

ISSN  
0029-0629  
CODEN:NFGZAD

# JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 37 No.1

January  
1992

## 日本不妊学会雑誌

第37巻 第1号

平成4年1月1日

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

# 会 告

## 第 37 回日本不妊学会総会および学術講演会 (第 1 回予告)

下記により第 37 回日本不妊学会総会ならびに学術講演会を開催いたしますので多数の方々ご参加下さいますようお願い申し上げます。

### 記

期 日：平成 4 年 11 月 5 日（木） 役員会  
11 月 6 日（金） 学術講演会，評議員会，総会  
11 月 7 日（土） 学術講演会

会 場：京王プラザホテル  
〒160 東京都新宿区西新宿 2-2-1  
TEL 03-3344-0111

なお演題募集要項，特別講演，シンポジウム，その他詳細につきましては次号（37 巻 2 号，平成 4 年 4 月発行予定）に掲載致します。一般演題の締め切りは平成 4 年 7 月上旬の予定です。

第 37 回日本不妊学会会長  
荒 井 清

連絡先：〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1  
帝京大学医学部産婦人科学教室内  
第 37 回日本不妊学会総会事務局  
TEL 03-3964-1211（内 1460）  
FAX 03-5375-1274

# お知らせ

## 顕微授精法の臨床応用に関する見解 案

「顕微授精法 (microinsemination) (以下本法と称する) は、極めて高度の技術を要する不妊症の治療行為であり、わが国における倫理・法律・社会的な基盤を考慮し、本法の有効性と安全性を十分に評価した上で慎重に実施されなくてはならない。

1. 本法は、難治性の受精障害で、これ以外の医療技術によっては夫婦間における妊娠の見込みがないか極めて少ないと判断されるものを対象とする。
2. 実施者は生殖医学に関する高度の知識・技術を習得した医師であり、また実施協力者は本法の技術に十分習熟したものでなければならない。
3. 本法を実施する医療機関は、すでに体外受精・胚移植 (IVF・ET) などによる妊娠・分娩の成功例を有するなど、一定の技術水準以上の機関であることを必要とする。
4. 被実施者に対しては、現在まで本法によって出生した児の染色体異常などの報告はないが、未だ確立された技術とはいえないので、本法の内容と予想される成績について十分に説明し、了解を得る。

社団法人 日本不妊学会理事会  
平成 2 年 11 月 15 日

# 日本産科婦人科学より

## 顕微授精法の臨床実施に関する見解

「顕微授精法 (microinsemination) (以下本法と称する) は、極めて高度の技術を要する不妊症の治療行為であり、その実施に際しては、我が国における倫理的・法的・社会的な基盤を配慮し、本法の有効性と安全性を評価した上で、これを実施する。本法は、体外受精・胚移植の一環として行われる医療行為であり、その実施に際しては、本学会会告「体外受精・胚移植」に関する見解 (注1) に基づき、以下の点に留意して行う。

1. 本法は、難治性の受精障害で、これ以外の治療によっては妊娠の見込みがないか極めて少ないと判断される夫婦のみを対象とする。
2. 実施者は生殖医学に関する高度の知識・技術を習得した医師であり、また実施協力者は本法の基礎的技術に十分習熟したものでなければならない。
3. 本法を実施する医療機関は、すでに体外受精・胚移植 (IVF・ET) などによる分娩の成功例を有することを必要とする。
4. 被実施者に対しては、本法の内容と問題点について十分に説明し、了解を得て行う。
5. 本学会会員が本法を行うに当たっては、所定の書式に従って本学会に登録・報告しなければならない。

(注1) 日産婦誌, 35 巻 10 号, 昭和 58, 10

## “顕微授精法（microinsemination）の 臨床実施に関する見解”に対する解説

IVF・ET は卵管性不妊症の治療法として開発され、その後は乏精子症や原因不明の不妊症の治療法としても広く応用され、今日では不妊症治療の有用な一方法として確立されてきている。

しかし、乏精子症を主とする受精障害例についてはIVF・ETによっても満足する成果が得られていないのが現状である。

近年の生殖科学分野における著しい技術の発展に伴い、卵の透明帯を機械的または化学的に開口する方法（zona opening, partial zona dissection, zona drilling）、卵腔内に直接精子を注入する方法（sperm injection into the perivitelline space, sub-zonal insemination of sperm, microinsemination sperm transfer）や卵細胞質内に精子を注入する方法（sperm injection into ooplasm）などの新しい方法が開発され、多くの研究業績が報告されるようになった。そこでこれらの一連の技術により受精させる方法をここでは顕微授精法（microinsemination）と総称することにした。

この顕微授精法は難治性の受精障害による不妊症の治療法として注目され、すでに世界各国において臨床応用も行われ、多数の正常児の出生が報告されてきている。このような世界的な展望に立ち、わが国の多くの研究者から本法の重要性が指摘され、日本不妊学会でも「顕微授精法の臨床応用に関する見解案」をすでに公表している。本学会でも診療・研究に関する倫理委員会で本法の臨床実施に関して種々の立場より検討してきた。とくに世界の現状の把握、安全性、社会性など各方面より有識者の意見を聴取し討議を重ねた結果、ここに「顕微授精法（microinsemination）の臨床応用に関する見解」をまとめた。

本法の臨床応用に際しては、すでに本学会にて公表された「体外受精・胚移植に関する見解（昭和58年10月）」および「解説」（日産婦誌36巻7号 pp.1131-1133）を遵守することはいうまでもない。

1. 本法は、難治性の受精障害で、これ以外の治療によっては妊娠の見込みがないか極めて少ないと判断される夫婦のみを対象とする。

（解説）

従来のIVFや配偶子卵管内移植（GIFT）を行っても受精や妊娠しない場合や、精子の所見にとくに問題はないが卵側などの原因により受精しない場合には、現時点までは有効な治療法がなかった。従って、本法の対象となる患者は、高度の乏精子症、極端な精子無力症、原因不明の受精障害などで、従来のIVFやGIFTを行っても受精や妊娠しないものとする。

2. 実施者は生殖医学に関する高度の知識・技術を習得した医師であり、実施協力者は本法の基礎的技術に十分習熟した者でなければならない。

（解説）

本法の実施者は生殖医学に関する高度の知識・技術を習得した医師で、その他関連領域の医学知識・技術を身につけた医師であることは当然であるが、本法が

技術的にも従来の IVF・ET と比較してかなり高度であることより、実施者および実施協力者は本法の基礎的技術に十分習熟した者に限定した。

3. 本法を実施する医療機関はすでに体外受精・胚移植 (IVF・ET) などによる分娩の成功例を有することを必要とする。

(解説)

本法はその技術上、当該医療機関ですでに IVF・ET や GIFT などによる分娩の例がない場合には成功する可能性は殆どないと考えられる。従って、本法を実施しようとする機関では、すでにこれらの新しい一連の医療技術により分娩の成功例を有することを必要とすることとした。

4. 被実施者に対しては、本法の内容と問題点について十分に説明し、了解を得て行う。

(解説)

本法を行う前に、その成功率などの問題点について十分に説明し、被実施者が了解した上で実施する必要がある。

5. 本学会会員が本法を行うに当たっては、所定の書式に従って本学会に登録・報告しなければならない。

(解説)

現在本学会では IVF・ET に関しては登録・報告制を施行している。本法は IVF・ET の一環として行われるものであり、本学会としてその実施状況を把握しておくことは医学的にも、社会的見地からも当然のことである。このため、本学会会員が本法を行う場合、所定の書式に従って本学会に登録・報告することとした。

## 顕微授精の臨床実施に関する登録

下記について登録致します

日本産科婦人科学会殿

施設・機関名

住所

施設・機関責任者名

施設・機関での実施許可；有・無

実施責任者

実施医師名

非医師協力者名（専門，最終学歴）

施設・機関の体外受精・胚移植による分娩例；（        ）例

実施内容（概略）

平成    年    月    日

登録者名

印

住所

# 日本不妊学会誌

## 第37巻 第1号

平成4年1月1日

### —目 次—

#### 原 著

プロラクチノーマ治療後妊娠例における妊娠中および産後の

- プロラクチン値の推移について……………小此木孝佳・他 …… 1
- 高 Prolactin (PRL)血性無月経例の産褥性機能と授乳との関連 ……木下俊彦・他 …… 7
- E I A法を用いた1日1回の血中LH測定による排卵予知……………伊藤 哲・他 …… 11
- スポーツ活動による LH の Pulse 状分泌の減少 (英文) ……目崎 登・他 …… 16
- 妊娠ラット下垂体細胞の LH 分泌におよぼす RU486 および  
keoxifene の影響について (英文) ……栗田松一郎 …… 22
- 子宮内膜症患者における免疫機能に関する検討……………刈谷方俊・他 …… 29
- 経腔超音波断層法による子宮内膜評価の正確性に関する検討……………廣田 穰・他 …… 35
- 当科における子宮内膜症の臨床統計学的検討 (英文) ……アブムサ・アントワン・他 …… 41
- 卵巣子宮内膜症における複合糖質の分布およびホルモン療法による  
影響に関する検討……………黄 宏駿・他 …… 44
- 子宮鏡による子宮腺筋症の診断に関する臨床的検討……………太田博孝 …… 49
- ダナゾール療法中のアンドロゲン動態と皮脂分泌・痤瘡について……………中村潔史・他 …… 56
- 早発閉経またはゴナドロピン抵抗性卵巣に関する臨床的研究  
—7大学病院における症例から (英文) ……永田行博・他 …… 63
- 枯死卵 (Blighted Ovum) の起源 ……千田 智・他 …… 70
- 胚盤胞形成過程における変形胚の出現と形態 (英文) ……四谷伊公子・他 …… 74
- 黄体化無排卵卵胞 (L U F) を有する不妊症例に対する  
超音波ガイド下卵胞穿刺 (NP) の効果……………山下三郎・他 …… 83
- 多嚢卵巣症候群における血中 testosterone 濃度について  
—使用 testosterone キットの比較および free-testosterone との  
関連性について—……………吉野和男・他 …… 89
- 治療成績を基に導かれた bromocriptine の投与基準に関する検討 ……辻 泰二・他 …… 93
- 過排卵刺激法における高純度 F S H 製剤の有用性に関する研究  
—IVF/GIFT における F S H 研究会報告— ……森 崇英・他 ……101
- ラット卵巣に於けるエンドセリン—1の存在 (英文) ……白杵 愼 ……110
- 過剰排卵マウスの受胎性に及ぼすコンプリートアジュバントの  
効果 (英文) ……小杉山基昭・他 ……114
- 抗プロジェステロン製剤 (RU486) の投与経路, 投与量および  
投与時期が家兎の妊娠阻止に及ぼす影響……………山海 直・他 ……118
- A F S 癒着スコア・閉塞スコアを使用した症例の個別化と  
Microsurgery の適応に関する検討 ……中塚幹也・他 ……125
- 4～8細胞期胚卵管内移植の臨床応用とその成績……………岡部親宣・他 ……131

|   |                       |     |
|---|-----------------------|-----|
| 経腔的卵管内胚移植法 (TV-TEST) の試み .....                  | 森 明人・他 .....          | 138 |
| 低用量経口避妊薬の脂質代謝への影響 .....                         | 坂本隆子・他 .....          | 142 |
| カウフマン療法を施行したマルファン症候群の1例<br>(身長増加阻止効果について) ..... | 沖 利通・他 .....          | 148 |
| 視床下部-下垂体-精巣機能の老化 第3報: 精巣機能の老化の研究 .....          | 三熊直人・他 .....          | 152 |
| 凍結保存精子の受精機能 第2報—HOS test を中心にして— .....          | 吉田仁秋・他 .....          | 157 |
| ヒト精子受精能獲得におよぼすカリクレインの<br>影響 (英文) .....          | ニコラオス ソフィキティス・他 ..... | 163 |
| 不妊男性に見られた Immotile spermatozoa の12例 .....       | 河原弘之・他 .....          | 167 |
| 特発性乏精子症に対する Ketotifen 療法の臨床的検討 .....            | 山根 享・他 .....          | 172 |
| 男性不妊に対する人参養榮湯および桂枝茯苓丸の効果 .....                  | 石川博通・他 .....          | 177 |
| 地方部会講演抄録 .....                                  |                       | 181 |

# Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 37, No. 1, 1992)

Japan Society of Fertility and Sterility

## CONTENTS

### Originals

- Changes in the Serum Prolactin Levels during Pregnancy and after  
Delivery in Hyperprolactinemic Women with Prolactin  
Producing Pituitary Adenoma ..... *T. Okonogi, Y. Ibuki & M. Igarashi* ..... 1
- The Effects of Pregnancy and Lactation on Patients  
with Hyperprolactinemia ..... *T. Kinoshita, J. Kato,*  
*Y. Taketani & M. Mizuno* ..... 7
- Predicting of Ovulation by Once a Day Measurement  
of Serum LH Levels with EIA Method ..... *S. Itoh, M. Iida,*  
*H. Takeuchi, M. Fukuda & M. Takada* ..... 11
- Exercise Decrease The Pulsatile Secretion  
of Luteinizing Hormone ..... *N. Mesaki, J. Sasaki, Y. Nabeshima,*  
*S. Sohda & H. Iwasaki* ..... 16
- Effects of RU486 and Keoxifene on the Dispersed  
Pituitary Cells of Pregnant Rats ..... *S. Awata* ..... 22
- Studies on the Immune Function of Patients  
with Endometriosis ..... *M. Kariya, K. Imai, H. Kanzaki,*  
*K. Takakura, N. Okamoto, N. Emi,*  
*H. Fujiwara, T. Mori & M. Maeda* ..... 29
- Study on the Accuracy of Endometrial Evaluation by Means  
of Transvaginal Ultrasonography ..... *Y. Hirota, T. Yoshimura,*  
*M. Shiraki, T. Sawada,*  
*S. Kawakami, M. Fukushima,*  
*Y. Yoshimura & Y. Nakamura* ..... 35
- A Clinical and Statistical Study on Endometriosis ..... *A. Abu-Musa,*  
*K. Takahashi, H. Nagata & M. Kitao* ..... 41
- Effect of Danazol and Buserelin on Glycoconjugate Distribution  
in Ovarian Endometriosis ..... *H. J. Huang, T. Iahimaru,*  
*A. Fujishita & T. Yamage* ..... 44
- Evaluation of Hysteroscopy in the Diagnosis of Adenomyosis ..... *H. Ota* ..... 49
- Circulating Androgen Dynamics and Skin Lipids  
and Acne during Danazol Therapy ..... *K. Nakamura, I. Kondo, T. Hayashi,*  
*T. Kimura, M. Ohosawa, O. Narita,*  
*Y. Ogino, K. Matunaga, R. Hayakawa,*  
*K. Matuzawa, Y. Ishihara, H. Oguri,*  
*T. Mizutani, N. Suganuma & Y. Tomoda* ..... 56

|  |  |     |
|--|--|-----|
| Clinical and Laboratory Evaluation of Patients<br>with Premature Ovarian Failure<br>in 7 University Hospitals .....  | <i>Y. Nagata, T. Dochi, T. Utsunomiya,<br/>G. Nakamura, T. Ishimaru, I. Miyakawa,<br/>H. Mori &amp; H. Okamura</i> .....   | 63  |
| The Origin of Blighted Ovum .....  | <i>S. Chida, M. Suzuki,<br/>L. Mettler &amp; K. Semm</i> .....   | 70  |
| The Incidence and Morphology of Transformed Embryos<br>in the Course of Blastocyst Formation<br>in Four Mammalian Species .....  | <i>I. Yotsutani,<br/>S. Niimura &amp; K. Ishida</i> .....  | 74  |
| Effects of Ultrasound-guided Follicular Needle Puncture (NP)<br>on Infertility with Luteinized Unruptured<br>Follicle (LUF) .....  | <i>S. Yamashita, T. Michioka, K. Shimamura,<br/>M. Kobayashi, A. Narimatsu &amp; T. Ito</i> .....  | 83  |
| Serum Testosterone Levels in Polycystic Ovarian Syndrome<br>—A Comparison of Testosterone Kits and the Relation<br>with free-Testosterone— .....   | <i>K. Yoshino, K. Takahashi, Y. Eda,<br/>H. Kurioka, A. Manabe &amp; M. Kitao</i> .....  | 89  |
| A New Criteria for Choosing a Bromocriptine<br>Therapy .....   | <i>T. Tsuji, M. Nishida, T. Kubo &amp; H. Iwasaki</i> .....  | 93  |
| Evaluation of Pure FSH in Use for Hyperstimulation<br>in IVF-ET and GIFT Program .....   | <i>T. Mori, Y. Noda,<br/>H. Kanzaki, K. Tatsumi, M. Hiroi,<br/>H. Saito, A. Yazima, T. Fukaya,<br/>M. Igarashi, M. Seki, R. Iizuka,<br/>K. Tababe, H. Minaguchi, T. Uemura,<br/>A. Fujii, M. Inoue, Y. Kobayashi,<br/>T. Aono, S. Yamano, T. Ohno, T. Oda,<br/>E. Watanabe, N. Furuhashi, T. Sugiyama &amp; K. Kamei</i> ..... | 101 |
| Presence of Endothelin-1 in High Concentrations<br>in Rat Ovaries .....  | <i>S. Usuki</i> .....  | 110 |
| The Influences of Complete Freund's Adjuvant on the Maintenance<br>of Pregnancy of Surrovaluated CBA/JJcl Female Mice Mated<br>with DBA/2JJcl Male Mice .....  | <i>M. Kosugiyama, H. Mori,<br/>T. Tabata &amp; Y. Shoda</i> .....  | 114 |
| Effective Route, Dose and Time of the Antiprogesteron<br>Compound RU486 Administration to Prevent Gestation<br>in Rabbits .....  | <i>T. Sankai, T. Endo, K. Kanayama,<br/>Y. Sakuma, M. Umezu &amp; J. Masaki</i> .....  | 118 |
| Assessment of Tubal Competency by The American Infertility<br>Society (A. F. S.) Classifications of Adnexal Adhesions<br>and Distal Tubal Occlusion: Indication of Microsurgery<br>and In Vitro Fertilization (IVF-ET) ..... | <i>M. Nakatsuka, N. Yoshida,</i>   |     |

|   |   |     |
|---|---|-----|
|   | <i>K. Nagoshi, Y. Hirano, T. Katayama,</i><br><i>S. Taga, J. Noma, K. Shimizu &amp; K. Sekiba</i> .....   | 125 |
| The Clinical Application and Results of Intrafallopian Transfer<br>of 4~8 Cell Stage Embryo (EIFT) .....              | <i>C. Okabe,</i><br><i>A. Tanaka &amp; M. Takada</i> .....  | 131 |
| Experience in Transvaginal Tubal Embryo Stage<br>Transfer (TV—TEST) .....   | <i>A. MORI, T. Oki, K. Takeuchi,</i><br><i>S. Yamamoto, S. Fukumoto,</i><br><i>T. Douchi &amp; Y. Nagata</i> .....  | 138 |
| Effects of Low Dose Oral Contraceptives on Plasma Lipids<br>and Lipoproteins .....                                    | <i>T. Sakamoto, M. Ogino, T. Yamamoto,</i><br><i>A. Kambegawa, H. Mori, T. Kobayashi,</i><br><i>S. Okinaga, K. Arai, T. Sako &amp; S. Motoyoshi</i> .....       | 142 |
| Estrogen Progesterone Cyclic Therapy of A Tall Girl<br>with Marfan Syndrome .....                                     | <i>T. Oki, T. Douchi, T. Matsumoto,</i><br><i>Y. Nakamura, A. Mori, S. Yamamoto,</i><br><i>K. Iio &amp; Y. Nagata</i> .....                                     | 148 |
| The Aging of Hypothalamo—Pituitary—Testicular Axis.<br>III: Testicular Endocrine Function<br>in Male Senescence ..... | <i>N. Mikuma,</i><br><i>Y. Kumamoto &amp; H. Maruta</i> .....   | 152 |
| Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Human Spermatozoa<br>The 2nd Report—HOS Test— .....                          | <i>H. Yoshida, T. Fukaya,</i><br><i>A. Tsuiki, H. Tozawa, Y. Mandai,</i><br><i>T. Murakami, W. I. Chan, S. Chida,</i><br><i>M. Tamura &amp; A. Yajima</i> ..... | 157 |
| The Effect of Kallikrein on Human<br>Sperm Capacitation .....   | <i>N. Sofikitis, I. Miyagawa, T. Harada,</i><br><i>T. Toda, Y. Mio &amp; N. Terakawa</i> .....  | 163 |
| Twelve Cases of Immotile spermatozoa<br>in Infertile Males .....  | <i>H. Kawahara &amp; H. Tanaka</i> .....  | 167 |
| Clinical Evaluation of Ketotifen Therapy for Patients<br>with Idiopathic Oligozoospermia .....                        | <i>S. Yamane, T. Oheda,</i><br><i>M. Yoshida, H. Ohmori, T. Ohashi,</i><br><i>A. Nagai &amp; Y. Yamashita</i> .....   | 172 |
| Clinical Effects of Ninjinyoeito with Keishibukuryogan<br>on Male Infertility .....                                   | <i>H. Ishikawa, H. Z. Tao, F. Manabe,</i><br><i>S. Yoshii &amp; K. Koiso</i> .....  | 177 |

## プロラクチノーマ治療後妊娠例における妊娠中 および産後のプロラクチン値の推移について

Changes in the Serum Prolactin Levels during Pregnancy and after Delivery  
in Hyperprolactinemic Women with Prolactin Producing Pituitary Adenoma

群馬大学医学部産科婦人科学教室

小 此 木 孝 佳      伊 吹 令 人      五十嵐 正 雄  
Takayoshi OKONOGI      Yoshito IBUKI      Masao IGARASHI

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Gunma University, School of Medicine, Maebashi 371, Japan

経蝶形骨洞的腺腫摘出術 (Ope 群), Bromocriptine 療法 (BC 群), その併用療法 (Ope+BC 群) により妊娠分娩に至った Prolactinoma 婦人 51 例について妊娠中および産後の血中 Prolactin (PRL) 値の推移を検討した。Ope 群では妊娠中 PRL 値は正常域以下で産後も高プロラクチン血症の再発を認めず全例に自然排卵を認めた。Ope+BC, BC 群では妊娠末期の PRL 値により A 正常域以上 ( $>300\text{ng/ml}$ ), B 正常値 ( $150\sim300\text{ng/ml}$ ), C 正常域以下 ( $<150\text{ng/ml}$ ) に分けて検討した。産後授乳中止後の PRL 値 ( $M\pm S E$ ) と自然排卵率はそれぞれ Ope+BC 群で  $A 291\pm90\text{ ng/ml}$ ,  $0\%$ ;  $B 67\pm38\text{ ng/ml}$ ,  $20\%$ ;  $C 30\pm7\text{ ng/ml}$ ,  $33\%$ ; BC 群で  $A 92\pm26\text{ ng/ml}$ ,  $11\%$ ;  $B 64\pm11\text{ ng/ml}$ ,  $25\%$ ;  $C 37\pm5\text{ ng/ml}$ ,  $36\%$  であり両群とも C が産後の PRL 値は最も低く自然排卵率は最も高かった。以上より妊娠中および産後の PRL 値の推移を連続的に観察することにより、分娩後の排卵に関する予後の予測が可能である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 1-6, 1992)

### はじめに

Prolactin (PRL) 産生下垂体腺腫の治療には経蝶形骨洞的腺腫摘出術 (Hardy 手術) による手術療法 (Ope 群) と、ドーパミン作動薬である Bromocriptine (BC) を投与する薬物療法 (BC 群) がある。手術療法のみで PRL の下降が不十分な例に対しては術後に薬物療法の併用 (Ope+BC 群) が行われている。これらの治療法により PRL 産生下垂体腺腫の予後はよく排卵率、妊娠率も高率であることをわれわれは以前に報告した<sup>1-3)</sup>。また妊娠、分娩後に PRL 値が下降し、なかには自然排卵の回復する例もあるという報告があり<sup>4-9)</sup>、われわれもこのような例について報告した<sup>10)</sup>。

これまで PRL 産生下垂体腺腫治療後妊娠例における妊娠中および産後の血中 PRL 値を連続的に観

察した報告はほとんどなく、われわれは今回これらについて連続的に観察し、その予後について若干の知見を得たので報告する。

### 対象と方法

PRL をはじめとする血中諸ホルモン検査、頭部単純 X 線写真、頭部 CT 等により PRL 産生下垂体腺腫と診断され、Ope, Ope+BC, BC の治療により妊娠し、満期産にて分娩に至り産後も follow できた 51 例 63 回妊娠を対象とした。症例の内訳を Table 1 に示す。Ope+BC 群, BC 群は clomiphene, hMG-hCG 併用例も含まれている。

Basal PRL level は  $4215\sim30.5\text{ng/ml}$ 、年齢は 22~43 歳、産後の追跡期間は 3~63 か月、治療前月経状態は続発 2 度無月経 33 例、続発 1 度無月経 12 例、原発 2 度無月経 2 例、稀発月経 3 例、無排卵周

Table 1. Subjects and treatment methods

|                   | Treatment | No. of patient<br>(Delivered<br>Twice) | No. of Term<br>Pregnancies |
|-------------------|-----------|--|----------------------------|
| Macroprolactinoma | Ope       | 5 ( 1)                                 | 6                          |
|                   | Ope + BC  | 11 ( 1)                                | 12                         |
|                   | BC        | 8 ( 0)                                 | 8                          |
| Microprolactinoma | Ope       | 2 ( 1)                                 | 3                          |
|                   | Ope + BC  | 5 ( 2)                                 | 7                          |
|                   | BC        | 20 ( 7)                                | 27                         |
| Total             |           | 51 (12)                                | 63                         |

Table 2. Number of term pregnancies differentiated by term-pregnancy PRL levels

|          |                   | Term-pregnancy PRL levels                    |   |  |
|----------|-------------------|--|---|--|
|          |                   | Above normal range<br>(300ng/ml<)<br>Group A | Normal range<br>(150~300ng/ml)<br>Group B | Below normal range<br>(150ng/ml>)<br>Group C |
| Ope + BC | Macroprolactinoma | 4  | 3   | 5  |
|          | Microprolactinoma | 4  | 2   | 1  |
|          | Total             | 8  | 5   | 6  |
| BC       | Macroprolactinoma | 3  | 3   | 2  |
|          | Microprolactinoma | 6  | 9   | 12   |
|          | Total             | 9  | 12  | 14   |

期症 1 例であり全例に月経異常を認めた。これらの症例の治療前、妊娠中、産後の血中 PRL 値を二抗体法による Radioimmunoassay により測定した。妊娠中はおおむね 2~4 週毎、産後は 1 ヶ月検診時に採血し、その後はおおむね 3~6 か月毎に来院させ採血した。採血は午前 9 時から 12 時までの間に行った。

BC 投与は妊娠が判明した時点で中止した。妊娠中頭痛、視野障害のため妊娠中 BC を投与した例が 6 例あったが、これらについては以前に報告した<sup>11)</sup>ので、今回は妊娠中 BC 投与を行っていない 51 例のみを対象とした。産後月経、排卵の有無、乳汁分泌の状態を調べた。乳汁分泌の評価は児の哺乳状況により母乳を Good、混合を Moderate、人工を Poor とした。産後、無月経、乳汁漏出のため BC を再度投与した例については、BC 投与前までを追跡期間とした。

Control として正常妊婦 65 例について妊娠中 2~4 週毎に血中 PRL 値を測定し、Mean±1SD を妊娠中の正常範囲とした。PRL の Radioimmunoassay はアメリカ NIADDK (National Institute of

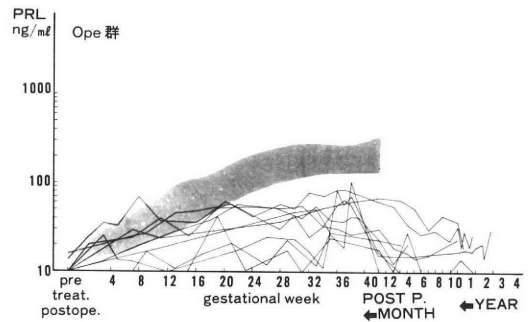


Fig. 1 Changes in the serum PRL levels in Ope group. Shaded area represents normal range during pregnancy.

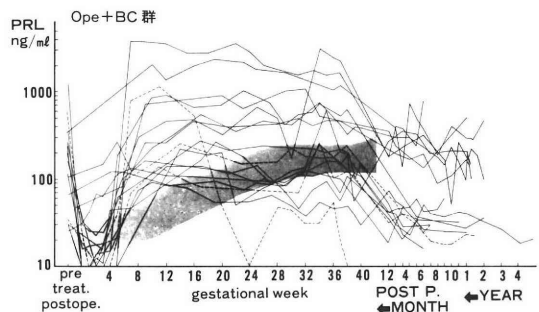


Fig. 2 Changes in the serum PRL levels in Ope+BC group. The dotted lines belong to the patients who restored spontaneous ovulation after delivery.

Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney disease) より提供された Kit を使用した。統計処理は Duchan's Multiple Range test,  $\chi^2$  test を用い、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 成 績

Ope 群では Figure 1 に示すように妊娠中の PRL 値は正常範囲ないしそれ以下で分娩後も高プロラク

チン血症の再発はなかった。分娩後は全例が再潮し、自然排卵を認めた。

Ope+BC 群, BC 群については妊娠末期の PRL 値が A 正常域以上 ( $>300\text{ng/ml}$ ), B 正常域 ( $150\sim300\text{ng/ml}$ ), C 正常域以下 ( $150\text{ng/ml}<$ ) に分けて検討を行った。内訳を Table 2 に示す。

Ope+BC 群では Figure 2 に示すように妊娠初期は BC 投与のため PRL は低値になっているが妊娠が判明し, BC の中止とともに PRL 値は術後の BC 投与前値程度まで上昇し, 以後はおおむねプラトーであった。産後は  $100\text{ng/ml}$  以上の高値群 7 例と  $100\text{ng/ml}$  以下の低値群 12 例の 2 群にわかれた。低値群 12 例中 3 例 (25%) に自然排卵がみられたが高値群には自然排卵を認めた症例はなかった。分娩後 6 ヶ月～1 年後の授乳中止時の PRL 値は  $A\ 291\pm$

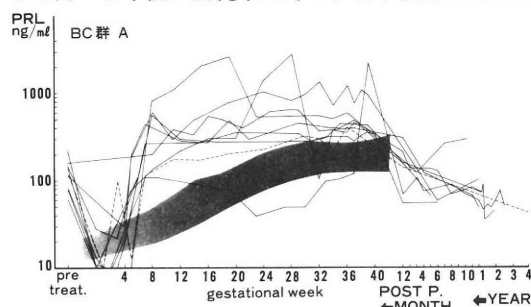


Fig. 3 Changes in the serum PRL levels in BC group whose term-pregnancy PRL levels were above normal range. The dotted line belongs to the patient who restored spontaneous ovulation after delivery.

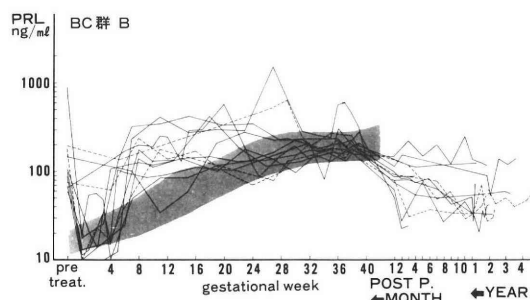


Fig. 4 Changes in the serum PRL levels in BC group whose term-pregnancy PRL levels were between normal range. The dotted lines belong to the patients who restored spontaneous ovulation after delivery.

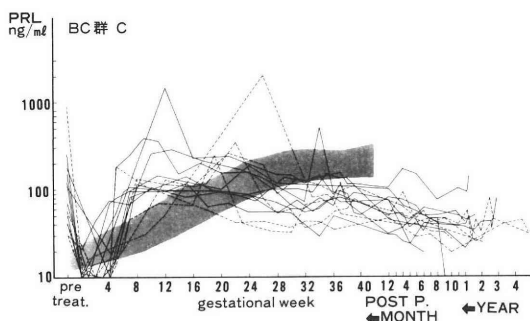


Fig. 5 Changes in the serum PRL levels in BC group whose term-pregnancy PRL levels were below normal range. The dotted lines belong to the patients who restored spontaneous ovulation after delivery.

Table 3. Pre-and post-pregnancy PRL levels and spontaneous ovulation ratios differentiated by term-pregnancy PRL levels

| Treatment | Classification Term-preg. PRL levels | No. of Term Pregnancy | Pre-pregnancy (ng/ml) | After Delivery (ng/ml) | Spontaneous Ovulation (%) |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| Ope + BC  | Group A ( $300\text{ng/ml}<$ )       | 8                     | $290\pm87$            | $291+90$               | 0 (0%)                    |
|           | Group B ( $150\sim300\text{ng/ml}$ ) | 5                     | $109\pm40$            | $67+38$ *              | 1 (20%)                   |
|           | Group C ( $150\text{ng/ml}>$ )       | 6                     | $227\pm81$            | $30+7$                 | 2 (33%)                   |
| BC        | Group A ( $300\text{ng/ml}<$ )       | 9                     | $124\pm16$            | $92+26$                | 1 (11%)                   |
|           | Group B ( $150\sim300\text{ng/ml}$ ) | 12                    | $177\pm68$            | $64+11$ *              | 3 (25%)                   |
|           | Group C ( $150\text{ng/ml}>$ )       | 14                    | $156\pm60$            | $37+5$                 | 5 (36%)                   |

Mean  $\pm$  SE \*  $P < 0.01$

Table 4. Relationship between puerperal lactation and spontaneous ovulation after delivery

|          | Spontaneous<br>Ovulation<br>after delivery | Lactation |              |          | Total |
|----------|--|-----------|--------------|----------|-------|
|          |  | Good (%)  | Moderate (%) | Poor (%) |       |
| Ope      | (+)  | 2 (22%)   | 3 (33%)      | 4 (45%)  | 9     |
| Ope + BC | (+)  | 0 (0%)    | 2 (67%)      | 1 (33%)  | 3     |
|          | (-)  | 11 (69%)  | 4 (25%)      | 1 (6%)   | 16    |
| BC*      | (+)  | 3 (33%)   | 5 (56%)      | 1 (11%)  | 9     |
|          | (-)  | 19 (73%)  | 7 (27%)      | 0 (0%)   | 26    |

$$*P < 0.05 \quad \chi^2 = 6.168$$

90 ng/ml, B 67±38 ng/ml, C 30±7 ng/ml と妊娠末期の PRL 値が低い群ほど低くなった。A-C 間 ( $P < 0.01$ ), B-C 間 ( $P < 0.01$ ) に有意差を認めた。産後自然排卵の回復は A 0 例 (0%), B 1 例 (20%), C 2 例 (33%) と有意差はなかったが妊娠末期の PRL 値が低い群ほど高くなる傾向を認めた (Table 3)。

BC 群では妊娠初期は BC 投与により PRL 値は低値となっているが、妊娠が判明し、BC 投与を中止とするとともに治療前値近くまで上昇した。その後妊娠末期の PRL 値により前述の如く A, B, C 群に分類して検討を行った (Figure 3, 4, 5)。Table 3 に示すように分娩後 6 カ月～1 年後の授乳中止時の PRL 値は A 92±26 ng/ml, B 64±11 ng/ml, C 37±5 ng/ml と妊娠末期の PRL 値が低いほど低くなった。A-C 間 ( $P < 0.01$ ) に有意差を認めた。産後自然排卵の回復は A 1 例 (11%), B 3 例 (25%), C 5 例 (36%) と有意差はなかったが妊娠末期の PRL 値が低い群ほど高くなる傾向を認めた。

CT では BC 群の自然排卵回復例の 2 例に治療前と比べ分娩後に腫瘍の縮小がみられた。

Table 4 に示すように産後の乳汁分泌は Ope 群では不良な例が 9 例中 4 例 (45%) と良好例, 中等例に比べ多かった。Ope+BC 群, BC 群では自然排卵が回復した例では回復しない例に比べ乳汁分泌が良好な例の割合 (0/3, 0%; 3/9, 33%) が少なかった。BC 群で有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。

## 考 察

Ope 群に関しては 1985 年成田ら<sup>12)</sup>, 1989 年近藤ら<sup>4)</sup>の報告があるが、妊娠中の PRL 値は正常範囲ないしそれ以下であるという点でわれわれの成績と一致していた。Ope 群は手術により腫瘍を完全に摘出できた症例で、残存する下垂体の lactotroph の数が減少するため妊娠中 estrogen の刺激によっても PRL 値が正常人より低値傾向にあると考えられる。分

娩後も高プロラクチン血症の再発はなく、全例に自然排卵がみられた。しかし産後乳汁分泌は PRL 低値のため不良な例が多かった。これも成田らの報告<sup>12)</sup>と同様である。

Ope+BC 群は Ope を行ったが腫瘍が残存した例で PRL 下降が不十分なため術後に BC の投与を行い、PRL を抑制し、排卵を誘発することにより妊娠に成功した。Ope+BC 群, BC 群では妊娠が判明し BC 投与を中止すると PRL 値は治療前値近くまで上昇し、おそらく estrogen の刺激もあって妊娠初期は高値をとる。その後妊娠中から PRL 値がしだいに下降し、妊娠末期には正常域以下となる例は産褥期に再潮がみられたり、排卵が回復したりする例があることに気付き、妊娠末期の PRL 値により分類する方法を検討することとした。1983 年 Anderson ら<sup>13)</sup>も BC 投与により妊娠に到った高プロラクチン血症 15 例 17 妊娠について、妊娠中の PRL 値の変化を調べたところ、10 例に妊娠中から PRL 値がしだいに下降し、妊娠末期には正常域以下となり、分娩後 PRL 値が治療前より有意に低下したと報告している。

Ope+BC 群, BC 群において分娩後 PRL 値が治療前より下降するという報告はこれまでもあり、妊娠、分娩という現象が Prolactinoma に好影響をおよぼすということが示唆されている<sup>4-9)</sup>。なかには PRL 値が正常化し自然排卵の回復する例も認められ、このことは Prolactinoma の寛解を意味する。Prolactinoma が妊娠、分娩を繰り返すことにより縮小し PRL 値が下降する例があるということは Prolactinoma の natural history を論ずるうえでたいへん興味深いことである。治療方針をたてる際、妊娠中頭痛、視野障害の出現の可能性の少ない Microprolactinoma の挙児希望者では、妊娠し、分娩させることを治療法の第一選択とすべきである。

妊娠中から PRL 値が正常域以下に下がる例があることから、Prolactinoma の縮小はすでに妊娠中から起こる考えられる。縮小の起こる機序としては

胎盤からの多量の estogen により Prolactinoma が膨大し腫瘍内に循環障害, すなわち Microinfarction が起こり腫瘍が縮小すると考えられてきた<sup>4)</sup>。

また, 比較的 PRL 値が低くても排卵のない例, PRL 値が高くても排卵のある例があり, これには PRL の heterogeneity が関与していると考えられる<sup>14)</sup>。すなわち生物活性の低い big PRL, big big PRL を多く含む例では Radioimmunoassay での値が高くても, 排卵がおこると考えられ, heterogeneity との関連も今後の課題である。

妊娠末期の PRL 値が低い群ほど分娩後の PRL 値が低く, 自然排卵の回復率が高いことより, 妊娠末期あるいは産後の PRL 値の推移により, 分娩後の排卵あるいは再潮に関する予後を予測できることが明らかになった。したがって妊娠中から連続的に PRL 値の推移を観察することが重要である。

Acknowledgment. We are grateful to NIADDK for their kind supply of RIA kit of PRL.

#### 文 献

- 1) 伊吹令人, 小此木孝佳: PRL 産生下垂体腺腫の薬物療法, 産と婦, 56: 849, 1989
- 2) 伊吹令人, 吉田光典, 新川唯彦, 田口宏中, 高橋義孝, 五十嵐正雄: Prolactinoma の診断と治療, 東京医学, 89: 229, 1982
- 3) 伊吹令人, 田口宏中, 五十嵐正雄: Prolactin 産生下垂体腺腫の治療別妊孕性と妊娠予後, 産婦の実験, 34: 263, 1985
- 4) Kondo, I., Suganuma, N., Kimura, T., Matsuzawa, K., Osawa, M., Masahashi, T., Mizutani, S., Narita, O., Tomoda, Y.: Effects of pregnancy, delivery and lactation in hyperprolactinemia with prolactin producing pituitary adenoma, 日産婦誌, 41: 595, 1989
- 5) Rassmussen, C., Bergh, T., Nillis, S. J., Wide, L.: Return of menstruation and normalization of prolactin in hyperprolactinemic women with bromocriptine-induced pregnancy, Fertil. Steril., 44: 31, 1985
- 6) Sato, O., Daibo, M., Kobayashi, K., Akagawa, S., Tanaka, S.: Remission of hyperprolactinemia during and after pregnancy in hyperprolactinemic women, Clin. Endocrinol., 31: 933, 1983
- 7) Gemzell, C., Wang, C. F.: Outcome of pregnancy in women with pituitary adenoma, Fertil. Steril., 31: 363, 1979
- 8) Bergh, T., Nillis, S. J., Larsson, S. G., Wide, L.: Effects of bromocriptine-induced pregnancy on prolactin producing pituitary tumors, Acta Endocrinol. (Copenh), 98: 333, 1981
- 9) Goto, T., Narita, O., Suganuma, N., Suzuki, M., Tomoda, Y., Kuwayama, A., Kageyama, N.: Successful pregnancies in patients with hyperprolactinemia—clinical and endocrinological studies on mothers and babies, 日産婦誌, 35: 550, 1983
- 10) 伊吹令人, 小此木孝佳, 五十嵐正雄: Prolactinoma の寛解例について, 日産婦誌, 41: 1263, 1989
- 11) 伊吹令人, 田口宏中, 吉田光典, 新川唯彦, 水沼英樹, 五十嵐正雄: 妊娠中の Macroprolactinoma 5例に対する長期連続 Bromocriptine 療法, 日不妊会誌, 31: 379, 1986
- 12) Narita, O., Kimura, T., Suganuma, N., Osawa, M., Mizutani, S., Masahashi, T., Asai, M., Tomoda, Y.: Relationship between maternal prolactin levels during pregnancy and lactation in women with pituitary adenoma, 日産婦誌, 37: 758, 1985
- 13) Anderson, A. N., Starup, J., Tabor, A., Jensen, H. K., Westergaard, J. G.: The possible prognostic value of serum prolactin increment during pregnancy in hyperprolactinemic patients, Acta Endocrinol., 102: 1, 1983
- 14) Malarkey, W. B., Jackson, R., Wortsman, J.: Long-term assessment of patients with macroprolactinemia, Fertil. Steril., 50: 413, 1988

#### Changes in the serum prolactin levels during pregnancy and after delivery in hyperprolactinemic women with prolactin producing pituitary adenoma

Takayoshi Okonogi, Yoshito Ibuki  
and Masao Igarashi

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Gunma University, School of Medicine,  
Maebashi 371, Japan

The authors investigated the changes in the serum prolactin (PRL) levels during pregnancy and after delivery in 51 hyperprolactinemic women with PRL producing pituitary adenoma who were successfully treated by transsphenoidal surgery (Ope group), bromocriptine (BC group), or a combination of the two (Ope+BC group). Blood samples were collected in pretreatment, every 2–4 week during pregnancy, every 3–6 month after delivery. In Ope group PRL levels were below normal range during pregnancy and all patients had spontaneous ovulation after delivery. In Ope+BC and BC group, when classified according to the term—pregnancy serum

PRL concentrations,  $\text{PRL} \geq 300\text{ng/ml}$  (Group A),  $150\text{ng/ml} < \text{PRL} < 300\text{ng/ml}$  (Group B),  $\text{PRL} \leq 150\text{ng/ml}$  (Group C), the serum PRL levels after delivery and the ratios of spontaneous ovulation (%) in group A, B and C were  $291 \pm 90\text{ng/ml}$ , 0%;  $67 \pm 38\text{ng/ml}$ , 20%;  $30 \pm 7\text{ng/ml}$ , 33% respectively in Ope+BC group and  $92 \pm 26\text{ng/ml}$ , 11%;  $64 \pm 11\text{ng/ml}$ , 25%;  $37 \pm 5\text{ng/ml}$ , 36% respectively in BC group. Lactation was poor in most of the women who restored spontaneous ovulation because of low PRL

levels. In both Ope+BC and BC group, group C with the lowest term-pregnancy serum PRL levels has the lowest serum PRL levels after delivery, and the highest spontaneous ovulation ratio. These results suggest that we can predict the prognosis of the hyperprolactinemic women with PRL producing pituitary adenoma by observing the changes of the serum PRL levels during pregnancy and postpartum.

(受付: 1991 年 8 月 15 日特掲)

## 高 Prolactin (PRL)血性無月経例の 産褥性機能と授乳との関連

### The Effects of Pregnancy and Lactation on Patients with Hyperprolactinemia

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

東京大学医学部産婦人科教室

武谷雄二 水野正彦

Yuji TAKETANI Masahiko MIZUNO

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

---

高 Prolactin (PRL)血症婦人の分娩後の性機能に、授乳や血中の PRL 値がいかに影響するかを検討した。

妊娠前に無月経であった例の 57% に分娩後月経が発来したことから、妊娠自体が高 PRL 血症の病態に改善をもたらす可能性が示唆された。妊娠前 PRL 値が低値なほど性機能が改善した。妊娠後の PRL 値も低下する例が多いが、妊娠後にも比較的高度の高 PRL 値が持続する場合には月経の改善がみられなかった。したがって、高 PRL 血症婦人の分娩後の性機能の改善には妊娠前後の PRL 値が関与していると考えられている。しかし、授乳に関しては母乳のみの哺育例や授乳期間の長い例では分娩後の性機能回復が不良であった。一方、これらの例では妊娠前の PRL 値が高値であることから、必ずしも授乳様式が性機能の回復に影響したとは断定し難い。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 7-10, 1992)

---

#### はじめに

高 PRL 血性排卵障害婦人の性機能は、妊娠分娩後に改善することがある。一般に産後の授乳は性機能の回復に影響し、血中 PRL 値とも密接に関係するために、高 PRL 血症婦人の授乳様式と性機能との関係は極めて興味深い問題であるにも拘らず、これに関する詳細な研究は行われていない。そこで、今回授乳が高 PRL 血症婦人の分娩後の性機能にいかに関与するかを血中 PRL 値との関連において検

討した。

#### 対象方法

1978～1985 年の間で、高 PRL 血症 (血中 PRL 値  $\geq 30\text{ng/ml}$ ) の診断後に分娩を経験した 28 例の婦人を対象に、分娩後 1 年以上を経た時点での性機能を検討した。授乳中止後 3 ヶ月以上を経た時点での PRL 値を妊娠後の PRL 値とした。PRL は血清分離後に RIA にて測定した。

## 結 果

高PRL血症の原因はmacroadenoma (腫瘍径1 cm以上) 8例, microadenoma 9例, Chiari-Frommel 症候群 5例, 特発性 4例, empty-sella 症候群 1例, 薬剤誘発性 1例であり, 全例が月経障害および乳汁漏出を訴えた。月経障害は原発性無月経, 稀発性月経がそれぞれ1例ずつであり, 他の26例は続発性無月経であった。原発性無月経は第II度無月経であり, 続発性無月経の20例は第I度, 6例は第II度無月経であった。

adenoma 例では1例を除き, 経蝶骨洞的に腫瘍切除 (T. S. R.) を受け, そのうちmacroadenoma 1例, microadenoma 2例がT. S. R.のみで妊娠に到っている。他のadenoma 例及び非腫瘍例では, bromocriptine, clomiphene, hMG+hCG 療法による排卵誘発を施行し妊娠に至った。

産後に自然月経が発来した例は16例 (57%) に認められた。平均月経発来時は産後10.4±2.9ヶ月であった。また, 原因疾患別ではmacroadenoma 2例, microadenoma 7例, Chiari-Frommel 症候群 3例, 特発性 2例, empty-sella 1例, 薬剤性 1例が産後に自然月経が発来した。すなわち, 腫瘍摘除をうけたmicroadenoma 例ではその75%に月経が発来したが, macroadenoma では25%とその発来率は低値であった。また, macroadenoma の1例とmicroadenoma の6例は自然月経発来後に自然妊娠に至った (図1)。

一方, 妊娠前のPRL値と産後性機能とを比較検討すると, 妊娠前PRL値が50ng/ml以下の例では88.8%に月経が発来したが, 50ng/ml以上の症例では36.8%に月経が発来したにすぎなかった。(図2)。

妊娠後PRL値は25例 (89.2%) において低下した。とくに月経発来例では全例が低下しており, PRL値は妊娠前後で577.7±11.5 ng/ml から24.7±5.9 ng/ml になった。しかし, 分娩後も無月経が持続

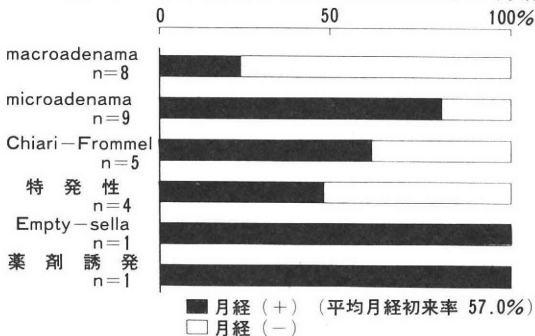


図1 高PRL血症の原因と産後性機能

した症例では妊娠前後でのPRL値は230.6±63.6 ng/ml から123.3±52.5 ng/ml と低下はしたが, 妊娠後も比較的高度な高PRL値症が持続するのが特徴的であった (図3)。なお妊娠中および分娩後に臨床的に下垂体腫瘍の増大や再発は認められなかった。

月経発来例では, 平均授乳期間は5.0±0.8ヶ月で, 無月経持続例の8.4±1.5ヶ月に比べて有意に短かった ( $P<0.05$ )。さらに授乳期間が3ヶ月以内の例においては全例に月経が発来したのに対して, 3~6ヶ月間授乳した例では54.8%, 6ヶ月以上の例では37.5%と授乳期間が長くなるにつれて月経の発来率が低下した。(表1)。また, 妊娠前のPRLが高値な程, 授乳期間が長期となる傾向がみられた。母乳のみで哺育を続けた例では月経発来率は22.2%であり, 混合栄養であった例の76.5%に比べて低値であった。一方, 母乳例の妊娠前PRL値は244.6±83.7 ng/ml であるのに対し, 混合栄養では69.4±13.0 ng/ml と有意な低値であった (表2)。授乳中止から月経発来までの期間は, 授乳期間が3~6ヶ月で7.1±4.3ヶ月, 6ヶ月以上の授乳で1.7±0.3ヶ月であった。すなわち, 授乳が長期間に及ぶにつれて月経発来までの期間は短くなる傾向が認められた。

## 考 察

本研究により高PRL血性排卵障害婦人は妊娠,

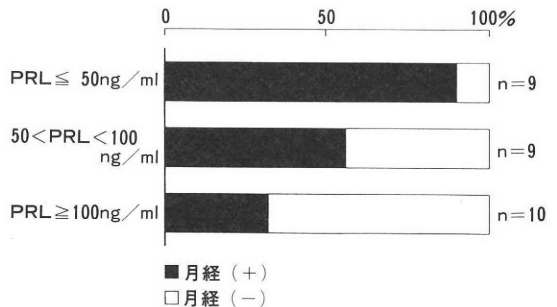


図2 妊娠前PRL値と産後性機能

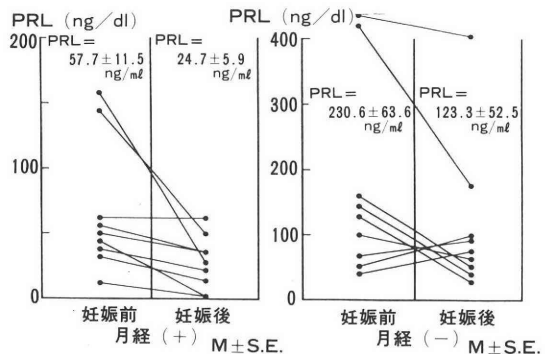


図3 妊娠前後のPRL値と性機能

表1 授乳期間と産後性機能の関連

| 授乳期間     | 産後の月経発来率 | 妊娠前 PRL 値<br>(ng/ml) |
|----------|----------|----------------------|
| ≤ 1 ヶ月   | 100%     | 48.5                 |
| 1 ~ 3 ヶ月 | 100%     | 23.8                 |
| 3 ~ 6 ヶ月 | 54.8%    | 107.0 ± 28.1         |
| ≥ 6 ヶ月   | 37.5%    | 207.5 ± 82.3         |

分娩を契機としてその性機能に改善がみられることが明らかになった。高 PRL 血症性排卵障害婦人の分娩後の性機能の改善についてはすでに Anderson<sup>1)</sup>や Bergh<sup>2)</sup>からも報告している。しかし、その改善率は 10~13% であり、今回の検討ではそれより高い傾向にあった。我々の症例には手術施行後の下垂体腺腫例が多く含まれており、腫瘍摘除後の PRL 値、すなわち妊娠前 PRL 値が従来の報告よりも低下していることが分娩後の性機能改善度を上昇させることに関与したと考えられる。しかし一方では adenoma 例でも microadenoma 例においては 77.7% に分娩後に自然月経が発来したのに対し、macroadenoma 例では自然月経発来率は 25% に過ぎず、原因疾患別にみた自然月経率では最も低率であった。腫瘍例での分娩後性機能回復の理由として妊娠により腫瘍が変性をおこす事などが報告されている。しかし、非腫瘍性高 PRL 血症性排卵障害婦人の分娩後においても性機能が回復したことは興味深い事実である。

分娩後の PRL 値は 90% の症例において妊娠前の値より低下していた。特に分娩後に自然月経が発来した例では分娩後の平均 PRL 値は著しく低下し、ほぼ正常値となった。これに対して、分娩後も無月経が持続する例では比較的高度な高 PRL 血症が持続していた。さらに、妊娠前の PRL 値が 50ng/ml 以上の症例では月経発来率が低下していた。一般に性機能の回復にはゴナドトロピン分泌能が直接的に関係しているが、本研究より PRL も産褥の性機能系の改善と密接な関連性を有することが示された。

bromocriptine 療法により妊娠した症例で分娩後に PRL 値が低下したり、排卵性月経周期が回復したことをすでに報告しているが<sup>3)</sup>、今回 bromocriptine 療法以外の排卵誘発にて妊娠した症例でも分娩後に PRL 値が低下し、自然月経が発来したことから分娩後の性機能や PRL 値に妊娠前の bromocriptine 療法が関係したというよりは、妊娠分娩そのものが改善因子となっている可能性が示唆された。

高 PRL 血症婦人の分娩後の PRL 値低下をきたす機序に対して Crosignani ら<sup>4)</sup>は妊娠中に腫大した下垂体組織が分娩後に梗塞をおこす可能性を示唆し、

表2 授乳状態と産後性機能

|            | 妊娠前 PRL 値<br>ng/ml | 月経発来率 |
|------------|--------------------|-------|
| 母乳哺育(n=9)  | 244.6 ± 83.7*      | 22.2% |
| 混合栄養(n=17) | 69.4 ± 13.0*       | 76.5% |

\* P &lt; 0.05

Isaacs<sup>5)</sup>は放射線学的に診断し得ない microadenoma の梗塞の関与を示唆しているが明確ではない。また、高 PRL 血症婦人では生理的にみられる妊娠中の PRL 値の上昇がみられないことから、エストロゲンに対する lactotrophs の反応性が妊娠分娩により変化する可能性も考えられる。

高 PRL 血症例の産褥期の授乳に関しては報告は少ない。授乳後には神経反射的に血中 PRL の一過性の上昇をきたすことから、授乳は下垂体腫瘍の発育を促すとの指摘もある。しかし妊娠自体が PRL 値の上昇をきたし、しかも長期間にわたっていることから、授乳による危険性は妊娠が及ぼす危険性より高いとは考え難い。我々も授乳中や授乳期間後に腫瘍増大を来した症例は経験していないし、非腫瘍例においても PRL 値の低下をみていることから、産褥期の授乳を中止する必要は無いと考えている。しかしながら、macroadenoma の非手術例では、腫瘍の増大に関する注意深い観察が必要となるであろう。

一般に高 PRL 血症性排卵障害婦人の母乳分泌量は不良と考えられているが<sup>6)</sup>、今回の授乳期も含めた検討では、人口乳による哺育例は 1 例であり、平均授乳期間が 4.9 ヶ月であったことは産褥後期以降には母乳分泌量は高 PRL 血症婦人においてもある程度保たれていることを示すものである。妊娠中の PRL 値上昇を欠如することが産後の乳汁分泌量の低下につながるといわれているが、適切な乳房管理および授乳意欲により母乳哺育はある程度確立されるものと考えられる。

今回、授乳期間が長期間に及ぶにつれて月経発来率が低下することが明らかになった。これは授乳にともない PRL 値の低下が妨げられ、性機能の改善が見られなかったことも否定できない。しかしながら、授乳期間が長い例には妊娠前 PRL 値が高値であった例が多く、そのため母乳分泌が良好であり、授乳中止後も妊娠前より持続する高度の高 PRL 血症が存在し無月経が持続したものと解釈するほうが妥当であろう。

したがって、授乳そのものが高 PRL 血症の程度により直接的に影響を受けることより、授乳が産褥

性機能改善に及ぼす影響に関してのなんらかの結論を導き出すことは困難といわざるを得ない。しかしながら、授乳により妊娠前より高PRL血症が進行したものは皆無であることより、授乳が少なくとも高PRL血症および産褥性機能に悪影響をもたらすものではないと考えられる。

#### おわりに

高PRL血症性排卵障害婦人においては妊娠、分娩を経過することにより自然月経が発来する例があり、妊娠自体が高PRL血症の病態に改善をもたらす可能性が示唆された。その機序には妊娠前後のPRL値が密接に関係していると考えられた。一方、授乳に関しては母乳のみの哺育例や授乳の長い例では、一般に分娩後の性機能回復が不良であったが、これらは妊娠前のPRL値が高値であることが多く、必ずしも授乳様式が性機能の回復に影響したとは断定し難い。

#### 文 献

- 1) Nyboe-Andersen, A., et al.: The possible prognostic value of serum prolactin increment during pregnancy in hyperprolactinaemic patient, *Acta Endocrinologica*, 102: 1, 1983
- 2) Bergh, T., et al.: Effective of bromocriptine-induced pregnancy on prolactin-secreting pituitary tumors, *Acta Endocrinologica*, 98: 333, 1981
- 3) 木下俊彦, 他: Bromocriptine 療法による妊娠例の Prolactin 値の変動ならびに産褥期の性機能, *臨婦誌*, 37: 733, 1983
- 4) Crosignani, P. G., et al.: Spontaneous and induced pregnancy in hyperprolactinemic women, *Obstet. Gynecol.*, 58: 708, 1981
- 5) Isaacs, A. J.: Resolution of hyperprolactinemia after bromocriptine-induced pregnancy, *Lancet*, 1: 784, 1979
- 6) 青野敏博他: Prolactinoma 症例の産褥期乳汁分泌について 間能下垂体機能障害調査研究班, 昭和 60 年度研究報告書, 厚生省, 288, 1986

### The effects of pregnancy and lactation on patients with hyperprolactinemia

Toshihiko Kinoshita and Junzo Kato

Department of Obstetrics and Gynecology  
Yamanashi Medical College,  
Yamanashi 409-38, Japan

Yuji Taketani and Masahiko Mizuno

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

Twenty-eight amenorrheic women with high serum prolactin levels have been investigated during pregnancies and lactation periods. Eight of the women had a macroadenoma; all of them underwent transsphenoidal resection and seven were given to induce ovulation with bromocriptine before pregnancy. Seven women with a macroadenoma became pregnant with bromocriptine after pituitary surgery, two shortly after the surgery. The other 11 women, varying etiology for hyperprolactinemia were treated with induced ovulation with bromocriptine and/or clomiphene before conception. No tumor complications developed during pregnancy and lactation. The prolactin level was measured in those patients, before pregnancy, at over 3 months post or cessation of lactation. The mean prolactin level of 25 women was decreased after pregnancy, especially in the group those spontaneous return of menstruation occurred (group A  $57.7 \pm 11.5 \text{ ng/ml}$  v. s.  $24.7 \pm 5.9 \text{ ng/ml}$ ). Amenorrhea persisted in the remaining patients, in this group prolactin level slightly decreased after pregnancy (group B  $230.6 \pm 63.6 \text{ ng/ml}$  v. s.  $123.3 \pm 52.5 \text{ ng/ml}$ ). There was significant difference of serum prolactin level between the group A and B, it was recognised in pre and post pregnancy period. The lactation period did not have any harmful influence on tumor development. Although pre and post pregnancy serum prolactin level partly affect menstrual function after pregnancy. The mechanism by which pregnancy itself may sometimes induce at least partial resolution of the hyperprolactinemic disorders is unknown.

(受付: 1991 年 5 月 14 日)

## E I A法を用いた1日1回の 血中LH測定による排卵予知

### Predicting of Ovulation by Once a Day Measurement of Serum LH Levels with EIA Method

順天堂大学医学部産婦人科学教室

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

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

当科不妊外来を受診した不妊症患者に対してE I A法を用いた1日1回の血中LH測定を行い、排卵予知が正確に行えるかどうかについて検討した。患者の内訳は自然周期群15例、22周期、clomiphene投与周期群41例、73周期であった。LH surge開始前(Day-4, Day-3)の血中LH値は $24.8 \pm 11.3$  mIU/ml (mean  $\pm$  S. D.)であり、mean + 2 S. D. = 47.6 mIU/ml からLH surgeの開始を45 mIU/ml以上とし、90 mIU/ml以上をLH surge peakとした。その結果、1) LH surge後24時間以内に排卵を認めた症例は、自然周期群で23周期中13周期、56.5%、clomiphene投与群で73周期中37周期、50.7%、両群あわせて96周期中50周期、52.1%であった。また、LH surge後48時間以内に排卵を認めた症例は、自然周期群で22周期、95.7%、clomiphene投与群で70周期、95.9%、両群あわせて92周期、95.8%であった。LH surgeの翌日に排卵した症例と翌々日に排卵した症例とで年齢による有意差は認められなかった。2) 血中LHが90 mIU/ml以上のpeak値を示した症例は、自然周期群で22周期中19周期、clomiphene投与群で73周期中53周期認められ、そのうち自然周期群では19周期中、翌日排卵例は13周期、68.4%、翌々日排卵例は6周期、31.6%であった。一方、clomiphene投与群では53周期中、翌日排卵例は20周期、37.7%、翌々日排卵例は33周期、62.3%とclomiphene投与群でpeak値から排卵までに時間を要する周期が多く見られた。3) 以上より、1日1回の血中LH測定による排卵予知は、精子の女性体内での受精能獲得および生存期間を考慮すれば、性交のタイミングやI U I (intrauterine insemination)の時期を決定する上で非常に有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 11-15, 1992)

#### 緒 言

不妊症治療において、排卵時期の予知を正確に行うことは妊娠率を向上させる上で非常に重要であることは言うまでもない。古くから基礎体温(BBT)の測定、頸管粘液検査などが行われており、加えて近年では経膈超音波による卵胞計測、血中、尿中の

LH, estradiol ( $E_2$ )の定量もしくは定性検査が排卵予知のために行われている。中でも血中LH値が排卵時期を最も正確に反映すると考えられているが、血中LH測定は尿中LH測定に比べて操作が煩雑であり、日々の診療の中で時間毎に採血することは不可能であることから、多くの施設では自己採尿による尿中LH測定を行っている。現在、尿中LH測定

簡易キットはいくつかのものが発売されているが、操作は簡便であるがその判定には習熟を要し、判断に迷うことがしばしばである。

そこでEIA法による1日1回のみの血中LH測定で排卵予知が正確に行えるかどうかについて検討した。

### 対象および方法

当科不妊外来を受診した不妊症患者のうち、HMG-HCG療法の症例をのぞく56例、96周期を対象とした。その内訳は、自然周期群15例、22周期、clomiphene投与周期群41例、73周期で、clomipheneの投与は月経周期5日目から100~150mg/dayを5日間内服投与とした。排卵の確認はすべて経腔超音波法（ソノビスタCS：持田社製）により行った。

経腔超音波で排卵確認をした日をDay 0とし、原則としてDay-3からDay-1まで連日LH測定を行い、その結果について検討した。

採血は午前10時に行い、単クローン抗体を用いたEIAキット（エルモテック持田：持田製薬）により、血中LH値を測定した。この測定系の変動係数は同時再現性4.3~7.5%，測定間再現性4.3~7.5%であった。その結果は午前11時30分に電話で報告し、LH surgeの開始と判断した日の午後もしくは夜に性交（intercourse）指示あるいは人工授精（IUI: intrauterine insemination）を施行した。

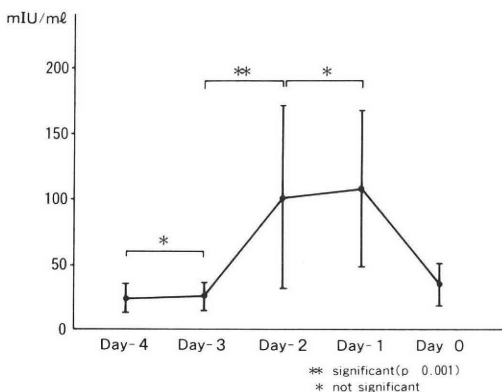


Fig. 1 血中LH値の推移 (mean±S. D.)

Table 1 血中LH値の推移 (mean±S.D.)

| Day    | n  | Mean LH (mIU/ml) | S.D. (mIU/ml) |
|--------|----|------------------|---------------|
| Day -4 | 36 | 23.9             | 10.9          |
| Day -3 | 54 | 25.4             | 11.5          |
| Day -2 | 72 | 101.6            | 71.1          |
| Day -1 | 93 | 108.8            | 61.3          |
| Day 0  | 56 | 35.3             | 16.6          |

対象群の平均年齢は、自然周期群で33.4±4.6歳、clomiphene投与周期群で32.4±4.0歳であり、両群間に有意差は認められなかった。

以後、連日のLH測定値と排卵との関係についてretrospectiveに検討を行った。

### 結 果

#### 1. LH値の推移

排卵を確認した日をDay 0とすると、Day-4からDay 0までの血中LH値は、それぞれDay-4: 23.9±10.9mIU/ml, Day-3: 25.4±11.5mIU/ml, Day-2: 101.6±71.0mIU/ml, Day-1: 108.8±61.3mIU/ml, Day 0: 35.3±16.6mIU/mlであり、Day-2と-1のLH値はDay-4と-3に比べ、有意に高値を示した (Table 1, Fig. 1)。

自然周期群とclomiphene投与群の血中LH値の推移は、自然周期群でDay-3: 34.1±10.9mIU/ml, Day-2: 87.9±44.2mIU/ml, Day-1: 114.9±14.5mIU/ml, Day 0: 34.6±14.5mIU/mlであり、clomiphene投与群ではそれぞれ23.6±11.0mIU/ml, 105.3±73.8mIU/ml, 106.8±62.9mIU/ml, 36.0±17.4mIU/mlであった (Table 2)。Day-3から-1の全てにおいて両群間にLH値の統計学的有意差を認めなかった。 (Fig. 2)。

#### 2. LH surgeの基準値

LH surge開始の基準値はDay-4および-3の血中LHの平均値から決定した。その平均値は24.8±

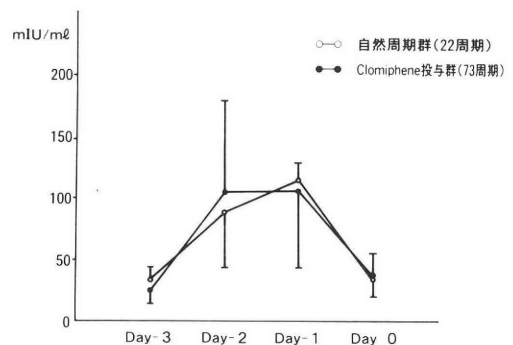


Fig. 2 両群の血中LH値の推移 (mean±S. D.)

Table 2 両群の血中LH値 (mean±S.D.)

|        | 自然周期群      | clomiphene 投与群 |
|--------|------------|----------------|
| Day -3 | 34.1±10.9  | 23.6±11.0      |
| Day -2 | 87.9±44.2  | 105.3±73.8     |
| Day -1 | 114.9±14.5 | 106.8±62.9     |
| Day 0  | 34.6±14.5  | 36.0±17.4      |

(mIU/ml)

11.3mIU/ml (mean  $\pm$  S. D.)であり, mean  $+2$  S. D., すなわち 47.6mIU/ml から LH surge の開始を 45mIU/ml 以上とし, その値の 2 倍の 90mIU/ml 以上を LH surge peak とした.

### 3. LH surge と排卵日との関係

LH surge と認めた時点から 24 時間後に排卵が確認された翌日排卵例は, 自然周期群で 23 周期中 13 周期, 56.5%, clomiphene 投与群では 73 周期中 37 周期, 50.7% であった. また, LH surge の 24 時間後に排卵を認めずに 48 時間後に排卵の認められた翌々日排卵例は自然周期群で 9 周期, 39.1%, clomiphene 投与群で 33 周期, 45.2% であった. 両群合わせると 96 周期中, 翌日排卵例 50 周期, 52.1%, 翌々

日排卵例 42 周期, 43.8% であり, 92 周期, 95.8% が LH surge から 48 時間以内に排卵を認めた (Table 3).

翌日排卵例と翌々日排卵例の LH surge と判断した時点の血中 LH 値 (mean  $\pm$  S. D.) はそれぞれ自然周期群では 138.2  $\pm$  49.6mIU/ml, 127.2  $\pm$  51.3mIU/ml, clomiphene 投与群では 152.2  $\pm$  55.8mIU/ml, 134.1  $\pm$  69.1mIU/ml で両群ともに統計学上の有意差は認められなかった. (Fig. 3).

### 4. LH peak と排卵日との関係

測定中に LH 値が 90mIU/ml 以上の peak を示した症例は, 自然周期群で 22 周期中 19 周期, clomiphene 投与群で 73 周期中 53 周期認められ, そのうち自然周期群では 19 周期中, 翌日排卵例は 13 周期, 68.4%, 翌々日排卵例は 6 周期, 31.6% であった. 一方, clomiphene 投与群では 53 周期中, 翌日排卵例は 20 周期, 37.7%, 翌々日排卵例は 33 周期, 62.3% と clomiphene 投与群で peak 値から排卵までに時間を要する周期が多く見られた (Table 4).

### 6. 年齢と排卵日との関係

翌日排卵例と翌々日排卵例の平均年齢は, 自然周期群でそれぞれ 35.1  $\pm$  4.7 歳, 32.8  $\pm$  4.1 歳で, clomiphene 投与群では 31.3  $\pm$  4.8 歳, 32.6  $\pm$  4.7 歳であり, 両群とも年齢による有意差は認められなかった.

## 考 察

排卵時期の予知は不妊症治療を行う上で非常に重要であり, 不妊外来においては排卵誘発とともにその根幹となるものである.

排卵時期を最も正確に反映するものは血中 LH 値であるが, 測定操作の簡便性から尿中 LH 測定キットがその代用として多く使われている. しかし筆者らの経験では, その判定には熟達を要し, 判定者間の誤差が生じ易く, 排卵を見逃す症例が少なからず認められたため血中 LH 測定に切り替えた. 測定精度を上げるためには一日の測定回数を増やせば良い

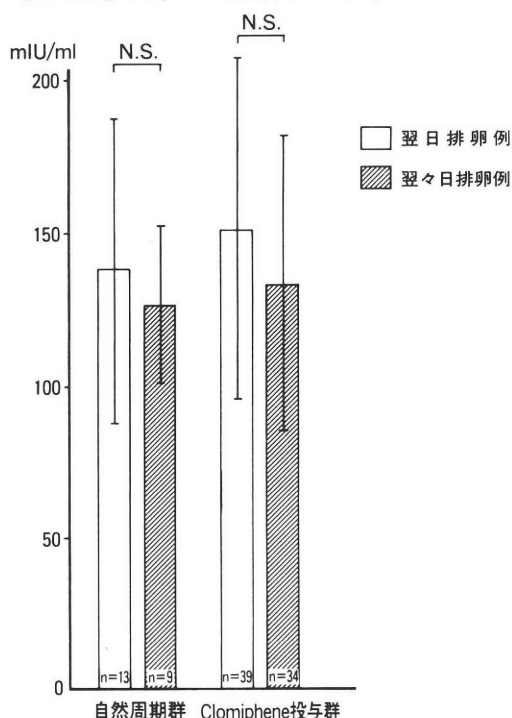


Fig. 3 ovulation time と LH 値 (mean  $\pm$  S. D.) との比較

Table 3 両群における LH surge 後の ovulation date

|                |        | 翌日排卵例 (%)  | 翌々日排卵例 (%) | Total (%)  |
|----------------|--------|------------|------------|------------|
| 自然周期群          | (23周期) | 13 (56.5%) | 9 (39.1%)  | 22 (95.7%) |
| clomiphene 投与群 | (73周期) | 37 (50.7%) | 33 (45.2%) | 70 (95.9%) |
| Total          | (96周期) | 50 (52.1%) | 42 (43.8%) | 92 (95.8%) |

Table 4 LH surge peak ( $\geq 90$ mIU/ml) 症例と ovulation time

|                |        | 翌日排卵例 (%)  | 翌々日排卵例 (%) |
|----------------|--------|------------|------------|
| 自然周期群          | (19周期) | 13 (68.4%) | 6 (31.6%)  |
| clomiphene 投与群 | (53周期) | 20 (37.7%) | 33 (62.3%) |

が、保険診療の枠内で行うには測定は6回までであり、また患者の負担を考えれば日常診療の中では1日に1回の血液採取が限度である。そこで今回、1日1回の血中LH測定により満足のいく排卵予知が可能かどうかについて検討した。

精子の女性体内での受精可能な時間は約48時間と報告されている<sup>1)</sup>。また、LH surge から排卵までの時間については多くの報告があり、Thomas らは LH surge 後約30時間で排卵が見られると報告しており<sup>2)</sup>、Feichtinger らは24~28時間<sup>3)</sup>、Lopata らは26~28時間<sup>4)</sup>、棕棒<sup>5)</sup>は31.4時間<sup>5)</sup>、高崎<sup>6)</sup>は41.0時間<sup>6)</sup>とその報告には幅がある。

今回の検討で LH surge 後24時間以内に排卵の見られた症例が52.1%、24時間以降48時間以内に排卵の見られた症例は43.8%であり、95.8%の症例が48時間以内に排卵を認めたことは、これらの報告と一致している。このように48時間までの幅が生じることをある程度考慮に入れた日常診療においては、精子の女性体内での受精能獲得までの時間および精子の生存期間から、1日に1回の血中LH測定のみで排卵を予測することはIUIのtimingを決定する上で十分に有効かつ有意義である。

また、1日1回の検査は保険診療の枠内で最高6日間まで行うことが可能であり、排卵日の一定しない症例でも排卵日を見逃すことが少なくなると考えられる。

LH surge と判断した時点から排卵までの時間は自然周期群と clomiphene 投与群との間に有意差は認められなかったが、LH peak との関連では、自然周期群において翌日排卵例が多く、clomiphene 投与群では翌々日排卵例が多く見られた。このような現象には clomiphene 投与による卵胞数の増加や主席卵胞径の増大などによる影響、さらに follicleogenesis の変化が関与している可能性が考えられる。

なお、LH surge から排卵までの時間に加齢による影響は認められなかったが、同一症例で各周期に一定の傾向が見られる個体差が存在するように思われた。

## 結 論

当科不妊外来を受診した不妊症患者に対してEIA法を用いた1日1回の血中LH測定を行い、排卵予知が正確に行えるかどうかを自然周期群15例、22周期、clomiphene 投与周期群41例、73周期について検討した。LH surge 開始前のDay-4、Day-3の血中LH測定値の統計処理により、LH surge の開始を45mIU/ml以上とし、90mIU/ml以上をLH surge

peak として検討した結果、LH surge 後24時間以内に排卵を認めた症例は、96周期中50周期、52.1%であり、LH surge 後48時間以内に排卵を認めた症例は92周期、95.8%であった。LH surge の翌日に排卵した症例と翌々日に排卵した症例とで年齢による有意差は認められなかった。また、血中LHが90mIU/ml以上のpeak値を示した症例は、自然周期群で22周期中19周期、clomiphene 投与群で73周期中53周期認められ、clomiphene 投与群でpeak値から排卵までに時間を要する周期が多く見られた。以上より、1日1回の血中LH測定による排卵予知は、精子の女性体内での受精能獲得および生存期間を考慮すれば性交のタイミングやIUIの時期を決定する上で非常に有用であると考えられた。

本論文の要旨は第35回日本不妊学会学術講演会(千葉)において発表した。

## 文 献

- 1) World Health Organization Scientific Group: Biology of fertility control by periodic abstinence, WHO Tech. Rep. Ser., 360: 15, 1967
- 2) Thomas, K., Ferin, J.: Comparative studies of LH levels in plasma and unconcentrated urine determined by radioimmunoassay and haemagglutination inhibition, Acta Endocrinol. Suppl., 141: 75, 1970
- 3) Feichtinger, W., Szalay, S., Beck, A., Kemeter, P., Janish, H.: Results of laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes from nonstimulated ovaries in an ongoing in vitro fertilization program, Fertil. Steril., 36: 707, 1981
- 4) Lopata, A.: In vitro fertilization and embryo transfer in treatment of infertility, Organor-ama, 18: 3, 1981
- 5) 棕棒正昌, 岡井 崇, 上妻志郎, 馬場一憲, 堤治, 木下勝之, 佐藤和雄, 水野正彦, 坂元正一: 超音波断層法による自然排卵過程の観察とそのホルモン動態との関係, 第36回日産婦講演会抄録集: 355, 1984
- 6) 高崎彰久, 上田一之, 田村晴代, 山下裕幸, 中村康彦, 猪口博臣, 新田 豊, 杉野法広, 宮内文久, 加藤 紘: 尿中LH測定キット「LHカラー」を利用した尿中LHの定量, 日本不妊学会誌, 34(3): 419, 1989

## Predicting of ovulation by once a day measurement of serum LH levels with EIA method

Satoshi Itoh, Makoto Iida,  
Hiroyuki Takeuchi, Masaru Fukuda  
and Michio Takada

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

The usefulness of once a day measurement of serum LH levels for predicting of ovulation was studied at our infertile clinic. The serum LH levels at 10:00 a. m. were measured daily from Day-3 until the end of ovulation by EIA method in 15 patients with spontaneous cycle and 41 patients with clomiphene-treated cycle. The LH levels immediately before LH surge were  $24.8 \pm 11.3$  mIU/ml. As the mean  $\pm 2$  S. D. of LH was 47.6 mIU/ml, it was determined for LH surge to begin when the level exceeded the level of 45 mIU/ml, and reach peak when the level was over 90 mIU/ml.

Consequently, the following results were obtained.

1) It was found that ovulation could be recognized within 24 hours after LH level was more than 45 mIU/ml in 13 of 23 cycles (56.5%) of spontaneous ovulation group, and 37 of 73 cycles (50.7%) of

clomiphene-treated group, totaling 50 of 96 cycles (52.1%). Moreover ovulation could be recognized within 48 hours after LH surge in 22 of 23 cycles (95.7%) of spontaneous ovulation group, and 70 of 73 cycles (95.9%) of clomiphene-treated group, totaling, 92 of 96 cycles (95.8%). No particular differences in the ages were found between those who ovulated within 24 hours and those within 48 hours. 2) It was found that serum LH value was more than 90 mIU/ml in 19 of 22 cycles of spontaneous ovulation group and 53 of 73 cycles of clomiphene-treated group. 13 of 19 cycles (68.4%) of spontaneous ovulation group ovulated within 24 hours, and 6 of 19 cycles (31.6%) within 48 hours. While in clomiphene-treated group, 20 of 53 cycles (37.3%) ovulated within 24 hours, and 33 of 53 cycles (62.3%) within 48 hours. Compared with spontaneous ovulation group, more cycles of clomiphene-treated group took time from peak to ovulation.

From these results, predicting of ovulation by LH measurement once a day was regarded to be of value in deciding the timing of intercourse and IUI in view of the capacitation and survival period of spermatozoa in female genitals.

(受付: 1991年4月10日)

## EXERCISE DECREASE THE PULSATILE SECRETION OF LUTEINIZING HORMONE

Noboru MESAKI, Junichi SASAKI, Yuichi NABESHIMA,  
Satoshi SOHDA and Hirokazu IWASAKI

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

---

**Abstract:** Five non-athletic women with normal ovulatory cycles were subjected to an investigation of episodic LH secretion before and after exercise. On 5th to 8th days of the follicular phase, blood samples were obtained via an indwelling venous catheter every 15 minutes for 3 hours before exercise, at the point of exhaustion during incremental exercise using cycle ergometer, and further every 15 minutes for 3 hours after exercise.

None of the subjects showed the signs of hyperprolactinemia. LH pulse frequencies were decreased significantly after exercise ( $p < 0.01$ ). However, there were no significant differences in pulse amplitude and mean level of LH before and after exercise. At the point of exhaustion during exercise, levels of prolactin and  $\beta$ -endorphin were increased significantly ( $p < 0.001$ ).

These data suggest that an increase of  $\beta$ -endorphin during exercise may cause to decrease pulsatile LH secretion after exercise.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 16-21, 1992)

---

### Introduction

During the past decade, the number of women participating in strenuous exercise has increased rapidly. Recent evidence indicating a causal relationship between athletic activity and a higher incidence of menstrual dysfunction. However, the mechanisms of exercise-induced menstrual dysfunction have not yet been clarified.

Three hypotheses have been put forward to account for exercise-induced menstrual dysfunction; 1) physical and/or psychological stress due to exercise, 2) loss of weight (body fat) due to dieting for control of body profile and/or exercising condition, 3) acute and/or chronic hormonal changes due to exercise. As we considered that the third hypothetical factor might be the most important, we investigated hormonal changes during exercise<sup>1-3)</sup> and hypothalamic-

pituitary function<sup>4,5)</sup> in female athletes.

Studies in both humans and animals have indicated that luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) are secreted intermittently by the pituitary<sup>6-8)</sup>. In this study, we investigated the effect of exercise on LH secretion profiles in non-athletic women during the middle follicular phase of their menstrual cycle.

### Materials and Method

#### A) Subjects and Blood Collection

Five non-athletic women, aged 18 to 22 years old, were subjected to an investigation of endocrinological responses to exercise. They measured their basal body temperature (BBT) every morning, and had normal ovulatory menstrual cycles. All subjects gave their informed consent. None was using or had previously used oral con-

traceptives. Studies were conducted on the 5th to 8th days of the follicular phase of the menstrual cycle in each women. The incremental exercise was performed using cycle ergometer<sup>1)</sup>.

After at leased 30 minutes rest, a venous catheter (18—gauge) was inserted into the left forearm vein. Blood samples were then obtained through an indwelling catheter every 15 minutes for 3 hours before exercise, at the point of exhaustion during incremental exercise, and further every 15 minutes for 3 hours after exercise. During the study, the subjects remained inactive sitting on a chair except for during exercise, and avoid sleep and oral intake of food and water.

B) Hormone Assays

The measurement methods of LH and prolactin in serum,  $\beta$ -endorphin in plasma were described previously<sup>9)</sup>.

C) Pulse Analysis

Pulsatile LH patterns were analyzed using a modification of the method of Santen and Bardin<sup>10)</sup> by Soules et al.<sup>11)</sup>. For each sampling series, measurement error was assessed based on assay replicate variability. A “pulse” was defined as nadir—to—peak increase two standard deviations greater than the assay variability. The pulse frequency was expressed as the number of pulses per 3 hours (times/3 hrs). The pulse amplitude was calculated from the nadir to apex of the pulse.

D) Statistical Methods

Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Student’s t—test was conducted for statistical analysis, and differences were con-

sidered to be significant at  $p<0.05$ .

Results

A) Basal Levels of Hormones

Table 1 shows the mean levels of hormones at rest of all subjects before exercise.

All data indicated within normal ranges. Non of the subjects showed the sings of hyperprolactinemia.

B) Effect of Exercise on Hormone Levels

Figure 1 shows the mean value of hormone levels at rest before exercise and at the point of exhaustion during exercise.

There was no significant difference in serum level of LH at rest ( $4.5\pm1.7$  mIU/ml) and the point of exhaustion ( $5.2\pm2.0$  mIU/ml).

On the contrary, serum prolactin and plasma  $\beta$ -endorphin levels increased significantly ( $p<0.001$ ) at the point of exhaustion (prolactin;  $21.0\pm7.4$  ng/ml,  $\beta$ -endorphin;  $25.4\pm9.6$  pg/ml) compare

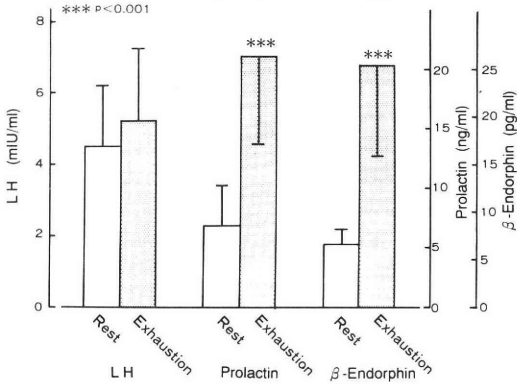


Fig. 1 Effect of incremental exercise on hormone levels. Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Asterisk show statistically significant difference from the value at rest (\*\*\*) $p<0.001$ .

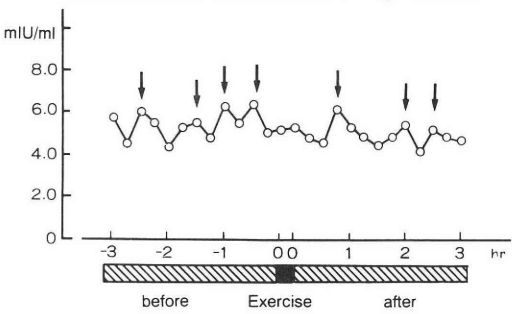


Fig. 2 Episodic secretion pattern of LH before and after exercise in a subject (No. 4 M. N.). Arrow indicate a “pulse”.

Table 1 Basal levels of hormones at rest before exercise of all subjects during the middle follicular phase. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD.

| Subject | LH (mIU/ml) | Prolactin (ng/ml) | $\beta$ -Endorphin (pg/ml) |
|---------|-------------|-------------------|----------------------------|
| 1. S.T. | $4.3\pm0.4$ | $5.2\pm1.2$       | $6.7\pm1.2$                |
| 2. Y.M. | $2.2\pm0.4$ | $8.6\pm0.6$       | $7.7\pm0.5$                |
| 3. Y.I. | $6.8\pm1.1$ | $8.9\pm5.3$       | $4.3\pm1.9$                |
| 4. M.N. | $5.4\pm0.6$ | $3.0\pm0.7$       | $6.7\pm0.5$                |
| 5. H.Y. | $4.0\pm0.6$ | $8.1\pm0.8$       | $7.7\pm0.5$                |
| Total   | $4.5\pm1.7$ | $6.8\pm3.4$       | $6.6\pm1.6$                |

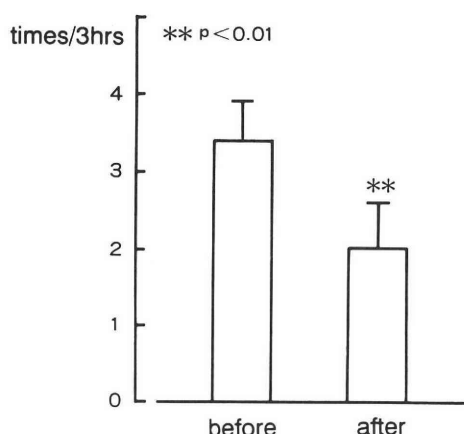


Fig. 3 Effect of exercise on the pulse frequency of LH. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Asterisk show statistically significant difference from the value before exercise (\*\* $p < 0.01$ ).

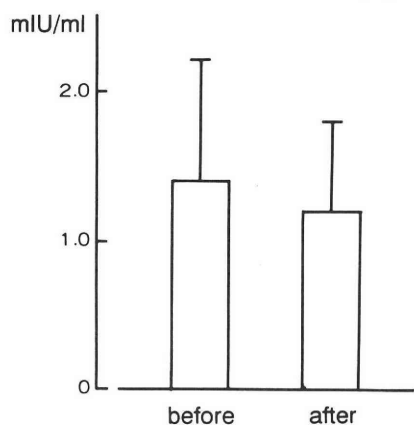


Fig. 4 Effect of exercise on the pulse amplitude of LH. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. There is statistically no significant difference between before and after exercise.

with the levels at rest ( $6.8 \pm 3.4$  ng/ml and  $6.6 \pm 1.6$  pg/ml respectively).

### C) Pulsatile LH Secretion

Pulsatile secretion of LH was observed in all subjects. Figure 2 shows episodic secretion pattern of LH during study in a subject (No. 4 M. N.). Arrow indicate a "pulse" of LH. The pulse frequencies were 4 times/3 hrs before exercise and 3 times/3 hrs after exercise.

#### 1) Pulse Frequency

Figure 3 shows the pulse frequency of LH before and after exercise. The pulse frequency after exercise ( $2.0 \pm 0.6$  times/3 hrs) decreased significantly ( $p < 0.01$ ) as compared with the value

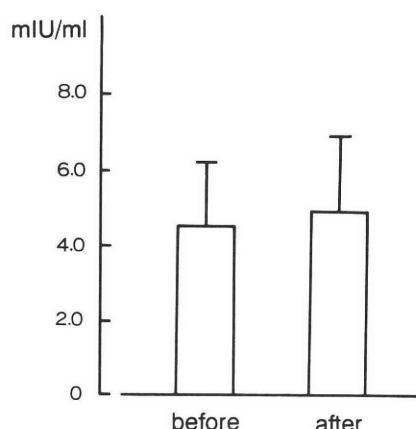


Fig. 5 Effect of exercise on the mean levels of LH. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. There is statistically no significant difference between before and after exercise.

before exercise ( $3.4 \pm 0.5$  times/3 hrs).

#### 2) Pulse Amplitude

There was statistically no significant difference in the pulse amplitude of LH between before ( $1.4 \pm 0.8$  mIU/ml) and after ( $1.2 \pm 0.6$  mIU/ml) exercise (Figure 4).

#### 3) Mean Level

There was statistically no significant difference in the mean level of LH between before ( $4.5 \pm 0.4$  mIU/ml) and after ( $4.9 \pm 2.0$  mIU/ml) exercise (Figure 5).

## Discussion

It is well known that strenuous exercise induces menstrual dysfunction, such as delayed menarche, secondary amenorrhea, oligomenorrhea and luteal insufficiency<sup>12-14</sup>. However, the mechanisms of exercise-induced menstrual dysfunction have not yet been clarified. We considered that acute and/or chronic hormonal changes due to exercise might be the most important factor causing exercise-induced menstrual dysfunction.

We previously investigated hormonal changes during exercise and reported that prolactin was the only hormone which was increased significantly in both the follicular and luteal phases<sup>1,2</sup>. Brisson et al.<sup>15</sup>) and Baker et al.<sup>16</sup>) also reported that prolactin was increased significantly during exercise. In this study, prolactin and  $\beta$ -endorphin were increased significantly, but LH showed

no significant changes at the point of exhaustion during incremental exercise.

The relationship between prolactin secretion and the occurrence of menstrual dysfunction is well established. Recently, it is believed that transient hyperprolactinemia and occulted hyperprolactinemia at night are important to infertility<sup>17)</sup> and anovulatory cycle<sup>18)</sup>. That is, a significant, transient release of prolactin during daily exercise is believed to be an important factor causing exercise-induced menstrual dysfunction.

It is well known that prolactin release from the pituitary anterior lobe is regulated by two mechanisms: the prolactin releasing factor (PRF) and the prolactin inhibitory factor (PIF). It is believed that the major PRFs are endogenous opiate peptide  $\beta$ -endorphin and vasoactive intestinal peptide (VIP)<sup>19,20)</sup>. On the contrary, there is growing skepticism of the view that dopamine is the sole PIF mediating tonic hypothalamic inhibition. Furthermore, it is thought that dopamine tonically stimulates the secretion of an unidentified PIF<sup>21)</sup>. However, Peters and coworkers<sup>22,23)</sup> reported that the extracts of pituitary posterior lobe contained a significant prolactin-inhibiting activity that could be attributed to dopamine since inhibition was reversed by cotreatment with a dopamine antagonist. In addition, the control of dopamine release or turnover in the central nervous system, therefore, may be mediated by  $\beta$ -endorphin<sup>24~26)</sup>. Furthermore, the interaction between  $\beta$ -endorphin and gonadotropin release is complex and appears to involve gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) with a modulating effect on ovarian sex steroids<sup>27)</sup>.

The relationship between prolactin and gonadotropin secretion by pituitary is very important. It is well established that LH and FSH are secreted in an intermittent (pulsatile) manner<sup>6~8)</sup>. Yen et al.<sup>8)</sup> reported that the frequency and magnitude of pulsatile gonadotropin release are important determinants of "basal" gonadotropin levels. Some previous studies of gonadotropin pulsatile secretion patterns have focused on variation during menstrual cycle<sup>8)</sup>, effects of sleep<sup>28)</sup> and circadian rhythms<sup>29)</sup>. Furthermore, several

studies have been done on female hypogonadism<sup>30)</sup>, luteal phase deficiency<sup>11)</sup> and hyperprolactinemia<sup>31)</sup>. However, there have been few reports of pulsatile gonadotropin secretion in female athletes<sup>5,32~34)</sup>. In this study, we found that exercise decrease the pulse frequency of LH in non-athletic women.

The hypothalamic-pituitary-ovarian axis is regulated by the long, short and ultra-short feedback mechanisms. The episodic release of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) from the hypothalamus into the pituitary portal circulation is thought to be the major factor determining the corresponding discharge of LH pulses from the pituitary gland<sup>35)</sup>. Low secretion of gonadotropins was thought to be due to hypothalamic-pituitary insufficiency, the non-responsive organ most likely being the hypothalamus. As administration of LH-RH to amenorrheic athletes increases LH secretion<sup>4,34)</sup>, the low levels and blunted pulsatile pattern of LH in amenorrheic women suggest that pulsatile secretion of LH-RH is diminished or absent. These facts indicate that the etiology of exercise-induced menstrual dysfunction is hypothalamic insufficiency<sup>4,5,34)</sup>.

An obvious significant release of prolactin during exercise has been reported<sup>1,2,15,16)</sup>. These secretion patterns during exercise are similar to those in transient hyperprolactinemia. In addition, amenorrheic and anovulatory athletes showed an abnormally high level of prolactin in a thyrotropin-releasing hormone (TRH) load test<sup>4,36)</sup>. These response patterns are also similar to that in patient with transient hyperprolactinemia<sup>18)</sup>. These data indicate that daily, transient increasing secretion of prolactin during exercise may affect hypothalamic insufficiency in female athletes. Other hormones that are affected by repeated endurance exercise may influence the hypothalamus. The increased levels of  $\beta$ -endorphin during exercise<sup>5,9)</sup> may contribute to the etiology of exercise-induced menstrual dysfunction. It is well known that opioid peptides decrease the frequency and amplitude of LH pulsation<sup>37)</sup>. We have reported that administration of naloxone, an opiate antagonist, decreased

the secretion of prolactin and  $\beta$ -endorphin during exercise in female athletes<sup>9</sup>). Furthermore, McArthur et al.<sup>34</sup>) have shown that administration of naloxone was followed by a pronounced increase in the amplitude of LH pulsation.

These data suggest that an increase of  $\beta$ -endorphin during exercise may be an important factor for decrease of pulsatile LH secretion after exercise.

We thank Prof. Katsumi Asano and Prof. Masasuke Eda, Institute of Sports and Science, University of Tsukuba, for their comprehensive corporation. This work was supported in part by the Uehara Memorial Foundation, and the University of Tsukuba Research Project.

### References

- 1) Mesaki, N., Sasaki, J., Shoji, M., Iwasaki, H., Asano, K. and Eda, M.: Hormonal changes during incremental exercise in athletic women, *Acta Obst. Gynec. Jpn.*, 38: 45, 1986
- 2) Mesaki, N., Sasaki, J., Shoji, M., Iwasaki, H., Asano, K. and Eda, M.: Hormonal changes during continuous exercise in athletic women, *Acta Obst. Gynec. Jpn.*, 39: 63, 1987
- 3) Sasaki, J., Mesaki, N., Shoji, M. and Iwasaki, H.: Hormonal changes during athletic activity in female badminton players, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 32: 5, 1987
- 4) Mesaki, N., Motobu, M., Sasaki, J., Shoji, M. and Iwasaki, H.: Hypothalamic-pituitary function in female athletes, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 33: 291, 1988
- 5) Mesaki, N., Sasaki, J., Nabeshima, Y., Sohda, S., Motobu, M., Asano, K. and Eda, M.: Decrease of pulsatile gonadotropin secretion in female athletes, *Jpn. J. Fitness Sports Med.*, 40: 365, 1991
- 6) Dierschke, D. J., Bhattacharya, A. N., Atkinson, L. E. and Knobil, E.: Circoral oscillation of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey, *Endocrinol.*, 87: 850, 1970
- 7) Gay, V. L. and Sheth, N. A.: Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats, *Endocrinol.*, 42: 58, 1972
- 8) Yen, S. S. C., Tsai, C. C., Naftolin, F., Vandenberg, G. and Ajabor, L.: Pulsatile patterns of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34: 671, 1972
- 9) Mesaki, N., Sasaki, J., Motobu, M., Nabeshima, Y., Shoji, M., Iwasaki, H., Asano, K. and Eda, M.: Effect of naloxone on hormonal changes during exercise, *Acta Obst. Gynec. Jpn.*, 41: 1991, 1989
- 10) Santen, R. J. and Bardin, C. W.: Episodic luteinizing hormone secretion in man: Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms, *J. Clin. Invest.*, 52: 2617, 1973
- 11) Soules, M. R., Steiner, R. A., Clifton, D. K. and Bremner, W. J.: Abnormal patterns of pulsatile luteinizing hormone in women with luteal phase deficiency, *Obstet. Gynecol.*, 63: 626, 1984
- 12) Frish, R. E., Gotz-Welbergen, A. V., McArthur, J. W., Albright, T., Witschi, J., Bullen, B., Birnholz, J., Reed, R. B. and Herman, H.: Delayed menarche and amenorrhea of college athletes in relation to age of onset of training, *J. A. M. A.*, 246: 1559, 1981
- 13) Mesaki, N., Sasaki, J., Shoji, M., Iwasaki, H. and Eda, M.: Delayed menarche followed by early onset of athletic sports training, *Acta Obstet. Gynaec. Jpn.*, 36: 49, 1984
- 14) Mesaki, N., Sasaki, J., Shoji, M., Iwasaki, H. and Eda, M.: Menstrual characteristics in college athletes, *Acta Obstet. Gynaec. Jpn.*, 36: 247, 1984
- 15) Brisson, G. R., Volle, M. A., DeCarufel, D., Desharnais, M. and Tanaka, M.: Exercise-induced dissociation of the blood prolactin response in young women according to their sports habits, *Horm. Metab. Res.*, 12: 201, 1980
- 16) Baker, E. R., Mathur, R. S., Kirki, R. F., Landgrebe, S. C., Moody, L. O. and Williamson, H. O.: Plasma gonadotropin, prolactin, and steroid hormone concentrations in female runners immediately after a long-distance run, *Fertil. Steril.*, 38: 38, 1982
- 17) Ben-David, M. and Schenker, J. G.: Transient hyperprolactinemia: A correctable cause of idiopathic female infertility, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 442, 1983
- 18) Mori, H., Aisaka, K., Matsuoka, R. and Kigawa, T.: The mechanism of induction of ovulation by bromocriptine in euprolactinemic anovulation—The role of occulted hyperprolactinemia in anovulation, *Folia Endocrinol.*, 61: 38, 1985
- 19) Grandison, L. and Guidotti, A.: Regulation of prolactin release by endogenous opiates, *Nature*, 270: 357, 1977
- 20) Frawley, L. S. and Neil, J. D.: Stimulation of prolactin secretion in rhesus monkeys by vasoactive intestinal peptide, *Neuroendocrinology*, 33: 79, 1981
- 21) Gibbs, D. M. and Neils, J. D.: Dopamine levels in hypophyseal stalk blood in the rat are suffi-

- cient to inhibit prolactin secretion in vivo, *Endocrinol.*, 102: 1895, 1978
- 22) Peters, L., Hoefler, M. T. and Ben-Jonathan, N.: The posterior pituitary: Regulation of anterior pituitary prolactin secretion, *Science*, 213: 659, 1981
- 23) Ben-Jonathan, N. and Peters, L.: Posterior pituitary lobectomy: Differential elevation of plasma prolactin and luteinizing hormone in estrous and lactating rats, *Endocrinol.*, 110: 1861, 1982
- 24) Deyo, S. N., Swift, R. M. and Miller, R. J.: Morphin and endorphins modulate dopamine turnover in rat median eminence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3006, 1979
- 25) Meites, J., Bruni, J. F., Van-Vugt, D. A. and Smith, A. F.: Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine function, *Life Sci.*, 24: 1325, 1979
- 26) Van Loon, G. R., Ho, D. and Kim, C.: Beta-endorphin induced decrease in hypothalamic dopamine turnover, *Endocrinol.*, 106: 76, 1980
- 27) Ferin, M., Van-Vugt, D. and Wardlaw, S.: The hypothalamic control of menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides, *Recent. Prog. Horm. Res.*, 40: 441, 1984
- 28) Kapen, S., Boyar, R., Hellman, L. and Weitzman, E. D.: The relationship of luteinizing hormone secretion to sleep in women during the early follicular phase: Effects of sleep reversal and prolonged three-hour sleep-awake schedule, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42: 1031, 1976
- 29) Soules, M. R., Steiner, R. A., Cohen, N. L., Bremner, W. J. and Clifton, D. K.: Nocturnal slowing of pulsatile luteinizing hormone secretion in women during the follicular phase of the menstrual cycle, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61: 43, 1985
- 30) Cetel, N. S. and Yen, S. S. C.: Concomitant pulsatile release of prolactin and luteinizing hormone in hypogonadal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56: 1313, 1983
- 31) Wiebe, R. H., Handwerger, S. and Soules, M.: Episodic luteinizing hormone release in hyperprolactinemic women, *Fertil. Steril.*, 45: 483, 1986
- 32) Cumming, D. C., Vickovic, M. M., Wall, S. R. and Fluker, M. R.: Defects in pulsatile release in normally menstruating runners, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 810, 1985
- 33) Fisher, E. C., Nelson, M. E., Frontera, W. R., Turksoy, R. N. and Evans, W. J.: Bone mineral content and levels of gonadotropins and estrogens in amenorrheic running women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 1232, 1986
- 34) McArthur, J. W., Bullen, B. A., Beitins, I. Z., Pagano, M., Badger, T. M. and Klibanski, A.: Hypothalamic amenorrhea in runners of normal body composition, *Endocr. Rec. Commun.*, 7: 13, 1980
- 35) Elkind-Hirsch, K., Ravnkar, V., Tulchinsky, D., Schiff, I. and Ryan, K. J.: Episodic secretory patterns of immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone (IR-LH-RH) in the systemic circulation of normal women throughout the menstrual cycle, *Fertil. Steril.*, 41: 56, 1984
- 36) Boyden, T. W., Pamentier, R. W., Grosso, D., Stanforth, P., Rotkins, T. and Wilmore, J. H.: Prolactin responses, menstrual cycles, and body composition of women runners, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 711, 1982
- 37) Quigley, M. E., Sheehan, K. L., Casper, R. F. and Yen, S. S. C.: Evidence for increased dopaminergic and opioid activity in patients with hypothalamic hypogonadotropic amenorrhea, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 949, 1980

## スポーツ活動による LH の Pulse 状分泌の減少

筑波大学臨床医学系産科婦人科

目崎 登 佐々木純一 鍋島雄一  
宗田 聡 岩崎寛和

スポーツ活動が視床下部-下垂体系機能に及ぼす直接的影響を検討するために、排卵性月経周期を有する一般女性5名(18~22歳)を対象として、運動前後におけるLHのpulse状分泌動態を検討した。

卵胞期の5~8日に、自転車エルゴメーターを用いる多段階漸増負荷法による最大運動負荷試験を実施し、その前後に3時間にわたり15分毎に採血を行った。

Pulse frequencyは、運動前は $3.4 \pm 0.5$  times/3hrsであったが、運動後には $2.0 \pm 0.6$  times/3hrsと明らかに( $P < 0.01$ )減少した。しかし、運動前後のpulse amplitudeおよびmean levelには明らかな差は認められなかった。なお、運動直後には、LHには変動は認められなかったが、prolactinおよび $\beta$ -endorphinは著明に上昇した。

運動直後のLHのpulse状分泌の減少は、運動による $\beta$ -endorphinの著明な分泌亢進が重要な要因として関与しているものと思われる。

(受付: 1991年6月9日)

# EFFECTS OF RU486 AND KEOXIFENE ON THE DISPERSED PITUITARY CELLS OF PREGNANT RATS

Shoichiro AWATA

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

**Abstracts:** LH secretion from rat pituitary is known to be modulated by sex steroids treatment in vitro and in vivo. Gonadotropin release is much suppressed during the latter half of pregnancy. The present study was undertaken to clarify the effect of sex steroid antagonists on the pregnant rat anterior pituitary cells in vitro, and the results were compared with those of ovariectomized non pregnant rats. De novo synthesis as well as release of LH in dispersed anterior pituitary cells from the pregnant rats were significantly suppressed by the high serum concentrations of estrogen and progesterone. The combined use of RU486 and keoxifene significantly enhanced the pituitary response. These sex steroid antagonists might have worked co-operatively to increase the LH secretion via the hormone receptor. A possible mechanism of action of sex steroids on the production of LH is discussed.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 22-28, 1992)

## Introduction

The pulsatile secretion of GnRH from the hypothalamus stimulates LH and FSH release from gonadotrophs of the anterior pituitary, and both of them control the secretion of estrogen and progesterone from the ovary. These sex steroids, on the other hand, modulate the release of gonadotropins by the feedback mechanism. The modulations of LH release by sex steroids appears to be exerted at both neural and hypophysial sites in vivo<sup>1,11~17</sup>.

Including gonadotropin synthesis and secretion, recent advance of elucidating the mechanism of receptor-signal transduction system is remarkable<sup>2~8</sup>. Much of what we know about the molecular basis of GnRH action has become available because of the widespread use of pituitary cell cultures prepared from rats, pigs, and sheep.

In pregnant rats, serum LH significantly

decreases from the day 11 to 13, and increases again before delivery (an LH surge)<sup>9,10</sup>. It is reported that the increased concentration of serum progesterone and estrogen is responsible for the suppression of LH secretion to GnRH stimulation<sup>18,19</sup>.

In the following study, the LH secretory response of the pregnant rat anterior pituitary cells cultured in vitro to GnRH and other secretagogues was examined when the cells had been pretreated with sex steroid antagonists.

## Materials and Methods

### 〈Animals〉

12-week old female rats of the Wistar-Imamichi strain were used. Pregnant rats were sacrificed on day 15 and non-pregnant spayed rats 3 weeks after ovariectomy.

### 〈Pituitary cell preparation〉

The pituitary glands were dissected free from the sella turcica, and the posterior and intermedi-

ate lobes were removed. Each anterior lobe was cut into four pieces. These tissue blocks were incubated for 90 minutes in 5ml of 1% BSA-Hanks' Balanced Salt Solution (HCMF) containing 40mg collagenase and 50 $\mu$ g DNase) at 37°C, in air, and stirred every 15 minutes. After removal of the residual sediments, the medium was centrifuged at 800rpm for 5 minutes, and the supernatant was discarded. The sediments of dispersed cells were washed and centrifuged again in 1% HCMF (without collagenase and DNase) twice, and finally incubated in 5ml of 1% BSA-DMEM. The viability of cells was assessed with trypan blue dye staining.

#### <Cell culture procedures>

The culture medium Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), containing 1% BSA, 100u/ml penicillin G, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, and 10% horse serum and 2.5% fetal calf serum pretreated with 2% charcoal (Norit A) and 0.2% Dextran T 70 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), was used. Dispersed anterior pituitary cells at the concentration of 10<sup>5</sup> viable cells/ml/well in the CELL WELLS (Corning, NY) were incubated for 48 hours at 37°C under a water-saturated atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. RU486 and keoxifene were added to the incubation medium, either for 48 hours from the beginning, or only for last 4 hours. After this pre-incubation, the medium was changed and washed twice with the medium. The se-

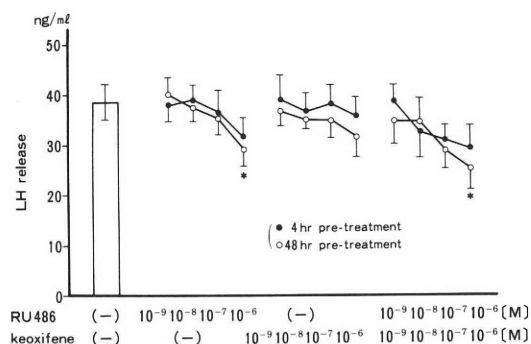


Fig. 1 Influences of acute (4h) and chronic (48h) exposure to increasing concentrations of anti-hormones (RU486 and keoxifene) on 3h of GnRH (10nM)-stimulated LH release by ovariectomized rat pituitary cells. \*:  $p < 0.05$  vs. control. Values are means  $\pm$  SE.

cretagogues dissolved in the medium (10<sup>-8</sup>M GnRH, 10<sup>-6</sup>M TPA, 100ng/ml Cholera toxin, or 10<sup>-4</sup>M A23187) were added and further incubated under the same condition. After 3 hours of stimulation, the media were separated and stocked at -20°C until assayed. For the assay of intracellular contents of LH, the monolayer culture wells were washed with the medium, and 5 mM EDTA (Sigma) was added. Frozen and thaw were repeated 3 times and the supernatant was assayed after centrifugation.

#### <Radioimmunoassay (RIA)>

The LH concentration was measured by the specific radioimmunoassay system. The antiserum and the standard hormone rLH-RP3 were kindly provided by NIADDKD (National Institute of Arthritis, Diabetes, and Digestive and Kidney diseases) Rat Pituitary Agency Hormone Distribution Program (Bethesda, Md, USA). Anti-rabbit goat serum was kindly provided by the Teikoku Hormone Co. (Tokyo).

#### <Reagents and Chemicals>

All reagents used were analytical grade. RU486 was kindly provided by Roussel-UCLAF (Romainville, France) and keoxifene Lilly Research laboratories (Indianapolis, Ind.). GnRH, TPA, A23187, and Cholera toxin were products of Sigma Chemical Co..

#### <Statistical analyses>

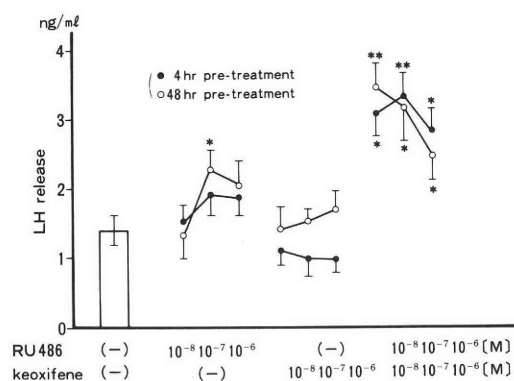


Fig. 2 Influences of acute (4h) and chronic (48h) exposure to increasing concentrations of anti-hormones (RU486 and keoxifene) on 3h of GnRH (10nM)-stimulated LH release by pregnant rat pituitary cells. \*:  $p < 0.05$  vs. control. Values are means  $\pm$  SE.

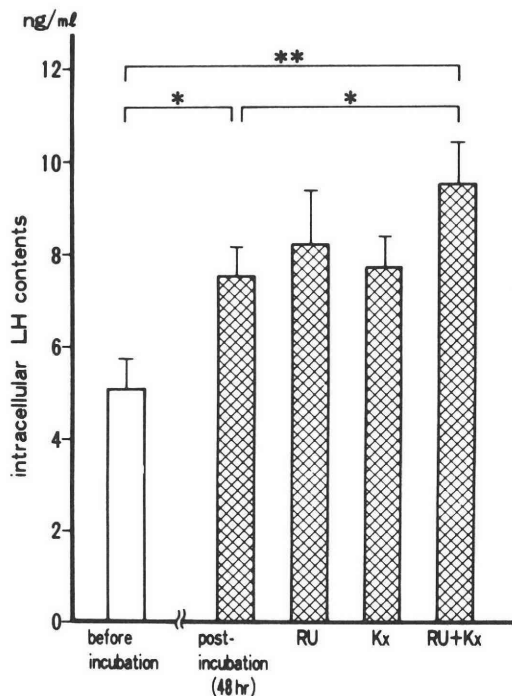


Fig. 3 Influences of acute (4h) and chronic (48h) exposure to ant-hormones (RU486 and keoxifene) on intracellular LH contents of pregnant rat pituitary cells. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . Values are means  $\pm$  SE.

Statistical analysis was performed using Student's  $t$ -test.

## Result

1) *Effect of RU486 and keoxifene on the LH release from pituitary cells of ovariectomized rats* (Fig. 1): Anterior pituitary cells of ovariectomized rats were stimulated with  $10^{-8}$ M GnRH for 3 hours, and released LH was assayed. Neither RU486 nor keoxifene did not cause a significant change in LH release except when  $10^{-6}$ M of RU486 was pre-incubated for 48 hrs; LH release was significantly suppressed.

