.: Heterogeneity of rat luteinizing hormone revaled by radioimmunoassay and electrofocusing studies, Endocrinol. Japon, 24: 473, 1977
12) Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Yazaki, C., Igarashi, M.: Regulation of the second surge of follicle-stimulating hormone; effects of antiluteinizing hormone-releasing hormone serum and pentobarbital, Endocrinology, 109: 130, 1981
13) Andrews, W. W., Ojeda, S. R.: A detailed analysis of the serum LH secretory profiles of conscions free-moving female rats during the time of puberty, Endocrinology, 109: 2032, 1981
14) Price, D., Ortiz, E.: The relation of age to reactivity in the reproductive system of the rat, Endocrinology, 34: 215, 1944
15) Ramirez, V. D., McCann, S. M.: A comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats, Endocrinology, 72: 452, 1963
16) Watanabe, S., McCann, S. M.: Alterations in pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) and hypothalamic FSH-releasing factor (FSH-RF) during puberty, Proc. Soc. Expe, Biol. Med., 132: 195, 1969
17) Kract, C. L., Ganong, W. F.: Pituitary FSH content in female rats at various ages, Endocrinology, 82: 1241, 1968
18) Lisk, R. D.: Luteinizing hormone in the pituitary gland of the albino rat: concentration and content as a function of sex and age, Neuroendocrinology, 3: 18, 1968
19) Ramirez, V. D., Sawyer, C. H.: Changes in hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LH-RF) in the female rat during puberty, Endocrinology, 78: 958, 1966
20) Critchlow, V., Elwers-Bar-Sela, M.: Control of the onset of puberty, In Neuroendocrinology, Vol. II, edited by L. Martini and W. F. Ganong, pp101—162, Academic Press, New York 1967
21) Ojeda, S. R.: Andrews, W. W., Advis, J. P., Smith-White, S.: Recent advances in the endocrinology of puberty, Endocr. Rev., 1: 228, 1980
22) Urbanski, H. F., Ojeda, S. R.: The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: Establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion, Endocrinology, 117: 644, 1985
23) Corbin, A., Daniels, E. L.: Changes in concentration of female rat pituitary FSH and stalk-median eminence follicle stimulating hormone releasing factor with age, Neuroendocrinology, 2: 304, 1967
24) Chappel, S. C., Ulloa-Aguirre, A., Ramaley, J. A.: Sexual maturation in female rats: Time course of the appearance of multiple species of anterior pituitary FSH, Biol. Reprod., 28: 196,

1983

# 幼若雌ラットにおける温経湯の視床下部内 LH-RH，下垂体内 LH，FSH に及ぼす影響について

東京医科歯科大学医学部産婦人科学教室

小山嵩夫　下地祥隆　大原基弘
矢口輝仁　麻生武志

62匹の幼若雌ラットに，生後23日齢より，温経湯（1 g/kg）を，強制栄養にて経口投与した．生後29，30，31日齢の午前に，卵管内の卵の有無，視床下部組織中 LH-RH，下垂体組織中 LH，FSH のレベルを測定した．温経湯投与により，30日齢において30％，31日齢において40％に，卵管内に卵が認められたが，対照群には認められなかった．視床下部中 LH-RH については，温経湯投与群と対照群との間に，差は認められなかった．下垂体中 LH，FSH レベルは，30日，31日齢のレベルに，温経湯投与群において，対照群に比べ，著明な減少を認めた．これらの事実から，温経湯が下垂体に作用して，LH，FSH を放出させ，卵巣を活性化することにより，排卵をひき起こしたことが，推察された．

（受付：1991年2月5日特掲）

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# EFFECT OF UNKEITO ON OVARIAN FUNCTION IN IMMATURE FEMALE RATS

Yoshitaka SHIMOJI, Takao KOYAMA, Motohiro OHARA, Teruhito YAGUCHI and Takeshi ASO

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

**Abstract:** Sixty two immature female rats were treated with Unkeito beginning at 23 days of age of 1 g/kg of body weight per day by using feeding tube and continuing during experimental sessions. Uterine and ovarian weight, plasma levels of LH, FSH and estradiol were measured on the morning of 29, 30 and 31 days of age. Unkeito treatment brought about significant increase of uterine weight at 30 and 31 days of age, however, this treatment did not show any significant change of ovarian weight. On plasma levels of hormones, significant increase of plasma LH at 30 days of age and significant increase of plasma FSH at 29 days of age were observed with Unkeito treatment compared to those of control group. These evidences suggest that Unkeito treatment activates ovarian function through the pituitary, however, direct action to the hypothalamus and/or the ovary may not exclude from the possibilities.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 36 (3), 626—629, 1991)

## Introduction

Japanese Kampo (herbal) medicines originated from mainland of China and have been used empirically for approximately more than 2000 years. In general, these herbal medicines contain multiple dried and powdered extracts from various kinds of herbs which are considered to exhibit their effects synergistically.[1, 2] It has been believed that a purified single component of them is able to show a limited effectiveness, if any. There is no theoretical explanation concerning the particular combination and proportion of the elements in order to make the medicine effectively. For the reasons mentioned above, little attention has been paid to Kampo medicines by the physicians and researchers who were specialized in the Western medicine exclusively for over 100 years in Japan. Thereafter, these Kampo medicines has been barely inherited as fork remedies together with "Acupuncture treatment", and were mainly used to the patients of nervous complaints and chronic diseases with unknown cause. But, increasing amount of clinical evidence relating to the curative effects of these medicines have been accumulated. Especially, large numbers reports indicated the efficacy of certain prescriptions of the Kampo in many gynecological hormonal disorders[3~5] and also supported by some of basic studies in gynecological field.[6~8]

In previous studies we suggested Unkeito might stimulate hypothalamic pituitary area and might activate ovarian function in rats and in women.[3,9] Unkeito consists of 12 kinds of herbs and may contain several components which may exert it's effect on hypothalamic-pituitary-ovarian function. In this study we investigated effects of Unkeito on ovarian function by determining

plasma levels of LH, FSH and estradiol in immature female rats.

## Materials and Methods

Sixty two sprague Dawley immature female rats were used in this study, and details of this experiment were described elsewhere.[9] Thirty rats were used for Unkeito (UKT, Tsumura Inc., Tokyo) treatment, UKT (1 g/kg of body weight) was given everyday orally with feeding tube beginning at 23 days of age through the experimental session. Another 32 rats were used for control group with no treatment. Blood was taken with heart puncture by heparinized plastic syringe under light sedation of ether before decapitation at 29, 30 and 31 days of age. Plasma levels of LH and FSH were measured by a double-antibody radioimmunoassay (RIA) method described before.[9] Plasma estradiol levels were measured using a commercially available RIA kit (Direct RIA kit, Sorin Biomedica S. P. A.).

After removing the surrounding tissue carefully, weight of both ovaries and uterus was measured in wet condition. Unpaired Student's t-test was used for the statistical analysis, and P value of less than 5% was considered significant.

## Results

*Uterine and ovarian weight*

Results were shown in Table 1. Significant increase of uterine weight was observed at 30 and 31 days of age compared with that of 29 days of age by UKT treatment and compared with those of 30 and 31 days of age in control group. No significant change of ovarian weight was observed by UKT treatment.

*Plasma LH*

Plasma LH was significantly increased at 30 days of age by UKT treatment compared with that of control group (Table 1).

*Plasma FSH*

Significant increase was observed at 29 days of age by UKT treatment compared with that of control group (Table 2).

*Plasma estradiol*

No significant change was observed by UKT treatment (Table 3).

## Discussion

As the results of systematic studies on the sequence of events in the wave of sexual development in female rats, various informations concerning the functional changes of hypothalamic-pituitary-ovarian axis in this period have been accumulated.[10] Currently, it is generally accepted that the plasma FSH concentration shows a significant increase around 15 days of age, as the earlier distinct event in the course of maturation, and then the level declines as the animal approaches to puberty beginning at approximately 40 days of age.[11] And as the second event, a dramatic transient increase of pituitary FSH content usually appears on day 20 of

Table 1 Effect of Unkeito treatment on uterine and ovarian weight in immature female rats

| Treatment | Days of age at Treatment | Uterine weight (mg) | | | Ovarian weight (mg) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Days of Age | | | Days of Age | | |
| | | 29 | 30 | 31 | 29 | 30 | 31 |
| Control | none | 84.1 (±7.1) | 78.1 (± 4.3) | 116.7* (± 9.4) | 25.7 (±2.2) | 26.5 (±1.7) | 30.0 (±1.7) |
| Unkeito | 23−28 | 79.6 (±7.0) | 117.3** (±12.1) | 158.3** (±11.4) | 30.3 (±1.8) | 28.6 (±1.9) | 34.0 (±2.0) |

Data : mean±SE

* : Significant difference ($p < 0.05$) was observed between data of 29 days of age and those of 30 or 31 days of age

** : Significant difference ($p < 0.05$) was observed between data of control and those of Unkeito treatment in each days of age.

age. On the other hand, pituitary LH content begins to increase from 20 days and the maximum LH content is found about 10 days before puberty.[12, 13] On the bases of these results, the immature female rats at 23 days of age, which were selected as the experimental animal in this study, were in the so-called prepubertal phase when the UKT treatment started. Namely, they had already been exposed to the transient elevation of plasma and pituitary FSH, and plasma LH concentrations. During the period from 23 to 29 or 31 days of age, which is corresponding to the experimental period of this study, pituitary LH content shows further progressive increase to the maximal levels at about 30-35 days of age.[13] As the consequence of these complex of events, the rats are supposed to achieve the gonadal ripeness and finally establish their estrus cycle at about 40 days of age.[14] This means that the rats in the natural course course of development have to wait more or less another 10 days before they will have the first ovulation from the last day of the present experimental period.

Our previous study demonstrated that this UKT treatment brought about ovulation at 30 days of age (30%) and at 31 days of age (40%), on the other hand no ovulation was observed in the control (Table 3).[9] The study also suggests that UKT may exert it's effect on hypothalamic pituiatry area then induces ovulation. Increase of uterine weight which was demonstrated in this study infers that UKT may stimulate ovarian function.

On plasma levels of hormones UKT exerted it' s effect on plasma gonadotropin level, however, plasma level of estradiol was not changed. The reason that plasma level of estradiol did not change is unknown at present time and should be investigated further.

Our previous study showed sudden decrease of gonadotropin content in the pituitary gland at 30 days of age in UKT treated rats.[9] This evidence suggests that gonadotropins which had been released from pituitary entered in the circulating system. However, plasma levels of LH and FSH which was obtained in this study did not reflect

Table 2 Effect of Unkeito on plasma levels of LH, FSH and estradiol in immature female rats

| Treatment | Plasma LH (μg/ml) | | | Plasma FSH (μg/ml) | | | Plasma Estradiol (pg/ml) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Days of Age | | | Days of Age | | | Days of Age | | |
| | 29 | 30 | 31 | 29 | 30 | 31 | 29 | 30 | 31 |
| Control | 0.885 (±0.13) | 0.467* (±0.03) | 0.675 (±0.07) | 0.978 (±0.39) | 6.25* (±0.55) | 3.80* (±0.28) | 29.6 (±2.6) | 39.4 (±3.5) | 45.5 (±4.1) |
| Unkeito | 1.001 (±0.15) | 0.821** (±0.11) | 0.693 (±0.07) | 3.77** (±0.52) | 6.19 (±1.45) | 4.10 (±0.92) | 32.1 (±5.4) | 42.5 (±5.0) | 41.1 (±3.1) |

Data : mean±SE

* : Significant difference ($p < 0.05$) was observed between data of 29 days of age and those of 30 or 31 days of age

** : Significant difference ($p < 0.05$) was observed between data of control and those of Unkeito treatment in each days of age

Table 3 Effect of Unkeito treatment on ovulation in immature female rats

| Experimental Design | Days of age at Treatment | Nos of Rats Ovulated (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 29* | 30* | 31* |
| Control** | none | 0/11(0)*** | 0/11(0) | 0/10(0) |
| UKT | 23−28 | 0/10(0) | 3/10(30) | 4/10(40) |

* : days of age at ovulation examined

** : no treatment

*** : 0/11 means no rat was ovulated in 11 rats that were examined

(reference 9, Koyama, T. et al)

these matters: i. e., plasma levels of LH and FSH may reflect momentary status of pituitary gland and may not always reflect general condition. In other words, these results can be thought to substantiate the effectiveness of UKT on the pituitary ovarian function because that low FSH and LH in pituitary gland just after releasing of these hormone[9] for provocation of ovulation are a matter of course. And it is thought that high FSH and LH released in the circulation are sustained for a short time in terms of delay of the removal of these hormones from the circulation or due to the metabolic clearance rate. In conclusion, despite that it is still unknown how about action of UKT on hypothalamus, it is suggested that, at least, UKT stimulates the pituitary-ovarian axis and are consequent to early growth of follicle to ovulation, however direct action to the ovary may not exclude from the possibilities in this experiment.

## References


1) Yamamura, Y.: The history of Kampo medicine and its development in modern Japan. In "Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicines", International Congress Series, No. 854, Ed. by E. Hosoya and Y. Yamaura, Excerpta Medica, p 3, 1988
2) Hosoya, E.: Scientific reevaluation of Kampo prescriptions using modern technology. In "Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicines", International Congress Series, No. 854, Ed. by E. Hosoya and Y. Yamaura, Excerpta Medica, p 17, 1988
3) Koyama, T., Ohara, M., Ichimura, M. and Saito, M.: Effect of Japanese Kampo medicine on hypothalamic-pituitary-ovarian function in women with ovarian insufficiency, Am. J. Chinese Medicine, 16: 47, 1988
4) Kano, T.: Kampo treatment on ovarian dysfunctional infertilities, Jpn. J. Fertil. Steril., 33: 617, 1988
5) Usuki, S. and Kubota, S.: Hachimijiogan for the treatment of hyperprolactinemia, Jpn. J. Fertil. Steril., 34: 799, 1989
6) Miyake, A., Lee, J. W., Tasaka, K., Ohtsuka, S. and Aono, T.: Wen-Jing-Tang, a traditional chinese herbal medicine increases luteinizing hormone release in vitro, Am. J. Chinese Medicine, 14: 157, 1986
7) Usuki, S.: Effects of Hachimiziogan, Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on estrogen and progesterone secretion in ovarian follicles, Jpn. J. Fertil. Steril., 32: 276, 1987
8) Koyama, T., Hagino, N., Cothron, A. W. and Saito, M.: Neuroendocrine effect of Tokishakuyakusan on ovulation in rats, Am. J. Chinese Medicine, 17: 29, 1989
9) Koyama, T., Shimoji, Y., Ohara, M., Yaguchi, T. and Aso, T.: Effect of Unkeito on hypothalamic LH-RH, pituitary LH and FSH in immature female rats, Jpn. J. Fertil. Steril.,(in submitting)
10) Ojeda, S. R., Andrews, W. W.,Advis, J. P. and Smith-White, S.: Recent advances in the neuroendocrinology of puberty, Endocr. Rev., 1: 228, 1980
11) Urbanski, H. F. and Ojeda, S. R.: The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: Establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion, Endocrinology, 117: 644, 1985
12) Ramirez, V. D. and Sawyer, C. H.: Changes in hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LH-RH) in the female rat during puberty, Endocrinology, 78: 958, 1966
13) Lisk, R. D.: Luteinizing hormone in the pituitary gland of the albino rat: concentration and content as a function of sex and age, Neuroendocrinology, 3: 18, 1968
14) Price, D. and Ortiz, E.: The relation of age to reactivity in the reproductive system of the rat, Endocrinology, 34: 215, 1944


## 幼若雌ラットにおける温経湯の卵巣機能への効果について


東京医科歯科大学医学部産婦人科学教室

下地祥隆　小山嵩夫　大原基弘
矢口輝仁　麻生武志



62匹の幼若雌ラットに，生後23日齢より，温経湯(1g/kg体重)を，強制栄養にて経口投与した．生後29，30，31日齢の午前に，子宮重量，卵巣重量，血漿LH，FSH，estradiolを測定した．温経湯投与により30，31日齢の子宮重量において，対照群に比べ，著明な増加が認められたが，卵巣重量においては，変化は認められなかった．血漿ホルモン値については，30日齢の血漿LH値，および29日齢の血漿FSH値において，対照群より著明な増加が認められた．これらの事実より，温経湯投与により，下垂体を経ての，卵巣機能の活性化が推察された．温経湯の視床下部や卵巣への直接作用については，今後の検討課題である．


(受付：1991年2月5日特掲)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# HORMONES IN AMENORRHEIC WOMEN WITH ALCOHOLICS

Meikan SEKI, Kohji YOSHIDA and Yasushi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology
University of Occupational and Environmental Health, School of Medicine.
Kitakyushu 807, Japan

**Abstract:** Twenty-one hospitalized Japanese female in amenorrhea with alcoholism under 40 years of age excluded with liver cirrhosis were surveyed. All patients showed the secondary amenorrhea and liver dysfunction on admission. Most of patients have lower estradiol levels and 85.7% of patients have the moderately elevated PRL levels. Nine of them were having the second grade amenorrhea and the others were having the first grade amenorrhea. In 9 patients with the second grade amenorrhea, all of them showed hypergonadotropic hypogonadism associated with hyperprolactinemia. On the other hand, remaining 12 patients showed normo-or hypogonadotropism. But 8 patients out of 12 were associated with hyperprolactinemia. Hypothalamic disorders due to hyperprolactinemia may have brought about ovarian dysfunction. Liver function tests were normalized during hospitalization with abstinence. And hyperprolactinemia was disappeared after the liver function restored.

Seven patients menstruated spontaneously.

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 630—635, 1991)

## Introduction

Nowadays the female alcoholics are recognized as a social problems in Japan. It has been estimated recently that there are at least three hundred thousand female alcoholics in Japan. In fact the number of female alcoholics is gradually increasing more than this values. The clinical signs and symptoms of sexual dysfunction, with amenorrhea, frigidity and infertility found in chronic alcoholic abuse women[1~3], however few investigators are made on the hormonal change of the sexually-matured with amenorrhea in alcoholic abuse women[5~7].

In experimental animal, ethanol feeding results in the atrophy of ovary and in a decreasing serum concentration of the sex hormone[8,9]. Levine[11] suggests that frigidity as the characteristic sexual problem of female alcoholics. Curran[10] also reported frigidity among his subjects but they did not related to amenorrhea. Huge[6] pointed out that amenorrhea was present in 67% of their chronic alcoholic patients.

The purpose of this work is to discuss in detail the hormonal disorder of amenorrheic women with alcohol liver disease.

## Subjects and Methods

Twenty-one alcoholic women ranging in age from 29 to 40 years with secondary amenorrhea that lasted for 7 months were chosen for this study. All had documented medical histories of chronic alcoholism (ethanol consumption greater than 84.0gm per day at least 4 years and did not receive any medication or drugs before this study). The physical examination were performed by the internist and cases with liver cirrhosis were excluded.

LH, FSH, PRL and Estradiol concentrations were measured by the radioimmunoassay methods and the response of the pituitary was examined by the LH−RH test. One hundred micrograms of synthetic luteinising hormone releasing hormone* (*gonadorelin acetate: Tanabe Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo) was given by rapid intravenous injection to all subjects and blood was taken from the forearm vein at frequent intervals for over 2 hours for mesurement of LH, FSH. For investigating the positive feedback of the LH, the Premarin* (*Conjugated estrogen: Toyo Jozo Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo) 20mg was given by intravenous injection to 5 patients, Serum LH levels were measured prior to initial injection and thereafter at 24, 48, 72 and 96 hours.

Table 1 Drinking Patterns of Female Chronic Alcoholics with Amenorrhea

n = 21

| | |
|---|---|
| Age | 34.8+4.2yr |
| Onset of Habitual Drinking | 27.6=4.1yr |
| Period of Problem Drinking | 7.2+4.2yr |
| Drinking Quantity | over 84.0g/day |
| Beverages | |
| Shochu | 10 |
| Sake | 3 |
| Whisky | 5 |
| Beer, Wine | 2 |
| Others | 1 |

## Results

Drinking patterns in the alcoholics with amenorrhea are shown in Table 1. The maximum drinking history was 18 years and period of problem drinking was 7.2±4.2 years in average. Shochu was the common consumed alcoholic beverage in the case studied with of patients (47.6%). Data of liver function test are shown in Table 2. There are not undernourished and the related body weight of all patients is within the normal

Table 2 Liver Function Test of Chronic Female Alcoholics with Amenorrhea on Admission

n = 21

| No | Age | GOT mU/ml | G P T mU/ml | γGTP mU/ml | ZTT | Alb g/dl | T.bil mg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 31 | 145 | 126 | 181 | 6.4 | 3.9 | 0.59 |
| 2 | 31 | 46 | 32 | 86 | 4.4 | 3.3 | 0.68 |
| 3 | 32 | 81 | 424 | 96 | 1.8 | 3.2 | 0.76 |
| 4 | 33 | 88 | 44 | 88 | 6.0 | 3.6 | 1.50 |
| 5 | 29 | 80 | 46 | 154 | 8.9 | 3.9 | 0.68 |
| 6 | 38 | 77 | 55 | 94 | 6.0 | 4.0 | 1.78 |
| 7 | 39 | 526 | 17 | 18 | 7.3 | 4.2 | 0.51 |
| 8 | 32 | 95 | 55 | 521 | 8.2 | 4.0 | 0.56 |
| 9 | 40 | 55 | 21 | 23 | 7.4 | 3.8 | 1.10 |
| 10 | 31 | 85 | 59 | 79 | 5.6 | 3.7 | 0.95 |
| 11 | 37 | 121 | 117 | 127 | 6.4 | 3.5 | 1.43 |
| 12 | 37 | 122 | 60 | 157 | 7.8 | 3.7 | 1.45 |
| 13 | 31 | 387 | 284 | 221 | 6.8 | 3.2 | 0.74 |
| 14 | 38 | 177 | 111 | 124 | 9.8 | 4.0 | 0.71 |
| 15 | 38 | 79 | 56 | 82 | 9.2 | 3.8 | 1.72 |
| 16 | 39 | 50 | 45 | 174 | 12.7 | 3.3 | 0.50 |
| 17 | 38 | 90 | 49 | 71 | 9.5 | 3.9 | 0.91 |
| 18 | 38 | 168 | 101 | 170 | 10.7 | 3.0 | 1.21 |
| 19 | 37 | 142 | 122 | 124 | 6.9 | 3.1 | 2.12 |
| 20 | 40 | 78 | 33 | 82 | 10.4 | 3.7 | 1.21 |
| 21 | 37 | 144 | 122 | 124 | 9.7 | 3.2 | 1.10 |

Table 3 Hormone levels in the Female Chronic Alcoholics with Menstrual Abnormalities

| No | Age | Grade of Amenorrhea | Duration Amenorrhea (month) | PRL ng/ml | $E_2$ pg/ml | LH mIU/ml | FSH mIU/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 31 | I | 16 | 11 | 21 | 7 | 4 |
| 2 | 31 | I | 9 | 27 | 41 | 7 | 4 |
| 3 | 32 | I | 15 | 27 | 21 | 15 | 4 |
| 4 | 33 | I | 18 | 29 | 12 | 11 | 5 |
| 5 | 29 | I | 16 | 38 | 28 | 18 | 17 |
| 6 | 38 | I | 13 | 80 | 30 | 5 | 3 |
| 7 | 39 | I | 24 | 87 | 52 | 19 | 7 |
| 8 | 32 | I | 11 | 91 | 42 | 11 | 6 |
| 9 | 40 | I | 24 | 115 | 21 | 9 | 8 |
| 10 | 31 | I | 10 | 120 | 49 | 18 | 7 |
| 11 | 37 | I | 38 | 162 | 25 | 12 | 6 |
| 12 | 37 | I | 30 | 184 | 17 | 8 | 9 |
| 13 | 31 | II | 7 | 59 | 10 | 85 | 102 |
| 14 | 38 | II | 9 | 59 | 16 | 130 | 111 |
| 15 | 38 | II | 30 | 61 | 17 | 76 | 82 |
| 16 | 39 | II | 20 | 70 | 41 | 115 | 80 |
| 17 | 38 | II | 24 | 80 | 29 | 75 | 22 |
| 18 | 38 | II | 15 | 92 | 14 | 79 | 86 |
| 19 | 37 | II | 18 | 97 | 27 | 75 | 92 |
| 20 | 40 | II | 24 | 140 | 25 | 127 | 70 |
| 21 | 37 | II | 16 | 156 | 22 | 93 | 71 |

range*. All of them were diagnosed fatty liver or alcoholic hepatitis by the internist.

Basal hormonal data on admission and duration of the amenorrhea are shown in Table 3. Most of patients have lower estradiol levels and 85.7% of patients have the moderately elevated PRL with the highest value of prolactin level as 184.0ng/ml and with the lowest value as 27.0ng/ml (the normal range was below 30.0ng/ml). Nine patients were classified as the 2nd grade amenorrhea having higher LH and FSH values than normal, consequently, they were diagnosed as having hypergonadotropic hypogonadism. Of the remaining 12 patients were classified as the lst grade amenorrhea of which FSH value for 11 patients were lower than normal.

The response to LH−RH is shown in Fig. 1 In patients with the 2nd grade amenorrhea, LH values increased three folds from the pre−injection values in all cases, and changes in FSH values were also good. In all 9 cases a similar response was noted. In patients with the lst grade amenorrhea, the responses were significantly higher than those of the 2nd grade amenorrhea on LH ($P<0.05$) and FSH ($P<0.05$) at 15min. after LH−RH injection. Peak values were between 4 and 8 times higher than pre−injection value. The results of Premarin test are shown in Fig. 2. In 4 patients (shown by open circles) for whom the experiment was conducted during the 2nd week of hospitalization, a rebound increment of LH values was not evident. In 5 patients, the experiment was conducted in the 6 th week of hospitalization. A satisfactory response was observed after 48−72 hours, as shown by circles, in the remaining patient. Only slight response was observed after 72hs.

## Discussion

Great stride have been made in the last decade

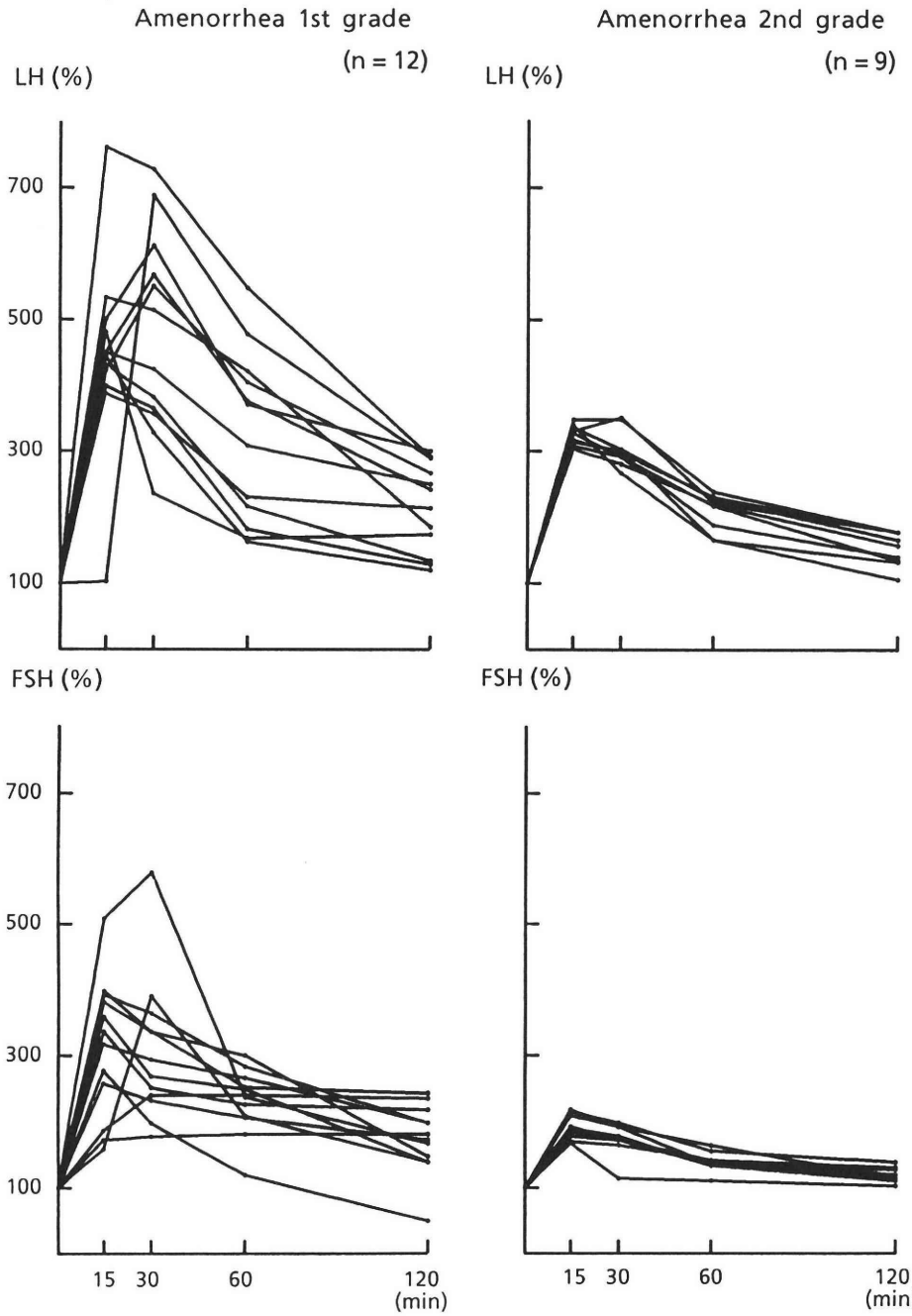



Fig 1 Results of LH-RH test in the female chronic alcoholics with amenorrhea. The changes in LH and FSH values are indicated by a percent increase with the previous values all considered as 100%.

about the harmful effects on reproductive function of male alcoholism. The literatures reveal that ethanol impairs testicular production of steroids both by a direct gonadal toxicity and perturbing to the function of the hypothalmic−pituitary gonadal axis[12~14]. But women essentially have been ignored in the experimental analysis of alcohol effects. Van Thiel et al.[9] reported that in female rats fed a diet in which ethanol accounted for 35% of the calorific intake ovarian weight

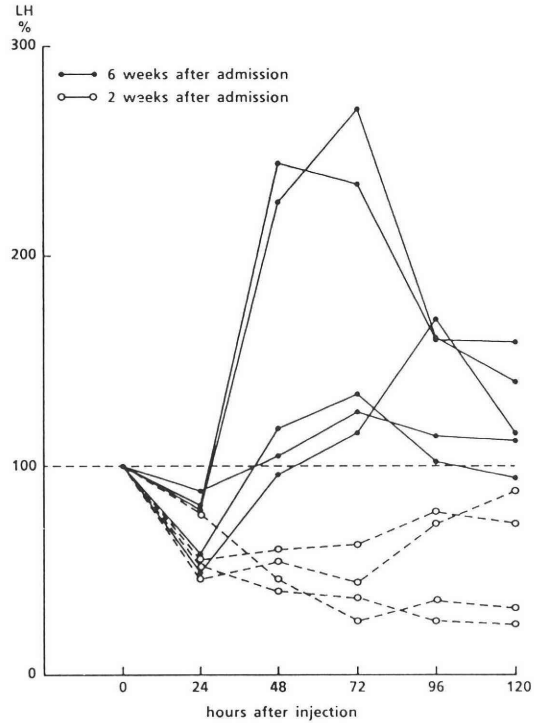



Fig 2 Comparison of LH responsiveness to Premarin loading test. The changes of LH values are indicated by percent increase, regarding the previous values as 100%

was markedly reduced and the luteal functions were completely lost, and lower levels of plasma concentration of estradiol and progesterone were revealed, but that of estrone was not simultaneously reduced. Eskary et al.[15] pointed out ethanol administration disrupted the normal cycle in female rats as monitored by vaginal epithelial cell change and Van Thiel[8] indicated the ovarian atrophy in female alcoholics. Huges et al[6] found that 67% of reproductive age of alcoholics, who were amenorrheic and had hormonal disorders, were due to central defect of hypothalamic origin. Nancy et al[16]. also indicated that chronic dependence produced persistent amenorrhoea in alcoholic women and female Macaque monkey.

In this study we have attempted to clarify the mechanism of amenorrhea with alcohol liver disease. By hormone measurements, lower estradiol levels and moderately elevated PRL levels were found. These 21 patients had a monophasic basal body temperature during hospitalization and amenorrhea lasted for at least 7 months before admission. According to the result of LH−RH test, we found that 12 of the lst grade amenorrheic patients showed better responses than those of patients with the 2nd grade amenorrhea, and the pituitary reservation of gonadotropin was maintained satisfactorily.

Therefore in the next step of this study, Premarin was given to patients with the lst grade amenorrhea to evaluate positive feed−back function. In 4 patients of them the experiment was conducted during the 2nd week of hospitalization, serum LH values were suppressed and did not show any increase. These patients may have had disorder in the hypothalamus since their pituitary functions were considered to be normal from the results of LH−RH test. In 5 patients, the experiment was conducted during 6 weeks of alcohol abstinence treatment. Two patients showed a normal rebound after premarin was given, therefore it was assumed that their hypothalamic funciton had been normalized. These results indicated that patients with alcoholism have hypothalamic disorder and this may be attributed to hyperprolactinemia. We found that all of patients had normal PRL values on discharge, and a follow−up study of 8 outpatients indicated that menstruation spontaneously recurred in a total of 7 patients. These results suggest that patients with alcoholism were affected with amenorrhea through the above−mentioned mechanism as the result of hyperprolactinemia.

It is well−known that chronic alcoholic men are occasionally hyperprolactinemic[17~20] because of their hyperestrogenism (estrogen induced prolactin secretion) but in our result chronic alcoholic women were hypoestrogenism insomuch the hyperprolactinemia may be considered due to some other factors not related to estrogen level. The pathophysiology of endocrine changes in female chronic alcoholics were considered to be some factors. But in our studies, liver damage may have deeply related to the hyperprolactinemia and the hyperprolactinemia may induced the amenorrhea in chronic female alcoholics.

**Acknowledgments**

and Clark, M. C.: Biologically active androgens

and estradiol in men with chronic liver disease, Yuai Hospital. Without his assistance and cooperation the present study could not have been actualized. Appreciation and gratitude are also due to Professor Hitoo Nakano and Dr. Gen－ichi Nakamura, Department of Gynecology and Obstetrics, Kyushu University.

## References

1) Irene, G. L.: Sexual dysfunction of the alcoholics, Sex. Disabil., 3: 27, 1980
2) Beckman, L. J.: Reported effect of alcohol on the sexual feeling and behavior of women alcoholics and nonalcoholics, J. Stud. Alcohol, 40: 272, 1979
3) Murphy, W. D., Coleman, E. and Hoone, S, C.: Sexual dysfunction and treatment in women, Sex. Disabil., 3: 240, 1980
4) Wilsnack, S. C.: Sex role identity in female alcoholism, J. Abnorm. Psychol., 82: 253, 1973
5) Ryback, R. S.: Chronic alcohol consumption and menstruation, JAMA, 238: 2143, 1977
6) Hugues, J. N., Coste, T., Perret, G., Jayce, M. F., Sebaoun, J. and Modigliani, E.: Hypothalamopituitary ovarian function in thirty－one women with chronic alcoholics, Clin. Endocrinol., 12: 543, 1980
7) Valimaki, M., Pelkonen, R., Salaspino, M., Harkonen, M., Hirvonen, E. and Ylikahari, R.: Sex hormones in amenorrheic women with alcoholic liver disease, J. Clin. Endocrinol, Metab., 59: 133, 1984
8) Van－Thiel, D. H., Gavaler, J. S., Lester, R. and Sherinis, R. J.: Alcohol induced ovarian failure in the rat, J. Clin. Invest., 61: 624, 1978
9) Van－Thiel, D. H., Gavaaler, J. G. and Lester, R.: Ethanol, a gonadal toxin in the female, Drug. Alcohol. Depend., 2: 373, 1977
10) Curran, F. J.: Personality studies in alcoholic women, J. Nerv. Ment. Dis., 86: 645, 1937
11) Levine, J.: The sexual adjustment of alcoholics, J. Stud. Alcohol, 16: 675, 1955
12) Van－Thiel, D. H., Macclain, C. J., Elson, M. K., Mcmillair, M. J. and Lester, R.: Evidence for autonomous secretion of prolactin in alcoholic men with liver cirrhosis and gynecomastia, Metabolism, 27: 1778, 1978
13) Valimaki, M., Salaspuro, M., Harkonen, M. and Ylikihari, R.: Liver damage and sex hormones in chronic male alcoholics, Clin. Endocrinol., 17: 467, 1982
14) Galvao－Teles, A., Anderson, D. C., Burke, C. W., Narshall, J. C., Corker, C. S., Bown, R. L.

The authors would like to express grateful acknowledgment to Dr. Akira Goto, Director or

Lancet, 1: 173, 1973
15) Eskary, R. L., Ryback, R. S., Goldman, M. and Maychrowicz, E.: Effect of chronic cthanol administration on plasma levels of LH and the estrous cycle in the female rat, Alc. Clin. and Exp. Res., 5: 204, 1981
16) Nancy, K. M., Mendelson, J. H., King, N. W., Bree, M. P., Skupny, A. and Ellingboe, J.: Alcohol self－administration by female Macaque monkey: A model for study of alcohol dependence, hyperprolactinemia and amenorrhoea, J. Stud. Alcohol, 49: 55, 1988
17) Van－Thiel, D. H., Gavaler, J. Louraux, D. L. and Braunstein, G. D.: Plasma estrone, prolactin, neurophysin and sex steroid binding globulin in chronic alcoholic men, Metabolism, 24: 1015, 1975
18) Lindholm, J., Fabricuis－Bjen, N., Bahnsen, M., Boiesen, Pedersen, L. and Hagen, C.: Pituitary－testicular function in patients with chronic alcoholism, Eur. J. Clin. Invest., 8: 269, 1978
19) Bahnsen, M,. Glund, C., Johnsen, S. G., Bennet, P., Svenstrup, S., Micre, S., Dietrichson O., Svendsen, L. B. and Brodthagen, U. A.: Pituitarytesticular function in patients with alcoholic cirrhosis of the liver, Eur. J. Clin. Invest., 11: 473, 1981
20) Majundar, S. K.: Serum prolactin in chronic alcoholics, Practitioner, 222: 693, 1979

## アルコール依存症を伴う無月経婦人のホルモン動態

産業医科大学産婦人科

石　明寛　吉田耕治　岡村　靖

40歳以下の性成熟期の female alcoholism 患者21名では全員に ovarian dysfunction が見られ，その内85.7％は hyperprolactinemia もあった．また全員に肝機能障害が見られた．

これらの患者に行なった LH－RH test, Premarin test の結果より，9名については hypergonadotropic hypogonadism を示し，卵巣性無月経と思われた．また他の14名については hyperprolactinemia による視床下部障害が ovarian dysfunction の原因と考えられた．患者は入院後の断酒により肝機能が回復し prolactin 値も正常化し，それと共に視床下部障害型の患者では卵巣機能も回復した．

(受付：1990年9月3日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 男性不妊症の評価における Sperm Penetration Assay の有用性に関する検討

## Sperm Penetration Assay in Evaluation for Male Infertility

順天堂大学医学部産婦人科学教室（主任：高田道夫教授）
福田 勝 Masaru FUKUDA
飯田 信 Makoto IIDA
武内裕之 Hiroyuki TAKEUCHI
高田道夫 Michio TAKADA

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

精液検査の精子パラメータと精子受精能の関係を明らかにし，男性不妊症の評価における sperm penetration assay (SPA)の有用性について検討した．すでに児を得ている男性5名27検体（コントロール群）と不妊夫婦男性49名49検体（患者群）を対象とし，一般的な精液検査と透明帯除去ハムスター卵子を用いたSPAを行い，以下の結果を得た．

1．精液検査の精子パラメータのうち精子運動率と精子前進運動性とがSPA精子侵入率と相関を示した．

2．患者群の47％にSPA異常が認められた．

3．患者群において，精子運動率異常例の74％にSPA異常を認め，他の精子パラメータに比べ，SPA成績との一致率が高率であった．

4．精液検査の各種パラメータが正常であった患者の32％にSPA異常が認められた．

5．患者群でSPA正常群とSPA異常群との間に精液検査の精子パラメータの有意差は認められなかった．

以上より精液検査にSPAを併用することは男性不妊症をより正確に評価する上で重要と考えられた．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 636—641, 1991)

### 緒　言

男性の妊孕能は従来一般的な精液所見すなわち精液量，精子濃度，精子数，精子運動率そして精子奇形率などで評価されてきた．しかしながらこれら精液検査の評価には限界がある．すなわち従来の精液検査では精子の明かな量的異常を同定することは可能であるが，精子の機能という質を正確に評価することはできない．精子受精能を評価する目的で透明帯除去ハムスター卵子を用いたヒト精子侵入試験 sperm penetration assay (SPA)がYanagimachiら[1]により最初に報告されて以来，多くの研究者によりSPAと精液検査所見の関係が報告されてきたが，その成績は一定していない．本研究の目的は精液検査の精子パラメータと精子受精能の関係を明らかにすること，ならびに男性不妊症をより正確に評価する上でのSPAの有用性を知ることである．

### 対象と方法

研究対象はすでに児を得ている健康男性5名27検

体のコントロール群（Fertile control group）と不妊夫婦男性49名49検体の患者群（Patient group）であり，精液検査の精子パラメータとSPAの精子侵入率の関係について検討した．精液は用手法により採取し，室温で約30分間静置して液化させ，精液検査を施行した．

精液検査のパラメータとしては精子濃度（Density），全精子数（Total sperm count），精子運動率（%Motility），精子前進運動性（Progression），精液量（Volume）を検討した形態正常精子率（%Normal Morphology）については検討しなかった．精子前進運動性は1＋，2＋，3＋に分け，1＋をほとんど前進運動を伴わない運動のもの，2＋を前進運動が不活発なもの，3＋を速い前進運動を伴うものとした[2]．さらに1＋より運動が不活発なものを0.5＋，1＋と2＋，2＋と3＋の間の運動をそれぞれ1.5＋，2.5＋とさらに細かく段階分けをしスコアで表した．

精液検査後，swim up法により運動精子を得た．具体的には，液化された精液0.5mlを3mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma)を含むmodified Biggers Whitten and Whittingham (mBWW) 培養液[3,4]2mlが入った15ml滅菌遠心試験管の管底に注入し，試験管を37℃，5%$CO_2$，95%airの条件下で，30°の角度で1時間静置し運動精子を回収した．これら運動精子をmBWWで2度遠心洗浄後，3－5×$10^7$/mlの濃度に調整し，37℃，5%$CO_2$，95%airの条件下で22時間前培養した．前培養後精子の運動率を検討し，最終精子濃度を1×$10^7$motile sperm/mlに再調整しSPAに供した．

ハムスター卵子は雌ゴールデンハムスターの復腔にPMS 25IUを投与し，その53～57時間後にhCG 25IUを投与して過排卵処理を行って得た．hCG投与の16～18時間後に卵管を取りだし，実体顕微鏡下で卵管より顆粒膜細胞層に包まれた卵子を採取し，これを0.1%hyaluronidaseで10分間処理して顆粒膜細胞を分離，mBWWで3回洗浄後，0.1%trypsinで1分間処理して透明帯を溶解，mBWWで3回洗浄して透明帯除去ハムスター卵子を得てSPAに供した．SPAは前培養され1×$10^7$ motile sperm/mlに再調整された精子浮遊液0.2mlをプラスチック製のペトリ皿に小滴とし入れ，その上をミネラルオイルにて覆い，この精子浮遊液に透明帯除去ハムスター卵を入れ，37℃，5%$CO_2$，95%airの条件下で3時間培養し，精子侵入の有無を判定した．なお各SPAには約30個の卵子を使用した．

精子侵入の判定は，位相差顕微鏡下に膨化した精子頭部または雄性前核が認められ，かつ精子の尾部を伴うものを精子侵入ありと判定し，精子侵入率（Percent penetration; %PEN）は検査に使用した卵子のうち精子侵入がみられた卵子の割合をもって表した．

## 結　果

コントロール群と患者群の76検体について精子パラメータとSPAの精子侵入率との関係を検討した成績をTable 1に示した．精子侵入率は精子運動率と危険率1%で，精子前進運動性と危険率5%で有意な相関を示した．しかし精子濃度，全精子数，精液量とは相関を示さなかった．

Table 2はコントロール群と患者群の精子パラメータ成績である．患者群の精子運動率と精子前進運動性がコントロール群に比べて有意に低かったが，精液量については患者群がコントロール群よりも有意に多かった．また精子濃度，全精子数では両群間に有意な差を認めなかった．

コントロール群と患者群のSPAの精子侵入率（%PEN）をFig. 1に示した．コントロール群の精子侵入率は40－100%，平均74%で，その最小値は40%であった．したがってコントロール群のすべてが正常と診断されるための閾値すなわち100%特異性閾値は40%となる．以上より精子侵入率40%以上をSPA正常，40%以下をSPA異常とし患者群の検討を行った．患者群の精子侵入率は0－100%，平均41%であったが，これら49例のうちSPA異常を示したものが23例（47%）であった．さらにこの23例のうち12例が精子侵入率が0%であった．

コントロール群の精子パラメータの最小値（Minimal donor value: MDV）をもとに患者群の精子パラメータとSPA異常の関係をTable 3に示した．精子パラメータのMDVはコントロール群の最小値で，精

Table 1　Correlation between Fertilizing Capacity and Conventional Criteria of Semen Quality in All Cases

| Semen parameter | Correlation coefficient | Significance |
|---|---|---|
| Density ($10^6$/ml) | 0.156 | NS |
| Total count ($10^6$) | −0.034 | NS |
| Motility (%) | 0.375 | $P < 0.01$ |
| Progression | 0.316 | $P < 0.05$ |
| Volume (ml) | −0.183 | NS |

n = 76; Fertile control group: n = 27, Patient group: n = 49
NS: Not significant

Table 2　Conventional Parameter of Semen Analysis for Fertile Control Group and Patient Group

| Parameter | Fertile group[a] n=27 | Patient group[a] n=49 |
|---|---|---|
| Density ($10^6$/ml) | 113±15 (20−359) | 105±15 (5−505)[b] |
| Total count ($10^6$) | 236±23 (30−558) | 314±44 (30−1608)[b] |
| Motility (%) | 71.6±1.4(58−82) | 60.3±1.7(25−96)[c] |
| Progression | 2.4±0.05(2−2.5) | 2.2±0.07(0.5−2.5)[d] |
| Volume (ml) | 2.3±0.2(0.5−3.2) | 3.5±0.3(1.1−10.4)[c] |

[a] Values are means ± SE.; Ranges are in parentheses.
[b] Not significant
[c] $P<0.001$
[d] $P<0.05$

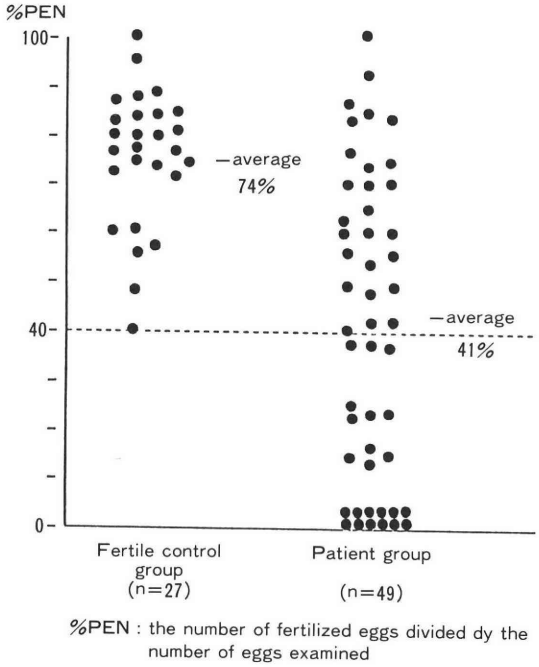



Fig. 1　Sperm Penetration Assay Results for Patient Group and Fertili Control Group

子濃度が $2\times10^7$/ml，全精子数が $3\times10^7$，精子運動率は58％であった．3つの精子パラメータのうち精子運動率がMDV以下であった時のSPA異常は19例中14例(74％)で，精子濃度がMDV以下の時のSPA異常は5例中2例(40％)であった．MDV以上の精子運動率を示した患者30例中9例(30％)にSPA異常が認められ，精子濃度，全精子数でMDV以上を示した症例のそれぞれ45％，47％にSPA異常が認められた．以上より精子運動率は他の精子パラメータに比べSPAの成績とより高い一致率を示した．

Table 4は患者群における精子パラメータ値がMDV以上を示した正常精子パラメータの数とSPA異常の発生の関係を示した成績である．患者49例中23例(47％)にSPA異常が認められたが，精子濃度，全精子数，精子運動率の全てが正常であった場でも28例中9例，32％にSPA異常が認められた．

Table 5は患者群のSPA異常を示した23例とSPA正常の26例の精子パラメータである．各種精子パラメータで両群間に有意な差は認められなかった．

Table 3　Comparison of Sperm penetration Assay Results and Individual Semen Parameters for Patients

| Semen parameter | MDV | Patients below MDV | | Patients above MDV | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Total | No.ab-SPA(%) | Total | No.ab-SPA(%) |
| Density($10^6$/ml) | 20 | 5 | 2 (40) | 44 | 20 (45) |
| Total count ($10^6$) | 30 | 0 | — | 49 | 23 (47) |
| Motility (%) | 58 | 19 | 14 (74) | 30 | 9 (30) |

MDV : Minimal donor value : the lowest semen parameter value for all normal donors examined.
ab-SPA ; abnormal SPA ; less than 40% of hamster egg fertilized in each sperm penetration assay.

