

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 37 No.2

April
1992

日本不妊学会雑誌

第37卷 第2号

平成4年4月1日

会 告

第 37 回日本不妊学会総会および学術講演会

(第 2 回会告)

第 37 回日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領により開催いたします。会員の皆様方の多数のご参加をお願い申し上げます。

日時・会場

学術講演会	1992 年 11 月 6 日 (金)・7 日 (土)	京王プラザホテル
理事会・幹事会	1992 年 11 月 5 日 (木)	京王プラザホテル
総会・評議員会	1992 年 11 月 6 日 (金)	京王プラザホテル
	京王プラザホテル	
	〒 160 新宿区西新宿 2-2-1	TEL 03(3344)0111

学術講演会

本講演会では、特別講演、シンポジウム、一般講演などを行う予定です。

一般講演には、多数の演題をお申し込み下さいますようお願いいたします。ご応募の方は、演題申込み要領に従い、倫理面を十分に考慮した研究についてご応募下さい。演題の採否・分類については会長にご一任願います。

I 特別講演

- 1) 下垂体ホルモンの新しい測定法
群馬大学内分泌研究所 若林 克己 教授
座長 自治医科大学 玉田 太朗 教授
- 2) プロラクチン分泌機構と性機能
日本大学医学部 村井 一郎助教授
座長 日本大学 高木 繁夫 教授
- 3) 性腺の機能異常とストレス
大阪府立大学農学部 森 純一 教授
座長 京都大学 入谷 明 教授
- 4) 染色体異常と男性不妊
国立小児病院小児医療研究センター 中堀 豊 先生
座長 東邦大学 白井 将文 教授

II シンポジウム

- 1) 性ステロイドホルモンの作用機構
座長：山梨医科大学 (産婦人科) 加藤 順三 教授
千葉大学医学部 (泌尿器科) 島崎 淳 教授
ステロイドホルモン受容体の存在様式
岩手医科大学歯学部 (口腔生化学) 太田 稔 教授
性ステロイドホルモン受容体遺伝子発現
山梨医科大学 (産婦人科) 平田 修司 助手
ヒトゲノムの Estrogen Responsive Element
東京大学医学部 (生化学) 井上 聡 助手
核内レセプターの相互作用
大阪大学医学部 (第三内科) 佐藤文三 助教授
アンドロゲン受容体と依存性
千葉大学医学部 (泌尿器科) 古谷 雄三 助手
ステロイドホルモン不応症
九州大学医学部 (第三内科) 名和田 新 教授

2) 精子形成の調節

座長	: 富山医科薬科大学 (泌尿器科)	片山 喬 教授
	放送大学 (生物)	毛利 秀雄 教授
培養系における精子形成		
	山形大学理学部 (生物)	鬼武 一夫助教授
精子形成とホルモン・成長因子		
	千葉大学医学部 (解剖)	羽地 達次 助手
精子形成とカルシウム結合蛋白		
	帝京大学医学部 (産婦人科)	中村 正久助教授
分子レベルでの生殖細胞の分析		
	京都大学医学部 (分子病診療)	中山 広樹助教授
造精障害不妊症の最近の治療法		
	富山医科薬科大学 (泌尿器科)	布施 秀樹助教授

III 一般演題

演題申込み資格

講演者 (共同発表者を含む) は本学会会員に限ります。会員以外の方は演題申込みと同時に、1992年度会員費 (8000円) を納入のうえ会員になってください。

演題申込み要領

1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプまたはワープロでうち、書留郵便にて下記へお送り下さい。
〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1
帝京大学医学部産科婦人科学教室
第37回日本不妊学会本部 (担当 味香, 森)
TEL 03(3964)1211 内線 1460
FAX 03(5375)1274
2. 抄録は800字以内、図・表はつけないでください。
3. 演題の申込みは一演者一題とさせていただきます。
4. 別紙演題申込書、受領書、採用通知書に所定の事項を記入して切手を貼り、抄録用紙 (原本) および抄録用紙のコピー7部と共にお送りください。
5. 申込み締切日: 1992年 (平成4年) 7月1日 (水) (必着)

演題発表形式

口演・ポスターの2つの形式を予定しております。発表形式の決定は会長にご一任ください。

参加申込み方法

学会当日会場にて受け付けます。

学会参加費 8,000円

懇親会費 8,000円

懇親会は、学術講演会第1日終了後に京王プラザホテルで行います。

1992年4月

第37回日本不妊学会

会長 荒井 清

連絡先 : 帝京大学医学部産科婦人科学教室
第37回日本不妊学会本部事務局 (担当 枅内)

〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1
TEL 03(3964)1211 内線 1460
FAX 03(5375)1274

日本不妊学会誌

第37巻 第2号

平成4年4月1日

—目 次—

原 著

- ヒト精子運動能, 膜機能, 寿命および受精能獲得におよぼす
L-arginine の効果 (英文) ……………ニコラオス・ソフィキティス・他 …… 1
実験的精巣障害に対するツムラ温経湯の効果……………白井 尚・他 …… 5
凍結保存精子の受精機能 第3報 Triple stain法による
ARの変化及び Computed Semen Autoanalyzer による解析 ……………吉田仁秋・他 …… 13
体外受精・胚移植時の精子処理における3層 Percoll 密度勾配法の
有用性について—Swim up 法との比較検討— ……………谷川正浩・他 …… 18
健康男性におけるハムスターテストでの精子侵入率の
変動に関する研究 (第1報) ……………三春範夫 …… 23
PMSG-hCG 処置未熟ラット排卵課程における凝固系の意義……………岩政 仁・他 …… 29
家兔胚の着床 (前半部) (英文) ……………立山一郎・他 …… 34
エンドセリン-1 のラット卵胞ステロイド分泌に及ぼす
影響について (英文) ……………白杵 愨 …… 46
尿中微量 LH 半定量測定による LH サージ検出の基礎的・臨床的研究……………小田隆晴・他 …… 52
ゴナール 20 およびゴナール 30 を用いた尿中 LH surge 検出の臨床的検討…中村潔史・他 …… 58
遅延性排卵の病態に関する研究—特に不妊因子としての検討—……………康 文豪 …… 65
LH 含量変更に伴う hMG (Humegon®) の卵胞機能賦活作用の変化 ……………假野隆司 …… 74
Buserelin acetate 投与中に突発性難聴型の聴力障害を来した症例 ……………吉田耕治・他 …… 80
ステロイド合成による α -tocopherol および β -carotene の役割
～ヒト黄体, ヒト胎盤での検討……………横江保彦・他 …… 85
血友病AのDNA診断 (英文) ……………竹下直樹 …… 91
習慣流産及びSLE患者における抗リン脂質抗体の臨床的意義 (英文) ……安藤 索・他 ……102
チョコレート嚢胞に対するエタノール注入療法の成績……………望月 修・他 ……109
体外受精患者における抗透明帯抗体検査の意義……………児玉英也・他 ……113
体外受精・胚移植による妊娠例における採卵法の意義に関する検討……………宮崎和典・他 ……118
IVF-ETにおける月経時遺残内膜吸引除去の有用性について ……………新崎盛雄 ……123
子宮外妊娠の保存的手術に関する検討: 特に手術手技について……………佐藤孝道・他 ……127
子宮鏡による子宮頸部癒着症の手術……………太田博孝・他 ……133
精子濃度と精子移動距離の相関 (英文) ……………宇津木利雄・他 ……138
排卵誘発による妊娠の子後 (英文) ……………長江光芳・他 ……142
地方部会講演抄録 ……………148

Japanese Journal of Fertility and Serility

(Vol. 37, No. 2, 1992)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Effect of L-Arginine on Human Sperm Motility,
Membrane Function, Life Span, and Capacitation*N. Sofikitis, I. Miyagawa,*
T. Harada, T. Toda, Y. Mio & N. Terakawa 1
- Effects of Tsumura Unkeito on Cyclophosphamido
Induced Testicular Disorder*T. Shirai, I. Ikemoto, T. Machida,*
A. Nishida, R. Kaneko, H. Nakajyo & M. Ueda 5
- Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Human Spermatozoa
.....*H. Yoshida, T. Fukaya,*
A. Tsuiki, H. Tozawa, Y. Mandai,
T. Murakami, W. I. Chan, S. Chida,
M. Tamura & A. Yajima 13
- Evaluation of Three-layer Percoll Gradient Method for Semen
Manipulation in IVF-ET*M. Tanikawa, C. Renbutu, N. Takao,*
T. Ikenari, A. Sekijima, T. Iwabe,
Y. Oonohara, H. Terado, T. Toda,
T. Harada, Y. Mio & N. Terakawa 18
- Varlability in Sperm Penetration Rate in the Hamster
Oocyte Penetration Test in Healthy Young Men. I*N. Miharu* 23
- Possible Roles of the Coagulation System During the Ovulatory
Process in Gonadotropin-primed Immature Rats*J. Iwamasa, K. Matsuura,*
N. Tanaka & H. Okamura 29
- In Vivo Studies on the First Half Stage of Rabbit
Blastocyst Implantation*I. Tateyama, K. Hashii,*
N. Kamitani, T. Tominaga & T. Mori 34
- Effects of Endothelin-1 on Steroidogenesis
by Rat Ovarian Follicles*S. Usuki* 46
- Basic and Clinical Studies on Detection of LH Surge with
a Highly Sensitive and Semiquantitative Urinary LH Assay
.....*T. Oda, K. Takahashi,*
K. Kihara & T. Hasegawa 52
- Ovulation Prediction by Using Urinary LH Test Kit
"Gonal 20 and Gonal 30"*K. Nakamura, T. Kitagawa, A. Nawa,*
S. Inagaki, H. Shibata, I. Kondo,
N. Suganuma, O. Narita & Y. Tomoda 58

Study on the Pathophysiology of Delayed Ovulation —As a Fertilized Factor—	<i>B. Kou</i>	65
Changes of Follicular Stimulizing Effects of hMG (Humegon®) Associated with Change of LH Content	<i>T. Kano</i>	74
Sudden Hearing-Loss Type of Auditory Disorder During Buserelin Acetate Administration, a Case Report	<i>K. Yoshida, S. Kusano, M. Seki & Y. Okamura</i>	80
The Roles of α -tocopherol and β -carotene in the Steroid-producing Cells with Emphasis on the Human Luteal Cells and Placental Chorion	<i>Y. Yokoe & A. Takenaka</i>	85
Dna Analysis of Hemophilia A—A Trial to Establish the Optimum Strategy for Carrier and Prenatal Diagnosis in the Japanese Population—	<i>N. Takeshita</i>	91
Clinical Significance of Antiphospholipid Antibodies in Patients with Habitual Abortion and Systemic Lupus Erythematosus Associated with Fetal Losses	<i>M. Ando, Y. Yoshimura, A. Yoshinaga, N. Koyama, Y. Ubukata, S. Shiokawa, H. Okamiya & Y. Nakamura</i>	102
Results of Ethanol Injection Therapy in Patients with Chocolate Cyst	<i>O. Mochizuki, M. Narita & H. Saito</i>	109
Examination of Anti-zona Pellucida Antibody in the Infertile women who Underwent In Vitro Fertilization	<i>H. Kodama, M. Kato, K. Sekine, J. Fukuda, T. Matsui, S. Takeda & M. Maki</i>	113
A Study on Significance of The Ovum Collection Method in Pregnancies Due to In Vitro Fertilization and Embryo Transfer (IVF • ET)	<i>K. Miyazaki, H. Okuda, T. Kaneko, S. Oota, Y. Suzuki, S. Sugiyama & O. Sugimoto</i>	118
Effects of the Removal of Menstrual Endometrium in IVF-ET	<i>M. Arasaki</i>	123
Conservative Surgery for Ectopic Pregnancy with Special Reference to the Techniques	<i>K. Sato, T. Kojima, K. Takahashi, K. Ogawa & H. Toubai</i>	127
Lysis of Cervical Adhesion by Hysteroscopy	<i>H. Ota & M. Fukushima</i>	133
Correlation Between Sperm Concentration and Migration Distance in Bovine Cervical Mucus	<i>T. Utsugi, Y. Nakajima & Y. Ibuki</i>	138
Outcome of Pregnancy After Ovulation Induction	<i>M. Nagae & M. Saito</i>	142

EFFECT OF L-ARGININE ON HUMAN SPERM MOTILITY, MEMBRANE FUNCTION, LIFE SPAN, AND CAPACITATION

Nikolaos SOFIKITIS and Ikuo MIYAGAWA

Department of Urology, Tottori University
School of Medicine, Yonago 683, Japan

Tasuku HARADA, Toshiko TODA, Yasuyuki MIO
and Naoki TERAKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tottori University School of Medicine Yonago 683, Japan

Abstract: Fifteen semen samples were collected from asthenospermic patients and processed for the swim-up washing procedure. Subsequently the effect of L-arginine on human sperm motility, membrane function, life span, and capacitation was evaluated. L-arginine significantly increased the percentage of motile spermatozoa but was not proven to have any effects on sperm membrane function, sperm life span and sperm capacitation. Considering that L-arginine improved the sperm motility from asthenospermic subjects its usage may be recommended for assisted reproduction programs.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 215—218, 1992)

Introduction

Motility of spermatozoa is provided in the axial spiral complex of the tail¹⁾ by a sliding mechanism of the axonemal microtubules under the gripping action of the dynein arms²⁾. This produces contractions and relaxations in the tail, propelling the spermatozoon in a quasipurposeful manner³⁾. Considering that many factors affect the process of spermatozoal motility, research for the discovery of some pharmacological agents which improve sperm motility is always popular.

Several agents such as methylxanthines, kinins, prostaglandins, and L-arginine have been used to increase sperm motility. Although the mechanism of the action of methylxanthines, kinins, and prostaglandins on spermatozoa has been well

studied³⁾, there are many unknown aspects concerning the importance of L-arginine as a component of human seminal plasma. Aspartic acid, glutamic acid, threonine, tyrosine, lysine, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, cystine, serine, phenylalanine, histidine, and arginine, are amino-acids which have been confirmed to be components of human seminal plasma⁴⁾. They are considered to be essential for the sperm activity in the seminal plasma⁴⁾ and they are supposed to increase the sperm life span⁵⁾. Among the above mentioned amino-acids only L-arginine has been proven to increase human sperm motility both in *in vivo* and *in vitro* studies^{3,4,6)}. In *in vitro* studies the highest sperm motility was achieved when 4mM L-arginine concentration was used⁶⁾. Furthermore, in rats which

were fed an arginine-free diet a decrease in spermatogenesis resulted⁷. It has been suggested that arginine may be required in increased amounts in tissues with a high metabolic rate, like testis⁸.

Although L-arginine has been proven to enhance sperm motility of unwashed spermatozoa⁶, its effect on motility of washed spermatozoa has not been studied yet and its importance for human sperm capacitation and sperm membrane function remains unknown. The present study was undertaken to evaluate the effect of L-arginine on motility of washed spermatozoa, sperm membrane function, sperm life span and sperm capacitation.

Materials and Methods

Fifteen 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 80% normal morphology, less than 20% motile spermatozoa, and cell counts of 40×10^6 /ml or more.

Each sample was processed for swim-up washing procedure. The swim-up technique (using BWW medium⁸); described by Lee et al,⁹) was performed twice. The retrieved sperm pellet (0.3ml) of each sample was resuspended in 3.7ml of BWW medium containing human serum albumin (30mg/ml). The final sperm samples (4ml) consistently showed forward motility percentages over 5% and less than 30%, and normal sperm morphology more than 95%. Cell concentrations were more than 7×10^6 /ml in all the final sperm suspensions. Each of these solutions was incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ for two hours (the incubation period for each sample started 90 minutes after ejaculation). Subsequently each sample was halved and the resulting pairs were incubated for three hours under the same conditions, after mixing one sample of each pair with 4mM of L - arginine (highly purified; Ajinomoto-Takara Corporation, Tokyo, Japan; experimental sample). The other sample of each pair was used as control sample. At the end of the incubation period, both samples of each pair were tested for assessment of sperm motility (% motile spermatozoa). The acrosomal status of spermat-

ozoa was appreciated as described by Talbot and Chacon¹⁰. The percentage of dead spermatozoa (blue spermatozoa) was counted using Trypan blue stain. The percentage of acrosome-reacted spermatozoa was calculated. To perform Talbot's triple stain assay, 0.8ml of each sperm sample was used. Subsequently, the HOST was performed as described by Jeyendran et al. The hypoosmotic solution used was a mixture of equal parts of fructose solution (150 mOsm) and sodium citrate solution (150 mOsm) with an ionic strength of 0.15. A volume of 0.2ml of each sample was used for the HOST. Then, all the pairs of samples were incubated (under the same conditions) for an additional three hours period (starting time was considered to be the completion of 45 minutes after the end of the previous incubation period) in the presence of ionophore A23187 (A23187; Behring Diagnostics, La Jolla, USA) added to a final concentration of 10 μ M from a 10mM stock solution in dimethylsulfoxide. A23187 treatment was used as a method to induce acrosome reactions⁹. After the additional incubation period all pairs of samples underwent again Talbot's triple stain to assess the acrosomal status of spermatozoa. The percentage of scrosome reacted spermatozoa in each sample was calculated.

During the various tests all the samples were incubated under the same conditions.

Student's t-test for paired observations was used for statistical analysis of the differences in the percentage of motile spermatozoa, percentage of dead spermatozoa, percentage of swollen spermatozoa, and percentage of acrosome reacted spermatozoa between control samples and experimental samples before A23187 treatment or after it. A probability less than 0.05 was considered to be statistically significant. All the data was expressed as mean value \pm standard deviation.

Results

The percentage of motile spermatozoa was significantly higher in experimental samples than in control samples ($p < 0.05$; Table 1).

There was not significant difference in the percentage of acrosome-reacted spermatozoa between control samples and experimental sam-

Table 1 Sperm motility and life span, percentage of acrosome reacted spermatozoa, and outcome of the HOST^a in control and experimental samples^b

Samples (n = 15)	L-arginine	% motile spermatozoa	% dead sperm	% acrosome reacted spermatozoa A23187 ^c		Outcome of HOST
				-	+	
Control	-	21 ± 4 ^d	8 ± 3 ^d	10.8 ± 2.5 ^d	29.3 ± 3.9 ^d	48.5 ± 7.0 ^d
Experimental	+	35 ± 5 ^e	6 ± 3 ^d	11.6 ± 2.9 ^d	31.1 ± 4.1 ^d	51.2 ± 8.3 ^d

a HOST : Hypoosmotic swelling test.

b Values are expressed as mean ± SD.

c A23187 : Ionophore A23187.

d, e Within each column mean ± SD values sharing the superscript "d" are not significantly different ($p > 0.05$) whereas values not sharing the same superscript "d or e" are significantly different (d vs e : $p < 0.001$).

ples before A23187 treatment and after it ($p < 0.05$ in both cases).

There was not significant difference in the percentage of swollen or dead spermatozoa between control samples and experimental samples ($p < 0.05$ in both cases).

Discussion

Keller and Polakoski⁶⁾ reported that the addition of 4mM of L-arginine to unwashed semen samples significantly improved the motility of spermatozoa. However, since unwashed semen samples were used in their studies, it is unknown whether or not the positive effect of L-arginine on sperm motility is direct or it is mediated through chemical interactions of L-arginine with other components of seminal plasma forming new compounds that in turn affect sperm motility. In the present study a direct effect of L-arginine on sperm motility was revealed, since L-arginine was proven effective in increasing the sperm motility of washed spermatozoa. The beneficial effect of L-arginine on the motility of spermatozoa pooled from asthenospermic patients recommends its usage for artificial insemination programs. The enhancement of sperm motility can not be attributed to a better sperm membrane function because the difference in the outcome of the HOST between experimental and control samples was not significant. Additionally, it can not be attributed to prolongation of the spermatozoal life span, since there was not significant difference in the percentage of dead spermatozoa between experimental and control samples.

Although the mechanism of improvement of sperm motility after L-arginine treatment is almost unknown, the terminal guanidino group of L-arginine must be an essential requirement for its action since it was proven that D-arginine, L-ornithine, and arginine analogs do not affect sperm motility⁶⁾.

Considering that sperm capacitation is essential for the occurrence of acrosome reaction¹¹⁾ the absence of significant differences in the percentage of acrosome reacted spermatozoa after A23187 treatment between control and experimental samples indicates that L-arginine may not be involved in the pharmacological agents which induce sperm capacitation.

The absence of significant difference in the percentage of simultaneous acrosome reactions before A23187 treatment suggests that L-arginine does not induce acrosome reactions in capacitated spermatozoa.

To evaluate the mechanism of improvement in sperm motility after L-arginine treatment more studies are necessary. The report that arginine concentration in seminal plasma in men with normal sperm concentrations is greater than that in oligospermic or azospermic patients¹²⁾ recommends the L-arginine administration in oligospermic men with lower than normal seminal plasma L-arginine values.

In the present study a direct effect of L-arginine on sperm motility in asthenospermic samples was proven. In addition, a positive correlation between sperm motility and seminal plasma concentration of free arginine has been reported

by Tanimura⁴⁾. Therefore, it appears that L-arginine administration in asthenospermic patients may be helpful. More studies are necessary for this purpose.

References

- 1) Pedersen, H.: Observations of the axial filament complex of the human spermatozoa, *J. Ultrastructures*, 33: 451, 1970
- 2) Huxley, H. E.: Mechanism of muscular contraction, *Science*, 164: 1356, 1969
- 3) Paulson, J. D., Harrison, R., Schill, W. B. and Barkay, J.: Addition of pharmacological agents to the ejaculate. In "Clinics in Andrology" (Emperaire, J. C., Audebert, A., Hafez, E. S. E., ed.), The Hague, Martinus Nijhoff, Vol. 1, p71, 1980
- 4) Tanimura, J.: Studies on arginine on human semen, *Bull. Osaka Med. Sch.*, 13: 76, 1967
- 5) Tyler, A. and Tanabe, T.: Motile life of bovine spermatozoa in glycine and yolk-citrate diluents at high and low temperatures, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81: 367, 1952
- 6) Keller, D. W. and Polakoski, K. L.: L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro, *Biol. Reprod.*, 13: 154, 1975
- 7) Holt, L. E. and Albanese, A. A.: Observations on amino acid deficiencies in man, *Trans. Ass. Amer. Phys.*, 58: 143, 1944
- 8) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro. In "Methods in Mammalian Embryology" (Daniel, D. J., ed.), W. H. Freeman, San Francisco, p 101, 1971
- 9) Lee, M. A., Trucco, G. S., Bechtol, K. B., Wummer, N., Kopf, G. S., Blasco, L. and Storey, B. T.: Capacitation and acrosome reac-

tions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay, *Fertil. Steril.*, 48: 649, 1987

- 10) Talbot, P. and Chacon, R. S.: A triple stain technique for evaluating normal acrosomal reactions of human sperm, *J. Exp. Zool.*, 215: 201, 1981
- 11) Austin, C. R.: The capacitation of the mammalian sperm, *Nature*, 170: 326, 1952
- 12) Krampitz, G. and Doepfmer, R.: Determination of free amino-acids in human ejaculate by ion exchange chromatography, *Nature*, 194: 684, 1962

ヒト精子運動能, 膜機能, 寿命および受精能獲得におよぼす L-arginine の効果

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

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

原田 省 戸田稔子 見尾保幸

寺川直樹

精子無力症 15 例から採取した精液を Swim-up 法を用いて処理した後, L-arginine のヒト精子における運動能, 膜機能, 寿命および受精能獲得に対する効果を検討した. L-arginine は精子無力症患者の精子の膜機能, 寿命および受精能獲得に影響を与えなかったが, 精子運動率を有意に増加させた. このことから, L-arginine は男性不妊症治療への応用も可能と考えられた.
(受付: 1991 年 5 月 23 日)

実験的精巣障害に対するツムラ温経湯の効果

Effects of Tsumura Unkeito on Cyclophosphamide- Induced Testicular Disorder

東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室 (主任: 町田豊平教授)

白井 尚	池本 庸	町田 豊平
Takashi SHIRAI	Isao IKEMOTO	Toyohei MACHIDA
西田 篤	金子 立	中条 洋
Atsushi NISHIDA	Ritsu KANEKO	Hiroshi NAKAJYO

Jikei University School of Medicine Department of Urology,
Tokyo 105, Japan (Director: Prof. Toyohei Machida)

富士市立中央病院

上田 正山
Masataka UEDA

Fuji City Hospital, Shizuoka 417, Japan

サイクロフォスファミド (以下, CPMと略す) により作製した実験的精巣障害マウスに, 視床下部で LH-RH 分泌を促進するという温経湯を投与し, 以下の結果を得た.