2) *Effect of RU486 and keoxifene on the LH release from pituitary cells of pregnant rats* (Fig. 2): Pre-treatment with RU486 alone showed an increasing tendency of LH release; a significant difference was observed when  $10^{-7}$ M of this compound was incubated for 48 hours (2.29ng/ml,  $p < 0.05$ ). On the other hand, keoxifene alone had no effect on the levels of LH, either incubated for 4

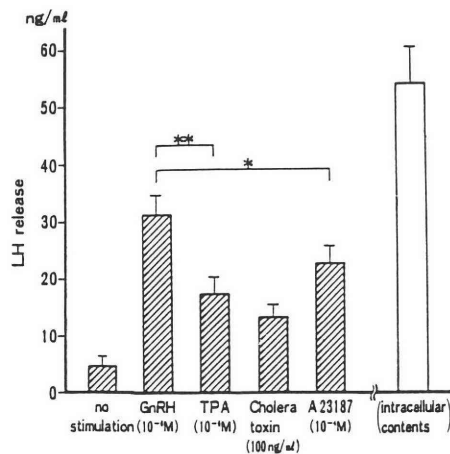


Fig. 4 LH release by ovariectomized rat pituitary cells stimulated with a variety of secretagogues for 3h. \*:  $p < 0.05$ . Values are means  $\pm$  SE.

hrs or 48 hrs. The combined pretreatment with RU 486 and keoxifene for 4 to 48 hrs significantly increased the LH release at all the concentrations used.

3) *Intracellular LH contents in pituitary cells of pregnant rats* (Fig. 3): The intracellular contents of LH in pituitary cells were markedly decreased in pregnant as compared to the castrated rats. The contents in pituitary cells increased significantly ( $p < 0.05$ ) after 48 hrs of blank incubation. The intracellular LH levels further augmented when RU486 and keoxifene had been added to the incubation medium ( $p < 0.01$  as compared with the controls).

4) *The response of LH release from pituitary cells of ovariectomized rat* (Fig. 4): Among the secretagogues used in the present study,  $10^{-8}$ M of GnRH caused the maximal release of LH. The stimulation with  $10^{-6}$ M of TPA and  $10^{-4}$ M of A23187 released 55% and 75% of LH as compared with the GnRH stimulated one. With 100ng/ml of Cholera toxin, a significant amount of LH (44% of the GnRH-stimulated secretion) was released ( $p < 0.05$ ).

5) *The response of LH release from pituitary cells of pregnant rats* (Fig. 5): The secretagogues (TPA, Cholera toxin, and A23187) stimulated LH release by 141%, 96%, and 158%, respectively, as

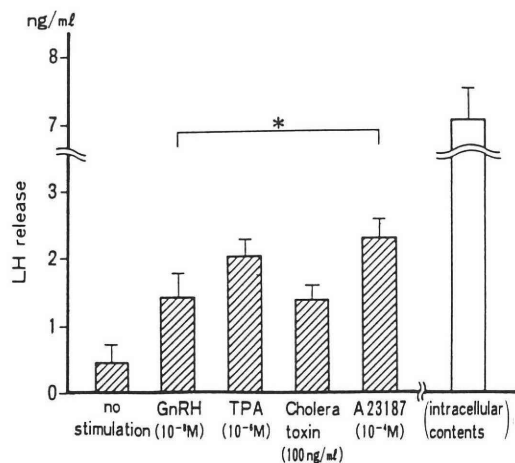


Fig. 5 LH release by pregnant rat pituitary cells stimulated with a variety of secretagogues for 3h. \*:  $p < 0.05$ . Values are means  $\pm$  SE.

compared with the GnRH-stimulation. Thus, the suppression of LH release as the effect of pregnancy was more prominent in the GnRH challenged cases (Fig. 4 and 5).

6) *The secretagogues and pre-incubation time* (Fig. 6): Significant increase of the LH release was observed in all the groups where  $10^{-7}$  of RU486 and  $10^{-7}$ M of keoxifene were used. When TPA or A23187 was used as a stimulant, the LH release was increased as the preincubation time with anti-hormones was prolonged.

### Discussion

In the case of pregnant rats, serum LH on days 15–18 is significantly lower than that on day 10 or 21.<sup>9,19</sup> Serum progesterone is markedly increased on days 12–15, and is decreased rapidly after day 21. It is reported that the serum estrogen level is gradually increased during the second half of pregnancy, and it makes a surge around delivery. On day 15, the responsiveness to GnRH is suppressed compared with that on day 10<sup>19</sup>, and the high concentrations of serum progesterone and estrogen are reportedly the causes for the lower response of the anterior pituitary to GnRH<sup>18</sup>.

Estrogen shows the positive or negative feedback mechanism on LH secretion under different conditions in non pregnant rats during estrous cycles or ovariectomized rats in vitro and in

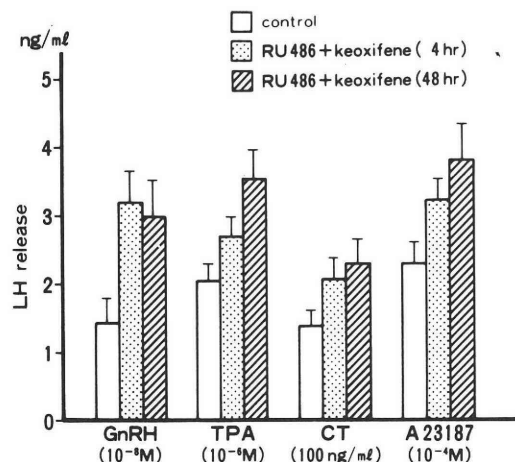


Fig. 6 Influences of acute (4h) and chronic (48h) exposure to anti-hormones (RU486 and keoxifene) on a variety of secretagogue-stimulated LH secretions by pregnant rat pituitary cells. Value are means  $\pm$  SE.

vivo<sup>11–13</sup>). Moreover, progesterone also modulates LH secretion in the rat pituitary gland pretreated with estrogen<sup>15–17</sup>. In the present study using monolayer culture of pregnant rat anterior pituitary cells, the significant suppression of the response of LH secretion to GnRH stimulation and the decrease of intracellular LH contents were confirmed.

RU486 is a synthetic steroidal drug which has a strong anti-progestin and anti-glucocorticoid action, and has a weak anti-androgen action. The mechanism of action is a competitive inhibition of progestin at the receptor level<sup>23–26</sup>. Keoxifene is a relatively new anti-estrogenic agent derived from benzothiophene of triphenylethylene type<sup>21</sup>, and has a stronger anti-estrogenic action than that of tamoxifene, with almost no estrogenic effect<sup>20–22</sup>. Both RU486 and keoxifene are considered to have no direct effect on gonadotrophs by themselves and accepted as pure antagonists of sex steroids<sup>22,23</sup>.

In the present experiment, the release of LH from the pituitary cells of castrated rats was suppressed with the highest dose of RU486 incubated for 48 hours (Fig. 1). It is not clear whether this effect was due to the pharmacological one or the cytotoxicity of RU486, but no increase in cellular permeability of trypan blue

staining was observed after the incubation, suggesting that no major damage to the cells took place. If anterior pituitary cells from pregnant rats were incubated with RU486, the suppressed LH secretion was somewhat recovered and resumed the higher level. (Fig. 2).

Keoxifene pre-treatment had no effect to the LH secretion from pituitary cells of non pregnant ovariectomized rats as well as of pregnant rats (Fig. 1 and 2). But, the pre-treatment with RU486 combined with keoxifene markedly increased the LH secretion of pregnant rat gonadotrophs (Fig. 2). From these result, we may speculate that the suppression of LH secretion in pregnant rats could be attributed to the combined effect of progesterone and estrogen.

Ueda<sup>18)</sup> reported that the serum LH level of the pregnant rats on day 15 was significantly lower than that on day 10. Since we used the monolayer culture system of pituitary cells from pregnant rats on day 15, the response of LH release to stimulants was reduced through exposure to the high levels of sex steroids. Under such circumstances the number of GnRH receptors would also decrease<sup>27,28)</sup>.

The present experiment also showed the significant reduction of the intracellular LH contents in pregnancy. This might be one of the main reasons of the decreased LH release from pituitary cells of pregnant rats. The fact that the combined pretreatment with RU486 and keoxifene significantly increased the intracellular contents of LH, might be the indirect proof of the suppressive effect of progesterone and estrogen on the intracellular LH synthesis in pregnancy. The effect of these anti-hormone compounds is most probably exerted via sex hormone receptors in the anterior pituitary; by cancelling the suppressive effect on LH synthesis of progesterone and estrogen.

It has recently been demonstrated that after its specific receptor, GnRH stimulates phosphoinositide turnover, mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$ , activates protein kinase C (PKC), and induces Arachidonic acid (AA) release<sup>2,3,5)</sup>. In the present experiment, we used 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA), to stimulate protein kinase C selec-

tively. A23187, one of the commonly used calcium ionophores, was used for the purpose of the induction of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel influx. Though in the case of non pregnant ovariectomized rats, GnRH best stimulated the LH secretion of anterior pituitary cells in the monolayer culture among several secretagogues (Fig. 4), the results showed discrepancy in pregnant rats (Fig. 5). Though the absolute amounts of the LH secretion are significantly suppressed at all the conditions in pregnant rat culture, especially strong suppression was observed at GnRH stimulated cases compared with those of A23187 and TPA. GnRH acts via its receptor on the membrane of gonadotrophs, however other secretagogues like A23187 or TPA directly stimulate the intracellular post-receptor transduction systems. It may be postulated that the GnRH receptor is also involved in the suppression by estrogen and progesterone of pregnant rat gonadotrophs. In the similar manner, the intracellular post-receptor level may play a role in this respect, too.

Although c-AMP plays an important role as a second messenger of intracellular signal transduction system in other tissues like ovaries, the participation of c-AMP as a second messenger of LH secretion in gonadotrophs is still controversial<sup>29-32)</sup>. To stimulate G protein mediated intracellular c-AMP production, we applied Cholera toxin as a secretagogue. The present study demonstrated that, despite not as much amount as of A23187 or TPA, Cholera toxin significantly increased LH secretion compared with control (no stimulation) (Fig. 4 and 5), and again this stimulatory effect was further enhanced by the combined pretreatment with RU486 and keoxifene in pregnant rats (Fig. 6). Recently, it was reported that Cholera toxin also effects upon G-protein of phospholipase C. As phospholipase C activates PI turnover<sup>33,34)</sup>, we should carefully consider the possibility of participation of c-AMP in the signal transduction mechanism of LH secretion in gonadotrophs.

Although slight differences were noted in a pattern of synergistic effects of RU486 and keoxifene as they were incubated with various stimulants, having varied sites of action, these anti-

hormones enhanced LH secretion by all the stimulants. And the longer the anti-hormones were incubated the more LH further tended to be released. However, further studies must be carried out to find the detailed mechanism of action of anti-hormones to enhance the LH secretion.

### Acknowledgements

The author is grateful to the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (Bethesda, MD) for providing LH RIA agents. Anti-rabbit goat serum was kindly supplied by Teikoku Hormone Co. (Tokyo). The author also wishes to thank Lilly Research laboratories (Indianapolis, Ind) for keoxifene, and Rousel-UCLAF (Romainville, France) for RU486.

I express deep appreciation to Prof. Kiyoshi Arai and to Associate prof. Akira Kambegawa for their appropriate advices.

This work was supported in part by a grant in aid from the Japan Ministry of Education, Science and Culture.

### References

- 1) Kalra, S. P. and Kalra, P. S.: Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat, *Endocrine Reviews*, 4: 311, 1983
- 2) Conn, P. M.: The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action, *Endocrine Reviews*, 7: 3, 1986
- 3) Naor, Z.: Signal transduction mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizing hormones: The case of gonadotropin-releasing hormone, *Endocrine Reviews*, 11: 326, 1990
- 4) Hirota, K., Hirota, T., Aguilera, G. and Catt, K. J.: Hormone-induced redistribution of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in pituitary gonadotrophs, *J. Biol. Chem.*, 260: 3243, 1985
- 5) Naor, Z. and Childs, G. V.: Binding and activation of gonadotropin releasing hormone receptors in pituitary and gonadal cells, *Int. Rev. Cytol.*, 103: 147, 1986
- 6) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor production, *Nature*, 308: 693, 1984
- 7) Naor, Z. and Catt, K. J.: Mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone, *J. Biol. Chem.*, 256: 2226, 1981
- 8) Kiesel, L. and Catt, K. J.: Phosphatidic acid and calcium dependent actions of gonadotropin-releasing hormone in pituitary gonadotrophs, *Arch. Biochem. Biophys.*, 231: 202, 1984
- 9) Morishige, W. K., Pepe, G. J. and Rothchild, I.: Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat, *Endocrinology*, 92: 1527, 1972
- 10) Labhsetwar, A. P. and Watson, D. J.: Temporal relationship between secretory patterns of gonadotropins, estrogens, progestins, and prostaglandin-F in periparturient rats, *Biol. Reprod.*, 10: 103, 1974
- 11) Frawley, L. S. and Neill, J. D.: Biphasic effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone release in monolayer cultures of rat and monkey pituitary cells, *Endocrinology*, 114: 659, 1984
- 12) Tang, L. K., Martellock, A. C. and Horiuchi, J. K.: Estradiol stimulation of LH response to LHRH and LHRH binding in pituitary cultures, *Am. J. Physiol.*, 242: E392, 1982
- 13) Emons, G., Knuppen, R., Ball, P. and Catt, K. J.: Biphasic modulation of pituitary sensitivity to GnRH by oestrogens: the effect of A- and D-ring substitution on LH release in culture pituitary cells, *Acta endocr. Copenh.*, 107: 317, 1984
- 14) Caligaris, L., Astrada, J. J. and Taleisnik, S.: Biphasic effect of progesterone on the release of gonadotropin in rats, *Endocrinology*, 89: 331, 1971
- 15) Attardi, B.: Facilitation and inhibition of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in the rat by progesterone: effects on cytoplasmic and nuclear estrogen receptors in the hypothalamus-preoptic area, pituitary, and uterus, *Endocrinology*, 108: 1487, 1981
- 16) Drouin, J. and Labrie, F.: Interactions between  $17\beta$ -estradiol and progesterone in the control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture, *Endocrinology*, 108: 52, 1981
- 17) Hsueh, A. J. W., Erickson, G. F. and Yen, S. S. C.: The sensitizing effect of estrogens and catechol estrogen on cultured pituitary cells to luteinizing hormone-releasing hormone: its antagonism by progestins, *Endocrinology*, 104: 807, 1979
- 18) Ueda, K.: Effect of LH-RH on LH release from the dispersed pituitary cells of pregnant rats, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 36: 103, 1984
- 19) Mano, T.: Pituitary responsiveness to LH-RH during pregnancy in the rat, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 35: 1649, 1983
- 20) Ortmann, O., Emons, G., Knuppen, R. and Catt, K. J.: Inhibitory actions of keoxifene on luteinizing hormone secretion in pituitary gonadotrophs, *Endocrinology*, 123: 962, 1988

- 21) Black, L. J., Jones, D. C. and Falcone, J. F.: Antagonism of estrogen action with a new benzothiophene derived antiestrogen, *Life Sci.*, 32: 1031, 1983
- 22) Simard, J., Labrie, F.: Keoxifene shows pure antiestrogenic activity in pituitary gonadotrophs, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 39: 141, 1985
- 23) Rojas, F. R., O'Connor, J. L. and Asch, R. H.: The antiprogesterone steroid RU-486 does not impair gonadotropin-stimulated luteal adenylyl cyclase activity or gonadotropin release by pituitary cells, *J. Steroid Biochem.*, 23: 1053, 1985
- 24) Ortmann, O., Emons, G., Knuppen, R. and Catt, K. J.: Inhibitory effects of the antiprogesterone, RU486, on progesterone actions and luteinizing hormone secretion in pituitary gonadotrophs, *J. Steroid Biochem.*, 32: 291, 1989
- 25) Arakawa, S., Ohkawa, T., Kambe-gawa, A., Okinaga, S. and Arai, K.: The effect of an anti progestin compound (RU486) on gonadotropin release from rat anterior pituitary cells in vitro, *Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol.*, 14: 251, 1988
- 26) Tsujii, T.: effects of the antiestrogenic agent RU486 in pregnant rats, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 34: 37, 1989
- 27) Reeves, J. J., Tarnavsky, G. K. and Platt, T.: Pituitary and ovarian luteinizing hormone releasing hormone receptors during the estrous cycle, pregnancy and lactation in the rat, *Biol. Reprod.*, 27: 316, 1982
- 28) Frager, M. S., Piper, D. R., Tonetta, J. A. and Marshall, J. C.: Pituitary GnRH receptors: effects of castration, steroid replacement, and the role of GnRH in modulating receptors in the rat, *J. Clin. Invest.*, 67: 615, 1981
- 29) Wun, W. S. A., Berkowitz, A. S. and Preslock, J. P.: Differences in the cyclic nucleotide mediation of luteinizing hormone-releasing hormone action on the rat and hamster anterior pituitary gland, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 55: 173, 1988
- 30) Conn, P. M., Morrell, D. V., Dufau, M. L. and Catt, K. J.: Gonadotropin-releasing hormone action in cultured pituitary cells: independence of luteinizing hormone release and adenosine 3', 5'-monophosphate production, *Endocrinology*, 104: 448, 1979
- 31) Borgeat, P., Chavaney, G., Dupont, A., Labrie, F., Arimura, A. and Schally, A. F.: Stimulation of adenosine 3' 5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2677, 1972
- 32) Kamel, F. and Krey, L. C.: Intracellular receptors mediated gonadal steroid modulation of LHRH-induced LH release, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 32: 285, 1983
- 33) Imboden, J. B., Shoback, D. M., Pattison, G. and Stobo, J. D.: Cholera toxin inhibits the T-cell antigen receptor-mediated increases in inositol triphosphate and cytoplasmic free calcium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5673, 1986
- 34) Lo, W. W. and Hughes, J.: A novel cholera toxin-sensitive G-protein (Gc) regulating receptor-mediated phosphoinositide signalling in human pituitary clonal cells, *FEBS Lett.*, 220: 327, 1987

### 妊娠ラット下垂体細胞の LH 分泌に およぼす RU486 および keoxifene の 影響について

帝京大学医学部産婦人科学教室  
(主任：荒井清教授)

栗田松一郎

ラット下垂体からの LH 分泌は性ステロイドによって修飾を受けているが、妊娠中はゴナドトロピンの分泌が強く抑制されている。妊娠 15 日目ラット下垂体前葉の分離細胞培養を行い、抗エストロゲン剤 keoxifene と抗プロゲステロン剤 RU486 を用いて、LH 分泌能および細胞膜内含量の変化をみた。また、卵巣摘出ラットを用いた実験との比較も行った。keoxifene あるいは RU486、それぞれの単独による処理では LH 分泌量の有意な変化を認めなかったが両剤の同時投与によって有意に LH 分泌が増加した。妊娠によって下垂体細胞膜内 LH 含有量自体が減少しているが、さらに、長期間のエストロゲンとプロゲステロンの影響で下垂体細胞からの LH 分泌機序も抑制されている。この抑制が、抗エストロゲン剤と抗プロゲステロン剤による、エストロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプターへの協同作用によって、ある程度解除された可能性が示唆された。また、他の刺激物質に比べて GnRH 刺激において、妊娠による抑制が相対的により強く認められ、細胞内情報伝達系のレベルにおける抑制とともに、膜の GnRH レセプターレベルにおける抑制の関与も考えられた。

(受付：1991 年 3 月 3 日)

## 子宮内膜症患者における免疫機能に関する検討

### Studies on the Immune Function of Patients with Endometriosis

京都大学医学部婦人科学産科学教室

|                  |                  |                  |
|------------------|------------------|------------------|
| 刈谷 方俊            | 今井 公俊            | 神崎 秀陽            |
| Masatoshi KARIYA | Kimitoshi IMAI   | Hideharu KANZAKI |
| 高倉 賢二            | 岡本 紀彦            | 江見 信之            |
| Kenji TAKAKURA   | Norihiko OKAMOTO | Nobuyuki EMI     |
| 藤原 浩             | 森 崇英             |                  |
| Hiroshi FUJIWARA | Takahide MORI    |                  |

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

京都大学医学部胸部疾患研究所

前田 道之  
Michiyuki MAEDA

Chest Disease Research Institute, Kyoto University

子宮内膜症患者の免疫機能を評価し、また特に細胞表面抗原を標的とする抗子宮内膜抗体が存在するか否かを明らかにするために、手術的あるいはMRIにて確認した子宮内膜症患者17名と手術的に内膜症の無いことを確認した対照8名の末消血を用いて、各種自己抗体、リンパ球サブセット、血清免疫グロブリン、補体を検討した。抗子宮内膜抗体以外の検査においては内膜症患者群と対照群の間で有意差は認められず、子宮内膜症患者が著名な免疫異常を伴わないことが明らかとなった。抗子宮内膜抗体については手術的に得られた子宮内膜間質細胞そのものを抗原として用いた cell ELISA 法を確立し、正常男性血清も対照として加え検討した。子宮内膜症では抗子宮内膜抗体の検出される頻度が高い傾向があり（6例／16例、対照群では1例／8例）、他の自己抗体との共存も約半数に認められた。抗子宮内膜抗体の存在と他の免疫機能検査との間には明らかな相関は認められなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 29-34, 1992)

#### 緒 言

子宮内膜症罹患婦人では軽症の者でも不妊症、流産を合併しやすいとする報告があり<sup>1-3)</sup>、一方、近年子宮内膜症に自己免疫状態がみられこれら不妊症、流産に関与していることを示唆する報告がなされている。すなわち子宮内膜症患者の一部に超音波破碎により得られる子宮内膜抗原を用いた受身血球凝集反応や Ouchterlony 法により、あるいは子宮内膜組織切片を用いた間接蛍光抗体法により正所性子宮内

膜組織に対する自己抗体の存在が報告され<sup>4-6)</sup>、同じく一部の患者に phospholipid, nucleotide に対する抗体の出現<sup>7)</sup>、免疫グロブリン、補体の変化<sup>5,7,8)</sup>などの自己免疫疾患としての特徴を有することが示唆されている。しかし子宮内膜症患者の血清中の免疫グロブリンや補体の変化に関しては上昇するとの報告や下降する、あるいは不変であるなど結果が一定せず、また自己免疫疾患に認めることの多い polyclonal B cell activation を示す各種自己抗体の発現を子宮内膜症患者において検討したものは少ない。そこで我々

は子宮内膜症患者の免疫異常のスクリーニングとして末梢血を用いてリンパ球サブセット、免疫グロブリン、補体、各種自己抗体の検討をおこなった。リンパ球サブセットでは二重染色を用いて helper T cell, suppressor T cell などの単独同定を行い、また NK 細胞に関しても検討した。さらに同じ血清を用い cell ELISA 法で抗子宮内膜抗体のうち、子宮内膜間質細胞表面抗原に対する抗体の検出を試み、さらに上記各免疫パラメーターとの相関を検討した。

### 研究対象及び方法

開腹術、腹腔鏡検査、MR I (magnetic resonance imaging) 検査のいずれかにより子宮内膜症と診断された患者 17 名より末梢静脈血を採取しこれを検体とした。同じく開腹術、腹腔鏡検査により肉眼的に子宮内膜症がないと診断された同年代の婦人 8 名を対照とした。抗子宮内膜抗体の検討では同年代の正常男性 5 名も対照とした。子宮内膜症患者のダナゾール治療の有無は表 1 に示す通りである。採血は手術のための麻酔導入前までにされた。子宮内膜症患者、対照共に悪性疾患、感染症のないことを確認している。リンパ球サブセット用の検体は直ちに検査に供され、他の検体は血清分離後、測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

リンパ球サブセットについては FALCO BIOSYS-TEMS に、抗子宮内膜抗体を除く自己抗体、免疫グロブリン、補体については京都医科学研究所に測定を依頼した。それぞれの検査方法の概要については以下の通りである。

リンパ球サブセットは Ficoll-Paque を用いた比重遠沈法によりリンパ球を分離、各種モノクローナル抗体で標識し、FACStar, SPECTRUM III による Flow cytometry で解析した。使用した抗体は Leu2, Leu3, Leu4, Leu7, Leu8, Leu11, Leu12, Leu15, Leu19 である (表 2)。Leu3, Leu8 の二重染色により helper T cell, Leu2, Leu15 の二重染色により suppressor T cell/cytotoxic T cell の単独同定を行い、また Leu7 Leu11 の二重染色により NK 活性の強弱を区別した。

免疫グロブリン、補体については免疫比濁法を用いて血清中の IgG, IgM, IgA, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> の定量を行った。

血清中の抗子宮内膜抗体以外の自己抗体については以下に示す方法で以下の 7 種類を検討した。抗 DNA 抗体: R I A, 抗核抗体: 蛍光抗体法, R A 試験: ラテックス凝集法, 抗 E N A 抗体, 抗サイログロブリン抗体, 抗マイクロソーム抗体: 受身血球凝集法, lupus anticoagulant: 希釈プロトロンビン時間法である。

抗子宮内膜抗体については cell ELISA による測定方法を確立した。すなわち手術にて得られた子宮内膜を P B S にて 3 回洗浄、細切、1mg/ml collagenase (和光純薬), 0.005 %, deoxyribonuclease (SIGMA) を含んだ RPMI 1640 (GIBCO) 中で 1.5 時間、 $37^{\circ}\text{C}$  にてインキュベーションした後、間質細胞を分離回収した。得られた間質細胞を RPMI 1640, 10% FCS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin (明治) にて浮遊し、 $2 \times 10^5 / \text{ml}$  の濃度で 96 穴 microwell plate に 100 $\mu\text{l}/\text{well}$  加え培養した。2 日後、間質細胞が confluent になったところで 100 $\mu\text{l}/\text{well}$  の 0.1 % glutaraldehyde/PBS で 3 分間室温固定し、P B S で 3 回洗浄、2 % B S A (SIGMA) / P B S を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$  注ぎ、1 時間静置した後使用するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

このようにしてあらかじめ準備した plate は室温にて解凍後、P B S にて 3 回洗浄して cell ELISA を行った。各々の well に 0.5% BSA, 0.1% sodium azide/PBS にて 32 倍に希釈した被検血清を 50 $\mu\text{l}$  入れ、室温で 1 時間インキュベーションした。上清を捨てた後、P B S にて 3 回洗浄、1,000 倍希釈した biotinylated goat antiserum IgG (Fc) (B R L) を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$  入れ室温で 1 時間さらにインキュベーションした。そして再び各 well の上清を捨てた後、P B S にて 3 回洗浄、1,000 倍希釈した streptavidine-horseradish peroxidase conjugate (B R L) を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$  入れさらに室温で 30 分反応させた。発色は plate を P B S にて 3 回洗浄した後、O P D (o-phenylenediamine dihydrochloride) 液を 50 $\mu\text{l}$  各々の well に注ぎ行った。3 分後に 1 M の H<sub>2</sub>

表 1 Profiles of patients with endometriosis and controls

|               | n  | Age (Mean $\pm$ SD) |                                  |       |
|---------------|----|---------------------|----------------------------------|-------|
| Control       | 8  | 32.0 $\pm$ 5.2      |                                  |       |
| Endometriosis | 17 | 33.5 $\pm$ 3.1      | no treatment                     | n = 4 |
|               |    |                     | during Danazol treatment         | n = 2 |
|               |    |                     | within 3 months after Danazol    | n = 3 |
|               |    |                     | more than 3 months after Danazol | n = 8 |

SO<sub>4</sub>を加えて反応を止め、492nmにおける吸光度をELISA READER (MTP-100, microplate reader. CORONA ELECTRIC) にて測定した。cell ELISAでは抗子宮内膜抗体と子宮内膜抗原との特異的結合を反映する発色だけでなく非特異的な発色が避けられず、その吸光度は非特異的反応をも含んだものとなる。そこで男性対照群の吸光度のmean+2SDを非特異的反応に基づく範囲と設定し、それより高値を示すものを抗子宮内膜抗体陽性と判定した。

## 結 果

子宮内膜症群、対照群の平均年齢はそれぞれ33.5歳、32.0歳で、ダナゾール治療の有無については表1に示す通りである。リンパ球サブセットについては表2に示すようにT cell, B cell, NK cell いずれにおいても内膜症群と対照群の間で有意差は認めなかった。参考として検査施設の設定している臨床的正常範囲と比較すると、平均値ではcytotoxic T cellを示すLeu2+/Leu15-が正常範囲よりも0.1%高値を示した以外はいずれも正常範囲内にあった。さらに個々の症例での値を比較しても、対照群と比して有意な上昇や下降を示すサブセットはなかった。

免疫グロブリン、補体についても子宮内膜症群に

対照群と比してIgGがやや高い傾向はあるものの、有違差は認めなかった(表3)。検査施設の臨床的正常範囲との比較では平均値はすべて正常範囲内であり、個々の値を比較すると子宮内膜症群のIgGで17例中7例がやや高値(対照群8例中では1例)を示していたが、IgM, IgA及び補体はほとんど正常範囲内にあった。

抗子宮内膜抗体以外の自己抗体については表4に示すように抗マイクロゾーム抗体が内膜症群17例中1例に陽性であったが、対照群でも8例中3例に陽性であり、その他の自己抗体では抗核抗体疑陽性が内膜症群2例対照群1例に認められた。

血清中の抗子宮内膜抗体についてはまず結果を吸光度で示すと表5のようになる。さきに述べたように男子対照群のmean+2SDより高値を示すものを陽性とする、子宮内膜症群16例名中6例、対照群8例中1例が抗子宮内膜抗体陽性と判定された。子宮内膜症群では抗体出現率が高頻度ではあるものの、検体数が少ないため対照群とは統計的な有意差は認められなかった。これらの抗子宮内膜抗体を持つ7例中では、3例が抗核抗体疑陽性もしくは抗マイクロゾーム抗体陽性であり、一方、これらの自己抗体のある5例(子宮内膜症群2例、対照群3例)中の

表2 Percentages of lymphocyte subset

|                    | Control  | Endometriosis |
|--------------------|----------|---------------|
| Leu4: T cell       | 67.5±7.2 | 67.2±12.4     |
| Leu3/Leu8          |          |               |
| Leu3+/Leu8-: Th    | 8.4±1.7  | 8.1±2.6       |
| Leu3+/Leu8+        | 33.9±6.1 | 31.4±9.2      |
| Leu2/Leu15         |          |               |
| Leu2+/Leu15-: Tc   | 18.9±6.0 | 20.0±7.4      |
| Leu2+/Leu15+: Ts   | 4.8±3.3  | 6.1±3.3       |
| Th/Ts              | 2.4±1.0  | 2.1±2.0       |
| Leu12: B cell      | 9.5±2.7  | 8.0±2.8       |
| Leu19: NK cell     | 12.0±6.6 | 16.2±9.8      |
| Leu7/Leu11         |          |               |
| Leu7-/Leu11+: NK++ | 5.9±3.4  | 6.6±4.2       |
| Leu7+/Leu11+: NK+  | 6.6±3.4  | 9.7±7.1       |

None of the cell populations showed any statistically significant difference by Student's t test.  
Values are mean±SD.

表3 Immunoglobulin and complement levels in sera of patients with endometriosis and controls

|               | IgG (mg/dl)  | IgM (mg/dl) | IgA (mg/dl) | C <sub>3</sub> (mg/dl) | C <sub>4</sub> (mg/dl) |
|---------------|--------------|-------------|-------------|------------------------|------------------------|
| Control       | 1565.6±206.9 | 305.8±111.2 | 264.5±80.7  | 60.0±13.4              | 26.0±10.7              |
| Endometriosis | 1719.8±329.5 | 242.7±101.3 | 297.0±80.2  | 62.1±7.2               | 25.9±7.7               |

None of immunoglobulin and complement levels showed any statistically significant difference by Student's t test. Values are mean±SD.

表4 The numbers of patients with endometriosis and controls positive for the autoantibodies screened

|                     | Control | Endometriosis |
|---------------------|---------|---------------|
| AntiDNA-Ab          | 0       | 0             |
| Antinuclear Ab      | 1 (±)   | 2 (±)         |
| AntiENA-Ab          | 0       | 0             |
| Lupus anticoagulant | 0       | 0             |
| RA test             | 0       | 0             |
| Thyroid test        | 0       | 0             |
| Microsome test      | 3       | 1             |

There were no positive cases for antinuclear antibody, but in 1 control and 2 patients with endometriosis, antinuclear antibody was borderline.

表5 Levels of antiendometrial antibody in sera of patients with endometriosis

|                         | Optic density×10 <sup>3</sup> |
|-------------------------|-------------------------------|
| Control (male): n = 5   | 111.1±23.3                    |
| Control (female): n = 8 | 144.6±72.7                    |
| Endometriosis: n = 16   | 152.7±73.3                    |

Values are mean±SD.

3例（子宮内膜症群2例，対照群1例）には抗子宮内膜抗体が認められた。しかしながら，免疫グロブリンを含む上記の他の免疫パラメーターとの間には特に相関を認めなかった。なお，この cell ELISA 法は別の婦人から得られた子宮内膜細胞を用いて同一血清で反復検査し同様の結果が得られた。

表6 Reports of serum immunoglobulins and compliments in women with endometriosis

|                              | No. of patients<br>(Characteristics) |                   | Immunoglobulin |     |     | Complements    |                |
|------------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------|-----|-----|----------------|----------------|
|                              | Endometriosis                        | Controls          | IgG            | IgM | IgA | C <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> |
| Badawy, 1984 <sup>5)</sup>   | 23                                   | 22<br>(infertile) | →              | →   | →   | ↑              | ↑              |
| Steele, 1984 <sup>11)</sup>  | 27                                   | 26<br>(infertile) | →              | →   | →   | →              | →              |
| Gleicher, 1987 <sup>7)</sup> | 31                                   | 100               | ↑              | →   | →   |                |                |
| Meek, 1988 <sup>8)</sup>     |                                      |                   |                |     |     |                |                |
| Follicular phase             | 6                                    | 4                 | ↓              | →   | ↓   | ↓              | ↓              |
| Luteal phase                 | 14                                   | 16                | →              | →   | →   | →              | →              |
| Total                        | 20                                   | 20<br>(fertile)   | →              | →   | ↓   | →              | →              |
| Kariya, 1991                 | 17                                   | 8                 | →              | →   | →   | →              | →              |

## 考 察

今回の検討では血清中の抗子宮内膜抗体を含む各種自己抗体，末梢血リンパ球サブセット，血清中の免疫グロブリン，補体のいずれの項目においても子宮内膜症群と対照群の間で有意差はなく末梢血レベルでは子宮内膜症患者に著明な免疫異常は存在しないことが示された。末梢血リンパ球サブセットに関しては Gleicher らも OKT3, OKT4, OKT8, OKM1, OKTa1 の各抗体を用いて検討し対照群と有意差のないことを報告している<sup>9)</sup>。我々はさらに二重染色を用いて helper T cell, suppressor T cell 等の単独同定を行って検討したがやはり有意差は認められなかった。子宮内膜症とNK機能については，腫瘍発生進展と免疫学的監視機構の観点からも非常に興味深い点であり，我々は以前，子宮内膜症患者血清が第三者のNK活性を抑制することを報告している<sup>10)</sup>。しかしながら今回のリンパ球サブセットの解析からは，内膜症患者自身のNK機能の低下を示唆する所見は得られなかった。

内膜症患者末梢血中の免疫グロブリン値，補体値についてこれまで報告されたものをまとめたものが表6であるがこれに示されているように一定の結果が得られていない。我々の結果は有意な変動は認めないというものであった。

抗子宮内膜抗体以外の自己抗体については，Gleicher らが子宮内膜症患者の28.8%に抗核抗体が陽性，45.5%にlupus anticoagulantが陽性で，患者の64.5%が何等かの自己抗体を持つことを報告している<sup>7)</sup>。我々の検討では抗核抗体は2例にのみ疑陽性，lupus anticoagulantには一例の陽性もなく全く対照

的な結果であった。

抗子宮内膜抗体については子宮内膜症患者がこれを高頻度に有するとの報告は多い<sup>4,5,6,12,13)</sup>。方法は子宮内膜組織切片上で免疫組織染色あるいは蛍光抗体法により調べたもの<sup>6,13)</sup>と子宮内膜組織より可溶性抗原を抽出し、これに対する抗体の存在を調べたもの<sup>4,5,12)</sup>とがある。免疫組織染色より抗子宮内膜抗体は細胞膜表面抗原であると考えられるが、同方法では定量的な比較ができない。一方子宮内膜組織可溶性抗原を用いたものでは定量は可能であるが細胞膜抗原に対する特異性という点に疑問が残る。それらと比較して今回我々が用いた cell ELISA 法は細胞膜抗原に対する抗体を定量的に測定できるという点でよりよい方法と思われる。ただし特異的抗体の存在の判定には、非特異的反応と区別するための cut off 値設定の問題がある。今回の検討では男性血清を negative control として検討し、子宮内膜症患者の 40%弱 (6/16) に抗体陽性という結果が得られたものの、症例が少ないため対照群との間に有意差は認めなかった。

なお自己抗体の機能的側面に関してはいまだ明らかでない点は留意されるべきであろう。すなわち抗子宮内膜抗体の存在は、それが内膜組織と抗原抗体反応さらには補体の活性化を通じて内膜の機能異常を来し不妊症や流産の原因になることが想定されるが、これに対し Schenken は次のように指摘している。『もし子宮内膜症患者にみられる抗子宮内膜抗体、補体が機能的に重要なものであれば当然認めるはずの子宮内膜における明らかな炎症所見の組織学的証明を示したものはない。子宮内膜症病変部においては炎症と繊維増成をよく認めるが、内膜症組織における抗子宮内膜抗体と補体の存在に関しては十分な検討がなされていない。』<sup>14)</sup>

一方、子宮内膜症患者の有する抗子宮内膜抗体以外の自己抗体が不妊症、流産と関連することを示唆する報告もある。前述したように Gleicher らは子宮内膜症患者の 2/3 に phospholipid, nucleotide に対する抗体が出現することを報告し<sup>7)</sup>、さらにこれらの自己抗体を有する不妊症患者の体外受精の妊娠率が自己抗体を有しないものに比し低い傾向にあり、これら抗体の存在が不妊症、流産と相関をすることを示唆している<sup>15)</sup>。しかしこれらの自己抗体の作用機序は推測の域を出ていない。

以上をまとめると抗子宮内膜抗体についてはその機能的な重要性、すなわち免疫応答に基づく組織障害、特に自己抗体による炎症等の組織障害が見られるか否かという検討が不十分であり、また他の自己

抗体についてもその存在が不妊をもたらす機序という最も重要な点が明らかでない。すなわち自己抗体の存在に関するこれまでの報告や今回の検討結果では、子宮内膜症患者が子宮内膜抗原に対する自己抗体を持っている可能性は強く示唆されるが、それにより病態が修飾されているか否かは明らかでなく自己免疫疾患というには不十分である。

以上、我々の検討結果をこれまでの報告と比較して考察したが、今回の結果からは、臨床的に診断される症状の完成した子宮内膜症では末梢血レベルでは明らかな免疫系の偏位は認められないことが示された。この結果は強力な免疫系の可塑性によるものかも知れないが、子宮内膜症の発症や初期病変の進展過程に免疫系が関わっている可能性は十分考えられ、今後さらに視点、方法を変えた詳細な検討が必要であろう。

#### 参考文献

- 1) Muse, K. N. and Wilson, E. A.: How does mild endometriosis cause infertility?, *Fertil. Steril.*, 38: 145, 1982
- 2) Wheeler, J. M., Johnston, B. M. and Malinak, L. R.: The relationship of endometriosis to spontaneous abortion, *Fertil. Steril.*, 39: 656, 1983
- 3) Groll, M.: Endometriosis and spontaneous abortion, *Fertil. Steril.*, 41: 933, 1984
- 4) Mathur, S., Peress, M. R., Williamson, H. O., Youmans, C. D., Maney, S. A., Garvin, A. J., Rust, P. F. and Fudenberg, H. H.: Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis, *Clin. Exp. Immunol.*, 50: 259, 1982
- 5) Badawy, S. Z. A., Cuenca, V., Stitzel, A., Jacobs, R. D. B. and Tomar, R. H.: Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis, *Obstet. Gynecol.*, 63: 271, 1984
- 6) Wild, R. A. and Shivers, C. A.: Antiendometrial antibodies in patients with endometriosis, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 8: 84, 1985
- 7) Gleicher, N., El-roey, A., Confino, E. and Friberg, J.: Is endometriosis an autoimmune disease?, *Obstet. Gynecol.*, 70: 115, 1987
- 8) Meek, S. C., Hodge, D. D. and Musich, J. R.: Autoimmunity in infertile patients with endometriosis, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 1365, 1988
- 9) Gleicher, N., Dmowski, W. P., Siegel, I., Liu, T. L., Friberg, J., Radwanska, E. and Toder, V.: Lymphocyte subsets in endometriosis, *Obstet. Gynecol.*, 63: 463, 1984
- 10) 王 輝生, 刈谷方俊, 神崎秀陽, 徳重 誠, 佐藤重恭, 吉田益美, 野田洋一, 森 崇英, 内田温士, 永牟田雅弘, 杜若笑美子: 子宮内膜症患者血清に

よるNK活性の抑制作用について,産婦進歩,41: 271, 1989

- 11) Steele, R. W., Dmowski, W. P. and Marmer, D. J.: Immunologic aspect of human endometriosis, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 6: 33, 1984
- 12) Chihai, H. J., Mathur, S., Holtz, G. L., Williamson, H. O.: An endometrial antibody assay in the clinical diagnosis and management of endometriosis, *Fertil. Steril.*, 46: 408, 1986
- 13) Saifuddin, A., Buckley, C. H. and Fox, H.: Immunoglobulin content of the endometrium in women with endometriosis, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2: 255, 1983
- 14) Schenken, R. S.: Endometriosis: Contemporary concepts in clinical management, 23, J. B. Lippincott Co., 1989
- 15) El-Roeiy, A., Gleicher, N., Friberg, J., Confino, E. and Dudkiewicz, A.: Correlation between peripheral blood and follicular fluid autoantibodies and impact on in vitro fertilization, *Obstet. Gynecol.*, 70: 163, 1987

## Studies on the Immune Function of Patients with endometriosis

Masatoshi Kariya, Kimitoshi Imai,  
Hideharu Kanzaki, Kenji Takakura,  
Norihiro Okamoto, Nobuyuki Emi,  
Hiroshi Fujiwara and Takahide Mori

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

Michiyuki Maeda

Chest Disease Research Institute,  
Kyoto University

It has been suggested that endometriosis may be a kind of autoimmune disease, on the basis of recent reports demonstrating that antibodies against endometrium were detected in patients with endometriosis and that endometriosis may be associated with abnormalities in immune function. To clarify the relationship of endometriosis to the immune dysfunction and presence of antibodies against the surface antigens of endometrial stromal cells, we investigated some of autoantibodies including antiendometrial antibodies, lymphocyte subsets, and levels of immunoglobulins and complements in endometriosis patients. Blood samples were obtained from 17 patients with endometriosis, 8 age-matched female controls and, for the study of antiendometrial antibodies, 5 age-matched male controls. The cell ELISA to detect antiendometrial antibodies was established using endometrial stromal cells as antigens which were obtained from a hysterectomized uterus. There were no significant differences between the patients with endometriosis and the female controls except for antiendometrial antibodies, indicating that patients with endometriosis are not accompanied with apparent abnormalities in the immune function. Antiendometrial antibodies were positive in 6 of 16 patients with endometriosis and in 1 of 8 control women, exhibiting a trend toward higher positivity in the patients group. There was no significant correlation between the existence of antiendometrial antibodies and the other parameters of immune function tested in this study, though 3 of 7 women positive for antiendometrial antibodies were also positive for the other autoantibodies. These findings suggest that some of the endometriosis patients develop antiendometrial antibodies during the course of the disease, however no obvious immunological deviation is present in the patients in spite of the induction of the antiendometrial antibodies.

(受付: 1991年2月28日)

## 経腔超音波断層法による 子宮内膜評価の正確性に関する検討

Study on the Accuracy of Endometrial Evaluation  
by Means of Transvaginal Ultrasonography

藤田保健衛生大学医学部産科婦人科学教室

廣 田 穰      吉 村 俊 和      白 木 誠  
Yutaka HIROTA    Toshikazu YOSHIMURA    Makoto SHIRAKI  
澤 田 富 夫      河 上 征 治      福 島 穰  
Tomio SAWADA      Seiji KAWAKAMI      Minoru FUKUSHIMA

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

杏林大学医学部産科婦人科学教室

吉 村 泰 典      中 村 幸 雄  
Yasunori YOSHIMURA    Yukio NAKAMURA

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

---

自然排卵周期婦人を対象とし、経腔超音波断層法による内膜評価の精度と臨床応用への有用性について検討を加え、以下の結果を得た。

1. 経腔超音波断層法により描出可能な内膜形態変化 (Ultrasonographic pattern of endometrium; UPE I→IV) と月経周期日との間には、有意の相関 ( $r=0.4789\sim0.5181$ ;  $P<0.01$ ) が認められた。
2. この内膜形態変化は、progesterone 分泌動態との強い関連が示唆され ( $r=0.6845$ ;  $P<0.01$ )、内膜形態により progesterone 値がある程度類推可能と思われた ( $P<0.01\sim0.001$ )。
3. また、UPE I→II への形態変化は progesterone の initial rise を表徴している可能性が類推され、更には卵胞期後期から黄体期初期にかけて、UPE II または III が描出されることは、排卵期周辺における至適な内分泌環境を示唆する所見と考えられた。
4. 黄体期に限れば、修正内膜体積 [= 内膜体積 / 子宮体部体積, (比)] と血中  $E_2 \cdot P$  値との間には高い相関 ( $r=0.7481, 0.7578$ ;  $P<0.01$ ) が認められ、修正内膜体積は黄体期の内分泌環境を良く反映するものと考えられた。

以上の結果は、経腔走査法により得られる子宮内膜の月経周期変動 (質的変動-内膜形態変化および量的変動-内膜体積変動) が steroid hormone 分泌と密接な関わりのあることを示唆するものであり、経腔超音波断層法による子宮内膜画像診断の信頼性と精度の高さを表すものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 35-40, 1992)

---

## 緒 言

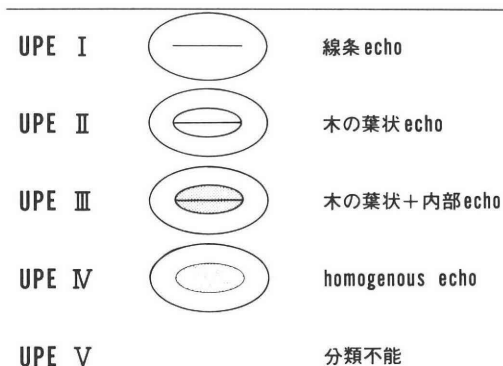
従来、子宮内膜の評価は、Noyes et al.<sup>1)</sup>の criteria に準拠した子宮内膜日付診と steroid hormone 測定 の両者より行われていたが、前者は観血的操作をと もなうため頻回な検査は不可能であり、pin point で の評価を余儀なくされていた。しかし、steroid hormone の target organ である子宮内膜は、月経周期 にともなう dynamic な変動を示しており、妊卵の着 床・発育という機能面から内膜を考えた場合、卵胞 成熟 monitoring と同様に、経日的な推移の中でその 変化を捉え評価していく必要があるものと思われる。 これを可能としたものが経腔走査法による子宮内膜 観察であり、本法は無侵襲かつ real time に子宮内膜 の描出を可能とし、繰り返し行える利点があり、更 には経腹走査法に比し再現性に優れる特徴を有して いる。このような経緯から、経腔超音波断層法によ る子宮内膜観察の評価は高まりつつあるが、いまま での報告は子宮内膜の周期性変動をその形態変化と 単なる内膜肥厚度とから別個に論じたものがほとん どである。

そこで今回我々は、子宮内膜の月経周期変動を、 質的変動—周期性内膜形態変化と量的変動—周期性 内膜体積変動の 2 点より捉え、これら形態変化と血 中 estradiol および progesterone 値との関連性を明 らかにし、経腔超音波断層法による内膜評価の精度 と臨床応用への有用性について検討を加えた。

## 対象および方法

対象は、当大学不妊外来を受診し LH surge の同 定が可能であった自然排卵周期婦人 34 例—103 周期 とした。対象症例の平均年齢は  $28.4 \pm 0.5$  歳、不妊 期間  $28.7 \pm 2.3$  カ月、月経周期  $30.1 \pm 1.8$  日であ った。なお子宮筋腫や子宮奇形などの子宮形態異常を 認めるものは、対象から除外した。

経腔走査法は、SONOLAYER—VSSA—90A：東 芝に 5MHz の経腔プローベを装着、同一検者、同一 条件 (gain 66dB, dynamic range 60dB) のもとに、 最大卵胞径が 18 mm になるまでは 2～3 日毎に、それ 以後は原則として連日行った。子宮内膜の観察は、 縦断面および横断面の二走査面より行い、月経周期 にともなう内膜形態変化は、図 1 に示す 5 型に分類 し評価した。すなわち内膜領域に線条エコーのみ観 察されるものを Ultrasonographic pattern of en- dometrium (以下 UPE) I、木の葉状のエコーと して観察されるものを UPE II、木の葉状エコーの 内部に echogenic 像が付加されたものを UPE III、



UPE : Ultrasonographic pattern of endometrium

図 1 経腔超音波断層法による内膜形態分類

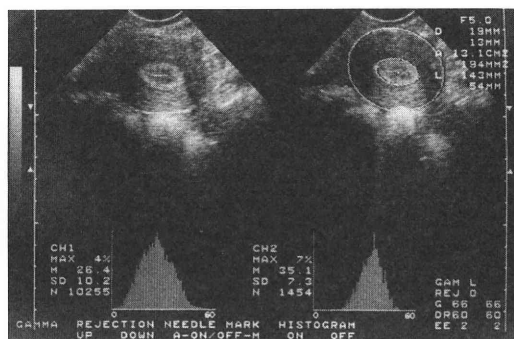


図 2 子宮内膜および子宮体部の関心領域の設定

木の葉状エコーが消失し homogenous な echogenic 像のみ認められたものを UPE IV、上記のどの cate- gory にも属さないものを分類不能例とした。また内 膜体積は、縦・横断の各走査面に関心領域を設定し、 A：縦断面最大内膜面積 ( $\text{mm}^2$ )、B：横断面最大内 膜面積 ( $\text{mm}^2$ ) を測定算出し、両者の積をもって内 膜体積 ( $= A \times B / 1000$ ) とした。同様の方法によ り、子宮体部体積の測定算出も行った (図 2)。LH surge の検出は、早朝第一尿を被検尿 (連日採取) と し、Hi—Gonavis を用い測定した。また血中の estradiol と progesterone 値の測定は、Radioim- munoassay (RIA) 法により行った。数値は Mean  $\pm$  SEM で表記、一部 data は computer による統計処 理 (相関分析) を加えた。

## 成 績

1. 月経周期における内膜形態分類 (UPE I～V) の分布 (図 3)

月経周期における UPE I から V の分布を、LH peak を基準とした dating から検討した。分類不能例 を除いたその分布は、月経周期にともない UPE I

→IVへと右あがりの分布傾向を示した。

## 2. 内膜形態分類 (UPE I ~ V) の出現頻度 (図4)

月経周期を LH peak を基準とし5期に集約, 各期における内膜形態の出現頻度を示す。UPE I は, 卵胞期より LH peak に向け出現し消失する pattern であり, UPE II は, LH peak に続く排卵の前後に出現し黄体期初期に消失する pattern, UPE III はその移行型として, また UPE IV は LH peak 以後急増し, 黄体期に特徴的な pattern として認識された。また UPE V は, 月経各期に 6.3~35.3% の出現頻度を示し, 月経前後で若干増加する傾向にあった。

## 3. 月経周期日と内膜形態 (UPE I ~ IV) との相

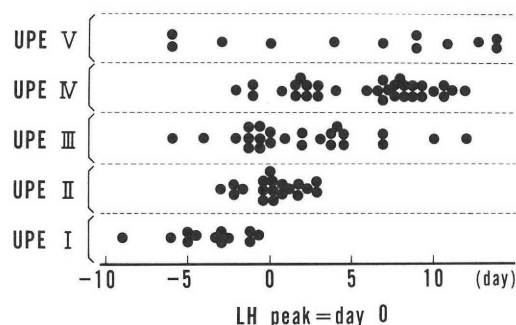


図3 内膜形態 I ~ V の分布

下の危険率で有意差が検定され, 本内膜分類と月経周期日との間の密接な関連が示唆された。

## 4. 内膜形態と血中 hormone 値との関係

表2にUPE I からIVに対応する血中 estradiol と progesterone 値を示した。中でも progesterone 値は, UPE I →IVへの移行にともない,  $0.3 \pm 0.1 \rightarrow 2.8 \pm 0.4 \rightarrow 5.1 \pm 0.6 \rightarrow 10.0 \pm 0.9$  ng/ml と順次上昇し, 各内膜形態との間に  $p < 0.01 \sim 0.001$  の有意差が検定され, 内膜形態から progesterone 分泌がある程度類推される可能性が示唆された。そこで, 血中 estradiol 値, progesterone 値, 内膜形態 (UPE I ~ IV) の3者の相互関係を相関マトリックスから検討したところ(表3), 月経周期にともなう内膜形

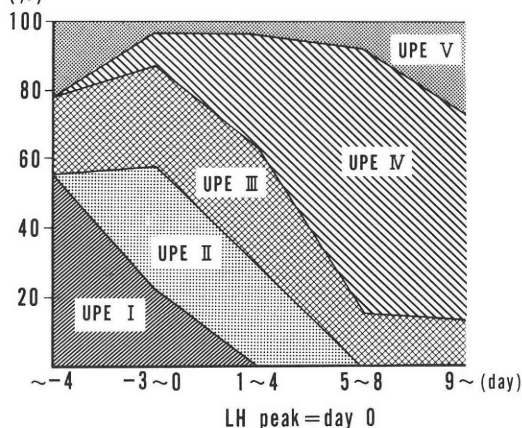


図4 内膜形態の I ~ V の出現頻度

表1 月経周期と内膜形態 (I ~ IV) との相関

| 月経周期               | 相関係数   | 分散比                            | 相関比                 |
|--------------------|--------|--------------------------------|---------------------|
| 月経開始日<br>= day 1   | 0.4789 | 25.4 > 4.05<br>F (3, 83, 0.01) | 有意差検定<br>$p < 0.01$ |
| LH peak<br>= day 0 | 0.4953 | 27.1 > 4.05<br>F (3, 83, 0.01) | $p < 0.01$          |
| 低体温最終日<br>= day 0  | 0.5178 | 29.7 > 4.05<br>F (3, 83, 0.01) | $p < 0.01$          |
| 超音波上排卵日<br>= day 0 | 0.5181 | 29.8 > 4.05<br>F (3, 83, 0.01) | $p < 0.01$          |

関 (表1)

月経周期日と内膜形態変化との間には一定の傾向があるように考えられたため, 両者の関係を相関比を用い検討した。月経周期は, ①月経開始日 (day = 1), ② LH peak (day = 0), ③低体温最終日 (day = 0) および④超音波上排卵日 (day = 0) で検討した。それぞれの基準に従った dating と内膜形態変化との相関係数は, ④:  $r = 0.5181$ , ③:  $r = 0.5178$ , ②:  $r = 0.4953$ , ①:  $r = 0.4789$  を示し, とともに 1% 以

態変化は, progesterone との関連の強いことが示唆された ( $p < 0.01$ )。

## 5. 内膜形態と血中 P 値の変動 (図5)

UPE I からIVは質的変量であるが, 以上の結果より定量的変量としての取扱いも可能と考え, それぞれに1から4の任意の数量化を行い, その変動を closed triangle 実線でプロット, LH peak 前後の血中 progesterone 動態と対比して示す。progesterone は, LH peak - 2day 以後徐々に上昇を開始し, LH

表2 内膜形態と血中 hormone 値

|         | E <sub>2</sub><br>(pg/ml) | Progesterone<br>(ng/ml) |   |
|---------|---------------------------|-------------------------|---|
| UPE I   | 80.2±10.8                 | 0.3±0.1                 | a |
| UPE II  | 93.3±9.6                  | 2.8±0.4                 | b |
| UPE III | 94.3±8.1                  | 5.1±0.6                 | c |
| UPE IV  | 91.4±10.6                 | 10.0±0.9                |   |

UPE: Ultrasonographic pattern of endometrium

a, c:  $p < 0.001$ b:  $p < 0.01$ 

表3 内膜形態と血中 hormone 値との相関マトリックス

|                |        |                     |                     |
|----------------|--------|---------------------|---------------------|
| E <sub>2</sub> | 1.0000 | 0.1115              | 0.1114              |
| Progesterone   | 0.1115 | 1.0000              | 0.6845 <sup>a</sup> |
| UPE I ~ IV     | 0.1114 | 0.6845 <sup>a</sup> | 1.0000              |

UPE: Ultrasonographic pattern of endometrium

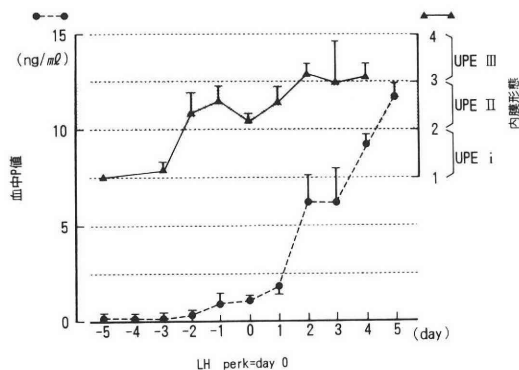
a:  $p < 0.01$ 

図5 内膜形態と血中 P 値の変動

peak+2day より急増してくるが、内膜もそれに呼応するように-2day には UPE I→IIへ、progesterone 分泌の急増する+2day 以後では II→IIIへの移行が観察された。特に、UPE I から II への変化は progesterone の initial rise を表徴している可能性が類推された。

#### 6. 子宮内膜体積と血中 E<sub>2</sub>, P 値の変動

内膜体積は症例ごとの子宮の大小によって個体差が生ずるのは当然であり、単にこれをもって評価を行うのは不適當であろう。そこで個体間での修飾因子を除く意味で、修正内膜体積〔=内膜体積/子宮体部体積, (比)〕を算出し検討した(図6)。その変動は closed circle 実線で示すように 2 峰性の変動を示し、progesterone 分泌増加の著しい黄体期中期に最大値 21.2±4.3 を示した。黄体期に限れば、その変動は両 hormone の分泌動態と parallel な関係にあるように思われた。そこで、黄体期における修正内膜体積と血中 estradiol および progesterone 値との

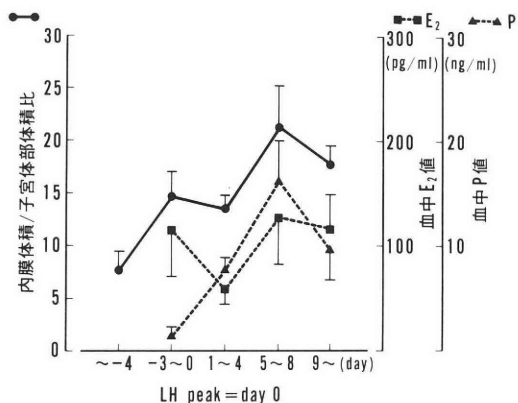


図6 修正内膜体積と血中 hormone 値の変動

表4 黄体期における修正内膜体積と血中 hormone 値との相関 Spearman 順位相関

|                                     | 相関係数   | 有意差検定      |
|-------------------------------------|--------|------------|
| 修正内膜体積-E <sub>2</sub> 値<br>(n = 17) | 0.7481 | $p < 0.01$ |
| 修正内膜体積-P 値<br>(n = 19)              | 0.7578 | $p < 0.01$ |

関係を Spearman の順位相関より検討した(表4)。修正内膜体積と血中 estradiol および progesterone 値との相関係数は、それぞれ  $r = 0.7481$ ,  $0.7578$  と高い相関を示した。したがって、修正内膜体積は、黄体期の内分泌環境を良く反映するものと考えられた。

#### 考 察

1970 年代後半に Hall et al.<sup>2)</sup>は、gray-scale により midluteal phase の子宮内膜を観察し、それを“bull's-eye”と表現し、子宮筋層と子宮内膜との echogenicity の差により内膜評価の可能なことを示した。その後 Sakamoto et al.<sup>3)</sup>は、月経周期にともなう子宮内膜領域の echogenicity の差とそれにより構成される子宮内膜形態変化より、増殖期と分泌期内膜の区別が可能なことを示し、臨床応用への先鞭をつけた。更に Fleischer et al.<sup>4,5)</sup>は、超音波断層法により描出される内膜 echo 像とそれに対応する内膜の組織学的な検討を行い、超音波上に描出される内膜形態変化は、増殖期・分泌期内膜の①内膜腺②血管③内膜線からの分泌物④間質の浮腫などの要因により惹起されることを提示し、月経周期にともなう内膜の microscopic な形態変化が超音波上で描出可能なことを報告した。また Sakamoto et al.<sup>6)</sup>はその後の追試により、月経周期を 5 期に分類し、それぞれに特徴的な超音波内膜所見を示したが、これは著者らの LH peak を基準とした内膜形態分類とほぼ一

致する結果であった。更には、吉満<sup>7)</sup>, Forrest et al.<sup>8)</sup>も同様の内膜形態変化を示すことを報告していることから、超音波断層法により本内膜形態分類の至適性は首肯されるものの、月経周期との関連を客観的に示したものは見当たらない。そこで著者らは、相関比を用い超音波上内膜形態分類と月経周期日との関連を検討し、両者間に有意の相関 ( $r=0.4789-0.5181$ ;  $P<0.01$ ) のあることを実証した。また、Shoupe et al.<sup>9)</sup>は内膜日付診の正確性に関する研究の中で、超音波上の排卵日を基準としたものが最も精度の高いことを指摘したが、著者らの検討でも、超音波上排卵日を基準としたものが最も高い相関係数 ( $r=0.5181$ ;  $P<0.01$ ) を示した。したがって、内膜をその形態 (microscopic であれば、ultrasonographic であれば) より評価する場合には、何を基準点として判定を行うかがその精度を論ずる場合の重要な要件であろうと思われた。

子宮内膜の echogenicity は、卵胞期後期より黄体期にかけて著明な変化を示すことは諸家の報告からも明らかであるが<sup>3-8)</sup>、我々が超音波上で内膜の存在を識別可能な level は U P E II 以上の形態ということになろう。そこで U P E I ~ IV における形態変化と steroid hormone の分泌動態との関連を検討した結果、その形態変化と progesterone 値との間には正の相関が認められ ( $r=0.6845$ ;  $p<0.01$ )、超音波上の内膜形態変化は主に progesterone の作用 (勿論、適切な estrogen の priming に立脚した) によることが示唆された。Wetzels et al.<sup>10)</sup>は、超音波上の排卵日前後の progesterone 値は  $1.5\text{ng/ml}$  前後の値を示すことを報告したが、我々の検討でも LH peak 翌日の progesterone 値は、 $1.8 \pm 0.3\text{ng/ml}$  の値を示し、U P E II の平均 progesterone 値 ( $2.8 \pm 0.4\text{ng/ml}$ ) に近接した値であり、U P E II は progesterone の initial rise と一致して発現する pattern であることが類推された。また LH peak の +2day および +3 day での progesterone 値は、ともに  $6.3\text{ng/ml}$  前後を示し、これもまた U P E III の progesterone 値 ( $5.1 \pm 0.6\text{ng/ml}$ ) と近似した値であった。したがって、卵胞期後期から黄体期初期にかけて、U P E II または III が描出されることは、排卵期周辺における至適な内分泌環境を示唆する所見と考えられた。

子宮内膜の量的変動因子としては、内膜の“thickness”を論じたものが全てであり、子宮内膜体積 (容量) より内膜変動を評価した報告はない。自然排卵周期における内膜肥厚度 (=thickness) の変動は、卵胞期:  $2.9\sim 4.2\text{mm}$ 、黄体期:  $3.6\sim 4.9\text{mm}$  とされ、概ね卵胞期から黄体期にかけて増加を示すとする報

告が多いが、報告者によってその変動幅は広い<sup>4,5,8,11)</sup>。これは、対象の個体差に起因している可能性もあり、著者らは個体間の修飾因子を取り除いた修正内膜体積により内膜の量的変動の評価を行った。その結果、黄体期での修正内膜体積変動は、estradiol ( $r=0.7481$ ;  $P<0.01$ ) および progesterone ( $r=0.7578$ ;  $P<0.01$ ) 分泌動態と高い相関のあることが明らかとなった。したがって、先に述べた子宮内膜の質的変動因子としての内膜形態変化の結果とを考え合わせると、黄体期初期から中期にかけて U P E II  $\rightarrow$  IV への変化が観察され、かつ修正内膜体積が 1.5 倍ほどの増加を示し、黄体期中期に修正内膜体積が 20 前後の値を示す場合は、内膜が steroid hormone に良く反応していることを示しており、その内分泌環境も良好なものと想定された。最近の超音波機器の改良進歩は数 mm の level での形態解析を可能とした。特に、子宮内膜描出における経腔走査法の解像度と再現性には優れたものがあり、上述のごとく子宮内膜形態所見より steroid hormone の分泌動態を類推し得る可能性が示唆されたことは、子宮内膜画像診断の信頼性と精度の高さを表すものと考えられた。

増殖期より分泌期にいたる子宮内膜成熟は、estrogen と progesterone の精緻な E-P balance に立脚する現象であり、これら hormone の imbalance は、子宮内膜腺と間質の解離発育を惹起し、子宮内膜本来の機能である妊卵の着床と発育を障害する。勿論その他にも、卵細胞自身の問題、免疫機構や PGs の関与など着床に関わる問題は数多くあるが、経腔超音波断層法を子宮内膜成熟障害の screening の一手段として位置付けた場合、本法は臨床に非常に有用な手法の一つであろうと思われた。またその他には、黄体機能不全の診断およびその治療効果の判定、IVF-ET の至適時期の決定など本法の応用範囲は広く、今後の運用に十分期待がもたれるものと思われた。

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 35 回日本不妊学会総会 (千葉) において発表した。

## 文 献

- 1) Noyes, R. W., Hertig, A. T. and Rock, J.: Dating the Endometrial Biopsy, *Fertil. Steril.*, 1:3, 1950
- 2) Hall, D. A., Hann, L. E., Ferrucci, J. T., Black, E. B., Braitman, B. S., Crowley, W. F., Nikrui,

- N. and Kelley, J. A.: Sonographic morphology of the normal menstrual cycle, *Radiology*, 133: 185, 1979
- 3) Sakamoto, C. and Nakano, H.: The echogenic endometrium and alterations during menstrual cycle, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 20: 255, 1982
  - 4) Fleischer, A. C., Kalemeris, G. C. and Entman, S. S.: Sonographic depiction of the endometrium during normal cycle, *Ultrasound in Med. & Biol.*, 12: 271, 1986
  - 5) Fleischer, A. C., Kalemeris, G. C., Machin, J. E., Entman, S. S. and Everette-James, A. Jr.: Sonographic depiction of normal and abnormal endometrium with histopathologic correlation, *J. Ultrasound Med.*, 5: 445, 1986
  - 6) Sakamoto, C.: Sonographic criteria of phasic changes in human endometrial tissue, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 23: 7, 1985
  - 7) 吉満陽孝, 中村元一, 井村睦規, 石明 寛, 松口博之, 浜田政雄, 中野仁雄: 超音波子宮内膜像の変化と卵巣ホルモン動態との関連性に関する研究, *日産婦誌*, 39: 1769, 1987
  - 8) Forrest, T. S., Elyaderani, M. K., Muilenburg, M. I., Bewtra, C., Kable, W. T. and Sullivan, P.: Cyclic endometrial changes: US assessment with histologic correlation, *Radiology*, 167: 233, 1988
  - 9) Shoupe, D., Mishell, D. R. Jr., Lacarra, M., Lobo, R. A., Horenstein, J., d' Ablain, G. and Moyer, D.: Correlation of endometrial maturation with four methods of estimating day of ovulation, *Obstet. Gynecol.*, 73: 88, 1989
  - 10) Wetzels, L. C. G. and Hoogland, H. J.: Relation between ultrasonographic evidence of ovulation and hormonal parameters; luteinizing hormone surge and initial progesterone rise, *Fertil. Steril.*, 37: 336, 1982
  - 11) Imoedemhe, D. A. G., Shaw, R. W., Kirkland, A. and Chan, R.: Ultrasound measurement of endometrial thickness on different ovarian stimulation regimens during in-vitro fertilization, *Hum.Reprod.*, 2: 545, 1987

### Study on the accuracy of endometrial evaluation by means of transvaginal ultrasonography

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

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

Yasunori Yoshimura and Yukio Nakamura

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

Endometrium was examined for the women with spontaneous ovulatory cycles by means of transvaginal ultrasonography. Assessment on its accuracy as well as usefulness of clinical application was carries out. Followings are the results:

1. Significant correlation ( $r=0.4789-0.5181$ ;  $p<0.01$ ) was recognized between the morphological changes of endometrium depicted by this method (ultrasonographic pattern of endometrium, UPE I  $\rightarrow$  IV) and the datings of menstrual cycle.

2. Strong correlation was assumed between the morphological changes of endometrium and secretory dynamics of progesterone ( $r=0.6845$ ;  $p<0.01$ ). Subsequently, we may to some extent infer the serum progesterone concentration by these endometrial morphologies.

3. Also, the morphological changes from the UPE I to II would possibly indicate the intial rise of progesterone. The fact that UPE either II or III could be observed around the late follicular and early luteal phases would strongly suggest the optimum endocrinological environment at the peri-ovulatory phase.

4. Looking into only the luteal phase, there exists a strong correlation ( $r=0.7481, 0.7578$ ;  $p<0.01$ ) between the corrected endometrial volume and the values of both E2 and progesterone in the blood. Therefore, this corrected endometrial volume would well reflect the endocrinological environment of luteal phase.

Above findings would suggest the presence of close relationship between the cyclic changes of endometrium depicted by thes method and the secretion of steroid hormones. Thus, these result would well endorse the reliability and the accuracy of the pictorial diagnosis of endometrium by means of transvaginal ultrasonography.

(受付: 1991 年 6 月 7 日)

# A CLINICAL AND STATISTICAL STUDY ON ENDOMETRIOSIS

Antoine ABU—MUSA, Kentaro TAKAHASHI, Hiroko NAGATA  
and Manabu KITAO

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

---

**Abstract:** A clinical and statistical analysis was performed in 204 women with endometriosis who visited our department from January 1986 to December 1989. Patients were divided into two groups: Group 1 in whom endometriosis was diagnosed clinically and group 2 in whom it was diagnosed surgically. The average ages of patients in group 1 and group 2 were  $34.0 \pm 7.0$  years and  $41.7 \pm 7.9$  years, respectively. Endometriosis was diagnosed in 16% of patients with infertility. With time the number of patients with stage 1 (r-AFS) endometriosis increased. Also laparoscopy was used more frequently during the latter half of the study. Recurrence of endometriosis was more significant in infertile as compared to fertile patients.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 41-43, 1992)

---

## Introduction

Endometriosis is a common cause of infertility. Although there has been substantial advancement in the understanding of its pathophysiology, diagnosis and treatment, endometriosis remains to be a challenge to the gynecologist. The aim of the present study was to evaluate our experience with this disease during the past 4 years.

## Materials and Methods

Between January 1986 and December 1989, 2779 patients visited our department at Shimane Medical University Hospital, of whom 204 were diagnosed to have endometriosis. Patients' medical charts were reviewed retrospectively and based on the method of diagnosis the patients were divided into 2 groups: Group 1 in whom the diagnosis was made clinically, i. e., based on signs and symptoms, physical examination, ultrasound and serum CA-125 levels; and group 2 who underwent laparoscopy or laparotomy with the visual or pathological documentation of en-

dometriosis. In group 1, endometriosis was classified using Beecham<sup>1)</sup> classification and in group 2 using revised AFS<sup>2)</sup> classification. Endometriosis was treated either medically and/or surgically. Surgical treatment included laparoscopy, conservative or definitive (total abdominal simple hysterectomy) surgery. The first two procedures were performed in patients with infertility, while the last one was applied when indicated to patients who completed their family. Patients were followed-up at our outpatient department. Student t-test was used for statistical analysis.

## Results

During the 4-year study period the number of patients diagnosed as endometriosis was 204. The ratio of patients diagnosed clinically at outpatient department to the total number of patients did not differ significantly in each year. On the other hand significantly more patients were diagnosed surgically to have endometriosis during the last 3 years of the study as compared to the first year.

The average age of patients in group 1 was 34.

$0 \pm 7.0$  years with no statistical difference in age between patients with external and internal endometriosis. The average age of patients in group 2 was  $41.7 \pm 7.9$  years, which was significantly more than that of group 1. Moreover, in this group the average age of patients with internal endometriosis ( $46.0 \pm 6.6$  years) was significantly more than that of external endometriosis ( $38.2 \pm 8.0$  years), throughout the study period (Table 1).

When our data was analyzed according to the stages of the disease, it was noted that with time the number of patients with stage I revised AFS<sup>2)</sup> endometriosis increased, although this did not reach statistical significance (Fig. 1). However, there was no change in the yearly number of patients in every stage of Beecham<sup>1)</sup> classification.

As for the operative procedure performed during the study period, there was no difference in the type of procedure performed but laparoscopy

was used more frequently during the latter half of the study (Table 2).

Endometriosis was associated with leiomyoma in 30% of the cases, which is in accordance with the national figures. Endometriosis was diagnosed in 16% of patients with infertility. Although many of them had advanced stages, there was no statistical difference in the number of infertile women among the different stages. These women were treated either surgically via laparoscope or conservative surgery and/or medically. Of the 46 women who presented with infertility and were found to have endometriosis, 7 got pregnant: 3 belong to group 1 and 4 to group 2. Recurrence was diagnosed in 2 patients of group 1 and in 9 patients of group 2. On the other hand, only 1 fertile women with endometriosis had recurrence and this was statistically less than that of infertile women (Table 1).

Table 1. Characteristics of patients with endometriosis

|                        | Clinically diagnosed | Surgically diagnosed |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| number                 | 33                   | 171                  |
| age (mean $\pm$ SD)    | $34.0 \pm 7.0^a$     | $41.7 \pm 7.9^b$     |
| external endometriosis | $33.9 \pm 6.8$       | $38.2 \pm 8.0^c$     |
| internal endometriosis | $34.1 \pm 8.1$       | $46.0 \pm 6.6^d$     |
| infertile              | 11                   | 35                   |
| concieved              | 3                    | 4                    |
| recurrence             | 2                    | 9 <sup>e</sup>       |
| fertile                | 16                   | 131                  |
| recurrence             | —                    | 1 <sup>f</sup>       |

a-b,  $p < 0.001$

c-d,  $p < 0.001$

e-f,  $p < 0.001$

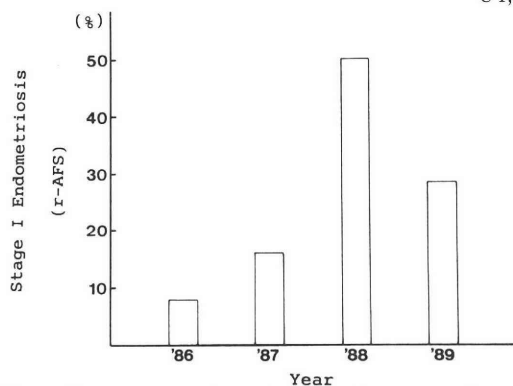


Fig. 1 Percentage of patients with stage I endometriosis (r-AFS) during the study period

Table 2. Operations

|       | Laparoscopy | Conservative | TAH+BSO* | Total |
|-------|-------------|--------------|----------|-------|
| 1986  | 2           | 5            | 21       | 28    |
| 1987  | 7           | 6            | 32       | 45    |
| 1988  | 6           | ?            | 33       | 42    |
| 1989  | 12          | 4            | 40       | 56    |
| Total | 27          | 18           | 126      | 171   |

\* TAH+BSO, Total abdominal hysterectomy +bilateral salpingoophorectomy

## Discussion

Our results show that endometriosis is a com-

mon cause of infertility (16% of infertile patients), which is not related to the stage of the disease. Also surgical and hormonal treatments seem to be equally effective in the treatment of endometriosis. Recurrence of the disease was less in fertile women as compared to infertile women. This can be explained by the fact that infertile woman has a more progressive disease which is not only affecting the pathology of her pelvis but also her fecundity. As we gained more experience with the use of laparoscopic technique there was an increasing trend to the use of laparoscopy for both the diagnosis and treatment of endometriosis as shown in this study. This probably led to the increased tendency in the diagnosis of early stages of the disease. Although the role of laparoscopy in the treatment of early endometriosis is still controversial<sup>3)</sup>, it remains to be the best method available for the diagnosis and follow-up of endometriosis. Since early diagnosis and treatment affect the prognosis of the disease, laparoscopy is expected to be more widely used. Although the diagnosis of endometriosis based on clinical and laboratory findings is not as valid as visual or pathological diagnosis, it might be resorted to in some cases where there is a contraindication to surgery. Using serum CA-125 has been of great aid<sup>4)</sup>, but its future depends on further research.

Endometriosis is still a complex disease. The understanding of its pathophysiology, role in infertility, diagnosis and treatment are still evolving and changing. One way to understand this disease is to analyze one's experience through such a study.

### References

- 1) Beecham, C. T.: Classification of en-

- dometriosis, *Obstet. Gynecol.*, 28: 437, 1966
- 2) Revised American Fertility Society: Classification of endometriosis: *Fertil. Steril.*, 43: 351, 1985
- 3) Chong, A. P., Keene, M. E., Thornton, N. L.: Comparison of three modes of treatment for infertility patients with minimal pelvic endometriosis, *Fertil. Steril.*, 53: 407, 1990
- 4) Takahashi, K., Kijima, S., Yoshino, K., Shibukawa, T., Kitao, M.: Serum CA 125 as a marker for patients with external endometriosis, *Int. J. Fertil.*, 34: 143, 1989

### 当科における子宮内膜症の 臨床統計学的検討

島根医科大学医学部産科婦人科学教室

アブムサ・アントワン 高橋健太郎 永田裕子  
北尾 学

1986年1月から1989年12月までに当科で子宮内膜症と診断された患者204名について臨床統計的に検討した。患者は以下の2群に分けた。：1群の子宮内膜症は外来で臨床的に診断した群とし、もう1群の子宮内膜症は腹腔鏡、または開腹術により診断した。手術患者の平均年齢は $41.7 \pm 7.9$ 歳で外来患者の $34.0 \pm 7.0$ 歳と比較して有意に高年齢であった。不妊症患者における子宮内膜症患者の頻度は約16%であった。手術患者ではr-AFS分類のI期の患者が年々増加傾向にあり、腹腔鏡施行数も増加傾向にあった。再発症例は非不妊症患者で不妊症患者よりも有意に低値であった。

(受付：1991年5月7日)

## 卵巣子宮内膜症における複合糖質の分布 およびホルモン療法による影響に関する検討

### Effect of Danazol and Buserelin on Glycoconjugate Distribution in Ovarian Endometriosis

長崎大学医学部産科婦人科学教室

黄 宏 駿 石 丸 忠 之 藤 下 晃  
Hung June HUANG Tadayuki ISHIMARU Akira FUJISHITA  
山 邊 徹  
Tooru YAMABE

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

卵巣子宮内膜症組織における複合糖質の分布, さらに danazol や buserelin 投与による影響について, 7種類のレクチンを用いて検討した. Con A, WGA, RCA-1 および PNA 反応は腺および間質に認められ, その反応態度は増殖後期内膜に比べて若干低下するか, 類似していた. SBA 反応では, 一部の腺細胞にのみ陽性所見が認められるが, 増殖後期内膜に比べると軽度であった. Danazol 投与によって, Con A, WGA および RCA-1 反応は低下し, SBA 反応は陰性となった. しかし PNA 反応には変化はみられず, その反応度は無治療群と同様であった. Buserelin 投与では, ConA, WGA および RCA-1 反応は danazol 投与の場合に類似し, かなり減弱していた. また SBA 反応も陰性であった. PNA では無治療群や danazol 投与群に比べて, 反応度は低下していた. 上記の成績より, 卵巣子宮内膜症組織における複合糖質の分布は増殖後期内膜に類似することが認められたが, その含量は少なかった. またホルモン療法において, ほとんどのレクチン反応は低下し, 閉経後萎縮内膜に類似していた. これはホルモン療法によりもたらされた低 estrogen 環境および内膜症組織への直接作用によるものと思われる.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1) 44-48, 1992)

#### 緒 言

子宮内膜症は月経困難症, 過多月経や下腹痛などを訴え, しばしば不妊の原因となる疾患である. これに対して, 従来より種々の治療法が行われてきたが, 最近, ホルモン療法および microsurgery の併用が推奨されている<sup>1)</sup>. すなわち, 術前のホルモン療法により, pelvic vascularization を減少させ, 手術操作を容易にし, 術後の癒着を軽減させることができる. そのためのホルモン剤としては danazol, progesteron の gestrinon (Roussel UCLAF, Paris,

Frances)<sup>2)</sup>, または LH-RH agonist の buserelin (Hoechst, West Germany)<sup>3)</sup>などが用いられるが, いずれも内膜症組織を萎縮させる作用を有している. 一方, 細胞の増殖, 分化, 退行性変化, 細胞相互間の認識さらに癌化に際して, 細胞膜における複合糖質の糖鎖構造は変化することが知られている. このような変化は糖鎖結合特異性を有するレクチンを指標として把握することができる. そこで, 卵巣子宮内膜症における複合糖質の分布および danazol や buserelin による影響について, レクチン組織化学的に検討した.

対象および方法

卵巣子宮内膜症のうち、無治療例5例、danazol 400mg /日を4か月間投与した3例およびbuserelin 900 $\mu$ g/日を6か月間投与した3例、計11例について、手術による摘出材料を用いた、11例の年齢は26~38歳で、いずれも正常月経周期を有していた。なお閉経後萎縮内膜2例を対照とした。採取された内膜組織は formalin 固定、paraffin 包埋後、4 $\mu$ m の薄切標本を作製し、H E 染色およびレクチン染色を施した。

Xylene・alcohol 系列で脱 paraffin した後、0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>・MeOH で内因性 peroxidase を不活性化し、ビオチン標識レクチンと室温で30分間反応させた。さらにABC法で呈色を行い、hematoxylin Mayer で核染色を施した。なお使用したレクチンは Con A, WGA, RCA-1, PNA, SBA, DBA および UEA-1 の7種であり、各レクチンの糖残基に対する特異性については、寡糖類を用いて確認した(表1)。

表1 用いられるレクチンの特性

| レ ク チ ン                        | 糖残基特異性*      |
|--------------------------------|--------------|
| ピーナッツ凝集素 (PAN)                 | $\beta$ -Gal |
| Dolichos biflorus 凝集素 (DBA)    | GalNAc       |
| 大豆凝集素 (SBA)                    | Gal, GalNAc  |
| Ulex europaeus 凝集素 I (UEA-1)   | Fucose       |
| コンカナバリン A (Con A)              | Man, Glc     |
| Ricinus communis 凝集素 I (RCA I) | $\beta$ -Gal |
| 小麦胚種凝集素 (WGA)                  | シアル酸, GlcNAc |

※Gal: ガラクトース, GalNAc: N-アセチル-ガラクトサミン, Man: マンノース, Glc: グルコース, GlcNAc: N-アセチル-グルコサミン

結 果

組織学的に卵巣子宮内膜症は腺および間質から構成される。腺は単層の立方上皮からなり、腺腔に分泌物は認められず、間質は密または疎であり、その量は腺上皮の増殖、分化とは並行しなかった。また正常内膜における増殖期や分泌期の像とも異っていた。一方、danazol や buserelin 投与群では、内膜症組織の腺上皮は萎縮性で菲薄となり、腺腔は狭小化し、間質細胞も小型となり、閉経後萎縮内膜に類似していた。

レクチン組織化学的には、Con A を除くすべてのレクチン反応は細胞膜に局限してみられた。また複合糖質は組織中に糖蛋白質、糖脂質または多糖類などの型で存在し、その大部分は末端にシアル酸を持ち、このシアル酸をはずせば、次にある糖鎖のレク

チン反応度が亢進するか、各レクチンと反応できるようになる。したがって、PNAについては neuraminidase による前処置を行った後に反応させた。

1. Con A

無治療群では、主として腺細胞の細胞質に陽性所見を認めたが、一部において細胞膜も陽性であった。また間質は一様に陽性であったが、血管内皮および赤血球は陰性であった。一方、danazol 群では、腺細胞の細胞膜のみが弱陽性で、細胞質は陰性であった。また間質は弱陽性となった。Buserelin 群では、腺細胞の細胞質に弱い陽性反応がみられ、細胞膜および

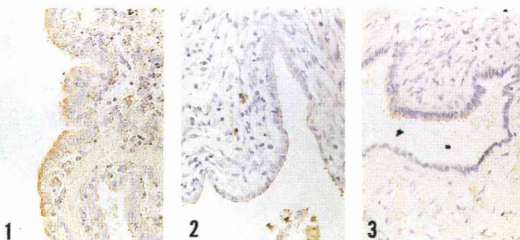


図1 卵巣子宮内膜症における Con A 反応。

1) 無治療群; 主に上皮細胞の細胞質に陽性所見がみられる。2) Danazol 投与群; 腺腔側細胞質が弱陽性である。3) Buserelin 投与群; 細胞質は弱陽性で、細胞質は陰性である。

間質はともに陰性であった(図1)。これらに対して、閉経後萎縮内膜では、細胞質にのみ弱陽性反応がみられ、間質は陰性であった。

2. WGA

無治療群では、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。danazol 群および buserelin 群では、腺腔側細胞膜のみが同程度陽性であったが、無治療群に比べると、軽度であった。また danazol 群において、一部の間質細胞は

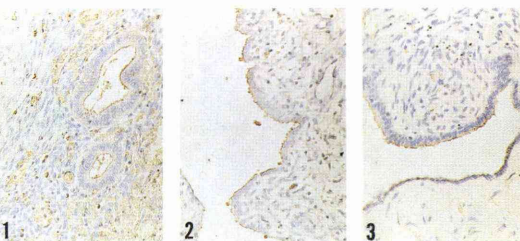


図2 卵巣子宮内膜症における WGA 反応。

1) 無治療群; 腺腔側細胞膜および間質は陽性である。2) Danazol 投与群; 細胞質は弱陽性となり、一部の間質に陽性反応がみられる。3) Buserelin 投与群; 細胞質は陽性を示すが、間質は陰性である。

陽性であった(図2)。一方、閉経後萎縮内膜では、上皮の細胞膜のみに陽性所見を認め、その程度は弱

かった。

### 3. RCA-1

無治療群における腺上皮の腺腔側細胞膜および間質は陽性であった。danazol および buserelin 群では、腺上皮の反応度はともに低下しており弱陽性であっ

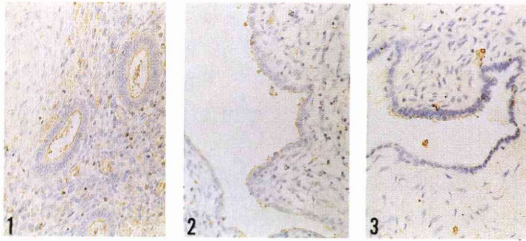


図3 卵巣子宮内膜症における RCA-1 反応。

1) 無治療群；腺腔側細胞膜および間質は陽性である。2) Danazol 投与群；細胞質は弱陽性である。3) Buserelin 投与群；細胞質に弱い陽性反応がみられる。

た。また danazol 群において、一部の間質細胞は陽性であった(図3)。閉経後萎縮内膜では、細胞膜のみ陽性で、間質は陰性であった。

### 4. PNA

無治療群、danazol 群および buserelin 群のいずれにおいても、腺上皮の腺腔側細胞膜に強い陽性反応がみられ、間質も陽性であった。また3群間に反応度の差は認められなかった(図4)。一方、閉経後萎

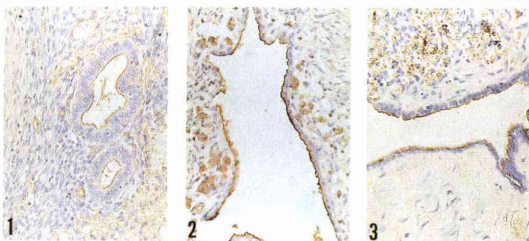


図4 卵巣子宮内膜症における PNA 反応。

1) 無治療群 2) Danazol 投与群および 3) Buserelin 投与群のいずれにおいても、細胞膜および間質は陽性である。またレクチン反応度は互いに類似している。

縮内膜では、腺腔側細胞膜に陽性反応がみられるが、その程度は他の3群に比べて減弱しており、間質も陰性であった。

### 5. SBA

無治療群においてのみ腺腔側細胞膜に陽性反応がみられたが、個々の腺上皮細胞によって反応度が異なり、陽性細胞の数も少なかった(図5)。danazol 群および buserelin 群では、ともに陰性であった。

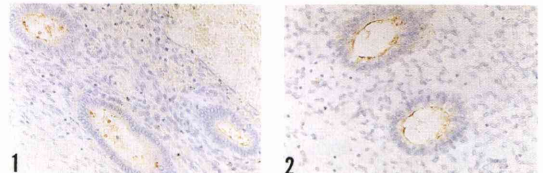


図5 SBA 反応。

卵巣子宮内膜症(1)では腺上皮の腺腔側細胞膜に陽性所見がみられるが、その反応度は低く、増殖後期内膜(2)に比べて軽度である。

### 6. DBA および UEA-1

いずれの群の内膜症組織においても、レクチン反応は陰性であった。

## 考 察

レクチンを指標として、卵巣子宮内膜症組織における複合糖質の分布、さらに danazol および buserelin 投与による糖鎖構造の変化について検索した(表2)。卵巣子宮内膜症では、腺細胞に ConA, WGA, RCA-1 および PNA 反応が証明され、それぞれのレクチンと特異的に結合する糖鎖の D-mannose, N-acetyl-D-glucosamine, D-galactose および galactose  $\beta$ -(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine が存在していることが認められた。このような所見は増殖後期内膜に類似するが<sup>4)</sup>、レクチン反応度から、その含量は少ないものと思われた。SBA 反応では、腺上皮においてもいくつかの細胞にしか陽性反応を示さず、また腺によって反応度が異なることから、SBA と特異的に結合する N-

表2 卵巣子宮内膜症におけるレクチン結合

|       | 無 治 療 群 |     | danazol 投与群 |     | buserelin 投与群 |     |
|-------|---------|-----|-------------|-----|---------------|-----|
|       | 腺上皮     | 間 質 | 腺上皮         | 間 質 | 腺上皮           | 間 質 |
| Con A | ++      | +   | ±           | ±   | ±             | -   |
| WGA   | ++      | +   | +           | ±   | +             | -   |
| RCA-1 | ++      | +   | ±           | -   | ±             | -   |
| PNA   | ++      | +   | ++          | +   | +             | -   |
| SBA   | +       | -   | -           | -   | -             | -   |
| DBA   | -       | -   | -           | -   | -             | -   |
| UEA-1 | -       | -   | -           | -   | -             | -   |

acetyl-D-galactosamine の含量が少なく、増殖後期内膜における態度とは異なっていた(図5)。そのほか、DBAやUEA-1反応は陰性であり、卵巣子宮内膜症組織には、DBAと特異的に結合するN-acetyl-D-galactosamine およびUEA-1と特異的に結合するfucoseの合成能がきわめて低いか欠如するものと考えられた。

このように、卵巣子宮内膜症は組織学的には、増殖後期内膜に近い所見を呈し、またレクチンによる組織化学的にも増殖後期内膜に類似した複合糖質の分布を示すことからしても、子宮内膜症はestrogen依存性とみなすことができる。一方、子宮内膜に比べてestrogen receptor, progesteron receptor またはandrogen receptorの量は少なく<sup>5,6)</sup>とくにestrogen receptorの量は内膜症組織によって変動が著しく、子宮内膜に類似する程度か、まったく検出できないこともあり<sup>5,8)</sup>、しかも周期的変化を示さない性質があるといわれる<sup>7)</sup>。したがって、ホルモン感受性は低く、腺および間質における増殖と分化の程度にも関連しない。このことから、卵巣子宮内膜症は月経周期とは無関係に、ほぼ一定した複合糖質の分布を示すものと考えられる。

ホルモン療法に関して、danazolは17- $\alpha$ -ethinyltestosteroneの誘導体であるが、末梢血中の性ステロイドホルモン結合(SHBG)と結合する一方、肝におけるSHBG合成を抑制する<sup>9,10)</sup>。その結果、生物活性を有するfree testosteroneが著明に増加する。しかし長期投与によって性腺におけるsteroidogenesisを抑制するため、total testosteroneは減少する<sup>9,10)</sup>。また標的細胞に対しては、danazolはandrogen receptorと強い親和性を有し、mRNAと新蛋白合成を誘導し、弱いandrogenicな性質を有する。また中枢に対しては、視床下部のandrogen receptorを介してGnRH pulse generatorに作用し、LH pulseの頻度を減少させるとともに、下垂体への直接作用によってLH pulseの振幅を増大させる。さらに抗gonadotropin作用による卵巣steroid合成抑制のほか、卵巣の性steroid合成酵素を直接抑制することから、末梢血estradiol値はさらに低下することになる。

子宮内膜症に対するdanazolの作用機序はさらに複雑である。すなわち上述した視床下部、下垂体に対する抗gonadotropin作用および卵巣におけるestrogen生合成抑制作用のほか、内膜症組織におけるandrogenまたはprogesteron receptorと結合し、細胞増殖を抑制することにより<sup>7)</sup>、内膜症組織の萎縮をもたらす。さらにdanazol投与により増加した血中free testosteroneはandrogen receptorと結合し

内膜症組織の萎縮をきたす。そのほか、T細胞増殖抑制など免疫系に対する作用によって、病巣の縮小はさらに促進されるものと思われる。

一方、danazolはestrogen receptorとは結合しないものの、その投与によりestrogen receptorおよびprogesteron receptorの量はかなり減少し、低estrogen環境がもたらされる。そのためか、danazol投与によりcon A, WGA およびRCA-1反応は減弱し、閉経後萎縮内膜に類似した反応態度を示し、それぞれのレクチンと特異的に結合する糖鎖の合成能が低下した状態となる。しかし、PNAでは、danazolを投与しても、その反応度は変化せず、無治療群に類似して、galactose  $\beta$ -(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine 合成は抑制されないものと思われる。またdanazolはestrogen値を低下させることから、該当する糖鎖の合成能にestrogenは関与しないことが示唆された。

これに対して、buserelinは長期持続性のLH-RH agonistで、その投与により下垂体におけるLH-RH receptorの数を著明に低下させるとともに、receptorと長期間結合することにより、下垂体でのgonadotropin産生を減少させる。それに伴って、末梢血estradiol値を低下させ、内膜症組織を萎縮に導く作用機序が認められている。しかし卵巣に対する直接作用については賛否両論がある。

Buserelinを投与することにより、内膜症組織におけるCon A, WGA およびRCA-1反応はかなり低下し、その程度はdanazol群よりも著明であった。これはbuserelinによる低estrogen環境によるものと思われるが、レクチン反応度から、danazolの場合よりも、それぞれのレクチンと結合する糖鎖の合成能が強く抑えられたものと考えられる。一方、PNA反応はdanazol群よりも軽度であり、低estrogen環境のほか、内膜症組織萎縮の程度がdanazol群よりも顕著のためと思われる。

以上のことから、卵巣子宮内膜症組織における複合糖質の分布は増殖後期内膜に類似するが、ホルモン療法において、PNA反応を除くすべてのレクチン反応は低下し、それぞれの糖鎖合成能が抑制されたものと考えられる。いずれにせよ、卵巣子宮内膜症に対するホルモン療法の効果には限度があり、今後、他の糖鎖への影響についても、さらに検討する必要がある。またestrogen receptorの量が治療効果に影響するものと考えられるが、内膜症では正常子宮内膜よりも少ないことから、病巣の萎縮をはかるには、danazolの免疫系への作用にも注意を払う必要がある。

## 文 献

- 1) Donnez, J., Lemaire - Rubbers, M., Karaman, Y., et al.: Combined (hormonal and microsurgical) therapy in infertile women endometriosis, *Fertil. Steril.*, 48: 239, 1987
- 2) Coutinho, E. M.: Treatment of endometriosis with Gestrinone (R23/23), a synthetic anti-estrogen, anti-progesterone, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 144: 895, 1982
- 3) Lemay, A., Maheux, R., Faure, N., et al.: Reversible hypogonadism induced by a luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) agonist (Buserelin) as a new therapeutic approach of endometriosis, *Fertil. Steril.*, 41: 863, 1984
- 4) 黄 宏駿, 藤下 晃, 河野雅洋, 石丸忠之, 山辺徹: 子宮内膜における複合糖質の分布に関する検討, *日不妊誌*, 36: 524, 1991
- 5) Janne, O., Kauppila, A., Kokko, E., Lantto, T., Ronnberg, L., Vihko, R.: Estrogen and progesterin receptors in endometriosis lesions: comparison with endometrial tissue, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 562, 1981
- 6) Forbes, K. L., Dowsett, M., Rose, G. L., Mudge, J. E., Jeffcoate, S. L.: Dosagerelated effects of danazol on sex hormone-binding globulin and free and total androgen levels, *Clin. Endocrinol.*, 25: 597, 1986
- 7) Bergqvist, A., Rannevik, G., Thorell, J.: Estrogen and progesterone cytosol receptor concentration in endometriotic tissue and intra-uterine endometrium, *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, [Suppl] 101: 53, 1981
- 8) Gould, S. F., Shannon, I. M., Gunha, G. R.: Nuclear estrogen-binding sites in human endometriosis, *Fertil. Steril.*, 39: 520, 1984
- 9) Kauppila, A., Vierikko, P., Isotalo, H., Ronnberg, L., Vihko, R.: Cytosol estrogen and progesterin receptor concentrations and  $17\beta$ -hydroxy-steroid dehydrogenase activities in the endometrium and endometriotic tissue. Effects of hormone treatment, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, [Suppl] 123: 49, 1984
- 10) Nilsson, B., Sodergard, R.: Damber, M-G., Damber, J-E., Von-Schoultz, B.: Free testosterone levels during danazol therapy, *Fertil. Steril.*, 39: 505, 1983
- 11) Barbieri, R. L. and Ryan, K. J.: Danazol; Endocrine pharmacology and therapeutic applications, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 453, 1981

### Effect of danazol and buserelin on glycoconjugate distribution in ovarian endometriosis

Hung June Huang, Tadayuki Ishimaru,  
Akira Fujishita and Tooru Yamabe

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

Glycoconjugate distribution in 11 endometriotic tissues of ovarian endometriosis from 5 normally cycling and 6 hormonal treated women were investigated using lectin histochemical techniques. In untreated endometriotic tissues Concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), Ricinus communis agglutinin (RCA-1) and peanut agglutinin (PNA) stained glandular cells and stroma. Soybean agglutinin (SBA) displayed slight positive stain at the apical surface. After hormonal treatment, the reactivity of Con A, WGA and RCA-1 were markedly decreased and SBA changed to negative stain. These finding was similar to that of postmenopausal atrophic endometrium. However, no changes in PNA reactivity in subject of danazol treatment, and a subtle decrease of reactivity was observed in subject of buserelin treatment. These findings indicate that glycoconjugate distribution in endometriotic tissue was similar to that of the late proliferative phase of menstrual cycle. After hormonal treatment, lectin reactivity showed a significant reduction which was due to the hypoeutrogenic state and the direct ovarian action induced by danazol and buserelin. This response also leads to atrophy of endometriotic tissue.

(受付: 1991 年 6 月 24 日特掲)

## 子宮鏡による子宮腺筋症の診断に関する臨床的検討

### Evaluation of Hysteroscopy in the Diagnosis of Adenomyosis

秋田組合総合病院産婦人科

太田 博 孝

Hiroataka OTA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Akita Kumiai General Hospital, Akita 011, Japan

子宮腺筋症の診断率向上を計る目的で、開腹手術予定の患者に子宮鏡を行い、retrospective に本法の有用度を検討した。対象は組織学的に子宮腺筋症と診断された40例である。子宮鏡による診断は集族性、あるいは慢性に存在する大きな腺開口や、網目状で怒張し走行不規則な血管を認めた例を陽性例とした。なお、対照は子宮筋腫21例とした。子宮鏡を施行した40例のうち陽性像は31例(77.5%)に認めた。このうち腺開口と異常血管像の両陽性例は16例(40.0%)、腺開口像のみ8例(20.0%)、血管像のみ7例(17.5%)であった。一方、子宮筋腫例では異常な腺開口像を認めることはなかった。また、血管像は認めないことが多く(13例;61.9%)、認められても血管は細く、走行も比較的規則的であった。以上より、子宮鏡は子宮腺筋症の診断に極めて有用であることが明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 49-55, 1992)

#### 緒 言

子宮腺筋症はその多くが妊娠・分娩を経験した婦人に発生する。本症と不妊との因果関係にはいまだ不明の点が多い。外性子宮内膜症では異所性子宮内膜症組織の存在が、種々の異常を惹起し、不妊原因になっていることはすでによく知られている。例えば、外性子宮内膜症では腹水中のマクロファージ数が増加し<sup>1)</sup>、かつその活性が亢進して<sup>2)</sup>interleukin-1<sup>3)</sup>、TNF(腫瘍壊死因子)<sup>4)</sup>などのサイトカインを分泌している。これらサイトカインは精子機能、受精、着床などの生殖過程を抑制している可能性がある<sup>5,6,7)</sup>。また、流・早産や異常分娩例をretrospectiveに検討すると、子宮腺筋症をよく合併しており<sup>8)</sup>、本症がその基礎疾患として存在している可能性が十分考えられる。従って、子宮腺筋症を治療前に診断することは極めて重要な意義がある。

子宮腺筋症の診断は意外と難しい。子宮腺筋症の診断法には双合診、子宮卵管造影法、超音波断層法、MRIなどがある。子宮が大きき、超音波断層法やMRIで明らかな子宮筋腫結節を認めない症例ではその診

断は比較的容易である。さらに約5-6割の症例に血中CA125値の上昇が見られ、その測定は極めて有用である。しかし、大きな子宮筋腫を合併する例や、CA125値が正常範囲の例でその診断は極めて難しい。本研究では子宮腺筋症の診断に子宮鏡を応用し、その有用度を検討したので報告する。

#### 対象と方法

##### 1. 対象

対象は1988年4月より1990年6月までに強度の月経痛、過多月経、貧血や子宮腫大などのため、子宮全摘除術を施行し、組織学的に子宮腺筋症と診断された40例である。全症例のうち、子宮筋腫合併例は32例、外性子宮内膜症合併例は8例であり、経妊・経産例は37例であった。対照群は同時期に開腹手術を行い、組織学的に子宮筋腫と診断された21例で、粘膜下筋腫あるいは漿膜下筋腫のみの例は除外し、筋層内筋腫の認められた例とした。

子宮鏡を施行した40例のうち37例は月経期を除く任意の時期に、また残り3例はダナゾール(400mg/日)投与30-60日目に施行した。

## 2. 子宮鏡検査法

子宮鏡施行 45 分前に硫酸アトロピン 0.5mg を皮下注射した。まず、外陰・腔内を消毒、次に 1% キシロカイン 10ml を子宮頸部子宮筋膜下の数カ所に注射した。用いた子宮鏡は 2 種類で、軟性子宮鏡 (フジノン HYS-FT; 富士写真光機, 埼玉), 硬性子宮鏡 (オリンパス光学工業, 東京) を用いた。軟性子宮鏡は子宮頸管を開大せずそのまま、硬性子宮鏡はヘガール 8 号まで開大後挿入した。軟性子宮鏡施行時の灌流液には生理食塩水液を、硬性子宮鏡検査時には高粘稠デキストラン液 (キセラン®; シオノギ製薬, 大阪) を用いた。

## 3. 診断基準

規則的月経周期をもつ正常婦人で腺開口は増殖期で徐々に出現し、排卵期で著明となる。排卵後腺開口はしだいに消失し、分泌後期ではみられなくなる。また、血管像は通常、増殖期ではみられず、分泌中期より現れ、月経直前に著明となる。その血管は細く、網目状であるが、その走行は比較的規則的である。子宮腺筋症の子宮鏡による診断には異常腺開口と血管像の 2 つの所見から判断した。

## 結 果

1. 子宮筋腫例と子宮腺筋症例の子宮鏡所見 40 例のうち子宮鏡所見による陽性例は 31 例 (77.5%) あった (図 1)。そのうち、腺開口と血管像の両者がみられたのは 16 例 (40.0%)、腺開口像のみ 8 例 (20.0%)、血管像のみ 7 例 (17.5%) であった。陰性例は 9 例 (22.5%) あった。

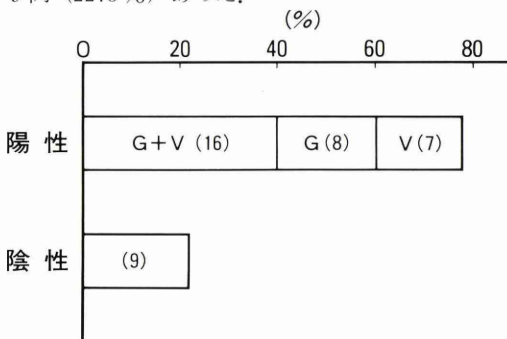


図 1 子宮鏡による子宮腺筋症の正診率

(n=40) ( ) 内は例数, G: 腺開口像  
V: 血管像

子宮鏡で異常所見の認められた部位でその粘膜下筋層内に子宮内膜症組織が存在したか否かについて検討した。それによると子宮鏡所見と組織所見が一致したのは 16 例 (51.6%) であった。組織所見では子宮内膜症組織が存在したが、子宮鏡では一部認め

られなかった例は 15 例 (48.4%) あった。子宮筋腫例では血管像は 8 例 (38.1%) にみられたが (図 2, 3, 4), 異常腺開口例は認められなかった。

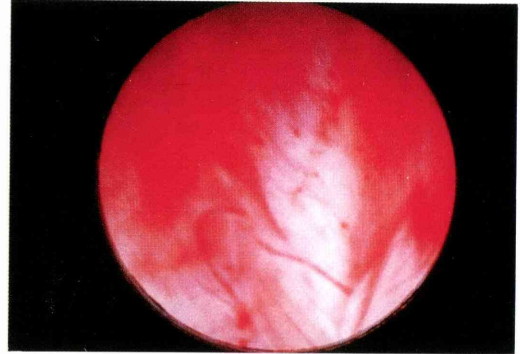


図 2 子宮筋腫例の子宮鏡所見



図 3 子宮筋腫例の子宮鏡所見

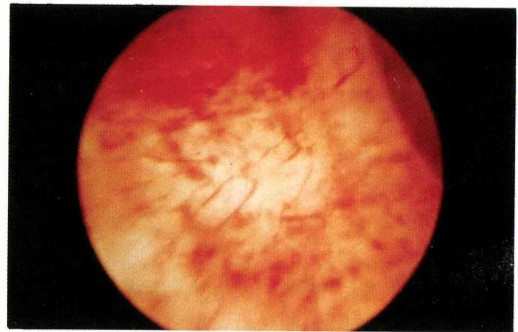


図 4 子宮筋腫例の子宮鏡所見

表 1 に子宮筋腫例と子宮腺筋症例の子宮鏡による鑑別所見を示した。すなわち、血管像は子宮筋腫例ではみられないことも多かった。また、中には太い血管も認められたが、一般に細く、その数も少なく、走行も比較的規則的であった。もちろん、腺開口との混在も認められなかった。一方、子宮腺筋症例では血管像が高頻度に認められた。血管は太い例が時々あった。その数も多い例から、少ない例まで症例により異なった。血管走行はその筋層内に子宮内膜症組織を内在するためか、一般に不規則であった。

表1 子宮鏡による子宮筋腫と子宮腺筋症との鑑別点

|         | 子宮筋腫        | 子宮腺筋症      |
|---------|-------------|------------|
| 腺開口     | 黄体中期以後見られない | どの時期でも見られる |
| 大きさ     | 小           | 大          |
| 数       | 多           | 少～多        |
| 分布      | 均一          | 不均一、集簇性    |
| 血管像     | 見られないことも多い  | 高頻度に見られる   |
| 太さ      | 細い          | 細い～太い      |
| 数       | 少           | 多          |
| 走向      | 規則的         | 不規則        |
| 腺開口との混在 | 無           | 有          |

腺開口は子宮筋腫例では黄体中期以後みられない。増殖期や黄体前期では認められるが、大きさは小さく、分布も均一である。一方、子宮腺筋症例で腺開口は月経周期のどの時期でもみられ、大きく、数も部分的に局在するものから彌漫性にみられるものまであった。部分的に局在するとき、腺開口は一般に集簇性に認められた。

## 2. 子宮腺筋症例の子宮鏡所見

### ① 症例 Y. K. (38歳) 2妊2産

この症例は月経痛、過多月経を主訴として来院した。血液検査では Hb 7.4g/dl, RBC 275 万/mm<sup>3</sup>, Ht 25.7%, Fe 23μg/dl と鉄欠乏性貧血の状態であった。血中 CA125 値は 92U/ml と高値であり、超音波断層法では左子宮頸部から体部にかけて、鳩卵大の筋腫結節を認めた。月経周期 23 日目に子宮鏡を行ったところ、図 5 に示すように子宮頸部左側で粘膜下筋腫結節による膨隆を認め、その表面に怒張気味の伸展した血管像を認めた。しかし、血管の走行は比較的規則的で網目状ではなかった。一方、子宮底部では全く異なる所見がみられた。すなわち、よく発達した網目状血管の network を認め、一部その中に腺開口像を認めた(図 6)。血管は正常例のそれと比べても太く、かつ数も多かった。この所見はダナゾール療法 2 カ月後でもみられた(図 7)。組織学的にも同部



図5 症例①の子宮鏡所見

位の筋層内に彌漫性に子宮内膜症組織を認めた。

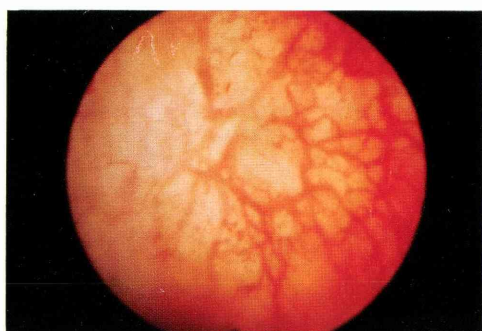


図6 症例①の子宮鏡所見

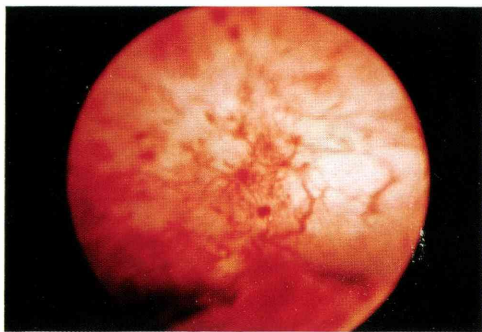


図7 症例①のダナゾール療法2カ月後の子宮鏡所見

### ② 症例 R. Y. (42歳) 3妊3産

本症例は数年来の月経痛、腰痛を主訴として来院した。血中 CA125 値は 161U/ml と高値を示し、超音波断層法では子宮は超手拳大に腫大し、かつ左側子宮底部に小指頭大の筋腫結節を認めた。本症例で月経周期は不規則であったが、月経 41 日目に子宮鏡を施行した。それによると子宮底部から体部後壁にかけて、彌漫性に大小の腺開口を認めた(図 8)。部分的に血管像も認めたが、それほど著明なものではなかった(図 8)。組織学的にも同部位の筋層内に子宮内膜症組織を認めた(図 9)。

### ③ 症例 H. S. (40歳) 5妊2産

本症例は強度の月経痛，腰痛および持続的な下腹痛を主訴として来院した。他院で子宮内膜症の診断のもとに LHRH アナログによる治療を行っていたが，あまり有効ではなかった。双合診上，子宮は超手拳大に腫大し，血中 CA125 値は 71U/ml と高値を示した。ただちに 1 日量 400mg でダナゾール療法を開始した。投与 60 日目に子宮鏡を行ったところ，図 10，11 に示すように孤立性に巨大な，または慢性の腺開口と，隆起し，かつ極めて怒張した血管像を認めた(図 12)。ダナゾール療法単独ではこのような血管像は認められず，子宮腺筋症の特徴的な所見と判断した。組織学的にも同部位の筋層内に広範に子宮内膜症組織を認めた(図 13)。

④ 症例 H. K. (46 歳) 6 妊 2 産

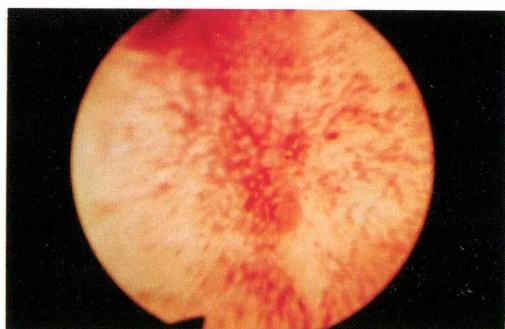


図 8 症例②の子宮鏡所見



図 9 症例②の組織所見 (x 50)

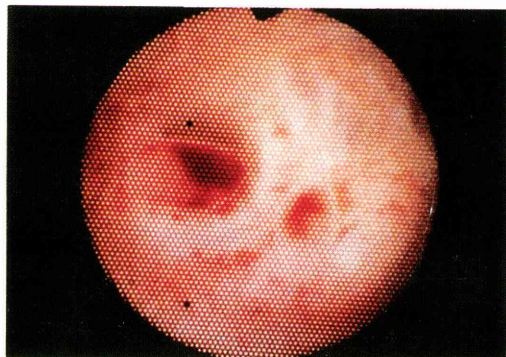


図 10 症例③の子宮鏡所見



図 11 症例③の子宮鏡所見

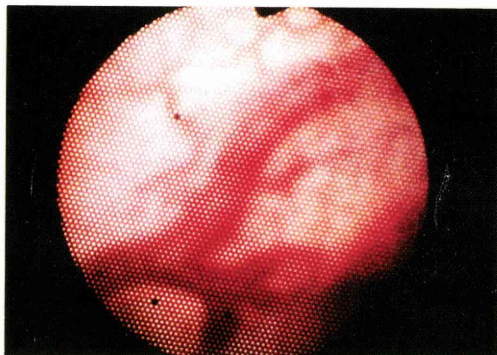


図 12 症例③の子宮鏡所見



図 13 症例③の組織所見 (x 50)

本症例は月経痛，易疲労感，下腹痛，不正性器出血を主訴として来院した。診察では子宮は超鶏卵大とあまり大きくはなかったが，前後径の長い，丸い子宮であった。血中 CA125 値も 99U/ml と高値であった。子宮鏡検査では子宮底部を中心に集簇性の腺開口を認めた(図 14)。

⑤ 症例 Y. K. (46 歳) 2 妊 1 産

本症例は過多月経，月経痛，易疲労感を主訴として来院した。双合診上，子宮は超手拳大に腫大していた。末梢血液検査では Hb 6.5g/dl, RBC 265 万/mm<sup>3</sup>, Ht 22.3%, Fe 21μg/dl と強度の鉄欠乏性貧血を認めた。また，CA125 値は 61U/ml と高値であった。このため，外来で造血剤を投与し，貧血の改善後子宮全摘除術を施行した。子宮鏡検査では図 15 に

示すように子宮底部から後壁にかけて数個の大きな窪みを認めた。この部位を組織学的に検討したところ、図16に示すように内膜陥凹部の筋層内に子宮内膜症組織を認めた。

#### ⑥ 症例 E. H. (51歳) 0妊0産

本症例は子宮癌検診で子宮腫大を指摘され、当院に来院した。双合診で子宮は新生児頭大に腫大していたが、とくに自覚症状はなかった。血中CA125値は8U/mlと低値だった。月経61日目に子宮鏡を行ったところ、子宮体部後壁に症例⑤と同様な窪みと(図17)、子宮体部左側壁に走行不規則な血管像を認めた。この2つの所見より子宮腺筋症の存在が示唆された。組織学的にも同部位に子宮内膜症組織が認められた。



図17 症例⑥の子宮鏡所見

### 考 察

子宮腺筋症例は一般に子宮筋腫例と比べ、月経痛、過多月経などの自覚症状が強く、また鉄欠乏性貧血になり易い。本症はほとんど経妊・経産の婦人に発生する。したがって子宮腺筋症と不妊との因果関係についてはいまだ不明な点が多い。しかし、いわゆる機能性不妊症の中に高率に子宮内膜症がみられるという事実がある。さらに子宮内膜症では免疫学的に種々の生殖過程で抑制的に作用している可能性がある。たとえば、子宮内膜症患者の腹水中のマクロファージ数<sup>1)</sup>やその活性が高まっており<sup>2)</sup>、これらマクロファージは種々のサイトカイン、すなわち interleukin-1<sup>3)</sup>や TNF<sup>4)</sup>を分泌する。分泌されたサイトカインは精子機能、受精あるいは着床過程で抑制的に作用している可能性がある<sup>5,6,7)</sup>。また、最近子宮内膜症や子宮腺筋症に高率に自己抗体が認められるとの報告がある<sup>9,10)</sup>。自己抗体の活性が高いと、その妊娠率は極めて低くなる<sup>11)</sup>。さらに子宮内膜症で血中CA125値が高値の例ではその妊孕性が明らかに低下する<sup>12)</sup>。以上のことから子宮腺筋症を治療前に診断することは重要な意義があると考ええる。

子宮腺筋症の診断は意外と難しい。子宮が丸く肥大し、かつ子宮筋腫結節を認めないような例でその診断は容易である。さらに血中CA125値が100U/mlを越える時、診断はさらに容易となる。しかし子宮筋腫を合併する例、あるいはCA125値が正常範囲にある時、その鑑別診断は極めて難しくなる。本症では高率に自己抗体、特に抗磷脂質抗体が陽性となる<sup>10)</sup>。したがって自己抗体を測定し得ればその診断は極めて容易となるが、まだ一般的ではない。

本研究より、子宮腺筋症の診断に子宮鏡が極めて有用であることが明らかとなった。子宮鏡による異常所見のうち腺開口と血管像がその診断的指標となった。腺開口は正常婦人では増殖初期よりみえ始め、排卵期で最もよく観察される<sup>13)</sup>。黄体期にはいと徐々

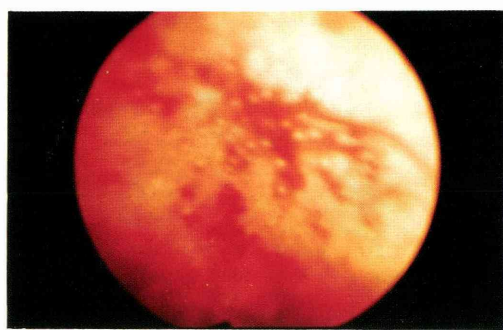


図14 症例④の子宮鏡所見



図15 症例⑤の子宮鏡所見

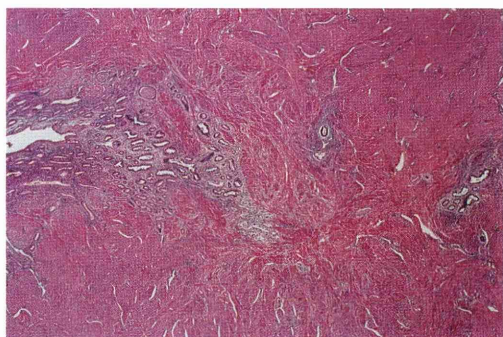


図16 症例⑤の組織所見 (x 50)

に不鮮明となり、黄体中期以後ではみられない。従ってそれ以後で大きな腺開口が慢性あるいは集簇性にみられる例は、子宮腺筋症に特徴的な所見となる。本症で腺開口が高頻度にみられるという報告は既にある<sup>14)</sup>。時に腺開口が数カ所しかみられないこともあるが、そうした例でも腺開口部は正常例より大きい。

血管像は正常例では増殖期にはみられない。排卵後血管像は徐々に出現し、月経直前に著明となる。その像は網目状で、血管自体あまり太くはなく、怒張していない。一方、子宮筋腫例では血管像はより高頻度にみられる。本研究では 38.1% に認められた。しかし、子宮腺筋症では 57.5% とより高率に認められた。子宮筋腫の血管像は数が多い例もあるが、一般にそれほど多くない。その走行は比較的規則的である。時に怒張している血管もあるが、稀である。一方、子宮腺筋症例では血管数の多い例が多く、その走行も不規則であった。典型例では網目状の network として認められた。しかし、子宮筋腫を合併するとその診断がやや困難となる場合もあった。子宮腺筋症でなぜこのように高率に腺開口、血管像が月経周期を通じみられるのか、その説明は難しい。実際、子宮鏡では異常所見が見られなかったが、筋層内に子宮内膜症組織のみられた例が約半数に認められた。月経周期を通じてみられる腺開口は子宮腺筋症の主な発生原因と考えられている子宮内膜の子宮筋層内への直接的侵入説との関係を思わせた。また、血管像の存在はその筋層内に存在する子宮内膜症組織による直接的な影響を示唆させた。

本論文の要旨は、第 30 回日本産科婦人科内視鏡学会（東京）にて発表した。

## 文 献

- 1) Haney, A. F., Muscato, J. J. and Weinberg, J. B.: Peritoneal fluid cell population in infertility patients, *Fertil. Steril.*, 35: 696, 1981
- 2) Halme, J., Becker, S. and Wing, R.: Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 148: 85, 1984
- 3) Fakih, H., Baggett, B., Holtz, G., Tsang, K-Y., Lee, J. C. and Williamson, H. O.: Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis, *Fertil. Steril.*, 47: 213, 1987
- 4) Eisermann, J., Gast, M. J., Pineda, J., Odem, R. R. and Collins, J. L.: Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery, *Fertil. Steril.*, 50: 573, 1988
- 5) Hill, J. A., Haimovici, F., Politch, J. A. and

- Anderson, D. J.: Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters, *Fertil. Steril.*, 47: 460, 1987
- 6) Morcos, R. N., Gibbons, W. E. and Findley, W. E.: Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis, *Fertil. Steril.*, 44: 678, 1985
  - 7) Hahn, D. W., Carraher, R. P., Foldes, R. G. and McGuire, J. C.: Experimental evidence for failure to implant as a mechanism of infertility associated with endometriosis, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 155: 1109, 1986
  - 8) 西田正人, 岩崎寛和: 子宮内膜症と妊孕性, 子宮内膜症, 産婦人科 Mook 26, 89, 金原出版, 1983
  - 9) Gleicher, N., El-Roeiy, A., Confino, E. and Friberg, J.: Is endometriosis an autoimmune disease?, *Obstet. Gynecol.*, 70: 115, 1987
  - 10) Ota, H. and Maki, M.: Evaluation of autoantibody and CA125 in the diagnosis of endometriosis or adenomyosis, *Med. Sci. Res.*, 18: 309, 1990
  - 11) El-Roeiy, A., Gleicher, N., Friberg, J., Confino, E. and Dudkiewicz, A.: Correlation between peripheral blood and follicular fluid autoantibodies and impact on in vitro fertilization, *Obstet. Gynecol.*, 70: 163, 1987
  - 12) 宮本 壮, 小林善宗, 井上正人, 淡路英雄, 本田育子, 宮川和子, 藤井明和: 不妊症合併子宮内膜症患者における血清 CA125 値と不妊症の予後の関係, エンドメトリオーシス研究会会誌, 9: 60, 1988
  - 13) Sugimoto, O.: Diagnostic and therapeutic hysteroscopy, 39, Igaku-Shoin, 1978
  - 14) 福田吉彦, 杉山修成, 前田洋一, 矢田守男, 宮崎和典, 奥田喜代司, 袖木孝士, 伊藤正尚, 杉本 修: 子宮腺筋症における子宮鏡検査の診断的意義, 日産婦内視鏡会誌, 1: 37, 1985

## Evaluation of hysteroscopy in the diagnosis of adenomyosis

Hirotsuka Ota

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Akita Kumiai General Hospital,  
Akita 011, Japan

To improve the diagnosis of adenomyosis before operation, I employed hysteroscopy in the patients who underwent hysterectomy and evaluated its clinical usefulness retrospectively. The subjects consisted of 40 adenomyosis patients diagnosed histologically. The criteria of adenomyosis by

hysteroscopy was the presence of large glandular ostium and/or network of dilated vessels showing irregular running. Control consisted of 21 adenomyoma patients. Thirty-one (77.5%) of the 40 patients showed positive findings. That is, 16 cases (40.0%) having both the ostium and the vessels, 8 cases (20.0%) with only the ostium and 7 cases (17.5%) with only the vessels. No large ostium was

found in the adenomyoma group. Although the vessels were occasionally observed in the adenomyoma group (8 cases, 38.1%), they were narrow and running often with regular pattern. In conclusion, I found hysteroscopy to be quite valuable in the diagnosis of adenomyosis before operation.