Table 4　Incidence of Abnormal SPA with Number of Normal Parameters

| No. of normal parameters | Patients | |
|---|---|---|
| | Total | No. ab-SPA (%) |
| 0 | 0 | —— |
| 1 | 3 | 2(67) |
| 2 | 18 | 12(67) |
| 3 | 28 | 9(32) |
| Combinated total | 49 | 23(47) |

Parameters are density, total sperm count and motiltity.
A normal semen parameter has a value above the minimal donor value.
ab-SPA ; abnormal SPA : less than 40% of hamster egg fertilized in each sperm penetration assay.

Table 5　Comparison of Semen Parameters for Normal SPA Group and Abnormal SPA Group in Patients

| Semen parameter | Patient[a] | |
|---|---|---|
| | Normal SPA[b] n = 26 | Abnormal SPA[c] n = 23 |
| Density ($10^6$/ml) | 104±20 | 106±23[d] |
| Total count ($10^6$) | 314±62 | 311±60[d] |
| Motility (%) | 63.5±1.9 | 56.7±2.8[d] |
| Progression | 2.3±0.1 | 2.1±0.2[d] |

[a] Values are means±SE.
[b] Normal SPA : more than 40% of hamster egg fertilized in each sperm penetration assay
[c] Abnormal SPA : less than 40% of hamster egg fertilized in sperm penetration assay
[d] Not significant

## 考　察

精子受精能と一般的な精液検査の精子パラメータとの関係を明らかにする目的で透明帯除去ハムスター卵子を用いたSPAと精液検査とをすでに児を得ているコントロール群と不妊夫婦男性の患者群に対して行い，その成績を検討した．これらの研究は1979年Rogersら[5]により報告されて以来，数多くの研究者によりSPAと精液検査の精子パラメータとの相関について検討が行なわれてきたが，その成績は必ずしも一致していない[6~13]．1985年のRogersの総説[14]では精子の卵子への侵入に最も相関を示す精子パラメータは精子の運動性と精子の形態であろうと考察されている．しかし多くの報告でのSPAは洗浄法によって得られ精子を用いており，かつ精子濃度を一定にして行われている．したがって精子の運動率が高ければ運動精子数が多く，運動率が低ければ運動精子数が少なく，SPA時の運動精子濃度は一定していない．したがって当然，精子運動率がSPAの成績に影響してくる．精子の機能という質（quality）の違いを知る目的のSPAでは量（quantity）を一定にすることが必要である．さらに，SPAに用いられる精子が洗浄法で得られた場合には，多くの非運動精子が含まれていることが多く，卵子との培養中，これら非運動精子が運動精子の卵子への接着さらには受精を妨げる可能性も否定できない．このような条件のばらつきが多くの報告の成績が一定しない原因なのかも知れない．本研究ではこれらの問題点をなくし，精子の受精能という質の違いをより明らかにするためにswim up法を採用して，運動精子を得てSPAに供した．さらにSPA時の精子濃度をすべて1mlあたり運動精子を$1\times10^7$に調整し，この濃度に達しないものは本研究の対象より除外した．コントロール群を用いたSPAの精子侵入率の報告は精子濃度や前培養時間などの条件が違うことから，その値の範囲が広く，正常値をどこにとるかは難しいが，多くの研究者は10％以上を正常としている[14]．本研究では，コントロール群の精子侵入率は40－100％と高い値の範囲を示した．理由としては精子の前培養が22時間と長いこと，そして卵子との培養時の運動精子濃度が$1\times10^7$/mlと高いことが考えられる．コントロール群の精子侵入率の最小値が40％であることから，この100％特異性閾値の40％を基準値とし，40％以上をSPA正常，40％以下をSPA異常とし患者群について検討した．

その結果，患者群のうち47例中23例，47％がSPA異常を示したことは不妊夫婦男性の約半数に妊孕力の低下があると考えられた．各種精子パラメータの基準値についてもSPAと同様にコントロール群の最小値を用い検討を行った．精子パラメータのうち精子受精能と相関を示したのは精子運動率と精子前進運動性であった．SPAの精子侵入率と精子運動率が相関するとの報告は多いが[6,8,9,11,13]，本研究のようにSPA時に運動精子数を一定にした場合でも相関を認められたことは，精子の運動性と受精能との間に何らかの密接な関係がある可能性があると考えられた．さらにこの密接な関係は患者群における精子パラメータと精子受精能の成績の一致率を検討した結果でも示され，精子運動率が精子受精能の成績と74％と最もよく一致していた．精子形態異常があるのかどうかは検討されていないが精子パラメータがすべて

正常範囲であるにもかかわらず，in vitroで精子受精能の低下あるいは欠如したものが28例中9例(32％)に認められたこと，さらにSPA正常群とSPA異常群との精子パラメータの比較検討では両群間に差が認められなかったことから精液所見のみで精子受精能を予測することには限界がある．したがって精液検査にSPAを併用することは有用であり，特に原因不明不妊症男性に対してはSPAによる精子受精能検査を行なう必要があると考えられた．ただし本研究でswin up法を採用し，SPA時の運動精子数を1mlあたり$1\times10^7$とし，この基準にみたない症例は研究対象より除外したが，臨床ではこれらの基準に達しない不良精子を持った患者が当然いる．SPAで卵子への精子侵入可能な最低運動精子濃度は$3-5\times10^5$/ml[15]，$6\times10^5$/ml[16]と報告されているが，われわれのコントロール男性精子を用いた検討では最低運動精子濃度が$10\times10^5$/mlで精子侵入率9％を得ることが可能であったが，$5\times10^5$/mlでは精子の侵入は認められなかった(data not shown)．しかし，たとえ不良精子の場合でも精子の処理法やSPA群の運動精子濃度の違いによりSPAの成績が異なるし，その成績の評価も違ってくるから，患者に対してSPAを行うときは常にコントロールをおき，同じ条件で行う必要があり，その成績を評価する際にはこの点に十分留意する必要がある．

## 文　献


1) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, Biol. Roprod., 15: 471, 1976

2) Freund, M. and Peterson, R. N.: Semen evaluation and fertility, In Human Semen and Fertility Regulation in Men, Edited by Hafez, E. S. E., Louis, St. and Mosby, C. V., p344, 1976

3) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro, Methods in Mammalian Embryology, Edited by Daniel, J. D,. San Francisco, Freeman, p86, 1971

4) Overstreet, J. W., Yanagimachi, R., Katz, D. F., Hayashi, K. and Hanson, F. W.: Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients, Fertil. Steril., 33: 534, 1980

5) Rogers, B. J., Van Campen, H., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova, Fertil. Steril., 32: 664, 1979

6) Hall, J. L.: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova, Fertil. Steril., 35: 457, 1981

7) Aiken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O. and Lees, M. M.: The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men, Fertil. Steril., 38: 68, 1982

8) Albertsen, P. C., Chang, T. S. K., Vindivich, D., Robinson, J. C. and Smyth, J. W.: A critical method of evaluating tests for male in fertility, J. Urol., 130: 467, 1983

9) Aitken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O., Templeton, A. and Lees, M. M.: An analysis of semen quality and sperm function in cases of oligozoospermia, Fertil. Steril., 38: 705, 1982

10) Aitken, R. J., Warner, P., Best, F. S. M., Templeton, A. A., Djahanbakhch, O., Mortimer, D. and Lees, M. M.: The predictability of subnormal penetrating capacity of sperm in cases of unexplained infertility, Int. J. Androl., 6: 212, 1983

11) Berger, R. E., Karp, L. E., Williamson, R. A., Koehler, J., Moore, D. E. and Holmes, K. K.: The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay, Fertil. Steril., 37: 557, 1982

12) Rogers, B. J., Bentwood, B. J. H., Van-Campen, H., Helmbrecht, G., Soderdahl, D. and Hale, R. W.: Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity, J. Androl., 4: 119, 1983

13) Aitken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O., Mortimer, D., Templeton, A. A. and Lees, M. M.: An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity, Fertil. Steril., 38: 212, 1982

14) Rogers, B. J.: The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated, Fertil. Steril., 43: 821, 1985

15) Yanagimachi, R.: Penetration of guineapig spermatozoa into hamster egg in vitro, J. Reprod. Fertil., 28: 477, 1972

16) Binor, Z., Sokoloski, J. and Wolf, D.: Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm, Fertil. Steril., 33: 321, 1980

# Sperm penetration assay in evaluation for male infertility

Masaru Fukuda, Makoto Iida,
Hiroyuki Takeuchi and Michio Takada

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

An analysis of semen quality was carried out in 27 fertile donors and the male partners of 49 infertile couples by the conventional semen analysis and the sperm penetration assay (SPA). Sperm motility and progression showed a significant relationship ($p<0.01$, $p<0.05$) with the penetration rates of the SPA. Sperm motility evaluation agreed better with SPA results than did either sperm density and sperm number.

Nine of 28 patients (32%) appraised as "normal" according to the conventional semen analys yielded below SPA results.

Therefore, the SPA might be useful as an additional tool in clinical investigations of the fertility of the male partners of childless couples.

(受付:1990年10月11日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 特発性乏精子症患者における精細管内テストステロン濃度の臨床的検討

# A Clinical Study on Intratubular Testosterone Levels in Patients with Idiopathic Oligozoospermia

岡山大学医学部泌尿器科学教室
大枝忠史 Tadashi OHEDA
山根享 Susumu YAMANE
吉田光宏 Mitsuhiro YOSHIDA
岡山大学医学部泌尿器科学教室 大森弘之 Hiroyuki OHMORI
日本鋼管福山病院泌尿器科 永井敦 Atsushi NAGAI
落合病院泌尿器科 大橋輝久 Teruhisa OHASHI
岡山赤十字病院泌尿器科 山下良孝 Yoshitaka YAMASHITA
岡山中央病院泌尿器科 入江伸 Shin IRIE

Department of Urology, Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan (Director: Prof. Hiroyuki Ohmori)

男子不妊症に対するホルモン療法の指針としての精細管内 testosterone (T)濃度の臨床的有用性を評価するため，特発性乏精子症患者107例において精細管内T濃度を測定し，男子不妊症のいくつかのパラメーターと比較検討した．

コントロール群40例の精細管内T濃度は197.0±107.7ng/g. t. w. (mean±SD) であり，特発性乏精子症の患者を精細管内T濃度により低T濃度群 (90ng/g. t. w.未満)，中等度T濃度群 (90以上300未満)，高T濃度群 (300以上) の3群に分けて検討した．

その結果，上記3群間においては，血清T・LH・FSH，JSCおよび精細管壁の厚さのいずれに関しても有意差は認めなかった．したがって，現時点で精細管内T濃度を予測する簡便なパラメーターは存在しないと考えられる．

一方，精巣内T濃度との精細管内T濃度との間には有意の正の相関が認められ，精細管内TはLeydig cellにより産生された内因性Tにある程度依存することが示唆された．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 642—647, 1991)

## 緒　言

ラットを用いた検討により，精子形成においては精細管内 androgen，特に精細管内 testosterone (T) が重要な役割を果たすといわれており[1~3]，何らかのホルモン療法が，障害された精子形成能を回復させるのに有用であると考えられる．しかし，適切なホルモン療法を決定するための指針はいまだ確立されていないのが現状である．そこで今回我々は，ホルモン療法における指針としての精細管内T濃度の臨床的有用性を評価するため，特発性乏精子症患者の精細管内T濃度および5 $\alpha$-dihydrotestosterone (DHT)濃度を測定し，男子不妊症のいくつかのパラメーターと比較検討した．

## 対象および方法

1．対象

対象は当科不妊外来を受診し，精巣生検を行ない得た特発性乏精子症患者107例である．ほかに精細管内Tの基準値を求めるために，コントロール群として，前立腺癌，精管結紮後および精管異常の患者より，精巣生検あるいは精巣摘除術により得た組織のうち，mean germinal epithelium count of Johnsen (JSC)[4]が8.5以上のもの40検体を用いた．

2．方法

採取した精巣組織より，精巣内T・DHT濃度測定用，組織検査用を取り分けたのち，残りの組織を精細管内T・DHT測定用とし，穂坂らの報告した方法に従い[5]精細管分離を行なった．精巣内および精細管内T・DHT濃度は，すでに報告した方法に従って[6,7] RIAにより測定した．

精細管壁の厚さの測定は，H&E染色標本を用い，オリンパス社製デジタル測微接眼装置(OSM-D4)で行なった．

## 結　果

コントロール群40例の精細管内T濃度は197.0±107.7ng/gtw (mean±S. D.)であった（図1）．この結果に従って，特発性乏精子症患者を精細管内T濃度により，便宜上低T濃度群（90ng/gtw未満），中等度T濃度群（90以上300未満），高T濃度群（300以上）の3群に分け，これら3群の間で血中T・LH・FSH濃度，JSC，精細管壁の厚さ，精巣内T・DHT濃度，および精細管内DHT濃度について比較検討した．

図2～図5に示すように，血中T・LH・FSH濃度，JSC，精細管壁の厚さ，精巣内DHT濃度については，3群の間で有意差を認めなかった．

これに対し精巣内T濃度は，低T濃度群で371.0±320.0ng/gtw (mean±S. D.)，中等度T濃度群で590.1+347.7，高濃度群で1460.6+848.2であり，精巣内T濃度と精細管内T濃度との間には有意の正の相関を認めた（図6）．

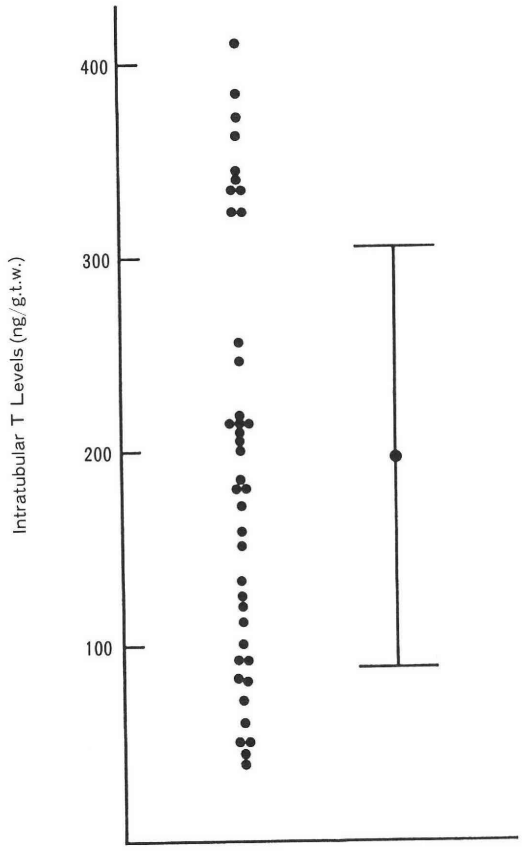



図1 コントロール群における精細管内testosterone濃度

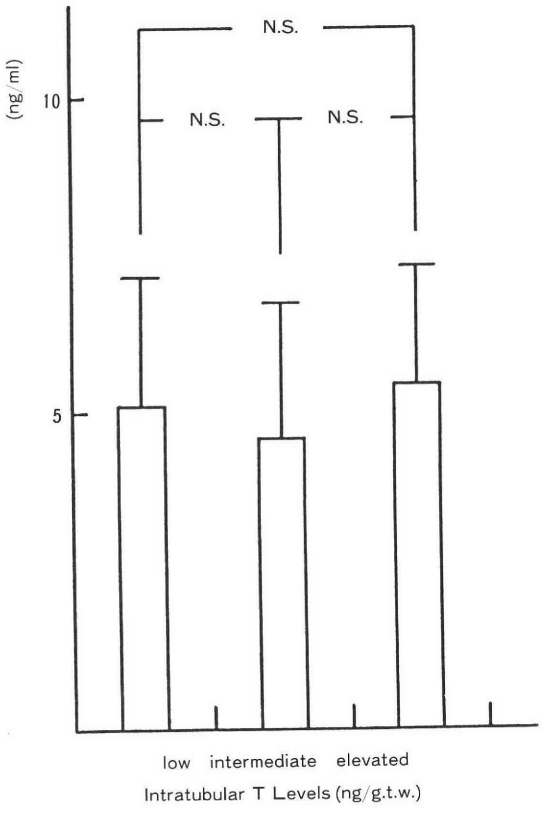



図2 各群における血中testosterone濃度

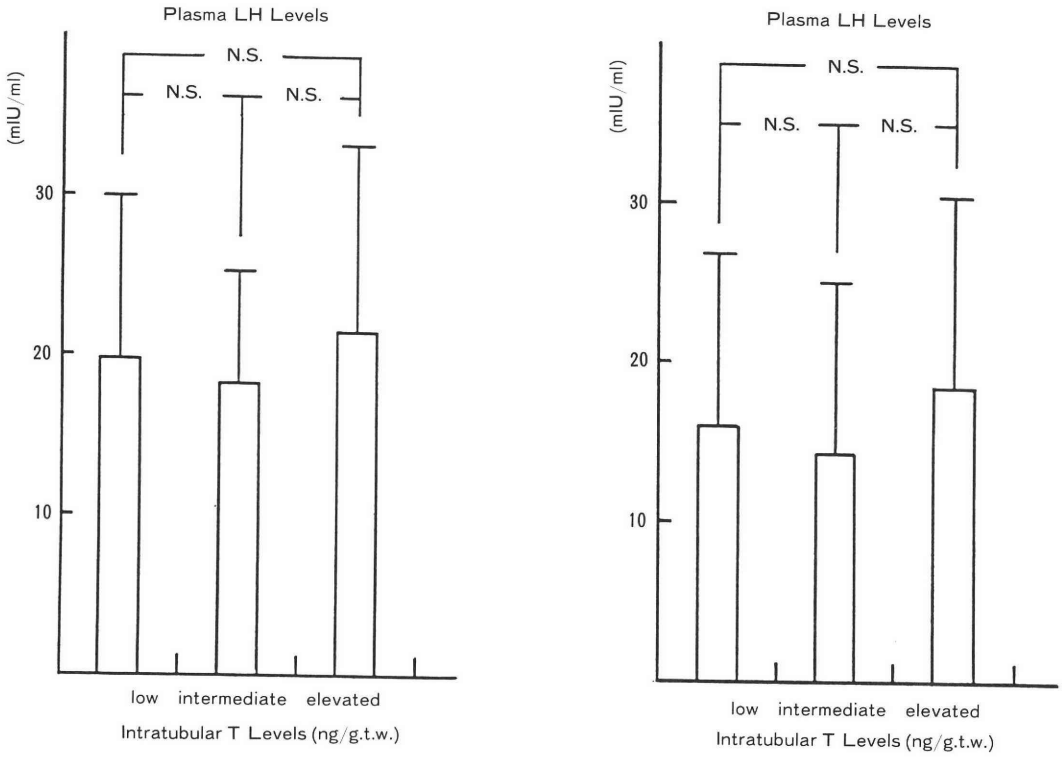



図3 各群における血中 LH, FSH 濃度

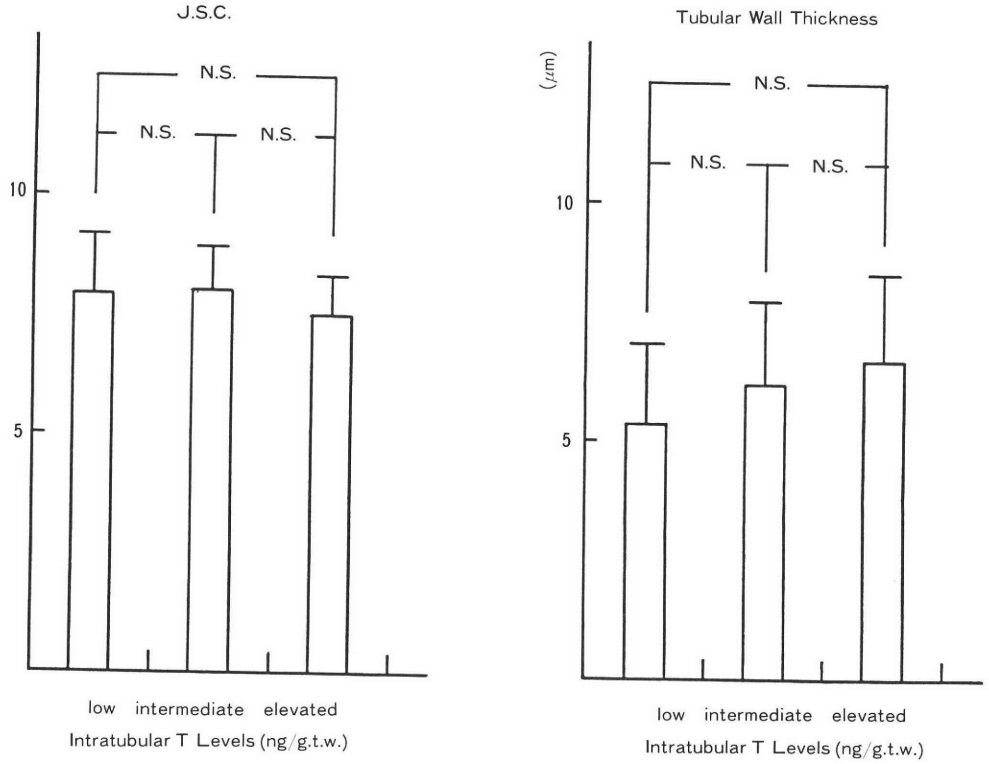



図4 各群における J. S. C.および精細管壁の厚さ

また，精細管内DHT濃度は，低T濃度群から順に17.1±18.0，13.5±16.5，8.5±6.1ng/gtwであり，高T濃度群は他の2群に比し有意に低かった．しかし，低T濃度群と中等度T濃度群との間には有意差は認めなかった（図7）．

## 考　察

ラットにおいては精子形成に直接関与する活性型androgenはDHTではなくTであると考えられているが，ヒトに関しては未だ不明な点が多いのが現状である[8]．今回の検討の結果，分離精細管においてはコントロール群，特発性乏精子症群ともにTがDHTよりも15～30倍優位であり，ヒトにおいても前立腺などの他のandrogen標的臓器とは異なり[9]，精細管内ではTが主要な役割を担っていることが推測された．

今回我々が示したように，特発性乏精子症の中には精細管内T濃度が低値を示す症例が存在し，こういった症例に対しては，精細管内T濃度を高めるようなホルモン療法が有効ではないかと考えられる．従って，精細管内T濃度を反映する簡便なパラメーターが存在すれば，実際の臨床において有用であると思われる．

まず血中T濃度であるが，血中Tと精細管内Tとの間に相関は認められなかった．精巣間質のLeydig細胞で産生されたTは，濃度勾配により精細管内へ移行していくと考えられているが，この際，血中へ移行するものと精細管内へ移行するものとがあり，この割合はおのおのの症例で異なっているものと考えられる．血中LH濃度についても，LHは血中Tにより negative feedback を受けており，血中Tが精細管内Tと関連性を持たないならば，LHと精細管内Tは相関しないことは容易に理解できる．また，血中FSH濃度についてであるが，FSHはSertoli細胞より産出されるinhibinによりコントロールされているといわれており[10]，FSHの作用は精細管内androgenを介するものではないとの報告もある[11]．今回の検討でも精細管内T濃度との関連は認められなかった．

次に，組織学的パラメーターであるが，まずJSCと精細管内Tとの間に相関は認めなかった．これは，造精機能は必ずしも精細管内Tのみに影響されるわけではないことを示していると思われる．また，障

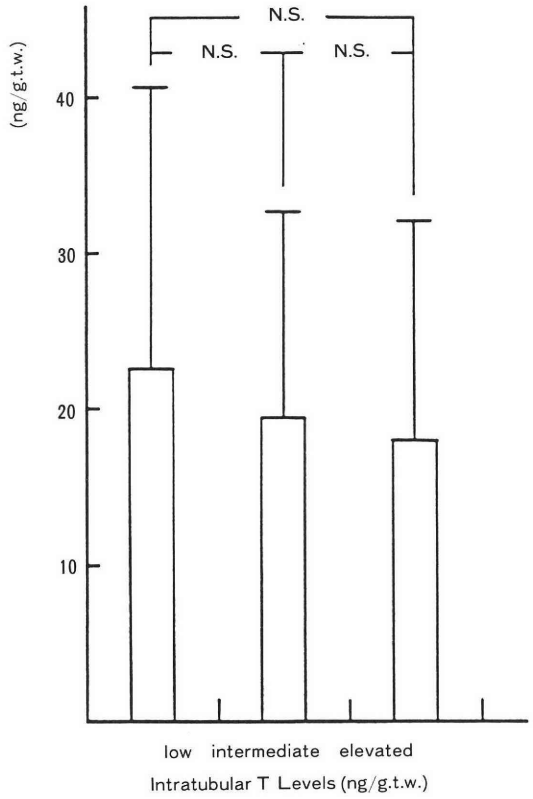



図5 各群における精巣内DHT濃度

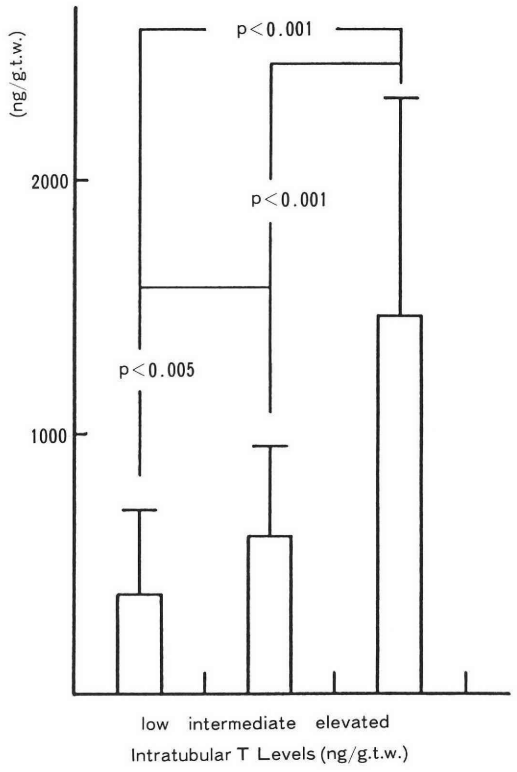



図6 各群における精巣内testosterone濃度

害された精細管の壁が肥厚していることはしばしば認められるが，精細管内T濃度と精細管壁の厚さとの間に相関は認められず，Tの透過性は精細管壁の厚さにはあまり影響されないと考えられた．

しかし，精巣内Tと精細管内Tとの間には明らかな正の相関が認められ，精細管内TはLeydig細胞より分泌される内因性Tにある程度依存していると考えられた．

DHTについてであるが，精巣内DHTと精細管内Tとの間には相関が認められず，精細管内DHTと精細管内Tとの比較では，高T濃度群において精細管内DHTはむしろ低値を示した．この明確な理由については不明であるが，いずれにしても精細管内Tと精巣内・精細管内DHTとの間には明らかな相関は認められなかった．

以上のように，今回の我々の検討では，精細管内T濃度と相関を示したのは精巣内T濃度のみであった．従って，精細管内Tを反映する簡便なパラメーターは存在しないと考えられる．また，精巣内T濃度は単位組織重量当たりのLeydig細胞数に影響を受けるため，精巣内T濃度では個々の症例のT濃度の比較検討は困難である．以上より，特発性乏精子症において精細管内Tを測定することはホルモン療法を決定する上で有意義であると思われた．

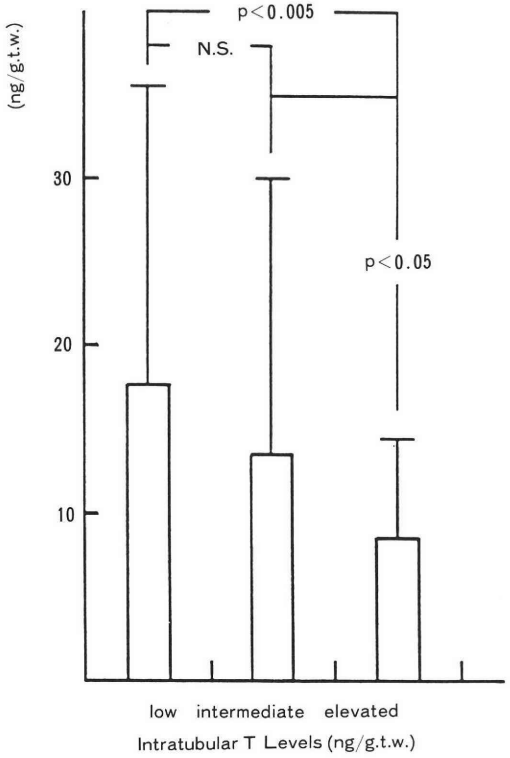



図7 各群における精細管内DHT濃度

## 結　語

特発性乏精子症患者107例の精細管内T濃度を測定し，男子不妊症の各パラメーターと比較検討した結果，以下の結論を得た．

1．血中T・LH・FSH濃度，JSC，および精細管壁の厚さなどのパラメーターと精細管内T濃度との間には相関を認めなかった．従って，精細管内T濃度を反映する簡便なパラメーターは存在しないことが示唆された．

2．精巣内T濃度と精細管内T濃度との間には有意の正の相関を認め，精細管内Tは，Leydig細胞により分泌される内因性Tにある程度依存すると考えられた．

3．特発性乏精子症患者の精細管内T濃度には，症例により大きな差があり，これを測定することは，特発性乏精子症に対するホルモン療法の適応を決定する上で，有用であると思われた．

稿を終えるにあたり，御協力いただいた本学泌尿器科湯川厚巳技官，また貴重な御助言を頂いた帝京大学産婦人科神戸川明教授に深謝いたします．

なお，本論文の要旨は第34回日本日不妊会誌学会学術講演会において発表した．

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) Steinberger, E.: Hormonal Control of mammalian spermatogenesis, Published by American Physiological Society, Pyhsiological Reviews, 51: 1, 1971
2) 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
3) Wilson, E. M. and French, F. S.: Binding properties of androgen receptors, J. Biol. Chem., 251: 5670, 1976
4) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males, Hormones, 1: 2, 1970
5) 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
6) 入江　伸，大橋輝久，大橋洋三，古川雅人，永井敦，山下良孝，大森弘之：精細管内Androgen濃

度の研究，第1報，日不妊会誌，33：236，1988
7）大橋輝久，入江　伸，大橋洋三，古川雅人，山下良孝，永井　敦，大森弘之：精細管内 Androgen 濃度の研究，第2報，日不妊会誌，33：651，1988
8）穂坂正彦，木下裕三：セルトリー細胞機能，臨泌，40：349，1986
9）森岡政明，武田克治，光畑直喜，大橋輝久，大森弘之，斉藤利興，神戸川明：ヒト前立腺組織内 Androgen 濃度について，日不妊会誌，58：876，1982
10) De-Jong, F. H. and Sharpe, R. M.: Gonadotrophins, Testosterone and spermatogenesis in neonatally irradiated male rats: Evidence for a role of the Sertoli cell in follicle-stimulating formone feedback, J. Endocr., 75: 209, 1976
11) Bartlett, J. M. S., Weinbauer, G. F. and Nieshlag, E: Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat, J. Endcr., 121: 49, 1989

## A clinical study on intratubular testosterone levels in patients with idiopathic oligozoospermia

Tadashi Oheda, Atsushi Nagai, Teruhisa Ohashi, Susumu Yamane, Mitsuhiro Yoshida, Yoshitaka Yamashita, Shin Irie and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology, Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

In order to assess the clinical usefulness of the intratubular testosterone (T) level as an indicator for hormonal therapy, the intratubular T level was determined in 107 patients with idiopathic oligozoospermia, and compared to several paremeters for male infertility, including serum LH, FSH and intratubular 5$\alpha$-dihydrotestosterone (DHT) levels.

Specimens were obtained by testicular biopsy from 107 patients with idiopathic oligozoospermia and a control group of 40 patients who had a mean germinal epithelium score count (JSC) of 8.5 or greater.

The intratubular T level in the control group was 197.0±107.7ng/g of tissue weight (g. t. w.) (mean± S. D.). Therefore, patients with idiopathic oligozoospermia were divided to 3 groups: a low level T group (below 90 ng/g. t. w.), an intermediate level T group (over 90 below 300) and an elevated T group (over 300) based on the intratubular T level.

No significant differences were present between the 3 group in plasma LH and T levels. Neither were any significant differences present in plasma FSH, JSC or the thickness of the seminiferous tubular wall. In addition, there were not any differences in the intratesticular or intratubular DHT levels between the 3 groups. On the other hand, a significant correlation in the intratesticular T levels was noted between the 3 groups, and this data suggest that the intratubular T level was partially dependent on endogenous T secreted from the Leydig cells. Moreover, our data suggest that different intratubular T levels may exist in idiopathic oligozoospermic patients. Therefore, we believe that the measurement of intratubular T levels is a useful parameter in selecting patients with idiopathic oligozoospermia for hormonal thorapy.

(受付:1990年8月20日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 視床下部－下垂体－精巣系の老化
# 第一報：視床下部機能の老化の研究

# The Aging of Hypothalamo-Pituitary-Testicular Axis. I:Hypothalamic Function in Male Senescence

札幌医科大学泌尿器科学教室（主任：熊本悦明教授）
三熊直人　熊本悦明　丸田浩
Naohito MIKUMA　Yoshiki KUMAMOTO　Hiroshi MARUTA

Depertment of Urology Sapporo Medical College Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

20～89歳までの内分泌疾患を持たない成人男子167例において，clomiphene citrateに対するgonadotropin反応性から，視床下部の老化について検討した．

20～49歳までの若年，中年男子では全例がclomiphene投与後gonadotropinの上昇反応を示し，7日目で最大反応値を示した．一方，50歳以降clomiphene投与後7日目での反応値が前値よりも低い減少反応例を認め，その割合は50歳台：5.0％，60歳台：22.6％，70歳台：28.8％，80歳台：40.0％と加齢とともに増加していた．60歳以降の減少反応例はhypergonadotropic hypogonadism様の状態にあり，sex steroidの低下がclomipheneのestrogen-like actionを介してgonadotropin抑制反応を生じていることが示唆された．しかし，一部の者では脳内sex steroid感受性の亢進あるいは脳内aromataseの低下といった視床下部自体の老化に伴う変化がclomiphene testでの異常反応性に関与することが示唆された．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 648—654, 1991)

## 緒　言

老年者における視床下部機能の加齢による変化については様々な議論のあるところであるが，視床下部機能の直接的な検査法が無いことから未だ充分な検討が為されていない．

しかし，現在，抗estrogen剤であるclomiphene citrateを用いたgonadotropin分泌刺激試験が間接的ながら，視床下部機能の検査法として用いられている．clomipheneは視床下部においてestrogen receptorを占拠することによりanti-estrogenic effectを発揮し，LH-RH pulse frequencyを増加させることにより，gonadotropinの分泌を促進する[3,4]ことが知られている．

このclomipheneを用いた高齢男子の視床下部—下垂体機能の研究はTenoverら[10]による報告のみであるが，彼等はFSH分泌能のみを検討し，加齢による変化を認めなかった．しかし，高齢者におけるgonadotropin分泌上昇は周知の事実であり，また，それが単に精巣機能の低下による中枢に対するnegative feedbackの減少のみによるのでなく，上位中枢の分泌調節機序の障害も推定されているところである．そこで我々は，clomipheneを用いて視床下部機能の老化にともなう変化を詳細に検討したのでここに報告する．

## 対象及び方法

内分泌疾患を持たない60歳以上の高齢男子135例，及び比較の為20歳から59歳までの若年及び中年男子32例の計167例について検討した．

1）clomiphene test

視床下部機能検査法として本法を施行した．前採

血の後，clomiphene citrate 100mg を5日間経口投与した．さらに clomiphene 投与3日目，5日目，7日目にも採血し，LH, FSH 濃度を測定した．

2）LH-RH test

下垂体機能検査法として本法を施行した．前採血の後，LH-RH 100$\mu$g を bolus に静注し，その後30分，60分，120分で採血し，LH, FSH 濃度を測定した．

3）LH, FSH の測定

LH, FSH の測定には第1ラジオアイソトープ社製，LH, FSH kit 第一® を用い RIA 法にて測定した．

4）testosterone の測定

testosterone の測定には Wien 社製 testosterone test kit® を用いた．

4）estradiol の測定

estradiol の測定には Cis 社製 estradiol-$I^{125}$ kit® を用い RIA にて測定した．

## 結　果

1）clomiphene test における gonadotropin 反応パターン

まず，20～49歳の若年及び中年男子では，Fig. 1 に示すごとく LH, FSH とも clomiphene 投与後漸増し，投与後7日目では投与前値の約2倍となっていた．Table 1 に示すごとく，投与前値及び投与7日目での gonadotropin 反応値を各年代毎に検討すると，LH については70歳代まで clomiphene 投与による有意 ($P<0.01$) の LH 上昇を示したが，80歳代では LH の上昇傾向を認めなかった．一方，FSH については60歳代まで clomiphene 投与による有意 ($P<0.01$) の上昇を示したが，70，80歳代の高齢者においては，上昇反応を認めなかった．

2）clomiphene 投与による gonadotropin 上昇値の加齢に伴う変化

Fig. 2, 3 に示すごとく，個々の LH, FSH 上昇値を plot してみると，50歳以降 clomiphene 投与により gonadotropin が減少する者も認められ，しかもその減少反応例の各年代内における比率は，Table 2 に示すごとく加齢に伴い増加傾向にあった．

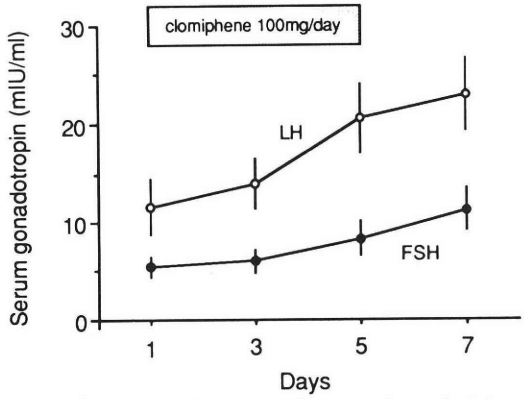



Fig. 1 Gonadotropin responsiveness in colmiphene test in young adult males (20-49, n=12) Bars indicate mean±SE.

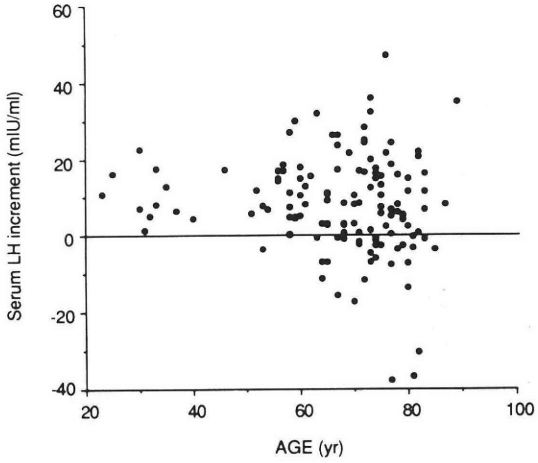



Fig. 2 Serum LH incremant at day 7 of clomiphene test

Table 1　Serum gonadotropin levels at basal and 7 days after clomid administration.

| age (yr) | No. of subjects | serum LH (mIU/ml) | | serum FSH (mIU/ml) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | basal | day 7 | basal | day 7 |
| 20－49 | 12 | 11.2±1.5 | 22.1±2.2* | 5.1±0.64 | 10.1±1.3* |
| 50－59 | 20 | 18.6±2.4 | 29.6±3.4* | 10.5±1.1 | 15.6±1.8* |
| 60－69 | 31 | 21.2±2.1 | 29.2±1.7* | 14.1±1.7 | 17.9±2.1* |
| 70－79 | 52 | 27.3±2.8 | 35.2±3.1* | 17.3±2.4 | 20.7±2.4 |
| 80－89 | 20 | 43.4±8.6 | 46.3±7.2 | 31.2±6.6 | 29.7±4.9 |

Values given are mean±SE

＊：$p < 0.01$

3)clomiphene 投与による gonadotropin 上昇値と，gonadotropin 基礎値，testosterone, estradiol 基礎値との相関性

まず，gonadotropin 基礎値との相関性では，Fig. 4, 5 に示すごとく LH, FSH とも基礎値の高い群において減少反応例が多い傾向にあった．testosterone, estradiol 基礎値との相関性では Fig. 6, 7, 8, 9 に示すごとく，testosterone, estradiol の低い群で減少反応例が多い傾向にあった．そこで，Table 3 に示すごとく，50 歳以降の上昇反応例 91 例と減少反応例 31 例の LH, FSH, testosterone, estradiol 基礎値を比較すると，減少反応例の gonadotropin は正常反応例に比して有意 ($P<0.01$) に高い値を示し，また血中 testosterone, estradiol は減少反応例で有意 ($P<0.01$) に低い値を示しており，減少反応例は hypergonadotropic hypogonadism 様の状態にあった．

次に，LH 減少反応例が LH 基礎値と testosterone, estradiol との相関の中でどのような位置にあるのかについて検討した．まず Fig. 10 に示すごとく estradiol と LH の相関を見ると，estradiol の正常下限(20, 30 歳代の若年者の mean-2SD)である 14.7pg/ml 以下の 28 例中 11 例 (39.3 %) において減少反応例が認められた．一方，estradiol 正常例においても 53 例中 11 例 (20.8 %) に減少反応を認めた．次に，Fig. 11 に示すごとく testosterone と LH の相関で検討すると，testosterone 347ng/dl (20, 30 歳代の若年者の mean-2SD) 以下と低下しているものでは 18

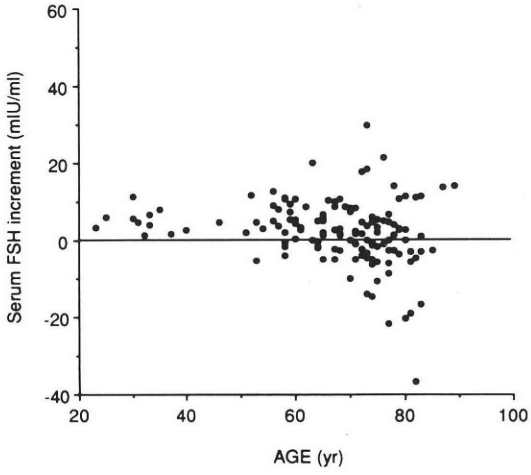



Fig. 3 Serum FSH incremant at day 7 of clomiphene test

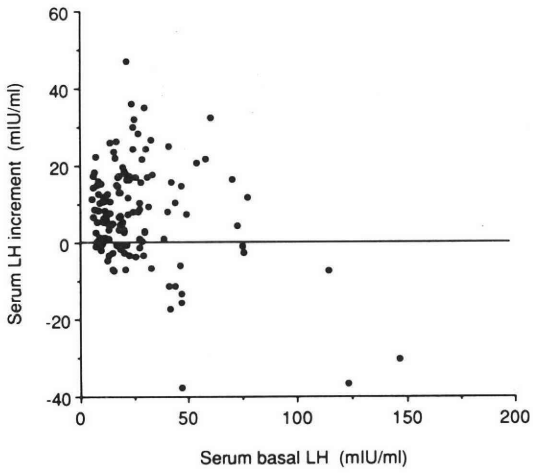



Fig. 4 Correlation of serum basal LH and LH increment at day 7 of clomiphene test

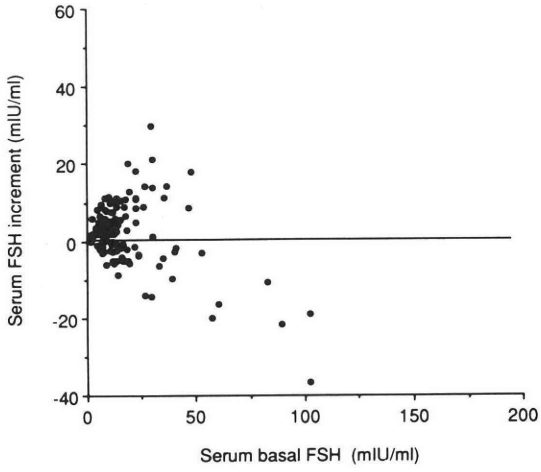



Fig. 5 Correlation of serum basal FSH and FSH increment at day 7 of clomiphene test

Table 2　The atio of increased and decreased LH responders in clomiphene test in each age groups

| age (yr) | No. of subjects | decreased responders (%) | increased responders (%) |
|---|---|---|---|
| 20－49 | 12 | 2(100.0) | 0( 0 ) |
| 50－59 | 20 | 19( 95.0) | 1( 5.0) |
| 60－69 | 31 | 24( 79.4) | 7(22.6) |
| 70－79 | 52 | 37( 71.2) | 15(28.8) |
| 80－89 | 20 | 12( 60.0) | 8(40.0) |

例中11例(66.7%)に，またtestosterone正常例でもやはり49例中8例(16.3%)においてやはり減少反応が認められた．

4)50歳以降の上昇反応例及び減少反応例における，gonadotropinのLH-RHに対する反応性

clomiphene testは視床下部機能を，下垂体から分泌されるgonadotropinの反応性から評価するものである．その為，下垂体にgonadotropin分泌機能不全がある場合には，視床下部機能を正しく評価できない．そこで次に，60歳以降のclomiphene testでのLH上昇反応例52例と減少反応例12例において，LH-RHに対するgonadotropinの反応性を検討した．この結果，Fig. 12, 13に示すごとく，上昇反応例と減少反応例の下垂体のLH-RHに対する反応性

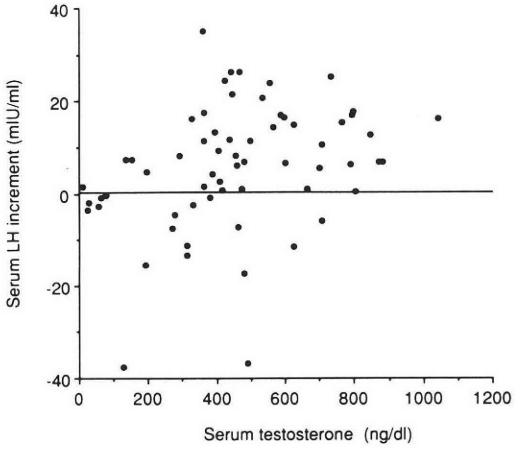



Fig. 6 Correlation of serum testosterone and LH increment at day 7 of clomiphene test

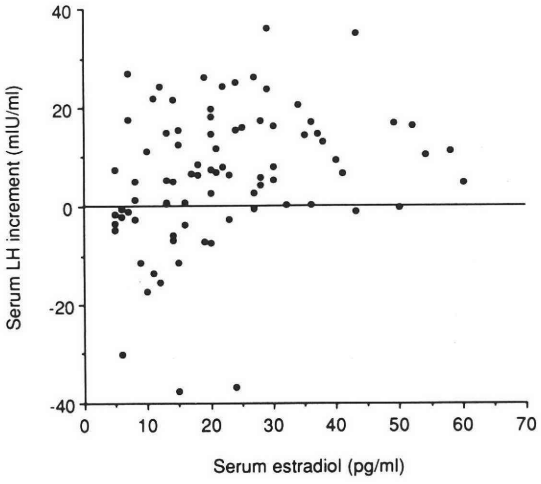



Fig. 7 Correlation of serum estradiol and LH increment at day 7 of clomiphene test

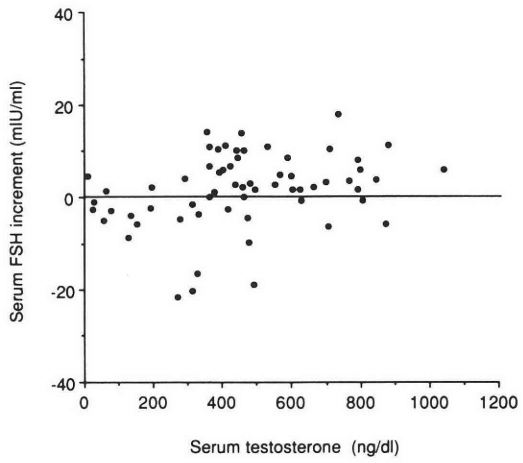



Fig. 8 Correlation of serum testosterone and FSH increment at day 7 of clomiphene test

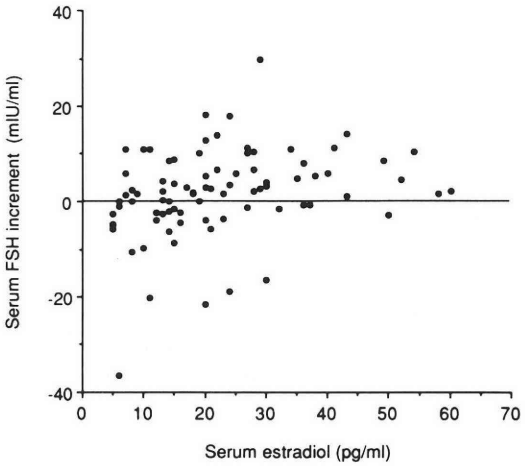



Fig. 9 Correlation of serum estradiol and FSH increment at day 7 of clomiphene test

Table 3　Basal LH, FSH, testosterone and estradiol levels of increased and decreased LH responder in clomiphene test

| | increased responder | decreased responder |
|---|---|---|
| No. of subjects | 91 | 31 |
| LH (mIU/ml) | 23.3±1.6 | 39.2±6.2* |
| FSH (mIU/ml) | 15.4±1.2 | 28.4±5.1* |
| testosterone (ng/dl) | 520.7±34.4 | 306.8±49.6* |
| estradiol (pg/ml) | 28.9±2.2 | 16.9±3.1* |

Values given are mean±SE

*：$p < 0.01$

には明らかな違いがなかった.