- 1) CPMによる精巣重量, 精細管直径および精細管内総細胞数減少は温経湯の併用投与で, 処置終了2週後で軽減した.
- 2) 温経湯単独投与群は, 処置終了2週後で一時的に精巣重量は減少したが, 6週後には増加傾向を示した.
- 3) CPM単独投与群は, 処置終了2週後で gonadotropin の分泌促進がみられた. しかしCPMと温経湯の併用投与群, 温経湯単独投与では gonadotropin の分泌促進はみられなかった.

以上より, CPMによる実験的精巣障害は温経湯の併用投与により軽減され, その機序は温経湯の内分泌学的な作用でなく, 一時的な軽度精巣障害が造精機能賦活に有利に作用したほか, 温経湯の混合生薬が複雑に絡みあった結果と考えられた.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 219-226, 1992)

緒 言

男子不妊症に対する治療法には, 内分泌的療法と非内分泌的療法があるが, 一般には非内分泌的療法が第1選択として好ましい. 近年, 非内分泌療法剤として八味地黄丸, 補中益気湯などによる漢方治療が男子不妊症の治療に有用性をもつことが報告されているが^{1,2)}, その作用機序はいまだ不明である.

すでに, 我々は視床下部で LH-RH 分泌を促進す

ると言われる³⁾ツムラ温経湯(以下, TJ-106 と略す)による男子不妊症患者の治療効果を検討し, 比較的良好な成績を得たが⁴⁾, 今回は実験的にサイクロフォスファミド (以下, CPM) による精巣障害を作製し, ツムラ温経湯による障害抑制結果を検討した.

対象および方法

Balb/C 系雄性成熟マウスを使用し, 10 週齢(体重 27-31 g)まで飼育後, 以下の4群に分け, 各群10

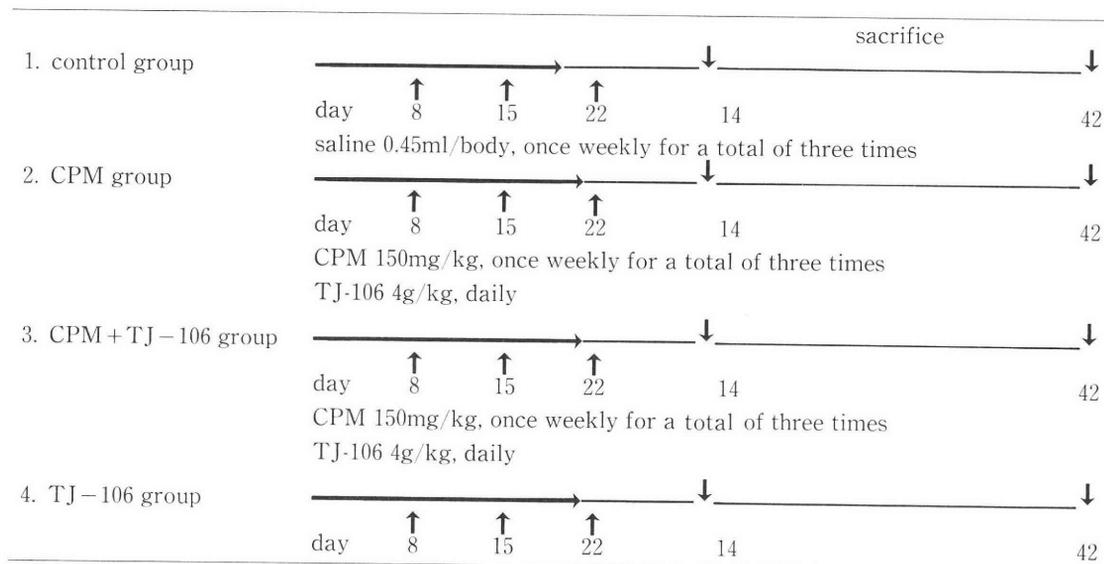


図1. 実験スケジュール

匹ずつとして実験を行なった (図1)。

1) 対照群

生食水 0.45ml を週1回, 計3回腹腔内注射。

2) CPM単独投与群

CPMを生食水に10mg/mlで溶解し, 150mg/kgを週1回, 計3回腹腔内注射。

3) CPMとTJ-106の併用投与群

上記CPM処置と同時に3週間連続, TJ-106 4g/kgを連日経口投与。

4) TJ-106単独投与群

3週間連続, TJ-106 4g/kgを連日経口投与。

各群処置終了後, 2週目, 6週目に各々5匹ずつ屠殺した。精巣障害および, その抑制効果の判定には精巣重量の計測と組織学的検索を行なった。組織学的には一側精巣はBouin液に固定, PAS-Hematoxylin染色して顕微鏡的に観察し, 各群で100精細管の精細管直径, 精細管内総細胞数を定量的に観察した。また, 生化学的には対側精巣は成熟精細胞に局在し, 造精能を反映する言われている lactate dehydrogenase-X (LDH-X)活性の測定に供した。すなわち, 摘出精巣をテフロンホモジェナイザーにてhomogenize後, 105,000 g, 60分冷却遠沈して得られたcytosol分画を一旦, -60°C で凍結保存した。1週以内に0.15mM α -ketovalarateを基質として補酵素に0.15mM NADHを用い, 試料100 μ lにPH 7.4, 0.05Mリン酸緩衝液を加えて全量3mlとし, 酵素反応で消費されたNADHの吸光度からLactate dehydrogenase-X (LDH-X)の活性を測定した。

結 果

1) 精巣重量の変化

体重100gあたりについて換算すると, 各群の精巣重量の変化は, 図2の如くになった。対照群に比しCPM単独投与群では処置終了2週後で28.1%と減少したが, 6週後には78.4%と自然回復した。一方, CPMとTJ-106の併用投与群では, 処置終了2週後で39.2%, 6週後では79.8%と, 2週後の精巣重量の減少はCPM単独投与群より有意に軽度であったが($P < 0.05$), 6週後では有意差はなかった。なお, TJ-106対独投与群では処置終了2週後で88.0%と一時的に減少したが, 6週後では109.3%と増加傾向を示した。

2) 精巣組織像の変化

各群処置終了2週後, 6週後の顕微鏡像は図3, 4に示す。処置終了2週後では, CPM単独投与群, CPMとTJ-106併用投与群ともに, 対照群にくらべ精細管直径の縮小および, ほとんど全ての成熟精細胞の消失を主体とした精細管内総細胞数の減少が見られた。また, 6週後でもCPM単独投与群, CPMとTJ-106併用投与群ともに, 対照群にくらべ精細管直径の縮小および, ほとんど全ての成熟精細胞の消失を主体とした精細管内総細胞数の減少が見られた。しかし, 顕微鏡上, 間質組織には変化は見られず, 間質内血管像の障害性変化も見られなかった。そしてCPM単独投与群, CPMとTJ-106併用投与群ともに処置終了6週後では2週後に比し精細管直径,

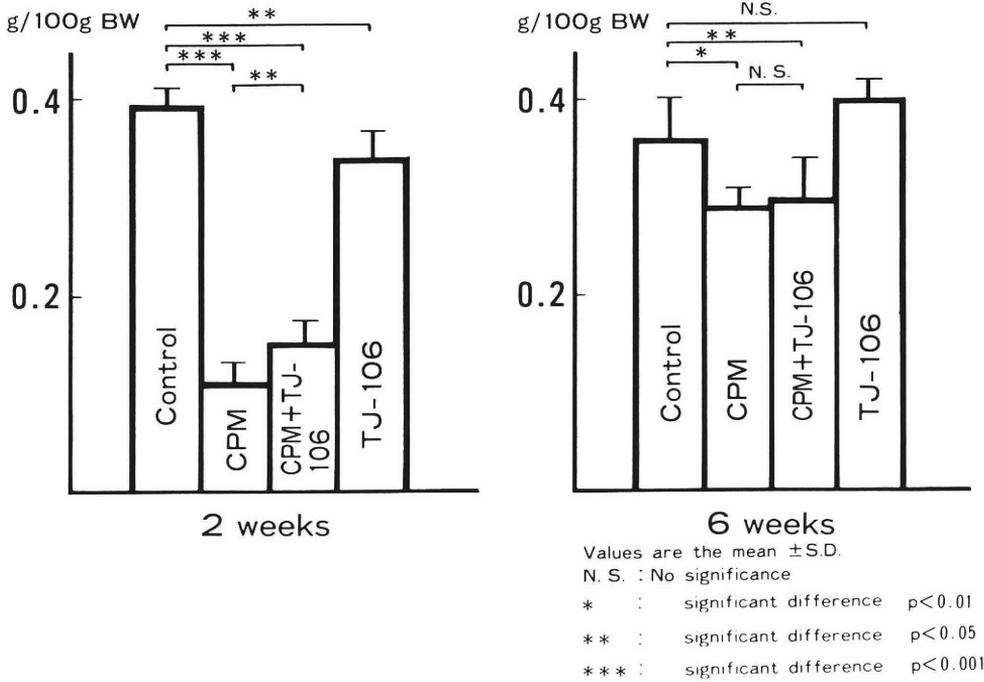


図2 CPM, TJ-106 処置が精巣重量に及ぼす影響

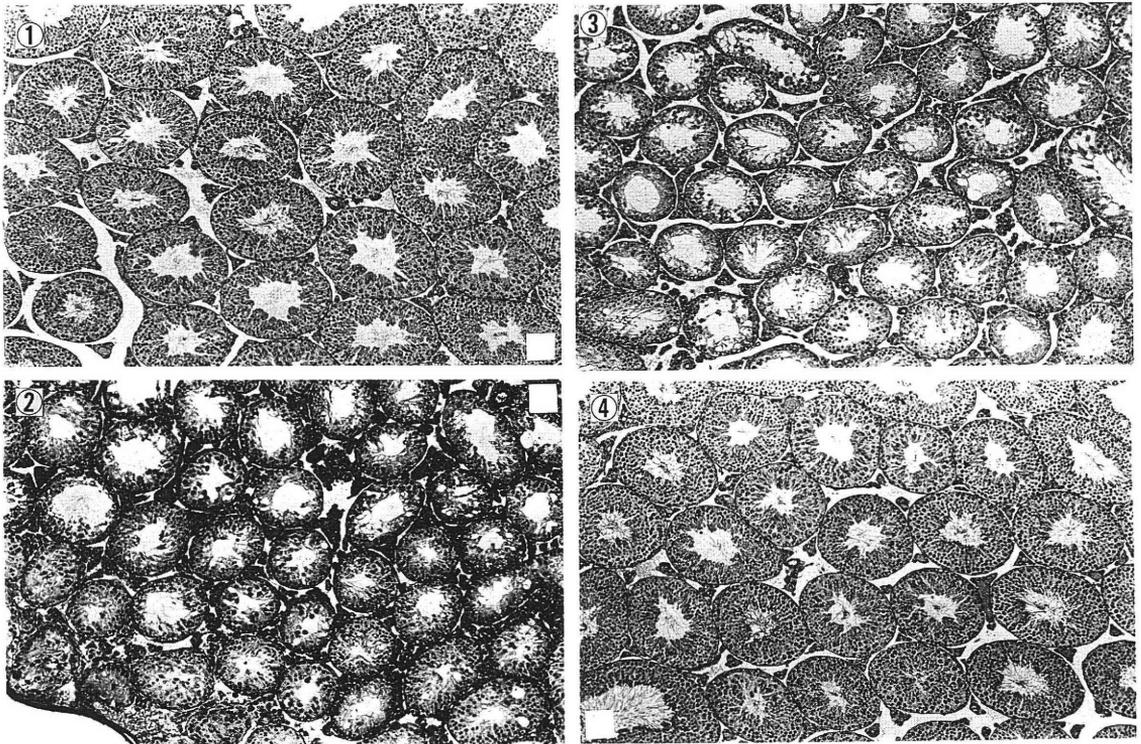


図3 処置終了2週後の精巣光顕像

① control group ② CPM group ③ CPM+TJ-106 group ④ TJ-106 group

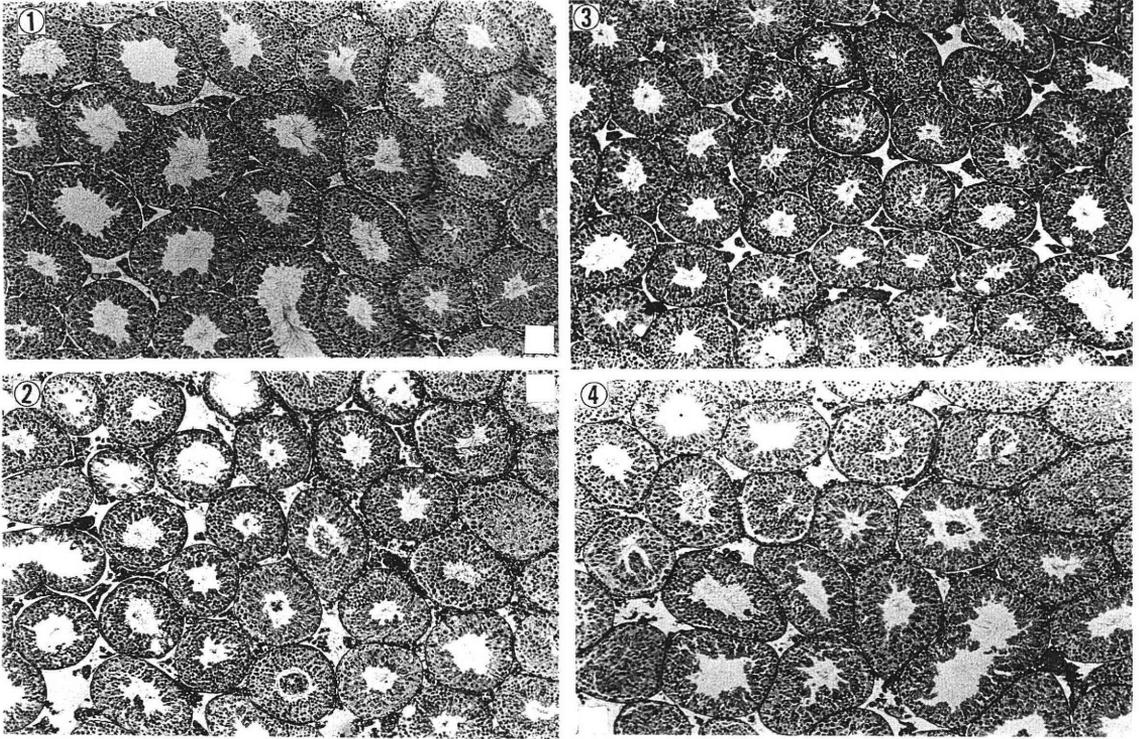
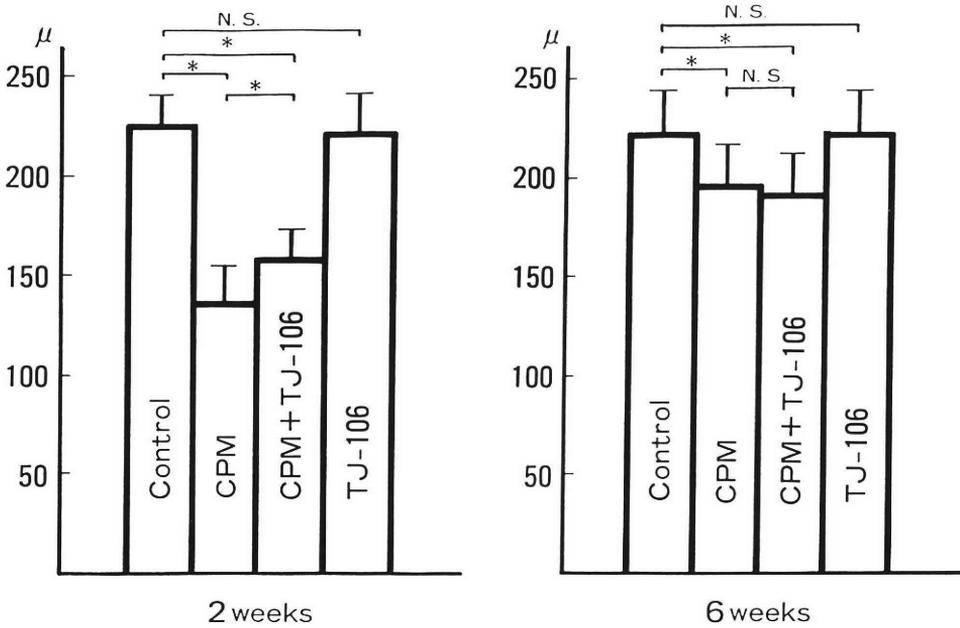


図4 処置終了6週後の精巣光顕像

① control group ② CPM group ③ CPM+TJ-106 group ④ TJ-106 group



Values are the mean ± S.D.
 N. S. : no significance
 * : significant difference p<0.001

図5 CPM, TJ-106 が精細管径に及ぼす影響

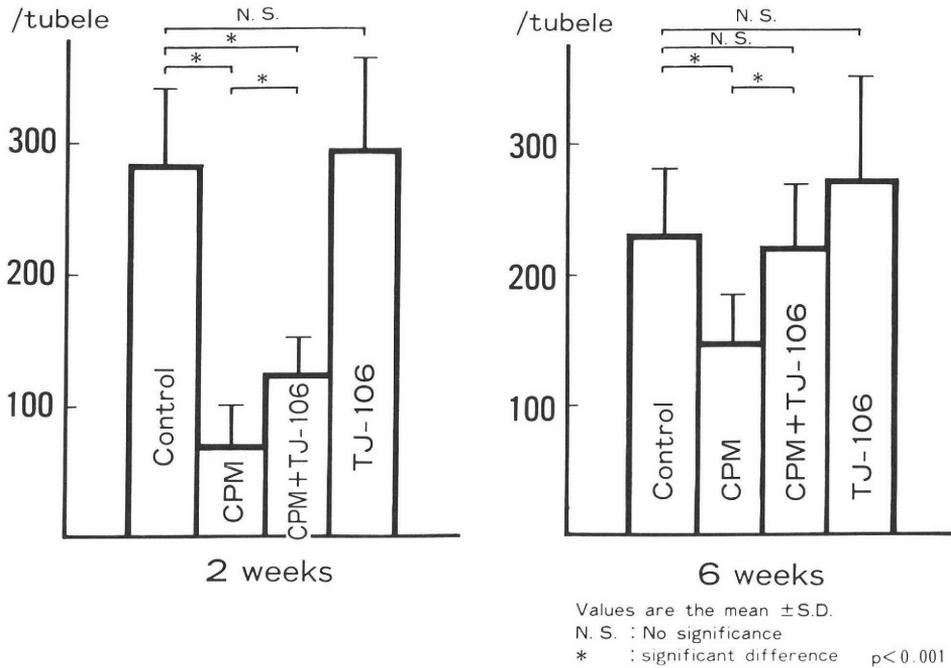


図6 CPM, TJ-106 が精細管内 細胞数に及ぼす影響

精細管内総細胞数ともに改善傾向を示した。一方、TJ-106 単独投与群では精細管直径、精細管内総細胞数の変化は見られず、間質にも変化はなかったが、精巣障害を示す sloughing が見られた。

次に組織定量的にこれらを分析した。精細管直径の各群での変化を図5に示す。処置終了2週後でCPM単独投与群の精細管直径は対照群の60.3%に縮小した、しかしCPMとTJ-106併用投与群では、70.9%とCPM単独投与群に比し有意に縮小軽度であった(P<0.001)。6週後ではCPM単独投与群の精細管直径は対照群の88.4%まで自然回復した。また、CPMとTJ-106併用投与群では、86.9%とCPM単独投与群ともに有意差はなかった。なお、TJ-106単独投与群は処置終了2週後で99.4%、6週後で100.4%と、対照群と有意差はなかった。

精細管内総細胞数の各群での変化を図6に示す。処置終了2週後でCPM単独投与群の精細管内総細胞数は対照群の24.8%と減少し、CPMとTJ-106併用投与群では、43.7%とCPM単独投与群より有意に減少軽度であった(P<0.001)。6週後ではCPM単独投与群の精細管内総細胞数は64.4%まで自然回復した。一方、CPMとTJ-106併用投与群では、96.6%と回復は有意に良好であった(P<0.001)。なお、TJ-106単独投与群は処置終了2週後で対照群の103.1%、6週後では117.7%と増加傾向を示した。

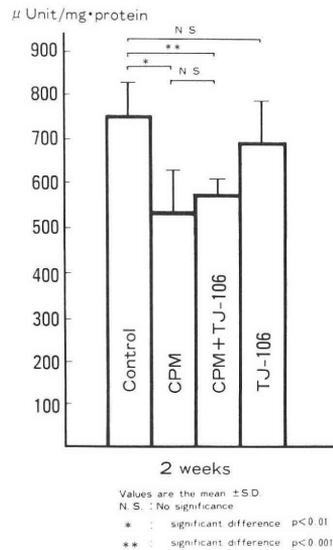


図7 CPM, TJ-106 がLDH-X 活性に及ぼす影響

た。

3) 精巣内 LDH-X 活性の変化

各群処置終了2週後での精巣内LDH-X活性は図7の如くである。CPM単独投与群のLDH-X活性は対照具の71.4%と低下したが、CPMとTJ-106併用投与群でも76.4%であり、CPM単独投与群とCPMとTJ-106併用群間に有意差はなかった。また、TJ-106単独投与群では対照群の92.2%と減少した

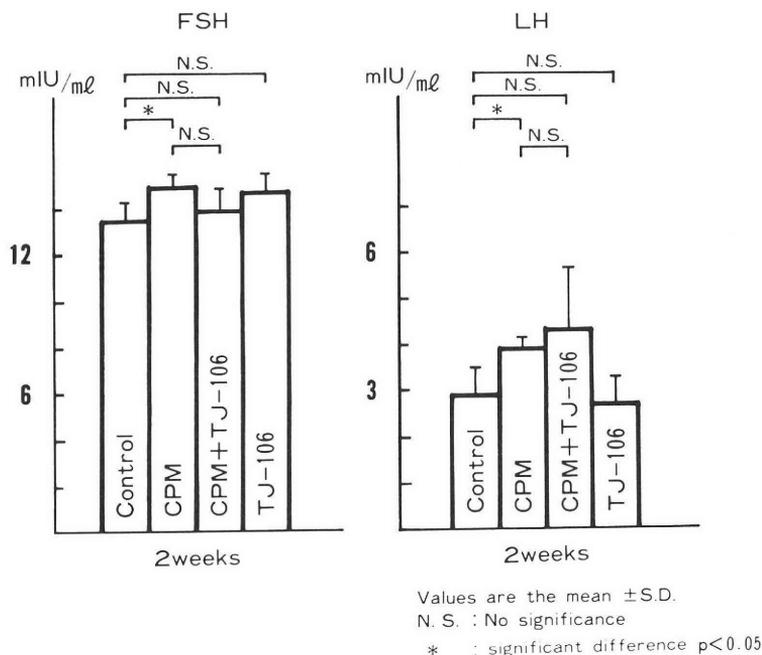


図8 CPM, TJ-106が血清FSH, LH値に及ぼす影響

が、有意ではなかった。

4) 血中 LH, FSH 値の変化

各群処置終了2週後での血中 LH, FSH 値は図8に示した。FSH値は対照群 13.38 ± 0.78 (M \pm S D) ng/ml, CPM単独投与群 14.72 ± 0.62 ng/mlとCPM単独投与群で有意に上昇した ($P < 0.05$)。しかし、TJ-106単独投与群では 14.53 ± 0.87 ng/mlと上昇傾向がみられたが、有意ではなかった。また、CPMとTJ-106併用投与群では 13.88 ± 0.94 ng/mlとCPM単独投与群との間に有意差はなかった。LH値は対照群 2.87 ± 0.59 ng/ml, CPM単独投与群 3.86 ± 0.23 ng/mlとCPM単独投与群で有意に上昇した ($P < 0.05$)。しかし、TJ-106単独投与群では 2.65 ± 0.56 ng/mlと変化がみられなかった。また、CPMとTJ-106併用投与群では 4.28 ± 1.33 ng/mlとCPM単独投与群より上昇傾向がみられたが有意ではなかった。