(受付：1991 年 1 月 31 日)

## ダナゾール療法中のアンドロゲン動態と 皮脂分泌・痤瘡について

### Circulating Androgen Dynamics and Skin Lipids and Acne during Danazol Therapy

名古屋大学分院産婦人科学教室

|                  |                |                  |
|------------------|----------------|------------------|
| 中 村 潔 史          | 近 藤 育 代        | 林 隆 行            |
| Kiyoshi NAKAMURA | Ikuyo KONDO    | Takayuki HAYASHI |
| 木 村 敏 男          | 大 沢 政 巳        | 成 田 收            |
| Toshio KIMURA    | Masami OHOSAWA | Osamu NARITA     |

Department of Obstetrics and Gynecology,  
The Branch Hospital, Nagoya University, School of Medicine, Nagoya 461, Japan

名古屋大学分院皮膚科学教室

|              |                 |                 |
|--------------|-----------------|-----------------|
| 荻 野 泰 子      | 松 永 佳 世 子       | 早 川 律 子         |
| Yasuko OGINO | Kayoko MATUNAGA | Rituko HAYAKAWA |

Department of Dermatology  
The Branch Hospital, Nagoya University, School of Medicine, Nagoya 461, Japan

名古屋大学産婦人科

|                 |                   |                |
|-----------------|-------------------|----------------|
| 松 沢 克 治         | 石 原 豊             | 小 栗 久 典        |
| Katuji MATUZAWA | Yutaka ISHIHARA   | Hisanori OGURI |
| 水 谷 哲 也         | 菅 沼 信 彦           | 友 田 豊          |
| Tetuya MIZUTANI | Nobuhiko SUGANUMA | Yutaka TOMODA  |

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Nagoya University, Nagoya 466, Japan

---

36例のダナゾール療法中の子宮内膜症症例におけるアンドロゲン動態とアンドロゲン作用としての皮脂分泌量、痤瘡の発生について検討し以下の結論を得た。

1) ダナゾール 400mg / 日の3カ月から6カ月にわたる投与で、皮脂分泌量は額部において有意に増加するが、痤瘡は特に新発生及び増悪する傾向はなかった。したがって、アンドロゲン作用の一徴候としては皮脂分泌の方が有力な指標となる。

2) ダナゾール投与後、SHBG, DHT,  $\Delta_4A$  は有意に低下したが、 $E_2$  は著変なく DHEA-S, T はやや上昇傾向を示した。しかし、アンドロゲン作用の発現には、量的に検討するとダナゾールの濃度よりもこれらのアンドロゲンは遙かに低く、内分泌動態の変化よりもダナゾールあるいはその代謝産物の直接作用が関与していると推測される。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 56-62, 1992)

---

## はじめに

ダナゾールは、 $17\alpha$ -ethinyl testosterone の誘導体であり、婦人科領域では子宮内膜症の治療薬として広く用いられている。しかし、ダナゾールの作用機序は複雑であり、更にその種々の代謝物が存在し、未だ不明の点も多いまま使用されているのが現状と思われる。今回、我々は、ダナゾール療法中の androgen 動態とその作用発現を知る目的で、ダナゾール投与前後の各種 androgen を測定し、併せて生体における androgen 作用の指標としての皮脂量と痤瘡の発生状況を検討した。

## 対象と方法

1988年1月より6月までに名古屋大学分院産婦人科を訪れ、子宮内膜症と診断された36例の患者を対象とした。年齢は、22歳から45歳 ( $31.4 \pm 8.4$ , mean  $\pm$  SD) までであった。これらの症例に対してダナゾールを1日400mg 連日3か月から6か月にわたり投与し、ダナゾールの投与前と投与4、8、12、16週後に午前9時から12までの間に採血し、血中 Dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S), Androstenedione ( $\Delta_4$ A), Testosterone (T), Dihydrotestosterone (DHT), Estradiol ( $E_2$ ) の各種ホルモンと sex hormone binding globulin (SHBG) を測定した。同時に皮膚科を受診し、ダナゾールの投与前と投与後2週間毎にリビドメーター（リコーエレメックス社製）を用いて額部、頬部の皮脂量を測定し、痤瘡を評価する目的で面皰、丘疹、膿疱の発生と面皰数、丘疹数、膿疱数の変化を調べた。また、季節差等の因子の影響を考慮して、コントロール群として20歳から50歳 ( $35.1 \pm 6.8$ , mean  $\pm$  SD) の健康女性を選び、同じく2週間毎に皮脂量・面皰・丘疹・膿疱数をチェックした。なおダナゾール投与群とコントロール群の間には年齢に有意差はなかった。

## ホルモン測定法

$E_2$  は、SORIN BIOMEDICA 製の Estradiol Radioimmuno Assay Kit を用いて測定した。検体のエーテル抽出操作を必要としない。本キットの交叉性は Estrone 0.7%, Estriol 0.55%,  $\Delta_4$ A, T, DHEA はいずれも 0.002% である。T は、同じく SORIN BIOMEDICA 製の Testosterone Direct Radioimmunoassay Kit を使用した。やはりエーテル抽出操作を必要とせず、交叉性は DHT 7.2%,  $\Delta_4$ A 0.81%, DHEA 0.036%,  $E_2$  0.02% である。DHEA-S,  $\Delta_4$ A, DHT は、いずれも帝国臓器社製の抗血清を

用いたRIAのキットを使用し、 $\Delta_4$ A, DHT は、エーテル抽出を行ない、sephadex LH-20 ミクロカラムにて分離した後に測定した。交叉性は、DHEA-S 測定キットは、 $\Delta_4$ A 27.7%, Androsterone 40.2%, T 2.27%, DHT 13.0%,  $E_2$  0.01 以下であり、 $\Delta_4$ A の測定では、 $5\alpha$ -Androstenedione 46.1%,  $5\beta$ -Androstandione 50.7%, T 5.43%, Androsterone 4.75%, DHT 0.76%, DHEA-S 0.17%,  $E_2$  0.07 以下で DHT の測定は、T 58.2%,  $\Delta_4$ A 10.0%, DHEA 0.02%,  $E_2$  0.01% である。SHBG は、FARMOS DIAGNOSTICA 製の  $I^{125}$  を用いた SHBG Immunoradiometric Assay Kit を使用した。

## 成績

血清中の DHEA-S, T は僅かながら増加傾向を示し、ダナゾール投与前と投与4週間後を比べてみると、それぞれ DHEA-S  $1125 \pm 102 \rightarrow 1531 \pm 174$  ng/ml, T  $0.66 \pm 0.05 \rightarrow 0.88 \pm 0.07$  ng/ml となり、4、8、12、16 週間後もほぼ同様で、投与前よりも高値を示す傾向にあった(図1)。しかし、ダナゾール投与4週間後のT値以外は有意の上昇ではなかった。また、血清  $E_2$  は、投与前と投与4週間後では、 $38.4 \pm 9.0 \rightarrow 40.4 \pm 5.6$  pg/ml と有意の変化はなく、その後も同様であった。これに対して SHBG, DHT,  $\Delta_4$ A は、いずれも投与4週間後では、有意に減少し、投与前と投与4週間後を比較してみると、それぞれ SHBG  $62.8 \pm 8.8 \rightarrow 12.0 \pm 4.2$  nmol/ml ( $p < 0.01$ ), DHT  $0.11 \pm 0.01 \rightarrow 0.04 \pm 0.01$  ng/ml ( $p < 0.01$ ),  $\Delta_4$ A  $1.22 \pm 0.12 \rightarrow 0.84 \pm 0.17$  ng/ml ( $p < 0.01$ ) となった。やはり同じく投与8、12、16 週間後も同様の傾向で低値を維持した。特に SHBG, DHT の低下は著明であった(図2、3)。

一方、皮脂量に関しては、コントロール群では、14 週間にわたり追跡した。皮脂量は、部位によって異なり、常に額部の方が頬部より高値であり、いず

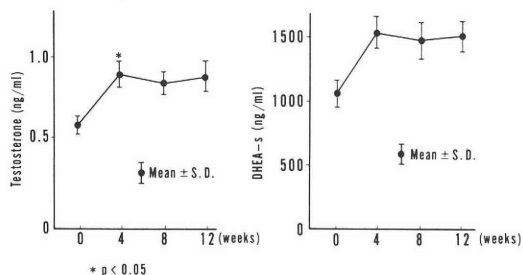


図1 Danazol 投与中の Testosterone と DHEA-S の変化

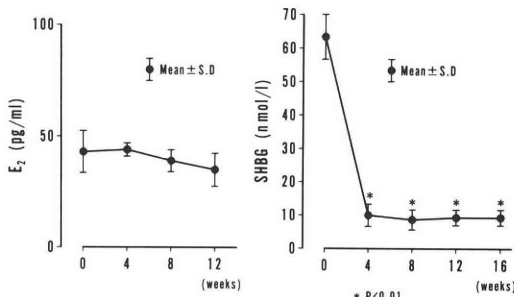
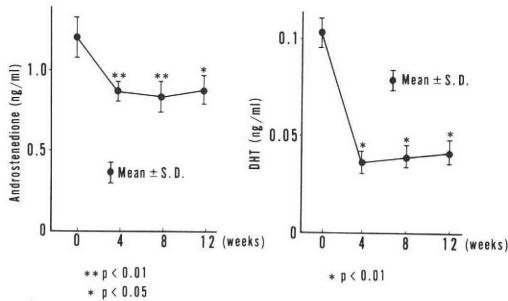
図2 Danazol 投与中の  $E_2$  の変化と SHBG の変化

図3 Danazol 投与中の Androstenedione の変化と DHT の変化

れも観察期間中有意の変化はみられなかった(図4)。これに対して、ダナゾール投与群では、同じく額部の方が頬部より高値であったが、額部と頬部のいずれも上昇傾向を示していた。特に額部では投与前と比べて、投与6, 8, 10 週後では、有意に上昇し、8, 10 週後ではコントロール群とも有意差がみられた(図5)。面皰、丘疹は、図6に示す如く、ダナゾール投与群では、コントロール群に比して投与した時点から、痤瘡の見られた症例が多いため、単純に比較できないが、特にダナゾール投与群で増加する傾向は見られなかった。新たに面皰の出現をみたものは、ダナゾール投与群では、18 例中 1 例(5.6%)、コントロール群では 15 例中 2 例(13%)であり、また丘疹の新たな出現をみたものは、ダナゾール投与群では 18 例中 2 例(11.1%)、コントロール群では 11 例中 2 例(18.1%)で、やはり差は認められなかった。また、ダナゾール投与前より、痤瘡のみられた症例でダナゾール投与後と面皰、丘疹の個数を比べてみたが、やはり変化は無く、増悪する傾向は見られなかった(図7)。なお膿疱のある症例は、コントロール群、ダナゾール投与群のいずれにもなかった。

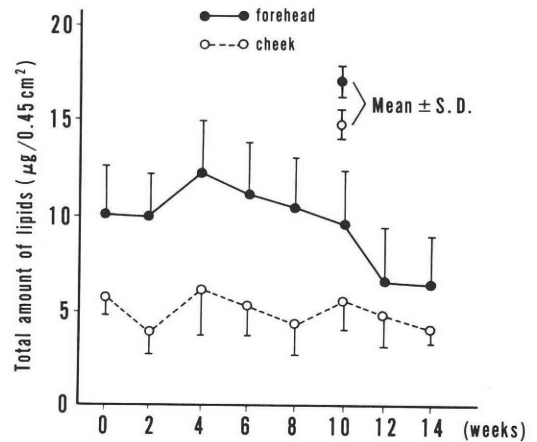


図4 コントロール群における皮脂量の変化

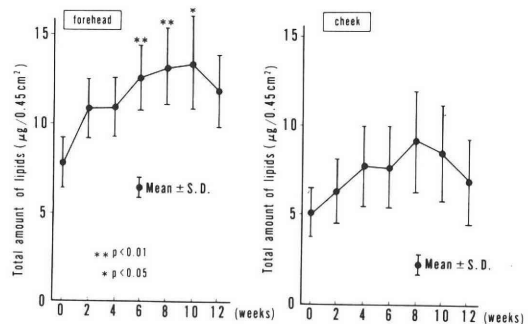


図5 Danazol 投与群の皮脂量の変化

## 考 察

ダナゾール投与中の副作用のひとつである痤瘡の発生頻度は、ダナゾール 400mg / 日の用量では、31%とするものや、400mg / 日以下では、4.9%とする報告など様々である<sup>1,2)</sup>。しかし、痤瘡と皮脂分泌増加は、まとめて副作用のひとつとして取り上げられることが多く、これを正確に個々に評価したデータに基づく報告は見当たらない。今回、我々の成績では、ダナゾール 400mg / 日の 3 ヶ月から 6 ヶ月投与にて、皮脂分泌は増加したものの、面皰、丘疹の発生は、わずかにみられたのみで、コントロール群と比較しても有意差はなく、また感染が加わった、より重症の痤瘡のタイプである膿疱はみられなかった。したがってダナゾールのアンドロゲン作用としての皮脂分泌の増加は認められるが、痤瘡の初期病変に表皮脂質はあまり関与しないといわれるように<sup>3)</sup>、更に毛包内細菌の増加による刺激や毛包の狭窄などの、その他の要因が加わらないと、面皰や丘疹には至らないと考えられ、今までの報告よりも実際には痤瘡の発生頻度はもっと低いものと思われる。逆に言え

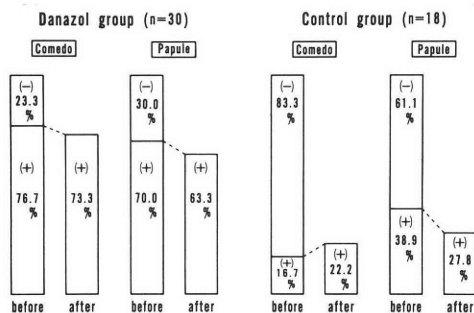


図 6 Danazol の痤瘡発生に及ぼす影響

ば、痤瘡はアンドロゲン作用発現の一徴候として、皮脂分泌や多毛などと同じく扱われるが、皮脂分泌の方がより客観的であり、信頼度の高いパラメーターであるといえよう。

内分泌動態においては、DHEA-S は主に副腎皮質より分泌され、卵巣の関与は殆ど無く、そのアンドロゲン作用は弱い。DHEA-S は、副腎皮質において、17-OH pregnenolone sulfate から 17-20 lyase の作用により、DHEA-S となるが、更に副腎と末梢では、sulfatase により DHEA に転換される。また、sulfokinase の作用により DHEA は逆に DHEA-S になる。DHEA-S の 70 % は副腎皮質からの産生で、残り 30 % は、末梢での DHEA からの転換によるといわれている。ダナゾール投与中 DHEA-S が上昇するという同様の報告が幾つかみられるが、その機序に関しては、後述するように in vitro 及び in vivo で副腎皮質において DHEA より転換された DHEA-S を更に  $\Delta_4$ A に転換する酵素である  $3\beta$ -ol-hydroxysteroid-dehydrogenase  $\Delta_5$ - $\Delta_4$  isomerase をダナゾールが抑制することが示されている。この結果として、DHEA-S が上昇するものと考えられている。しかし、Carlstrom ら<sup>4)</sup>は、DHEA と DHEA-S の末梢濃度は、ある一定の副腎からの産生がある場合には主に肝臓の sulfatase と sulfokinase のバランスによって決まると述べている。そして彼らはダナゾールが人培養肝細胞において量依存性に DHEA-S の分解を抑制することを示した<sup>5)</sup>。更に DHEA と DHEA-S が divergent な pattern で変化することから、ダナゾールのこれらホルモンに対する副腎への関与は否定的としている。

$\Delta_4$ A は、生物活性は T の 1/5~1/10 といわれ、T および  $E_2$  の前駆体として注目される。閉経前の女性ではその血液中の 25 % が卵巣起源であり、65 % が副腎皮質に由来し、10 % が末梢の DHA から転換される。今回の我々の成績では  $\Delta_4$ A はダナゾール投与により有意に低下した。In vitro の実験では、卵巣およ

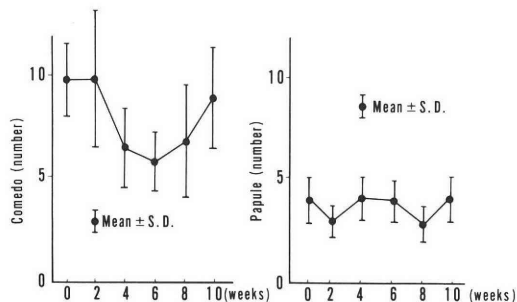


図 7 Danazol 投与群の面皰・丘疹数の変化

び副腎の  $17\alpha$ -hydroxylase, C 17-20 lyase,  $3\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase- $\Delta_5$  isomerase 活性を抑えることが知られている<sup>6)</sup>。In vivo でも Stillman ら<sup>7)</sup>は、 $3\beta$ -ol-hydroxysteroid dehydrogenase  $\Delta_5$ - $\Delta_4$  isomerase の活性が低下することから示唆しており、これらの酵素活性を抑えることにより卵巣および副腎での産生が低下し、血中濃度が低下するものと思われる。

女性では T の起源は卵巣、副腎皮質からの産生および肝臓、脂肪、皮膚などの末梢での  $\Delta_4$ A を主体とする前駆物質からの転換である。Kirchner ら<sup>8)</sup>によれば、総 T 産生のうち卵巣からは 25 %、同じく副腎からは 25 %、残り 50~60 % が末梢での前駆物質からの転換であるという。また、T は SHBG, Albumin, CTG と結合して存在するが、数 % のみが遊離 T として存在し、この遊離 T がアンドロゲン活性をもつ。今回の成績では、ダナゾール投与により T は僅かながら上昇傾向を示した。これと同様の報告は幾つかあるが、ダナゾール投与中の T を測定する場合には、その主要な代謝物である ethisterone,  $2\alpha$ -hydroxy-methyl-ethisterone (2-OHME) など<sup>9)</sup>の交叉性に注意が必要である。この点について Forbes ら<sup>10)</sup>はクロマトグラフィーを用いたエーテル抽出によって検体を処理した後、RIA で測定した結果、T はダナゾール投与後低下し、今までの T が上昇するという報告は、すべてダナゾール代謝物との交叉性を考慮しなかったためであるとしている。確かに遊離 T が慢性的に増加すると、 $5\alpha$ -reductase をはじめとする T の代謝酵素の誘導が起こり、T の metabolic clearance rate (MCR) が亢進するために T の代謝が早まり、T は低下する可能性がある。しかし、これらの前処理操作を行なうことによって、T も一部除かれてしまう可能性は否定できず、T の測定については今後さらに検討が必要と思われる<sup>11)</sup>。

今回の変化の中で最も著明であったものは SHBG

の低下である。SHBG は、肝臓で合成され 2 つのサブユニットからなる分子量 100000 の糖蛋白である<sup>12)</sup>。主な作用は T と E<sub>2</sub> の担体として働くことであるが、その他のアンドロゲンやダナゾール、ダナゾールの代謝産物と結合することが知られている。Pugeat ら<sup>13)</sup>によれば、SHBG との affinity の強さは、DHT > T > Ethisterone > E<sub>2</sub> > ダナゾールの順であるといわれ、ダナゾール投与中、SHBG の結合部位へ T とダナゾールや Ethisterone などは競合することが知られている<sup>14)</sup>。SHBG 産生はホルモンに依存し、エストロゲンは産生を増加させるのに対してアンドロゲンは低下させることが知られている<sup>15)</sup>。また、ダナゾール投与の場合は、ダナゾールが直接、肝細胞での SHBG の合成を抑制することが報告されている<sup>16)</sup>。したがって、ダナゾールが直接、肝細胞に作用して SHBG の合成が低下するか、あるいは初めに SHBG に結合している T とダナゾールが競合することから生ずる遊離 T の上昇が合成を抑制するように働くためと思われる。

DHT は強力なアンドロゲン作用をもち、皮膚などの末梢組織細胞内に取りこまれた T や同じく細胞内に取りこまれた  $\Delta_4$ A が 17 $\beta$ -ol-D の作用にて転換され T となった後、5 $\alpha$ -reductase の作用により DHT となり、DHT-receptor と結合して初めて、そのアンドロゲン作用が発揮される。したがって、血液中に放出される DHT は末梢のアンドロゲン標的器官の活動性を現わしているものと考えられる。今回の成績では DHT は明らかに低下し、投与後 4~12 週後 0.04 $\pm$ 0.01ng/ml のレベルに維持された。一方、ダナゾールの血中濃度は、報告<sup>17)</sup>によれば 200mg 1 日 2 回投与では 20 日間投与すると、その血中濃度は投与後 7 日から 14 日までの間に定常状態に達する。そして、200mg カプセルを 1 日 2 回連続 14 日間投与した実験では、その 14 日目に内服し、2、4、8、12 時間後に調べた血中濃度は、2 時間後でピークとなり最大 921ng/ml で、12 時間後でも 200~300ng/ml に維持されている。これは DHT の濃度は勿論、T の濃度と比べても相当高い<sup>18,19)</sup>。

ダナゾール療法中のアンドロゲン作用の発現に関しては、当教室の浅井ら<sup>20)</sup>が次のように報告している。大量のダナゾールにより SHBG から T が遊離し free T が増加するが、SHBG 濃度が低下するために、更に free T の増加が起こる。しかし、ダナゾールは、彼らの行なった恥骨部の皮膚を用いた実験で示されるように、皮膚のアンドロゲンレセプターに対して、T の 1/20 というかなり強い親和性をもっており、ダナゾールがアンドロゲンレセプターと結合し、antagonist として働くためにアンドロゲン作用は強く現われ

ないと考えた。今回の成績を考慮してみると、前述の如く、T の上昇だけでは不十分で、標的細胞中で DHT とならなければ、その作用が発現されないが、DHT の血液中濃度は著明に低下していることと、血液中の T 濃度がダナゾールやダナゾール代謝産物の濃度よりも非常に低いことから、今回見られた皮脂分泌亢進は、ダナゾールが間接的にアンドロゲン動態に変化を及ぼした結果というよりは、むしろダナゾールやダナゾールの代謝産物の直接的作用ではないかと思われる。ダナゾール代謝物のアンドロゲン作用に関して、Ethisterone については、ダナゾールより弱い作用を有することが知られている<sup>21)</sup>が、その他の代謝物に関しては報告は殆どなく、今後の検討課題である。このように考えた場合、アンドロゲン作用がダナゾールあるいはその代謝物のいずれであるにせよ、血液中の濃度からみるとあまり強いものではなく、比較的穏やかに作用するものと、考えられた。

#### まとめ

以上、ダナゾール 400mg / 日を 3~6 ヶ月間投与の用量では、皮脂分泌量は増加するが、痤瘡の有為な発生は認められなかった。また、ダナゾール投与により SHBG は著明に低下し、T、 $\Delta_4$ A、DHT、DHEA-S も変化がみられたが、アンドロゲン作用の発現には、それ以上にダナゾールおよびダナゾール代謝物の直接作用が関与しているものと思われる。

#### 文 献

- 1) 第 2 回ボンゾール研究会誌, Endometriosis に対する Danazol 療法の臨床的評価について, 表 7 P 54, 1981
- 2) Spooner, J. B.: Classification of Side-Effects to Danazol Therapy, J. Int. Med. Res., 5, Supplement (3): 15, 1977
- 3) 松永佳代子, 早川律子: 尋常性ざそうの皮表脂質と血清脂質に関する研究: 条件の一致したざそう群・正常群女子ボランティア間の比較, 西日皮膚, 47: 1080, 1985
- 4) Carlstrom, K., Doberl, A., Greshagen, S., Rannevik, G.: Peripheral levels of dehydroepiandrosterone-sulfate, dehydroepiandrosterone, androstendione and testosterone following different doses of danazol, Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavia, Suppl 123: 125, 1984
- 5) Carlstrom, K., Doberl, A., Pousette, A., Rannevik, G., Wilking, N.: Inhibition of steroid sulfatase activity by danazol, Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl., 123: 107, 1984
- 6) Barbieri, R. L., Canick, J. A., Makris, A., Todd,

- R. B., Davies, I. J., Ryan, K. J.: Danazol inhibits steroidogenesis, *Fertil. Steril.*, 28: 809, 1977
- 7) Stillman, R. J., Fencel, M. de M., Schiff, I., Barbieri, R. L., Tulchinsky, D.: Inhibition of adrenal steroidogenesis by danazol in vitro, *Fertil. Steril.*, 33: 401 1980
  - 8) Kirschner, M. A., Zuker, I. R. and Jespersen, D. L.: Ovarian and adrenal vein catheterization studies in women with idiopathic hirsutism, In James, V. H. T., M. Serio, and G. Guisti (eds.), *The Endocrine Function of the Ovary*, 443 Academic Press, New York, 1976
  - 9) Davison, C., Banks, W., Fritz, A.: The absorption, distribution and metabolic fate of danazol in rats, monkeys and human volunteers, *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 221: 294, 1976
  - 10) Forbes, K. L., Dowsett, M., Rose, G. L., Mudge, J. E., Jeffcoate, S. L.: Dosage-related effects of danazol on sex hormone binding globulin and free and total androgen levels, *Clinical Endocrinology*, 25: 597, 1986
  - 11) Vermeulen, J. P., Bonne, C., Bouton, M. M., Moguilewsky, M., Philbert, D., Azadian-Boulanger, G.: Screening for anti-hormones by receptor studies, *Journal of Steroid Biochemistry*, 6: 615, 1975
  - 12) Cheng, C. Y., Musto, N. A., Gunsalus, G. L. and Bardin, C. W.: Demonstration of heavy and light protomers of human testosterone-estradiol-binding globulin, *J. Steroid Biochem.*, 19: 1379, 1983
  - 13) Pugeat, M. M., Dunn, J. F., Nisula, B. C.: Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 53: 69, 1981
  - 14) Dowsett, M., Forbes, K. L., Rose, G. L., Mudge, J. E., Jeffcoate, S. L.: A comparison of the effects of danazol and gestrinone on testosterone binding to sex hormone binding globulin in vivo and in vitro, *Clinical Endocrinology*, 24: 555, 1986
  - 15) Anderson, D. C.: Sex hormone binding globulin, *Clinical Endocrinology*, 3: 69, 1974
  - 16) Laurell, C. B., Rannevik, G.: A comparison of plasma protein changes induced by danazol, pregnancy and estrogens, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 49: 719, 1979
  - 17) Lloyd-Jones, J. G., Labross, A., Williams-Ross, T.: Danazol plasma concentration in man, *J. Int. Med. Res* 5, (Supp 3), 18, 1977
  - 18) Nilsson, B., Sodergard, R., Damber, M. G., Damber, J. E., von-Schultz, B.: Free testosterone levels during danazol therapy, *Fertil. Steril.*, 39: 505, 1983
  - 19) Luciano, A. A., Hauser, K. S., Chapler, F. K., Sherman, B. M.: Danazol: Endocrine consequences in healthy women, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 723, 1981
  - 20) 浅井光興, 大沢政己, 市川弥生, 呉明超, 正橋鉄夫, 成田収: Danazol 療法時のアンドロゲン動態, *日産婦誌*, 37: 1001, 1985
  - 21) Desaulles, P. A., Krahenbuhl, C.: Comparison of the anti-fertility and sex hormonal activities of sex hormones and their derivatives, *Acta Endocrinologica*, 47: 444, 1964

### Circulating androgen, skin lipids and acne during danazol therapy

Kiyoshi Nakamura, Ikuyo Kondo,  
Takayuki Hayashi, Toshio Kimura,  
Masami Ohosawa and Osamu Narita

Department of Obstetrics and Gynecology,  
The Branch hospital, Nagoya University  
School of Medicine

Yasuko Oginio, Kayoko Matunaga  
and Rituko Hayakawa

Department of Dermatology, The Branch hospital,  
Nagoya University School of Medicine

Yoshimasa Asada, Nobuhiko Suganuma  
and Yutaka Tomoda

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Nagoya University School of Medicine

We studied the effects of danazol on circulating androgen and skin lipids, acne as androgenic manifestation. Thirty six women endometriosis were taken danazol 400mg daily for 3 to 6 months. We measured circulating level of testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), androstenedione ( $\Delta_4A$ ), dehydroepiandrosteronesulfate (DHEA-S), estradiol ( $E_2$ ), and sex hormone binding globulin (SHBG) before and every 4 weeks during danazol therapy. Furthermore, we examined skin lipids at forehead and cheek, and acne. Skin lipids were increased significantly at the 6, 8, 10 weeks after danazol administration.

Compared with control group, acne was not deteriorated nor newly appeared. As to androgen dynamics, serum DHT,  $\Delta_4A$ , SHBG were remarkably decreased but DHEA-S and T were slightly elevated. (the value before and after the 4 weeks

danazol administration is as follows, DHT:  $0.11 \pm 0.01 \rightarrow 0.04 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ ,  $P < 0.01$ ,  $\Delta_4\text{A}$ :  $1.22 \pm 0.12 \rightarrow 0.84 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$ ,  $P < 0.01$ , SHBG:  $62.8 \pm 8.8 \rightarrow 12.0 \pm 4.2 \text{ nmol/l}$ ,  $P < 0.01$ , DHEA-S:  $1125 \pm 102 \rightarrow 1531 \pm 174 \text{ ng/ml}$ , NS, T:  $0.66 \pm 0.05 \rightarrow 0.88 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$ ,  $P < 0.05$ ).

So the frequency of acne as a side effect of danazol therapy is not so high as reported before. And the skin lipids is a more reliable sign as an androgenic effect than acne.

Decreased SHBG results in increased free forms of steroid hormones. But DHT which is the most potent androgen and activating form of T, is remarkably decreased. And its concentration is far lower than danazol's. So we suppose that the direct effect of danazol or its metabolites play a significant role for the manifestation of androgenic effects.

(受付: 1991 年 5 月 7 日)

# CLINICAL AND LABORATORY EVALUATION OF PATIENTS WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE IN 7 UNIVERSITY HOSPITALS

Yukihiro NAGATA and Tsutomu DOCHI

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

Takefumi UTSUNOMIYA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Oita 874, Japan

Gen-ichi NAKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

Tadayuki ISHIMARU

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

Isao MIYAKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Miyazaki Medical College, Miyazaki 889-16, Japan

Hiroyuki MORI

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Oita Medical College, Oita 879-56, Japan

Hitoshi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kumamoto University, Kumamoto 860, Japan

---

**Abstract:** To assess the endocrine profiles and successful treatment of premature ovarian failure, medical questionnaires concerning this disorder had been sent out to medical university hospitals of Kyushu, Japan, and 7 hospital filled these questionnaires out.

19 women from 7 hospitals, showing elevated basal gonadotropin levels and hyperresponses to LH-RH, normally corresponding to menopausal women, showed ovulation and/or pregnancy. 5 women conceived with spontaneous ovulation after estrogen-progesterone cyclic treatment (Kaufmann therapy), and one conceived with spontaneous ovulation. 8 women were induced or

spontaneous ovulation after Kaufmann therapy and 5 women were induced ovulation. Histologically, primordial follicle was recognized in 4 out of 6 women.

These data suggest that Kaufmann therapy might be the most effective treatment for patients with premature ovarian failure and histological evaluation obtained by ovarian biopsy might not reflect the real prognosis.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 63-69, 1992)

## Introduction

Premature ovarian failure or premature menopause or gonadotropin resistant ovary syndrome is generally characterized by hypergonadotropic amenorrhea before 40 years of age. Even though there have been many reports on this disorder, the incidence and successful treatment, thereof, is not well established. When premature ovarian failure is experienced clinically, the gynecologist is faced with the problem of how to recreate ovarian function.

To assess the incidence, endocrine profiles and successful treatment of premature ovarian failure, medical questionnaires concerning this disorder had been sent out to all medical university hospitals on Kyushu, Japan (Kyushu consists of 8 prefectures and 12 university hospitals) and 7 of 12 hospitals filled these questionnaires out. The purpose of this report is to present detailed clinical, histologic and endocrinologic aspects of 19 patients with premature ovarian failure, collected from 7 hospitals.

## Materials and methods

The medical questionnaire which was distributed, was designed to identify all women meeting the following criteria; 1) those with hypergonadotropic hypogonadism with serum LH and FSH levels over 40 mIU/ml. 2) incidences when ovulation and/or pregnancy was confirmed by the shift of basal body temperature (BBT) or elevation of serum progesterone levels. 3) those cases where amenorrhea occurred before 30 years old.

19 women from 7 university hospitals fulfilled these criteria and the data collected on each case consisted of age of menarche, menstrual history, height, weight, hormonal profile (especially the pattern of gonadotropin response to LH—RH 100

$\mu$ g injection), the degree of ovarian insufficiency, history of operation to the ovary, response to clomiphene citrate administered at 150mg/day for 5 days, the hormonal response to human menopausal gonadotropin (hMG), the response to estrogen—progesterone cyclic treatment (Kaufmann therapy), the outcome of successful cycle and the effective treatment for ovulation and/or pregnancy. Occasionally, laparoscopic findings, ovarian histologic findings and karyotype were obtained.

The degree of ovarian insufficiency was evaluated by BBT, the progesterone test and estrogen—progesterone test. In this study, the degree of ovarian insufficiency was determined and divided according to Japanese standards, with the anovulatory cycle diagnosed by no shift in BBT. Amenorrhea first grade was determined by the occurrence of withdrawal bleeding after progesterone treatment and amenorrhea second grade defined by a lack of bleeding after progesterone treatment, but the existence of bleeding after estrogen—progesterone treatment.

The hormonal levels of LH, FSH, estradiol, testosterone and prolactin were assayed by radioimmunoassay.

## Results

The mean age of 19 patients with premature ovarian failure ranging from 22 to 39 years old was  $30.3 \pm 4.9$  (mean  $\pm$  S. D.). The mean age of menarche was  $13.3 \pm 1.2$  and ranged from 10 to 15 years old, except for one primary amenorrhea. The mean height was  $157.4 \pm 4.6$  cm and mean weight was  $48.9 \pm 4.3$  kg. Generally, a slender physique was prevalent.

The 19 women were divided into 3 groups by the varying degree of ovarian insufficiency. The anovulatory cycle group consisted of 2 women

Table 1. Summary of 19 patients with premature ovarian failure. (AC : anovulatory cycle, K : Kaufmann therapy)

| Case | Age  | Men-<br>arche | Height<br>(cm) | Weight<br>(kg) | Ameno-<br>rrhea<br>Grade | LH-RH test (mIU/ml) |             |             |             | Estradiol<br>(pg/ml) | Prolactin<br>(ng/ml) | Testo-<br>sterone<br>(ng/ml) | Follicle        |          | Karyo-<br>type | Effective<br>treatment | Outcome                      |
|------|------|---------------|----------------|----------------|--------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|----------------------|------------------------------|-----------------|----------|----------------|------------------------|------------------------------|
|      |      |               |                |                |                          | L<br>before         | H<br>30min. | F<br>before | S<br>60min. |                      |                      |                              | primor-<br>dial | Graafian |                |                        |                              |
| 1    | 31   | 15            | 155            | 48             | II                       | 101                 | 479         | 142         | 222         | 20.0                 | 8.2                  |                              | ++              | -        | 46xx           | 1) K<br>2) *           | 1) conceived<br>2) conceived |
| 2    | 29   | 13            | 163            | 47             | II                       | 129                 | 429         | 151         | 290         | 10.0                 | 12.9                 | 0.9                          | -               | -        | 46xx           | K                      | conceived                    |
| 3    | 30   | 13            | 162            | 53             | II                       | 133                 | 597         | 115         | 215         | 10.0                 | 4.6                  | 0.3                          | -               | -        | 46xx           | K                      | conceived                    |
| 4    | 24   | 14            | 157            | 49             | II                       | 174                 | 519         | 154         | 220         | 21.6                 | 22.5                 |                              |                 |          | 46xx           | K                      | conceived                    |
| 5    | 32   | 14            |                |                | II                       | 91                  | 340         | 47          | 144         |                      |                      |                              |                 |          |                | K                      | conceived                    |
| 6    | 39   | 15            | 160            | 44             | II                       | 138                 |             | 105         |             |                      |                      |                              |                 |          |                | spontan                | conceived                    |
| 7    | 30   | 14            | 158            | 51             | II                       | 173                 |             | 107         |             | 21.8                 | 9.3                  |                              |                 |          |                | K                      | spont.                       |
| 8    | 27   | 14            | 158            | 43             | II                       | 144                 | 500         | 180         | 340         | 21.8                 | 18.3                 | 0.4                          | +               | +        | 46xx           | 1) K<br>2) hMG         | 1) spont.<br>2) induced      |
| 9    | 24   | 12            | 154            | 44             | II                       | 147                 | 530         | 142         | 222         | 38.5                 | 17.6                 |                              |                 |          | 46xx           | k + hMG                | induced                      |
| 10   | 22   | 13            | 154            | 48             | II                       | 45                  | 159         | 53          | 75          | 18.3                 | 18.7                 |                              |                 |          | 46xx           | k + hMG                | induced                      |
| 11   | 27   | 14            | 154            | 45             | II                       | 112                 | 285         | 73          | 92          | 16.8                 |                      |                              | +               | -        | 46xx           | k + hMG                | induced                      |
| 12   | 33   | 14            | 163            | 55             | II                       | 162                 | 500         | 100         | 228         | 10.0                 | 7.1                  |                              |                 |          |                | k + hMG                | induced                      |
| 13   | 31   | prim          |                |                | II                       | 85                  | 305         | 63          | 86          |                      |                      |                              |                 |          |                | hMG                    | induced                      |
| 14   | 39   | 14            | 157            | 53             | II                       | 160                 |             | 120         |             | 13.5                 | 13.0                 | 0.5                          |                 |          | 46xx           | k + hMG                | induced                      |
| 15   | 27   | 13            |                |                | I                        | 54                  | 195         | 42          | 62          |                      |                      |                              |                 |          |                | Clomid                 | induced                      |
| 16   | 37   | 14            | 148            | 52             | I                        | 81                  | 399         | 70          | 134         | 69.7                 | 6.5                  |                              | +               | +        | 46xx           | hMG                    | induced                      |
| 17   | 28   | 10            | 165            | 57             | I                        | 127                 | 500         | 69          | 132         |                      | 12.9                 |                              |                 |          |                | Clomid                 | induced                      |
| 18   | 37   | 12            | 153            | 44             | AC                       | 71                  | 340         | 47          | 90          | 226.0                | 19.0                 | 0.5                          |                 |          | 46xx           | k + Clomid             | induced                      |
| 19   | 29   | 12            |                | 50             | AC                       | 123                 |             | 142         |             |                      | 7.5                  |                              |                 |          |                | hMG + hCG              | induced                      |
| n    | 19   | 18            | 15             | 16             |                          | 19                  | 15          | 19          | 15          | 13                   | 14                   | 5                            |                 |          |                |                        |                              |
| mean | 30.3 | 13.3          | 157.4          | 48.9           |                          | 118.4               | 405.1       | 101.2       | 170.1       | 37.5                 | 12.7                 |                              |                 |          |                |                        |                              |
| S.E. | 1.1  | 0.3           | 1.2            | 1.1            |                          | 9.2                 | 33.3        | 9.8         | 21.8        | 16.4                 | 1.5                  |                              |                 |          |                |                        |                              |

Table 2. Findings of ovarian biopsy obtained by either laparoscopy or laparotomy for 6 patients with premature ovarian failure.

|                | primordial<br>(+) | follicle<br>(-) | Graafian<br>(+) | follicle<br>(-) | follicle (total) |   |
|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|---|
| Amenorrhea II. | 3                 | 2               | 1               | 4               | 3                | 2 |
| Amenorrhea I.  | 1                 | -               | 1               | -               | 1                | - |
| total          | 4                 | 2               | 2               | 4               | 4                | 2 |

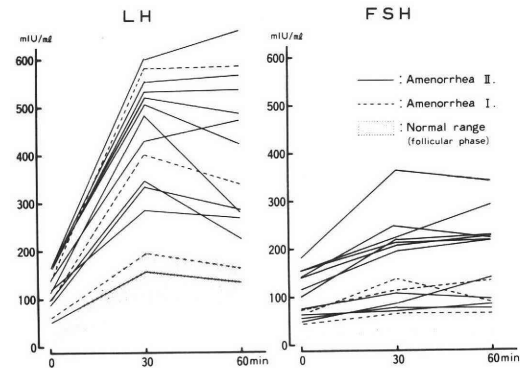


Fig. 1 Serum LH and FSH reponse to 100 µg LH-RH administration in patients with premature ovarian failure.

with mild ovarian insufficiency, the amenorrhea

Table 3. Response to clomiphene citrate, administered at 150mg/day for 5 days, in 10 patients with premature ovarian failure.

|                | ovulation<br>(+) | ovulation<br>(-) | total |
|----------------|------------------|------------------|-------|
| Amenorrhea II. | 2                | 5                | 7     |
| Amenorrhea I.  | 2                | 1                | 3     |
| total          | 4                | 6                | 10    |

first grade was made up 3 women with moderate insufficiency and the amenorrhea second grade group consisted of 14 women with marked ovarian failure included one primary amenorrhea.

The karyotype was checked in 11 of 19 women and all showed 46, xx.

Table 4. Clinical outcome of 19 women

|                          | spont. ovulation<br>and pregnancy                         | spont. ovulation | Induced ovulation<br>and pregnancy | Induced ovulation                          |
|--------------------------|---|------------------|------------------------------------|--|
| Amenorrhea II.<br>n = 14 | 7 (after K-Kur : 5<br>after preg. : 1<br>spontaneous : 1) | 3 (after K-Kur)  | 0                                  | 8 (hMG : 2<br>K-Kur+hMG : 5<br>Clomid : 1) |
| Amenorrhea I.<br>n = 3   | 0   | 0                | 0                                  | 3 (hMG : 1<br>Clomid : 2)                  |
| Anovu. Cycle<br>n = 2    | 0   | 0                | 0                                  | 2 (hMG : 1<br>K-Kur+Comid : 1)             |
| total n = 19             | 7   | 3                | 0                                  | 13   |

hMG : human menopausal gonadotropin

K-Kur : Kaufmann therapy

(estrogen-progesterone cyclic therapy)

The mean basal LH levels of the 19 women was  $118.4 \pm 9.2$  mIU/ml (mean  $\pm$  S. E.), mean basal FSH was  $101.2 \pm 9.8$  mIU/ml and mean estradiol level was  $37.5 \pm 16.4$  pg/ml. The mean basal prolactin levels was  $12.7 \pm 1.5$  ng/ml and no one showed over 25 ng/ml. The administration of 100  $\mu$ g LH-RH gave rise to remarkable responses in LH and FSH in 15 of 19 women. The mean LH and FSH levels 30min. After LH-RH administration were  $405.1 \pm 33.3$  mIU/ml and  $170.1 \pm 21.8$  mIU/ml, respectively, proving good gonadotropin reserve capacity of the pituitary (Table 1., Figure 1.).

Blood hormonal analysis, showing elevated basal gonadotropin levels and hyperresponses to LH-RH, normally corresponding to menopausal women, gave the hypothesis of premature menopause in these 19 women.

The histological picture of the ovary was obtained by either laparoscopic or laparotomic biopsy in 6 of the 19 women. Primordial follicle was recognized in 4 of 6 women and Graafian follicle was found in 2 of 6 women. This fact suggested that histologically, although no follicle is present in the ovary as determined by biopsy, it is not positive there will be no pregnancy or ovulation in the future (Table 2.).

Table 3. demonstrates the response to clomiphene citrate in 10 women. 150 mg of clomiphene citrate was given daily for 5 days and ovulation in 4 women was noted. Although induced ovulation is not usually effective in this disorder, clomiphene citrate is occasionally successful, but not

consistent.

Table 4. shows the clinical outcome of 19 women. 5 women conceived with spontaneous ovulation after Kaufman therapy, of which one woman conceived with spontaneous ovulation after previous pregnancy. Another woman conceived spontaneously. Spontaneous ovulation was recognized another 2 women after Kaufman therapy, but to date, they have not conceived. Consequently, all women who experienced spontaneous ovulation and/or pregnancy were amenorrhea second grade.

Induced ovulation was observed in 13 women. Induced ovulation by hMG administration succeeded in 9 women including with induced ovulation after Kaufmann therapy. Clomiphene citrate was effective in inducing ovulation in 4 women including one case after Kaufmann therapy. Kaufmann therapy was effective in 13 cases, allowing ovulation and/or pregnancy and spontaneous ovulation was observed in 7 cases after Kaufmann therapy.

### Discussion

Even though there have been many reports on premature ovarian failure, the incidence and successful treatment of this disorder is not well established. Coulam et al<sup>1)</sup> reported the incidence of premature ovarian failure to be 0.9% in 1858 women. 10 to 28% of women with primary amenorrhea have premature ovarian failure (Mashchak et al<sup>2)</sup>, Kinch et al<sup>3)</sup>). Thus, premature ovarian failure is not a rare disorder. We have

already reported on successful treatment of premature ovarian failure resulting in pregnancy obtained by including ovulation with large doses of hMG following repeated Kaufmann therapy<sup>4,5)</sup>. In this study, to compile and assess the profile of successful treatment of premature ovarian failure, medical records concerning this disorder were obtained from all over the Kyushu area.

According to our data, most of the patients experienced ovulation and/or pregnancy after treatment with estrogen-progesterone replacement therapy, named Kaufmann therapy, because of hypoestrogenic symptoms or amenorrhea. Kaufmann therapy may be effective in the reversal of these adverse processes. Several investigators have reported successful treatment of premature ovarian failure. Alper et al<sup>6)</sup> reported two pregnancies occurring while women were receiving conjugated estrogen therapy, two pregnancies while women were taking oral contraceptives and two women conceived spontaneously. Shangold et al<sup>7)</sup> reported a conception while receiving estrogen therapy. Szlachter et al<sup>8)</sup> reported that 3 patients became pregnant during estrogen replacement therapy. Check and Chase<sup>9)</sup> reported the successful treatment of induction of ovulation in 3 of 5 women by employing estrogen to suppress endogeneous gonadotropins and then hMG administration to stimulate ovulation. Johnson and Peterson<sup>10)</sup> reported one case where hMG was administered for 5 days (225IU/day) and following three normal consecutive menses, and the women conceived. They advocated that women with premature ovarian failure were candidates for gonadotropin stimulation to achieve pregnancy, since many would have at least some primordial follicles.

Thus, there have been several reports of pregnancy in patients with hypergonadotropic hypogonadism following the use of exogenous estrogen and hMG therapy. However, our data suggests that Kaufmann therapy or exogenous estrogen replacement therapy is more effective than hMG therapy, since estradiol may effect FSH receptor in the ovary. Louvet and Vaitukaitis<sup>11)</sup> showed that the number of specific FSH receptors per ovarian cell was unaffected by

pretreatment with estradiol, but FSH binding was enhanced by estrogen-induced proliferation of granulosa cells. Richards et al<sup>12)</sup> reported that when rats were pretreated with estradiol, the response of follicles to FSH was markedly enhanced, as indicated by the appearance of large, antral follicles and elevated receptor content for both FSH and LH.

In the case reported herein, it is presumed that recovery of spontaneous ovulation occurred because of estrogen action on the ovary and pregnancy resulted because ovulation occurred after Kaufmann therapy. Therefore, estrogen replacement therapy has been thought to be essential for ovulation in patients with premature ovarian failure.

Our patients consisted of various grades of ovarian insufficiency including 2 women of anovulatory cycle, 3 of amenorrhea first grade and 14 of amenorrhea second grade. Falk<sup>13)</sup> reported the case of euestrogenic ovarian failure with clinically good estrogenization, including withdrawal bleeding after administration of progestins, findings which would not lead one to consider the diagnosis of ovarian failure, but who also had menopausal levels of gonadotropins. Kim<sup>14)</sup> reported patients who revealed elevated levels of serum FSH and LH in the presence of numerous primordial follicles and low normal levels of estradiol and estrone. He stressed the importance of ovarian biopsies to confirm the diagnosis of premature ovarian failure. In 1973, Goldenberg et al<sup>15)</sup> claimed that the level of FSH in plasma clearly indicated the presence or absence of functioning ovarian follicles. They found that FSH levels above 50mIU/ml implied ovarian failure without functioning follicles in the ovaries.

We assumed, however, that serum estrogen levels and gonadotropin levels might not reflect the presence or absence of follicles in the ovary of premature ovarian failure, since 2 women of anovulatory cycle and 3 of amenorrhea first grade revealed elevated gonadotropin levels. Especially, in case 2 and case 3 in our study who conceived after Kaufmann therapy, no follicle had been found in the ovaries obtained at caesarean sec-

tion. Aiman and Smentek<sup>16)</sup> found that ovarian biopsy results could be misleading, as one of their two patients who conceived had no follicle in the histologic sections of her ovarian wedge biopsy. Therefore, we concluded that the presence or absence of follicles obtained from ovarian biopsy might not reflect the severity of premature ovarian failure and the prognosis of this disorder.

The etiology of premature ovarian failure is not confirmed, but, recently, several reports on this disorder have been associated with an autoimmune disorder. Williamson et al<sup>17)</sup> reported two cases of premature ovarian failure with myasthenia gravis and suggested an autoimmune etiology of this disease because of this high titers of antithyroid and antiovarian antibodies. Escobar et al<sup>18)</sup>, Emperaire et al<sup>19)</sup>, Irvine et al<sup>20)</sup>, Tang and Faiman<sup>21)</sup>, Alper and Garner<sup>22)</sup> also suggested that an associated autoimmune disease is present in premature ovarian failure.

In this study, we cannot explain the etiology of this disorder, but we suggested that Kaufmann therapy might be the most effective treatment for patients with premature ovarian failure and histological evaluation obtained by ovarian biopsy might not reflect the real prognosis.

### Acknowledgment

We are grateful to Linda Saza for her kind cooperation.

### References

- 1) Coulam, C. B., Adamson, S. C., Annegers, J. F.: Incidence of premature ovarian failure, *Obstet. Gynecol.*, 67: 604, 1986
- 2) Mashchak, C. A., Kletzky, O. A., Davajan, V. and Mishell, D. R.: Clinical and laboratory evaluation of patients with primary amenorrhea, *Obstet. Gynecol.*, 57: 715, 1981
- 3) Kinch, R. A. H., Plunkett, E. R., Smout, M. S. and Carr, D. H.: Primary ovarian failure, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 91: 630, 1965
- 4) Utsunomiya, T., Yamaguchi, S., Yoshida, K., Tateyama, H., Katagiri, H. and Kadota, T.: The effect of Kaufmann therapy and large dose treatment of human menopausal gonadotropin on gonadotropin resistant ovary syndrome, *Acta Obst. Gynec. Jpn.*, 33: 250, 1981
- 5) Miyakawa, I., Tanaka, T., Inoue, H., Koike, H. and Mori, N.: Pregnancy of premature menopause, *Obste. Gynecol. (Tokyo)*, 53: 1137, 1986
- 6) Alper, M. M., Jolly, E. E., Garner, P. R.: Pregnancies after premature ovarian failure, *Obstet. Gynecol.*, 67: 59s, 1986
- 7) Shangold, M. M., Turksoy, R. N., Bashford, R. A. and Hammond, C. B.: Pregnancy following the "insensitive ovary syndrome", *Fertil. Steril.*, 28: 1179, 1977
- 8) Szlachter, B. N., Nachtigall, L. E., Epstein, J., Young, B. K. and Weiss, G.: Premature menopause: a reversible entity?, *Obstet. Gynecol.*, 54: 396, 1979
- 9) Check, J. H. and Chase, J. S.: Ovulation induction in hypergonadotropic amenorrhea with estrogen and human menopausal gonadotropin therapy, *Fertil. Steril.*, 42: 919, 1984
- 10) Johnson, T. R. and Perterson, E. P.: Gonadotropin-induced pregnancy following "Premature ovarian failure", *Fertil. Steril.*, 31: 351, 1979
- 11) Louvet, J. P. and Vaitukaitis, J. L.: Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming, *Endocrinol.*, 99: 758, 1976
- 12) Richards, J. S., Ireland, J. J. and Rao, M. C.: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, *Endocrinol.*, 99: 1562, 1976
- 13) Falk, R. J.: Euestrogenic ovarian failure, *Fertil. Steril.*, 28: 502, 1977
- 14) Kim, M. H.: "Gonadotropin resistant ovaries" syndrome in association with secondary amenorrhea, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 120: 257, 1974
- 15) Goldenberg, R. L., Grodin, J. M., Rodberd, D. and Ross, G. T.: Gonadotropins in women with amenorrhea, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 116: 1003, 1973
- 16) Aiman, J. and Smentek, C.: Premature ovarian failure, *Obstet. Gynecol.*, 66: 9, 1985
- 17) Williamson, H. O., Phansey, S. A., Mathur, S., Mathur, R. S., Baker, E. R. and Fudenberg, H. H.: Myasthenia gravis, premature menopause, and thyroid autoimmunity, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 137: 893, 1980
- 18) Escobar, M. E., Cigorrage, S. B., Chiauuzzi, V. A., Charreau, E. H. and Rivarola, M.: Development of the gonadotrophic resistant ovary syndrome in myasthenia gravis: suggestion of similar autoimmune mechanism, *Acta Endocrinol.*, 99: 431, 1982
- 19) Emperaire, J. C., Audebert, A. and Greenblatt, R. B.: Premature ovarian failure, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 108: 445, 1970

- 20) Irvine, W. J., Chan, M. M. V., Scarth, L., Kolb, F. O., Hartog, M., Bayliss, R. I. S. and Drury, M. I.: Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease, *Lancet*, X: 883, 1968
- 21) Tang, V. W. and Faiman, C.: Premature ovarian failure: A search for circulating factors against gonadotropin receptors, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 146: 816, 1983
- 22) Alper, M. M. and Garner, P. R.: Premature ovarian failure: Its relationship to autoimmune disease, *Obstet. Gynecol.*, 66: 27, 1985

**早発閉経またはゴナドロピン抵抗性  
卵巣に関する臨床的研究  
—7 大学病院における症例から**

鹿児島大学医学部産婦人科学教室

永田行博 堂地 勉

九州大学生体防御医学研究所  
生殖生理内分泌部門

宇都宮隆史

九州大学医学部婦産科学教室

中村元一

長崎大学医学部産婦人科学教室

石丸忠之

宮崎医科大学産婦人科学教室

宮川 勇

大分医科大学産婦人科学教室

森 宏之

熊本大学医学部産婦人科学教室

岡村 均

早発閉経またはゴナドロピン抵抗性卵巣に関して、内分泌学的に、あるいは治療成績からその病態を評価するために、九州内の7大学病院にアンケート調査を行い、その結果を分析した。

19 症例の排卵あるいは妊娠例が集積された。いずれも高ゴナドトロピン値を示し、正常閉経婦人と同様な LH-RH への過剰反応がみられた。妊娠は6 症例7 回あった。5 例はカウフマン療法後に自然排卵し妊娠し、うち1 例はさらにその後自然排卵で妊娠した。他の1 例は自然排卵で妊娠した。排卵例のみでは、8 例はカウフマン療法後の誘発あるいは自然排卵であった。5 例は誘発排卵であった。6 例中4 例は組織学的に原始卵胞が認められた。

以上の結果から、早発閉経またはゴナドロピン抵抗性卵巣にカウフマン療法が有効であることを示している。また卵巣生検が必ずしも精確な予後を示すとは限らないといえる。

(受付: 1991 年 4 月 22 日)

## 枯死卵 (Blighted Ovum) の起源

### The Origin of Blighted Ovum

医療法人社団スズキ病院産婦人科

千 田 智 鈴 木 雅 洲  
Satoru CHIDA Masakuni SUZUKI

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

Kiel 大学産婦人科

Liselotte METTLER Kurt SEMM

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kiel University Hospital, 2300 Kiel, FRG

臨床において、枯死卵 (blighted ovum) の発生率は全妊娠中の 7~10 %, 全流産例の約 70 % と報告されているが発生機序は不明である。今回マウス受精卵を用いた quality control のシリーズより得た胞胚期での内細胞塊の発育不全と思われる胚を、hatching 後 plastic dish 上に接着させ、その後の発育形態を観察することで以下の結果を得た。In vivo 受精由来の胞胚において 8.1 %, in vitro 受精由来の胞胚において 11.2 % の内細胞塊発育不全胚を認めた。これらは正常に hatching し、dish 上において trophoblast の out growth を認めたが、胎児成分となる内細胞塊の発育を認めなかった。つまり、枯死卵発生の起源は内細胞塊発育不全胚にあり、発生時期は胞胚形成前後にあると考えられた。また、in vivo 受精由来胞胚と in vitro 受精由来胞胚における内細胞塊発育不全胚の発生率において有意差を認めなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 70-73, 1992)

### 緒 言

臨床においては一般に“胎児生存が1度も確認されずに妊娠が中絶すること”を枯死卵 (blighted ovum) といい“生存胎児を認めない流産”と診断される<sup>1)</sup>。超音波診断学上では“胎芽がすでに死亡しているか、あるいは最初から (正常) 胎芽として発生してこなかった妊卵が胎嚢のみを形成している状態”と解釈されているが一定の診断基準がない<sup>2,3)</sup> (写真1)。また組織学的には“流産時における子宮内容物の組織学的検索において胎児成分、胎児組織を認めない流産状態 (anembryonic or pathologic ovum)”としている<sup>4)</sup>。枯死卵の発生率は全妊娠中の 7~10 %, 全流産例の約 70 % といわれており<sup>1,5)</sup> その大部分は染色

体異常を伴うとの報告がある<sup>6)</sup>。ヒト体外受精胚移植後における枯死卵発生率は約 14 %, その約 60 % は染色体異常ともいわれている<sup>7)</sup>。しかし、いずれにせよその発生起序及び時期は不明である。著者はマウス受精卵を用いた培養系の quality control をしていた際、胞胚期における内細胞塊発育不全と思われる胚を認め、さらにそれらを hatch 後 plastic dish 上に接着させて trophoblast 及び内細胞塊 (inner cell mass) の形態を追跡観察することで in vitro における枯死卵発生について知見を得たので考察をまじえて報告する。

### 方 法

今回の報告は、(旧)西ドイツ Kiel 大学産婦人科研

研究室において1987年12月から1989年10月まで、Ham's F10 培養液を用いた quality control のシリーズより得たデータによるもので、マウスはCB6F1を使用した<sup>8,9)</sup>。幼若雌マウスにPMSG・hCGにて過

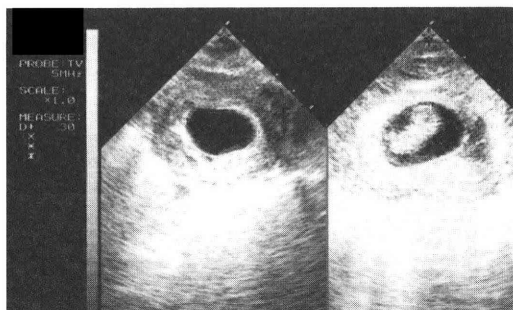
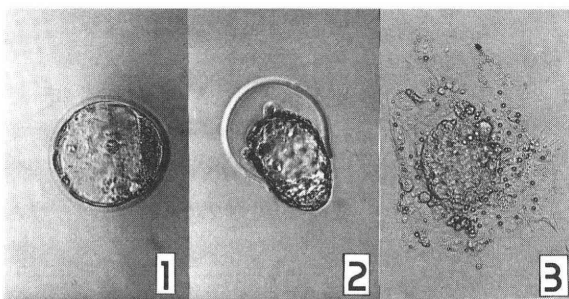


Fig. 1 Ultrasound image of human pregnancy with a fetus (right) and blighted ovum (left) at 9 weeks gestational age following IVF-ET.



体内受精及び体外受精由来の1個の内細胞塊をもつ胚の dish 上での着床率は各々73.5%, 41.0%と体内受精由来胚群で有意に高かった。胚着床後、1個の内細胞塊として発育した胚 (写真2) は、体内受精由来胚 90.8%, 体外受精由来胚 86.7%, また内細胞塊発育不全胚 (写真3) は、体内受精由来胚で 8.1%, 体外受精由来胚で 11.2% であった。さらに1個の内細胞塊が着床後2個に分裂するものが認められ (写真4), 各々1.2%, 2.0% であった。以上について両群間に有意差を認めなかった (表1)。

Fig. 2 1. Expanded blastocyst with one inner cell mass (ICM). 2. Blastocyst hatching. 3. Trophoblastic outgrowth formation with ICM on the surface of the plastic culture dish after 48 hours in culture of blastocyst.

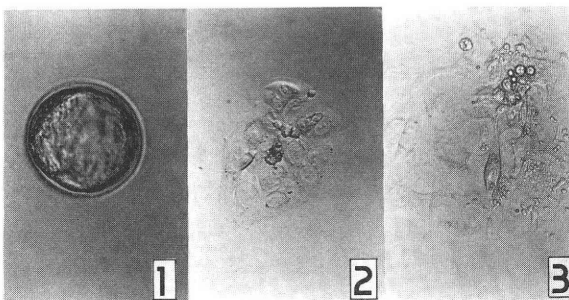


Fig. 3 1. Expanded blastocyst with poor (or no) differentiated ICM. 2. After 24 hours in culture of blastocyst. Poor differentiation of ICM in trophoblastic outgrowth formation. 3. After 48 hours in culture of blastocyst. No inner cell masses are observed.

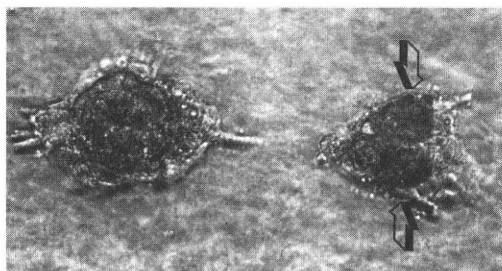


Fig. 4 Following 48 hours in culture of single ICM blastocyst. Two inner cell masses are observed in right embryo.

## 成 績

## 考 察

光学顕微鏡下に形態的に正常と観察される胚において、体内受精由来胚の trophoblast の着床率および outgrowth が体外受精由来胚に比して高いということは、胚の質 (quality) と活力 (activity) が高いということであり、体外受精そのものにまだ何らかの改良の余地がある<sup>8,9)</sup>。

ところで枯死卵 (blighted ovum) とは GS (gestational sac) と血中 HCG の上昇を認めることから、trophoblast は発育増殖しているにもかかわらず、超音波断層装置及び組織学的に胎児成分を認めないわ

Table 1. Number of blastocyst attachment in three groups of the inner cell mass (ICM) formation following fertilization in vivo and in vitro.

| Fertilization             | in vivo     | in vitro |    |
|---------------------------|-------------|----------|----|
| No. blastocyst attachment | 346/471     | 98/239   |    |
| No. single ICM blastocyst | (73.5%)     | (41.0%)  |    |
|                           | —————*————— |          |    |
| No. single ICM            | 314/346     | 85/98    |    |
| No. blastocyst attachment | (90.8%)     | (86.7%)  | NS |
| No. no ICM                | 28/346      | 11/98    |    |
| No. blastocyst attachment | (8.1%)      | (11.2%)  | NS |
| No. double ICM            | 4/346       | 2/98     |    |
| No. blastocyst attachment | (1.2%)      | (2.0%)   | NS |

ICM : inner cell mass.

\* $p < 0.005$  by chi-square test.

NS : not significant.

けであり、今回の in vitro での観察と一致する。つまり、in vitro においては、trophoblast は dish 上に発育増殖するが胎児組織となる内細胞塊を認めない胚発生、ないしは内細胞塊らしきものを認めるが発育不全に終わるものといえる。ということは胎芽は存在しても生存（心拍動）が認められないものも枯死卵に含まれると考えても良いであろう。この時期では胎芽は胎児組織としては観察されないからである<sup>17,18)</sup>。

枯死卵の鑑別診断として、いわゆる生化学妊娠 (biochemical pregnancy) がある。これはヒト体外受精胚移植が始まってから使用された言葉であり、血中  $\beta$ HCG の上昇を認めるも次回月経にて流産してしまう妊娠 (pre-clinical abortion) である。体外受精妊娠後の枯死卵は、受精後 20~30 日目に 500 IU/L 以上の  $\beta$ HCG 上昇を認めるが、biochemical pregnancy では 200 IU/L までしか上昇しない<sup>14)</sup>。一般臨床において生化学妊娠を確定するのは難しい。体外受精後妊娠においては、自然妊娠に比して枯死卵の頻度は低く、生化学妊娠の頻度は高いとの報告<sup>14)</sup>もされているが、差がないとの報告もある<sup>7)</sup>。これは体外受精胚移植後妊娠においては詳細に検索し、経過をみる為であると思われる。今回の in vitro における内細胞塊発育不全胚の発生頻度は体外受精由来群と体内受精由来群において差を認めなかった。また、枯死卵は多胎妊娠における“vanishing fetuses”としても観察されるがその発生率は 15~20% と自然妊娠群と体外受精妊娠群との間に差を認めない<sup>15,16)</sup>。

体外受精胚移植後の枯死卵の約 60% は染色体異常であったというが、自然妊娠における枯死卵の染

色異常の分析と比較していない<sup>7)</sup>。しかし、体外受精体外培養における異常卵の発生は結果的に染色体異常として、胞状奇胎、枯死卵を含む自然流産の形態をとることが多く<sup>19)</sup>、受精培養環境とその後の胚発育との関係についての検討が必要であり<sup>17)</sup>、内細胞塊の染色体分析や DNA 解析は有効な手段と考えられる<sup>19,20)</sup>。

今回の観察で、1 個の内細胞塊をもつ胞胚が hatching 後 dish 上に着床し 2 個の内細胞塊へ分裂発育するものを認めた。これは 1 絨毛 1 羊膜の一卵性双胎を形成するものであり、さらに着床が進行した時期に分裂すると結合体として観察される異常卵の 1 つと考えられる<sup>12,13)</sup>。体外受精、体内受精由来胞胚の両者において、枯死卵を含む異常卵の発生率に差を認めなかったのではあるが、異常卵の多くは胞胚期前および hatching 前後に淘汰されているのであり、生き残った胚において差を認めなかったと考えるべきである<sup>8,9)</sup>。

本研究は、(旧)西ドイツ Alexander von Humboldt 財団の助成を受けた。

## 文 献

- 1) 佐々木記久子, 青木嶺夫, 長谷川利典, 倉智敬一, 千葉喜英: 流産の超音波診断システム, 産婦進歩, 35: 581, 1983
- 2) 岡井崇, 馬場一憲, 上妻志郎, 棕棒正昌, 水野正彦, 坂元正一, 箕浦茂樹, 原量宏: 妊娠初期の超音波診断, 超音波医学, 9: 243, 1982
- 3) 佐藤章, 山辺紘猷, 斉藤晃, 経塚光夫, 劉雪美, 井戸川敏彦, 遠藤力, 山口祐, 鈴木雅洲: 妊娠初期の超音波診断, 超音波医学, 9: 249, 1982

- 4) Jouppila, P. and Herva, R.: Study of blighted ovum by ultrasonic and histopathologic methods, *Obstet. Gynec.*, 55: 574, 1980
- 5) 加藤達夫, 後藤清二, 黒木尚之: 妊娠各期における子宮内胎芽胎児死亡の分布について, 第44回日本超音波医学会講演論文集, 753, 1984
- 6) Honoré, L. H.: Letters to editor, *Fertil. Steril.*, 32: 349, 1979
- 7) Roesler, M., Wise, L. and Katayama, K. P.: Karyotype analysis of blighted ova in pregnancies achieved by in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 51: 1065, 1989
- 8) Chida, S. and Mettler, L.: Screening test for mouse blastocysts as an index of the vitality of embryos, *J. In vitro Fert. Embryo Transfer*, 6: 310, 1989
- 9) Chida, S. und Mettler, L.: Lebensfähigkeit von Mausblastozysten nach In vivo und In vitro Fertilisation, *Fertilität*, 6: 40, 1990
- 10) Chen, L. T. and Hsu, Y. C.: Development of mouse embryos in vitro: Preimplantation to the limb bud stage, *Science*, 218: 66, 1982
- 11) Hsu, Y. C. and Gonda, M. A.: Monozygotic twin formation in mouse embryos in vitro, *Science*, 209: 605, 1980
- 12) Chida, S.: Monozygous double inner cell masses in mouse blastocysts following fertilization in vitro and in vivo, *J. In vitro Fert. Embryo Transfer*, 7: 177, 1990
- 13) Chida, S. und Mettler, L.: Monozygote Zwillingsembryoblastentwicklung von Mausembryonen nach in vitro und in vivo Fertilisation, *Reprod. Dom. Anim.*, 25: 173, 1990
- 14) Edwards, R. G.: Normal and abnormal implantation in the human uterus. In *Implantation of the Human Embryo*, 303, Academic press, London, 1985
- 15) Landy, H. J., Keith, L. and Keith, D.: The vanishing twin, *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 31: 179, 1982
- 16) Steptoe, P. C., Edwards, R. G. and Walters, D. E.: Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human in vitro fertilization, *Hum. Reprod.*, 1: 89, 1986
- 17) Edwards, R. G.: Causes of early embryonic loss in human pregnancy, *Hum. Reprod.*, 1: 185, 1986
- 18) Gardner, R. L.: Origin and development of the trophoectoderm and inner cell mass. In *Implantation of the Human Embryo*, 155, Academic Press, London, 1985
- 19) Edwards, R. G., Crow, J., Dale, S., Macnamee, M., Hartshorne, G. M. and Brinsden, P.: Preimplantation diagnosis and recurrent hydatidiform mole, *Lancet*, i: 1030, 1990
- 20) Edwards, R. G., and Hollands, P.: New advances in human embryology: implantations for the preimplantation diagnosis of genetic disease, *Hum. Reprod.*, 3: 549, 1988

### The origin of blighted ovum

Satoru Chida and Masakuni Suzuki

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

Liselotte Mettler and Kurt Semm

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kiel University Hospital,  
2300 Kiel, FRG

The present study reports the origin of blighted ovum following in vivo and in vitro fertilization in mouse embryos. It was observed that the trophoblastic outgrowth with no inner cell masses formed the blighted ovum after 48 hours in culture of blastocysts following fertilization in vivo or in vitro, and there are no correlations between in vivo and in vitro fertilization groups in the rate of no inner cell masses formations, 8.1% (28/346) and 11.2% (11/98) respectively. It is indicated the formation of blighted ovum is made from no or poor inner cell masses blastocyst before or after hatching.

(受付: 1991年6月11日)

# THE INCIDENCE AND MORPHOLOGY OF TRANSFORMED EMBRYOS IN THE COURSE OF BLASTOCYST FORMATION IN FOUR MAMMALIAN SPECIES

Ikuko YOTSUTANI

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

Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

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

---

**Abstract:** The incidence and morphology of embryos including transformed blastomeres in the course of blastocyst formation were examined in hamsters, rats, mice and rabbits. (1) In hamster embryos, 4 outer blastomeres were flattened at the 8-cell stage (65 hrs after ovulation); in rat embryos, the outer blastomeres were flattened at the 16-cell stage (89 hrs); in mouse embryos, the outer ones were flattened either at the 8-cell stage (59hrs) or at the 16-cell stage (63 hrs); while in rabbit embryos, the outer blastomeres were cuboidal at the 64-cell stage (60 hrs). (2) Tight junctions (*zonula occludens*) were formed between each group of two transformed blastomeres at the 8-cell stage in hamster embryos, at the 16-cell stage in rat embryos, either at the 8-cell or at the 16-cell stage in mouse embryos, and at the 64-cell stage in rabbit embryos, co-inciding with the period of blastomere transformation. (3) Compaction occurred in hamster, rat and mouse embryos at the period of blastomere transformation, which was also of tight junction formation, but such was not observed in rabbit embryos. Compaction was more pronounced in the embryos whose blastomeres were transformed at earlier stages, as compared with the blastomeres which were transformed at a later stage. (4) Blastomere transformation occurred both *in vitro* and *in vivo* either at the 8-cell or at the 16-cell stage in mouse embryos, but the formation into blastocysts took longer *in vitro*.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 74-82, 1992)

---

## Introduction

It is generally accepted that in mammalian embryos, the transformation of blastomeres, the formation of junctional complexes among blastomeres and the compaction of the embryos occur in the course of blastocyst formation. As for the transformation of the blastomeres, Gregory (1930)<sup>1)</sup> first observed that some of the outer

blastomeres in 32-cell rabbit embryos were flattened, and thereafter many investigators reported on the transformation of blastomeres in other mammalian embryos<sup>2-10)</sup>. The transformation of blastomeres occurs either at the 8-cell<sup>2)</sup> or at the 16-cell<sup>3)</sup> stage in mice, at the 8-cell stage in hamsters<sup>4)</sup> and rats<sup>5,6)</sup>, at the 16-cell stage in pigs<sup>7)</sup>, and either at the 16-cell<sup>8)</sup> or at the 32-cell stage<sup>9)</sup> in bovines. In mouse<sup>2)</sup> and rat<sup>5,6)</sup> embryos,

all the blastomeres are first said to be flattened, whereas in pig<sup>7)</sup> and bovine<sup>8,9)</sup> embryos, only some of the outer blastomeres are. In rabbit embryos<sup>10)</sup>, outer blastomeres are said to become cuboidal.

As for the formation of tight junctions (*zonula occludens*) between blastomeres, Calarco and Brown (1968)<sup>11)</sup> first observed such phenomenon by electron microscopy between each group of two outer blastomeres in mouse morulae. However, other investigators who later studied mouse embryos reported that tight junctions were formed either at the 8-cell<sup>2)</sup> or at the 16-cell<sup>12)</sup> stage. The formation of tight junctions in other mammalian embryos occurs at the 8-cell stage in rats<sup>6)</sup>, at the morular stage in rabbits<sup>13)</sup>, at the 16-cell stage in sheep<sup>14)</sup>, and at the 32-cell stage in monkeys<sup>15)</sup>. However, the formation period of such apparatus in hamster, pig and bovine embryos is unknown.

Ducibella and Anderson (1975)<sup>2)</sup> examined by electron microscopy 8-cell mouse embryos including transformed blastomeres and reported that the whole embryo markedly shrunk because of the close adherence that occurred between each group of two blastomeres (compaction). The compaction in mammalian embryos occurs at the morular stage in rabbits<sup>16)</sup>, and at the 16-cell stage in hamsters<sup>4)</sup>, pigs<sup>17)</sup>, bovines<sup>8)</sup> and monkeys<sup>18)</sup>, but the degree of compaction differs among each species of animals. Morphological observations of blastocyst formation were performed *in vitro* using mice<sup>19)</sup>. The transformation of blastomeres, the formation of tight junctions and the compaction of embryos occur *in vitro* as well as *in vivo*, though the formation into blastocysts takes longer *in vitro*<sup>20)</sup>.

The present investigation deals with the transformation of blastomeres, the formation of junctional complexes, the compaction of embryos in the course of blastocyst formation in hamsters, rats, mice and rabbits, and with the incidence of embryos including transformed blastomeres, as time passes, recorded every minute. This investigation further deals with the incidence of transformed mouse embryos *in vitro*, in comparison with that *in vivo*.

## Materials and Methods

Seventy golden hamsters, 77 rats of the Wistar strain, 73 mice of the ICR strain, and 29 Japanese White rabbits were used in the experiments. These animals were kept and fed in a room at 24°C. This room was lit 14 hrs a day, from 4 a. m. until 6 p.m. Mouse embryos were obtained through superovulation: the animals were subjected to peritoneal injections with 5 IU of PMSG (Serotropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) and with 5 IU of hCG (Gonotropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) 48 hrs later, and then were mated with male animals. Embryos were recovered from oviducts or uteri at intervals of 4 hrs during the period from 64 to 100 hrs after hCG injection. As for hamsters, rats and rabbits, the embryos were obtained by natural ovulation. Namely, hamsters and rats were mated with males at the proestrous, and the next morning, the presence of sperm was ascertained in the smear (Day 1). Hamster embryos were recovered from oviducts or uteri at intervals of 2 hrs during the period from 4 p. m. on Day 3 to 8 a. m. on Day 4, while rat embryos from oviducts or uteri at intervals of 3 hrs during the period from 2 p. m. on Day 4 to 2 p.m. on Day 5. Rabbit embryos were recovered from oviducts or uteri at intervals of 5 hrs during the period from 43 to 95 hrs after mating. As it is known that ovulation occurs 13 hrs after hCG injection in mice<sup>21)</sup>, 8 hrs after the onset of heat in hamsters<sup>22)</sup>, at 3 a. m. on the day of metestrous in rats<sup>23)</sup>, and 10 hrs after mating in rabbits<sup>24)</sup>, the recovery hours of embryos were described in numerical values which were converted into hours after ovulation.

Some embryos from each species were minutely examined under a phase-contrast microscope. The rest were fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 4% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde at 4°C for 3 hrs. Rinsed 3 times in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) over night, they were post-fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 1% osmium tetroxide. The embryos thus fixed were dehydrated through an acetone series, and then embedded in Epon 812. Some of the samples em-

bedded were stained with toluidine blue (pH 7.0) after being sectioned, and then observed under a light microscope. The other samples were cut using an ultramicrotome, stained with uranium acetate and lead nitrate, and then were photographed under a JEM-100B electron microscope. Oviducts or uteri from each species containing embryos were fixed in a Bouin solution, serially cut, and stained with hematoxylin and eosin.

To culture mouse embryos, 2-cell embryos were recovered 48 hrs after hCG injection from the oviducts of superovulated and mated mice. These embryos were cultured in the Whittingham medium<sup>25)</sup> at 37°C for 52 hrs with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The embryos were observed at intervals of 8 hrs. The observation hours were described in numerical values which were converted into hours after ovulation.

### Results

1. The incidence and morphology of embryos including transformed blastomeres

**Hamster** (Table 1) Sixty-three hrs after ovulation, all the embryos had 8 round-shaped blastomeres (Fig. 1), and some stayed in this stage up to 71 hrs after ovulation. During the period from 65 to 73 hrs, observed were 8-cell embryos with 4 flattened outer blastomeres in addition to 4 round inner ones, which looked immensely shrunk with perivitellin spaces enlarged (compacted em-

bryos, Figs. 2 and 3). During the period from 71 to 79 hrs, observed were 16-cell embryos which looked slightly shrunk with flattened outer blastomeres and round inner ones. Blastocysts first appeared 73 hrs after ovulation, and all the embryos became blastocysts after 81 hrs.

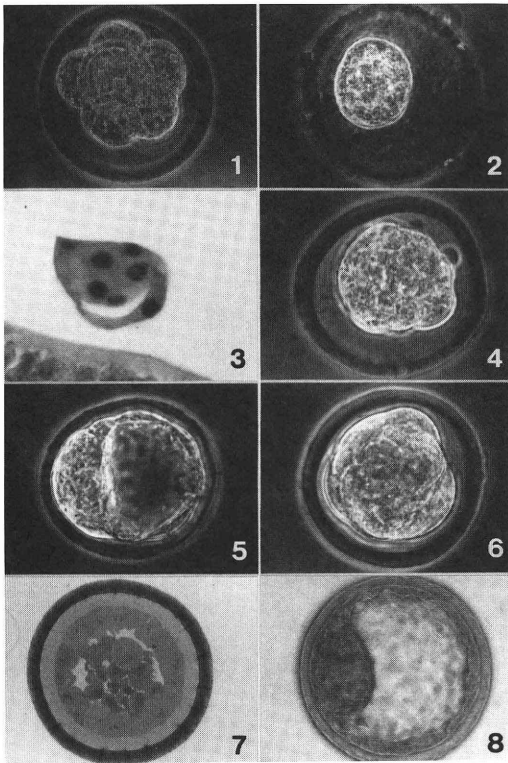
**Rat** (Table 2) Eighty-three hrs after ovulation, all the embryos had 8 round-shaped blastomeres, and some stayed in this stage up to 101 hrs after ovulation. During the period from 88 to 101 hrs, found were 16-cell embryos which had only round-shaped blastomeres. During the period from 89 to 104 hrs, there were slightly shrunk 16-cell embryos with flattened outer blastomeres and round inner ones (Fig. 4) as well as 32-cell embryos with flattened outer blastomeres and round inner ones. Blastocysts (Fig. 5) first appeared 95 hrs after ovulation, and all the embryos were blastocysts after 107 hrs.

**Mouse** (Table 3) Fifty-five hrs after ovulation, all the embryos had 8 round-shaped blastomeres, and some stayed in this stage up to 71 hrs after ovulation. During the period from 59 to 75 hrs, observed were greatly shrunk 8-cell embryos with 4 flattened outer blastomeres and 4 round inner ones as well as 16-cell embryos which had only round-shaped blastomeres. During the period from 63 to 83 hrs, observed were slightly shrunk 16-cell embryos with flattened outer blastomeres and round inner ones (Fig. 6), and during the period from 67 to 83 hrs, slightly shrunk 32-cell

Table 1. Incidence of hamster embryos from the 8-cell to the blastocyst stage 63 to 81 hours after ovulation

| Hours after ovulation | No. of embryos observed | 8-Cell embryo                  |                                 | 16-Cell embryo                  | Blastocyst  |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
|                       |                         | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) | With transformed blastomere (s) |             |
| 63                    | 36                      | 36 (100. 0)                    |                                 |                                 |             |
| 65                    | 56                      | 33 ( 59. 1)                    | 23 (40. 9)                      |                                 |             |
| 67                    | 52                      | 10 ( 19. 2)                    | 42 (80. 8)                      |                                 |             |
| 69                    | 55                      | 12 ( 20. 7)                    | 46 (79. 8)                      |                                 |             |
| 71                    | 44                      | 4 ( 10. 0)                     | 31 (70. 5)                      | 9 (19. 5)                       |             |
| 73                    | 48                      |                                | 21 (43. 8)                      | 13 (27. 0)                      | 14 ( 29. 2) |
| 75                    | 35                      |                                |                                 | 10 (28. 6)                      | 25 ( 71. 4) |
| 77                    | 32                      |                                |                                 | 13 (40. 6)                      | 19 ( 59. 4) |
| 79                    | 49                      |                                |                                 | 10 (20. 4)                      | 39 ( 79. 6) |
| 81                    | 45                      |                                |                                 |                                 | 45 (100. 0) |

The numbers in parentheses show percentages.



Microphotographs of Figs. 1, 2, 4, 5, 6 and 8 are of whole mount embryos taken under a phase-contrast microscope, and those of Figs. 3 and 7 are of sectioned specimens of embryos stained with hematoxylin and eosin (Fig. 3) and with toluidine blue (Fig. 7). Fig. 1 An 8-cell hamster embryo 63 hrs after ovulation.  $\times 125$ . Fig. 2 A transformed 8-cell hamster embryo 71 hrs after ovulation.  $\times 125$ . Fig. 3 A transformed 8-cell hamster embryo 71 hrs after ovulation.  $\times 125$ . Fig. 4 A transformed 16-cell rat embryo 95 hrs after ovulation.  $\times 125$ . Fig. 5 A rat blastocyst 98 hrs after ovulation.  $\times 125$ . Fig. 6 A transformed 16-cell mouse embryo 67 hrs after ovulation.  $\times 125$ . Fig. 7 A transformed 64-cell rabbit embryo 65 hrs after ovulation.  $\times 100$ . Fig. 8 A rabbit blastocyst 75 hrs after ovulation.  $\times 50$ .

embryos with flattened outer blastomeres and inner ones. Blastocysts first appeared 67 hrs after ovulation, and all the embryos were blastocysts after 87 hrs.

**Rabbit** (Table 4) During the period from 33 to 38 hrs after ovulation, 8-cell embryos were observed; and during the period from 38 to 65 hrs, 16-cell embryos; and from 60 to 70 hrs, 32-cell em-

bryos. All the embryos at these stages had round blastomeres only. During the period from 60 to 80 hrs, transformation was first seen with 64-cell embryos having cuboidal outer blastomeres and round inner ones (Fig. 7). Compaction did not occur in such embryos. Blastocysts (Fig. 8) first appeared 65 hrs after ovulation, and all the embryos were blastocysts after 85 hrs.

## 2. Appearance of tight junctions in transformed embryos

**Hamster** Though there was no tight junctional complex while 8-cell embryos were composed only of round blastomeres, tight junctions (Fig. 9) developed between each group of two flattened outer blastomeres of transformed 8-cell embryos, and there frequently were gap junctions inside the tight junctions. Occasionally predesmosomes (Fig. 9) were observed inside the tight junctions, as were reported by Dvořák (1978)<sup>6)</sup> in rat embryos and by Hastings and Enders (1975)<sup>13)</sup> in rabbits'. Between any two round blastomeres or between a flattened blastomere and a round one, however, there was no such junctional complex observed even in transformed 8-cell embryos. In transformed 16-cell embryos, there were tight junctions between each group of two flattened blastomeres, and besides, there often were predesmosomes and gap junctions between any two of the blastomeres of the same shape, that is, between two flattened ones or two round ones, as well as between those of different shapes. In blastocysts, there always existed tight junctions between each group of two trophoblast cells, often accompanied by desmosomes, predesmosomes and gap junctions (Fig. 10) inside such tight junctions, and either both or one each of predesmosomes or gap junctions between every two inner-cell-mass cells and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell.

**Rat** There was no junctional complex observed in 8-cell embryos and in 16-cell embryos which consisted of round blastomeres only. In transformed 16-cell embryos, however, there were tight junctions between each group of two flattened blastomeres, and there frequently existed predesmosomes inside the tight junctions. No

Table 2. Incidence of rat embryos from the 8-cell to the blastocyst stage 83 to 107 hours after ovulation

| Hours after ovulation | No. of embryos observed | 8-Cell embryo                  | 16-Cell embryo                 |                                 | 32-Cell embryo                  |            | Blastocyst |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|------------|
|                       |                         | Without transformed blastomere | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) | With transformed blastomere (s) |            |            |
| 83                    | 30                      | 30 (100.0)                     |                                |                                 |                                 |            |            |
| 86                    | 42                      | 35 ( 83.3)                     | 7 ( 16.7)                      |                                 |                                 |            |            |
| 89                    | 48                      | 18 ( 37.5)                     | 23 ( 47.9)                     | 3 ( 6.3)                        | 4 ( 8.3)                        |            |            |
| 92                    | 38                      | 14 ( 36.8)                     | 9 ( 23.7)                      | 10 ( 26.3)                      | 5 ( 13.2)                       |            |            |
| 95                    | 48                      | 4 ( 8.3)                       | 10 ( 20.8)                     | 24 ( 50.0)                      | 8 ( 16.7)                       | 2 ( 4.2)   |            |
| 98                    | 63                      | 7 ( 11.1)                      | 13 ( 20.6)                     | 20 ( 31.7)                      | 8 ( 12.7)                       | 15 ( 23.8) |            |
| 101                   | 47                      | 5 ( 10.6)                      | 1 ( 2.1)                       | 1 ( 2.1)                        | 10 ( 21.3)                      | 30 ( 63.8) |            |
| 104                   | 35                      |                                |                                | 2 ( 5.7)                        | 6 ( 17.1)                       | 27 ( 77.2) |            |
| 107                   | 46                      |                                |                                |                                 |                                 | 46 (100.0) |            |

The numbers in parentheses show percentages.

Table 3. Incidence of mouse embryos from the 8-cell to the blastocyst stage 55 to 87 hours after ovulation

| Hours after ovulation | No. of embryos observed | 8-Cell embryo                  |                                 | 16-Cell embryo                 |                                 | 32-Cell embryo                  |             | Blastocyst |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|------------|
|                       |                         | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) | With transformed blastomere (s) |             |            |
| 55                    | 159                     | 159 (100.0)                    |                                 |                                |                                 |                                 |             |            |
| 59                    | 132                     | 42 ( 31.8)                     | 59 ( 44.7)                      | 31 ( 23.5)                     |                                 |                                 |             |            |
| 63                    | 111                     | 31 ( 27.9)                     | 14 ( 12.6)                      | 42 ( 37.8)                     | 24 ( 21.6)                      |                                 |             |            |
| 67                    | 167                     | 5 ( 3.0)                       | 8 ( 4.8)                        | 44 ( 26.3)                     | 91 ( 54.5)                      | 13 ( 7.8)                       | 6 ( 3.6)    |            |
| 71                    | 117                     | 2 ( 1.7)                       | 4 ( 3.4)                        | 9 ( 7.7)                       | 25 ( 21.4)                      | 59 ( 50.4)                      | 18 ( 15.4)  |            |
| 75                    | 70                      |                                | 3 ( 4.3)                        | 5 ( 7.1)                       | 18 ( 25.7)                      | 15 ( 21.4)                      | 29 ( 41.4)  |            |
| 79                    | 147                     |                                |                                 |                                | 23 ( 16.4)                      | 43 ( 30.6)                      | 75 ( 53.0)  |            |
| 83                    | 94                      |                                |                                 |                                | 11 ( 11.7)                      | 11 ( 11.7)                      | 72 ( 76.6)  |            |
| 87                    | 126                     |                                |                                 |                                |                                 |                                 | 126 (100.0) |            |

The numbers in parentheses show percentages.

Table 4. Incidence of rabbit embryos from the 8-cell to blastocyst stage 33 to 85 hours after ovulation

| Hours after ovulation | No. of embryos observed | 8-Cell embryo                  | 16-Cell embryo                 | 32-Cell embryo                 | 64-Cell embryo                  | Blastocyst |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|
|                       |                         | Without transformed blastomere | Without transformed blastomere | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) |            |
| 33                    | 48                      | 48 (100.0)                     |                                |                                |                                 |            |
| 38                    | 33                      | 27 ( 81.8)                     | 6 (18.2)                       |                                |                                 |            |
| 60                    | 31                      |                                |                                | 19 ( 61.0)                     | 12 ( 39.0)                      |            |
| 65                    | 31                      |                                | 6 (19.3)                       | 3 ( 9.7)                       | 7 ( 22.6)                       | 15 ( 48.4) |
| 70                    | 30                      |                                |                                | 12 ( 40.0)                     | 6 ( 20.0)                       | 8 ( 40.0)  |
| 75                    | 18                      |                                |                                |                                | 12 ( 66.7)                      | 6 ( 33.3)  |
| 80                    | 36                      |                                |                                |                                | 3 ( 8.3)                        | 33 ( 91.6) |
| 85                    | 15                      |                                |                                |                                |                                 | 15 (100.0) |

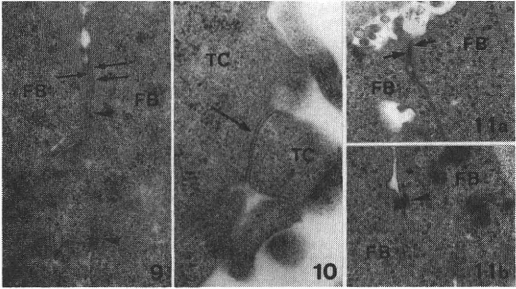
The numbers in parentheses show percentages.

junctional complex was observed, however, between any two round blastomeres or between a flattened blastomere and a round one. In transformed 32-cell embryos, there always were tight junctions between each group of two flattened blastomeres, often accompanying desmosomes, predesmosomes and gap junctions inside. There were predesmosomes and gap junctions between every two round blastomeres and between a

flattened blastomere and around one. In blastocysts, the kinds and locations of junctional complex were the same as seen in hamster blastocysts.

**Mouse** Although there was no junctional complex while 8-cell and 16-cell embryos were composed only of round blastomeres, tight junctions always existed between each group of two flattened blastomeres of transformed 8-cell and 16-cell embryos, frequently accompanying predesmosomes and gap junctions inside such. In these transformed embryos, there were gap junctions between any two round blastomeres as well as between a flattened blastomere and a round one. In transformed 32-cell embryos, tight junctions (Fig. 11) were always observed between each two flattened blastomeres, frequently accompanied by desmosomes, predesmosomes and gap junctions inside. In these transformed embryos, there frequently were predesmosomes and gap junctions between every group of two round blastomeres and between a flattened blastomere and a round one. In blastocysts, the kinds and locations of junctional complex were the same as seen in those of hamster and rat blastocysts.

**Rabbit** There was no junctional complex in 8-cell, 16-cell and 32-cell embryos which were composed only of round blastomeres. In transformed 64-cell embryos, there appeared tight junctions between each two cuboidal blastomeres, and there frequently were predesmosomes and gap junctions inside the tight junctions. In these transformed embryos, there were predesmosomes and gap junctions between every group of two round blastomeres and between a



All figures are electron microphotographs of embryos.  
 Fig. 9 A transformed 8-cell hamster embryo 69 hrs after ovulation. Tight junctions (arrows) and predesmosomes (arrowheads) seen between two flattened outer blastomeres (FB).  $\times 10,000$ .  
 Fig. 10 A hamster blastocyst 77 hrs after ovulation. A gap junction (arrow) seen between two trophoblast cells (TC).  $\times 12,000$   
 Fig. 11-a A transformed 32-cell mouse embryo 83 hrs after ovulation. Tight junctions (arrows) seen between two flattened outer blastomeres (FB).  $\times 5,000$ .  
 Fig. 11-b Another microphotograph of the same embryo in Fig. 11-a. A desmosome (arrowhead) seen between two flattened outer blastomeres (FB).  $\times 5,000$ .

Table 5. In vitro incidence of mouse embryos from the 8-cell to the blastocyst stage 55 to 87 hours after ovulation

| Hours after ovulation | No. of embryos observed | 8-Cell embryo                  |                                 | 16-Cell embryo                 |                                 | 32-Cell embryo                 |                                 | Blastocyst |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|
|                       |                         | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) | Without transformed blastomere | With transformed blastomere (s) |            |
| 55                    | 177                     | 142 ( 80.2)                    | 17 ( 9.6)                       | 12 ( 6.7)                      | 6 ( 3.9)                        |                                |                                 |            |
| 63                    | 158                     | 45 ( 28.5)                     | 60 ( 38.5)                      | 14 ( 8.9)                      | 38 ( 24.1)                      | 1 ( 0.7)                       |                                 |            |
| 71                    | 164                     | 20 ( 12.2)                     | 32 ( 19.5)                      | 3 ( 1.8)                       | 86 ( 52.4)                      | 19 ( 11.6)                     |                                 | 4 ( 2.4)   |
| 79                    | 143                     | 17 ( 11.9)                     | 24 ( 16.8)                      | 3 ( 2.1)                       | 29 ( 20.3)                      | 20 ( 14.0)                     |                                 | 50 ( 35.0) |
| 87                    | 111                     |                                | 1 ( 0.9)                        |                                | 24 ( 21.6)                      | 5 ( 4.5)                       |                                 | 81 ( 73.0) |

The numbers in parentheses show percentages.

cuboidal blastomere and a round one. In blastocysts, the kinds and locations of junctional complex were the same as seen in the blastocysts of the above three species.

3. Incidence of transformed mouse embryos *in vitro* (Table 5)

After 20 hrs of culturing (55 hrs after ovulation), 2-cell embryos had developed into 8-cell or 16-cell ones. Most of those embryos were composed of round blastomeres only, but some of them had been transformed 8-cell and 16-cell embryos. These transformed embryos were compacted as those *in vivo* were. The incidence of such transformed embryos was higher later, but grew lower 87 hrs after ovulation. Sixty-three hrs after ovulation, 32-cell embryos first appeared, and all the 32-cell embryos were transformed ones. It was 71 hrs after ovulation that blastocysts first appeared. Thereafter, the incidence of them became higher, and was as high as 73.0% 87 hrs after ovulation.

### Discussion

#### Blastomere transformation

It is known that half the number of blastomeres are flattened in transformed hamster embryos<sup>4)</sup>, while all the blastomeres are said to be flattened in transformed embryos of rats<sup>5,6)</sup> and mice<sup>2)</sup>. In the present investigation, however, only half of the blastomeres were flattened in transformed embryos of rats, mice and those of hamsters. It is said that the outer blastomeres of transformed rabbit embryos are either flat<sup>1)</sup> or cuboidal<sup>10)</sup>, but the results of the present investigation agreed only with the latter.

#### The period of blastomere transformation

Blastomere transformation in rat embryos is said to occur at the 8-cell stage<sup>5,6)</sup>. In the present investigation, however, it occurred at the 16-cell stage. In mouse embryos, blastomere transformation is said to occur at the 8-cell<sup>2)</sup> or at the 16-cell<sup>3)</sup> stage. The present investigation demonstrated that blastomere transformation occurred both at the 8-cell and 16-cell stages even among individual embryos. In rabbit embryos, blastomere transformation has been accepted to occur at the 32-cell stage<sup>1,10)</sup>, however, in the present investigation, the transformed embryos were observed

at the 64-cell stage. It is presumed then that transformation may have occurred toward the end of the 32-cell stage.

#### Junctional complexes of embryos

It is accepted that tight junctions are formed between each group of two transformed blastomeres in any embryos prior to blastocyst formation; that is, it appears at the 8-cell stage in rat embryos<sup>6)</sup>, at the 8-cell<sup>2)</sup>, 16-cell<sup>12)</sup> or morular<sup>11)</sup> stage in mouse embryos, at the morular stage in rabbit embryos<sup>13)</sup>, at the 16-cell stage in sheep embryos<sup>14)</sup>, and at the 32-cell stage in monkey embryos<sup>15)</sup>. Other junctions are said also to be formed between two of any blastomeres in embryos prior to blastocyst formation<sup>2,6,10,13,25,26)</sup>, though such facts have not been studied in hamster embryos. In the present investigation, tight junctions were found to be formed between each group of two transformed hamster blastomeres at the 8-cell stage. It was further clarified that the transformation of blastomeres occurred no sooner than the formation of tight junctions.

#### Compaction of embryos

Compaction has been said to occur at the 8-cell stage in mouse embryos<sup>2)</sup>, at the 16-cell stage in hamster<sup>4)</sup>, pig<sup>17)</sup>, bovine<sup>8)</sup> and monkey<sup>18)</sup> embryos, and at the morular stage in rabbit embryos<sup>16)</sup>. In the present investigation, however, compaction was observed to occur when tight junctions were formed; that is, either at the 8-cell or at the 16-cell stage in mouse embryos, at the 8-cell stage in hamster embryos, at the 16-cell stage in rat embryos, whereas no such phenomenon was observed to occur in rabbit embryos. Compaction may be induced by the formation of tight junctions between each group of two transformed blastomeres, because the formation of tight junctions, the transformation of blastomeres and the compaction of embryos occur in the same period. It was further confirmed that compaction was more remarkable in the embryos, in which transformation of blastomeres occurred at earlier stages while the number of blastomeres was yet smaller.

#### Develoment of mouse embryos *in vitro*

It was ascertained in the present investigation that with mouse embryos, there were two stages

in which transformation took place *in vitro* or *in vivo*; that is, transformation occurred at the 8-cell stage or at the 16-cell stage even among embryos from a dam. Transformed 8-cell embryos appeared 4 hrs earlier *in vitro* than *in vivo*, while transformed 16-cell embryos 8 hrs and transformed 32-cell embryos 4 hrs earlier respectively, and yet blastocysts appeared 4 hrs later *in vitro* than *in vivo*. Bowman and McLaren (1970)<sup>20)</sup> who cultured 2-cell mouse embryos up to blastocysts reported that speed of cleavage up to 65 hrs after ovulation was faster *in vitro* than *in vivo*, then the speed slowed down *in vitro*, agreeing with the present results. The difference in the speed of cleavage between *in vitro* and *in vivo* may have been induced by the different developmental environment.