## 考　察

正常成人の clomiphene citrate に対する gonadotropin の反応性は，その作用機序[3,4]からして上昇反応であるはずであるが，我々の検討では50歳以降 clomiphene 投与による gonadotropin の減少反応例が認められ，しかもその減少反応例は老化にともない増加傾向にあった.

この clomiphene を用いた検査法は，視床下部から GnRH 分泌動態を，gonadotropin 動態を介して間接的に評価する方法である．従って下垂体機能に異常がある場合には，視床下部機能を正確に評価できないわけであるが，LH-RH test の結果では，減少反応例の下垂体機能は正常反応例と同様であり，下垂体機能の異常がこの減少反応の原因でない事が明らかであった.

これまでにも clomiphene 投与による gonadotropin の減少反応は，閉経後婦人[2]，卵巣摘除症例[5]，思春期前小児[1]において報告されている．まず閉経後婦人及び卵巣摘除症例における減少反応は，内因性の estrogen 基礎値が低い事が原因と考えられている．clomiphene は本来，anti-estrogenic drug であるが，その構造自身が stilbesterol に似ており，弱い estrogen-like action を持っている．その為，閉経後婦人のように内因性の estrogen が少ない場合には，clomiphene との量的な力関係で，clomiphene の anti-estrogenic action よりも estrogen-

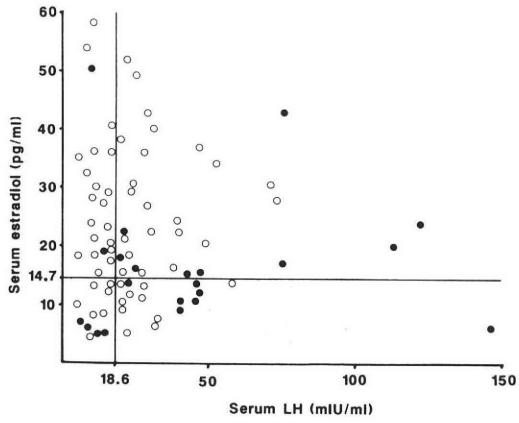



Fig. 10 Correlation of serum LH and estradiol in subjects who received clomiphene test. Open circles indicate increased responders and closed circles indicate decresed responders.

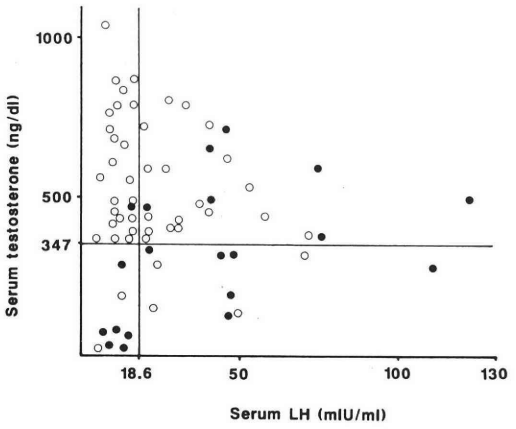



Fig. 11 Correlation of basal LH and testosterone levels in subjects who received clomiphene test. Open circles indicate increased responders and closed circles indicate decreased responders.

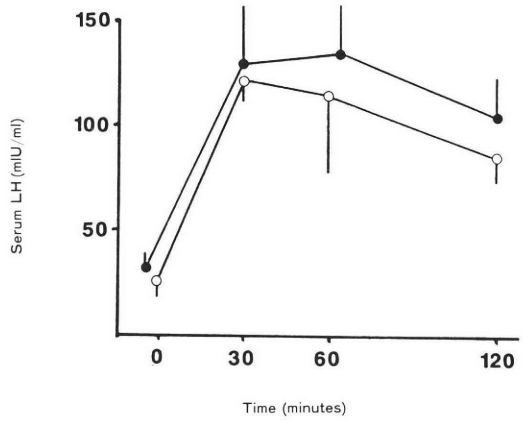



Fig. 12 Serum LH respnse to LH-RH. Closed circle indicates the decreased responders (n=12) and open circle does the increased responder. (n=52) Bars indicates SE.

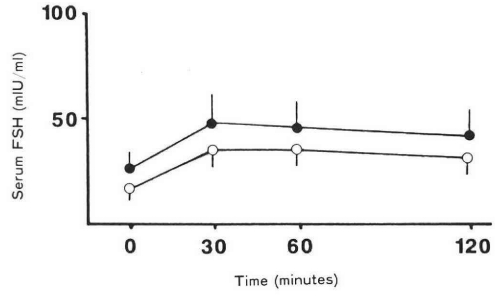



Fig. 13 Serum FSH response to LH-RH. Closed circles indicates decreased responders (n=12) and open circles indicates increased responders (n=52). Bars indicates SE.

like action が強く表われる為, gonadotropin の減少反応をもたらすと考えられている[2,5]. また, この低estrogen 環境下での clomiphene の gonadotropin 抑制作用は rat を用いた実験的検討でも確かめられている[8].

我々の結果では, estradiol 低値の 28 例中 11 例(39.3 %), 及び testosterone 低値の 18 例中 12 例 (66.7 %)において clomiphene 投与による LH 抑制反応を認め, これらは閉経後婦人及び卵巣摘除後の症例と同様に clomiphene の estrogen-like action によると考えられた.

一方, 思春期前小児においても clomiphene 投与による減少反応を生ずることが知られているが, この場合には視床下部—下垂体系の性ステロイドに対する感受性が高いために clomiphene の estrogen-like action が強く表われることがその異常反応性の原因と考えられている[1].

今回の検討で testosterone, estradiol の低下にも拘らず LH が正常範囲内 (20～30 歳台の若年者の mean+2SD である 18.6mIU/ml 以下)にあるものが認められたが, この群の中で clomiphene 投与による減少反応を示したものについては, 性ステロイドに対する視床下部の感受性が高い為に, clomiphene 投与時に gonadotropin の減少反応を生じた可能性がある.

老年者の性ステロイド感受性については議論のあるところであるが, Winters ら[11]は若年男子と老年男子に testosterone, dihydro-testosterone を投与し, その投与前後での血中 LH の平均値, pulse frequency, amplitude を検討した結果, testosterone, dihydro-testosterone 投与による LH の平均値, pulse frequency の減少は老年者の方が著明であること及び pulse amplitude の減少は老年者にのみ認められるということから, 老年者では androgen に対する視床下部の感受性が若年者よりも増大していることを推論している.

この異常反応性は sex steroid 正常例でも認められ, estradiol 正常例では 53 例中 11 例(20.8), testosterone 正常例では 49 例中 8 例(16.3 %)に認められた. その詳細な機序は不明であるが, 一つの推論として脳内 aromatase 活性の低下が示唆される.

脳内で testosterone を estradiol に変換する aromatase 活性は内因性 testosterone の量によって調節されており, testosterone の減少は脳内 aromatase 活性を低下させる事が Rosseli ら[6], Takahashi[9]によって報告されている. 一方, 老年者においては血中 testosterone binding globulin (TeBG)の上昇に伴い free testosterone の減少が著明となる[7]ことが知られている. その為, 血中 testosterone 値が正常であるにも拘らず clomiphene に対する gonadotropin の減少反応を生じたものでは, 血中 free testosterone の減少に伴い視床下部 aromatase 活性が低下し, 視床下部内 estrogen 濃度が減少することによって clomiphene の estrogenic action を生じている可能性がある. 50 歳以下の者では, testosterone 正常であるにも拘らず clomiphene による gonadotropin 抑制反応を示した者が認められないこともこの推論を支持する所見の一つと考えられた.

以上の結果から, clomiphene test における gonadotropin 抑制反応は, 単に精巣機能の低下に伴う sex steroid の減少のみでなく, 視床下部の sex steroid 感受性或いは脳内 aromatase 活性の低下といった視床下部自体の機能的変化が関与している可能性が示唆された. しかし, その詳細な機序は未だ明らかではなく, 他の neurotransmitter, neuromodulator の関与を含めたより詳細な検討が必要である.

## 文　献


1) Grumbach, M. M.: Hypothalamic pitutary regulation of puberty in man: Evidence and concept derived from clinical research. in Control of the onset of puberty, pp115, John Wiley & Sons, New York, 1974

2) Hashimoto, T., Miyai, K., Izumi, K. and Kumahara, Y.: Effect of clomiphene citrate on basal and LRH-induced gonadotropin secretion in postmenopausal women, JCEM, 42: 539, 1976

3) Kato, J., Kobayashi, T. and Ville, C. A.: Effect of clomiphene on the uptake of estradiol by the anterior hypothalamus and hypophysis, Endocrinology, 82: 1049, 1968

4) Kerin, J. F., Lin, J. H., Phillipou, G. and Yen, S. S. C.: Evidence for a hypothalamic site of action of clomiphene in women, JCEM, 61: 265, 1985

5) Ravid, R., Jedweb, G., Persitz, E., David, M. P., Karni, N., Gil, S., Cordova, T., Harell, A. and Ayalon, D.: Gonadotropin release in ovariectomized patients, Clinical endocrinology, 6: 333, 1977

6) Roselli, C. E. and Resko, J. A.: Androgen regulate brain aromatase activity in adult rats through a receptor mechanism, Endocrinology, 114: 2183, 1984

7) Royer, G. L. JR., Seckman, C. E., Schwartz, J. H., Bennett, K. P. and Hendrix, J. W.: Relationship between age and levels of total, free, and

bound testosterone in healthy subjects, Curr. Therap. Res., 35: 345, 1984
8) Schultz, K. D., August, S., Gasde, K. and Kramer, G.: Studies on the anti-oestrogenic and oestrogen-like action of clomiphene citrate; animal experiment, Gynec. Invest., 3: 134, 1972
9) Takahashi, Y., Fukaboli, Y., Kaburagi, Y. and Yamanaka, H.: The regulation system of brain aromatase activity; effects of androgens on hypothalamic aromatase in the male rats, Folia Endocrinol., 62: 1212, 1986
10) Tenover, J. S., Dahi, K. D., Hsueh, A. J. W., Lim, P., Matsumoto, A. M. and Bremner, W.: Serum biaoactive and immunoactive follicle stimulating hormone levels and the response to clomiphene in healthy young and elderly men, JCEM, 64: 1103, 1987
11) Winter, S. J., Sherins, R. J. and Troen, P.: The gonadotropin-suppressive activity of androgen is increased in elderly men, Metabolism, 33: 1052, 1984

## The aging of hypothalamo-pituitary-testicular axis. I : Hypothalamic function in male senescence

Naohito Mikuma, Yoshiaki Kunamoto and Hiroshi Maruta

Department of Urology Sapporo Medical College, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

The aging of hypothalamus was examined by analyzing gonadotropin respons to clomiphene citrate (100mg/day, 5 days) in 167 adult male subjects, between the ages of 20 to 89, with no endocrinological diseases.

Between the ages of 20 to 49, all subjects showed gonadotropin elevation at day 7 of clomiphene test. But after the age of 50, decrease in gonadotropin response to clomiphene was observed. The ratio of decreased responders in each decade increased with aging (50th: 5.5%, 60th: 22.6%, 70th: 28.8%, 80th: 40.0%).

In decreased responders, basal gonadotropin levels were significantly ($p<0,01$) elevated, and serum testosterone and estradiol levels were significantly ($p<0.01$) decreased in comparison to increased responders. The low sex steroid milieu was supposed to be the cause of estrogen-like action of clomiphene and resulted in gonadotropin suppression. But in some decreased responders, the cause of gonadotropin suppression by clomiphene was supposed to be the elevated brain sensitivity to sex steroid and also to be the decreased aromatase activity in the hypothalamus.

These results suggest that the aging of hypothalamus itself might be concerned to the decreased of serum gonadotropin levels in response to clomiphene citrate, as well as the decrease of serum sex steroid concentration. However, the precise mechanism of this abnormal response to clomiphene still remains to be elucidated.

(受付:1990年8月24日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 精子自動分析装置による精液検査

## Semen Analysis using an Automated Semen Analyzer

千葉大学医学部泌尿器科学教室（主任：島崎　淳教授）
始関吉生　角谷秀典　高原正信
Yoshio SHISEKI　Hidenori SUMIYA　Masanobu TAKAHARA
小竹　忠　島崎　淳
Tadashi KOTAKE　Jun SHIMAZAKI

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

精索静脈瘤および特発性男子不妊症を含む270検体の精液を精子自動分析装置(Cell Soft Series 3000)とマクラー計算盤による従来の検査法で比較した.

精子濃度10～110×$10^6$／mlの範囲において,両測定法はよい相関を示したが,従来法に比べ精液自動分析装置は10×$10^6$／ml未満および110×$10^6$／ml以上では高値傾向を示し,また精子運動率は全範囲においてやや低値であった.

精索静脈瘤の精液自動分析装置による検査は,精子濃度別にみると60×$10^6$／ml以上で特発性男子不妊症に比し運動率が低下しており,60×$10^6$／ml未満では両者に運動率の差を認めず従来法の所見と同じであった.精子Velocityおよび精子Linearityには精子濃度別にみて両群間では差を認めなかった.これより,精索静脈瘤では運動精子数が減少しているが、個々の運動精子能は保持されていると推測した.

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 655—659, 1991)

### 緒　言

男子不妊症の精液検査は,従来よりマクラー計算盤による検査が行われてきたが,検査者の経験により左右さる欠点があった.1981年のLevinら[1]が精子自動分析装置を報告して以来,精子運動能の解析が発展してきた[2~8].今回,不妊症を主訴とする患者の検体を用いて,精子自動分析装置（Cell Soft Series 3000）の有用性を検討すべく,精子濃度および運動率を測定し従来法と比較検討した.また,精子自動分析装置を用いて,精子運動能を精索静脈瘤患者と特発性男子不妊症の間で比較した.

### 対象および方法

1988年3月から7月までに,千葉大学附属病院泌尿器科を不妊を主訴に受診した270例につき検討した.精液は,禁欲5日後,用手法にて採取し,室温にて30分静置の後、検査に供した.従来法は1滴(約5 μl)で,マクラー計算盤を用いて精子濃度と運動率を測定した.精子自動分析装置による検査は,Cell Soft Series 3000 (CRYO Resourse社）を用いた.パラメーターは,Frame数15(30Hz),Velocity 10.00～150.00 microns/sec, 4～25 pixels (Pixel Scale 0.688microns),Threthold Grey Level 110～125に設定した.Cell Softの測定は解析精子数が,150個以上を原則とした.低精子濃度で解析精子数が150個未満では20視野まで測定し,Velocityの平均標準誤差が5未満を信頼できる測定結果とし,それ以外の測定結果は対象から除外した.触診法にて精索静脈瘤を認める27例と特発性男子不妊症74例はCell

Soft にて運動能を測定し，精子濃度別に両群の結果を比較した．統計的解析はｔ検定により，数値は平均±標準偏差（M±SD）で表した．

## 結　果

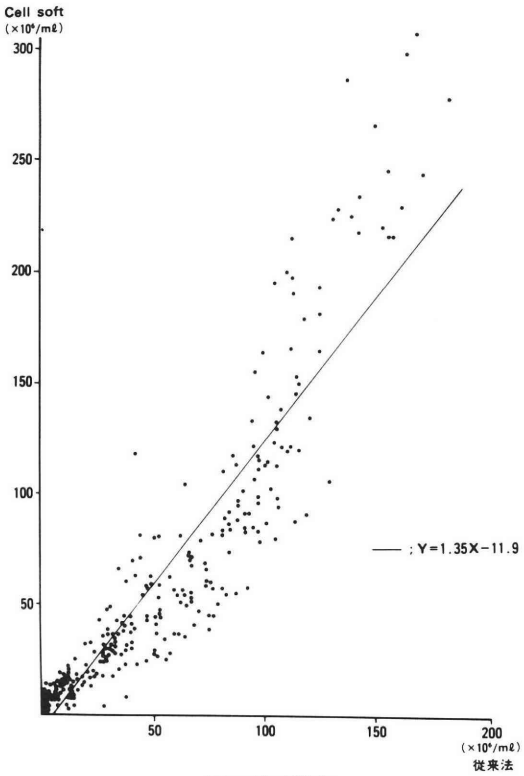



図1 精子濃度

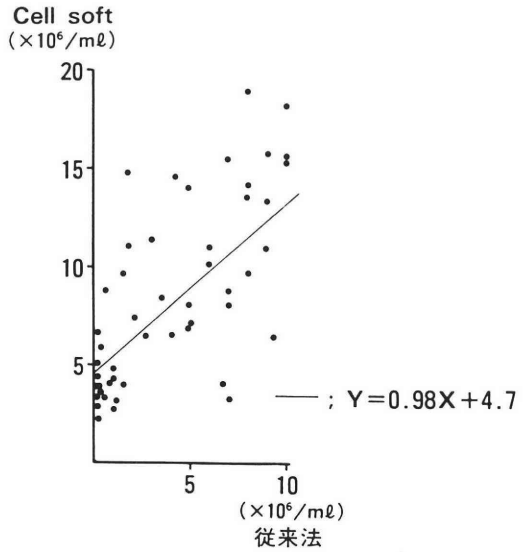



図2 10×10⁶/ml 未満の精子濃度

1）従来法と Cell Soft による精子数および精子運動率

両測定法による精子濃度はよく一致していた（図1）．精子濃度を層別化して検討すると，10×10⁶／ml 未満の群では両値はよく相関しているが(図2)，従来法の精子濃度は 3.7±3.2×10⁶／ml で，これに対応する Cell Soft の精子濃度は 8.3±4.5×10⁶／ml で有意差（$p<0.01$）があり，Cell Soft では従来法に比し高値をとる傾向であった．精子濃度 10～110×10⁶／ml では，両値はよく一致していた(図3)．精子濃度 110×10⁶／ml 以上では，両測定法間に正の相関を認めるも，従来法の精子濃度は 144.6±16.9×10⁶／ml で，Cell Soft の精子濃度 223.7±60.2×10⁶／ml に比べ，対応するｔ検定で有意に（$p<0.01$）高値をとる傾向であった（図4）．

精子運動率は，従来法と Cell Soft との間でいずれの精子濃度をみてもよく相関していた．しかし，従来法と Cell Soft の精子運動率は対応する検体でみると両者に有意差（$p<0.01$）があり，Cell Soft のものは低値傾向であった．（図5）

2）精索静脈瘤と特発性男子不妊症の精子運動能

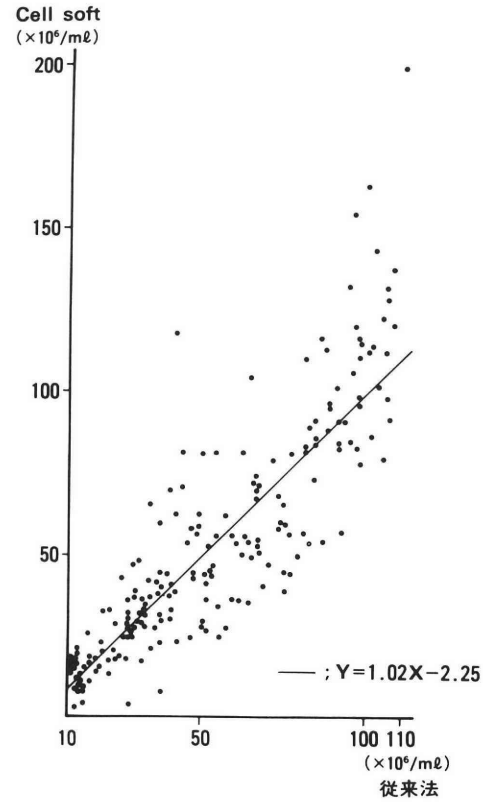



図3 10×10⁶/ml 以上 110×10⁶/ml 未満の精子濃度

精子濃度を $30\times10^6$／ml 未満，$30\times10^6$／ml 以上 $60\times10^6$／ml 未満，$60\times10^6$／ml 以上の3群に分けて両疾患群の運動能を検討した．$60\times10^6$／ml 以上の精子運動率は，精索静脈瘤の方が両測定法共低値であった(図6，7)．しかし，精子濃度 $30\times10^6$／ml 以上 $60\times10^6$／ml 未満および $30\times10^6$／ml 未満共に，両測定法で両者の精子運動率に差を認めなかった．両者の間で平均精子 Velocity（精索静脈瘤 36.8±7.9，特発性男子不妊症 37.9±9.6），平均精子 Linearity (4.26±1.18，4.51±1.28) に差を認めなかった(図8，9)．

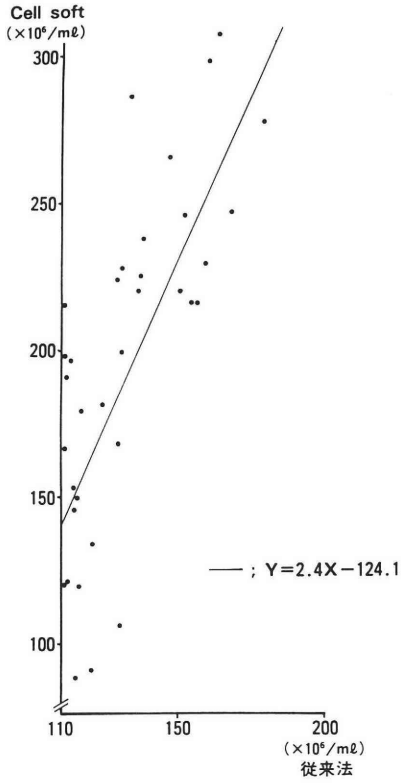



図4 $110\times10^6$/ml 以上の精子濃度

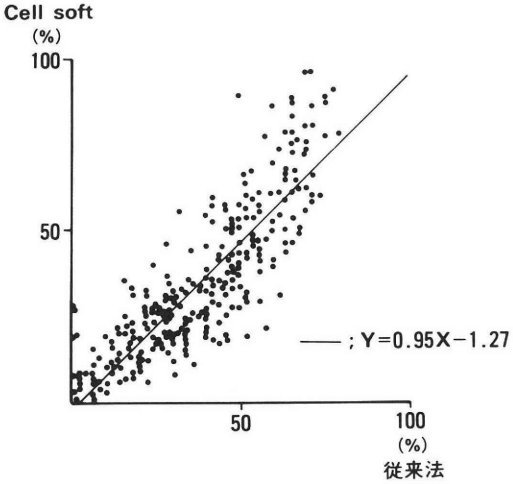



図5 精子運動率

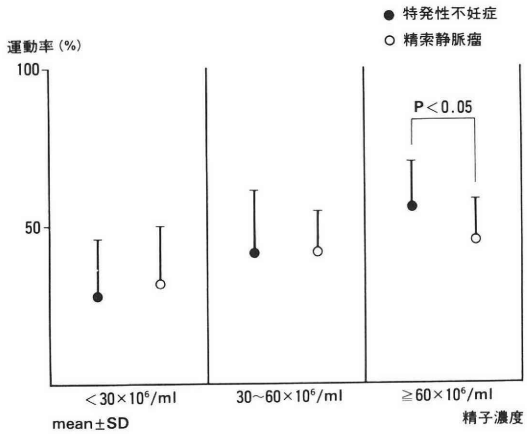



図6 従来法による精子運動率

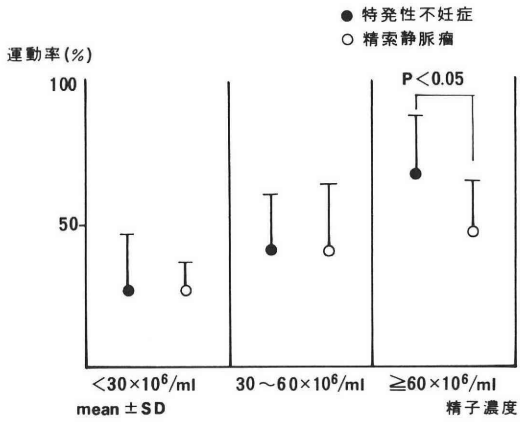



図7 Cell Soft による精子運動率

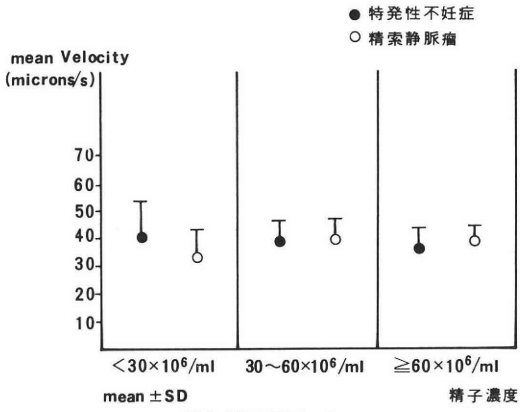



図8 精子 Velocity

## 考　察

精子自動分析装置が開発され，従来法による精子濃度・運動率の測定に客観性がでた．さらに，精子のVelocity, Linearity, Amplitude of lateral head displacement (ALH)等の解析が迅速に行えるようになった．Knuthら[9]は，$20\times10^6$／ml以下の精子濃度では，debrisの影響で，従来法に比し有意に精子濃度は高値，運動率は低値を示し，$100\times10^6$／ml以上の精子濃度では精子頭部の重なりや精子頭部の接触によるsizeの超過のため，実際よりも低く精子濃度を算定するであろうと述べている．自験例においても精子濃度$10\times10^6$／ml以下ではCell Softが従来法に比べ高値傾向を示した．このことから，ビデオ画面と解析精子数を比較し検体の精子濃度を、可及的にthrethold grey level等で調節すること，精子頭部と同程度の大きさのdebrisが存在する場合はdebrisの割合を考慮して算定結果を評価する必要がある．一方，自験例において高濃度精子の検体では，Cell Softで高値に算定された．高精子濃度の場合は，従来法による肉眼的測定が困難であり，$100\times10^6$／ml以下に精液を希釈して精液分析を行えば，従来法とCell Softは同値傾向を示すであろうと報告されている[10,11]．

精子運動率は，Cell Softが精子濃度を高く算定することから，従来法とCell Softで運動精子数が同じであるとすると，運動率は相対的低下が予想れれる．自験例では，従来法の精子濃度が$110\times10^6$／ml未満の精子濃度において，従来法の平均精子濃度は$45.7\times10^6$／ml，Cell Softの平均精子濃度は$46.1\times10^6$／mlであり，従来法の平均運動率が37.1％であることから，Cell Softの平均運動率は36.8％になると推定される．しかし，実測値は32.5％でありさらに低値を示した．Cell Softによる測定可能なVelocityの範囲が10～150microns／秒であることが，推定よりも低値をとった一つの要因であると考えられる．

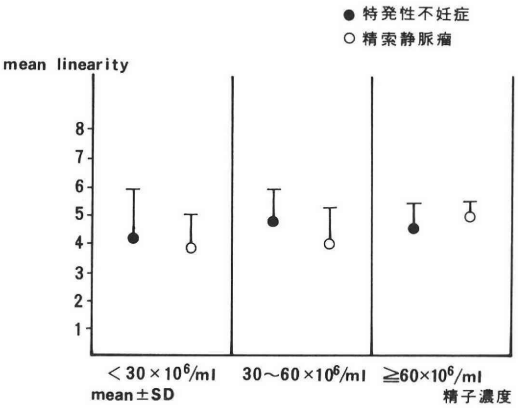



図9 精子Linearity

従来法でみた場合，精索静脈瘤の精子運動率は，$50\times10^6$／ml以上の精子濃度では特発性男子不妊症より低下していると報告している[12～14]．本研究においても，従来法とCell Softを用いて測定した結果，$60\times10^6$／ml以上の精子濃度において精策静脈瘤では特発性に比し有意に運動率は低下しており，従来の報告をうらずけた．しかし，平均Velocityおよび平均Linearityは，特発性男子不妊症と比較して差を認めなかったことから，個々の運動精子の運動能は精索静脈瘤で保持されていると見なされた．以上より精索静脈瘤では高度の運動能を有する精子の減少が推測された．

## 文　献

1) Levin, R. M., Greenberg, S. H. and Wein, A. J.: Clinical use of the turbidimetric analysis of sperm motility, comparison with visual techniques, Fertil. Steril., 35: 332, 1981
2) Knuth, U. A., Yung, C., Nieschlag, E. N.: Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is biased by subjective paramenter setting, Fertil. Steril., 48: 118, 1987
3) Mahong, M. C., Alexander, N. J., Swanson, R. J.: Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analysis, Fertil. Steril., 49: 876, 1988
4) 石津和彦，林田英嗣，山川弦一郎，磯山理一郎，瀧原博史，酒徳治三郎：精子自動分析装置を用いて測定した精子運動能の保持性，日不妊会誌，33：769，1988
5) Pedigo, N. G., Vernon, M. W., Curry, T. E.: Characterization of a computerized semen analysis system, Fertil. Steril.,52: 659, 1989
6) Levin, R. J., Bentley, K. S., Mathew, R. M., Mohr, K. L., Brown, M. H., Working, P. K., Hurtt, M. E.: Computer-assisted semen analysis: results vary across technicians who prepare videotapes, Fertil. Steril., 52: 673, 1989
7) 植野卓也，石津和彦，林田英嗣，磯山理一郎，馬場良和，瀧原博史，酒徳治三郎：精子自動分析装置と顕微鏡下精子算定法との比較検討－精子濃度別各パラメーターの比較－，日不妊会誌，34：465，1988
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の精子運動性の検討，西日泌尿，52：1013，1990
9) Knuth, U. A., Nieschlag, E.: Comparison of computerized semen analysis with the conven-

tional procedure in 332 patients, Fertil. Steril., 49: 881, 1988
10) Vantman, D., Zindman, M., Koukoulis, G., Sherins, R. J., Dennison, L.: Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influnce of sperm concentration on linear velocity determination, Fertil. Steril., 49: 510, 1988
11) Mortimer, D., Goel, N., Shu, M. A.: Evaluation of the Cell Soft automated semen analysis system in routine laboratory setting, Fertil. Steril., 50: 960, 1988
12) 伊藤晴夫，柳　重行，川村健二，片海善吾，五十嵐辰夫，角谷秀典，布施秀樹，宮内大成，島崎　淳：精索静脈瘤の不妊症の成因　1　精索静脈瘤は男子不妊症の原因か，西日泌尿，48：1105，1986
13) Macleod, J.: Seminal Cytology in the Presence of Varicocele, Fertil. Steril., 16: 735, 1965
14) Greenberg, S. H.: Varicocele and male fertility, Fertil. Steril., 28: 699, 1977

## Semen analysis using an automated semen analyzer

Yoshio Shiseki, Hidenori Sumiya, Masanobu Takahara, Tadashi Kotake and Jun Shimazaki

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

Two hundreds and seventy semen samples were studied to compare the result of the computerized semen analysis with that of the conventional procedure. For second, sperm motility characteristics were compared with 27 patients with varicocele and 74 idiopathic male infertile patients by using computerized semen analysis.

In sperm concentration from $10\times10^6$/ml to $110\times10^6$/ml, the good correlation of concentration was found between the two analyzing methods. But in sperm concentration less than $10\times d10^6$/ml or more than $110\times10^6$/ml, the computerized semen analysis yieled higher concentration that the conventional method. The percentile motility was well correlated each other, but computerized semen analysis tended to show the lower percentile motility

In sperm concentration more than $60\times10^6$/ml the ejaclate ftom the patient with varicocele showed significantly lower sperm percent motility than that from idiopathic infertile men. No significant differences were observed in velocity and linearity between varicocele and idiopathic infertility.

(受付:1990年10月19日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 前立腺機能の指標としての前立腺液中 polyamine 濃度の検討

# Prostatic Fluid Polyamine Levels as a Marker of Prostatic Function

札幌医科大学泌尿器科学教室（主任：熊本悦明教授）

立木 仁　熊本悦明　南部明民
Hitoshi TACHIKI　Yoshiaki KUMAMOTO　Akihito NANBU
伊藤直樹　三熊直人　高木良雄
Naoki ITOH　Naohito MIKUMA　Yoshio TAKAGI
塚本泰司　丸田浩
Taiji TSUKAMOTO　Hiroshi MARUTA

Department of Urology, Sapporo Medical College,
Sapporo 060, Japan

大阪医科大学第一内科学教室（主任：大澤仲昭教授）

大澤仲昭
Nakaaki OHSAWA

The First Department of Internal Medicine,
Osaka Medical College

前立腺液中の総 polyamine 濃度を測定し前立腺機能の指標としての意義について検討した．分画射精による検討の結果，精液中の polyamine が前立腺由来であることを確認した．前立腺液中 polyamine 濃度は前立腺機能の指標とされる亜鉛，magnesium 濃度と高い相関を示し，前立腺機能の指標として有用と思われた．前立腺液中 polyamine 濃度は前立腺機能が低下していると考えられる高度の前立腺炎症例で著明に低下していた．男子不妊症においては一部の症例で前立腺液中 polyamine 濃度が低値を示したが，精子濃度および精子運動率との関係はなく，その意義については明らかでなかった．ただし全身の androgen level が低い症例では前立腺液中 polyamine 濃度は低値であり，ある程度 androgen level を反映するものと思われた．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 660—665, 1991)

## 緒　言

polyamine は全身に広く分布するが，前立腺では前立腺上皮細胞より前立腺液中に分泌され，全身でもっとも高濃度に存在している[1,2]．polyamine の生理的役割については不明な点が多いが，前立腺液中の polyamine 濃度は前立腺機能を反映する指標になりうると考えられる．

今回我々は分画射精によって得られた精液の polyamine 測定から，ヒト精液中に含まれる polyamine が前立腺由来であることを確認するとともに，他の前立腺機能の指標となる物質との相関より前立腺液中 polyamine 測定が前立腺機能検査法として有用であるか否かを検討し，さらに前立腺炎

および男子不妊症症例において前立腺液中polyamineがどのような値を示すかについて検討したので報告する.

## 対象および方法

対象は前立腺炎49例，未治療男子不妊症24例，およびhypogonadism症例3例である。

方法は，前立腺massageにより前立腺液を採取し，酵素法による協和メディックス社製血中polyamine定量試薬kitを用いて，前立腺液中総polyamineを測定した[3].

また，従来から前立腺機能を反映するとされている前立腺液中亜鉛（Zn）およびmagnesium (Mg)も同時に測定した．controlは若年正常男子16例である.

また，正常男子5例で分画射精を行い，精漿中のpolyamineおよびfructoseを各分画ごとに測定した．採精に用いるtrayはEliassonらが用いたものに準じて製作した[4].

## 結　果

①分画射精

分画射精は律動的に射出される精液を順次採取するもので，射精の前半では前立腺液が，後半では精嚢腺液が多いとされている．したがって精漿中の物質が前立腺由来であるか精嚢腺由来であるかを推測するのに用いられている.

polyamineが前立腺から分泌されることを確かめる目的で，正常男子5例で分画射精で精液を採取し，精漿中のpolyamineおよび精嚢腺由来とされているfructoseを各分画ごとに測定した（Fig. 1A）．その結果fructoseは射精の最初で少なく最後に近づくにつれ徐々に多くなるのに対し，polyamineは射精の最初でもっとも多く，その後は徐々に低下した．またFig. 1Bに前立腺由来であるZnとMgの測定結果を示したが，polyamineと同様射精の最初で多くその後徐々に低下した．したがって，精液中のpolyamineが前立腺由来であることを確認することが出来た.

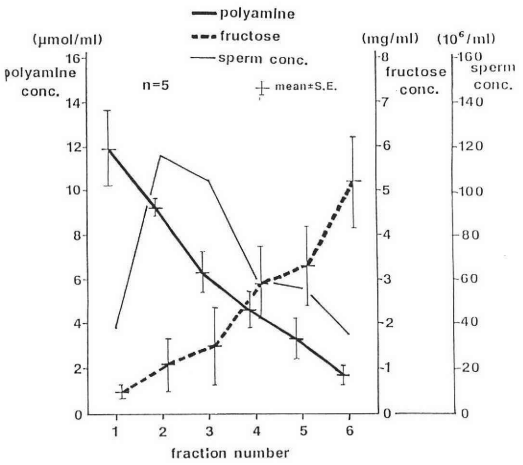



Fig. 1A 分画射精におけるポリアミンおよび果糖濃度

②前立腺液中ZnおよびMg濃度との関係

前立腺液中polyamine濃度と，前立腺機能の指標とされる前立腺液中ZnおよびMg濃度との関係について検討したところ，それぞれ有意な正の相関が認められた（Fig. 2A. 2B.）．したがって前立腺液中polyamine濃度は前立腺機能の指標として有用と思われた.

③前立腺炎

前立腺炎症例の前立腺液中polyamine濃度の測定結果をFig. 3.に示す．症例を前立腺液1視野(400倍）当たりの白血球数に応じて4群に分けた.

(±)　5～9個
(＋)　10～29個
(＋＋)　30個～視野の半分
(＋＋＋) 視野の半分以上

前立腺液中に白血球を認めない正常男子では前立腺液中polyamine濃度が平均16.8μmol/mlであったが，前立腺炎が高度と考えられる前立腺液中白血

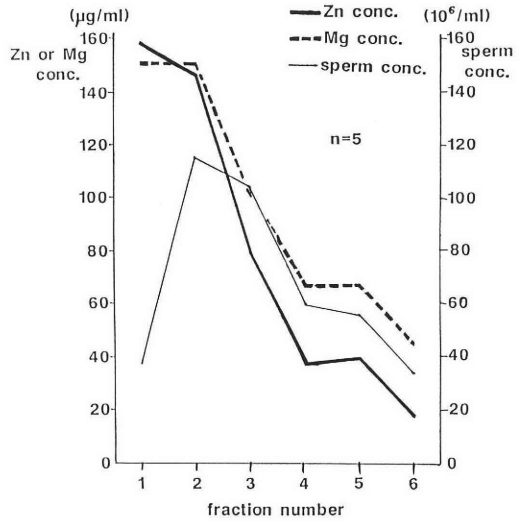



Fig. 1B 分画射精における亜鉛およびマグネシウム濃度

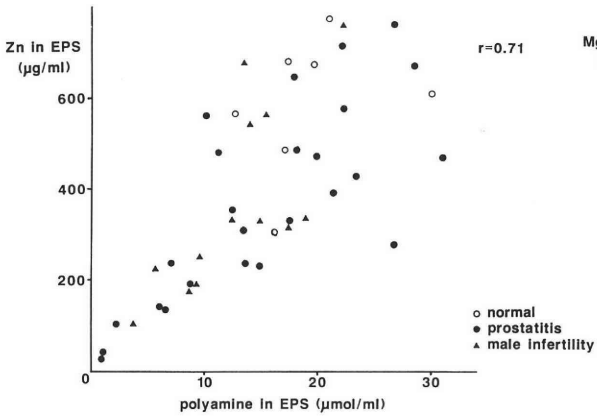



Fig. 2A 前立腺液中 polyamine 濃度と Zn 濃度との関係

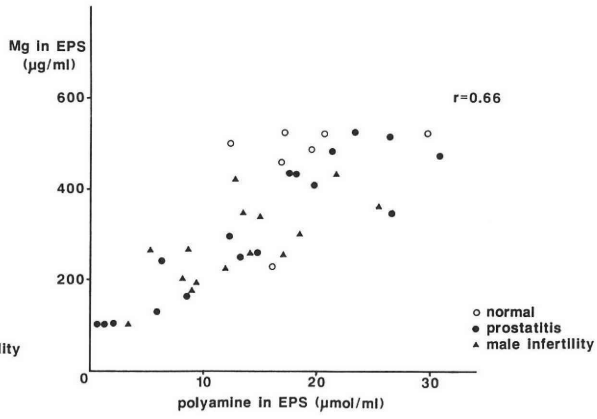



Fig. 2B 前立腺液中 polyamine 濃度と Mg 濃度との関係

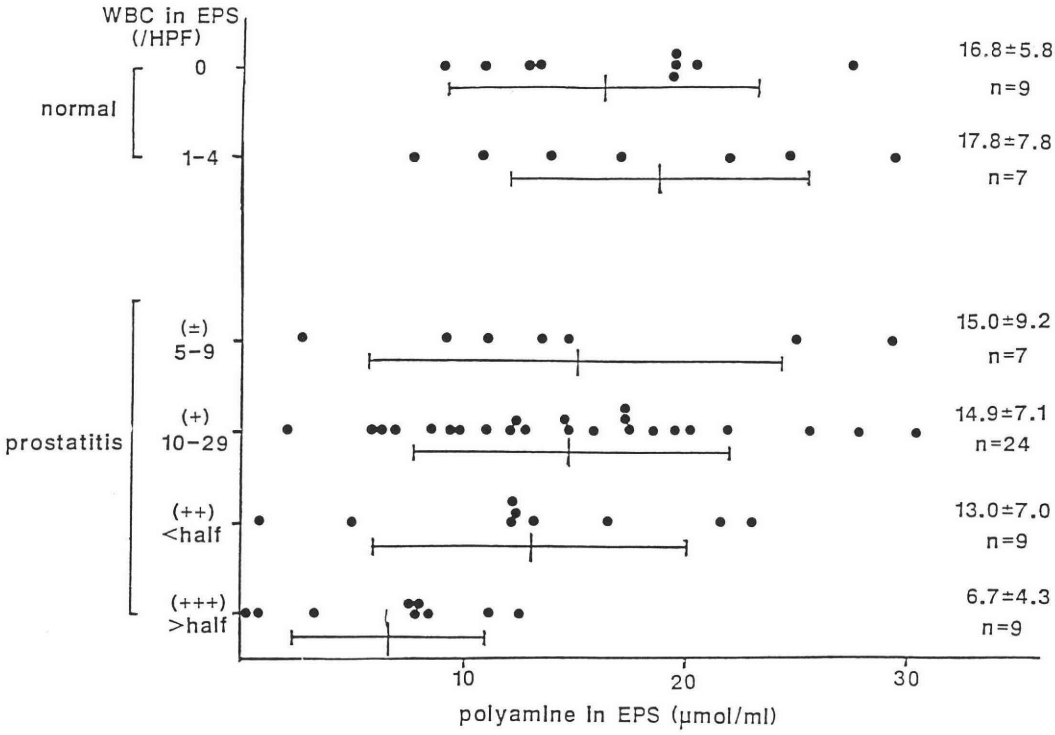



Fig. 3 前立腺液中白血球数とポリアミン濃度との関係

球数が（＋＋＋）の前立腺炎症例では平均 6.7μmol/ml と低値を示した．

④男子不妊症

男子不妊症症例についての結果を Fig. 4A に示す．男子不妊症症例の前立腺液中 polyamine 濃度は，一部の症例で低値を示すものの，広い範囲に分布しており，精子濃度，運動率との関係も明らかではなかった．

また血中 testosterone level が著明に低値である hypogonadism 症例を含め前立腺液中 polyamine 濃度と血中 testosterone 濃度との関係をみると，血中 testosterone level が正常範囲を下回って低値のものでは polyamine 濃度も低値であった (Fig. 4B)．したがって，polyamine の分泌能は全身の androgen level にある程度左右されるものと思われた．

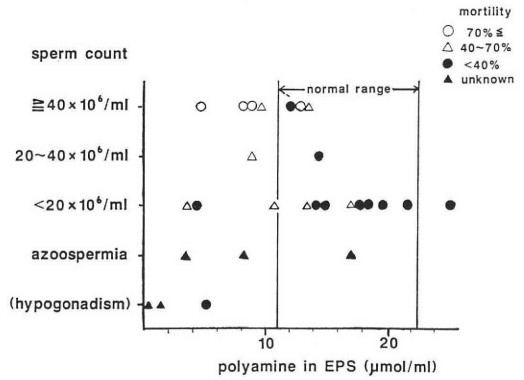



Fig. 4A 男子不妊症における前立腺液中ポリアミン濃度

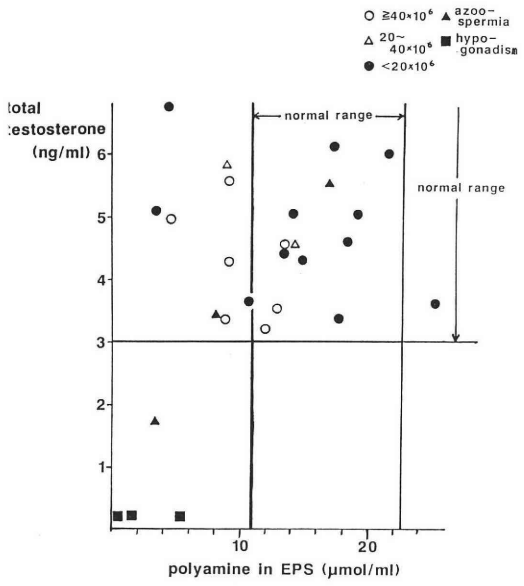



Fig. 4B 前立腺液中ポリアミン濃度と血糖 testosterone 濃度との関係

## 考　察

polyamine は spermine, spermidine, putrescine の3種の物質の総称であり，尿素 cycle の主要中間代謝産物である ornithine より生合成される (Fig. 5.).

polyamine は種々の細胞に成長因子として働き[5]，polyamine 合成酵素阻害剤が悪性腫瘍の治療薬として注目されている．また，血中・尿中の polyamine は種々の悪性腫瘍で高値を示すため，tumor marker としても利用されている．

polyamine は全身に広く分布しているが，前立腺に最も高濃度に存在し Zn, Mg などと同様，前立腺上皮細胞から前立腺液中に分泌されている．今回我々

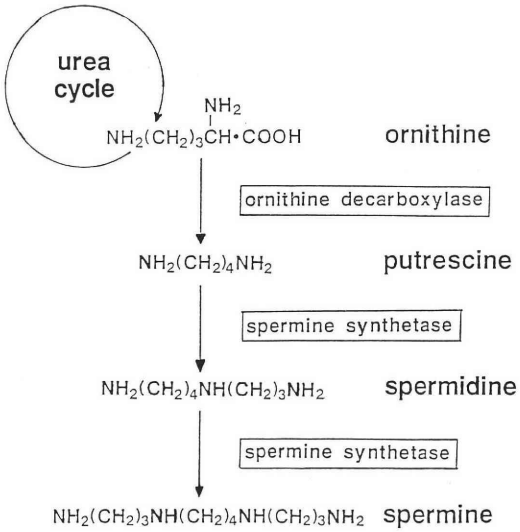



Fig. 5 ポリアミンの生合成経路

は分画射精の検討からこの点を確かめ，Purvis らも polyamine が分画射精の前半の分画に高濃度に存在することを報告している[6]．

前立腺液および精液中における polyamine の機能については不明な点が多いが，感染防御物質としての働きがあることが示唆されている[7][8][9]．

polyamine は前述の通り spermine, spermidine, putrescine の3種の物質の総称であり，前立腺液および精液では90％以上が spermine である．従来 polyamine 測定は，高速液体 chromatography やアミノ酸分析法を用いておこなわれてきたが，今回我々は，尾辻らが開発した酵素法による極めて簡便な総 polyamine 測定法を用いた．本法は spermine,spermidine, putrescine の総和を測定するものであり，前立腺液中の polyamine は90％以上が spermine であることから，前立腺液を用いた本法による測定値は spermine 濃度に近似していると考えられる．

Zn, Mg など，前立腺由来物質の精漿中における濃度は，前立腺機能の指標として知られている[4]．しかし精漿は前立腺液と精嚢腺液の混合物であり，両者の割合は一定ではないため，精漿中の前立腺由来物質の濃度を前立腺の分泌能の指標とするには問題があると思われる．そこで今回は，前立腺液中の polyamine 濃度について，前立腺機能の指標としての有用性を検討した．

まず，前立腺液中 polyamine 濃度が他の前立腺機能の指標となる物質の濃度とどの程度相関があるのかを見る目的で，前立腺液中の Zn および Mg 濃度と

の関係について検討したところ，Zn および Mg のいずれとも高い相関を示した．このことから前立腺液中 polyamine 濃度は前立腺機能の指標として有用であることが示された．

前立腺液で polyamine と Zn, Mg との直接的な関係を検討した報告はないが，前立腺液中の spermine 濃度と前立腺由来である citrate 濃度との高い相関，および citrate 濃度と Zn 濃度との高い相関が報告されている[10,11]．今回の結果は，これらの報告を裏付けるものと考えられた．

次に前立腺炎について検討した．前立腺炎症例においては，前立腺機能の低下により，前立腺液中および精漿中の Zn，酸 phosphatase など前立腺由来物質の濃度が低下するという[4]．そこで今回我々は，前立腺の炎症の程度と前立腺機能との関係を検討する目的で，前立腺炎症例を前立腺液中の白血球数に応じて，(±) ～(＋＋＋) の4群に分け，それぞれの群について前立腺液中 polyamine 濃度を検討した．その結果，前立腺液中 polyamine 濃度は，炎症の程度が強くなるほど低くなる傾向が認められ，殊に炎症の最も強い (＋＋＋) 群においては 6.7$\mu$mol/ml と著明に低値であった．このことは，前立腺の炎症，殊に強い炎症により，前立腺分泌能の低下を来すことを示すものと考えられた．

次に男子不妊症について検討した．前立腺液中 polyamine 濃度は一部の症例で低値であったが，精子濃度，運動率とは明らかな関係を認めなかった．Fair らは，精漿中の polyamine 濃度と，精子濃度および運動率との間に正の相関関係があるとしている[12]．しかし今回のわれわれの data が示すように，前立腺の polyamine 分泌能と造精能との間に直接的な関係は認めなかった．

しかし全身の androgen level が低いものでは，前立腺機能と造精能がともに低下する可能性が考えられる．そこで血中 testosterone level が著明に低値である hypogonadism 症例を含め前立腺液中 polyamine 濃度と血中 testosterone 濃度との関係を検討すると，血中 testosterone level が正常範囲を下回って低値のものでは polyamine 濃度も低値を示した．Williams-Ashman によると，前立腺における polyamine の生合成は，androgen により調節されている[13]．polyamine 合成の律速酵素である ornithine 脱炭酸酵素 (ODC) の活性は，androgen に強く依存しているという[14]．今回の我々の結果は，これらの報告を臨床的に裏付けるものであり，前立腺中 polyamine 濃度は全身の androgen level にある程度左右されるものと思われた．すなわち全身の androgen deficiency，前立腺の polyamine 分泌低下をもたらすと考えられる．

しかし，全身の androgen level が正常の男子不妊症症例において，前立腺液中 polyamine 濃度が低い症例については，その意義を明らかにすることはできなかった．この点については，今後更に検討を加えて行きたい．

## 文　献


1) Williams-Ashman, H. G., Pegg, A. E. and Lockwood, D. H.: Mechanisms and regulation of polyamine and putrescine biosynthesis in male genital glands and other tissues of mammals, Adv. Enzyme Regul., 7: 291, 1969
2) Mann, T. and Mann, C. L.: Male reproduction and semen, 29, Splinger-Verlag, New York, 1981
3) 尾辻省悟，副島安子，山田秀明：血中ポリアミンの新しい測定法と癌患者への応用，臨床検査，31：453，1987
4) Eliasson, R. and Lindolmer, C.: Functions of male accessory genital organs. In; Human semen and fertility regulation in men, 44, Mosby, St. Louis, 1976
5) Tabor, C. W. and Tabor, H.: 1, 4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine, Annu. Rev. Biochem., 45: 285, 1976
6) Purvis, K., Attramadal, A. and Rui, H.: Secratory function of the prostate gland, Scand. J. Nephrol. Suppl., 107: 46, 1988
7) Barcan, T., Paz, G., Hommonai, Z. T., Chayn, R. and Kraicer, P. F.: Spermine and citric acid in human prostatic fluid, Int. J. androl., 1: 393, 1978
8) Jänne, J., Höltta, E., Haaranen, P. and Elfving, K.: Polyamines and polyamine-metabolizing enzyme activities in human semen, Clin. Chim. Acta, 48: 393, 1973
9) Paz, G., Softer, A., Hommonai, Z. T. and kraicer, P. F.: Human semen analysis; Seminal plasma and prostatic fluid compositions and their interrelations with sperm quality, Int. J. Fertil., 22: 140, 1977
10) Pulkkinen, P., Sinervirta, R. and Jänne, J.: Mechanism of action of oxidized polyamines on the metabolism of human spermatozoa, J. Reprod. Fert., 51: 399, 1977
11) Coffey, D. S.: The biochemistry and physiology of the prostate and seminal vesicles. In; Campbell's Urology, 5th ed., 233, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1976
12) Fair, W. R., Clark, R. B. and Wehner, N.: A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in human, Fertil. Steril., 23: 38,

1972
13) Williams-Ashman, H. G., Jänne, J., Coppoc, G. L., Geroch, M. E. and Schenone, A.: New aspects of polyamine biosynthesis in eukaryotic organisms, Adv. Enzyme. Regul., 10: 225, 1972
14) Russel, D. H.: Polyamines and prostatic function. In; The prostatic cell, Structure and function, Alan R. Liss, Inc., New York, 1981

## Prostatic fluid polyamine levels as a marker of prostatic function

Hitoshi Tachiki, Yoshiaki Kumamoto, Akihito Nanbu, Naoki Itoh, Naohito Mikuma, Yoshio Takagi, Taiji Tsukamoto and Hiroshi Maruta

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

Nakaaki Ohsawa

The First Department of Internal Medicine, Osaka Medical College

Prostatic fluid polyamine levels were measured by simple enzymatic assay. Our data of split ejaculation indicates that seminal polyamine originates from the prostate. A close correlations were found among polyamine, zinc and magnesium levels in prostatic fluids. Prostatic fluid polyamine levels were reduced in patients who had severe inframmatory findings of prostatic fluids and systemic androgen deficiency. In conclusion, polyamine levels of prostatic fluid are good indicator for prostatic secretory function.