考案

温経湯は12種の生薬成分よりなる混合薬で、表1のように薬効別に4群に分けられる。これらのうち、LH-RH分泌を促進させる効果があるものは、婦人科疾患に有用な牡丹皮とされている³⁾。しかし、その作用機序は他の生薬と複雑に絡み合い、解明はできていないように思われる。臨床的に温経湯は婦人科領域で排卵障害や不妊症治療薬として近年注目され、

表1 温経湯の成分

I. 全身性疾患の薬物	
①桂皮(ケイヒ).....	2 g
②甘草(カンゾウ).....	2 g
③人参(ニンジン).....	2 g
④麦門冬(バクモンドウ).....	4 g
⑤呉茱萸(ゴシュユ).....	1 g
II. 産婦人科疾患の薬物	
⑥芍薬(シャクヤク).....	2 g
⑦川芎(センキュウ).....	2 g
⑧当帰(トウキ).....	3 g
⑨牡丹皮(ボタンピ).....	2 g
III. 消化器疾患の薬物	
⑩生姜(ショウキョウ).....	1 g
⑪半夏(ハンゲ).....	4 g
IV. 出血性疾患の薬物	
⑫阿膠(アキョウ).....	2 g

田坂ら³⁾により成熟雌性ラットにおいて視床下部よりLH-RH分泌を促進させる事がin vitroの実験で証明されている。久具ら⁵⁾は温経湯にはラット下垂体前葉細胞系のLH-RH感受性増加作用があり、これによりゴナドトロピンの分泌が促進されるのであろうと報告している。さらに、朝海ら⁶⁾は続発性無月経患者に温経湯を投与し、投与後のゴナドトロピンの反応性から、下垂体への直接作用の存在を示唆してい

る。そこで、我々は温経湯のLH-RH分泌促進作用および下垂体への作用に注目し、男子不妊症にクエン酸クロミフェンと同様な効果が期待できると考え、臨床的に使用したところ良好な成績を得た⁴⁾ので、今回は実験的にC P Mによる精巣障害を作製し温経湯の障害抑制効果を検討した。

今回の我々の実験で、C P Mと温経湯併用投与群では、C P M単独投与群と比較して、精巣重量、精細管直径ならびに精細管内総細胞数において処置終了2週後で有意に障害は軽度となり、成熟精細胞の障害程度と相関して変化するLDH-X活性も、2週後では前者が高値を示す傾向が見られた。さらに、C P M単独投与では精巣障害による視床下部、下垂体系へのfeedback作用からgonadotropinの分泌促進がみられたのに対し、C P Mと温経湯の併用投与ではgonadotropinの分泌促進がみられないことから、温経湯はC P Mによる実験的精巣障害を軽減することが解明した。しかし、その機序については温経湯単独投与でゴナドトロピン値の上昇が認められなかったことから、我々が期待した内分泌学的な作用機序によるものでないと考えられた。

温経湯単独投与群では、対照群と比較し精巣重量は処置終了2週後に一時的に減少したが、6週後には増加傾向を示し、精細管内総細胞数も2週後では変化がみられなかったが、6週後には増加傾向を示した。また、LDH-X活性も2週後に対照群より低値を示したことから、温経湯の作用機序は一時的に軽度の精巣障害を来し、これを契機にrebound現象が起き造精機能が賦活された可能性があると考えられた。さらに、C P Mと温経湯併用投与群ではC P M単独投与群に比べ精巣障害が抑制された機序は、実験的に停留精巣モデルを作製後、2,5-Hexanedioneを投与し、後に陰嚢内に精巣を固定すると、2,5-Hexanedioneを単に投与した時に比べ精巣障害が軽減される⁷⁾のと同様と考えられた。すなわち、温経湯投与による軽度の精巣重量減少が精巣内血流を減少させ⁸⁾、精巣内に到達するC P Mが減少して精巣障害が軽減したと考えられた。また、その他には温経湯の構成生薬の人参、桂皮、芍薬、牡丹皮、川芎、当归、阿膠には血液循環改善作用が認められており、これが精巣および副性器の血流を改善し、精巣障害を抑制する。甘草、人参の cortisol 分泌作用促進作用および甘草、桂皮、芍薬、牡丹皮の抗ストレス作用も精巣障害を抑制する方向に作用したとも考えられた。また、人参には蛋白、脂質、DNA合成促進作用も認められており、これも精巣障害抑制に有利に作用したと考えられた。

今後、精巣への直接作用をさらに検討していく必要があるが、どの生薬が精巣障害に有利の作用したかを特定することは困難と思われる。臨床的には、婦人科領域でクロミフェン無効の無排卵症に、温経湯、クロミフェン併用療法で排卵が誘発されるとの報告⁹⁾も見られ、男子不妊症でも検討していく予定である。

(本論文の要旨は第33回日本不妊学会総会において発表した。)

稿を終えるにあたり、本研究の内分泌学的検討を終始御懇篤な御指導、御協力を賜った、群馬大学内分泌研究所若林克巳教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 吉田英機：男子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）：12，1981
- 2) 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，日不妊誌，29：458，1984
- 3) 田坂慶一，三宅 侃，大塚志郎，吉本泰弘，青野敏博，谷澤 修：温経湯のLH-RH分泌促進作用，日産婦誌，37：2821，1985
- 4) 池本 庸，町田豊平，小寺重行，御厨裕治，白井尚：ツムラ温経湯のよる特発性乏精子症の治療，日不妊誌，33：1010，1988
- 5) 久具宏司，林 直樹，武谷雄二，水野正彦：ラット下垂体前葉細胞培養系における温経湯のgonadotropin分泌刺激作用，日不妊誌，32：577，1987
- 6) 朝海 怜，岡田紀三男，左雨秀治，坂本 忍，小畑英介，岡本良平：漢方薬投与の内分泌的検討—温経湯による短期的無月経治療の試み—，日不妊誌，29：419，1984
- 7) Boekelheide, K., Eveleth, J. and Hall, S. J.: Experimental Cryptorchidism Protects Against Long-Term 2, 5-Hexanedione-Induced Testicular Germ Cell Loss in the Rat, J. Andrology, 11: 105, 1990
- 8) Setchell, B. P. and Galil, K. A. A.: Limitations imposed by testicular blood flow on the function of Leydig cells in rats in vivo, Aust. J. Biol. sci., 36:285, 1983
- 9) 吉本泰弘，三宅 侃，田坂慶一，谷澤 修，青野敏博：Clomiphene無効の無排卵症に対する温経湯—Clomiphene併用効果，産婦人科漢方研究のあゆみ，V：40，1988

Effects of Tsumura Unkeito on cyclophosphamido-induced testicular disorder

Takashi Shirai, Isao Ikemoto,
Toyohei Machida, Atsushi Nishida,
Ritsu Kaneko and Hiroshi Nakajyo

Jikei University School of Medicine
Department of Urology, Tokyo 105, Japan
(Director: Prof. Toyohei Machida)

Masataka Ueda

Fuji City Hospital,
Shizuoka 471, Japan

The effects of oral "Unkeito," which is reported to stimulate LH-RH release from the hypothalamus, were studied in mice with an experimental testicular disorder induced by cyclophosphamide (CPM). The following results were obtained.

(1) Treatment with Unkeito significantly inhibited decreases in the weight of the testes, the diameter of the seminiferous tubules, and the total number of

cells in the seminiferous tubules, as compared with a control group treated with CPM only; these parameters were evaluated 2 weeks after completion of the treatment.

(2) In mice which received Unkeito alone, the weight of the testes was reduced temporarily at 2 weeks after completion of the treatment, but tended to increase after 6 weeks as compared with testes weight in the control group.

(3) The group treated with CPM alone showed greater stimulation of gonadotropin release at 2 weeks after completion of the treatment.

In contrast, this stimulation was not observed in either the group treated with CPM and Unkeito or in the group administered Unkeito alone.

These results indicated that Unkeito treatment inhibited the experimental testicular disorder induced by CPM. We assumed that the mechanism did not involve any endocrinological effects of Unkeito, but that the temporary mild testicular damage worked favorably to activate spermatogenesis, and components of Unkeito promoted this activity.

(受付: 1991年9月26日特掲)

凍結保存精子の受精機能

第3報 Triple stain 法による AR の変化及び Computed Semen Autoanalyzer による解析

Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Human Spermatozoa

東北大学医学部産科婦人科学教室

吉田仁秋	深谷孝夫	村木章
Hiroaki YOSHIDA	Takao FUKAYA	Akira TSUIKI
戸沢秀夫	萬代泰男	村上節
Hideo TOZAWA	Yasuo MANDAI	Takashi MURAKAMI
陳偉業	千田定則	田村みどり
Wai Ip CHAN	Sadanori CHIDA	Midori TAMURA
	矢嶋聰	
	Akira YAJIMA	

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

目的：凍結融解前後の精子受精機能を Triple Stain 法による AR の検索及び精子自動解析装置を用いて検討した。方法：凍結保存は保存液に KS-II 液を使用し、Program-freezer により凍結後液体窒素中に保存した。2～12 週間の保存後融解し、一般精液検査を施行し、ARtest 及び精子自動解析装置による分析を行った。結果：1) 凍結融解前後の平均蘇生率は A) B) 群が C) 群より低い傾向を認めた。2) 凍結前後の平均 AR 率は、凍結前で 22.3 ± 16.3 (M \pm S D) % 凍結後では 24.5 ± 21.3 % と有意な差は認めなかった。3) A) B) C) 各群の比較でも凍結後にやや上昇する傾向を認めるが有意差をみとめなかった。4) 精子自動解析装置による分析では LHD 以外は凍結後に有意に低下したが、受精機能には変化の無い事が示唆された。5) A) B) C) 各群の比較では有意の差を認めなかった。

以上の結果より凍結融解後の AR 率に変化を認めず、精子自動解析装置による検討でも凍結後の受精機能に変化を認めなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 227—231, 1992)

緒言

凍結保存精子の臨床応用は、欧米では多くの施設で AID や IVF に利用されている。しかし実際の凍結後の受精機能の評価に関しては今だ十分になされているとは言い難い。現在まで我々は凍結保存精子の受精機能を、頸管粘液を用いた精子運動機能試験

Bovine cervical Mucus Penetration test (以下 BMP test), Zona free Hamster ova Sperm penetration test (以下 ZSPT), Hypoosmotic Swelling Test (以下 HOS test) 等を施行し、凍結保存精子の有用性を受精機能の面から判定し報告してきた^{1,2)}。そこで今回我々は、凍結前後の精子受精機能を Triple stain 法による Acrosome Reaction (以下 AR) の

変化及び精子自動解析装置を用いて評価し、更に今までの凍結前後の受精機能試験の結果を総合的に評価したので報告する。

対象及び方法

研究対象は正常及び不妊症患者126名より採取した精液である。精液採取後37°Cで30~60分間静置し液化させ、半量は一般精液検査をした後ARtestを施行し、残量は凍結保存用とした。前回同様^{1,2)}凍結前の精子濃度により、A) 20×10⁶/ml未満 B) 20~40×10⁶/ml C) 40×10⁶/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

精子は凍結保護剤にKS-II液を用い、0.5mlストロー管に注入し、凍結を開始した。凍結方法はprogram freezerを使用し段階的に行った。即ち室温より-5°C/minで冷却し、-5°Cで10分間holdした後、10°C/minで-80°Cまで凍結後、更に5分間holdして、液体窒素中に保存した^{1,2)}。融解は37°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、ARtest及びSemen Autoanalyser (HTM-2030)にて解析を行った。

2) Triple-stain法によるARの検索

Triple-stain法はTalbot³⁾らの方法に準じて行った。

a) 第1段階の染色

新鮮精液及び凍結保存精液は、洗浄処理後37°Cで15分間2% trypan blue液で染色した。余剰のtrypan blue液を洗浄後、3% glutalaldehydeで固定し、蒸留水で水洗し、自然乾燥させた。

b) 第2段階の染色

0.4% Bismarkbrown Y (pH 1.8)液で40°C 5分間染色後、蒸留水にて洗浄後乾燥させた。

c) 第3段階の染色

続いて0.8% Rose Bengal (pH 5.3)液で25°C 20分間染色を行い水洗後乾燥させた。検体を1000倍にて鏡検し、100~400の精子を観察しAR率を求めた。

3) 精子自動解析装置による凍結前後の比較

凍結前及び凍結融解後の精液179例について、精子自動解析装置 (Computerized Semen Autoanalyser HTM-2030)にて精子濃度、運動率を算出し、更に現在受精機能と関係していると推測されている以下の5項目について凍結前後で比較検討した。: 1) mean velocity (mic/sec), 2) mean Lat-

表1 凍結前後の運動率の比較

(×10 ⁶ /ml)	凍 結 前		凍 結 後		蘇 生 率	n
	Count (×10 ⁶ /ml)	Motility (%)	Count (×10 ⁶ /ml)	Motility (%)		
(A) 0~20	11.6±5.70	41.9±14.3	11.2± 9.9	21.7±21.5	46.6±45.3	46
(B) 20~40	35.3±34.7	48.6±14.5	14.7±19.4	27.8±24.5	51.1±43.4	52
(C) 40~	87.6±37.5	61.2±17.2	39.4±30.0	40.9±21.7	63.5±29.4	116
Total	68.2±45.7	56.5±18.1	30.5±28.6	35.4±23.2	59.3±35.4	214

(M±SD)

表2 凍結融解前後のAcrosome Reactionの比較

(×10 ⁶ /ml)	UR		R	
	Fresh	Post thaw	Fresh	Post thaw
(A) 0~20	28.04±14.08	21.56±8.54	16.46±13.30	19.67±18.86
(B) 20~40	25.30±12.41	21.17±8.89	24.70±14.26	28.78±21.11
(C) 40~	24.32±17.80	21.79±10.26	24.76±19.29	25.29±24.59
Total	25.65±15.59 (n=82)	21.48±8.98 (n=50)	22.32±16.80 (n=82)	24.52±21.30 (n=50)

UR: ARを起こさなかった群。R: ARを起こした群

表3 Semen Autoanalyzer による凍結前後の比較

($\times 10^6/ml$)	mean velocity (mic/sec)		mean LHD (mic/sec)		mean lineality (%)		prog. motility (%)		mean Frequency (Hz)	
	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後
A	35.93 ± 5.68	28.85 ± 12.43	2.42 ± 0.85	2.82 ± 2.15	61.73 ± 14.21	50.46 ± 18.56	29.33** ± 19.81	15.69 ± 12.59	5.55* ± 1.55	3.77 ± 1.77
B	34.70** ± 8.95	23.63 ± 11.25	3.03 ± 0.99	2.89 ± 1.53	64.20 ± 7.24	49.13 ± 22.05	28.10 ± 21.18	15.75 ± 13.34	11.37 ± 20.63	3.16 ± 1.78
C	36.93 ± 832	32.63 ± 15.21	3.55 ± 121	3.08 ± 164	58.14 ± 716	49.75 ± 18.18	53.25* ± 21.40	22.75 ± 12.99	4.86* ± 083	3.19 ± 177
Total	36.15* ± 7.62 (n=105)	28.87 ± 13.34 (n=73)	3.16 ± 1.20 (n=105)	3.01 ± 1.75 (n=73)	60.29* ± 9.63 (n=105)	50.36 ± 18.29 (n=73)	42.27* ± 23.83 (n=105)	18.13 ± 12.60 (n=73)	6.22** ± 8.83 (n=105)	3.29 ± 1.64 (n=73)

* (P<0.01) ** (P<0.05)

eral Head Displacement (LHD mic), 3) mean lineality (%), 4) progressive motility (%) 5) mean frequency (Hz)

結 果

1) 凍結後の精子蘇生率

<表1>は、凍結前融解後のA) B) C) 各群での精子濃度、運動率及び蘇生率を示したものである。A) B) 群の乏精子症では融解後の蘇生率が、C) 群の正常群に比べ低下する傾向を認めた。

2) 凍結前後のAR率の比較

凍結前のAR出現率は $22.3 \pm 16.8\%$ 、凍結融解後では $24.5 \pm 21.3\%$ であった<表2>。各群とも凍結後に上昇する傾向を認めるが、有意の差は認められなかった。更にA) B) C) 各群間の比較でAR出現率に差を認めなかった。

3) 精子自動解析装置による凍結前後の比較

受精機能と関連があると推測されているパラメータの凍結前後の値を示した<表3>。表の如くmean LHD, mean velocity 以外のパラメータは、凍結融解後にそれぞれ有意に低下していた。更にA) B) C) 各群の比較では差を認めなかった。

考 察

現在の一般精液検査は、男性の妊孕力を推定する上で、受精機能を直接反映するものとは言い難い。この受精機能を客観的に評価するため様々な検査が最近開発され、臨床応用され始めている。

Acrosome Reaction (AR) は、正常では射出後2.5時間より開始し、5~7時間でピークを迎え、全体の60~75%の生存精子のうち約20~25%がARを起こすと報告されている³⁾。更に顆粒膜細胞やヒト未受精卵との供培養でAR率が上昇すると報告され^{4,5)}、受精現象のステップの中で重要な一役を担っ

ていると推察される。最近、acrosin specific monoclonal 抗体を用いたARの電顕的観察による受精現象の新しい概念が明らかとなった⁶⁾。即ち頸管粘液と子宮腔を通過した精子は卵管内に到着後、Capacitationを完了するまで少量のacrosinを放出し、その後透明帯と接合して初めてacrosinを大量に放出し、Acrosome Reactionを開始するとしている。

今回我々は、この受精現象と結びついたARの出現率とSemen Autoanalyzerによる分析を凍結前後で検索した。AR testの結果では、凍結後にやや上昇傾向を認めるが、凍結前後の平均AR出現率に変化を認めず、更にA) B) C) 各群に於いても有意差を認めなかった。これは即ち凍結によるAcrosomeの消失を増強させるのではなく、むしろAR率が凍結融解後僅かに上昇する事から、原形質は正常な構造を保ち、Capacitationが出現したと考えられる。この結果はPilikian⁷⁾らの報告と一致した。更にIVF時のAR出現率を、受精した群と受精しなかった群とを比較した我々の研究では⁸⁾、両者に差を認めずDeJonge⁹⁾らの報告と一致した。このことはARそのものが受精率を左右するのではなく、20%前後のAR出現率が得られれば凍結後でも受精率を充分維持できると推察される。

精子自動解析装置は最近多くの施設において用いられ、一般精液検査と良く相関しているが、 $5 \sim 10 \times 10^6/ml$ 以下ではdebrisを精子と区別できず、誤差が生じてしまうと報告されている^{10,11)}。更にどのパラメータが受精機能と関連しているのかは今だ明確ではない。Sandler¹²⁾やGrunert¹³⁾らの報告では、IVF時の卵の受精率と対比させた結果、自動解析装置で受精率に差が認められたものは、motility, lineality, LHD等であったとしている。更にLHDが、2.8 mic以上で90%が受精していた事実により、LHDが最も受精と関係が深いとしている。同様に

Holt¹⁴⁾らの報告では、I V F時に於いて Velocity が 25~30 mic/sec 以上で受精率が高くなるとしている。更に Check¹⁵⁾らの報告では新しい指標として、SLVMD (Straight-line velocity motile density) を受精率の予知に役立つとしている。凍結前後の結果では LHD, Velocity 以外は凍結後に有意に低下したが mean LHD は 2.8 mic 以上、Velocity も 30 mic/sec 以上という結果により、凍結後でも受精能力は充分保持されていると推測される。

これまで凍結保存精子の受精現象を様々な受精機能試験を利用して施行してきたが、どの機能検査を用いても凍結後でも充分受精機能は維持されている事が判明した。しかし乏精子症患者では BMPtest や ZSPT では受精能の低下を認め、臨床応用の際に工夫が必要であると考えられる。

今後凍結精子はますます臨床応用されると推測されるが、AR や精子自動解析装置による分析では、乏精子症患者でも凍結保存後の受精率に変化を与えなかった。この結果はこれまでの受精機能試験とは異なり、乏精子症患者にも受精能力の可能性を与えた事になり、今後の研究を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) 吉田仁秋他：凍結保存精子の受精機能第2報—HOS test を中心にして—，日不妊会誌，37：157，1992
- 3) Talbot, P. and Chacon, R. S.: A Triple-Stain Technique for Evaluating Normal Acrosome Reactions of Human Sperm, *J. Exper. imental Zoology*, 215: 201, 1981
- 4) VanKooij, R. J., et al.: Oocyte Penetration and Acrosome Reaction of Human Spermatozoa I: Influence of incubation Time and Medium Composition, *Andrologia*, 18: 152, 1986
- 5) Siiteri, J. E., et al.: Human Sperm Acrosome Reaction-Initiating Activity Associated With the Human Cumulus Oophorus and Mural Granulosa Cells, 246: 71, 1988
- 6) Tesarik, J.: Subcellular immunochemical localization of acrosin in human sperm atozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration, *Fertil. Steril.*, 50: 133, 1988
- 7) Pilikian, S. and Guerin, J. F.: Acrosomereacing capacity of frozen-thawed human semen: relationn to hamster ova penetration, *J. Androl.*, 16: 209, 1986
- 8) 吉田 仁秋他：HOS test—我々の行っている方法，産婦治療，62：1991，登載予定
- 9) DeJonge, C. J., Rawlins, R. G., et al.: Induction

of human sperm acrosome reaction by human oocytes, *Fertil. Steril.*, 50: 949, 1988

- 10) Knuth, U. A. and Nischlag, E.: Comparison of computerized semen analysis with the conventional procedure in 322 patients, *Fertil. Steril.*, 49: 881, 1988
- 11) Mahony, M. C., Alexander, N. J., Swanson, R. J.: Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers, *Fertil. Steril.*, 49: 876, 1988
- 12) Sandler, B., et al.: The Amplitude of Lateral Head Displacement (AHL) Correlates with Human In Vitro Fertilization, 88' Anual meeting of American Fertility Society, P095 Abstracts, S75, 1988
- 13) Gruent, J. H., et al.: Does Computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen an alysis for in-vitro fertilization results? *Int. J. Andrology*, 12: 329, 1989
- 14) Holt, W. V., Moore, H. D. and Hillier, S. G.: Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 44: 112, 1985
- 15) Check, J. H., et al.: Correlation of computerized semen analysis with sucessful fertilization of oocytes in an in vitro fertilization program, *Archives of Andrology*, 24: 229, 1990

Fertilizing capacity of fresh and frozen human spermatozoa

Hiroaki Yoshida, Takao Fukaya,
Akira Tsuiki, yasuo Mandai,
Takashi Murakami, Wai Ip Chan,
Sadanori Chida, Midori Tamura
and Akira Yajima

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

Frozen semen is now being used clinically, but the fertilizing function of after thawed semen has not yet been evaluated adequately. We attempted to evaluate the fresh and frozen semen fertilizing capacity and investigated the changes in frozen sperm functions. The collected semen was evaluated by AR-test and also by computed semen autoanalyzer (HTM-2030). The freezing medium used was KS-2 solution and in this method we used the programfreezer (CRYO-10). The semen samples were classified into 3 groups on the basis of sperm count results in semen analysis before freezing. 1)

In group A) and B) there was low values in the recovery rate. 2) There was no significant difference between fresh and frozen spermatozoa in the AR-test. 3) There was tendency to an increase in AR rate in after frozen semen, but there was no difference in each groups. 4) In the analysis of semen autoanalyzer, there was low values except for LHD and mean velocity. But it is suggested that

this does not change the fertilizing function of after thawed semen. 5) There was no significant difference in each groups by the semen autoanalyzer.