### References

- 1) Gregory, P. W.: The early embryology of the rabbit, Contr. Embryol. Carnegie Inst., 21: 141, 1930
- 2) Ducibella, T. and Anderson, E.: Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst, Dev. Biol., 47: 45, 1975
- 3) Smith, L. J.: A morphological and histochemical investigation of a preimplantation lethal ( $t^{12}$ ) in the house mouse, J. Exp. Zool., 132: 51, 1956
- 4) Ishida, K.: Appearance of the differentiated 8-cell stage in the process of cleavage of hamster eggs, Jpn. J. Anim. Reprod., 17: 25, 1971
- 5) Izquierdo, L. and Vial, D. J.: Electron microscope observation on the early development of the rat, Cell Tissue Res., 56: 157, 1962
- 6) Dvořák, M.: The differentiation of rat ova during cleavage, Adv. Anat. Embryol. Cell Biol., 55: 1, 1978
- 7) Hunter, R. H. F.: Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*, Anat. Rec., 178: 169, 1973
- 8) Brackett, B. G., Oh, Y. K., Evans, J. F. and Donawick, W. J.: Fertilization and early development of cow ova, Biol. Reprod., 23: 189, 1980
- 9) Lindner, G. M. and Wright, R. W.: Bovine embryo morphology and evaluation, Theriogenology, 20: 407, 1983
- 10) Hesseldahl, H.: Ultrastructure of early cleavage stages and preimplantation in the rabbit, Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 135: 139, 1971
- 11) Calarco, P. G. and Brown, E. H.: Cytological and ultrastructural comparisons of  $t^{12}/t^{12}$  and normal mouse morulae, J. Exp. Zool., 168: 169, 1968
- 12) Magnuson, T., Jacobson, J. B. and Stackpole, C. W.: Relationship between intercellular permeability and junction organization in the preimplantation mouse embryo, Dev. Biol., 67: 214, 1978
- 13) Hastings, R. A. and Enders, A. C.: Junctional complexes in the preimplantation rabbit embryo, Anat. Rec., 181: 17, 1975
- 14) Calarco, P. G. and McLaren, A.: Ultrastructural observations of preimplantation stages of the sheep, J. Embryol. Exp. Morph., 36: 609, 1976
- 15) Hurst, P. R., Jefferris, K., Eckstein, P. and Wheeler, A. G.: An ultrastructural study of preimplantation uterine embryos of the rhesus monkey, J. Anat., 126: 209, 1978
- 16) Adams, C. E.: Egg-uterus interrelationships, Adv. Biosci., 4: 150, 1970
- 17) Papaioannou, V. E. and Ebert, K. M.: The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophoectoderm and inner cell mass of blastocyst *in vivo* and *in vitro*, Development, 102: 793, 1988
- 18) Lewis, W. A. and Hartman, C. G.: Early cleavage stages of the egg of the monkey (*Macacus rhesus*), Contr. Embryol. Carnegie Inst., 24: 187, 1933
- 19) Levy, J. B., Johnson, M. H., Goodall, H. and Maro, B.: The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis, J. Embryol. Exp. Morph., 95: 213, 1986
- 20) Bowman, P. and McLaren, A.: Cleavage rate of mouse ova *in vivo* and *in vitro*, J. Embryol. Exp. Morph., 24: 203, 1970
- 21) Gates, A. H.: Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In Methods in Mammalian Embryology, Daniel, J. C. Jr. ed., 64, W. H. Freeman and Company, 1971
- 22) Harvey, E. B., Yanagimachi, R. and Chang, M. C.: Onset of estrus and ovulation in the golden hamster, J. Exp. Zool., 146: 231, 1961
- 23) Pederson, E. S.: Histogenesis of lutein tissue of the albino rat, Am. J. Anat., 88: 397, 1951
- 24) Austin, C. R. and Braden, A. H. W.: Time relations and their signification in the ovulation and penetration of eggs in the rats and rabbits, Aust. J. Biol. Sci., 7: 179, 1954
- 25) Whittingham, D. G.: Culture of mouse ova, J. Reprod. Fert. Suppl., 14: 7, 1971
- 26) Ducibella, T., Albertini, D. F., Anderson, E. and Biggers, J. D.: The pre-implantation mammalian embryo: characterization of

intercellular junctions and their appearance during development, Dev. Biol., 45: 231, 1975

### 胚盤胞形成過程における 変形胚の出現と形態

新潟大学自然科学研究科

四谷伊公子

新潟大学農学部家畜生産学教室

新村末雄 石田一夫

胚盤胞形成過程にあるハムスター、ラット、マウスおよびウサギの変形割球を持つ分割胚について、形態変化と出現頻度を調べた。

1. 分割胚の割球は、ハムスターでは8細胞期(排卵後65時間)、ラットでは16細胞期(89時間)、マウスでは8細胞期(59時間)または16細胞期(63時間)に外側に位置するものが扁平に、ウサギでは64細胞期(60時間)に外側のものが立方形に変形した。

2. 変形割球間における閉鎖帯の形成は、どの動物の分割胚においても、外側割球の変形と同じ時期に初めて認められた。

3. 胚のコンパクションは、ハムスター、ラットおよびマウスでは割球の変形と同じ時期に起こったが、ウサギでは観察されなかった。コンパクションの程度は割球の変形時期が早い胚ほど著しかった。

4. 培養マウス胚のコンパクションと割球の変形は、*in vivo* の胚と同様、8細胞期または16細胞期に起こった。

(受付: 1991 年 5 月 7 日)

## 黄体化無排卵卵胞 (LUF) を有する不妊症例に対する 超音波ガイド下卵胞穿刺 (NP) の効果

Effects of Ultrasound-guided Follicular Needle Puncture (NP) on  
Infertility with Luteinized Unruptured Follicle (LUF)

社会保険徳山中央病院産婦人科

山下 三郎      道岡    亨      嶋村 勝典  
Saburo YAMASHITA    Toru MICHIOKA    Katsunori SHIMAMURA

小林 正幸      成松 昭夫      伊東 武久  
Masayuki KOBAYASHI    Akio NARIMATSU    Takehisa ITO

Division of Obstetrics and Gynecology  
Tokuyama Central General Hospital Tokuyama 745, Japan

黄体化無排卵卵胞 (LUF) を合併する排卵誘発剤使用中の長期不妊症例に対して経陰的に超音波ガイド下卵胞穿刺 (NP) を行いその臨床的有用性を検討した。

排卵誘発剤使用群 17 名, 36 周期につき, 卵胞发育, 内分泌的背景を超音波断層法, 血中・尿中ホルモン測定により検討し, これを自然排卵群 17 名, 36 周期と比較した結果, LH カラー陽性化後 24 時間以上卵胞存続の認められる症例は, いわゆる LUF とほぼ同様の endocrinological profile を有していると考えられたため, これを LUF と規定した。排卵誘発剤使用中の不妊症患者のうち LUF と判定された 19 名 (原発性不妊症 11 名, 続発性不妊症 8 名) に対し, 連続して最長 4 周期にわたり NP 治療を行った結果, 19 例中 10 例 (52.6%) に妊娠例を認めた。内訳は, NP 施行周期には, 妊娠例は認めなかったが, それ以後の排卵周期—NP 後第 2 周期 6 名 (60.0%), 第 3 周期 2 名 (20.0%), 第 4 周期 2 名 (20.0%)—に妊娠例が認められた。その mechanism は不明だが, ①NP 療法により卵胞消失までの時間が短縮すること, ②NP を加えた卵巣と同側卵巣より, 次周期に自然排卵が高率 (90.0%) に認められる事より, NP 療法は, 卵巣表面の膜成分に対して局所的に何らかの改善をもたらすのではないかと推定できる。LUF に対する治療法は確立していない現在, 本法は臨床的に有用な方法と思われる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 83-88, 1992)

### 緒 言

正常婦人においても黄体化無排卵細胞 (LUF) は低頻度かつ散発的に発症する事が kerin<sup>1)</sup>らを始め多くの報告者によりなされている<sup>2~8)</sup>。一方, 長期不妊症例においては, クロミフェン (CL), プロモクリプチン (BRC), hMG, hCG 等の排卵誘発剤の使用頻度も多くなり, それが 2 次的に視床下部—下垂体—

卵巣系に変調を与え, その結果, LUF などの発症頻度が高まり, 新たな不妊原因となる可能性も考えられる<sup>2)</sup>。そこで今回, LUF に対する治療法として, 超音波ガイド下に卵胞穿刺 (NP) を行い, 機械的刺激により排卵を促進し受精のタイミングを改善する事で妊娠率の向上が可能か否かについて検討した。

表1 Needle Puncture の timing を決めるための Preliminary Study (Mean  $\pm$  S.E.)

|          | 例数<br>(人)<br>周期数<br>(周期) | 年 齢<br>(歳)     | 不妊期間<br>(年)   | LH カラー(+) から排卵までの日数<br>(日) | LH カラー(+) から24時間以内の排卵 | 排卵日<br>(月経周期)  |
|----------|--------------------------|----------------|---------------|----------------------------|-----------------------|----------------|
| NO DRUGS | 17/36                    | 29.2 $\pm$ 1.8 | 4.2 $\pm$ 0.3 | 1.3 $\pm$ 0.1              | 26/36<br>(72.2%)      | 14.5 $\pm$ 0.4 |
| BRC      | 5/8                      | 32.0 $\pm$ 1.0 | 4.7 $\pm$ 0.8 | 1.5 $\pm$ 0.2              | 4/8<br>(50.0%)        | 13.9 $\pm$ 0.6 |
| CL       | 3/4                      | 32.0 $\pm$ 4.0 | 4.0 $\pm$ 0.6 | 1.5 $\pm$ 0.3              | 2/4<br>(50.0%)        | 14.8 $\pm$ 0.8 |
| CL+BRC   | 9/24                     | 30.3 $\pm$ 0.8 | 4.3 $\pm$ 0.4 | 1.7 $\pm$ 0.3              | 12/24<br>(50.0%)      | 15.0 $\pm$ 0.2 |

## 対象・方法および結果

(I) 自然排卵周期および排卵誘発剤使用例による排卵時期の比較検討—NPのタイミングを決定するための preliminary study—

## ①方法

不妊症治療としてのNPの目的は、LH surge から排卵～受精というプロセスを円滑に進め自然排卵周期の状況に近づける事にあると考えられる。そこで、表1に示すように、自然排卵を有する患者 (NO DRUGS 群) 17 名 (36 周期) および、排卵誘発剤使用群 (BRC, CL, CL+BRC) に対し、月経周期第5日目 (M5) より、可及的連続的に経膈プローブを用いて卵胞計測を行い、加えてLHカラーを連日午前10時頃の実施した。排卵は、超音波断層法の所見を中心にして確認した。なお、各群の年齢、不妊期間を始めとする background については差を認めていない。

## ②成績

自然排卵群では、LHカラー陽性化から24時間以内に36周期中26周期 (72.2%) に排卵が認められたが、一方排卵誘発剤使用群では、24時間以内に排卵が認められたのは、それぞれ、BRC; 8周期中4周期 (50.0%)、CL; 4周期中2周期 (50.0%)、CL+BRC; 24周期中12周期 (50.0%) と低い割合であった。即ち、これら薬剤使用群では、合計すると36周期中18周期 (50.0%) が24時間以内に排卵したがこの割合は、前述の自然排卵群36周期中26周期 (72.2%) に比して、排卵の遅延傾向 ( $\chi^2 = 3.74$ ,  $0.05 < P < 0.1$ ) が認められた。

一般的にもLHカラー陽性化を確認した時点から、24時間以内に98%の割合で排卵が生じると報告されており<sup>9-11)</sup>、LHカラー陽性時点から24時間後に卵胞存続を認める場合には排卵の遅延と考え、いわゆ

先行周期にてLUF(+)と診断された、

|         |                   |      |
|---------|-------------------|------|
| 原発性不妊症  | 11例               | 計19例 |
| 続発性不妊症  | 8例                |      |
| 年 齢     | 26～36歳(平均31歳)     |      |
| 不 妊 期 間 | 26ヶ月～90ヶ月(平均45ヶ月) |      |
| 治 療 法   | CL + BRC          | 16例  |
|         | CL + BRC + HMG    | 2例   |
|         | HMG               | 1例   |

## 図1 対 象

るLUFになる可能性が大きい。今回の検討でもLHカラー陽性時より24時間後に卵胞を認めるものをLUFとし、直ちに主席卵胞一個に対して超音波ガイド下に卵胞穿刺を行った。

(II) LUF症例におけるNP療法の有効性の検討

## ①対象

図1にNP療法の効果を検討するための研究対象を示す。対象は当院不妊外来に通院している患者のうち、先行周期においてLUFが確認されている原発性不妊症11名、続発性不妊症8名の計19名である。年齢は26～36歳 (平均31歳) で、不妊期間は26ヵ月～90ヵ月 (平均45ヵ月) と長期不妊例が多く含まれている。研究期間中の使用薬剤は、CL+BRC16名、CL+BRC+hMG 2名、hMG 1名であり、研究期間中、最長4周期は使用薬剤を変更せずに follow up した。

## ②成績

検討した19例中10例 (52.6%) に妊娠が認められた。内訳は、図2に示す如くで、NP施行周期には妊娠例はなく、NP後第2周期に10例中6例 (60.0%)、第3周期目に2例 (20.0%)、第4周期目に2例 (20.0%) であった。その経過は、図3に示す如くであり、最初のNPから最長4周期までの治療経過を示した。●はNP周期を、○は排卵周期を、ま

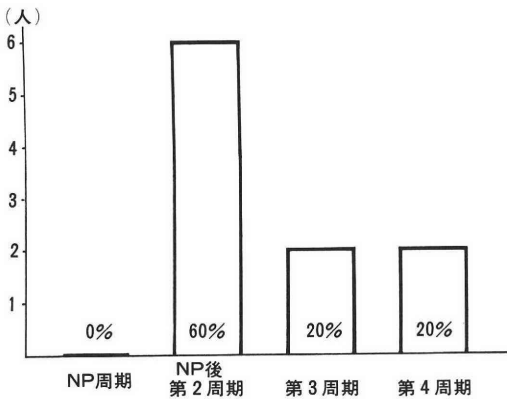


図 2 Needle Puncture 後の妊娠例

|         | 第1周期 | 第2周期 | 第3周期 | 第4周期 |
|---------|------|------|------|------|
| ① K. K. | ●    | ○    | ○    | ○★   |
| ② K. O. | ●    | ○★   |      |      |
| ③ M. K. | ●    | ○★   |      |      |
| ④ K. M. | ●    | ○    | ●    | ○★   |
| ⑤ M. N. | ●    | ○★   |      |      |
| ⑥ Y. M. | ●    | ○★   |      |      |
| ⑦ A. F. | ●    | ○    | ○★   |      |
| ⑧ N. S. | ●    | ○    | ○    | ○★   |
| ⑨ Y. A. | ●    | ○★   |      |      |
| ⑩ A. M. | ●    | ●    | ○    | ○★   |

● NP周期 ○ 排卵周期 ★ 妊娠周期

図 3 妊娠例の経過

表 2 内分泌学的背景 Hormonal Profile (Mean  $\pm$  S.E.)

|                | 排卵前 E <sub>2</sub><br>(pg/ml) | 黄体期<br>(pg/ml)<br>E <sub>2</sub> (Max) | 黄体期<br>(ng/ml)<br>prog (Max) | 卵胞期<br>日数 (days) | 黄体期<br>日数 (days) |
|----------------|-------------------------------|--|------------------------------|------------------|------------------|
| LUF            | 869 $\pm$ 159                 | 319 $\pm$ 43                           | 27.5 $\pm$ 5.7               | 15.1 $\pm$ 0.7   | 14.1 $\pm$ 0.3   |
| LUF (NP周期)     | 897 $\pm$ 137                 | 338 $\pm$ 55                           | 23.8 $\pm$ 2.9*              | 15.2 $\pm$ 0.4   | 14.5 $\pm$ 0.4   |
| 非 NP 周期 (排卵周期) | 916 $\pm$ 116                 | 421 $\pm$ 92                           | 367 $\pm$ 5.5 *              | 16.2 $\pm$ 0.5   | 15.2 $\pm$ 0.3   |

(\* - \* : P<0.05)

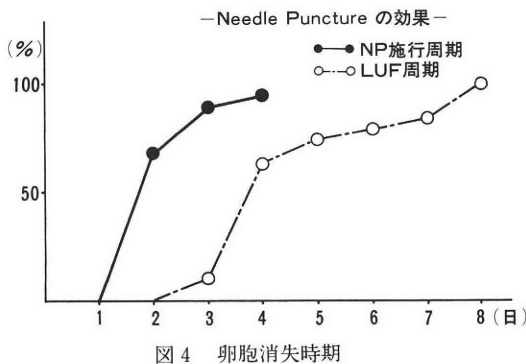


図 4 卵胞消失時期

表 3 Needle Puncture の効果

|                 | 同側排卵       | 対側排卵      |
|-----------------|------------|-----------|
| 妊娠例<br>(N = 10) | 9 (90.0%)  | 1 (10.0%) |
| 非妊娠例<br>(N = 9) | 8 (88.9%)  | 1 (11.1%) |
|                 | 17 (89.5%) | 2 (10.5%) |

殊にNP周期と排卵周期との間に5%の危険率で有意差を認めた。LUFとNP周期は、ほぼ同じホルモン値を示した。

i i) NPの卵胞破裂に与える影響

LUFに対し、NPを加えると一例は翌周期まで卵胞が存続したが、その他の症例については全例卵胞消失がみられた。卵胞消失の日をLHカラー陽性後の日数で示すと2日後に18例中13例(72.2%)、3日後に18例中4例(22.2%)、4日後に1例(5.6%)に卵胞消失が認められた。これを累積曲線として図4に示す。LUF周期では、3日後に2例(10.5%)、4日後に12例(62.3%)と卵胞消失時期が遅延し、全例の卵胞消失までにLHカラー陽性化後8日間を要した。これらの成績はNPにより卵胞消失が促進される事を示している。

た☆は妊娠周期を示す。症例⑩を除く9例ではNP施行の翌周期に排卵周期となり、このうち5例が妊娠した。

### ③NPの基礎的検討

#### i) Hormonal profile

研究対象19名につき、先行周期におけるLUF周期、研究期間中のNPおよび排卵周期について表2に示す。

項目は排卵前E<sub>2</sub>、黄体期中期におけるE<sub>2</sub>およびprogの最大値、卵胞期日数、黄体期日数である。これらのdataにおいて、黄体期progの最大値はLUFおよびNP周期で、排卵周期のそれに比して低く、

次に、19例の対象例を妊娠例10名、非妊娠例9名に分類して、NPを加えた翌周期の自然排卵が左右いずれの側から生じたかを検討し、それが前周期にNPを行った側と同側か、または反対側かをTable 3に示した。両群とも同側卵巣からの排卵が妊娠群で90.0%、非妊娠群で88.9%と高率に認められた。即ち、NPを加える事により卵巣表面に何らかの影響を与え、そのため翌周期にNPを加えた卵巣と同側から排卵が起こり易くなるのではないかと推測される。

### 考 察

黄体化非破裂卵胞(LUF)は、1975年Jewlewicz<sup>12)</sup>が、clomipheneによる排卵誘発療法施行時に満足すべき妊娠率が得られない事に対してそれを説明するための仮説として本症を提唱した事にはじまり、最近では不妊症との関連まで諸家によりその診断基準、発症頻度、病因論等々、さまざまな角度からの研究報告がなされている<sup>1-8)</sup>。LUFの診断は、日常臨床的には超音波断層法を用いて行われる事が多く<sup>1-8)</sup>、最近、戸田<sup>2)</sup>により詳細な報告が行われている。その中で、排卵誘発法とLUFとの関係が検討され、clomiphene+hCG、またはBRC+hCG等の組み合わせにより、治療を行う場合にそれぞれ51.9%、13.5%のLUFの発症頻度をみたと報告されている。長期不妊症例においては上記排卵誘発剤の使用頻度が多くなり、それにより二次的にLUFが生じ<sup>2,13)</sup>これが新たな不妊原因となっている可能性も否めない。そこでわれわれは、当院不妊外来に通院中の長期不妊症例の中で、前述のCL、BRC、hMG、hCGなどの使用例および、薬剤無投与にて自然排卵を認める症例において、LHカラー陽性確認後、何日目排卵が完了するかを検討した。その結果、表1に示す如く、排卵誘発剤使用群では自然排卵群に比してLHカラー陽性化後排卵までの日数は長くなる症例が多く、かつ、殊にLHカラー陽転後24時間以内に排卵が完了する周期は、自然排卵群の方が薬剤使用群に比して多い傾向を認めた( $\chi^2=3.74$ ,  $0.05 < P < 0.1$ )。これらのdataは排卵誘発剤の使用群では卵胞成熟徴候の後に排卵刺激(LH surge)が出現しても排卵終了までにより多く時間を要し、その間に卵胞内での卵の過熟が起こり得る事を唆している。排卵の遅延を特徴とする病態は、臨床的には遅延排卵<sup>14,15)</sup>が知られているが、遅延排卵は卵胞成熟は充分認められるものの、LH surgeの出現の遅れにより二次的に発症し得るものと考えられており、従ってLH surgeの出現のtimingに関して、遅延排

卵とLUFは区別されるものであろう。

排卵機構に関しては不明な点が多いが、岡村<sup>16)</sup>によると排卵予定卵胞内では、LH surgeを契機として実に多彩な現象が一条乱れる事なく一定の順序で精妙に組み合わされて進行し、その最後の過程として排卵が起こるものと考えられている。また卵放出の前段階として卵胞壁頂部(壁)の解離が生じる事が必要であるが、これに関与する因子として、①卵胞壁毛細血管の基底部分における血流増加と透過性の亢進、頂部における血流低下と血栓形成、②卵胞壁頂部の排卵酵素活性、③卵胞壁基底部分の収縮性、④一定に保たれた卵胞内圧が考えられる。LUFはこれらの因子のいずれかに障害が起こり生じるものと思われるが、最近の報告では、外性子宮内膜症患者や既往手術歴を有する不妊患者にLUFが多い事が明らかにされており<sup>2)</sup>、前述①~④の因子以外にも卵巣表面の膜構造自体に変化が生じ、いわゆる器質的な原因により、LUFが発症する可能性が考えられる。我々のNPによるLUFの治療は、卵胞局所の異常による器質的排卵障害に対して機械的に排卵を促すことを目的としたものである。従来、NPによるLUFの治療を行ったという報告は少ないが、その中で、加藤<sup>17)</sup>は7例のLUFに対して機械的卵巣卵胞穿刺を行い、このうち4例(57.1%)に妊娠例を認めたと報告し、そのmechanismは不明だが本法は、その他にPCOの楔状切除に代わり得る可能性があるとして報告した。また戸田<sup>18)</sup>もPCO症例に対して超音波ガイド下に卵胞穿刺・のう胞液の吸引、排除を行う事により高い有効性を報告している。今回我々の行ったNPのtimingについては、LHカラー陽性化後24時間以上を経過後卵胞存続を認める場合に行うものとしたが、果たしてそれで良かったのかという問題点と同時に、それら症例はLUFであったのか、という疑問が生じる。しかし、我々は、表2に示すdataにより、NP群はLUFとほぼ同様の内分泌学的所見を示し、それらは自然排卵周期とは異なっている事を明らかにした。その結果、LHカラー陽性化後24時間経過してなお卵胞存続の認められる症例は、ほぼLUFとみなして差し支えないものと考えている。以上より、LUFのprospectiveな診断は可能であろうと考えられる。

次に、何故NPをdominant follicleに加える事で妊娠率が向上するのか、という点について考察した。図4にLUFの場合の卵胞消失時期、およびLUFに対してNPを加えた場合(NP施行周期)に卵胞消失が明らかに早くなる事を示した。また表3に示すように、妊娠例・非妊娠例併せて19例中17例が

NPの翌周期にNPを行った卵巣と同側卵巣から排卵する事が認められ、NPの効果は、局所的なものである事が確認された。これから導かれる仮説は、LUFにおいて、dominant follicleに加えられたNPは機械的刺激で排卵をおこす事、および翌周期にNPを加えた卵巣と同側の卵巣から排卵をおこし易くする事、などによりNP後の翌周期に妊娠が成立し易くなる事が示唆される。一方、何故NPを加えたその周期には妊娠例が得られないのかという問題については表2に示す如くNP周期では、自然排卵周期に比して黄体期の機能低下が関与しているものと思われる。即ち、黄体期の血清プロゲステロン値が有意に低く妊娠に不都合な環境が形成されており、このことよりNP周期の如く、単に排卵を機械的に早くするだけでは妊娠に結びつかない事を示唆している。LUFについて未だその原因、病態生理等が明かでなく、治療法についても確定したものはないのが現状だが、今後さらにLUFにおける卵胞内環境の研究および子宮内膜の機能的変化、黄体形成能等についても広く有機的な研究の展開が望まれる。

本論文の要旨は、第35回日本不妊学会一般演題として発表した。

#### 参考文献

- 1) Kerin, J. F., et al.: Incidence of the luteinized unruptured follicle phenomenon in cycling women, *Fertil. Steril.*, 40: 620, 1983
- 2) 戸田稔子：超音波断層法による黄体化非破裂卵胞の研究，日本産科婦人科学会雑誌，42（9）：1195, 1990
- 3) 田中温，他：排卵モニタと採卵，超音波断層法による黄体化無排卵卵胞（LUF）の診断，日本超音波医学会50回，研究発表講演集，P 23, 1987
- 4) Ritchie, W. G. M.: Ultrasound in the evaluation of normal and induced ovulation, *Fertility Sterility*, 43: 167, 1985
- 5) Marik, J. and Hulka, J.: Luteinized unruptured follicle syndrome: A subtle cause of infertility, *Fertility Sterility*, 29: 270, 1978
- 6) Coulam, C. J., et al.: Ultrasonic evidence for luteinization of unruptured pre-ovulatory follicles, *Fertility Sterility* "37巻": 524, 1982
- 7) 佐藤和雄，他：黄体化無排卵卵胞症候群，ホルモンと臨床，32：1175, 1984
- 8) 佐藤和雄：黄体化無排卵卵胞について，日本産科婦人科学会雑誌，38：119, 1986
- 9) 田中温，他：尿中LH検出試薬「オルガノンLHカラー」の排卵時期のモニタリングとしての有用性に関する臨床的検討，産科と婦人科，55：1975, 1988

- 10) 田辺清男，他：尿中LH簡易検出試薬「オルガノンLHカラー」の基礎的ならびに臨床的検討，日本不妊学会雑誌，33：759, 1988
- 11) 高崎彰久，他：尿中LH測定キット「LHカラー」を利用した尿中LHの定量，日本不妊学会雑誌，34：419, 1989
- 12) Jewelewicz, R.: Management of infertility resulting from anovulation, *Am. J. Obstet Gynecol.*, 122: 909, 1975
- 13) 竹内悟，他：黄体化無排卵卵胞症候群，高知市民病院紀要，11：41, 1987
- 14) 佐藤孝道：遅延排卵の卵および妊孕現象に及ぼす影響に関する基礎的研究，日本産科婦人科学会雑誌，30：1647, 1987
- 15) Yamashita, S., et al.: Endocrinological profile and treatment for patients with delayed ovulation, *Jap. J. Fert. Ster.*, 32 (1) : 30, 1987
- 16) 岡村均：排卵時の卵胞破裂機序，産科と婦人科，50：458, 1983
- 17) 加藤修，他：LUFにおけるNeedle Puncture療法，日本不妊学会雑誌，33：923, 1988
- 18) 戸田稔子，他：多嚢胞性卵巣症候群に対する治療的超音波ガイド下卵胞穿刺術による排卵誘発の試み，日本不妊学会雑誌，33：942, 1988

#### Effects of ultrasound-guided follicular needle puncture (NP) on infertility with luteinized unruptured follicle (LUF)

Saburo Yamashita, Toru Michioka,  
Katsunori Shimamura, Masayuki Kobayashi,  
Akio Narimatsu and Takehisa Ito

Division of Obstetrics and Gynecology,  
Tokuyama Central General Hospital  
TOKUYAMA 745, Japan

NP was carried out in patients with long term infertility complicated by LUF who were receiving ovulation-inducing therapy, and the clinical usefulness of NP was evaluated.

As a preliminary study, the follicular development and endocrinological background were examined by means of two-dimensional ultrasonography and measurements of blood and urinary hormone levels in 36 cycles of 17 naturally ovulating subjects and 36 cycles of 17 ovulation-induced subjects. Since the subjects in whom follicles persisted for more than 24 hours after positive conversion of the LH color were considered to have an endocrinological profile similar to that of LUF, this condition was defined as LUF. A protocol of applying NP to this condition was established.

Next, this protocol was carried out in 19 patients with long term infertility under ovulation-induction therapy (11 with primary infertility and 8 with secondary infertility) in 4 consecutive cycles. As a result, pregnancy was established in 10 (52.6%) of the 19 patients, none in the cycle of NP, 6 (60.0%) in the second post-NP cycle, 2 (20.0%) in the third post-NP cycle, and 2 (20.0%) in the fourth post-NP cycle. Although the mechanism of successful fertilization is unknown, NP is considered (1) to shorten the period until the disappearance of folli-

cles and (2) to cause some local improvements in the membrane components on the ovarian surface as suggested by the spontaneous ovulation frequently (90.0%) observed from the stimulated ovary during the period of NP. As the treatment for LUF has not been established today, this procedure, which is technically simple and results in pregnancy within a short period is considered to be of clinically useful.

(受付：1991 年 3 月 18 日)

## 多嚢胞卵巣症候群における血中 testosterone 濃度について—使用 testosterone キットの比較および free-testosterone との関連性について—

### Serum Testosterone Levels in Polycystic Ovarian Syndrome—A Comparison of Testosterone Kits and the Relation with free-Testosterone—

島根医科大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 北尾 学教授)

|                |                   |              |
|----------------|-------------------|--------------|
| 吉 野 和 男        | 高 橋 健 太 郎         | 江 田 芳 美      |
| Kazuo YOSHINO  | Kentaro TAKAHASHI | Yoshimi EDA  |
| 栗 岡 裕 子        | 真 鍋 敦             | 北 尾 学        |
| Hiroko KURIOKA | Atushi MANABE     | Manabu KITAO |

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

血中 testosterone 濃度は測定キットの種類により値が異なり, また高 androgen 血症のより正確な診断のためには free-testosterone の測定が必要である. 今回, 経膈超音波断層法で両側に多嚢胞卵巣 (PCO) が認められた 61 例 (正常月経周期を有する reg-PCO 群, 23 例, 無排卵性月経周期を有する irreg-PCO 群, 38 例) を対象とし, 血中 testosterone を無抽出法である DPC トータルテストステロンキット (T-DPC) と抽出法である testosterone・栄研キット (T-栄研), 血中 free-testosterone を Coat-A-Count Free Testosterone 測定キットを用いて測定した. また, control として, PCO の認められない正常月経周期婦人 16 例を用いた. 結果として, 1) irreg-PCO 群の T-DPC, T-栄研, free-testosterone は control 群に比べて有意な高値であった. 2) control 群より cut off 値 (T-DPC; 0.46ng/ml, T-栄研; 108.7ng/dl, free-T; 1.39pg/ml) を設定し, 異常値を示す割合を見てみると, irreg-PCO 群が reg-PCO 群より高かった. 3) T-DPC, T-栄研の sensitivity はそれぞれ 59.3%, 29.6%, specificity はそれぞれ 76.5%, 88.2% であった. 4) free-testosterone とは T-DPC ( $r=0.626$ ), T-栄研 ( $r=0.442$ ) 共に有意な正の相関関係が認められた. 以上のことより, 血中 testosterone に関して, free-testosterone をより反映しているのは無抽出法であることが示唆された.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 89-92, 1992)

#### はじめに

多嚢胞卵巣症候群 (PCOS) の診断基準は明確に定まっていないのが現状である. PCOS の内分泌学的特徴として, 1) gonadotropin 分泌異常, 2) estrogen 産生異常, 3) androgen 産生異常が主なものであるが, 3) の androgen 産生異常の指標として testosterone 及び androstenedione がその診断学的基準として有用であるとされている<sup>1)</sup>. しかし, 血中 testosterone 濃度は測定キットの種類により値が異なり, また,

血中 testosterone の大部分が結合蛋白と結合し, ごく微量が活性型ホルモンとして存在しているので, 高 testosterone 血症の診断には free-testosterone の測定がより有用である. そこで今回, 血中 testosterone を 2 つの測定キットで測定し, free-testosterone との関係について検討を加えたので若干の文献的考察を加えて報告する.

#### 研究対象及び方法

島根医科大学医学部産科婦人科不妊・内分泌外来

を受診し、経腔超音波断層法で両側に多嚢胞卵巣(PCO)を認めた61例を対象とし、正常月経周期を有するreg-PCO群23例と、無排卵性月経周期を有するirreg-PCO群38例に分類した。また、controlとしてPCOの認められない正常月経周期婦人16例を用いた。そして、正常月経周期の場合は卵胞期初期に、無月経の場合は随時採血し、血中total testosterone, free-testosteroneを以下の測定キットを用いて測定した。1) total testosterone; (i) 無抽出法として、DPCトータルテストステロンキット(T-DPC) (ii) 抽出法としてテストステロン栄研キット(T-栄研), 2) free-testosterone; Coat-A-Count Free Testosterone kit.

### 研究結果

#### 1) 各群のtotal testosterone及びfree-testosterone

表1 各群のtotal testosterone及びfree-testosterone値(mean±S.D.)

|                      | T-DPC (ng/ml)          | T-栄研 (ng/dl)            | free-T (pg/ml)           |
|----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| reg-PCO 群 (n = 23)   | 0.33±0.12 <sup>a</sup> | 73.9±20.5 <sup>a*</sup> | 1.12±0.37 <sup>a**</sup> |
| irreg-PCO 群 (n = 38) | 0.48±0.20 <sup>b</sup> | 94.8±31.7 <sup>b*</sup> | 1.85±0.98 <sup>b**</sup> |
| control 群 (n = 16)   | 0.24±0.11 <sup>c</sup> | 70.5±19.1 <sup>c*</sup> | 0.99±0.20 <sup>c**</sup> |

a-b, b-c, b\*-c\*, a\*\*-b\*\*, b\*\*-c\*\*: p < 0.001

a\*-b\*: p < 0.01

a-c: p < 0.05

表2 PCO群における異常値症例(%)

|             | T-DPC (%) | T-栄研 (%)  | free-T (%) |
|-------------|-----------|-----------|------------|
| reg-PCO 群   | 4 (17.4)  | 1 (4.3)   | 5 (21.7)   |
| irreg-PCO 群 | 20 (52.6) | 11 (28.9) | 22 (57.9)  |

one値: T-DPCはreg-PCO群, irreg-PCO群がcontrol群に比べて有意に高値であった。T-栄研はirreg-PCO群のみcontrol群に比べて有意に高値であった。free-testosteroneはirreg-PCO群のみがcontrol群に比べて有意に高値であった。また、T-

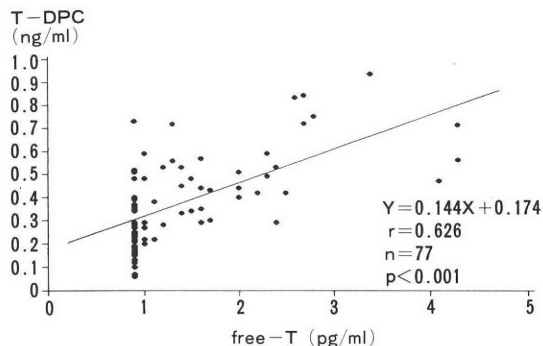


図1 free-TとT-DPCとの関係

DPC, T-栄研, free-testosterone共にirreg-PCO群がreg-PCO群に比べて有意な高値であった(表1)。

2) 正常範囲の設定及び各群の異常値の割合: 表1のcontrol群よりcut off値(mean+2S.D.)をT-DPC; 0.46ng/ml, T-栄研; 108.7ng/dl, free-testosterone; 1.39pg/mlと設定した。異常値を示す割合は、表2に示すように、irreg-PCO群がreg-PCO群に比べて全ての測定キットで高い割合であったが、有意な差ではなかった。

3) free-testosteroneとT-DPC及びT-栄研との相関関係: 図1, 2に示すように、free-testosteroneとT-DPC, T-栄研との間には共に有意な正の相関関係(T-DPC; r=0.626, T-栄研; r=0.442)が認められた。

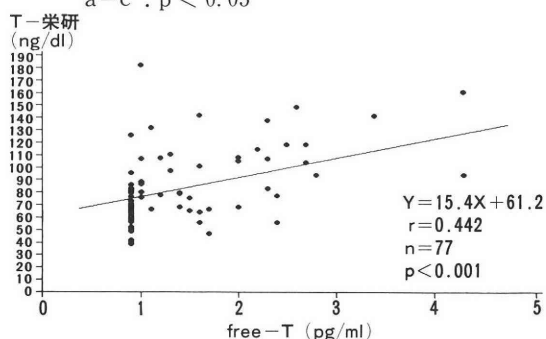


図2 free-TとT-栄研との関係

4) PCO群におけるfree-testosterone値とT-DPC及びT-栄研との関係: (i) free-testosteroneが異常値(>1.39pg/ml, 27例)の場合; T-DPC, T-栄研共に異常値が5例(18.5%), 正常範囲内が8例(29.6%)であり、T-DPCのみ異常値が11例, T-栄研のみが3例であった。以上より、T-DPCのsensitivityは59.3%であり、T-栄研は29.6%であった(図3)。 (ii) free-testosteroneが正常値(<1.39pg/ml, 34例)の場合; T-DPC, T-栄研共に正常値が25例(73.5%), 異常値が3例(8.8%)であり、T-DPCのみが異常値が5例, T-栄

研のみが1例であった。以上より、T-DPCの specificity は76.5%であり、T-栄研は88.2%であった(図4)。

ト(テストステロン・栄研キット)と比較検討した結果、testosterone は経腔超音波断層法で多嚢胞卵巣が認められても、無排卵性月経の場合は正常月経

|                               | T-DPC $\geq 0.46\text{ng/ml}$ | T-DPC $< 0.46\text{ng/ml}$ |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| T-栄研 $\geq 108.7\text{ng/dl}$ | 5                             | 3                          |
| T-栄研 $< 108.7\text{ng/dl}$    | 11                            | 8                          |

図3 PCO群でfree-Tが異常値( $>1.39\text{pg/ml}$ , 27例)の場合のT-DPC, T-栄研の結果

|                               | T-DPC $\geq 0.46\text{ng/ml}$ | T-DPC $< 0.46\text{ng/ml}$ |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| T-栄研 $\geq 108.7\text{ng/dl}$ | 3                             | 1                          |
| T-栄研 $< 108.7\text{ng/dl}$    | 5                             | 25                         |

図4 PCO群でfree-Tが正常値( $<1.39\text{pg/ml}$ , 34例)の場合のT-DPC, T-栄研の結果

### 考 察

慢性的な無排卵と高androgen血症に特徴づけられる多嚢胞卵巣症候群は多面性を持つ症候群である。しかし、すべての患者がandrogen過剰の症状である多毛を呈するわけではない。卵巣より過剰に産生されるandrogenはtestosterone及びandrostenedioneであるが<sup>1)</sup>、多嚢胞卵巣症候群におけるandrogenの指標としては特にtestosteroneが有用であるという報告<sup>2)</sup>がある。testosteroneは多嚢胞卵巣症候群の患者の69%で上昇が認められるという報告<sup>3)</sup>や50%だけが上昇しているという報告<sup>2)</sup>がある。この理由としては、多嚢胞卵巣症候群ではsex hormone-binding globulinが有意に減少し、free-testosteroneが上昇しているためとされている<sup>2)</sup>。

血中testosteroneの測定法としては、従来、抽出法radioimmunoassay(RIA)が用いられてきた<sup>4,5)</sup>。しかし、抽出法RIAキットでは $5\alpha$ -dihydroxytestosterone(DHT)との交叉反応が問題となることが報告されている<sup>6)</sup>。また、近年、経腔超音波断層法の発達により卵巣のより詳細な観察が容易となっている<sup>7)</sup>。そして、経腔超音波断層法で多嚢胞卵巣が認められても、正常月経周期を有する患者があり、多嚢胞卵巣を呈する患者でもその診断学的手段としてtestosteroneを用いる際には注意を要すると思われる。今回、経腔超音波断層法で多嚢胞卵巣が認められた患者のtestosteroneの測定を無抽出法キットとしてのDPC-トータルテストステロンキット(日本DPCコーポレーション)を使用し、抽出法RIAキッ

である場合よりも抽出法、無抽出法共に高い値であった。また、無抽出法が抽出法に比べてfree-testosteroneとより良い相関関係が認められた。さらにfree-testosteroneの値(cut off値= $1.39\text{pg/ml}$ )より抽出法、無抽出法のsensitivity, specificityを比較してみると、無抽出法が抽出法に比べて良好な結果であった。以上のことより、血中testosteroneを測定する場合、測定キットにより正常範囲が異なり、また、free-testosteroneの値をより正確に反映しているのは無抽出法であることが示唆された。

### 文 献

- 1) Kase, N., Kowal, J., Soffer, L. J.: In vitro production of testosterone and androstenedione in normal and Stein-Leventhal ovaries, *Acta Endocrinol.*, 44: 8, 1963
- 2) Lobo, R. A.: Disturbances of androgen secretion and metabolism in polycystic ovary syndrome, *Clinics in Obstetrics and Gynecology*, 12: 633, 1985
- 3) DeVane, G. W., Czekala, N. M., Judd, H. L., Yen, S. S. C.: Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 121: 496, 1975
- 4) 多田耀潔, 大島一洋, 斎藤史郎: ラジオイムノアッセイキットによる血漿テストステロン濃度の測定, *ホと臨床*, 27: 89, 1979
- 5) 宇津宮隆史, 山口省之, 内田徹: <sup>125</sup>I-Testosterone Radioimmunoassay Kit “栄研”の基礎的検討, *ホと臨床*, 29: 1413, 1981
- 6) 田中俊誠, 古田伊都子, 相原稔彦, 田中信一, 佐藤広文, 日下真純, 計良光昭, 林正路, 藤本征一

郎：抗体固相法キット（DPC トータルテストステロン）による血中テストステロン濃度の測定、および使用テストステロン抗体の特異性に関する基礎的検討、ホと臨床 37：961, 1989

- 7) Takahashi, K., Nishigaki, A., Eda, Y., Yamasaki, H., Yoshino, K., Kitao, M.: Transvaginal ultrasound is an effective method for screening in polycystic ovarian disease: Preliminary study, Gynecol. Obstet. Invest., 30: 34, 1990

# **Serum testosterone levels in polycystic ovarian syndrome —A comparison of testosterone kits and the relation with free testosterone—**

Kazuo Yoshino, Kentaro Takahashi,  
Yoshimi Eda, Hiroko Kurioka,  
Atushi Manabe and Manabu Kitao

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

It is known that serum testosterone levels differ using different commercial kits, but that it is essential to have an accurate measurement of free-testosterone in order to diagnose the presence of

high serum androgen levels. In the present study, we have measured testosterone levels using three methods [serum testosterone measured using the non-extraction method DPC total testosterone kit (T-DPC) and using the extraction method testosterone Eiken Kit (T-Eiken) and serum free-testosterone using the Coat-A-Count free Testosterone Kit]. Subjects were 61 cases of polycystic ovarian (PCO) syndrome with bilateral polycystic ovaries detected using transvaginal ultrasound [23 with normal menstrual cycles (reg-PCO) and 38 with anovulatory menstrual cycles (irreg-PCO)]. As controls, 16 subjects with normal menstrual cycles and without PCO were also studied.

We found that: (i) the free-testosterone, T-DPC and T-Eiken levels were significantly higher in the irreg-PCO group than in the normal controls; (ii) using cut-off values from the normal group (T-DPC, 0.46ng/ml; T-Eiken, 108.7ng/dl; free-testosterone, 1.39pg/ml), a larger percentage of patients in the irreg-PCO group than in the reg-PCO group had abnormally high values; (iii) the sensitivity of the T-DPC and T-Eiken methods was 59.3% and 29.6%, and the specificity was 76.5% and 88.2%, respectively; (iv) significant positive correlations were found between free-testosterone and T-DPC values ( $r=0.626$ ) and T-Eiken values ( $r=0.442$ ). These results suggest that the non-extraction method more accurately reflects serum free-testosterone levels.

(受付：1991 年 5 月 27 日)

## 治療成績を基に導かれた bromocriptine の 投与基準に関する検討

### A New Criteria for Choosing a Bromocriptine Therapy

筑波大学臨床医学系産婦人科 (主任: 岩崎寛和教授)

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

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

prolactin (PRL)分泌異常に対する bromocriptine (Br)の投与基準は趨勢に従い諸家が独自に決定している。今回著者らは治療成績から Br の投与基準の再検討を計った。男性因子や卵管因子を認めず、甲状腺機能が正常で下垂体腺腫や多嚢胞性卵巣症候群を否定した 281 例を対象とした。その上で、無作為に Br を投与するしないを決定、最低 3 周期治療経過を観察、Br の投与非投与が排卵誘発・妊娠成立という点で有効だったか否かを確認し、Br 投与有効群と非投与有効群間の血中 PRL 基礎値 (PB) と TRH 負荷後反応頂値 (PP) を特性値とした線形判別関数を求め、Br が有効であった条件を求めた。その結果、排卵誘発で有効であった条件は、 $\log(PB) + 1.96\log(PP) > 11.95$ 、妊娠成立では  $\log(PB) + 4.14\log(PP) > 22.09$  と導かれた。2 式を満たす場合 Br 投与は有効であるとし、これを新基準とした。新基準は既存の基準より偽陽性・偽陰性が少なく有意義な基準であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 93-100, 1992)

#### 緒 言

現在、いわゆる機能性の高 prolactin 血症 (以下 prolactin を PRL と略す。また、以下文中で高 PRL 血症という名称は、機能性の高 PRL 血症を指すものとする) は、第 32 回日本産科婦人科学会総会シンポジウムの提言<sup>1)</sup>を基に血中 PRL 基礎値 (以下単に基礎値と表現する) 30ng/ml (RIA による値、以下同様) 以上をもって診断する趨勢にある。しかしながら、基礎値正常上限については、Kleinberg et al.<sup>2)</sup>は 20~25ng/ml、本邦では、森ら<sup>3)</sup>は 15ng/ml、小田ら<sup>4)</sup>は 10ng/ml かそれ以下とするなど、研究者によって、各々の根拠から異なった数値を提唱しており、実際の高 PRL 血症の診断は、諸家が独自に基準を設定し流動的に扱われている。同様に潜在性高

PRL 血症の診断基準も、TRH 負荷試験による TRH 負荷後血中 PRL 反応頂値 (以下単に反応頂値と表現する) によって定める趨勢にあるものの、診断の基準値については 100~150ng/ml と諸家毎に幅があり、こちらも定説はない。

一方、高 PRL 血症や潜在性高 PRL 血症の治療薬として、bromocriptine (以下 Br と略す) が有効であることは今更言うまでもないことだが、その投与基準となると、診断基準が流動的であるだけに、正式に確立されていない。実際には、諸家が定めた高 PRL 血症や潜在性高 PRL 血症の診断基準に照らして、基礎値  $x$  以上ないし反応頂値  $y$  以上なら投与、といった具合に行なわれている。本学でも、これまで基礎値 20ng/ml 以上ないし反応頂値 100ng/ml 以上とした Br 投与基準を設定してきた。しかし、

この基準に従って診療をしても、Br が期待通りの効果を示さないことがしばしば経験された。

Br の効果が予想を裏切る原因として、著者らは、Br の投与量の設定が適切でないこと<sup>6)</sup>、長期投与に伴う効果の劣化<sup>7)</sup>、非適応疾患に対する投与<sup>8)</sup>などを考え、各々に対する検討を行なってきたが、その都度、投与基準値やその設定の仕方といった基本的な問題に過誤がある可能性を否定できなかった。

そこで、今回、PRL分泌異常による不妊症症例に対する Br の投与基準の再検討を行ない、若干の知見を得たので報告する。

## 対 象

筑波大学付属病院産婦人科不妊外来において、T RH 負荷試験及び LH-RH 負荷試験を施行した 281 症例を対象とした。ただし、甲状腺機能が正常なこと、下垂体腺腫を認めないこと、男性因子・卵管因子を認めないこと、LH-RH 負荷試験で多嚢胞性卵巣型反応を示さないことを条件とした。多嚢胞性卵巣型反応を示す症例を除外した理由は、既に示した通り<sup>8)</sup>、それらが Br の適応症例ではないのではないか、という疑いを著者らが持っているためである。なお、本研究における PRL の各測定値は、IRMA (Immuno Radio Metric Assay) キット導入以前のデータであり、第一 R I 社製の旧 R I A キットを用いて測定した結果である。

## 検討方法

対象に対して、既存の基準に捕らわれず、できる限り無作為に Br の投与・非投与を決定した。治療方針の決定に関して「できる限り無作為」という曖昧な表現を用いたのは、本研究が randomized study を理想としながらも治療に並行して実施された臨床研究であるがゆえに、例えば、30ng/ml を越えるような高い PRL 値を示す無排卵症例を無治療で放置できなかったり、正常な内分泌環境を持ちきちんとした排卵が認められる症例にあえて投薬できない、といった事態が出現し、完全な randomized study とはならなかったからである。この点は、この種の研究の持つ限界であろう。

本研究では、決定した方針に従い最低 3 周期加療した上で、Br を投与したあるいは投与しなかったことが、排卵誘発ないし妊娠成立という点で有効であったか否かを確認した。

Br 投与が有効であった症例群とは、投与前に無排卵であったものが投与後排卵が認められた、あるいは投与により妊娠が成立したと判断される症例を指

し、真に Br を必要とした症例群、つまり、その殆どが PRL 分泌異常群と考えられる症例群である。また、Br を投与しなかったことが有効であった症例群とは、Br 投与を行なうことなく排卵・妊娠が認められた症例を指し、PRL 分泌に異常のない症例群、すなわち正常群と考えられる。従って、この 2 群を判別する条件こそが、真の Br 投与基準であると考えられる。

その条件を導くに当たって、著者らは 1 つの仮説を基に、基礎値と反応頂値を特性値とした線形判別分析法を用いることにした。その仮説とは、「既存の基準が臨床に則さないのは、これら 2 値を独立した値として捉えてきたためである」というものである。

図 1 にシエマを示した。図 1 A の様に高 PRL 血症や潜在性高 PRL 血症は別個の病態であり個々に診断を下すという理解が従来のものである。この理解から生まれた既存の基準が臨床に則しないと判断した。そこで、図 1 B の様に、基礎値と反応頂値は常に対応のある 2 値で強い関連を持っていると考え、高 PRL 血症と潜在性高 PRL 血症が渾然一体と、PRL 分泌異常として存在しているという理解に改めた。この様に考えると、PRL 分泌異常群を正常群と判別するには、基礎値いくつ以上、ないし反応頂値いくつ以上という条件では不適切であることがわかる。この 2 群を判別するためには、基礎値

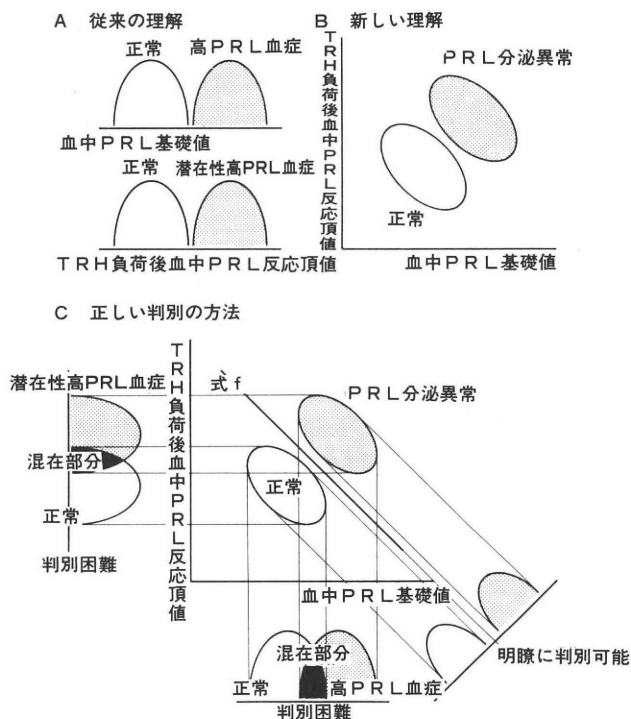


図 1 PRL分泌異常の診断

と反応項値によって定義される条件 (図1 Cにおける式 f) が必要である。

線形判別分析法は、まさしくこの判別式を求める方法であり、いくつかの特性値を基に対象となる2群を有意に判別する線形関数を求める統計学的手法の一つである。

こうして導いた判別式による成績と、既存の基準によって分類した場合の成績とを比較検討し、検討方法を考慮するにあたり発端となった著者らの仮説につき考察を加えることにした。

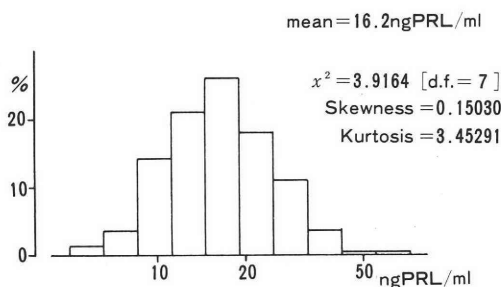
### 成 績

データの解析に入る前に、各特性値の数値分布を確認した。使用する線形判別分析は、パラメトリカルな統計学的手法であるので、各特性値が正規分布することを前提条件として求めている。分布の検定には、既に示した如く<sup>5)</sup>、 $\chi^2$ 適合度検定と、尖度・歪度の検定を用いた。結果、基礎値も反応項値もほぼ対数正規分布で近似できることがわかった。各値の分布図と、対象全例の散布図をそれぞれ図2・3に示した。

ちなみに今回の対象の各値の平均値と95%信頼区間は、

基礎値 : 平均 16.2ng/ml

血中PRL基礎値の分布



TRH負荷後血中PRL頂値の分布

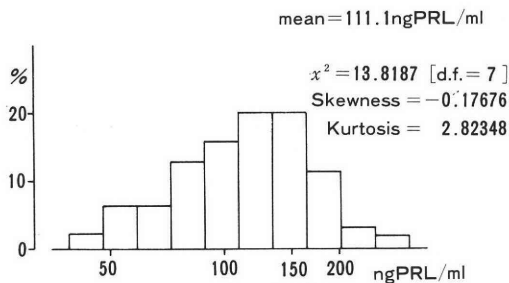


図2 各値の数値分布

信頼区間 7.1-36.8ng/ml

反応項値: 平均 111.1ng/ml

信頼区間 49.5-249.1ng/ml

であった。

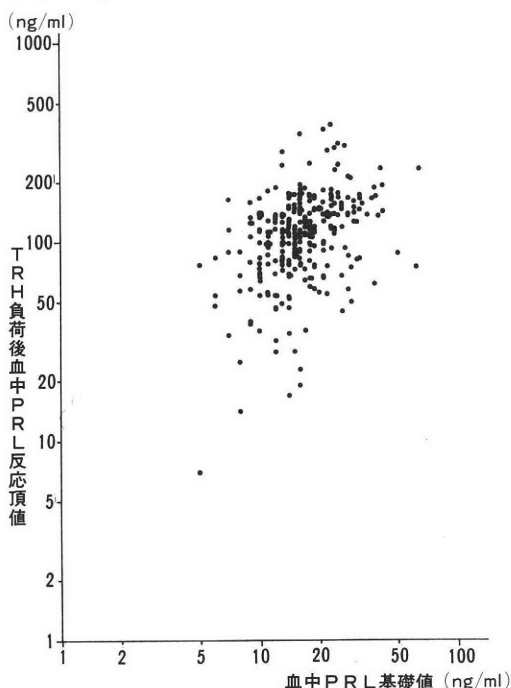


図3 対象全例の散布図

表1 対象内訳

|          |              |
|----------|--------------|
| Br 投与群   | 121例 (43.1%) |
| 投与前有排卵症例 | 52例          |
| 投与前無排卵症例 | 69           |
| 排卵誘発成功例  | 62 (89.9%)*  |
| 妊娠成立     | 45 (37.2%)   |
| Br 非投与群  | 160例 (56.9%) |
| 投与前有排卵症例 | 79例          |
| 投与前無排卵症例 | 81           |
| 排卵誘発成功例  | 57 (70.4%)*  |
| 妊娠成立     | 66 (41.3%)   |
| 合 計      | 281例         |

(\*...p < 0.005)

対象の内訳を表1に示した。対象281例中、Brを投与したのは121例であった。この内、治療前に無排卵であったのは69例であり、この69例中62例で排卵誘発に成功した。この62例を排卵誘発においてBr投与が有効であった症例群とした。また、Brを投与した121例中妊娠は45例に成立した。この45例を妊娠成立においてBr投与が有効であった症例群とした。なお、妊娠成立にBrが有効であったか否かの

表2 誤判別率一覧

|                | 式①                   | 式②                   |    |
|----------------|----------------------|----------------------|----|
| 計算上の誤判別率       | 29.5%                | NS 26.1%             | NS |
| internal check | 31.9%                | 34.2%                |    |
| external check | (29.5%) <sub>A</sub> | (34.5%) <sub>A</sub> |    |
|                | (32.8%) <sub>B</sub> | (37.7%) <sub>B</sub> |    |

NS...Not Significant

判定においては、Br 投与以外の要因で妊娠したと考えられるもの、例えば通水周期の妊娠例などは卵管因子保有例として、対象から除外した。

一方、Br を投与しなかった 160 例では、治療前に無排卵であった 81 例中 57 例で排卵誘発に成功し、160 例中 66 例に妊娠が成立した。これらを Br を投与しなかったことが排卵誘発および妊娠成立に有効であった症例群とした。

単純に Br 投与群・非投与群間で排卵率・妊娠率を比較すると、排卵率は Br 投与群が有意に高い ( $P < 0.005$ ) が、妊娠率に有意な差はなかった。

この対象を基に、Br 投与が排卵誘発に有効であった条件、および妊娠成立に有効であった条件を求めた。

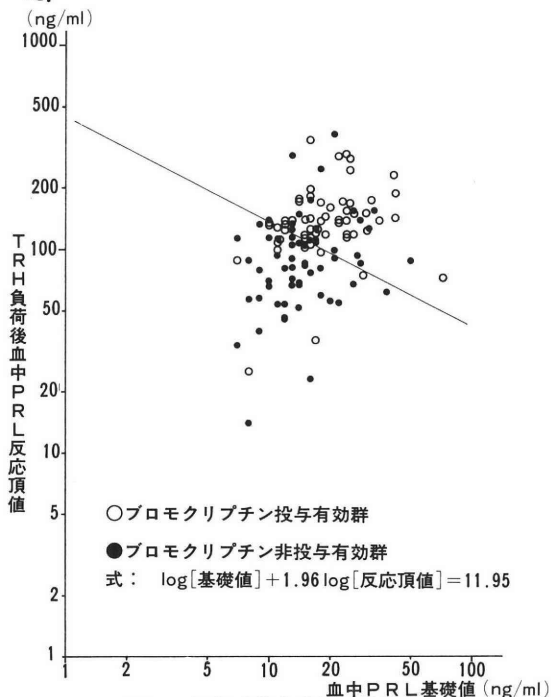


図4 排卵誘発成功例の判別式

まず、排卵誘発という点で、投与が有効であった 62 例と、投与しなかったことが有効であった 57 例に対して線形判別分析を行なった。その結果、危険率  $P < 0.005$  で、

$\log [\text{基礎値}] + 1.96 \log [\text{反応頂値}] > 11.95 \dots \dots \textcircled{1}$   
を満たす場合、Br 投与が有効であるとの結果を得た。ただし、この条件を満たしても実は Br を投与しないことが望ましいという判断過誤、つまり誤判断の確

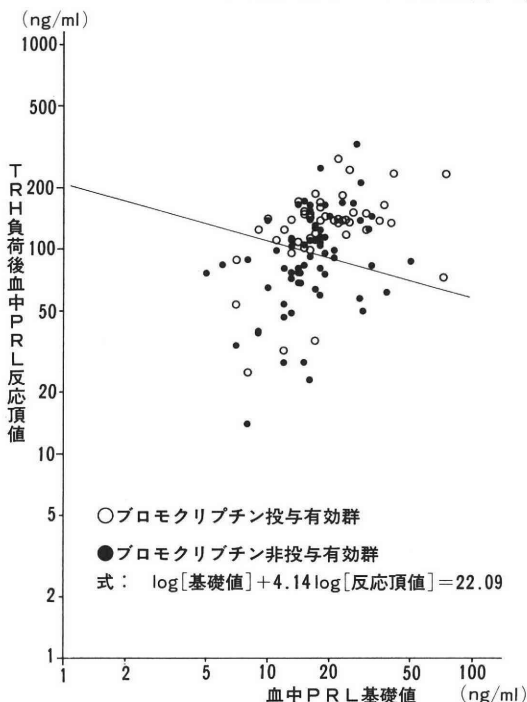


図5 妊娠成立例の判別式

率は、計算上 29.5% と導かれた (図 4)。

次に、妊娠成立という点で、投与が有効であった 45 例と、投与しなかったことが有効であった 66 例に対して線形判別分析を行なった。その結果、危険率  $P < 0.005$  で、

$\log [\text{基礎値}] + 4.14 \log [\text{反応頂値}] > 22.09 \dots \dots \textcircled{2}$   
を満たす場合、Br 投与が有効であるとの結果を得た。この場合の誤判別率は計算上 26.1% と導かれた (図 5)。

今回の目的の第一は、臨床 Br 投与が有効になる条件を求めることであった。従って、求める新しい Br の投与基準とは、Br を投与することにより、排卵誘発においても妊娠成立においても有効となる基準であることが必要である。つまり、「T R H 負荷試験における血中 P R L 基礎値ならびに反応頂値が式①②を同時に満たす場合に Br の投与は有効である」が求めた条件である。(図 6) 以下この条件を新基準と呼称する。

最後に、新基準と既存の基準の比較を行なった。比較した既存の基準とは、

(1) 既存の本学の基準：すなわち、基礎値 20ng/ml 以

表3 各投与基準の比較

|   | 感 度   | 特異度     | 正診率      |
|---|-------|---------|----------|
| 新 基 準   | 79.5% | 62.1% ※ | 69.6% NS |
| 既存の本学基準<br>(基礎値 $\geq 20\text{ng/ml}$ , 反応頂値 $\geq 100\text{ng/ml}$ )             | 88.5  | 45.5    | 64.2     |
| 高 PRL 血症診断基準*に基づく基準<br>(基礎値 $\geq 30\text{ng/ml}$ , 反応頂値 $\geq 150\text{ng/ml}$ ) | 39.7  | 81.2    | 63.1     |

\*…日本産科婦人科学会提唱他 ※… $p < 0.05$  †… $p < 0.01$  ‡… $p < 0.001$

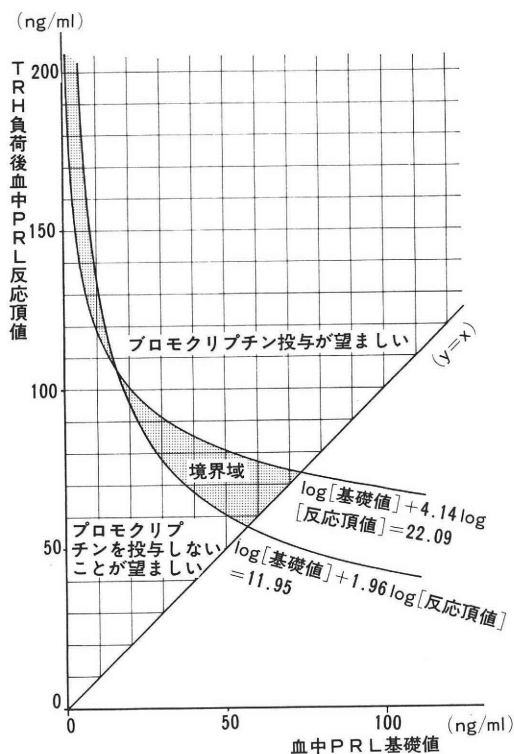


図6 新基準

上ないし、反応頂値  $100\text{ng/ml}$  以上で Br を投与する。

- (2) 日本産科婦人科学会の提唱した高 PRL 血症・潜在性高 PRL 血症の診断基準を基にした基準：すなわち、基礎値  $30\text{ng/ml}$  以上ないし、反応頂値  $150\text{ng/ml}$  以上で Br を投与する。  
の2つとした。

比較は、3つの検査法の比較ということになるので、本研究対象を用いた場合の、それぞれの感度、特異度、正診率の比較によって行った。表3に結果を示したが、感度と特異度に有意な差があることが判明した。感度が高いものの特異度が低いのは偽陽性が、特異度が高いものの感度が低いのは偽陰性が増えることになる。その点から考えても、また、統計学的な有意差はなかったが正診率から考えても、

新基準が最も優れた基準であることが予想される。従って、PRL 分泌異常に対して Br を投与するにあたっては、新基準を採用して検討することが有意義であると結論した。

## 考 察

### 1. 新基準の信頼性に関する検討

まず初めに、今回導いた各判別式が信頼の置けるものか否かを検討した。

判別式は、誤判別率、すなわち集合Aと集合Bを判別する式fによってある要素xを判別した際、集合Aに属すると判断したにもかかわらず実際には集合Bに属するという過誤を生じる確率に、どれだけの信頼が持てるものかを明確にしておかねば、実際に使用するには難がある。

誤判別率の確認の方法には、判別式を導いた標本で実際に誤判別率を確認する internal check 法と、新たな標本に適用した場合の誤判別率を確認する external check 法とがある。こうして確認された各々の誤判別率と、判別式を導くにあたり算出される計算上の誤判別率とを比較して、信頼が置けるか否かを検討し、ひいては信頼の置ける判別式であるか否かを判定することになる。external check 法は、標本数などから制限を受けることが多いこともあり容易ではなく省かれることも多いが、internal check 法での誤判別率は実際の誤判別率より低く見積もられることが多いので、ぜひとも必要な確認である。そこで今回著者は、対象を無作為に2分しそれぞれで判別式を求め、互いの標本で external check 法を実施し、元の判別式における誤判別率と比較するという方法を取ることにした。

以下にその経過と結果を示す。

#### i 計算上の誤判別率

前述した如く、式①の計算上の誤判別率は  $29.5\%$ 、式②の誤判別率は  $26.1\%$  であった。

#### ii internal check 法により導いた誤判別率

式①を導いた標本を実際に式①で判別してみると、誤判別率は、 $31.9\%$  であった。

同様に式②を導いた標本を実際に式②で判別してみると、誤判別率は34.2%であった。

iii external check 法により導いた誤判別率

(1)対象を無作為にA群 (n=138) とB群 (n=143) に2分した。

(2)A群のデータを用いて同様に判別式を求めた。排卵誘発に有効な条件 (①<sub>A</sub>) は、

$$\log [\text{基礎値}] + 7.62 \log [\text{反応値}] > 38.29 \quad (P < 0.025)$$

妊娠成立に有効な条件 (②<sub>A</sub>) は、

$$\log [\text{基礎値}] + 50.5 \log [\text{反応値}] > 237.2 \quad (P < 0.1)$$

と導かれた。

(3)B群のデータを用いて同様に判別式を求めた。排卵誘発に有効な条件 (①<sub>B</sub>) は、

$$\log [\text{基礎値}] + 1.49 \log [\text{反応値}] > 9.775 \quad (P < 0.005)$$

妊娠成立に有効な条件 (②<sub>B</sub>) は、

$$\log [\text{基礎値}] + 1.99 \log [\text{反応値}] > 12.10 \quad (P < 0.025)$$

と導かれた。

(4)B群の排卵誘発および妊娠成立に成功した症例のデータを①<sub>A</sub>, ②<sub>A</sub>を用いて判別してみると, ①<sub>A</sub>の誤判別率は29.5%, ②<sub>A</sub>の誤判別率は34.5%であった。

(5)A群の排卵誘発および妊娠成立に成功した症例のデータを①<sub>B</sub>, ②<sub>B</sub>を用いて判別してみると, ①<sub>B</sub>の誤判別率は32.8%, ②<sub>B</sub>の誤判別率は37.7%であった。

#### iv 各々の比較

各値を表2に再掲した。 $\chi^2$ 検定により、それぞれの値に有意な差はないことが判明したので、式①および式②の誤判別率には信頼が置けると言ってもよい事が判明した。従って、判別式①②はいずれも信頼のおける判別式であると言える。

#### 2. データのバイアスの程度の把握

方法の項でも述べたが、本研究は完全には randomized study になっていない。治療方針の選択に際して治療担当医の意志が介在している。従って、得られたデータにバイアスが掛かっていることが十分考えられる。つまり前項で、導いた式には信頼が置けることが判明したが、この式を導くにあたって使用したデータに信頼が置けないのでは、それを使用した判別そのものに信頼が置けるかに疑問が残る。

そこで、集合Aを「Br投与が有効であった症例群」と「Br非投与が無効であった症例群」の和集合、集合Bを「Br非投与が有効であった症例群」と「Br投

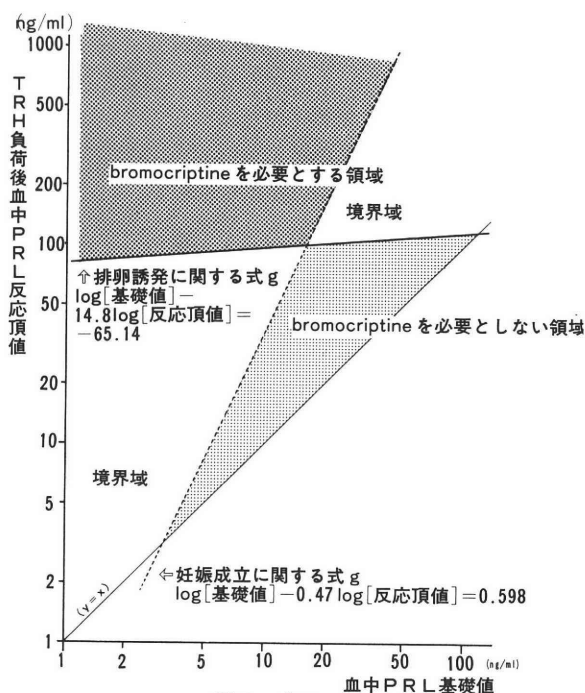


図7 式g

bromocriptine投与が有効と判別される領域に関する比較 (ng/ml)

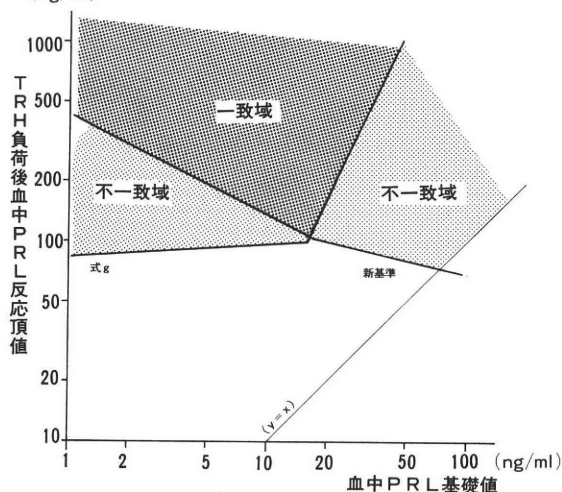


図8 新基準と式gの比較

与が無効であった症例群」の和集合と定義し、集合AとBを判別する判別式gを求め、新基準と比較することにした。純粋に、集合AはBrを必要とする群、集合BはBrを必要としない群と考えれば、データに掛かったバイアスが小さければ、式gと新基準は近似するはずである。

計算経過は割愛するが、排卵誘発・妊娠成立に関する式gとBr投与が有効と考えられる領域に関する式gと新基準の比較をそれぞれ図7・8に図示した

(注：妊娠成立に関する式gは有意な式ではなかったため点線で図示している)。

図8を見てわかるように、式gと新基準が一致しているとはいえない。この原因は二つ考えられる。第一は、予想外にデータのバイアスが大きかった可能性。第二は、Br投与あるいは非投与が無効であった症例の中に、投与・非投与に拘らず無効であった可能性を持つ症例が存在する可能性。

無作為な投与と思っていても、基礎値・反応頂値の組合せから治療担当医の経験を基に投与・非投与が決定されたケースが多ければ、おのずと結果には偏りが生じてしまい、結局その結果には信頼が置けないということになる。純粋に、Br非投与が無効であった症例がBrを投与していれば有効であったと考えられるなら、今回導いた新基準は使いものにならない基準としか言えないことになる。

しかし、Br投与が無効だったからといって非投与も無効であったかもしれない症例の存在は否定できない。具体的に言えば、ルーチン検査で発見できない卵管の可動性障害などの症例が混入しているなどの可能性を否定できない。ルーチン検査の結果を基に対象を拾っている本研究では、この類の症例を対象から除去するのは不可能である。つまり、治療法選択時に生じたバイアス以外に式gと新基準を一致させない因子が存在しうるのは間違いない。従って一概に、データ選択時に大きなバイアスが掛かったために新基準は無意味な基準であるとは言えない。

しかしながら、新基準を求めるために集めたデータ自体に全幅の信頼が置けないことも事実であり、今回導いた新基準は、暫定的なものとしか言えず、今後とも追試・再検討が必要であることは間違いない。

### 3. 著者らの「仮説」に関する考察

従来確定した投与基準の無かったBrの投与基準の設定を試みた。その結果、著者らの、Brを投与しているにもかかわらず治療効果が上がらないという経験の一因は、これまで著者らが用いてきたBr投与基準に偽陽性が多かったためと判明した。すなわち適応の無いものに投与を行っていた可能性が強いということである。一方、日本産科婦人科学会の提唱している高PRL血症の診断基準に基づいた投与基準では、偽陰性が多いことが判明し、この基準を採用してきた施設では、適応のある症例の見逃しがあったことが疑われる。この問題は、今回著者らが導いた新基準を暫定的に導入することにより、かなりの改善が見込められると思われる。しかし、この問題の根底にある投与基準の設定法、すなわち、診断基準

即投与基準という短絡的な考え方が放置されてきた事が何よりも問題なのではなかろうか。

ある症例が、診断基準に則って、ある病態にあると診断されたからといって必ず治療を要するものとは限らない。軽症か、あるいは全く症状が無ければ治療の必要は無いと考えるのが臨床的には妥当である。PRL分泌異常の場合、その臨床的重症度が血中PRL値に依存しない事は既に報告<sup>9)</sup>した。また、現在提唱されているPRL分泌異常の診断基準は確定的なものではなく、未だ定説はないとも言える。従って、PRL分泌異常に対する治療基準を決定するためには、現状では実際の治療の結果からアプローチをしていく以外に方法は無いと考えられる。

ここで考慮すべきは、集積された治療成績をどう評価するか、という点である。そこで著者らは、検討方法の項でも述べた「仮説」を立てるに至ったのである。この説は、裏返せば、「正しいBr投与基準は、TRH負荷試験の結果得られる基礎値と反応頂値の組合せによって規定されるべきである」と言うことである。この考えは、Peillon et. al.<sup>9)</sup>の潜在性高PRL血症は高PRL血症の前駆状態であるとする説、森ら<sup>3)</sup>の高PRL血症と潜在性高PRL血症は同一の病態ではないかとの推察、そして著者ら<sup>9)</sup>の高PRL血症症例と潜在性高PRL血症症例間にTRHに対する反応やBrに対する反応に差がないことの確認を基礎とし、ホルモンの分泌調節機構の異常とは、静的な基礎分泌の異常と、動的な刺激に対する反応性の異常が表裏一体で存在するはずとの考えから導いた。Brが有効な条件をより生理的に把握しようという目的からであった。

その結果、この「仮説」に従って解析を加えたところ、問題点は残るものの、「仮説」を裏付け、従来の考え方に従った治療方針の決定に比べ、より臨床に即した、より高い治療成績を得られる可能性のある新基準を導くことができた。すなわち、高PRL血症と潜在性高PRL血症という2病態を独立して把握することに誤りがある可能性が高いことが示唆されたと言える。

「仮説」が正しい可能性が生まれたとは言え、PRL分泌異常の診断基準は依然闇の中である。臨床的には優秀な治療基準があれば治療という面では事足りる。しかし、その治療基準の理論的な裏付けともなる適応疾患の診断基準が蔑ろになっていてはやはり問題である。PRL分泌異常の的確な診断法と、高PRL血症と潜在性高PRL血症の関連については、今後とも検討が続いていくことであろう。その過程で、今回提唱した「仮説」が有意義であること

を期待する。

(本論骨子は、第 34 回日本不妊学会総会、および第 42 回日本産科婦人科学会総会において発表した)。

## 文 献

- 1) 倉智敬一：プロラクチンとリプロダクション，日産婦誌，32：1235，1980
- 2) Kleinberg, D. L., Noel, G. L., Frantz, A. G.: Calactorrhea: A study of 235 cases, including 48 with pituitary tumors, N. Eng. J. Med., 295: 589, 1977
- 3) 森 宏之, 松岡 良, 合阪幸三, 木川源則: 正プロラクチン血症黄体機能不全の病態にかかわるプロラクチンの意義, 日不妊誌, 30: 17, 1985
- 4) 小田隆晴, 平山寿雄, 佐藤 聡, 長谷川剛志, 広井正彦: 子宮頸管分泌動態よりみた Bromocriptine (CB-154) の作用, 産と婦, 53: 276, 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おける 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: 373, 1991 印刷中
- 8) 辻 泰二, 西田正人, 岩崎寛和: 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, 日不妊誌, 36: 579, 1991
- 9) Peillon, F., Vincens, M., Cesselin, F., Doumith, R., Mowszowicz, I.: Exaggerated prolactin response of thyrotropin-releasing hormone in women with anovulatory cycles: possible role

of endogenous estrogens and effect of bromocriptine, Fertil. Steril., 37: 530, 1982

## A new criteria for choosing a bromocriptine therapy

Taiji Tsuji, Masato Nishida,  
Takeshi Kubo and Hirokazu Iwasaki

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

Nobody knows the correct criteria for choosing a bromocriptine therapy for the abnormal secretion of prolactin (PRL), the hyperprolactinemia or the occult hyperprolactinemia. The authors employed the following criteria: the basal PRL level (BASE) is greater than 20 ng/ml or the peak PRL level after loading with 0.5mg TRH (PEAK) is greater than 100 ng/ml in serum. However, the therapeutic effects were not satisfactory. The authors, therefore, established a new criteria induced by means of the discrimination analysis, which was expressed by the following two formulae:

$$\log [\text{BASE}] + 1.96 \log [\text{PEAK}] - 11.95 > 0 \text{ and} \\ \log [\text{BASE}] + 4.14 \log [\text{PEAK}] - 22.09 > 0 \quad (p < 0.005)$$

This new criteria is considered to be more accurate than any existing one. This analysis suggests that the hyperprolactinemia is closely related to the occult hyperprolactinemia in the abnormal secretion of PRL.

(受付: 1991 年 3 月 12 日)

# 過排卵刺激法における高純度FSH製剤の有用性に関する研究 ——IVF/GIFTにおけるFSH研究会報告——

## Evaluation of Pure FSH in Use for Hyperstimulation in IVF-ET and GIFT Program

京都大学医学部婦人科学産科学教室

|                 |             |                  |
|-----------------|-------------|------------------|
| 森 崇 英           | 野 田 洋 一     | 神 崎 秀 陽          |
| Takahide MORI   | Yoichi NODA | Hideharu KANZAKI |
| 辰 巳 賢 一         |             |                  |
| Kenichi TATSUMI |             |                  |

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

山形大学医学部産婦人科学教室

|                |                |
|----------------|----------------|
| 廣 井 正 彦        | 斎 藤 英 和        |
| Masahiko HIROI | Hidekazu SAITO |

Department of Obstetrics and Gynecology  
Yamagata University, School of Medicine

東北大学医学部産科学婦人科学教室

|              |              |
|--------------|--------------|
| 矢 嶋 聰        | 深 谷 孝 夫      |
| Akira YAZIMA | Takao FUKAYA |

Department of Obstetrics and Gynecology  
Tohoku University, School of Medicine

群馬大学医学部産科婦人科学教室

|                |                |
|----------------|----------------|
| 五 十 嵐 正 雄      | 関 守 利          |
| Masao IGARASHI | Moritoshi SEKI |

Department of Obstetrics and Gynecology  
Gunma University, School of Medicine

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

|                |              |
|----------------|--------------|
| 飯 塚 理 八        | 田 辺 清 男      |
| Rihachi IIZUKA | Kiyoo TANABE |

Department of Obstetrics and Gynecology  
Keio University, School of Medicine

横浜市立大学医学部産婦人科学教室

水 口 弘 司      植 村 次 雄  
Horoshi MINAGUCHI      Tsugio UEMURA

Department of Obstetrics and Gynecology  
Yokohama City University School of Medicine

東海大学医学部産婦人科学教室

藤 井 明 和      井 上 正 人      小 林 善 宗  
Akikazu FUJII      Masato INOUE      Yoshimune KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology  
Tokai University, School of Medicine

徳島大学医学部産科婦人科学教室

青 野 敏 博      山 野 修 司  
Toshihiro AONO      Shuji YAMANO

Department of Obstetrics and Gynecology  
Tokushima University, School of Medicine

東京歯科大学市川総合病院産婦人科

大 野 虎 之 進      小 田 高 久  
Toranoshin OHNO      Takahisa ODA

Department of Obstetrics and Gynecology  
Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

醍醐渡辺病院

渡 辺 栄 三  
Eizo WATANABE

Daigo Watanabe Hospital

太田総合病院産婦人科

古 橋 信 之  
Nobuyuki FURUHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Ohta Sougou Hospital

荻窪病院産婦人科

杉 山      武  
Takeshi SUGIYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Ogikubo Hospital

済生会中央病院産婦人科

亀 井      清  
Kiyoshi KAMEI

Department of Obstetrics and Gynecology, Saiseikai Chuo Hospital

体外受精・胚移植法および GIFT 法のため過排卵刺激における pure FSH (フェルティノーム) の有用性を検討した。

pure FSH, または対照として HMG を用いた 4 種の過排卵刺激法のプロトコールを作成し, 151 症例の体外受精・胚移植法または GIFT 法の治療周期に 4 種のプロトコールのいずれかを用了過排卵刺激を行った。そして各プロトコールを用了場合の發育卵胞数, 採取卵数, 分割卵数, 妊娠率, 内分動態等を比較検討した。

pure FSH を用了過排卵刺激を行った場合, FSH 含有量が同量の HMG を用了場合に比べると卵巣刺激効果が弱く, 妊娠率も低くなった。しかし, pure FSH の初期投与量を増量した場合には, 充分な卵胞發育, 高い採卵率, 分割率が得られ, HMG を用了場合と同様の妊娠率となり, かつ流産率は低く, 多胎率が高くなった。pure FSH は, 体外受精・胚移植法や GIFT 法のための過排卵刺激に有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 101-109, 1992)

## 緒 言

本邦における体外受精・胚移植法 (IVF-ET) や配偶子卵管内移植法 (GIFT) の妊娠率は以前に比べれば高くなったもののなお満足できるものではない<sup>2)</sup>。これを高める一つの有望な方法として過排卵処置を改善, 工夫することが考えられる。IVF-ET や GIFT のための過排卵刺激にはゴナドトロピンとして HMG 製剤を用いるのが一般的であるが<sup>3)</sup>、これまでの HMG 製剤には FSH 活性とほぼ同量の LH 活性が含まれている。また、最近では LH 活性を少なくした HMG 製剤も開発されているがなお無視できない LH 活性が残存している。この LH 活性が卵胞におけるアンドロゲン産生を刺激し<sup>4,5)</sup>卵に悪影響を与える可能性が示唆されている<sup>6)</sup>。最近 LH 活性をほとんど除いたいわゆる pure FSH 製剤フェルチノームが開発され、本剤の各種排卵障害や多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) に対する排卵誘発における有用性に関しては、既に一定の評価を得ている<sup>7,8)</sup>。今回我々は、多施設共同研究プログラムを企画し、この pure FSH 製剤を IVF-ET や GIFT のための過排卵刺激に用い、その有用性について検討したので報告する。

## 対象と方法

本研究は 8 大学およびその関連病院による多施設共同研究として企画され、研究期間は昭和 63 年 4 月 1 日より平成元年 3 月 31 日までの 1 年間であった。対象は一般健康状態に異常を認めず、正常月経周期を有する IVF-ET または GIFT の適応となる婦人で、年齢 38 歳以上の症例、子宮に着床を妨げるおそれのある要因を持つ症例、明らかな内分泌異常を有する症例 (甲状腺機能異常、多嚢胞性卵巣症候群な

ど)、一側卵巣を欠く症例、IVF-ET では夫精子濃度 2000 万/ml 以下またはハムスターテストで受精能力に異常が認められる症例、GIFT では夫精子濃度 1000 万/ml 以下または運動率 40 %以下、またはハムスターテストで受精能力に異常が認められる症例は除外した。

IVF-ET, GIFT の卵巣刺激法は以下の 4 法とした。本研究の開始時には、1) 月経周期 3 日目よりフェルティノーム (セローノ) 150 IU を連日筋注 (2 FSH 群)、2) コントロール群として月経周期 3 日目よりヒュメゴン (オルガノン) またはパーゴナル (帝国臓器) 150 IU を連日筋注 (2 HMG 群)、の 2 法を用いていたが、中間検討会での 2 FSH 群の卵巣刺激効果が弱いという報告に基づき、その後以下の 2 法を追加した。3) 月経周期 3 日目よりフェルティノーム 300 IU を 2 日間筋注、月経周期 5 日目よりフェルティノーム 150 IU を連日筋注 (4 FSH 群)、4) 月経周期 3 日目よりフェルティノーム 225 IU を 3 日間筋注、月経周期 6 日目よりフェルティノーム 150 IU またはフェルティノーム 225 IU

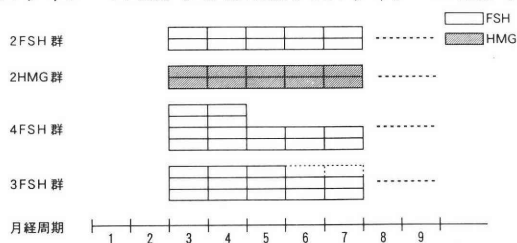


図1 各群の投与法

Uをそのまま連日筋注 (3 FSH 群) (図 1)。どの患者にどの刺激法を用いるかは、作為が入らないよう任意に振り分けるという条件のもとに各施設に委ねた。

その結果、対象症例数はIVF-ET 127 症例、GIFT 24 症例となり、その内訳はIVF-ET では2 FSH群 26 例(年齢  $32.5 \pm 0.5$  歳(Mean $\pm$ SE)), 4 FSH群 45 例 ( $32.7 \pm 0.6$  歳), 3 FSH群 19 例 ( $33.0 \pm 0.7$  歳), 2 HMG群 37 例 ( $31.8 \pm 0.6$  歳)で、GIFT では2 FSH群 7 例( $31.4 \pm 1.4$  歳), 4 FSH群 8 例( $32.0 \pm 1.3$  歳), 3 FSH群 6 例( $35.3 \pm 2.7$  歳), 2 HMG群 3 例 ( $36.3 \pm 0.7$  歳)となった。

卵巣刺激周期における卵胞モニタリング法、FSHまたはHMGの中止時期、HCG投与時期、採卵時期、採卵法、培養法、卵子前培養時間、媒精精子濃度、受精判定、卵割判定、胚移植時期、胚移植法、妊娠判定は各施設の方法に委ねた。

全症例についてFSHまたはHMG投与直前、最終投与翌日、HCG投与直前、採卵時、採卵後2日目、7日目、14日目の7点で採血を行い、血清を凍結保存し、全検体が揃った時点でFSHをFSHセロザイムキット(セローノ)(同時再現性:1.4-2.3%, 測定間再現性:3.7-5.9%), LHをLHセロザイムキット(セローノ)(同時再現性:1.2-2.9%, 測定間再現性:4.8-6.8%), エストラジオール( $E_2$ )をエストラジオールマイヤーキット(セローノ)(同時再現性:3.9-9.3%, 測定間再現性:7.5-12.0%), プロゲステロン(P)をプロゲステロンマイヤーキット(セローノ)(同時再現性:4.8-15.8%, 測定間再現性:6.4-6.9%)により測定した。

各群の平均値の有意差検定にはStudent's test またはCochran-Cox test, 出現頻度の差の検定にはカイ2乗検定を用いた。

## 結 果

不妊原因の分布は、各刺激法間に大きな偏りは無く、また年齢も各群間に有意差を認めなかった。

HCG投与までに要したFSHまたはHMGの投与期間および投与量(アンブル数:75 IU/アンブル)を表1に示した。投与期間は長い順に2FSH群, 3FSH群, 4FSH群, 2HMG群であり、(2FSH vs 2HMG:  $P < 0.01$ , 2FSH vs 4FSH, 4FSH vs 2HMG, 3FSH vs 2HMG:  $P < 0.05$ ), 投与量が多い方から3FSH群, 4FSH群, 2FSH群, 2HMG群となった(3FSH, 4FSH, vs 2FSH:  $P < 0.05$ , 3FSH, 4FSH, 2FSH vs 2HMG:  $P < 0.01$ )。

刺激法別の成績をみるとIVF-ETでは表2に示すように、2FSH群26例中に22例に採卵、20例に胚移植を行い1例に妊娠が成立した。4FSH群では45例中42例に採卵、36例に胚移植を行い8例が妊娠したが1例が流産となり、多胎は3例に認められた。3FSH群では19例中13例に採卵、12例に胚移植を行い1例が妊娠に至ったが、この例は多胎であった。対照とした2HMG群では37例中37例に採卵、26例に胚移植を行い6例が妊娠したが3例が流産、多胎は1例であった。周期あたりの妊娠率は高い順に4FSH群18%, 2HMG群16%, 3FSH群5%, 2FSH群4%となったが有意差はなかった。

一方GIFTでは、2FSH群7例中6例に採卵を行い妊娠例は無く、4FSH群では8例中7例に採卵、妊娠例無く、3FSH群では6例中5例に採卵、妊娠例は1例で周期あたりの妊娠率は17%であったのに対し、2HMG群では3例中3例に採卵したが

表1 過排卵処置各群の、FSH/HMGの投与期間および投与量\*

|             | 2FSH群          | 4FSH群          | 3FSH群          | 2HMG群          |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 投与期間(日)**   | $7.8 \pm 0.3$  | $6.8 \pm 0.2$  | $7.1 \pm 0.3$  | $6.1 \pm 0.2$  |
| 投与量(アンブル)** | $15.6 \pm 0.6$ | $17.5 \pm 0.4$ | $19.0 \pm 1.0$ | $12.2 \pm 0.4$ |

\* IVF-ETとGIFT両者を含む  
\*\* Mean $\pm$ SE

表2 過排卵処置各群のIVF-ET成績

|           | 2FSH群 | 4FSH群 | 3FSH群 | 2HMG群 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| 周期数       | 26    | 45    | 19    | 37    |
| 採卵例数      | 22    | 42    | 13    | 37    |
| 胚移植例数     | 20    | 36    | 12    | 26    |
| 妊娠例数      | 1     | 8     | 1     | 6     |
| 流産例数      | 0     | 1     | 0     | 3     |
| 多胎例数      | 0     | 3     | 1     | 1     |
| 妊娠率(%/周期) | 4     | 18    | 5     | 16    |

表3 過排卵処置各群における採卵成績\*

|               | 2FSH群   | 4FSH群   | 3FSH群   | 2HMG群   |
|---------------|---------|---------|---------|---------|
| 採卵例数          | 26      | 49      | 18      | 40      |
| 卵胞数 (>14mm)** | 5.1±0.6 | 5.6±0.6 | 7.1±1.0 | 5.5±0.7 |
| 採取卵数**        | 2.9±0.6 | 4.6±0.5 | 5.9±0.8 | 3.1±0.5 |
| 採卵率 (%)       | 57      | 82      | 83      | 56      |

\* IVF-ET と GIFT 両者を含む  
\*\* Mean±SE

妊娠例は無かった。

卵巣刺激を行ったにもかかわらず採卵に至らなかった症例はIVF-ET, GIFT 合わせて151例中18例(11.9%)に見られた。刺激法別にその原因をみると、2FSH群では33例中7例(21.2%)が採卵に至らず、その原因は5例がlow response、2例がpremature LH surgeであり、4FSH群では53例中4例(7.5%)が採卵に至らず、2例がlow response、2例がpremature LH surgeであり、3FSH群では25例中7例(28%)が採卵に至らず、7例すべてがlow responseによるものであったのに対し、2HMGでは40例すべてが採卵に至った。

採卵例について採卵時直径14mm以上の卵胞数、採取卵数、および採卵率(採取卵数/卵胞数)を刺激法別に表3に示した。卵胞数は2FSH群5.1±0.6個、4FSH群5.6±0.6個、3FSH群7.1±1.0個、2HMG群5.5±0.7個であり(N.S.)、採取卵数は2FSH群2.9±0.6個、4FSH群4.6±0.5個、3FSH群5.9±0.8個、2HMG群3.1±0.5個であったため(3FSH, 4FSH vs 2FSH, 2HMG: P<0.05)、採卵率は2FSH群57%、4FSH群82%、3FSH群83%、2HMG群56%となった(3FSH, 4FSH vs 2FSH, 2HMG: P<0.01)。

IVF-ETについて採卵は行ったが胚移植に至らなかった症例の原因を刺激法別にみると、2FSH群では22例に採卵を行ったが2例胚移植に至らず(9.1%)、この2例は共に採卵を行ったが卵を採取できなかった採卵不成功例であった。4FSH群では42例採卵を行い胚移植に至らない症例が6例あったが(14.2%)、採卵不成功例が2例と分割胚数0の症例が4例であった。3FSH群は13例採卵を行い胚移植に至らなかったのは1例で(7.7%)分割胚数0の症例であった。2HMG群では37例に採卵を行ったが胚移植を行えない症例は11例と最も多く(29.7%)、その内訳は、採卵不成功例4例と分割胚数0の症例が7例であった。

IVF-ETについて各群の採取卵数、分割卵数、分割率(分割卵数/採取卵数)、移植卵数(移植卵数/

移植回数)は表4に示した通りである。採取卵数は多い順に3FSH群、4FSH群、2FSH群、2HMG群となり(3FSH vs 2FSH, 3FSH vs 2HMG, 4FSH vs 2HMG: P<0.05)、分割卵数は多い順に3FSH群、4FSH群、2FSH群、2HMG群であった。(3FSH, 4FSH vs 2HMG: P<0.05)。その結果、分割率は高い順に2FSH群、3FSH群、4FSH群、2HMG群となった(2FSH vs 4FSH, 2HMG: P<0.05)。移植胚数は多い順に3FSH群、4FSH群、2FSH群、2HMG群であった(3FSH, 4FSH vs 2HMG: P<0.05)。

過排卵刺激時における血中各種ホルモンの動きを刺激法別に比較すると、まず血清FSH値は図2に示すように最終HMG/FSH投与翌日の2FSH群

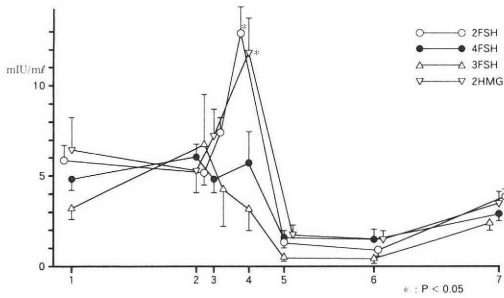


図2 過排卵処置各群における血清FSH値の推移(Mean±SE)。横軸の数字1はFSH/HMG投与直前、2はFSH/HMG最終投与翌日、3はHMG投与直前、4は採卵時、5は採卵後2日目、6は採卵後7日目、7は採卵後14日目。

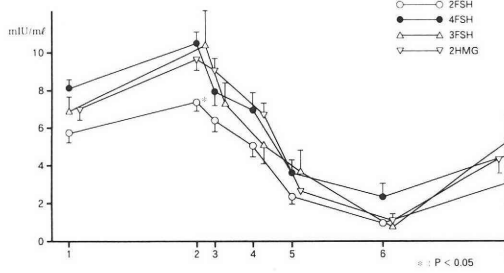


図3 過排卵処置各群における血清LH値の推移(Mean±SE)。横軸の数字は図2と同じ。

表 4 過排卵処置各群における分割と移植成績\*

|         | 2FSH 群  | 4FSH 群  | 3FSH 群  | 2FSH 群  |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| 採取卵数**  | 3.3±0.7 | 4.8±0.6 | 6.3±0.9 | 3.1±0.5 |
| 分割卵数**  | 2.5±0.4 | 3.0±0.4 | 4.1±0.9 | 1.7±0.4 |
| 分割率 (%) | 76      | 63      | 65      | 55      |
| 移植卵数**  | 2.2±0.3 | 2.4±0.3 | 3.4±0.7 | 1.9±0.3 |

\* IVF-ET のみ

\*\* Mean±SE

が他の群より有意に低値をとっており、血清LH値は図3に示すように採卵時の2FSHおよび2HMG群が他群に比して有意に高値をとった。血清E<sub>2</sub>値は図4に示すように最終FSH/HCG投与翌日、HCG投与直前、および採卵後7日のポイントで2FSH群が他群より有意に低値となり、血清P値は図5に示すように採卵後2日目および7日目で3FSH群および4FSH群が2FSH群および2HMG群より有意に高値となった。

### 考 察

IVF-ETやGIFTの成績には、対象症例の不妊原因や年齢が大きな影響を与える。今回の研究において、どの刺激法をどの症例に用いるかは、作為が入らないように任意に振り分けるといった条件のもとに各施設に委ねた。その結果、不妊原因、年齢共に各刺激法間に偏りを認めなかったことから、各刺激法群にほぼ同様の背景を持った患者が割り振られたと考えられ、比較的純粋に卵巣刺激法がIVF-ETやGIFTの成績に与える影響を見ることができたと考えてよからう。

まず、HMGまたはFSHの平均投与日数および平均投与量であるが、2FSH群と2HMG群を比較した場合、同じ反応を得るのに2FSH群の方が2HMG群より1.7日長く、3.4アンプル多くの投与を必要とした。フェルティノームと、ヒュメゴンやパーゴナルのFSH含量が実際に同じであるとす

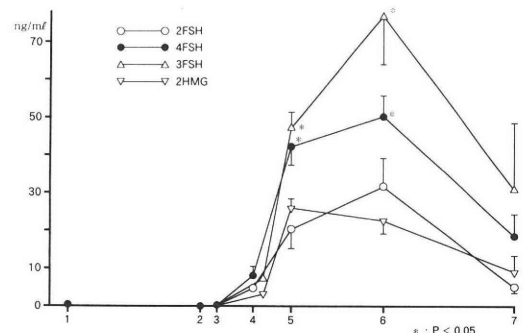


図5 過排卵処置各群における血清P値の推移(Mean±SE)。横軸の数字は図2と同じ。

れば、HMG製剤中のLHが卵胞発育に促進的に働いている可能性があると考えられる。しかし、Navotらの2FSH 44例、2HMG 109例の比較では、同じ反応を得るのに、2FSH群10.9±2.5アンプルに対し2HMG群11.3±2.5アンプル(mean±SD)と、むしろ2HMG群の方が2FSH群より多量の投与を必要とし、HCG投与日も2FSH群9.0±1.4に対し、2HMG群9.5±1.2(mean±SD)と2FSH群の方が卵胞発育が早いという成績を報告している<sup>9)</sup>。またRussellらも、より少数の比較ながらやはり2FSH群のほうが2HMG群より卵胞発育速度が早いという結果を得ている<sup>10)</sup>。これらのデータからみればLHが卵胞発育に促進的に働いているとは考えられず、卵胞発育刺激が、我々の研究ではHMGの方が強く、NavotやRussellらの研究ではFSHの方が強いという結果の相違は、本邦と米国におけるFSHやHMG製剤中のFSH含有量の違いや、人種差などに起因すると考えられる。

FSHによる刺激を行った111例中18例(16.2%)が採卵に至らなかったのに対し、HMGによる刺激を行った40例全てが採卵に至った。採卵に至らなかった18例中14例はlow responseであったことからみても、やはり本邦においてはFSHはHMGに比べ卵胞発育刺激が弱いと考えられる。しかし4FSH群53例中low responseによるキャンセル例は2例のみであったことから、正常月経周期におけるF

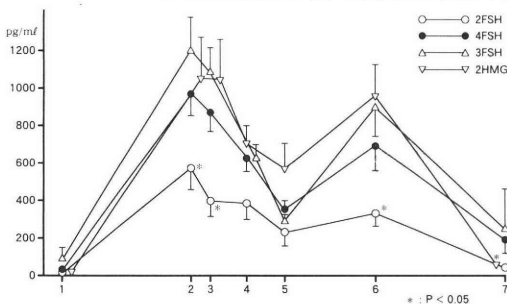


図4 過排卵処置各群における血清E<sub>2</sub>値の推移(Mean±SE)。横軸の数字は図2と同じ。

SH動態になぞらえて、卵胞期の早い時期にFSHを増量することによりlow responseによる採卵キャンセルを減らすことができ、2FSH群にみられる弱点を補うことが可能であると考えられた。

採卵時の卵胞数は各群間に有意差を認めなかった。2HMG群は卵胞刺激を始めてから採卵日までの日数は他群に比して有意に短い、すなわち主席卵胞径を大きくする刺激は最も強いにもかかわらず、採卵時の径14mm以上の卵胞数が他群に比して多くなかったのは、2HMG法による卵胞刺激では卵胞の同期化が起こらずに、発育する卵胞径にばらつきが生じたためであろう。また、採卵率は発育卵胞のうち成熟卵胞の占める割合を示す一つの指標と考えられる。採卵率は3FSH群、4FSH群が2FSH群、2HMG群に比して有意に高かった。これは3FSH群や4FSH群では、卵胞期の初期にFSHを増量することにより過排卵処置により排卵系へリクルートされる卵数の増加とリクルートされた卵胞の発育同期化という2つの要因に依るものであろう。それ故、HCG投与時にも主席卵胞と次席卵胞以下の卵胞の成熟度にあまり差がなく、成熟度の高い卵胞が揃うため高い採卵率が得られたものと考えられる。これに対し、2FSH群や2HMG群では発育卵胞の動員力と同調能が弱いため採卵率が低くなるのであろう。また、2HMG群では採卵キャンセル率は低かったものの、採卵不成功例や分割卵数0の症例が多く、また分割率も低くなった。これはHMG製剤中のLH活性が卵胞のアンドロゲン分泌を促進し<sup>4,5)</sup>、卵になんらかの悪影響を及ぼしている<sup>6)</sup>可能性もある。結局2HMG群は主席卵胞が最も早く基準値の大きさに達したにもかかわらず、移植できた卵の数は4FSH群や3FSH群に比べて有意に少なかった。

妊娠率は4FSH群および2HMG群が、3FSH群および2FSH群より高いという成績が得られたが有意差はなかった。4FSH群と2HMG群を比較した場合4FSH群の妊娠例8例中流産例が1例であり、かつ多胎3例が含まれているのに対し、2HMG群の妊娠例6例中3例が流産、多胎は1例のみであったことから、4FSH群の方が2HMG群より、生児を得ることのできる卵を数多く回収できる卵胞刺激法であると考えられた。Navotらの多数例の検討においても、4FSH群と2HMG群が高く、ついで3FSH群で、2FSH群が最も低いという我々と同様の成績を出している。

内分泌学的にみると、まず、血清FSH値はHMG/FSH最終投与翌日において2FSH群が他群に比し

て有意に低値であった。2FSH群が4FSH群および3FSH群に比して低値をとっていたのはFSHの投与量の差によると理解されるが<sup>11)</sup>、本来同量のFSH活性を投与しているはずの2FSH群が2HMG群よりも低値をとった原因は、HMG製剤中のLH活性が血清FSHを上昇させるとは考えにくいことから、HMG製剤中のFSH活性と今回用いたFSH製剤のFSH活性が異なっているという可能性に求められざるを得ない。次に、血清LHについては、最終HMG/FSH投与翌日の2HMG群の値と他の群の値との間に有意差を認めなかった。血清FSH値はこのポイントでFSHの投与量により差が認められたが、LH投与量に大きな差があるにもかかわらず血清LH値に差が見出されてない。このことは、LHの半減期がFSHのその4分の1であるという事実から<sup>12)</sup>、HMG/FSHを24時間間隔で投与した場合FSHには蓄積効果が見られるのに対し、LHにはこれがみられないためと理解されよう。さて2HMG群および2FSH群の採卵時の血清LH値は他の群に比して有意に高い値をとっていた。このLHアッセイキットはHCGと交差反応しないためHCG投与後の血清LH値を測定できる。2FSH群の $13.0 \pm 0.9$  mIU/mlや、2HMG群の $12.0 \pm 1.5$  mIU/mlという値はこれらの群の一部の症例でHCG投与後採卵頃にLHサージが起こっていたと考えられる<sup>13)</sup>。

血清 $E_2$ は2FSH群においてほとんどのポイントで他の群より低値となった。これは2FSH群の刺激の弱さに伴う卵胞数の相対的低下に起因するものであろう。

血清P値は、3FSH群および4FSH群において2FSH群および2HMG群より高い値となっている。これはひとつには発育卵胞数の差が反映しているとみることができるが、他方、黄体補充の方法が各施設様々であるため、評価を困難にしているといえよう。

体外受精・胚移植法における卵巣刺激法の意義は大きく、その目的は、生児となることのできる質のよい卵を可及的多く回収することである。この目的のため強制排卵の手段として各種の過排卵刺激法が工夫、改善されてきた。今回の共同研究において、FSHの有用性について検討した結果では、FSHを卵胞期初期に大量に投与することにより排卵系にリクルートできる卵胞を増やすと同時に、これら卵胞の同調的発育が誘導され、その結果質のよい多数の卵を回収することが可能であると考えられた。FSHを体外受精・胚移植法の卵胞刺激に用いるには、

月経周期 3 日目と 4 日目に FSH 300 IU, 5 日目から 150 IU を連日投与する 4 FSH 法が最も良い成績が期待できると考えられた。(謝辞: 今回の臨床試験に使用したフェルティノームを, 提供して頂いたセローノ・ジャパン株式会社に感謝いたします。)

## 文 献

- 1) 生殖医学の登録に関する委員会: 生殖医学の登録に関する委員会報告, 日産婦誌, 42: 393, 1990
- 2) 生殖医学の登録に関する委員会: 平成 2 年度生殖医学の登録に関する委員会報告, 日産婦誌, 43: 470, 1991
- 3) Garcia, J. E., Jones, G. S. and Acosta, A. A.: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase I, 1981, Fertil. Steril., 39: 167, 1983
- 4) Tsang, B. K., Armstrong, D. T. and Whitfield, J. F.: Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro, J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 1407, 1980
- 5) Mori, T., Fujita, Y., Suzuki, A., Kinoshita, Y., Nishimura, T., Kambe-gawa, A.: Functional and structural relationships in steroidogenesis in vitro by human ovarian follicles during maturation and ovulation, J. Clin. Endocrinol. Metab., 47: 955, 1978
- 6) McNatty, K. P., Smith, D. M., Mavis, A., Osathanondh, R., Pyon, 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
- 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, S J-1001 の排卵誘発成績, 産科と婦人科, 56: 501, 1989
- 8) 五十嵐正雄, 他: PCO に対する高純度 FSH 製剤, S J-1001 の効果とその投与法の検討, 産科と婦人科, 56: 511, 1989
- 9) Navot, D. and Rosenwaks, Z.: The use of follicle-stimulating hormone for controlled ovarian hyperstimulation in in vitro fertilization, J. Vitro. Fert. Embryo Transfer, 5: 3, 1988
- 10) Russell, F. B., Polan, M. L. and DeCherney, A. H.: The use of follicle-stimulating hormone for ovulation induction in normal ovulatory women in an in vitro fertilization program, Fertil. Steril., 45: 829, 1986
- 11) Mizunuma, H., Takagi, T., Honjyo, S., Ibuki, Y. and Igarashi, M.: Clinical pharmacodynamics of urinary follicle-stimulating hormone and its application for pharmacokinetic simulation program, Fertil. Steril., 53: 440, 1990

- 12) Yen, S. C. C. and Jaffe, R. B.: Reproductive Endocrinology, 94, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1986
- 13) Hamori, M., Stuckensen, J. A., Rumpf, D., Kniewald, T., Kniewald, A. and Marquez, M.: Blunted LH surge after HCG administration in cycles superovulated for in-vitro fertilization, Human. Reprod., 4: 392, 1989

## Evaluation of pure FSH in use for hyperstimulation in IVF-ET and GIFT program

Takahide Mori, Yoichi Noda,

Hideharu Kanzaki and Kenichi Tatsumi  
Department of Gynecology and Obstetrics,  
Kyoto University, Faculty of Medicine,  
Kyoto 606, Japan

Masahiko Hiroi and Hidekazu Saito

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Yamagata University, School of Medicine

Akira Yazima and Takao Fukaya

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Tohoku University, School of Medicine

Masao Igarashi and Moritoshi Seki

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Gunma University, School of Medicine

Rihachi Iizuka and Kiyoo Tanabe

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Keio University, School of Medicine

Hiroshi Minaguchi and Tsuguo Uemura

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Yokohama City University, School of Medicine

Akikazu Fujii, Masato Inoue  
and Yoshimune Kobayashi

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Tokai University, School of Medicine

Toshihiro Aono and Shuji Yamano

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Tokushima University, School of Medicine

Toranoshin Ohno and Takahisa Oda

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Tokyo Dental College,  
Ichikawa General Hospital  
Eizo Watanabe

Daigo Watanabe Hospital

Nobuyuki Furuhashi

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Ohta Sougou Hospital

Takeshi Sugiyama

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Ogikubo Hospital

Kiyoshi Kamei

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Saiseikai Chuo Hospital

Usefulness of pure FSH preparation (Fertinorm)

for hyperstimulation in IVF-ET and GIFT was investigated in comparison with conventional HMG treatment. One hundred and fifty-one patients were stimulated with one of the four hyperstimulation protocols using pure FSH or HMG during their IVF-ET/GIFT cycles, and the numbers of growing follicles, collected oocytes, cleaved oocytes, pregnancy rate and endocrinological profile in each protocol were compared to one another.

when both preparations were used at the same dose level in terms of FSH unit, the ovarian stimulation effect of pure FSH was weaker than that of HMG, and pregnancy rate in pure FSH cycles was lower but not significantly than that in HMG cycles. However, pure FSH was proven as effective as HMG in terms of numbers of growing follicles and pregnancy rates when the initial dose of pure FSH were increased. Further, higher oocyte recovery rate, cleavage rate, multiple pregnancy rate, and lower abortion rate appear to be characteristic of pure FSH. Thus pure FSH was concluded to be useful in use for hyperstimulation in IVF-ET and GIFT.

(受付: 1991年9月6日特掲)

## PRESENCE OF ENDOTHELIN-1 IN HIGH CONCENTRATIONS IN RAT OVARIES

Satoshi USUKI

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

**Abstract:** Immunoreactive endothelin-1 (ET) levels in plasma and the ovary of randomly chosen non-pregnant, adult rats, 200 to 250 g, were measured using reversed-phase high pressure liquid chromatography and a sensitive sandwich-enzyme immunoassay. The ET levels in plasma and the ovaries were  $1.20 \pm 0.21$  (mean  $\pm$  SE) pg/ml and  $278.51 \pm 25.01$  pg/g ovarian wet weight for 46 samples, respectively, the latter being much higher than the former. These results suggest that ET is involved in events related to the reproduction process by inducing a local intraovarian production or accumulation of ET.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 110-113, 1992)

### Introduction

Endothelin-1 (ET) is found to be a circulating peptide<sup>1,2)</sup>, regionally distributed in various tissues<sup>3-9)</sup> and functions as a new local mediator peptide<sup>5-10)</sup>. Further investigations have demonstrated widespread binding sites for ET not only in vascular bed but also in endocrine systems<sup>6)</sup> and widespread transcription of ET mRNA in various tissues including neurons<sup>11,12)</sup>, suggesting a variety of hormonal roles of ET in regulation of secretion of hormones. In the present study, we identified the presence of the abundance of ET in the rat ovary using reversed-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) and a sensitive sandwich-enzyme immunoassay (EIA) for ET.

### Materials and Methods

Synthetic Peptide of human ET was purchased from the Peptide Institute (Osaka). Non-pregnant, adult female rats of a locally bred strain (originally Wistar-Imamichi stock) were housed under conditions of standardized light (lights on

from 8:30 to 20:30 h) and temperature (24°C) with free access to standard purine chow and water. The randomly chosen rats, weighing 200 to 250 g, were anesthetized with ether and decapitated. The ovaries were quickly removed, the periovarian bursa stripped off, and immediately frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -30°C until assayed for ET. Venous blood was also collected at autopsy in tubes containing 300 KIE/ml aprotinin (Bayer, Leverkusen, West Germany), and 2 mg/ml EDTA, centrifuged at  $1,000 \times g$  for 10 min at 4°C and the supernatants were stored at -30°C until the ET assay was carried out. The ovaries were homogenized with a polytron homogenizer for 60 sec at 4°C in 10 volumes of 1 M acetic acid containing 10 µg/ml pepstatin (Peptide Institute) and immediately boiled for 10 min to inactivate protease. After chilling, the homogenates were centrifuged at  $25,000 \times g$  for 30 min at 4°C and the supernatants were stored at -30°C.

The supernatant from each plasma or tissue was applied to a Sep-pak C18 cartridge (Waters, Massachusetts, U. S. A.) which was preequilibrated with 1 M acetic acid, and the adsorbed peptides

were eluted with acetic acid: ethanol: water=4: 86: 10, concentrated under a nitrogen gas stream<sup>1)</sup>. The concentrated plasma and tissue extracts were characterized by RP-HPLC on a TSK ODS-80TM (4.5×250mm, Tosoh, Tokyo) column. The solvents used were A, 5% CH<sub>3</sub>CN containing 0.05% trifluoroacetic acid (TFA), and B, 60% CH<sub>3</sub>CN containing 0.05% TFA. Each fraction (0.5 ml) was lyophilized and assayed for ET by the sandwich-EIA (Fig. 1), as described previously<sup>2)</sup>.

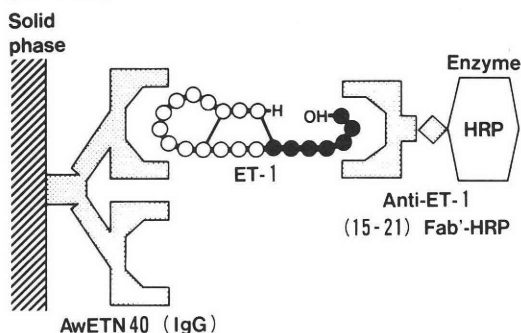


Fig. 1 Principle of sandwich-EIA for endothelin-1.

## Results

### Sandwich-EIA and characterization of ET

Figure 2 shows the standard curve for ET in the sandwich-EIA. The EIA for ET could detect as little as 200 fM/1. Characterization by RP-HPLC of endothelin in the ovaries were specific for ET (Fig. 3). The same data were obtained for plasma (data not shown).

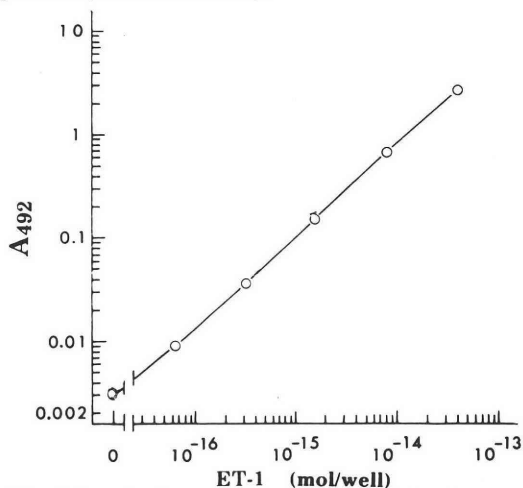


Fig. 2 Standard curve of endothelin-1 in the sandwich-EIA.