(受付:1990年10月26日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# PERICENTRIC INVERSION OF CHROMOSOME 9 IN MALE INFERTILITY

Tadashi MATSUDA, Yasuki HORII, Mitsuo NONOMURA and Osamu YOSHIDA

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

Ken HAYASHI

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

**Abstract:** Pericentric inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 (inv (9) ) is one of the most common aberrations of human chromosomes. The incidence of inv (9) for subfertile males determined by the chromosomal survey on the 736 males who attended the Male Infertility Clinic of Kyoto University Hospital from January 1985 to June 1989 was investigated and the clinical features of fifteen carriers found by the survey were evaluated. The incidence of inv (9) was 2.0% overall, 4.6% for 130 azoospermias, 1.5% for 342 oligoasthenozoospermias and 1.5% for 264 normozoospermias. The incidence for the azoospermic patients was significantly higher than for the oligoasthenozoospermia or normozoospermia patients ($p=0.022$ by chi-square test). However, there were no characteristics of testicular pathology, semen quality, hormonal status or physical findings which were common to the fifteen carriers and the clinical features of the majority of the carriers were compatible with those of the usual male infertility cases without chromosomal anomalies.

The clinical study showed no evidence that inv (9) harmed spermatogenesis directly, inspite of its high incidence for the patients with azoospermia.

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 666—671, 1991)

## Introduction

Chromosomal pairing is an essential phenomenon in meiosis and structural chromosomal rearrangement could have an adverse effect on gametogenesis. Meiotic studies show that structural rearrangement, such as translocations or inversions cause spermatogenic breakdown through pairing disturbance or sex autosome interaction[1]. Structural aberrations of autosomes, as well as sex chromosomal anomalies are found in a much higher incidence in subfertile males than in the general population[2,3].

Pericentric inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 (inv (9) ) is one of the most common aberrations of human chromosomes. The heterochromatic region of the long arm of chromosome 9 is inverted to the short arm. Cytogenetic surveys of newborn populations showed that the incidence of this type of inversion is 0.957% and no characteristic anomalies have been found in the phenotype of the carriers[4]. However, the effect of inv (9) on the reproductive process is not yet fully understood although sev-

eral authors have indicated the possible adverse effect of this common aberration on human reproduction[5,6].

In the present study, the incidence of inv (9) in infertile males was studied by a cytogenetic survey of subfertile men. The reproductive conditions of fifteen carriers of inv (9) detected through the survey were fully evaluated and the effect of this inversion on reproduction is discussed.

## Patients and Methods

*Patients*

The subjects of the chromosomal survey were 736 subfertile males who attended the male infertility clinic of Kyoto University Hospital from January 1985 to June 1989. Fifteen carriers of inv (9) were found among the 736 patients (2.04%). Thirteen of them consulted the clinic because of primary infertility lasting more than two years, while two had children with normal prenotypes and were referred for secondary infertility. No spontaneous abortions were recorded in their wive's histories. None of them had a family history of congenital anomaly. Chromosomal study of the family members of the probands was not available except in one case. The ages of the carriers at the diagnosis ranged from 24 to 40 years with a mean age of 32.9 years.

*Chromosome Analysis*

Chromosomal analysis was done from cultures of peripheral blood lymphocytes by the standard method, and a G-banding technique was employed for all patients. When inv (9) was found by G-banding, it was confirmed using the C-banding technique.

*Evaluation of the Carriers*

Routine physical examinations were done including the estimation of testicular volume using a punched-out orchidometer. The normal value of the testicular volume for fertile young men estimated by this method was reported to be more than 14ml[7].

Somen analysis was performed according to the methods recommended by the World Health Organization[8].

Circulating levels of testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) were measured by double antibody radioimmunoassay. Normal values of these hormones were 2.8 to 8.2ng/ml for testosterone, 4.8 to 25.2 IU/L for LH, and 3.0 to 17.6 IU/L for FSH. From the beginning of 1989, LH and FSH were measured by immunoradiometric assay with normal values of 1.1 to 9.8 IU/L and 1.6 to 14.9 IU/L, respectively.

Testicular biopsy was performed under local anesthesia on all azoospermic patients except for a patient with Klinefelter's syndrome. The specimens were fixed in Bouin's fixative and stained with standard hematoxylin and eosin. All seminiferous tubules in the histological slide were analyzed and scored according to the criteria proposed by Johnsen[9].

## Results

The results of the chromosomal analyses of 736 subfertile males are listed in table 1. In all carriers of inv (9), the total heterochromatic region was inverted to the short arm (Fig. 1). The incidence of inv (9) in the azoospermia group was 4.6%, which was significantly higher than that in the oligoasthenozoospermia or normozoospermia group (p=

Table 1 Results of chromosomal survey of 736 subfertile males

| Semen quality | No. of Pts. | Major chromosomal abnormalities | | | Inv (9) | Variants |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Sex chromosomal | Autosomal | Total | | |
| Azoospermia | 130 | 9# | 2 | 11(8.5%) | 6# (4.6%) | 2 |
| Oligoasthenozoospermia* | 342 | 3 | 6 | 9(2.6) | 5 (1.5) | 2 |
| Normozoospermia | 264 | 0 | 3 | 3(1.1) | 4 (1.5) | 3 |
| Total | 736 | 12 | 11 | 23(3.1) | 15 (2.0) | 7 |

* Sperm count below $20 \times 10^6$/ml and/or sperm motility rate below 50%

# Including a patient with 47, XXY, inv (9)

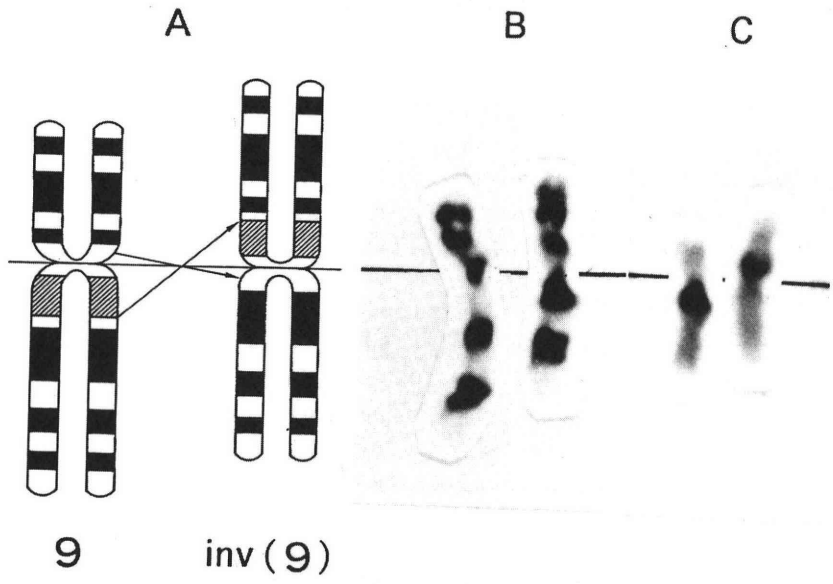



Fig. 1 Karyotype showing pericentric inversion of chromosome 9. A: Schema, B: G-banding, C: C-banding.

Table 2 Clinical features, breakpoint of inverted chromosome 9 and results of semen analyses of inv(9) carriers

| Pt. No. | Age | Period of infertility (years) | Break-point* | Testes volume (ml.) | | Semen analysis | | | | Comment |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Rt. | Lt. | Volume (ml) | Sperm count (×10⁶/ml) | Motility (%) | Normal morphology (%) | |
| 1 | 24 | 2 | p11q13 | 6 | 14 | 2.8 | 0 | — | — | Klinefelter syndrome |
| 2 | 30 | 1 | p11q13 | 12 | 12 | 3.0 | 0 | — | — | |
| 3 | 38 | 9 | p13q21.2 | 6 | 8 | 5.2 | 0 | — | — | |
| 4 | 30 | 5 | p13q13 | 6 | 6 | 7.3 | 0 | — | — | Paternally inherited |
| 5 | 37 | 11 | p11q13 | 12 | — | 4.6 | 0 | — | — | Lt. orchiectomy<br>Rt. orchiopexy |
| 6 | 32 | 2 | p11q21.2 | 10 | 10 | 5.3 | 0 | — | — | |
| 7 | 30 | 2 | p13q22 | 14 | 12 | 3.6 | 0.4 | 70 | 33 | |
| 8 | 39 | 10 | p13q22 | 16 | 16 | 5.4 | 0.6 | 0 | — | |
| 9 | 34 | 4 | p11q13 | 20 | 20 | 2.7 | 2.7 | 0 | 0 | Lt. vasal obstruction<br>Rt. seminal vesicle cyst |
| 10 | 32 | 4 | p11q13 | 20 | 18 | 3.6 | 12.3 | 65 | 33 | |
| 11 | 33 | 10 | p11q13 | 20 | 20 | 7.2 | 59.0 | 10 | 30 | |
| 12 | 28 | 3 | p11q13 | 24 | 24 | 4.6 | 74.5 | 75 | 35 | |
| 13 | 32 | 5 | p11q13 | 20 | 18 | 2.8 | 95.0 | 58 | 33 | Lt. varicocele (grade 1) |
| 14 | 34 | 3 | p13q13 | 16 | 18 | 3.6 | 97.3 | 65 | 48 | Secondary infertility |
| 15 | 40 | 5 | p11q13 | 24 | 20 | 3.1 | 130.5 | 68 | 50 | Secondary infertility |

* Breakpoint of inverted chromosome 9

0.022 by chi-square test).

Table 2 shows clinical information, the breakpoints of inverted chromosome 9 and the results of semen analyses. Semen analysis revealed that sperm densities were widely distributed from 0 to 130.5 $\times 10^6$/ml in the fifteen carriers. There were six azoospermias including a patient with Klinefelter's syndrome, four oligozoospermias, one asthenozoospermia and four normozoospermias. It was determined that, in Case 3 with azoospermia, inv (9) had been inherited from his father. Bilateral cryptorchidism treated by left orchiectomy and right orchiopexy was considered to be responsible for the azoospermia in Case 5. In Case 9, a vasal obstruction caused by inguinal herniorrhaphy and congenital cystic dilatation of the contralateral seminal vesicle was revealed by vasovesiculography and was responsible for the severe oligozoospermia in this patient.

The testicular volume was less than 14ml in every azoospermic patient but normal in every non-azoospermic patient. Serum FSH levels were higher than the normal value in all azoospermias except for Case 5 with cryptorchidism, while they were within the normal range in all non-azoospermias except for Case 7 with severe oligozoospermia. Serum testosterone levels were normal in all cases including the patient with Klinefelter's syndrome. The testicular biopsies on the azoospermic patients revealed germ cell aplasia in Case 2 and 3, hypospermatogenesis in Case 4, 5 and 6 with Johnsen's mean score ranging from 4.0 to 7.8.

## Discussion

The heterochromatic regions of chromosomes, which are composed of repetitive DNA sequences, are commonly the site of chromosomal variants. Elongation of the heterochromatic regions of chromosome 1, 9, 16, and Y, and the pericentric inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 (inv (9) ) are the most common polymorphisms of human chromosomes[4,10]. The incidence of inv (9) in the general Caucasian population was reported to range from 0.957%[4] to 4.0%[11] . Although cytogenetic surveys of other races are limited, Lubs and Ruddle[12] showed a twenty-fold higher incidence of inv (9) in American Negros than in Caucasians. For Mongoloids, however, the incidence of inv (9) in the general population has not been established.

Inv (9) has also been detected in a cytogenetic survey of a subfertile population, and the incidence was reported to be 1.6%[2] or 2.8%[13] . For couples who are subfertile due to recurrent spontaneous abortions, Tibiletti et al.[6] reported a significantly higher incidence of inv (9) than for the general population. In this study the incidence of inv (9) for Japanese subfertile males was found to be 2.0%, which was similar to the incidence for the general Caucasian population. However, a significantly higher percentage of azoospermic patients were found to be carriers when compared with non-azoospermic patients. Even if the carrier with both XXY and inv (9) is excluded from the analysis, the difference of the incidence of inv (9) between the two groups is statistically significant. A high incidence of inv (9) for patients with azoospermia might be evidence that supports the hypothesis that the existence of inv (9) adversely affects spermatogenesis.

Typically, the effect of structural chromosomal rearrangement on spermatogenesis is the breakdown of normal meiosis. In the case of a reciprocal Y-autosome translocation, for example, the majority of the adult cases are found at male infertility clinics and show spermatogenic arrest at the spermatocyte stage[14]. However, in the case of an autosomal translocation, the effect of chromosomal rearrangement on meiosis is not clear. Some carriers are azoospermic due to spermatogenic arrest like the cases with a Y-autosome translocation, while others are normally fertile. The exact mechanism in the meiotic process that will account for this discrepancy has not yet been clarified.

In the present study, carriers of inv (9) had a variety of clinical features. In six azoospermic patients, none of the testicular specimens showed spermatogenic arrest that could be seen in the case of translocations. The results of other clinical evaluations, such as hormonal analyses or testicular volume measurements, agreed well with the testicular pathology. One case had a rare

combination of Klinefelter's syndrome and inv (9), with a karyotype of 47, XXY, inv (9). The clinical features of this patient, small testes and high gonadotropin levels, were consistent with the symptoms of Klinefelter's syndrome, except for the normal testosterone level in this case. It has been reported, however, that about 40% of patients with Klinefelter's syndrome have normal testosterone levels[15]. In the other nine patients with oligozoo- or normozoospermia, no common findings, other than those normally shared by subfertile patients with normal karyotypes, were observed.

The interference with normal spermatogenesis by structural chromosomal rearrangements has been studied by the meiotic chromosomal analysis of testicular specimens. Paring disruption was shown around the rearranged segments in an autosomal translocation carrier[16] and a carrier of inversion of chromosome 6[17] . In the case of inv (9), however, only limited information about the meiosis is available. De la Chapelle et al.[18] reported that the inverted chromosome 9 behaved almost normally, but this study was not detailed. Impairment of the essential processes in meiosis, such as pairing failure around the inverted segments, might interfere with spermatogenesis in some cases with inv (9) and result in azoospermia.

*In conclusion,* although the incidence of inv (9) was significantly higher in the azoospermia group than in the normozoo- or oligoasthenozoospermia groups, clinical and histological examinations of the azoospermic carriers of inv (9) did not reveal any common reproductive features. In the other carriers with normozoo- or oligoasthenozoospermia, no evidence that this chromosomal aberration harmed spermatogenesis was found in the present study. However, the fact that the incidence of inv (9) was high in the azoospermia group should be investigated further with regard to male reproduction and chromosomal polymorphism.

**Acknowledgment**

We are grateful to Miss Higuchi for her assistance in semen analysis.

**References**

1) Handel, M. A.: Chromosome anomalies affecting spermatogenesis; in Hennig W (ed): Spermatogenesis: Genetic Aspects, 23, Berlin, Springer-Verlag, 1987
2) Bourrouillou, G., Dastugue, N. and Colombies, P.: Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml, Hum. Genet., 71: 366, 1985
3) Matsuda, T., Nonomura, M., Okada, K., Hayashi, K. and Yoshida, O.: Cytogenetic survey of subfertile males in Japan, Urol. Int., 44: 194, 1989
4) Nielsen, J., Wohlert, M., Faaborg-Andersen, J., Hansen, K. B., Hvidman, L., Krag-Olsen, B., Moulvad, I. and Videbech, P.: Incidence of chromosome abnormalities in newborn children. Comparison between incidences in 1969-1974 and 1980-1982 in the same area, Hum. Genet., 61: 98, 1982
5) Boué, J., Taillemite, J. L., Hazael-Massieux, P., Léonard, C. and Boué, A.: Association of Pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families, Humangenetik, 30: 217, 1975
6) Tibiletti, M. G., Simoni, G., Terzoli, G. L., Romitti, L., Fedele, L. and Candiani, G. B.: Pericentric inversion of chromosome 9 in couples with repeated spontaneous abortion, Acta Eur. Fertil., 12: 245, 1981
7) Takihara, H., Cosentino, M. J., Sakatoku, J. and Cockett, A. T. K.: Significance of testicular size measurement in andrology: 2. correlation of testicular size with testicular function, J. Urol., 137: 416, 1987
8) World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, Cambridge, Cambridge University press, 1987
9) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males, Hormones, 1: 2, 1970
10) Nielsen, J. and Sillesen, I.: Incidence of chromosome aberrations among 11148 newborn children, Humangenetik, 30: 1, 1975
11) Metaxotou, C., Kalpini-Mavrou, A., Pnanagou, M. and Tsenghi, C.: Polymorphism of chromosome 9 in 600 Greek subjects, Am. J. Hum. Genet., 30: 85, 1978
12) Lubs, H. A. and Ruddle, F. H.: Chromosome polymorphism in American negro and white populations, Nature, 233: 134, 1971
13) Mićić, M., Mićić, S. and Diklić, V.:

Chromosomal constitution of infertile men, Clin. Genet., 25: 33, 1984
14) Matsuda, T., Hayashi, K., Nonomura, M., Yamamoto, S. and Yoshida, O.: Azoospermic male with a balanced Y-autosome translocation, Urol. Int., 44: 43, 1989
15) Komatz, Y., Kiriyama, T., Tomoyoshi, T. and Yoshida, O.: Clinical observations in 100 cases of Klinefelter's syndrome, Jpn. J. Fertil. Steril., 28: 332, 1983
16) Chandley, A. C., Speed, R. M., McBeath, S. and Hargreave, T. B.: A human 9 ; 20 reciprocal translocation associated with male infertility analyzed at prophase and metaphase 1 of meiosis, Cytogenet. Cell Genet., 41: 145, 1986
17) Gabriel-Robez, O., Ratomponirina, C., Croquette, M., Maetz, J. L., Couturier, J. and Rumpler, Y.: Reproductive failure and pericentric inversion in man, Andrologia, 19: 662, 1987
18) De-la-Chapelle, A., Schröder, J., Stenstrand, K., Fellman, J., Herva, R., Saarni, M., Anttolainen, I., Tallila, I., Tervilä, L., Husa, L., Tallqvist, G., Robson, E. B., Cook, P. J. L. and Sanger, R.: Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10, Am. J. Hum. Genet., 26: 746, 1974

# 男子不妊症における 9番染色体腕間逆位について

京都大学医学部泌尿器科学教室
*産婦人科学教室

松田公志　堀井泰樹　野々村光生
*林　研　吉田　修

9番染色体腕間逆位は，最も頻度の高い染色体異型である．1985年1月から1989年6月までに，京都大学医学部附属病院泌尿器科男子不妊外来を受診した736名について染色体検査を行い，15名の9番染色体腕間逆位を認めた。9番染色体逆位の頻度は，全体では2.0％，無精子症130例中6例(4.6％)，乏または無力精子症342例中5例（1.5％），正常精子症264例中4例(1.5％）であり，無精子症では他のグループに比べ有意に（P＝0.022）高率であった．15名の逆位保有者について，精液検査，内分泌学的検査，精巣生検を行ったが，なんら共通の異常を認めず，染色体異常を伴わない通常の男子不妊症患者と異なる点はなかった．

9番染色体腕間逆位の保因者の臨床的検索では，この逆位が精子形成を直接障害している所見は認められなかったが，無精子症患者群で有意に高率に認められたことから，9番染色体逆位と男子生殖機能との関連については，さらに検討を重ねる必要があると思われる．

（受付：1990年11月14日）

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 男子不妊症患者における加水分解曲線解析法を用いた精子DNAの検討—第二報：妊孕力評価の試み—

# A Study of Sperm DNA in Infertile Men Using Hydrolysis Curve Analysis Method —The Second Report: Application to Evaluate Fertility—

金沢大学医学部泌尿器科学教室（主任：久住治男教授）
山本秀和　内藤克輔　久住治男
Hidekazu YAMAMOTO　Katsusuke NAITO　Haruo HISAZUMI

Department of Urology, School of Medicine,
Kanazawa University, Ishikawa 920, Japan

同医学部衛生学教室（主任：橋本和夫教授）
橋本和夫
Kazuo HASHIMOTO

Department of Hygiene, School of Medicine,
Kanazawa University, Ishikawa 920, Japan

福井医科大学病理学講座（主任：福田　優教授）
三好憲雄　福田　優
Norio MIYOSHI　Masaru FUKUDA

Department of Pathology, Fukui Medical Collage,
Fukui 910-11, Japan

第一報にて報告した加水分解曲線解析法を用いて，妊娠例13例，不妊例21例の精子について検討した．加水分解曲線におけるBateman式のパラメーター$1/k_1$は精子の成熟度を表し，$k_2$は精子DNAの微少障害を表すことを第一報にて報告した．今回，$1/k_1$と精子濃度および運動率，特に運動率，との間には有意な正の相関関係が認められたが，$k_2$と精子濃度および運動率との間には有意の相関関係は認められなかった．すなわち，精子成熟度と精子濃度および運動率，特に運動率との関連性が示唆された．次に，判別関数を用いて，$1/k_1$，$k_2$による妊孕力の評価を試みた．妊娠例は13例中12例，不妊例は配偶者に不妊の原因があると考えられた2例を除いた19例中17例で判別可能であり，正診率は90.6％と高率を示した．すなわち$1/k_1$，$k_2$は妊孕力評価に有用であることが示唆された．また，精策静脈瘤の1例を報告し，本法が治療効果判定にも有用である可能性を報告した．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 672—676, 1991)

## 緒　言

われわれは，乏精子症および精子無力症患者と精液所見の正常な男子の精子DNAの質的相違について，加水分解曲線解析法を用いて検討し，第一報として報告した[1]．

今回，精子濃度および精子運動率と，加水分解曲線から求めたDNAの質的パラメーターである$k_1$，$k_2$との相関関係を検討すると共に，妊孕力の評価および治療効果判定の可能性を検討し，若干の知見が得られたので報告する．

## 対象および方法

1）対象

1987年6月より2年以上の不妊を主訴に金沢大学医学部附属病院泌尿器科を受診した21例と，挙子ある男子13例を対象とした．不妊男子の年齢は28歳より41歳，平均33.4歳であり，挙子ある男子の年齢は25歳より37歳，平均29.3歳であった．なお，不妊を主訴とする21例のうち2例は配偶者側に不妊の原因があると考えられ産婦人科で治療中であるが，他の19例の配偶者は産婦人科学的に異常を認めなかった．

2）方法

検体処理法，測定法および解析法は第一報にて詳細に報告した[1]ので，今回は簡単に述べる．精液は用手法にて採取し，Table 1に示すように種々の時間で加水分解した後，アクリジンオレンジ(AO)染色をした．各加水分解時間における赤色蛍光強度（加水分解にて二重鎖DNAより生ずる単鎖DNA量）をオリンパス社製落射蛍光測光顕微鏡(BH2-QRFL)にて測定した後，computer fittingしBateman式

$$y(t) = y_0 k_1 (e^{-k1t} - e^{-k2t})/(k_2 - k_1)$$

に従ってアプリン酸(単鎖DNA量)の生成速度定数$k_1$，崩壊速度定数$k_2$を求めた．これまでの研究で$1/k_1$はクロマチンの濃縮度を，$k_2$は核DNAの脆弱度（酸処理に対する不安定性）を表すパラメーターであることが知られている[2]．今回われわれは，$1/k_1$，$k_2$と，精子の濃度，運動率とのpearsonの相関関係を検討すると共に，判別関数[3]を用い$1/k_1$，$k_2$を妊孕力の評価に応用できないか検討した．さらに，本法が治療効果判定に有用であった精索静脈瘤の1例を報告する．

Table 1　Method of hydrolyzation and acridine orange staining

| |
|---|
| Semen obtained by masturbation → Semen analysis |
| ↓ |
| Centrifugation (1,200rpm, 5min in Tris-EDTA buffer) |
| ↓ |
| Touch smears |
| ↓ |
| Fixation (70% ethanol, 4°C, 16-24hrs) |
| ↓ |
| Rinse (Dulbecco's PBS, 10min) |
| ↓ |
| RNase treatment (37°C, 60min) |
| ↓ |
| Rinse (Dulbecco's PBS, 10min) |
| ↓ |
| Hydrolysis (2N HCl, 30°C, 0-120min) |
| ↓ |
| Rinse (Dulbecco's PBS, 10min) |
| ↓ |
| Acridine orange stain (30μg/ml in Dulbecco's PBS, 20min) |
| ↓ |
| Rinse (Dulbecco's PBS, 10min, 2times) |
| ↓ |
| Embedding |

## 結　果

1）Bateman式におけるパラメーター$1/k_1$，$k_2$と精子濃度，運動率との相関関係

Fig. 1, Fig. 2に示すように，$1/k_1$は精子濃度，運動率と有意($p<0.01$)な正の相関関係が認められた．また，妊娠例では高値を示す傾向が認められ，低値を示す症例はすべて不妊例であった．しかし，不妊例の中には高値を示す症例も少数認めており，また配偶者に問題があると考えられる不妊2例も高値を示した．

一方$k_2$はFig. 3, Fig. 4に示すように精子濃度，

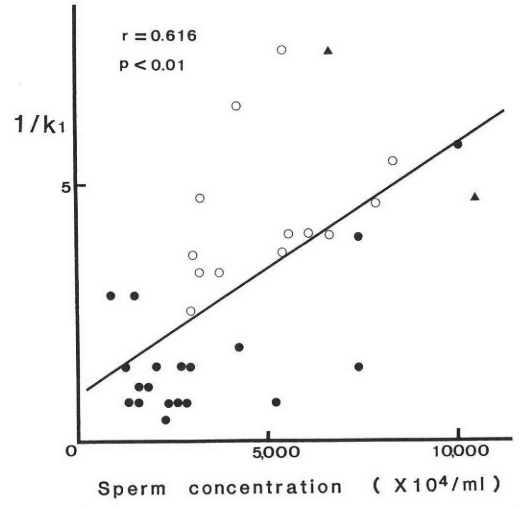



Fig. 1 Relationship between sperm concentration and $1/k_1$. ○, Pregnancy. ●, Male infertility. ▲, Infertilitas feminis

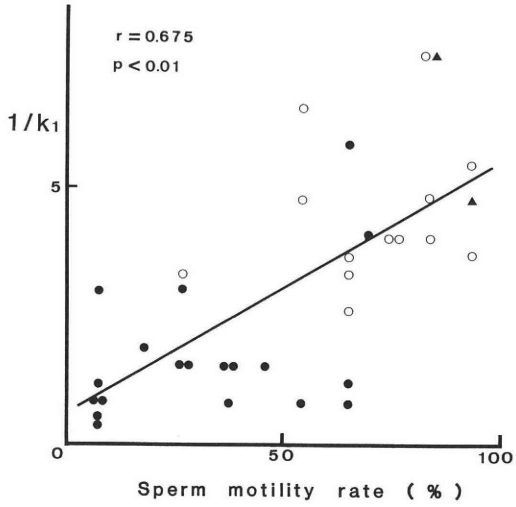



Fig. 2　Relationship between sperm motility rate and $1/k_1$. ○, Pregnancy. ●, Male infertility. ▲, Infertilitas feminis

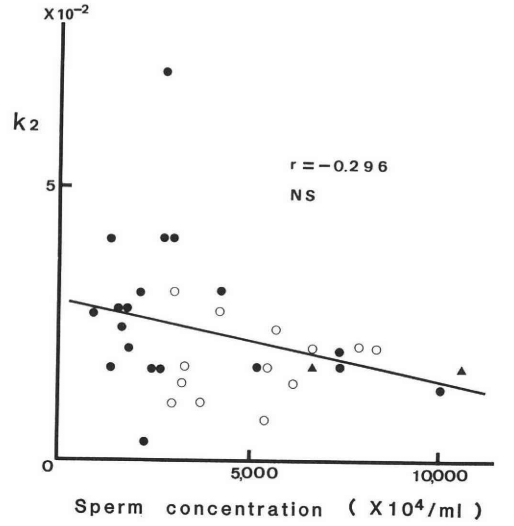



Fig. 3　Relationship between sperm concentration and $k_2$. ○, Pregnancy. ●, Male infertility. ▲, Infertilitas ferminis

Table 2　Discriminant function analysis using sperm cncentration and motility rate

$Z = 1.900 \times 10^{-9} X_1 + 8.067 \times 10^{-2} X_2 - 4.200$

($X_1$ = Sperm concentration, $X_2$ = Motility)

Mahalanobis　$D^2 = 3.276$　　F　value = 12.274

| | $Z \geqq 0$ | $0 > Z$ |
|---|---|---|
| Pregnancy | 12 | 1 |
| Non-pregnancy | 5 | 14 |

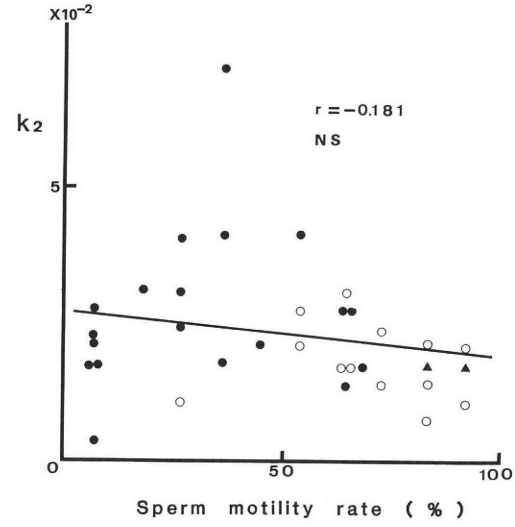



Fig. 4　Relationship between sperm motility rate and $k_2$. ○, Pregnancy. ●, Male infertility. ▲, Infertilitas feminis

運動率と軽度の負の相関関係が認められたが，有意ではなかった．また，妊娠例は低値を示し，不妊例は高値を示す傾向が認められたが $1/k_1$ ほど明瞭な分布差はなかった．

2）精子濃度，運動率，$1/k_1$，$k_2$と妊孕力との関係

判別関数を用いて，精子濃度，運動率，$1/k_1$，$k_2$による妊孕力の評価を試みた．対象は，配偶者に不妊の原因があると考えられた2例を除外した32例とした．まず，精子濃度，運動率の2つの変数で妊孕力を評価した(Table 2)．妊娠例は13例中12例，不妊例は19例中14例判別可能であり，診断率は80.1％と比較的高値を示した．また変数増加法で運動率のみが選択され，判別式は運動率が優位であると考えられた．次に $1/k_1$，$k_2$の2つの変数で妊孕力を評価した(Table 3)．マハラノビスの汎距離は3.906，F値も14.572と軽度増加しており，また，妊娠例は13例中12例，不妊例は19例中17例判別可能で，診断率は90.6％と更に高率を示した．なお，変数増加法にて上記の判別式は $1/k_1$が優位であると考えられた．最後に，精子濃度，運動率，$1/k_1$，$k_2$の4つの変数を用いて評価した(Table 4)．マハラノビスの汎距離は6.225，F値は10.811と高値を示していたが，診断率は $1/k_1$と$k_2$の2変数の場合と変わらなかった．

3）精策静脈瘤の1症例

症例は28歳の男性．不妊期間5年6カ月．術前の

Table 3　Discriminant function analysis using $1/k_1$ and $k_2$

$Z = 1.401X_1 - 36.037X_2 - 3.274$

$(X_1 = 1/k_1,\ X_2 = k_2)$

Mahalanobis $D^2 = 3.906$　　F value = 14.572

| | $Z \geqq 0$ | $0 > Z$ |
|---|---|---|
| Pregnancy | 12 | 1 |
| Non-pregnancy | 2 | 17 |

Table 4　Discriminant function analysis usisg sperm concentration, motility rate, $1/k_1$ and $k_2$

$Z = -3.492 \times 10^{-8}X_1 + 7.690 \times 10^{-2}X_2 + 1.303X_3 - 64.704X_4 - 4.938$

$(X_1$ = Sperm concentration, $X_2$ = Motility, $X_3 = 1/k_1,\ X_4 = k_2)$

Maharanobis D2 = 6.225　　F value = 10.811

| | $Z \geqq 0$ | $0 > Z$ |
|---|---|---|
| Pregnancy | 12 | 1 |
| Non-pregnancy | 2 | 17 |

精液所見は，精子濃度 $2,300 \times 10^4$／ml，運動率 20～30％であり，$1/k_1$ は 1.45，$k_2$ は $2.97 \times 10^{-2}$ であった．判別関数の関数値は，精子濃度，運動率で見た場合－2.139，$1/k_1$，$k_2$ で見た場合は－4.232 と共に負の値を示し妊娠は不可能と考えられた．1988 年 11 月 13 日左内精静脈塞栓術[4]を施行したが効果不十分と考えられ，11 月 27 日左高位結紮術[5]を施行した．術後 2 週間目の精液所見は，精子濃度 $3,600 \times 10^4$／ml，運動率 20～30％であり，濃度の改善傾向は認められるものの運動率は不変であり，精液所見による判別関数値も－2.114 と負のままであった．一方，Bateman 式におけるパラメーターを見ると，$1/k_1$ は 3.13，$k_2$ は $0.75 \times 10^{-2}$ と著明に改善しており，$1/k_1$，$k_2$ を用いた判別関数値も 0.842 と正の値に変化し妊娠可能と判定された．1989 年 2 月，彼の妻の妊娠が確認され，3 月に再度精液検査を施行した．精子濃度 $8,400 \times 10^4$／ml，運動率 50～60％と正常化し，$1/k_1$，$k_2$ もそれぞれ 4.35，$1.78 \times 10^{-2}$ とさらに改善していた．また，判別関数値も $1/k_1$，$k_2$ のみならず精子濃度，運動率を用いた場合も陽性化し，妊娠可能と考えられる精液所見であった．

## 考　察

われわれは第一報で，①加水分解曲線解析法における Bateman 式のパラメーターのうち $1/k_1$ はクロマチンの濃縮度すなわち精子の成熟度を表しており，$k_2$ は核 DNA の脆弱度(酸処理に対する DNA の不安定性)すなわち精子 DNA の微少障害を表すこと，②乏精子症および精子無力症における $1/k_1$ は低値，$k_2$ は高値を示しており，精子の未熟性が示唆されたことを報告した[1]．

今回，$1/k_1$ は精子濃度および運動率と有意な正の相関関係を認めたが，$k_2$ には有意の相関関係は認められなかった．また，$1/k_1$ は精子濃度より運動率と強い正の相関関係を認めた．すなわち，精子の成熟度は精子濃度と運動率，特に運動率と強く関連していることが示唆された．さらに妊孕力との関連性を検討すると，妊娠例では $1/k_1$ は精子濃度や運動率にかかわらずすべて高値を示しており，不妊例では低値を示す傾向が認められた．この結果より $1/k_1$ は，精子濃度や運動率よりも妊孕力の評価に優れている可能性があると考えられた．$k_2$ も妊娠例では低値を示し，不妊例では高値を示す傾向が認められたが，$1/k_1$ ほど明瞭な分布差はなく $k_2$ のみでは妊孕力の評価は困難であろうと考えられた．そこで，判別関数を用いて $1/k_1$ および $k_2$ による妊孕力の評価を試みた．

今回，精子濃度と運動率による判別関数でも 81.3％と比較的高い診断率が得られた．これは判別関数を用い複数の変数にて評価したためと考えられ，複数の変数を用いる判別関数の有用性が示唆された．なお，運動率が変数選択されたことは，運動率が妊孕性と強く関連しているとの報告[6]と一致する．一方 $1/k_1$ と $k_2$ による判別関数を用いると判別精度はさらに高まり，90.6％と非常に高い診断率が得られた．すなわち，判別関数を用いた $1/k_1$ および $k_2$ による妊孕力評価の有用性が示唆された．また，$1/k_1$ が変数選択されたことにより，精子の成熟度が妊孕力に強く関連していることが示唆された．なお，$1/k_1$ と $k_2$ を用いた判別関数で妊娠可能と判断された 14 例中 2 例（14.3％）は不妊例であった．これは，本法が精子の成熟度のみを見ており，受精と言う現象を見ていないためと考えられる．一方，$1/k_1$ が低値で精子が未熟と考えられる場合には妊娠の可能性は低く，妊娠不可能と判定された 18 例中 1 例(5.5％)のみ妊娠例であった．以上より加水分解曲線解析法は妊孕力の評価に非常に有用であることが示唆された．

今回さらに，術後に挙子を得た精策静脈瘤の一症例において，治療効果判定が可能であるかを検討した．術後には，$k_1$ と $k_2$ は共に高値であることより，精子は未熟であり，おそらく陰嚢内温度の上昇[7]または精子形成に有害な物質(プロスタグランジンなど)

の腎または副腎からの逆流[8]によると考えられる精子DNAの微少障害も示唆された．術後2週目の精液所見では妊孕力は小さいと考えられたが，$1/k_1$と$k_2$は改善し，判別関数値より妊娠可能と判別された．すなわち，精子の未熟性が不妊の原因と考えられる症例においては，本法は従来の精液検査より治療効果を鋭敏に反映すると考えられ，治療効果判定に有用である可能性が示唆された．

## 結　語

加水分解曲線解析法を用いて，妊娠例13例，不妊例21例の精子について検討し，以下の結果が得られた．

1）加水分解解析法におけるBateman式のパラメーター$1/k_1$は精子成熟度を表しており精子濃度および運動率，特に運動率と有意な正の相関関係が認められた．

2）加水分解解析法におけるBateman式のパラメーター$1/k_1$，$k_2$は、妊孕性の評価に有用である．

3）$1/k_1$，$k_2$は，治療効果判定にも有用である可能性がある．

なお本論文の要旨は，第34回日本不妊学会総会にて発表した．

## 参考文献


1）山本秀和，内藤克輔，久住治男，三好憲雄，福田優：男子不妊症患者における加水分解曲線解析法を用いた精子DNAの検討(第1報)，日不妊会誌，35：131，1990

2）福田　優，三好憲雄，法木左近，今村好章：顕微蛍光側光法による生体試料分析の動向，ぶんせき，9：612，1987

3）柳井晴夫，高木廣文：多変量解析ハンドブック，126，現代数学社，1986

4）藤尾幸司：精策静脈瘤：塞栓術，西日泌尿，48：1143，1986

5）守殿貞夫，羽間　稔，松本　修：精策静脈瘤の手術—高位結紮術について—，臨泌，38：115，1984

6）松本　修，浜口毅樹，篠崎雅史，岡本恭行，藤澤正人，岡　伸俊，岡田　弘，羽間　稔，守殿貞夫：精子からみた問題点—とくに精液検査の正常値と妊孕力の評価に関する検討—，泌尿紀要，34：1959，1988

7）中村正広，野々村祝夫，並木幹夫，奥山明彦，高栄　哲，近藤宣幸，竹山政美，清原久和：ヒト精巣機能におよぼす温度の影響—精巣DNA合成，RNA合成，蛋白合成における至適温度—，日泌尿会誌，80：1362，1989

8）川村健二，伊藤晴夫，島崎　淳：精策静脈瘤不妊症の成因　II，精策静脈瘤が造精機能障害をおこす機序について，西日泌尿，48：1112，1986


# A study of sperm DNA in infertile men using hydrolysis curve analysis method —The second report: Application to evaluate fertility—


Hidekazu Yamamoto, Katsusuke Naito and Haruo Hisazumi

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Ishikawa 920, Japan

Kazuo Hashimoto

Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University, Ishikawa 920, Japan

Norio Miyoshi and Masaru Fukuda

Department of Pathology, Fukul Medical Collage, Fukui 910-11, Japan



An analysis of hydrolysis curve obtained by acridine orange stain was done to study sperm DNA in 21 infertile men and 13 fertile men. The value of kinetic parameter of Bateman function, $1/k_1$ was corresponded to the sperm maturation, and that of $k_2$ was corresponded to the microdamages of sperm DNA. There was a significant correlation between $1/k_1$ and sperm concentration, and motility, but not between $k_2$ and the sperm concentration or motility. These results indicated the presence of sperm immaturation in oligozoospermia and asthenospermia. The values of $1/k_1$ and $k_2$ were then applied to evaluate fertility using a discriminant function analysis. Correct discrimination was obtained 12/13(92.3%) in fertile men, and 17/19(89.5%) in infertile men. An anaysis of hydrolysis curve obtained by acridine orange stain was found to be useful for evaluation of fertility. A case of varicocele, in which this analysis was also useful for the evaluation of treatment effect, was reported.