We could demonstrated that there was no reduction in fertilizability following freezing through the AR-test and semen autoanalyzer.

(受付：1991年5月21日)

体外受精・胚移植時の精子処理における3層 Percoll 密度勾配法の有用性について—Swim up 法との比較検討—

Evaluation of Three-layer Percoll Gradient Method for Semen Manipulation in IVF-ET

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

谷川正浩	蓮佛千恵子	高尾成久
Masahiro TANIKAWA	Chieko RENBUTU	Naruhisa TAKAO
池成孝昭	関島秋男	岩部富夫
Takaaki IKENARI	Akio SEKIJIMA	Tomio IWABE
大野原良昌	寺戸博文	戸田稔子
Yoshimasa OONOHARA	Hirohumi TERADO	Toshiko TODA
原田省	見尾保幸	寺川直樹
Tasuku HARADA	Yasuyuki MIO	Naoki TERAKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

ヒト体外受精・胚移植 (IVF-ET) 時に3層 Percoll 密度勾配法 (Percoll 法) を用いて精子処理を行い、その有用性を Swim up 法との比較により検討した。原精液所見をWHOの定めた精子濃度 $20 \times 10^6 / \text{ml}$ 、精子運動率 50% を基準として4群に分類し、精子処理後の運動精子回収率、運動率改善度、精子前進運動スコア (forward progression score, FP スコア) 改善度、受精・分割率、そして胚移植時の分割球数を求めた。運動精子回収率と運動率改善度は、いずれの群においても Pwecoll 法と Swim up 法の間には差を認めなかった。しかしながら精液所見不良群の精子 FP スコア改善度は、Percoll 法においてより良好な成績を示した。原精液所見において精子濃度 $20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下、精子運動率 50% 以下の群では Percoll 処理後の受精率、分割率そして分割球数は有意に高く、妊娠例も得られた。IVF-ET に際して、精液所見不良群の精子処理法として Percoll 法の有用性が示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 232-236, 1992)

緒言

ヒト体外受精・胚移植 (IVF-ET)、配偶者卵管内移植 (GIFT)、配偶者間人工受精 (AIH) のための精子処理法として Swim up 法が広く用いられている。鳥取大学医学部産科婦人科の IVF-ET プログラムにおいても、従来より Swim up 法を採用して良好な受精・分割率を得てきたが^{1,2)}、乏精子症例においては、受精率、分割率ともに極めて低く、妊娠例も得られなかった。近年、IVF-ET、GIFT、AIH のた

めの精子処理法として Percoll 密度勾配法の有用性が報告されている^{3,4)}。近年、当科においても IVF-ET 時の精子処理法として3層 Percoll 密度勾配法 (Percoll 法) を採用し、一定の成績が得られつつある。本研究は、従来の Swim up 法の成績と比較検討することにより、Percoll 法の有用性を知ることを目的とした。

対象および方法

1. 対象

鳥取大学医学部産科婦人科において、卵管閉塞、子宮内膜症、乏精子症のためにIVF-ETを行った60症例、96周期を対象とした。

2. 精子所見

3日間以上の禁欲後に用手的に採取した精液を室温で30分間液化させたのち、Makler counting chamberを用いて精子濃度、精子運動率、精子FPスコアを計測した。原精液所見をWHOの定めた⁵⁾精子濃度 $20 \times 10^6 / \text{ml}$ 、精子運動率50%を基準としてA,B,C,Dの4群に分類した(表1)。Percoll法またはSwim up法による精子処理後の運動精子回収率、精子運動率改善度、精子FPスコア改善度を求めた。精子FPスコアは、Makler counting chamberの1区画を通過する前進運動精子の速度およびその数により、0から4の5段階に分類した(表2)。

3. 3層 Percoll 密度勾配法

Percoll (Pharmacia 社製、スウェーデン) はその9容に1容の10倍濃度HEPES緩衝化BWW培養液を加えて等張化したのち、HEPES緩衝化BWW培養液を用いて90%、70%、40% Percoll液を作成した。5%患者血清を添加した各濃度Percoll液1.0mlを10mlプラスチックチューブに高濃度順に層積し、液化精液2.0mlを重積後、1500rpm、30分間で遠心分離した。遠心分離後、上層を除去し、90% Percoll液層(0.5ml)を10%患者血清添加HEPES緩衝化BWW培養液で懸濁し、1000rpm、10分間で遠心分離した。sperm pelletを残して培養液を除去し、精子所見を得たのち媒精に供した(図1)。

表1 原精液所見による分類

精液所見	精子濃度	精子運動率
A群	$\geq 20 \times 10^6 / \text{ml}$	$\geq 50\%$
B群	$\geq 20 \times 10^6 / \text{ml}$	$< 50\%$
C群	$< 20 \times 10^6 / \text{ml}$	$\geq 50\%$
D群	$< 20 \times 10^6 / \text{ml}$	$< 50\%$

表2 精子前進運動(FP)スコア

FPスコア	精子前進運動性の評価
0	前進運動精子を認めない
1	総運動精子の30%以上が1区画を5秒以上で通過する
2	総運動精子の30%以上が1区画を3秒以上5秒未満で通過する
3	総運動精子の30%以上が1区画を2秒以上3秒未満で通過する
4	総運動精子の30%以上が1区画を2秒未満で通過する

4. Swim up 法

10mlプラスチックチューブ(2001, FALCON社製、米国)を用い、液化精液1.0mlを10%患者血清添加BWW培養液⁶⁾2.0mlで懸濁し、1000rpm、10分間で遠心分離後上清を除去した。遠沈した精子を培養液で再懸濁し、1000rpm、10分間で遠心分離後、上清を除去しsperm pellet上に静かに培養液1.0mlを加えた。プラスチックチューブを37°C、5%CO₂ in airの条件下で60分間静置し、培養液の上層部を採取し、精子所見を得たのち媒精に供した(図2)。

5. IVF-ET

当科IVF-ETプログラム^{1,2)}に従って採卵し、ercoll1法またはSwim up法で処理した精子(5~10 $\times 10^4 / \text{ml}$)を用いて媒精した。媒精16時間後に受精の有無を確認し、40時間後に分割卵を胚移植した。採卵時のoocyte-corona-cumulus-complexの形態から成熟卵⁷⁾と判定した卵における受精率、分割率そして胚移植時の分割球数を求めた。 χ^2 検定およびStudent-t検定を用いて統計処理を行った。

成績

運動精子回収率(表3)、精子運動率改善度(表4)は、いずれの原精液所見群においても精子処理法による差を認めなかった。精液所見正常群(A群)における精子FPスコア改善度は、Percoll法とSwim up法で差はなかったが、精液所見不良群(B、C、

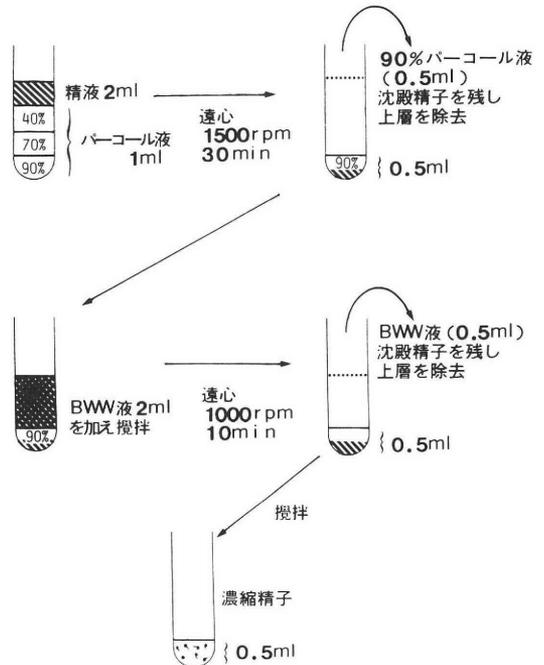


図1 3層 Percoll 密度勾配法

D群) ではF Pスコアが1段階以上改善する率はPercoll法で有意(P<0.05)に高かった。また2段階改善する症例がPercoll法では9.1%(3/33)に認められたが、Swim up法では認められなかった。

A, B, C群でのIVF-ETの成績はいずれの精子処理法によっても変わらなかったが、精液所見が極めて不良のD群では、受精率、分割率、胚移植時の分割球数ともにPercoll法で比較的良好な成績が得られ、Swim up法との差は有意(P<0.01)となった。またSwim up法では受精に至らなかったD群の4症

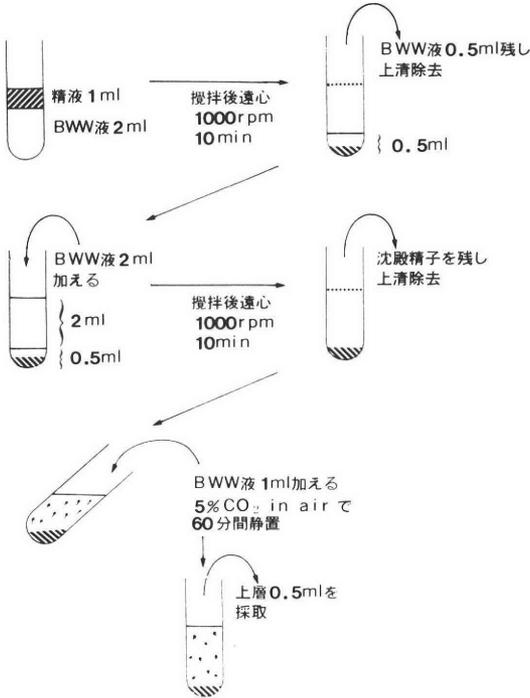


図2 Swim up法

表3 精子処理法と運動精子回収率

精液所見	運動精子回収率	
	Percoll法	swim up法
A群	28.3±18.3%	31.5±22.1%
B群	36.8±23.9%	23.4±23.6%
C群	22.8±16.0%	24.0±23.6%
D群	22.7±18.0%	39.1±40.7%

(M±SD)

$$\text{運動精子回収率(\%)} = \frac{\text{総回収運動精子数}}{\text{原精液中総運動精子数}} \times 100$$

表4 精子処理法と運動率改善度

精液所見	運動率改善度	
	Percoll法	Swim up法
A群	1.3±0.2	1.5±0.5
B群	2.5±0.8	3.2±1.8
C群	1.1±0.1	1.2±0.4
D群	2.1±1.1	3.3±2.4

$$\text{運動率改善度} = \frac{\text{回収精子運動率}}{\text{原精液中精子運動率}}$$

表5 精子処理法と精子FPスコア改善度

FPスコア改善度	精液所見正常群(A群)		精液所見不良群(B, C, D群)	
	Percoll法 (n=16)	Swim up法 (n=8)	Percoll法 (n=33)	Swim up法 (n=15)
0	6(37.5%)	2(25.0%)	5(15.2%)	8(53.3%)
+1	10(62.5%)	5(62.5%)	25(75.8%)*	7(46.7%)*
+3	0(0%)	1(12.5%)	3(9.1%)	0(0%)

Percoll法とSwim up法間での有意差 * p<0.05(x² test)

表6 精子処理法によるIVF-ETの成績

精液所見	精子処理法	採卵周期	成熟卵数	受精卵数(%)	分割卵数(%)	分割球数	妊娠例(%)
A群	Percoll	19	70	55(78.6)	50(71.4)	3.8	6 6(31.6)
	Swim up	10	42	32(76.2)	27(64.3)	3.4	3(30.0)
B群	Percoll	13	60	45(75.0)	37(61.7)	3.6	3 3(23.1)
	Swim up	11	38	28(73.7)	21(55.3)	3.4	2(18.2)
C群	Percoll	14	50	24(48.0)	17(34.0)	3.7	2 2(14.3)
	Swim up	6	15	6(40.0)	5(33.3)	3.6	0(0)
D群	Percoll	11	11	11(34.4)	7(21.9)	3.2	1 1(9.1)
	Swim up	6	24	3(12.5)*	0(0)*	0	0(0)

Percoll法とSwim up法間での有意差 * p<x² test)

例においては、Percoll法を用いた結果、3症例に受精、分割が得られた。精子濃度 $20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下(C, D群)の症例中より3例の妊娠が成立したが、これらはすべてPercoll法を用いた精子処理によって得られた(表6)。D群の妊娠成立例の原精液所見は、精子濃度 $0.5 \times 10^6 / \text{ml}$ 、精子運動率20%、FPスコア1であったが、精子処理後には、精子運動率70%、FPスコア2と著明な改善を示した。

考 察

AIHやIVF-ET、GIFTプログラムのための精子処理法としてSwim up法が広く用いられている。本法は精液から精漿、細胞成分を除き、運動良好精子の回収を目的としているが、液化不良精液においては運動良好精子回収が困難となることや、精漿、細胞成分の混入などの問題点を有している。さらに、高度の乏精子症や精子無力症例では満足な精子回収が困難であり、受精卵、分割卵を得ることは難しい。Percollはポリビニルピロリドン被覆コロイドシリカゲルで、浸透圧を変化させることなく任意の密度を調整できるという特性を有し⁸⁾、種々の細胞の分離に応用されてきた⁹⁾。またPercollは精子受精能を低下させず¹⁰⁾、生体内で炎症反応を誘起しないことから¹¹⁾、AIH、GIFT、IVF-ETのための精子処理法として安全性は高いと考えられる。Percoll法には、主に精子濃縮を目的とした単層Percoll法、さらに受精に関与する比重の高い成熟精子を選択的に濃縮しうる多層Percoll法がある。当科では今回、多層Percoll法の有用性と操作の簡便性から3層Percoll法を採用した。3層Percoll法とSwim up法による成績の比較検討の結果は、運動精子回収率、運動率改善度には差が認めなかった。一方McClureら¹²⁾は、2層Percoll法とSwim up法を比較検討し、運動精子回収率、精子処理後の運動率ともにPercoll法で良好な成績を示したと報告している。Percoll法による運動精子回収率、運動率改善度は、Percollの層積数、濃度及び遠心分離の際の回転数に依存するため、目的に応じた、精子処理のための条件設定が重要であると考えられた。今回の当科の成績では、精子濃度 $20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下、運動率50%以下の高度の精液所見不良群において、Percoll法を用いた受精率、分割率そして胚移植時の分割球数は、Swim up法に比して有意に改善された。Guerinら¹³⁾は、精液所見正常例のIVF-ETにおける妊娠率はSwim up法に比してPercoll法で有意に高く、Swim up法で分割卵の得られなかった症例に対してPercoll法を用いることにより、その61.5%に分割卵が得られ、妊娠も成立したことを報告し

ている。一方、Zona-free hamster eggを用いたsperm penetration assayにおいて、Percoll法はSwim up法に比較して高い精子侵入率をもたらすとされている^{12,14)}。またTanphaichitrら¹⁴⁾はPercoll法処理精子表面にはSwim up法処理精子で認められるcoating envelopesがないことを透過型電子顕微鏡で観察し、Percoll処理でcoating envelopesが除去され、精子侵入率が改善されることを報告している。したがってPercoll法による精子処理は、単に運動精子回収のみならず、精子受精能をも高め、ひいてはその後の受精卵の発育にも影響を及ぼすものと考えられる。乏精子症や精子無力症群においてPercoll法はSwim up法に比して精子FPスコアを改善した。当科では、従来より精子機能の評価法の一つとしてFPスコアを採用している。本研究においても、精液所見不良例におけるIVF-ETの成績においてPercoll理後の受精率、分割率の改善とFPスコア改善度との関連が示されたことから、FPスコアは簡便かつ有用な精子機能の評価法と考えられる。今回の成績より、3層Percoll密度勾配法は比較的簡便な操作で、短時間内に高い受精能力を盛った成熟精子を回収できることから、精液所見不良症例におけるIVF-ETの精子処理法として有用であることが示された。

本論文要旨は、第43回日本産科婦人科学会学術講演会、第35回日本不妊学会において発表した。

文 献

- 1) 見尾保幸, 岩部富夫, 関島秋男, 谷川正浩, 寺戸博文, 戸田稔子, 和田 省, 岩本好吉, 菊川章仁, 前田一雄: 経腔探触子を用いた超音波採卵の有用性に関する検討, 日不妊会誌, 33: 378, 1988
- 2) 見尾保幸, 杉本伴芳, 岩部富夫, 関島秋男, 大野原良昌, 谷川正浩, 寺戸博文, 戸田稔子, 原田 省, 菊川章仁, 前田一雄: 体外受精・胚移植のための超音波採卵の総合的評価, 日産婦誌, 41: 129, 1989
- 3) Hyne, R. V., Stojanoff, A., Clarke, G. N., Lopata, A., Johnston, W. H.: Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation, Fertil. Steril., 45: 93, 1986
- 4) Pardo, M., Buxaderas, C., Barri, P. N., Pomerol, Jr. J. M., Bancells, N., Sabater, J., Coroleu, B.: Spermatozoa selection in discontinuous Percoll gradients for use in artificial insemination, Fertil. Steril., 49: 505, 1988
- 5) World Health Organization: Normal values of semen variables, In WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucous Interaction, Cambridge, Cambridge University Press, p 27, 1987

- 6) Wada, T.: Evaluation of media, protein supplements and potassium concentration for human in vitro fertilization and embryo transfer by preimplanted mouse embryo development, *Acta. Obstet. Gynaec. Jap.*, 40: 640, 1988
- 7) 和田 省, 杉本伴芳, 岩部富夫, 関島秋男, 大野原良昌, 谷川正浩, 寺戸博文, 戸田稔子, 菊川章仁, 見尾保幸, 前田一雄: 卵成熟度判定受精, 分割率との関連, *日本受精着床学会誌*, 6 : 133, 1989
- 8) Pertoft, H., Laurent, T. C., Laas, T.: Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll) , *Anal. Biochem.*, 88: 271, 1978
- 9) Pertoft, H., Laurent, T. C.: Isopycnic separation of cells and cell organelles on centrifugation in modified colloidal silica gradients. In *Methods of Cell Separation*, p 25, New York, Plenum, 1977
- 10) Forster, M. S., Smith, W. D., Lee, W. I., Berger, R. E., Karp, L. E., Stenchever, M. A.: Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs, *Fertil. Steril.*, 40: 655, 1983
- 11) Pickering, S. J., Bolton, V. N., Fleming, T. P., Gresham, G. A. G., Braude, P. R.: Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use?, *Fertil. Steril.*, 51: 1024, 1989
- 12) McClure, R. D., Nunes, L., Tom, R.: Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient, *Fertil. Steril.*, 51: 874, 1989
- 13) Guerin, J. F., Matheu, C., Lornage, J., Pinatel, M. C., Bouliou, D.: Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients, *Hum. Reprod.*, 4: 798, 1989
- 14) Tanphaichitr, N., Millette, C. F., Agulnick, A., Fitzgerald, L. M.: Egg-penetration ability and

structural properties of human sperm prepared by Percoll-gradient centrifugation, *Gamate Research*, 20: 67, 1988

Evaluation of three-layer percoll gradient method for semen manipulation in IVF-ET

Masahiro Tanikawa, Chieko Renbutu,
Naruhisa Takao, Takaaki Ikenari,
Akio Sekijima, Tomio Iwabe,
Yoshimasa Oonohara, Hirohumi Terado,
Toshiko Toda, Tasuku Harada,
Yasuyuki Mio and Naoki Terakawa

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tottori University School of Medicine,
Yonago 683, Japan

We evaluated three-layer Percoll gradient method (Percoll method) together with swim up method for semen manipulation in IVF-ET. There were no differences in recovery of motile sperm and improvement of sperm motility between Percoll and swim up method. However the Percoll method significantly improved sperm forward progression in abnormal semen samples. In IVF-ET, fertilization and cleavage rates in Percoll method were significantly higher than those in swim up method in the samples of oligoasthenozospermia. Also the number of blastomere at ET in Percoll method was significantly larger than that in swim up method in the samples of oligoasthenozospermia. These results suggest that Percoll method increase sperm fertilizing capacity especially in abnormal semen samples. The authors conclude that three-layer Percoll method is useful for semen manipulation in IVF-ET.