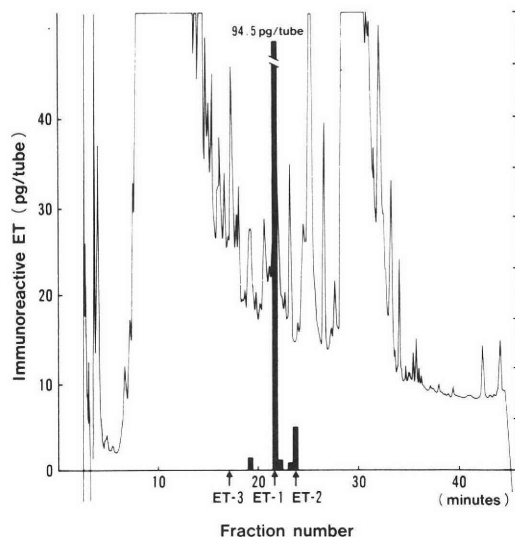


Fig. 3 RP-HPLC elution profiles of the ovarian extracts on a TSK ODS-80TM column.

The fraction was lyophilized and subjected to the sandwich-EIA for endothelin-1. The vertical arrows indicate the eluted portions of endothelin-1 (ET-1), endothelin-2 (ET-2) and endothelin-3 (ET-3).

### ET levels in plasma and the ovaries

The ET levels in plasma and the ovaries were  $1.20 \pm 0.21$  (mean  $\pm$  SE) pg/ml and  $278.51 \pm 25.01$  pg/g ovarian wet weight for 46 samples, respectively, the latter being much higher than the former. In addition, this increase in ovarian ET was also by far higher than that in ovarian vein or arterial plasma in which the plasma ET levels in the ovarian vein was higher than that in artery (data not shown).

## Discussion

This study clearly describes the presence of ET at a high level in adult rat ovaries. Recently, it has been reported the presence of ET in ovaries of hypophysectomized immature rats<sup>13)</sup>. The present study thus extends our initial observations of the presence of ET by showing that there also exists ET at high levels in adult rat ovaries. Since ET stimulates ovarian steroidogenesis by rat preovulatory follicles<sup>10)</sup>, this finding leads us to propose the possibility that ET functions as a local mediator peptide in rat ovaries.

However, one key question is whether the tissue

ET found in the ovary has been synthesized in this tissue. The fact that the tissue ET content is much higher than that in blood and not correlated with plasma ET concentration (unpublished data), and that the plasma ET levels in the ovarian vein are higher than that in the artery may favor the idea of a local intraovarian production, but not blood contamination, indicating a novel intraovarian autocrine/paracrine control mechanism. It has been well known that ET exists at a high level in the endocrine systems and may act as a local hormonal peptide<sup>3,5,6,8-10,13</sup>. The abundance of ET in the ovary found in this study leads us to propose ET as an intraovarian autocrine/paracrine peptide.

### Acknowledgements

The author thanks Miss J. Tanaka and Y. Hayasaka for their technical assistance. This study was supported in part by a Tsukuba University, Project Research Grant, a Grant from the Japan-China Medical Association, Lhi Shi Zhen Awards for Scientific Manuscripts, and Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (62570741, 02670731).

### References

- 1) Suzuki, N., Matsumoto, H., Kitada, C., Masaki, T. and Fujino, M.: A sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin, *J. Immunol. Methods*, 118: 245, 1989
- 2) Usuki, S., Saitoh, T., Sawamura, T., Suzuki, N., Shigemitsu, S., Yanagisawa, Y., Goto, K., Onda, H., Fujino, M. and Masaki, T.: Increased maternal plasma concentration of endothelin-1 during labor pain or on delivery and the existence of a large amount of endothelin-1 in amniotic fluid, *Gynecol. Endocrinol.*, 4: 85, 1990
- 3) Kitamura, K., Tanaka, T., Kato, J., Eto, T. and Tanaka, K.: Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161: 348, 1989
- 4) Kitamura, K., Tanaka, T., Kato, J., Ogawa, T., Eto, T. and Tanaka, K.: Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162: 38, 1989
- 5) Matsumoto, H., Suzuki, N., Onda, H. and Fujino, M.: Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 74, 1989
- 6) Masaki, T., Usuki, S., Yanagisawa, M. and Suzuki, N.: Endothelin in perinatal pharmacology, *Semin. Perinatol.*, 3: 1, 1991
- 7) Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., Yanagisawa, M. and Masaki, M.: Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide?, *Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.*, 256: R858, 1989
- 8) Yoshizawa, T., Shinmi, O., Giard, A., Yanagisawa, M., Gibson, S. J., Kimura, S., Uchiyama, Y., Polak, J. M., Masaki, T. and Kanazawa, I.: Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system, *Science*, 247: 462, 1990
- 9) Stojilkovic, S. S., Merelli, F., Iida, T., Krstanovic, L. Z. and Catt, K. J.: Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells, *Science*, 248: 1663, 1990
- 10) Usuki, S., Saitoh, T., Suzuki, N., Kitada, C., Goto, K. and Masaki, T.: Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate ovarian steroidogenesis, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 17: S256, 1991
- 11) Giaid, A., Gibson, S. J., Ibrahim, N. B. N., Legon, S., Bloom, S. R., Yanagisawa, M., Masaki, T., Varndell, I. M. and Polak, J. M.: Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7634, 1989
- 12) Nunez, D. J. R., Brown, M. J., Davenport, A. P., Neylon, C. B., Schofield, J. P. and Wyse, R. K.: Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues, *J. Clin. Invest.*, 85: 1537, 1990
- 13) Usuki, S.: Role of growth hormone in ovarian physiology. In proceedings of Sapporo International Symposium on Ovarian Function, in press, 1991

### ラット卵巣に於けるエンドセリン —1 の存在

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 愼

卵巣に於けるエンドセリン-1 (ET) の存在について検討を加えた。Wistar-Imamichi 系成熟雌ラットを用い、血漿中及び卵巣組織中の ET 濃度を EIA 法

で測定した。E T は血漿中に  $1.20 \pm 0.21$  pg/ml (mean  $\pm$  SE, n=46), 卵巣中に  $278.51 \pm 25.01$  pg/g ovarian wet weight (n=46) 存在し, 後者の濃度は前

者に較べ遙かに多く, 卵巣に於ける autocrine/paracrine 作用が推察された。

(受付: 1991 年 2 月 28 日)

# THE INFLUENCES OF COMPLETE FREUND'S ADJUVANT ON THE MAINTENANCE OF PREGNANCY OF SUPEROVULATED CBA/JJcl FEMALE MICE MATED WITH DBA/2JJcl MALE MICE

Motoaki KOSUGIYAMA, Hidenori MORI, Toshiyuki TABATA  
and Yoichi SHODA

Faculty of Agriculture, Ibaraki University,  
Ami-machi, Ibaraki 300-03, Japan

---

**Abstract:** It was reported that the high resorption rate in CBA/J females mated with DBA/2J mice could be reversed by immunization of complete Freund's adjuvant. We investigated whether the superovulated mice in the same combination could be also reversed by the same adjuvant, or not.

CBA/JJcl female mice and DBA/2JJcl male mice were used. CBA/JJcl was rooted in CBA/J and DBA/2JJcl was rooted in DBA/2J. The female was mated with the male about 8 weeks of age and the day when a vaginal plug was observed was defined as Day 1 of pregnancy.

The females were divided into not-superovulated and superovulated clusters. Each cluster was divided into groups with and without adjuvant injection. Superovulation was induced with 5 IU PMSG injection followed 48 hr later by 5 IU hCG injection. Adjuvant was injected into foot pads on days 2 and 9 of pregnancy in a dose of 0.1ml. Numbers of fetuses and so on were observed on Day 14 of pregnancy.

The number of placentas in the superovulated females with adjuvant injection was larger than that in the superovulated females without adjuvant injection, significantly ( $P < 0.05$ ). The number of fetuses in the former was also larger than that in the latter, but the differences was not significant. We estimated that the adjuvant injection was effective in the maintenance of pregnancy, especially in the implantation of superovulated CBA/JJcl female mice mated with DBA/2JJcl male mice.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 114-117, 1992)

---

## Introduction

Gill<sup>1)</sup> has pointed out in his general remarks that in the mating of CBA females with DBA/2 males 20 to 30% of the conceptuses abort spontaneously and this combination provides a model system with which to investigate the problem of fetal loss in mammals.

Toder et al. (1989)<sup>2)</sup> experimented in this system

and showed that the high resorption rate in CBA/J females mated with DBA/2J male mice could be reversed by immunization of complete Freund's adjuvant to the females. We thought the same situation should occur in the superovulated females in the same combination that Toder et al. used, that is, we investigated whether the resorption rate of the superovulated CBA/J female mice mated with DBA/2J males could be also reversed

by the same adjuvant, or not.

### Materials and Methods

#### Animals

CBA/JJcl female mice and DBA/2JJcl male mice were purchased at 7 weeks of age from Clea Japan, Inc. (Tokyo, Japan). Both strains were introduced to the company via Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and the origins were the same ones that Toder et al.<sup>2)</sup> used. They were housed in individual cages under controlled

foot pads on days 2 and 9 of pregnancy in a dose of 0.1ml.

#### Fetal resorption

Females were checked for resorption of their fetuses on day 14 of pregnancy. The numbers of the placentas which had no fetus were regarded as resorbing fetuses. Statistical analyses were performed by means of Student's *t*-tests. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

### Results

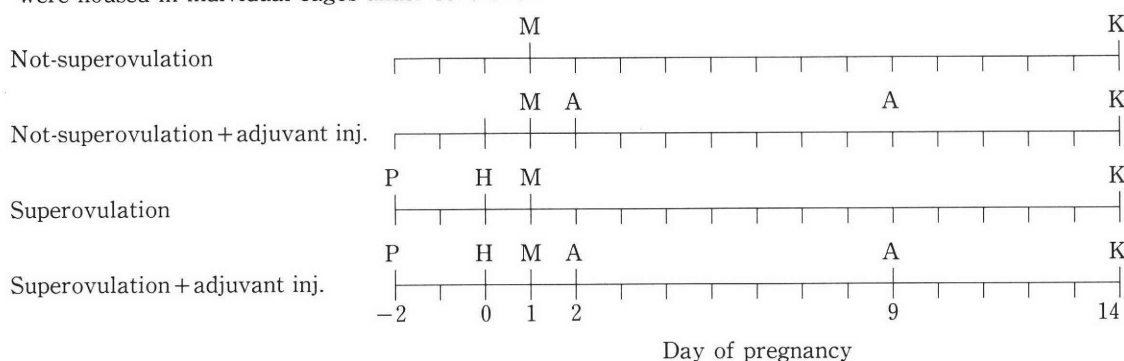


Fig. 1. The procedure of PMSG and adjuvant injection to the mice

M: mating, A: adjuvant injection, K: kill, P: PMSG injection, H: hCG injection

conditions of light (lights on 07:00–21:00 hr) and fed on CMS pellets (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) and water *ad libitum*.

#### Treatment

The experimental treatment in four groups is shown in Fig. 1. Not-superovulated female mice were mated about 8 weeks of age with one male. The presence of a vaginal plug was taken to indicate successful mating and defined as day 1 of pregnancy.

Superovulated female mice were injected intraperitoneally with 5 IU PMSG (Serotropin, Teikoku Hormone Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) regardless of the stage of the estrous cycle and 48 hr later received 5 IU hCG (Gonotropin, Teikoku Hormone Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) intraperitoneally about 8 weeks of age. Each PMSG-hCG-treated female was housed with one male immediately after the hCG injection and allowed to copulate overnight. The day after the hCG injection was defined as day 1 of pregnancy.

Complete Freund's adjuvant (Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) was injected into the

The effect of adjuvant injection to pregnant mice in superovulated or not-superovulated condition are summarized in Table 1. The number of placentas in the superovulated females with adjuvant injection was larger than those in the superovulated females and the not-superovulated females without adjuvant injection, significantly ( $p < 0.05$ ). The number of fetuses in the superovulated females with adjuvant injection was also larger than those in the other groups, but the differences were not significant.

The number and the percentage of the aborted fetuses per mouse of the superovulated females without adjuvant injection were larger than those of the not-superovulated females without adjuvant injection, significantly ( $p < 0.05$ ).

### Discussion

Mori et al.<sup>3)</sup> reported that the average litter size in superovulated mice was more 2 heads addition than not-superovulated mice, but stillbirths were increased, consequently, many offsprings were not obtained in the superovulation treatment. The

Table 1. Effect of adjuvant to the pregnant state of superovulated or not-superovulated mice

| Treatment                               | No. of mice | No. of fetuses per mouse<br>Mean $\pm$ SD | No. of placentae per mouse<br>Mean $\pm$ SD | No. of aborted fetuses per mouse<br>Mean $\pm$ SD | BW of a fetus (g)<br>Mean $\pm$ SD | % of aborted fetuses to placentae<br>Mean $\pm$ SD |
|---|-------------|---|---|---|------------------------------------|--|
| Not-superovulation                      | 8           | 6.6 $\pm$ 1.7                             | 7.1 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>                  | 0.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>                        | 0.10 $\pm$ 0.03                    | 5.7 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>                         |
| Not-superovulation + adjuvant injection | 3           | 6.0 $\pm$ 2.9                             | 7.3 $\pm$ 3.8                               | 1.3 $\pm$ 1.2                                     | 0.09 $\pm$ 0.02                    | 13.3 $\pm$ 12.5                                    |
| Superovulation                          | 6           | 6.5 $\pm$ 3.3                             | 8.8 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>                  | 2.3 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>                        | 0.09 $\pm$ 0.03                    | 31.8 $\pm$ 23.2 <sup>b</sup>                       |
| Superovulation + adjuvant injection     | 6           | 11.5 $\pm$ 4.7                            | 14.6 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>                 | 3.2 $\pm$ 3.3                                     | 0.10 $\pm$ 0.02                    | 21.4 $\pm$ 21.5                                    |

Means with different letters in the same column are different from each other significantly ( $p < 0.05$ ).

same tendency was observed in our experiment, i. e. the number and the percentage of aborted fetuses per mouse of the superovulated females without adjuvant injection were larger than those of the not-superovulated females without adjuvant injection, significantly.

The number of placentas in the superovulated females with adjuvant injection was larger than that of the superovulated females without adjuvant injection, significantly. The number of fetuses in the superovulated females with adjuvant injection was inclined to be larger than that in the superovulated females without adjuvant injection. Those results indicate that the pregnancy rate in superovulated CBA/JJcl mice females mated with DBA/2JJcl male mice can be improved by the injection of complete Freund's adjuvant. Toder et al.<sup>2)</sup> described that non-specific stimulation of the maternal immune system by complete Freund's adjuvant could improve reproductive success in allogeneic mice with increased pregnancy loss. We thought that the same stimulation worked in our superovulated mice.

Suga<sup>4)</sup> said that in superovulated cows the disadvantage of the uterine environment caused the death of the fetuses. Ishibashi et al.<sup>5)</sup> suggested that the diminished incidence of implantation in the superovulated rats was caused by hypersecretion of estrogen. We do not explain what kind of effects to the uterine environment or to estrogen secretion the adjuvant injection to the superovulated mice have.

## References

- 1) Gill, T. J. III: Immunogenetics of recurrent abortions in experimental animals and humans, In: The immunology of the fetus (Chaouat, G. ed.), 293, CRC Press, Inc., 1990
- 2) Toder, V., Strassburger, D., Carp, H., Irlin, Y., Lurie, S., Pecht, M. and Trainin, N.: Immunopotential and pregnancy loss, J. Reprod. Fert., Suppl., 37: 79, 1989
- 3) Mori, H., Tsukamoto, N., Tanaka, R. and Kashiwabara, T.: Reproductive efficiency of superovulated mice by GTH and growth of their offspring, Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., 28: 31, 1980 (in Japanese)
- 4) Suga, T.: Biochemistry of bovine uterine secretion, In: Animal reproduction — recent progress — (Yamanouchi, A. ed.) 271, Bun-eido, 1978 (in Japanese)
- 5) Ishibashi, I., Hashimoto, I., Suzuki, S. and Kosaka, M.: Effects of aminoglutethimide phosphate administration on embryonic development and implantation and on steroid hormone levels in superovulated rats, Anim. Reprod. Sci., 22: 339, 1990

## 過剰排卵マウスの受胎性に及ぼす コンプリートアジュバントの効果

茨城大学農学部

小杉山基昭 森 英紀 田畑利幸  
正田陽一

過剰排卵誘起したCBA/JJcl 雌マウスにDBA/2JJcl 雄マウスを交配し、その妊娠維持に対するフロイントのコンプリートアジュバント投与の効果を調べた。実験は8週齢から開始し、過剰排卵誘起群、非過剰群に

分け、それぞれをアジュバント投与区、非投与区とし、全体を4区に分けた。過剰排卵は5IUのPMSG投与48時間後に5IUのhCGを投与して誘起した。交配日を妊娠1日とし、アジュバントは妊娠2日、9日に投与し、妊娠14日に殺して胎子数等を調べた。

胎盤数は、過剰排卵誘起してアジュバント投与したものの方がアジュバント非投与のものより、5%水準

で統計的に有意に大きかった。胎子数は、過剰排卵してアジュバント投与したものの方がアジュバント非投与のものより大きかったが、統計的有意差はなかった。アジュバントは、過剰排卵誘起状態においても妊娠維持に有効であり、とくに着床に対して効果があると考えられた。

(受付：1991年5月29日)

## 抗プロジェステロン製剤 (RU486) の投与経路, 投与量および投与時期が家兎の妊娠阻止に及ぼす影響

### Effective Route, Dose and Time of the Antiprogesteron Compound RU486 Administration to Prevent Gestation in Rabbits

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

山 海 直\*      遠 藤 克      金 山 喜 一  
Tadashi SANKAI      Tuyoshi ENDO      Kiichi KANAYAMA  
佐 久 間 勇 次  
Yuzi SAKUMA

Department of Veterinary Physiology,  
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University,  
1866 Kameino Fujisawa, Kanagawa 252, Japan

東北大学農学部家畜繁殖学教室

梅 津 元 昭      正 木 淳 二  
Motoaki UMEZU      Junji MASAKI

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture,  
Tohoku University, 1-1 Amamiya Tsutsumidori Aoba-ku Sendai, Miyagi 981, Japan

妊娠阻止のための RU486 の投与条件を詳細に検討する目的で、RU486 の投与経路、投与量および投与時期について検討した。交配後 11 日目の家兎に RU486 を投与した結果、各投与経路における、最少有効投与量は、静脈内投与で 5.0mg/rabbit、腹腔内投与で 10.0mg/rabbit、筋肉内投与で 2.5mg/rabbit、皮下投与で 2.5mg/rabbit、経口投与で 30mg/rabbit 以上であった。すなわち、RU486 の有効な投与経路は、皮下、筋肉 > 静脈内 > 腹腔内 > 経口投与の順であることが明らかとなった。また、RU486 を交配時および交配後 3, 7, 11, 18, 25 日目に投与したところ、交配後 11 日目までの試験区では全例に妊娠阻止が認められたが、交配後 18 日目の投与では 4 例中 2 例、交配後 25 日目の投与では 4 例中 1 例に認められたにすぎなかった。すなわち、RU486 の投与は、妊娠の初期ほど有効であることが示唆された。しかし、妊娠後期に投与した試験区においても、妊娠を阻止した個体を認めたことから、投与量を検討することによって妊娠を阻止できる可能性が示された。

以上のことから、RU486 の投与は皮下および筋肉内投与が最も有効であり、また、妊娠の初期ほど有効であることが判明した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 118-124, 1992)

現所属；国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター\*

Present address; Tsukuba Primate Center for Medical Science, the National Institute of Health, 1 Hachimandai Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

## 結 論

RU486 (Roussel-UCLAF, France)は、プロジェステロンに対して強い拮抗作用をもつ合成ステロイドである。妊娠の成立、維持に必須のホルモンであるプロジェステロンに対して拮抗作用をもつ本製剤は、プロジェステロンに関する基礎的研究において非常に応用範囲の広い製剤である。また、RU486の着床阻止作用、妊娠阻止作用、分娩誘発作用などが多くの研究者によって報告されており<sup>1-6)</sup>、さらに、RU486作用の発現後の生殖機能には影響を及ぼさないことが知られている<sup>7,8)</sup>。これらの知見は、産科婦人科および獣医畜産領域において十分応用できる可能性を示唆するものである。しかし、研究者によってRU486の投与経路、投与量、投与時期、などが多様であり、有効投与方法について詳細に検討されていないのが現状である。

そこで本研究は、供試動物に家兎を用いて、妊娠阻止におけるRU486の投与条件を確立する目的で、RU486の投与経路、投与量および投与時期について詳細に検討した。すなわち、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下および経口投与における有効投与量について検討し、各投与経路における最少有効投与量を比較することによって、RU486の作用発現に有効な投与経路について検討した。さらに、同一の投与経路および投与量で妊娠の初期から末期までの投与を試み、妊娠阻止を目的としたRU486の有効投与時期について検討した。

## 材料および方法

### 供試動物

供試動物は、日本白色種の家兎で、体重2.8 kg～3.2 kgの成熟未経産雌102例を用いた。これらの家兎は業者より購入後、個別ケージに収容し、水および固形飼料を不断に給与して約1ヶ月間の予備飼育を行ったのちに供試した。妊娠家兎の作出は、雄と交配しその直後に確実に排卵を誘起する目的でhCG (ゴナトロピン：帝国臓器) 75IUを耳静脈内に投与して妊娠を誘起した。これらの家兎は、交配後11および35日目にペントバルビタール酸誘導体による全身麻酔下で開腹し、子宮の着床胎児および卵巣の所見について検索した。

### RU486の調製

RU486は、ゴマ油あるいはポリエチレングリコールに20mg/mlになるように調製して投与した。ゴマ油での調製は、まず最初にRU486を99.5%エタノールに溶解し、最終濃度が20mg/mlになるようにゴマ油を添加し、その後、湯煎でエタノールの臭い

がなくなるまで十分にエタノールを気化した。また、ポリエチレングリコールでの調製は、直接RU486を添加して20mg/mlになるように溶解した。

### 投与経路および投与量の検討

交配後11日目に開腹し、着床胎児および妊娠黄体を確認したのちにRU486を投与して、家兎の妊娠を阻止するのに有効な投与経路と投与量との関係について検討した。RU486の投与経路は、静脈内(n=12)、腹腔内(n=10)、筋肉内(n=24)、皮下(n=24)および経口(n=11)であり、いずれも一回投与とした。RU486は、静脈内投与においてはポリエチレングリコールに溶解したものを、他の投与経路ではゴマ油に溶解したものをを用いた。なお、RU486の投与量は、各投与経路により異なるが、0.5～30.0 mg/rabbitの範囲とした。RU486投与後、流産、早産、膣からの出血などについて観察した。

### 投与時期の検討

各試験区4例の家兎を用いて、ゴマ油に溶解したRU486 5mg/rabbitを交配時および交配後3, 7, 11, 18, 25日目に皮下投与した。おな、交配後11, 18および25日目に投与した試験区では、交配後11日目の開腹手術により妊娠していることを確認した個体のみを供試した。RU486投与後、流産、早産、膣からの出血などについて観察した。

## 実験成績

### 投与経路および投与量の検討

家兎の妊娠阻止を目的としたRU486の静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下および経口投与における有効投与量を検討した結果は、Table1～6に示すとおりである。

静脈内投与では、5.0mg/rabbitの投与で供試した4例の全例に妊娠阻止を認めた。しかし、0.5および2.5mg/rabbitの投与では供試全例が分娩し、1.0mg/rabbitの投与では4例中1例に妊娠阻止を認めたにすぎなかった。腹腔内投与では、10.0mg/rabbit投与で供試4例の全例に、1.0および5.0mg/rabbitではそれぞれ2例中1例、4例中2例に妊娠阻止が認められた。筋肉内投与では、2.5mg/rabbit以上の投与で全例に完全な妊娠の阻止が認められた。1.5および2.0mg/rabbitの投与では、いずれも4例中1例、1.0mg/rabbit投与では5例中3例に妊娠の阻止を認めたが、0.5mg/rabbitの投与では供試3例の全例に分娩が認められた。皮下投与では、2.5mg/rabbitの投

Table 1 Relationship between dose and pregnancy inhibition on the single intravenous injection of RU486 at the 11th day after mating

| Dose of RU486 (mg) | No. of Anim. examind | Total No. of implanted fetuses | No. of Anim. showing delivery (%) | Total No. of newborn (%) |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 0.5                | 1                    | 10                             | 1 (100)                           | 7 (70.0)                 |
| 1.0                | 4                    | 37                             | 3 ( 75)                           | 27 (73.0)                |
| 2.5                | 4                    | 43                             | 3 ( 75)                           | 17 (39.5)                |
| 5.0                | 4                    | 40                             | 0 ( 0)                            | — ( 0 )                  |

Table 2 Relationship between dose and pregnancy inhibition on the single intraperitoneal injection of RU486 at the 11th day after mating

| Dose of RU486 (mg) | No. of Anim. examind | Total No. of implanted fetuses | No. of Anim. showing delivery (%) | Total No. of newborn (%) |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 1                  | 2                    | 18                             | 1 (50)                            | 1 ( 5.6)                 |
| 5                  | 4                    | 27                             | 2 (50)                            | 3 (11.1)                 |
| 10                 | 4                    | 23                             | 0 ( 0)                            | — ( 0 )                  |

Table 3 Relationship between dose and pregnancy inhibition on the single intramuscular injection of RU486 at the 11th day after mating

| Dose of RU486 (mg) | No. of Anim. examind | Total No. of implanted fetuses | No. of Anim. showing delivery (%) | Total No. of newborn (%) |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 0.5                | 3                    | 23                             | 3 (100)                           | 14 (60.9)                |
| 1.0                | 5                    | 23                             | 2 ( 40)                           | 13 (56.5)                |
| 1.5                | 4                    | 40                             | 3 ( 75)                           | 12 (30.0)                |
| 2.0                | 4                    | 32                             | 3 ( 75)                           | 15 (46.9)                |
| 2.5                | 4                    | 20                             | 0 ( 0)                            | — ( 0 )                  |
| 5.0                | 4                    | 27                             | 0 ( 0)                            | — ( 0 )                  |

Table 4 Relationship between dose and pregnancy inhibition on the single subcutaneous injection of RU486 at the 11th day after mating

| Dose of RU486 (mg) | No. of Anim. examind | Total No. of implanted fetuses | No. of Anim. showing delivery (%) | Total No. of newborn (%) |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 0.5                | 4                    | 40                             | 4 (100)                           | 33 (82.5)                |
| 1.0                | 4                    | 41                             | 3 ( 75)                           | 30 (73.2)                |
| 1.5                | 4                    | 39                             | 4 (100)                           | 33 (84.6)                |
| 2.0                | 4                    | 32                             | 1 ( 25)                           | 10 (31.6)                |
| 2.5                | 4                    | 34                             | 0 ( 0)                            | — ( 0 )                  |
| 5.0                | 4                    | 33                             | 0 ( 0)                            | — ( 0 )                  |

与で供試全例に、2.0mg/rabbit の投与で 4 例中 3 例に、1.0mg/rabbit では 4 例中 1 例に妊娠阻止を認めた。また、0.5 および 1.5mg/rabbit の投与では全例が分娩した。経口投与では、30mg/rabbit の多量投

与を試みたが妊娠の完全な阻止は認められなかった。なお、15mg/rabbit 投与では 3 例中 2 例において胎児の一部に流産が認められたがその後、正常な産子を分娩した。5.0 および 10.0mg/rabbit 投与では、そ

Table 5 Relationship between dose and pregnancy inhibition on the single oral injection of RU486 at the 11th day after mating

| Dose of RU486 (mg) | No. of Anim. examind | Total No. of implanted fetuses | No. of Anim. showing delivery (%) | Total No. of newborn (%) |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 5                  | 4                    | 34                             | 3 ( 75.0)                         | 22 (64.7)                |
| 10                 | 3                    | 14                             | 1 ( 33.3)                         | 3 (21.4)                 |
| 15                 | 3                    | 13                             | 2 ( 66.7)                         | 2 (15.4)                 |
| 30                 | 1                    | 7                              | 1 (100 )                          | 6 (85.7)                 |

Table 6 Minimum effective dose in various injection route on pregnancy inhibition

| Route of injection | Minimum effective dose on pregnancy inhibition (mg/rabbit) |
|--------------------|--|
| Subcutaneous       | 2.5  |
| Intramuscular      | 2.5  |
| Intraperitoneal    | 10.0   |
| Oral               | 30<*   |
| Intravenous        | 5.0  |

\* Rabbit examined delivered newborn in the administration with 30mg/rabbit of RU486

れぞれ 4 例中 1 例, 3 例中 2 例に妊娠阻止を認めたにすぎなかった。

以上の結果, 各投与方法における完全な妊娠阻止が認められる最少投与量は, 静脈内で 5.0mg/rabbit, 腹腔内で 10.0mg/rabbit, 筋肉内および皮下で 2.5mg/rabbit であり, 経口投与では 30mg/rabbit までの投与を試みたが完全な妊娠阻止は認められなかった。

Table 7 Relation between pregnancy inhibition and the days RU486 injection of 5mg/rabbit, S.C., 0, 3, 7, 11, 18, or 25 days after mating

| Injection of RU486 (Days after mating) | No. of Anim. examined | Total No. of implanted fetuses (11 days after mating) | Delivery | No. of Anim. prevented pregnancy |
|--|-----------------------|---|----------|----------------------------------|
| 0                                      | 4                     | 0   | —        | 4                                |
| 3                                      | 4                     | 0   | —        | 4                                |
| 7                                      | 4                     | 0   | —        | 4                                |
| 11                                     | 4                     | 33  | 0        | 4                                |
| 18                                     | 4                     | 32  | 2 *      | 2                                |
| 25                                     | 4                     | 40  | 3 **     | 1                                |

\* : One of the Anim. aborted 2 days after RU486 injection.

Litter size : 4, 5      Gestation period : 34 day, 31 days

\*\* : One of the Anim. aborted 3 days after RU486 injection.

Litter size : 9, 9, 8      Gestation period : 30 days, 29 days, 30 days

投与時期の検討

RU486 5.0mg/rabbit を交配時, 交配後 3, 7, 11, 18 および 25 日目に皮下投与した結果は, Table7 示すとおりである。

交配時および交配後 3, 7 日目に投与した試験区においては, 交配後 11 日目の開腹手術で供試全例に着床胎児が認められなかった。交配後 11 日目投与の試験区では, 交配後 11 日目すなわち RU486 投与時に供試 4 例で合計 33 個の着床胎児が確認されたが, 1 例の分娩も認めなかった。交配後 18 日目投与の試験区では, 交配後 11 日目の検索において供試 4 例で合計 32 個の着床胎児を認めたが, 2 例が計 9 匹の産子を分娩し, 他の 2 例は分娩を認めなかった。交配後 25 日目投与の試験区では, 交配後 11 日目に供試 4 例で合計 40 個の着床胎児を認め, 3 例が計 26 匹の産子を分娩し, 1 例は分娩を認めなかった。

以上のように, 交配時, 交配後 3, 7, 11 日目の投与では供試全例において完全な妊娠阻止が認められたが, 交配後 18 および 25 日目の投与では, それぞれ 4 例中 2 例, 4 例中 1 例に妊娠阻止を認めたにすぎなかった。

## 考 察

RU486の抗プロゲステロン作用に関する検討は、多くの研究者によって試みられており、抗プロゲステロン作用を期待するのに有効な投与方法と投与量との関係、投与時期は動物種によって大きな差が認められている。これらの報告では、投与が容易な筋肉内あるいは経口投与での検討であり、とくにヒトにおける投与方法は、ほとんどが経口投与である。また、Hodgen<sup>9)</sup>はRU486を含むタンポンを用いて経腔的に投与した成績を報告している。投与量についても研究者によって種々であり、投与時期についても研究目的によって異なっているのが現状である。

本研究では、家兎の妊娠阻止を目的とした各投与経路における有効投与量について検討したが、RU486の妊娠阻止作用を発現するのに有効な投与方法は、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、経口投与の順であることが明らかとなった。このことは、一般に薬理学的に知られている薬物の体内吸収速度による順位と相違が認められた。すなわち、皮下および筋肉内投与における妊娠阻止成績が、静脈内および腹腔内の場合よりも良好であった。これは、吸収速度が遅い皮下、筋肉内投与の方がRU486が持続的に作用し、このことが良好な結果をもたらしたものと考えられる。また、経口投与による検討では、効果がきわめて悪いことが明らかとなった。この要因は、他のステロイド製剤で知られているように腸肝循環において肝で不活性化されるためと考えられる。また、消化管内での変性、管壁からの吸収などの影響により効果が減少した可能性が考えられる。ヒトにおいて検討されているものの多くでRU486は経口投与されているが、投与経路を再検討することでより優れた成績が得られるものと考えられる。また、獣医畜産領域における犬、猫あるいは豚、牛などに応用する場合、最も簡便的確な投与方法は皮下あるいは筋肉内投与であり、RU486の作用効果から考えても皮下、筋肉内投与が優れた投与方法であるといえる。

RU486による妊娠阻止を目的とした投与時期の検討では、妊娠の全期間にわたってRU486の効果を認めたが、供試全例に妊娠阻止を認めた試験区は、交配後11日目までの投与区であり、それ以降の投与では正常に分娩する個体も認められた。また、交配時および交配後3、7日目にRU486を投与した試験区では、妊娠を確認していないため、供試した家兎の全例が正常に排卵、受精したかどうかは不明である。しかし、当教室における正常妊娠の成績は、本実験と同様の方法で妊娠を誘起した場合、その妊娠率は

84% (n=147: 交配後11日目に検索) であり、本研究におけるRU486の妊娠阻止成績は十分に信頼できるものと考えられる。妊娠初期におけるRU486の妊娠阻止に関する検討は、実験動物およびヒトで試みられているが、いずれも良好な妊娠阻止作用が報告されている。本研究においても、妊娠の初期ほど完全な妊娠阻止効果が期待できることが明らかとなった。著者らは、妊娠初期の妊娠阻止作用の要因について検討を試みており、その結果、少なくとも著者らの用いた投与量 (5mg/rabbit, S. C.) では排卵、受精および卵子の発育には全く影響を認めなかった<sup>10)</sup>。しかし、5mg/rabbit, S. C.の投与により完全な着床阻止が認められ、その要因は、卵子の卵管内下降速度の遅延<sup>11)</sup>と子宮内膜の着床性変化の遅延であることを明らかにしている (未発表)。しかし、妊娠初期においてもプロゲステロンは大きく関与しており、RU486が排卵および卵子の発育に対して抑制効果があることが報告されており<sup>12-14)</sup>、RU486の投与量および投与時期の微妙なタイミングなどが関与しているものと思われる。また、近年RU486のエストロゲン、エストロゲンレセプターとの関係、LHサージの抑制などについても明らかにされつつあり<sup>15-20)</sup>、RU486の作用機序を解明するためには、複雑なホルモン抑制作用を考慮しなければならない。家兎では、妊娠の全期間にわたって卵巣からのプロゲステロンによって妊娠が維持されており、胎盤からのプロゲステロンの分泌がないため、両側の卵巣を摘出すると妊娠は維持できない。また、妊娠中のプロゲステロン濃度は、交配後緩やかに増加して12~15日目に最大となり、それ以降、分娩に至るまでに緩やかに減少していくことが知られている<sup>21,22)</sup>。このように、プロゲステロンは妊娠の後期においても妊娠維持には必須のホルモンである。本研究では、交配後18および25日目に投与した試験区でRU486による妊娠阻止を認めなかった個体があったが、いずれも5mg/rabbit, S. C.で検討したものであり、投与量を増加することで妊娠後期においても妊娠阻止を誘起できる可能性があるものと考えている。

以上のように、RU486の妊娠阻止作用を期待するのに有効な投与方法は、皮下および筋肉内投与であり、妊娠の初期ほど有効であることが明らかとなった。なお、抗プロゲステロンに関する検討は、RU486以外にもZK98, 299, ZK98, 734<sup>23)</sup>など種々の製剤でなされており、抗プロゲステロン製剤の基礎研究および臨床応用が強く期待されるものである。

## 謝辞

稿を終わるに臨み、RU486を御提供頂いた Rous-

sel-UCLAF 社に感謝致します。

# 文 献

- 1) Asch, R. H. and Rojas, F. J.: The effects of RU486 on the luteal phase of the rhesus monkey, *J. Steroid Biochem.*, 22: 227, 1985
- 2) Shortle, B., Dyrenfurth, I., Ferin, M.: Effect of an antiprogesterone agent, RU486, on the menstrual cycle of the rhesus monkey, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 731, 1985
- 3) Healey, D. L., Chrousos, G. P., Sculter, H. M., Williams, R.: Pituitary and adrenal responses to the antiprogesterone and antiglucocorticoid steroid RU486 in primates, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 867, 1983
- 4) Sakiz, E., Euvrard, C. and Baulieu, E. E.: The antiprogesterone activity of RU486, a contraceptive agent in the human, *Int. Congr. Ser. Excerpta. Med.*, 655: 239, 1984
- 5) Shaison, G., George, M., Lestrat, N., Reinberg, A. and Baulieu, E. E.: Effect of the antiprogesterone steroid RU486 during midluteal phase in normal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61: 484, 1985
- 6) Bosc, M. J., Germain, G., Nicolle, A., Mouren, M., Philibert, D. and Baulieu, E. E.: Control of birth in rats by RU486, an antiprogesterone compound, *J. Reprod. Fert.*, 79: 1, 1987
- 7) Umez, M., Tadano, M., Furusawa, T., Ishii, S., Masaki, J., Sankai, T., Endo, T. and Sakuma, Y.: Interruption of pregnancy by RU486, an antiprogesterone compound and subsequent reproductivity in rats, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 33: 431, 1988
- 8) 山海 直, 遠藤 克, 金山喜一, 佐久間勇次, 梅津元昭, 正木淳二: 抗プロゲステロン製剤 (RU486) による家兎の妊娠阻止とその後の妊孕性について, *日不妊会誌*, 36: 211, 1991
- 9) Hodgen, G. D.: Pregnancy prevention by intravaginal delivery of a progesterone antagonist: RU486 tampon for menstrual induction and absorption, *Fertil. Steril.*, 44: 263, 1985
- 10) 山海 直, 金山喜一, 遠藤 克, 佐久間勇次, 梅津元昭, 正木淳二: 家兎における RU486 の受精および胚の発育に及ぼす影響, 第5回日本受精着床学会講演要旨, 1987
- 11) 山海 直, 金山喜一, 遠藤 克, 佐久間勇次, 梅津元昭, 正木淳二: 抗プロゲステロン, RU486 が家兎卵子の下降速度および発育ステージに及ぼす影響, *日本受精着床学会雑誌*, 6: 176, 1989
- 12) Uem, F. H. M., Hsiu, J. G., Chillik, C. F., Danforth, D. R., Ulmann, A., Baulieu, E. E. and Hodgen, G. D.: Contraceptive potential of RU486 by ovulation inhibition: I. pituitary versus ovarian action with blockade of estrogen-induced endometrial proliferation, *Contraception*, 40: 171, 1989
- 13) Danforth, D. R., Dubois, C., Ulmann, A., Baulieu, E. E. and Hodgen, G. D.: Contraceptive potential of RU486 by ovulation inhibition: III. preliminary observations on once weekly oral administration, *Contraception*, 40: 195, 1989
- 14) Psychoyos, A. and Prapas, I.: Inhibition of egg development and implantation in rats after post-coital administration of the progesterone antagonist RU486, *J. Reprod. Fert.*, 80: 487, 1987
- 15) Wolf, J. P., Hsiu, J. G., Anderson, T. L., Ulmann, A., Baulieu, E. E. and Hodgen, G. D.: Noncompetitive antiestrogenic effect of RU486 in blocking the estrogen-stimulated luteinizing hormone surge and the proliferative action of estradiol on endometrium in castrate monkeys, *Fertil. Steril.*, 52: 1055, 1989
- 16) Haluska, G. J., West, N. B., Novy, M. J. and Brenner, R. M.: Uterine estrogen receptors are increased by RU486 in late pregnant rhesus macaques but not after spontaneous labor, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 181, 1990
- 17) Collins, R. L. and Hodgen, G. D.: Blockade of the spontaneous midcycle gonadotropin surge in monkeys by RU486. A progesterone antagonist or agonist?, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 1270, 1986
- 18) Liu J. H., Garzo, G., Morris, S., Stuenkel, C., Ulmann, A. and Yen, S. S. C.: Disruption of follicular maturation and delay of ovulation after administration of the antiprogesterone RU486, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65: 1135, 1987
- 19) Shoupe, D., Mishell, D. R., Page, M. A., Madkour, H., Spitz, I. M., Lobo, R. A.: Effects of an antiprogesterone RU486 in normal women II: Administration in the late follicular phase, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 157: 1421, 1987
- 20) Luukkainen, T., Heikinheimo, O., Haukkamaa, M. and Lahteenmaki, P.: Inhibition of folliculogenesis and ovulation by the antiprogesterone RU486, *Fertil. Steril.*, 49: 961, 1988
- 21) Hilliard, J., Scaramuzzi, R. J., Penardi, R. and Sawyer, C. H.: Progesterone, estradiol and testosterone levels in ovarian venous blood of pregnant rabbits, *Endocrinology*, 93: 1235, 1973
- 22) Challes, J. R. G., Davis, I. and Ryan, K. T.: The relationship between progesterone and prostagrandin F concentration in the plasma of pregnant rabbits, *Prostagrandin*, 4: 509, 1973
- 23) Puri, C. P., Patil, R. K., Kholkute, S. D., Elger, W. A. G. and Swamy, X. R.: Progesterone antagonist lilepristone: A potent abortifacient in the common marmoset, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161: 248, 1989

**Effective route, dose and time  
of the antiprogesteron Compound  
RU486 administration to prevent  
gestation in rabbits**

Tadashi Sankal\*, Tuyoshi Endo,  
Kiichi Kanayama and Yuzi Sakuma

Department of Veterinary Physiology,  
College of Agriculture and Veterinary Medicine,  
Nihon University, 1866 Kameino Fujisawa,  
Kanagawa 252, Japan

Motoaki Umezu and Junji Masaki

Laboratory of Animal Reproduction,  
Faculty of Agriculture, Tohoku University.  
1-1 Amamiya Tsutsumidori Aoba-ku  
Sendai, Miyagi 981, Japan

**Abstract:** The study compared effects of dose, time and route of antiprogesterone compound RU486 administration on interruption of pregnancy. The animals used were 102 Japanese white rabbits weighing 2.8 to 3.2 kg. They were laparotomized at 11th day after mating to confirm the

presence of implanted fetuses and functioning corpora lutea.

RU486 was administered at 11th day after mating to each animal subcutaneously, intramuscularly, intravenously, intraperitoneally, or orally, to compare with the effect of different administration. The minimum dose for interruption of pregnancy was 2.5mg/rabbit in intramuscular and subcutaneous injection, 5mg/rabbit in intravenous, 10mg/rabbit in intraperitoneal, and over 30mg/rabbit in oral administration. It was revealed that interruption of pregnancy of rabbit was achieved by intramuscular or subcutaneous injection of 2.5mg or more of RU486 per rabbit, and their route were the greatest interrupt effect of pregnancy.

5mg of RU486 was subcutaneously administered into each animal at the time of mating or 3, 7, 11, 18, or 25 days later to compare reveal the effect of different time of administration. RU486 proved to be perfectly effective when given on the same day of mating or 3, 7, and 11 days afterwards, but it was effective in 2 out of 4 cases when given on the 18 days and in only one out of 4 cases when given on the 25 days. RU486 could show the great effect on interrupt of pregnancy when it was given in early period during gestation.

(受付: 1991 年 5 月 9 日)

\* Present address; Tsukuba Primate Center for Medical Science, the National Institute of Health, 1 Hachimandai Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

## A F S 癒着スコア・閉塞スコアを使用した症例の個別化と Microsurgery の適応に関する検討

Assessment of Tubal Competency by The American Infertility Society (A. F. S.)  
Classifications of Adnexal Adhesions and Distal Tubal Occlusion: Indication  
of Microsurgery and In Vitro Fertilization (IVF-ET)

岡山大学医学部産科婦人科

|                  |                  |                  |
|------------------|------------------|------------------|
| 中 塚 幹 也          | 吉 田 信 隆          | 名 越 一 介          |
| Mikiya NAKATSUKA | Nobutaka YOSHIDA | Kazusuke NAGOSHI |
| 平 野 由 紀 夫        | 片 山 隆 章          | 多 賀 茂 樹          |
| Yukio HIRANO     | Takaaki KATAYAMA | Shigeki TAGA     |
| 野 間 純            | 清 水 健 治          | 関 場 香            |
| Jun NOMA         | Kenji SHIMIZU    | Kaoru SEKIBA     |

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

Microsurgery 適応決定のため A F S の分類 (1988 年), 特に癒着スコア, 遠位卵管閉塞スコアの使用を試みた。

[対象・方法] 55 例を対象とし, 術中所見により採点し, 良好側卵管のスコアと術後成績, および再閉塞例に施行した IVF-ET の成績を対比した。

[結果] 癒着スコア 5 点以下の群は 35 例 (63.6%) で, 妊娠率は 28.6%, 子宮外妊娠は 11.4%, 6 点以上の群は 20 例 (36.4%) で, 各 5.0%, 0% だった。閉塞スコアが 5 点の群は 26 例 (47.3%) で, 妊娠率は 38.5%, 子宮外妊娠が 11.5%, 6 点以上の群は 29 例 (52.7%) で, 子宮外妊娠が 3.4% のみだった。両スコアとも低スコア群では, Microsurgery は IVF-ET の成績とほぼ同等, 高スコア群では全く及ばなかった。

[考察] 両スコアは Microsurgery の適応決定に有用であり, 特に遠位卵管閉塞スコアにより Microsurgery 適応を決定し, 他を IVF-ET の適応とすれば妊娠率の向上が予想される。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 125-130, 1992)

### はじめに

Microsurgery の導入により卵管性不妊に対する手術療法の予後は改善し, 有効な治療法として確立しているが, 術後も妊娠に到らない症例も依然として存在する。Microsurgery を施行し, 長期間の経過観察の後, 結局 IVF-ET 施行を要すること多い。Microsurgery と IVF-ET のうち, どちらを第一選択とするかは各施設の状況によって異なり一定の基

準は設定できないが, 倫理問題や経済的な問題, 現時点での IVF-ET の成績などを考慮すると, まずは Microsurgery が選択される場合が多いと考えられる。しかし, IVF-ET の成績が向上<sup>1,2)</sup>し, Microsurgery の成績に近づくに伴い, 卵管性不妊症例の治療法の決定には慎重を要するようになってきている。最も効率的な治療を行うには Microsurgery 有効群を的確に抽出する基準の設定が望まれているが, 現在のところ, 患者の年齢や, 癒着の程度などにより各施

設で経験的に行われているに過ぎず、客観的なものは少ない。このため私達は Microsurgery の適応基準設定のため、症例の個別化を行う目的で、AFS (American Fertility Society) の分類 (1988 年)<sup>3)</sup> の使用を試みた。特に癒着スコア (Adnexal Adhesion Score)、遠位卵管閉塞スコア (Distal Tubal Occlusion Score) に注目し、その有用性を検討した。

### 対象および方法

当科で卵管性不妊症例に対して施行した Microsurgery のうち 1984 年 1 月より 1990 年 3 月までの約 6 年間に施行したものが計 62 例あり、そのうち追跡可能であった 55 例を対象とした。全症例の平均年齢は  $31.1 \pm 4.5$  (以後 Mean  $\pm$  S. D.) 歳で、平均不妊期間は  $5.4 \pm 3.7$  年で、経妊回数が  $0.69 \pm 0.97$ 、経産回数

が  $0.25 \pm 0.69$  であった。また、原発性不妊が 32 例 (58.2%)、続発性不妊が 23 例 (41.8%) で、うち経産婦は 7 例 (12.7%) であった。

Microsurgery 施行時の所見により、A F S の癒着スコア (表 1) と遠位卵管閉塞スコア (表 2) を採点し、左右いずれか良好な状態 (低スコア) の卵管について、これらの症例を分類した。そして両スコアと術後成績とを対比し、また Microsurgery 不成功例に対して施行された IVF-ET の成績も加えて retrospective に検討した。

### 結 果

#### 1. 術式と成績

Gomel の分類 (1980)<sup>4)</sup> を参考に、Microsurgery 施行術式を分類し、各々の症例数と成績を示す (表

表 1 The American fertility society classification of adnexal adhesions

|       | ADHESIONS | < 1/3 Enclosure | 1/3-2/3 Enclosure | > 2/3 Enclosure |
|-------|-----------|-----------------|-------------------|-----------------|
| OVARY | R Filmy   | 1               | 2                 | 4               |
|       | Dense     | 4               | 8                 | 16              |
|       | L Filmy   | 1               | 2                 | 4               |
|       | Dense     | 4               | 8                 | 16              |
| TUBE  | R Filmy   | 1               | 2                 | 4               |
|       | Dense     | 4*              | 8*                | 16              |
|       | L Filmy   | 1               | 2                 | 4               |
|       | Dense     | 4*              | 8*                | 16              |

\* If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

表 2 The American fertility society classification of distal tubal occlusion

| Dist al ampullary diameter      |  | < 3 cm                  | 3-5cm                             | > 5 cm                                |
|---------------------------------|--|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| L                               |  | 1                       | 4                                 | 6                                     |
| R                               |  | 1                       | 4                                 | 6                                     |
| Tubal wall thickness            |  | Normal/Thin             | Moderately Thickened or Edematous | Thick & Rigid                         |
| L                               |  | 1                       | 4                                 | 6                                     |
| R                               |  | 1                       | 4                                 | 6                                     |
| Mucosal folds at neo stomy site |  | Normal/ > 75% Preserved | 35% to 75% Preserved              | < 35% Preserved Adherent Mucosal Fold |
| L                               |  | 1                       | 4                                 | 6                                     |
| R                               |  | 1                       | 4                                 | 6                                     |
| Extent of adhesions             |  | None/Minimal/Mild       | Moderate                          | Extensive                             |
| L                               |  | 1                       | 3                                 | 6                                     |
| R                               |  | 1                       | 3                                 | 6                                     |
| Type of adhesions               |  | None/Filmy              | Moderately Dense (or Vascular)    | Dense                                 |
| L                               |  | 1                       | 2                                 | 4                                     |
| R                               |  | 1                       | 2                                 | 4                                     |

3). 今回は Combination として、一側該当卵管に Adhesiolysis 以外の2つの術式を同時に施行した症例を分類した。

全症例を総合すると妊娠例は11例(20.0%)で、子宮内への妊娠は自然流産例も含めて7例(12.7%)で、子宮外妊娠が4例(7.3%)に見られた。卵管の開存率は、6ヵ月以上開存した症例が32例(65.3%)、6ヵ月未満で再閉塞した症例が17例(34.7%)であった(術後6ヵ月未満や、未検索の症例が6例)。

術式の内訳は Implantation が19例、Fimbriostomy が12例と多かった。成績は卵管の開存率(6ヵ月)は Adhesiolysis のみの場合が85.7%、Implantation が53.3%、Anastomosis が85.7%、Salpingostomy が60.0%、Fimbriostomy が63.6%、Combination が66.7%であった。これに対して妊娠率は Adhesiolysis のみの場合が25.0%、Implantation が26.3%、Anastomosis が42.9%、Salpingostomy が0%、Fimbriostomy が0%、Combination が25.0%であった。このうち子宮外妊娠が Implantation では4例中1例に、Anastomosis では3例中2例に見られた。

再閉塞例のうち IVF-ET を施行した症例が16例あり、総合すると妊娠率が37.5%、子宮外妊娠を除外すると25.0%であった。

## 2. 癒着スコアと成績

A F S の癒着スコアは、左右卵管・卵巣の癒着に

ついてそれぞれ、癒着の程度を2段階(Filmy か Dense か)、癒着範囲を3段階に分け採点し、各側のスコアにより a. Minimal (0-5), b. Mild (6-10), c. Moderate (11-20), d. Severe (21-32)の4段階に評価することになっている。Filmy とは剪刀、電気凝固、レーザー等で出血することなく、また癒着した他の臓器を傷つけることなく剥離できる程度の癒着をさす。

癒着スコアにより、5点以下の群と6点以上の群に分けて成績を検討した(表4)。癒着スコアが5点以下の、癒着が軽度の群は35例(63.6%)で、うち妊娠に到ったのは10例(28.6%)、子宮腔内に妊娠した症例は6例(17.1%)、子宮外妊娠が4例(11.4%)であった。一方、癒着スコアが6点以上の、癒着が高度の群は20例(36.4%)で、妊娠例は Implantation を施行した1例(5.0%)のみであった。妊娠率に関しては、5点以下の群が有意に高く( $P < 0.05$ )、子宮内に妊娠した率も高い傾向が見られた。

また、術後の再閉塞例に施行した IVF-ET の成績を両群で比較すると(表5)、癒着スコア5点以下の群(8例)では全妊娠が2例(25.0%)、そのうち子宮内妊娠が1例(12.5%)、6点以上の群(8例)では全妊娠が4例(50.0%)、そのうち子宮内妊娠が3例(37.5%)であった。

## 3. 遠位卵管閉塞スコアと成績

A F S の遠位卵管閉塞スコアは、Hydrosalpinx な

表3 術式別の成績

| 術式              | 例数 | 子宮内妊娠        | 子宮外妊娠        | 全妊娠数          | 6ヵ月以上開存 |
|-----------------|----|--------------|--------------|---------------|---------|
| Adhesiolysis のみ | 8  | 2            | 0            | 2 (25.0%)     | 85.7%   |
| Implantation    | 19 | 4            | 1            | 5 (26.3%)     | 53.3%   |
| Anastomosis     | 7  | 1            | 2            | 3 (42.9%)     | 85.7%   |
| Salpingostomy   | 6  | 0            | 0            | 0 (0%)        | 60.0%   |
| Fimbriostomy    | 12 | 0            | 0            | 0 (0%)        | 63.6%   |
| Combination     | 4  | 0            | 1            | 1 (25.0%)     | 66.7%   |
| 合計              | 55 | 7<br>(12.7%) | 4<br>(11.4%) | 11<br>(20.0%) | 65.3%   |

表4 癒着スコア (Adnexal Adhesion Score) からみた術後成績

|            | 例数 | 子宮内妊娠        | 子宮外妊娠        | 全妊娠数           |
|------------|----|--------------|--------------|----------------|
| 癒着スコア 5点以下 | 35 | 6<br>(17.1%) | 4<br>(11.4%) | 10†<br>(28.6%) |
| 癒着スコア 6点以上 | 20 | 1<br>(5.0%)  | 0<br>(0%)    | 1†<br>(5.0%)   |
| 合計         | 55 | 7<br>(12.7%) | 4<br>(7.3%)  | 11<br>(20.0%)  |

†  $p < 0.05$

表5 Microsurgery 術後の IVF-ET 施行例の成績

|            | 例数 | 子宮内妊娠        | 子宮外妊娠        | 全妊娠数         |
|------------|----|--------------|--------------|--------------|
| 癒着スコア 5点以下 | 8  | 1<br>(12.5%) | 1<br>(12.5%) | 2<br>(25.0%) |
| 癒着スコア 6点以上 | 8  | 3<br>(37.5%) | 1<br>(12.5%) | 4<br>(50.0%) |
| 合計         | 16 | 4<br>(25.0%) | 2<br>(12.5%) | 6<br>(37.5%) |

表 6 閉塞スコア (Distal Tubal Occlusion score) からみた術後成績

|             | 例数 | 子宮内妊娠          | 子宮外妊娠        | 全妊娠数            |
|-------------|----|----------------|--------------|-----------------|
| 閉塞スコア 5 点   | 26 | 7 †<br>(26.9%) | 3<br>(11.5%) | 10 †<br>(38.5%) |
| 閉塞スコア 6 点以上 | 29 | 0 †<br>(0 %)   | 1<br>(3.4%)  | 1 †<br>(3.4%)   |
| 合 計         | 55 | 7<br>(12.7%)   | 4<br>(7.3%)  | 11<br>(20.0%)   |

†  $p < 0.05$ 

どの病変に見られる様な遠位卵管の状態を捉えるもので、左右の卵管について Ampulla の拡大、壁の肥厚、粘膜皺襞の状態、癒着の程度と癒着のタイプについて採点し、やはり各側のスコアにより a. Minimal (5), b. Mild (6-8), c. Moderate (9-10), d. Severe (11-) の 4 段階に評価する。

遠位卵管閉塞スコアにより、5 点の群と 6 点以上の群に分けて成績を検討した (表 6)。

閉塞スコアが 5 点の、遠位卵管が比較的状态の良い群は 26 例 (47.3%) で、妊娠は 10 例 (38.5%)、子宮内妊娠は 7 例 (26.9%)、子宮外妊娠が 3 例 (11.5%) であった。

また閉塞スコアが 6 点以上の、遠位卵管の状態の不良な群は 29 例 (52.7%) で、Salpingostomy や Fimbriostomy 施行例の割合が大きく、妊娠は 1 例 (3.4%) で、しかも子宮外妊娠であった。全妊娠率も、子宮内妊娠率も、5 点の群が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

術後の再閉塞例に施行した IVF-ET の成績を両群で比較すると (表 7)、閉塞スコア 5 点の群 (4 例) では子宮外妊娠が 1 例 (25.0%) のみで、6 点以上の群 (12 例) では全妊娠が 5 例 (41.7%)、子宮内妊娠が 4 例 (33.3%) であった。

#### 4. 症例の分布

癒着スコアを X 軸、閉塞スコアを Y 軸にとって、症例の分布を見てみた (図 1)。Open Circle で示した正常妊娠例は、癒着スコア 5 点以下、閉塞スコア 5 点の範囲に集中していた。

### 考 察

当科にては、卵管性不妊に対して通常は Microsurgery による手術療法を第一選択としてきたが、必ずしも満足すべき成績は得られていない。他の各施設の報告でも、成績にかなりの格差がみられ、これは機器や技術の違いもあるが、むしろ Microsurgery の適応基準の違いによるところが大きいと考えられる。

表 7 Microsurgery 術後の IVF-ET 施行例の成績

|             | 例数 | 子宮内妊娠        | 子宮外妊娠        | 全妊娠数         |
|-------------|----|--------------|--------------|--------------|
| 閉塞スコア 5 点   | 4  | 0<br>(0 %)   | 1<br>(25.0%) | 1<br>(25.0%) |
| 閉塞スコア 6 点以上 | 12 | 4<br>(33.3%) | 1<br>(8.3%)  | 5<br>(41.7%) |
| 合 計         | 16 | 4<br>(25.0%) | 2<br>(12.5%) | 6<br>(37.5%) |

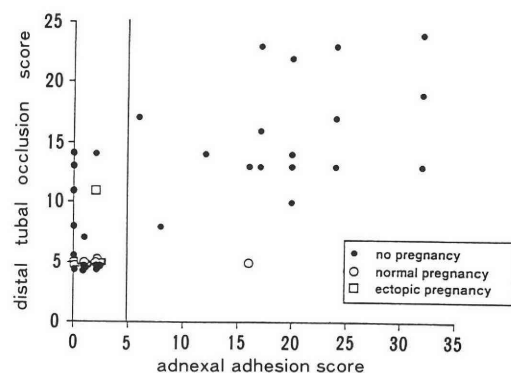


図 1 スコアと予後

特に IVF-ET の成績向上に伴い、Microsurgery の適応は厳密に設定する必要に迫られている。

Microsurgery と IVF-ET の比較は時代とともに見解が変化してくると考えられる<sup>5,6)</sup>が、Marana and Quagliarello (1988)は、Microsurgery と IVF-ET との成績に関する最近の報告を総合し、遠位卵管閉塞<sup>7)</sup>と近位卵管閉塞<sup>8)</sup>に分けて両治療法を比較している。これによると、近位卵管閉塞 (9 報告, 187 症例) では、Microsurgery の術後成績は全妊娠率が 62%、子宮内妊娠率が 58%、子宮外妊娠率が 4%であり、また遠位卵管閉塞 (14 報告, 1275 症例) では全妊娠率が 33%、子宮内妊娠率が 26%、子宮外妊娠率が 8%となっている。これに対して IVF-ET (35 報告, 7745 ET) では、全妊娠率 (per ET) が 19%で、うち子宮内妊娠率が 98%、子宮外妊娠率が 2%となっている。そして、近位卵管閉塞例では Microsurgery を第一選択に、遠位卵管閉塞例では Mild から Moderate の程度なら、Microsurgery を、Severe では IVF-ET を第一選択にすべきであるとしている。

当科でも、Microsurgery の術式に関して言えば、従来の報告と同様に Salpingostomy や Fimbriostomy では、良好な卵管の開存率に比較して、妊娠率は低い。同術式施行群の再閉塞例に対する IVF-ET の成績にも勿論及んでいない。また、Anastomosis についても、その部位によって (特に卵管膨大部の侵

襲が強い症例と思われるが), 子宮外妊娠となる率が高くなる。このように施行した術式によって経験的に予後を予想するのみではなく, 卵管の状態を正確に捉える, 客観的な指標が得られれば, Microsurgery か IVF-ET かの選択に有用であろう。

今回使用した AFS の分類は, 感染, 卵管結紮, 奇形などその原因を問わず, 子宮, 卵管, 卵巣にわたって起こった機械的障害を分類するための基準として作製されたもので, 本来は6つのシートから成っており今回使用した癒着スコア, 遠位卵管閉塞スコアはその一部でしかないが, スコアリングできることから容易に応用できる。

癒着スコア別に Microsurgery と IVF-ET との成績を比較すると, 5点以下の群では, Microsurgery 施行後の全妊娠率は28.6%, 子宮内妊娠が17.1%に見られ, 同群の内, 再閉塞した症例に対して施行した IVF-ET の成績(各25.0%, 12.5%)とほぼ同等であった。6点以上の群では妊娠は5.0%に見られたのみで IVF-ET の成績には全く及ばなかった。Microsurgery の適応を5点以下とすると適応になるのは35例(63.6%)となる。

遠位卵管閉塞スコア別に両者の成績を比較すると, 5点の群では, Microsurgery 術後の全妊娠率は38.5%, 子宮内妊娠も26.9%であり, 同群の内, 再閉塞した症例に対して施行した IVF-ET の成績(各25.0%, 0%)を上まわった。6点以上の群では子宮外妊娠が3.4%にみられたのみで IVF-ET の成績に及ばなかった。Microsurgery の適応を5点の群のみとすると症例は26例(47.3%)にしばらく, 術後成績も良好であるとともに, 術後再閉塞のため IVF-ET を施行する症例も減少する。

以上のことから両スコアが Microsurgery の予後の推定, すなわち適応決定に有用であると考えられる。

以前から, 癒着の種類や程度のみを評価して, Microsurgery の予後との関連を検討した報告<sup>9,10,11)</sup>があるが, 必ずしも予後を反映したものばかりではない。Rock ら<sup>12)</sup>は Salpingostomy の成績に影響を与える因子として Hydrosalpinx の直径, 卵管采の状態, 癒着の程度, Hysterosalpingography での粘膜皺襞の状態をあげている。これらの総合評価により, 遠位卵管の異常に関して Mild, Moderate, Severe の3段階に分類し, この3群間に術後成績に有意差を認めている。Hulka ら<sup>13)</sup>は卵巣の癒着状態, 癒着の程度, 卵管采の疎通性, 卵管峡部の疎通性の評価を基に分類し, 術後予後を反映していたと報告している。これら2者はスコアリングの形式はとっていないが, Wu ら<sup>14)</sup>は癒着, 卵管炎, 卵管閉塞の状態をそれぞれ採点し, その

合計によって症例を5段階に分類しており, やはり術後予後に有意差を認めている。今回, 私達が使用した AFS の両スコアも複数の因子を評価する点で同系列に属し, 術後予後を反映するとともに, 更には, 術前に的確に把握することで, Microsurgery の適応決定にも使用できる。

しかし実際には, 検査の段階でどの程度正確にスコアを把握できるかが問題となる。癒着スコアに関しては腹腔鏡検査下に癒着剥離を行えば, 治療とともに filmy か dense かの判定もでき, スコアリング可能である。遠位卵管閉塞スコアに関しても, やはり腹腔鏡で癒着の状態は判定でき, Hydrosalpinx 等の直径も測定可能である。粘膜皺襞の状態に関しては, Hysterosalpingography である程度判定できるが, 腹腔鏡下の Microbiopsy による ciliation index の判定を施行することで, さらに情報が得られるとともに, 卵管壁の厚さも判明する。また Salpingoscopy の使用<sup>15)</sup>も有用であろう。

#### まとめ

卵管性不妊に対する治療として Microsurgery は有効な方法であり, 現在もさらなる改良が行われており, 成績の向上が期待されている。しかし一方では IVF-ET の進歩も著しく, Microsurgery の適応は限定されていく傾向にある。この適応決定のために可能な限り客観的な指標として, AFS の癒着スコアと遠位卵管閉塞スコアを使用した。両者とも有用であったが, 特に遠位卵管閉塞スコアにより Microsurgery 適応を決定し, 他を IVF-ET の適応とすれば妊娠率の向上が予想される。

#### 文 献

- 1) Medical Research International Society for Assisted Reproductive Technology. 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) Medical Research International Society for Assisted Reproductive Technology. The American Fertility Society: In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1989 results from the IVF-ET Registry, *Fertil. Steril.*, 55: 14, 1991
- 3) The American Fertility Society: The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, Mullerian anomalies and intrauterine

adhesions, *Fertil. Steril.*, 49: 944, 1988

- 4) Gomel, V.: Classification of operations for tubal and peritoneal factors causing infertility, *Clin. Obst. Gynecol.*, 23: 1259, 1980
- 5) Hedon, R., Dejean, R., Daure, J. P., Mares, P., Valentin, B., Viala, J. L. and Durand, G.: In vitro fertilization and microsurgery, *Acta Eur. Fertil.*, 14: 17, 1983
- 6) Schoysman, R.: Tubal microsurgery versus in vitro fertilization, *Acta Eur. Fertil.*, 15: 5, 1984
- 7) Marana R. and Quagliarello, J.: Distal tubal occlusion: Microsurgery versus in vitro fertilization—A review, *Int. J. Fertil.*, 33: 107, 1988
- 8) Marana, R. and Quagliarello, J.: Proximal tubal occlusion: Microsurgery versus IVF—A review, *Int. J. Fertil.*, 33: 338, 1988
- 9) Bronson, R. A. and Wallach, E. E.: Lysis of periadnexal adhesions for correction of infertility, *Fertil. Steril.*, 28: 613, 1977
- 10) Capsi, E., Halperin, Y. and Bukovsky, L.: The importance of periadnexal adhesions in tubal reconstructive surgery for infertility, *Fertil. Steril.*, 31: 296, 1979
- 11) Tulandi, T.: Salpingo—ovariolysis: a comparison between laser surgery and electrosurgery, *Fertil. Steril.*, 45: 489, 1986
- 12) Rock, J. A., Katayama, K. P., Martin, E. J., Woodruff, J. D. and Jones, H. W. Jr.: Factors influencing the success of salpingostomy techniques for distal fimbrial obstruction, *Obstet. Gynecol.*, 52: 591, 1978
- 13) Hulka, J. F.: Adnexal adhesion: A prognostic staging and classification system based on a five—year survey of fertility surgery results at Chapel Hill, North Carolina, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 144: 141, 1982
- 14) Wu, C. H. and Gocial, B.: A pelvic scoring system for infertility surgery, *Int. J. Fertil.*, 33: 341, 1988
- 15) Puttemans, P., Brosens, I. A., Delattin, P. H., Vasquez, G. and Boeckx, W.: Salpingoscopy versus hysterosalpingography in hydrosalpinges, *Hum. Reprod.*, 2: 535, 1987

**Assessment of tubal competency by  
The American Infertility Society  
(AFS) classification of adnexal  
adhesions and distal tubal occlusion:**

**Indication of microsurgery and  
In Vitro Fertilization (IVF—ET)**

Mikiya Nakatsuka, Nobutaka Yoshida,  
Kazusuke Nagoshi, Yukio Hirano,  
Takaaki Katayama, Shigeki Taga,  
Jun Noma, Kenji Shimizu  
and Kaoru Sekiba

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

It is said that the success of IVF—ET has established it as an alternative to microsurgery in the treatment of infertility associated with tubal occlusion. At this time, it is obscure for us to select microsurgery or IVF—ET, initially. To answer this question, we compare the pregnancy outcome of microsurgery to IVF—ET based on AFS classification.

Tubal competencies of 55 patients, undergone reconstructive microsurgery for infertility from 1984 to 1990 in Okayama University Hospital, were assessed by AFS classification (1988) containing scoring systems for adnexal adhesions and distal tubal occlusion. We categorized patients into two groups according as their scores were more than 5 or not.

Poorer prognosis for conception was observed in the patients with higher scores in both scoring systems. The pregnancy rate of those who had higher adnexal adhesion score was 5.0% after microsurgery. And it was lower than that of IVF—ET (50.0%) in the same group. In the group with high distal tubal occlusion scores, the pregnancy rate were 3.4% after microsurgery and 41.7% after IVF—ET, respectively.

In the group of patients, whose tubal competency were relatively remained, microsurgery and IVF—ET was almost equally effective.

An significant relationship was recognized between the scores and the pregnancy rate in microsurgery. Our results show that both scoring systems are important prognostic parameters for microsurgery. Improvement of the prognosis will be obtained, if we adopt this scoring systems for the indication of microsurgery.

(受付: 1991 年 3 月 30 日)

## 4～8細胞期胚卵管内移植の臨床応用とその成績

### The Clinical Application and Results of Intrafallopian Transfer of 4～8 Cell Stage Embryo (EIFT)

順天堂大学医学部産婦人科学教室 (主任: 高田道夫教授)

岡 部 親 宣      田 中      温      高 田 道 夫  
Chikayoshi OKABE      Atsushi TANAKA      Michio TAKADA

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

不妊期間が3年以上の夫婦20組に対し、4～8細胞期胚卵管内移植 (Embryo intrafallopian transfer: EIFT) を施行し、その妊娠率に関して IVF-ET および GIFT の成績と比較検討した。3群間で年齢、採卵時E<sub>2</sub>値、採卵数および胚移植数などの背景因子に、有意差を認めなかった。それぞれの妊娠率は EIFT が対周期、对患者いずれも 65 %、IVF-ET が対周期 23 % (121/526)、对患者 28 % (121/432)、GIFT が対周期 32 % (81/253) 对患者 36 % (81/225) であり、EIFT と IVF-ET、GIFT 両者との間に統計学的有意差を認めた。流産率、子宮外妊娠率は3群間に有意差を認めなかった。多胎妊娠率は EIFT にやや高い傾向を認めた。これらのことより EIFT は① IVF-ET に比べ卵管内の生理的な発育環境が得られる点で有利である② GIFT に比べ、外科的操作の前に受精分割および embryo loss を確認できる点で有利である。よって、胚一個あたりの妊娠率が最も高くなることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 131-137, 1992)

#### 緒 言

不妊症治療の領域において最近の進歩は目ざましく、本邦においても体外受精胚移植 (IVF-ET) および配偶子卵管内移植 (GIFT) は定着しつつあり、その治療成績も向上してきている。IVF-ET は高度卵管通過障害に対する唯一の手段であることに加え、in vitro で受精を確認できるという利点はあるが、未だその妊娠率において GIFT に劣ると言われている。一方、GIFT は受精能の卵管内因子による獲得などの点で IVF-ET よりも、より生理的ではあるが、受精を確認しておらず、その妊娠不成功例の中には受精し得なかった症例も比較的多いとされている。卵管内は受精、卵割の最適の環境であり、動物実験の成績では8細胞期胚までは子宮内より卵管内の方が妊娠率が高いことが報告されている<sup>1)</sup>。今回我々は体外受精胚移植の妊娠率の向上を目的として、4～8細胞期胚を卵管内に移植する方法、すなわち embryo

intrafallopian transfer (EIFT)を行いその臨床成績を検討した。

#### 対 象

昭和63年7月から平成2年7月までの期間に不妊を主訴として来院し、HSG透視下で少なくとも一側の卵管の正常な通過性を確認し得た20組の夫婦を対象とした。年齢分布は26～41歳、平均年齢は34.0±1.1歳 (mean±se, 以下同様) であった。不妊期間は3～16年で平均不妊期間は8.3±1.1年であった。不妊原因は表1のように男性因子8例、卵管采部癒着例3例、子宮内膜症合併例1例で、原因不明のものが8例であった。また今回我々がEIFTを施行するに至った20組の夫婦は、いずれも過去にGIFTおよびIVF-ET失敗例であり、その内訳はGIFT失敗例4例、IVF-ET失敗例16例そのうちETチューブを円滑に挿入し得なかったもの12例、ETチューブを円滑に挿入し得たにもかかわらず妊

表1 EIFT 施行患者の不妊原因

| Causes of infertility<br>(EIFT) |   |
|---------------------------------|---|
| Unexplained infertility         | 8 |
| Male factor                     | 8 |
| Perifimbrial adhesion           | 3 |
| Endometriosis                   | 1 |

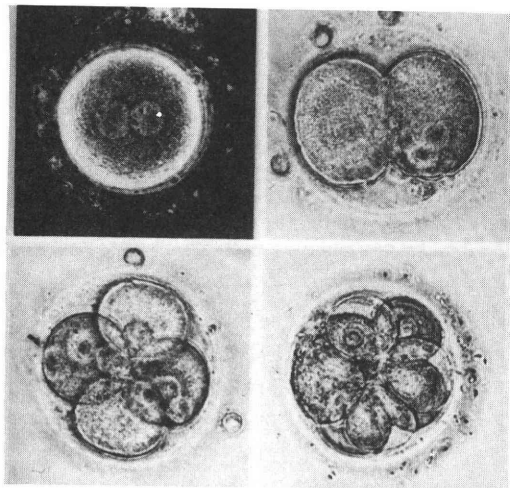


図1 前核期胚～8細胞期胚の顕微鏡像

娠に至らなかったもの4例であった。

### 方 法

1) 過排卵誘発の方法には以下の3方法を用いた。

6例に対して clomiphene (Serophene—Serono laboratories)—HMG (Humegon—Organon 社) 療法を施行した。月経5日目より clomiphene 100 mg を経口にて連日投与し、同日より HMG を最初の2日間 300 mg 筋注し、残りは主席卵胞の直径が約 20 mm となり、同時に血中  $E_2$  値が 1500 pg/ml に達するまで連日 150 mg を筋注し、その翌日に HCG (Gonotropin—帝臓社) 6000～9000 単位を投与した。

3例に対しては short protocol を施行した。本法は月経初日より LH—RH agonist (suprecure—Organon 社) を経鼻的に1日3回投与し、HCG 投与直前まで連日投与した。同時に月経3日目より最初の2日間 HMG 300mg、以後 150 mg を連日投与した。

9例に対し long protocol を施行した。本法は月経初日より 14 日間 LH—RH agonist を投与し、血中  $E_2$  値が 20 pg/ml 以下になった時点で HMG を投与した。なお、本法において十分な down regulation が得られず血中  $E_2$  値が 20 pg/ml 以下に成り得なかった症例に対しては、随時 LH—RH agonist を追加使

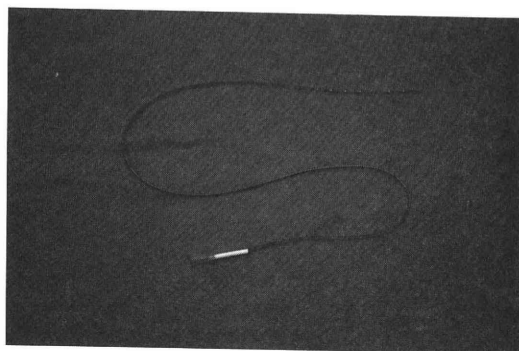


図2 EIFT に用いた GIFT チューブ

用した。

2例に対し original protocol を施行した。本法は高温相初日より LH—RH を使用し、次の月経周期第3日目より HMG を連日投与した。

なお、long protocol および original protocol の HMG 投与方法は short protocol のそれに準じた。また、いずれの protocol も HCG への切り換えのタイミングは clomiphene—HMG 療法のそれに準じた。おのおのの過排卵刺激法によって成熟した卵子は HCG 投与 37～38 時間後に経膈超音波下に採卵された。

2) 採卵された卵子のみが直ちに 10 % 非働化血清添加 HTF に移され、 $O_2$  5 %,  $CO_2$  5 %,  $N_2$  90 % の 3 種混合ガスを約 30 秒間吹き込んだ後、密栓して 37°C インキュベーター内に静置された。採取された精液は 20～30 分液化後 10 % 非働化血清添加 HTF を加え、1300 回転 10 分間の遠心を 2 度行い、得られた pellet は swim up 法により運動良好な精子のみが集められ、再び 3 種混合ガスを吹き込んだ後 37°C インキュベーター内に静置された。次に、すでに採卵後 4～12 時間の前培養しえた卵子を  $30 \sim 50 \times 10^4$ /ml に調整された精子と媒精した。媒精 6～8 時間後に受精卵は 20 % 非働化血清添加 HTF の培養液に移された。採卵 48～64 時間後に倒立顕微鏡下に受精卵を観察し、図 1 下段に示すように割球の大きさが均等に発育した 4～8 細胞期胚のみを卵管内移植した。尚、図 1 上段は左より前核期胚および 2 細胞期胚であり、これらは移植されなかった。

3) EIFT の外科的操作とその後の処置は GIFT のそれに準じ、腹腔鏡下に無鉤把持鉗子にて注意深く卵管采をつかみ右下腹部より挿管した GIFT 管より、図 2 で示された GIFT チューブ (富士システム社) を卵管膨大部中央付近と思われる卵管内側 5～6 cm

の部位まで挿入し、胚移植を施行した。図 3 にこの時の腹腔鏡像を示した。なおこの時、分割卵は約 20  $\mu$ l の 100 % 非働化血清と共に移植された。EIFT に用いた分割卵は最高 4 個とし、残りは凍結保存した。4) EIFT 後の対処として、すべての患者は当日入院、ベッド上安静とし、翌日退院とした。又、術当日よりエストロゲン、プロゲステロン合剤 (pranoval-日本ワイス社) を連日 1 錠ずつ 14 日間経口投与した。EIFT 施行後 20 日間 BBT 上高温相を示したものに對し妊娠反応 (gonacrome S-帝臓社) を行い、陽

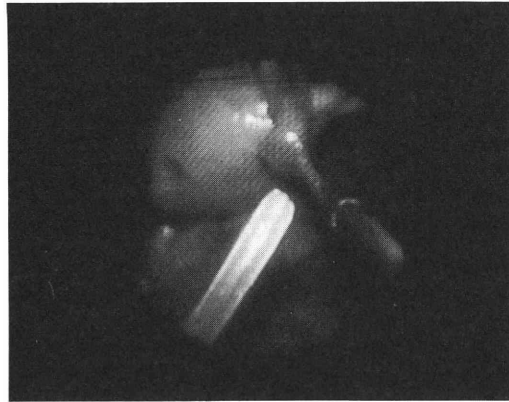


図 3 EIFT 施行時の腹腔鏡像

性例に対しては経腔超音波により胎児心拍が確認されるまで HCG 5000iu を 3 日に 1 回の割合で投与した。

結 果

1. EIFT の臨床成績

表 2 に対象 20 例に対する各過排卵刺激のプロトコール、採卵数、分割卵数、分割率、各分割卵のステージおよびその数、妊娠の有無を示した。採卵数は 2 ~ 21 個の範囲で、その平均は  $10.9 \pm 1.22$  個、分割卵数は 2 ~ 21 個の範囲でその平均は  $6.4 \pm 0.56$  個、分割率は 24 ~ 100 % の範囲でその平均は 59.0 % であった。精子数は  $5 \sim 161 \times 10^6 / \text{ml}$  の範囲でその平均は  $61.2 \pm 10.29 \times 10^6 / \text{ml}$ 、精子運動率は 20 ~ 90 % の範囲で、その平均は  $48.3 \pm 5.35$  % であった。表 3 は EIFT の臨床成績を示したものである。妊娠例は 20 例中 13 例でその妊娠率は 65 % であった。又、流産例は 2 例でその割合は 15 % であった。多胎妊娠は 5 例で其の割合は 38 % であり、その内訳は双胎 3 例、品胎 2 例で子宮外妊娠は無かった。表 4 は EIFT の適応となった症例の原因別に分けた妊娠数及び妊娠率を示したもので、おのおの ET チューブ挿入困難例が 12 例中 8 例 (75 %)、IVF-ET 失敗例が 4 例中

表 2 EIFT 施行患者の clinical data

|                                       | 1         | 2          | ③               | 4                | 5                | 6         | 7                | 8          | ⑨         | 10        | 11         | 12                 | 13        | 14         | 15                           | 16        | 17        | 18        | 19        | 20        |
|---------------------------------------|-----------|------------|-----------------|------------------|------------------|-----------|------------------|------------|-----------|-----------|------------|--------------------|-----------|------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Age                                   | 38        | 35         | 38              | 34               | 30               | 41        | 41               | 35         | 27        | 38        | 26         | 32                 | 27        | 39         | 40                           | 30        | 36        | 32        | 31        | 29        |
| Duration of infertility (years)       | 12        | 8          | 12              | 6                | 8                | 16        | 4                | 7          | 4         | 15        | 3          | 7                  | 3         | 16         | 15                           | 4         | 8         | 6         | 5         | 7         |
| Hyperstimulation protocol             | Long      | Original   | Long            | Short            | Short            | Long      | Long             | Long       | Short     | CL+HMG    | CL+HMG     | Long               | Long      | CL+HMG     | CL+HMG                       | CL+HMG    | Long      | Long      | Original  | CL+HMG    |
| No. of oocytes recovered              | 13        | 14         | 19              | 9                | 6                | 7         | 3                | 13         | 21        | 15        | 19         | 11                 | 6         | 3          | 2                            | 8         | 9         | 13        | 14        | 12        |
| No. of aggs cheavaged (cleavage rate) | 7<br>(54) | 11<br>(79) | 9<br>(47)       | 6<br>(67)        | 4<br>(67)        | 6<br>(86) | 3<br>(100)       | 10<br>(77) | 5<br>(24) | 6<br>(40) | 10<br>(53) | 8<br>(73)          | 4<br>(67) | 3<br>(100) | 2<br>(100)                   | 5<br>(63) | 6<br>(67) | 8<br>(62) | 7<br>(50) | 7<br>(58) |
| Cleavage cell stage                   | 432       | 642        | 864             | 42               | 42               | 42        | 42               | 6432       | 864       | 4         | 432        | 42                 | 42        | 42         | 4                            | 4         | 42        | 42        | 42        | 42        |
| No. of embryos                        | 421       | 281        | 324             | 22               | 13               | 51        | 21               | 3412       | 113       | 6         | 424        | 44                 | 13        | 21         | 2                            | 5         | 42        | 62        | 34        | 43        |
| Pregnancy                             | +         | +          | +               | +                | +                | +         | +                | +          | +         | -         | +          | +                  | +         | -          | -                            | -         | -         | +         | -         | -         |
|                                       | (Twin)    |            | (Triplet)       |                  | (Aborton)        |           | (Aborton)        |            | (Twin)    |           |            | (Triplet)          |           |            |                              |           |           |           |           |           |
|                                       | ND        | ND         | C.Sec           |                  |                  |           |                  |            |           |           |            |                    |           |            |                              |           |           |           |           |           |
| Sperm count $\times 10^6$             | 60        | 40         | 50              | 5                | 8                | 161       | 15               | 40         | 50        | 40        | 70         | 150                | 150       | 80         | 80                           | 40        | 40        | 90        | 30        | 25        |
| Sperm motility %                      | 30        | 80         | 50              | 20               | 20               | 90        | 20               | 65         | 50        | 60        | 80         | 70                 | 30        | 50         | 20                           | 60        | 60        | 70        | 20        | 20        |
| Infertility causes                    | Asthen    | PFA        | U.I.<br>Post 3D | Oligo-<br>Asthen | Oligo-<br>Asthen | U.I.      | Oligo-<br>Asthen | U.I.       | PFA       | U.I.      | U.I.       | Endome-<br>triosis | Asthen    | U.I.       | Asthen<br>Endome-<br>triosis | U.I.      | PFA       | U.I.      | Asthen    | Asthen    |

3例(75%), GIFT失敗例が4例中1例(25%)であった。

2. EIFTによる妊娠群と非妊娠群の臨床データの分析

#### 1) 年齢と不妊期間

妊娠群と非妊娠群における年齢の平均値はそれぞれ $33.5 \pm 1.42$ 歳および $34.7 \pm 1.74$ 歳, 不妊期間の平均値はそれぞれ $7.4 \pm 1.08$ 年および $10.9 \pm 1.95$ 年であり, 不妊期間において非妊娠群の方が長期間である傾向を示した。

#### 2) 不妊原因

妊娠群と非妊娠群の不妊原因をあげると, 妊娠群では男性因子および原因不明が38.4% (5/13), 卵管周囲癒着が16.1% (2/13), 子宮内膜症が7.7% (1/13)であった。非妊娠群では男性因子および原因不明が42.8% (3/7) 卵管周囲癒着が14.3% (1/7)であった。

#### 3) 精液性状

妊娠群における平均精子および平均精子運動率はそれぞれ $6830 \pm 15.0 \times 10^4 / \text{ml}$ ,  $51.9 \pm 7.10\%$ で, 非妊娠群ではそれぞれ $4790 \pm 8.58 \times 10^4 / \text{ml}$ ,  $41.4 \pm 7.69\%$ であり, 妊娠群の方が精液所見が良好である傾向が認められた。

#### 4) 過排卵誘発のプロトコール

LH-RH agonistを用いた症例15例中13例が妊娠に至った(86.6%)。その内訳はlong protocol 8例, short protocol 3例, original protocolが2例であった。一方clomid-HMG-HCG療法により妊娠に至ったものは6例中1例(16.7%)にとどまり, これよりLH-RH agonistによる過排卵誘発法はclomid-HMG-HCGによる方法よりも有効であると考えられた。

表3 EIFTの臨床成績

|           |     |                                |
|-----------|-----|--------------------------------|
| 妊 娠 率     | 65% | (13/20)                        |
| 流 産 率     | 15% | ( 2/13)<br>(clinical abortion) |
| 多 胎 妊 娠 率 | 38% | ( 5/13)<br>( 双胎 3<br>品胎 2 )    |
| 子 宮 外 妊 娠 | 0   |                                |

#### 5) 平均採卵数と分割率

妊娠群の平均採卵数及び分割率はそれぞれ $11.8 \pm 1.55$ 個, 65.8%であった。非妊娠群ではそれぞれ $9.0 \pm 1.93$ 個, 68.3%であり, 両者間に有意差は見られなかった。

#### 6) 各 cell stage とその個数

妊娠群13例のうち, そのcell stageが4細胞期以上に发育した胚が4個以上得られたものが9例(77.8%)あったのに対し4個未満のものは4例(22.2%)であった。このことより4細胞期以上に发育した胚が4個以上得られた場合, 妊娠率は高い傾向を示すと思われた。

#### 3. EIFT, IVF-ET, GIFT 各群における比較

##### 1) 背景因子の比較

EIFT, IVF-ET, GIFTの3群間の背景因子について比較検討した。表5のように平均年齢はそれぞれ $34.0 \pm 1.08$ ,  $32.4 \pm 7.80$ ,  $34.5 \pm 6.40$ 歳であった。採卵時の血清 $E_2$ 値(pg/ml)はそれぞれ $2369 \pm 680$ ,  $2276 \pm 611$ ,  $2537 \pm 507$ であった。採卵数はそれぞれ $10.9 \pm 1.22$ ,  $11.4 \pm 6.40$ ,  $6.9 \pm 7.50$ 個であった。平均年齢, 血清 $E_2$ 値, 採卵数のいずれにおいても3群間に統計学的有意差を認めなかった。また, EIFT, IVF-ETの胚移植数およびGIFTの卵子移植数はいずれも4個とした。

##### 2) EIFT, IVF-ET, GIFT 各群における妊娠率, 流産率, 多胎妊娠率, 子宮外妊娠発生率の比較

それぞれの妊娠率は表6のように, EIFTがper cycle 及び per patient で65% (13/20), IVF-ETがper cycle で23% (121/526), per patient で28% (121/432), GIFTがper cycle で32% (81/253), per patient で36% (81/225)であった。EIFTとIVF-ETの間にはper cycle, per patient いずれにおいても $P < 0.001$ , の危険度で統計学的有意差を認めた。またEIFTとGIFTの間にも, per cycle で $P < 0.01$ , per patient で $P < 0.05$ の危険度で統計学的有意差を認めた。

表4 EIFTの適応とそれぞれにおける妊娠率

| 適 応        | 症例数 | 妊娠率        |
|------------|-----|------------|
| ET チープ困難例  | 12  | 75% (8/12) |
| IVF-ET 失敗例 | 4   | 75% (3/4)  |
| GIFT 失敗例   | 4   | 25% (1/4)  |

表5 EIFT, IVF-ET, GIFT 各群における背景因子

|                            | EIFT           | IVF-ET         | GIFT           |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| age (y.o.)                 | 34.0           | $32.4 \pm 7.8$ | $34.5 \pm 6.4$ |
| $E_2$ value (pg/ml)        | $2369 \pm 680$ | $2276 \pm 611$ | $2537 \pm 507$ |
| number of oocyte recovered | $10.9 \pm 3.7$ | $11.4 \pm 6.4$ | $6.9 \pm 7.5$  |

表6 EIFT, IVF-ET, GIFT 各群における妊娠率, 流産率, 多胎妊娠率の比較

|                         | EIFT                  | IVF-ET                   | GIFT                      |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| pregnancy rate          |                       |                          |                           |
| 1. per cycle            | $\frac{13}{20}$ (65%) | $\frac{121}{526}$ (23%)* | $\frac{81}{253}$ (32%)**  |
| 2. per patient          | $\frac{13}{20}$ (65%) | $\frac{121}{432}$ (28%)* | $\frac{81}{225}$ (36%***) |
| abortion rate           | $\frac{2}{13}$ (11%)  | $\frac{17}{121}$ (14%)   | $\frac{10}{81}$ (11%)     |
| multiple pregnancy rate | $\frac{5}{13}$ (38%)  | $\frac{27}{121}$ (22%)   | $\frac{19}{81}$ (23%)     |

\*  $P < 0.001$  ( $\chi^2 = 16.15$ )\*\*  $P < 0.01$  ( $\chi^2 = 7.53$ )\*\*\*  $P < 0.05$  ( $\chi^2 = 5.36$ )

意差を認めた。それぞれの流産率はEIFTが11%(2/13), IVF-ETが14%(17/121), GIFTが11%(10/81)であった。それぞれの子宮外妊娠発生率はEIFTが0%(0/20), IVF-ETが3%(4/121), GIFTが2%(2/81)であった。流産率, 子宮外妊娠発生率に関して3群間に有意差を認めなかった。またそれぞれの多胎妊娠率はEIFTが38%(5/13): (双胎3例, 胎胎2例), IVF-ETが22%(27/121): (双胎21例, 胎胎5例, 要胎1例), GIFTが23%(19/81): (双胎13例, 胎胎5例, 要胎1例)であり, EIFTがIVF-ET及びGIFTに比べ高い傾向を示した。

## 考 察

1978年EdwardsらによってIVF-ETによる妊娠第1例が報告されて以来, 本法は過排卵処理法の進歩, さらに培養液やチューブの改良に伴い, その妊娠率は徐々に向上してきている。本法は体外で受精, 分割した胚をそのまま子宮内に移植する方法ではあるが, 妊娠率はGIFTに比べいまだに低い。従来, 卵管内生理や卵管上皮組織に関する知見は乏しく未解決の分野が多かったが, 近年, 卵管内因子解明の必要性が指摘されるようになって以来, いくつかの研究成果が報告されている<sup>2-10)</sup>。卵管はまず①卵管采で卵子をpick upし, 受精の場である膨大部へ移送し②受精を助け③分割の過程で胚に栄養を補給し④さらに胚に何らかのcapacitationを与えながら子宮に移送し, 着床を助ける。このように卵管は生殖にとって不可欠の役割を果たしていると考えられている。

受精卵に対する卵管因子に関する研究は, 1962年Biggers, Brinsterらによる卵管・受精卵共培養実験に始まった。in vitroではほとんど8細胞期で発育が

停止してしまう系のマウスの前核期胚を, 切り出した卵管と4日間共培養し, 106例中69例(65.1%)をblastocyst, 14例(13.2%)をmorulaまで発育させた<sup>2)</sup>。1967年Whittingamらはin vitroでは2細胞期で発育が停止してしまう系のマウスの2分割卵を切り出した卵管膨大部とともに共培養し240例中88例(36.7%)をblastocyst, 18例(7.5%)をmorulaまで発育させた。これらのことより, 卵管には胚の或るcell stageにおいて分割blockを解除する因子があるものと考えられている。

1979年Verhageらは卵管上皮細胞である線毛細胞と分泌細胞が性周期の変化に伴い, ステロイドホルモンの影響を受けながら, ダイナミックに形態学的変化を遂げることを報告した<sup>3)</sup>。すなわち排卵期前後にはエストロゲン濃度のピークに一致して, 線毛細胞と分泌細胞の活動は最大となる。上皮の細胞長は30 $\mu$ mと最大となり, 分泌細胞にはmicro villiが発達して分泌もさかんになるが, 黄体期に入り, プログステロンが増加してくると内皮細胞は萎縮し, 細胞長は20 $\mu$ mまで短縮し, 線毛脱落が起こり分泌活動も最低となるとしている<sup>3)</sup>。1980年Lippesはヒト卵管にカテーテルを留置し卵管液量を測定した。分泌量は血中エストロゲンの上昇に伴って増加し, 排卵期初期0.3mlが排卵期直前には9.48mlまで増加し, 全体の蛋白量は排卵時に最大となり, 特にこの時点でアルブミンと $\beta$ -グロブリンの増加が著しいとしている<sup>4)</sup>。

1970年Moghissiはヒト卵管液と血清中の蛋白分画を比較し,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 各グロブリン分画比は一致しているが卵管ではIgMが欠如し,  $\beta$ -glycoproteinが存在することを示した<sup>5)</sup>。また, 1975年Kapurらは排卵期のマウスの卵管液, 卵管上皮, 排卵卵, 初期胚囲卵腔に分子量215kDaのglyco-

protein が存在することを認め、この蛋白が血清中及び卵胞卵に存在しなかったことより、卵または受精卵によって取り込まれ何らかの役割を演じていることを示唆した<sup>6)</sup>。さらに 1987 年 Verhage らはヒト卵管液中に排卵期にのみ現れる分子量 120000～130000MW の glycoprotein の存在を認め、これはある特定の cell stage において特異的に出現してくると報告した<sup>7)</sup>。

Biggers, Whittingum らによって報告された初期胚と卵管の共培養実験は卵管内因子の重要性を裏付けており<sup>2)</sup>、現在までに Mastroianni, Verhage, Kapur らにより卵管上皮由来と思われる非血清由来の糖蛋白の存在が、卵管液中や卵管内排卵卵、さらに初期胚周囲卵腔などに証明されている<sup>6-8)</sup>。これらが胚に対し栄養、発育、あるいは着床などに関して、どのような作用機序をもって影響を与えるかはいまだに未解決ではあるが、いわゆる tubal-capacitation の存在は無視できない。したがって EIFT は IVF-ET よりも、より生理的な発育環境を得ることができると考えられる。

GIFT はその適応が広く、卵管采周囲癒着による卵の捕捉障害の推定される症例、免疫学的障害などによって十分な精子が卵管に到達できないような症例、その他緒種の機能性不妊にも適応とされている。また、乏精子症や精子無力症などの男性因子に対し、ブリンスター法などで得られた濃縮精子を用い、受精率を増加させることも可能である。しかし重症男性不妊症における本法の妊娠率は低く、移植後も受精、分割に至らないものが数多く存在すると考えられる。

今回我々が EIFT を施行した 20 例の成績によって EIFT は対周期 (65%)、対患者 (65%)、対移植胚 (16.5%) いずれの妊娠率においても IVF-ET, GIFT より優れていることが判明した。Henriksen や Bal-moceda らによる EIFT の報告でも、対患者あたりの妊娠率はそれぞれ 50% (3/6) および 60% (6/10) であり、我々と同様に高い成功率をえている<sup>9,10)</sup>。

EIFT に影響を与える因子として cell stage およびその個数が示唆された。今回我々が経験した 20 症例において、卵割率、cell stage それぞれを妊娠率と比較した。妊娠例および非妊娠例の平均卵割率は、おのおの 65.0%、68.3% であり両者の間に有意差は見られなかった。しかし妊娠例および非妊娠例の 4 細胞期以上に発育した胚の平均個数を比較した成績では、おのおの  $4.6 \pm 0.8$  個、 $3.7 \pm 0.6$  個であり、4 細胞期以上に発育した胚の個数の増加に伴い妊娠率は明らかに増加する傾向がみられた。4 細胞期以上に

発育した胚の数が 4 個以上の場合と 4 個未満の場合とで妊娠率を比較すると、おのおの 76.9% (9/13)、57.1% (4/7) であった。また、6 細胞期以上の分割まで認めた 4 例は 100% (4/4) 妊娠に至った。これらのことより EIFT の妊娠率に影響を与える因子として、分割率よりもむしろ、胚のより進んだ段階の cell stage およびその個数が重要であると考えられる。

なお EIFT は移植する初期胚の選別をより正確に把握することが可能であり、本来淘汰されるべき embryo loss を確認し、未然に防止できる点において、GIFT および PROST よりも有利であると考えられる。GIFT ではその受精、分割の過程で約 40% の embryo loss が生じ、PROST では前核期から 2 cell までの分裂過程において約 10～20% の embryo loss が生じる。井上らの報告によれば、PROST の妊娠率は per patient で 36.1% (39/108)、per cycle で 30.7% (39/127) であり<sup>11)</sup>、EIFT の方がその妊娠率において優っている。その理由として EIFT では同数の胚を移植する際、本来淘汰されるべき前核期胚がすでに除外されており、胚 1 個あたりの妊娠率が高くなっていると考えられる。それゆえに EIFT は外科的操作（腹腔鏡）の回数を最小限に抑えることが可能である。

EIFT の適応はいくつか挙げられるが、ET チューブ挿入困難例は絶対的適応である。このような場合大なり小なり移植に要する時間が長くなり、出血の頻度も高くなり、妊娠失敗に終わるケースも比較的多い。そのため特にこのような場合は EIFT にきりかえる方が良策と考えられる。その他、発育卵胞が少ない症例、高齢者、過去に 1 度でも IVF-ET または GIFT に失敗している症例なども適応と考えられる。ただし GIFT 失敗例のうち、卵管内環境が高度に障害されている症例は適応とにならない。そのため事前に HSG を施行し、通過性に障害のある例や卵管采の変形が著しい症例などは適応外として除外しなければならない。今回 EIFT 施行例の中に子宮外妊娠が 1 例もなかったのは、これら術前のチェックが確実であったと考えられる。

EIFT の問題点として、GIFT 及び IVF-ET に比べて多胎妊娠率が高い傾向にあることが挙げられる。この理由としては胚 1 個あたりの妊娠率が最も高いということが考えられ、今後の問題として移植する胚の個数の設定に留意し余剰となった胚の凍結保存も考慮されなければならないと思われる。もう 1 つの問題点として、男性因子が重篤な場合などではしばしば、媒精しても受精、分割の認められないこと

も多く、EIFT 施行に至らないケースも少なくない。今後、男性因子に対する治療法の向上が望まれる。

最後に、EIFT は IVF-ET と GIFT 両者の長所を合わせ持った治療法であり、受精卵割を確認し、初期胚を卵管内環境の恩恵を受けるべく卵管内に移植する方法である。それゆえ本法において妊娠率を増加させるためには、GIFT, IVF-ET 両者の技術をマスターする必要がある。少なくとも一側の卵管が健常な患者に対して、本法は最も有力な治療法であり、その適応も広がることが期待される。

なお本論文の要旨は第8回日本受精着床学会（於千葉、1990年）、第35回日本不妊学会（於千葉、1990年）において発表した。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った順天堂大学医学部産婦人科学教室高田道夫教授並びにセントマザー産婦人科医院、院長田中温先生に深く感謝致します。

#### 文 献

- 1) 豊田裕, 笠井健吉: 体外受精の基礎, 周産期医学, 10: 43, 1980
- 2) Biggers, J. D., Gwatkin, R. B. L., Brinster, R. L.: Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tube on a chemically defined medium, *Nature*, 194: 747, 1962
- 3) Verhage, H. G., Bareither, M. L., Jaffe, R. C., Akbar, M.: Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in the women, *A. J. Anat.*, 156: 505, 1979
- 4) Lippes, J., Krasner, J., Alfonso, L. A., Dacalos, E. D., Lucero, R.: Human oviductal fluid proteins, *Fertil. Steril.*, 36 (5): 623, 1980
- 5) Maghissi, K. S.: Human fallopian tubal fluid I. Protein Composition, *Fertil. Steril.*, 121 (12): 821, 1970
- 6) Kapur, R. P., Jhonson, L. V.: An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos, *Develop Biol.*, 112: 89, 1985
- 7) Harold, G., Verhage, A. T., Fazlebas, K. D.: The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct, *Endocrinology*, 122: 1639, 1988
- 8) Mastroianni, L., Urzua, M., Stambaugh, R.:

Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation, *Fertil. Steril.*, 21 (12) 817, 1970

- 9) Henriksen, T., Abyholm, T., Tanbo, M.: Pregnancies after intrafallopian transfer of embryos, *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*, 5 (5): 296, 1988
- 10) Balmaceda, J. P., Gastaldi, C., Remohi, J., Borrero, C., Ordo, T., Asch, R.: Tubal embryo transfer as a treatment for infertility due to male factor, *Fertil. Steril.*, 50 (3): 476, 1988
- 11) 小林善宗, 井上正人, 本田育子, 淡路英雄, 藤井明和: GIFT と IVF-ETR, 臨床産科婦人科, 43(2) 143, 1989

### The clinical application and results of intrafallopian transfer of 4~8 cell stage embryo (EIFT)

Chikayoshi Okabe, Atsuchi Tanaka  
and Michio Takada

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

20 couples of patients with a history of infertility of more than 3 years were offered embryo of 4~8 cell stage transfer to the fallopian tubes (EIFT). We have compared EIFT with IVF-ET and GIFT about pregnancy rate. There were no significant differences in clinical factors, age, peak  $E_2$  level when aspirating oocytes, number of oocytes recovered and number of embryos transferred. EIFT was 65% (13/20) per cycle and 65% (13/20) per patient in pregnancy rate, IVF-ET; 23% (121/526) and 28% (121/432), GIFT; 32% (81/253) and 36% (81/225). EIFT obtained significantly higher pregnancy rate than the other groups. However there was no differences in the rate of abortion and ectopic pregnancy in each groups. EIFT was a little higher than the other groups in multiple pregnancy rate. We concluded that EIFT was superior to GIFT and IVF-ET.

(受付: 1991年7月12日特掲)

## 経膣的卵管内胚移植法 (TV-TEST) の試み

### Experience in Transvaginal Tubal Embryo Stage Transfer (TV-TEST)

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

森 明 人

Akito MORI

沖 利 通

Toshimichi OKI

竹 内 一 浩

Kazuhiro TAKEUCHI

山 元 慎 一

Shinichi YAMAMOTO

福 元 清 吾

Seigo FUKUMOTO

堂 地 勉

Tsutomu DOUCHI

永 田 行 博

Yukihiro NAGATA

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

我々は Jansen-Anderson Intratubal Transfer Set (COOK 社)を用い、Transvaginal tubal embryo stage transfer (TV-TEST)を試み、有効な結果を得たので報告する。対象は当科で IVF-ET を施行し、2 回以上不成功に終わった症例の中で少なくとも片側の卵管の疎通性が保たれている 10 例である。体外受精の適応は 2 例が男性因子、8 例が原因不明不妊であり、平均年齢は  $35.4 \pm 3.3$  歳、平均不妊期間は  $9.8 \pm 0.8$  年であった。排卵誘発は Buserelin-hMG-hCG 法で行い、媒精後 20~24 時間で TV-TEST を試みた。移植卵はすべて前核期胚であり、移植胚数は片側卵管に最高 3 個までとした。10 例中 3 例は卵管内への catheterization が困難であり子宮内胚移植に終わったが、7 例はスムーズに入った。その 7 例の内 2 例 (28.6%) に妊娠が成立し、1 例は子宮外妊娠に終わったが、1 例は ongoing で経過良好である。TV-TEST は IVF-ETR をより簡便化したものであり、優れた方法であると考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 138-141, 1992)

#### 緒 言

体外受精卵卵管内移植 (IVF-ETR) や配偶子卵管内移植 (GIFT) は体外受精胚移植 (IVF-ET) に比較して妊娠率が高いことは周知の事実である。これは受精卵の発育に卵管が重要な鍵を握っていることを示唆する。

近年、経膣超音波断層法の出現により採卵が極めて容易となった。しかし IVF-ETR や GIFT では受精卵を卵管内に移植するために腹腔鏡は必要不可欠であり、IVF-ET に比較して煩雑である。1988 年、Jansen et al<sup>1)</sup>は自ら考案した Jansen-Anderson Intratubal Transfer Set を用い経膣超音波下に経膣的に前核期胚を卵管内に移植 (transvaginal tubal

embryo stage transfer, 以下 TV-TEST と略す) し妊娠例を得たと報告した。また Bauer et al<sup>2)</sup>は同様の Set を用い、超音波ガイドなしに 2~8 細胞期胚を卵管内に移植し、妊娠したと報告している。

今回、我々はこの TV-TEST を Bauer et al と同様に超音波ガイドなしに試み、興味ある結果を得たので報告する。

#### 対象と方法

##### 1. 対象

当科で IVF-ET を施行し、2 回以上不成功に終わった症例の中で少なくとも片側の卵管の疎通性が保たれている 10 例を対象とした (表 1)。体外受精の適応は機能性不妊 8 例、乏精子症などの男性因子 2

例で、平均年齢は  $35.4 \pm 3.3$  歳、平均不妊期間は  $9.8 \pm 0.8$  年である。

1. 方法

(1) 排卵誘発法と体外受精

排卵誘発は当科の IVF-ET のプロトコールに従い、Buserelin-hMG-hCG 法で行った。月経周期第 1 日目 (Day 1) より Buserelin 1200 $\gamma$ /day を hCG 注射前日まで連日投与、Day 3 より hMG 150 単位を連日筋注し、主席卵胞径が 18 mm に達した時点で hMG 投与を中止し、hCG に切りかえた、hCG 1 万単位筋注 32~36 時間後に経腔超音波下に採卵を施行し、媒精後 16~24 時間で TV-TEST を試みた。移植卵はすべて前核期胚であり、移植胚数は片側卵管に最高 3 個までとし、妊娠率等について検討した。

(2) TV-TEST

①使用器材

図 1 は今回、卵管内 catheterization に用いた Jansen-Anderson Intratubal Transfer Set (KJITS 2005, COOK 社, Australia) である。obturator (ガイドワイヤー) とテフロン製ガイドカニューレ (外筒) と先端の外径が 0.74 mm のテフロンカテーテル (内筒) の 3 本で一組になっている。テフロン製の外筒は先が屈曲しており、また先端が特殊な構造になっ

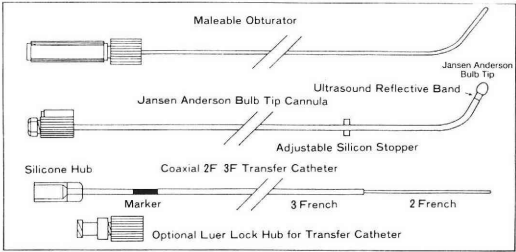


図 1. JANSEN ANDERSON INTRATUBAL TRANSFER SET のシェーマ

ており、子宮の中に入り子宮角部にうまく adapt できるようになっている。

②挿入法

あらかじめ子宮ゾンデで子宮の長さや方向を確かめ、そのゾンデと同じ屈曲をガイドワイヤーにつけてテフロン製の外筒に入れると曲がっていた外筒の先はほぼまっすぐになる。ストッパーを動かし内腔の長さに合わせ、これを子宮内に入れガイドワイヤーを抜き、あらかじめかけておいた腔部鉗子を引けば、外筒の先端は子宮角部におのずと wedge される。外筒の先端がうまく子宮角部に wedge されれば外筒の先から内筒が出て卵管内に約 3 cm ほど入ることになる。外筒の先端が子宮角部に wedge されなければ抵抗があり内筒がそれ以上進まず、手元で屈曲する。catheterization は摘出子宮で繰り返し練習することによって、容易にその技術を習得できる。そして、catheterization できたか否かは内筒が卵管内に入る際の感触でわかるようになる。

図 2 は卵管内に catheterization した状態のシェーマである。この状態で内筒の先端にごく微量の medium (20 % 血清添加 H T F) とともに胚を卵管内へ push する。

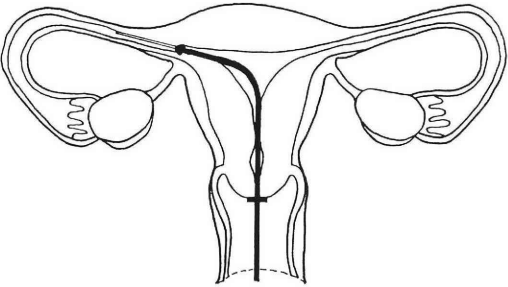


図 2. 右卵管内に catheterization した状態

表 1 症例の内訳

| 症例 | IVF 適応 | 年齢 (歳) | 不妊期間 (年) | 移植胚数 | 妊娠 | 備考      |
|----|--------|--------|----------|------|----|---------|
| 1  | 機能性不妊  | 34     | 10       | 3    | +  | ongoing |
| 2  | 機能性不妊  | 34     | 9        | 6    | —  |         |
| 3  | 機能性不妊  | 38     | 8        | —    | —  | 粘膜下筋腫   |
| 4  | 男性因子   | 31     | 8        | 3    | —  |         |
| 5  | 男性因子   | 37     | 11       | —    | —  | 後屈強し    |
| 6  | 機能性不妊  | 34     | 9        | 1    | —  |         |
| 7  | 機能性不妊  | 33     | 5        | —    | —  | 後屈強し    |
| 8  | 機能性不妊  | 39     | 15       | 3    | —  |         |
| 9  | 機能性不妊  | 32     | 7        | 2    | +  | 子宮外妊娠   |
| 10 | 機能性不妊  | 42     | 16       | 2    | —  |         |

卵管内移植率: 70 % (7/10)  
TV-TEST 妊娠率: 28.6% (2/7)

表2 Transvaginal tubal embryo stage transfer の報告

| 報告(年)         | 移植時 stage    | 妊娠率            | 流産率         | 外妊率         |
|---------------|--------------|----------------|-------------|-------------|
| Diedrich (90) | 4~8cell      | 30.5% (32/105) | 6.3% (2/32) | 0 %         |
| Kumar (91)    | pronuc~2cell | 12.5% (8/64)   | 0 %         | 0 %         |
| Anderson (91) | pronuclear   | 26.6% (21/79)  | 0 %         | 9.5% (2/21) |

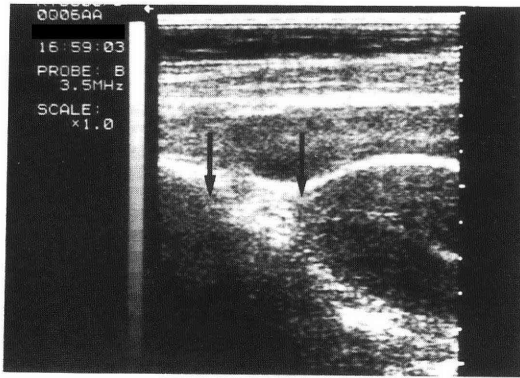


写真1. 右卵管内に catheterization した経腔超音波像

## 結 果

今回、10 例に TV-TEST を試みた(表1)。7 例が catheterization でき、挿入率は 70 % (7/10) であった。3 例は挿入不可能であったが、症例3は粘膜下筋腫例、症例5、7は強度の子宮後屈例であった。

写真1は右卵管内に catheterization したところを経腔超音波でみたものである。右側矢印の部分で子宮一卵管移行部で、そこから左側矢印の部位まで内筒が卵管内に挿入されているのがわかる。

結局7例に TV-TEST を行った。卵管内に移植した前核期胚の数は平均  $3.0 \pm 1.4$  個であった。そのうち2例に妊娠が成立し、妊娠率は 28.6 % (2/7) であった。しかし症例9は右側卵管に TV-TEST を行い、妊娠7週で同側膨大部の外妊と診断された。

## 考 察

最近の不妊症治療進歩は従来では考えられなかった難治性不妊の妊娠をも可能としつつある。特に IVF-ET は経腔採卵法の確立により技術的にも簡単になり、現在では一般病院でも行われるようになってきた。しかし IVF-ET は、胚を受精後早期に子宮内に移植するという非生理的な面をもつために、妊娠率はかならずしも満足できるものではない。

一方、小林ら<sup>3)</sup>は GIFT 不成功例に対する新しい治療法として IVF-ETR を開発して良好な妊娠率を得ている。また、ほぼ類似した方法として前核期胚卵

管内移植 (PROST)<sup>4)</sup> や接合子卵管内移植 (ZIFT)<sup>5)</sup> の方法も行われるようになってきた。しかし、IVF-ETR は IVF-ET に比べてより生理的であるという長所や受精を確認できるという GIFT にない利点がある反面、腹腔鏡操作を必要とし、煩雑であるという欠点がある。

このような欠点を補うため、Jansen et al<sup>6)</sup> は腹腔鏡を用いず、経腔的に簡単に卵管内に catheterization する方法を考察した。経腔的受精卵管内移植法 (TV-TEST) といわれており、この方法により妊娠例が報告されている(表2)。いずれの報告でも症例の 90 % 前後に卵管内 catheterization が可能であったという。しかし、これらはいずれも超音波ガイド下で行われた成績であり、一方、我々の卵管内移植率 70 % は超音波ガイドなしで得られた成績であり、それを勘案すれば我々の成績は遜色ない成績といえよう。挿入不可能であった原因は子宮の後屈の強い症例や子宮内腔に異常のある症例に限られた。これらは諸家の報告とも一致するものである。今後、症例を増やし熟練すれば、卵管内移植率はさらに上昇すると考えている。

Diedrich et al<sup>7)</sup> は 105 例に TV-TEST を施行し、32 例 (30.5 %) が妊娠し、2 例 (6.3 %) が流産、子宮外妊娠は一例もなかったとし、従来の IVF-ET に比較し妊娠率が高く、流産、外妊が少ないのが特徴であると報告している。このように妊娠率が高い理由として、卵管内に移植するために、子宮内移植よりも一連の操作による子宮収縮が少ないためではないかと彼らは推測している。

外妊に関しては、Anderson et al<sup>8)</sup> は 9.5% (2/21) に外妊を認めており、われわれの症例でも 1 例は外妊であったことから TV-TEST では外妊が起こらないとはいえない。この点に関して、Bauer et al<sup>2)</sup> は PID の既往や外妊、卵管の手術歴のないことが TV-TEST の条件であるとしている。また Diedrich et al も卵管の癒着、奇形がある症例や PID の既往のあるものは、子宮外妊娠の可能性があるので TV-TEST は適応にならないと述べている。従って、TV-TEST を施行する前に、子宮卵管造影や腹腔鏡検査は必要であり、少なくとも片側の卵管が正常で卵管周囲の炎症や癒着がないことを確かめる必要がある。

この卵管内カテーテル法の臨床応用は人工授精の妊娠率の上昇や GIFT の操作の簡便化にもつながると思われる。われわれはこの方法を従来の A I H で妊娠しない症例に応用し、2 例に妊娠成立をみている。Jansen et al<sup>9)</sup>は従来の AID で妊娠に至らなかった 46 例に卵管内 catheterization による A I D を行い、6 例 (13 %) が妊娠したと報告している。Pratt et al<sup>10)</sup>も子宮内人工授精不成功例 32 例に卵管内人工授精を試み、34%が妊娠したと報告している。従来の方法による AIH, AID で妊娠に至らなかった症例でこれほどの妊娠率であることは注目すべきであり、この catheterization による卵管内への AIH, AID を行ってみる価値もあるといえる。

### 結 語

以上より、少なくとも片側の卵管が温存されている体外受精症例に対して TV-TEST を試みることは妊娠率の向上につながるとと思われる。またこの卵管内 catheterization 法は人工授精にも応用できる。腹腔鏡を利用しない点で従来の GIFT や IVF-ETR にとってかわる可能性がある。今後、ますます普及すべき方法であると考ええる。

### 参考文献

- 1) Jansen, R. P. S., Anderson, J. C. and Sutherland, P. D.: Non operative Embryo Transfer to the Fallopian Tube, *New England Journal of Medicine*, 319: 288, 1988
- 2) Bauer, O., Van-der-Ven, H., Diedrich, K., Al-Hasani, S., Krebs, D. and Gembruch, U.: Preliminary results on transvaginal tubal embryo stage transfer (TV-TEST) without ultrasound guidance, *Human Reproduction*, 5: 553, 1990
- 3) 小林善宗, 井上正人, 本田育子, 松山毅彦, 宮川和子, 村上 優, 内村道隆, 藤井明和: 体外受精卵卵管内移植による妊娠の 1 例, *日不妊会誌*, 31: 636, 1986
- 4) Yovich, J. L., Blackledge, D. G., Richardson, P. A., Matson, P. L., Turner, S. R. and Draper, R.: Pregnancies following pronuclear stage tubal transfer, *Fertil. Steril.*, 48: 851, 1987
- 5) Hamori, M., Stuckensen, J. A., Rumpf, D., Kniewald, T., Kniewald, A. and Marquez, M. A.: Zygote intrafallopian transfer (ZIFT), *Fertil. Steril.*, 50: 519, 1988
- 6) Jansen, R. P. S. and Anderson, J. C.: Catheterization of the fallopian tubes from the vagina, *Lancet* August, 8: 309, 1987
- 7) Diedrich, K.: Transvaginal intratubal embryo

transfer makes promising start, *IVF Congress Magazine*, 8, 1990

- 8) Anderson, J. C., Boogert, A., Woolcott, R., Radonic, I., Brancroft, A. and Jansen, R. P. S.: Ultrasound-guided tranvaginal catheterization of the fallopian tube for gamete or embryo transfer, *Abstracts of the 7th World Congress on IVF and Assisted Procreations*, 126, 1991
- 9) Jansen, R. P. S., Anderson, J. C., Radonic I., Smit, J. and Sutherland, P. D.: Pregnancies after ultrasoundguided fallopian insemination with cryostored donor semen, *Fertil. Steril.*, 49: 920, 1988
- 10) Pratt, D. E., Bieber, E., Branes, R., Shangold, G., Vignovic, E. and Schreiber, J.: Transvaginal intratubal insemination by tactile sensation. *Abstracts of the 7th World Congress on IVF and Assisted Procreations*, 125, 1991

### Experience in transvaginal tubal embryo stage transfer (TV-TEST)

Akito Mori, Toshimichi Oki,  
Kazuhiro Takeuchi, Shinichi Yamamoto,  
Seigo Fukumoto, Tsutomu Douchi  
and Yukihiro Nagata

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

We performed transvaginal tubal embryo stage transfers (TV-TEST) on 10 patients (2 male subfertility, 8 unexplained infertility cases) with an Jansen-Anderson intratubal transfer set. The mean age of the women was 35.4 years (range, 31 to 42) and the mean duration of their infertility was 9.8 years (range, 7 to 16). After stimulation with GnRH-analogue/HMG-HCG, the transvaginal oocyte retrieval was performed. At 16 to 24 hours after insemination, the TV-TEST was performed, in the course of which a maximum of three pronuclear stage embryos was transferred into one tube. Intrafallopian catheterization and TV-TEST was carried out successfully in seven patients, but catheterization failed in other three patients. Two pregnancies (28.6%) were obtained in seven successful cases; one was an ectopic pregnancy and the other was intrauterine viable pregnancy. From these results, it can be concluded that transvaginal tubal embryo stage transfer (TV-TEST) with intratubal transfer sets may take the place of the laparoscopic embryo transfer.