(受付:1990年12月10日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# Y:Y 転座［46, X, t (Y;Y)］を認めた尿道下裂の一例

# A Case of Y; Y Translocation Mosaicism with Hypospadia

高知医科大学泌尿器科教室（主任：藤田幸利教授）
谷村正信　森岡政明　戦　泰和
Masanobu TANIMURA　Masaaki MORIOKA　Yasukazu SEN
山本志雄　藤田幸利
Yukio YAMAMOTO　Yukitoshi FUJITA

Department of Urology, Kochi Medical School
Kochi 783,Japan (Director: Prof. Yukitoshi Fujita)

高知医科大学第一解剖学教室（主任：山本恵三教授）
白石行正
Yukimasa SHIRAISHI

1st Department of Anatomy, Kochi Medical School,
Kochi 783, Japan (Director: Prof. Keizo Yamamoto)

高知医科大学泌尿器科学教室では尿道下裂患者についても染色体検査を実施しているが，Y: Y 転座と思われる症例を経験し，5年の経過を追うことができたので，若干の文献的考察を加え報告する．症例は5歳男子．生下時より尿道下裂を指摘されていたが，精神的身体的発育に異常はなかった．第1回入院時，染色体検査で 45, X/46, XY/46, X, t (Y; Y) の核型モザイクを認めた．第2回入院時，低身長 (<−2SD) を見たが，LH-RH テスト，HCG 負荷テストに異常なく，精巣生検では年齢相応の像であったが，再検した染色体では，45, X/46, XY/46, X, t (Y; Y)/47, XY, t (Y;Y) を認めた．5年後の昭和62年9月には低身長を認めたが，手根骨X線検査，ホルモン検査では異常なかった．本症例は文献上世界第3例目に相当すると思われるが，症例数が少なく，染色体異常と臨床像の関係について言及することはできず，今後の症例の集積と検討が必要であると考えられた．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 677—682, 1991)

## 緒　言

Y染色体の構造異常には，metacentric Y, dicentric Y, iso-Y, ring Y, Y translocation (autosome, X, Y) 等が知られているが，Y; Y translocation の報告は文献上わずかに2例[1~2]しか見られていない．また dicentric Y との鑑別が問題となるが，dicentric Y も文献上47例を見るだけである．今回，Y;Y translocation と思われる症例を経験し，dicentric Y も含めて若干の文献的考察を加えたので報告する．

## 症　例

患者：[redacted] 5歳，男子
主訴：手術希望
既往歴：特記事項なし
家族歴：両親，姉に身体的異常所見なし

現病歴：満期正常分娩にて，生下時体重2,700 g，妊娠中ホルモン剤の投与はなかった．生下時より尿道下裂を指摘されていたが，精神的，身体的発育に異常は認めなかった．昭和57年9月8日当科初診．

初診時所見：体重15kg，胸腹部に理学的異常所見なし．陰茎は索を伴い腹側に屈曲し，外尿道口は陰茎中部に開口し，いわゆる陰茎型尿道下裂を認めた(図1)．陰嚢内容に異常を認めず，精巣は両側共に年齢相応であった．血液生化学，尿所見に異常はなかった．

## 経　過

昭和57年11月22日手術目的で入院．11月25日索切除術施行12月4日退院．その際検査した染色体に45, X/46, XY/46, X, t (Y;Y) の核型モザイクを認めた（表1）．

昭和59年8月18日第2次手術目的で入院．入院前の術前検査の際に染色体検査を本人および両親に行ない，後日得た結果では，45, X/46, XY/46, X, t (Y; Y)/47, XY, t (Y;Y) の核型モザイクを認めたが，両親は共に正常核型を示した(表1)．入院時，身長108.1cm (<−2SD)，体重17.5kgと低身長を示した．血液生化学，尿に異常所見はなかった．8月20日尿道形成術施行，同時に精巣生検を行なったが病理組織像は年齢相応の像を示した（図2）．術後，LH-RHテスト，HCG負荷テストを行なったが，いずれも正常反応を示した．

昭和62年9月1日，低身長続くため精査希望して受診．身長120cm (<−2SD)，体重22kgであり，第2次性徴は認めなかった．手根骨X線検査，ホルモン検査，染色体の再検を行なった．手根骨は年齢相応であり，ホルモン学的にも異常は認めなかった．再検した染色体は，45, X/46, X, dic (Yq) であり，前2回の染色体検査の結果との異同が問題となった(表1)．

## 内分泌学的検索

1．LH-RHテスト（昭和59年8月）

LH-RH100μg静注前のLH値は5.38mIU/ml, FSH値は2.56mIU/mlであり静注後30分でLH値



図1 外性器

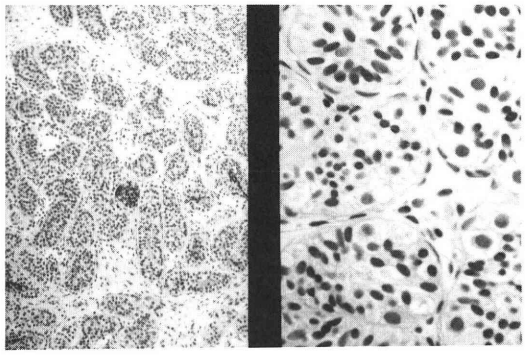


図2 精巣組織像(HE染色)

表1　染色体検査

| | | |
|---|---|---|
| 1．昭和57年11月 | | |
| 末梢血30細胞 | 45，X | 6細胞（ 20%） |
| | 46，XY | 15細胞（ 50%） |
| | 46，X，t (Y;Y) | 9細胞（ 30%） |
| 2．昭和59年8月 | | 18 |
| 末梢血22細胞 | 45，X | 4細胞(18.2%) |
| | 46，XY | 6細胞(27.3%) |
| | 46，X，t (Y;Y) | 10細胞(45.5%) |
| | 47，XY，t (Y;Y) | 2細胞( 9.1%) |
| 3．昭和62年9月 | | |
| 末梢血27細胞 | 45，X | 23細胞(85.2%) |
| | 46，X，dic (Yq) | 4細胞(14.8%) |

は19.76mIU/ml, FSH値は16.76mIU/mlと上昇し，正常反応を示した．

2．HCG負荷テスト（昭和59年8月）

HCG3000IU連続3日間筋注前のTestosterone値は8 ng/dlであり，1日目47ng/dl, 2日目205ng/dl, 3日目126ng/dlと正常反応を示した．

3．一般ホルモン検査（昭和62年9月）

LH 4.0mIU/ml, FSH 2.3mIU/ml, Testosterone 16ng/dl, $T_3$ 1.6ng/ml, $T_4$ 9.6$\mu$g/dl, TSH 2.2$\mu$U/ml, GH 2.7ng/mlと全て正常範囲内にあった(表2)．

## 染色体検査

1．昭和57年11月

末梢血リンパ球培養により分析した30細胞中，45, Xが6細胞に，46, XYが15細胞に，またY染色体同士が短腕を介して重なっている様に観察される染色体像が9細胞に認められ，Y;Y Translocationと判断した（図3）．

2．昭和59年8月

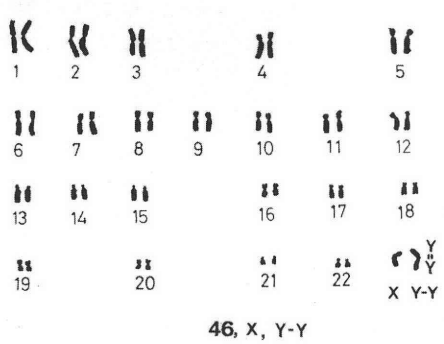



図3 Y:Y転座核型(末梢血)

末梢血リンパ球22細胞の分析の結果，45, Xが4細胞に，46, XYが6細胞に，46, X, t (Y;Y) が10細胞に，47, XY, t (Y;Y) が2細胞に認められた．この際Q-band法，G-band法により詳細な観察を行なったが，Y染色体短腕はあたかも付随染色体を介して結合している様に見え，dicentric Yとの異同が問題となったが，文献上，Y染色体短腕について詳細

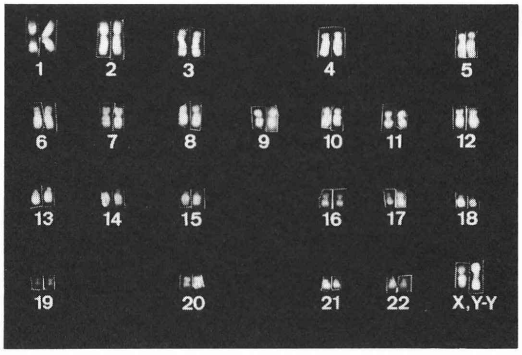



図4 Y:Y転座核型(末梢血,Qバンド法)

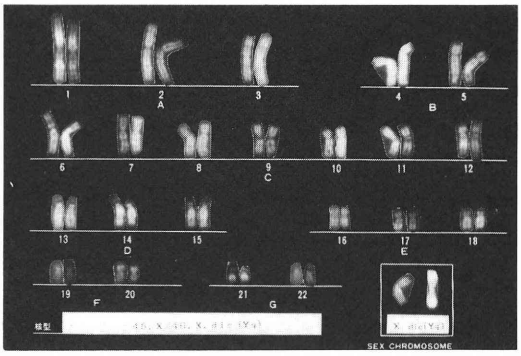



図5 dic (Yq)核型(末梢血,Qバンド法)

表2　内分泌学的検査

1）昭和59年8月（7歳4ヵ月）

1．身長 108.1cm（＜－2SD），体重 17.5kg，両側精巣異常なし

2．LH-RHテスト

| | 前値 | 後値 |
|---|---|---|
| LH (mIU/ml) | 5.38 | 19.76 |
| FSH (mIU/ml) | 2.56 | 16.76 |

3．HCG負荷テスト

| | 前値 | 1日目 | 2日目 | 3日目 |
|---|---|---|---|---|
| Testosterone (ng/dl) | 8 | 47 | 205 | 126 |

2）昭和62年9月（10歳4ヵ月）

1．身長 120cm (＜－2SD), 体重 22kg, 精巣size 両側約3ml

2．LH 4.0mIU/ml, FSH 2.3mIU/ml, Testosterone 16ng/dl, $T_3$ 1.6ng/ml, $T_4$ 9.6$\mu$g/dl, TSH 2.2$\mu$U/ml, GH 2.7ng/ml

な記載を見出せず，広義の Y;Y Translocation と判断した(図4)．また同時に両親の染色体分析を行なったが，共に異常は認めなかった．

3．昭和62年9月

末梢血リンパ球27細胞の分析結果，45, X が23細胞に，46, X, dic (Yq) が4細胞に認められた．Q-band 法，G-band 法による観察でもY染色体短腕の詳細は不明で，前2回の分析との異同は判断し得なかった(図5)．

## 考　察

Y染色体の構造異常は，その臨床像と併せ考えることにより，Y染色体の動きを知る上で，非常に重要な鍵を握っていると考えられる．しかしその異常例の報告は限られており，Y染色体の動きについて，臨床像からは推測はできるものの判定はできないのが現実である．1981年に Davis[3]はY染色体の構造異常を集計し，その臨床像からY染色体の動きについて検討している．この中で Davis は koo[4]らが推測した H-Y 遺伝子が短腕，もしくは長腕の動原体に近い部分に存在しているという説を押し進め，多数の H-Y 遺伝子が存在しているという概念をもとに，男性決定因子はY染色体短腕の動原体よりにあり，精巣の発育すなはち精子形成はY染色体長腕の非蛍光部にあるのではないかと述べている．本症例ではY染色体短腕の動原体近位部および長腕はともに存在し，前述の精巣生検の結果および性ホルモン検査を併せて考えるとこの Davis らの説を裏付けていると思われる．

3回の染色体分析の結果からは本症例の持つ cell line が問題となる．まず第一に 46, XY の細胞が3回目の分析で見られなかったことである．染色体分析自体が in vitro の検査であり，in vivo の状態を完全に反映しているとは言いきれないため，検査による偶然の結果とも考えることができるが，原因は不明である．第二には前2回の Y;Y translocation と3回目の dicentric Y の異同であるが，文献上Y染色体短腕に関する詳細な記載を探しえず，また文献の dicentric Y と本症例の Y;Y translocation とは写真上からは異なると考えたが3回とも同じものであった可能性はある．またY染色体の in vitro での不安定さは1978年に Fryns[2]らが Y;Y translocation 症例で述べている．このなかで，Y染色体は Y;Y translocation, deletion Y を含めた色々なモザイクを示しているが，Y-Y translocation と dicentric Y の同一症例での出現は見ていない．今回の in vitro の dicentric Y, Y; Y translocation の異同を唱えるよりも，正常で見られないY染色体が in vitro で見つかっていること，すなわち，in vivo で何らかの状態を起こしていることを考える必要があると考えられた．今回の Y;Y translocation, dicentric Y であれ，Davis のいう男性決定因子をすべて含んでおり，男性発現には問題ないと考えられた．以下，Y;Y translocation と dicentric Y について文献的考察を加える．

Y;Y translocation は1976年の Wahlstrom[1]と1978年の Fryns[2]らの症例の報告が見られる．Wahlstrom らの症例は67歳の性的に攻撃的性格を持つ男性で，低身長等の骨格異常を持つものの他の明らかな神経学的異常を認めず，精巣は年齢相応の母指頭大であるが，精液，ホルモン検査等を施行しておらずY染色体の精巣機能について言及はしていない．Fryns の症例は2歳男児で2.300 g の低体重で出産し，クルゾン病様の顔貌を持つ頭蓋早期癒合があるものの神経学的発達には異常は認めていない．また外性器は男性型で精巣の発達も正常である．以上と我々の症例を合わせて考えるに Y;Y translocation は男性型の発達，精巣の発育には傷害となっていない．これは先に述べた様にY染色体の精巣発育に関与する部位はY染色体の短腕よりにあるということを裏付けていると思われる．

Y;Y translocation の発生についてはY染色体の不分離，Y染色体同士の癒合時の中心体近傍の欠失，Y染色体の組み替え時の4倍体化等が考えられているが，何れも確定的ではない．その時期についても胎生初期に発生したと思われるが妊娠中のエピソードは特になく，誘因等は不明であり，今後の症例の集積検討が待たれるところである．

dicentric Y については，文献上調べえた限りでは，欧米では1981年の Davis[3]の集計までの43例が，また本邦では4例が認められる[5~6]（表3）．このうち dicentric Yq を認めたものが32例あり，表現型が男性型を示したものが4例，女性型を示したものが11例，不鮮明17例である．内性器の検索は29例に行われており，両側精巣10例，一側が精巣ないしは卵巣，他側が索状性腺か性腺の欠如を見る，混合型性腺異発生症の様相を呈する症例が11例，両側とも索状性腺が6例である．また4例には性腺腫が摘出されていた．これらの相違は dicentric Yq 以外のY染色体及びY染色体の含まれる量，特に男性決定因子を含む短腕の量によると考えられる．しかし，その記載からY染色体の短腕の状態ははっきりせず，症例数も多くはないので，染色体と臨床像の関係については言及できないのが現実である．

以上 Y;Y translocation 及び dicentric Y について

文献的考察を加えたが，染色体分析はあくまでもin vitroの検査であり，その現象はin vivoで起こる可能性はあるが，in vivoで起こっていることを正確に反映しているとは限らない．今回我々の症例でも，3回の末梢血染色体分析の結果はすべて異なり，in vitroの検査である染色体分析の不安定さをうかがわせた．3回の検査結果の異同を考えるよりも，in vitroで見られた現象すべてが正しいと考えたほうが良いのかもしれない．すなはち，正常で見られないものが見つかっており，異常には違いないが，異常なY

表3　dic (Y) の表現型と内性器

| | | dic (Yp) | | | dic (Yq) | | | 記載なし |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 症例数 | | 12 | | | 32 | | | 3 |
| | | 男性 | 女性 | 記載なし | 男性 | 女性 | 性不鮮明 | |
| 外性器 | | 2 | 9 | 1 | 4 | 11 | 17 | |
| 内性器 | 両側精巣 | 1 | | | 3 | | 7 | |
| | 両側精巣＋性腺腫 | | | | 1 | | | |
| | 精巣＋索状性腺 | | | 1 | | | 3 | |
| | 精巣＋索状性腺＋性腺腫 | | | | | | 1 | |
| | 精巣＋性腺欠如 | | | | | 2 | 2 | |
| | 精巣＋性腺腫 | | | | | | 1 | |
| | 精巣＋卵巣 | | | | | | 1 | |
| | 卵巣精巣＋索状性腺 | | | | | | 2 | |
| | 両側索状性腺 | | 4 | | | 4 | | |
| | 両側索状性腺＋性腺腫 | | | | | 2 | | |
| | 索状性腺＋性腺欠如 | | 2 | | | | | |
| | 両側性腺欠如 | 1 | | | | | | |
| | 検索せず | | 3 | | | 3 | | 3 |

表4　小児尿路性器奇形の染色体異常

(高知医科大学泌尿器科1981.10～1986.12)

| 尿路性器奇形 | 症例数 | 染色体検査例数 | 異常例 (%) | 異常内容 |
|---|---|---|---|---|
| 停留精巣 | 125 | 59 | 7 (11.9%) | 46, X sma 11 Y　5例<br>47, XYY　1例<br>47, XXY　1例 |
| 単精巣 | 5 | 4 | 2 ( 50%) | 46, X sma11 Y　2例 |
| 尿道下裂 | 28 | 16 | 5 (31.3%) | 46, X sma11 Y　4例<br>45, X/46, XY/46, X, t (Y ; Y)　1例 |
| 停留精巣尿道下裂合併 | 7 | 5 | 0 | |
| 前置陰嚢 | 1 | 1 | 0 | |
| 埋没陰茎 | 1 | 1 | 0 | |
| 性腺機能低下症 | 3 | 3 | 0 | |
| 巨大尿道 | 1 | 1 | 0 | |
| 左片側多嚢胞腎 | 1 | 1 | 0 | |
| 副腎性器症候群 | 3 | 3 | 0 | |
| 計 | 174 | 93 | 14 (15.1%) | |

染色体というよりは，不安定なY染色体を持つ症例と考えた方が良いのではないかと考えられた．今後も経過を追っていく予定であるので，他の症例も含めて検討を加えてみたい．本症例は外性器異常，尿道下裂を認めたが，染色体と奇形の因果関係については本症例だけでは言及はできない．当科での染色体検査結果の全例を示すが(表4)．何れも外性器異常等があって初めて染色体検査をしており，藤田ら[7]が報告した1例では，遺伝的にsmall Yを証明しているが，外性器異常の遺伝は認めておらず，正常児に対する染色体検査が殆どない状況では，染色体異常が外性器奇形にもたらす影響は深く言及は出来ないと考えられた．

## 結　語

Y;Y translocationと考えられた1例を経験し，若干の文献的考察を加え報告した．

## 文　献


1) Wahlstrom, J., Akesson, H. O. and Eriksson, B.: A man with presumptive Y/Y translocation, observed in a forensic psychiatric department, Clin. Genet., 10: 82, 1976
2) Fryns, J. P., Cassiman, J. J. and Van-den-Berghe, H.: Unusual in vivo Rearrangements of the Y Chromosome With Mitotic Instability in vitro, Hum. Genet., 44: 349, 1978
3) Davis, R. M.: Localization of male determining facters in man: A through review of structural anomalies of the Y chromosome, J. Med. Genet., 18: 161, 1981
4) Koo, G. O., Wachtel, S. S., Krupen-Brown, K., Mittle, L. R., Breg, W. R., Genel, M., Rosenthal, I. M., Borgaonkar, D. S., Miller, D. A., Tantravahi, R., Schreck, R. R., Erlanger, B. F. and Miller, O. J.: Mapping the locus of the H-Y gene on the human Y chromosome, Science, 198: 940, 1977
5) 梶尾百合子，他：外性器異常を伴ったdicentric Yq染色体の一例－45, X/46, X, dic (Y) (qter → pll：pll → qter)，日本小児科学会雑誌，86：1922, 1982
6) 藤林伸助，他：Turner Syndromeの表現型を呈したPseudo-dicentric Y chromosomeの1例，小児科臨床，38：1817, 1985
7) 藤田幸利，他：Y染色体長腕部分欠損を認めた尿道下裂兼陰茎陰嚢不完全位置異常の一例，泌尿会誌，74：2154, 1983


## A case of Y; Y translocation mosaicism with hypospadia


Masanobu Tanimura, Masaaki Morioka, Yasuaki Sen, Yukio Yamamoto and Yukitoshi Fujita

Department of Urology, Kochi Medical School, Kochi 783, Japan (Director: Prof. Y. Fujita)

Yukimasa Shiraishi

1st Department of Anatomy, Kochi Medical School, Kochi 783, Japan (Director: K. Yamamoto)



A Y; Y translocation Mosaicism was found in a 5 year-old boy with hypospadia and follwed up during 5 years. Other feature was only small stature (＜-2SD), but mental retardation, hormonal abnormalities, and testicular aplasia were not seen.

This is the third report in the world literature and the structually abnormal Y chromosomes were discussed.


(受付:1990年9月3日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# 男子不妊症に対する ツムラ補中益気湯の効果

# Effect of Tsumura Hochuekitoh on Male Infertility

筑波大学臨床医学系泌尿器科
真鍋文雄 Fumio MANABE
吉井慎一 Shinichi YOSHII
石川博通 Hiromichi ISHIKAWA
小磯謙吉 kenkichi KOISO

Department of Urology, Institute of Clinical Medicine
Tsukuba University Ibaraki 305, Japan

1988年1月より1989年12月までの2年間に当科に受診した無精子症を除く63例の男子不妊症患者にツムラ補中益気湯7.5 gを3ケ月間連日投与し，その投与前後で精液検査および血中LH，FSH，プロラクチン，エストラジオール，テストテロン値の測定を行ない，比較検討した．また精液所見からWHOの基準に基ずいて分類し，その各群に於いても検討した．

全症例では精子濃度は59例中24例（41％），精子運動率は59例中19例（32％）の改善をみた．血中ホルモン値はFSH，プロラクチン，エストラジオール値が投与後，有意に低下していた．（それぞれ$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.01$）

また，Oligozoospermia群，Asthenozoospermia群，Oligoasthenoteratozoospermia群などの精子所見に異常のある症例において，精子濃度，精子運動率の改善が認められた．

以上より，補中益気湯は精液所見の異常例に対し有用な薬剤と考えられた．

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 683—689, 1991)

## はじめに

男子不妊症に対する薬物治療はホルモン療法と非ホルモン療法に大別され，非ホルモン療法のなかで，近年，補中益気湯を始めとする漢方製剤が注目されている．今回われわれは男子不妊症患者に補中益気湯を投与し，精液所見およびホルモン値に対する効果を検討したので報告する．

## 対　象

1988年1月より1989年12月までの2年間に当科不妊症外来に来院した患者のうち無精子症を除く63例を対象とした．患者年齢は24歳から40歳で平均32.7歳であり，精液所見による内訳はWHOの分類[1]（表1）によると，Normozoospermia（以下N）群18例，Oligozoospermia（以下O）群12例，Asthenozoospermia（以下A）群11例，Oligoasthenoteratozoospermia（以下OAT）群22例であった．

## 方　法

ツムラ補中益気湯を1回2.5 g，1日3回計7.5 gを食前に投与した．投与前と投与3カ月後に，精液検査を行ない，血中ホルモン値をラジオイムノアッセイで測定した．

精液所見のうち，精子濃度，精子運動率について，また，血中ホルモンのうちFSH，LH，テストステ

表1　精液分析の正常値 (WHO, 1987)

| | |
|---|---|
| 精液量 | Volume : 2.0ml 以上 |
| pH : 7.2～7.8 | |
| 精子濃度 | Sperm concentration : $20\times10^6$/ml 以上 |
| 総精子数 | Total sperm count : $40\times10^6$ 以上 |
| 精子運動率 | Motility : 前進する精子（表2のaあるいはb）が50%以上，もしくは高速に直進する精子（表2のa）が25%以上（採取後60分以内） |
| 精子奇形率 | Morphology : 50%未満 |
| 精子生存率 | Viability : 50%以上（supra-vital staining による） |
| 白血球数 | White blood cell : $1\times10^6$/ml 未満 |

精液性状の表現方法 (WHO, 1987)

| | |
|---|---|
| 正常精液 | Normozoospermia : 表1の基準を満たす精液 |
| 乏精子症 | Oligozoospermia : 精子濃度 $20\times10^6$/ml 未満 |
| 精子無力症 | Asthenozoospermia : 前進する精子（表2のaあるいはb）が50%未満，もしくは高速に直進する精子（表2のa）が25%未満 |
| 奇形精子症 | Teratozoospermia : 形態正常精子が50%未満 |
| 乏精子－精子無力－奇形精子症 | Oligo-astheno-teratozoospermia : 精子濃度，運動率，奇形率の総てが異常 |
| 無精子症 | Azoospermia : 精液中に精子が存在しない |
| 無精液症 | Aspermia : 精液が射精されない |

表2　精液所見の評価方法[2)]

| | |
|---|---|
| 1．精子濃度 | |
| (1) 著明改善 | $20\times10^6$/ml 以上の増加 |
| (2) 改善 | $10\times10^6$/ml 以上の増加 |
| (3) 不変 | $\pm10\times10^6$/ml 未満の変化 |
| (4) 悪化 | $10\times10^6$/ml 以上の減少 |
| 2．精子運動率 | |
| (1) 著明改善 | 30%以上の増加 |
| (2) 改善 | 20%以上の増加 |
| (3) 不変 | ±20%未満の変化 |
| (4) 悪化 | 20%以上の減少 |

ロン（以下T）プロラクチン（以下P）、エストラジオール（以下$E_2$）について，補中益気湯投与前後において比較検討した．また，WHOの基準に基ずいた各群間でもそれぞれ検討した．統計学的検討はすべてt検定で行なった．また精液所見に関しては熊本ら[2)]による効果判定基準（表2）でも評価した．

## 結　果

（1）精子濃度，精子運動率

投与前後における精子濃度，精子運動率の改善度は図の如くであった．（図1－5）

全症例では，精子濃度は41％で，精子運動率では32％が改善し，統計学的にも有意差を認めた．（共にP＜0.01，図1）．N群では，逆に有意に，悪化傾向を認めた（共にP＜0.01，図2）．O群では，精子濃度のみ，有意差を認めた（P＜0.01，図3）．A群では精子濃度，精子運動率，共に有意差を認めた（P＜0.05，P＜0.01，図4）．OAT群でも精子濃度，精子運動率，共に有意差を認めた（共にP＜0.01，図5）．

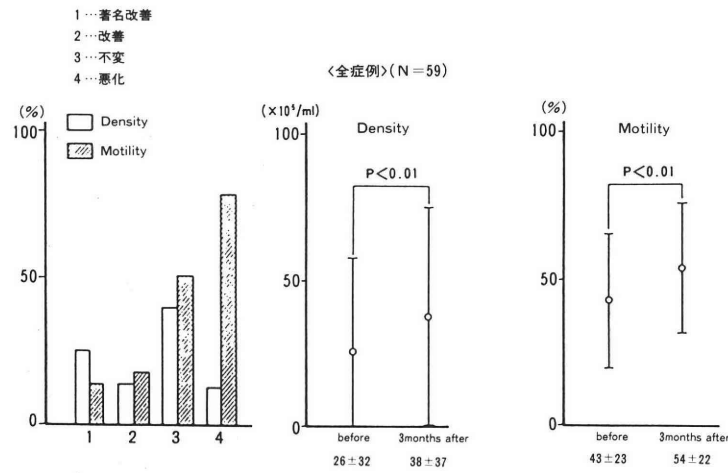



図1　補中益気湯投与前後の精子濃度・運動率 (M±S.D.)

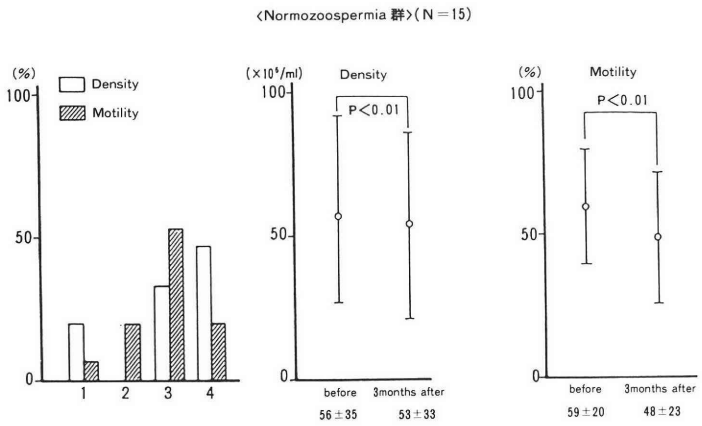



図2　補中益気湯投与前後の精子濃度・運動率 (M±S.D.)

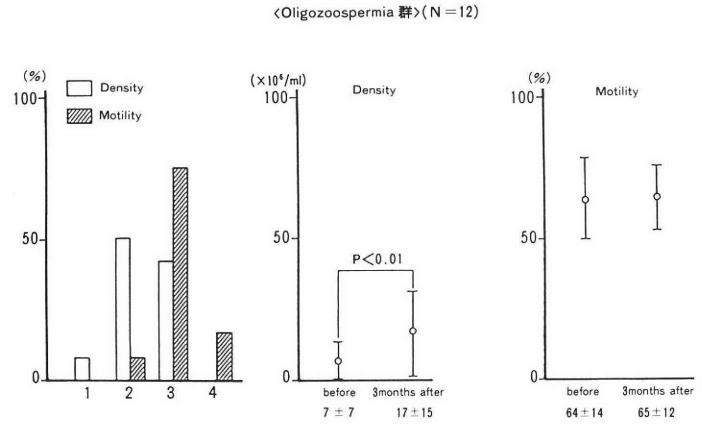



図3　補中益気湯投与前後の精子濃度・運動率 (M±S.D.)

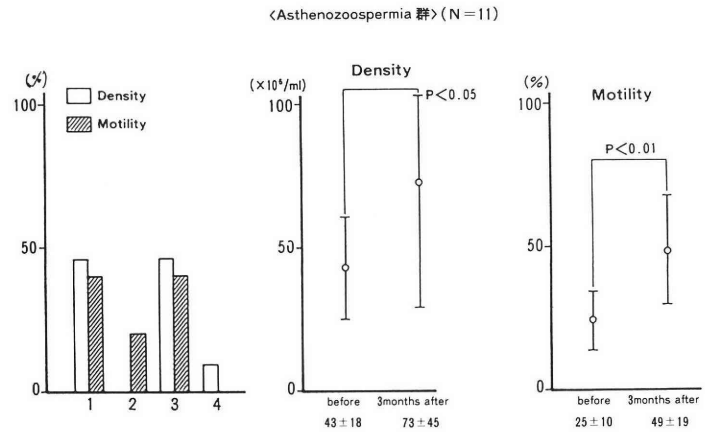



図4　補中益気湯投与前後の精子濃度・運動率 (M±S.D.)

(2) 血中ホルモン値

補中益気湯投与前後の各血中ホルモン値は図の如くであった. (図6－10)

全症例ではFSH (P＜0.05), P (P＜0.01), $E_2$ (P＜0.01) 値が有意に低下していた (図6).

N群ではP (P＜0.01), $E_2$ (P＜0.05) 値が逆に上昇していた(図7). O群ではP値が有意に減少していた (P＜0.05) (図8).

A群ではFSH(P＜0.05), P(P＜0.05), $E_2$(P＜0.05)値が有意に減少していた(図9). OAT群では補中益気湯投与前後でのホルモン値の変化に有意差を認めなかった (図10).

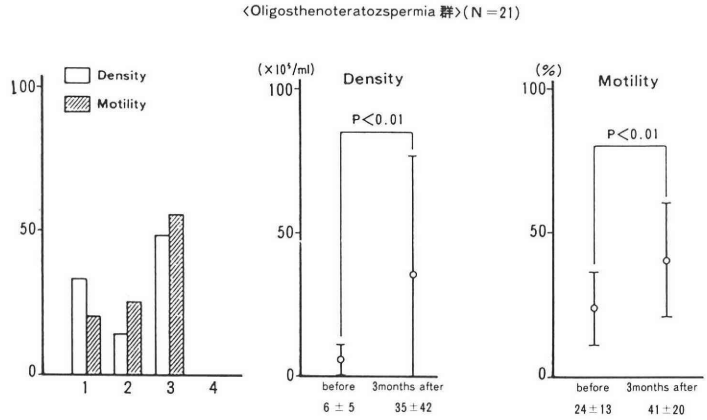



図5　補中益気湯投与前後の精子濃度・運動率 (M±S.D.)

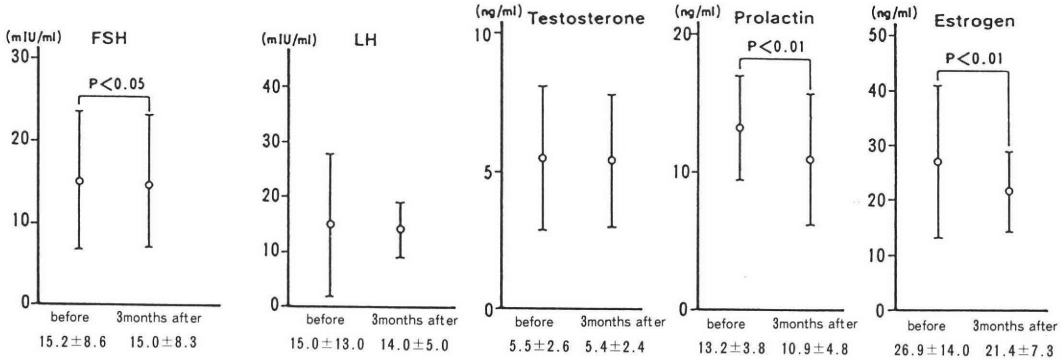



図6　ツムラ補中益気湯投与前後の血中ホルモン値 (M±S.D.)

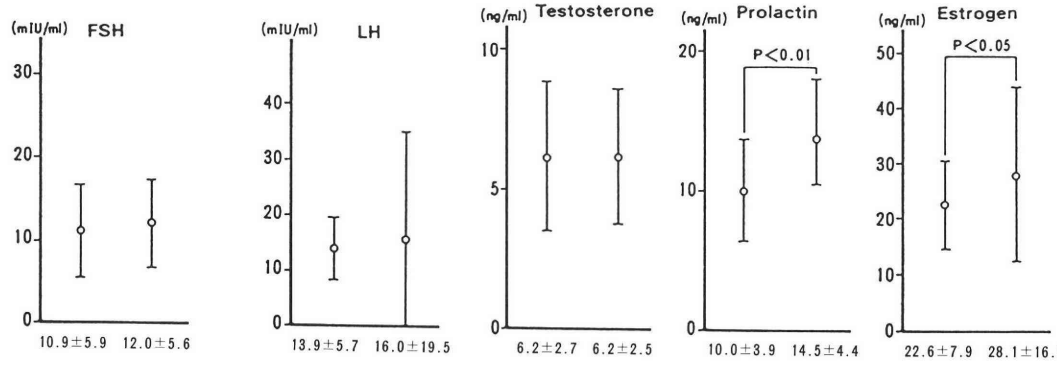



図7　補中益気湯投与前後の血中ホルモン値 (M±S.D.)

<Oligozoospermia 群>(N＝12)

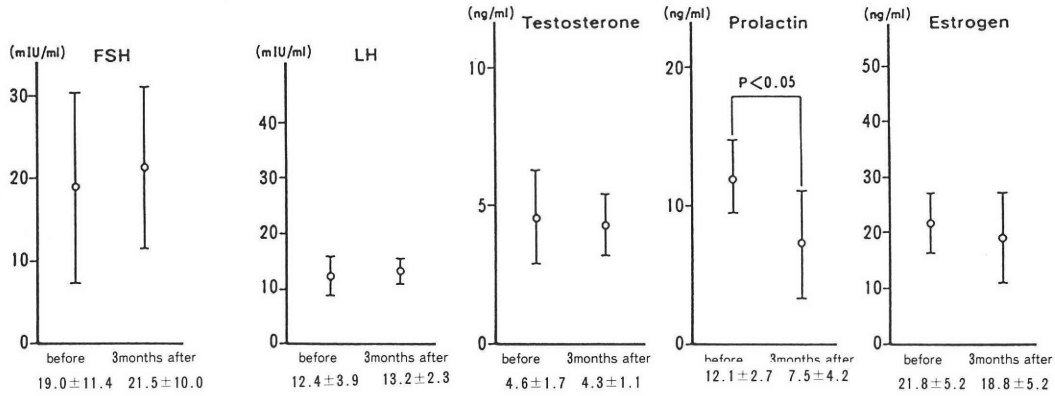



図8　補中益気湯投与前後の血中ホルモン値 (M±S.D.)

<Asthenozoospermia 群>(N＝11)

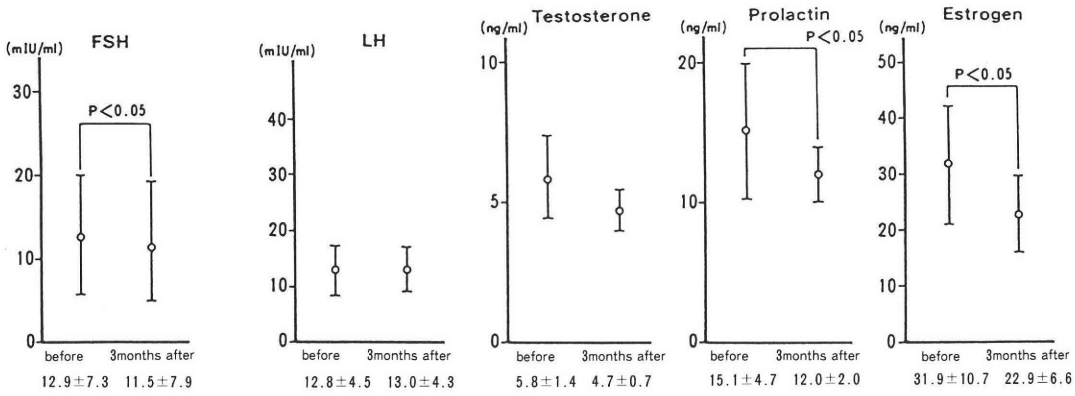



図9　補中益気湯投与前後の血中ホルモン値 (M±S.D.)

<Oligoasthenoteratozoospemia 群>(N＝22)

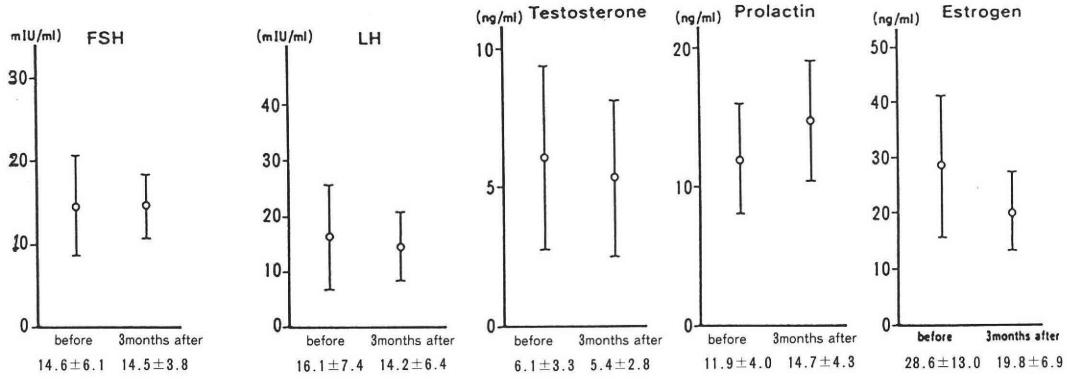



図10　補中益気湯投与前後の血中ホルモン値 (M±S.D.)

## 考　察

近年，非ホルモン療法の一つとして補中益気湯，八味地黄丸，牛車腎気丸，人参湯などの漢方薬が注目され，各施設でその効果も注目されてきている[3~9]．今回われわれは男子不妊症患者に補中益気湯を投与し，精子濃度，精子運動率及び，内分泌学的効果に関して検討を行なった．

これまで明らかにされている補中益気湯の治療効果の機序は以下のように報告されている．

1．人参アルコールエキスの抗ストレス作用[10]．
人参 ginsenoside, Rb1, Rb2, Re, Rg1 の肝，骨髄，精巣の蛋白質，DNA，RNA，脂質の生合成促進作用[11]．

2．柴胡粗サポニン[12]，大棗メタノールエキス[13]，甘草グリチルリチン[14]の抗ストレス作用およびストレスからくる動脈硬化の予防．

3．黄耆[15]，当帰[16]の末梢血管拡張作用による精子形成の促進

4．生姜，陳皮の胃液分泌，蠕動運動亢進作用[17]．

5．柴胡の精子運動持続化作用[18]．

さらに動物実験では木村[19]や須藤ら[20]が，Adriamycine 投与による造精機能障害のあるラットの精子形成の回復を報告している．木村らは投与後の Sertoli cell ratio が Spermatocytes 以降で有意なことから，主に Sertoli cell を介して精細胞に作用するとしている．

今回の我々の治療成績についてみると全症例レベルでは精子濃度，運動率ともに改善をしていた．また群別もしくは症例別にみると，WHO の基準で精子濃度または運動率が正常なら変化は認められないが，それらが異常ならはっきりとした改善傾向が認められた．

他施設での報告をみると，当施設での精子濃度改善率 41％，運動率改善率 32％なのに対し，光川ら[3]はそれぞれ 67.3％，74.5％，佐藤ら[4]は補中益気湯にコウジン末を併用しそれぞれ 62.5％，65.6％，とかなり良い成績をあげている．これは当施設での症例が精子濃度，精子運動率ともに高度な障害のある Oligoasthenoteratozoospermia 群の占める比率が高かったため，やや改善率が低くなったものと思われる．

他の非ホルモン療法に関してみると，メチコバラミンの精液所見改善率は，角谷ら[21]は精子濃度 34.5％，精子運動率 17.2％と報告している．また，カリクレインの改善率は当施設でそれぞれ，26％，29％，であり，角谷[21]はそれぞれ，18.8％，12.9％，と報告しており，補中益気湯は他の非ホルモン療法薬と比べ，有効性が高いものと思われた．

血中ホルモンに関しては FSH, P, $E_2$ 値が精液所見異常例で低下する傾向が認められた．

FSH は Sertoli cell での ABP，$E_2$ 合成促進，トランスフェリン合成，酵素プロテインキナーゼの活性化，インヒビン合成などを司っており，Sertoli 細胞機能障害があると下垂体前葉へのフィードバック機構により，FSH が上昇する．LH も Leydig 細胞機能障害のフィードバック機構により，その値が上昇するが，これまでの我々の報告[22]でも精巣機能障害が高度な程，FSH，LH が高値を呈しており，特に FSH の方がより鋭敏に精巣機能障害を反映すると言われている．

P は実験動物では LH によるステロイド産生を増加させ，これにより精子形成を刺激するが，P 過剰の場合には精巣機能を抑制する方向へ働くと報告されているが[23~24]，その作用には不明な点も少なくない．

$E_2$ は中枢を介して LH 分泌を阻害し，Leydig 細胞での T 分泌を阻害する．また直接精巣 LH 受容体を阻害する作用や，FSH のフィードバックファクターにもなりうる[25]．

以上により，血中 FSH 値の補中益気湯投与後の低下は，補中益気湯が Sertoli 細胞に対する作用を介し，精細胞に働き，精巣機能を改善することを裏付けているものと考えられるが，より詳細な検討が必要なことは言うまでもない．$E_2$ も FSH，LH に対するフィードバック阻害を抑制することが精巣機能改善に合目的に作用しているものと思われる．P に関してはその変動の意義は不明である．

現在，確実に有効な治療薬の少ない男子不妊症患者において，補中益気湯は，おそらく内分泌環境の変化を通して精液所見を改善させる有用性の高い薬剤の一つと思われた．

## 文　献

1）WHO: laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, published on behalf of the WHO, Cambridge University press, 1987
2）熊本悦明，丸田浩ら：　Oligozoospermia に対する Mecobalamin の臨床効果－二重盲検比較試験による検討－，泌尿紀要，34：1109, 1988
3）光川史郎，木村正一，石川博夫，折笠精一：男子不妊症患者に対する補中益気湯の使用経験，日不妊会誌，29（4）：458, 1984
4）佐藤和宏，折笠精一，前原郁夫，佐藤滋彰，佐藤正義，高橋勝：男子不妊症患者に対する補中益気湯，コウジン末併用療法の経験，泌尿器外科，2（6）：641, 1989

5) 玉舎輝彦, 大野洋介, 岡田弘二：乏精子症の補中益気湯による治療と髄証療法指針, 日不妊会誌, 32：385, 1987
6) 森明人, 堂地勉, 山元慎一, 竹内一浩, 福元清吾, 沖利通, 永田行博：八味地黄丸の乏精子症に対する効果, 日不妊会誌, 35：329, 1990
7) 吉井慎一, 友政宏, 石川博通, 小磯謙吉：特発性男子不妊症における八味地黄丸およびKallikreinの臨床効果, 西日泌, 51：1135, 1989
8) 太田博孝, 福島峰子：男子不妊と漢方, 産婦人科治療, 57：304, 1988
9) 奥山明彦, 並木幹史, 園田孝夫, 林知厚, ：男子不妊症に対する八味地黄丸及人参湯の効果, 泌尿器要, 30：409, 1984
10) 斉藤洋, 包点桐, 上山敬司, 中信子, 西山信好, 日向恵子：ストレス負荷動物の学習及び性行動に対する紅参野影響, 第16回和漢薬シンポジウム講演要旨集, 66：1982
11) Oura, H., Hiai, S., Nakagawa, H., Kurata, Y. and Sasaki, N.: Effect of ginseng extract on endoplasmic reticulum and Ribosome, Plants. Medica, 28：76, 1972
12) 柴田丸, 吉田玲子, 本橋幸子, 福島正子：柴胡の薬理学的研究（第4報）Crude Saicosides, Saicogenin A及びSyrupy Residueの薬理作用, 薬誌, 93：1660, 1973
13) 山原篠二, 金真理子, 沢田徳之助, 藤原一：生薬の生物活性成分に関する研究（第1報）生薬の抗潰瘍作用, 生薬誌, 28：33, 1974
14) Schulze, E., Frank, R. and Keller, N.: Uberdie Wirkunge von Succus liguiritiae, Deutshe Med. Wochenschrift, 79：716, 1954
15) 寺田文次郎, 高橋富雄：漢薬黄耆の抗高血圧性成分に就いて, 日薬物誌, 25：27, 1938
16) 林元英：柴根および当帰の薬理学的研究（第1報), 日薬理学誌, 73：177, 1977
17) 神戸中医研究会編著：中医処方解説　14, 医歯薬出版, 1982
18) 田代眞一：補中益気湯の精子運動持続化作用, 漢方医学, 12：13, 1988
19) 木村正一：男子不妊症に対するツムラ補中益気湯の基礎的研究, 漢方医学, 13：5, 1989
20) 須藤和彦, 本多一裕, 滝昌之, 蟹谷昌尚, 藤井祐一, 油田正樹, 細谷英吉, 木村正一, 折笠精一：マウスにおけるAdriamycinによる造精機能障害におよぼすTJ－41（ツムラ補中益気湯）の効果, 日薬理誌, 92：251, 1988
21) 角谷秀典, 小竹忠, 始関吉生, 高原正信, 石井弘之, 島崎淳：乏精子症を呈する特発性男子不妊症の薬物療法, 西日泌尿, 52：591, 1990
22) 吉井慎一, 友政宏, 武島仁, 石川博通, 小磯謙吉：過去5年間の男子不妊症の臨床統計, 日不妊会誌, 34：454, 1989
23) Bartke, A., Hafiez, A. A. and Bex, F. J.: Hormonal interactions inreguration of and rogen secretion, Biol. Reprod., 13: 44, 1978
24) Fang, V. S., Refetoff, S. and Rosenfield, R. L.: Hypogonadism induced by a transplantable, prolactin-producing tumor in male rats: Hormonal morphological studies, Endocrinology, 95: 991, 1974
25) 大橋輝久：男子におけるEstrogenの研究第2報正常人男子および性腺疾患患者における合成ACTH, HCG刺激に対する血中Estrogen動態, 日泌会誌, 70：915, 1979

## Effect of tsumura hochuekitoh on male infertility

Fumio Manabe, Shinichi Yoshii,
Hiromichi lshikawa and kenkichi koiso

Department of Urology, lnstitute of Clinical Medicine Tsukuba University lbaraki 305, Japan

To investigate the clinical effects of chinese herbal medicines on male infertility, we administered 7.5g of Hochuekitohdaily for 3 months to 63 infertile patients.

Semen analyses were performed for sperm density and motility before and after the treatment, and the changes of serum FSH, LH, testosterone, prolactin and Estradiol were evaluated.

For more detailed investigation, patients were divided into 4 groups based on WHO criteria.

ln all cases sperm density was improved in 24 (41%) out of 59 evaluable cases and sperm motility was improvedin 19 (32%) of 59 cases. Serum levels of FSH, prolactin and estradiol were significantly decreased after the treatment.

As to each group, improvement of spermdensity and motility, and/or decreases in hormonal levels were observed in 3 groups with impaired sperm qualities.

These results suggest that Hochuekitoh is effective agent for male infertile patients with impaired sperm qualities.

(受付:1990年12月10日)

日本不妊学会雑誌
第36巻 第3号 1991

# SECRETORY DYSFUNCTION OF THE MALE ACCESSORY GENITAL GLANDS DUE TO PROSTATIC INFECTIONS AND FERTILITY; A SELECTED REVIEW OF THE LITERATURE

Nikolaos SOFIKITIS and Ikuo MIYAGAWA

Department of Urology, Tottori University School of Medicine,
Yonago 683, Japan (Director: Prof. I. Miyagawa)

**Abstract:** Male subfertility or infertility has many causes, one of which is chronic bacterial or non bacterial prostatitis. Such infertility may result from the following factors: a secretory dysfunction of the prostate, seminal vesicles and epididymis; strictures or obstructions of the excretory ducts; testicular atrophy; a direct effect of bacteria on semen quality; a decreased number or motility of sperm; a disturbance of sperm penetration into the zona pellucida, and a high incidence of antibodies reactive with spermatozoa. The importance of those factors is reviewed. To illustrate the detrimental effect of the secretory dysfunction of the male accessory genital glands on fertility quantitative changes of seminal components in patients with chronic prostatic infertility are referred, in details, Improvement of the infertility occurs following the appropriate treatment of chronic bacterial prostatitis or non bacterial prostatitis.

(Jpn. J. Fertil, Steril., 36 (3), 690—699, 1991)

Infertility is a private as well as social problem, It is reported[1] that primary infertility affects about 15 per cent of all married couples in the United States. If we add to this the number of cases of secondary infertility, the number soars. In healthy couples, pregnancy is achived within 12 months in 80 per cent of those who use no contraceptive measures. Those who fail to conceive after this period (assuming they have a normal, regular sexual life) must be evaluated.

About 33 per cent of the cases of infertility result from pathologic factors in the male, 33 per cent from factors in the female, with both responsible in 33 per cent.

A major problem in diagnosing male infertility is determining the effect of chronic infection of the paragenital glands. Infection of the male accessory glands has been diagnosed[2] in 13 per cent of men with abnormal semen quality. The relevant literature will be reviewed.

## Etiology of prostatic infection

The causal agents of bacterial prostatitis are similar to these of urinary tract infections with Escherichia coli strains predominating[3]. Less frequently responsible are Proteus, Klebsiela, Pseudomonas, and Serratia[3]. Other than enterococci gram-positive species seldom cause prostatitis[4,5]. The importance of viruses on inflammatory processes of the genitourinary tract is not completely understood. The possible routes of acquiring bacterial infection include: ascending urethral infection; reflux of infected urine into prostatic ducts; sexual intercourse; hematogenous infection and lymphogenous spread. At present the role of some strains of Mycoplasma and Chlamydia in the development of non bacterial prostatitis remains controversial and needs more illustration[6~11]. Different results have been published in regard with their incidence in infertile

men.

Nikkanen et al.[7] reported that between twenty one infertile men twelve were positive for Chlamydial antibody (titer≧16). On the other hand, Busolo et al.[12] reported of 103 patients with unexplained infertility and asymptomatic bacteriospermia which were tested for Chlamydia trachomatis all were found negative.

The incidence of Mycoplasma in infertile men is about 40 per cent and among controls it is reported to be between 10 and 30 per cent in different centers[9,13~15], However, there are remarkable variations among the results of different investigations concerning the incidence of Mycoplasma in infertile men[13~15].

**Diagnosis of chronic bacterial or nonbacterial prostatitis**

Since similar clinical findings as well as objective results of prostatic fluid analysis and semen analysis occur in patients with chronic prostatic infections as in patients with conditions other than infection, there is a need for strict criteria to establish the diagnosis. Those mentioned by Comhaire et al.[16] include the following: 1) History of urogenital infection and/or abnormal rectal palpation; 2) Significant alterations in the expressed prostatic fluid and/or urinary sediment after prostatic massage; 3a) Uniform growth of more than $10^3$ pathogenic bacteria per ml of semen or more than $10^4$ non pathogenic bacteria per ml in 1:2 diluted seminal plasma; 3b) Signs of disturbed secretory function of the prostate or of the seminal vesicles; and 3c) Presence of more than $10^6$ (peroxidase positive) leucocytes per ml of ejaculate. A combination of two of the above parameters establishes the diagnosis of male adnexitis.