(受付: 1991年7月1日)

健康男性におけるハムスターテストでの 精子侵入率の変動に関する研究 (第1報)

Variability in Sperm Penetration Rate in the Hamster Oocyte Penetration Test in Healthy Young Men. I

広島大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 大浜紘三教授)

三 春 範 夫
Norio MIHARU

Department of Obstetrics and Gynecology Hiroshima University
School of Medicine, Hiroshima 734, Japan (Director: Prof. K. Ohama)

健康な男性3人を対象として、3～4日間の禁欲期間の後4～6日間を1シリーズとして連日精液を採取し、精液パラメーター(精子濃度、運動率、精液量)およびハムスターテストでの精子侵入率を調べ、連日の射精が精液パラメーターおよび精子侵入率に与える影響を検討した。なお、3人のうち2人では2シリーズ、1人では4シリーズ、計8シリーズの検討を実施した。

その結果、精液パラメーターは検査日による変動が大きく、経日的な漸減傾向は認められなかった。一方、同一シリーズ内でのハムスターテストでの精子侵入率の変動幅(最大値と最小値との差)は14%～22%、平均17.8%で、シリーズ内では安定した数値を示した。また、精子侵入率はいずれの精液パラメーターとも、またいかなる組合せとも有意な相関を示さなかった。

以上の結果より、正常男性においてハムスターテストでの精子侵入率は1週間程度の短期間であれば精液パラメーターと無関係に安定した値を示すことが判明した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 237-242, 1992)

緒 言

近年、IVF-ET, GIFTなどの配偶子操作法の進歩により、女性不妊、特に卵管性不妊の予後は著しく改善されている。しかし、不妊症の約半数を占める男性不妊に対しては依然として有効な治療法がなく、重症の男性不妊例では配偶子操作法によってほとんど妊娠が期待できないのが現状である。そこで、不妊症の臨床において、治療法の選択や予後判定などのため男性の妊孕性を正確に評価することがますます重要となってきた。

従来から、男性の妊孕性すなわち精子受精能の指標としては、精子濃度、運動率、精液量などのいわゆる精液パラメーターが用いられてきたが、1976年 Yanagimachi ら¹⁾によりヒト精子が透明帯を除去したハムスター卵子に侵入することが報告されて以来、

この現象を利用したハムスターテストが精子の受精能を評価する機能検査法として広く利用されている。一般には、精液パラメーターは射精後回復するまでにある程度の期間が必要であると考えられ、そのため、精液検査は一定の禁欲期間(2～7日間)の後に実施すべきとされているが²⁾、ハムスターテストの場合も通常一定の禁欲期間の後に行われている。しかし、ハムスターテストの成績と精液パラメーターとは強い相関を示さないという報告^{3,4,5,6)}が多く、また、本テストが精子の機能検査法である点からも、ハムスターテストにおける禁欲期間の影響や必要性に関しては再検討する必要がある。

そこで今回、精液パラメーター検査およびハムスターテストを数日間連続して実施し、禁欲期間がこれらの成績におよぼす影響を検討するとともに、精液パラメーターとハムスターテストの成績の関連に

ついて統計学的な解析を行ったのでその結果を報告する。

対象および方法

20～25 再の健康な男性 3 人から、4～6 日間連続して精液の提供を受けこれを 1 シリーズとして、精液パラメーター（精子濃度、運動率、精液量）検査とハムスターテストを行った。各シリーズ初日の前には 3～4 日間の禁欲期間を設けるよう指導し、前シリーズと次シリーズとの間隔は最低 4 週間とした。なお、3 人のうち 2 人では 2 シリーズ、1 人では 4 シリーズを行い、計 8 シリーズを検討対象とした。

用手法にて採取した精液を 30 分から 1 時間、37°C に保って十分液化させた後、メスピペットで精液量を計測し、次いで MAKLER counting chamber で精子濃度および運動率を算定した。

ハムスターテストは以下の方法で行った。0.5 ml の液化精液に HSA (human serum albumin) を 0.5 % 含む mBWW (modified Biggers, Whitten and Whittingham) 液 4 ml を加え、その後遠沈 (300 g, 5 分間)、洗浄を 3 回行った。得られた沈渣に mBWW 液を加え、37°C, 5 % CO₂ in Air の条件で 6 時間培養した後、再び精子濃度と運動率を算定し、運動精子 5X10⁶/ml の濃度に調整した精子浮遊液を作製し、これに透明帯除去ハムスター卵子を加えた。なお、ハムスター卵子は、5～8 週齢の雌ゴールデンハムスターを、PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) 30 i. u. および HCG (human chorionic gonadotropin) 30 i. u. により過排卵処理し、採取した卵子を 0.1 % hyaluronidase と 0.1 % trypsin で透明帯除去卵としたものを用いた。卵子を加えて再び 37°C, 5 % CO₂ in Air の条件でさらに 3 時間培養した後、位相差顕微鏡下に 20 個以上の卵子について精子の侵入（膨化した精子頭部あるいは雄性前核が精子尾部をとまう場合）の有無を判定し、精子侵入率（精子侵入卵子数/観察卵子数×100）（%）を求めた。

1 シリーズ内での精液パラメーターおよび精子侵入率の変動の指標として、変動幅（シリーズ内の最大値と最小値との差）を求めた。また、精子侵入率では変動幅とともに変動比（ ρ ）を下記の式によって求めた。

$$\rho = \sqrt{s/\nu}$$

$$\nu = m_i - 1$$

$$s = 4 \sum_{i=1}^{m_i} n_i (z_i - \bar{z}_i)^2$$

$$\bar{z}_i = \sin^{-1} \sqrt{x_i/n_i}$$

$$\bar{z}_i = 1/m_i \sum_{i=1}^{m_i} z_i$$

ρ はデータが二項分布していると仮定した場合に期待される分散より実際の分散が大きい確率を示し、したがって ρ が大きいほど変動の程度が大きいことを意味する。また、式中の m はシリーズあたりの検討回数、 n は観察卵子数、 x は精子侵入卵子数を示す。

精液パラメーターとハムスターテストでの精子侵入率との関連を、SAS の GLM procedure を用いた共分散分析により検討した。本分析では説明要因として精子提供者、シリーズ、精子濃度、運動率および精液量の 5 因子を用いた線形モデルによる解析を行い、各説明変数の F 値および P 値（F 値に対応する F 分布の上側確率）を求めた。

成 績

3 人の精子提供者 (A, B, C) の計 8 シリーズにおける精液パラメーターと精子侵入率の経日変化およびそれらの変動幅、変動比を表 1、図 1 に示した。

1. 精液パラメーターの経日変化と変動幅

8 シリーズのうち、精子濃度で 1 シリーズ（シリーズ No. 4）、運動率で 1 シリーズ（シリーズ No. 5）、精液量で 2 シリーズ（シリーズ No. 1, 2）において経日的な漸減傾向が認められたが、全体としては検査日による変動が大きく、一定した経日的変化は認めなかった。

シリーズ内での精子濃度の変動幅は 4 シリーズで 50 X 10⁶/ml 以上であったが、提供者 B では 20～27 X 10⁶/ml と比較的小さかった。運動率の変動幅は 10～20 % であったのが 5 シリーズ、20～30 % がシリーズで、平均は 19.5 % であった。また、精液量の変動幅は 0.4～2.0 ml、平均 1.18 ml であった。

2. ハムスターテストでの精子侵入率の経日変化と変動幅、変動比

シリーズで No. 1, 5 では、6 日間を通じて精子侵入率がほぼ 100 % であったが、今回の検討では侵入精子数の算定は行っていないため、変動幅および変動比の算定対象からは除外した。6 シリーズのうち 2 シリーズ（シリーズ No. 6, 8）では精子侵入率が漸減傾向を示したが、全体では変動幅は 14～22 % で、平均 17.8 % であった。なお、変動比（ ρ ）は 0.59～1.2 であり、提供者による明らかな差異は認めなかった。

一方、同一提供者の異なったシリーズでの精子侵入率を比較すると、提供者 A および B では 50 % を超える侵入率の差異が観察された。

3. 精液パラメーターと精子侵入率の関連

表 2 に分散分析の結果を示したが、5 因子の説明要因のうち、提供者とシリーズの P 値はともに 0.0001 で精子侵入率と有意の相関が認められた。したがっ

表1 3人の精子提供者(A~C)における精液パラメーターと精子侵入率

提供者	シリーズ	精子濃度 ($\times 10^6$ /ml)	運動率 (%)	精液量 (ml)	精子侵入率 (%)
A	1	34	65	2.4	100
		94	70	1.2	100
		41 (68)	56 (28)	1.8 (1.4)	100
		77	55	1.2	100
		64	47	1.0	100
	102	42	1.0	100	
	2	55	65	2.4	62
		51	58	2.1	57
		44 (56)	71 (13)	1.5 (1.1)	54 (16) <0.67>
		73	60	1.6	62
		20	66	1.3	69
	17	66	1.3	53	
	3	9	70	2.4	36
		23	73	2.7	35
		62 (53)	73 (14)	1.7 (1.0)	57 (22) <1.2>
		36	60	2.1	38
		46	63	1.9	54
	27	59	2.1	44	
	4	42	60	2.6	44
		19	34	2.8	29
13 (36)		53 (28)	2.4 (0.4)	50 (21) <1.1>	
6		58	2.7	42	
16		62	2.4	42	
B	5	32	52	2.3	94
		52	47	2.4	100
		59 (27)	46 (28)	2.5 (1.7)	100
		38	42	3.5	100
		34	35	1.8	100
	42	33	1.9	100	
	6	35	36	1.8	30
		55 (20)	49 (19)	1.5 (0.6)	24 (17) <0.81>
		48	51	2.1	29
		50	50	1.8	13
76		69	3.7	25	
C	7	87	69	2.9	40
		48 (47)	65 (12)	3.1 (1.2)	42 (17) <0.79>
		40	62 (15)	2.5	33
		46	74	3.1	39
	8	89	71	3.5	25
		67	60	4.0	18
		39 (50)	48 (27)	4.0 (2.0)	22 (14) <0.59>
		53	75	3.8	11
58	67	2.0	11		

() : 変動幅 = 最大値 - 最小値, < > : ρ

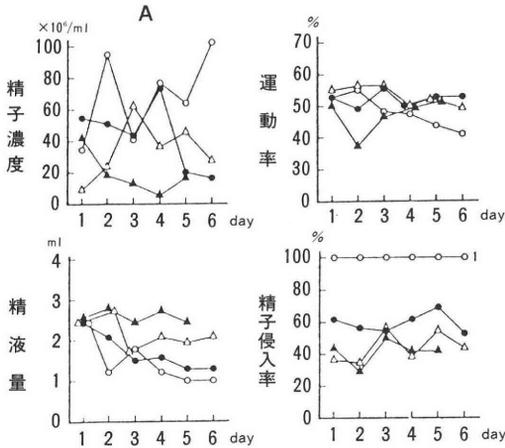


図1 精提供者Aにおける精液パラメーターと精子侵入率

○—○ シリーズ1, ●—● シリーズ2, △—△ シリーズ3, ▲—▲ シリーズ4

表2 提供者, シリーズ, 精子濃度, 運動率および精液量を説明要因とした分散分析表

要因	自由度	残差平方和	平均平方	F値	P値
モデル	10	3.79	0.38	82.2	0.0001
提供者	2	1.14	0.57	123.2	0.0001
シリーズ	5	2.65	0.53	114.8	0.0001
精子濃度	1	0.01	0.01	1.2	0.280
運動率	1	0.00	0.00	0.0	0.956
精液量	1	0.00	0.00	0.1	0.742
残差	32	0.14	0.01		
合計	42	3.93			

て, 精子侵入率は提供者により異なり, さらにシリーズごとに変動していると判断された。一方, 精子濃度, 運動率および精液量の P 値は各々 0.280, 0.956, 0.742 と大きく, 精子侵入率はこれら 3 つの精液パラメーターのいずれともまたどのような組合せとも有意の相関を認めなかった。

考 察

成熟した精巣では 1 g あたり毎日約 1000 万の精子が形成され⁷⁾, 精子はその後約 12 日間かかって精巣上体の中を通過する間に成熟を遂げている⁸⁾。成熟精子のほとんどは精巣上体の中に貯蔵され, 射精の間隔すなわち禁欲期間が長くなればそれだけ成熟精子の貯蔵量は増加する。そのため, 射精精液のパラメ

ーターや精子機能は禁欲期間の長短に影響されることが考えられるが, 貯蔵されている成熟精子の何%が 1 回の射精で放出されるかは明らかでなく, またこの比率には個人差も大きいと考えられる。

禁欲期間が精液パラメーターに与える影響に関する検討成績はこれまでもいくつか報告されている。Schwartz ら⁹⁾は正常男性 36 人の合計 220 の精液検体について, 禁欲期間 (1 日 ~ 7 日) と精子濃度, 精液量, 総精子数の関係を分析し, 禁欲期間が延長するにつれてこれらのパラメーターは増加傾向を示すことを報告している。また, Levin ら¹⁰⁾は, 正常男性 12 について 21 日間連続して精液検査を行った結果, 最初の 4 日間は精子濃度, 精液量ともに減少したが, それ以後はほぼ一定の値を示したとしている。一方, Mortimer ら¹¹⁾は不妊夫婦の男性について検討を行い, 禁欲期間が 1 ~ 7 日間では禁欲期間の延長とともに精液量と総精子数は増加を示したものの, 運動率, 生存率 (運動精子および運動性を示さないが生存している精子の全精子に占める割合) および奇形率は禁欲期間の影響を受けずほぼ一定であったと報告している。さらに, Sauer ら¹²⁾はビデオによる精子運動能自動解析装置を用いた検討で, 精子濃度, 精液量は禁欲期間の延長とともに増加したが, 運動率と運動パターン (Lateral head amplitude, Cross-beat frequency, Mean velocity, Mean linearity) は禁欲期間に左右されなかったとしている。これらの成績より, 精子濃度, 精液量あるいは総精子数は禁欲期間の影響を強く受けるが, 一方, 運動率や運動パターンなどは禁欲期間の影響を受けず, 精子の量的変化は必ずしも質的变化を伴うものではないことがうかがわれる。

ところで, 精液パラメーターには同一個人でも時期によりかなりの変動が認められるため, 異なった時期に種々の禁欲期間を設定してその影響を評価する方法では, 精液パラメーターの変動が時期によるものなのか禁欲期間の影響なのかを正確に区別することは困難である。そこで今回の検討では, 3 ~ 4 日間の禁欲期間の後, Levin らの検討のように連日で精液検査を行い, 精液パラメーターの推移を検討した。その結果, 運動率, 精子濃度および精液量には連日射精による明らかな漸減傾向は認められなかったが, 変動の程度には大きな個人差が認められた。

男性の妊孕性の指標としてハムスターテストでの精子侵入率が精液パラメーターに比べ優れていることは既に多くの研究により明らかにされており, 精液パラメーターが正常な男性でも, ハムスターテストにより精子の受精能異常とされることは少なくな

い¹³⁾。ハムスターテストでは、精子の capacitation, acrosome reaction, 卵細胞膜との融合能など受精の成立に必要な一連の精子機能が評価され、この点から本テストは精液パラメーター検査とは本質的に異なる真の精子機能検査法であるとされている¹⁴⁾。事実、これまでの報告でも精液パラメーターと精子侵入率との間には強い相関はないとするものが多く、今回の共分析による検討でも精子侵入率はいずれの精液パラメーターとも有意の相関関係は認められなかった。

ハムスターテストでの精子侵入率に与える禁欲期間の影響を検討した報告は少ない。斎藤ら¹⁵⁾は、1人の正常男性について4日間連日で精液検査とハムスターテストを実施した結果、総運動精子数は日数とともに著明な減少を示したものの精子侵入率は89~93%と安定した値であったと報告している。一方、Rogersら¹⁶⁾は、4人の正常男性を対象として、1週間以内に12時間、48時間、24時間の順に禁欲期間を設定して3回精液を採取し、各々の検体についてハムスターテストを実施した成績を報告している。それによると、禁欲期間が48時間の場合に最も精子侵入率が高く、逆に12時間では侵入率の低下が著明であったことから、本テストを実施するにあたっては12時間を超える禁欲期間が必要であると述べ、さらに、このような精子受精能低下の原因として、禁欲期間の短縮による成熟精子の減少や capacitation に対する“inhibitor”の増加を推定している。Mooreら¹⁷⁾は、精巣上体の異なる部位から採取した精子についてハムスターテストを実施し、頭部の精子はまったく卵に結合せず、体部の精子では約10%が、また尾部の精子では約40%が卵に結合したと述べている。このことは成熟精子は未熟精子よりもより高い受精能を持つことを示しており、したがってRogersの指摘するように頻回の射精による成熟精子の減少が精子侵入率の低下につながる可能性は考えられる。

しかし、今回の検討では、4~6日間での精子侵入率の変動幅は最大でも22%であり、経日的な漸減傾向も認められなかった。また、変動比(ρ)も最大1.2で6シリーズ中4シリーズでは1未満であった。自験例や斎藤らの検討では連日(24時間ごと)で検査を実施しており、連日検査ではないRogersらの12時間の禁欲期間での成績とは単純に比較できないが、少なくとも今回の成績からは、正常男性においては約24時間程度の禁欲期間であれば精子侵入率はほとんど影響を受けないと推定された。また、各シリーズ内では安定した精子侵入率が得られたことから、本テストが bioassay であるにもかかわらず、十分に

再現性のある検査であることが確認された。

このような比較的短い禁欲期間での精子受精能の安定性が、精子受精能の低下している不妊男性の場合についてもあてはまるのか否かについては今後検討する必要があるが、今回の成績から、男性の妊孕性がほぼ正常と考えられる場合、例えば卵管因子を適応としたIVF-ETやPost coital test不良例におけるAIHなどに対しては必ずしも数日間の禁欲期間は必要でなく、AIHの場合にはむしろ積極的に反復実施を行うことの利点の方が大きいと判断された。

一方、同一提供者であっても検査時期(シリーズ)により著明な精子侵入率の差異が観察されたことは興味深いことである。前述のように、精液パラメーターは時期によりかなりの変動を示すことが広く知られている。しかし、ハムスターテストでは時期による変動に関する検討はほとんど行われておらず、また手技が複雑で時間を要する検査であるため、反復検査もあまり行われていない。この点については、今後さらに多数例を対象として検討する必要があるが、今回の検討成績からは精子侵入率すなわち精子受精能は同一個人でも時期により変動している可能性は高いと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました藤原篤前教授並びに大浜紘三教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御助言、御指導をして頂いた上田克憲講師に心より感謝いたします。さらに、統計学的解析に関して御指導並びに御鞭撻を頂いた広島大学原爆放射能医学研究所生物統計学研究部門、務中昌巳教授、大瀧慈教授に深謝いたします。

本論文の要旨は、第7回日本受精着床学会、Symposium on Fertilization Mammals (Boston)において発表しました。

文 献

- 1) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 15: 471, 1976
- 2) World Health Organization: Collection and examination of human semen. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, Cambridge University Press, Cambridge, 1987
- 3) Aitken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O., Lees, M. M.: The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men, *Fertil. Steril.*, 38: 68, 1982
- 4) Hall, J. L.: Relationship between semen quality

- and human sperm penetration of zona-free hamster ova, *Fertil. Steril.*, 35:457, 1981
- 5) Rogers, B. J., Van-Campen, H., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R., Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova, *Fertil. Steril.*, 32: 664, 1979
 - 6) Zausner-Guelman, B., Blasco, L., Wolf, D. P.: Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: A comparative study of proven fertile donors and infertility patients, *Fertil. Steril.*, 36: 771, 1981
 - 7) 岡田耕一：造精機能とその調節，新臨床泌尿器科全書，8 A：122，金原出版，1984
 - 8) Rowley, M. J., Teshima, F., Heller, C. G.: Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system, *Fertil. Steril.*, 21: 390, 1970
 - 9) Schwartz, G., Laplanche, A., Jouannet, P., David, G.: Within-subject variability of human semen in regard to sperm count, volume, total number of spermatozoa and length of abstinence, *J. Reprod. Fert.*, 57: 391, 1979
 - 10) Levin, R. M., Latimore, J., Wein, A. J., Van-Arsdalen, K. N.: Correlation of sperm count with frequency of ejaculation, *Fertil. Steril.*, 45: 732, 1986
 - 11) Mortimer, D., Templeton, A. A., Lenton, E. A., Coleman, R. A.: Influence of abstinence and ejaculation-to-analysis delay on semen analysis parameters of suspected infertile men, *Arch. Androl.*, 8: 251, 1982
 - 12) Sauer, M. V., Zeffler, K. B., Buster, J. E., Sokol, B. Z.: Effect of abstinence on sperm motility in normal men, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 604, 1988
 - 13) Aitken, R. J., Best, F. S. M., Richardson, D. W., Djahanbakhch, O., Mortimer, D., Templeton, A. A., Lees, M. M.: An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility, *Fertil. Steril.*, 38: 212, 1982
 - 14) Yanagimachi, R.: Zona-free hamster eggs. Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa, *Gamete. Res.*, 10: 187, 1984
 - 15) 齊藤 晃，星 和彦，鈴木雅洲，柳町隆造，林 恵子：ハムスター卵子を使用したヒト精子の受精力検討，産と婦，49：1855，1982
 - 16) Rogers, B. J., Perreault, S. D., Bentwood, B. J., McCarville, C., Hale, R. W., Soderdahl, D. W.:

Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evaluation, *Fertil. Steril.*, 39: 204, 1983

- 17) Moore, H. D. M., Hartman, T. D., Pryor, J. P.: Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis, *Int. J. Androl.*, 6: 310, 1983

Variability in sperm penetration rate in the hamster oocyte penetration test in healthy young men. I.

Norio Miharu

Department of obstetrics and Gynecology,
Hiroshima University of Medicine,
Hiroshima 734, Japan

In this study, the effect of frequent ejaculations on semen parameters and sperm penetration rate (SPR) in the hamster oocyte penetration test (hamster test) were examined.

The subjects were three healthy young donors. Semen samples were collected at 24-hour intervals for 4 to 6 consecutive days (one series) after an initial abstinence of 3 to 4 days. Semen analysis (sperm concentration, sperm motility, and volume) and the hamster test were performed for four separate series in one donor and for two series in two donors.

Semen parameters varied considerably within each series and no decline in parameters could be detected with time. The variation of SPR in the hamster test in a series (maximum SPR-minimum SPR) ranged from 14 to 22% (mean, 17.8%). No correlation was observed by analysis of variance, between any semen parameter or any combinations of semen parameters and SPR ($p < 0.01$).

These results indicate that SPR in healthy young men is stable between consecutive samples over 4 to 6 days and is not influenced by frequent ejaculations or variations in semen parameters.