(受付: 1991 年 9 月 1 日特掲)

## 低用量経口避妊薬の脂質代謝への影響

### Effects of Low Dose Oral Contraceptives on Plasma Lipids and Lipoproteins

帝京大学医学部産婦人科学教室

|                 |                |                  |
|-----------------|----------------|------------------|
| 坂 本 隆 子         | 荻 野 雅 弘        | 山 本 樹 生          |
| Takako SAKAMOTO | Masahiro OGINO | Tatsuo YAMAMOTO  |
| 神 戸 川 明         | 森 宏 之          | 小 林 拓 郎          |
| Akira KAMBEGAWA | Hiroyuki MORI  | Takuro KOBAYASHI |
| 冲 永 莊 一         | 荒 井 清          |                  |
| Shoichi OKINAGA | Kiyoshi ARAI   |                  |

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

日本獣医畜産大学獣医内科学教室

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| 左 向 敏 紀        | 本 好 茂 一              |
| Toshinori SAKO | Shigekatsu MOTOYOSHI |

Department of Internal Medicine,  
Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo 180, Japan

家兎に  $EE_2$ +norgestrel ( $EE_2$ +norg.)と  $EE_2$ +desogestrel ( $EE_2$ +desog.)の2種の低用量経口避妊薬 (O. C.) のヒト常用量と常用量の50倍の大量投与を行い、O. C.の脂質代謝に及ぼす影響を検討した。ヒト常用量投与では、血漿脂質、リポ蛋白等の変化は見られなかった。大量投与では  $EE_2$ +norg.群で phospholipids (PL), triglycerides (TG)の有意な増加 ( $P < 0.05$ ) と total cholesterol (TC), LDL+VLDLの増加傾向を認めた。 $EE_2$ +desog.群ではTC, PLの増加傾向を認めたが、有意ではなかった。以上の結果より、脂質代謝の面では  $EE_2$ +desog.の方が  $EE_2$ +norg.に比し影響は少ないことが示唆されたが、両薬剤とも単に低用量とするだけで血中脂質への影響の軽減がはかれることが判明した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 142-147, 1992)

#### 緒 言

経口避妊薬 (Oral Contraceptives; O. C.) はその効果が確実なことから、世界で6000万人の服用者がいると推定されている。以前よりO. C.服用者に血中のtotal cholesterol (TC)やtriglycerides (TG)が上昇する現象が見られ<sup>1,2)</sup>、これらの脂質変化は動脈硬化の危険因子となりうることが問題視され、O. C.の副作用の1つとして議論的となっている。O. C.の脂質代謝への影響は、含有されるエストロゲンとプ

ロゲステロンの製剤の違いや量により異なる。一般にエストロゲン活性とプロゲステロン活性の比が高いものほどHDLの低下の程度は少なく、TGの増加の程度は著しい傾向にある<sup>2-5)</sup>。高用量O. C.の副作用の軽減のため、1980年代に欧米で低用量O. C.が開発され、使用されている。今回我々は低用量O. C.のうち代表的な三相性のethinyl estradiol ( $EE_2$ )+norgestrel (norg.)と一相性の $EE_2$ +desogestrel (desog.)の2種の製剤のヒト常用量と大量投与として50倍量の製剤を作製して家兎に投与し、1)O. C.に

含有されるステロイドホルモンの量の違いによる変化, 更に, 2) 含有黄体ホルモン剤としての norg. と desog. の違いによる変化を検討し, O. C. の脂質代謝へ及ぼす影響を調べた。

### 材料および方法

#### (1) 実験動物

体重 3 kg 前後の家兎 (New Zealand White 種, 雌) を代謝ケージ内で飼育し, 照明は 14 時間 (8:00 am ~ 10:00 pm) 明 / 10 時間 (10:00 pm ~ 8:00 am) 暗とし, 餌 (ウサギ用固形飼料 PM-4) および水は自由摂取とした。

#### (2) 実験方法

家兎に  $EE_2$  + norg. のヒト常用量の等価量 ( $\times 1$ ) (家兎のクリアランスはヒトの 3 倍であるので, 体重当りヒトの 3 倍を投与), 同一製剤 50 倍量 ( $\times 50$ ), およびプロゲステロン剤の異なる  $EE_2$  + desog. の常用量 ( $\times 1$ ), 同 50 倍量 ( $\times 50$ ) (各群 4 羽) の O. C. をそれぞれ 21 日間連続経口投与した (表 1)。採血は投与前および投与終了時の空腹時に耳静脈より行い, 血漿分離は EDTA 処理とした。測定方法は, TC, phospholipids (PL), TG は日立 736 型自動分析装置を用い酵素法にて測定した。リポ蛋白分画はアーチ型電気泳動システム (コーニング社) を用い, 1% アガロースゲル, 90 V 定電圧, 36 分間電気泳動を行い分析した。ゲルを Fat Red 7B 染色後 520nm でデンシトメトリーし, 各分画は総脂質 (TC + PL + TG) に分画の比を乗じて算出した。

また同時に TG 代謝に関連の深い lipoprotein lipase (LPL) 活性を, Loadet<sup>®</sup> の方法に準じヘパリン (ノボ・ヘパリン: ノボインダストリー A/S) 175 IU/kg を静注 10 分後に採血した血漿中の TG 代謝の酵素活性である post-heparin lipolytic activity (PHLA) として, 人工基質法<sup>7)</sup>で測定した。

統計処理は paired t-test を用いた。

### 結 果

O. C. 投与前後の変化を増加率または減少率として

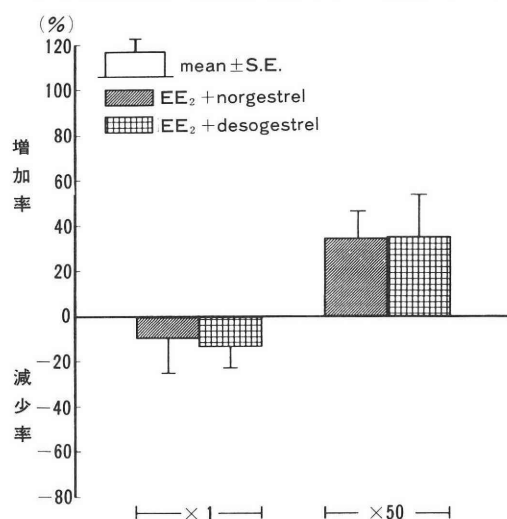


図1 経口避妊薬投与前後の total cholesterol の増加率または減少率

表1 投与量および投与期間

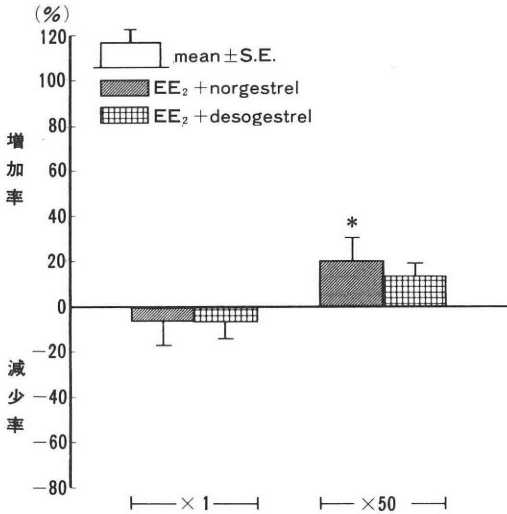
| O.C. | 投与日数 | estrogen | $\mu\text{g/day}$ | progesterone | $\mu\text{g/day}$ |
|------|------|----------|-------------------|--------------|-------------------|
| 三相性  | 6    | $EE_2$   | 30                | norgestrel   | 50                |
|      | 5    | $EE_2$   | 40                | norgestrel   | 75                |
|      | 10   | $EE_2$   | 30                | norgestrel   | 125               |
| 一相性  | 21   | $EE_2$   | 30                | desogestrel  | 125               |

2 種の O. C. のヒト常用量の家兎等価量 (体重当りヒトの 3 倍を投与) およびその 50 倍量を, 21 日間経口投与した。

表2 経口避妊薬投与前後の血漿脂質, リポ蛋白分画, PHLA のパーセント変化率

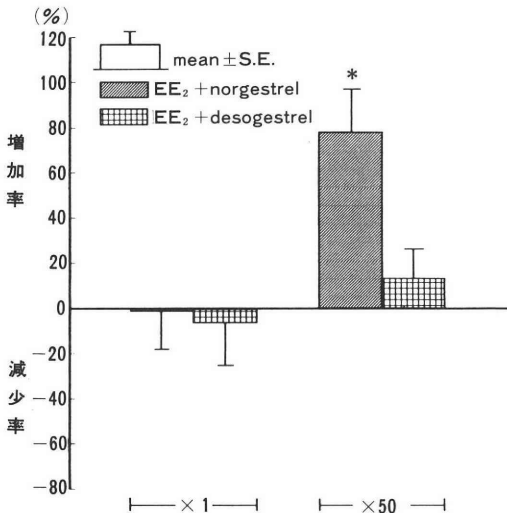
|                   | $EE_2$ + norgestrel          |                   | $EE_2$ + desogestrel |                  |
|-------------------|------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|
|                   | $\times 1$                   | $\times 50$       | $\times 1$           | $\times 50$      |
| total cholesterol | 90.3 $\pm$ 14.8 <sup>+</sup> | 134.5 $\pm$ 10.6  | 86.3 $\pm$ 10.0      | 135.3 $\pm$ 17.8 |
| phospholipids     | 93.5 $\pm$ 10.2              | 120.5 $\pm$ 8.1*  | 93.0 $\pm$ 5.8       | 113.8 $\pm$ 6.6  |
| triglycerides     | 98.5 $\pm$ 17.4              | 178.3 $\pm$ 16.7* | 93.5 $\pm$ 19.3      | 113.5 $\pm$ 13.1 |
| HDL               | 97.3 $\pm$ 11.7              | 126.5 $\pm$ 15.2  | 99.8 $\pm$ 5.4       | 114.5 $\pm$ 8.8  |
| LDL + VLDL        | 89.0 $\pm$ 12.9              | 180.3 $\pm$ 25.9  | 81.0 $\pm$ 10.9      | 137.3 $\pm$ 38.9 |
| PHLA              | 124.0 $\pm$ 38.7             | 79.0 $\pm$ 30.0   | 103.8 $\pm$ 9.8      | 111.8 $\pm$ 56.3 |

<sup>+</sup>; mean  $\pm$  S.E., \*;  $p < 0.05$ , 同群の投与前後を比較



\*:  $p < 0.05$ , 同群の投与前後を比較

図2 経口避妊薬投与前後の phospholipids の増加率または減少率



\*:  $p < 0.05$ , 同群の投与前後を比較

図3 経口避妊薬投与前後の triglycerides の増加率または減少率

図1～6に示す。O.C.投与前値を100%とすると、常用量投与群(×1)の投与後のTCは、EE<sub>2</sub>+norg.およびEE<sub>2</sub>+desog.ではそれぞれ90.3±14.8%, 86.3±10.0%と軽度減少した(図1, 表2)。大量投与群(×50)では、EE<sub>2</sub>+norg.およびEE<sub>2</sub>+desog.は134.5±10.6%, 135.3±17.8%と増加傾向を示した(図1, 表2)。PLの変化はTCと同様の傾向を示し、常用量投与群(×1)では93.5±10.2%, 93.0±5.8%とわずかな減少傾向を示したが、大量投

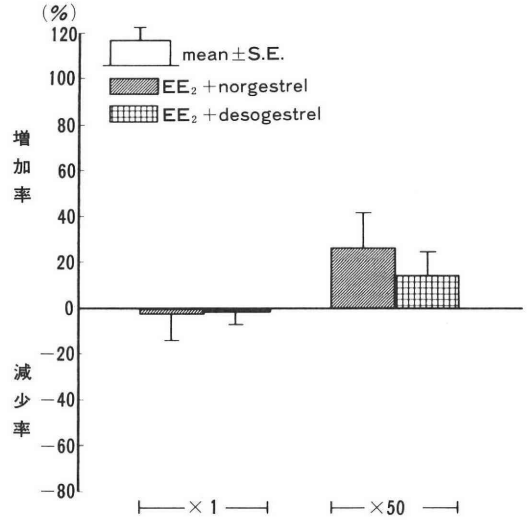


図4 経口避妊薬投与前後のHDL分画の増加率または減少率

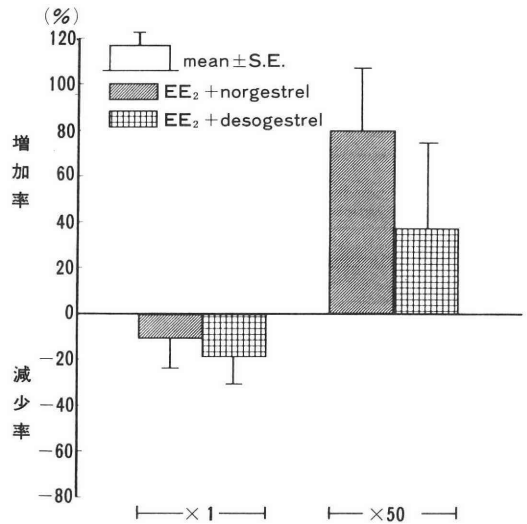


図5 経口避妊薬投与前後のLDL+VLDL分画の増加率または減少率

与群(×50)では120.5±8.1%, 113.8±6.6%と増加を示し、EE<sub>2</sub>+norg.群の変化は有意( $p < 0.05$ )であった(図2, 表2)。TGは常用量投与群(×1)では98.5±17.4%, 93.5±19.3%と軽微な変化であった。大量投与群(×50)ではEE<sub>2</sub>+norg.群で、178.3±16.7%と有意な増加( $p < 0.05$ )が見られたが、EE<sub>2</sub>+desog.では113.5±13.1%とわずかな増加傾向であった(図3, 表2)。

リポ蛋白HDL分画は常用量投与群(×1)ではEE<sub>2</sub>+norg.が97.3±11.7%, EE<sub>2</sub>+desog.が99.8±

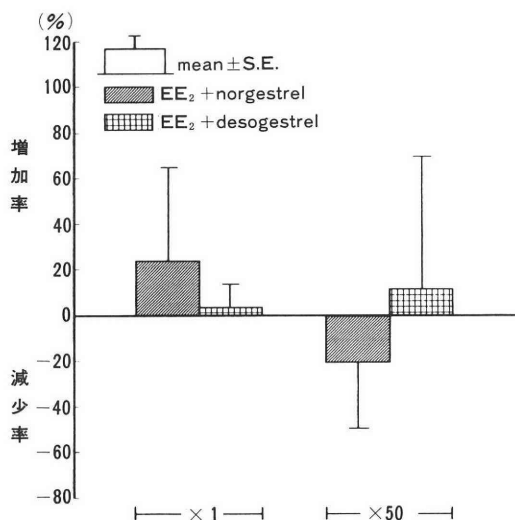


図6 経口避妊薬投与前後 PHLA の増加率または減少率

5.4%と軽微な変化であったが、大量投与群(×50)では $126.5 \pm 15.2\%$ 、 $114.5 \pm 8.8\%$ と増加傾向が認められた(図4, 表2)。LDLとVLDLは電気泳動の分画の分離が不十分であったため合わせて測定した。常用量投与群(×1)では $89.0 \pm 12.9\%$ 、 $81.0 \pm 10.9\%$ と軽微な減少傾向が見られたが、大量投与群(×50)ではEE<sub>2</sub>+norg.が $180.3 \pm 25.9\%$ 、EE<sub>2</sub>+desog.でも $137.3 \pm 38.9\%$ と増加傾向が認められた(図5, 表2)。

PHLAはTG代謝に関連の深い酵素の1つでありカイロミクロンやVLDL中のTGの異化を反映すると考えられている。PHLAの変化はいずれの群でも一定の傾向は見られず、TG代謝が特に亢進または遅延しているとは考えられなかった(図6, 表2)。

以上の結果をまとめると表2に示すように、常用量投与群(×1)ではTC, PL, TGの変化は軽微であった。しかし大量投与群(×50)になると増加傾向が窺われ、EE<sub>2</sub>+norg.大量投与群においてはPLとTGの有意な増加が見られた。リポ蛋白分画の結果より、これらの変化はLDLまたはVLDLの増加によるものと推察された。

## 考 察

O.C.の副作用として、以前より血栓症惹起の危険性、脂質代謝異常、催糖尿病、発癌性等が論じられてきた。このうち血栓症に関しては、疫学的調査においてもO.C.服用者では虚血性疾患の発症が有意に高く<sup>8)</sup>、血液凝固系の亢進が見られることが報告されている<sup>9,10)</sup>。しかしO.C.服用による脂質代謝異常と

虚血性疾患の因果関係についての調査研究はまだ推測の域を出ない。

内因性または外因性の性ステロイドホルモンは、脂質代謝に様々な影響を及ぼすことが知られている。例えば閉経後のエストロゲン減少に伴ないLDL-Cが急激に上昇<sup>11)</sup>し、またエストロゲン投与によりHDLやVLDLが増加<sup>12)</sup>したりTGの代謝に関与する酵素のLPL<sup>13)</sup>やHTGL<sup>12)</sup>が低下すること等が報告されている。プロゲステロンは単剤では脂質代謝にあまり影響を与えないが、O.C.のようなエストロゲンとの合剤ではエストロゲン作用に拮抗する。即ちO.C.服用者に見られるHDLの低下および、LDL, TCの上昇等の動脈硬化に促進的な変化<sup>3-5,14)</sup>はプロゲステロンの作用によるものと考えられている。

副作用を軽減するために作られた低用量O.C.は、高用量のO.C.に比べ脂質代謝への影響は軽度であるとされている。しかし文献的には本実験に用いた三相性のEE<sub>2</sub>+norg.でもTGの増加<sup>15-17)</sup>やHDL-CまたはHDL<sub>2</sub>-Cの減少<sup>15-18)</sup>が見られ、また新しい合成プロゲステロン剤のdesog.を含む一相性のO.C.でもTGの増加が報告されている<sup>16,19)</sup>。

今回の実験では2種類の代表的低用量O.C.のEE<sub>2</sub>+norg.とEE<sub>2</sub>+desog.のヒト常用量とその50倍という大量投与を21日間連続して家兎に行い、投与前後の血漿中の脂質(TC, PL, TG)、リポ蛋白分画(HDL, LDL+VLDL)、TG代謝に関与する酵素(PHLA)の変化を検討した。その結果、ヒト常用量では血中脂質の変化はわずかであり、大量投与でもHDLの低下は見られなかった。しかしEE<sub>2</sub>+norg.を大量投与すると、PL, TGの有意な増加が認められたことより、家兎とでは種差があるもののヒトにおいてもnorg.を含む製剤は脂質へ影響を及ぼすことが推測された。一方desog.を含む製剤は大量投与しても血中脂質に有意の変化を示さなかったことから、desog.を含有するO.C.はnorg.を含むものより脂質代謝に及ぼす影響は少ないといえよう。

性ステロイドホルモンがTG代謝に関与する酵素活性に及ぼす影響を検討したBerr<sup>13)</sup>らは、エストロゲン投与によりLPL, PHLAの低下とTGの増加を指摘し、Schaefer<sup>12)</sup>らはHTGLの低下とTG, TCの増加を報告している。今回検討したO.C.はエストロゲン活性比が高く、TG代謝に影響を及ぼすのではないかという予想から、TG代謝のkey enzymeであるPHLAを測定したが、PHLAの変化には一定の傾向が見られなかった。しかしEE<sub>2</sub>+norg.大量投与群においてVLDL上昇に起因するTGの上昇が見られ、このTG上昇の原因がTG異化の低下であると

すれば、長期の投与により HDL の低下を期す可能性がある。また今回の実験は常用量、大量投与群とも 21 日間の短期間投与実験であったので、血中脂質の変化は軽度にとどまり、報告<sup>15-17,19)</sup>にあるような著明な脂質代謝の変化が見られなかった可能性がある。従って PHLA に関しては、長期投与による検討が必要と思われる。

以上、今回検討した低用量 O. C. は、21 日間の常用量投与では脂質代謝の変化はほとんど見られなかった。大量投与群では  $EE_2 + norg.$  群では VLDL 増加に伴う TG の有意な増加と LDL 増加に伴う PL の有意な増加が見られた。一方、 $EE_2 + desog.$  群の変化は有意ではなかった。このことから  $EE_2 + desog.$  の方が  $EE_2 + norg.$  に比し脂質代謝に及ぼす影響は軽微であることが推察され、脂質代謝における副作用軽減という意味からは、黄体ホルモン剤としては  $desog.$  を用いた方が  $norg.$  を用いるよりも好ましいと考えられた。しかし常用量投与の結果から、同一黄体ホルモン剤を用いても、単に低用量とするだけで脂質代謝に及ぼす影響は軽減できることが判明し、低用量 O. C. の脂質代謝における影響は従来のものに比べ軽微となっていることが示唆された。

## 文 献

- 1) Donde, U. M. and Virkar, K.: The effect of combination and low dose progestogen oral contraceptives on serum lipids, *Fertil. Steril.*, 26: 62, 1975
- 2) Stokes, T. and Wynn, V.: Serum-lipids in women on oral contraceptives, *Lancet*, 25: 677, 1971
- 3) Powell, M. G., Hedin, A. M., Cerskus, I., Kakis, G., Prudham, D. and Rosenrot, P.: Effects of oral contraceptives on lipoprotein lipids: A prospective study, *Obstet. Gynecol.*, 63: 764, 1984
- 4) Larsson-Cohn, U., Fahraeus, L., Wallentin, L. and Zador, G.: Lipoprotein changes may be minimized by proper composition of a combined oral contraceptive, *Fertil. Steril.*, 35: 172, 1981
- 5) Knopp, R. H., Walden, C. E., Wahl, P. W., Hoover, J. J., Warnick, G. R., Albers, J. J., Ogilvie, J. T. and Hazzard, W. R.: Oral contraceptive and postmenopausal estrogen effects on lipoprotein triglyceride and cholesterol in an adult female population: Relationships to estrogen and progestin potency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 1123, 1981
- 6) Laudet, A. M., Dousset, N., Carton, M. and Douste-Blazy, L.: Effects of an antimitotic agent (cyclophosphamide) on plasma lipoproteins, *Biochem. Pharmacol.*, 33: 2961, 1984
- 7) 久城英人, 高野圭似, 曾山浩吉, 福井 巖: 血漿リポ蛋白質リパーゼに関する研究 (第 1 報) —測定法の検討—, *臨床病理*, 19: 622, 1971
- 8) Royal College of General Practitioners' oral contraception study: Further analysis of mortality in oral contraceptive users, *Lancet*, 1: 541, 1981
- 9) Inauen, W., Baumgartner, H. R., Haeberli, A. and Straub, P. W.: Excessive deposition of fibrin, platelets and platelet thrombi on vascular subendothelium during contraceptive drug treatment, *Thromb. Haemost.*, 57: 306, 1987
- 10) Beller, F. K. and Ebert, C.: Effects of oral contraceptives on blood coagulation. A review, *Obstet. Gynecol. Survey*, 40: 425, 1985
- 11) Rifkind, B. M., Tamir, I., Heiss, G., Wallace, R. B. and Tyroler, H. A.: Distribution of high density and other lipoproteins in selected LRC prevalence study populations: A brief survey, *lipids*, 14: 105, 1979
- 12) Schaefer, E. J., Foster, D. M., Zech, L. A., Lindgren, F. T., Brewer, H. B. and Levy, R. I.: The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 262, 1983
- 13) Berr, F., Eckel, R. H. and Kern, F. Jr.: Contraceptive steroids increase hepatic uptake of chylomicron remnants in healthy young women, *J. Lipid Res.*, 27: 645, 1986
- 14) Burkman, R. T., Robinson, J. C., Kruszon Moran, D., Kimball, A. W., Kwiterovich, P. and Burford, R. G.: Lipid and lipoprotein changes associated with oral contraceptives use: A randomized clinical trial, *Obstet. Gynecol.*, 71: 33, 1988
- 15) Notelovitz, M., Feldman, E. B., Gillespy, M. and Gudat, J.: Lipid and lipoprotein changes in women taking low-dose, triphasic oral contraceptives: A controlled, comparative, 12-month clinical trial, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 160: 1269, 1989
- 16) Fotherby, K.: Oral contraceptives, lipids and cardiovascular disease, *Contraception*, 31: 367, 1985
- 17) Patsch, W., Brown, S. A., Gotto, Jr. A. M. and Young, R. L.: The effect of triphasic oral contraceptives on plasma lipids and lipoproteins, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161: 1396, 1989
- 18) Kjaer, A., Lebech, A. M., Borggaard, B., Refn, H., Pedersen, L. R., Schierup, L. and Bremmelgaard, A.: Lipid metabolism and coagulation of two contraceptives: Correlation to serum concentrations of levonorgestrel and gestodene,

Contraception, 40: 665, 1989

- 19) Cullberg, G.: Pharmacodynamic studies on desogestrel administered alone and in combination with ethinylestradiol, Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Suppl., 133: 1, 1985

**Effects of low dose oral  
contraceptives on plasma lipids  
and lipoproteins**

Takako Sakamoto, Masahiro Ogino,  
Tatsuo Yamamoto, Akira Kambegawa,  
Hiroyuki Mori, Takuro Kobayashi,  
Shoichi Okinaga and Kiyoshi Arai

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

Toshinori Sako and Shigekatsu Motoyoshi

Department of Internal Medicine,  
Nippon Veterinary and Zootechnical College,  
Tokyo 180, Japan

To assess the effect of two low dose oral contraceptives (O. C.) on plasma lipid metabolism, four groups of rabbits were assigned to receive either regular or fiftyfold dosage of the agents. As estrogen the same dose of ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>) was used in combination with norgestrel (norg.) or desogestrel (desog.), respectively.

In regular dosage, no major changes in plasma lipids or lipoproteins were noted in both O. C. groups. But if the fiftyfold dosage was used, phospholipids (PL) and triglycerides (TG) were significantly increased ( $p < 0.05$ ). Also, total cholesterol (TC) and LDL+VLDL increased in the EE<sub>2</sub>+norg. group. TC and PL increased in the EE<sub>2</sub>+desog. group, too.

These results suggest that the effect of EE<sub>2</sub>+desog. on lipids is weaker than that of EE<sub>2</sub>+norg.. As long as the low dose of these agents is being used less deleterious effects on lipid metabolism may occur.

(受付: 1991年3月20日)

## 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)

### Estrogen Progesterone Cyclic Therapy of A Tall Girl with Marfan Syndrome

鹿児島大学医学部産婦人科

沖 利 通

Toshimichi OKI

堂 地 勉

Tsutomu DOUCHI

松 元 保

Tamotsu MATSUMOTO

中 村 行 彦

Yukihiko NAKAMURA

森 明 人

Akito MORI

山 元 慎 一

Shin-ichi YAMAMATO

飯 尾 一 登

Kazuto IIO

永 田 行 博

Yukihiro NAGATA

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

特有な身体的特徴を持つ Marfan 症候群は、思春期においては急激な身長増加により脊椎側弯・脊椎圧迫骨折が問題になる。我々は前思春期に発症した Marfan 症候群に身長増加阻止目的の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歳中学生、初経発来はなし。10歳時から156 cmと身長が高く、脊椎側弯も認めていた。12歳時胸痛が強く当院内科を受診、Marfan 症候群(不全型)と診断される。この時点での最終予測身長が182 cm、今後側弯進行の恐れもあり、当科紹介となった。初診時からカウフマン療法を開始した。開始1年後には、身長増加が標準曲線を下回り、最終予測身長も177.1 cmとその効果が認められた。

以上より、高身長で脊椎に障害を来す恐れのある Marfan 症候群症例に積極的にカウフマン療法を行うことは、心理的配慮・骨系統の障害の予防の点で極めて有意義である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 148-151, 1992)

#### 緒 言

マルファン症候群は特有な身体的特徴を持つ疾患で、思春期における急激な身長増加により、脊椎側弯・脊椎圧迫骨折等が問題になることがしばしばである。今回、我々は前思春期に発症したマルファン症候群に対し身長増加阻止目的のカウフマン療法を施行した症例を経験したので報告する。

#### 症 例

症例 : 12歳, 中学生。

主訴 : 胸痛と原発性無月経。

家族歴 : 特記すべきことなし。

既往歴 : 3歳時、肺炎の既往あり。

現病歴 : 10歳時から156 cmと極めて身長が高かった。脊椎側弯もあり、近くの小児科・整形外科で follow されていた。3月12歳時、胸痛が強く当院内科を受診。精査後マルファン症候群(不全型)と診断された。この時点の最終予測身長が182 cmと、今後骨系統の障害が進行する恐れもあるため、身長増加阻止目的で同年5月当科紹介となった。

理学的所見 : 初診時、初経発来はなく、身長168 cm体重39 kg、乳房は Tanner 分類のII度、恥毛はIII度で、腋毛はなかった。子宮腔部は小さく、子宮は

鳩卵大であった。

4つの主要症状の内2つ以上存在すれば Marfan 症候群と診断するが、本例は下線に示した特徴的骨症状しか該当がなく、Marfan 症候群 (不全型) と診断した (表1)。

検査所見：血中エストラジオールは26.8 pg/ml, LH-RH テストでのLHは前値6.6 mIU/ml, 30分値は18.9 mIU/ml, FSH前値5.1 mIU/ml 30分値6.5 mIU/mlで、反応は弱かった。成長ホルモン・プロラクチン・甲状腺ホルモン値に異常なく、インシュリン・成長ホルモン・TSH負荷試験も正常範囲内であった (表2)。また、暦年齢は12歳5ヵ月であったが、手根骨のレントゲン写真からの骨年齢は12.0歳であった。尚、骨年齢の算出は、杉浦の方法<sup>1)</sup>を用いた。

症例の経過 (図1)：骨端線早期閉鎖を期待し、早速、初診時からカウフマン療法を開始した。最初の2クールはプロギノン・デポー10 mgを筋注し、その10日後、プロギノン・デポー10 mgとプロルトン・デポー125 mgを筋注し、消退出血を認めた。その後は、プレマリン0.625 mg1錠、ソフィアC (ノルエ

表1 マルファン症候群の診断

#### 1. 特徴的骨症状

##### ・蜘蛛状手

Sternberg sign, wrist sign, Metacarpal index > 8

##### ・上半身長/下半身長 < 1

##### ・高角度弓状口蓋・長頭蓋

##### ・偏平足・反張膝

##### ・肋骨の変形 (漏斗胸・鳩胸)・脊椎側弯

##### ・関節の過伸展・習慣性脱臼

#### 2. 眼 症 状：水晶体の亜脱臼・脱臼

#### 3. 心血管異常：解離性大動脈瘤・大動脈の拡張

#### 4. 家族内発生：常染色体優性遺伝

4症状のうち2症状以上を認めたものをマルファン症候群と診断する

(下線は症例が該当する症状を示す)

表2 内分泌学的検索

|                |         |        |               |
|----------------|---------|--------|---------------|
| Estradiol      | 26.8    | pg/ml  | ( 30-90 )     |
| LH             | 6.6     | mIU/ml | ( 1.6-9.3 )   |
| FSH            | 5.1     | mIU/ml | ( 1.9-9.5 )   |
| Cortisol       | 10.2    | ug/ml  | ( 5.0-20.0 )  |
| Prolactin      | 20.0    | ng/ml  | ( <30.0 )     |
| GH             | 0.2-3.7 | ng/ml  | ( <5.0 )      |
| T <sub>3</sub> | 1.75    | ng/ml  | ( 0.70-1.80 ) |
| T <sub>4</sub> | 8.5     | ug/ml  | ( 3.7-12.5 )  |
| TSH            | 0.61    | uU/ml  | ( 0.40-5.00 ) |

チステロン2 mg, メストラノール0.1 mg) 1錠に切り替え、定期的に消退出血を認めていた。身長増加抑制効果がみられず、1989年9月下旬から倍量のプレマリン0.625 mg2錠、ソフィアC2錠に変更した。その結果、徐々に身長増加率は予測値を下回って行った。8月現在もカウフマン療法施行し経過観察中である。

次に、治療経過中の10月12日 (day 7) の時点での検査所見を次に示す。エストロゲンは61.6 pg/mlと上昇し、LH-RH テストでのLHは前値5.9 mIU/ml 30分値は32.1 mIU/ml, FSHは前値3.1 mIU/ml 30分値5.6 mIU/mlであり、反応性も上昇してきた。骨年齢は14.5歳でありと暦年齢の12.9歳を上回った。また、Bayleyらの表<sup>2)</sup>から算出した最終予測身長も182 cmから177.1 cmと減少し (図2)、カウフマン療法が有効と思われた。

## 考 察

女性においては、身長が高すぎることは深刻な悩みである。北欧では成人女性の平均身長が170 cmを上回るため、このような心理的影響ばかりでなく高身長による側弯、脊椎の圧迫骨折等が問題になることが多い<sup>3)</sup>。この様な理由から、高身長が予測される思春期女性に身長増加阻止目的のホルモン療法が積極的に行われている<sup>3)</sup>。しかし、わが国では、成人女性の平均身長は未だ160 cmに満たないため、このよ

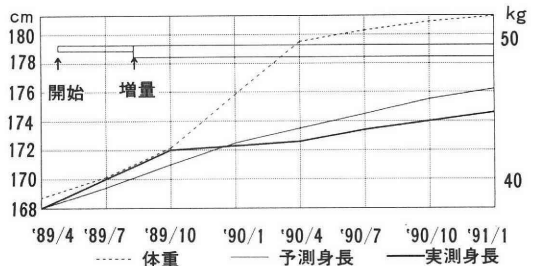


図1 症例の経過 (1)

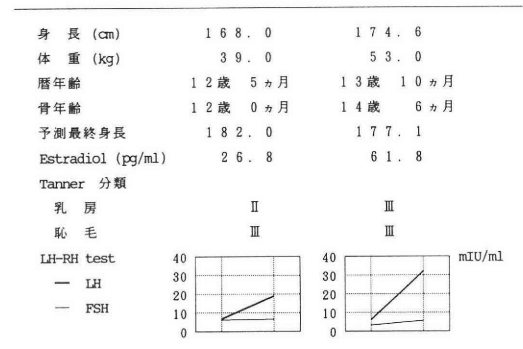


図2 症例の経過 (2)

表 3 身長増加阻止目的のカウフマン療法

| 報告者                           | 対 象         | 薬 剤 名   | 投 与 量  |
|-------------------------------|-------------|---|--|
| Rinshospitalet                | 健常者         | ① Ethinyl estradiol<br>MPA  | 0.1 mg / day<br>10mg × 5 days / month  |
| Knudtzon (1988) <sup>4)</sup> | 健常者         | ① Estradiol valerate<br>Noresthisterine<br>② Ethinyl estradiol<br>Noresthisterine | 6-8 mg / day<br>5mg × 7 days / month<br>0.25 mg / day<br>5mg × 7 days / month    |
| Skovby (1977) <sup>5)</sup>   | Marfan syn. | ① Premarin<br>MPA<br>② Ethinyl estradiol<br>MPA                                   | 10 mg / day<br>10 mg × 5 days / month<br>0.25 mg / day<br>10 mg × 5 days / month |

うな必要性は全く無い。

ところが, Marfan 症候群では本邦においてもしばしば 180 cm 以上の高身長となる。欧米では高身長が予測される Marfan 症候群にカウフマン療法を施行し, 有効であったとする報告も散見される<sup>3)</sup>。しかし, 本邦では, 身長増加阻止目的で Marfan 症候群にカウフマン療法を行ったという報告はない。我々の症例が初めての報告と思われる。

この身長増加阻止目的のカウフマン療法の報告<sup>3-6)</sup>をみると, Marfan 症候群に対する投与量が健常者に用いる量に比べて多いとは思えない(表 3)。しかし, 投与開始時期が, 健常者では 10-12 歳であるのに対して<sup>3)</sup>, Marfan 症候群では診断がつき次第早く開始すべきであるという報告が多い<sup>4)</sup>。投与中止時期に関しても意見の一致をみない。健常者の場合は, 骨年齢 14 歳・最終予測身長が 170 cm 未満をカウフマン療法の中止時期とする意見<sup>3)</sup>がある。これに対し Marfan 症候群では, 骨年齢が 16 歳・最終予測身長が 180 cm 未満を投与終了の目安とすべきであるとしている報告<sup>4)</sup>がある。また, カウフマン療法の身長増加阻止効果は Marfan 症候群の方が健常者より効果が少ないという<sup>4)</sup>。その理由は必ずしも明確ではない。Marfan 症候群は前思春期から思春期を通して長管骨の発育スピード自体が速いという骨自体の特異性<sup>7)</sup>で, その違いを説明できるかも知れない。

われわれは初経発来以前の少女にカウフマン療法を行った。当然月経出血が来することから, 本人及び母親を含めて十分な説明を行った。また, カウフマン療法の副作用も十分に説明する必要がある。カウフマン療法の副作用には消化器症状(悪心, 嘔吐), 体重増加, 肝機能障害, 不正子宮出血などがある。このうち最も頻度の高い消化器症状は, 投与量を少ない量から開始して漸増すればある程度軽減できると思われる。また, 学生においては就学時の消化器

症状を避けるため, 休日前に投与開始する配慮も必要とする報告もある<sup>5)</sup>。本例では悪心・嘔吐など認めなかったが, 3 カ月で約 10 kg と急激な体重増加を認めた。思春期のカウフマン療法が性機能に及ぼす影響など不明な点も多いので, カウフマン療法は必要最小限に止めるべきとする意見も出て来る。このためには, 中枢が発動し内因性エストロゲンが充分分泌されると思われる時期にカウフマン療法を中止できれば理想的である。しかし, 前思春期で内因性のステロイドと外因性のステロイドが骨に対して同等の効果を発揮するかは不明である。その点からは中枢の成熟の有無に関わらず骨端線が完全閉鎖するまで外因性ステロイドを投与する方が良いと我々は考える。

本症例は当初, 身長抑制効果が低く, 4 カ月後から投与量を増加したところ, 抑制効果の改善を図ることができた。このことから, 性ステロイドの骨成長抑制効果には用量依存性があることは明白である。正常者と同等の身長増加抑制効果を得るためには, Marfan 症候群では常用以上のステロイド量が必要かもしれない。そして, 治療効果に応じ投与量を適宜漸増・漸減していく必要性があらう。

Marfan 症候群は性ステロイドの影響の少ない前思春期から身長の増加は著しいので, 身長発育のスパークが起こる前に可能な限り身長を抑制する必要がある。そのためには, 早期発見が大切である。本症例は治療開始時期の骨年齢が 12 歳であったため, 更に早期に治療開始していれば最終身長がまだ抑制されたものと思われる。

本症例はまだ思春期の途上にあり, 骨端線はまだ閉じていない。カウフマン療法の身長増加抑制を今後繰り返して評価する必要がある。また, 我々は初経発来以前の少女にカウフマン療法を行ったのは本症例以外に経験はなく, 性成熟期以降の性機能への影

響や副作用なども慎重に観察していくつもりである。

### まとめ

1. 今回、我々は Marfan 症候群に身長増加阻止目的でカウフマン療法を施行し有効だった症例を経験し、報告した。

2. 高身長が予測され、脊椎に障害を来す恐れのあるマルファン症候群に積極的にカウフマン療法を行うことは、心理的配慮・骨系統の障害の予防の点からも充分有意義と思われた。

3. 思春期におけるカウフマン療法が成熟期以後の性機能へ及ぼす影響等副作用の面で明確でないことも多く、Marfan 症候群に対するカウフマン療法の是非・投与方法など今後の検討が必要と思われる。

### 文 献

- 1) 杉浦保夫：骨年齢評価法，日本整形外科学会雑誌，44：1021，1970
- 2) Nancy, B., Samuel, R., Pinneau, M. A., Barkley, C.: Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with the Greulich-Pyle hand standards, *The Journal of Pediatrics*, 40: 423, 1952
- 3) Olav, T.: Oestrogen treatment of adolescent tall girls; short term side effects, *Acta. Endocrinol (Copenh)*, 279: 170, 1986
- 4) Kudtson, D. A.: Estrogen Treatment of Excessively Tall Girls with Marfan Syndrome, *Acta. Pediatr. Scand.*, 77: 537, 1988
- 5) Stovsky, F.: Estrogen Treatment of Tall Stature in girls with Marfan Syndrome, *Birth Defect*, 13: 155, 1977
- 6) Warren, P. M.: Scoliosis and fractures in young ballet dancers. Relation to delayed menarche and secondary amenorrhea, *N. Eng. J. Jour. of Medicine*, 314: 1348, 1986
- 7) McKusick, V. A.: Heritable Disorders of Con-

nective Tissue, 4th ed., C. V. Mosby Co., St. Louis, 1972

### Estrogen progesterone cyclic therapy of a tall girl with marfan syndrome

Toshimichi Oki, Tsutomu Douchi,  
Tamotsu Matsumoto, Yukihiro Nakamura,  
Akito Mori, Shin-ichi Yamamoto,  
Kazuto Iio and Yukihiro Nagata

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

Marfan syndrome which has specific proportion often complicate with scoliosis and vertebral fracture due to its rapid growth. In this study, we performed the Estrogen Progesterone Cyclic Therapy (EPCT) to the patient with Marfan syndrome in order to suppress the overgrowth. The patient was 12-year-old girl, and had no menarche. At 10 years old, she was 156cms, and had slight scoliosis. At 12 years old, she visited the department of internal medicine of our hospital because of chest pain. She was diagnosed as Marfan syndrome. At that time, it was thought that her predicting adult height would reach 182cms and her scoliosis would progress more and more. From this point of view, She was introduced to our department, and we performed EPCT to her. One year after treatment, the growth rate of hers gradually decreased and the predicting adult height of her change to 177.1cms.

Our report shows that EPCT for the patient of Marfan syndrome to slow down the growth has itself effectiveness and significance in prevalence of scoliosis and so on.

(受付：1991年6月19日)

## 視床下部—下垂体—精巣機能の老化

### 第3報：精巣機能の老化の研究

#### The Aging of Hypothalamo—Pituitary—Testicular Axis. III: Testicular Endocrine 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  
Naohiko MIKUMA    Yoshiaki KUMAMOTO    Hiroshi MARUTA

Department of Urology, Sapporo Medical  
College, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

20歳から90歳までの内分泌疾患を持たない成人男子216例において血中 testosterone, gonadotropin 基礎値, testosterone の HCG に対する反応性を検討することにより, 老化に伴う精巣機能の変化について検討した。

血中 testosterone, estradiol 基礎値及び HCG に対する testosterone 反応性は 50 歳以降減少傾向にあった。

血中 testosterone 基礎値の HCG 投与後の最大反応値に対する比は, LH, testosterone とともに正常である I 群では  $55.0 \pm 7.7\%$  (MISE) であるのに対し, testosterone 正常で LH が上昇している II 群では  $65.6 \pm 2.5\%$  と上昇していた。一方 LH の上昇にも拘らず testosterone が低下している III 群では  $43.8 \pm 4.6\%$  と減少していた。

以上の結果より, 50 歳以降の老年者での精巣内分泌機能の低下が明らかであったが, それには精巣自体の老化の他に gonadotropin の生物学的活性の低下が関与している可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 152-156, 1992)

#### 緒 言

視床下部—下垂体—精巣機能の老化が, 上位中枢において先に始まるのか, それとも性腺が先なのかは議論のあるところであるが, 人においては性腺先行説が定説となりつつある<sup>6)</sup>。女子においては, 閉経という現象があり, 視床下部—下垂体—卵巣系の老化については, 比較的詳細な検討が行われているが, 男子における視床下部—下垂体—精巣系の老化の検討は, 未だ充分とは言えない。そこで今回我々は, 血中 testosterone, estradiol, gonadotropin 基礎値及び testosterone の HCG に対する反応性を分析することにより, 睾丸内分泌機能の老化に伴う変化について詳細に検討した。

#### 対 象

20歳から90歳までの, 内分泌疾患を持たない成人男子216例を対象として検討した。

#### 方 法

1) 血中 testosterone, estradiol および gonadotropin 基礎値の検討

採血は基本的に9時から12時までの間とした。

2) HCG test

前採血の後, HCG を3日間連続で10,000, 5,000, 5,000 IU を筋注した。採血はHCG投与24, 72時間後にも施行し, 血中 testosterone, estradiol の反応性を検討した。

3) ホルモン測定

testosterone 測定は, Wien 社製, testosterone test kit, estradiol 測定は, C I S 社製 estradiol I125 kit, LH, FSH ノ測定は第一ラジオアイソトープ社製 LH, FSH Kit 第一を用い, R I A にて測定した.

## 結 果

### 1) 性ステロイドの加齢に伴う変化

血中 testosterone 基礎値は Fig. 1 に示したように加齢に伴って減少傾向し, 特に 50 歳以降低値を示すものが多く認められた. そして, 各年代ごとの testosterone 基礎値を検討すると, 50 歳以降の各年代では 20 代の若年者に比べ有意 ( $P < 0.01$ ) に減少していた. しかし, その一方で高齢に至るまで若年者と同程度の testosterone 基礎値を維持する者もあった.

血中 estradiol 基礎値も Fig. 2 に示したごとく加齢に伴い減少する傾向にあった.

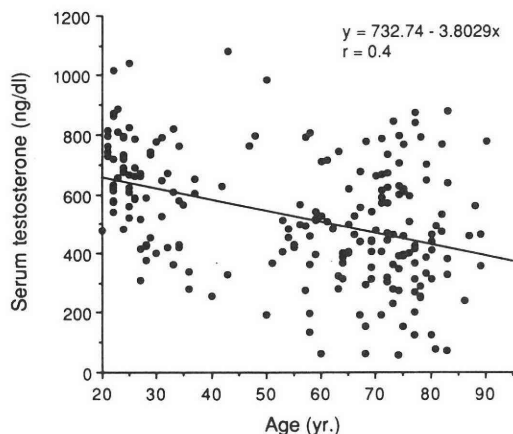


Fig. 1 Serum testosterone levels as a function of age in males

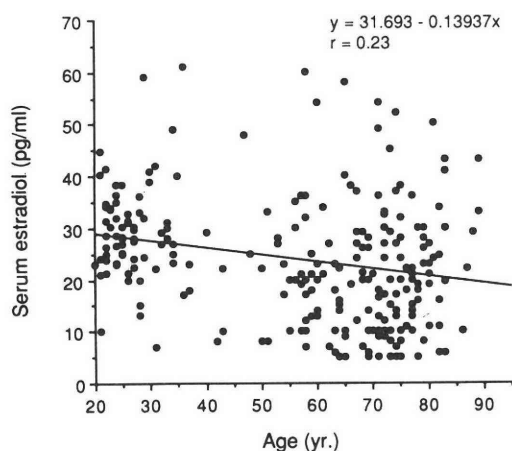


Fig. 2 Serum estradiol levels as a function of age in males

### 2) 性ステロイドと gonadotropin の相関性

血中 testosterone と LH (Fig. 3), FSH (Fig. 4) の相関性を検討すると, 両者の間には負の相関性が認められ testosterone が低いほど LH, FSH が上昇する傾向が明らかであった.

LH と testosterone の相関図を Fig. 5 に示すごとく, LH の正常上限である 18.6 mIU/ml (20, 30 歳代の若年者の mean + 2SD) と, testosterone の正常下限である 376 ng/dl (20, 30 歳代の若年者の mean + 2SD) で区切って 4 つの領域に分け, 各々の比率が加齢に伴ってどのように変化するかについて検討した. Table 1 に示すごとく, 40 歳代まではほとんどの者が LH, testosterone とともに正常である I 群に属していた. しかし, 50 歳代以降 II 群 (LH 上昇, testosterone 正常), 及び III 群 (LH 上昇, testosterone 低下) に属する者が出現し, しかもその各年代内における比率は加齢に伴って増加傾向にあった. IV 群は (LH 正常, testosterone 低下) については, 加齢に伴う変

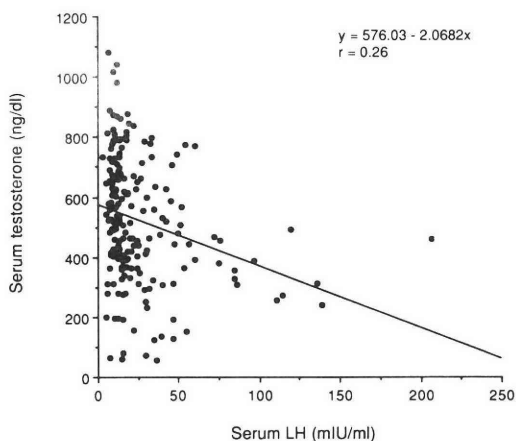


Fig. 3 Correlation of serum testosterone and LH

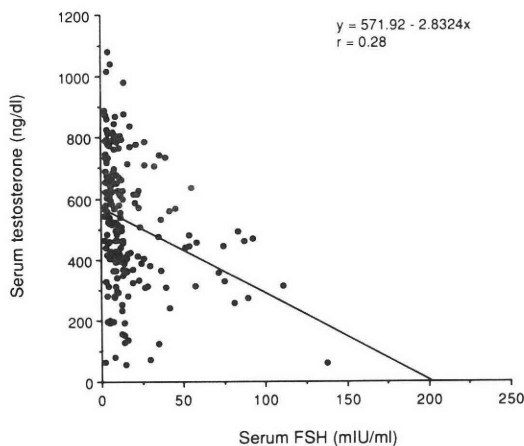


Fig. 4 Correlation of serum testosterone and FSH

動が明らかではなかった。

3) HCG 投与に対する testosterone 反応性の加齢に伴う変化

HCG 投与時の testosterone の反応性は、投与後 72 時間で peak を示す<sup>9)</sup>ことから、各年齢群で HCG 投与後 72 時間での反応性について検討した。Fig. 6 に示すごとく、testosterone 反応値は基礎値と同様に、50 歳以降の老年者において低下傾向にあった。I - IV 群の各々について testosterone 基礎値及び HCG に対する反応値を検討すると、Fig. 7 に示したごとく testosterone 基礎値が正常の I、II 群のうち、LH 上昇を伴っていた II 群では HCG に対する反応性が I 群に比して有意 ( $P < 0.01$ ) に減少していた。また、testosterone の低下にも拘らず LH 正常であった IV 群では、III 群よりも良好な反応性を示していた。

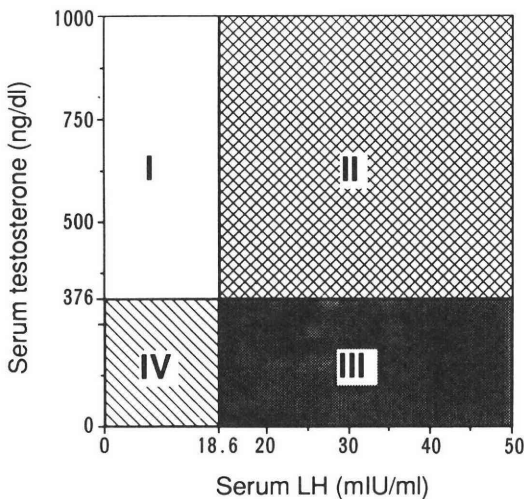


Fig. 5 Correlation of serum testosterone and LH

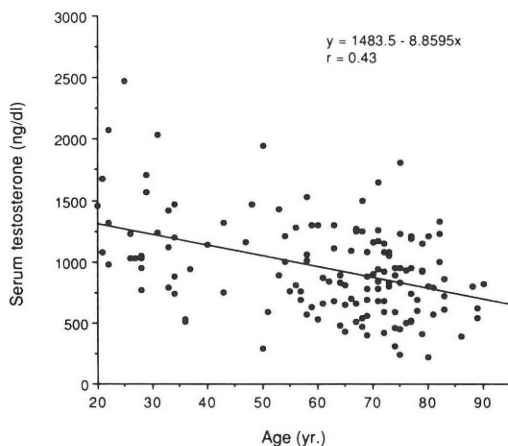


Fig. 6 Serum testosterone response at 72 hours after HCG administration.

この I - IV 群の LH, testosterone 基礎値, HCG に対する testosterone 反応性を Table 2 に示すが、ここで testosterone 反応値に対する基礎値の比率を比較すると、I 群では  $55.0\% \pm 7.7\%$  であるのに対し、II 群では  $65.6 \pm 2.5\%$  と基礎値の比率が高かった。反対に、testosterone 基礎値の低下のある III, IV 群ではその比率は  $43.8 \pm 4.6\%$ ,  $32.4 \pm 19.0\%$  と著明に低下していた。

## 考 察

今回の我々の検討では、50 歳以降血中 testosterone の減少及び gonadotropin の上昇傾向が明らかであり、諸家の報告と同様の結果を得た<sup>1,3,6,9,12,13)</sup>。

I - IV 群の各年代ごとの割合の、加齢に伴う変動を見ると、40 歳代までは、ほとんどの者が LH, testosterone とともに正常である I 群に属していた。しかし、50 歳以降、testosterone は正常であるが LH が上昇

Table 1 The proportion of 4 subgroups as a function of age

| Age(yr.)     | I    | II   | III  | IV     |
|--------------|------|------|------|--------|
| 20-49 (n=66) | 87.9 | 4.5  | 0    | 7.5    |
| 50-59 (n=23) | 56.5 | 26.1 | 4.3  | 13.0   |
| 60-69 (n=36) | 33.3 | 27.8 | 22.2 | 16.7   |
| 70-79 (n=58) | 29.3 | 41.4 | 22.4 | 6.9    |
| 80-89 (n=23) | 13.0 | 47.8 | 30.4 | 8.8(%) |

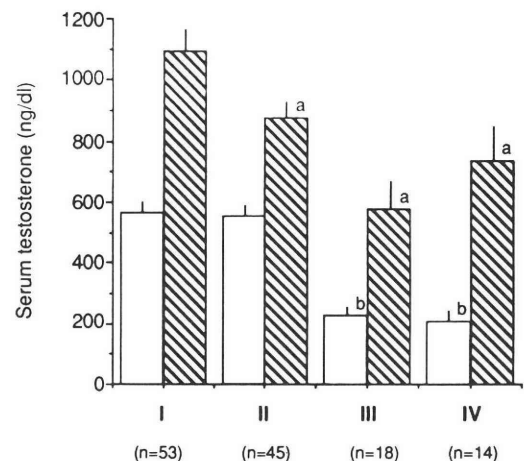


Fig. 7 Serum testosterone levels at basal and 72 hours after HCG administration. Open columns indicate basal levels and hatched columns indicate testosterone responses at 72 hours after HCG administration. Bars indicate S. E.

a:  $p < 0.01$  versus group I

b:  $p < 0.01$  versus group I, II

Table 2 Basal levels of serum LH, testosterone(A) and testosterone response to HCG(B) and A/B ratio.

|              | mean age<br>(year) | LH<br>(mIU/ml) | testosterone (ng/dl) |                          | A/B ratio<br>(%) |
|--------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------------|------------------|
|              |                    |                | basal(A)             | 72 hours after<br>HCG(B) |                  |
| I (n = 103)  | 44.9               | 11.6 ± 0.3     | 565.9 ± 27.4         | 1092.1 ± 56.8            | 55.0 ± 7.7       |
| II (n = 55)  | 70.6               | 42.4 ± 4.2     | 549.7 ± 22.1         | 876.5 ± 42.9             | 65.6 ± 2.5       |
| III (n = 29) | 74.1               | 49.8 ± 6.4     | 227.9 ± 26.4         | 574.8 ± 72.7             | 43.8 ± 4.6       |
| IV (n = 20)  | 59.0               | 11.7 ± 0.9     | 208.4 ± 30.4         | 736.2 ± 110.0            | 32.4 ± 19.0      |

Values given are mean ± S.E.

しているII群が25%以上となり、高齢になるに連れてその比率は、更に大きくなっていった。さらに、60歳代になるとLHの上昇にも拘らず、testosteroneの減少しているIII群が20%以上の比率で認められるようになった。

この結果は、以下の様に解釈される。即ち、50歳以降、精巣機能の低下の伴い代償性にLH分泌が亢進し、血中testosteroneは結果的に正常範囲内に保たれる(II群)。しかし、60歳以降では精巣機能の低下が更に著明となり、LH分泌亢進にも拘らず、血中testosteroneが減少しているIII群が認められるようになる。老年者の精巣機能の低下は外因性HCG投与に対するtestosterone反応性の減少からも明らかであり、諸家の報告<sup>7,8)</sup>と同様に50歳以降その減少傾向が明らかであった。

一方、最近の知見として、老年者のgonadotropinの生物学的活性の低下が、精巣機能の低下に関与している可能性が示唆されている<sup>4,10)</sup>。

II群とIII群を比較すると、両者の平均年齢、血中LH基礎値は同様であるが、III群の血中testosteroneの基礎値、HCGに対する最大反応値ともII群より有意に低く、III群の精巣機能の低下がII群より進んでいることが示唆される。しかし、testosterone基礎値のHCG投与後の反応値に対する比を検討するとII群が約65%であるのに対し、III群では約43%と著明に低下していた。つまりIII群では、内因性のLHによっては睾丸が最大限分泌し得る量のtestosteroneの約40%程度しか分泌されていないということであり、内因性LHの生物学的活性の低下を示唆する。

LHの生物学的活性の変化は老年者のみで認められるわけではなく、思春期に亢進すること<sup>6)</sup>や、menstrual cycleに伴って変化する事<sup>11)</sup>が知られている。またhypogonadism<sup>2)</sup>ではその活性が低下する事なども報告されており、精巣機能障害を伴う種々の病態においては、gonadotropinの免疫学的活性のみならず、その生物学的活性の検討も同時に検討する事が

重要であると考えられた。

## 文 献

- 1) Baker, H. W. G., Burger, H. G., DEKretzer, D. M., Hudson, B., O'connor, S., Wang, C., Mir-ovics, A., Court, J., Dunlop, M. and Rennie, G. C.: Changes in the pituitary-testicular system with age, Clin. Endocrinol., 5: 349, 1976
- 2) Beitins, I., Axelrod, L., Ostrea, T., Little, R. and Badger, T. M.: Hypogonadism in a male with an immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: characterization of the abnormal hormone, J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 1143, 1981
- 3) Bremner, W. J., Vitiello, M. V. and Prinz, P. N.: Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men, J. Clin. Endocrinol. Metab., 56: 1278, 1983
- 4) Celani, M. F., Montanini, V., Baraghini, G. F., Carani, C. and Marrama, P.: Effects of acute stimulation with gonadotropin releasing hormone (GnRH) on biologically active serum luteinizing hormone (LH) in elderly men, J. Endocrinol. Invest., 7: 589, 1984
- 5) Lucky, A. W., Rich, B. H., Rosenfield, R. L., Fang, V. S. and Roche-Bender, N.: LH bioactivity increases more than immunoreactivity during puberty, J. Pediatr., 97: 205, 1980
- 6) Meites, J.: The neuroendocrinology of hypothalamic aging, Neuroendocrine perspectives, 5: 179, 1985
- 7) 加藤堅一, 本松利治, 赤嶺康夫, 名和田新, 植田太郎, 合馬紘, 梅田文夫, 土師正文, 幸田和夫: シンポジウム I: 老化とホルモン, 2. 下垂体性腺系 (男子), 日本内分泌会誌, 53: 1300, 1977
- 8) Rubens, R., Dhont, M. and Vermeulen, A.: Further studies on Leydig cell function in old age, J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 40, 1974
- 9) Stearns, E. L., MacDonnell, J. A., Kaufman, B. J., Padua, R., Lucman, T. S., Winter, L. J. S. D. and Faiman, C.: Declining testicular function with age. Hormonal and clinical correlates,

Am. J. Med., 57: 761, 1974

- 10) Tenover, J. S., Dahl, K. D., Hsueh, A. J. W., Lim, P., Matsumoto, A. M. and Bremner, W. J.: Serum bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone levels and the response to clomiphene in healthy young and elderly men, J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1103, 1987
- 11) Veldhuis, J. D., Beitins, I. Z., Johnson, M. J., Serabian, M. A. and Dufau, M. L.: Biologically active luteinizing hormone is secreted in episodic pulsations that vary in relation to stage of the menstrual cycle, J. Clin. Endocrinol. Metab., 58: 1050, 1984
- 12) Vermeulen, A. and Deslypere, J. P.: Testicular endocrine function in the ageing male, Maturitas, 7: 273, 1985
- 13) Winters, S. J. and Troen, P.: Episodic luteinizing hormone (LH) secretion and the response of LH and follicle-stimulating hormone to LH-releasing hormone in aged men: Evidence for coexisting primary testicular insufficiency and an impairment in gonadotropin secretion, J. Clin. Endocrinol. Metab., 55: 560, 1982

## **The aging of hypothalamo-pituitary — testicular axis**

### **III: Testicular endocrine function in male senescence**

Naohito Mikuma, Yoshiaki Kumamoto  
and Hiroshi Maruta

Department of Urology, Sapporo Medical  
college, chuo-ku, Sapporo 060, Japan

Testicular endocrine function in male senescence was evaluated by analyzing serum levels of basal testosterone, estradiol and gonadotropin and, furthermore, testosterone response to exogenously administered HCG in 216 males with no endocrinological disorders between the ages of 20 and 90 years.

Serum levels of basal testosterone, estradiol and their response to HCG tended to decrease after the age of 50 years.

The ratio of basal testosterone to its response to HCG was  $55.0 \pm 7.7\%$  in group I subjects, who had normal levels of basal LH and testosterone. In group II subjects, who had normal testosterone and elevated LH levels, the ratio was elevated up to  $65.6 \pm 2.5\%$ . In group III subjects, who had low testosterone and elevated LH levels, the ratio was decreased to  $43.8 \pm 4.6\%$ .

These results suggest that 1) after the age of 50, testicular endocrine function declines. 2) decreased biological activity gonadotropin might be responsible, at least in part, to the decline of testicular endocrine function in male senescence.

(受付: 1990 年 8 月 24 日)

## 凍結保存精子の受精機能 第2報

### —HOS test を中心にして—

#### Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Human Spermatozoa The 2nd Report —HOS Test—

東北大学医学部産科学婦人科学教室

吉田 仁 秋  
Hiroaki YOSHIDA

戸 沢 秀 夫  
Hideo TOZAWA

陳 偉 業  
Wai Ip CHAN

深 谷 孝 夫  
Takao FUKAYA

萬 代 泰 男  
Yasuo MANDAI

千 田 定 則  
Sadanori CHIDA

矢 嶋 聰  
Akira YAJIMA

村 上 章  
Akira TSUIKI

村 上 節  
Takashi MURAKAMI

田 村 み どり  
Midori TAMURA

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

目的：精子凍結後の受精機能に関しては、十分な評価が成されていない。そこで凍結融解前後の精子受精機能を、HOS test 法を中心に評価した。更に精子尾部の膜構造を走査型電顕を用いて観察し、凍結による膜構造の変化を観察した。方法：凍結保存は一般精液検査後K S-II液を使用し、Program-freezerにより凍結後液体窒素中に保存した。結果：1)凍結融解前後の平均蘇生率は、乏精子症群が精液検査正常群より低い傾向を認めた。2)凍結前の総膨化率は精子濃度と有意の相関を認めた。3)凍結前後の総膨化率は運動率と各々有意の弱い相関を認めた。4)凍結前後のG-type膨化率は精子濃度、運動率と有意の相関を認めた。5)走査型電顕による凍結前後の比較では、その内膜構造に変化は認められなかった。しかし乏精子症群では凍結により、受精機能の低下する傾向を示した。よって乏精子症群では凍結融解後の臨床応用に工夫が必要であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 157-162, 1992)

#### 緒 言

精子の凍結保存方法は、既に臨床応用され、欧米ではAIDばかりではなく、IVFにも繁用されてきている。しかし凍結精子の受精機能の評価が充分なされているとはいえない。前回我々は、凍結保存精子の受精機能としてHamster testや頸管粘液を用いた精子運動能試験(PENETRAK test)により、乏精子症が凍結保存により受精機能の低下すること

を報告した<sup>1)</sup>。そこで今回我々は、凍結前後の受精機能をHOS testを用いて評価し、更に精子尾部の膜構造の変化を走査型電顕を用いて観察したので報告する。

#### 対象及び方法

研究対象は、正常及び不妊症患者96名とし、精液採取は用手的に行い37°C、30-60分間静置液化した。半量是一般精液検査後HOS testを施行し、残量は凍

結保存用とした。前回同様凍結前の精子濃度により、A)  $20 \times 10^6/\text{ml}$  未満, B)  $20-40 \times 10^6/\text{ml}$ , C)  $40 \times 10^6/\text{ml}$  以上の3群に分類し、各群での凍結融解後の精子機能を検討した。

### 1) 精子の凍結方法

精子の凍結保存はKS-II液を使用し、精液と1:1に混合し、0.5ml ストロー管に注入した。凍結方法は、Program-freezer (PLANNER 社 KRYO-10) を用いて段階的に行い、凍結速度は、前回と同様の設定条件とした。即ち室温より $-5^\circ\text{C}$ までは、 $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却し、 $-5^\circ\text{C}$ で10分間holdした後、 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ で $-80^\circ\text{C}$ まで凍結後、更に5分間holdして、液体窒素中に保存した。融解は $37^\circ\text{C}$ の微温湯にて急速融解を行った。精子の蘇生率を算出した後、HOS test を施行した。

### 2) HOS test

HOS test は、Jendran ら<sup>2)</sup>の方法に準じ、fructose 液とクエン酸ナトリウム液を1:1に混合させた低浸透圧溶液 (150mOsm) を用いた。この低浸透圧溶液 1 ml と精液 0.1ml とを混合させ、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  in air 下で30-60分間培養を行った後、400倍にて鏡検した。低浸透圧溶液の作用で変化を来した精子尾部の変化により a-g type に分類した(図1)。少なくとも100以上の精子数を算定し、総膨化率及びG-type 膨化率の割合を算出した。凍結精子も融解後、上述の方法にて膨化率を算出した。

### 3) HOS test に於ける膨化精子の走査型電子顕微

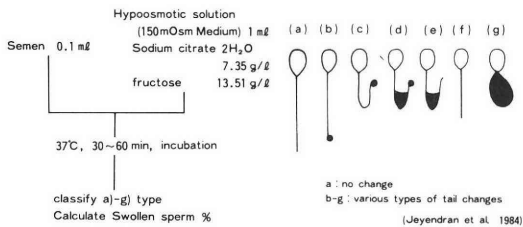


図1 HOSテストの分類

膨化精子の形態分類

### 鏡所見

HOS test に於ける精子尾部の膨化を、凍結前・融解後の各々について走査型電子顕微鏡にて観察した。方法は、低浸透圧溶液を濃縮させ、2% glutaraldehyde で1時間固定洗浄後、poly-L-lysine で coat したカバーガラスに滴下した。ついで0.1 M phosphate buffer で洗浄した後、2% タンニン酸で1時間導電染色し、洗浄後1% osmium tetroxide で1時間の後固定を行った。エタノール系列で脱水し、その後 critical point dryer HCP-2 にて臨界点乾燥を行った。試料台に銀ペーストにてマウントし白金パラジウムでコーティングを行い、日立 S-450 型走査型電子顕微鏡で観察した。

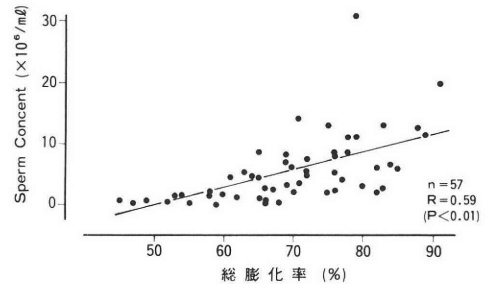


図2 a HOS総膨化率と精子濃度との相関

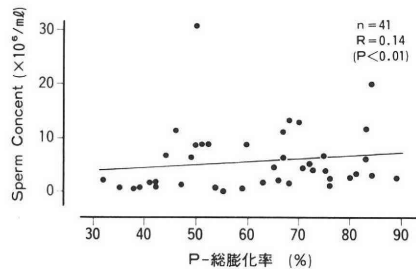


図2 b 凍結後総膨化率と精子濃度との相関

表1 凍結前後の運動率の比較

| ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | Fresh                             |                 | post thaw                         |                 | Recovery Rate   | n   |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----|
|                             | Count ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | Motility (%)    | Count ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | Motility (%)    |                 |     |
| (A) 0~20                    | $11.6 \pm 5.75$                   | $41.9 \pm 14.3$ | $11.2 \pm 9.9$                    | $21.7 \pm 21.5$ | $46.6 \pm 45.3$ | 46  |
| (B) 20~40                   | $35.3 \pm 34.7$                   | $48.6 \pm 14.5$ | $14.7 \pm 19.4$                   | $27.8 \pm 24.5$ | $51.1 \pm 43.4$ | 52  |
| (C) 40~                     | $87.6 \pm 37.5$                   | $61.2 \pm 17.2$ | $39.4 \pm 30.0$                   | $40.9 \pm 21.7$ | $63.5 \pm 29.4$ | 116 |
| Total                       | $68.2 \pm 45.7$                   | $56.5 \pm 18.1$ | $30.5 \pm 28.6$                   | $35.4 \pm 23.2$ | $59.3 \pm 35.4$ | 214 |

## 結 果

### 1) 凍結前後の蘇生率の比較

〈表1〉は凍結前後の運動率の差より蘇生率を求め、A) B) C) 各群で比較検討したものである。融解後の蘇生率は、A) B) 群の乏精子症群がC) 群より低い傾向を認めた。

### 2) 凍結前後の総膨化率と精子濃度

凍結前後のHOS test 総膨化率と精子濃度との相関関係を〈図2〉に示した。凍結前では $R=0.59$  ( $P<0.01$ )と相関関係を認めるが、凍結後では弱い相関しか得られなかった。

### 3) 凍結前後の総膨化率と運動率

同様に凍結前後のHOS test 総膨化率と運動率との相関関係を求めたのが〈図3〉である。両者とも各々 $R=0.36$  ( $P<0.01$ ),  $R=0.25$  ( $P<0.01$ )と弱い有意の相関関係を認めた。

4) 凍結前後のG-type 膨化率と精子濃度との相関関係を求めたものが〈図4〉である。凍結前では $R=0.57$  ( $P<0.01$ ), 凍結後では $R=0.42$  ( $P<0.01$ )と有意の相関関係を認めた。

### 5) 凍結前後のG-type 膨化率と運動率

同様に凍結前後のHOS test G-type 膨化率と運動率との相関関係を求めたものを〈図5〉に示した。凍結前では $R=0.58$  ( $P<0.01$ ), 凍結後でも $R=$

0.53 ( $P<0.01$ )と有意の相関関係を認めた。以上のことよりHOS test ではG-type 膨化率の方が凍結前後に於いて、より高い相関関係が得られたことになる。

### 6) HOS test 法凍結前後のA) B) C) 各群での比較

〈表2〉はHOS test に於ける総膨化率及びG-type 膨化率を凍結前後で比較し、さらにA) B) C) 各群で比較検討したものである。凍結前のG-type 平均膨化率は、 $18.0 \pm 12.7\%$ で凍結後では $10.3 \pm 6.0\%$ であり有意に低下していた。しかしA) B) C) 各群での比較では、凍結前後に有意の差は認めなかった。更に、凍結前の総膨化率の平均は $69.8 \pm 11.8\%$ で、融解後では $62.2 \pm 16.3\%$ であり、凍結前後に於いてA) 群以外有意差は認められず、凍結後に於いても平均60%以上の総膨化率を示していた。

### 7) 走査型電顕による凍結前後の比較

〈写真1〉はB-type 膨化精子の凍結前後の比較である。右側が新鮮精子、左側は凍結精子の電顕像である。新鮮精子の尾部の外周は滑らかであり、内膜は膜構造を呈している。凍結精子でも新鮮精子と同様に尾部は滑らかで2-3重にコイルし、内面は膜構造を呈している。同様に〈写真2〉はG-type 膨化精子の凍結前後の比較である。新鮮精子の尾部は多重にコイルしており、外周は滑らかである。凍結精

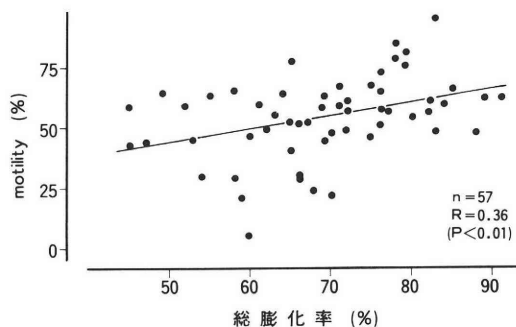


図3 a HOS 総膨化率と運動率との相関

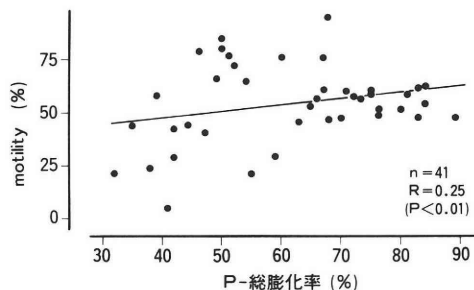


図3 b 凍結後総膨化率と運動率との相関

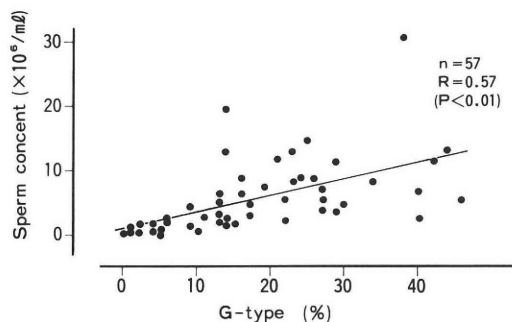


図4 a HOS G-type 総膨化率と精子濃度との相関

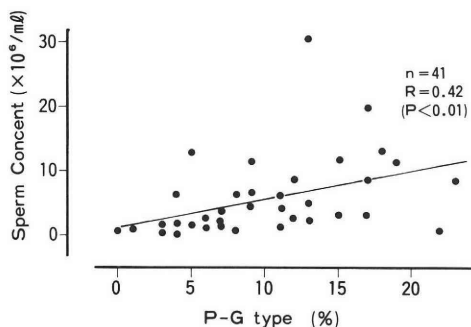


図4 b 凍結後G-type 膨化率と精子濃度との相関

表2 凍結融解前後のHOS-testの比較

| ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | G Type                     |                          | Total                     |                           |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                             | Fresh                      | Post thaw                | Fresh                     | Post thaw                 |
| (A)<br>0~20                 | 5.7 $\pm$ 5.0              | 6.2 $\pm$ 5.9            | 57.6 $\pm$ 8.1            | 51.4 $\pm$ 13.8           |
| (B)<br>20~40                | 15.9 $\pm$ 10.8            | 10.4 $\pm$ 4.5           | 72.5 $\pm$ 7.6            | 71.8 $\pm$ 17.0           |
| (C)<br>40~                  | 25.7 $\pm$ 9.2             | 22.4 $\pm$ 5.1           | 75.1 $\pm$ 8.3*           | 63.6 $\pm$ 13.2           |
| Total                       | 18.0 $\pm$ 12.7*<br>(n=57) | 10.3 $\pm$ 6.0<br>(n=40) | 69.8 $\pm$ 11.8<br>(n=57) | 62.2 $\pm$ 16.3<br>(n=40) |

\* (P&lt;0.01)

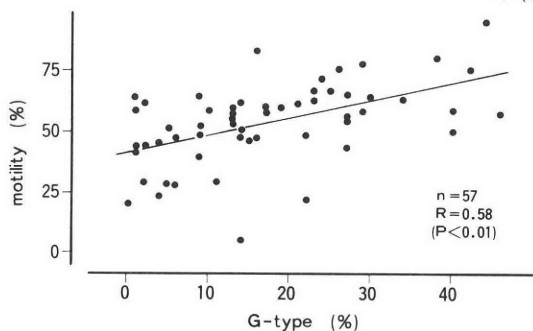


図5 a HOS G-type 総膨化率と運動率との相関

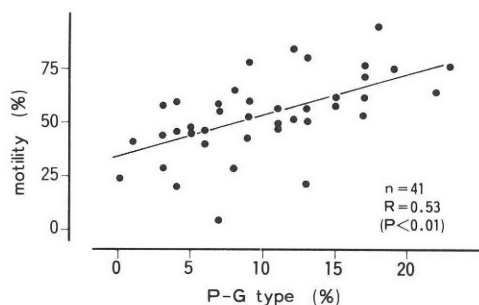


図5 b 凍結後 G-type 膨化率と運動率との相関

子の尾部も多重にコイルし、内面は一部融解していた。

### 考 察

HOS test は従来、哺乳類特にウシ精子についての検討が行われ、低浸透圧溶液中の組成並びに圧の変化より、精子尾部の膨化の状況が異なるとされていた<sup>3,4)</sup>。1984年に Jendran<sup>2)</sup>らが初めてヒト精子について種々の検討を行っている。即ち精子の原形質膜が正常であれば精子は膨化し、その上精子の膜構造が完全であれば、原形質膜の輸送機能が維持されるばかりではなく、精子の代謝や精子尾部線維の活動な

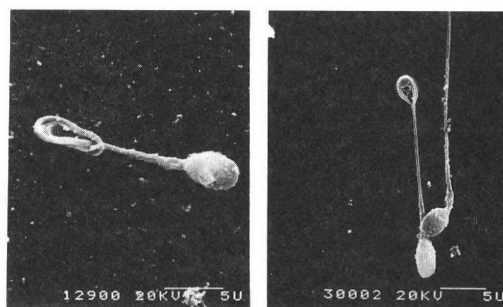


写真1 左 b type 電顕像 (凍結精子)

右 b type 電顕像 (新鮮精子)

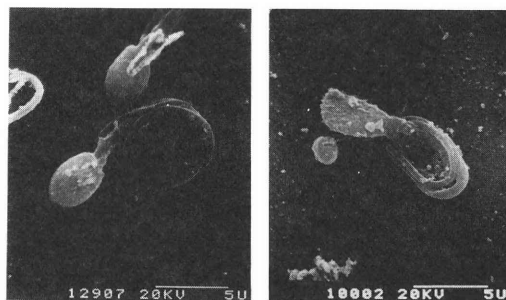


写真2 左 g type 電顕像 (凍結精子)

右 g type 電顕像 (新鮮精子)

どに関係する生化学的な機能も保っていることになる。それ故これが精子運動能更には、capacitation, hyperactivation, acrosome reaction, 卵への侵入等に影響を与え、受精現象の一役を担っていると考えられる。よって精子尾部全体が大きく膨化している G-type 膨化精子の占める割合や、総膨化率が、重要となってくる。

一般精子検査との関連では、凍結前後に於いて精子濃度と総膨化率及び G-type 膨化率との間には正の相関関係が得られ、且つ運動率との間にもより強い相関が認められた。この結果は吉野<sup>5,6)</sup>らの運動率特に G-type 膨化精子と相関関係があるという報告

と一致した。更に凍結後でもB) C) 群では平均60%以上の総膨化率を認めるが、乏精子症のA) 群では低下していた。この結果は我々が以前に報告した<sup>7)</sup>新鮮精子の総膨化率が、fertile 群で有意に高く、65%以上であったと言う基準を充たしている。そのため凍結後でも充分受精機能が維持され、凍結前後に精子の膜機能に変化の無いことを示唆する。

更に実際にこの精子の膜構造が凍結後でも維持されているか否かを判定するため、走査型電顕を用いて形態学的に観察した。その結果、凍結後でもその膜構造に変化を認めず、凍結精子でも膜構造に変化の無いことが示唆された。また、電顕的観察では、光学顕微鏡所見では尾部がcoilしている状態を膨化と見誤ったり、低滲透圧負荷以前より尾部がcoilしている場合があり、HOS test を施行する際、注意が必要であると考えられた。

HOS test と Hamster test との関係では多数の報告があり、Jendran<sup>2)</sup>や Hans<sup>8)</sup>らは良く相関をしていると報告し、逆に Chan<sup>9)</sup>らは相関がなかったと報告している。我々の研究でも両者に相関が認められなかったが<sup>7)</sup>、これはHOS test では精子尾部の膜機能を、Hamster test では精子受精能を見ている様に、両者では異なった機能を判断しているためと考えられる。

我々のI V F時の受精率との関連では、受精率50%以上の群では全て総膨化率が平均65%以上を示していた<sup>7)</sup>。Hans<sup>8)</sup>らの報告では我々の結果と同様に受精した群は全て60%以上の総膨化率を示し、更にChan<sup>10)</sup>らは精液の形態異常とG-type 膨化率を組み合わせると、I V Fの受精率の予知を61.9%に高められると報告している。このようにHOS test はI V Fの受精率の予知とも関連性を認め、現在我々はI V F時卵の受精率とも検討中である。

以上の結果より凍結保存後の精子でも精液正常患者では、受精機能が十分保持されていることがHOS test により確認され、更に凍結後でもその膜構造が維持されていることが電顕的観察により確認された。本試験は実施操作が簡便で判定にも時間を要せず、臨床応用が容易である。その上精子受精機能試験のスクリーニング法として有用性が高く、凍結保存後の精子の膨化所見の判定にも有用であることが推定された。しかし乏精子症では凍結により機能面での脆弱性が増し、膜構造にも変化をきたすことが示唆された。

凍結保存精子はA I HやI V Fでも益々臨床応用されると考えられるが、乏精子症の場合にはこの点を考慮した臨床応用が必要であり、今後の研究に期

待するものである。

## 文 献

- 1) 吉田仁秋他：凍結保存精子の受精機能，日不妊会誌，36：304，1991
- 2) Jendran, R. S., Van-derVen, H. H., et al.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, J. Reprod. Fert., 70: 219, 1984
- 3) Dervius, L. O. and Eriksson, H.: Osmotic swelling of mammalian spermatozoa, Expl. cell. Res., 42: 136, 1966
- 4) Dervius, L. O.: The permeability of bull spermatozoa to water, Polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and spermmodels, J. Reprod. Fert., 28: 41, 1972
- 5) 吉野和男，高橋健太郎他：精子機能としてのHypoosmotic swelling test と一般精液検査との関連性について，日不妊会誌，34：101，1989
- 6) 布施秀樹他：Hypoosmotic Swelling test と各種精子パラメーターとの関連性についての検討，日不妊会誌，35：252，1990
- 7) 吉田仁秋他：HOS test—我々の行っている方法，産婦治療，62：1991 投稿中
- 8) Hans, Van-der-Ven, et al.: Correlation Between Human Sperm Swelling in Hypoosmotic Medium (Hypoosmotic Swelling Test) and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay, Fertil. Steril., 44: 668, 1985
- 9) Steven, Y., Chan, W., et al.: The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay, Fertil. Steril., 44: 668, 1985
- 10) Chan, S. Y. W., Wang, C., Chan, S. T. H. and Ho, P. C.: Differential evaluation of human sperm hypoosmotic swelling test and its relationship with the outcome of in-vitro fertilization of human oocytes, Human Reprod., 5: 84, 1990

## Fertilizing capacity of fresh and frozen human spermatozoa The 2nd report —HOS Test—

Hiroaki Yoshida, Takao Fukaya,  
Akira Tsuiki, Hideo Tozawa,  
Yasuo Mandai, Takashi Murakami,  
Wai Ip CHAN, Sadanori Chida,  
Midori Tamura and Akira Yajima

Department of Obstetrics and Gynecology  
Tohoku University, School of Medicine

The fertilizing function of after thawed semen has not yet been evaluated adequately. So, we attempted to evaluate the fresh and frozen semen fertilizability based on the HOS test. Furthermore we observed the changes of the sperm tail structure due to freezing using the scanning type electron microscope. The freezing medium used was KS-2 solution and in this method we used program freezer. After freezing, we preserved the semen in liquid nitrogen. 1) In group A) and B) there was low values in the recovery rate. 2) There was significant correlation between the total swollen sperm rate

before freezing and the sperm concentration. 3) There was also significant correlation between the total swollen sperm rate before freezing and the motility. 4) A good correlation was observed between G-type swollen sperm rate before freezing and after thawed semen and both sperm concentration and motility. 5) On comparison, before and after freezing, by the scanning type electronic microscope there was no change in the swollen sperm membrane structure. We could demonstrate that sperm specimens endure freezing and maintain the sperm membrane integrity in the normal sperm count group.

(受付：1991 年 3 月 8 日)

# THE EFFECT OF KALLIKREIN ON HUMAN SPERM CAPACITATION

Nikolaos SOFIKITIS and Ikuo MIYAGAWA

Department of Urology

Tasuku HARADA, Toshiko TODA, Yasuyuki MIO  
and Naoki TERAOKA

Department of Obstetrics and Gynecology Tottori University  
School of Medicine, Yonago 683, Japan

---

**Abstract:** The role of kallikrein on human sperm capacitation was evaluated. It was proved that the percentage of acrosome-reacted spermatozoa after sperm incubation with ionophore A23187 was significantly higher in sperm samples preincubated with kallikrein compared with samples preincubated without kallikrein. Considering that sperm capacitation is essential for the occurrence of acrosome reaction, our results suggest that kallikrein enhances human sperm capacitation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 163-166, 1992)

---

## Introduction

Kallikrein, a serine proteinase, liberates vasoactive peptides (kinins) from their kininogen precursors in  $\alpha_2$ -globulin<sup>1)</sup>. Kallikrein has a positive effect on sperm motility<sup>2,3)</sup> and significantly increases spermatozoal penetration into cervical mucus in normozoospermic subjects after three hours incubation<sup>4)</sup>. Furthermore, kallikrein increases sperm fructolysis<sup>5)</sup>, sperm oxygen consumption<sup>6)</sup>, and sperm intracellular cyclic adenosine-mono-phosphate levels<sup>7)</sup>. Studies regarding the effects of kallikrein on cryopreserved semen after thawing have resulted in inconsistent results<sup>8-10)</sup>.

Shinohara et al.<sup>11)</sup> have reported that trypsin, chymotrypsin, and a kallikrein preparation can induce sperm capacitation and stimulate acrosome reaction of golden hamster epididymal sperm. However, relative studies using human spermatozoa have not been reported yet.

Although many bioassays for the assessment of capacitation of human sperm have been developed<sup>12,13)</sup>, these assays may not sufficiently represent the 'physiological events of fertilization<sup>14)</sup>. Considering that capacitation is essential for the occurrence of acrosome reaction<sup>15)</sup>, an alternative method for the evaluation of human sperm capacitation is quantitation of the percentage of acrosome reactions undergone in sperm samples under conditions which are supposed to induce capacitation<sup>16)</sup>.

This study was performed to estimate the influence of kallikrein on human sperm capacitation.

## Materials and Methods

Twenty human ejaculates collected by masturbation after 36 to 48 hours of abstinence were allowed to liquefy at 37°C for 20 to 30 minutes. All samples used in this experiment had at least 50% motile spermatozoa, 80% normal morphology and cell counts of  $30 \times 10^6$  or more.

Performing twice the swim-up washing technique (using BWB medium<sup>17)</sup> described by Lee et al.<sup>18)</sup>, and by resuspending the final sperm pellet (0.1ml) of each sample in 0.4ml of BWB medium containing human serum albumin (30mg/ml) we obtained sperm samples (0.5ml) consistently showing forward motility percentages over 90% and normal sperm morphology more than 95%. Cell concentrations were more than  $34 \times 10^6$ /ml in all the sperm suspensions obtained by swim up into BWB medium. Each of these solutions was incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for two hours (the incubation period for each sample started 90 minutes after the ejaculation) and then was halved and the resulting pairs were incubated for three hours under the same conditions, after mixing one sample of each pair with 1.75ml of BWB medium containing human serum albumin (30mg/ml) and human kallikrein (8 Kallikrein Units, Japan Chemical Research Company, Kobe, Japan; experimental sample; final concentration: 4 Kallikrein Units/ml of final solution) and the other sample of the pair with 1.75ml of the same medium, but without kallikrein (control sample). After the end of the incubation period, both samples of each pair were tested for acrosome reaction as described by Talbot and Chacon<sup>19)</sup>. The percentage of acrosome-reacted spermatozoa was calculated. All samples contained less than 5% of dead cells (dark acrosome). Therefore, the dead cells could be ignored in scoring the percentage of acrosome reaction. During the acrosome reaction evaluation period all samples were incubated under the same conditions. To perform Talbot's triple stain assay, 1ml of each sperm sample was used. Then, all the pairs of samples

were incubated (under the same conditions) for an additional three hours (starting time was considered to be the completion of 30minutes after the end of the previous incubation period) in the presence of ionophore A23187 (INP; Behring Diagnostics, La Jolla, USA) added to a final concentration of 10 $\mu$ M from a 10mM stock solution in dimethylsulfoxide, giving a dimethylsulfoxide content of 0.1%. INP treatment was used as a method to induce acrosome reactions<sup>20)</sup>. After the additional incubation period all pairs of samples underwent again the triple stain assay and the percentage of acrosome reacted spermatozoa in each sample was calculated.

All the data were expressed as mean value  $\pm$  standard deviation. Student's *t*-test for paired observations was used for statistical analysis of the difference in the percentage of acrosome reacted spermatozoa between control samples and experimental samples before and after INP treatment. A probability  $<0.05$  was considered to be statistically significant.

### Results

There was not significant difference in the percentage of acrosome-reacted spermatozoa between control samples and experimental samples before INP treatment ( $p>0.05$ ). However, after INP treatment, the percentage of acrosome reacted spermatozoa was significantly higher in kallikrein treated samples than in control samples ( $p<0.001$ ).

### Discussion

The present study did prove that kallikrein induces human sperm capacitation. The signifi-

Table 1. Spontaneous and A23187<sup>a</sup>-induced acrosome reactions in the presence or absence of kallikrein.

| Samples      | kallikrein | % acrosome reacted spermatozoa<br>A23187 |                             |
|--------------|------------|--|-----------------------------|
|              |            | —  | +                           |
| Control      | —          | 10.3 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>              | 38.5 $\pm$ 3.8 <sup>d</sup> |
| Experimental | +          | 12.1 $\pm$ 4.3 <sup>c</sup>              | 43.9 $\pm$ 4.1 <sup>e</sup> |

<sup>a</sup> Ionophore A23187.

<sup>b, c</sup> b vs c,  $p > 0.05$  (not significant difference).

<sup>d, e</sup> d vs e,  $p < 0.001$  (significant difference).

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

cantly higher mean value of the percentage of acrosome reacted—spermatozoa after INP treatment in the experimental samples than in the control samples indicates that kallikrein treatment increased the percentage of capacitated spermatozoa, because only capacitated spermatozoa can undergo acrosome reaction<sup>15</sup>. Such an action of kallikrein is additionally supported by the reported increases in intracellular sperm cyclic adenosine—mono—phosphate levels, sperm fructolysis, and sperm oxygen consumption after kallikrein treatment<sup>5-7</sup>, since sperm capacitation has been proved to be related to an increase in intracellular cyclic adenosine—mono—phosphate concentration and to involve major biochemical and biophysical changes in the sperm membrane complex and the energy metabolism of sperm<sup>21</sup>.

Kallikrein has been supposed<sup>11</sup> to act on the golden hamster epididymal sperm head glycoprotein coat known for its decapacitating and stabilizing sperm surface properties<sup>22</sup>, as a protease inducing hydrolysis of the glycoprotein coat. Sperm capacitation is thought to include removal or modification of sperm surface glycoproteins<sup>21</sup> and is known to involve major reconstruction and destabilization of the sperm surface, increasing sperm permeability<sup>21</sup>. However, it is still unknown whether the induction of sperm capacitation by kallikrein is mediated through the same mechanism in human and hamster. Reported positive effects of kallikrein on sperm motility, sperm fructolysis, and sperm oxygen consumption<sup>5-10</sup> have been attributed to liberation of kinins by the action of kallikrein on kininogen sources (seminal plasma or human serum albumin included in the washing medium). However, it is still unknown whether or not kinins have some properties related to induction of sperm capacitation.

Although the border between sperm capacitation process and acrosome reaction process is not clear, the absence of a significant difference in the number of acrosome—reacted spermatozoa between the experimental and control samples before INP treatment suggests that kallikrein does not induce acrosome reaction.

The beneficial role of kallikrein in sperm

capacitation process recommends its usage in assisted reproduction programs.

## References

- 1) Schill, W. B.: Medical treatment of male infertility, In "Infertility, Male and Female" Edited by V. Insler and B. Lunenfeld, Churchill Livingstone, London, p533, 1986
- 2) Schill, W. B., Braun—Falco, O. and Haberland, G. L.: The possible role of kinins in sperm motilities, *Int. J. Fertil.*, 19: 163, 1974
- 3) Schill, W. B.: Caffeine and kallikrein—induced stimulation of human sperm motility: a comparative study, *Andrologia*, 7: 229, 1975
- 4) Colpi, G. M., Crosti, C., Parini, A. and Ohnmeiss, H.: A direct action of kallikrein on spermatozoal motility, *Acta Eur. Fertil.*, 17: 121, 1986
- 5) Schill, W. B.: Increased fructolysis of kallikrein—stimulated human spermatozoa, *Andrologia*, 7: 105, 1975
- 6) Leidl, W., Prinzen, R., Schill, W. B. and Fritz, H.: The effect of kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro, In "Kinon—genases. Kallikrein 2" Edited by J. W. Haberland, C. Rohen and P. Schirren. Schattauer, Stuttgart, p33, 1975
- 7) Schill, W. B. and Preissler, G.: Improvement of cervical mucus spermatozoal penetration by kinins: a possible therapeutical approach in the treatment of male subfertility, In "The Uterine Cervix in Reproduction" Edited by V. Insler and G. Bettendorf. Georg Thieme, Stuttgart, p134, 1977
- 8) Schill, W. B. and Pritsch, W.: Kinin—induced enhancement of sperm motility in cryo—preserved human spermatozoa, *Proc. Int. Congress Animal Reprod. Artif. Insemination*, 8: 1071, 1976
- 9) Paulson, J. D., Harrison, R., Schill, W. B. and Barkay, J.: Addition of pharmacological agents to the ejaculate In "Clinics in Andrology" Edited by J. C. Emperaire, A. Audebert and E. S. E. Hafez. The Hague, Martinus Nijhoff, Vol. 1, p71, 1980
- 10) Schill, W. B., Pritsch, W. and preissler, G.: Effect of caffeine and kallikrein on cryopreserved human spermatozoa, *Int. J. Fertil.*, 24: 27, 1979
- 11) Shinohara, H., Yanagimachi, R. and Srivastava, P. N.: Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by the proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin, and chymotrypsin, *Gamete Res.*, 11: 19, 1984
- 12) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers,

- B. J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 15: 471, 1976
- 13) Overstreet, J. W. and Hembree, W. C.: Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro, *Fertil. Steril.*, 27: 815, 1976
- 14) Boldt, J. and Wolf, D. P.: Sperm capacitation, In "Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer" Edited by D. P. Wolf and M. Quigley. Plenum, New York, p171, 1984
- 15) Austin, C. R.: The capacitation of the mammalian sperm, *Nature*, 170: 326, 1952
- 16) Wolf, D. P., Boldt, J., Byrd, W. and Bechtol, K. B.: Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies, *Biol. Reprod.*, 32: 1157, 1985
- 17) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro, In "Methods in Mammalian Embryology" Edited by D. J. Daniel. W. H. Freeman, San Francisco, p101, 1971
- 18) Lee, M. A., Trucco, G. S., Bechtol, K. B., Wummer, N., Kopf, G. S., Blasco, L. and Storey, B. T.: Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay, *Fertil. Steril.*, 48: 649, 1987
- 19) Talbot, P. and Chacon, R. S.: A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm, *J. Exp. Zool.*, 215: 201, 1981
- 20) Byrd, W. and Wolf, D.P.: Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm, *Biol. Reprod.*, 34: 859, 1986
- 21) Coetzee, M. S., Swanson, R. J. and Kruger, T. F.: Acrosome reaction, 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, Baltimore, p121, 1990
- 22) Meizel, S.: Molecules that initiate or help or stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface, *Am. J. Anat.*, 174: 285, 1985

## ヒト精子受精能獲得におよぼす カリクレインの影響

鳥取大学医学部泌尿器学教室

ニコラオス ソフィキティス 宮川征男

産科婦人科学教室

十二原田 省 戸田稔子 見尾保幸  
寺川直樹

ヒト精子受精能獲得に及ぼすカリクレインの影響を検討した。カリクレイン添加培養液で前培養した精子は、カリクレインを含まない培養液で前培養した精子に比較して、イオノフォア A 23187 により高率に先体反応が誘起された。したがって、カリクレインはヒト精子受精能獲得を促進することが示唆された。

(受付: 1991 年 3 月 25 日)

## 不妊男性に見られた Immotile spermatozoa の12例

### Twelve Cases of Immotile spermatozoa in Infertile Males

川崎医科大学泌尿器科

河原 弘之 田中 啓幹

Hiroyuki KAWAHARA Hiroyoshi TANAKA

Department of Urology, Kawasaki Medical School, Kurashiki 701-1, Japan

不妊を主訴として来院する患者のなかに、精液検査で精子は存在するが運動性の著しく障害されたものがある。精液検査で運動率 20 % 以下の患者 35 例中 17 例に対し電顕的検索を行った。この 17 例中精子鞭毛に異常が見られた 12 例を immotile spermatozoa と診断した。12 例のうち 1 例を除いた 11 例に central complex の欠損を、全例に doublet の欠損を認めた。Dynein arm のみの欠損は見られなかったが、3 例に dynein arm, doublet, peripheral linkage および central complex のすべての異常が見られた。運動率の低下している症例においては精子鞭毛の構造異常は、けっして珍しいものではないと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 167-171, 1992)

#### はじめに

不妊を主訴として来院する患者のなかに、精液検査で精子は存在するが運動性の著しく障害されたものがある。1977 年 Eliasson ら<sup>1)</sup>は、慢性気道感染と男性不妊を示し、気道粘膜の線毛と精子鞭毛の先天的な構造異常を示すものを Immotile cilia syndrome として報告した。しかし、最近では慢性気道感染症の既往がなく、精子運動率の低下を見る患者もあり、そのような患者に対し精子鞭毛の電顕的検索を行なった結果、同様の精子鞭毛の構造異常を認め immotile spermatozoa と診断した 12 例を経験したので報告する。

#### 対象および方法

1985 年 5 月より 1990 年 3 月までの 4 年 11 ヶ月間に当科不妊外来を受診した男子不妊症のうち、精液検査で精子濃度  $5 \times 10^6 / \text{ml}$  以上かつ運動率が 20 % 以下の症例 35 例中 17 例に精子鞭毛の電顕的検索を行なった。その中の 12 例に精子鞭毛の異常が見つかった。対象とした 12 例の年齢は 31~39 歳、平均 32.2 歳、不妊期間は 3~12 年、平均 6 年 7 ヶ月であ

った。家族歴は全例特記すべきものはなかった。既往歴は症例 2 と症例 5 に副鼻腔炎を認めた。精巣容量の測定は、山口大式オルキオメーターを用いて行なった。症例 8 の左右 10ml、症例 9 の右 8ml、左 10ml と 2 例にやや低容量の症例があったが、他の 10 例は異常を見なかった。全例に施行した radioisotope scrotal scintigraphy で、症例 2 と症例 6 に精索静脈瘤を認めた (Table 1)。

精液の電顕検査法は Fig. 1 に示した (Fig. 1)。

#### 結 果

精液検査、ならびに内分泌検査成績を示す。精液検査では、精子数は  $5 \times 10^6 / \text{ml}$  から  $317 \times 10^6 / \text{ml}$  と変動が見られたが、運動率は、0 から 20 % と低下していた。抗精子抗体は、8 例に測定されており、不動化抗体、凝集抗体ともに 2 例の陽性例を見た。内分泌検査では症例 11 を除き、特に異常を示すものはみられなかった。この 1 例は当科受診前に他院で投薬を受けており、その影響と考えられるがその後再検されていない (Table 2, 3)。精子鞭毛の構造異常は、症例 12 の 1 例を除いた全例に central complex の欠損を、さらに doublet の欠損は全症例

Table 1 対象症例

| 症例 | 年齢 | 不妊期間 | 既往歴        | 精巣容量<br>(右) (左) |    | 精索静脈瘤 |
|----|----|------|------------|-----------------|----|-------|
| 1  | 39 | 12   | 肝障害        | 19              | 17 | —     |
| 2  | 32 | 5    | 副鼻腔炎気管支拡張症 | 19              | 17 | +     |
| 3  | 37 | 12   |            | 19              | 22 | —     |
| 4  | 34 | 6    |            | 20              | 20 | —     |
| 5  | 32 | 6    | 副鼻腔炎       | 16              | 16 | —     |
| 6  | 31 | 5    |            | 16              | 16 | +     |
| 7  | 33 | 4    |            | 19              | 16 | —     |
| 8  | 34 | 6    | ネフローゼ症候群   | 10              | 10 | —     |
| 9  | 34 | 3    |            | 8               | 10 | —     |
| 10 | 34 | 5    |            | 19              | 22 | —     |
| 11 | 38 | 9    |            | 18              | 20 | —     |
| 12 | 39 | 7    |            | 26              | 26 | —     |

Table 2 精液検査成績

| 症例 | 量<br>(ml) | P H | 数<br>( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | 運動率<br>(%) | 白血球<br>(/HPF) | 抗精子抗体<br>不動化抗体 | 凝集抗体 |
|----|-----------|-----|----------------------------------|------------|---------------|----------------|------|
| 1  | 0.5       | 7.4 | 317                              | 6.1        | 2 - 4         | 1.10           | —    |
| 2  | 2.6       | 7.3 | 16                               | 0          | 0 - 1         |                |      |
| 3  | 4.8       | 7.4 | 5                                | 8.5        | 4 - 6         |                |      |
| 4  | 3.0       | 7.6 | 30                               | 0          | 2 - 4         | 1.42           | +    |
| 5  | 4.3       | 7.4 | 5                                | 1.0        | 1 - 3         | 2.02           | —    |
| 6  | 4.8       | 7.4 | 9                                | 13.0       | 4 - 6         | 3.14           | —    |
| 7  | 3.8       | 7.6 | 13                               | 6.0        | 0 - 2         | 1.32           | —    |
| 8  | 2.3       | 7.4 | 50                               | 5.6        | 1 - 3         | 1.41           | —    |
| 9  | 1.9       | 7.2 | 23                               | 14.0       | 1 - 3         | 0.89           | —    |
| 10 | 0.5       | 7.2 | 185                              | 18.0       | 1 - 3         | 1.52           | +    |
| 11 | 1.6       | 7.4 | 26                               | 15.0       | 0 - 2         |                |      |
| 12 | 0.8       | 7.4 | 70                               | 20.0       | 0 - 2         |                |      |

Table 3 内分泌検査成績

| 症例 | L H<br>(mIU/ml) | F S H<br>(mIU/ml) | P R L<br>(ng/ml) | P <sub>4</sub><br>(ng/ml) | T<br>(ng/ml) | E <sub>2</sub><br>(pg/ml) |
|----|-----------------|-------------------|------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| 1  | 13.2            | 7.7               | 9.3              | 0.2                       | 5.1          | 33.1                      |
| 2  | 13.0            | 5.0               | 10.5             | 0.5                       | 5.5          | 26.2                      |
| 3  | 21.2            | 5.4               | 12.2             | 0.2                       | 3.5          | 31.5                      |
| 4  | 6.7             | 3.9               | 13.7             |                           | 5.7          | 47.4                      |
| 5  | 10.6            | 6.0               | 7.2              | 0.3                       | 6.2          | 49.1                      |
| 6  | 7.1             | 3.9               | 15.0             | 0.2                       | 5.7          | 36.9                      |
| 7  | 9.7             | 6.5               | 17.5             | 0.5                       | 4.7          | 33.3                      |
| 8  | 5.7             | 4.7               | 9.9              | 0.2                       | 5.0          | 34.3                      |
| 9  | 7.6             | 5.5               | 17.5             | 0.5                       | 3.6          | 36.6                      |
| 10 | 5.8             | 4.0               | 15.8             | 0.5                       | 3.7          | 26.5                      |
| 11 | 33.6*           | 20.6*             | 23.4             | 1.0                       | 6.5          | 53.0                      |
| 12 | 1.2*            | 7.8*              | 10.3             | 0.6                       | 3.3          | 32.2                      |

\* スパック法

Table 4 Axonemal abnormalities

| Case No. | Dynein arm | Doublets | Peripheral linkages | Central complex |
|----------|------------|----------|---------------------|-----------------|
| 1        |            | +        |                     | +               |
| 2        | +          | +        | +                   | +               |
| 3        |            | +        |                     | +               |
| 4        |            | +        |                     | +               |
| 5        |            | +        |                     | +               |
| 6        |            | +        |                     | +               |
| 7        |            | +        | +                   | +               |
| 8        | +          | +        | +                   | +               |
| 9        | +          | +        | +                   | +               |
| 10       |            | +        |                     | +               |
| 11       |            | +        |                     | +               |
| 12       | +          | +        |                     |                 |

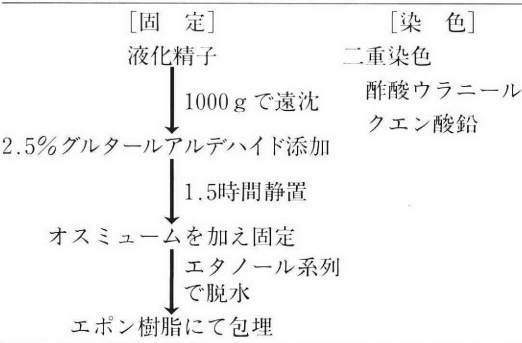


Fig. 1 精子の電顕検査方法

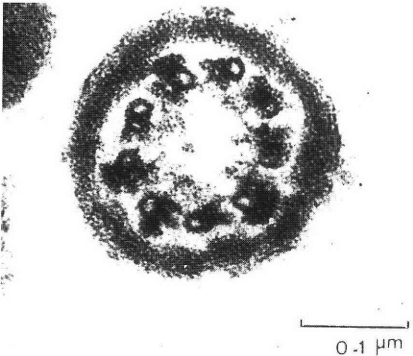


Fig. 3 症例 5 Central complex の欠損と doublet の異常を見る

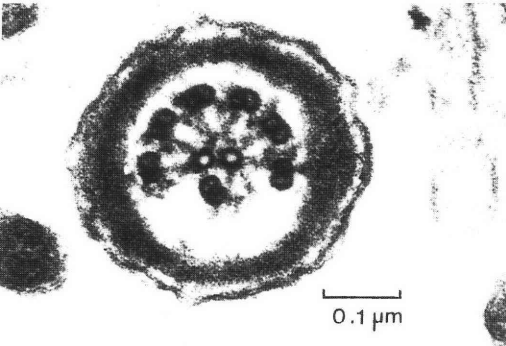


Fig. 2 症例 1 Principal piece 部で doublet の欠損を見る

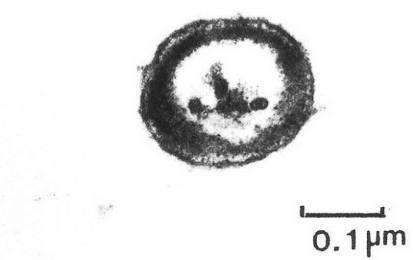


Fig. 4 症例 9 全ての構造異常が見られる

に認められた, Dynein arm のみの欠損はなかったが, 3 例に dynein arm, doublets, peripheral linkages, central complex 全ての構造異常が見られた (Table 4).