**Subfertility following chronic bacterial or non-bacterial prostatitis**

While there is no general agreement, numerous articles have been published concerning the causal relationship of chronic bacterial or non bacterial prostatitis to male subfertility.

It is known[17,18] that the addition of large numbers of microorganisms ($>10^6$ organisms per ml) to normal fresh ejaculate decreases the viability of sperm (impaired motility and agglutination). Spermatozoa are not usually exposed to such concentrations of pathogens during chronic bacterial prostatitis, so that subfertility in thses cases perhaps is not the result of a direct effect of the pathogen on the spermatozoa[3]. The following ten factors may contribute to the subfertility secondary to chronic bacterial or non bacterial prostatitis. The importance of the first, second, and third factor will be discussed in details later.

1. Secretory dysfunction of the prostate[19,20].
2. Secretory dysfunction of the seminal vesicles in those patients in whom seminal vesiculitis follows prostatitis.

In semen sampled from men suffering from Ureaplasma-associated prostatitis a significant negative correlation was detected between the numbers of Ureaplasma and the concentration of zinc in semen and a similarly significant negative correlation in regard to fructose content, indicating a secretory dysfunction of both the accessory glands in such prostatic infections[15] .

3. Secretory dysfunction of the epididymis in those patients in whom epididymitis follows prostatitis. However, the utility of assessing the concentration of secretory products of the epididymis has not yet been evaluated in the diagnosis of chronic infections of the prostate[2].
4. Stricture or obstruction of the excretory ducts acquired following infections of those structures as a complication of a prostatic infection. Previously gonorrheal urethritis frequently led to obstructive epididymitis. Small pox and filariasis also previously led to excretory duct obstruction[21]. The agents responsible for chronic bacterial prostatitis may lead to male infertility if the infection produces an obstruction of the excretory ducts or epididymis. In such cases a low number of ejaculated spermatozoa may be responsible for the patients' infertility.
5. Testicular atrophy following long-standing proximal obstruction[22]. Chlamydia trachomatis or Mycobacterium tuberculosis infection may result in testicular atrophy[23] due to obstruction of the efferent testicular ducts. In these cases a decreased sperm number and an impaired sperm motility due to insufficient sperm production and maturation may result in infertility.

6. Direct effect of bacteria on semen quality by utilization of important substances[23]. Semen components are important for the maintenance of the integrity, motility, and viability of the spermatozoa. Thus, a consumption of seminal substances may decrease their optimum concentrations leading to an impaired fertilizing ability of the sperm.
7. Abnormal number and motility of spermatozoa in seminal fluid positive for specific microorganisms; or a direct effect of the microorganisms on the spermatozoa. Semen abnormalities have been associated with schistosomiasis in subfertile men[24].

Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum have been observed with increasing frequency in males with genitourinary disorders. These species have been found capable of attaching to the spermatozoa of infertile men with a reduction in sperm motility[25].

Naessens et al.[26] reported that the presence of Ureaplasma urealyticum in samples of seminal fluid from unselected men attending a fertility clinic was correlated significantly with abnormal semen analysis. Grossgebauer and Henning[27] also reported the case of an infertile man with oligospermia and symptoms of urethritis-prostatitis whose spouse had a vaginal discharge. Microbiological analysis of the appropriate specimens in both cases revealed a strain of tetracycline-resistant Ureaplasma urealyticum. In addition, using the transmission electron microscope, spermatozoal heads infected with microorganisms strongly resembling Ureaplasma urealyticum were observed.

Thus, impaired motility and morphological changes of the spermatozoa due to their touching with the microorganisms may be a mechanism of the development of infertility during prostatic infections.
8. A disturbance of sperm penetration related to the production of diffussible, relatively heat-labile factors in the semen of infected men[28]. Therefore, the presence of factors responsible for the inhibition of sperm penetration can be cause of infertility in some patients with prostatic infections.
9. High incidence of antibodies reactive with the spermatozoa[10,29], Decreased motility resulting in infertility follows the action of these antibodies on the spermatozoa.
10. Presence of pelvic inflammatory disease in the female partner. It is suggested that there is a direct relationship between female pelvic inflammatory disease or salpingitis and male infertility. Thus, the presence of a large number of bacteria in the semen of infertile men may be related to a gynecologic infection in the female partner and may also lead to female infertility[23]. Therefore when treating a gynecologic infection, consideration should also be given to treating the male[30].

Factors 1-3 cited above are due to the effect of the infection on the function of the male accessory genital glands, while factors 4-10 may contribute to subfertility or infertility developing as a complication of the prostatic infection. The latter might be due to an influence on fertilization; spermatogenesis, sperm maturation, transport of sperm, and other steps important in fertilization.

## Prostatitis and secretory dysfunction of the male accessory genital glands

The seminal fluid may contain factors that are not absolutely essential to fertilization. However, their secretion may provide the environment ideal for sperm motility and transport.

Inflammation of the accessory glands is not necessarily associated with biochemical changes in the seminal fluid. Some indices reflect the extension of epithelial activity of these glands, not the inflammatory process per se. Secretory dysfunction sometimes occurs following severe damage to the prostatic or vesicular epithelium[23]. Prostatic infection sometimes leads to a secretory dysfunction of the male accessory genital glands. Thus, the secretory dysfunction of the male accessory genital glands may participate in the development of subfertility following chronic bacterial or nonbacterial prostatitis.

The detrimental effect of the impaired secretory function of the accessory glands on fertility and the importance of the bio-indices of these glands for fertilization is apparent if we study their role in semen biochemistry and their levels in the seminal plasma of infected or infertile men as compared with fertile men.

*Citric Acid*

Citrate, the major anion of human seminal fluid is important in maintaining the osmotic equilibrium of the prostate[31]. Citrate is a potent binder of metal ions. Of all prostatic marker substances, the total output per ejaculate of citric acid was found[2] to be most specifically related to infection. Lower levels were found in patients with prostatic infections[3]. In such cases an alteration of the osmotic equilibrium of the prostate due to a decreased citrate concentration may have an influence on the concentration of metal ions in the seminal fluid. Taking into consideration that an ideal sperm motility is related with an optimal qualitative and quantitative concentration of metal ions in the seminal fluid it is easy to understand the detrimental effect of lowered levels of citrate on human fertility.

*Calcium and Magnesium*

Calcium and magnesium, which are secreted by the prostate decrease[32] in the prostatic secretions of infertile men with chronic prostatitis.

Magnesium is an important intracellular cation. It is also present in many enzymes, specially those participating in carbohydrate metabolism. Considering that spermatozoa utilize fructose to derive energy, it seems that a magnesium deficiency due to prostatic infection, interfering in the spermatozoa metabolism may affect fertility.

*Zinc*

Human prostatic fluid contains a potent antibacterial factor (PAF) that is bactericidal to many pathogens. PAF has been identified as a zinc compound probably a salt[33,34].

Concentrations of zinc are low in men with chronic bacterial prostatitis. Whether the infection develops because the prostatic secretion contains an inadequate level of zinc, or whether the zinc is reduced as a result of the prostatic infection is unknown. Since the content of all cations in prostatic fluid, not merely zinc, is depressed in patients with chronic bacterial prostatitis, the low level of zinc may be an effect rather than a cause[35].

The depressed levels of zinc remain unaltered in prostatic secretions during therapy with oral zinc preparation[33,34]. The high level of zinc in human seminal plasma appears to originate primarily from prostatic gland[36].

Evaluation of zinc levels in semen permits the diagnosis of patency of the seminal pathways. Semen from patients with bilateral agenesis of the vas deferens showed high levels of zinc whereas lower levels have been found in patients with monolateral congenital or acquired obstruction[37].

It is possible that zinc may influence the physio-

Table 1 Bio-indices of the function of the Accessory Genital Glands

| Component | Marker of the function of | Mean level |
|---|---|---|
| Citric Acid | Prostate | 376 (mg/dl) |
| Calcium | Prostate | 28 (mg/dl) |
| Magnesium | Prostate | 11 (mg/dl) |
| Zinc | Prostate | 14 (mg/dl) |
| Acid Phosphatase | Prostate | 340 King-Armstrong units per ml |
| Spermine | Prostate | 273 (mg/dl) |
| Cholesterol | Prostate | 103 (mg/dl) |
| Fibrinolysin | Prostate | |
| Fructose | Seminal vesicles | 222 (mg/dl) |
| Prostaglandins | Seminal vesicles | 212 ($\mu$g/ml) |
| Bicarbonate | Seminal vesicles | |
| Proteinkinase | Seminal vesicles | |
| L-Carnitine | Epididdymis | |
| Glycerylphosphorylcholine | Epididdymis | 66 (mg/dl) |
| $\alpha$-Glucosidase | Epididdymis | |

Data compiled from Mann and Mann[31], Zaneveld and Chatterton[47].

logical integrity of the spermatozoa[38]. On the other hand it is reported that no correlation has been found between sperm count or motility and the seminal zinc level[37].

Zinc excreted from the human prostate provides for a high content of zinc in the sperm nucleus and contributes to the stability of the quaternary structure of the chromatin[39,40].

After ejaculation, in vitro, a second type of stability most probably involving disulfide-bridge crosslinks supersedes the zinc depended stability[39,40].

Normally the nuclei of the ejaculated spermatozoa remain stable; they do not decondence when exposed to a detergent as sodium dodecyl sulfate-SDS. However spermatozoa to a zinc chelating medium become destabilized and decondence in SDS. Spontaneous decondensation in SDS occurs in many spermatozoa from some infertile men, especially those whose prostatic secretory function is impaired[39,40].

Thus, lowered levels of zinc in semen due to impaired prostatic secretory function in patients with prostatic infection may lead to destabilized ejaculated spermatozoa with impaired integrity, not capable of fertilizing an ovum.

*Spermine*

The level of spermine, a substance in seminal fluid, secreted by the prostate, is correlated with sperm count and motility[41]. At room temperature acid phosphatase hydrolyzes seminal phosphorylcholine. Free inorganic phosphate ions are formed which then interact with the positively charged spermine and precipitate large translucent yellow salt crystals of spermine phosphate. Spermine concentrations are low in men with chronic bacterial prostatitis[3]. Spermine is a very basic aliphatic polyamine. Because polyamine metabolism is correlated with growth and because the potential of polyamines for interacting with DNA is documented, decreased levels of spermine in the seminal fluid of men with chronic bacterial prostatitis may have a detrimental effect on fertility. However, the biologic role of these polyamines has not been resolved.

*Acid Phosphatase*

Human semen contains high acid phosphatase activity originating from prostatic secretions[42]. It is important to recognize that this enzyme activity is sensitive to body temperature. Acid phosphatase appears to be a reliable parameter for evaluating prostatic function in cases of prostatic infection whereas alkaline phosphatase may be a nonspecific parameter of subfertile semen[43] Lower levels of acid phosphatase are found in patients with chronic prostatic infections[3].

It has been found[44] that the catalytic activity of acid phosphatase in the spermatic fluid of subfertile men increased following the administration of clomiphene citrate, 50mg orally given for three months. The concentration of the main prostate-specific acid phosphatase remained unchanged. The spermatic fluid concentrations of zinc and magnesium ions were increased in this case. Therefore, an increase in zinc and magnesium ion concentration may be responsible for the activation of acid phosphatase in semen, or the administration leads to increased secretion of prostatic acid phosphatase (s) other than the main enzme. However, it is clear that the secretion of the main prostatic acid phosphatase into semen is under different control than that of zinc and magnesium[44]. Although the biologic functions of this enzyme and its reactions are not known, decreased levels of acid phosphatase in the seminal fluid of patients with chronic bacterial prostatitis being insufficient for the hydrolysis of phosphorylcholine phosphate (the natural substrate for prostatic acid phosphatase) may have a detrimental influence on fertilization.

*Cholesterol*

The synthesis of cholesterol by the human prostate has been studied in detail[45]. Its concentration in prostatic fluid is decreased in patients with prostatic infection[3]. Cholesterol is one of the highest concentration of lipids in the prostate. The ratio of cholesterol to phospholipid in the seminal plasma stabilizes the sperm against temperature and environmental shock[3]. Thus, decreased secretion of cholesterol in patients with chronic bacterial prostatitis resulting in less stable sperm against enviromental stimuli may affect the fertility potential of these men.

*Fibrinolysin*

Liquefaction of the coagulated seminal fluid after ejaculation occurs within 10 to 20 minutes of collection due to the action of three enzymes, fibrinolysin (secreted by the prostate), fibrinogenase, and aminopeptidase[46].

If liquefaction takes more than 20 minutes or does not occur at all it is a sign of prostatic dysfunction, usually due to previous chronic prostatitis. Therefore, decreased secretion of fibrinolysin in men with chronic bacterial prostatitis may impair the liquefaction of the seminal fluid and may disturb the release of spermatozoa from the seminal clots.

*Fructose*

Fructose, the main sugar in seminal plasma[47] originates in the seminal vesicles[31]. While the concentration of fructose in human semen is under androgenic regulation, such factors as storage, frequency of ejaculation, blood glucose levels and nutritional status may also affect its concentration[31].

Fructose appears to provide an anaerobic and aerobic source of energy for sperm[47]. Concentrations below 120mg per 100ml usually reflect underlying pathology such as : inflammation of the seminal vesicles, androgen defficiency, partial obstruction of the ejaculatory ducts or incomplete ejaculation.

Decreased fructose secretion due to chronic bacterial prostatitis exerting a detrimental influence on the production of energy of the spermatozoa may affect the fertility of the patients.

*Prostaglandins*

Prostaglandins found in seminal plasma are produced mainly by the seminal vesicles[48].

Prostagladins are implicated in a wide variety of biological events in the male such as erection, ejaculation, sperm motility, sperm transport, testicular and penile contractions[48].

A decreased secretion of the seminal vesicles due to inflammation will result in a decreased total output per ejaculate of prostaglandins[2] . Therefore, many important biological events necessary for fertilization may be affected.

*Bicarbonate*

Bicarbonate in the semen is found[49] to originate mainly from the seminal vesicles and a positive correlation has been observed between bicarbonate levels and volume of sperm or sperm motility in infertile patients. It has been suggested[49] that lowered levels of bicarbonate due to secretory dysfunction of the seminal vesicles may be at least in part responsible for poor sperm motility as a result of the failure in the activation of the sperm adenylate cyclase.

*Proteinkinase*

Proteinkinase, produced by the seminal vesicles[50], is responsible for the coagulation of sperm after ejaculation. If a severe secretory dysfunction of the seminal vesicles due to chronic bacterial prostatitis leads to a disturbance of sperm coagulation has not been reported yet.

*L-Carnitine-Glycerophosphorylcholine-α-Glucosidase*

Data on the level of free L-carnitine, an epididymal marker in human semen, are contradictory and unclear particularly as they relate to fertility. Infertile men have been found to have significantly lower seminal L-carnitine levels compared with fertile men[51].

Cooper et al. measured α-glucosidase, glycerophosphorylcholine, and L-carnitine in sperm-free seminal samples to detemine whether these substances would reflect the epididymal function of men attending an infertility clinic. The putative markers correlated well with each other. Glucosidase was considered the best index of epididymal function[52]. Decreased secretion of α-glucosidase, glycerophosphorylcholine, or L-carnitine in patients with chronic bacterial prostatitis may disturb epididymis to carry out its functions of sperm transport, spem maturation, and sperm storage, because these processes are influenced by the fluids and secretions within the epididymal lumen, with a harmful effect on the fertility of the patients.

*Other*

Portnoy suggested that the presence of an infection in the genital tract, prostate or seminal vesicles can increase the viscosity of the seminal fluid, which has a deleterious influence on motility[53].

A suggestion of a decrease in prostatic function or of the seminal vesicles due to infection is an alkaline pH ($>7.8$) or an acid pH ($<7.2$) respectively.

A decreased secretion of the seminal vesicles due to inflammation will lead to a decreased volume of ejaculate.

Thus, an increased viscosity or a decreased volume of the seminal plasma due to infection of the male accessory genital glands disturbing the optimum sperm motility or the ideal sperm concentration and normal sperm metabolism respectively may reduce the fertility potential of these patients.

Taking into consideration that chronic bacterial prostatitis reduces the secretion of some substances (by the male accessory genital glands; Table 1) which provide the ideal conditions for fertilization, we suggest that the secretory dysfunction of the prostate, seminal vesicles, and epididymis is the connective link between chronic bacterial prostatitis and subfertility.

## Treatment of chronic bacterial or nonbacterial prostatitis; effect on male infertility

1. Antimicrobial Substances

A patient with infertility in the presence of semen leucocytosis and oligoasthenozoospermia should be evaluated for underlying chronic prostatitis. Should it be diagnosed long-term treatment with the appropriate antimicrobial agent will not only improve or cure the chronic prostatitis but will subsequently improve or cure the infertility[54]. Doxocycline and cotrimoxazole have long been used in treating prostatic infection. However, in double-blind prospective studies no beneficial effect was detected with either doxycycline or erythromycin[55,56].

Recently, the new antimicrobials pefloxacin or norfloxacin have been administered for treating chronic prostatitis. Double-blind studies have demonstrated efficacy[2]. Considering that pefloxacin and norfloxacin are excreted by the prostate and seminal vesicles of patients with chronic inflammation of those glands[2], we suggest that these substances may be suitable for treating prostatovesiculitis.

2. Ultra-High Frequency Electric Field

Bogolybov et al. proposed[57] a new method for treating patients with chronic prostatitis and sterility by means of an ultra-high frequency electric field (60W) applied bitemporally. During treatment, 82% of the patients showed an increase in the number of spermatozoa per ml of ejaculate. The percentage of motile and morphologically normal spermatozoa increased. Patients with chronic prostatitis and infertility showed in their prostatic secretions before treatment, a predominance of B-lymphocytes over T-lymphocytes. Following treatment, the number of T-lymphocytes in the prostatic secretions increased and the content of B-lymphocytes decreased. A pregnancy rate of 50/67 was reported in the wives of the patienst, 6 months after beginning the treatment.

3. Transurethral Drainage of the Seminal Tract for Obstruction, Infection and Infertility

Weintraub[58] described transurethral drainage of the seminal tract with encouraging results. He suggested that this clinical problem should receive more attention by urologists.

4. Epididymovasostomy for Epididymal Obstruction

Postinflammatory obstructive lesions, specially epididymal obstruction, is likely to cause azoospermia in a man whose testicular biopsy demonstrates normal spermatogenesis, who has seminal fluid that yields positive results when tested for fructose and in whom vasographic examination is normal.

Microscopic anastomosis of the vas deferens to a single epididymal tube is the ideal procedure[59].

The improvement of male subfertility after conservative or surgical treatment of the complications of prostatic infections confirms a cause and effect relationship between chronic bacterial prostatitis and male subfertility.

## References

1) Mc-Clure, R. D.: Male infertility. In Smith's General Urology, Edited by E. A. Tanagho and J. W. McAninch, Lange, 637, 1988

2) Comhaire, F. H., Vermeulen, L., Verschraegen, G. and Claeys, G.: Bacteriology and leukospermia: Diagnosis of male accessory gland infection. In Human Spermatozoa in Assisted Reproduction, Edited by A. A. Acosta, R. J. Swanson, S. B. Ackerman, T. F. Kruger, J. A. van Zyl and R. Menkveld, Williams and Wilkins,

90, 1990
3) Meares, E. M. Jr.: Prostatitis and related disorders. In Campbell's General Urology, Edited by P. C. Walsh, R. F. Gittes, A. D. Perlmutter and T. A. Stamey, W. B. Saunders Company, 868, 1986
4) Meares, E. M. Jr.: Bacterial prostatitis versus prostatosis: A clinical and bacteriological study, Jama, 224: 1372, 1973
5) Stamey, T. A.: Prostatitis, J. R. Soc. Med., 74: 22, 1981
6) Weidner, W., Brunner, H. and Krause, W.: Quantitative culture of ureaplasma urealyticum in patients with chronic prostatitis or prostatosis, J. Urol., 124: 622, 1980
7) Nikkanen, V., Terho, P. and Meverman, O.: The significance of chlamydial genital infection in male infertility, Arch. Androl., 4: 57, 1980
8) Bruce, A. W., Chadwick, P., Willett, W. S. and O'Shaughnessy, M.: The role of chlamydiae in genitourinary disease, J. Urol., 126: 625, 1981
9) Bennett, A. H., Hipp, S. S. and Alford, L. M.: Pyosemia and carriage of chlamydia and ureaplasma in infertile men, J. Urol., 128: 54, 1982
10) Witkin, S. S. and Tuth, A.: Relationship between genital tract infections, spem antibodies in seminal fluid and infertility, Fertil. Steril., 40: 805, 1983
11) Brunner, H., Weidner, W. and Schiefer, H. G.: Studies of the role of ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in prostatitis, J. Infect. Dis., 147: 807, 1983
12) Busolo, F., Zanchetta, R., Lanzone, E. and Cusinato, R.: Microbial flora in semen of asymptomatic infertile men, Andrologia, 16: 269, 1984
13) Rehewy, M. S. E., Hafez, E. S. E., Thomas, A. and Brown, W. J.: Aerobic and anaerobic bacterial flora in semen from fertile and infertile groups of men, Arch. Androl., 2: 263, 1979
14) Lewis, R. W., Harrison, R. M. and Domingue, G. J.: Culture of seminal fluid in a fertility clinic, Fertil. Steril., 35: 194, 1981
15) Weidner, W., Krause, W., Schiefer, H. G., Brunner, H. and Friedrich, H. J.: Ureaplasma infections of the male urogenital tract, in particular prostatitis, and semen quality, Urol. Int., 40: 5, 1985
16) Comhaire, F., Verschraegen G. and Vermeulen, L.: Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility, Int. J. Androl., 3: 32, 1980
17) Meares, E. M. Jr.: Prostatic syndromes: New perspectives about old woes, J. Urol., 123: 141, 1980
18) Fowler, J. E. Jr.: Infections of the male reproductive tract and infertility: A selected review, J. Androl., 3: 121, 1981
19) Homonnai, Z. T., Matzkin, H., Fainman, N., Paz, G., Kraicer, P. F.: The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality, Fertil. Steril., 29: 539, 1978
20) Caldamone, A. A., Emilson, L. B. V., Al-Juburi, A., Cockett, A. T. K.: Prostatitis: Prostatic secretory dysfunction affecting fertility, Fertil. Steril., 34: 602, 1980
21) Beach, E. W.: Genital manifestation in early filariasis, J. Urol., 59: 371, 1948
22) Harrison, R. G.: The effect of ligation of the vasa efferentia on the rat testis, Proc. Soc. Stud. Fertil., 5: 95, 1953
23) Megory, E., Zuckerman, H., Shoham (Schwartz), Z. and Lunenfeld, B.: Infections and male infertility, Obstet. Gynecol. Surv., 42: 283, 1987
24) Omer, E. F.: Inflammatory conditions and semen quality among subfertile Sudanese males, Trop. Doct., 15: 27, 1985
25) Busolo, F., Zanchetta, R. and Bertoloni, G.: Mycoplasmic localization pattetns on spermatozoa from infertile men, Fertil. Steril., 42: 412, 1984
26) Naessens, A., Foulon. W., Debrucker, P., Devroey, P. and Lauwers, S.: Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation, Fertil. Steril., 45: 101, 1986
27) Grossgebauer, K. and Henning, A.: Ureaplasma-infected human sperm in inferile men, Arch. Androl., 12: 35, 1984
28) Busolo, F. and Zanchetta, R.: The effect of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum on Hamster egg in vitro penetration by human spermatozoa, Fertil. Steril., 43: 110, 1985
29) Torino, G., Bizzaro, A., Castello, G., Daponte, A., Fontana, A., De Bellis, A. and Amoresano-Paglioniko, V.: Cytomegalovirus and male infertility, Ann. Biol. Clin., 45: 440, 1987
30) Swenson, C. E., Toth, A., Toth, C., Wolfgruber, L., O'Leary, W. M.: Asymptomatic bacteriospermia in infertile men, Andrologia, 12: 7, 1980
31) Mann, T. and Mann, C. L.: Male Reproductive Function and Semen, 171, New York, Springer & Verlag, 1981
32) Ponchietti, R., Raugei, A., Lanciotti, E., Ademollo, B., Galvan, P. and Poggini, G.: Calcium, zinc, magnesium, concentration in seminal plasma of infertile men with prostatitis, Acta Eur. Fertil., 15: 283, 1984
33) Fair, W. R. and Parrish, R. T.: Antibacterial

substance in prostatic fluid. In Prostatic Cell: Structure and Function, Part A, Edited by G. P. Murphy, A. A. Sandberg, and J. P. Karr, New York, Alan R. Liss, 247, 1981
34) Fair, W. R. and Wehner, N.: The prostatic antibacterial factor: Identity and significance. In Prostatic disease, Edited by H. Marberger, 6, 383, New York, Alan R. Liss, 1976
35) Meares, E. M. Jr.: Prostatitis: A review, Urol. Clin. North Am., 2: 3, 1975
36) Tisell, L. E. and Leissner, K. H.: Prostatic weight and zinc concentration. In New Approaches to the Study of Benign Prostatic Hyperplasia, Edited by F. A. Kimball, A. E. Buehl and D. P. Carter, New York, Alan R. Liss, 333, 1984
37) Canale, D., Bartelloni, M., Negroni, A., Meschini, P., Izzo, P. L., Bianchi, B. and Menchini-Fabris, G. F.: Zinc in human semen, Int. J. Androl., 9: 477, 1986
38) Pandy, V. K., Parmeshwaran, M., Soman, S. D. and Dacosta, J. C.: Concentrations of morphologically normal, motile spermatozoa: Mg, Ca and Zn in the semen of infertile men, Total Environ., 27: 49, 1983
39) Kvist, U., Kjellberg, S., Bjorndahl, L., Hammar, M. and Roomans G. M.: Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertile men and men in barren unions, Scand. J. Urol. Nephrol., 22: 1, 1988
40) Kvist, U., Bjorndahl, L. and Kjellberg, S.: Sperm unclear zinc, chromatin stability, and male fertility, Scanning Microsc., 1: 1241, 1987
41) Fair, W. R., Couch, J. and Wehner, N.: The purification and assay of the prostatic antibacterial factor (PAF), Biochem, Med., 8: 329, 1973
42) Kutchner, W. and Wolberg, H.: Prostatophosphatase, Z. Physiol. Chem., 236: 237, 1935
43) Girgis, S. M., Deinasury, M. K., El-Kodary, M., Metawy, B., Moussa, M. M., Momen, N. and Saleh, S. M.: Diagnostic value of determination of acid and alkaline phosphatase levels in the seminal plasma of infertile males, Andrologia, 13: 330, 1981
44) Ronberg, L., Vihko, P., Sajanti, E. and Vihko, R.: Clomiphene citrate administration to normogonadotropic subfertile men: Blood hormone changes and activation of acid phosphatase in seminal fluid, Int. J. Androl., 4: 372, 1981
45) Schaffner, C. P.: Effects of cholesterol-lowering agents, In Benign Prostatic Hypertrophy, Edited by F. Hinman, Jr., New York, Springer & Verlag, 280, 1983
46) Mann, T.: Biochemical appraisal of human semen, In Fertility Disturbances in Men and Women, Edited by C. A. Joel, Basel Karger, 146, 1971
47) Zaneveld, L. J. D. and Chatterton, R. T.: Biochemistry of Mammalian Reproduction, 65, New York, John Wiley & Sons, 1982
48) Eliasson, R.: studies on prostaglandins. Occurrence, formation, and biological actions, Acta Physiol. Scand., 158: 1, 1959
49) Okamura, N., Tajima, Y., Ishikawa, H., Yoshi, S., Koiso, K. and Sugita, Y.: Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients, Fertil. Steril., 45: 265, 1986
50) Mandal, A. and Bhattacharyya, A. K.: Studies on the coagulational characteristics of human ejaculates, Andrologia, 17: 80, 1985
51) Soufir, J. C., Ducot, D., Marson, J., Jouannet, P., Feneux, D., Soumah, A. and Spira, A.: Levels of seminal free L (-) carnitine in fertile and infertile men, Int. J. Androl., 7: 188, 1984
52) Cooper, T. G., Yeung, C. H., Nashan, D. and Nieschlag, E.: Epididymal markers in human infertility, J. Androl., 9: 91, 1988
53) Portnoy, L.: The diagnosis and prognosis of male infertility: a study of 44 cases with special reference to sperm morphology, J. Urol., 48: 735, 1946
54) Giamarellou, H., Tympanidis, K., Bitos, N. A., Leonidas, E. and Daikos, G. K.: Infertility and chronic prostatitis, Andrologia, 16: 417, 1984
55) Comhaire, F. H., Rowe, P. J., 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
56) Baker H. W. G., Staffon, W. G. E., Mc-Gowan, M. P., Burger, H. C., 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
57) Bogolyubov, V. M., Karpukhin, I. V., Bobkova, A. S., Pazuvayev, A. V. and Kozhinova, E. Y.: Dynamics of spermatogenesis, hormonal and immune response of patients suffering from chronic prostatitis and sterility under bitemporal treatment with an ultra-high frequency electric field, Int. Urol. Nephrol., 18: 89, 1986
58) Weintraub, C. M.: Transurethral drainage of the seminal tract for obstruction, infection and infertility, Br. J. Urol., 52: 220, 1980
59) Silber, S. J.: Microscopic vasoepididymostomy: specific microanastomosis to the epididymal tubule, Fertil. Steril., 30: 565, 1978

# 前立腺感染症による男性生殖付属腺の分泌能低下が妊孕性に及ぼす影響

ニコラオス・ソフィキティス　宮川征男

鳥取大学医学部泌尿器科学教室
(主任：宮川征男)

慢性細菌性，あるいは非細菌性前立腺炎に合併して生じる妊孕性低下，又は不妊の原因としては，前立腺，精嚢腺，副睾丸の分泌能低下，分泌経路の狭窄ないし閉塞，睾丸萎縮，精液の細菌性障害，精子減少や運動性の低下，zona pellucida への精子侵入阻害，抗精子抗体の出現，細胞性免疫系の変化が考えられる．以上の点に関し検討し，男性生殖付属腺の分泌能低下による妊孕障害性を明らかにした．

(受付：1990年11月1日)

# 地方部会講演抄録

## 平成2年度日本不妊学会東北支部・学術講演会

日　　時：平成2年10月27日（土）
場　　所：弘前市医師会館

### 1．日本シカの電気射精反応における年間の変化

○大谷　健・銭　暁喬・島崎琢也
汲田　健・正木淳二
（東北大農学部）
武田武雄・池田昭七・中馬亮一
（宮城農短大）
鹿股幸喜（仙台市八木山動物園）

目的：電気射精法による精液採取は，野生動物の人工繁殖に欠かせない方法として期待されているが，家畜と比べて詳細な報告が少なく，実施に当たって困難を伴うことが多い．本研究は，ヤギと近縁な反すう動物である日本シカについて，ヤギとほぼ同じ条件の電気射精を試み，反応の年間変化を調べた．
方法：日本シカ成熟雄1頭，性成熟期前後の雄3頭を供試した．繁殖季節中は隔週1回，非繁殖季節中は月1～2回の間隔で電気射精法（3～15 Vの通電）による精液採取を試みた．
結果：8月から翌年2月までは精液が採取可能であったが，3月から7月までは射出物中にほとんど精子はみられなかった．また，ヤギと異なり通電によって排尿を起こしやすく，精液性状を不良にすることが多かった．1989年秋～冬期の精液性状は，精液量100～600$\mu$l，精子濃度13～31×$10^8$/ml，pH6.8，奇形率10％であった．

### 2．ウサギ精巣精子の受精能の検討

○矢沢浩之・柳田　薫・片寄治男
藤森　淑・佐々木宏子・星　和彦
佐藤　章　　（福島県立医大産婦）

精巣精子は運動性が獲得されていない未成熟精子であるため，一般的には受精能力がないとされている．今回我々は，ウサギ精巣精子核をMicroinjectionによって卵子内に注入することで，その運動性を補えば受精が可能であるかどうかを検討した．まず，雄ウサギから精巣精子を得，homogenizationにて精巣精子核を尾部より分離し，次に，雌ウサギに過排卵処理を行ない，卵管より未受精卵を回収した．これらの卵子に精巣精子核を1個ずつcytoplasmic injectionを行なった．injection後の卵子は24時間培養し，卵子を観察後，2細胞以上の受精卵を雌ウサギの卵管内に移植した．
結果：65個の卵子のうち変性を起こした卵は6個であり，生存率は90.8％であった．24時間の培養後，2細胞以上の初期胚は19個，29.2％であった．以上より，精巣精子核のMicroinjectionによって，初期胚発生が認められ，未熟精子である精巣精子にも受精能力があることが示唆された．

### 3．去勢または潜伏精巣の雄ラット血中および精巣中IGF-1値の変化について

○三輪明美・石井伸一・梅津元昭
正木淳二　　（東北大農学部）

インシュリン様成長因子（IGF-1）は，性腺中にも存在し，雌では顆粒層細胞，雄ではセルトリ細胞で産生される．先に演者らは，雄ラットの精巣中IGF-1含量が血中IGF-1濃度と同様，性成熟過程に増加することを報告した．今回は，去勢または潜伏精巣手術を施し，その後の血中および精巣中IGF-1値の変化を調べた．
方法：供試動物にはウィスター・今道系の8週齢時の雄ラットを用い，①両側または片側去勢，②両側または片側の潜伏精巣手術を行ない，③偽手術のものを対照とした．術後2週時に採血し，精巣および精嚢腺重量を測定した．血清および精巣中のIGF-1は，酸エタノール法で抽出し，RIAにより測定した．
結果：血中IGF-1濃度には①，②とも変化がみられなかった．精巣中IGF-1含量は去勢後も変化がみられなかったが，潜伏精巣手術を施した精巣では，精巣単位重量当りのIGF-1含量が増加した．
以上の結果から，血中IGF-1濃度に性腺は関与していないことが明らかとなった．また，精巣中のIGF-1産生は腹腔内温度により影響を受けることが示唆された．

**4．性成熟過程の雌ラットの血中および卵巣中インヒビン含量の変化について**

○石井伸一・三輪明美・菅原誠太郎
藤村達也・梅津元昭・正木淳二
（東北大農学部）

インヒビン（INH）は下垂体に作用し，FSHの合成，分泌を抑制する性腺由来のペプチドホルモンである．これまでに演者らは，雌ラットでは性成熟過程に伴い，INHに対する下垂体の感受性が増加することを報告した．今回はheterologousなRIAを用い，性成熟過程の雌ラットの血中および卵巣中INH含量の変化について調べたので報告する．

方法：出生率5，10，15，20，25日齢のウィスター今道系雌ラットより，血清および卵巣を得た．INH-RIAは，牛INHに対する抗体と，31kDa牛INHの標識抗原を用い，PMSG処理した雌ラット卵巣抽出液をスタンダードに用い行なった．

結果：血中および下垂体中FSH含量は，15日齢まで増加し，その後，減少した．血中INH濃度は5日齢から徐々に増加し，20日齢以降は急激に増加した．卵巣中INH含量は20日齢までは増加せず，その後，卵巣重量の増加と一致した増加が見られた．

以上より性成熟過程のFSH分泌調節にINHが関与していることが示された．

**5．ダナゾール投与後の子宮筋腫および子宮筋層内ER・PR染色率の比較**

○立崎　達夫・鍵谷昭文・越前谷成広
新野隆宏・斎藤良治　（弘前大産婦）
藤井俊策　（青森労災病院産婦）

ダナゾールによる子宮筋腫縮小のメカニズムを組織内ステロイド受容体（ER・PR）との関連から検討した．

性成熟期婦人の子宮筋腫手術症例で，卵胞期・ダナゾール非投与の5例と術前14日より術当日までダナゾール400mg投与を受けた5例を対象とした．ER-ICA，PR-ICAキットを用いて検討した．

ER陽性率：ダナゾール非投与例正常筋層58.0±17.2％，筋腫結節65.2±16.9％，ダナゾール投与例正常筋層7.8±6.2％，筋腫結節9.7±6.2％であった．PR陽性率：ダナゾール非投与例正常筋層64.7±16.2％，筋腫結節76.4±11.8％，ダナゾール投与例正常筋層31.3±6.8％，筋腫結節32.4±12.5％であった．

以上のことより，ダナゾールは子宮筋組胞のERおよびPRをともに減少させ，とくにERを減少させることで，子宮筋腫結節の縮小効果と関連することが示唆された．

**6．哺乳動物精子核の雄性前核形成における安定性**

○栁田　薫・矢沢浩之・星　和彦
佐藤　章　（福島県立医大産婦）
柳町隆造
（ハワイ大学解剖・生殖生物学）

精子核を配偶子として保存する場合の基礎研究として，その雄性前核形成能が置かれる環境から受ける影響と，精子核の安定性を支えている構造について，まず熱を加えて調べた．用いた動物種はハムスター・マウス・ヒトそしてテラピア・ニワトリで，これらの精子からsonicationによって精子核を分離し，熱処理を加えた精子核の1個をハムスター未受精卵内にmicroinjectionを行ない，5時間の培養の後に精子核の雄性前核形成能を調べた．ハムスター精巣上体尾部精子で90℃，30分加熱した時の雄性前核形成率は95％で，100℃，30分間では18％であった．マウスの精巣上体尾部精子とヒト射出精子でも同じ結果であった．テラピアの精巣精子・ルースターの精管精子，ハムスターとマウスの精巣精子ではいずも90℃，30分間の加熱では雄性前核形成が強く障害され0％であった．以上から精子核中のDNA-protamine complex内のSS結合が少ない精子では熱に対する安定性が無いことが分った．

**7．偽妊娠ラット脱落膜培養細胞とラット初期胚の接着**

○大井嗣和・永沼孝子・陳　偉業
吉田仁秋・角田千恵子・戸沢秀夫
村上　節・対木　章・深谷孝夫
矢島　聰　（東北大産婦）

目的：偽妊娠ラットに脱落膜を形成し，その培養細胞と同系ラット胚を共培養することにより，in-vitro着床モデルを作成，着床の機序の一端を解明することを目的とした．

結果：①脱落膜形成4日目の培養細胞が最もconfluentな状態になったが，progesterone receptorの推移との間に関連がみられた．②培養細胞は，電顕的に脱落膜間質細胞由来であることが確認された．③blastocystをこの培養細胞に静置すると，hatching途上の時期に60％が間質細胞由来と思われる培養細胞に接着した．④培養細胞と共培養したmorula中74％がblastocystに，さらに26％がhatched blastocystに発育した．

結論：初期胚の内膜への接着は，胚と腺上皮細胞の

相互作用と考えられているが，blastocyst 自身の直接作用と思われる培養細胞への接着を確認した．また胚の発育に関して促進的影響を及ぼす，この in-vitro 着床モデルは，今後，妊卵着床機序を解明するのに有用と思われる．

### 8．男子不妊症の臨床統計学的観察(1984～1989)

○高橋　勝・前原郁夫・佐藤和宏
佐藤滋彰・蓮田精之・平松正義
折笠精一　　(東北大泌尿器)

当科における最近6年間の男子不妊症の臨床統計を行なった．不妊患者数は1055名で，男子新患数の14.3％を占めていた．初診時齢は24～49歳，平均32.3歳，不妊期間は6～240カ月，平均4年6カ月で，結婚後5年以内に70％以上が受診した．問診はその他，鼠径ヘルニア，小児熱性疾患，外傷等の既往歴，配偶者の年齢および産婦人科的異常の有無等につき行なった．理学的所見で精索静脈瘤が認められたものは196名であった．精液検査は精液量，運動率，奇形数，精子濃度，運動能(SMEI)，pH，赤血球数，白血球数の測定を行なったが，無精子症を呈していたものは137名で，LH，FSHともに上昇していた．精液中白血球数が1視野に10個以上認めたものは61名で，精子運動性の低下が認められた．内分泌学的検査，SVG，病理組織学的検査，染色体検査は必要に応じて行なった．

### 9．当科における精索静脈瘤の手術成績

○菅谷公男・小浜丈夫・西沢　理
能登宏光・佐藤一成・若山由紀子
土田正義　　(秋田大泌尿器)

当科開設以来18年間に精索静脈瘤で手術を行なった17例について検討した．不妊を主訴としたのは9例で，婦人科からの紹介はそのうち8例あり，1988～1989年の受診であった．不妊以外で受診した8例の主訴は下腹部痛や陰嚢部腫瘤であった．患側は1例が両側で16例が左側であった．術式は1974年までの4例は低位結紮で，1980年以後の13例は高位結紮であった．術前後に精液検査を行なえたのは11例で，精子濃度の改善が5例，活動率の改善が4例であったが，術前の精液所見が劣っている例で改善する例が多かった．不妊の9例中8例で追跡調査ができ，5例が妊娠したが，自然妊娠が2例，AIHが2例，体外受精が1例であった．以上から，精索静脈瘤高位結紮術は不妊症の有効な治療法と考えられたが，本症の発見と治療には婦人科の協力が必要であった．

### 10．凍結保存精子の受精機能—HOS test を中心にして—

○吉田仁秋・深谷孝夫・陳　偉業
村上　節・萬代泰男・戸沢秀夫
角田千恵子・大井嗣和・対木　章
矢島　聰　　(東北大産婦)

精子の凍結融解後の受精機能に関しては，今日まで充分な評価がされていない．今回我々は，凍結融解前後の精子機能を HOS test 法を中心にして評価し，凍結保存による受精能を検討した．採取された精液は一般精液検査後，半量を用いて HOS test を施行し，残量は凍結保存用とした．凍結保存は KS-II 液を使用し，program freezer により凍結後，液体窒素中に保存した．全ての精液は融解後蘇生率を算出し，凍結前と同様に HOS test により精子機能を評価した．なお，対象は精子濃度によりA)$20\times10/^{6}$ml 未満，B) $20-40\times10^{6}$/ml，C) $40\times10^{6}$/ml 以上の3群に分類した．G type 膨化率は凍結後でも運動率と相関を示すが，総膨化率では相関を示さなかった．更にA)群では凍結により機能面での脆弱性が増し，受精能の低下が示唆された．従って乏精子症では凍結融解の臨床応用が困難であることが示唆され，正常者では，臨床応用が充分可能であることが，本研究より明らかとなった．

### 11．顆粒膜細胞群，頚管粘液のヒト精子 acrosome reaction に及ぼす影響

○菅野孝子・吉松宣弘・矢沢浩之
佐々木宏子・栁田　薫・星　和彦
佐藤　章　　(福島医大産婦)

目的：ヒト精子の spontaneous acrosome reaction と zona induced acrosome reaction を検討し，顆粒膜細胞群，頚管粘液のヒト精子 acrosome reaction 誘起作用について検討した．

方法：ヒト salt-stored egg と精子を授精させ，3時間後に卵子のみを取り出し，さらに3時間培養後，透明帯付着精子をはずして，FITC labelled PSA を用いて染色し acrosome の状態を観察した．頚管粘液および顆粒膜細胞群通過精子を用い同様に観察した．

結果：Spontaneous acrosome reaction に比べ，zona induced acrosome reaction は，有意に高率に誘起された．コントロールに比べ顆粒膜細胞群通過精子の zona induced acrosome reaction は差がなかったのに対し，頚管粘液通過精子は有意の差を認めた．

結論：ヒト精子の zona induced acrosome reaction

を確認した．精子に対し顆粒膜細胞群は影響を及ぼさなかったが，頚管粘液は精子の capacitation 促進作用をもつと考えられた．

### 12．X線連続回転立体撮影法による HSG

○藤井俊策・西村幸也・片桐清一
（青森労災病院産婦）

不妊症診断における HSG は，スクリーニング検査としての役割は大きいが，腹腔鏡診断との不一致がしばしば認められ，診断的限界が指摘されている．今回我々は，脳神経外科領域で頭部の血管造影検査に対して行なわれている回転立体撮影法を，HSG に応用した．

X線管球を側面から正面を経て対側側面まで回転して撮影し，X線 TV から送られた画像信号を光ディスクに，動画像をビデオテープに記録した．診断はこれらを再生して行ない，さらにシネフィルム立体投影機を用いて立体視下で検討を加えた．

単純写真と同等の画質で立体的に対象を把握でき，得られる情報量がはるかに多く，高圧撮影であるため被曝量が少ない，などの利点があるが，特殊な撮影装置が必要であるため，一般化するのは困難かも知れない．今後，症例を重ねて，どの程度詳細な読影が可能なのか，単純写真に対するアドバンテージを検討したい．

### 13．不妊外来における異常な HSG 所見について

○越前屋成広・立崎達夫・新野隆宏
鍵谷昭文・斎藤良治（弘前大産婦）
藤井俊策　（青森労災病院）

最近卵管卵巣周囲癒着ならびに骨盤内子宮内膜症にラパロスコープの有用性が強調されている．しかし，HSG は非観血的検査法で容易であり，迅速に結果が得られる．不妊症診断においては，不可欠な検査法である．

今回我々は，過去2年間における当科で行なった HSG 撮影179例を検討したので報告した．卵管像では，両側または片側卵管に特記すべきことなし84例(48.6％)，卵管挙上像38例（22.3％），卵管延長像7例（4.0％），PFA および PTA16例（9.1％），HYD13例(7.4％)，ITA12例(6.9％)，子宮卵管角部の閉塞3例(1.7％)であった．また子宮腔像では，辺縁不整7例（3.9％），内腔拡大8例（4.5％），双角子宮2例（1.1％）であった．

膀胱充満は判読を誤らせる可能性があるので，必ず排尿直後に撮影することが，必要であることを症例で示した．

### 14．当科における卵巣過剰刺激症候群について（経腹的超音波下卵胞穿刺の有効性）

○古橋信之・高山和人・河野秀昭
土屋あさ子・渡辺英子
（太田綜合病院・太田西ノ内病院産婦）
深谷孝夫・田村みどり
（東北大産婦）

1985年より1990年の6年間に入院を要した卵巣過剰刺激症候群31症例，32周期を経験した．WHO の分類では，GARDE-1 が4例，GARDE-2 が21例，GRADE-3 が7例であった．全体では12例に，GRADE-3 では7例中5例に妊娠を認めた．刺激方法では，HMG-HCG が29例で，HMG 使用の目的としては，IVF，GIFT が13例，排卵誘発が13例等であった．32周期中27周期においては，輸液療法等の保存的療法にて改善を認めたが，GRADE-3 の5例に対しては，経腹的超音波下卵胞穿刺，腹水穿刺を施行した．経腹的超音波下卵胞穿刺においては1－3回(160－900ml)，腹水穿刺では1－4回（600－3000ml）の施行で，4例において術後2－3日で症状の改善を認めた．

穿刺卵胞液の性状では，生化学的検査(osm，TP etc)において血液，腹水と差を認めなかったが steroiod hormone（E-2，P-4）濃度において著明な差を認めた．十分な補液下であれば経腹的超音波下卵胞穿刺，腹水穿刺は安全であり，有効な方法と考えられる．

### 15．一過性の失語を呈した卵巣過剰刺激症候群（OHSS）の1症例

○戸沢秀夫・陳　偉業・村上　節
C.マンスフィールド・角田千恵子
吉田仁秋・大井嗣和・対木　章
深谷孝夫・矢島　聰
（東北大産婦）

一過性の失語症を呈した OHSS の1症例を経験したので報告する．症例は35歳の不妊症患者で，ブセレリン併用下に HMG150 IU を7日間投与し，首席卵胞径23×20mm で HCG10,000IU を投与して GIFT を施行した．退院後より腹部膨満・嘔吐・下痢・乏尿が出現，GIFT 後6日目にショック状態で外来受診した．超音波で両側卵巣の腫大と腹水を認め OHSS の診断で入院となった．補液などの治療により全身状態は次第に改善したが，入院翌日より発語と言語の理解が困難となり，この状態は数日を経て徐々に改善に向かった．脳神経内科の MRI 検査で左中大脳動脈域に病変が認められたが，その1か月後の脳血

管造影では異常を認めず，この間に失語症はほぼ回復した．血栓により一過性の虚血を生じ脳梗塞を起こしたものと思われる．重症のOHSSでは血液濃縮や高エストロゲンによる血液凝固系の亢進により血栓を生じることがあり，死亡例も報告されている．排卵誘発に際してより慎重な管理が必要と思われた．

### 16. 両側卵巣チョコレート嚢腫と診断され，異なる臨床経過をたどっている姉妹症例

○渡辺清彦・高梨子篤浩
（福島県立会津総合病院産婦）
月川　奏・星　和彦
（福島医大産婦）

26歳と21歳の姉妹に，両側卵巣チョコレート嚢腫を認め，異なった経過をたどっている症例を経験した．

姉は17歳時に左卵巣チョコレート嚢腫の摘出術を受け，このとき既にSLEの治療を受けていた．さらに平成元年，右卵巣にもチョコレート嚢腫を認め，同年11月よりダナゾール療法を開始，同年11月，腹腔鏡下にエタノール療法を施行した．その後11月よりGn-RH analog療法を開始したが，月経のコントロールがつかず過多月経となり，平成2年7月より再度ダナゾール療法を開始している．