(受付：1991年9月5日)

目の午前 9 時に pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (セロトロビン®帝国臓器 K. K.)10 単位を生理食塩水 0.1 ml に溶解後、皮下投与し、その 48 時間後に 5 単位の human chorionic gonadotropin (hCG)(hCG モチダ®、持田 K. K.) を生理食塩水 0.1 ml に溶解して皮下投与し、これを対照群とした。

【動物処置方法ならびに排卵数の算定】

1) ATml III 単独投与

対照群と同様の処置に加え、AT III(ノイアート®, ミドリ十字 K. K.)として 30, 100, 300 U/kg を総量 0.3 ml として hCGml 投与後、0 ないし 6 時間目にそれぞれ静脈内に投与した。

2) ヘパリン単独投与

対照群と同様の処置に加え、ヘパリン(ノボヘパリン®, ノボインダストリー A/S, デンマーク)300 U/kg を生理食塩水で 0.3 ml に希釈し、hCG 投与後 0 ないし 6 時間目に静脈内に投与した。

3) AT III とヘパリンの併用投与

対照群と同様の処置に加え、AT III 300 U/kg を hCG 投与後の 0, 2, 4, 6, 8, および 10 時間目に投与し、ヘパリン加生理食塩水(ヘパリンとして 300 U/kg) を AT III 投与前 30 分から投与後 120 分まで分注した。投与はいずれも静脈内投与とした。

排卵数は hCG 投与 24 時間後に開腹して両側卵管を摘出し、光学顕微鏡下 50 倍にて卵管内卵子数を算定した。

【凝固系への影響】

AT III とヘパリンを併用投与した場合のみ排卵数が有意に減少したため、最も減少した投与方法(AT III を hCG 投与後 4 時間目に投与した場合)において hCG 投与後の 6 ないし 8 時間目にプロトロンビン時間(PT) と活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定し、さらに、hCG 投与後の 6, 8, 10 時間目に AT III 活性値の測定を行った。

【PT, APTT および AT III 活性測定法】

下大静脈より採血したクエン酸ナトリウム血漿とし -70°C にて保存した。PT は Quick 二段法¹¹⁾、APTT はエラジン酸活性法¹²⁾、AT 酸活性は合成基質法⁷⁾にて測定を行った。

【統計】

実験結果はすべて平均±標準誤差にて表わした。なお有意差検定は student's t-test にて行い、P < 0.05 をもって有意差とした。

研究成績

【排卵数】

1) AT III を hCG 投与 0 時間目に投与した群の排卵数は各用量でそれぞれ 27.8±5.7, 34.0±3.9, 30.2±6.2 であった。hCG 投与後 6 時間目に投与した群では、36.3±5.2, 34.3±4.1, および 27.5±3.5 であり、いずれの投与時間においても対照群と比較して有意差は認められなかった。

2) ヘパリン単独投与群 (図 2)

hCG 投与後 0 ないし 6 時間目にヘパリンを投与した時の排卵数は 34.0±5.7 と 31.3±5.8 で、対照群との有意差は認められなかった。

3) AT III とヘパリンの併用投与群 (図 3)

hCG 投与後 0, 2, 4, 6, 7, 8 および 10 時間目に AT

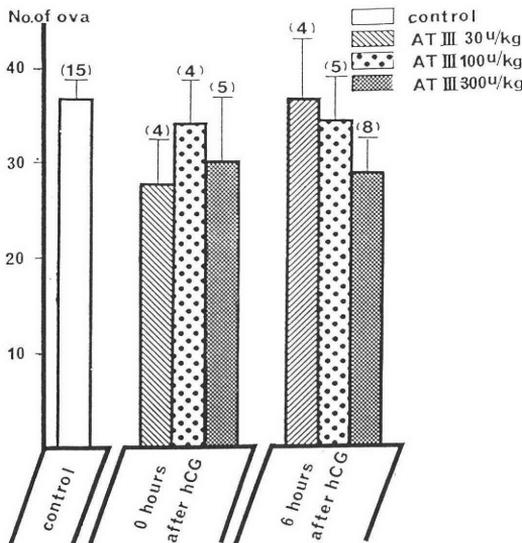


図 1 AT III 単独投与における排卵数の変化 () 内の数値はラット数を示す

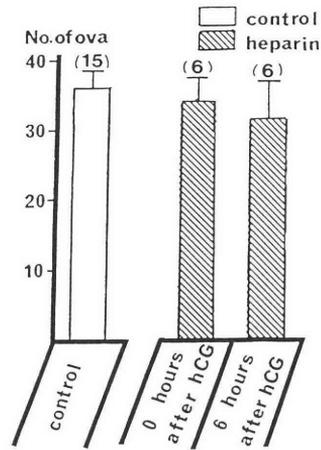


図 2 ヘパリン 300U/Kg 単独投与における排卵数の変化 () 内の数値はラット数を示す

III 300 U/kgを投与し、ヘパリン 300 U/kgを AT III 投与 30 分前から 150 分にわたって分注した場合の排卵数は、 23.0 ± 4.0 , 22.3 ± 0.3 , 20.9 ± 3.8 , 22.5 ± 3.2 , 33.6 ± 2.8 , および 39.3 ± 4.7 と対照群と比較して 0 時間目投与群で $P < 0.01$ の危険率で有意の減少が認められた。8 ないし 10 時間目投与群では有意の変化は認められなかった。

【凝固系への影響】

1) PT, APTT (表 1)

AT III とヘパリンの併用投与で排卵数が最も減少した方法、すなわちヘパリン 300 U/kg を AT III 投与 30 分前から 150 分にわたって分注し AT III を hCG 投与後 4 時間目に投与した場合の hCG 投与後 6 ないし 8 時間目に測定した PT ならびに APTT は、対照群に比して有意な差は認められなかったが高値を示した。

2) AT III 活性 (図 4)

PT, APTT を測定した場合と同様の薬剤投与条件において hCG 投与後の 6, 8, 10 時間目の AT III 活

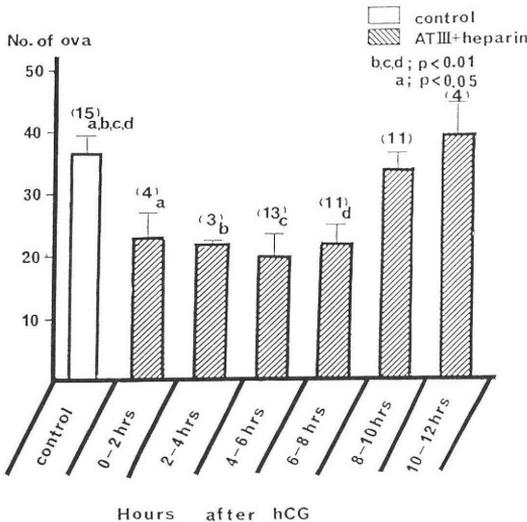


図 3 AT III 300U/Kg とヘパリン 300U/Kg の併用投与における排卵抑制効果 () 内の数値はラット数を示す

性値は対照群と比較して有意に高い値を示した。

考 察

抗凝固因子としての AT III は単独での作用は弱く、ヘパリンの存在下で相乗的に強力な抗凝固能が発揮される。一方、ヘパリンも単独での抗凝固作用は弱く、AT III の存在を必要としている。今回の実験においても AT III あるいはヘパリンの単独投与では排卵の抑制はみられず、両者を併用して初めて有意の抑制がみられた。この両者併用投与時における全身の凝固系の指標として PT・APTT ならびに AT III 活性値に変化がみられたのは当然の帰結と思われる。

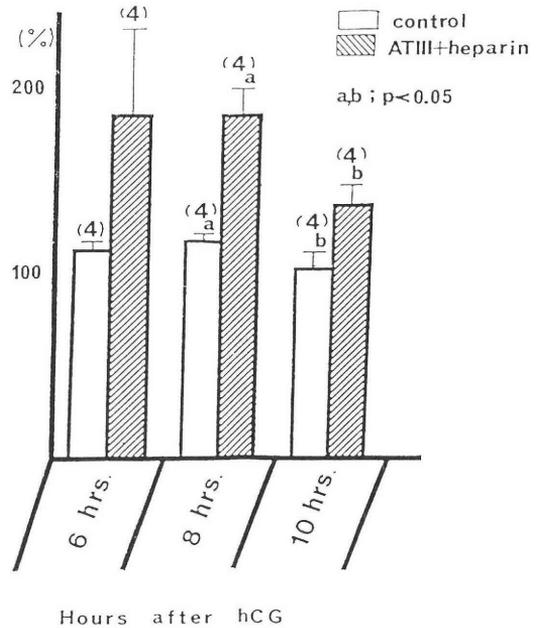


図 4 AT III とヘパリンの併用投与における AT III 活性値の変化

AT III を hCG 投与後 4 時間目に投与した群における投与後 2 時間 (hCG 投与後 6 時間), 4 時間 (hCG 投与後 8 時間) および 6 時間 (hCG 投与後 10 時間) の AT III 活性値の変化を表す () 内の数値はラット数を示す

表 1 AT III とヘパリンの併用投与における凝固能の変化

	hCG 投与後 6 時間		hCG 投与後 8 時間	
	PT	APTT	PT	APTT
対 照 群	14.0 ± 1.39 (3)	28.1 ± 2.08 (3)	13.4 ± 1.00 (4)	25.2 ± 3.78 (4)
AT III とヘパリン併用投与群 (AT III を hCG 投与後 4 時間目に投与した群)	61.4 (2)	173.9 (2)	14.1 ± 0.56 (4)	31.4 ± 0.50 (4)

本研究では、全身的に凝固能を抑制した状態を作り出した場合に排卵数の抑制が起こるか否かを検討する方法を用いた。毛細血管内血栓が排卵直前の卵胞頂部という局所において起こっている訳であるが^{9,11}、これは生理的条件下で生じており、これが全身的な凝固系の亢進の結果として生じているとはとうてい考えられない。しかし、本研究の意義は PMSG/hCG 過排卵処置ラットにおいて、hCG 投与 6 時間までに AT III とヘパリンを投与して凝固能を抑制した場合にのみ排卵数が減少しており、8 ないし 10 時間目の投与では排卵数の減少はみられないことを示した点にある。つまり、hCG 投与直後の凝固能抑制は卵胞破裂に障害を与えることが明らかにされた。このことから、mid cycle LH サージに暴露され、卵胞が卵胞壁の破裂に向けて最終成熟を行う過程で、LH サージ後の比較的早い時期から局所では凝固系が促進される環境にあるものと推察される。事実、卵胞破裂に近づくにつれて卵巣血液量は増加しており¹³、その増加に伴う血流の停滞が LH サージの 4 時間後から開始するという報告⁹もあり、本実験結果からの推察と一致している。今回の研究結果から、排卵現象には凝固系が深く関与し、しかも LH サージ後の比較的早期から関与している可能性が示唆された。

卵胞局所における凝固能亢進に関しては、トロンボキサン B2 (TXB2) との関与が報告されている¹⁰。凝固能と綿密に関係する卵巣血流量がインドメサシン投与により抑制されることから¹³、TXB2 や PGI2 など凝固能に関与する PG が卵胞破裂に密接に関与していることが推察される。

Platelet activating factor (PAF) も排卵過程に関与していることは PAF の antagonist を用いた実験⁵ や卵巣内の PAF 濃度が LH サージ後に低下すること⁹ から示唆されている。しかし、PAF の作用は血小板の活性化だけにとどまらず、血管拡張、血管透過性および白血球遊走などと幅が広いことが明らかにされつつあり、PAF の排卵過程における作用機序の詳細は今後の検討を必要としている。

排卵に伴う腹腔内出血を来した先天性凝固因子欠損患者の臨床報告が散発的にみられるが²、このような患者で仮に毎周期卵胞破裂が起こっているとすれば、卵巣出血の頻度はかなり高くなると予想されるが、実地臨床では極めて少ない。従って、今回の研究で示されたように、全身的な凝固能低下状態は卵胞破裂機構を障害し、未破裂黄体化卵胞の状態を招来するため基礎体温表上二相性を認めることも可能であろう。

参考文献

- 1) 岩政 仁, 田島朝信, 松浦講平, 岡村 均: PMSG/hCG 処置未熟ラット排卵過程における progesterone の意義, 日産婦誌, 41: 1551, 1989
- 2) 恵良一郎, 松尾 勇, 坂本卓史, 山田 満: 卵巣出血を起こした, 先天性第 V 因子欠乏症と von Willebrand 病の複合合併症の 1 例, 日産婦誌, 41(6): 761, 1989
- 3) 岡村 均, 奥田雄二, 神崎秀陽, 竹中 章, 森本幸己, 西村敏雄: 排卵時ヒト卵胞壁血管系の微細構造, 日産婦誌, 33(2): 215, 1981
- 4) 奥田雄二, 岡村 均, 神崎秀陽, 竹中 章, 森本幸己, 西村敏雄: 排卵過程における家兎卵胞壁毛細血管の超微細形態学的研究, 日産婦誌, 32: 739, 1980
- 5) 菊川美一: 排卵・卵成熟に及ぼす platelet activating factor の意義に関する研究, 日不誌, 35: 630, 1990
- 6) 牧野田知: 排卵時卵巣血行動態学的ならびに組織学的研究, 北医誌, 55: 521, 1980
- 7) Arne, N. T. and Mette, L.: Evaluation of an amidolytic heparin assay method: Increased sensitivity by adding purified antithrombin III, Thromb. Res., 10: 399, 1977
- 8) Espey, L. L., Kohda, H., Mori, T. and Okamura, H.: Rat ovarian prostaglandin levels and ovulation as indicators of the strength of non steroidal anti-inflammatory drugs, Prostagl, 36: 875, 1988
- 9) Espey, L. L., Tanaka, N., Woodard, D. S., Harpar, M. J. K. and Okamura, H.: Decrease in ovarian platelet-activating factor during ovulation in the gonadotropin-priming immature rat, Biol. Reprod., 41: 104, 1989
- 10) Okamura, H.: Vascular role in the mechanisms of ovulation.: In Preservation of Tubo-ovarian Function in Gynecologic and Malignant Disease, Edited by Ichinoe, K., Segal, S. S. and Mastroianni, L., Serono Symposia Publications from Raven Press, Vol. 48, 192, 1988
- 11) Langdell, R. D.: Effect of antihemophilic factor on one stage clotting tests, J. Lab. Clin. Med., 41: 637, 1954
- 12) Margolis, J.: The kaolin clotting time. A rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects, J. Clin. Pathol., 11: 406, 1958
- 13) Tanaka, N., Espey, L. L. and Okamura, H.: Increase in ovarian blood volume during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat, Biol. Reprod., 40: 762, 1989

Possible roles of the coagulation system during the ovulatory process in gonadotropin-primed immature rats

Jin Iwamasa, Kohei Matsuura,
Nobuyuki Tanaka and Hitoshi Okamura

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

Close to the time of follicle rupture, thrombosis has been shown to occur in the capillaries of the apex of the preovulatory follicle. We examined the

effect of anti-thrombin III (AT III) and/or heparin on ovulatory function in gonadotropin-primed immature rats.

Single injection of AT III or heparin did not significantly decrease the number of ovulated ova compared to the control group. Concomitant injections of AT III and heparin within 6 hours after the hCG injection significantly decreased the number of ovulated ova in comparison with the control group. It is concluded that the normal function of the coagulation system is mandatory for the ovulatory process and its critical time is from 0 hour to 6 hours after the hCG injection.

(受付：1991 年 7 月 18 日)

IN VIVO STUDIES ON THE FIRST HALF STAGE OF RABBIT BLASTOCYST IMPLANTATION

Ichiro TATEYAMA and Koji HASHII

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kishiwada City Hospital, Osaka 596, Japan

Naoyuki KAMITANI and Toshiro TOMINAGA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukui Medical School, Fukui 910-11, Japan

Takahide MORI

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

Abstract: Rabbit blastocyst implantation was observed morphologically over the course of time to investigate how previous *in vitro* studies of rabbit blastocyst implantation are reflected by the process of *in vivo* implantation, and to investigate the mechanism of implantation. Implantation is a dramatic physiological phenomenon involving interactions between the blastocyst (composed mainly of trophoblasts) and the endometrial cells (composed mainly of uterine endometrial stromal cells). The present study detected the presence of lymphocytes and macrophages, which have not been observed in *in vitro* studies, and implantation could be assessed from the immunological viewpoint. Many points corresponding to the *in vitro* findings were also observed, such as the changes of collagen, the secretory behaviour of endometrial epithelial cells, and the lysis of the blastocyst covering. In this report, the first half of implantation is covered up to 7.5 days after coitus, and the changes of the endometrium to accommodate trophoblasts and the behaviour of the blastocyst which differentiate moment by moment are described clearly. The changes in this first stage were considered to be a significant prelude to the subsequent more drastic changes which might be said to be the essence of implantation.

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 37 (2), 248-259, 1992)

Introduction

Pregnancy in mammals can be regarded as a type of successful allograft, and since blastocyst implantation in the uterine endometrium is the starting point of establishing a viable pregnancy, it is a very interesting physiological phenomenon. The course of blastocyst implantation varies depending on the species of animal, but if im-

plantation-placentation is considered as a reproductive phenomenon peculiar to viviparous animals, the presence of common essential mechanisms transcending these species differences is emphasized. In rabbits, central implantation occurs, which is greatly different from the interstitial implantation seen in humans. In central implantation, the blastocyst remains in the uterine cavity and only superficial implantation

occurs. From the evolutionary aspect, this can be seen as primitive type of implantation. Therefore, by studying rabbit blastocyst implantation from its morphological or immunological aspects, it may be possible to review the basic implantation process occurring in various viviparous animal species. The present study was performed on the basis of preceding *in vitro* studies of rabbit blastocyst implantation¹⁻³⁾.

Materials and Methods

New Zealand female white rabbits (Keari, 2.5-3.5 kg) were reared under specific pathogen-free (SPF) conditions and, classified into the following groups: nonpregnant, 6.5 days post coitus (d.p.c.), 7 d. p. c., 7.5 d. p. c., 7.75 d. p. c., 8 d. p. c., 8.25 d. p. c., 8.5 d. p. c., and 9 d. p. c. The uterus of each rabbit was excised and the intrauterine cavity was observed morphologically. Two rabbits were used at each time period. In rabbits, if the room temperature is regulated correctly for sexual excitement and ovulation, an almost 80-90% successful mating rate is obtained. Rabbits were laparotomized under intravenous anesthesia (pentobarbital sodium, 0.3 ml/kg) plus ether anesthesia, and the whole uterus was excised. The excised uterus was divided immediately for light microscopy and electron microscopy, with cross-sections being made to view the uterine cavity and the site of implantation. In the preparation of light microscopy specimens, the uterus was cut into several parts, fixation was performed in 20% neutral buffered formalin for about one week, and hematoxylin-eosin (HE) staining, Azan staining (modified Azan method), or toluidine blue staining of sections was performed. In preparing electron microscopy specimens, the excised uterus was divided at each site of implantation, and at each implantation 3-4 uterine crosssections were cut with a very sharp razor blade. If the sections were cut too small at this time, the site of implantation was destroyed and the specimen became useless. Therefore, it was necessary to make large sections with a long fixation time, but even so the site of implantation was lost in a considerable proportion of cases. Prefixation was performed overnight with a mixture of equal

volumes of 4% paraformaldehyde and 5% glutaraldehyde containing 4% sucrose.

After washing several times with cacodylate buffer containing 0.1 M sucrose, sections were left for 6 hours, and then postfixation was performed for 3 hours with 2% osmium tetroxide. After dehydration with an ethanol series, Epon embedding was performed. Ultrathin sections were cut with an ultramicrotome (MT2-B, Porter-Blum), and after double staining with uranyl acetate and lead citrate, observation was performed with a transmission electron microscope (HITACH-H 600).

Concerning the anatomy and physiology of the rabbit uterus in the implantation period, reference was made to the articles of Boving et al.⁴⁾ and Denker⁵⁾, and the terms used here are in accordance with these sources, as shown in the diagram. In the first half of rabbit blastocyst implantation, the 4 stages of nonpregnant, 6.5 d. p. c., 7 d. p. c., and 7.5 d. p. c. were investigated morphologically over the course of time.

Results

Since the rabbit zona pellucida seems to be more properly called the blastocyst covering after 6.66 d. p. c.⁵⁾, this term is used in our article. Collagen was observed by light microscopy and collagen fibrils by electron microscopy.

<Light microscopic findings>

Light microscopy of the nonpregnant uterus showed endometrial folds densely covering the interior of the uterine cavity. The collagen content of the endometrial folds was very low and no protuberance of the folds themselves was seen (Fig. 1,2). At high power, stromal components of the uterine endometrium were denser and stained more darkly than the endometrial epithelial cells. Furthermore, endometrial epithelial cells facing the lumen of the uterine cavity had dense villi and cilia (Fig. 3). At 6.5 d. p. c., development of the endometrial stromal component was greater, collagen and other components were increased in quantity, and stromal cells and capillaries showed proliferation. The stromal cells themselves were enlarged and a tendency to edema was seen (Fig. 4).

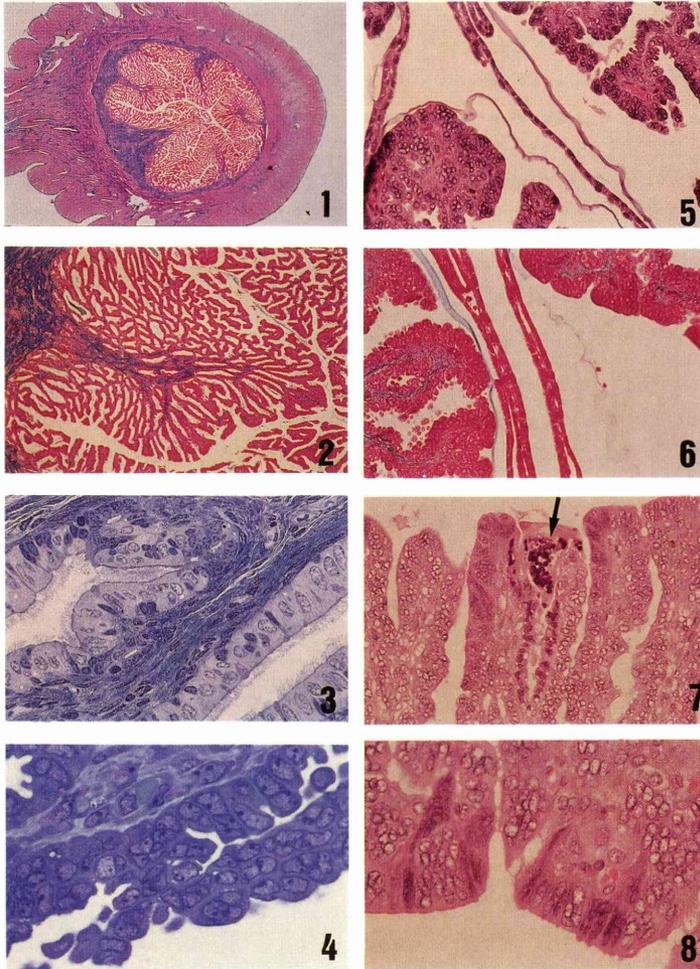


Fig. 1 The uterine cavity is filled densely with endometrial folds. Nonpregnant, $\times 10$, Azan staining

Fig. 2 There is little collagen in the endometrial folds and no protuberance of the folds is seen. Nonpregnant, $\times 40$, Azan staining

Fig. 3 In the endometrial folds, endometrial epithelial cells are arranged in an orderly fashion and possess villi or cilia. The endometrial stromal components are stained much more darkly than the endometrial epithelial cells. Nonpregnant, $\times 1,000$, toluidine blue staining

Fig. 4 Development of the endometrial stromal component is good, and the quantity of collagen is also increased. Capillaries and red blood cells are also seen. 6.5 d. p. c., $\times 1,000$, toluidine blue staining

Fig. 5 Attachment of the endometrial epithelial cells to the blastocyst covering is seen. The endometrial folds have developed further. 7 d. p. c., paraplacental folds, $\times 200$, HE staining

Fig. 6 The quantity of collagen in the stromal component has increased further. 7 d. p. c., paraplacental folds, $\times 200$, Azan staining

Fig. 7 The arrangement of epithelial cells of the endometrial folds has become irregular. Lymphocytes and other cells are seen in the residual blastocyst covering (\uparrow). 7 d. p. c., placental folds, $\times 200$, HE staining

Fig. 8 Cells shortly before necrosis (shortly before desquamation) are seen among the epithelial cells of the endometrial folds. 7 d. p. c., placental folds, $\times 400$, HE staining

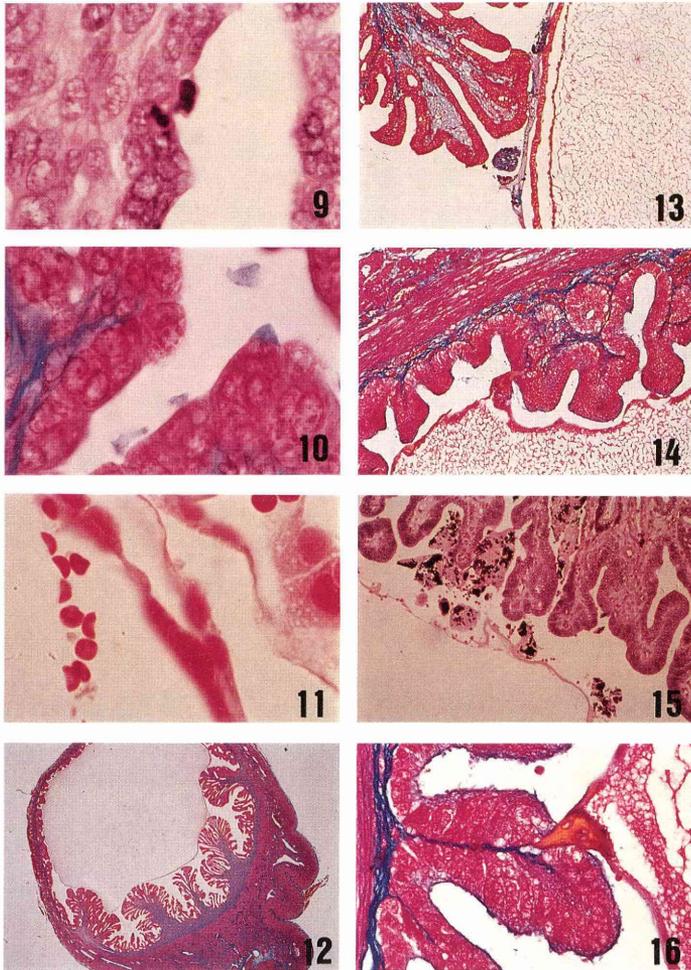


Fig. 9 Emergence of mononuclear cells from among the endometrial epithelial cells. 7 d. p. c., placental fold, $\times 1,000$, HE staining.