代表的な症例を提示する. 症例 1 は精子鞭毛の principal piece レベルでの断面像で, central com-

plex は異常を見ないが, doublet は 7 個しか存在せず, しかも, 1 番目の doublet の位置異常を認めた. 他部位の横断面では central pair の欠損や, doublet の配列異常を認めた (Fig. 2). 症例 5 の midpiece 部の横断面では central complex の欠損と, doublet の異常が見られた. (Fig. 3). 症例 9 では central complex の異常と, doublet, dynein arm の欠損, peripheral

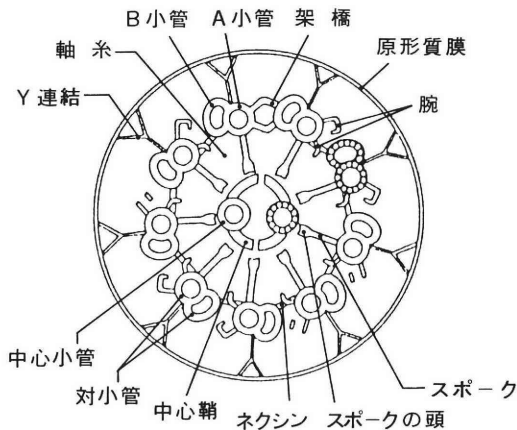


Fig. 5 正常精子鞭毛像のシェーマ

linkageの欠損と全ての異常を有していた (Fig. 4).

### 考 察

Immotile cilia syndrome は1977年 Eliasson ら<sup>1)</sup>により慢性気道感染症と男子不妊症を呈する症候群に名付けられた。精子の運動能については、精子の鞭毛において、ATPase 活性は主に dynein arm に存在し、このATPのエネルギーにより、隣接する doublet が互いに滑っていくことで精子の鞭毛運動が生じると考えられている<sup>2-3)</sup>。正常精子の鞭毛は9+2の微小管群から成り、2本の singlet 中心小管と、これを取り囲むように対をなした9本の doublet 周辺小管からなっている。Doublet は円形のもの（A小管）と、それに付着しているようなC字型のもの（B小管）と呼んでいる。A小管からB小管に向かって伸びている突起を腕（arm）といい、これは内・外の一対からなり、ATPase 活性をもつ dynein 分子を含んでいる。Satir の提唱した「滑り説」ではこの腕の隣接するB小管との架橋形成が重要な役割を果たすといわれている<sup>2)</sup>。Outer および inner arm の欠損では、鞭毛運動は行なえないと考えられているが、outer または inner arm のどちらかの欠損では運動性の低下のみであると報告されている (Fig. 5)。従来、immotile cilia syndrome では、精子の運動性はまったく認められないと考えられていたが、現在では運動性の低下としている症例の方がむしろ多いとされている<sup>5)</sup>。

Immotile spermatozoa の分類には、Afzelius ら<sup>6)</sup>は14例を分析し、I) both dynein arm の欠損、II) inner dynein arm の欠損、III) outer dynein arm の欠損、IV) spoke head の欠損、V) 1つまたは2つの microtubules の欠損および central sheath の欠損の5型に分類している。自験例12例のうち、9例は

Table 5 Immotile spermatozoa 本邦報告例の解剖学的部位別分類

| Defect of the axonemal complex | Case |
|--------------------------------|------|
| I. Both dynein arm             | 2    |
| II. Peripheral junction        |      |
| III. Central complex           | 2    |
| IV. Doublet                    | 1    |
| V. Absence of several elements | 19*  |
| Total                          | 24   |

\* 自験例

Afzelius らの分類ではV型にあたり、3例はI、IV、V型の合併であった。また、Escalier ら<sup>7)</sup>は57例の分析によりI) both dynein arm の欠損、II) inner dynein arm と peripheral junction の欠損、III) outer dynein arm の欠損、IV) central junction の欠損、V) central complex の欠損、VI) doublet と peripheral junction の欠損、の6型に分類している。自験例では8例がIV、V、VI型の合併、3例がI、IV、V、VI型の合併、1例がVI型に相当した。

本邦で精子電顕像の記載のあった immotile cilia syndrome を含む immotile spermatozoa の症例は、集め得た限りでは12例であった。<sup>6,8-13)</sup>。その中、Afzelius らや Escalier らの報告に見られるような dynein arm のみの欠損例は少なく、ほとんどがわれわれの症例と同様いくつかの異常を合併している。角谷ら<sup>9)</sup>もこれまでの分類には入らないものとして報告している例もある。そこで今回、我々は解剖学的部位別に分類し、本邦報告例をまとめてみた (Table 7)。

Immotile spermatozoa の原因としては、先天性要因として、常染色体劣性遺伝を示す発生学的な異常によると言われ、その兄弟例の報告も見られる。<sup>6)</sup>。一方、後天性要因として、感染、外傷、抗精子抗体などが原因でも起こり得るといわれている。Escalier ら<sup>7)</sup>も、IV、V型は先天性のみならず後天性の精巣機能不全に続発して起こるとしている。また、佐藤ら<sup>12)</sup>は濃精液症において精子の運動性が低下するのは、精漿中の多核白血球が精子を貪食するのみでなく、逆行性感染により blood-testis barrier を破壊し、その結果抗精子抗体を生じさせ、early spermatid に影響を及ぼして精子の微細構造に乱れを生じさせるのではないかとしている。自験例にも感染例、抗精子抗体陽性例、および精索静脈瘤の合併例があり、これらが原因となっている可能性も否定できない。

治療法は、現在の所有効なものはないが、Jewett ら<sup>14)</sup>はAIDを行なって妊娠した1例を報告している。

自験例12例中10例に見られるようにある程度の運動率を有する症例では, percoll による処理精液のA I Hが適応と考えられる。われわれはこの方法により症例10の1例に妊娠を確認できたが, 妊娠16週で流産した。

### 結 語

今回, 精液検査で $5 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上の精子濃度はあるものの, 運動率の低下を見た症例に対し電顕的検索を行なった。その中12例に精子鞭毛の異状を認め immotile spermatozoa と考えられた。また, その中1例は percoll 処理後の精子を用いた, A I Hで妊娠の成立をみたが妊娠16週で流産した。

### 文 献

- 1) Eliasson, R., Mossberg, B., Camner, P. and Afzelius, B. A.: The immotile cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as a etiologic factor in chronic airway infection and male infertility, *New Engl. J. Med.*, 297: 1, 1977
- 2) Satir, P.: Cilia and Flagella (ed. by Sleight, M. A.): 131, Acad., Press, London 1974
- 3) 奥野 誠, 毛利秀雄: 精子の運動に関する基礎的研究, ホと臨, 34: 150, 1986
- 4) Camner, P., Afzelius, B. A., Eliasson, R. and Mossberg, B.: Relation between abnormalities of human sperm flagella and respiratory tract disease, *Int. J. Androl.*, 2: 211, 1979
- 5) 角谷秀典, 伊藤晴夫, 片海善吾, 川村健二, 布施秀樹, 島崎 淳, 永野俊雄, 外山芳郎: Immotile-cilia syndrome の1例, 日不妊会誌, 31: 132, 1986
- 6) Afzelius, B. A. and Eliasson, R.: Flagellar mutant in man: On the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome, *J. Ultrastruct. Res.*, 69: 13, 1979
- 7) Escalier, D. and David, G.: pathology of the cytoskelton of the human superm flagellum: axonemeal and periaxonemeal anomalies, *Biol. Cell*, 50: 37, 1984
- 8) 伊藤晴夫, 皆川秀雄, 布施秀樹, 川村健二, 内藤仁, 島崎 淳, 永野俊雄, 鈴木二美枝, 夜久有滋, 石川堯夫, 山口邦男: Immotile-cilia syndrome, 日泌尿会誌, 73: 206, 1982
- 9) 角谷秀典, 高原正信, 片海善吾, 川村健二, 布施秀樹, 伊藤晴夫, 島崎 淳, 外山芳郎, 永野俊雄: "9+0" Immotile Spermatozoa の2例, 日泌尿会誌, 77: 1643, 1986

- 10) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原邦男, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について 第1報: 精子無力症の臨床的事項に関する一考察, 日不妊会誌, 32: 339, 1987
- 11) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原邦男, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について 第2報: immotile cilia syndrome の1例, 日不妊会誌, 33: 39, 1988
- 12) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原邦男, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について 第3報: 精子尾部中間部形態異常の3例, 日不妊会誌, 34: 785, 1989
- 13) 佐藤和宏, 石川博夫, 前原邦男, 佐藤滋彰, 木村正一, 折笠精一: 精子無力症における精子の微細構造について 第4報: 短尾精子症と思われる5例について, 日不妊会誌, 34: 152, 1989
- 14) Jewett, M. A. S., Greenspan, M. B., Shier, R. M. and Howatson, A. F.: Necrospemia or immotile cilia syndrome as a cause of male infertility, *J. Urol.*, 124: 292, 1980

## Twelve Cases of Immotile Spermatozoa in Infertile Males

Hiroyuki Kawahara and Hiroyoshi Tanaka

Department of Urology, Kawasaki Medical School, Kurashiki 701-1, Japan

Seventeen patients with less than 20% or no sperm motility ratio were studied by electron microscopy. Twelve of 17 patients had immotile spermatozoa with ultrastructural sperm tail abnormalities. The defects of the central complex were detected in twelve but one patients, and those of the doublet were found in all of them. There were three patients who had all kinds of ultrastructural defects (defects of the dynein arm, doublet, peripheral linkages and central complex), but there was no patient who had the defect of the dynein arm alone. The importance of electron-microscopic examination of semen samples in patients with very reduced motile or immotile spermatozoa was considered. From the present investigation of the 12 patients with viable but less than 20% motile or immotile spermatozoa.

(受付: 1991年3月30日)

## 特発性乏精子症に対する Ketotifen 療法の臨床的検討

### Clinical Evaluation of Ketotifen Therapy for Patients with Idiopathic Oligozoospermia

岡山大学医学部泌尿器科学教室（主任：大森弘之教授）

山 根 享 大 枝 忠 史 吉 田 光 宏  
Susumu YAMANE Tadashi OHEDA Mitsuhiro YOSHIDA  
大 森 弘 之  
Hiroyuki OHMORI

Department of Urology, Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan (Director: Prof. H. Ohmori)

岡山赤十字病院泌尿器科

大 橋 輝 久  
Teruhisa OHASHI

Department of Urology, Okayama Red Cross  
General Hospital, Okayama 700, Japan

日本鋼管福山病院泌尿器科

永 井 敦  
Atsushi NAGAI

Department of Urology, Nihonkoukan Fukuyama  
Hospital, Fukuyama 721, Japan

落合病院泌尿器科

山 下 良 孝  
Yoshitaka YAMASHITA

Department of Urology, Ochiai Hospital, Okayama 719-31, Japan

---

特発性乏精子症 41 例に対し、mast cell blocker として ketotifen (ザジテン) 2 mg を経口投与し、12 週、20.6 %、24 週、18.8 % の全般改善率を得た。また、4 例に妊娠の成立をみた。治療前 LH、FSH 高値例、および治療前 JSC 低値例では治療効果が低い傾向を示した。副作用は 4 例に認められたが軽度であり、今後は肥満細胞の増殖と血液・精巣関門との間の関係、さらには精巣内、精漿内 prostaglandin を含めた血管作用性物質の意義に関する詳細な検討が必要と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 172-176, 1992)

---

#### 緒 言

近年、特発性男子不妊症患者の障害された精細管壁に、mast cell の増生が認められることが報告され

ており、精巣障害に mast cell がなんらかの関連を持つことが推測されている。Schill<sup>1)</sup>らは 1986 年、mast cell blocker である ketotifen が特発性乏精子症および精子運動低下症に有効であったと報告している。

今回我々は、特発性乏精子症患者に対し Ketotifen 療法を試み、若干の知見を得たので報告する。

### 対象および方法

対象は、昭和62年4月から平成2年3月までの間に不妊を主訴に当科を受診した特発性乏精子症患者41症例である。患者の年齢は42~24歳(平均33歳)で、妻の年齢は39~23歳(平均29歳)である。治療前の精子濃度の内訳は、精子濃度  $10 \times 10^6 / \text{ml}$  未満の高度乏精子症35例、 $10 \times 10^6 / \text{ml}$  以上の乏精子症6例であった。治療開始前、37症例に精巢生検を行ない、mean germinal epithelium count of Johnsen (JSC)<sup>2)</sup>は9.3~2.0、平均7.4であった。大部分の症例が以前になんらかの治療を受けており、いずれも前治療が無効であったものである。

投与方法は、Ketotifen (商品名ザジテン) 1 mg を朝夕2回連日経口投与し、投与開始後12週および24週の精液検査により、精子濃度・精子運動率に対する効果、およびこれらを併せた全般改善度につき評価を行なった。効果判定には、Methyl-B<sub>12</sub>用量比較試験の際使用した治療効果判定基準を用いた(表1)。

で有意の変化を認めなかった。

精液所見の治療効果については、表2に示したごとくであるが、著明改善、改善を併せて改善率とした。精子濃度では投与開始後12週で20.6%、24週で18.8%、精子運動率では12週で26.5%、24週で18.8%の改善率を得た。また、これらを併せた全般改善度では、12週で20.6%、24週で18.8%の改善率であった。副作用は眠気3例、発疹1例を認めたが、いずれも軽度であった。なお、妊娠の成立は4例に認められた。

次に治療前精子濃度、精子運動率、LH濃度、FSH濃度別に治療効果を検討した。

治療前精子濃度については、精子濃度  $10 \times 10^6 / \text{ml}$  以上群、 $10 \times 10^6 / \text{ml}$  未満群の2群に分けて治療効果を検討した(表3)。 $10 \times 10^6 / \text{ml}$  以上群では、症例は少ないながらも、12週で50.0%、24週で40%の改善率であった。 $10 \times 10^6 / \text{ml}$  未満群では、12週で18.8%、24週で14.8%の改善率であった。

治療前精子運動率では、精子運動率20%以上群、20%未満群の2群別に治療効果を検討した(表4)。運動率が20%以上群では改善率は12週、24週とも

表1 治療効果判定基準

- 1) 精子数改善度 (投与前値が  $40 \times 10^6 / \text{ml}$  以下のものに対して判定する)
  - (1) 著明改善……精子数が治療前値より  $20 \times 10^6 / \text{ml}$  以上増加したもの。
  - (2) 改 善……精子数が治療前値より  $10 \times 10^6 / \text{ml}$  以上増加したもの。
  - (3) 不 変……精子数が治療前値と比較して  $\pm 10 \times 10^6 / \text{ml}$  未満の変動のもの。
  - (4) 悪 化……精子数が治療前値より  $10 \times 10^6 / \text{ml}$  以上減少したもの。
- 2) 運動率改善度 (投与前値が50%以下のものに対して判定する)
  - (1) 著明改善……運動率が治療前値に比べ、20%以上改善したもの。
  - (2) 改 善……運動率が治療前値に比べ、10%以上改善したもの。
  - (3) 不 変……運動率が治療前値と比較して10%未満の変動のもの。
  - (4) 悪 化……運動率が治療前値に比べ、10%以上悪化したもの。

### 3) 全般改善度

精子数および運動率に対する治療効果を総合的に判定し、5段階で判定する。

1. 著明改善    2. 改善    3. やや改善    4. 不変    5. 悪化

また、併せて血清 testosterone, LH, FSH 濃度を測定し、血中ホルモン濃度に対する影響も検討するとともに、精巢生検を施行した症例では、JSCおよび精細管内 testosterone 濃度にも検討を加えた。

### 結 果

血中ホルモン濃度の変動については、治療前、12週後、24週後の血清 testosterone, LH, FSH いずれについても、治療前後で有意の変化を認めなかった(図1)。また精液量、精液の pH についても治療前後

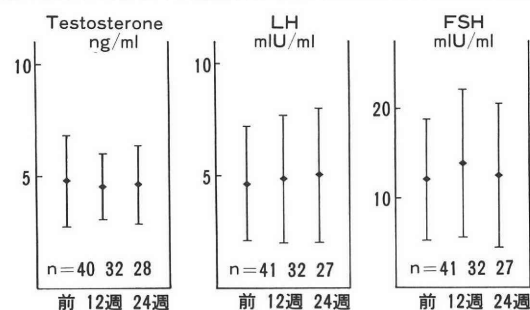


図1 治療前後の血中ホルモン濃度の推移

表2 治療効果一覧

| 層 別              | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|------------------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 精 子 濃 度<br>改 善 度 | 12 | 34 | 2    | 5  | —    | 27   | 20.6% |
|                  | 24 | 32 | 3    | 3  | —    | 26   | 18.8% |
| 運動率改善度           | 12 | 34 | 7    | 2  | —    | 25   | 26.5% |
|                  | 24 | 32 | 2    | 4  | —    | 26   | 18.8% |
| 全 般 改 善 度        | 12 | 34 | 4    | 3  | 6    | 21   | 20.6% |
|                  | 24 | 32 | 2    | 4  | 5    | 21   | 18.8% |

表3 治療前精子濃度別治療効果

| 層 別                          | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|------------------------------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 10×10 <sup>6</sup> /ml<br>以上 | 12 | 2  | 1    | 0  | 1    | 0    | 50.0% |
|                              | 24 | 5  | 1    | 1  | 0    | 3    | 40.0% |
| 10×10 <sup>6</sup> /ml<br>未満 | 12 | 32 | 3    | 3  | 5    | 21   | 18.8% |
|                              | 24 | 27 | 1    | 3  | 5    | 18   | 14.8% |

21.1%，運動率20%未満群では12週で20.0%，24週で15.4%と、2群間で改善率に差は認めなかった。

治療前血中LH濃度では4 mIU/ml 未満群、4 mIU/ml 以上8 mIU/ml 未満群、8 mIU/ml 以上群の3群別に検討した(表5)。4 mIU/ml 未満群では、改善率12週、27.8%，24週、26.7%，4 mIU/ml 以上8 mIU/ml 未満群では、12週、8.3%，24週、16.7%，8 mIU/ml 以上群では、12週、25.0%，24週、0%であり、LHが8 mIU/ml 以上の症例には改善率が低い傾向を認めた。

治療前血中FSH濃度では8 mIU/ml 未満群、8 mIU/ml 以上15 mIU/ml 未満群、15 mIU/ml 以上群の3群別に検討した(表6)。8 mIU/ml 未満群では、改善率12週、30.0%，24週、16.7%，8 mIU/

ml 以上15 mIU/ml 未満群では、12週、25.0%，24週、33.3%，15 mIU/ml 以上群では、12週、7.7%，24週、9.1%であり、LH同様FSH高値群では治療効果が低い傾向にあった。

治療前JSC<sup>2)</sup>では、8.0以上群、8.0未満群の2群別に検討した(表7)。JSC 8.0以上群では12週で35.3%，24週で20.0%の改善率を得たが、JSC 8.0未満群では12週で5.9%，24週では17.6%であり、治療効果は低かった。

治療前精細管内testosterone濃度では、200 ng/g. t. w.以上群、200 ng/g. t. w.未満群の2群別に検討した(表8)。200以上群では、12週で26.7%，24週で28.6%の改善率を得たが、200未満群では12週で15.8%，24週で11.1%であり、精細管内testos-

表4 治療前精子運動率別治療効果

| 層 別   | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|-------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 20%以上 | 12 | 19 | 2    | 2  | 4    | 11   | 21.1% |
|       | 24 | 19 | 2    | 2  | 2    | 13   | 21.1% |
| 20%未満 | 12 | 15 | 2    | 1  | 2    | 10   | 20.0% |
|       | 24 | 13 | 0    | 2  | 3    | 8    | 15.4% |

表5 治療前LH濃度別治療効果

| 層 別       | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|-----------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 4 未満      | 12 | 18 | 3    | 2  | 3    | 10   | 27.8% |
|           | 24 | 15 | 2    | 2  | 2    | 9    | 26.7% |
| 4 以上 8 未満 | 12 | 12 | 1    | 0  | 3    | 8    | 8.3%  |
|           | 24 | 12 | 0    | 2  | 2    | 8    | 16.7% |
| 8 以上      | 12 | 4  | 0    | 1  | 0    | 3    | 25.0% |
|           | 24 | 4  | 0    | 0  | 1    | 4    | 0%    |

LH : mIU/ml

表 6 治療前 FSH 濃度別治療効果

| 層 別      | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|----------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 8 未満     | 12 | 10 | 2    | 1  | 3    | 4    | 30.0% |
|          | 24 | 12 | 2    | 0  | 1    | 9    | 16.7% |
| 8 以上15未満 | 12 | 12 | 2    | 1  | 2    | 7    | 25.0% |
|          | 24 | 9  | 0    | 3  | 3    | 3    | 33.3% |
| 15以上     | 12 | 12 | 0    | 1  | 1    | 10   | 7.1%  |
|          | 24 | 11 | 0    | 1  | 1    | 9    | 9.1%  |

FSH : mIU/ml

表 7 JSC 別治療効果

| 層 別   | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|-------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 8.0以上 | 12 | 17 | 4    | 2  | 4    | 7    | 35.3% |
|       | 24 | 15 | 0    | 3  | 3    | 9    | 20.0% |
| 8.0未満 | 12 | 17 | 0    | 1  | 2    | 14   | 5.9%  |
|       | 24 | 17 | 2    | 1  | 2    | 12   | 17.6% |

表 8 精細管内 Testosterone 濃度別治療効果

| 層 別   | 週  | 総計 | 著明改善 | 改善 | やや改善 | 不変悪化 | 改 善 率 |
|-------|----|----|------|----|------|------|-------|
| 200以上 | 12 | 15 | 3    | 1  | 0    | 11   | 26.7% |
|       | 24 | 14 | 1    | 3  | 1    | 9    | 28.6% |
| 200未満 | 12 | 19 | 1    | 2  | 6    | 10   | 15.8% |
|       | 24 | 18 | 1    | 1  | 4    | 12   | 11.1% |

T濃度 : ng/g. t. w.

terone 濃度が 200 未満の症例では改善率が低い傾向を認めた。

## 考 察

近年、動物実験において prostaglandin  $F_{1\alpha}$ ,  $F_{2\alpha}$  が精子形成障害を惹起することが報告され<sup>3,4)</sup>, さらにヒトにおいては、特発性男子不妊症患者の精細管に接して肥満細胞が増えているという報告がある。三宅ら<sup>5)</sup>は、不妊精巣では間質に肥満細胞が増加しており、とくに壁が肥厚し狭小化した精細管周囲に多数出現するとともに、精細管壁内においても増加していると報告している。その肥満細胞を透過電顕でみると分泌亢進の像を示しており、また不妊精巣では肥満細胞のみ増加し、リンパ球、好酸球、プラズマ球などの増加をみないところから、アレルギー性変化や自己免疫性変化とは異なるものであり、肥満細胞の刺激により組織の線維化が誘導促進される可能性が示唆されるとしている。

また肥満細胞活性化により遊離されるものとしては、histamine 以外に prostaglandin がある。この prostaglandin  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $F_{1\alpha}$ ,  $F_{2\alpha}$  あるいは oxytocin, testosterone は精細管の収縮を引き起こすことが in vitro の実験で薬理学的に確かめられている<sup>6)</sup>が、山

本ら<sup>7)</sup>は精巣内精子輸送機構を調節する主たる因子は自律神経系であり、prostaglandin や hormone は、それを補助する形で局所的な調節因子として働いているのではないかと推察している。

一方臨床的には、Schill<sup>1)</sup>らは 1986 年、mast cell blocker である Ketotifen による治療効果は非常に軽度ではあるが、精子濃度、精子運動率を改善させると報告している。すなわち、idiopathic normogonadotropic oligozoospermia 17 例に対し、ketotifen を 3 ヶ月間連日内服させ、治療前精子濃度  $12.9 \pm 5.5 \times 10^6 / \text{ml}$  が治療後  $20.2 \pm 14.8 \times 10^6 / \text{ml}$  になり、妊娠率 9 % と報告している。判定基準の相違で単純に比較はできないが、我々の得た結果では、精子濃度では投与開始後 12 週で 20.6 %, 24 週で 18.8 %, 精子運動率では 12 週で 26.5 %, 24 週で 18.8 % の改善率で、これらを併せた全般改善度は、12 週で 20.6 %, 24 週で 18.8 % であった。しかし妊娠率は 9.8 % と Schill<sup>1)</sup>らとほぼ同等の結果を得ている。治療前精子濃度、精神運動率、LH 濃度、FSH 濃度と治療効果との関係より、治療前 LH、FSH が高値を示す、高度乏精子症例では効果が低かった。この事は、精巣における造精能が既に高度に障

害されている症例では、治療効果が期待できない事を示している。

Ketotifen の作用機序としては、抗ヒスタミン作用だけでなく、抗アナフィラキシー作用も有している。すなわち ketotifen はヒスタミンレセプターに作用するだけでなく、肥満細胞に貯蔵されている histamine, prostaglandin などの血管作用性物質の放出を妨げる働きがある<sup>8)</sup>。前述した如く、これらの血管作用性物質が精細管内の自律神経系に対する調節因子として働いていることを考えあわせると、ketotifen 療法の作用機序を考える上で興味深い。

最後にこの新しい治療法の意義を評価するためには、肥満細胞の増殖と血液・精巣関門との間の関係、さらには精巣内、精漿内 prostaglandin を含めた血管作用性物質の意義に関する詳細な検討が必要と考える。

## 結 語

1. 特発性乏精子症患者 41 例に対し ketotifen 療法を行ない、12 週で 20.6%, 24 週で 18.8% の全般改善率を得た。また、4 例に妊娠の成立を見た。
2. 治療前の血中 LH・FSH が高値の症例では治療効果が低かった。
3. 治療前 JSC が低値の症例では治療効果が低かった。

以上、特発性乏精子症に対する Ketotifen 療法について報告したが、今後も症例を重ね、精巣内、精漿内 prostaglandin を含めた、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

(本論文の要旨は、第 34 回日本不妊学会で発表した。)

## 文 献

- 1) Schill, W. B., Schneider, J. and Ring, J.: The use of Ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenozoospermia, *Andrologia*, 18: 570, 1986
- 2) Johnsen, S. G.: Testicular biopsy scorecount—a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males, *Hormone*, 1: 2, 1970
- 3) Abbatiello, E. R., Kaminsky, M. and Weisbroth, S.: The effect of prostaglandins  $F^1\alpha$  and  $F^2\alpha$  on spermatogenesis, *Int. J. Fertil.*, 21: 82, 1976
- 4) Saksena, S. K., Hunt, D. M. and Lau, I. F.: Effects of prostaglandin  $F_2\alpha$  on sperm count, sperm motility and fertilizing capacity in the male rabbit, *Int. J. Androl.*, 1: 639, 1978
- 5) 三宅弘治: 精巣生検よりみた特発性男子不妊症, *泌尿紀要*, 29: 991, 1983
- 6) Ellis, L. C., Groesbeck, M. D., Farr, C. H. and Tesi, R. J.: Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male, *Archives of Andrology*, 6: 283, 1981
- 7) 山本雅憲, 三宅弘治, 三矢英輔: 微小穿刺法によるラット精細管蠕動運動に関する研究, *日泌尿会誌*, 74: 907, 1983
- 8) Martin, U. and Roemer, D.: Ketotifen; a histamine release inhibitor, *Monographs Allergy*, 12: 145, 1977

## Clinical evaluation of ketotifen therapy for patients with idiopathic oligozoospermia

Susumu Yamane, Tadashi Oheda,  
Mitsuhiro Yoshida and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology, Okayama University  
Medical School, Okayama 700, Japan  
(Director: Prof. H. Ohmori)

Teruhisa Ohashi

Department of Urology, Okayama Red Cross  
General Hospital, Okayama 700, Japan.

Atsushi Nagai

Department of Urology, Nihonkoukan Fukuyama  
Hospital, Fukuyama 721, Japan

Yoshitaka Yamashita

Department of Urology, Ochiai Hospital,  
Okayama 719-31, Japan

Forty one patients with oligozoospermia were treated with oral administration of ketotifen (Zaditen, 2mg/day) for 24 weeks. Overall effective rates including the sperm density and the sperm motility were noted in 20.6% of the patients at 12 weeks and 18.8% at 24 weeks after the therapy. Pregnancies were achieved in 4 cases. Only a little clinical effect was found in patients with elevated gonadotropin levels and low levels of the mean germinal epithelium counts of Johnsen. On the other hand, adverse effects were noted in 4 cases but they were mild. Therefore, it was suggested that ketotifen therapy might be useful for mild oligozoospermic patients with normal gonadotropin levels, and further investigation should be necessary including prostaglandins in seminal fluid.

(受付: 1991 年 3 月 27 日)

## 男性不妊に対する人參養榮湯および桂枝茯苓丸の効果

### Clinical Effects of Ninjinyoeito with Keishibukuryogan on Male Infertility

筑波大学泌尿器科

|                    |                |              |
|--------------------|----------------|--------------|
| 石 川 博 通*           | 何 仲 涛          | 真 鍋 文 雄      |
| Hiromichi ISHIKAWA | He Zhong TAO   | Fumio MANABE |
| 吉 井 慎 一            | 小 磯 謙 吉        |              |
| Shinichi YOSHII    | Kenkichi KOISO |              |

Department of Urology Tsukuba University, Ibaragi 305, Japan

われわれは無精子症を除いた男性不妊患者のうち精液所見で精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下か精子運動率が50%以下であった20例にツムラ人參養榮湯9.0 g/日および桂枝茯苓丸7.5 g/日を最低3ヶ月投与した。精子検査を投与前後に行い精子濃度および精子運動率を算定した。また投与前に血清FSH, LHおよびテストステロン値を測定した。

- 1) 精子濃度は評価対象例において投与後有意に増加していた。
- 2) 精子運動率は全例および評価対象例の双方で投与後有意に増加していた。
- 3) 精子濃度に対する有効率は53.8%で、精子運動率に対する有効率は81.3%であった。
- 4) 薬効と投与前ホルモン値との間に相関関係は認められなかった。

これらのことからこの療法は男性不妊とくに精子無力症の治療に有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (1), 177-180, 1992)

#### 緒 言

男性不妊の漢方療法としては補中益気湯<sup>1,2)</sup>、八味地黄丸<sup>3,4)</sup>、牛車腎気丸<sup>5)</sup>などが使用されてきた。今回われわれは男性不妊患者に人參養榮湯および桂枝茯苓丸を投与し比較的良好な成績を得たので報告する。

#### 対 象

過去1年間に筑波大学泌尿器科外来を受診した男性不妊患者のうち無精子症を除き、かつ精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下か精子運動率が50%以下であった20例(27~42歳、平均35.3歳)を対象とした。

#### 方 法

##### 1. 薬剤の投与

ツムラ人參養榮湯9.0 g/日(本品9.0 g中に地

黄4.0 g, 当帰4.0 g, 白朮4.0 g, 茯苓4.0 g, 人參3.0 g, 桂皮2.5 g, 遠志2.0 g, 芍薬2.0 g, 陳皮2.0 g, 黄耆1.5 g, 甘草1.0 g, 五味子1.0 gの割合の混合生薬の乾燥エキス6.0 gを含有する)およびツムラ桂枝茯苓丸7.5 g/日(本品7.5 g中に桂皮3.0 g, 芍薬3.0 g, 桃仁3.0 g, 茯苓3.0 g, 牡丹皮3.0 gの割合の混合生薬の乾燥エキス1.75 gを含有する)を最低3ヶ月間投与した。

##### 2. 精液所見の検討

薬剤の投与前原則として2回(精子濃度が良好な方の所見を採用)投与後3~6ヶ月の時点で1回の精液検査を行い、主に精子濃度、精子運動率について検討した。

##### 3. ホルモン値の検討

薬剤の投与前に血清FSH, LHおよびテストステロン値ラジオイムノアッセイで測定した。

\*現住所: 東京歯科大学市川総合病院泌尿器科

表 1 薬効評価基準

| 評価 | 精 子 濃 度                          | 精子運動率    |
|----|----------------------------------|----------|
| 著効 | $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の増加 | 20%以上の増加 |
| 有効 | $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の増加  | 10%以上の増加 |
| 不変 | $5 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の増減  | 10%未満の増減 |
| 悪化 | $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の減少  | 10%以上の減少 |

表 2 精子濃度に対する効果

|    |            |       |
|----|------------|-------|
| 著効 | 6例 (46.1%) | 53.8% |
| 有効 | 1例 (7.7%)  |       |
| 不変 | 5例 (38.5%) |       |
| 悪化 | 1例 (7.7%)  |       |
| 計  | 13例 (100%) |       |

表 3 精子運動率に対する効果

|    |             |       |
|----|-------------|-------|
| 著効 | 12例 (75.0%) | 81.3% |
| 有効 | 1例 (6.3%)   |       |
| 不変 | 2例 (12.5%)  |       |
| 悪化 | 1例 (6.3%)   |       |
| 計  | 16例 (100%)  |       |

#### 4. 薬効の判定

表 1 のような薬効評価基準に従って精子濃度および精子運動率について薬効を判定した。

#### 5. 投与前後の精液所見の検討

20 例につき投与前後の精子濃度および精子運動率を算定しそれぞれ比較検討した。さらに精子濃度および運動率のそれぞれの評価対象例 (精子濃度  $20 \times 10^6/\text{ml}$  以下 - 13 例, 精子運動率 50 % 以下 - 16 例) の投与前後値の比較検討を行った。

#### 6. 薬効とホルモン値との関係の検討

精子濃度および精子運動率についての評価対象例を有効群 (著効 + 有効) と無効群 (不変 + 悪化) に分け, それぞれ投与前の FSH, LH およびテストステロン値を比較検討した。

以上のデータの統計学的検討には Student-t テストを用いた。

### 結 果

#### 1. 薬効の検討結果

精子濃度の評価対象例は 13 例であり, 成績は著効 6 例 (46.1 %), 有効 1 例 (7.7 %), 不変 5 例 (38.5 %), 悪化 1 例 (7.7 %) という結果であった。有効以上は 7 例であり, 有効率 53.8 % となった (表 2)。

精子運動率の評価対象例は 16 例であり, 成績は著効 12 例 (75.0 %), 有効 1 例 (6.3 %), 不変 2 例 (12.5

%), 悪化 1 例 (6.3 %) という結果であった。有効以上は 13 例であり, 有効率 81.3 % となった (表 3)。

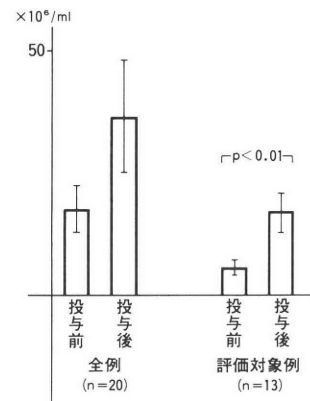
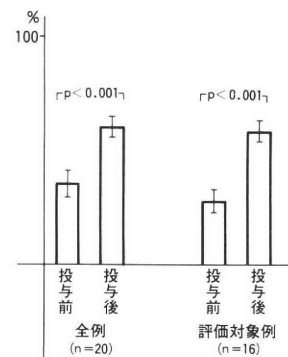
#### 2. 投与前後の精液所見 (Mean $\pm$ SE)

精子濃度について見ると 20 例全例では投与前  $17.6 \pm 4.7 \times 10^6/\text{ml}$  から投与後  $36.2 \pm 11.7 \times 10^6/\text{ml}$  と増加したが有意差はなかった。また評価対象 13 例では投与前  $5.2 \pm 1.5 \times 10^6/\text{ml}$  で投与後  $16.7 \pm 4.6 \times 10^6/\text{ml}$  となり有意に増加していた ( $P < 0.01$ ) (図 1)。

精子運動率について見ると 20 例全例では投与前  $35.3 \pm 5.3 \%$  から投与後  $60.0 \pm 4.8 \%$  と有意に増加していた ( $P < 0.001$ )。また評価対象 16 例でも投与前  $27.8 \pm 5.1 \%$  から  $56.9 \pm 5.7 \%$  と有意に増加していた ( $P < 0.001$ ) (図 2)。

#### 3. 薬効とホルモン値との関係

精子濃度の評価対象例中有効群 (7 例) の FSH, LH およびテストステロン値 (Mean  $\pm$  SE) はそれぞれ  $13.8 \pm 1.5 \text{ mIU/l}$ ,  $14.1 \pm 2.7 \text{ mIU/l}$ ,  $6.0 \pm 0.8 \text{ ng/ml}$  であり, 無効群 (6 例) ではそれぞれ  $20.8 \pm 4.6 \text{ mIU/l}$ ,  $21.8 \pm 6.1 \text{ mIU/l}$  および  $4.0 \pm 0.6 \text{ ng/dl}$  であった。2 群間のホルモン値に有意差は認められなかった (図 3)。

図 1 精子濃度 (Mean  $\pm$  SE) の変化図 2 精子運動率 (Mean  $\pm$  SE) の変化

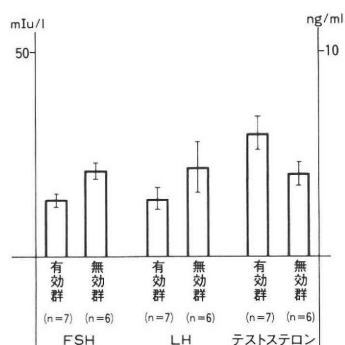


図3 精子濃度に対する効果とホルモン値 (Mean±SE) との関係

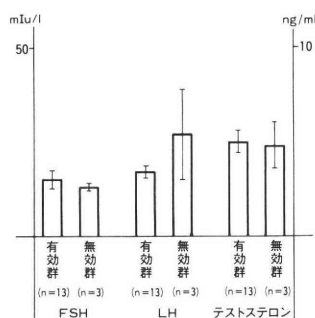


図4 精子運動率に対する効果とホルモン値 (Mean±SE) との関係

精子運動率の評価対象例中有効群(13例)のFSH, LHおよびテストステロン値(Mean±SE)は $15.0 \pm 2.4$  mIU/l,  $15.2 \pm 1.4$  mIU/l,  $5.0 \pm 0.6$  ng/mlで、無効群(3例)ではそれぞれ $12.9 \pm 0.7$  mIU/l,  $27.1 \pm 12.1$  mIU/l,  $4.8 \pm 1.2$  ng/dlであった。2群間のホルモン値に有意差は認められなかった(図4)。

### 考 按

本研究で人参養栄湯を使用したのは構成成分である人参の抗ストレス作用<sup>6)</sup>、蛋白合成促進作用<sup>7)</sup>、黄耆<sup>8)</sup>、および当帰<sup>9)</sup>の末梢血管拡張作用、地黄の滋養強壮強精作用<sup>10)</sup>などが乏精子症または精子無力症に有効であると考えたからである。即ち補中益気湯、八味地黄丸、牛車腎気丸などと同様またはこれらを合わせた薬効を期待したものである。これに加えて桂枝茯苓丸をいわゆる駆瘀血剤として用いた。瘀血の概念を現在西洋医学の中で表現することはなかなか難かしいが<sup>11,12)</sup>、本研究では骨盤内のうっ血を瘀血の一種と解釈してそれによっておこる数々の病態を除去する意味で本剤を用いた<sup>13,14)</sup>。

精子濃度に対する効果を見ると全例では投与後増

加傾向にあるものの有意差はなかったが評価対象例( $20 \times 10^6$ /ml以下)では有意に増加していた。これは佐藤ら<sup>15)</sup>が指摘しているように $20 \times 10^6$ /ml以上の症例でなければ自然増加する可能性が少ないことを考えれば意味のある成績と思われる。また有効率は53.8%であったが、補中益気湯では67.3%<sup>1)</sup>および40.0%<sup>2)</sup>で、八味地黄丸では21%<sup>3)</sup>、牛車腎気丸では33%<sup>5)</sup>と報告されている。これらの成績は評価基準の違うものもあるので単純に比較はできないが、われわれの成績は他の漢方療法と比べても一応満足のいくものと言えよう。

精子運動率に対する効果は全例でも評価対象例でも投与後に向上しており、明らかに有効と考えられる。また有効率は81.3%で補中益気湯の74.5%<sup>1)</sup>および45.7%<sup>2)</sup>八味地黄丸の50%<sup>3)</sup>、牛車腎気丸の53%<sup>5)</sup>と比較してかなり高い。このような精子運動率の改善を示すのは今までの治療法の中では精索静脈瘤に対する高位結紮術のみが相当するものと考えられる<sup>16)</sup>。さらに今後詳細に検討するつもりであるが、20例中9例に精索静脈瘤を認めそのうち7例で消失または軽快を確認している。この精索静脈瘤の治療を介すると思われる精子運動率の改善は人参養栄湯を含めた前述の製剤の効果とは考えにくく、駆瘀血剤として用いた桂枝茯苓丸によるものとするのが妥当であろう。しかし当然のことながら今回の研究法では結論を出すわけにはいかない。

薬効と投与前のホルモン値との関係を見ると精子濃度と精子運動率のそれぞれについて有効群と無効群との間で有意差はなかったがFSHおよびLH値は無効群で高い傾向にあったのは興味深いことである。

今回の検討で注目すべきなのは有効率の高さと桂枝茯苓丸の薬効に関することであろう。それ故今後本療法をつづけるとともに、とくに精索静脈瘤のある症例には桂枝茯苓丸の単独療法も試みるつもりである。さらにFSH, LHの投与前値または投与後値についても症例を重ねて分析したい。これらの検討により男性不妊の漢方療法がより具体的かつ理論的なものになりうると思われる。

### 文 献

- 1) 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: 51, 1984
- 2) 吉井慎一, 友政 宏, 石川博通, 小磯謙吉: 男子不妊症に対する補中益気湯の効果, 和漢医薬学会誌, 6: 494, 1989

- 3) 奥山明彦, 並木幹夫, 園田孝夫, 林知厚: 男子不妊症に対する八味地黄丸および人参湯の効果, 泌尿紀要, 30: 409, 1984
- 4) 内藤善女, 吉田英機, 今村一男: 乏精子症に対する八味地黄丸の効果と末梢血中ホルモン値の変動について, 日不妊会誌, 30: 12, 1985
- 5) 高山秀則, 小西 平, 神波照夫, 若林賢彦, 渡辺仁, 林田英資, 友吉唯夫: 男性不妊症に対する牛車腎気丸の効果, 泌尿紀要, 30: 1685, 1984
- 6) 斉藤 洋, 包 天桐, 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の影響, 第 16 回和漢薬シンポジウム講演要旨集, P 66, 1982
- 7) Oura, H., Tsukada, J., Nakagami, H.: Effect of radix ginseng extract on cytoplasmic polysome in rat liver, Chem. Pharm. Bull., 20: 219, 1972
- 8) 寺田文治郎, 高橋富雄: 漢方黄耆の抗高血圧性成分について, 日薬物誌, 25: 27, 1938
- 9) 林 元英: 柴根および当帰の薬理学的研究 (第一報), 日薬理誌, 73: 177, 1977
- 10) 吉田英機: 男性不妊症に対する漢方療法 (ツムラ八味地黄丸), 漢方医学, 5: 12, 1981
- 11) 寺沢捷年, 篠田裕之, 今田尾章, 土佐寛順, 坂東みゆ紀: 瘀血証の症候解析と診断基準の提唱, 日東洋医誌, 34: 1, 1983
- 12) 伊東信夫: 瘀血の現代医学的考察—病理形態学と臨床医学の立場から—, 漢方医学, 3: 14, 1979
- 13) 村田高明, 飯塚理八: 骨盤内うつ血症候群, 産婦人科の世界, 34: 90, 1982
- 14) 稲木一元: 末梢循環と漢方—動脈疾患・静脈疾患・微小循環, 循環科学, 9: 54, 1989
- 15) 佐藤和宏, 折笠精一, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 松平正義, 高橋 勝: 男性不妊患者に対する補中益気湯, ユウジン未併用療法の経験, 泌尿器外科, 2: 641, 1989

- 16) 武島 仁, 石川博通: 男性不妊症における精索静脈瘤 その 3 治療および手術成績, ペリネイタルケア, 5: 89, 1986

### Clinical effects of ninjinyoeito with keishibukuryogan on male infertility

Hiromichi Ishikawa, He Zhongtao,  
Fumio Manabe, Shinichi Yoshii  
and Kenkichi Koiso

Department of Urology Tsukuba University,  
Ibaragi: 305, Japan

We administered 9.0g of Ninjinyoeito with 7.5g of Keishibukuryogan daily for more than 3 months to 20 patients with male infertility. Semen was examined for sperm density and motility before and after administration and blood was drawn for the determination of serum FSH, LH and testosterone before administration.

- 1) Sperm density showed a significant improvement in studied cases after administration.
- 2) Sperm motility showed significant improvements in studied cases and all cases after administration.
- 3) The effectiveness rate for sperm density was 53.8% and that of sperm motility was 81.3%.
- 4) No significant relationship was observed between the effectiveness of this therapy and the hormonal levels.

We conclude that this therapy is effective for male infertility, especially in asthenozoospermia.

(受付: 1991 年 4 月 17 日)

## 地方部会講演抄録

## 第109回 日本不妊学会関西支部集談会

日時：平成3年3月16日

場所：大阪(株)日本シェーリング社講堂

## 1. 腎移植患者の精液中の ciclosporin 濃度と精液所見の検討

朴 勺・國保昌紀・尾松 操  
友吉唯夫 (滋賀医大泌尿器)  
迫 裕孝・沖野功次・中根佳宏  
(同第1外科)  
芝田信人 (同附属病院薬剤部)

ciclosporin (CsA)の導入により、臓器移植の成績は飛躍的に向上したが、種々の副作用についても報告されている。しかし、副作用報告の中には、CsAの生殖系に及ぼす影響についてほとんど報告されていない。CsAは動物実験では卵巣や精巣に毒性がみられたとの報告がある。腎移植成績の向上に伴い、腎移植患者の quality of life が重視されているが、CsAの長期服用による生殖系への影響を検討することは重要であり、とくに若年者においては軽視できない問題である。そこで今回、CsA投与を受けている腎移植患者の精液所見と精液中のCsA濃度について検討したので報告する。

精液中のCsA濃度は27ng/mlから296ng/ml(平均 $106.0 \pm 74.5$  ng/ml)であり、全血中のCsA濃度と相関関係がみられた。精液中のCsA濃度は精液中の濃度とほぼ同じであった。全例でCsA投与前後の精液所見の推移を検討できたわけではないが、精液中のCsA濃度と精液所見についても報告する。

## 2. HCG-HMG療法およびAIHで妊娠に成功した hypogonadotropic hypogonadism による無精子症の1例

石田 章・林田英資・友吉唯夫  
(滋賀医大泌尿器)  
加藤英子 (かとう医院)

症例は32歳の男性で、主訴は1年間の不妊。既往歴として27歳で2次性徴認められず、テストステロン療法を3年間うけたことがある。1987年12月より東京大学医学部附属病院にて挙児希望のためHCG-HMG療法を開始するも転勤のため当科紹介される。

初診時(5月11日)、精巣は両側も5mlと萎縮し、無精子症であった。FSH 2.1mIU/ml, LH 1.3mIU/ml, テストステロン 0.4ng/2mlであった。HCG-HMG療法(第1週はHCG 5000単位、週1回、第2週はHCG 5000単位週1回、第3週はHMG 300単位週1回、この方法をくりかえす)を施行し、27週後には精子濃度 $12 \times 10^6$ /ml 運動率10~20%、54週後には精子濃度 $45 \times 10^6$ /ml 運動率30~40%と改善したのでAIHを依頼したところ、1990年8月妊娠に成功した。

## 3. 精索静脈瘤に対する手術治療成績の検討

林 晃史・今西 治・奥田喜啓  
篠崎雅史・中川泰治・岡 伸俊  
松本 修・守殿貞夫 (神戸大泌尿器)

精索静脈瘤は、男性不妊の原因の一つと考えられているが、本症が不妊をひき起こす機序に関しては不明な点も少なくない。しかし内精静脈高位結紮術などの外科的治療により、精液所見の改善や妊娠成功率の上昇などが得られることから、手術療法は有効とされている。今回我々は、当科男性不妊外来における精索静脈瘤症例について、手術治療成績を中心とした臨床統計的観察を行った。

対象症例は、1980年から1988年までの9年間に精索静脈瘤と診断された642例である。結果はOligozoospermiaに関しては、精子濃度 $5 \times 10^6$ /ml未満の症例ならびに $5 \times 10^6$ /ml未満で、かつ精索静脈瘤のGradeの高い症例で、手術施行群において精子濃度の有意な改善がみられた。またAsthenozoospermiaに関しては、精子運動率10%未満の症例では手術の効果を認めなかった。Oligozoospermia, Asthenozoospermiaとも、手術の効果を認められた症例の大半は、術後1年以内に、その効果があらわれた。

## 4. 精子に対する Electroporation 法による外来遺伝子導入の検討

中西 章・岩田尚孝・内海恭三  
入谷 明 (京都大農学部畜産)

(目的) Electroporation法によりニワトリ精子にDNAを導入し、その精子を受精させることによりニワトリゲノムへ外来DNAを組み込ませることを目的とした。

(材料と方法) 採取した精子を洗浄し, 200mM のシヨ糖を含む Tris-HC 1M 溶液に懸濁した。導入する遺伝子は  $\beta$ -actin のプロモーター部位をもつホタル由来の Luciferase 構造遺伝子を用いた。Electroporation は東京理化機械㈱製, ECF-2000 型により 8KV/cm, 40 $\mu$ ec., 精子濃度は 1~2 億/ml, 液量は 300 $\mu$ lml, 導入する DNA の濃度は 1~7  $\mu$ g/ml で行なった。Electroporation 処理後の精子懸濁液 0.3~0.8 ml を人工受精に供した。人工受精後卵を回収し 5~7 日間孵卵した後, 胚の Luciferase 活性を調べた。

(結果) 95 個の受精卵が得られ 1 個の胚で弱い Luciferase 活性が見られた。現在活性が見られた胚の DNA を解析中である。

### 5. Sperm Prep Column による精子調整法有用性の検討

脇本昭憲・大橋一友・加藤宗寛  
佐治文隆・谷澤 修 (大阪大産婦)

(目的) 従来, 精液所見の不良な精液より運動精子を回収するためには, Swim up 法やパーコール密度勾配法が用いられている。しかし前者は運動精子の回収率が低く, 後者は回収率が高いが操作が煩雑である。今回 Sperm Prep 精子濾過カラムを用いて所見不良の精液を調整し, その有用性を検討した。

(方法) 乏精子症および精子無力症を伴う不妊夫婦 25 組を対象とした。人工授精前に液化した精液を 20% パーコールに重層し, 遠沈後上清を除いた。次いで, 1 ml の精子浮遊液を作製し Sperm Prep Column で調整をおこなった。この結果従来おこなっている Swim up 法の精液所見と比較検討した。

(結果) ① Sperm Prep 法にて得られた精子浮遊液は Swim up 法に比べ, 精子運動率に差は認められなかった。②一方, 運動精子回収率は有意に増加し, Swim up 法で運動精子回収不能であった症例も含め, すべての症例で回収可能であった。③操作は 20 分で終了した。

### 6. 体外受精における卵成熟および精子機能の検討

谷口 武・大橋一友・加藤宗寛  
下屋浩一郎・佐治文隆・谷澤 修  
(大阪大産婦)  
亀田 隆 (大阪労災病院産婦)  
岡部 勝・三村 務 (大阪大薬学部)

(目的) 体外受精胚移植 (IVF-ET) における妊娠率向上のため, 卵の成熟および精子機能の検討を加え

た。

(対象と方法) 1990 年に当科不妊外来にて, IVF-ET program による排卵誘発をおこなった 19 人 33 周期について ① HCG 切り替え時の progesterone の値と卵割率, ② acrosome reacted sperm に対するモノクローナル抗体を用いた bead test により, 精子機能検査と卵割率との関係を検討した。

(結果) ① 14 人 21 周期に対して胚移植をおこない 6 例の妊娠例を得た。②卵割率は LH-RHa・HMG・HCG 法の方が HMG・HCG 法よりも良好であった。③ HCG 投与時の  $P_4$  が 1.5 以上ものでは卵割が認められなかった。④ bead test 不良群では卵割率が低かった。

(考察) progesterone 値の高いものに対しては排卵誘発法の検討が必要である。bead test は精子機能判定に有用である。

### 7. Syn<sup>elisa</sup> Kit を用いた抗精子抗体の測定

加藤宗寛・大橋一友・脇本昭憲  
古山将康・佐治文隆・谷澤 修  
(大阪大産婦)  
都竹 理 (都竹産婦人科医院)  
小幡祐美 (富士薬品工業)

(目的) 不妊婦人十数%は抗精子抗体を保有している。われわれは精子不動化試験, 精子凝集試験, 酵素免疫測定等による抗精子抗体測定をおこなってきた。今回は, Syn<sup>elisa</sup> (Elisas 社) を用いた抗精子抗体測定を試みた。

(検体) 未婚婦人 50 名, 不妊患者 76 名, 習慣流産患者 20 名の血清を用いた。各検体は duplicate で測定し, 標準血清から検量線を作製し抗体価を決定した。(結果) 各群の平均抗体価は, 未婚婦人 14.3 u/ml, 不妊患者 20.3 u/ml, 習慣患者 8.0 u/ml であった。未婚婦人の mean + 2 S. D. の 28.5 u/ml を cut off 値とすると, 不妊患者中の 15.8% (12/76 名) が抗体陽性となり, 精子不動化抗体陽性者は, 8.3% (3/36 名) が抗体陽性となった。なお, 習慣流産患者には陽性者はいなかった。

(考察) Syn<sup>elisa</sup> は, 精子抗原付着 pin を用いて免疫酵素反応にて血清中の抗精子抗体を検出する kit である。不妊患者の 15.8% が陽性となったが, この抗体の spectrum は精子不動化抗体とは異なるものと考えられた。

## 8. マウス胚における接着能獲得時期の検討

井田憲司 (京都警察病院)  
野田洋一・岸 淳二・都倉 隆  
塩谷雅英・成本勝彦・森 崇英  
(京都大婦産)

着床機構解明の目的をもって、われわれは着床実験モデルを作製し、各種条件下での接着能獲得時期の検討をおこなった。PMS, hCG による排卵誘起を施した I C R 雌マウスより h C G 投与後 95~100 時間に子宮灌流法にて採取した胚を、各種培養液中で、また各種接着面上にて培養、底面への接着時期を観察した。

d-MEM+HF12(1:1, Ca 濃度 0.1 mM)+10% FCS を用いた時のプラスチック底面への胚の接着は、hCG 投与後 110 時間より開始し、133 時間で 8 割の胚が接着し、140 時間ではほとんどの胚が接着を完了した。この接着時刻は、他の培養液 HF10, BWW などでも大きな変化はなく、また底面が子宮内膜上皮単層培養でもガラス面でも、コラーゲンまたはゼラチンを処理した底面でもプラスチック底面と大きく変わることがないことから、胚の接着能獲得時期に子宮内膜の大きな関与はなく、胚それぞれのプログラミングはかなり固定した固有のものであることが推測された。

## 9. マウス体外受精—胚培養系におけるチオレドキシンの影響—

野々垣多加史・野田洋一・森 崇英  
(京都大婦産)

われわれは近年、低酸素下培養、SOD 添加培養を用いて哺乳動物胚の体外培養における発育遅延への活性酸素の関与を示してきた。活性酸素による障害の機序は不明であるが、今回われわれは蛋白のSH基の酸化の関与を想定し、SH基の酸化還元反応に関与するチオレドキシン (TR) を培養液に添加して、受精と胚発生に及ぼす影響を検討した。

Two-cell block を示す Tuck 系マウスの卵と同系の精子を用いて、0.3% BSA 加 BWW 液 (対照群) またはそれに TR500 $\mu$ g/ml を添加した液 (TR 群) の中で IVF をおこない、受精卵を更に培養した。両群の間で受精率に有意差はなかった。受精卵が拡張胚盤胞まで至る率は対照群が 0% であるのに対し TR 群では 34% と著明に高率であった。

以上より胚に対する活性酸素障害発生機序のひとつとして、細胞分裂に関わる蛋白のSH基の酸化による S-S 結合形成により、蛋白の機能が障害され

て胚発生が停止する可能性が示された。

## 10. 尿中 LH 検出試薬 (エルチェック) の患者自己判定による成績

亀田 隆・長井聡里・橋本一昌  
伴 龍生・小尾靖江・岡 征雄  
小寄正人・桑原繁樹  
(大阪労災病院産婦・同臨床検査科)  
佐治文隆・谷澤 修 (大阪大産婦)  
都竹 理 (都竹産婦人科医院)

不妊治療において排卵予知は重要な課題である。種々の検査が排卵予知法として知られているが、LH surge の把握が最も確実な方法である。従来は LH surge の検出に高感度妊娠判定試薬が用いられてきたが、操作も繁雑で時間を要した。エルチェックは操作が簡便で短時間 (2 分間)、しかも判定結果の保存可能な尿中 LH 検出試薬である。われわれは 19 例のクロミッド服用排卵周期不妊婦人を対象として、患者自己判定によるエルチェックの使用を試みた。その結果、19 例中 17 例に LH surge による明瞭な陽性所見を認めた。この 17 例中 16 例のエルチェック初回陽性日は、BBT 低温相最終日の少なくとも 24 時間前に認められた。また BBT 上排卵日の不明確な 1 症例が、エルチェック使用により排卵予知ができ、妊娠に成功した。

したがって、エルチェックは排卵予知に極めて有用な手段であるだけでなく、患者自身による判定にも十分応用可能な、尿中 LH 検出試薬であると考えられた。

## 11. 不妊症例における甲状腺機能と gonadotropin 分泌の検討

奥田喜代司・佐伯理男・後山尚久  
杉本 修 (大阪医大産婦)

排卵障害例の中には軽度の甲状腺機能の低下がみられ、甲状腺剤の投与により性腺系機能の改善がみられる例が報告されている。そこで不妊症における甲状腺機能と妊娠能との関連性を検討した。有排卵の不妊患者 47 例を対象に卵胞期に TRH, LHRH test をおこない、各種ホルモンの反応性を中心に検討した。

TRH 負荷テストにより TSH 値は 47 例中 8 例が 40 $\mu$ U/ml 以上を示したが、甲状腺機能は正常範囲であった。これら TSH 高値例の各種ホルモンの律動性分泌をみると、TSH pulse は 3 時間に 2~3 回みられ、57% に PRL pulse と 43% に FSH および LH pulse とが同時にみられ、これらホルモン分泌の関連

性が示唆された。TSH 高値例の 5 例に Thyradin-S 25~50 $\mu$ g/day 投与し、1 例が妊娠した。

以上より排卵性周期を有する不妊症例の中にも潜在性甲状腺低下症ともいふべき症例があり、TSH 分泌と gonadotropin 分泌との関連性より妊孕能との関連性が示唆された。

## 12. 当科における子宮内膜症治療の現状と問題点

塩谷雅英・野田洋一・神崎秀陽  
泰井俊造・成本勝彦・高倉賢二  
森 崇英 (京都大産産)

当科における子宮内膜症治療の現状を把握する目的で retrospective に解析を試み若干の知見を得た。1989 年の 1 年間に子宮内膜症の診断で治療をおこなったものは 90 名で、11.7% を占めていた。平均年齢は 35.8 歳であった。rAFS 分類では I 期 11 名、II 期 9 名、III 期 25 名、IV 期 27 名、18 名は腹腔鏡などを受けておらず、rAFS 分類は不明であった。診断方法は、腹腔鏡検査 25 名 (27.8%)、開腹術 47 名 (52.2%)、内診・画像検査 18 名 (20.0%) であった。治療は Danazol 投与が 66 名 (73.3%) に、GnRh 投与が 27 名 (30.0%) に、保存手術が 63 名 (70.0%) に、IVF が 27 名 (30.0%) になされた。

治療後の妊娠率は 20.0% であった。期別では I 期 36.4%、II 期 44.4%、III 期 24.0%、IV 期 3.7% であり、IV 期の妊娠率が特に低いことが特徴的であった。軽症群に比し重症群の妊娠率は低く、このことから妊娠率を向上させるためには早期発見・早期治療が重要と考えられ、子宮内膜症が疑われる際には積極的に腹腔鏡をおこなう必要があると考えられた。

## 第 2 回 日本不妊学会春季九州支部会

日 時：平成 3 年 4 月 21 日 (日)  
場 所：城山観光ホテル

### 1. 最近 5 年間の当科不妊外来における妊娠症例についての検討

小山伸夫・河野哲郎・本田賀裕  
松井幹夫・西村 弘・田中信幸  
松浦講平・岡村 均 (熊本大産産)

(目的・対象) 生殖医学の進歩に対応して当科でもここ数年新しい不妊治療に取り組んできた。そこで、最近 5 年間に当科不妊外来で妊娠が設立した 381 例について年次的な推移を検討し、以下の結果を得た。(成績) 1. 粗妊娠率は各年を通じて 16.0% から 18.8% で変化はなかった。2. 最近 2 年間では 4 年以上の不妊期間症例の妊娠が全体の約 40% を占めた。3.

初診から妊娠成立までの期間の延長がみられた。4. 不妊因子の分布では、排卵因子・子宮内膜症が多く、次いで卵管因子・機能性不妊が多かった。5. 治療法の内訳では、各年とも排卵誘発剤の使用例が最も多く、全体の 40% を占めた。AIH、IVF-ET による妊娠例は全体の 14% を占めた。

(考察) 最近の晩婚・家族計画および不妊症の難治化を反映した結果が得られたが、新しい治療法の導入にもかかわらず、粗妊娠率は増加しておらず、従来からの治療法適応についても再検討を要すると思われる。

### 2. 腹腔鏡検査施行後の妊娠例の検討—腹腔鏡下操作の有用性について—

池田景子・小山雅子・詠田由美  
澄井敬成・牧野康男・吉満陽孝  
白川光一 (福岡大産婦)

1989 年 1 月~1990 年 12 月の間に、腹腔鏡を施行した不妊症例のうち、①腹腔鏡は診断のみで、治療は開腹手術によった 21 例 (I 群) と、②開腹をせず、腹腔鏡下に癒着剥離や焼灼、囊腫吸引などの治療を行い、また腹腔鏡前に AIH を行い、腹水中精子回収試験を施行した 19 例 (II 群) を対象に、その後の妊娠予後について比較検討した。I 群と II 群の平均年齢、平均不妊期間には差がなかった。妊娠例は I 群で 4 例 (19%)、II 群で 10 例 (53%) ( $P < 0.05$ ) であったが、卵管開口術や IVF-ET が必要であった両側卵管閉塞例を除外して検討すると、腹腔鏡施行後 6 カ月以内の妊娠例は I 群で 2 例 (11%)、II 群では 8 例 (57%) と II 群で有意に高率であった ( $P < 0.01$ )。以上より、腹水中精子回収試験を含めた腹腔鏡下での諸操作を行なうことにより、早期の積極的な治療が可能となり、妊娠率が向上すると思われた。

### 3. 免疫療法が奏功した習慣流産の 1 症例〈免疫療法前後の免疫学的パラメーターの変動〉

横山幹文・渡邊良嗣・野崎雅裕  
佐野正敏・中村元一・中野仁雄  
(九州大産婦)

我々は、中隔子宮および黄体機能不全に対して各々治療を施行したにもかかわらず、流産を反復した症例に対して免疫療法を行い無事出産に至った症例を経験し、若干の免疫学的検討を行ったので報告する。症例は初診時 31 歳、30 歳で結婚後、2 回連続して妊娠初期に自然流産したため当科を受診した。中隔子宮に対して中隔切除術および黄体機能不全に対して HMG 療法を行ったが、妊娠 10 週、7 週および 10 週

で子宮内胎児死亡に至った。免疫学的検査の結果、遮断抗体 (MLR-BE) は陰性 (12.7%) で夫リンパ球に対する細胞障害性T細胞 (CTL) は陽性 (26.5%) であった。また患者末梢血リンパ球に流産絨毛に対する細胞障害活性 (47.1%) を認めた。この症例に対して妊娠6週より夫リンパ球を用いた皮下免疫療法を施行後、妊娠36週で帝王切開分娩により2930 g, 男児を出産した。免疫後のMLR-BEは陽性 (63.0%), CTLは陰性化 (-1.2%), 正常満期絨毛細胞に対しては27.6%と軽度の細胞障害活性を認めた。

#### 4. 46XY 性腺形成不全症の1例

西村 弘・田中信幸・松浦講平  
岡村 均 (熊本大産婦)

原発性無月経を主訴として来院し、染色体および各種ホルモン検査により pure 46XY gonadal dysgenesis と診断した症例を報告する。症例は現在27歳で、表現型は女性型のため出生時より女性として養育されたが、17歳になっても月経発来ならびに二次性徴の発現がないため近医を受診している。また、この頃より急激な身長伸びがみられ、現在187 cmである。22歳時に他院にて染色体検査を施行され、46XYを指摘されているが、個人的な事情により外来にて経過観察していた。当科にて性腺摘除までの期間Kaufman療法を行ったところ消退出血の発現と乳房の発育がみられ、身長伸びは停止した。今回、性腺摘除目的にて入院したので、各種内分泌学的な検査を行った。開腹時、両側の索状性腺と超母指頭大の子宮を確認し、両側性腺を摘出した。摘出性腺は組織学的に纖維成分のみであった。現在外来にて、Kaufman療法を続行中である。

#### 5. Mosaic Turner 症候群で妊娠した1例

東島利紀・友成廉平・友成美鈴  
平井ひろみ・薬師寺道明 (久留米大産婦)  
河田文子 (河田産婦医院)

産婦人科外来に無月経を主訴として訪れる患者に染色体異常が含まれ、その中で一番多いものがTurner症候群である。その核型には多彩なモザイクと構造異常の組合せがあり、最近では妊娠、出産の報告例も見られている。しかし出生児の先天異常は高率で、その対応は慎重になる必要がある。今回我々は、正常児を得た mosaic Turner 症候群の妊娠例を経験した。症例は22歳、月経不順を主訴に来院した。身長135 cm, 体重40 kg, 外反肘を認め、LH-RH test はHypergonadotropic hypogonadism であった。末梢

血の染色体検査にて、45 XO (30%) / 46 XX (70%) の mosaic Turner 症候群と診断された。E-P療法を施行し、治療開始約1年目に妊娠を確認した。妊娠28週2日より切迫早産で入院管理を行い、妊娠35週5日帝王切開術にて2300 gの女児を娩出した。児の染色体は46 XXで現在まで順調に発育している。

#### 6. 性成熟期における女性アルコール依存症患者の生殖機能について

石 明寛・吉田耕治・岡村 靖  
(産業医大産婦)

近年、女性の社会的進出に伴って女性のアルコール依存症が年々増加傾向にある。このような社会事情は20歳代から40歳代の女性の生殖機能にも悪影響を及ぼす可能性が考えられる。今回、我々は女性アルコール依存症27名 (年齢: 29~40歳, 平均:  $34.5 \pm 4.1$  歳) について性機能の障害を内分泌的に検討したので、その成績について報告する。これら27名の患者の初経は12~15歳の間に発来していた。第2次性徴の発現も正常であった。続発性無月経となった者は25名 (92%) で、そのうち第1度無月経は14名、第2度無月経は11名であった。また稀発月経は2名であった。全症例はいずれも性欲の低下と冷感症を訴えた。血中FSH, LH, PRLおよび $E_2$ 値、そしてLH-RH testの成績から第2度無月経患者11名はいずれもHypergonadotropic hypogonadismを示していた。第1度無月経14名中の8名は、禁酒療法および底肝療法後月経が発来した。しかし治療後にも性機能障害が高頻度 (70.8%) であった。

#### 7. 子宮筋腫核出術前のGnRH analogue (スプレキュア) 投与の有効性について

山下隆則・一瀬俊介・楠田典子  
石丸忠之・山辺 徹 (長崎大産婦)

子宮筋腫の手術適応は、年齢、症状および大きさによって総合的に決められるが、妊孕性を温存するためには一般的に筋腫核出術が行われる。筋腫核出術において、筋腫核の存在する位置や大きさによっては、止血困難な場合や子宮内膜損傷、漿膜の広範にわたる欠損などにより、二次的に内膜癒着、卵管角部閉塞や腹腔内癒着などを生じ、医原的不妊原因ともなりかねない。そのため核出術といえども術中操作には十分な注意を払う必要がある。GnRH analogue (スプレキュア) は、内因性LH, FSHを抑制することにより卵巣性estrogenの分泌を抑制し、筋腫核を縮小させることが知られているが、投与中止後は、再び筋腫核の増大を認めることから根本的治

療法とはなり得ない。今回私どもは、子宮筋腫核出術前に GnRH analogue を投与し、筋腫核の縮小をはかった後、核出術を施行した 2 例を経験したので、現在 GnRH analogue 投与中の 6 例を含めて経過および術中所見を報告し、GnRH analogue の術前投与の有用性について若干の文献的考察を加えて報告する。

## 8. 当科更年期外来患者の Body Mass Index と骨量および内分泌学的因子について

橋本和法・野崎雅裕・佐野正敏  
中村元一・中野仁雄 (九州大産婦)

骨粗鬆症患者の危険因子としてやせ体質という事が言われ、特に閉経後女性にその傾向が強いとも言われている。また肥満婦人には骨粗鬆症が少ないとも言われている。今回我々は当科更年期外来登録患者で両側卵巣摘出後婦人 89 名について体型の指標となる Body Mass Index と骨量の相関について検討を加えてみた。結果は 46 歳から 50 歳では  $r=0.66$ , 51 歳から 59 歳では  $r=0.61$  で骨量と Body Mass Index 間に相関を認めた。両側卵巣摘出後婦人において Body Mass Index と骨量に相関があるという事実の背景には、エストロゲン、骨代謝回転、Peak Bone Mass の値などが考えられる。今回我々は両側卵巣摘出後の主たるエストロゲンとなるエストロンと骨量との相関について、前述の 46 歳から 59 歳の両側卵巣摘出後婦人について検討を加えてみた。結果はこれらに相関は認められなかった。従って今後更に他の要因についての検討が必要と考えられた。

## 9. プロラクチン (PRL) によるヒト顆粒膜細胞増殖抑制作用—増殖抑制作用発現への抗 PRL 抗体の影響—

楢原久司・河野康志・松井尚彦  
廣田佳子・早田 隆・宮川勇生  
(大分医大産婦)

前回報告した PRL のヒト顆粒膜細胞抑制作用の発現機序を明らかにすることを目的として、その細胞増殖抑制作用への抗 PRL 抗体の影響について検討した。直径 15 mm 以上の大卵胞より顆粒膜細胞を採取し、10 % FCS DMEM / 12 培地にて 96 時間培養を行い、ヒト PRL 100ng/ml 添加、または、抗ヒト PRL 抗体の種々の濃度の添加における細胞増殖能を  $^3\text{H}$ -thymidine (TdR) の取込みを指標として比較した。PRL 100ng/ml の添加により  $^3\text{H}$ -TdR の取り込みは有意に抑制された。この抑制作用は抗ヒト PRL 抗体の濃度依存性に阻止された。抗体のみを

添加した場合は control 群と有意差を生じなかった。これらの結果より、PRL はヒト顆粒膜細胞の増殖を抑制することが強く示唆された。

## 10. 排卵日推定における尿中 LH 測定の有用性について

布施正樹・岡本純英・石丸忠之  
山辺 徹 (長崎大産婦)

人工授精 (A I H) において排卵日を推定することは重要である。今回、尿中 LH 測定による排卵日の有用性について検討した。

(方法) A I H に際して、超音波断層法および尿中 LH 測定により排卵を確認できた 27 例 101 周期を対象とした (1990 年 8 月～1991 年 1 月)。その内訳は自然周期 12 例 49 周期およびクロミフェン周期 15 例 52 周期である。それぞれについて、排卵日前日の卵胞径および月経周期日について検討した。

(成績) 自然およびクロミフェン周期における前日の卵胞径のメディアンは、それぞれ 19.0 および 21.5 mm で、月経周期日はそれぞれ 14 および 17 日目であった ( $P<0.005$ )。しかし、各症例間および症例内で卵胞径および月経周期日のバラツキがみられた。尿中 LH 測定による排卵日の推定は 101 周期中 96 周期で予知できた。

(結論) 1. B B T および超音波断層法による排卵日の推定は不確実である。2. 尿中 LH 値上昇による排卵日の推定は有用であると思われる。

## 11. 透明帯付着精子数による精子の受精能力の検討

吉田一郎・田中 温・豊成由佳  
田中威づみ・竹本洋一・鷹野和哉  
(セントマザー産婦医院)

精子の受精能力を判定する方法としてはハムスターテストが有用であることは諸家より報告されているが、その複雑さによりルーチンの検査にはなりにくい。今回我々は、体外受精失敗症例を検討した結果、受精しなかった卵子の透明帯に付着した精子数が少ない点が認められた。この点をさらに検討するために、体外受精失敗卵子を 25 % グルタルアルデヒド、中性ホルマリンで固定後、95 % エタノール→45 % 酢酸で処理した後に、テクモイド染色を施し透明帯付着精子数を count し、媒精時の精子性状を検討した。付着精子数の分類は 0, 少 (1～5), 中 (6～20), 多 (20 以上) とした。最活発前進運動精子が媒精時全体の 10 % 以下で精子数が  $5 \times 10^4 / \text{cc}$  以下の症例では殆どの場合、付着精子数は 0～少であっ

た。一方、媒精時の精子性状は良好な症例の10~20%でも付着精子が少であった。分割卵子における付着精子数は多であった。

## 12. 体外受精における未受精群の検討

森 明人・山元慎一・沖 利通  
堂地 勉・竹内一浩・福元清吾  
永田行博 (鹿児島大産婦)

平成元年4月から平成3年3月に当科にて体外受精を行い、1個以上の卵を採卵できた101周期の中で全く受精を認めなかったのが12例、15周期(14.9%)であった。この未受精群について夫婦の平均年齢、精液所見(総精子数、運動精子数、運動率)、卵のgrade等について検討した。未受精群の体外受精適応因子は、男性因子が15周期中9周期と圧倒的に多かった。精液所見別に未受精率をみると総精子数が4000万以上では12.8%、未満では21.7%、運動精子数が2000万以上では8.5%、未満では42.1%、運動率が50%以上では11.0%、未満では31.6%と運動精子数で分けたものが最も有意差があった。即ち運動精子数が受精能と最も関連あることがわかった。運動精子数が1000万未満では未受精率50%、500万未満では71.4%、100万未満では1例も受精しなかった。しかし文献的には15万/mlで体外受精で妊娠した症例もあることから、重症の乏精子症でも体外受精を試みる価値はあるが、何度か試みて受精しない場合は、顕微受精またはAIDの適応になると考えられる。

## 13. ヒト卵胞液(HFF)を用いた良好精子回収法の開発とその臨床成績

田中威づみ・田中 温・豊成由佳  
吉田一郎・竹本洋一・鷹野和哉  
(セントマザー産婦医院)

ヒト卵胞液中には精子の運動率を上昇させる物質が含まれていると報告されている。今回我々はこのヒト卵胞液を用いて、良好精子回収法を開発し、これを臨床に応用したので、その成績について報告する。採卵時、成熟卵より採取した卵胞液を濾過滅菌後-70℃で凍結保存。使用時融解し、濾過滅菌後使用した。精子性状が重症の場合は、パーコールで一旦精子を遠心分離後、4~6% HFFで培養し使用した。精子がある程度 Swim up 可能な場合は、Swim up 後回収した精子浮遊液内に4~6%となるようにHFFを滴下し培養した。この両者の方法をAIH、GIFT、IVF-ETに使用し、従来の精子回収法では妊娠に至らなかった症例でそれぞれ27例(27/114:

24%), 21例(21/94: 22%), 43例(43/141: 30%)の妊娠を認めた。

## 14. マウス受精卵を用いた共培養の効果に関する研究—培養液内酸素分圧の変化について—

山元慎一・竹内一浩・森 明人  
沖 利通・中村行彦・福元清吾  
堂地 勉・永田行博 (鹿児島大産婦)

ヒトの体外受精・胚移植においてfibroblastや卵管上皮細胞との共培養の試みがなされており、その有効性が示唆されている。共培養の効果については、共培養細胞からのなんらかの発育促進因子の産生、培地内の環境の変化などが考えられているが、我々は、共培養の効果も共培養地内酸素分圧の低下さらに受精卵発育促進因子の産生によると考えている。本実験では、共培養による受精卵発育促進の効果も培養液内低酸素分圧によるものかどうかについて、ヒト卵巣癌細胞を共培養細胞として検討した。Nunc 4well multidish内で共培養細胞の培養を行ない、confluentに増殖した後に1 mlの10% FCS添加HTFで37℃・5% CO<sub>2</sub> in air下に培養した。培養24時間後の培地最下層の80μlの培養液(co-culture群)の酸素分圧は136.6±1.1 mmHgとcontrol群の108.5±10.7 mmHgに比較して有意に低下した(P<0.05)。共培養培地内低酸素分圧状態を解除する目的で作製した装置内(equivalent-co-culture群)の培養開始24時間の培養液内酸素分圧は130.9±1.8 mmHgと低酸素分圧を解除できた。共培養の効果を見るためにcontrol群およびco-culture群の培地でマウス1細胞期胚を96時間培養(37℃・5% CO<sub>2</sub> in air)とするとblastocyst発育率は、それぞれ6.3%、25.0%と有意(P<0.05)にco-culture群で受精卵発育促進を示した。しかしながら、低酸素分圧状態を解除したequivalent-co-culture群では、6.1%とco-cultureによる受精卵発育促進効果は認められなかった。本実験から、受精卵を共培養すると共培養培地内で低酸素分圧状態になりそのために酸素毒としての酸素が消費され受精卵発育が促進されるものと考えられる。

## 15. Zona openingの臨床応用

田中 温・豊成由佳・田中威づみ  
吉田一郎・竹本洋一・鷹野和哉  
(セントマザー産婦医院)

重症男性不妊症に対するIVF-ETおよびGIFTの妊娠率は極端に悪い。良好精子の回収法は種々あるが、いずれの方法でも妊娠率は低いのが現状であ

る。重症男性不妊症の中で、特に我々は精子運動率は良好であるが、精子濃度が低い重症男性不妊症に対し、Zona opening の臨床成績について報告する。従来の過排卵処理法にて採取した成熟卵を 0.1% ヒアルロニターゼで顆粒膜細胞を除去後、0.3~0.4 M sucrose-HTF 内に注入し、細胞質を縮小させた後 micromanipulator (ナリシゲ) を用いて卵子を固定後、ガラス製微小フックを用いて透明帯を開孔した。良好精子はヒト卵胞液を用いた方法で回収した。現在この微小フック法の他に 31 G 針を用いて透明帯を切除する方法を検討中である。

#### 16. 体外受精・胚移植における pure-FSH の使用経験

沖 利通・堂地 勉・森 明人  
山元慎一・福元清吾・竹内一浩  
永田行博 (鹿児島大産婦)

体外受精・胚移植 (以下、IVF と略す) の排卵誘発には、種々の HMG 製剤が使われているが、どのような製剤が良いかは、意見の一致をみない。今回、我々は IVF に純度の高い FSH 製剤であるフェルチノームを使用し若干の知見を得たので報告する。対象は、1990 年 1 月から 91 年 3 月までに当科で IVF を施行した 40 症例 78 周期であり、pure FSH を用いた群は 7 例 10 周期、プセリンを併用した従来 HMG 使用群は 35 例 68 周期である。FSH 群の方が、穿刺卵胞数・採取卵数・受精卵数・妊娠率ともに HMG 群に比較し多い傾向にあったが、採卵日は FSH 群が HMG 群より約 1 日遅かった。ホルモン検査では、血中エストロゲンは採卵前で FSH 群の方が高く、血中プロゲステロンは採卵日以降に FSH 群の方が有意に高かった。P/E<sub>2</sub> 比に関しては、採卵前は HMG 群、採卵後は FSH 群が高い傾向にあり、着床に関しては、FSH 群の方が好都合である可能性が示唆された。

#### 17. 結核性子宮内膜炎治療後の IVF-ET の妊娠の 1 例

高宮城直子・佐久川政男・新崎盛雄  
佐久本哲郎・東 政弘・中山道男  
(琉球大産婦)

性器結核による不妊症は、これまでは不妊治療対象となり得なかったが、近年 IVF-ET による不妊治療が可能となった。今回我々は、興味ある経過を示した結核性子宮内膜炎治療後の IVF-ET 妊娠例を経験したので報告する。症例は、肺結核の既往を有する 35 歳の 12 年間の原発性不妊症で、30 歳の時卵

管形成術を受けた際に、卵管内容液中に結核菌が検出され、8 か月間の P.A.S 投与を受けている。35 歳、他院にて IVF-ET により妊娠したが、妊娠 10 週 1 日結核性子宮内膜炎により自然流産となった。1 年間の INH・RFP・EB 3 者併用療法後、今回 IVF-ET にて妊娠し、現在妊娠 14 週、特に異常なく経過中である。本例の経験から結核性不妊症の IVF-ET 施行前には子宮内膜を含めた病変の存続の有無を十分検討する必要があると思われる。

#### 18. 個人病院のグループ診療による体外受精・胚移植

堂園光一郎 (堂園クリニック)  
楠元博彦 (やはたウイメンズクリニック)  
榎園祐治・中村雅弘・儀保善英  
四宮大乗 (愛育病院)

1990 年 2 月より個人病院、3 施設のグループ診療による体外受精・胚移植を施行しているので、その治療成績を報告する。

(方法と対象) 3 施設で主治医が各々排卵誘発を行い、1 施設で採卵、媒精、卵培養、胚移植を施行、胚移植後の luteal support 等は各主治医が行った。1990 年 2 月より 1991 年 1 月までに、体外受精・胚移植を目的に排卵誘発を行った 66 名、103 周期を対象とした。

(成績) 96 周期に採卵を施行し、少なくとも 1 個採卵できた周期は 94 周期であった。(平均採卵数: 5.2 個)、72 周期に胚移植を行った。(平均移植胚数: 3.1 個)。臨床的妊娠例は 12 例で、対採卵施行周期妊娠率: 12.5%、対胚移植妊娠率: 16.7% であった。妊娠例の予後は分娩: 1 例、妊娠継続中: 8 例、流産: 2 例、子宮外妊娠: 1 例であった。

(まとめ) 3 施設の連携、協力により、外来診療、分娩、手術等の日常診療に支障を来すことなく体外受精・胚移植を行い得た。

#### 19. 超音波断層下経腔的卵管カテーテル挿入法の検討

岡本純英・布施正樹・山下隆則  
河野雅洋・重松 潤・黄 宏駿  
石丸忠之・山邊 徹 (長崎大産婦)

従来の腹腔鏡採卵に比べ、経腔的超音波採卵法には、方法の簡易化、腹腔内癒着への対応性、採卵時間の短縮と麻酔手術侵襲の軽減など多くの利点がある。一方、GIFT および TET 法導入による妊娠率の向上が報告されているが、腹腔鏡を不可欠とする点で問題が残されていた。1989 年 7 月ヘルシンキで開

催された世界生殖学会議において Jansen & Anderson による超音波断層下経腔の卵管カテーテル挿入の手技が紹介された。本法の実用性が確認できれば、腹腔鏡を必要としない retrograde GIFT および TET が実現化する。そこで、1990年9月より超音波断層下経腔の卵管カテーテル挿入法の検討を開始した。無麻酔下、経腔超音波断層の観察のもとに卵管内に Jansen & Anderson カテーテルを挿入した。9例に挿入を試み、8例で成功した。ブラクティカルカテーテル挿入に成功後、ひきつづき gamete および embryo の移植も行った。本法が、比較的容易に実施可能な臨床手技であることが確認できた。

## 20. 当院における不妊症治療の3本柱—AIH, GIFT (ZIFT, EIFT), IVF-ETの臨床成績—

豊成由佳・田中 温・田中威づみ

吉田一郎・竹本洋一・鷹野和哉

(セントマザー産婦医院)

1989年4月より我々は不妊専門クリニックを開設し、AIH, GIFT (ZIFT, EIFT), IVF-ET を不妊症治療の3本柱と考え、不妊原因に応じてこれらの3つの方法を施行してきた。今回は、1991年1月までの臨床成績について報告する。排卵誘発法は① clomiphene 単独、② clomiphene + HMG + HCG、③ GnRH-a + HMG + HCG (Original 法, Short 法, Long 法)、④ GnRH-a + pure FSH + HMG + HCG を使用した。HCG 投与時期、良好精子回収法、採卵、培養、媒精、移植は従来の方法に準じて行った。AIH, GIFT, IVF-ET の妊娠率、流産率、多胎妊娠発生率、子宮外妊娠発生率はそれぞれ〔対周期妊娠率 9% (204/2267), 対患者妊娠率 17% (204/1200), 12% (25/204), 8% (16/204 : 多胎 12, 品胎 4), 2% (4/204)〕〔32% (237/741), 11% (26/237), 22% (52/237), 多胎: 37, 品胎: 12, 要胎: 3) 2% (4/237)〕〔対周期妊娠率 21% (243/1157), 対 ET 妊娠率 36% (243/675), 14% (34/243), 22% (53/243), 多胎: 35, 品胎: 14, 要胎: 4) 4% (10/243)〕であった。

## 特 別 講 演

### 家畜における microfertilization

後藤和文 (鹿児島大農学部家畜繁殖学)

#### 平成3年度日本不妊学会中部支部学術集会

日 時: 平成3年5月18日 (土)

会 場: 興和紡績本社ビル 11階ホール

## 1. 卵巣機能不全を伴う肥満婦人に対する漢方薬の使用経験

金倉洋一・千原 啓・米谷国男

石川 洋

(藤田保健衛生大学坂文種報徳会病院)

河上征治 (藤田保健衛生大学産婦)

伊藤 誠 (聖霊病院)

不妊症における肥満は性ステロイドホルモン代謝異常と密接に関連し、卵巣機能不全をきたすことがある。また産婦人科領域において、妊娠中毒症、子宮体癌との関連で、肥満婦人の課題は少なくない。肥満の対策として摂取カロリーの制限が主体ではあるが、運動、薬物による消費カロリーの増加を図る事も一つの方法である。そこで我々はBMRの上昇に伴う消費カロリーの増加、脂質代謝改善作用、利尿作用等の効果がある漢方製剤を投与し体重減少効果を検討した。

2回の分娩を経て16kg体重増加し無月経をきたした婦人に、カロリー制限と大柴胡湯を連日服用させることにより3か月で7kg体重減少し排卵が起こった症例を経験した。

また、肥満に対する漢方製剤に関して、葛根湯が有効であったBMR低値の症例を経験したので報告する。

## 2. Percoll を用いた攪拌密度勾配法による

### AIHの検討

高橋正明・鈴木清明 (清慈会鈴木病院)

米谷国男・金倉洋一・永田哲朗

千原 啓・丹羽邦明・山口陽子

石川 洋・石川順子・釜付弘志

渡辺朝香

(藤田保健衛生大学坂文種報徳会病院)

男性不妊の妊娠率が低いのは周知の事実であり、これに対し当科では1986年4月より80% Percoll を用いた攪拌密度勾配法によるAIHを行っている。今回過去3年間の不妊患者60人(延べ375回)の統計を試み以下の結果を得た。

Percoll 処理前後における①精子運動率(%), ②直進精子運動率(%), ③精子奇形率(%), ④精子濃度( $\times 10^6 / \text{ml}$ ), ⑤直進運動精子濃度( $\times 10^6 / \text{ml}$ )はそれぞれ①  $50.0 \pm 19.32 \rightarrow 68.1 \pm 21.65$ , ②  $28.5 \pm 20.27 \rightarrow 48.8 \pm 26.27$ , ③  $7.6 \pm 5.16 \rightarrow 5.0 \pm 4.75$ , ④  $97.2 \pm 90.04 \rightarrow 94.1 \pm 96.23$ , ⑤  $30.3 \pm 37.96 \rightarrow 52.1 \pm 62.56$  (Mean  $\pm$  S. D.) と④以外はすべて  $P < 0.001$  で有意差を認めた。また Percoll 処理

による回収率(%)は全精子  $43.3 \pm 22.98$ , 運動精子  $62.1 \pm 40.49$ , 直進運動精子  $88.5 \pm 77.75$  で, それぞれの間に  $P < 0.001$  で有意差を認め, 優良精子を選択的に回収できる事がわかった. 1986 年 4 月よりの全妊娠例は 14 例で, Wastage 率 21.4 %, 児の男女差は認められなかった. 処理に要する時間も 40 分以内と短く, 一般外来診療においても充分利用できる方法であると考えられる.

### 3. AIH 妊娠成績の検討

福永友明 (福永産婦人科)

80 % Percoll 攪拌密度勾配法による洗浄濃縮精子を用いて 72 症例に延べ 433 周期の A I H を施行した. その結果, 25 例 (34.7 %) に妊娠が成立した.

①洗浄後精子運動率が妊娠群, 非妊娠群とも有意に増加した. 精子数はやや増加したものの有意差はない.

②A I H 適応別では, 男性因子 37 例中 9 例, 頸管因子 13 例中 11 例, 機能性不妊 22 例中 5 例が妊娠した.

③妊娠までに要した A I H 周期数は 1 回目で 7 例, 2 回目で 6 例と, 妊娠例の半数以上が 2 回目までに妊娠した.

④妊娠 25 例中 16 例 (双胎 1 例) が分娩を終了して, 性比は男:女 (7:10) で, 異常児の出生はなかった. 流産 3, 子宮外妊娠 2, 不明 1, 妊娠中 3 例である.

⑤本法による洗浄濃縮の手法は簡単で, 技術を要さず, 個人開業医の日常診療に容易に導入することができた.

### 4. Bromocriptine 0.625mg 肛門坐薬による妊娠例の報告

戸谷良造 (国立名古屋病院産婦)

第 1 度無月経より軽度の排卵障害は, 少量の Bromocriptine 投与により正常排卵周期となる. 我々は, 過去 3 年 8 カ月に 262 例の挙児希望者に本剤を投与し, 66 例に 75 妊娠をみた (粗妊娠率 28.6 %). そのうち, 挙児および妊娠中は 58 妊娠であった. 中絶例を除いた挙児率は, 80.6 % であった. これらの症例の既往妊娠の流産率は高く, 挙児率は 50.9 % であった. すなわち, Bromocriptine 投与例では, 挙児率の上昇が認められた. 排卵障害の原因としてのみならず, 流産の原因にも潜在性高プロラクチン血症が関与している可能性がある. 流産は免疫学的原因が重視されているが, 内分泌原因の流産もあり得ると考えられる. 従来汎用されてきた Clomiphene に

代わり, Bromocriptine 療法が第一選択の排卵誘発療法と成り得ることが考えられる.

### 5. 不妊外来の統計

服部政博・今西克彦・松本光之  
斉藤美和 (清水市立病院産婦)

清水市立病院は, 平成元年 5 月より旧病院より移転し, 以前の 2 倍の規模の 500 床の病院となった. 産婦人科外来患者は, 1 日平均 83.7 名, うち不妊症患者は 9.2 名であった. 平成元年 4 月より平成 3 年 3 月まで 2 年間の不妊症患者は, 174 名で, うち原発性不妊は 104 名 (59.8 %), 続発性不妊は 70 名 (40.2 %) であった. 年齢は 22 歳から 43 歳まで, 平均 30.2 歳で, 不妊期間は 1 年から 14 年まで, 平均 3.4 年であった. 原因別では, 排卵障害 39.1 %, 機能性 21.8 %, 男性因子 13.8 %, 卵管因子 11.5 %, 子宮因子 3.4 % の順となっている. 妊娠例は 72 名, 妊娠率 41.4 % で, 原発性不妊 46 名, 続発性不妊 26 名であった. 正期産は 37 名 (51.4 %), 流産 9 名 (12.5 %), 妊娠継続中 26 名 (36.1 %) となっている. 早産, 子宮外妊娠, 奇形等はなかった. 妊娠例は, 原発性不妊に多く, 排卵障害, 機能性不妊に多くみられ, 排卵を誘発, 性交タイミングの指導, 黄体期の hCG による支持が妊娠につながると考えられた.

### 6. 卵管妊娠保存療法の予後と問題点

岸川 剛・増沢利秀・馬島秀泰  
(慶応大伊勢病院産婦)

我々は子宮外妊娠に対して積極的に保存的手術療法を施行している. 外妊症例の年齢構成では 20 歳以下にも 8 % あり, 若年化の傾向がうかがえた. 経妊, 経産との関係では初回妊娠, 1 回経妊で 36 %, 未産, 1 回経産で 60 % と将来の挙児が問題になる症例が多かった. 更に高感度 HCG 測定による妊娠の早期診断, 超音波断層法, 特に経膈プローベによる検査やラパロスコプの普及により, 外妊の破裂前, 流産前の症例が増加し, またショック対策の向上, 麻酔学の進歩もあり, 外妊の死亡率が著しく減少している今日, 産婦人科医として常に妊孕性を考慮しなくてはならない時期にあると思われる. 我々の行う保存的手術療法は linear incision, salpigostomy (64.7 %) を主体とし, 術後 93.3 % に HSG で患側の疎通性が認められた. 更に 17 例の保存手術症例中, 術後のべ 10 例の子宮内妊娠を得ている. うち 2 例は手術側卵管による妊娠と確定でき, 保存手術は極めて価値のある処置と思われた.

## 7. 閉鎖的骨盤腔手術 (CPS) の経験から

可世木辰夫・可世木成明・加藤正三  
可世木公美子・松原一太・山中 桂  
(名古屋市可世木病院)

1990年12か月間に当科で施行した109症例のCPSを手術時間と外性子宮内膜症の有無とを指標に検討した。

手術時間は1時間毎に区切ると20, 60, 19, 4, 4, 2例となった。内膜症43例はR-AFS分類I, II, III, IV度で15, 4, 16, 8例となり, 超5時間内群はアルコール注入とシスト切除の1例, 筋腫1例計2例, 4時間, 5時間の5例はシスト3, 筋腫1, 癒着剥離1で, 度数が上ると時間が延びる。

内膜症無しは1時間毎に16, 38, 9, 2, 1計66例で内膜症より短時間である。2時間を超える12例では, シスト6, 開口術3, 剥離2, 外妊1である。

両群を通じて外妊は9例で, 内7例は開腹に移行し, 2例はCPSで手術を完遂した。卵管摘出は2例で他は全部核出縫合した。内1例は妊娠している。

術後最長1年5か月, 最短5か月の現在妊娠は内膜症で5例(11.6%), 非内膜症で11例(16.6%), 計16例(14.7%)であった。

腹腔内の縫合は訓練が必要である。施行上のヒントについて2・3の症例を供覧した。術終了後はダグラス腔ドレンを入れ, 抗生剤, ステロイドを使用している。

## 8. 過排卵刺激を行った原因不明不妊症についての解析

貝田清隆・鈴木真史・岡田英幹  
生田克夫・花田征治・八神喜昭  
(名古屋市大産婦)  
万歳 稔 (中日病院産婦)

原因不明不妊症11症例(平均年齢34歳, 平均不妊期間7.3年), 36周期に対して, 過排卵刺激治療を行い, その不成功例3例にIVF-ETを施行し, これら原因不明不妊症につき解析を試みた。

月経周期3~5周日から, hMG 150IUを連日投与, 主席卵胞が18mm以上となった日にHCGに切り替えた。切替時の15mm以上の卵胞数は平均2.5個であった。11周期に軽度のOHSSがみられた。1例1周期に妊娠成立した。妊娠不成功例の内3例にIVF-ETを施行した。1例は低い受精率だが妊娠が成立, 1例は着床の障害も考えられ, 1例は原因不明の受精障害が認められた。過排卵刺激治療で期待した過排卵成果が得られず, 今後刺激法に改善の余地があ

ると思われたが, 肉体的, 経済的負担がIVF-ETに比べて少なく, IVF-ETの前にまず試みる治療法と考えられた。しかしIVF-ETの結果で, 原因不明の受精障害や着床の障害も考えられた例があることから, 3周期程度にとどめるのが良いと考えられた。

## 9. 超音波多嚢胞型卵巣における内分泌学的考察

和田圭介・操 良・中川美樹  
玉舎輝彦 (岐阜大産婦)

1990年4月から1991年3月末までの不妊, 内分泌外来の患者で高プロラクチン血症, 甲状腺機能異常を除き, 経腔超音波にて多嚢胞を呈する卵巣(超音波多嚢胞型卵巣; US-PCO)を有する患者を抽出し, 主に内分泌学的な検討を行った。その結果US-PCOを示したのは26名, そのうち高T( $\geq 0.5\text{ng/ml}$ )を示したのは17名, 高LH( $\geq 8.0\text{mIU/ml}$ )は7名であった。高Tでも高LHでもないUS-PCOの患者が8名存在した。この正T, 正LH, US-PCOの群でもcontrol群に比して有意にSHBGが低く, Total T/SHBG(free androgen index; FAI)が有意に高かった。このことは卵巣の多嚢胞型の変化とアンドロゲンの関係をうかがわせるとともに, 女性の異常アンドロゲン環境を知るにはSHBGの測定も重要であると思われた。

## 10. OHSS 2症例4検体における腹水性状の検討

朝比奈俊彦・川口欽也・松山 薫  
藤城 卓・寺尾俊彦・川島吉良  
(浜松医大産婦)

腹水穿刺を施行したOHSS 2症例4検体の, 腹水と血清中の電解質, 蛋白質,  $E_2$ ,  $P_4$ , プロラクチン(PRL), CA 125値を比較検討することにより, 腹水における水分代謝を解析した。検体は, 1例は29歳のPCO患者, hMG-hCG療法後の双胎妊娠で妊娠5週3日時のもの, 3例は39歳の卵管性不妊患者, Gn-RH<sub>a</sub>-hMG-hCG-IVF-ET療法後の単胎妊娠で妊娠4週1日, 4週4日, 5週0日のものである。結果は, 腹水と血清において電解質にはほとんど差を認めなかったが, 蛋白質, PRL, CA125値は血清中において高く,  $E_2$ 値は腹水中において高い傾向がみられた。PRL値およびCA 125値は腹水・血清中ともに正常妊娠初期血清値よりも有意に高かった。血清CA 125値は利尿期に入った後も高値が持続した。以上の結果より, OHSSにおける腹水の水分代謝は, 卵胞→腹水→腹膜→血清のルートをとることが示唆された。またPRLはこれらの水の移

動制限に働いている可能性が示唆された。

### 11. 子宮内膜および初期妊娠着床部における XIII 因子産生マクロファージの局在とその意義

川口欽也・朝比奈俊彦・松山 薫

藤城 卓・寺尾俊彦・川島吉良

(浜松医大産婦)

性周期および初期妊娠時の子宮内膜における XIII A 産生組織マクロファージ (t-m $\phi$ ) の動態を免疫組織学的に明らかにし、その意義を検討することを目的とした。妊娠 5 週脱落膜および月経周期第 2, 12, 14, 19 日目の子宮内膜を酵素抗体間接法を用いて染色した。結果は増殖期から着床期に進むにつれて内膜機能層、特に上皮直下の緻密層に XIII A 産生 t-m $\phi$  の集積が著明になった。海綿層では月経周期各期を通じて疎らに存在した。妊娠初期子宮内膜では絨毛と接する脱落膜部に集積を認めた。t-m $\phi$  は増殖期には機能層に集積し間質の fibroblast の増生による内膜の肥厚に関与し、排卵期、着床期へと進むにつれて緻密層への集積が著明になり、自身は XIII A を盛んに産生分泌し、また fibroblast にシグナルを送りフィブロネクチンなどの接着性蛋白を産生分泌させたり、また血管内よりフィブリノゲンを漏出させたりすることにより受精卵の着床の場の準備をしている可能性が示唆された。

### 12. 妊娠初期における脱落膜マクロファージの免疫学的機能

水野昌彦・平尾有希恵・尾崎康彦

金原敏弘・青木耕治・八神喜昭

(名古屋大産婦)

妊娠初期脱落膜には非妊時の子宮内膜に比べ、マクロファージ (M $\phi$ ) が多数存在し、妊娠維持機構に関与していることが推測される。今回我々は、正常妊娠例 (NP) および自然流産例 (SA) より M $\phi$  を採取し、その免疫学的機能について比較検討した。

[方法] ①抗原提示機能を検討するため、monocyte を除去した妊婦単核球を responder としての MLR に M $\phi$  を添加して % reconstitution を算定した。②妊婦単核球を responder、夫単核球を stimulator としての MLR に regulator として M $\phi$  を添加して % suppression を算定した。③ PHA 刺激下における M $\phi$  の IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$  および PGE<sub>2</sub> 産生能を測定した。

[成績] ① NP の抗原提示機能は、SA に比較し低値であった。② MLR に対する % suppression は、NP : 40.5 $\pm$ 20.2 %, SA : 3.7 $\pm$ 16.3 % で、NP は SA

に比較し有意の高値であった。③ IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$  産生能では、NP は SA に比較し低値であったが、PGE<sub>2</sub> 産生能は、差がなかった。

### 13. HMG の Contamination

藤原義俱

(静岡市)

森 誠・番場公雄 (静岡大学農学部)

下垂体性性腺刺激ホルモンの HMG の中に胎盤性性腺刺激ホルモンの HCG の混入が証明された (フェルチノーム 1.3mIU/ml その他の HMG 770~2900mIU/ml)。この HMG 中にある HCG が受精・着床に如何なる影響を与えるかを検索するために ICR マウスで実験したので報告する。

3 週齢のマウスに PMSG5IU で誘起した場合、受精率は約 90 %、前核形成率は約 70 %、PMMSG5IU+HCG5IU の場合は受精率約 80 %、前核形成率 58 % と低下し、PMSG5IU+HCG0.5IU の場合は受精率・前核形成率ともに回復した。一方着床率は HMG 中の HCG の含有量の差に対して変化は認めなかった。これは 3 週齢のマウスでは子宮内環境が悪いための現象と考えられる。次に性周期が確立し子宮内環境の良い 8 週齢マウスで同様の実験の結果では、HCG の多少にかかわらず着床率には変化がなかった。この事から私達が行っている IVF を含めてホルモン療法の対象者は 3 週齢のマウスに相当し、子宮内環境が悪いために着床率が低く、今後誘発方法を改善しないかぎり、現在より妊娠率が著明に上昇させる事は困難のように思われた。

### 14. クラミジア・トラコマティスによる実験的卵管炎の検討

保條説彦・稗田茂雄・岡本俊充

大橋正宏・浅井光興・野口昌良

中西正美 (愛知医大産婦)

近年クラミジア・トラコマティス感染の既往と卵管因子による不妊との間に大きな関わりがあると言われるようになってきた。

そこで今回我々は以下の検討を行った。日本白色家兔の卵管に CT 臨床分離株 GIUR-488 を接種し、実験的卵管炎を起こし、1 週~4 週目に開腹し、組織学的、電子顕微鏡学的検討を行ったところ、感染初期 (1 週目) では急性卵管炎のみられる時期であり、走査電顕上最も組織損傷が激しかった。その後、部分的には修復機転に向かうも、無治療のまま感染が持続している状態では、卵管周囲癒着や卵管留水症が形成され、これが直接不妊の原因となり得ると思われた。

今後我々はCTの細胞障害性について、感染による直接細胞障害なのか、あるいは間接的に局所免疫によるものなのか追求して行く必要があると思われる。

#### 15. 実験的精索静脈瘤 rat の Leydig 細胞機能

泉谷正伸・田中利幸・月脚靖彦  
石川清仁・白木良一・篠田正幸  
星長清隆・名出頼男  
(藤田保健衛生大泌尿器)  
西山直樹 (名古屋記念病院泌尿器)

我々は、実験的精索静脈瘤の Leydig 細胞機能に及ぼす影響について検討した。生後8週齢の Wistar 系雄 rat を用いて左腎静脈の部分結紮、および左総腸骨静脈への側副路を切断して、術後4週目と12週目に再開腹し、左内精静脈が拡張したものについて両側精巣を摘出した。collagenase を用い精巣内容を分散し、Percoll による連続的密度勾配分離法にて Leydig 細胞を分離した。分離された Leydig 細胞を  $1 \times 10^5$  / ml に調整し hCG 100mU を加えた群と加えない群に分けて、混合ガス下に incubate し産生された testosterone を測定した。この結果から、varicocele の Leydig 細胞機能への障害が片側性病巣であっても両側に及ぶ事、また経時的に障害の程度が進む事を示唆した。

#### 16. 静岡赤十字病院における IVF-ET の現況について

染谷健一・新里康尚・清水 篤  
古川雄一・谷 道郎  
(静岡赤十字病院産婦)

静岡赤十字病院産婦人科では、H2年1月より不妊症治療に IVF-ET を導入している。地方市中病院での限られたスタッフ・設備の中で施行した37例61周期 (H3年3月31日まで) について retrospective に解析を加えた。適応症例は、卵管性不妊症・男性不妊症・子宮内膜症・難治性不妊症であり、不妊期間は2年から14年である。

卵巣刺激法は GnRHa+HMG+HCG を用いた short protocol であり、採卵法は TV probe を使用した超音波ガイド下卵胞穿刺法としている。採卵率は 91.80% であった。

平均年齢  $33.7 \pm 4.97$  (M $\pm$ S D), 平均採卵数  $4.50 \pm 2.41$  (M $\pm$ S D), 平均 E T 数  $3.57 \pm 1.80$  (M $\pm$ S D) となり、周期あたりの妊娠率は 22.95%, 患者あたりの妊娠率は 32.43%, 正常児2例分娩との結果を得ることができた。

#### 17. 高齢婦人 (40 歳以上) の IVF-ET の治療成績について

上田 真・丸山邦之・近藤正利  
(八千代病院産婦)

40歳以上婦人に対する IVF-ET の適応については、議論のあるところであり、IVF-ET の適応外とする施設も多い。当科ではこれまでに40歳以上婦人3名、14周期に卵巣刺激を行い、3周期に妊娠成立を認めたので、若干の考察を加えて報告する。

症例1は、42歳の原発不妊、卵管不妊にて IVF-ET の適応となった。1回目、2回目の周期は cancel。3回目、4回目は IVF-ET 施行するも妊娠成立せず、5回目は cancel、6回目は chemical pregnancy に終わった。7回目は現在妊娠33週継続中。

症例2は43歳の原発不妊、原因不明不妊にて IVF-ET の適応となる。1~4回目まで刺激周期は cancel。5回目は IVF-ET 施行するも妊娠成立せず、6回目妊娠成立、現在34週。

症例3は42歳、原発不妊、男性不妊にて1回目の IVF-ET 施行するも妊娠に至らなかった。(結論) cancel 率は 50% (7/14) と高かったが、刺激方法を変更することによって、良好な反応が得られれば、妊娠率は 44.4% (3/7) と良好であった。

#### 18. 体外受精後卵巣妊娠に至った症例

白木 誠・隅山充樹・服部公博  
青木豊和・吉田麻里子・吉村俊和  
神谷貴之・多田 伸・樋口泰彦  
廣田 穰・澤田富夫・河上征治  
福島 穰 (藤田保健衛生大産婦)

今回我々は、卵管通過障害と oligospermia による不妊患者に IVF-ET を施行し、子宮外妊娠の中でも珍しい卵巣妊娠を経験したので若干の考察を加えて報告する。

症例は25歳の主婦で、結婚は22歳。不妊期間1年6カ月。近医を受診し、夫の oligospermia、および腹腔鏡検査で左卵管の留水症と PFA を指摘された。coitus timing 指導後 A I H (14回) 施行するも妊娠成立せず、IVF-ET 目的に当院を受診。F S H 製剤 (フェルティノーム) による卵巣刺激を行い、12日目に経膈エコー下に10個採卵、媒精し、2日後に3個の分割受精卵を移植した。ET後14日目に尿中 HCG 50 IU 陰性で、その後は経過観察としたが、ET後26日目の12月26日左下腹部痛を主訴に来院。頻回の超音波検査、および尿中 hCG の推移で左卵巣妊娠と診断。左卵巣部分切除を施行した。妊娠

6 週までに子宮内に胎嚢が認められない場合、積極的に腹腔鏡検査等をおこない子宮外妊娠を鑑別診断すべきである。

### 19. 当教室におけるヒト受精卵凍結保存法の臨床成績

近藤育代・北川武司・那波明宏  
稲垣史郎・柴田 均・中村潔史  
成田 收 (名古屋大分院産婦)  
広岡 孝・塚原慎一郎・山口一雄  
花井一夫・浅田義正・菅沼信彦  
友田 豊 (名古屋大産婦)

(目的) 余剰受精卵の凍結保存を施行することにより、体外受精-胚移植 (IVF-ET) の妊娠成績をいかに向上させるか、その臨床成績から検討した。

(方法および対象) 当科にて受精卵凍結保存を開始した平成 2 年 1 月より平成 3 年 4 月までの IVF-ET 刺激周期 183 について臨床成績と受精卵凍結保存の実施状況、また同期間中の融解移植周期 28 例の臨床成績を調べた。(結果) 刺激周期 183 中胚移植は 123, そのうち 55 周期 (胚移植中 44.7%) に受精卵凍結保存を施行した。しかし、55 周期のうち 23 周期に妊娠成立し、流産例などを加えて、37 周期の凍結受精卵 (胚移植中 30.1%, 凍結保存中 67.3%) が、今後、融解移植に供されることになった。融解移植施行 28 例中 9 例 (32.1%) に妊娠成立、3 例流産、1 例新生児死亡 (前置胎盤) となったが、2 例生産、3 例の経過良好を得た。(考察) 患者の負担なく 2 度目の機会を得、ある程度の結果を得られたことから、IVF-ET にとって重要な補助手段と言えた。

### 第 104 回 日本不妊学会関東地方会

日 時: 平成 3 年 6 月 8 日 (土) 午後 2 時～6 時  
場 所: 新潟大学医学部有壬会館 2 階大会議室

### 1. 子宮内病変に対する YAG レーザー治療の不妊領域への応用

斉藤寿一郎・堀越裕史・栗林 靖  
大野祐子・渡辺研一・近藤俊彦  
石塚文平・浜田 宏  
(聖マリアンナ医大産婦)

子宮鏡下で使用可能な YAG レーザーを用い、不妊症患者に経腔的に子宮内病変の治療をした後、妊娠が成立した症例を報告する。

方法は、フレキシブルヒステロファイバースコープの処置孔より YAG レーザーのペアエンドファイバーを挿入し、子宮腔内でのレーザー照射のフレキ

シビリティーを確保し施行した。

症例 1 は、32 歳の経産婦。外来での子宮鏡で子宮腔癒着と診断。子宮腔癒着を剥離を目的として本法を実施した。手術後 1 カ月の外来での子宮鏡は、子宮腔癒着を認めなかった。術後、月経 4 周期目に妊娠を確認し、妊娠経過も順調で自然分娩した。

症例 2 は、34 歳、未妊未産婦。30 歳時に体部子宮筋腫核出術を行っている。子宮鏡で子宮後壁の粘膜下筋腫と診断。本法の治療を行った。術後、月経 2 周期目に妊娠を確認した。

以上より、不妊症患者に、積極的な子宮内病変の検索を行い、病変に対し、子宮鏡下に YAG レーザー治療を行う事は、有用と考える。

### 2. 腹腔鏡による不妊原因の検討

源川雄介 (木戸病院産婦)  
荒川 修 (立川総合病院産婦)  
谷 啓光・田中憲一 (新潟大産婦)

当院において、平成元年 1 月より平成 3 年 5 月までの間に腹腔鏡を施行した不妊患者 65 例について検討を加え、下記の結果を得た。

1. 卵管疎通性は HSG と腹腔鏡で一致しないことが多く、両側の一致率は 58.7% であった。
2. 原因不明不妊 17 例中、15 例 (88%) に腹腔鏡における異常所見を認めた。
3. 腹膜因子は腹腔鏡以外での診断は困難であるが、腹腔鏡施行例では、腹膜因子を多く認める。
4. クラミジア抗体陽性患者の 82% に何らかの卵管通過障害、PID を認めた。
5. 治療が長期化する不妊症に対して、腹腔鏡は有効な検査・治療方法であり、治療方針を立てる上で極めて重要な検査方法である。

### 3. 腹腔鏡施行後妊娠例のラパロ所見について

荒川 修・星野明生 (立川総合病院産婦)

今回、我々は立川総合病院において、昭和 62 年 10 月から平成 2 年 6 月までに施行された 90 例中、予後調査可能であった 81 例について検討した。

- 1) 腹腔鏡施行後の妊娠率は 27 / 81 例 (33%) であった。
- 2) 妊娠例、非妊娠例の患者背景に有意差はなかった。
- 3) 腹腔鏡検査後の妊娠例には卵巣因子の例が 7 / 27 例と比較的多くみられた。
- 4) 非妊娠例では 26 / 54 例 (48%) に卵管の異常が確認された。
- 5) 子宮内膜症の重症度に関係なく妊娠例が確認さ

れた。

6) 早期に腹腔鏡検査を受けた患者に妊娠率が高い傾向がみられた。

7) 腹腔鏡後、自然妊娠が40%にみられ、6カ月以内に14/27例が妊娠し、22/27例は経過順調であった。

#### 4. Endometriosis early stage における CA125 の分析

横川智之・中條 潤

(社会保険桜ヶ丘総合病院産婦)

楠原浩二・松本和紀・川勝雅秀

後藤 誠・寺島芳輝 (慈恵会医大産婦)

機能性不妊患者に月経周期7日目から14日目までの期間に腹腔鏡検査を施行し、同時に血清CA125, CA19-9を測定した。endometriosisを認めなかった8例をcontrolとし、endometriosis early stage 12例をr-AFS Scoringで分類し、control, stage I, IIの各々におけるCA125, CA19-9レベルを対比させ、これらがendometriosis early stageの診断に有用か否かを検討した。