妹は平成2年5月両側卵巣チョコレート嚢腫を認め，6月に両側卵巣嚢腫核出術を施した．7月より現在まで子宮内膜症に対してGn-RH analog療法を施し，$CA_{125}$が47U/ml ⇨ 26U/mlと検査値においても良好な経過をたどっている．

この姉妹症例においてSLE合併時の子宮内膜症治療法（ダナゾール療法，エタノール療法，Gn-RH analog療法），妊孕能等に対する考察を加え報告する．

### 17. 腹腔鏡にて確認した子宮内膜症の妊娠例について

○本多廣行・倉本雅規・原谷博信
小菅周一・土岐利彦・中山千冬
中野盛夫　（八戸市民病院産婦）

子宮内膜症は不妊症の原因となりうるとされるが，その因果関係は必ずしも明らかとなっていない．そこで腹腔鏡により子宮内膜症と診断され，その後妊娠が成立した18名にいて検討した．年齢は23歳から40歳迄，平均29.6歳であり，腹腔鏡をするまでの不妊期間は1年から10年，平均3.1年であった．r-AFS分類による進行期はI期6人，II期4人，III期2人，IV期6人で，妊娠率は，それぞれ，23.3％，25％，25％，45.5％であった．治療ではダナゾールによるものが多く10名であった．腹腔鏡から妊娠までの期間は，3カ月より2年6カ月であた，腹腔鏡のみの妊娠例は5例，平均4.6カ月で妊娠している．ダナゾール使用後の妊娠は2カ月から12カ月で妊娠しており，進行した時期のものほど遅いようであった．LHRHアナログ使用では1例のみ4カ月で妊娠していた．

### 18. 当科における最近2例のswim-up AIH妊娠について

○佐々木裕之・新宅裕子
（十和田市立中央病院産婦）
星合　昊（近畿大産婦）

精液状態不良の男性不妊に対しAIH法が用いられて久しいが，最近当科で2例のswim-up洗浄濃縮法によるAIH（以下swim-up-AIH）妊娠を経験したので報告する．

swim-up-AIHを行なった症例はいずれも7年以上の不妊期間があり，男性側に乏精子症もしくは精子無力症があった症例である．症例1は昭和60～61年まで通水療法に加えて18回のAIHを施行するも妊娠に至らず，昭和62～平成1年までHMG-HCG-AIH（静置法）なども含めて再度7回のAIHを試みるも妊娠に至らなかった例であるが，今回HMG-HCG療法にswim-up-AIHを試み妊娠に成功した．症例2は精液検査で運動率が9～11％と著しく障害されているため，最初からswim-up-AIHを施行して妊娠に成功した．当科で用いているswim-up法は手技も容易で，調整にも時間を要しないことから通常のAIH法と使い分けることにより妊娠率の向上に寄与するものと思われた．

### 19. 体外受精における抗透明帯抗体の意義

○吉岡知巳・児玉英也・加藤充弘
松井俊彦・武田志保・関根和子
真木正博　（秋田大産婦）

体外受精における原因不明の受精障害に，患者血清中の抗透明帯抗体が関与する可能性を検討した．当科で施行した体外受精患者189例の患者血清中の抗透明帯抗体を，ブタ透明帯抗原を用いた受身赤血球凝集反応にてスクリーニングし，8倍希釈血清陽性例を，抗ブタ透明帯抗体陽性とした．陽性患者は8例（4.2％）で，平均年齢31.9歳，平均不妊期間5.9年，卵管因子4例，男性因子1例，内膜症2例，原因不明1例，付属器手術の既往のあるものが4例であった．陽性患者は全例に受精が成立しており，6例で妊娠が成立していた．また，陰性患者との間に，

受精率の差はなかった．したがって，臨床的に，抗透明帯抗体が体外受精での受精障害の原因となる可能性は少ないものと考えられた．

**20．体外受精における受精障害の解析**

○児玉英也・加藤充弘・松井俊彦
武田志保・吉岡知巳・関根和子
真木正博 （秋田大産婦）

1988年10月から1990年7月までの体外受精で，304周期の採卵の結果299周期に卵が採取されたが，受精卵が得られた周期はその中の240周期であった．受精が成立しなかった59周期（100％）の原因を解析した．WHOの男性不妊の定義に合致する57例の患者に対して80周期の治療が行なわれたが，36周期(61.0％)には受精が成立せず，20周期は受精は成立したもののその受精率は低率であった．精子不動化抗体陽性者は，今回の検討患者中14例（男性7例，受精7例）存在し，20周期の治療の中で抗精子抗体に起因すると思われる受精不成立周期は7周期存在した(11.9％)．男性因子，免疫因子の含まれない治療周期208周期においても16周期（27.1％）の受精障害周期が存在し，この中には採取された卵子の問題や原因不明の受精障害例が存在するものと考えられた．当科の体外受精の成績も，抗精子抗体のスクリーニングの徹底化，卵胞発育のより厳重なモニタリングにより，成績向上の余地があるものと考えられた．

**21．体外受精時の polyploidy について**

○佐藤文彦・杉内明子・椎名有二
斎藤英和・広井正彦
（山形大産婦）

体外受精（IVF）時に多倍体（polyploidy）がしばしば認められ，移植胚数が減少する．また，polyploidyの存在する状態自体が受精などに影響を与えている可能性がある．

そこで，平成2年1月から7月の間に当科で行なったIVF周期について，polyploidyの割合などを検討した．

この対象期間に201周期のIVFを行ない，採卵卵子1,088個中638個が受精した．polyploidy卵子は採卵数あたり6.25％，受精卵あたり10.7％であった．平均精子濃度はpolyploidy（－）周期のほうが良好であったが，精子運動率はpolyploidy（＋）周期のほうが高率であった．また，総hMG使用量はpolyploidy(＋)周期で有意に増加していた．妊娠率，妊娠継続率ともpolyploidy（－）で高率であった．

IVF時には，精子運動率の良好な症例で，培精精子数を減らし，少量のhMGで良好な卵子の得られる排卵誘発法を検討し，polyploidyを防ぐ必要があるものと思われた．

**22．体外受精—胚移植法における各種卵巣刺激法の検討**

○渋谷守重 （由利組合総合病院）
深谷孝夫・矢嶋 聰（東北大産婦）
鈴木雅洲 （スズキ病院）

目的：体外受精—胚移植における妊娠率向上のため，各種卵巣刺激法を試み，どの方法が効果的かを種々の観点から検討した．

方法：刺激法として，HMG群（HMG法），pure FSH＋HMG群（F/HMG法），Buserelin併用群(B-Gn法)の3つに大別し，さらにB併用群は，HMG群(B-HMG法)，pure FSH＋HMG群(B-F/HMG法)，pure FSH群（B-FSH法）に分類し，各々の臨床成績と採取卵子の成熟度・胚移植率の成績を比較した．

結果：妊娠率の比較では，HMG法で31.5％，全体の平均で25.6％であった．採取卵子の質の比較では，B-Gn法で胚移植率が有意に高く，B-Gn法の中ではB-HMG法で成熟度が高く，胚移植率100％であった．

まとめ：B-HMG法で成熟度の高い卵子が採取され，結果しとてviableな胚が移植可能であり，IVF-ETの卵巣刺激法として，本法がより効果的であることが示唆された．

**23．10回以上の体外受精・胚移植による妊娠成功例**

○槇 真理子・斎藤英和・佐藤文彦
広井正彦 （山形大産婦）

目的：当科の体外受精・胚移植の治療法を10回以上繰り返し妊娠に至った4症例について，治療法の改良点より検討した．

方法：現在，卵巣刺激法はLH-RH a＋hMG＋hCG療法へ，モニターは経腟的超音波による卵胞・子宮内膜計測へ，採卵法は経腟的超音波下採卵法へ，胚移動カテーテルは柔らかいシリコン製へと変更した．

結果：2症例は全10回目に，LH-RHa＋hMG＋hCG療法に変更して1回目と2回目であった．1症例は全15回目に，LH-RHa＋hMG＋hCG療法5回目に，この回のみhMG300単位を月経3日めより使用した．1症例は全14回目に，凍結受精卵の胚移植にて妊娠分娩に至った．

結論：この4症例は当科体外受精・胚移植の開始当時からの症例である．種々な点において改良を施行してきたが，特に卵胞刺激法の改良によりそれぞれの症例にとって妊娠しやすいホルモン環境が作られ妊娠に至ったと考えられる．

### 24．当院における体外受精・胚移植成績—妊娠・分娩および出生児についての検討—

○千田　智・小田原靖・森　滋
飯田修一・鈴木雅洲
（スズキ病院産婦）
立花郁雄・武田信好
（同臨床検査部）

当院で，1990年8月31日までに実施した体外受精・胚移植（IVF・ET）598例（446名）において138件の妊娠を認め57件の分娩を終了し以下の結果を得た．

1）妊娠率は胚移植あたり23.1％，患者あたり30.9％，流産率は30.4％であった．

2）分娩57件（単胎47件，双胎10件）における計67名の出生児において，平均分娩週数38.2±2.2，出生児体重2766±524 g，男女比1.4であり，自然妊娠群（対照群）と比較して差を認めなかった．

3）双胎群において子宮内胎児発育遅延13名，早産3件を認め，平均出生体重も2416±282 gと低く，多胎妊娠は周産期における危険因子のひとつと考えられた．

4）帝切率はIVF群全体で43.9％（双胎群50.0％，単胎群42.6％）と高頻度であった．

以上の結果より，当院のIVF・ETの成績は先進諸国と比較して遜色のないことがわかった．

## 教育シンポジウム　不妊症

### 1．男性不妊症　～妊孕性を高めるために～

星　和彦（福島医大）

不妊症の中で男性因子の占める率は思いの外多く40～50％といわれている．男性不妊の原因は，造精機能障害，輸精路の障害，副性器障害，機能障害の4つに大別されるが，90％が造精機能障害，しかもその70～80％が原因不明の造精機能障害であることが治療を困難なものにしている．

治療法としては根本的に造精機能の改善を目的とするものと妊娠率の向上をめざすものに分類される．前者には観血的方法と非観血的方法があり，われわれが関与できる非観血的療法（薬物療法）としてはホルモン剤・ビタミン剤・漢方製剤が知られている．しかし残念ながらその効果は前述の理由から著しいものとはいえない状況にある．後者すなわち対不妊症対策としては従来からAIHが有名である．AIHは最近では良好精子のみを種々の方法で精液から分離回収して行なう方法が確立され効果があがっている．もちろんIVF-ET，GIFTに代表される最新の生殖医療技術がこの領域に応用され，成果を上げつつあることは言うまでもない．最近では，さらにより高度なテクニックを用いるmicrofertilizationの利用も検討段階にはいっており，倫理的な問題がクリヤーできれば臨床応用も近いと思われ，関心を集めている．

### 2．不妊症と内視鏡—内視鏡の有用性—

福島峰子（秋田大医療技術短大学部）

産婦人科で繁用される内視鏡のなかで，とくに不妊症の診断や治療に有用なものは子宮鏡，腹腔鏡，骨盤腔鏡，卵管鏡である．

それぞれrigidのもの，flexibleのもの，diagnosticまたsurgicalと目的に応じて考案されている．基本的には陰影や画像による方法より直視下に診断出来るので，有用性に富んでいるが，正確度を高めるにはそれなりの訓練を要する．

機能性不妊の約60％に子宮鏡でなんらかの異常所見を認めた．それらの所見と組織検査所見との相関性は高かったが，癒着やポリープの診断は子宮鏡の方が優れていた．腹腔鏡も子宮内膜症の診断には不可欠で，例えば腹腔鏡を実施しなければ臨床診断を下したものの20％に内膜症がなく，不妊症に腹腔鏡を実施しなければ約50％の子宮内膜症を見逃している．

各内視鏡の診断的適応，手術的適応また禁忌などについて解説した．

### 3．無排卵症の病態生理—とくにPCOの病態について—

川越慎之助（山形大産婦）

多嚢胞性卵巣症候群（PCO）はLH，FSH分泌異常，androgen分泌亢進などを特徴とするが，病因については不明である．今回は本症の神経内分泌学的病態について解説した．

(1) Naloxone投与は正常婦人（黄体期）でLHパルスの上昇を起こすが，PCO症例では殆ど影響を受けない．

(2)外因性のopioidsは正常婦人でLH分泌低下を生ずるが，PCO例では抵抗性を示す．

(3) Dopamine infusionの際に，正常例ではLH，PRLの分泌低下を示し，PCOでもほぼ同等の反応を示す

が，一部に過剰反応をみるものがある．
(4) Metoclopramide は PCO 例の LH 分泌に影響を与えないが，PRL 分泌は著明に上昇する．

以上のような所見から，PCO 症においては endogenous opioid 系の機能が減弱し，dopamine 系抑制作用も一部の例で失調していると考えられている．

### 4．排卵誘発の実際—初心者のために—

平野睦男（東北大産婦）

1．排卵障害の程度の把握

既往歴，BBT 測定，内分泌学的検査などにより，まず排卵障害の程度を把握する．

2．ホルモン測定値

とくに最近，LH，FSH および PRL の測定は新標準物質および IRMA 法，EIA 法の導入により，基礎値がかなり低値を示すことを念頭において分析しなければならない．

3．排卵誘発剤の種類

ステロイドホルモン，経口化学物質，性腺刺激ホルモン，および視床下部ホルモンに分類することができる．近年，pure FSH や GnRHa なども臨床応用されるようになった．

4．排卵誘発の実際

原則として，無排卵周期症および第1度無月経には clomiphene citrate 療法，第2度無月経には HMG 療法，高プロラクチン血症には Bromocriptine 療法が用いられ，PCO 症候群には clomiphene citrate 療法のほかに，pure FSH や GnRHa なども用いられるようになった．

## 第90回　九州医師会医学会

## 日本不妊学会九州地方部会

会　　期：平成2年11月25日

### 1．卵管結紮術後の再疎通術の成績

○田栗博紹・石丸忠之・鮫島哲郎
増崎英明・山辺　徹
（長崎大産婦）

卵管のmicrosurgeryは卵管不妊に対する有力な治療手段として用いられており，私どもも数年前より，これを行なってきた。種々の卵管障害の中でmicrosurgeryの最も良い適応は結紮術後の再疎通術reversal of sterilizationである．今回私どもは6例のreversal手術を経験したので，その術後成績ならびに本手術に関連した2～3の事項について述べてみたい．6例の手術時の年齢は30～37歳である．anastomosisを行なった卵管は10本であり，残り2本の卵管のうちの1本はすでに子宮外妊娠で摘出されており，残り1本は炎症による強固な癒着のため，手術不能であった．6例のうち4例に妊娠が成立し，いずれも子宮内妊娠で，すべて生児獲得に成功した．術後から妊娠までの期間は短いもので2カ月，長いもので26カ月であった．妊娠した4例のうちの1例は生児獲得後，子宮内外同時妊娠となった．以上の症例の詳細を報告する．

### 2．チョコレート嚢胞症例に対する嚢胞内容吸引およびアルコール療法の試み

○山元慎一・堂地　勉・森　明人
沖　利通・中村行彦・秋元　保
（鹿児島大産婦）

〔目的〕子宮内膜症チョコレート嚢胞患者に対し，経腟超音波下または腹腔鏡下に穿刺およびアルコール固定療法を施行した．

〔方法〕腹腔鏡にてチョコレート嚢胞と診断した3名および内診その他で診断した4名の計7名を対象とした．穿刺針は23針を用い，嚢胞内内容物を充分吸引した後にアルコールにて固定，固定時間は原則として30分とした．

〔結果〕7例中3例はアルコール療法が可能であったが，4例は穿刺中に腹腔内にleakageが認められたため内容液吸引のみ施行した。特に腹腔鏡下吸引では吸引不十分でアルコール療法は施行できなかった．アルコール療法を施行し得た症例すべてにおいて血中アルコール濃度は測定感度以下であった．アルコール療法後ホルモン療法を併用しているが，現在のところ再発症例は全例認めていない。

〔考察〕チョコレート嚢胞に対し超音波下吸引およびアルコール療法は有用な治療方法になり得ると考えられる．

### 3．不妊婦人における子宮筋腫核出術

○大山和之・福田　宰・鏡　輝雄
（熊本労災病院産婦）

1987年1月から1989年12月までの3年間に，当院にて子宮筋腫の診断のもとに手術した症例は218例で，このうち筋腫核出術をした症例は15例であった．このうち9例が不妊婦人であったが，5例が妊娠し，妊娠率は55.6％であった．今回我々は，この子宮筋腫核出後に妊娠の成立した不妊婦人5例について報告する．

年齢は26歳から32歳で，不妊期間は1年4ヵ月から8年であった．術前の子宮の大きさは手拳大から成人頭大で，核出筋腫結節の大きさは大豆大から新生児頭大で，数は2個から12個であった．術後妊娠までの期間は3ヵ月から13ヵ月で，分娩様式は，胎児仮死の診断にて2例が帝王切開術であったが3例は経腟分娩であった．在胎週数は35週から41週で，35週の症例が低出生体重児であったが順調に発育し，すべて生児を得ることができた．

### 4．腟・子宮・卵管留血症を伴った処女膜閉鎖症の1例

○藤下　晃・町田雅子
（大村市立病院産婦）
増崎英明・石丸忠之・山邊　徹
（長崎大産婦）

症例は15歳，既往歴および家族歴に特記すべきことはない．原発性無月経，下腹部膨満感および周期的下腹痛を主訴に平成2年7月20日当科を初診した．身長164cm，体重49kg，乳房の発育は良好であった．腹部では臍高に達する腫瘤を認め，外性器の視診では処女膜が膨隆し，膜を通して暗赤色の内容が透見された．超音波断層法では子宮および腟内に嚢胞像がみられ，頸管が拡張しており、また右卵管にも嚢胞を認めた．骨盤X線CTでは、骨盤内の大部分を占める嚢胞像および右付属器領域にも嚢胞像を認めた．腟，子宮および右卵管留血症を伴った処女膜閉鎖症と診断し，7月24日全身麻酔下に処女膜切開術を行なった．貯溜した血液は暗褐色を呈し，総量は1,200mlに達した．輪状に切除を追加し，創面を吸収糸で縫合した．術後経過は良好で7月31日退院した．その後8月11日まで性器出血が少量続いた

が，8月31日から月経が発来し，現在外来で経過観察中である．

### 5．多嚢胞卵巣症候群における GnRH アナログ併用ゴナドトロピン療法の有用性について

○田中誠司
（北九州市立門司病院産婦）
野崎雅裕・内海善夫・横山幹文
渡邊良嗣・佐野政敏・中村元一
中野仁雄　（九州大婦産）

嚢胞卵巣症候群（PCOS）では，内因性 LH の過剰分泌のために，hMG 療法施行時に卵巣過剰刺激症候群（OHSS）が起こりやすいことが知られている．この内因性 LH を GnRH アナログ（ブセレリン）を併用することにより抑制し，hMG 療法における OHSS 発生を減少させる試みが近年報告されるようになった．今回，当科不妊外来において hMG 療法を行なった PCOS 症例7例にブセレリンを併用し，OHSS の発生頻度を比較検討したので報告する．

PCOS の診断は，無月経1度のクロミッド無効例で LH/FSH 比2.5以上とし，高プロラクチン血症を伴う症例は除外した．症例は平均年齢 30.4 歳で全て原発性不妊であり，LH/FSH 比は 2.83±0.16（2.60－3.05）であった．hMG 単独療法は7例で 40 周期に，hMG＋ブセレリン併用療法は 35 周期に行なった．排卵率は hMG 単独療法で 80.0％，hMG＋ブセレリン併用療法で 88.6％と有意差はなかった．主席卵胞の平均直径は 18mm 以上の時点で hCG10,000IU を投与したが，hCG 切り替え時の最大卵巣径および主席卵胞の平均径は，hMG 単独療法でそれぞれ 46.5±16.0mm，21.2＋2.7mm，hMG＋ブセレリン併用療法では，それぞれ 44.3±12.8mm，20.9±3.1mm と有意差はなかった．hCG 切り替えまでに要した hMG 量は hMG 単独療法で 1,534±880IU，hMG＋ブセレリン併用療法で 1,360±785IU と有意差はなかった．hCG 切り替え以前に最大卵巣径が 50mm を越えた症例は，腹水の有意に関わらず OHSS 発生例としたが，OHSS 発生頻度は hMG 単独療法で 40 周期中7周期（17.5％），hMG＋ブセレリン併用療法では 35 周期中3周期（8.6％）であり，推計学的に有意差は認められなかった．なお妊娠成立は今回はなかった．

以上より，hMG 療法にブセレリンを併用することは OHSS の発生予防に有意義であるとは考えられる．

### 6．遅発月経をきたしたインスリン抵抗性糖尿病合併多嚢胞性卵巣症候群の1例

○岩尾貴子・横山幹文・黒埼雅裕
中村元一・中野仁雄
（九州大婦産）

インスリン（I）抵抗性糖尿病に合併し，遅発月経をきたした多嚢胞性卵巣症候群（PCO）の1例を経験したので報告する．

症例は 16 歳時，内科で高 I 血症を伴う糖尿病を指摘され，インスリン受容体異常症 type C と診断された．17 歳5カ月で無月経を主訴に当科を受診したが，肥満・多毛・男性化徴候を示し，内分泌学的所見，腹腔鏡所見で典型的な PCO の所見を呈していた．

治療は1年前の内科受診時より食事療法，当科で Kaufmann 療法を行ない，体重は 80kg から 73kg と減少し，血糖値は正常化し，I は 108.0mU/ml から 46.2mU/ml，テストステロンは 2.5ng/ml から 0.9ng/ml と高値ながら減少傾向を示している．PCO の病因・病態として高 I や高アンドロゲン，肥満が重要視されているが，本症例でも，増悪させたと考えられる．また，その発端の1つとしてインスリン受容体の異常の関与が考えられた．

### 7．早発閉経に対する LH-RH アナログ療法とカウフマン療法の効果について

○宇津宮隆史・室　康治・岩里桂太郎
溝口洋一・貞永明美・谷口一郎
肥田木孜　（大分県立病院産婦）

早発閉経 16 例について，LH-RH アナログ（LH-RHa），LH-RHa＋human menopausal gonadotropin (hMG)，Kaufmann 療法＋hMG 療法による卵巣刺激を同一症例に行なってみた．

対象は平均年齢 30.4±1.4 歳（mean＋SE），LH 28.7±6.6，FSH68.5±7.2uIU/nl，Estradiol ($E_2$) 18.5±5.5pg/ml であった．LH-RHa のみでは $E_2$ の上昇は見られず，また LH-RHa＋hMG225IU/day×14days でもみられなかった．更にその後の経過観察期間でも LH，FSH の上昇はみられたが，$E_2$ の上昇はみられなかった．その後 K-療法を3周期行ない，hMG 投与を行なうと，2例に $E_2$ の上昇が見られ1例には BBT の上昇，Progesterone 値の上昇がみられた．ところが，hMG 療法を行なっている途中で早発閉経となった1例は，LH-RHa＋hMG 療法で排卵誘発に成功した．

これらの結果から早発閉経の早期では LH-RHa＋hMG 療法が，また長期無月経では K-療法＋hMG 療法に反応する場合があると考えられた．

### 8．早発卵巣不全における卵の存在の非観血的確認の試み

○楢原久司・河野康志・松井尚彦
廣田佳子・村田博久・宮川勇生
（大分医大産婦）

早発卵巣不全（POF）の診断および治療法を確立することを目的として，患者に卵の存在の非観血的な確認および排卵誘発を試みた．

続発無月経および挙児希望を主訴とし hypergonadotropic hypogonadism を呈する5症例に，月経開始後3日目より4週間 GnRHa（ブレセリン）を900ug/day 投与し，その後投与を中止し4～6週間経過を観察しながら毎週 $E_2$, LH, FSH を測定した．$E_2$上昇が認められた症例には経腟エコー下に卵胞発育を計測し自然排卵を期待した．その後消退出血を惹起し GnRHa 再投与下に HMG-HCG にて排卵誘発を試みた．

GnRHa 投与中，LH, FSH の値は低下したが $E_2$が50pg/ml 以上となったのは5例中1例のみであった．GnRHa 中止後5例中2例に $E_2$上昇が認められた．エコー上卵胞発育も認められたが排卵には至らなかった．GnRHa 下 HMG-HMG にて1例排卵したが，妊娠に至らなかった．

### 9．hMG 刺激を併用した洗浄精子による AIH の治療成績

○池田景子・小山雅子・澄井敬成
詠田由美・吉満陽孝・白川光一
（福岡大産婦）

(目的)体外受精で得られた排卵誘発法や精子調整技術を AIH へ導入することにより，その治療成績が向上することが報告されている．われわれは，hMG 刺激を併用した洗浄精子による AIH を行ない，その治療成績を検討した．

(成績) 15例の不妊夫婦（PCT 不良，原因不明，男性因子，子宮内膜症，排卵障害）に対して，計23周期，hMG を300～1800単位投与し，hCG 注射の翌日に AIH を施行した．精子は HTF 液（含10％血清）2回遠沈後、運動精子3～95×$10^6$/ml の濃度で0.6～0.8ml 注入した．その結果，8例（46.7％／症例，34.8％／周期）に妊娠が成立した．精子濃度，hMG 投与量，卵巣腫大の発生率には，妊娠周期と非妊娠周期との間に有意差はなかった．

(考察)本法による妊娠率は高く、良好な成績であった．しかし，乏精子症や精子無力症には妊娠例はなく，このような症例には精子濃度の改善の必要性があると思われた．

### 10．精子濃度，運動率の季節による変動に関する検討

○森　明人・沖　利通・山元慎一
堂地　勉・永田行博
（鹿児島大産婦）

一般に，精子数および精子運動率は夏に減少し冬に増加するといわれており，これを裏付ける報告も幾つか散見される．当科を受診した不妊患者の夫にもこの傾向があるかどうかを調査し，文献的考察を加え検討した．

対象は当科で AIH または IVF-ET を施行した不妊患者の夫で，正常精子群22例と精子濃度が4,000万/ml 以下または運動率が50％以下の乏精子症群25例の計37例で，少なくとも5回以上の精液検査を受けたものである．

正常精子群では，運動精子数（×$10^6$/ml）は春55.6±24.5，夏54.0±27.3，秋75.5±37.7，冬69.3±28.4と，秋から冬にかけ上昇する傾向にあった．運動率（％）は春69.6±14.9，夏70.2±21.9，秋66.4±16.0，冬73.4±20.6と季節的変動はなかった．乏精子症群においては運動精子数，運動率ともに季節的変動はみられなかった．これはヒトの場合は他の哺乳類と異なり日照時間や温度などの影響をあまり受けないためではないかと考えられる．

### 11．AIH の工夫—GPM 培養液を用いた活動精子分離法—

○富田利紀・友成廉平・友成美鈴
平井ひろみ・薬師寺道明
（久留米大産婦）

近年 IVF-ET や GIFT の普及につれ良好運動精子の採取が不可欠となっているが，AIH においても同様である．当科ではこれまで AIH に Ham F-10 を用い，Swim up 洗浄濃縮法を行なっていたが，今回新しい培養液 GPM を使用したより簡便な Swim up 法を試みたので，従来法と比較検討し報告する．．

対象は，平成元年12月から平成2年10月までに当科外来で AIH を施行した20症例延べ60周期で，症例の内訳は，精液不良例が GPM 法で15周期，従来の Swim up 法で12周期，同様に Huhner test 陰性例で5周期・3周期，機能性不妊9周期・16周期であった．Swim up 前後での運動精子の改善率等は両方法で全ての症例において統計学上有意な差は認められなかった．GPM 法は従来の方法に比べ操作が簡便で短時間での処理が可能なため外来での AIH に

有用と考えられる.

### 12. 習慣性流産患者における HLA 遺伝形跡の解析

○有馬隆博・岩永知久・今村利明
本田つよし・宮本新吾・西田　眞
西田純一・加藤秀則・和気徳夫
(九州大生体防御医産婦)

習慣流産とその夫妻間の HLA 型共有との関連について,これまで数多くの報告がなされている.しかし流産という現象は母体と胚間での現象であり,HLA 型を共有する夫妻の母体と胎児間で HLA を共有する確率はメンデルの分離の法則に従うと1／2となる.一方マウスではヒトの HLA に相当する腫瘍組織適合抗原系 H-2 の近傍にも t-complex の遺伝子座が存在する.t ハプロタイプの雄からは90％以上その t 遺伝子座が伝達されるいわゆる分離比の歪曲が知られている.

今回習慣流産夫妻の精子から DNA を抽出し,減数分裂レベルで分離比の歪曲の有無を,遺伝的多型のある HLADQ$\alpha$, DQ$\beta$ 遺伝子を probe とし, Southern blot hybridization 法も用いて解析した.

結果：9例は分離比の歪曲はみられなかったが,6例に由来不明の Band がみられた.さらにこの Band は,プラスミドの混入, partial digast 細菌の混入ではないことがわかったが,今後さらに解析を加える予定である.

### 13. ヒト卵胞液（F・F）を用いた良好精子回収法の開発と臨床応用

○田中威づみ・竹本洋一・吉田一郎
岡部親宜・田中　温
(セントマザー産婦医院)

(目的) ヒト卵胞液 (F・F) を用いてヒト精子を処理すると,ハムスター卵子内への精子の進入率が増大することが報告されている.今回従来の Swim up 法では妊娠に至らなかった IVF-ET, GIFT 症例を対象として本法を臨床に応用したのでその結果について報告する.

(方法) 成熟卵胞より採取した卵胞液を 0.22$\mu$m ミリポアフィルターで濾過し使用した.① P-FF 法：液化精液を Percoll 密度勾配遠心法で遠心分離後4％ FF 2 ml を添加し培養 (30分), さらに遠心分離後6％ FF を2 ml 添加し培精に供した.② H-FF：従来の Swim up 法で分離した精子浮遊液に1％ FF を2 ml 加え30分培養後遠心分離, この中に8％ FF 2 ml 加え培精に供した.

(結果) この両方を症例に応じて使い分けた. その結果,従来の Swim up 法による精子処理後の精子濃度および運動率が FF を使用することにより $4.3\pm6.7\times10^4$/ml → $27.5\pm15.4\times10^4$/m, $16.1\pm8.4$％→ $49.4\pm25.3$％と著明に上昇した.

### 14. 凍結保存精子を用いて妊娠に成功した体外受精・胚移植の6症例

○竹本洋一・吉田一郎・田中威づみ
岡部親宜・田中　温
(セントマザー産婦医院)

(目的) 不妊症の原因の中に夫の長期不在 (海外出張, 遠洋漁業, 多忙など) や, 精子運動率は良好で精子数が少ない場合がある. このような症例では精子凍結を頻回に治療前に施行することが最適である.

(方法) 精液は Percoll 密度勾配遠心法により洗浄濃縮した後, KS-II 精子保存液と等量混合し, 凍結保存用チューブに充填した.液体窒素を凍結容器に注ぎ, 蒸気平衡に達した後,チューブを液面上2 cm に横置にして凍結し, 2分後に液体窒素内に浸漬し, 凍結を完了した. 融解は液体窒素タンクよりとり出し, ただちに約30℃の微温湯につけた. 融解後, 10％非働化血清添加 HTF で希釈,遠心し,前培養に供した.

(結果) 11症例にこの凍結保存精子を用いた体外受精・胚移植を行ない, 6例で妊娠に成功した. 6症例のうち4症例は夫の長期不在, 2症例は乏精子症が原因であった.妊娠第1例目は,2860g 男児を正常分娩した.

### 15. Pure FSH（フェリチノーム, セロノジャパン）を用いた過排卵処理法の検討

○田中　温・竹本洋一・吉田一郎
田中威づみ・岡部親宜
(セントマザー産婦医院)

(目的) いかに成熟度の高い卵子を多く発育させるかが, 不妊症治療 (特に GIFT, IF-ET) の妊娠率を左右するといっても過言ではない.今回, Pure FSH (フェリチノーム, セロノジャパン) を用いて新しい過排卵処理を行ない, 従来の過排卵処理法と比較検討したのでその結果について報告する.

(方法)① Clomiphene＋Pure FSH＋HMG, ② Pure FSH＋HMG, ③ GnRH-a＋Pure FSH＋HMG, ④ Pure FSH の4種類の方法で過排卵処理を行なった.

(結果) 4法における HCG 投与時 $E_2$値(pg/ml), 採卵数, G1 数, 分割卵数, 分割率, GIFT 妊娠率, IVF・ET 妊娠率は①：2291.5, 7.0, 2.7, 1.8, 22％, 13％ (1/8), 11％ (1/9), ②：1909.1, 7.9, 3.4, 1.8, 33

%，33％ (1/3)，33％ (1/3)，③：1916.4，7.2，2.3，1.1，33％，25％(1/4)，33％(1/3)，④：1989.5，9.1，3.2，1.7，25％，0％ (0/5)，0％ (0/3) であった．以上の結果より，①卵の発育にはLHを含んだHMGが必要である，② Pure FSH 単独群および Clomiphene＋Pure FSH＋HMG 群では，従来の過排卵処理法より明らかに妊娠率が低下した．

### 16．強度の骨盤内癒着を伴う子宮腺筋症症例に対する IVF-ET 成功例

○松井幹夫・松浦講平・本田賀裕
古木義弘・岡村　均
（熊本大産婦）

当科では現在までに本症に対する積極的縮小術を行なった症例を積み重ねてきている．今回，強度の骨盤内癒着を伴う子宮腺筋症症例に対して子宮腺筋症縮小術を行ない，その後IVF-ETを行ない，妊娠した例を経験したので報告する．

症例は14年の不妊期間を有する38歳の原発性不妊婦人で，既往治療として2回の骨盤内癒着剝離術とその後3回のIVF-ETを受けるも妊娠は成立していない．当科初診時の子宮は過手拳大であり，MRIにて子宮の後壁全体がほぼ腺筋症に置換されていた．子宮腺筋症組織を可及的に縮小し，損傷の著しい両側卵管は切除した．術後3カ月後にGnRH＋hMGで過排卵刺激を行ない，IVF-ETを行なった結果，妊娠が成立し8週で児心拍を確認したが，12週でIUFDに終わった．本症例でのIUFDの原因は胎盤付着部位が腺筋症が存在している後壁であったことであろうと予想されるが，年齢因子も加味されるべきであり，若年からの積極的な手術療法が考慮されるべきであろう．

### 17．IVF における poor responder に対する卵巣刺激方法の検討

○佐久川政男・山城一也・花城可信
稲福　薫・新崎盛雄・佐久本哲郎
東　政弘・中山道男（琉球大産婦）

体外受精・胚移植（RVF-ET）では，卵巣刺激に対する低反応群（poor responder）が2割近くあり，このような例では妊娠成績は不良である．このような症例に対してhMG・FSHの分割増量投与を試みた．発育卵胞数が2個以下のpoor responder13例を対象とした．その際の卵巣刺激はGnRHaを黄体中期より使用し，月経3日目より，hMGを150～300単位投与する方法であった．同一症例に対して次回は以下の方法をとった．GnRHaに併用して月経3日目より朝FSH150単位，夕方FSH150単位投与し，8日目より，朝FSH225単位，夕方hMG150単位投与する方法か，または3日目より朝FSH225単位，夕方hMG150単位を連日投与する方法のいずれかを使用した．上記方法にて，キャンセル率が低下し，1例に妊娠が得られた．

またキャンセルをくり返す症例のFSHの基礎値は高い傾向がみられ，このような例では新たな卵巣刺激方法の検討の必要があると思われた．

### 18．当院の不妊外来の原因別統計

○室　康治・宇津宮隆史・岩里桂太郎
溝口洋一・貞永明美・寺脇信二
谷口一郎・肥田木孜
（大分県立病院産婦）

当院では不妊外来を特別に設けているが，今回は1989年6月より1990年7月までの集計を行なった．初診時年齢は原発性不妊は26～30歳代，続発例は31～35歳代が最も多かった．不妊期間では原発，続発ともに2年未満で来院する例が最も多かった．不妊原因別では黄体機能不全を含めると卵巣機能異常が最も多く，64％を占め，次に男性因子が26.9％であった．それらの妊娠率は卵巣因子群27.6％であったのに比べ，男性因子群は6.5％と低率であった．男性因子の治療の困難さがうかがわれた．当科では腹腔鏡を積極的に行なっているが，これらのうち72例に腹腔鏡を行なった．その結果，子宮内膜症が最も多く56.9％を占めた．不妊症治療では子宮内膜症を常に念頭におくべきであろう．また，ここ3カ月間に一度も来院していない症例の治療期間をみると初診のみと4カ月以内で通院中止している例が最も多く，不妊症治療の特殊性を啓蒙する必要が考えられた．

### 19．基礎体温の基礎的検討

○馬場伸二（和白病院産婦）
岡村　靖（産業医大産婦）

水銀体温計・5分計と電子体温計・1分計の基礎的な比較検討を行なった．また測定時間による基礎体温の調整，3交代勤務のBBT曲線についても検討を行なった．対象は産業医科大学の看護婦・助産婦19名で，内訳は3交代勤務者が14名，日勤のみの看護婦が5名で，測定は連続した3月経周期の測定を電子体温計で行ない，1周期のみ水銀計を併用した．

1．電子体温計は水銀計に比べ約0.1度高く，両者の相関係数は0.91と良好であった．

2．電子体温計のBBT曲線はほぼ水銀計と同様の曲線を示しており，水銀計で2相性と判断された12名

のうち，電子体温計で1相性と判断する例はなかった．

3．測定時刻がいつもと大きく異なる場合はBBTの補正を行なう必要がある．

4．3交代勤務での連続3周期において，1回でも2相性を示したものは14名中12名であったが，3周期とも2相性を示したものは1名しかいなかった．

### 20．女性重症心身障害者の二次性徴および内分泌機能について

○石　明寛・蜜山高宏・岡村　靖
（産業医大産婦）

(目的)近年，日本における周産期医学の進歩は目ざましく，その結果として出生児の長期予後の改善という成果がもたらされている．本研究の目的は，女性の重症心身障害者の二次性徴および内分泌機能の検討を行なったので，報告する．

(対象) 女性の重症心身障害者17名（重症分類II型，年齢構成29.9歳±4.2年)について初経，二次性徴およびLH, FSH, $E_2$, PRLを調べた．

(結果)初経に関しては，17名中14名において14歳以後に発来した．2名は不明で残り1名は12歳であった．続発性無月経となった者は10名(58.8％)で，そのうち第1度無月経は7名，第2度無月経は3名であった．また稀発月経は4名，正常性周期は3名であった．17名いずれも乳房および恥毛の発育は正常であった．続発性無月経患者10名の血中FSH, LH, $E_2$の成績によるとHypogonadotropic Hypogonadismであった．

(考察)女性重症心身障害者の月経異常は高頻度であることが分った．また第二次性徴はほぼ正常であった．

### 21．カウフマン療法を施行したマルファン症候群の1例（身長増加阻止効果について）

○沖　利通・堂地　勉・松本　保
中村行彦・森　明人・山元順一
飯尾一登・永田行博
（鹿児島大産婦）

マルファン症候群は，その身体的特徴から思春期において急激な身長増加により，脊椎側湾・脊椎圧迫骨折などが問題になる．今回我々は前思春期に発症したマルファン症候群に，身長増加阻止を目的としてカウフマン療法を施行し若干の知見を得たので報告する．

症例は12歳，主訴は原発性無月経．10歳時から高身長・脊椎側湾を認め，89年3月胸痛が強く当院内科を受診．マルファン症候群と診断され，最終予測身長が182cmのため，身長増加阻止目的で89年5月当科紹介受診となった．初診時，身長168cm，体重39kg，乳房，恥毛はそれぞれTanner分類αII，III，早速，骨端腺早期閉鎖を期待しカウフマン療法18カ月行ない，最終予測身長は現在177.1cmとなっている．このように，高身長で脊椎障害を来す恐れのあるマルファン症候群症例に積極的にカウフマン療法を行なうことは，骨系統の障害・心理的配慮の点から有意義であると思われた．

## 第103回　日本不妊学会関東地方部会

日　　時：平成3年2月2日（土）午後1時半～6時10分
場　　所：順天堂大学青山記念館

### 1．clomiphene citrate-HCG刺激周期におけるIUI臨床成績の検討

○岩佐　剛・豊成由佳・中條真美子
町田正弘・竹内久彌
（順天堂大浦安病院産婦）

当院のclomiphene-HCG-IUI療法について検討した．対象は昭和63年11月から平成2年12月までの期間に，同療法を施行した57人である．方法としては，clomipheneを月経周期5日目より内服させた後，適宜，卵胞計測を行ない，また尿中エストロゲン定量により，卵胞径20mm以上，$E_2$60ng/ml以上で，HCG10,000 IU筋注施行し，翌日IUIを施行した．また翌々日に排卵の確認，およびHCG10,000IU筋注を行なった．IUIは80％パコール液を用いた撹拌濃度勾配法を用いた．妊娠率は，per cycleで7.5％，per personで33.3％であった．妊娠した19例20周期中，生児を得たのは17周期で，流産率は10.0％，性比は1対2.2であった．胎児奇形は，1例に副耳が見られた．平均施行回数は4.67回で，妊娠例の平均施行回数は6.54回であった．妊娠例は機能性不妊例，視床下部性無月経例，頚管因子例に多い傾向が見られた．

### 2．卵管閉塞の非観血治療―子宮鏡下卵管形成術について―

○長田尚夫・高見毅司・滕　嘉敏
山田祐士・津端捷夫・佐藤和雄
（日本大産婦）

当院における6年間のHSG例は1818例で，卵管疎通障害と診断された症例は270例14％である．この卵管閉塞に対し非観血的卵管疎通術である選択的卵管造影や子宮鏡下卵管形成術を行ない，これらによっても卵管疎通が得られなかった症例に対し，観血的卵管疎通術である子宮卵管吻合術を行なっている．前者は，細径のフレキシブル子宮鏡を用いて直接，卵管子宮口より卵管内に造影剤を注入し，卵管閉塞を強圧によって再疎通させる非観血的卵管疎通術で，後者は，PTCAバルンカーテルによって閉塞部卵管内腔を拡張する方法である．

我々は一旦卵管閉塞と診断された症例152例に対し，本法を用いて80例52.6％に再疎通を認め，46例58％が妊娠している．間質部閉塞の治療には，体外受精による胚移植法が行なわれている今日，我々が行なっている非観血的，観血的卵管形成術は，術後成績も非常に良く，しかも妊娠成立過程が自然妊娠であるので，倫理的問題も無く理想的治療法と言える。

### 3．不妊症治療に対する意識調査

○五味淵秀人・*太田昭彦・貝原　学
（帝京市原病院産婦・*同・臨床研究部）

当科外来受診患者に対し不妊症の治療法についての意識調査を行なった．平成元年6月，更に2年10月の2回にわたり同一のアンケート調査を行ない，第1回目266名，2回目294名の有効回答を得た．排卵誘発や顕微鏡下卵管形成術は疾病に対する治療として受け入れられていたが，AIHには難色を示す回答が多く，AIDには3／4が拒否の回答をした．IVF-ETについて約80％が進歩として容認していた．反対理由として奇形児への懸念は10％に過ぎず，倫理面と曖昧な畏怖の念と答えたものがほぼ同数であった．さらに，実際に受けるかという質問に対して肯定的な回答は半数に減じた．不妊患者では1回目調査に比し2回目ではより積極的で，特に，AIHやIVF-ETについては肯定的であった．治療レベルの向上に伴い意識も変化していくことがうかがわれた．しかし，回答者全体としての意識に大きな変化はなく，不妊治療の進歩が全て全体の合意が得られているものとは考えにくかった．

### 4．性器感染と不妊――特にクラミジア，ウレアプラスマとの関連――

○佐藤芳昭・三宅崇雄・望月愛郎
松信　晶・梶野　徹・樋口正臣
大沢章吾（相模原協同病院産婦）

精液および性器の感染症と不妊との関係については多くの研究があるが，明確な結論は得られていない．今回は不妊症カップルのうち，男性側に主としてクラミジアおよびウレアプラスマ感染がどのくらいあるか，またこれらに有効と言われるoflexan (OFLX)の投与により，どのような結果が得られるかを検討した．不妊症でおとずれたカップルに対して，クラミジア抗原，抗体(IgG, IgM)，ウレアプラスマ，ウレアリィティクムの検索を行なった．精液でのクラミジア抗原の陽性は5.4％ (3/56) であり，抗体系の出現は33.9％で，うち活動型と考えられるIgA陽性は26.7％であった．ウレアプラスマは17.8％に陽性であり，クラミジアとウレアプラスマ同時

に陽性は5例にみられた。これらの症例に対してOFLX 300mg/日，28日間投与をして，投与後の陰性化率はクラミジアIgA抗体（10週目）66.6％，ウレアプラスマ（投与終了後）70.0％であった．

治療後に妊娠した例は5例であり，うち2例はIVF, ETによる卵管性不妊であった．

### 5．AIH後経ダグラス窩精子回収試験の有用性

○栗林　靖・石塚文平・近藤俊彦
渡辺研一・大野裕子・堀越裕史
斉藤寿一郎・浜田　宏
（聖マリアンナ医大産婦）

精子卵管通過性検査として，AIH後，腹腔鏡下腹腔内精子回収試験（L-PSRT）が行なわれている．PSRTは月経周期の施行時期，精液所見の良否にともない変化する可能性がある．そこで，外来ペースで反復検査の行ない得るAIH後，経ダグラス窩腹腔内精子回収試験（TV-PSRT）を試みた．

1）L-PSRT, TV-PSRTの陽性率は，それぞれ41％，54％．

2）L-PSRT, TV-PSRTを同日に施行した10例の結果は，100％一致した．

3）推定排卵日－4日以前，3日以降においてPSRT陽性例はなかった．

4）PSRT陽性例，陰性例の平均運動精子濃度は，それぞれ$90.08\pm72.92\times10^6$/ml，$1.146\pm12.63\times10^6$/mlで，両群間には，危険率1％以下の有意差があった．

以上より，PSRT所見は，種々の状況で変化する可能性があり，繰り返し検査の行なえるTV-PSRTは，臨床上有用な検査と思われた．

### 6．嚢胞腎と部分的逆行性射精を合併した精管末端部拡張症の1例

○大橋正和・石川博義・橘　政昭
田崎　寛　（慶応大泌尿器）
織田孝英（国立埼玉病院泌尿器）

症例は36歳，男性で結婚後3年間の不妊を主訴として当科を受診した．泌尿器科的診察では両側精巣はともに約10 gとやや萎縮していた．精液所見は量：0.5ml，数：$10\times10^6$/ml，運動率：10％以下であった．染色体は46XYで正常．抗精子抗体は陰性．精巣生検では造精機能はほぼ保たれていた．精嚢腺部はUS, CTにて嚢胞状拡張を呈しており，また嚢胞腎が認められた．精管精嚢造影では両側精管の疎通性は良好で，精嚢腺というより精管末端部が拡張しており，そのまま射精管に連続していた．尿道膀胱鏡的には膀胱頚部は三角状に開大していた．射精後尿には$700\times10^6$の精子が存在しており，現在当院産婦人科にて射精後尿を用いたAIHを施行中である．精管末端部嚢胞状拡張症，嚢胞腎の合併例は本症例を含めて10例が報告されているが，さらに膀胱頚部形成不全の合併は胎生期の中腎管，尿管芽レベルの発生異常を示唆するものである．

### 7．凍結精子を用いたAIHの簡易化を目的としたcryosyringeとfloating platformの開発

○兼子　智・小田高久・泉　康史
吉村慎一・大野虎之進
（東京歯科大市川総合病院産婦）
小林俊文・原　唯純・朴　俊英
野澤志朗　（慶応大産婦）

精子凍結保存法の簡便化を目的としたcryosyringeとfloating platformを試作した．精液はあらかじめ撹拌密度勾配法による洗浄濃縮を施行し，0.2mlとなるように再懸濁した後，KS-II精子保存液と等量混合して凍結した．液体チッソ蒸気による凍結は液体チッソ液面からの高さにより精子凍結速度が規定されるので，液体チッソの注入量にかかわらず，常に同じ高さで凍結を行なうため，発泡スチロール製の枠の上面に金網を張ったfloating platformを試作した．高さは3 cmとした．凍結容器と融解後の人工授精用注射筒兼用を目的としてcryosyringeを試作した．市販のツベルクリンシリンジの胴体部分を肉薄のプラスチックストローに置換し，熱伝導率の向上を図った．運動不良精液（n＝9）を，本研究で確立した方法で凍結した結果，平均4,000万，18％であった原精液は洗浄濃縮により8,700万，29％となり，融解後においても4,900万，18％と原精液とほぼ同程度の精液性状が得られた．

### 8．Semen Filtration Columns（Sperm Prep）の使用経験

○丸山喜徳・大原基弘・鎌田周作
麻生武志　（東京医歯大産婦）

不妊症治療におけるAIH, GIFT, IVF-ETなどにおいて，良好運動精子を選別回収することは，その受精率，妊娠率の向上を計る上で重要である．今回我々は，良好運動精子回収法としてsemen filtration column（Sperm Prep）法（SFC法）を使用し，swim-up法（SU法）と比較した．SFC法は，精液をGPM（Gamete Preparation Medium）で遠沈洗浄し，その浮遊液を，あらかじめGPMにて膨潤させた，Sephadex G100にてfiltrationし，精子を回収する方

法である.