Fig. 10 Secretion of collagen or its precursors from the endometrial stromal side is seen on the surface of the endometrial folds. 7 d. p. c., placental folds, $\times 1,000$, Azan staining

Fig. 11 Red blood cells appearing in the uterine cavity. They were especially present around the trophoblast, perhaps due to increased endometrial capillary permeability at the site of implantation. 7 d. p. c., $\times 1,000$, Azan staining

Fig. 12 The endometrial folds were raised, as if to meet the blastocyst. 7.5 d. p. c., $\times 10$, Azan staining

Fig. 13 Attachment of the blastocyst covering, which has begun to undergo lysis, to the endometrial fold is seen. The collagen content in the endometrial fold has increased considerably. 7.5 d. p. c., paraplacental fold, $\times 100$, Azan staining

Fig. 14 Penetration of the trophoblasts into the endometrial folds is seen. 7.5 d. p. c., obplacental folds, $\times 100$, Azan staining

Fig. 15 Scattered products of the lysis of the blastocyst covering are seen. 7.5 d. p. c., placental folds, $\times 100$, HE staining

Fig. 16 At the site of penetration of the trophoblasts into the endometrial fold, the syncytiotrophoblasts are stained orange. 7.5 d. p. c., obplacental fold, $\times 400$, Azan staining

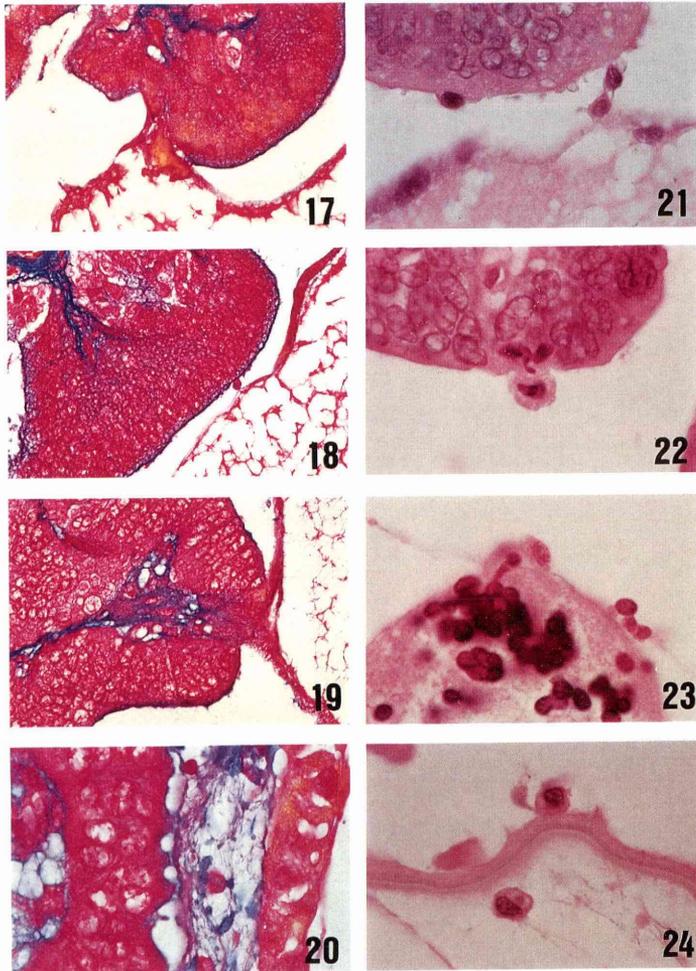


Fig. 17 Also at the site of trophoblast penetration. The surface of the endometrial fold is stained with aniline blue. 7.5 d. p. c., oblacental fold, $\times 400$, Azan staining

Fig. 18 Cells are observed on the surface of the endometrial fold. The surface of the endometrial fold is stained with aniline blue. 7.5 d. p. c., oblacental fold, $\times 400$, Azan staining

Fig. 19 Penetration of the trophoblast extends as far as to endometrial stroma in some parts. 7.5 d. p. c., oblacental fold, $\times 500$, Azan staining

Fig. 20 Cells penetrating into the blastocyst covering which has begun to be lyzed. 7.5 d. p. c., paraplacental fold, $\times 1,000$, Azan staining

Fig. 21 Lymphocytes appearing on the surface of the endometrial fold. 7.5 d. p. c., oblacental fold, $\times 1,000$, HE staining

Fig. 22 Macrophages appearing on the surface of the endometrial fold. 7.5 d. p. c., oblacental fold, $\times 1,000$, HE staining

Fig. 23 Lymphocytes in the products of lysis of the blastocyst covering. 7.5 d. p. c., $\times 1,000$, HE staining

Fig. 24 Macrophages present around the blastocyst covering which has begun to be lyzed. 7.5 d. p. c., $\times 1,000$, HE staining

At 7 d. p. c., protuberance of the endometrial cells and the blastocyst covering was seen. The endometrial folds had developed further, and among them collagen, capillaries, and erythrocytes were seen in large numbers. In the blastocyst, the development of trophoblasts in a single layer was marked (Fig. 5,6). The endometrial epithelium of the placental folds showed an irregular arrangement, in contrast to the previous stratified arrangement. Moreover, some HE-stained cells had different levels of staining, and may have been epithelial cells immediately before necrosis. The blastocyst covering was partially lyzed, and among the lyzed products cellular clusters composed mainly of lymphocytes were also seen. Erythrocytes were prominent in the endometrial folds, but the secretory action of the epithelial cells themselves was not so marked (Figs. 7, 8). From among the endometrial epithelial cells, the emergence of lymphocytes or slightly larger cells was seen (Fig. 9). In the endometrial folds, the development of collagen was good and its secretion (collagen or collagen precursors) into the uterine cavity was also seen (Fig. 10). In the uterine cavity, erythrocytes were seen around the trophoblast and in various other places, and they may have indicated endometrial hemorrhage in the early stage of implantation (Fig. 11).

At 7.5 d. p. c., protuberance of the endometrial folds has become still more marked, and they "reached out" to meet the blastocyst. The protuberance of endometrial folds was mainly due to the increased quantity of collagen in the stroma, and also to a strong tendency towards edema. The protuberance of placental folds was particularly intense and the blastocyst was pushed up towards the antimesometrial region at this stage. Obplacental folds also took on the form of having trapped the blastocyst and contained a large quantity of collagen (Fig. 12). In the paraplacental folds, attachment was seen between the blastocyst covering, which has begun to be lyzed, and the folds themselves. In the blastocyst covering, both thick and thin zones were noted, and the mode of lysis was not uniform. Completely lyzed and separated masses were also seen. When seen at high power, various cells were mixed in the blastocyst

covering which has begun to be lyzed, and endometrial epithelial cells were also discharging secretions that appeared to aid in the lysis (Fig. 13, 20). At this time, in the obplacental folds, penetration of trophoblasts belonging to the blastocyst into the endometrial folds was seen here and there. The extent of penetration varied, while the trophoblast which was the forefront of penetration was the syncytiotrophoblast, and the cytoplasm of these cells was stained a bright orange color with Azan staining. This penetration of the trophoblast was directed towards the interior of the endometrial folds, and already at this time some trophoblasts had reached as far as the endometrial stromal components (Figs. 14, 16, 17, 19). In the vicinity of the placental folds, the blastocyst covering was lyzed and a residue was seen. At high power, the lyzed products contained large numbers of cells that were assumed to be lymphocytes or macrophages (histiocytes, etc.) (Fig. 15, 23, 24). On Azan staining of the endometrial folds, a substance was present among the endometrial epithelial cells that stained with aniline blue, and also the surface of the endometrial epithelium facing to the uterine cavity was stained with aniline blue. These findings suggest that not only the secretions of endometrial epithelial cells, but also collagen or its precursor were stained blue. On the surfaces of endometrial folds, cells were sometimes present that might be macrophages or lymphocytes, and they were thought to have migrated out from the endometrial tissue (Figs. 18, 21, 22).

<Electron microscopic findings>

Electron microscopy of the nonpregnant uterus showed that the villi and cilia of endometrial epithelial cells were arranged densely towards the surface of the uterine or glandular cavities. Furthermore, the endometrial epithelial cells were mononucleated and presented an orderly stratified arrangement, while migrating cells, especially lymphocytes, were seen from time to time. The endometrial epithelial cells were generally somewhat large cells containing many slender mitochondria, while among the cells of the superficial layer covering the glandular cavities some had a marked increase in free ribosomes



Fig. 25 Endometrial epithelial cells with villi and cilia. Lymphocytes are also present (\uparrow). Some of the epithelial cells are engaged in prominent secretory activity. Nonpregnant, $\times 1,500$, TEM

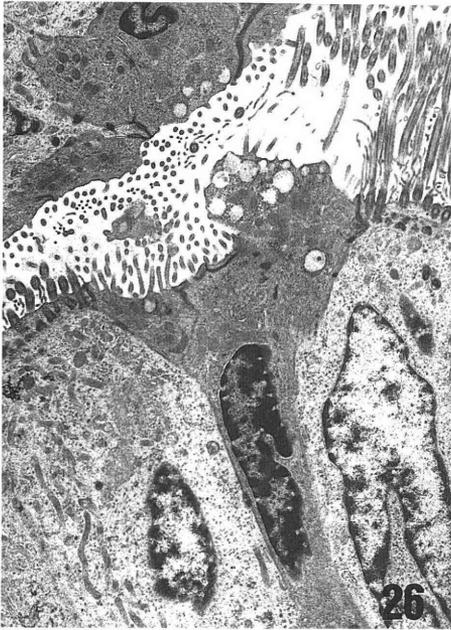


Fig. 26 A cell producing uteroglobin. Rough endoplasmic reticulum and free ribosomes are abundant. These cells seem to dequamate into the uterine cavity after discharging their secretions. Nonpregnant, $\times 6,500$, TEM

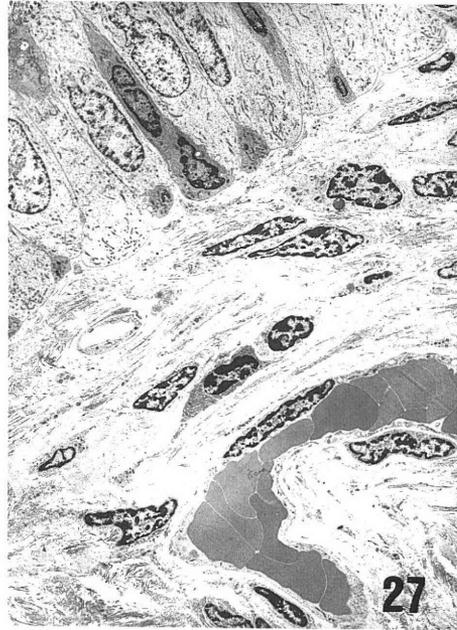


Fig. 27 As stromal components, endometrial stromal cells, collagen fibrils, and capillaries were arranged densely. Nonpregnant, $\times 2,000$, TEM

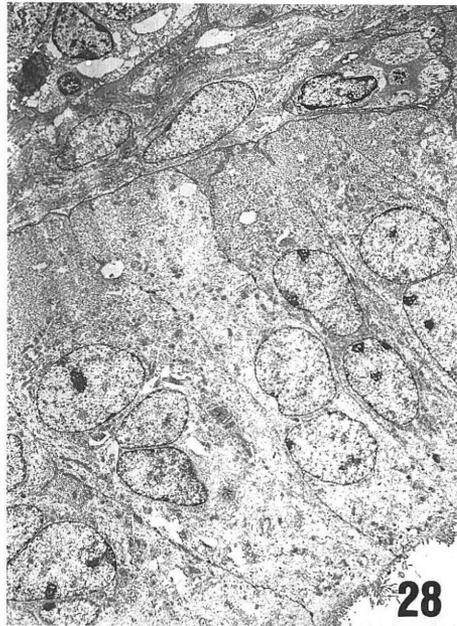


Fig. 28 Endometrial epithelial cells beginning to unite, showing also a tendency to edema. Apical secretion is also noted. 6.5 d. p. c., $\times 2,500$, TEM

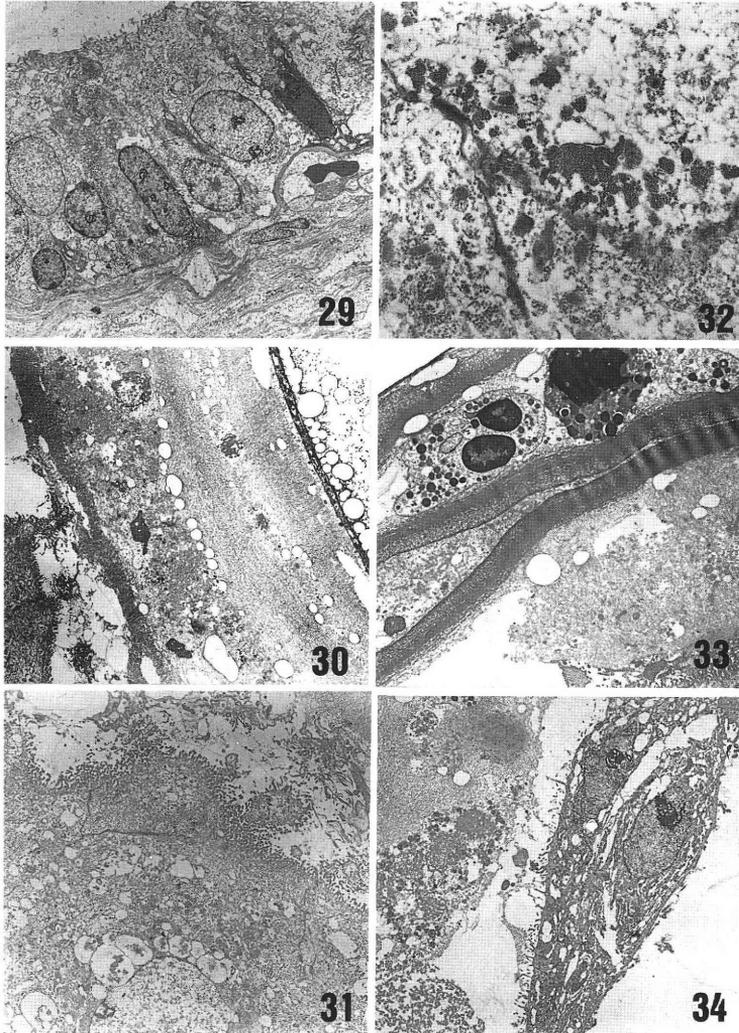


Fig. 29 The tendency to edema and swelling is stronger in the endometrial tissue on the whole. 7 d. p. c., $\times 2,000$, TEM

Fig. 30 The blastocyst covering is being lysed. Holes are seen leading to the interior. 7 d. p. c., $\times 1,500$, TEM

Fig. 31 The attachment between the endometrial epithelial cells and the blastocyst covering. The epithelial cells show intense apical secretion, edema, necrosis and desquamation. 7 d. p. c., $\times 3,000$, TEM

Fig. 32 Magnified image of the attachment site in Fig. 31. Products of lysis of the blastocyst covering, collagen fibrils, and secretions of the endometrial epithelial cells are mixed. 7 d. p. c., $\times 10,000$, TEM

Fig. 33 Groups of cells with lysosomes are seen in the blastocyst covering which is being lysed. 7.5 d. p. c., $\times 3,500$, TEM

Fig. 34 The site of attachment between the trophoblasts and the blastocyst covering. 7.5d. p. c., $\times 2,500$, TEM

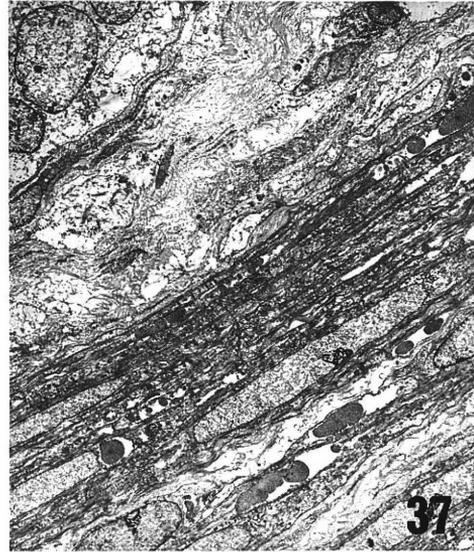
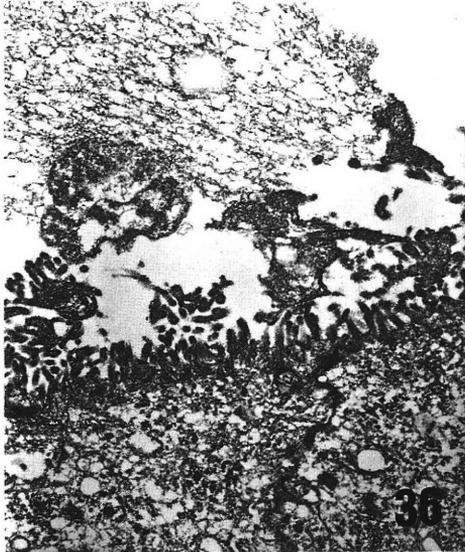
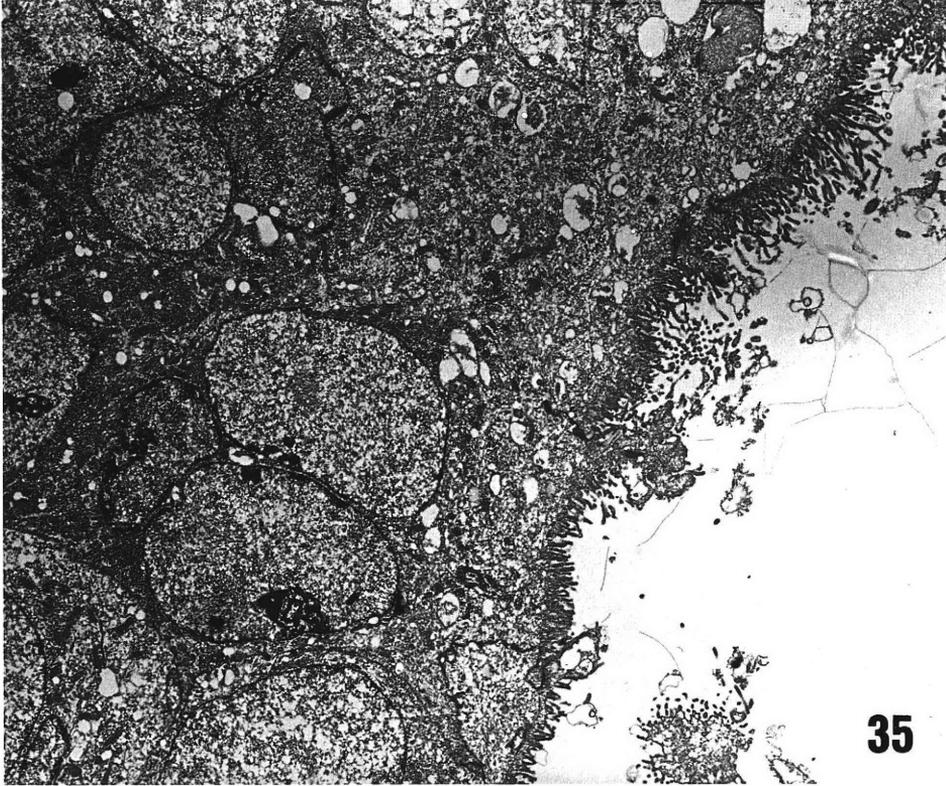


Fig. 35 Union of the endometrial epithelial cells has progressed further. 7.5 d. p. c., $\times 5,000$, TEM

Fig. 36 The secretory activity of the endometrial epithelial cells has become more prominent. The attachment of the epithelial cells to one another has become very loose. 7.5 d. p. c., $\times 8,000$, TEM

Fig 37 Among the stromal components, collagen fibrils are increased in quantity and there is a tendency for stromal becoming edema. 7.5 d. p. c., $\times 2,000$, TEM

and rough endoplasmic reticular, and their mitochondria also became slightly larger. They contained many cytoplasmic granules and thus were shown to be actively secreting. Probably, they were secreting fluid into the uterine cavity. The stromal components beneath the basement membrane showed dense stromal cells, collagen fibrils, and capillaries, and erythrocytes were seen here and there in the capillaries (Figs. 25-27). At 6.5 d. p. c., a tendency for edema of the endometrial epithelial cells and stromal components appeared, and low electron density lesions were seen in various places. The endometrial epithelial cells the beginnings of union, and cells lining the surfaces of the glandular cavities showed apical secretion (Fig. 28).

At 7 d. p. c., the edema and swelling became more intense in the endometrial epithelial cells, secretion into the uterine or glandular cavities became more intense, and simultaneously some cells showed necrosis or sloughing. The blastocyst covering also started to undergo lysis, its electron density showed great variation, and there were many gaps leading to the interior. This was considered to be the result of enzymatic lysis as well as of interactions between the trophoblastic and endometrial sides. When the attachment between the blastocyst covering and the endometrial epithelial cells was observed, especially on the side of the placental folds, various fibers, cords, and granules were present. They seemed to be the products of lysis of the blastocyst covering including collagen fibrils and other secretions on the endometrial side (Figs. 29-32).

At 7.5 d. p. c., in the blastocyst covering which was being lysed, groups of cells containing many lysosomes were observed. They were thought to be macrophages or lymphocytes and to correspond to the macrophages and lymphocytes seen by light microscopy (Fig. 33). Trophoblasts had also proliferated actively to form 1-2 layers of cells (cytotrophoblasts), and were in contact with the blastocyst covering which was undergoing lysis (Fig. 34). On the endometrial side, the union of endometrial epithelial cells had advanced further, and cells with 2 or 3 nuclei had appeared. Vacuoles increased in number in the cytoplasm of

these cells, while apical secretion via the villi also increased and the secretory activity was further enhanced. The endometrial epithelial cells were united with one another by desmosome-like junctions, but these were very loose (Figs. 35, 36). In the endometrial stroma, stromal cells, collagen fibrils, and capillaries were seen, and the quantity of collagen fibrils was markedly increased. Also, the stroma showed a tendency to the development of edema (Fig. 37). However, electron microscopic observation up to 7.5 d. p. c. did not reveal trophoblastic penetration to the endometrial side in the obplacental folds or macrophages and lymphocytes on the surfaces of the endometrial folds, as was seen by light microscopy.

Discussion

In the rabbit, the first stage of implantation is attachment of the blastocyst covering to the endometrial epithelial cells while it is being lysed. Considering pregnancy from the immunological viewpoint, the fertilized ovum (blastocyst) is foreign to the mother (allogeneic), and so a foreign body reaction is caused at the time of implantation. In this study, at 7 d. p. c. and 7.5 d. p. c. many macrophages and lymphocytes were noted among the endometrial epithelial cells of the endometrial folds, on the surface of the uterine cavity, and in residual blastocyst covering. These cells are often involved in inflammatory reactions and foreign body reactions. There is a report⁶ that, in the nonpregnant state, 10,000-100,000 cells (especially migrating cells, endometrial epithelial cells, and red blood cells) are present in the secretions in the uterine cavity. As the number of migrating cells (especially neutrophils, macrophages, and lymphocytes) increases, the foreign body reaction or inflammatory reaction becomes more intense. If it is considered that an intense foreign body reaction takes place also at the time of pregnancy, it is natural that macrophages and lymphocytes should increase to enormous numbers. In the mouse, the strong antigenicity of the trophoblast as well as maternal antibodies against sperm-derived antigens have been demonstrated, and it is assumed that immune tolerance is caused by hyperimmunization^{7,8}. Also in the

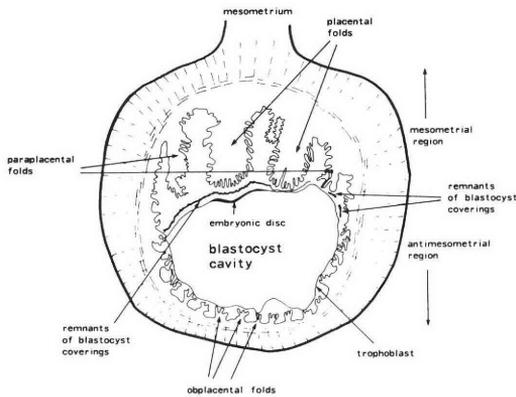


Fig 38 Schematic drawing of blastocyst and uterus in the rabbit, cross section, 7.5 d. p. c.

rabbit, in the early stage of implantation a complex immunoregulatory mechanism seems to involve macrophages, lymphocytes, and the lymphokines produced by these cells. At 7.5 d. p. c., mononuclear cells were observed light microscopically in the endometrial epithelium, but they could not be observed electron microscopically. It is assumed that during the preparing specimens for electron microscopy, these cells were lost. However, by 7.75 d. p. c. the image became clearer. In our *in vitro* studies of rabbit blastocyst implantation¹⁻³), these mononuclear cells were not observed, which may be due to difference between cell culture systems and the *in vivo* situation. Concerning red blood cells, from the early period of implantation (7-7.5 d. p. c.) their penetration from the endometrium into the uterine cavity was seen, which was considered to be caused by increased endometrial capillary permeability at the site of implantation. This is a phenomenon also noted in the rat and mouse.