その結果stage I, IIのCA125値はいずれも、cut off値(50U/ml)以下であったものの、nonendometriosisの値に比し、両stageとも有意に高値を示した。またCA125値10U/ml以下では、endometriosisを認めなかった。さらにCA125値とr-AFS Scoringとは、正の相関関係( $r=0.93$ )を認めた。一方CA19-9値とearly stage endometriosisとの間に相関は認められなかった。

腹腔鏡検査後endometriosis症例全例にGn-RHaまたはDanazol療法を行い、うち排卵刺激周期に行ったAIHで4例が妊娠した。

#### 5. 子宮内膜症とNK活性

石川尚顕・今泉英司・平田純子

菊池義公・永田一郎 (防衛医大産婦)

子宮内膜症と免疫異常は不妊症も含めて議論されている。今回われわれは、子宮内膜症の末梢血Natural Killer (以下NKと略す)細胞のsubsetおよび子宮内膜症がNK活性に及ぼす影響を検討したので報告する。

(方法) 子宮内膜症と子宮筋腫それぞれ10例に対して、術前・術後の末梢血NK細胞のsubsetをTwo color法により分析した。一方、子宮内膜症病巣の培養上清を用いて、 $^{51}\text{Cr}$ -release-assay法により、NK活性を測定した。

(結果) ①子宮内膜症症例の術前では中等度に分化し

たNK細胞(CD57<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>)が有意に低値を示したが、術後子宮筋腫症例のレベルに回復した。②子宮内膜および子宮内膜症病巣の培養上清は、共にNK活性を抑制したが、抑制作用は子宮内膜症病巣により強く見られた。

(結論) 子宮内膜症病巣がNK活性抑制物質を産生している可能性、およびその物質が末梢血NK細胞の分化に影響を与えている可能性が示唆された。

#### 6. マウスの加齢に伴う多精子受精卵の出現頻度の変動

新村末雄・四谷伊公子・石田一夫

(新潟大農)

30日齢、60ないし90日齢および180ないし210日齢のICRマウスについて、多精子受精卵の出現頻度が動物の加齢に伴って変動するかどうかを調べた。

体内受精における多精子卵の割合は、30日齢、60ないし90日齢および180ないし210日齢の動物で、それぞれ14.9%, 1.2%および1.5%で、30日齢の動物における値は、60ないし210日齢の動物における値に比べ有意に高かった。また、30日齢の動物では補足精子を持つ多精子受精卵が0.8%観察された。一方、体外受精における多精子受精卵の割合は、それぞれの日齢の動物で18.3%, 4.5%および3.3%で、30日齢の動物における値は、60ないし210日齢の動物における値に比べ有意に高かった。また、いずれの日齢のものにも補足精子を持つ多精子受精卵が少数観察された。

#### 7. マウス卵子の成熟過程におけるc-mos遺伝子の関与

小瀬村伊久美・横田秀夫・佐藤嘉兵

(日本大農獣医学部動物細胞学)

c-mos遺伝子は体細胞組織ではほとんど発現されていない。最近、その産物が卵子成熟過程に特異的に合成され成熟卵子を分裂中期で止めることがアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた実験系で明らかにされてきた。本実験ではマウス卵子の成熟過程におけるc-mos遺伝子の発現についてin situ hybridization法を用いて検討を加えた。

ddy系雌マウスに5IUのPMSG注射し、50時間後にhCG8IUを注射して卵胞発育を刺激させた。hCG投与後3時間から7時間までの卵胞卵子を取り出して卵子の成熟ステージとc-mosRNAの発現について調べた。

結果、まずhCG投与3時間までは卵子の成熟にほとんど大きな変化は見られないが、5時間後から急

速に成熟が進行した。一方, c-mosRNA は hCG 投与 3 時間前では検出されなかったが, 投与後 0, 3 および 7 時間の卵子においてその発現が見られた。この結果はマウス卵子の成熟過程において c-mos 遺伝子が関与していることを示唆している。

#### 8. 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・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。精子注入には細胞質に注入する方法, 囲卵腔に注入する方法, 囲卵腔に注入し, 卵子細胞質に接触刺激を与える方法がある。我々は, すでに発表された結果から, 卵子への接触刺激により卵子が活性化され, 囲卵腔内の不動化精子が受精するのではないかと考えられた。そこで卵子への物理的刺激による卵子の活性化について検討を行った。過排卵処置により採取したウサギ卵子にマイクロマニピレーターを用いて各々の方法で刺激を与え, 表層顆粒の放出により, 卵子の活性化について検討した。その結果, 卵子細胞質に注入を行ったものと卵子囲卵腔に注入し卵子細胞質膜に接触刺激を与えたものでは, 表層顆粒の放出がみられ, 卵子が活性化された。このことから卵子の活性化に物理的な刺激が関与しているのではないかと考えられた。

#### 9. 精液自動分析装置による精子分析とその電顕観察

永江 毅・持田福重・向井治文  
三宅 潔・柿沼三郎・布施養慈  
佐藤なおみ・森本建五  
(帝京大溝口病院産婦)

体外受精培養液中での精子運動能の変化および先体反応の変化について検討した。

HTF-Hepes 培養液中では, ヒト精子の運動は 4-9 時間で活性化され, 精子直進性・速度・鞭毛運動・平均運動半径・頭部平均振幅などに peak が観察された。一方, 円運動精子率はこの期間に低値を示し, このことから, Hyperactivation がこの時期に生じることが考えられた。また, この傾向はヒト血清添加によっても変動しなかった。

電顕観察は各実験系列において行ったが, HTF-Hepes 培養液中で 16 時間培養した系列において先体反応開始精子が観察された。さらに 16 時間培養後ヒト血清添加では先体反応開始精子数が上昇していた。このことから, ヒト精子の先体反応は比較的ゆっく

りと進行し, Hyperactivation・Capacitation・先体反応の各変化はそれぞれ独立した生理現象と考えられた。体外受精時のヒト精子の先体反応には, 顆粒膜細胞-卵が重要と思われる。

#### 10. 当科で行った hMG-hCG 療法の検討

須藤寛人・常木郁之輔・八幡剛喜  
安達茂実 (長岡赤十字病院産婦)

1982 年 4 月より 1991 年 3 月までの当科, 不妊外来患者数は 2296 例であった。このうち, hMG-hCG 治療を行った 41 患者 (48 治療回数, 総コース 261 周期) について臨床成績を検討した。

治療例の半数は重症 PCO 型症例であった。妊娠率は対治療回数で 64.6%, 分娩率は対患者で 56.1% であった。多胎妊娠率は対分娩数で 16.0% で, OHSS 発生率は対治療回数で 39.6% であった。

非妊娠群 (17 人) は妊娠群 (24 人, 31 回妊娠) に比し, 不妊期間が約 2 年程長く, 本法治療開始年齢が約 1 歳高く, 原発性不妊症例の多いことが示された。

非妊娠群には高プロラクチン血症例, 内性器異常症例, 男性因子例が多く含まれていた。非妊娠群の排卵率は 54.7% で妊娠群の 86.0% より有意に低率であった。

妊娠に至ったものの平均は 4 コースであり, 5 コース目までに 80% が妊娠した。

既往に卵巣楔状切除術を受けた患者で, 本治療により OHSS となり第 9 コース目以降に排卵は導かれず, 早発閉経が確認された 1 例, および, 四胎妊娠となったが減胎術を受け双胎を分娩した 1 例を問題例として述べた。

#### 11. 当科における 2 年間の Percoll-AIH 症例の検討

加藤龍太・大内秀高 (済生会川口総合病院)  
本多 晃・西村紀夫・永松幹一郎  
(中央総合病院産婦)  
宮崎千恵子 (県立加茂病院)  
丸山晋司 (県立六日町病院産婦)

原発性不妊症 38 例, 続発性不妊症 17 例の計 55 例, 235 周期に対して, 単層 20% Percoll 精子洗浄濃縮法による人工授精を行った。12 例で妊娠が成立し, 妊娠率は対症例で 21.8%, 対周期で 5.1% であった。1 例が 5 週流産した他, 11 例は分娩例も含め経過順調である。精子溶媒として Ham's-F10 および GPM を用いたところ, 全精子濃度では, Ham's-F10 群で 1.32 倍, GPM 群で 1.5 倍に, 運動精子濃

度では、Ham's-F10 群で 1.32 倍、GPM 群で 1.34 倍と両群とも有意に改善された。両群の改善度に有意差は認めず、精子回収率は全精子・運動精子ともに 30 % 前後であった。精子濃度  $40 \times 10^6 / \text{ml}$  以下群の検討では、全精子濃度で有意に改善されたものの、運動精子濃度では改善度に有意差を認めなかった。妊娠成立群と非成立群との間には、原精液の性状・改善度・精子回収率等で明らかな差を認めなかった。本法と卵巣刺激法との併用は、妊娠率向上の手法として有用と考えられた。

#### 12. AIH 時の Percoll 2 層法による運動精子回収に関する検討

飯田 信・岡部親宜・武内裕之  
福田 勝・高田道夫（順天堂大産婦）

（目的）当教室では、AIH に際して Percoll 2 層法により回収された運動精子を用いている。今回、Percoll 2 層法の安定性を評価する目的で Percoll 処理による運動精子回収率について検討した。

（方法）不妊夫婦男性精液 700 検体を研究の対象とした。Percoll 処理前後の精子数、精子運動率、精子前進運動性をカウントし、処理前後の運動精子数より運動精子回収率を算定した。

（結果）Percoll 処理後の精子運動率と精子前進運動性は処理前に比べ有意に向上した。運動精子回収率は 22 % で、Percoll 処理前の精子数および精子運動率は回収率は何らの影響も及ぼさなかった。

（考察および結論）Percoll 2 層法により精子の運動率および前進運動性が著明に改善されること、さらにその回収率が一定していることより、Percoll 2 層法は非常に安定した精子回収法であると考えられる。

#### 13. パーコール洗浄濃縮精子のハムスターテストによる評価

小林万利子・松尾明美・瀬戸山琢也  
中山摂子・三室卓久・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）

乏精子症が原因と考えられる不妊症例において、パーコール法を用い精子の濃縮および性状の良好な精子を分離することにより従来の人工授精より良好な妊娠率が報告されている。今回、我々は 34 症例の精液を対象に 80 % パーコール処理による精子運動率の改善の検討および精子受精能のハムスターテストによる検討を行った。この結果、パーコール法によ

り、精子濃度 3000 万 / ml 以下の精液および運動率 40 % 以下の精液において、運動率の改善を認めた。また、ハムスターテストでは、パーコール処理することにより、処理前の精子濃度、運動率にかかわらず、精子受精能の改善がみられた。以上によりパーコール法は、精子の濃縮のみならず良好な受精能を有する精子を分離することにも有効であり、乏精子症における妊娠率向上に有益であることが示唆された。

#### 14. IVF-ET 反復失敗例に対する免疫療法の試み

浅野堅策・山田 潔・谷 啓光  
長谷川功・風間芳樹・高桑好一  
金沢浩二・田中憲一（新潟大産婦）

IVF-ET の妊娠率を上げるための一つの試みとして、従来、習慣流産の治療法として施行されてきている、夫リンパ球皮内注射による免疫療法を行った。適応は、IVF-ET が適切に施行されたにもかかわらず続けて 3 回以上妊娠不成立に終わったものの中で、夫婦間リンパ球混合培養抑制活性、いわゆる遮断抗体が陰性であった症例とした。平成 2 年 4 月から 8 月までに、以上のような症例が 3 例あり、免疫療法後、遮断抗体が陽性となったことを確認してからの IVF-ET により、1 例で妊娠成立に到り、妊娠経過中も遮断抗体高値が持続、妊娠 37 週にて 3306 g の生児を得た。

IVF-ET 反復失敗例中には、着床時あるいは妊娠ごく初期の免疫の関与も推察され、今後の症例の集積、検討が望まれる。

#### 15. 男性不妊症に対する体外受精・胚移植の成績

藤巻 尚・谷 啓光・安田雅弘  
倉林 工・山崎俊彦・田中憲一  
（新潟大産婦）

今回、当科の IVF-ET における男性不妊症の治療成績を他の不妊因子と比較検討し、若干の知見を得た。当科で IVF-ET を開始した '88 年 2 月より、'90 年 9 月までの 2 年 8 カ月間に採卵術を施行した症例を対象とした。卵巣刺激法は HMG-HCG 法または GnRH-HMG-HCG 法。経膣法にて採卵した。精液は、Swim up 法、洗浄濃縮法または Percoll 法で処理し、媒精した。媒精濃度は原則として 10-50 万 / ml としたが、男性不妊症の場合は 50 万 / ml あるいはそれ以上とした。媒精 16 時間後に受精を判定し、採卵 24 から 48 時間後に胚移植した。対象症例は男性因子 100 周期およびその他 240 周期。計 340 周期。

結果、1) 男性因子の不妊期間が長く、重症例が多いと思われた。2) hMG 投与量、E 2、P 4、採卵数には差が見られなかった。3) 男性因子において受精率は低く、OR 当たりの胚移植数は有意に少なかった。4) E T 当たりの胚移植数および妊娠率に有意差は認めなかった。5) 男性因子の流産率が高い傾向にあった。

#### 16. IVF-ET にて妊娠に成功した重症乏精子症の 1 例

小林廉祐・村藤裕子・大原基弘  
鎌田周作・麻生武志

(東京医歯大産婦)

IVF-ET にて重症乏精子症の妊娠例を経験したので報告する。

症例は 27 歳の 0 妊 0 産で不妊歴は 4 年。11 月乏精子症の適応にて IVF-ET を施行した。月経周期 20 日 8 個の卵を得、分割卵 4 個を移植し、妊娠に至った。配偶者の精液原液所見は精液量 2 ml、精子濃度 40 万/ml、運動率 70 % と重度の乏精子症を示した。精子調整は通常の Swim up 法を用いず、2 回の遠沈洗浄後、混和し混濁液のまま媒精した。また、Hypoosmotic swelling test 総精子膨化率 70 %、g 型膨化率 68 % を示しており、一般の基準値を上回る成績であった。

(考察) 1) 精液中に含まれる白血球などの細胞成分が必ずしも受精の決定的な阻害因子とはならないことが示された。2) 精子受精能判定における Hypoosmotic swelling test の有用性が示唆された。3) 近年、顕微受精が検討されつつあるが、重症乏精子症例でも通常の媒性法にても妊娠しうる例があり、まず通常の IVF-ET を行ってみるべきであると考え。

#### 17. 採卵時卵胞液量、卵成熟度と卵分割との関係について

加藤晴美・三ツ矢和弘・榎本英夫  
生山 博・瀬川裕史・林 雅敏  
松永啓伸・松田隆夫・高橋一久  
矢追良正 (独協医大越谷病院産婦)

体外受精を行うに際し、HMG 投与開始まで、前周期黄体期中期より LH-RH analog 連日経鼻投与し、経腔採卵、採卵後の卵の分割を個々に観察した。卵胞が多数の場合には卵分割率が低くなる傾向を示した。卵胞の大きさに関係なく、小さい卵胞からも卵が採取され、分割に至った。分割卵の成熟度を 5 段階に分け、各段階の成熟度と分割に至った比率を見ると、I 度: 30 %、II 度: 26 %、III 度: 39 %、IV

度: 37 %、V 度: 25 % であり、III、IV 度でやや高かった。採取卵胞数と採取後 7 日目の progesteron (P) 値との相関を見ると、採取卵胞数が多い程高値であり、卵胞 1 個分の P 値を換算すると 14.41 ng/ml であった。もちろん主席卵胞が成熟に至ってからの採卵の場合に限られる。採卵後 7 日でのステロイド値は、卵胞数、卵胞液量と並行し、従って卵胞数の多いものでは過剰刺激反応が発生する可能性が高い。妊娠維持に係わる卵のクオリティーに関しては今後更に検討して行きたい。

#### 18. 余剰卵子を用いた受精試験による GIFT 法の予後判定について

久保春海・安部祐司・白井 彰  
雀部 豊・矢野義明・森田峰人  
小島栄吉・片山 進・百瀬和夫

(東邦大第 1 産婦)

GIFT 施行時の余剰卵子を用いて IVF を行い、GIFT 法の予後を診断したり、受精卵を次回以降の周期に有効利用しようとする試みがなされている (Fishel et al., 1987; Quigley et al., 1987; Abdalla et al. 1988, 1989)。しかし、GIFT 法の予後を反映し得るかどうかに関しては疑問を投げかける研究者も多い (Mason et al., 1987; McKenna et al., 1988; Wong et al., 1988)。

当科では従来より不妊症検査の一環として、内視鏡施行時に採卵を行い、直接受精能試験 (DIVFA) を実施している。近年、GnRH アナログを用いた卵胞刺激法が確立され、多数の成熟卵子が安定して得られるようになり、GIFT や IVF-ET の成績も格段に向上した。

今回、GIFT 時の余剰卵子を用いて DIVFA を行い、その受精率が GIFT の予後を反映しているかどうかを検討した。その結果、受精能テストは感度 90 %、特異性 89.5 %、PPV 81.8 %、NPV 94.4 % と受精率 50 % を境界に妊娠予測が可能であることが判明した。

#### 19. Karyotype 46XY の原発性無月経の 1 例

家老仁郎・竹下茂樹・土橋一慶  
森 宏之・竹内正七・荒井 清

(帝京大産婦)

今回我々は、無月経、陰毛欠如を主訴として来院し、染色体検査で Karyotype 46XY を示した症例を経験した。外見は女性で乳房発育は Tanner 分類 III 度、外陰は女性型で陰毛が欠如しており、膣は盲端に終わっていた。LH-RH テストでは FSH の基礎

値が高く、LH、FSHとも過剰反応を示した。HCG負荷試験ではE<sub>1</sub>、テストステロンの上昇が認められた。超音波検査、腹部CT、腹腔鏡で子宮は存在せず、左右に母指頭大の性腺を認めた。R1881を用いたAndrogen receptor assayにおいて、患者外陰部皮膚のアンドロゲンレセプターは陰性であった。今回の症例は、LH基礎値が正常で、血中テストステロンが正常女性範囲である特徴を持つAndrogen insensitivity syndromeであった。

## 20. 抗癌剤によると思われる一過性卵巣性無月経の2例

長田久文・木村昭裕・小野瀬亮  
菊地紫津子（横浜市立市民病院）

婦人科領域で妊孕性をもった女性に抗癌剤を投与しなければならない時があり、そのため一時的にでも排卵障害を起こし、診療上、苦慮することがある。今回そのような2例を経験したので報告する。

症例1は臨床的絨毛癌で、1回経産の30歳の主婦。MTX+ACD+Etoposideを計7クール投与した。7クール時のLH、FSHはFSHを主とするhypergonadismを呈し、E<sub>2</sub>やProgesteroneは低値でE<sub>2</sub>は10.0pg/ml以下の値であった。7クール終了時のgonadotropin pulsatile分泌をみると、FSH、LHとも高値持続でpulsatile secretionはみられなかった。7クール終了後約3か月で排卵周期は回復した。

症例2は25歳の主婦で両側卵巣腫瘍で右付属器摘出と左卵巣腫瘍核出術を行い、病理が奇形腫悪性境界型で、術後CAP2クールを行った。CAP終了直後のLH-RH testで症例1と同様hypergonadism, hypogonadalであった。またLH pulseもなかった。CAP終了3か月位で排卵周期は回復した。

## 21. 排卵誘発後の卵胞残存に対するBuserelin投与の臨床的効果について

飯野好明・竹田 省・高田真一  
関 博之・木下勝之・坂元正一  
（埼玉医科大学総合医療センター産婦）

HCG投与後に排卵しない卵胞が次周期まで残存し、新たに発育した卵胞との鑑別が困難であったり、卵のqualityや受精着床などにも悪影響を与える可能性がある。このような症例に対しBuserelinの有効性が示唆された。

対象は当科でHMG-HCG療法を施行した不妊症患者12例、39周期、このうち17周期に残存卵胞が認められBuserelinを投与した。

HMG-HCG療法後の残存卵胞は56.4%に認めら

れ、OHSSの発症後と関連していた。卵胞残存時は非卵胞残存時に比し、血中E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>が高値、Pは有意に高値を示した。残存卵胞症例にBuserelin 900-1200 µg/day投与すると、76.5%は3週間以内に消失し、E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、Pは有意に低下した。Buserelin投与後HMG-HCG療法により4例(23.5%)に妊娠を認めた。

HMG投与を開始する場合必ず超音波で残存卵胞を確認し、残存する場合Buserelinを投与し、残存卵胞を消失させ、ホルモン環境を改善することが示唆された。

## 22. TRH負荷試験正常反応群と過剰反応群における黄体機能の比較

安藤一道・山田清彦・道下正彦  
水沼英樹・長谷川喜久・伊吹令人  
（群馬大産婦）

自然排卵周期を有し乳漏を認めない正PRL血症性不妊婦人77例に対してTRH(500µg)負荷試験を実施し、正常反応群と過剰反応群の黄体機能を比較検討した。無治療で妊娠した13例のTRH負荷試験結果より、最大PRL値 $\geq 85$ ng/mlまたは $\Delta$ PRL値 $\geq 11.3$ を示す症例を過剰反応群(n=46)、これら未満を正常反応群(n=31)とした。子宮内膜日付診断で内膜異常と診断された症例は正常反応群で12例、過剰反応群で8例と異常内膜の頻度は全く同じであった。また過剰反応群で正常内膜例(n=23)は、正常反応群で正常内膜例(n=34)と比較し、黄体期血中progesterone(P)・estradiol(E2)・inhibin・P/E2 ratioに有意差を認めなかったが、過剰反応群で異常内膜例(n=8)は有意の分泌低下を認めた。以上のことから、TRH負荷試験で過剰反応を示す症例が必ずしも黄体機能異常を起こし易いとは言えず、また過剰反応群の中には黄体機能異常を示す群と全く異常を示さない群が存在することが明らかとなった。

## 23. 自宅での測定が可能な尿中LHキットの有用性の検討

綾部琢哉・林 直樹・大須賀穰  
宮内彰人・百枝幹雄・郭 宗明  
成 鑑非・堤 治・三橋直樹  
武谷雄二・水野正彦（東京大産婦）

近年の不妊症治療におけるトピックスの1つとして、排卵のタイミングをより正確に推定する方法の進歩があげられる。1つは経膈超音波法による卵胞径の計測であるが、卵胞径には個人差があり、また

連日の計測は実際には困難である。もう1つの方法はLHサージをとらえるものであり、主として尿中LH濃度を半定量するキットが開発されている。今回、ニプロ社の「エルチェック」利用できるようになった。本キットの特長は、①手技が簡単に操作手順において反応時間の制約を受けない、全所要時間が5分足らずで済む、②白いプレート面が赤紫色に発色するので判定が容易である、③結果を保存できる、ということである。今回の検討から、患者が自宅で本キットを連日用いLHサージを観察することが可能であり、本キットは排卵時刻を推定する際の補助診断法として利用し得るものであると思われた。

### 特別講演

#### 子宮内膜症と免疫

武谷雄二 (東京大産婦)

#### 第29回 日本不妊学会中国四国支部学術講演会

日時：平成3年8月3日(土)

会場：宇部全日空ホテル

#### 1. 停留精巣における合併症および精巣上体の異常

鎌田清治・植野卓也・石津和彦  
馬場良和・瀧原博史・酒徳治三郎  
(山口大泌尿器)

停留精巣における合併症、特に鼠径ヘルニアと精巣上体の異常について検討した。

(対象および方法) 1968年より1990年までに当科にて精巣固定術を行った349例(右側のみ113例、左側のみ119例、両側性117例)を対象とし、鼠径ヘルニアについては記載のある147精巣、精巣上体については記載のある98精巣について検討した。精巣上体の異常はMarshall and Shermeta, 角谷らにしたがって分類した。

(結果) 鼠径ヘルニアは147精巣中74精巣(50%)に認め、合併率は腹腔内精巣100%、鼠径部停留精巣では82%、外鼠径輪および高位陰嚢部20%、移動性14%と停留部位が高位になるほど高くなる傾向にあった。精巣上体については98精巣中17精巣(17%)に異常を認め、うち体部遊離9精巣(53%)、尾部延長5精巣(29%)、体尾部遊離3精巣(18%)であり、左9例、右2例、両側3例と左に多かった。精巣上体異常の合併率は腹腔内精巣50%、鼠径部停留精巣30%、外鼠径輪および高位陰嚢部12.5%、移動性2.5%と停留部位が高位になるほど高くなる

傾向にあった。また7精巣(41%)では精巣上体の異常とともにヘルニアの合併をみた。

(結語) 精巣上体異常は停留部位が高位になるほど発生頻度が高かったことより、停留精巣の成因に精巣上体異常が関与していることが示唆された。

#### 2. 顕微鏡下精巣上体精管吻合術で妊娠成立を見た閉塞性無精子症の1例

河原弘之・田中啓幹  
(川崎医大泌尿器)

閉塞性無精子症は、男子不妊症の5~10%を占めるにすぎない。しかし、精巣の造精機能は保たれており、手術的に治療可能な本疾患は男子不妊症のなかで重要な疾患といえる。今回我々は、Silverのspecific tubule法に準じ妊娠の成立を見た1例を経験したので報告する。

患者：32歳、会社員。主訴：育児希望、家族歴：配偶者は24歳、婦人科的正常。既往歴：特記すべき事なし。現病歴：不妊期間1年にて近医産婦人科受診。無精子症を指摘され当科紹介受診した。現症：陰茎・陰嚢に異常なく、精巣容量は右22ml、左18ml、両側精管は触知した。検査成績：精液検査；無精子症。ホルモン検査；LH 2.3mIU/ml、FSH 9.4mIU/ml、T 4.5ng/ml、精子不動化抗体・精子凝集抗体；陰性であった。以上より閉塞性無精子症と診断し、3月15日、顕微鏡下に精巣上体精管吻合術を行った。方法は、精巣上体管のうち最後まで精巣上体管液の流出する唯一の管を同定し、精管断端と端端吻合した。しかし、術後精子の出現は見られず、7カ月経過しても同様の結果であった。同年12月18日再手術施行。右側精巣上体管は、拡張の見られた1本のみを切開し、精管と側側吻合した。術後、1カ月目に妊娠反応が認められ、現在妊娠7カ月目である。術後、精液検査に来院していないが、現在連絡を取り検査予定である。若干の文献的考察を加え報告する。

#### 3. 特発性男子不妊症患者に対する人參養榮湯の使用経験(第1報)

志田原浩二・小沢英夫・山根 享  
大枝忠史・大森弘之(岡山大泌尿器)  
大橋輝久 (岡山赤十字病院泌尿器)

我々は人參養榮湯の有用性および安全性を、本剤とカルナクリンとのクロスオーバースタディで検討中である。今回その第1報として、精子濃度 $10\sim40\times 10^6/\text{ml}$ 、運動率50%未満の乏精子症症例7例について検討した。人參養榮湯は1日9.0g、カルナクリ

ンは1日300IUをそれぞれ12週投与し、薬剤投与前後の精液所見を比較検討し、有効の時は、4週の休薬後同じ薬剤を連続投与し、無効の時は、もう一方の薬剤に切り替えた。

人参養栄湯投与は5例（初回：3例、カルナクリンより変更：2例）であり、改善度に関し、精子濃度は不変3例、悪化2例であった。一方、運動率は著明改善2例、改善2例、不変1例であった。全般改善度は改善1例、やや改善3例、悪化1例であった。

カルナクリン投与は7例（初回：4例、人参養栄湯より変更：3例）であり、精子濃度は著明改善1例、不変5例、悪化1例であった。運動率は著明改善2例、改善1例、不変2例、悪化2例であった。全般改善度は改善3例、やや改善1例、不変1例、悪化2例であった。

両薬剤とも妊娠成立例はなかった。また、重篤な副作用もみられなかった。

以上より症例数は少ないが、乏精子症の治療薬としての可能性が示唆され、今後更に詳細な検討を加える予定である。

#### 4. 前立腺機能とCELL SOFT SYSTEM

##### による精子運動能の解析

##### 第2報(各種パラメーターと精漿成分の関連)

安元章浩・吉田裕之・空本慎慈

杉元幹史・藤田 潔・竹中生昌

(香川医大泌尿器)

(目的と方法)精子の運動と精漿中成分との関連について調べるため、今回私達は54例の成人男子(平均年齢:29.5歳)を対象とし、用手的に採取された精液54検体を用い、前立腺機能を反映する精漿中物質として酸性フォスファターゼ、クエン酸、スベルミジン、スベルミン、亜鉛などの精漿中濃度を測定し、Cell soft systemにより精子運動能として濃度(CONC)、運動率(MOT)、速度(VEL)、直線性(LIN)、精子頭部の振幅の最大値(maxALH)、精子頭部の振幅の平均値(meanALH)、精子頭部の拍動回数(BCF)を測定し、前立腺機能と精子運動能との関係を検討した。

(成績)①精漿中濃度は、酸性フォスファターゼ  $714.7 \pm 422.4$ 、クエン酸  $5.9 \pm 2.4$ 、スベルミジン  $124.2 \pm 70.8$ 、スベルミン  $165.5 \pm 102.3$ 、亜鉛  $2736.4 \pm 2365.6$  であった。

②精漿中、酸性フォスファターゼ、クエン酸、スベルミジン、スベルミン、亜鉛は総てお互いに正の相関が見られた。③酸性フォスファターゼとBCFは

負の相関が見られた。④クエン酸、スベルミジン、スベルミンとConcentrationには正の相関が見られた。

(考案)以上の結果より酸性フォスファターゼ、亜鉛、クエン酸、スベルミジン、スベルミンに代表される前立腺機能とCONCに代表される精漿での造精と精子運動性の3者はやはりお互いに関連していると考えられた。

#### 5. Motility Analyzer HT-M2030 による

##### 精子運動能解析の成績

##### —正常男子での rapid motile cells について—

熊谷正俊・上田克憲・新甲 靖

竹中雅昭・大浜紘三 (広島大産婦)

己斐秀豊

(己斐産婦)

我々は、不妊症の夫を対象とした精子運動能解析の結果、rapid motile cellsの比率(%RMC)が精子受精能を最も良好に反映するパラメーターであり、これが20%未満の症例ではハムスターテストでの精子侵入率が低く、IVFでの受精率も著しく不良であることを報告した。そこで今回、精子受精能における%RMCの判定基準の設定を目的として、妊娠性のある男性での%RMCを検討した。

AIDの精子提供者16名を対象として、1名あたり2~8回、合計55回の精子運動能解析をMotility Analyzer HT-M2030を用いて行った。%RMCは、 $35\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上のpath velocity示す高速運動精子が観察精子(運動精子+非運動精子)中に占める比率とした。その結果、%RMCの分布は30未満が1例、30~40が3例、40~50が7例、50~60が3例、60~70が2例であり、55例での平均値は $45.8 \pm 12.9$ であった。同一提供者でも、%RMCおよび運動率には検体による変動が小さくなかったが、一方、運動精子中に占めるRMCの割合は51.8から78.0%(平均67.0%)で、提供者ごとに比較的安定した値を示していた。

以上の成績より、精子受精能という点からみた%RMCの判定基準としては、20%未満の異常、20~30%を境界、30%以上を正常とするのが妥当と考えられた。また、正常男性では、運動精子中に占めるRMCの割合が一定の範囲内に分布していることが判明した。

#### 6. クラミジア感染症検索の意義

宮内文久・大塚恭一・南條和也

(愛媛労災病院産婦)

頸管炎、卵管炎からFitz-Hugh-Curtis症候群ま

で様々な病態が存在するクラミジア感染症が最近増加傾向にあることを観察したので報告する。①下腹部痛や帯下を訴えて受診した患者に microtrak 法を用いて抗原検査を行い、その頻度を 1989 年 4 月から 1991 年 3 月までの 2 年間で半年ごとの 4 期に分けて検討した。1989 年 4 月から 1991 年 3 月へと経過するにつれて、クラミジア抗原陽性率は 14.3 % (3/21 例), 18.8 % (3/16), 36.0 % (9/25), 47.6 % (20/42) と急増した。これら陽性婦人のうち未婚者の比率もこの期間に 0 %, 0 %, 22.2 % (2/9), 20.0 % (4/20) と増加した。なお、陽性例において高頻度に認められた症状は微熱 (60.0 %, 2/3), 強度の下腹部痛 (50.0 %, 4/8), 帯下の増加 (42.9 %, 12/28), 軽度の下腹部痛 (38.9 %, 21/54) で、下腹部痛と帯下の増加の両方を訴えた婦人は 13 例中 8 例 (61.5 %) が陽性であった。②挙児を希望して 1991 年 1 月から 1991 年 4 月までに新たに受診した患者 23 名にイパザイム IgA/IgG テストを行った。I g A 抗体陽性を 1 例 (4.3 %) に、I g G 抗体陽性を 5 例 (21.7 %) に認めた。

以上より、クラミジア感染症の症状の多くは軽いものの蔓延する傾向を認め、不妊症患者においても要注意であることが示唆された。

## 7. 当院不妊症外来におけるクラミジア感染症の現況

大頭敏文・平野浩紀・坂本康紀  
鎌田正晴・青野敏博

(徳島大産婦)

(目的) クラミジア感染は STD の中でも最も頻度の高い疾患であり、その後遺症として不妊を惹起することが示唆されている。そこで、当科不妊外来患者を対象に、不妊症におけるクラミジア感染の現況につき検討した。

(対象および方法) 1990 年 4 月以降、不妊外来を受診した挙児希望患者の子宮頸部よりクラミジア抗原(以下抗原)の検出を行い、同時に血中抗クラミジア抗体(以下抗体)を測定した。さらに、クラミジア感染による不妊症発症機序を明らかにする目的で、明らかな不妊原因を有する患者(両側卵管閉塞、内分泌異常、男性因子)および機能性不妊患者を選び抗体を測定した。抗原は E I A (クラミジアザイム) および蛍光抗体法 (Micro Trak) を用いて検出し、抗体測定には酵素抗体法 (イパザイム) を用いた。

(結果) 不妊患者 114 例中抗原陽性例は 2 例 (1.8 %) であったが、抗体は I g G が 53 例 (46.5 %), I g A が 35 例 (30.7 %) に陽性であった。不妊患者の抗

体陽性率は I g G, I g A ともに対照の妊婦に比し有意に ( $P < 0.01$ ) 高い頻度であった。両側卵管閉塞、男性因子における I g G 陽性率はそれぞれ 57.7 %, 50 % であり、内分泌異常 21.9 % に比し有意に ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) 高頻度であった。

(結論) 不妊患者における抗体陽性率は極めて高く、不妊症発症にクラミジア感染の関与が強く示唆される。クラミジアは卵管障害、造精機能障害を惹起し不妊をもたらすことが考えられる。

## 8. IVF, GIFT における磁気分離法を用いた EIA 法による血中 E2 測定の有用性について

蔵本武志・高崎彰久・野口博史

平塚主祐 (済生会下関総合病院産婦)

岡本尚子・藤井洋治・森岡 均

(同検査)

(目的) IVF, GIFT の採卵時期の決定には血中 E 2 モニタリングが重要である。今回我々は磁気分離固相を用いた E I A 法 (セロザイム) により血中 E 2 を測定し、その有用性を検討した。

(方法) 1. 当科不妊外来受診患者の血中 E 2 値を E I A 法および R I A 法にて測定し、両測定法の相関を検討した。また E2-EIA 法の再現性について検討した。2. IVF, GIFT 症例の血中 E2 (EIA) を妊娠例および非妊娠例について検討した。

(結果) 1. E2-EIA 法による測定範囲は、20 ~ 6000 pg/ml であり、感度、再現性ともに良好であった。測定時間は約 1 時間 20 分であった。2. 不妊症患者 15 例において E I A 法, R I A 法による血中 E 2 は良い相関を認めた。3. IVF, GIFT 症例で、妊娠例では卵胞径の増大につれ血中 E 2 は連続上昇して行き、HCG 投与日の平均 E 2 値は  $1949 \pm 1128$  pg/ml であった。一方、非妊娠例では卵胞径は増大するものの E 2 の連続上昇の認められない症例があり、それらの HCG 投与日の平均 E 2 値は  $533 \pm 239$  pg/ml と妊娠例に比し低値であった。

(結論) 1. 良好な卵を得るには血中 E 2 のモニタリングが不可欠であると思われた。2. E2-EIA 法 (セロザイム) は R I A 法に比べ、一般検査室で短時間で測定でき IVF, GIFT の HMG 投与量および採卵時期の決定に非常に有用であると思われた。

## 9. 分泌期中期における超音波子宮内膜日付診の有用性について

谷 政明・清水健治・吉田信隆  
白河一郎・多賀茂樹・片山隆章  
名越一介・野間 純・関場 香  
(岡山大産婦)

(目的) 子宮内膜超音波像は増殖期に肥厚したのち、排卵より分泌期中期にかけて筋層に接した部分から中心に向かい高輝度領域が広がる。この子宮内膜超音波像の特異的な変化により子宮内膜日付診が可能であるか否かを内膜一掻き組織診の結果との対比により検討した。

(方法) 対象は1990年10月から1991年2月までの間に当科不妊外来を受診した者のうち、連日の経腔超音波断層法により自然排卵(卵胞の消失:L0)を確認しL6~L9に内膜組織の採取を行った10例である。子宮内膜超音波像は正中矢状断面を観察し高輝度部分の評価により、内膜組織は前壁または後壁正中から一掻き掻爬にて採取し核下空胞・間質浮腫・腺上皮分化等により日付診を行った。

(成績) 今回検討した10例のうち内膜超音波像が明瞭に描出されず日付診が不可能であったものは2例であり、これらは組織学的日付診と排卵後日数は一致していた。解析可能な8例のうち3例は超音波日付診、組織学的日付診および排卵後日数の全てに一致をみた。4例は超音波日付診と組織学的日付診は一致していたが、排卵後日数とは不一致であり、診断としては正しいが内膜の成熟化が不良と考えられた。残り1例は超音波日付診のみ不一致であり明らかに誤診と考えられた。

(結論) 今回検討した10例のうち、内膜の成熟化が不良な症例をも含む7例に超音波日付診と組織学的日付診の一致を認めたことはこの超音波日付診の有用性を示唆していると考えられる。

## 10. 血中 LH, FSH, PRL の全自動測定系 IM<sub>x</sub> LH, IM<sub>x</sub> FSH, IM<sub>x</sub> PRL の有用性の検討

松崎利也・桑原 章・横山裕司  
井川 洋・斎藤誠一郎・安井敏之  
三宅敏一・苛原 稔・青野敏博  
(徳島大産婦)

酵素免疫法を原理とした血中 LH, FSH, PRL の全自動測定系 IM<sub>x</sub> LH, IM<sub>x</sub> FSH, IM<sub>x</sub> PRL の有用性につき検討を行った。測定範囲は LH 0.5~250mIU/ml, FSH 0.2~150mIU/ml, PRL 0.6~200mIU/ml

で、直線性を示す良好な標準曲線が得られた。測定内および測定間変動係数は10%以内と良好であった。IRMA 測定系であるスパック S との相関につき調べたところ、相関係数(r) 回帰式(Y) は、LH では  $r=0.98$ ,  $Y=1.13X+3.91$ , FSH では  $r=0.98$ ,  $Y=0.87X+1.44$ , PRL では  $r=0.99$ ,  $Y=1.81X+0.02$  と高い相関を示し、回帰式も原点の近くを通っていた。臨床的検討では、測定値は従来の測定系と同様の傾向を示したが、妊婦血清の測定で、スパック S-LH, FSH では測定感度以下であったのに対し、IM<sub>x</sub> では LH, FSH ともに、hCG との交差の影響を認めた。IM<sub>x</sub> は操作法が簡便で測定時間も約30~40分と短時間であり、少数の検体でも経済的に測定できるため迅速に結果が得られる。また、放射性同位元素を使用しないため被曝の危険がなく、特別な設備も必要としない。LH, FSH では現在国際的に広く用いられている下垂体性ゴナドトロピンを標準品として使用しておりRIAとのデータの比較も容易であり、有用な測定系であると思われる。なお、IM<sub>x</sub> では、PRL の標準品がスパック S-PRL と異なるため測定値の比較および高プロラクチン血症の診断に注意を要すると思われる。

## 11. 不妊を伴った子宮内膜症における rAFS 分類の有用性と限界について

高橋 彰・浮田昌彦・布谷隆明  
諏訪美鳥・赤松可得・山中研二  
井上卓也・中堀 隆・朴 由美  
(倉敷中央病院産婦)

rAFS 子宮内膜症進行期分類が不妊治療の成否と相関するか否かについて検討を行った。対象は、治療開始前に腹腔鏡あるいは開腹術にて進行期を確認した45例(I期14例, II期3例, III期6例, IV期22例)の不妊症を伴う子宮内膜症である。

各進行期の妊娠率は、I期42.9%, II期66.6%, III期66.6%, IV期50.0%と、進行期と妊娠率は必ずしも相関しなかった。また、各進行期における rAFS score も妊娠群、非妊娠群の間に有意差を認めなかった。なお、各進行期の治療法は、薬物療法、手術療法、およびその併用であるが、妊娠群、非妊娠群の間に治療法選択の差異はみられていない。

子宮内膜症の障害部位と妊娠成立との関係を進行期III期, IV期において検討したところ、ダグラス窩の閉塞の有無、その程度は妊娠の成立には無関係であり、両側チョコレート嚢腫の存在は非妊娠群でやや多くみられる傾向にあった。妊娠成立の有無に最も大きな関係を有していたのは両側性卵管癒着の有

無であり、妊娠成立例 15 例中 13 例は少なくとも一方の卵管は癒着のない状態であったが、不成立の 13 例では 7 例に両側卵管に癒着が存在していた。

以上より rAFS 分類は、意味合いの異なる障害部位の得点を単純に加算してしまうこと、障害部位の左右差を隠蔽してしまうこと、ダグラス窩閉塞に特に大きな配点がなされていることなどが妊娠成立の指標とするうえでは不十分となる原因と考えられた。

## 12. ダナゾール治療中の子宮内膜症患者における各種免疫学的因子の検討

桑原 章・横山裕司・井川 洋  
斎藤誠一郎・松崎利也・安井敏之  
三宅敏一・大頭敏文・苛原 稔  
山野修司・青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 子宮内膜症 (EM) の病態に免疫学的機序の関与が注目されている。一方、EM の治療薬であるダナゾール (DZ) には免疫系に対する作用が報告されている。そこで EM に特異的な免疫学的異常の有無と、それらに対する DZ の作用を明らかにするため、DZ 治療中の EM 患者における各種免疫学的因子の推移を検討した。

(方法) DZ 治療 (400/mg 日) を行った EM 患者 29 例に対し、DZ 治療経過に伴う血中各種免疫学的因子の推移を検討した。

(成績) 治療前では、血中 IgG、IgA および補体価は対照と差がなかったが、IgM は高値を示した (EM:  $235 \pm 98 \text{ ng/ml}$ , 対照:  $114 \pm 51 \text{ ng/ml}$ )。また血中リンパ球分画には差がなかったが、単核球分画が高値を示した (EM:  $40 \pm 12\%$ , 対照:  $13 \pm 7\%$ )。一方、各種自己抗体の陽性率は、抗核抗体 17%、ループスアンチコアグラント (LAC) 26%、カルジオリピン IgM 抗体 (CL) 34% と高率を示した。これらの DZ 治療経過による推移では、血中 IgA および単核球分画が低下する傾向にあったが、他の因子には変動を認めなかった。さらに、治療終了後の LAC および CL の陽性率はそれぞれ 13%、0% と著明に低下した。

(考察) EM の病態においては自己免疫疾患の免疫異常の存在が考えられ、DZ 療法によりそのような免疫異常状態が改善される可能性が示唆された。

## 13. 不妊症腹水のヒト精子運動への影響

武田康成・中橋徳文・北川博之  
松浦俊平 (愛媛大産婦)  
杉並 洋 (国立京都病院)

(目的) 精子 hyperactivation (HA) は卵透明帯貫通に

必要な精子運動能の変化といわれている。一方、子宮内膜症不妊患者腹水がヒト精子に悪影響を与え不妊を惹起すると報告されている。今回、腹水の精子の HA 惹起に及ぼす影響について検討した。

(方法) 不妊精査で腹腔鏡を行った際に採取した腹水 (正常骨盤 5 例、子宮内膜症 5 例) を cell-free にして実験に用いた。妊娠歴を有し妊孕能が正常と考えられる精液を実験に供した。液化した精液を Ham's F-10 にて 1 回洗浄し、10% 腹水添加 Ham's F-10 に入れ、 $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  in air 環境下で培養した。精子運動性は Motility Analyzer HTM-2030 にて経時的に分析した。HA 精子は、①運動速度  $\geq 100 \mu/\text{秒}$ 、②直進性  $\leq 65\%$ 、③頭部振幅  $\geq 7.5 \mu$  の基準を満たすものとした。

(成績) 培養 5 時間後の運動精子中の HA 精子の割合は、腹水非添加群: 30.5%、正常骨盤腹水群: 25.9%、子宮内膜症腹水群: 3.8% で子宮内膜症腹水群で有意に低値を示した。しかし、運動精子数の変化は 3 群間で有意差はなかった。

(結論) 子宮内膜症腹水中には、HA 惹起を阻害する因子があることが示唆された。

## 14. 原因不明不妊症例における腹腔鏡検査所見の解析

蓮佛千恵子・見尾保幸・高尾成久  
池成孝昭・関島秋男・岩部富夫  
大野原良昌・谷川正浩・寺戸博文  
原田 省・寺川直樹 (鳥取大産婦)

(目的) 不妊原因の究明のため施行した腹腔鏡検査所見から、不妊症と子宮内膜症の関連を検討した。

(方法) 1989 年 1 月より 1990 年 12 月までに診断学的腹腔鏡検査を施行した 92 症例の不妊症患者を対象とした。腹腔鏡施行時期は卵胞期前期とし、全麻下に 2 孔式腹腔鏡を用いて骨盤内を観察した。子宮内膜症の診断は r-AFS 分類に基づき、必要に応じて electrocautery による治療も行った。また、dye test も全例に施行した。

(成績) 対象症例の平均年齢は 32.6 (24-44) 歳で、子宮内膜症は 50 症例 (54%) に認められた。また、原因不明不妊 31 症例のうち、20 例 (64.5%) に子宮内膜症が存在した。このうち 16 症例 (80%) は、軽度子宮内膜症 (stage 1, 2) であった。

(結論) 不妊症における子宮内膜症の関与は極めて重大であり、特に、原因不明不妊と軽度子宮内膜症との強い関連が確認され、原因不明不妊症に対する腹腔鏡検査の意義が再確認された。

### 15. 子宮内膜症腹腔鏡下治療におけるCO<sub>2</sub>レーザーの使用経験

中橋徳文・北川博之・武田康成  
松浦俊平 (愛媛大産婦)  
杉並 洋 (国立京都病院)

近年、腹腔鏡の普及に伴い子宮内膜症は腹腔鏡での診断およびStagingがなされている。また、腹腔鏡施行時に子宮内膜症病巣焼灼を行うことにより妊孕性が向上するともわかってきた。我々は、子宮内膜症を疑う不妊患者に積極的に腹腔鏡検査を施行し子宮内膜症患者には、同時にその焼灼治療を行っている。治療機器として、従来高周波電気凝固およびNd-YAGレーザーを使用していたが、今回Flexible fiber CO<sub>2</sub>レーザーを使用する機会を得、子宮内膜症患者の病巣焼灼に使用し、有用な手段と思われたので報告する。

(方法および機器)腹腔鏡施行時に第2穿刺部位よりファイバーを腹腔内に挿入し、先端を病巣より数mmの距離におきレーザー照射を行った。器械は持田製MEDILASER-10Sを10w 0.5sec pulseにて使用した。子宮内膜症病巣はblue berry spots, ecchymosis, 等と称される着色性病変と、translucent raising spots等の非着色性病変がある。病巣焼灼を行う場合、機器により焼灼の程度に差異がある。高周波電気凝固では、焼灼範囲が不均一な場合があり周辺臓器に対する影響が危惧される。Nd-YAGレーザーでは焼灼範囲設定は容易であるが、レーザー光が非着色物に吸収されにくいために非着色性病変の焼灼に困難を感じていた。一方CO<sub>2</sub>レーザー光は水分に吸収されるため、着色の有無に左右されず、非着色病変も容易に蒸散が可能であった。CO<sub>2</sub>レーザー光は光ファイバーに吸収されるため従来は反射鏡を内蔵した多関節アームが使用されていたが、CO<sub>2</sub>ファイバーの開発により腹腔鏡下にて容易に使用でき、腹腔鏡下治療に有用な手段と思われた。

### 16. 反復IVF-ETの成績

多賀茂樹・吉田信隆・平野由紀夫  
片山隆章・名越一介・野間 純  
清水健治・関場 香 (岡山大産婦)

(目的) IVF-ETによる治療で妊娠するためには、一般に何周期か繰返し治療を行うことが必要になるが、妊娠しない場合、何回まで治療を試みるべきか検討した。

(方法) 当科において現在のIVF-ETプログラムが確立した1989年1月より1990年3月までにIVF-

ETのため経腔的に採卵を1回から5回行った66症例の治療成績と採卵回数別の卵巣のhMGに対する反応性について検討した。

(結果) 66症例のうち、18症例(27%)に妊娠が成立した。妊娠した18例のうち、1回目に11例(61%)、2回目までに15例(83%)、3回目までに17例(94%)、4回目までに18例(100%)が妊娠した。1回目から5回目の採卵例の妊娠率(対採卵)はそれぞれ17%(n=66)、13%(n=31)、14%(n=14)、20%(n=5)、0%(n=3)で、いずれの間にも有意差はなかった。しかし1回目採卵後34例中3例(8.8%)が、2回目採卵後15例中1例(6.7%)が次の卵巣刺激周期で採卵中止となった。また採卵回数を重ねても、卵巣刺激法別(clomid-hMG法およびbuserelin-hMG法)のhMG投与量に有意な増加はなく、平均採卵個数にも有意な差はなかった。

(結論) IVF-ETによる初回治療で妊娠しなかった場合、次の卵巣刺激周期での採卵中止率は約10%であるが、4回目採卵までは初回と同じ妊娠率(対採卵)が期待できると考えられた。hMG所要量および採卵個数にも変化はなかった。

### 17. GnRHa-hMG-hCG法を用いた体外受精・胚移植法におけるE<sub>2</sub>初期上昇日と妊娠率との関連

南 晋・村山眞治・小林津月  
加川俊明・山野修司・青野敏博  
(徳島大産婦)

(目的) 体外受精・胚移植において、血中estradiol(E<sub>2</sub>)値が上昇を開始する日およびその日からhCGを投与するまでの日数と妊娠率との関連を、GnRHaで前処理しhMG-hCGで卵巣刺激した周期で検討した。(方法) 対象は、両側卵管閉塞のため体外受精・胚移植法を受けた症例のうちE<sub>2</sub>を連続的に測定し得た59例で、妊娠例12例と非妊娠例47例である。前周期の高温相7日目よりブセレリン600μg/日をhCG投与前日まで連日投与し、月経周期の3日目よりhMG日研225IU/日を、7日目からはヒュメゴン150IU/日の投与を行い、最大卵胞の平均径が18mmに達したら注射を中止し、最終投与から50時間後にhCG5000単位を筋注し、その36時間後に採卵した。月経周期3日目より連日採血し、E<sub>2</sub>をRIAにて測定した。E<sub>2</sub>初期上昇日は、全症例の月経周期3日目のE<sub>2</sub>のMean+2SD(170pg/ml)を超えた日とし、E<sub>2</sub>上昇日数とはE<sub>2</sub>初期上昇日からhCG投与日までとした。

(成績)①E<sub>2</sub>初期上昇日が月経周期 6～8 日目である群の妊娠率は 38.5 % (8/27)であり,月経周期 3～5 日目である群の 6.9 % (2/29) に比して有意に高かった(P<0.01). ②月経周期 3～5 日目の血清 LH, FSH 値は, 妊娠群と E<sub>2</sub>が早期に上昇した (E<sub>2</sub>初期上昇日: 3～5 日目) 非妊娠群の間に有意な差は認めなかった. ③E<sub>2</sub>上昇日数が 8 日間以上の症例では妊娠例は認められなかった.

(結果) E<sub>2</sub>初期上昇日が 6～8 日目であった場合 GnRHa を用いた卵巣刺激周期における IVF-ET の妊娠率が向上する.

#### 18. 卵巣刺激周期における内因性 LH surge 発来に及ぼす血中 progesterone の影響

原田 省・高尾成久・蓮佛千恵子  
池成孝昭・関島秋男・岩部富夫  
谷川正浩・大野原良昌・寺戸博文  
見尾保幸・寺川直樹 (鳥取大産婦)

(目的) Clomid-hMG 刺激による体外受精周期において LH surge 発来に及ぼす progesterone (P) 値の影響を, GnRH-analog+hMG 刺激周期と比較することにより検討した.

(方法) 当科で 1989 年 1 月から 1990 年 2 月までに Clomid-hMG 刺激を行った 87 周期および GnRH-analog+hMG を行った 22 周期, 計 109 周期を対象とした. 血中ホルモン測定は E<sub>2</sub>, P, LH を月経第 3 周日より隔日, 第 9 周日より連日 12 時間毎に測定した.

(結果) Clomid-hMG 周期では LH surge は 24 周期 (28 %) (surge 群) に認められ, hCG 投与は 38 周期 (44 %) (hCG 群) であり, 25 周期をキャンセルした. surge 群では, surge の開始 12 時間後に LH はピーク値をとった. hCG 群においても hCG 投与 12 時間後に LH surge が発来し 24 時間後にピーク値をとった. 一方, GnRH-a+hMG 周期 (GnRH 群) では LH surge は認められなかった. surge 群および hCG 群では LH surge 開始時の P 値は基礎値に比較し有意に高かった.

(考察) Clomid-hMG 周期では, 大部分の症例で hCG 投与前あるいは投与後に LH surge が発来し, いずれにしても LH surge の開始時に P 値の有意な上昇が認められたことより, LH surge 発来に P 値の関与が強く示唆された.

#### 19. GnRH analog 併用卵巣刺激周期における内分泌学的解析—特に卵胞期 progesterone の動態と IVF-ET 成績との関連—

見尾保幸・蓮佛千恵子・高尾成久  
関島秋男・岩部富夫・大野原良昌  
谷川正浩・寺戸博文・原田 省  
寺川直樹 (鳥取大産婦)

(目的) 我々は, IVF-ET 治療のための卵巣刺激周期において, LH 放出に起因しない血中 progesterone (P) の上昇が卵胞期に頻発することを明らかにしてきた. この卵胞期血中 P 上昇の IVF-ET 治療成績に及ぼす影響について検討した.

(対象と方法) 1989 年 5 月より 1990 年 4 月までの 1 年間に IVF-ET のために卵巣刺激を行った 191 周期を対象とした. 卵巣刺激法は, Standard regimen, GnRHa を併用した Flare regimen および Midluteal regimen である. いずれの周期でも, 月経第 3 周日より隔日または連日 12 時間おきに採血し, 血中 estradiol (E<sub>2</sub>), P, LH を測定した. 卵胞成熟を確認後, LH surge 開始後または hCG 5000iu 投与後 36 時間に採卵を施行した.

(成績) 卵胞期血中 P 上昇は, いずれの刺激法でも極めて高頻度に認められた. E<sub>2</sub> 値, 发育卵胞数は P 上昇周期で有意に増加し, 逆に, 受精率, 妊娠率は, P 上昇周期で有意に低下した. 全妊娠症例 21 例のうち, 3 症例のみが P 上昇周期で得られ, 残りの 18 症例は全て非 P 上昇周期であり, 妊娠継続例はすべて非 P 上昇周期で認められた.

(結論) 卵胞期血中 P 上昇はいずれの卵巣刺激法でも高頻度に認められ, これが IVF-ET 成績に重大な影響を及ぼすことから, 卵胞期血中 P 動態は, 妊娠予後を占う指標となり得ることが確認された.

#### 20. 妊娠成立例の不妊治療

山本順子・林 伸旨・西条仁子  
金重恵美子 (岡山中央病院産婦)

(目的) 不妊原因別にその治療法を考察することは重要であるが, 不妊原因が単一でない症例や原因不明の症例が多いことから, その臨床的検討は容易ではない. 今回妊娠成立をみた症例を男性因子があるものとないものに大別しその治療法について検討した. (方法) 1990 年 1～12 月に挙児希望で当院を受診した 591 例のうち妊娠成立をみた 114 例について精液異常 (精子濃度 2000 万/ml 未満または運動率 50 % 未満) がある 41 例と精液異常がない 73 例に分類して検討した.

(成績) 初診時年齢・不妊期間・治療期間は、それぞれ精液異常あり群:  $30.0 \pm 3.4$  歳 (mean  $\pm$  SD)  $\cdot$   $41.5 \pm 29.3$  月  $\cdot$   $16.2 \pm 15.3$  月, 精液異常なし群:  $29.2 \pm 3.9$  歳  $\cdot$   $30.6 \pm 21.5$  月  $\cdot$   $10.0 \pm 8.9$  月であった。精液以外の不妊原因は、精液異常あり群では、原因なし、または不明(51%), 排卵黄体機能障害(27%), 精液異常なし群では、原因不明(38%), 排卵黄体機能障害(36%)であった。妊娠成立周期の治療・検査は、精液異常あり群では、卵胞刺激(78%), A I H(54%), 精液異常なし群では、卵胞刺激(75%), 卵管検査(41%), A I H(23%)が比較的高頻度であった。A I Hは全体の34%と高率に施行しており、その内訳は洗浄濃縮精子液(56%), 精液原液(26%), 凍結分加・洗浄濃縮精子液(18%)であった。妊娠成立周期以外では、腹腔鏡(27%), 開腹手術(9%), 子宮内膜症薬剤治療(4%), リンパ球免疫(3%)あどであった。

(結語) 今後、長期不妊例には体外受精などによる妊娠を期待したい。

## 21. 血中 FSH 濃度のみ高値を示した gonadal dysgenesis について

森下 一・武本幹彦・青野敏博  
(徳島大産婦)

Gonadal dysgenesis の症例においては通常血中 FSH, LH 濃度は高値を、血中 estrogen 濃度は低値を示し、LHRH に対して血中 LH, FSH は過大反応を示す。今回我々は Turner 症候群において血中 F S H 濃度は高値であるが、血中 L H 濃度は正常値で、LHRH に対して FSH, LH とも過大反応を示さなかった症例を経験したので報告する。

症例は 25 歳、原発性無月経を主訴として来院、家族歴、既往歴には特記すべきことはなかった。現症では身長 135 cm、体重 44 kg、乳房、陰毛の発育は不良、大陰唇、小陰唇の発育もやや不良であった。双手診で子宮らしきものを触知したが不明瞭であった。両側卵巣は触知しなかった。超音波断層法では子宮は  $29 \times 12 \times 21$  mm で、両側卵巣は認められなかった。血中ホルモン値は FSH 35.3 mIU/ml, LH 3.8 mIU/ml で、LH の pulse 状分泌は 5 時間で 5 回認められ、estradiol 13 pg/ml, testosterone 0.3 ng/ml であった。LHRH テストでは F S H は正常、L H はやや低反応を示した。末梢血の染色体検査では 45, X/46, X, i (Xq) であった。Kaufman 療法にて血中 F S H 濃度は低下し、消退出血を認めた。

## 22. 子宮奇形に対する Jones 手術成績の AFS 分類による検討

河西邦浩・片山隆章・吉田信隆  
清水健治・関場 香(岡山大産婦)  
西条仁子・金重恵美子(岡山中央病院産婦)

(目的) 一般に Jones 手術は挙児希望を伴う子宮奇形患者に有効な治療法であると言われている。今回我々は挙児希望を伴う子宮奇形を有する患者 Jones 手術を行い、術後妊孕性への効果を検討した。

(方法) 1981 年から 1990 年までの 10 年間に Jones 手術を行った症例のうち、予後の追求が可能であった 24 例につき予後を A F S 分類により検討した。術前の子宮奇形は、A F S III (完全重複子宮) 5 例, A F S IV (単頸双角子宮) 8 例, A F S V (中隔子宮) 8 例, A F S VI (弓状子宮) 3 例であった。術前妊娠既往のあったのは 12 例、なかったのは 12 例であり、その不妊期間は 19~180 か月、平均 27.8 か月であった。

(結果) A F S III は術前の妊娠率 1/5 (20%) から術後は妊娠率 4/5 (80%) に増加し、術後の流産率も 0/4 (0%) であった。A F S IV は、妊娠率は術前 6/8 (75%), 術後 5/8 (63%) と変化がなかったが、流産率は術前の 15/16 (94%) から術後の 0/6 (0%) に減少した。A F S V は、妊娠率は術前の 3/8 (38%) から術後は 6/8 (75%) と増加し、流産率は術前の 5/5 (100%) から術後の 2/8 (25%) に減少した。A F S VI の 3 例は、術前術後とも不妊、子宮外妊娠、流産により生児を得られなかった。生児を得たのは 12 例であり、在胎週数は 36~40 週、出生時体重は平均 3011 g であった。

(結論) Jones 手術により、A F S III は妊娠率の向上、A F S IV は流産率の減少、A F S V は妊娠率の向上および流産率の減少が認められ、妊孕性の向上に有効な治療法であると考えられた。

## 23. 当科不妊外来で経験した早発卵巣不全 (POF) の 4 症例

石松正也・中村康彦・手山知行  
田村晴代・加藤 紘(山口大産婦)

P O F は、不妊症・内分泌分野において最も治療に苦慮する疾患の一つである。今回は、P O F と診断された治療を行った 4 症例につき報告する。4 症例中 2 例は挙児希望、残り 2 例は無月経を主訴とし当科不妊内分泌外来を受診した。全例第 II 度無月経であり、ゴナドトロピン値は高値を、エストラダイオール値は低値を示した。未婚の無月経症例は、染

色体 G-band の検索の結果ターナー症候群のモザイクであることが判明した。カウフマン療法の後 HMG 刺激を行ったが卵巣の反応はみられず、現在カウフマン療法中である。その他 3 症例は染色体異常を認めず、カウフマン療法を 3 周期繰り返した後 HMG 刺激を行ったが卵巣の反応性はみられなかった。POF 発症因子の一つとして卵巣に対する自己抗体の報告がある。そこでこれら 3 症例につき各種自己抗体の測定を行った。その結果 1 例でサイロイドテスト、マイクロソームテストが陽性であった。この症例は、T<sub>4</sub> 補充療法を行った結果、卵巣の自然発育を認め自然排卵には至らなかったものの hCG にて黄体期に移行させることが出来た。他の 2 症例についてはカウフマン療法、プセリリン+HMG 律動的投与にもかかわらず、卵巣発育には成功しえなかった。POF は我々臨床医にとって治療に苦慮する疾患である。特に患者が育児希望の場合は、その感が強い。今後更にいろいろな可能性を模索しながら検討を重ねたい。

#### 24. 習慣性流産に対する夫リンパ球免疫療法

北川博之・中橋徳文・武田康成

矢野樹理・松浦俊平 (愛媛大産婦)

これまでに原因不明の習慣性流産患者においては HLA-DR locus の夫婦間の一致率が有意に高く、習慣性流産の原因の 1 つとして alloimmune mechanism が関与していることを報告してきた。今回これらの患者に対して夫リンパ球を用いての免疫療法を施行し、良好な成績を得たので報告する。

(方法) 対象は 3 回以上の自然流産の既往を有し、かつ原則的に HLA Dr Locus で 1 個以上の一致が認められる症例とした。夫より 30ml へパリン加採血し、濃度勾配遠心法により単核球の分離。生理食塩水により 4 回の洗浄後 0.75ml の生理食塩水に混濁。前腕 3 カ所に 0.25ml の皮内注射。上記免疫療法を妊娠前に 4～5 回、妊娠後に追加免疫を 2 回施行した。

(成績) これまでに 19 症例に対して夫リンパ球免疫療法を施行し、14 症例に妊娠の成立を認めた。5 症例が分娩 (1 症例のみが胎児仮死により帝王切開)、6 症例が妊娠の継続中、3 症例が自然流産であり、妊娠継続例を含めて 11/14 (79%) の成功率であった。また夫リンパ球免疫療法後に間接クームス試験、抗核抗体などが陽性化する症例は認められなかった。(考察) 夫リンパ球免疫療法成功群の既往流産歴 (3～8 回; 平均 3.8 回) を考慮すると 79% の成功率は良好な成績と考えられる。夫リンパ球免疫療法は大きな副作用も認められず、一部の習慣性流産患者に

おいて有効な治療方法であると考ええる。

#### 25. 抗精子抗体含有不妊婦人血清と反応するヒト精子抗原の純化

前田信彦・平野浩紀・森 一正

大頭敏文・鎌田正晴・青野敏博

儀間裕典・吉田 博・Samuel S. Koide

(徳島大、儀間クリニック、The Population Council, Center for Biomedical Research)

(目的) 我々は抗精子抗体の作用機序が、可逆的な先体反応の抑制による受精阻害であることを報告してきた。本研究では、より詳細な作用機構の解明を目的として抗精子抗体の対応抗原の純化を試みた。

(方法) 洗浄後凍結乾燥保存した精子を PBS 中で 4℃、30 分攪拌し上清を得た (PBSE)。以後、NaClO<sub>4</sub> (CLE), DOC (DE), SDS (SE) と順次強力な可溶化を行った。抗原の検出は抗精子抗体をもつ不妊婦人血清を用い Western blotting により行った。抗原の精製は、FPLC system (Pharmacia) および HPLC 逆相クロマトグラフィーにより行った。

(成績) 抗精子抗体含有不妊婦人血清とのみ反応する特異的抗原として、PBSE に 50KD, 33KD のバンドを、CLE に 33 KD のバンドを検出した。DE, SE および精漿中には明らかな特異的バンドは検出されなかった。そのうち今回は PBSE の 50KD, 33KD 抗原の純化に成功した。両抗原はともに ConA 非結合性で、熱 (80℃, 30 分) およびトリプシン処理 (200U) に耐性であった。まだ部分純化の過程であるが、CLE-33KD は ConA 結合性で、熱およびトリプシン処理に感受性であった。

(結論) 今回純化した抗原は、mannose および glucose を含まない糖蛋白精子抗原と考えられるが、マイルドな方法で抽出される極めて遊離しやすい精子付着抗原であり、免疫性不妊の原因解明や治療法の開発研究に応用できると思われる。

#### 26. 血中抗卵透明帯抗体の検討と IVF を施行した 1 症例について

平野浩紀・森 一正・大頭敏文

鎌田正晴・青野敏博 (徳島大産婦)

抗卵透明帯抗体による免疫性不妊症の存在は明らかであるが、発症機序等に関する十分な検討はなされていない。そこで今回、血中抗卵透明帯抗体の検出頻度、抗体陽性患者の不妊原因につき検討を加え、さらに体外受精 (IVF) を施行した抗体陽性不妊症例について報告する。

対象は昭和 57 年 1 月より平成 3 年 3 月までに当科

を受診した不妊婦人1872例である。抗卵透明帯抗体は対照群では622例中3例(0.5%)であったのに対し、不妊婦人では1872例中45例(2.4%)が陽性であり、有意に( $P < 0.01$ )高頻度であった。不妊原因としては排卵障害および原因不明不妊が多く認められた。

症例は34歳、原発性不妊(不妊期間9年4カ月)、不妊原因としては稀発排卵以外特に異常無く、血中抗卵透明帯抗体が常に陽性であった。hMG-hCG療法およびA I Hを施行するも、妊娠が成立しなかった。そこでGnRHa-hMG-hCG後I V Fを行ったが、受精率は0%(0/5)であった。血漿交換施行後、臍帯血血清を培養液に添加し再びI V Fを行ったが、受精卵は得られなかった(0% 0/8)。抗卵透明帯抗体は透明帯と反応し、受精を阻害すると考えられる。

## 27. Percoll 三層法による回収精子の受精能力に関する検討

迫田良一・高橋健太郎・吉野和男  
岡田さおり・北尾 学(島根医産婦)

Percoll 三層法により得られた各層精子ならびに、調整前精子の受精能力をHypoosmotic swelling test (HOST)により判定し、比較検討することを目的とした。

研究対象は当科不妊、内分泌外来を受診し、精液検査を施行した10例とした。Percoll 三層法の各層より得られた調整精子ならびに調整前精子において、総精子濃度、精子運動率を比較検討した。更にHOSTを施行し、total swollen sperm (HOST-T)および、g type swollen sperm (HOST-G)についても同様の検討を加えた。

結果として1) Percoll 三層法の三層目の総精子濃度は一層目、二層目に比べて有意な高値を示した。2) Percoll 三層法の三層目の精子運動率は調整前の精子、Percoll 三層法の一層目および二層目に比べて有意な高値であった。3) Percoll 三層法により回収された各層の精子HOST-Tは調整前に比べて有意な差は認められず、また各層間でも大きな差は認められなかった。HOST-Gに関しては二層目、三層目が調整前に比べて有意に上昇していた。

以上のことより、Percoll 三層法にて精子回収を行った場合、特に三層目に精子運動率の上昇が認められ、精子受精能力とよく相関するといわれるHOSTに関しても、二層目、三層目のHOST-Gは、調整前に比べて高値であり、Percoll 三層法の有用性が受精能力の面からも証明された。

## 28. 各種精子調整法の比較検討

小林正幸・嶋村勝典・伊東武久  
成松昭夫・山下三郎

(社会保険徳山中央病院)

A I H等の際し、精子を前処理して用いることは現在広く行われている。今回我々は各種処理法により精液処理を行い精子濃縮効果、運動率改善効果等につき検討を加えた。対象としたのは58症例139回分の精液である。精液はswim up, グラスウールカラム, 20%単層パーコール, 80%攪拌パーコールを用いて処理し約0.7mlに調節した。そして処理前後の精子濃度、運動率、運動精子濃度を比較した。結果は精子濃縮効果では単層パーコールが136.6%と最も良く、続いてグラスウール、攪拌パーコールの順でありswim upが43.3%と最も悪かった。運動率の改善度はswim upが233.2%、攪拌パーコールが241.4%と良好であったが、単層パーコールでは148.3%であり、有意な運動率の改善は認められなかった。運動精子濃度の改善率は単層パーコールが229.3%と最も良く、攪拌パーコール167.3%、グラスウール127.4%の順でswim upが96.3%と最も悪かった。以上の結果より、運動率の改善のためにはswim up、攪拌パーコールが良いが、特にswim upは希釈される事が多く、注意が必要であり、また、運動精子濃度を高めるためにはこの中では単層パーコールが勝れていることが判明した。各種手技にはそれぞれ特徴があり、精液の性状、施設の設備状態に応じて処理法を選択することが必要であると思われた。

## 29. マウス未受精卵の凍結保存

村山眞治・南 晋・小林津月  
加川俊明・山野修司・青野敏博  
(徳島大産婦)

(目的) 未受精卵の凍結保存に関しては、再現性が高く凍結融解後の生存率も高い凍結方法は現在のところ確立されていない。そこで我々は高い生存率を示す未受精卵の凍結方法を開発するため、マウス未受精卵を用いて、凍結保護剤の種類ならびに濃度が凍結融解後の未受精卵の生存性ならびに受精能、発生能におよぼす影響を検討した。

(方法) B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub>成熟雌マウスにPMS 5単位とhCG 5単位を腹腔内投与し、hCG投与14~16時間後に卵管膨大部より未受精卵を採取した。凍結保護剤として1.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO)または1.5 M propanediol (PROH)を用い、それに各種濃度(0, 0.1, 0.2 M)のsucroseを併用した。凍結保護剤を

3段階で添加し、室温から1℃/minで冷却、植氷後0.5℃/minで-35℃まで冷却(急速凍結)あるいは70℃まで冷却(緩慢凍結)した後、液体窒素中に浸漬した。融解は、急速凍結の場合は急速融解(37℃温水)を、緩慢凍結の場合には緩慢融解(室温に放置)を行った。凍結保護剤を洗った後媒精し、形態正常率および受精率、胚盤胞までの発育率を比較検討した。

(成績)①PROHを使用した場合凍結法にかかわらず受精した卵は1個もなかった。②DMSOに0.2 M sucroseを併用し緩慢凍結を行った群の受精率は23/32(71.9%)で、他の群に比し高い傾向にあった。③しかし、発育率はどの群も20%以下にとどまった。(結果)DMSOにsucroseを併用することにより高い受精率が得られたが、発育率はまだ低率であり今後検討の必要があると思われる。

### 30. ハムスター裸化卵子へのウシ精子の侵入について

中川 明・野口敦功・川手憲俊  
菅 徹行

(山口大農学部家畜臨床繁殖学)

透明帯を除去したハムスター卵子にウシ精子を受精し、その後の体外培養成績と染色体標本作製について検討した。

ゴールデンハムスター雌にPMSGとhCGで過剰排卵処置を施し、hCG投与後17時間に卵管膨大部より卵子を取り出し、卵丘細胞と透明帯を除去して供試した。ウシ精子は凍結精液を融解後、イオノフォア溶液で処理し、3時間体外培養を施して受精能を獲得させた。媒精8時間後にpodophyllotoxinとvinblastinを添加し、媒精18時間後より2時間おきに卵子を観察し、前核の消失した卵子を分離して、漸進固定・空気乾燥法にて、卵子標本作製した。

黒毛和種と無角和種雄牛の精液を用いたが、媒精後ハムスター卵子が前核期に達した割合、および媒精24時間後までに前核が消失した卵子の割合について、それぞれ種雄牛による個体差が認められた。

さらにウシ体外受精の割合の精子処理法に準じて、ヘパリンで精子の受精能獲得を誘起し、ハムスター卵子に媒精した。その場合の受精率等について、ウシ体外受精との関係について検討中である。

### 31. 成熟婦人における Melatonin-Prolactin 分泌機構に関する検討

岡谷裕二・岡田真尚・相良祐輔

(高知医大産婦)

(目的)夜間に増量するMelatonin(Mel)とProlactin(PRL)分泌動態には有意の相関性のあることを明らかにし報告してきた。今回、さらに、MelとPRL分泌との関連および分泌機構を明らかにするために、内因性Melが極めて低値で推移する日中にMelを内服負荷すると同時に、Bromocriptine(BC)前投与条件下にMelを負荷し、PRL分泌動態を検討した。

(方法)同意を得た正常成熟婦人を対象に、卵胞期6～8日目の13時にMel 1mgおよびVehicle(1% EtOH-牛乳50 ml)を投与した。BC投与群は12時に2.5 mg, 1.25 mg, 0.625 mgを内服させ、13時にMel 1mgを投与した。採血は20分毎に5時間行った。血中MelはHPLC法により、PRLはダイナボット社RIAkitを用いて測定した。

(成績)Mel負荷群では、血中Mel値は20分後より増量し、40, 60分後では $3.49 \pm 2.20$ ,  $3.42 \pm 1.62$  ng/mlを示し、以後減少した。PRL値はMel負荷後80分より有意に増量し、ピーク時刻はMelのそれより120～140分遅れた180分後で $30.0 \pm 15.1$  ng/mlを示した。このMel-PRL分泌パターンは夜間と極めて類似していた。一方、BC投与群ではいずれの用量群もMel負荷後へのPRLの増量は認められなかった。

(結論)日中のMel負荷により、夜間と極めて類似したMel-PRL分泌動態を示し、MelとPRL分泌機構に強い関連のあることが示された。さらに、MelのPRL分泌機構にはDopamine系が関与する可能性が強く示唆された。

### 32. gonadotropin に対する poor responders におけるクロニジン負荷テストの反応性について

高崎彰久・野口博史・蔵本武志

平塚圭祐・森岡 均

(済生会下関総合病院産婦)

最近、gonadotropinに対するpoor respondersにおける、growth hormone(GH)の関与が報告されている。今回、我々は、当院不妊外来受診患者に対し、GH刺激試験の1つであるクロニジン負荷テストを行い、poor respondersの反応性を検討した。

(方法)HMG投与患者中、最大卵胞径が18 mmを越えるまでのHMGの総投与量が1500 IU以上の群をgood responder群(9名)とし、1500 IU未満の群

(poor responder 群: 5名)および、無治療あるいは clomid 投与により排卵を有する群 (control 群: 7名) とのクロニジン負荷テストの反応性の違いを検討した。なお、クロニジン負荷テストは、月経周期の3~5日目に行い、クロニジン  $300 \mu\text{g}$  を経口投与し、投与前、投与後30, 60, 90, 120分に採血しGHを測定した。

(結果)クロニジン投与前のGH値は、3群間で有意の差は認められなかった。control 群では、GHは60分後より上昇を始め、90分後にピーク ( $16.8 \pm 4.4 \text{ ng/ml}$ ) に達した。good responder 群も control 群とほぼ同様の变化を示した。これに対して poor responder 群では、GHの上昇は認められず、90分値も  $3.3 \pm 0.9 \text{ ng/ml}$  と他の2群に比して有意に低値を示した。(結論)poor responder 群では、潜在性のGH分泌不全が存在することが示唆された。現在、poor responders に対し、GHを用いた治療の有用性を検討している。

### 33. 下垂体からの gonadotropin 分泌機構における activin A と性ステロイドホルモンの相互作用の検討

三宅敏一・桑原 章・横山裕司  
松崎俊也・斎藤誠一郎・井川 洋  
安井敏之・荻原 稔・青野敏博  
(徳島大産婦)

下垂体からの gonadotropin 分泌に対する activin A と性ステロイドホルモンの相互作用をラット下垂体初代培養系を用いて検討した。この系に activin A とともに、estradiol (E2), testosterone (T), または progesterone (P)を添加し、gonadotropin の基礎分泌および、GnRH 刺激による反応性分泌に対する相互作用を検討した。activin A とTあるいはPを同時添加すると、activin A 単独投与時に比し、FSHの基礎分泌を有意に促進したが、(activin A: 100%, activin A+T: 144%, activin A+P: 148%,  $p < 0.05$ ) が、E2を同時に添加してもこの作用はなかった。他方、GnRH 刺激におけるFSH分泌に対する activin A の促進作用をE2は抑制したが(activin A: 100%, activin A+E2: 81%,  $p < 0.05$ )、T、あるいはPには有意な作用はなかった。以上より activin A の下垂体からの gonadotropin 分泌作用は、性ステロイドホルモンにより修飾を受けることが示唆された。

### 34. 内因性摂食調節物質 2-buten-4-olide のラット性機能抑制に関する検討

斎藤誠一郎・桑原 章・横山裕司  
井川 洋・松崎利也・安井敏之  
三宅敏一・荻原 稔・青野敏博  
(徳島大産婦)

(目的)前回、内因性摂食調節物質である 2-buten-4-olide (2-B 40) をラットの腹腔内に慢性投与すると性周期が不規則となり、in vitro では 2-B 40 が GnRH 刺激やエストロゲンのポジティブ・フィードバックによる下垂体からの LH 放出を抑制することを報告した。そこで今回は、性機能抑制の機序をさらに詳細に解明する目的で、2-B 40 をラットの脳室内に投与し、下垂体からの LH のパルス状分泌の変動について検討を加えた。

(方法)雌ラットの両側卵巣を摘除し、29 ゲージの注射針をラットの第3脳室に装着した。右心房にカニューレを留置した後、 $5 \mu\text{mol}$  の 2-B 40 を微量注入装着を用いて第3脳室に注入した。対照として  $10 \mu\text{l}$  の生食を注入した。採血は  $0.3 \text{ ml} / 6 \text{ 分}$  の間隔で合計 120 分間にわたって行った。

(結果)パルス状分泌の頻度はコントロール群の  $11.3 \pm 0.12$  (回/時間) に対し 2-B 40 を  $5.0 \mu\text{mol}$  投与した群では  $0.50 \pm 0.23$  (回/時間) と有意 ( $p < 0.02$ ) に減少した。振幅に有意差は認められなかった。

(結論) ラットに 2-B 40 を投与すると下垂体からの LH のパルス状分泌の頻度が減少したが振幅には影響を与えなかった。このことから 2-B 40 は視床下部に作用して、GnRH のパルス状分泌を減少させ、その結果、性機能を抑制する可能性が示唆された。

### 35. クロミフェンの子宮内膜レセプター含量におよぼす影響について

上田一之・富松 健・中田雅彦  
西村博通 (山口県立中央病院産婦)

我々は第12回世界産婦人科学会において卵胞期子宮内膜のプロゲステロンレセプター量 (PgR) は卵胞期の血中エストラジオール (E2) 値と正の相関関係にありその比 (PgR/E2) は黄体期子宮内膜日付診不良例で有意に低いことを報告した。今回クロミフェンの子宮内膜への影響を観察する目的で内膜のステロイドレセプターを測定した。対象は当科不妊外来を受診中の患者 14 名 (無治療群 6 例、クロミフェン治療群 8 例) とした。排卵直前および排卵後 6 から 8 日間に採血および子宮内膜を採取し、一部を日付診に、一部をプロゲステロンおよびエストロ

ゲンレセプター量 (ER) 測定に用いた。内膜の ER, PgR はモノクローナル抗体を用いて測定し, 血中 E<sub>2</sub>, プロゲステロン (P) 値は RIA にて測定した。卵胞期では ER は無治療群で有意に高値を示し, 血中 E<sub>2</sub> 値はクロミフェン群に, 内膜量は無治療群に高い傾向が認められた。ER/E<sub>2</sub> 比および PgR/E<sub>2</sub> 比はクロミフェン群に有意に低値であった。黄体期 E<sub>2</sub>, P, ER, PgR, ER/E<sub>2</sub> PgR および PgR/E<sub>2</sub> 比に有意な差は認められなかった。また内膜日付診では, 無治療群全例が正常であり, クロミフェン群 8 例中 4 例に内膜発育不全を認めた。以上の結果より, クロミフェン治療は卵胞期における内膜ステロイドレセプターの誘導に影響をおよぼし, 黄体期子宮内膜日付診を悪化させる可能性が示された。

### 36. Clomiphene Citrate 投与周期における maturation index および Insler score の変化

片山隆章・吉田信隆・中塚幹也

平野由紀夫・野間 純・清水健治

関場 香 (岡山大産婦)

(目的) 自然排卵周期において, estrogen および gestagen の変動に伴い, 頸管粘液の性状および腔スミアにおける表層細胞, 中層細胞の割合は変化する。一方, anti-estrogenic effect のある Clomiphene 投与周期には, それらはどのような変化を示すのか充分検討されていない。そこで各周期における maturation index (MI) の変化と頸管粘液における Insler score (IS) との関係を検討した。

(方法) 対象は自然排卵周期 10 周期および Clomiphene Citrate (CC) 投与周期 10 周期とし, MI として全細胞に対する表層細胞の割合を経日的に調べ, 同時に IS を記録した。排卵日 (day0) は経腔超音波により確認した。

(結果) 自然排卵周期では, IS は day-2 から day0 にかけてピーク値 (6.0~7.3) をとり, day1 には 3.2 と減少した。MI は卵胞期後期より増加し, day0 の 33.9% から day3 の 34.7% まで高値を保った後, day5 には 12.6% と減少した。CC 投与周期では, IS は day-3 から day0 にかけてピーク値 (4.1~5.9) を形成し, 排卵後減少したが, MI は排卵期にも増加せず, 月経周期を通じて 2.3%~10.6% と常に低値であった。

(結論) CC 投与周期では, IS は排卵直前に増加したが, MI は変化を認めなかったことより, CC の anti-estrogenic effect は, 円柱細胞領域よりも扁平細胞領域に対してより強く作用すると考えられた。

### 37. 多嚢胞卵巣症候群における臨床症状と血中 androgen 濃度との関係について

岡田さおり・高橋健太郎・吉野和男

江田芳美・北尾 学 (島根医大産婦)

多嚢胞卵巣症候群の臨床症状 (月経異常, 男性化徴候, 肥満度) と血中 androgen 濃度の関係について検討した。研究対象は経腔超音波断層法にて多嚢胞卵巣が認められた 25 例とし, 排卵性月経周期を有する群 (reg-PCO 群: 6 名) と無排卵性の月経周期を有する群 (irreg-PCO 群: 19 名) の 2 群に分け, 血中 androgen 濃度 (testosterone [T], free-testosterone [free-T]), および sex hormone-binding globulin [SHBG] を比較検討した。さらに, irreg-PCO 群について, 肥満の有無, 多毛の有無により, androgen 濃度および SHBG を検討した。

結果として, ① free-T は irreg-PCO 群が reg-PCO 群に比べて有意な高値を示し, SHBG は有意な低値を示したが, T は両群間で有意な差を認めなかった, ② irreg-PCO 群において多毛の有無で 2 群に分け, T, free-T, SHBG を比較したが, 有意な差は認められなかったが, ③ 同様に肥満であるかないかで 2 群に分けると, T, free-T は両群間で差を認めなかったが, SHBG は肥満群が有意な低値を示した。

以上のことより多嚢胞卵巣症候群の androgen, SHBG 状態は排卵性月経周期の有無により異なること, そして無排卵性の月経周期の場合, 男性化徴候の有無では androgen, SHBG 状態に差はないが, 肥満に関しては SHBG が関与していることが示唆された。

### 38. 排卵現象における Plasminogen Activator-Plasmin 系の作用機序について一特に作用時期, 作用時間および卵巣 tPA 活性の変動を中心に

森岡信之・山中 恵・相良祐輔

(高知医大産婦)

(目的) 未成熟 Rat 卵巣還流系を用い, AMCHA によって排卵は用量依存的に抑制されることを報告して来た。今回 Plasminogen activator (以下 PA) - Plasmin 系の排卵機構への影響, 特に作用発現時期, 作用発現時間および卵巣 tPA 活性の変動につき検討した。

(方法) AMCHA (PA-Plasmin 系の阻害剤) を添加し用量, 暴露時期, 暴露時間の排卵におよぼす影響, 更に排卵過程における卵巣 tPA 活性を測定した。

(成績) AMCHA 暴露は  $0.05 \sim 5$  mM 間で有意の用量依存的排卵抑制効果を認め、 $5$  mM で  $4.2 \pm 1.9$  と最大排卵抑制効果をみた。AMCHA 暴露後 Plasminogen  $4.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の添加により  $21.4 \pm 4.4$  と正常排卵数に回復した。AMCHA 暴露開始時期の排卵におよぼす影響は LH+IBMX 投与  $1 \sim 3$  時間後より暴露させた群にのみ有意の排卵抑制効果を認めた。暴露時間の排卵におよぼす影響では LH+IBMX 投与  $1$  時間後より  $3$  時間の暴露で排卵は  $6.0 \pm 2.6$  と有意に抑制された。卵巣 tPA 活性は HCG 投与  $2$  時間および  $9$  時間後に peak を形成する二峰性の推移を示した。

(結論) (1) AMCHA の用量依存的排卵抑制効果がみられた。(2) AMCHA は LH 投与後  $4$  時間以内という排卵過程の初期段階に作用させた時のみ排卵抑制効果を認めた。(3) これらの排卵抑制効果は Plasminogen 投与により回復された。(4) 卵巣 tPA 活性は HCG 投与  $2$  時間後に初期活性 peak を認めた。すなわち、PA-Plasmin 系は排卵過程の極初期段階に活性化され以後の卵胞壁破裂機序の Trigger となることが示唆された。

#### 特 別 講 演

##### 1. 性腺機能の細胞性調節

###### ——組織マクロファージの起源と意義

高橋迪雄 (東京大学)

##### 2. フィットネスと利己的な遺伝子

日高敏隆 (京都大学)

# 訂正とお詫び

第36巻4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。

19ページ 栗田松一郎論文：灌流ラット下垂体前葉細胞からのパルス状 LH 分泌に及ぼすゲスターゲン剤とそのアンタゴニストの影響について

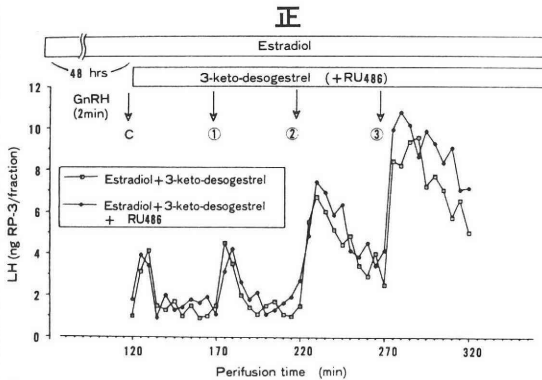


Fig. 3 Typical perfusion experiment showing LH release from rat pituitary cells cultured on the microcarrier beads in response to 2-min GnRH ( $10^{-8}$ M) pulses administered every 50 min. Cells were obtained from 3 wk ovariectomized rats. Prior to perfusion, cells were pretreated with  $10^{-9}$ M estradiol for 48h. After an initial control pulse of GnRH the cells were further perfused with the medium added with  $10^{-7}$ M 3-keto-desogestrel (3kDg) or 3kDg plus  $10^{-6}$ M RU486.

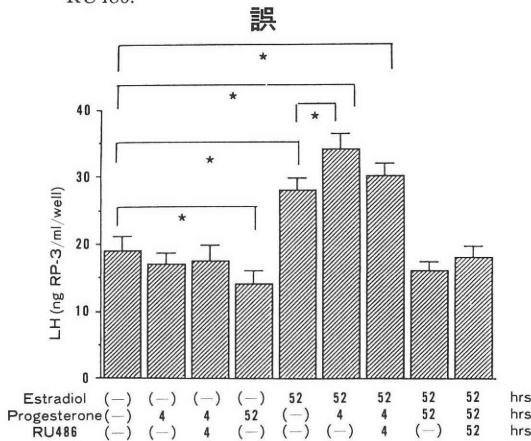


Fig. 3 Typical perfusion experiment showing LH release from rat pituitary cells cultured on the microcarrier beads in response to 2-min GnRH ( $10^{-8}$ M) pulses administered every 50 min. Cells were obtained from 3 wk ovariectomized rats. Prior to perfusion, cells were pretreated with  $10^{-9}$ M estradiol for 48h. After an initial control pulse of GnRH the cells were further perfused with the medium added with  $10^{-7}$ M 3-keto-desogestrel (3kDg) or 3kDg plus  $10^{-6}$ M RU486.

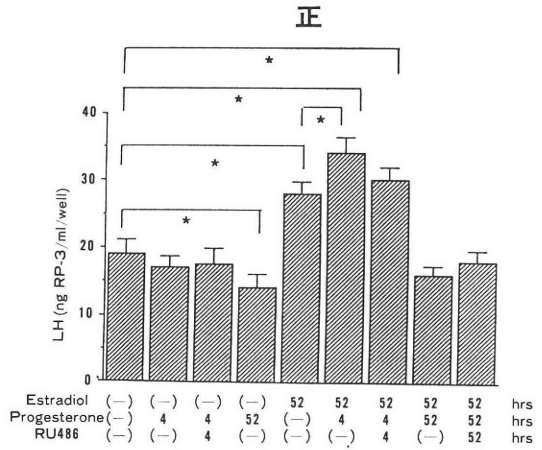


Fig. 4 Effects of acute (4h) and chronic (52h) exposures to progesterone with or without RU486 on GnRH-stimulated LH release from estradiol treated pituitary cells in culture. \* $p < 0.05$  (t test). The values shown are the mean  $\pm$  SE (n=4).

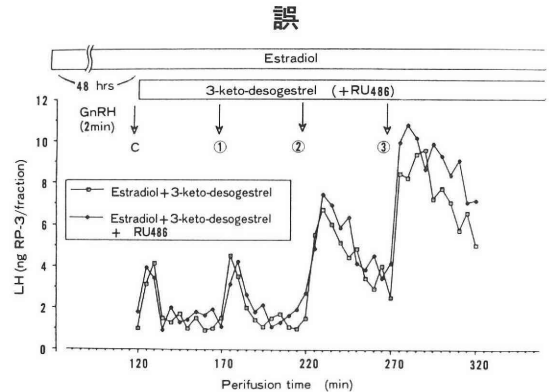


Fig. 4 Effects of acute (4h) and chronic (52h) exposures to progesterone with or without RU486 on GnRH-stimulated LH release from estradiol treated pituitary cells in culture. \* $p < 0.05$  (t test). The values shown are the mean  $\pm$  SE (n=4).

正

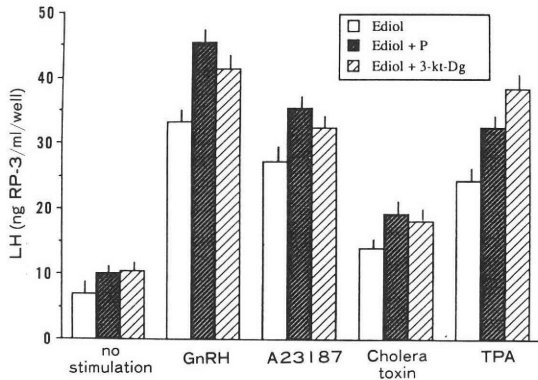


Fig. 6 Effects of acute exposures (4h) to progesterogens on a variety of secretagogue-stimulated LH release from estradiol treated pituitary cells in culture. The values shown are the mean  $\pm$  SE (n=4).

誤

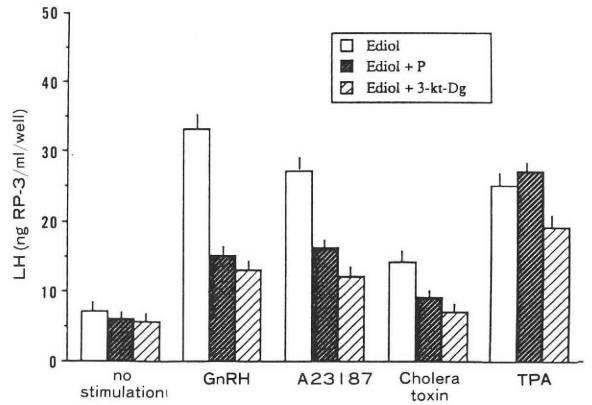


Fig. 6 Effects of acute exposures (4h) to progesterogens on a variety of secretagogue-stimulated LH release from estradiol treated pituitary cells in culture. The values shown are the mean  $\pm$  SE (n=4).

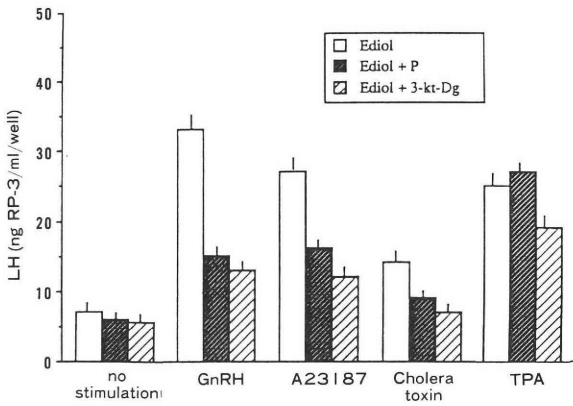


Fig. 7 Effects of chronic exposures (52h) to progesterogens on a variety of secretagogue-stimulated LH release from estradiol treated pituitary cells in culture. The values shown are the mean  $\pm$  SE (n=4).

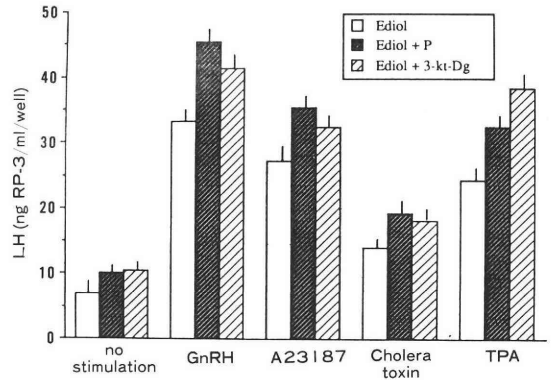


Fig. 7 Effects of chronic exposures (52h) to progesterogens on a variety of secretagogue-stimulated LH release from estradiol treated pituitary cells in culture. The values shown are the mean  $\pm$  SE (n=4).

訂正とお詫び

第36巻4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。

110ページ 町澤一郎論文：hCG 投与によるラット精巢のテストステロン産生の調節とペントースサイクルへの影響

正

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

町澤一郎

Ichiro MACHIZAWA

誤

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

町澤一郎

1st. hiro MACHIZAWA

抄録2行目

正

hCG(600IU/KgBW)

誤

hCG(600IU/KgcBW)

訂正とお詫び

第36巻4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。

149ページ 川上寧論文：電気刺激によるラット精巢上体尾部精子の大量回収法の受付年月日

正

(受付：1991年5月15日特掲)

誤

(受付：1991年5月15日)

# 関連学会のお知らせ

## 第 4 回 Microfertilization Seminar

日 時：平成 4 年 4 月 18 日（土） 午後 1 時

会 場：東海大学交友会館

東京都千代田区霞が関 3 - 2 - 5 霞が関ビル 33 階

TEL 03-3581-0121

### 特別講演

演題名：New advances in micro-manipulation: possibilities for treatment of the severe male factor patient

演 者：Soon-Chye Ng, MD, Associate Professor

Department of Obstetrics and Gynaecology, National University of Singapore

一般演題募集：Microfertilization およびその関連の研究に関する一般演題を募集します。

演題名，発表者名，所属，要旨（400 字以内）を担当世話人あてにお送り下さい。

一般演題締切：平成 4 年 2 月末日

連絡先：福井県吉田郡松岡町下合月 23-3

福井医科大学産科婦人科学教室

TEL 0776-61-3111

FAX 0776-67-8117

担当世話人 富永敏朗（内線 2374）

事務担当 竹内 譲（内線 2379）

## 第 33 回 哺乳動物卵子学会

第 33 回 哺乳動物卵子学会

大会長 広井 正彦

下記により第 33 回哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員のご参加をお願い致します。

### 記

日 時：平成 4 年 5 月 16 日（土）13：00～17 日（日）15：00 まで

場 所：上山温泉 月岡ホテル

山形県上山市新湯 1－33

TEL 0236－72－1212

一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子学会誌第 9 巻 第 1 号に講演要旨として掲載致します。各演題は 2 ページにおまとめ頂きます。

発表時間は 1 題につき 10 分、討論 5 分を予定します。

なお、演題多数の場合は会場の都合などで一部示説発表をお願いすることもありますのでご了承下さい。

演題申込：締 切 平成 4 年 1 月 31 日必着

演題の申し込みは、葉書に演題名（和文および英文）発表者および共同研究者（ローマ字）を記入のうえ下記宛お送り下さい。折返し発表内容を記載する原稿用紙をお送り致します。

講演原稿の締め切りは平成 4 年 2 月 28 日（厳守）とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学農獣医学部獣医生理学研究室

哺乳動物卵子学会事務局

TEL 0466－81－6241 内 332

総 会：5 月 17 日（日）13：00～13：30 月岡ホテル内

懇親会：5 月 16 日（土）18：00～20：00 月岡ホテル内

宿泊関係：宿泊は、月岡ホテル内に多数確保してありますので、各自『学会出席のため』として、直接 月岡ホテルに電話でお申し込み下さい。

月岡ホテル 上山温泉（上山市新湯 1－33）

TEL 0236－72－1212

学会事務局：〒990-23 山形市飯田西 2－2－2

山形大学医学部産婦人科教室内

第 33 回 哺乳動物卵子学会事務局

大会長 広井 正彦

（総会幹事 斉藤 英和）

# 日本アンドロロジー学会 第11回学術大会

会 期：1992年7月25日（土）・26日（日）

会 場：宇部市文化会館

〒755 山口県宇部市朝日町8番1号 電話(0836)31-7373

## 主要プログラム

### 1) 教育講演

「脳内神経伝達物質と性機能」

佐藤嘉一（札幌医科大学泌尿器科学教室）

「ヒト特発性乏精子症辜丸組織像について」

寺田充彦（東京医科歯科大学医学部病理学教室）

「精巣機能異常の分子生物学的診断」

並木幹夫（大阪大学医学部泌尿器科学教室）

「精索静脈瘤の臨床：男性不妊症との関連について」

広川 信（藤沢市民病院泌尿器科）

### 2) 特別講演

「閉塞性無精子症に対する精路再建術」

瀧原博史（山口大学医学部泌尿器科学教室）

### 3) シンポジウム

「精子形成の正常と異常」（仮題）

司会 毛利秀雄（放送大学）

竹中生昌（香川医科大学泌尿器科学教室）

演題申込締切 1992年3月30日 必着

応募方法 演題応募の資料請求は官製はがきに、所属、氏名、所在地、電話番号をご記入の上、下記連絡先までお送り下さい。

## 連絡先

〒755 山口県宇部市小串1144

山口大学医学部泌尿器科学教室

日本アンドロロジー学会第11回学術大会事務局

TEL (0836)22-2275

FAX (0836)22-2276

日本アンドロロジー学会第11回学術大会

会長 酒徳治三郎（山口大学名誉教授）

# 日本医学会だより

1991年5月 No.5

## 1. 第57回定例評議員会

1991年2月26日(火), 13:30から81名の評議員が出席して日本医師会館小講堂において開催・羽田日本医師会会長から, 医師生涯教育の一環としても第23回総会の成功を祈る旨の挨拶があった後, 太田会長が議長となり, 第23回総会の準備状況, 1990年度年次報告, 1991年度事業計画などを原案どおり可決し, 後述のように, 第24回総会の開催地, 時期, 会頭, 副会頭を決定した。なお, 会長は冒頭, 歴史と現状とを鑑み日本医学会の将来像, ことに, その望ましい組織と活動の在り方について, 新規加盟学会の審査を含め, 評議員各位の深刻な検討を期待すると述べた。

## 2. 第23回日本医学会総会

4月3日, 総合展示場の会場によって開幕し, 従来の記録を破る32,500人の登録参加者を始め公開された会場にも予想以上の入場者があって, 総ての行事が極めて盛大に, 全く滞りなく遂行された。好天に恵まれ桜が満開となった4月5日～7日にわたる学術集會も各会場とも超満席の盛況であったのは, プログラムの選択が優れ, 転換期に立つ医学と医療—創造と調和と信頼—の標語に共感があり, また分科会の協力の賜物であったためかと思われる。岡本会頭, 両佐野副会頭, 井村準備委員長を初めとする総会当局に敬意と感謝が捧げられるべきだろう。

## 3. 第24回日本医学会総会の構成

上述の評議員会において, 第24回総会は1995年4月上旬, 名古屋市に開催されることになり, 会頭には, 飯島宗一前名古屋大学長, 副会頭には, 加藤延夫名古屋大学教授・竹内俊彦名古屋市立大学教授が満場一致で選出された。なお準備委員長には, 齋藤英彦名古屋大学教授が指名された。また, 幹事長も堀田知光名古屋大学講

師に決定し, 名古屋においては準備態勢に入っている。各分科会の協力が期待される。

## 4. 総会ありかた委員会の報告をめぐって

第22回総会(東京)後, 上記の委員会(委員長 中尾真幹事)が設置され, 1990年2月の幹事会に報告が提出されたが, 1991年6月には, この報告を中心に, 過密な総会を緩和し, 急速な医学の進歩を速やかに反映させ, かつ全国の都市に開催の機会を与える方途が深刻に検討されることになっている。“中間総会”の設定が具体化すれば第24回総会の内容にも影響が及ぶ可能性があるとの見方もある。

## 5. 医学用語管理事業: 用語辞典の発刊

1975年, 日本医学会は医学用語辞典(欧和版)を刊行した後, 医学用語管理委員会がその改訂に取り組んで来たが, 幸い第23回総会を前にして1991年4月1日をもって, 新しく英和版を完成し, 大方の用に供する事が出来たことは, 誠に喜ばしい。長い準備期間があったにもかかわらず, 様々の隘路があつて, 必ずしもすべて満足すべき段階に達していないとの批判もあろうかと思われるが, 貴重な時間を捧げられた委員に感謝し, またその改善と既に準備中の和英版の完成のため, 分科会会員諸君ことに分科会用語委員の方々からの貴重な意見を歓迎する。ご意見は用語管理委員会の草間委員長宛にされたい。

なお, 日本医学会としては, 日本における医学用語の管理は, 国際的な情報社会での対応の上から将来日本国内の関係機関との共同事業として運営することも考慮の中においている。

## 6. 新規加盟審査のための臨時評議員会の開催

内規に従い, 分科会としての新規加盟申請を1991年2月に公示し, 1991年5月31日に受付を締め切り, 来る6月25日, 上記の臨時評議員会を開催して審査する。将来の日本医学会の活

動や方針に決定的な影響をもつものと考えられ、  
評議員各位の慎重な判断が期待されている。

## 7. 日本医学会シンポジウム

### 第 91 回シンポジウム

#### 細胞増殖とその制御—病気とのかかわり—

1991 年 6 月 14 日（金）日本医師会館大講堂

組織委員：豊島久真男，高井義夫，山本雅

### 第 92 回シンポジウム

#### 癌集団検診の再評価

1991 年 8 月 30 日（金）～9 月 1 日（日）箱根

組織委員：末舛恵一，富永祐民，久道 茂，

大島 明

### 第 93 回シンポジウム

#### 主題未定

1991 年 12 月予定，日本医師会館大講堂

\* シンポジウムの主題と組織とは，シンポジウム企画委員会の検討によっているが，分科会からの意見を歓迎する。

\* \* シンポジウムの記録は，第 84 回以降独立の出版物となっている。希望者は日本医学会に申込めたい。無料領布。

## 8. 認定医制三者懇談会

日本医学会は，認定医制の推進を図るため，学会認定医制協議会と日本医師会を招請して，すでに 10 回にわたって懇談会を開催して来たが，分科会のご努力によって，問題解決の曙光がみえて来た感がある。次回の懇談会は 6 月 20 日に開催される予定である。

## 9. 著作権・複写権の問題について

日本工学会が中心となって進められて来たこの問題は，最近複写権センター設立によって前進を見たようであるが，なおその運営・経理等について，明らかにされるべき所が残っているために，日本医学会としては，まだ正式に参加していない。分科会への直接の働き掛けがある可能性もある。ただしこの問題は，分科会の機関誌が投稿規定によって掲載論文の著作権をもつことが前提である。

分科会においては，この点に留意して投稿規

定を整備することが必要となる。また近年，医学論文の国際的基準についても論じられるようになってい

にっていることにも留意される。

### 日本医学会

〒 113 東京都文京区本駒込 2-28-16

日本医師会館内 TEL 03-3946-2121 (代表)

FAX 03-3946-6295

# 日本医学会だより

JAMS News

1991年10月 No. 6

## 1. 新規加盟申請分科会の選定

第58回臨時評議員会は、第23回総会後の1991年6月25日(火)に、日本医師会館小講堂で開催した。加盟申請学会は33、うち30が審査対象となり慎重な審査ののち投票によって、日本動脈硬化学会、日本東洋医学会、日本小児神経学会、日本呼吸器外科学会の4学会の加盟が認められた。これで日本医学会の分科会数は89学会となった。この機会に日本医学会の長期的活動目標や構成について、真剣な再検討が望まれている。

## 2. 第24回総会役員の決定

臨時評議員会席上、第23回および第24回総会の会頭から挨拶があり、第24回総会(1995年4月、名古屋)の役員が紹介された。

会頭：飯島宗一前名大学長

副会頭：加藤延夫名大教授

武内俊彦名市大教授

準備委員長：齋藤英彦名大医学部長

幹事長：堀田知光名大講師

## 3. 特別シンポジウムの検討

日本医学会は総会あり方委員会の報告をうけて、審議を重ねてきたが幹事会の決定にしたがい「中間総会」を地方開催の特別シンポジウムとして具体的に検討するために、特別シンポ検討委員会を発足させた。委員は次のとおり。

飯島宗一(第24回総会会頭)、石田名香雄、井口潔、中尾真、三浦祐晶(各幹事)、森 亘(副会長)

## 4. 日本医学会シンポジウム

「癌集団検診の再評価」が、1991年8月30日～9月1日の間、箱根においてクローズド形式で開催され活発な討議で多大な成果を収めた。

なお、第93回シンポジウムは、主題を「MRSA感染症の実態と対策」として、1991年12月3日(火)10:00～17:00、日本医師会館の大講堂で、清水喜八郎・紺野昌俊・小林寛伊の三氏を組織委員として開催される。(参加は無料、希望者は日本医学会に葉書で申込みのこと。)

また既刊シンポジウム記録集は希望者に無料頒布している。

## 5. シンポジウムの企画

第13回シンポジウム企画委員会を1991年7月9日(火)に開催。12月開催のシンポジウムのテーマを、多くの企画案の中から「MRSA感染症の実態と対策」に決定した。

なお、委員2名の任期満了に伴い、現委員は、野々村禎昭、京極方久、尾形悦郎、堀 原一、桜井治彦の5氏となっている。

## 6. 認定医制の検討

認定医制についての第11回三者懇談会は、日本医学会長が日本医師会、学会認定医制協議会を招請して1991年6月20日(木)に開催され、学会認定医制協議会からの経過報告を中心に討議がすすめられ、とくに基本的科目の考え方、表示の仕方、認定の主体などについて検討が行われた。

## 7. 医学賞・医学研究助成費の選考

医学賞・医学研究助成費選考委員会は、日本医学会が全面的に選考にあたることになって3回目であるが、その第3回が1991年9月10日(火)に開催され、下記の如く決定をみた。

1991年度日本医師会医学賞は推薦18件の中から下記の3名に決定した。

**基礎部門** 廣川信隆教授(東大解剖学) 神経細胞・細胞骨格の分子細胞生物学的研究。

**臨床部門** 井村裕夫教授(京大内科学) 神経内分泌学に関する基礎的・臨床的研究—とくに神経ペプチドの役割について。

北村忽一郎教授(奈良医大外科学) 川崎病(MCLS)に起因する冠動脈疾患の外科治療の開発。

1991 年度日本医師会学研究助成費は、推薦 70 件中、次の 15 件が選定された。

**基礎部門** 生体内細胞移動に関与する細胞相互認識機構—リンパ球の再循環機構(田中寿子・慈大病理)。

Wilson 病モデル動物の樹立とその発症機序の遺伝学病理学的研究(武市紀年・北大癌研)。

エストロゲンによる胸腺外 T リンパ球分化の活性化と自己免疫疾患女性優位現象(安保徹・新大医動物)。

原虫感染における宿主防御およびエスケープ機構に係わる熱ショック蛋白質の役割(姫野國祐・徳大寄生虫)。

心筋細胞内 Ca 濃度調節と収縮制御に関する研究(栗原敏・慈大生理)。

**社会部門** 職域がん検診のシステム化に関する研究(岡崎勲・慶大衛生)。

**臨床部門** 慢性心不全に対する新しい治療法：サウナ浴および温水浴による温熱性血管拡張療法(鄭忠和・鹿大リハビリ医学)。

糖尿病の発症と糖輸送担体遺伝子(岡芳知・東大内科)。

骨髄異形成症候群の分子病態の解析(平井久

丸・東大内科)。

成人 T 細胞白血病における IL-2 受容体発現に関する研究(内山卓・京大ウイルス研)。

脂質性オートコイドの代謝と作用機構に関する分子生物学的研究(渡辺毅・東大内科)。

BRM による新しいがん局所免疫療法の開発(島野高志・阪大外科)。

眼先天異常の成立機序(白井正一郎・名市大眼科)。

内視鏡使用による副鼻腔手術々式の開発(森山寛・慈大耳鼻科)。

尿路結石症の病態と治療に関する研究(郡健二郎・近畿大泌尿器科)。

授賞は、11 月 1 日(金)の日本医師会設立記念医学大会で行われ、医学賞の 3 教授が授賞講演を行う。

## 8. 医学用語

医学用語管理委員会は、本年 4 月の医学用語辞典英和版完成に引きつづき和英版の出版のために努力している。分科会の用語委員を通じての協力が切望される。

日本医学会

*The Japanese Association of Medical Sciences*

〒113 東京都文京区本駒込 2-28-16

日本医師会館内 TEL 03-3946-2121(代表)

FAX 03-3946-6295

## 投 稿 規 定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある原著、総説、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、原則として未発表のものに限る。
3. 1論文は、原則として刷り上り6ページ以内とし、超過は4ページ(計10ページ)までを認める。超過ページならびに特に費用を要する図、表、写真は実費を著者負担とする。
4. 原著、総説、論説、臨床報告などは必ず、400字以内の和文抄録ならびに、ダブルスペース2枚以内の欧文抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付する。
5. 図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。
6. 記述は和文または欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。
  - a. 雑誌の場合  
著者名：題名、誌名、巻数：ページ数、年次  
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。誌名は規定または慣用の略名に従うこと。特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に括弧で囲む、すなわち  
著者名：題名、誌名、巻数(号数)：ページ数、

年次

- 例1. Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy, Amer. J. Obstet. Gynec., 25: 104, 1933
2. 足高善雄, 竹村 喬, 美並義博: 最近1カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察, 日不妊会誌, 4: 13, 1956
- b. 単行本の場合  
著者名: 著書名, ページ数, 発行所, 年次
- 例1. Rovinsky, J. J. and Guttmacher, A. F.: Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy, 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 (株) アイシーエス企画内

(Tel. 03-3272-7077)

### 日本不妊学会雑誌 37 巻 1 号

1991 年 12 月 25 日 印 刷

1992 年 1 月 1 日 発 行

編集兼発行者 百 瀬 和 夫

印 刷 者 安 永 修

東京都文京区関口 1-43-5

有 限 会 社 ル ー プ 社

東京都文京区関口 1-43-5

社団法人 日 本 不 妊 学 会

東京都中央区日本橋二丁目14-9

加商ビル (株) アイシーエス企画内

Tel (03) 3272-7077

振替口座番号 東京 7-93207