用手的に採取し，液化後の精液の量，濃度，運動率，奇形率を求め，これら2種の方法での良好運動精子の回収率を検討した．SFC法は，重度の精子無力症例に対しSU法に比べ回収率は良好で，操作時間も短い利点があったが，精子濃度が高い場合には，目詰まりを来して回収率が低下し，操作時間も延長する欠点がみられた．以上より，良好運動精子を選別する際に，症例によりSU法とSFC法を使い分ける必要があると考えられる．

### 9．精子受精能判定法としての hypoosmotic swelling test と Eosin Y 超生体染色法の比較検討

○近藤俊彦・石塚文平・渡辺研一
堀越裕史・大野裕子・栗林　靖
斉藤寿一郎・浜田　宏
(聖マリアンナ医大産婦)

(目的) HOSTは，精子尾部細胞膜機能を検討する方法であり簡便な受精能判定法として注目されている．Eosin Y超生体染色法（E）は精液検査として古典的なものであるが，精子頭部の細胞膜機能を反映するものと考えられる．今回我々は両者をハムスターテスト(H)，一般精液検査との相関において比較検討した．

(方法) 対象は当科を不妊外来受診中の23例で1回の精液検査を用いてHOST, E, HおよびCASAによる一般精液検査を行なった．一般精液検査はpercoll（P）処理前後に行なった．

(成績) P処理前精子運動率とHOSTのg型膨化率のみと正の相関（$r=0.35$, $P<0.05$）を示した．EはP処理前運動率と有意な正の相関（$r=0.49$, $P<0.01$）を示した．またP処理後の運動率とはさらに強い正の相関（$r=0.53$, $P<0.01$）を示した．HとEも有意な正の相関（$r=0.37$, $P<0.05$）を示した．

(結論) EはHOSTに比し，精子運動率とより強い，Hと有意な相関を示すことより受精能判定上臨床的意義を有する．

### 10．ヒト精漿中のアルギニンエステラーゼについて

○朴　俊英・小林俊文・原　唯純
野澤志朗　(慶応大産婦)
松田兆史・秋浜澄行
(明治薬科大第1生化学)
兼子　智・大野虎之進
(東京歯科大市川病院産婦)

すでに我々は，ひと精漿中から分子量の異なる3種のアルギニンアミダーゼ（エステラーゼ）活性の存在を見い出し報告した．これらの酵素の生理的役割については現在検討中であるが，今回は，ヒト男性尿中に見い出されたアルギニンエステラーゼの起源と目される塩基性アルギニンアミダーゼについてその性質の追究を行なった．酵素活性の測定はN-$\alpha$-tosyl-L-arginine methyl ester（Tos-Arg-Me）を用い，pH8.5，37℃で行なった．

精漿中の塩基性アルギニンエステラーゼの精製は，ヒト精漿を透析した後，CM-セルロース吸着，CM-セルロースクロマトグラフィーおよびリマ豆トリプシンインヒビター親和吸着クロマトグラフィーを用い行なった．

精製した標品の比活性は3.2$\mu$mol/min/A280であり，活性回収率は580％であった．活性回収率の上昇は精漿中のプロテイナーゼインヒビターが除去されたためである．また本酵素の性質についても述べた．

### 11．IVF-ET 内外同時妊娠3例の検討

○宗　完子・小林善宗・本田育子
井上正人・藤井明和
(東海大産婦)

子宮内外同時妊娠は，従来自然妊娠30,000例に1例の頻度で発生する極めてまれな疾患と考えられてきたが，近年では排卵誘発法の普及に伴い，その発生率は上昇し，ことに配偶子操作治療では，1％から2.9％に発生すると報告されている．

最近の超音波検査法，特に経腟的超音波検査技術の向上に伴い，子宮外妊娠，ことに卵管妊娠は早期に確定診断がつくようになり，非観血的治療を含めた治療法の選択が可能となった．子宮内外同時妊娠では早期に診断を確定させ，直ちに卵管切除を行なえば，子宮内妊娠の継続は可能である．

我々はIVF-ETによる内外同時妊娠を3例経験したが，いずれの症例も経腟的超音波検査により妊娠初期（6～7週）に診断をつけ，卵管切除を行なう

ことで，子宮内妊娠の存続に成功した．当科におけるIVF-ETの内外同時妊娠発生率は1.2％(3/250)で諸家の報告と同じであった．

**12．体外受精・胚移植において2回のchemical pregnancyの後，夫リンパ球輸血を施行し，生児を得た1症例**

○笠井　剛・加藤順三
(山梨医大産婦)
小川恵吾・高橋敬一・塩津英美
児島孝久・佐藤孝道
(虎の門病院産婦)

3回の子宮外妊娠の既往を持つ卵管性不妊のため体外受精・胚移植を施行し，2回のchemical pregnancyの後，夫リンパ球輸血を施行し生児を得た症例を経験した．

症例は，31歳の婦人．右卵管膨大部妊娠で，顕微鏡下に保存的手術を施行したが，右卵管膨大部妊娠を繰り返したため右卵管を切除した．さらに左卵管膨大部に妊娠，保存的手術を施行したが，経過とともに閉塞したため体外受精・胚移植の適応となった．

体外受精・胚移植は計5回施行した．3回目と4回目がchemical pregnancyに終わったため，夫リンパ球を2回輸血し，5回目の体外受精・胚移植を施行したところ，双胎を妊娠し生児を得ることかできた．

このことから5回目に妊娠が継続した原因として，回数を重ねる毎に排卵誘発法も改良され内分泌学的環境も改善されてきたことも考えられるが，着床の時点から，免疫学的機構が関与していることも示唆された．

**13．不動化精子の囲卵腔内注入による受精について**

○横田秀夫・赤星　波・佐藤嘉兵
(日本大応用生物科学)

精子を卵子内に注入することによって受精が成立することが知られている．本実験では，先体反応を誘起した不動化精子の囲卵腔注入による受精について検討した．射出精子をLCを用いて先体反応を誘起した後に，マイクロマニュピレーターを用いて排卵卵子内に注入した．注入は注入用ピペットで卵子細胞質膜の一点を圧迫させた後，精子を囲卵腔内に注入した．また，卵子細胞膜への接触なしに注入する方法，更に細胞質内への直接注入も行なった．その結果，受精率は細胞膜接触注入では56.9％，接触なしの囲卵腔注入では3.1％，細胞質内注入では42.0％であった．また，受精卵子の発生率はそれぞれ56.9％，3.1％，28.0％であった．以上のことから不動化精子を囲卵腔に注入し効率的に受精を引き起こすのには，卵子細胞膜の物理的刺激が必要であると考えられた．

**14．透明帯開口術によるマウス卵子受精法の検討，その1**

○伊藤きよみ・吉田長生・吉田竹郎
(豊島中央病院)
山田祐士・長田尚士・佐藤和雄
(日本大産婦)
高木繁夫
(日本大学総合科学研究所)

IVF-ET, GIFTなど，最近では様々な方法が改良され，用いられつつあるが，その中で，重度の乏精子症は，運動精子数が少なく，また受精に必要な精子濃度に至らぬこともしばしばある．透明帯開孔術(Zona-cutting，略Z.C)は，それらの不妊夫婦に対する新たな方法として開発されている．今回は，マウス卵子を用いて，Z.C.を試み，その後，24時間，48時間で観察した．24時間後のそれでは58.2％(294/505)が2細胞期胚となり，その内の17.3％(51/294)がpolyspermyであった．またfragmentationについては8.5％ (25/294) であった．48時間後のそれでは，85.6％(185/216)が4細胞期胚となり，fragmentationは14.3％ (31/216) であった．Z.C.を行なっていないコントロール群との間の比較においても有意の差が認められた．従って，この実験成績より，従来良好な治療法がない重度の乏精子症において，Z.C.が有効な治療手段となるものと考えられる．

**15．当科における原発無月経の分類と管理**

○瀬戸山琢也・小林万利子・松尾明美
三室卓久・中山摂子・吉井大介
安達知子・武田佳彦
(東京女子医大産婦)
岩下光利・坂元正一
(東京女子医大母子総合医療センター)

最近6年間の原発無月経（含む，初経遅延）の分類と治療を検討した．外来患者36,000例中，原発無月経患者は35例，約0.1％で，初診時年齢は18～20歳にピークを認めた．原因別では間脳下垂体性無月経が34.3％と最も多く，以下卵巣性無月経22.9％，性腺分化異常（全例Rokitansky-Kustner-Hauser症候群）14.3％，染色体異常（精巣女性化症候群を除く）14.3％，精巣女性化症候群8.6％と続いた．子

宮を認める27例中のKupperman方式による無月経分類では，第1度，第2度，子宮性無月経はそれぞれ4例，16例，3例であった．子宮性無月経の3例は，エストロゲン効果を高めたKaufmann療法後に全例第2度無月経と診断され，うち1例は結婚後HMG-HCG療法にて排卵を認めた．以上より，原発無月経患者では，はじめに子宮性無月経と診断される症例中に子宮内膜のホルモン感受性低下例があることが示された．

### 16. 脳および肺梗塞を合併した重症卵巣過剰刺激症候群の内分泌動態

○安藤　索・中村幸雄・吉村泰典
山田春彦・丸山圭子・南野智徳
苅部正隆・生方良延・小山典宏
高橋昌俊・鈴木正彦
（杏林大産婦）

hMG-hCG療法施行中，OHSSに脳梗塞，肺梗塞および急性腎不全を合併した1例を経験したので報告する．

症例は32歳主婦で，4年来の不妊を主訴に近医受診し，第I度無月経なるもclomid療法では排卵せず，LH-RH testにてPCO typeを呈したため，hMG律動的皮下投与法が施行された．投与6クール目，hMG225iu×13回，hCG 5000iu×3回投与後，下腹部膨満感，下腹痛出現し同院入院したが，意識混濁血圧低下，乏尿，片麻痺認められ，当院転送となった．

諸検査にて脳梗塞、肺梗塞，胸腹水貯留，卵巣腫大が明らかとなり，血栓溶解剤投与を開始し，腎前性腎不全に対し透析導入，全身管理を行なった．OHSS発生周期の血中ホルモン動態は，PCO症例24周期と比較すると，hMG投与後，LHは低下せずむしろ上昇傾向を示したが，FSHには著変を認めなかった．Estradiolはhcg投与前に12,656pg/mlとpeak値を呈し，progesteroneは排卵後，458ng/mlまで上昇した．

### 17. 下垂体腫瘍術後排卵障害に対するGnRHパルス投与法の試み

○林　直樹・島内昌仁・武谷雄二
水野正彦　　（東京大産婦）

下垂体腫瘍Hardy手術術後排卵障害例に対し，GnRHパルス皮下投与を試みた．

(方法) 対象はmacroprolactionma (以下M) 術後2例(2例ともbromocriptine投与中、1例は高PRL血症持続) 2周期，craniopharyngioma (以下C) 術後1例(副腎皮質steroid，甲状腺剤，Desmopressin補充中) 1周期である．3例ともHypogonadotropic hypogonadismであった．GnRH製剤Hypocrineを90分間隔で20μg皮下投与適宜増量した．黄体期補充はHCG投与によった．

(成績) M術後症例は単一の卵胞発育を示し各15，22日目に排卵，妊娠した．C症例は49日間の投与にても卵胞発育を認めなかった．

(結論) GnRHパルス皮下投与方法が有効であったM術後排卵障害例を経験した．腫瘍の進展，手術侵襲等により下垂体系の血管走行に変位を来し，視床下部由来GnRHのゴナドトロピン分泌細胞へのaccessに障害があったためと推定される．一方，汎下垂体機能不全を示したC症例ではコナドトロピン分泌細胞は存在しなかったものと考えられる．

### 18. 妊娠初期脱落膜組織のMacrophageの免疫組織学的検討とInterleukin-1産生能について

○松本和紀・後藤　誠・川勝雅秀
許山浩司・楠原浩二・寺島芳輝
（慈恵会医大産婦）

1989年に“脱落膜はinterleukin-1 (IL-1) の産生源たりうる”と“IL-1は絨毛のHCG分泌を促進する”という2編の生殖免疫学上重要な論文が発表された．そこで妊娠初期脱落膜組織の凍結切片を作製し，CD68ならびにHLA-DRにて免疫染色を行なったところ，腺直下から間質に多数のMacrophageの存在を認めたが，IL-1βでは染色されなかった．

そこで，脱落膜を酵素処理し，RPMI-1640 (10％heat inactivated human AB serum添加，LPS100ng/ml添加) で2日間培養した細胞を検討したところ，組織同様多数のMacrophageを認め，IL-1β強陽性であった．

結論：正常脱落膜組織では多数のMacrophageの存在を認めるが，IL-1β陰性で，それらは活性化されてはじめてIL-1を産生する．従って，生理的な条件下ではTrophoblastのregulationにMacrophage由来のIL-1が妊娠初期の時点で関与している可能性は少ないものと考えられた．

### 19. 子宮内膜症患者の術前・術後における末梢血リンパ球サブセットの変動について

○石川尚顕・平田純子・古谷健一
今泉英司・星原孝幸・関　克義
菊池義公・永田一郎
（防衛医大産婦）

(緒言) 最近，不妊症原因の1つである子宮内膜症と

免疫系との関係に強い関心が寄せられている．今回我々は，不妊症を含む子宮内膜症患者の術前・術後におけるリンパ球サブセットの変動を検討した．
(方法) 子宮内膜症患者10例，対照としての子宮筋腫患者10例の手術直前および手術後約10日目に末梢血を採取し，CD57, CD16, CD4, 2H4, 4B4, CD8, CD11を用いたTwo, Color 解析二重染色法によりNK (natural killer) 細胞・サプレッサーインデューサーT細胞・サプレッサーT細胞・ヘルパーT細胞およびサイトトキシックT細胞を測定した．
(結果) ①子宮内膜症症例では，術前の中等度分化・NK細胞は子宮筋腫症例と比較し有意に低値であったが，術後では子宮筋腫症例のレベルに回復した．②術後のT細胞サブセットに関しては，子宮内膜症症例ではサプレッサーインデューサーT細胞が，子宮筋腫症例ではサプレッサーT細胞が，おのおの有意に高値を示した．
(結論) 子宮内膜症病変は，リンパ球サブセット，特にNK細胞の分化過程に影響を及ぼす可能性があり，子宮内膜症における免疫系の関与が考えられる．

### 20. RT-PCR法によるエストロゲン受容体mRNAの検出

○平田修司・平井光男・萩原和紀
長田孝明・加藤順三
(山梨医大産婦)

エストロゲンは，reproductionの諸現象に深く関与しているが，その作用機構の解明には，エストロゲン受容体 (ER) についての解析が不可欠である．今回われわれは，ERmRNAの存在，存在量および一次構造についてRT-RCR (Revere Transcription Polymerase Chain Reaction) 法により検討した．まず，ラットの脳および末梢の諸組織について検討した結果，検索したすべての組織においてERmRNAに特異的な増幅遺伝子が検出された．その増幅量はERmRNAの存在量を概ね反映しており，本法によりERmRNAを極めて鋭敏に，かつ半定量的に検出できることが示された．次に，ヒト子宮内膜ERmRNAについてRT-PCR-直接塩基配列決定法により解析した結果，本法によりERmRANの一次構造の解析が可能であることが示された．総じて，エストロゲンの作用機構の解明にRT-PCR法が極めて有力な手段になり得ることが示された．

### 21. ラット卵巣細胞のcAMPとSteroidogenesisに及ぼすPRLの影響について

○磯部　聡・神戸川明・吉羽幸子
森　宏之・沖永荘一・荒井　清
(帝京大産婦)

(目的) ラット卵巣細胞に各種Mediatorを加え，これにPRL添加による影響をみたので報告する．
(方法) 23日齢SDラットにPMS 10IU注射72時間後採取した卵巣をdisperseし$2\times10^5$cell/ml/uellとし，これにhCG, rLH, CT. FKを添加し，更に一部にrPRLを加え，$CO_2$培養器で12時間incubate, Medium中，細胞内のcAMP，$P_4$をそれぞれRIA, EIAで測定した．
(結果) Medium中のcAMPは対照が2 pMに対し，hCG 2，10，50，200IUで5，9.4，10，10pM/ml，rLH20，100，500ngでは，5.6，9.2，5.2pM/ml，このhCG 50IUにPRL100または500mgを加えても変化がみられなかった．CT20, 100ngでは7.5, 11.5pM, FK$10^{-6}$, $3\times10^{-6}$Mで15pM, 20.6pMを量依存的にhCGやLHの最大値を越えて増加，CT, FRにPRLを添加すると更に有意に増加を示した．Medium中のcAMPと$P_4$は同じ傾向であった．
(結論) PRLは，Cholera toxin, ForskolinのcAMP上昇作用，Progesteroue分泌亢進作用を増強した．

## シンポジウム：受精をめぐる諸問題

### 1．卵子の立場から

青木　類 (慶応大産婦)

(目的) 体外受精・胚移植の成績向上の一環として，初期胚および卵子の生存能を非侵襲的に評価する方法の確立と基礎的検討を目的とした．
(方法) 340nmで励起して得られたICR系マウス卵子・胚の細胞質内還元型ピリジンヌクレオチド(PN)の自家蛍光(455nm)を光子単位で測定し，電算機による数値演算処理を行なった．
(結果) ①励起光による受精率・発生率の有意な低下は認められなかった．②測定値と還元型PNの量との間には線形の関係が存在した．③細胞内呼吸遮断剤 (KCN) の添加により測定値が上昇した．④体外培養で正常発生した初期胚の測定値は発生停止群および変性群よりも有意に低値であった．⑤体外受精により受精の成立した群の測定値は，非受精群に比して有意に低値であった．
(考察) 本法は細胞内生体エネルギー利用の状態を反映し，非侵襲的かつ定量的な生存能評価が可能であ

ることが示され，将来の臨床応用への可能性が示唆された．

### 2．精子の Acrosome Reaction 後の受精能力保有時間について

佐藤嘉兵（日本大農獣医学部動物細胞学）

受精の成立にとって精子の先体反応（AR）が必須である．しかし，通常の体外受精系においてARが誘起された後の精子の受精能力（卵子内への進入能力）については十分な検討がなされていない．この点についてウサギ精子を用いて検討した．Lysophosphatidyl choline 処理を行なってARを誘起した精子を用いて体外受精を行なったところ，少なくともAR誘起後5時間までは受精能力を示した．それ以後は運動性も急速に減少して受精は不可能であった．また，受精卵子の囲卵腔内から回収した精子を用いた実験系でも，ほぼ同様な結果であった．一方，射精された精子を−20℃で凍結すると先体膜は部分的に破壊され，このようにして処理した精子を未受精卵子の細胞質内にマイクロマニピュレイターを使用して注入し受精させたところ，凍結開始後ほぼ3週間以上受精可能であった．以上の結果について考察したい．

### 3．環境因子の立場から

三橋直樹（東京大産婦）

受精および初期胚発生の場である卵管の生理を検討した．先ずヒト卵管のエストロゲンおよびプロゲステロンレセプターを検討し，これらが月経周期および卵管の部位により変動することを示した．ついでヒト卵管においてアラキドン酸からプロスタグランデイン（PG）が産生されること，またPG以外のリポキシゲナーゼ系の代謝物も産生されることを示した．これらPGの卵管に対する作用は主として収縮，あるいは線毛の運動にあるが，さらに卵の成熟の促進，また場合によっては初期胚の発生に阻害的にも作用することを示した．また家兎の卵管周囲に人為的に癒着を起こした場合受精あるいは初期胚の発生が阻害されるため，受精あるいは初期胚の発生には卵管内輸送が障害されないことが必要であることを示した．

### 追加発言（精子の立場から）

福田　勝（順天堂大産婦）

受精能獲得精子は卵胞液により先体反応が誘起される．ヒト卵胞液を用いてIn vitroでのヒト精子の受精能獲得，先体反応の発生，さらに卵子との受精について検討した．先体反応の判定には，Hoechst 33258とFITC-Pisum sativum agglutininを用いた．また受精の検討には透明帯除去ハムスター卵子を用いた．

結果：1）先体反応精子，受精能獲得精子は培養の時間経過とともに増加し，培養24時間目には先体反応精子は6％，受精能獲得精子は35％に達した．またヒト精子の受精能獲得時間は3－6時間と考えられた．2）精子の形態と先体反応発生には関連があり，形態異常精子は先体機能に異常があると考えられた．3）卵子との受精には精子先体反応の他に，精子運動性など他の因子の関与が考えられた．

### 追加発言

楠原浩二（慈恵会医大産婦）

精子因子のためIVF-ET等の配偶子操作をするにあたりHemizona assay（HZA）がその精子の受精能をprospectiveに判定し得るか否かを明らかにすることを目的とした．

方法はIVFにて得られた未受精卵を高塩基溶液にて保存（Salt stored egg）した．この卵を27G針にて2等分に半切し，その一方には既にIVF-ETにて受精率50％以上と良好な受精能を有することが確認されている精子（control sperm）を，残りの半分の透明帯にはやはりIVFにて受精率0％の精子（poor sperm）をそれぞれ媒精しzonaへの精子の接着数をカウントした．

その結果，control sperm群でのzonaへの精子接着数は平均36.9個であるのに比しpoor spermのそれは12.3個と有意に少なかった．また［poor spermのzonaへの接着数／control spermのzonaへの接着数］×100（％）であらわしたHemizona Index（HZI）は平均47.0％であった．この事よりHZIがおおむね50％以上であれば，IVFにても受精が期待し得ると予想された．この事はHZAによりIVF-ETに先立ち精子受精能をprospectiveに判定し得る方法として有用であると考えられた．

## 第33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3年2月9日（土）
場　　所：第一製薬ビル2階ホール

### 1．犬および猫における避妊手術が術後の健康状態に及ぼす影響

○執取大幹・森好政晴・中尾敏彦
河田啓一郎
（酪農学園大獣医臨床繁殖学）

犬および猫において卵巣摘出，卵巣子宮摘出または精巣摘出による避妊手術がその後の健康，疾病の発生，性格の変化などに及ぼす影響を知る目的で，本学付属家畜病院で過去5年間に避妊手術を受けた雌犬131頭，雌猫157頭，雄犬14頭および雄猫74頭の飼い主にアンケート調査を行なった．

その結果，子宮蓄膿症と乳腺腫瘍の発症は認められなかったが，脱毛，皮膚病，尿失禁，尿閉などが少数例にみられた。性格の変化では，特に雄猫でおとなしくなる傾向があった．また，手術後の体重増加は雌犬で57.3％，雌猫で60.5％，雄犬で64.3％および雌猫で72.4％にみられ，手術前にくらべて2.5倍になったものもあった．手術後に再び産子を得たいと希望する飼い主が雌で12.2％，雄で15.6％にみられ，一定期間のみ避妊を希望する飼い主も雌犬で32.8％，雌猫で19.1％，雄犬で28.6％および雄猫で39.5％であった。以上の結果から，避妊手術は術後の健康などには大きな影響は与えないが，体重増加を防ぐには適切な指導が必要であると思われた。また一時的な避妊を希望する飼い主が意外と多いことを知った。

### 2．ウシ血漿中エストロンサルフェートの測定法に関する研究

○中村圭一・大崎和栄・宮澤清志
佐藤邦忠
（帯広畜産大臨床繁殖学）

固相カラム（Sep pak® $C_{18}$）による，検体の前処理と，特異的な抗血清を用いたウシ血漿中エストロンサルフェート（$E_1S$）のラジオイムノアッセイ法について検討した．

使用した抗血清は6-Ketoestrone-3-sulfate-6-carboxymethyloxime-BSAを家兎に免疫して得られたものであり，$E_1S$に対して特異性の高いものである．

固相カラムによる回収率は，94.6±2.5％であった．標準曲線は，10～200pg/tubeの範囲でほぼ直線的に変化した．血漿に0.2～20.0ng/mlの$E_1S$を添加して測定したところ，回収率は80.4～107.7％であった．測定内および測定間変動係数はそれぞれ1.8～10.1％，4.3～15.1％であった。また妊娠期の血漿中$E_1S$を測定したところ，受精後100日までは低値で推移し，220日から急激に上昇し始め，260日目に最高値をとった．

### 3．牛の漿液性卵巣嚢胞腺腫の1例

○中尾敏彦・松本　太・中尾　茂
森好政晴・河田啓一郎
（酪農学園大獣医繁殖学）
石田　修
（江別家畜診療センター）
大崎和栄
（帯広畜産大家畜臨床繁殖学）

牛の卵巣腫瘍としては顆粒膜細胞腫がよく知られているが，その他のものについては報告が少ない．今回，江別市内の1牧場のホルスタイン種牛群において，漿液性卵巣嚢胞腺腫と診断された1例に遭遇したので報告する．

本牛は1989年12月，20か月齢時に，無発情の稟告で臨床的検査を行なったところ左側卵胞嚢腫と診断されたため，hCG 10,000IUの筋肉内注射を行なった．その後卵巣はソフトボール大となり，1990年5月には小児頭大になり，乳房腫脹，仙棘結節靭帯の弛緩などが認められたため顆粒膜細胞腫を疑い，本学付属家畜病院に入院させ，20日間経過を観察後，左卵巣の摘出手術を行なった．

摘出卵巣は，14×13×7 cm，重さ925gであり，病理組織学的に漿液性卵巣嚢胞腺腫と診断された．血中testosteroneおよびestradiol-17$\beta$値はやや高値であったが，摘出後低下した．右卵巣は萎縮の状態であったが，左卵巣摘出後，卵胞の発育，排卵，黄体の形成が認められた．

### 4．マウス2細胞期胚における割球の電気融合

○青柳伸介・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）

ICRマウス由来の2細胞期胚の割球における融合胚の発育および電気融合の細胞周期への影響を調べた．また，電気融合法を利用して，マウス胚に起こる2-cell blockの機序を解明する足掛りとなるような実験を行なった．後期2細胞期胚を用いて，電気融合の最適条件，融合胚の発育過程および胚盤胞への発生（細胞数，染色体数）を調べた結果，電気融

合処置は胚が持つ本来の細胞周期を変えることなく，割球の融合を引き起こすことが明らかになった．初期2細胞期胚の2-cell blockを改善する目的で，初期および後期2細胞期胚の単一割球の電気融合を行なったが，融合胚の発生能の向上はみられなかった．従って，後期2細胞期胚の割球には2-cell blockを解除する能力はないことが示唆された．

### 5．マウス胚盤胞のセンダイウイルスに対する感受性について

○太田慶一・喜田　宏・Apelo, C. L.
高橋芳幸・金川弘司
（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

近年，受精卵（胚）移植技術の進展に伴って，胚を介して伝染病が伝播する可能性のあることが問題となってきている．そこで，マウス胚盤胞とセンダイウイルスの系を用いて，ウイルスに対する胚の感受性を検討した結果，マウス胚盤胞の胚細胞はセンダイウイルスに対して高い感受性を示すことが解った．また，透明帯は胚細胞のバリアとなってウイルス感染を防ぐが，透明帯を有する胚盤胞でも，胚細胞が透明帯から脱出するような，ウイルス感染を受ける環境下にあれば，ウイルスに感染する危険性のあることが明らかになった．さらに，センダイウイルスに暴露されたマウス胚盤胞は，ウイルスを産生しながら生存し続けて，ウイルス汚染胚として移植される危険性をもつことが解った．

### 6．牛体外受精卵の卵管上皮細胞との共培養および合成培地での体外発育

○吉岡耕治・高橋芳幸・菱沼　貢
金川弘司
（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

牛体外受精卵の体外発育について検討を行なった．受精卵をmTCM199＋10％FCS内で体外培養した場合，胚盤胞への発育は認められなかったが，牛卵管上皮細胞との共培養によって，媒精卵の15.2％が胚盤胞に発育した．卵管上皮細胞培養液中のグルコース濃度は時間と共に低下し，培養72時間目以降では1 mM以下となった．体外受精卵をBMOC-3，グルコース無添加のBMOC-3および乳酸とピルビン酸濃度を3.0mMと0.3nMに修正したグルコース無添加のBMOC-3 (mBMOC-3)の3種類の合成培地で培養した結果，mBMOC-3で8.2％が胚盤胞へ発育した．さらに，必須・非必須アミノ酸添加により胚盤胞への発育率は16.5％となり，その平均細胞数(104個)はmBMOC-3（79個）に比べ有意に増加した．

以上のことから，共培養の有効性の要因にグルコース濃度の減少が示唆され，合成培地中のグルコース除去，乳酸とピルビン酸濃度の調整，さらにアミノ酸添加が受精卵の発育に有効であることが示された．

### 7．ハムスター卵の凍結保存・融解法の改良

○立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉
（旭川医大生物学）

透明帯除去ハムスター卵はヒト卵の代用としてヒト精子の受精能の判定や染色体研究に有用である．しかし，一度に多数の卵をタイミングよく得るには常に多くの動物を飼育しておく必要があり，また，あらかじめホルモンで過排卵処理しておかなければならないなど，実地上数々の難点がある．これらの解決法として凍結ハムスター卵が利用されてきたが，受精能，発生能の保持率は必ずしも高くなかった．

われわれの開発した凍結保存・融解法では卵の生存率は92± 4％であった．これらの卵子の受精能，前核形成能は極めて高く，ハムスターテスト用としては新鮮卵に匹敵するものであった．また，精子の染色体研究用としても，第一卵割紡錘体形成能が新鮮卵の約90％を保持していて，十分に信頼できるものといえる．上述の実施上の難点を殆んど解決できたことは，これら技術の普及を大いに助けるものとなるであろう．

### 8．培養豚卵巣顆粒膜細胞でのGonadotropinによるGlutathione S-Transferase活性の調節について

○計良光昭・古田伊都子・田中俊誠
藤本征一郎　　（北海道大産婦）
西平　順・石橋輝雄（第2生化学）

（目的）豚卵巣黄体よりGlutathione S-transferase (GST)を精製し，さらに培養豚卵巣顆粒膜細胞におけるGST活性を測定することにより，その性質および生理的意義について検討した．
（結果）本酵素の分子量は49Kdで，24Kdのサブユニットからなるhomodimerであり，等電点がpH8.8の塩基性蛋白質であることを明らかにした．また，培養顆粒膜細胞では，培養液中のFSHの濃度に依存してGST活性，Progesterone ($P_4$) 産生が増加することが示された．

以上より卵巣顆粒膜細胞におけるGST活性はFSHなどのgonadotropinの刺激により促進され，かつ卵巣におけるステロイド産生と密接に関与することが示唆された．

### 9. Prolactinoma 婦人における PRL の heterogeneity について

○林 正路・古田伊都子・桜田芳弘
田中俊誠・藤本征一郎
(北海道大産婦)

血中に存在するプロラクチン(PRL)の molecular size には heterogeneity が存在しており,それぞれ分子量の大きいものから, big-big, big, small PRL と呼ばれている.

(目的) Prolactinoma 婦人における, これらの比率および臨床経過に伴なう比率の変動を観察することを目的とした.

(方法) Prolactinoma 婦人 (治療・未治療を含む) 4例, Prolactinoma 男性1例を対象とし採血後可及的速やか血清分離しその 1.5ml をセファデックス G-150 (G 150) もしくはセファクリル S-200(S-200)を用いた 1.5×90 cmのカラムでゲル濾過した. 流出は 0.067M の PBS, PH6.7 で行ない, 流速は G-150 の場合は 4.0ml/h S-200 の場合 13.5ml/h とした. 各画分の PRL 濃度の測定は RIA 法あるいは EIA 法を用いた.

(結果) (i) Prolactinoma 未治療例では small PRL の比率が高かった. (ii) bromocriptin 服用例では臨床症状の改善にともない PRL の免疫学的活性の低下のみでなく, big-big ならびに big PRL の比率が高くなる傾向を認めた. (iii) bromocriptin 治療抵抗例では small PRL の比率が高かった.

### 10. 培養ヒト顆粒膜細胞のステロイド産生に及ぼす高プロラクチン血清の影響

○古田伊都子・林 正路・田中俊誠
藤本征一郎 (北海道大産婦)

培養ヒト顆粒膜細胞 (GC) のステロイド産生に及ぼす高プロラクチン (PRL) 血清の影響について検討した.

GC を無血清培地下で前培養した後, metoclopramide (MCP)投与後 30 分の正常婦人より得られた高 PRL 血清を培養液に添加し, 培養液中のプロゲステロン (P), エストラジオール ($E_2$) の産生を調べた. MCP 投与前の血清を同様に添加したものを対照とした. 高 PRL 血清の添加によって P および $E_2$ 産生は対照に比べ有意に低下した. 次に, 高 PRL 血清よりアフィニティクロマトグラフィーに精製した PRL の影響について検討した. 精製 PRL の添加によって P および $E_2$ 産生は有意に低下した. 以上より血中の PRL が GC の P および $E_2$ 産生を抑制することが示唆された.

### 11. IVF-ET による妊娠5例と GIFT による妊娠9例の臨床成績

○東口篤司・神谷博文・高階俊光
森若 治 (斗南病院産婦)

平成元年5月より平成2年12月までに IVF-ET を 43 例 (67 周期), GIFT を 22 例 (25 周期) に施行し, IVF-ET 5例 (分娩1例, 妊娠中2例, 流産2例), GIFT 9例 (分娩3例, 妊娠中5例, 流産1例) の妊娠成功例を得た.

当科では IVF-ET, GIFT とも開始当初より LH-RHa および HMG-HCG で排卵誘発を行ない, すべて経腟超音波ガイド下に採卵し, Luteal support の方法も一律に行なっている. したがってこのような IVF-ET と GIFT の成功率の差異の原因は in-vitro の環境にあると思われた.

また今回 LH-RHa の short protocol と long protocol による成績の差異, 各種 HMG 製剤での過排卵成績の違いに若干の知見を得たので報告し, IVF-ET, GIFT による妊娠成功の要点にも言及したい.

### 12. IVF-ET 反復子宮外妊娠の1症例

○高岡康男・千石一雄・玉手健一
石川睦男・清水哲也
(旭川医大産婦)

IVF-ET 妊娠の増加に伴ない, 各施設で子宮外妊娠の症例が報告されてきている. 一般的に, 本邦では IVF-ET 妊娠における子宮外妊娠の発生率は比較的高いとされており, 当科においても, 既に4症例の子宮外妊娠を経験し, このうち1症例は反復子宮外妊娠であった. この症例について, その臨床経過を詳細に観察し得たので報告する.

症例は 31 歳, 19 歳時人工妊娠中絶の既往がある。1984 年1月, 他医にて両側卵管閉塞と診断され, 86 年5月当科紹介され初診, 87 年9月, 3回の IVF-ET で左卵管峡部妊娠, さらに 90 年 11 月, 10 回目の IVF-ET で右卵管峡部妊娠となり, 各々卵管切除術を施行した. この症例を通し, IVF-ET における子宮外妊娠の問題点について検討を試みた.

### 13. Gn Rh agonist 併用による排卵誘発法の検討

○玉手健一・千石一男・高岡康男
石川睦男・清水哲也
(旭川医大産婦)

Gonadotropin releasing hormone agonist (以下 Gn RH-a と略) は子宮内膜症治療薬として使用され

ているが，その薬理作用より最近では不妊症領域においても頻用されている．殊に体外受精では有用な卵巣刺激法として既に定着している．今回我々は，体外受精以外の不妊症患者に対し，Gn RH-a 併用療法を行ない，以下の結果を得たので報告する．

対象はこの1年間で Gn RH-a 併用による排卵誘発を行なった14症例20周期で，平均年齢 33.6±5.0 歳，平均不妊期間 79.0±43.7 カ月間であった．適応別には PCO 7例，poor responder 5例，POF 2例で POF 以外はすべていわゆる short protocol で行なった．このうち4例が妊娠し，現在継続中である．諸条件を考慮すると，Gn RH-a 併用療法は不妊治療手段として有用と考えられた．

### 14．当科における習慣流産症例の予後

○福江ひろみ・藤井美穂・西川　鑑
山川　康・小泉基生・山本　弘
田中昭一・橋本正淑
（札幌医大産婦）

習慣流産の機序に関する研究は着床機構解明の進歩に伴い盛んに行なわれているが，臨床における治療方針に関する新しい報告はここ数年見ない．今回1988年4月から1990年9月までに当科不妊症外来を受診した習慣流産の25症例について原因，治療内容などを検討したので報告する．

連続2回以上流産を繰り返しているものを対象とした．習慣流産に対する一般検査終了後，治療を開始している10例中成功例は5例であった．内容は APTT が高値を示しプレドニンと夫リンパ球皮内注で治療した2例（うち1例は抗カルジオリピン抗体も高値であった），黄体機能不全で HCG 補充療法とリンパ球皮内注施行の1例，HMG-HCG 療法とリンパ球皮内注施行の2例であった．これに対し成功に至らなかった5例は染色体異常，子宮奇形と橋本病の合併例，早発排卵，遅発排卵でクロミッド内服例，原因不明例であった．

### 15．卵管性不妊へのクラミジア感染症の関与についての検討

○桜田芳弘・林　正路・古田伊都子
田中俊誠・藤本征一郎
（北海道大産婦）

(目的) クラミジア感染症と卵管性不妊との関連をクラミジア抗体と卵管因子とで検討する．
(対象・方法) 対象は1988年8月より1990年12月までの間に，当科不妊外来にて，クラミジア抗体を測定し，かつ腹腔鏡ないし開腹手術にて卵管因子を検討された症例のうち，他に明らかな不妊因子，卵管・腹膜因子を有しない44症例である．クラミジア抗体は間接免疫ペルオキシダーゼ法 (Ipazyme 法) にて IgG 抗体および IgA 抗体について測定された．
(結果) 卵管因子の異常を認めた症例は，25症例であり，その内訳は，卵管閉塞13例，卵管留水症11例（両者合併例3例），卵管周囲癒着4例である．卵管因子の異常を認めなかった症例は，19症例であった．卵管因子異常群でのクラミジア抗体陽性例（率）は IgG 抗体陽性例20例（20／25，80％），IgA 抗体陽性例10例（10／25，40％），卵管因子を認めない群では，IgG 抗体陽性例のみ4例（4／19，21.1％）認めた．
(結論) 卵管因子異常群では，クラミジア抗体陽性例（率）が多く，クラミジア感染症が不妊症，特に卵管性不妊に関与していることが示唆された．

### 16．腹腔鏡による腹腔内観察所見の検討

○中町悟子・藤井美穂・井上雄子
山本　弘・田中昭一・橋本正淑
（札幌医大産婦）

以前より主に機能性不妊症症例に対し腹腔鏡検査を施行してきた．最近施行例が非常に増加してきた．腹腔鏡下手術，GIFT 予定症例の卵管疎通性の確認，またチョコレート嚢腫に対する腹腔鏡下アルコール注入法など今後ますます腹腔鏡が臨床上幅広く使用されることが予想される．しかし腹腔内所見を系統的に観察しなければ異常を見逃す可能性もある．腹腔鏡検査を施行することによりなんらかの異常を認めた率は70％との報告もある．

今回1987年11月から1990年10月までの3年間に腹腔鏡検査および腹腔鏡下手術を施行した124例に関し腹腔内所見を整理検討してみた．また HSG，Rubin test との一致率，生検組織と肉眼所見の比較，腹水中の PGs，CA125，フィブロネクチンなどと臨床症状の比較検討なども併せて行なった．

### 17．犬の精液性状および副腎皮質機能と採精時の環境との関連性について

○内藤秀樹・森好政晴・中尾敏彦
河田啓一郎
（酪農学園大獣医臨床繁殖学）

犬において，採精時の飼育環境の変化が精液性状に及ぼす影響およびその際の副腎皮質機能の変化を ACTH 負荷試験により検討した．ビーグル種雄犬5頭を用い，24時間室温30℃保持（実験1），採精時発情雌犬の存在（実験2），48時間絶食（実験3）と

いう採精時の飼育条件を設定し，精液性状検査と副腎皮質機能検査を行なった．

精液性状は実験1では精液量，精子生存指数，精子濃度および総精子数が通常の飼育環境下のそれらよりも減少する傾向がみられ，実験2ではそれぞれの項目で有意な増加を示し（$P<0.05$, $P<0.01$），実験3では精子生存指数に減少傾向があったもののその他の項目には変化がみられなかった．副腎皮質機能検査では実験1～3において副腎皮質機能には顕著な影響が認められなかった．

以上の結果から実験1および2での飼育環境は犬の精液性状に影響を与えるが，副腎機能には影響を与えないことから精液性状の変化は他の要因によるものと考えられる．

### 18. 透明帯除去ハムスター卵子へ侵入した牛精子の性染色体観察法の検討

○山本　昌美・高橋芳幸・菱沼　貢
金川弘司
（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

透明帯除去ハムスター卵子と牛精子の異種間体外受精を利用した牛精子の性染色体観察法において，Podphyllotoxin（P）とVinblastine（V）を併用して用い，その添加濃度および添加時期の検討を行なった．卵子をIonophore A23187処理（0.5$\mu$M）した牛精子と媒精後，PとV無添加倍地(mTCM199＋10％FCS)で継続培養し，前核の形成と消失および2細胞期への発育を観察した．雄性前核形成は媒精10時間後で最高値を示し，前核の消失と2細胞期への発育は，それぞれ媒精13および16時間後から観察された．PとVの添加時間（媒精10および13時間後）による差異は認められず，牛由来中期核板保有率は，PとVの添加濃度をそれぞれ0.06$\mu$g/mlとした場合に最高値（62.7％）を示した．最適条件を用いた3頭の種雄牛について性染色体を観察した結果，牛由来中期核板は媒精卵子の49.9％に認められ(卵子1個あたり平均1.4個)，その78.2％が性判別可能であった．

### 19. 各種放射線に対するヒト精子染色体の感受性

○上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉
（旭川医大生物学）

我々は，ヒト精子とハムスター卵子の間の異種間体外受精法を応用してヒト精子染色体に及ぼす3種類の放射線(X線，$^{137}$Cs-$\gamma$線およびトリチウム$\beta$線)の影響をin vitroで調査し，以下の結果を得た。

1）放射線誘発の構造的染色体異常をもつ精子の出現率は線量に伴って直線的に増加し，その増加率は3線種の間でほぼ等しかった。

2）精子当たりの切断型異常の出現率は交換型異常の出現率よりはるかに高かった．これらの異常のうち，切断型異常と染色分体型交換は線量増加に伴って直線的に増加したが，染色体型交換は二次曲線的に増加した．

3）上述の線量効果を基に計算した，X線および$\beta$線の$\gamma$線に対する生物学的効果比（RBE）はほぼ1であった．

4）精子の放射線感受性に大きな個人差はなかったか．

5）最も高い照射線量群（4.25Gy）でもヒト精子は高い受精能に保持しており，放射線の影響が次世代に伝えられる危険性が示された．

6）ヒト精子の放射線感受性は実験動物精子の場合より1.5～3倍高かった．

### 20. 男子不妊症の臨床的検討——特に精巣組織所見，内分泌学的環境と治療効果との関係について——

○新田俊一・伊藤直樹・南部明民
立木　仁・丸田　浩・熊本悦明
（札幌医大泌尿器）

当科で治療を行なった男子不妊症症例を対象に治療前の精子数，血中LH, FSH, Testosterone,さらに精巣生検を施行した症例に関しては組織学的所見について検討を行なった．治療はClomiphen, HCG, HCG＋HMG, Vitamine, Kallikrein投与を行なった．治療前に比べ精子数が$10\times10^6$/ml以上増加したものを効果ありとした場合20～32.9％の効果を認めた．精子数でAzoospermia群，Oligozoospermia群，Subnormal群に症例を分け，造精能障害の程度を反映すると考えられているLH, FSHで比較すると，精子数が少ない群で高値をとる傾向にあった．また各群における治療効果率はそれぞれ0％，20％，37.5％で障害の軽度なものに効果が認められる傾向にあった．また今回の検討ではLH, FSHをIRMA法で測定し従来のRIA法より治療効果推定の指標として有用であるかについても検討する．

**【特別講演】**

### 男子不妊症に関する最近の話題

島崎　淳（千葉大泌尿器）

## 訂正とお詫び

第36巻1号に下記の誤りがありましたので，訂正の上お詫び致します．

塩谷雅英論文：下垂体―卵巣―子宮膜機能関連からみた黄体期子宮内膜不全の総合的解析

80(80)頁の右上から8行は，同頁右下から1行目上に入ります．

## 訂正とお詫び

第36巻2号に下記の誤りがありましたので，訂正の上お詫び致します．

第36回日本不妊学会総会および学術講演会(第3回予告）の一般演題抄録送付先㈱MAコンベンションコンサルティングの電話番号

(誤）03-5275-1911

(正）03-5275-1191

# 関連学会のお知らせ

## 第6回日本生殖免疫学会

**期　　日**：平成3年12月12日（木）～14日（土）
**会　　場**：野口英世記念会館
東京都新宿区大京町26（ＪＲ千駄ヶ谷駅より徒歩7分）
TEL　03-3357-0741
**一般演題**：口演およびポスター
**招請講演**：

1．Characterization of immunoglobulin-Fc binding factors of human seminal plasma.
S.S. Koide (The Population Council)
2．精子不動化抗体に起因する女性不妊研究の歩み
磯島晋三（兵庫医科大学）
3．胎盤トロホブラストの免疫学的意義をめぐって
竹内正七（帝京大学）
4．The role of endometrial leukocytes in human pregnancy.
J.N. Bulmer (University of Leeds)

**連 絡 先**：〒260 千葉県千葉市若葉2－11　放送大学
TEL　0472-76-5111　内線　2579，2794
会長　毛利秀雄

## 第14回国際不妊学会（IFFS）

**期　　日**：1992年11月22日（日）～27日（金）
**会　　場**：カラカス（ベネズエラ）
Hilton Convention Center
Teresa Carreño Cultural Complex
**抄　　録**：1992年5月31日締切
会議の詳細およびアブストラクトフォームを含むSecond Announcementのご請求は日本不妊学会（tel：03-3272-7077）へご連絡下さい．

# 投 稿 規 定

1．本誌掲載の論文は，特別の場合を除き，会員のものに限る．

2．原稿は，本会の目的に関連のある原著，総説，論説，臨床報告，内外文献紹介，学会記事，その他で，原則として未発表のものに限る．

3．1論文は，原則として刷り上り6ページ以内とし，超過は4ページ(計10ページ)までを認める．超過ページならびに特に費用を要する図，表，写真は実費を著者負担とする．

4．原著，総説，論説，臨床報告などは必ず，400字以内の和文抄録ならびに，ダブルスペース2枚以内の欧文抄録（題名，著者名，所属を含む）を添付する．

5．図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ，符号を記入し，かつ本文中に挿入すべき位置を明示する．

6．記述は和文または欧文とし，和文は横書き，口語体，平がなを用い，現代かなづかいによる．

7．外国の人名，地名等は原語，数字は算用数字とする．学術用語および諸単位は，それぞれの学会所定のものに従い，度量衡はメートル法により，所定の記号を用いる．

8．文献は次の形式により，末尾に一括記載する．

a．雑誌の場合

著者名：題名，誌名，巻数：ページ数，年次

原則として，特に原著の場合は著者名を全員あげる．誌名は規定または慣用の略名に従うこと．特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に入れて括弧で囲む，すなわち

著者名：題名，誌名，巻数（号数）：ページ数，年次

例1．Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy, Amer. J. Obstet. Gynec., 25: 104, 1933

2．足高善雄，竹村　喬，美並義博：最近1カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察，日不妊会誌，4：13，1956

b．単行本の場合

著者名：著書名，ページ数，発行所，年次

例1．Rovinsky, J. J. and Guttmacher, A. F.: Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy, 68, Williams & Wilkins Co., 1965

9．同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする．

10．著者校正は原則として初校のみ1回とする．なお，校正は字句の訂正にとどめる．

11．原稿の採否，掲載順位その他，編集に関する事項は編集会議で決定する．掲載は原則として受付順にする．

12．特別掲載を希望する論文は，受付順序によらず，速やかに掲載される．この場合は掲載に要する実費は全額著者負担とし，かつ特別掲載料を納付する．

13．掲載原稿に対しては，別刷30部を贈呈する．これ以上を必要とする場合は，原稿に別刷総部数を朱記する．なお，30部を越す分についての実費は著者負担とする．

14．投稿先および諸費用の送付先は，東京都中央区日本橋2丁目14番9号 加商ビル(株)アイシーエス企画内 社団法人 日本不妊学会　事務局とする．

## 編集会議からのお知らせ

原稿用紙はB5判横書き400字詰のものを使用し，組版に差支えないよう清書して下さい．ワープロを使用しても結構です．(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 | 白井将文 | 平川舜 |
| 穂坂正彦 | 毛利秀雄 | |

## EDITORIAL BOARD

Kazuo MOMOSE (Editor-in-Chief)

| | | |
|---|---|---|
| Katsuya AJIKA | Yoshiro ISHIJIMA | Tuyoshi ENDO |
| Toshihumi KOBAYASHI | Masafumi SHIRAI | Shun HIRAKAWA |
| Masahiko HOSAKA | Hideo MORI | |


## 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　㈱アイシーエス企画内
（Tel. 03-3272-7077）


**日本不妊学会雑誌**　36巻3号

1991年6月25日　印刷
1991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
印刷所　有限会社ループ社
東京都文京区関口1－43－5
発行所　社団法人　**日本不妊学会**
東京都中央区日本橋二丁目14-9
加商ビル㈱アイシーエス企画内
Tel（03）3272－7077
振替口座番号　東京　7－93207