Endometrial epithelial cells produce uteroglobin (blastokinin) even before pregnancy⁹). This is a glycoprotein with a molecular weight of 14,000-15,000, and the regulation of its secretion is dependent on estrogen and progesterone. In the present study, uteroglobin-like granules were noted in the cytoplasm of endometrial epithelial cells before pregnancy. These cells producing uteroglobin had abundant rough endoplasmic reticulum, free ribosomes, and slightly large mitochondria, and a higher electron density than the

other endometrial epithelial cells. Moreover, they were present in the most superficial layer on the surface of the uterine or glandular cavities, and underwent necrosis after producing and secreting uteroglobin to be released into the uterine secretions. Similar findings were also noted at the time of implantation, and those endometrial epithelial cells which produced and secreted uteroglobin actively became edematous and then underwent necrosis. Concerning the significance of this glycoprotein, there are different opinions at present and various theories have been considered^{10,11}).

The lysis of the blastocyst covering is reported in detail in Denkers' article⁵). Lysis commences at 6.5-7 d. p. c., and is especially intense in the neighborhood of the trophoblastic knob. It is said that the trophoblasts of the blastocyst secrete a protease at implantation, which acts in the lysis of the blastocyst covering, the lysis of substances around the blastocyst covering, and the lysis of the surface of the endometrial epithelium, as well in adhesion and fusion of the trophoblast with the endometrial epithelium (blastolemmase)⁵). In the present study, the lysis of the blastocyst covering seemed to be a cooperative effort of the trophoblast and endometrial epithelial cells, with immunoregulatory mechanisms involving mononuclear cells having a role. *In vitro* studies of rabbit blastocyst implantation¹⁻³) showed a different mode of lysis due to the presence of culture fluid and the absence of mononuclear cells, and partial rupture of the blastocyst covering was also seen.

As stated before, implantation of the rabbit blastocyst is an example of the central type of implantation. While the blastocyst is pushed up by the placental folds, implantation starts first at the oblacental folds in the antimesometrial region, extending gradually to the paraplacental folds and further to the placental folds. The progression of implantation is very dramatic^{12,13}). The subsequent 7.75 d. p. c. changes, which are of considerable interest, were reported on the basis of *in vitro* studies on the second half of rabbit blastocyst implantation¹⁴).

References

- 1) Tateyama, I.: In vitro studies on the early stage of rabbit blastocyst implantation, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 34: 316, 1989
- 2) Tateyama, I.: In vitro studies on the middle stage of rabbit blastocyst implantation, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 34: 385, 1989
- 3) Tateyama, I.: In vitro studies on the last stage of rabbit blastocyst implantation, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 34: 761, 1989
- 4) Boving, B. G. and Larsen, J. F.: Human reproduction (Conception and contraception), 133, Harper & Row, 1973
- 5) Denker, H. W.: Advances in anatomy, embryology and cell biology, 15, Springer-Verlag, 1977
- 6) Moyer, D. L., El-Sahwi, S., Macaulay, L. and Shaw, S. T. Jr.: The biology of the fluids of the female genital tract, 59, Elsevier, North-Holland, 1979
- 7) Allen, W. R.: Immunology of Trophoblast, 217, Cambridge University Press, 1975
- 8) Johnson, M.: Immunology of trophoblast, 87, Cambridge University Press, 1975
- 9) Beier, H. M.: The biology of the fluids of the female genital tract, 89: Elsevier, North-Holland, 1979
- 10) Krishnan, R. S. and Daniel, J. C. Jr.: "Blastokinin"-Inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus, *Science*, 158: 490, 1967
- 11) Johnson, M. H.: The protein composition of secretions from pregnant and pseudopregnant rabbit uteri with and without a copper intra-uterine device, *Fertil. Steril.*, 23: 123, 1972
- 12) Kirby, D. R. S.: The development of mouse blastocysts transplanted to the spleen, *J. Reprod. Fertil.*, 5: 1, 1963
- 13) Larsen, J. F.: Physiology and genetics of reproduction 287, Plenum Press, 1974
- 14) Tateyama, I.: In vivo studies on the second half stage of rabbit blastocyst implantation, submit-

ted for publication

家兔胚の着床 (前半部)

市立岸和田市民病院産科婦人科

立山一郎 橋井康二

福井医科大学産科婦人科学教室

紙谷尚之 富永敏朗

京都大学医学部婦人科学産科学教室

森 崇英

家兔胚の着床を、時間経過に従って形態学的に観察した。これは着床の mechanism を解明するという理由の他に、これに先だって報告した in vitro studies of rabbit blastocyst implantation が in vivo 着床にどのように反映されるか調査するためであった。着床とは、trophoblast を中心とする胚側と、子宮内膜間質細胞を主役とする内膜側との相互作用によって作り出される極めて drastic な生理現象とすることができる。今回の研究では、in vitro studies では観察されなかったリンパ球やマクロファージの出現があり、免疫学的な方面からの着床を捉えることができた。また collagen の動態、内膜上皮細胞の分泌活動、blastocyst covering の溶解など、in vitro studies での反映が多く観察された。この報告では、非妊、6.5 d. P. c., 7 d. P. c., 7.5 d. P. c. と着床の前半とも言うべき時点を扱ったが、刻々と分化していく胚と、trophoblast を迎え入れる内膜側の変化が鮮明に描き出された。この前半部の変化は、着床の本質とも言える来たるべき更に drastic な変化の序曲として、意義深いものと考えられた。

(受付: 1991 年 7 月 18 日)

EFFECTS OF ENDOTHELIN—1 ON STEROIDO- GENESIS BY RAT OVARIAN FOLLICLES

Satoshi USUKI

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

Abstract: The possible direct involvement of endothelin-1 (ET) in ovarian steroidogenesis was investigated *in vitro*.

Rats of the Wistar-Imamichi strain at 27 days of age were treated subcutaneously with 10 IU of pregnant mare's serum gonadotropin (PMS). Ovaries were resected 24 or 48 h after PMS treatment and incubated with or without 0.01 to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ET for 120 min. ET significantly increased progesterone, testosterone and estradiol-17 β levels in incubation media. In the subsequent time-course study, ovaries were incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ET for 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 or 180 min. ET also stimulated progesterone, testosterone and estradiol-17 β secretion. The stimulatory effect of ET was more on progesterone secretion than it was on testosterone or estradiol-17 β secretion. In addition, ET significantly, but weakly, increased cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) accumulation in ovarian tissue. These findings point toward the involvement of ET in the regulation of ovarian steroidogenesis, possibly through the partial mediation of the cyclic AMP.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 260—265, 1992)

Introduction

ET is well known for its characterization as a 21-residue potent vasoconstrictor peptide initially isolated from porcine aortic endothelial cells¹⁾. In addition to the circulating peptide²⁻⁵⁾, several organs have also been shown to contain ETs⁶⁻⁸⁾ and extensive research is in progress to outline nervous and endocrine functions other than vasoconstriction and pressor response. ET has a wide variety of physiological actions on endocrine system such as brain-gut peptide⁷⁾, the inhibition of renin release⁹⁾, the induction of the release of atrial natriuretic peptide¹⁰⁾, increase in aldosterone secretion¹¹⁾, eicosanoids¹²⁾ and vasopressin and epinephrine¹³⁾, modulation of the release of vasopressin or oxytocin⁸⁾ and uterine contraction or fetal development^{3,14)}. Recently it has also been

reported that ET exists at a high level in the ovary^{15,16)}, suggesting that ET could contribute to the physiological control of ovarian function. This study was performed to investigate the effect of ET on steroidogenesis by ovarian follicles.

Materials and Methods

ET was obtained from Peptide Institute, Inc. (Osaka). Immature female Wistar-Imamichi rats were maintained in an environmentally controlled room with free access to a balanced diet and water. They were injected subcutaneously with 10 IU of PMS on day 27 of age. The animals were decapitated under mild anesthesia 24 and 48 h after PMS administration, the ovaries immediately removed. The ovaries (one per for each experimental chamber room) were incubated *in vitro* at

37°C for 120 min in 2 ml TC-199 medium (1% glucose and 0.2% NaHCO₃, pH 7.4) containing 0.01–10 μg/ml of ET following preincubation for 60 min, as described previously¹⁷⁾. Secondly, the ovaries were incubated *in vitro* with 1 μg/ml ET for 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 or 180 min after 20-min preincubation. After incubation, medium progesterone, testosterone and estradiol-17β concentrations were measured by RIA, as described previously^{18,19)}. In the case of 120-min incubation, tissue or medium cyclic AMP content was also measured by RIA²⁰⁾.

Student's t-test was employed for the statistical analysis of the results, and differences were considered to be significant at the level of $p < 0.05$.

Results

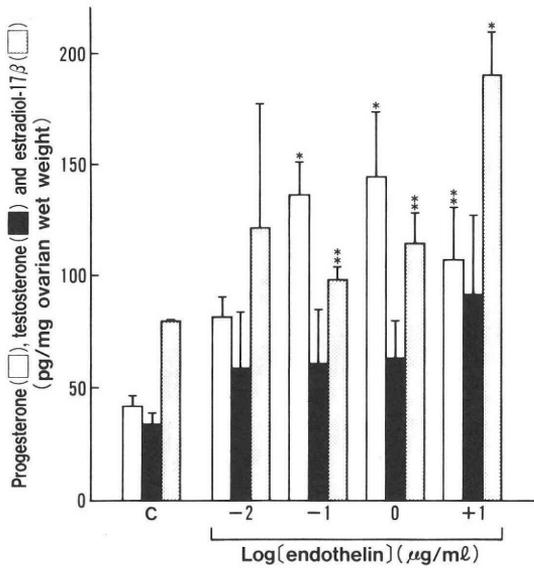


Fig. 1 Effect of endothelin-1 on progesterone, testosterone and estradiol-17β concentrations in ovaries, incubated *in vitro*, of immature rats. Ovaries were collected from immature rats after pretreatment with a single administration of 10 IU of PMS at 24 before the rats were killed. Ovaries were incubated with or without ET. Steroids that accumulated in the medium during 120-min incubations were measured by specific RIAs. C, control group. Data are expressed as mean±SD of six observations in each group. *, $P < 0.001$; **, $p < 0.01$ compared with control group.

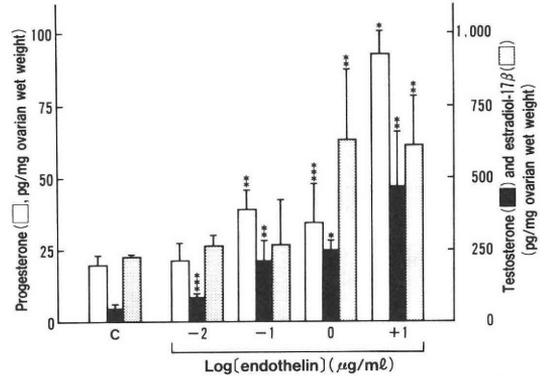


Fig. 2 Effect of endothelin-1 on progesterone, testosterone and estradiol-17β concentrations in ovaries, incubated *in vitro*, of immature rats. Ovaries were collected from immature rats after pretreatment with a single administration of 10 IU of PMS at 48 before the rats were killed. Ovaries were incubated with or without ET. Steroids that accumulated in the medium during 120-min incubations were measured by specific RIAs. C, control group. Data are expressed as mean±SD of six observations. *, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.05$ compared with control group.

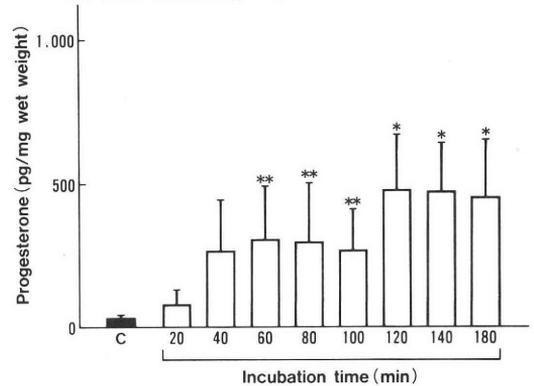


Fig. 3 Time course of effect of endothelin-1 on progesterone concentration in ovaries, incubated *in vitro*, of immature rats. Ovaries were collected from immature rats after pretreatment with a single administration of 10 IU of PMS at 48 before the rats were killed. Ovaries were incubated with or without 1 μg/ml ET for 180-min. At the end of the incubation, medium progesterone levels were measured by specific RIA. Data represent the mean±SD of eight observations in each group. *, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$ compared with control group (C, solid bar).

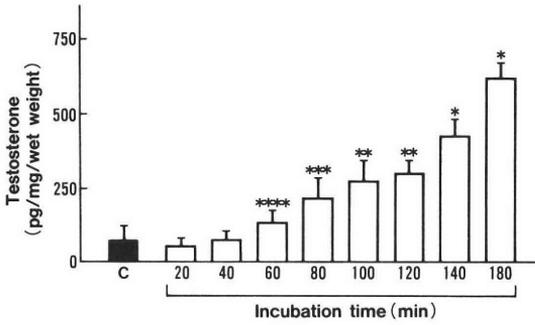


Fig. 4 Time course of effect of endothelin-1 on testosterone concentration in ovaries, incubated *in vitro*, of immature rats. Ovaries were incubated as described in Fig. 3. Medium testosterone levels were measured by RIA. Data represent the mean±SD of eight observations. *, P<0.001; **, P<0.01; ***, P<0.02; ****, P<0.05 compared with control group (C, solid bar).

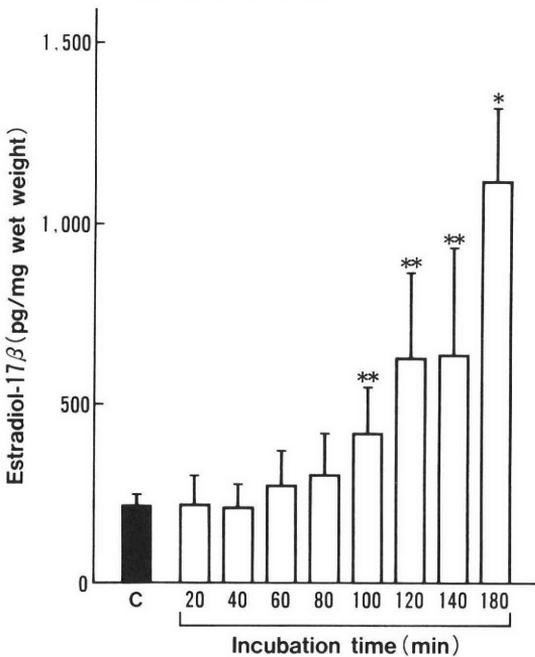


Fig. 5 Time course of effect of endothelin-1 on estradiol-17β concentration in ovaries, incubated *in vitro*, of immature rats. Ovaries were incubated as described in Fig. 3. Medium estradiol-17β levels were measured by RIA. Data represent the mean±SD of eight observations. *, P<0.001; **, P<0.01 compared with control group (C, solid bar).

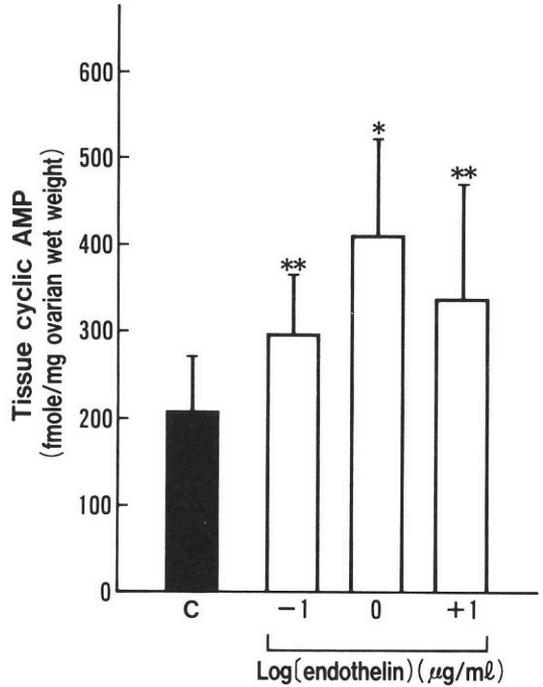


Fig. 6 Effect of endothelin-1 on tissue cyclic AMP accumulation in ovaries of immature rats. Ovaries were collected from immature rats after pretreatment with a single administration of 10 IU of PMS at 48 before the rats were killed. Ovaries were incubated for 120 min with or without ET. At the end of 120 min, the tissue cyclic AMP content was measured by specific RIA. Values are the mean±SD of seven observations in each group. *, P<0.01; **, P<0.05 compared with control group (C, solid bar).

As shown in Fig. 1, significant stimulation of progesterone, testosterone and estradiol-17β concentrations in ovaries 24 h after PMS injection was obtained with ET in concentrations of 0.01 to 10 μg/ml in the incubation media, with an exception of testosterone and estradiol-17β at 0.01 μg/ml. In ovaries with more mature preovulatory follicles 48 h after PMS injection, the medium progesterone, testosterone and estradiol-17β concentrations were also significantly increased with 0.01-10 μg/ml ET, with an exception of progesterone and estradiol-17β at 0.01 and 0.01-0.1 μg/ml respectively (Fig. 2).

Figures 3, 4 and 5 illustrate the time course of each steroid secretion. Significant stimulation of

progesterone, testosterone and estradiol-17 β concentrations in the incubation media was also obtained with 1 μ g/ml of ET, and the concentrations of testosterone and estradiol-17 β but not progesterone were time-dependent. The same data were obtained in the ovaries 24 h after PMS (data not shown). The stimulatory effect of ET was most remarkable on progesterone concentration.

To determine the mechanism of ET action, the tissue or medium cyclic AMP accumulation was examined. Significant stimulation of the tissue cyclic AMP accumulation in the ovaries 48 h after PMS injection was obtained with 0.1-10 μ g/ml ET (Fig. 6), whereas the medium content was questionable because the content was undetectable on some occasions (Fig. 7).

Discussion

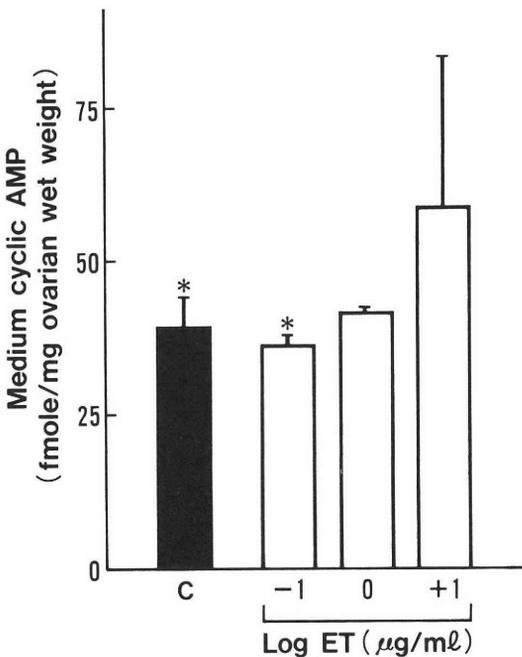


Fig. 7 Effect of endothelin-1 on medium cyclic AMP accumulation in ovaries of immature rats. Ovaries were incubated as described in Fig. 6. At the end of 120 min, the medium cyclic AMP content was measured by specific RIA. Values are the mean \pm SD of seven observations in each group. * indicates that the medium cyclic AMP in four of seven samples were undetectable.

Recently several lines of evidence have suggested various hormonal effects of endothelins other than the novel vasoactive properties⁷⁻¹⁴, and we have further identified the high existence of ET in the ovary^{15,16}. In this study, ET stimulated progesterone, testosterone and estradiol-17 β secretions in the ovaries in which the predominant steroid stimulated was progesterone. These results suggest that ET stimulates preovulatory follicles to secrete progesterone, testosterone and estradiol-17 β with a predominant secretion of progesterone. Whether or not ET acts on ovarian steroidogenesis *via* a versatile regulatory agent mediating a host of hormonal effects is another very intriguing problem to be solved. In this study, the tissue cyclic AMP accumulation was stimulated by ET. Since it is well known that cyclic AMP stimulates ovarian steroidogenesis^{21,22}, the increase in tissue cyclic AMP may also mediate a steroidogenic effect of ET as other peptide hormones do in the ovaries. However, the stimulatory effect of ET was less on cyclic AMP accumulation than it was on steroidogenesis, indicating that there may also exist other pathways to ovarian steroidogenesis such as Ca⁺⁺, IP₁, DAG and so on. The reason why the medium cyclic AMP content was negligible on some occasions might be due to the use of the whole ovary for which is yet to be clarified.

These results lead to the conclusion that, in addition to the release of steroids caused by the follicular contraction due to ET's contractile action, ET stimulates cyclic AMP accumulation at least partially and brings about a direct steroidogenic effect on the preovulatory follicles as a local autocrine/intracrine/paracrine mediator hormone. However, it remains to be investigated what mechanisms in ET action are involved in ovarian steroidogenesis or whether the presence of ETs is due to the local production or the pool of the circulating ETs in the ovary. Furthermore, in the present study it cannot be concluded which ovarian cell types were responsible for the steroidogenesis, because of the heterogeneity of the ovaries being incubated. This elucidation also awaits future studies.

Acknowledgements

The author thanks Miss J. Tanaka, Miss M. Kanzaki, Miss Y. Hayasaka and Mrs. S. Kawamura 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, and Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (62570741, 02670731).

References

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, M., Kobayashi, Y., Mitui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature*, 332: 411, 1988
- 2) Suzuki, N., Matsumoto, H., Kitada, C., Masaki, T., Fujino, M.: A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin, *J. Immunol. Method*, 118: 245, 1989
- 3) Usuki, S., Saitoh, T., Sawamura, T., Suzuki, N., Shigemitsu, Yanagisawa, M., 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
- 4) Usuki, S.: Endothelin-1 levels are not influenced by tokishakuyakusan and keishibukuryogan treatment in women, *AJCM*, 18: 139, 1990
- 5) Otani, S., Usuki, S., Iwasaki, H., Suzuki, N., Yanagisawa, M., Goto, K. and Masaki, T.: Plasma endothelin-1 in normal and complicated pregnancy, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5 (suppl. 7): S308, 1991
- 6) Kitamura, K., Tanaka, T., Kato, J., Ogawa, T., Eto, T., Tanaka, K.: Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162: 38, 1989
- 7) 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
- 8) Yoshizawa, T., Shinmi, O., Giaid, A., Yanagisawa, M., Gibson, S. J., Kimura, S., Uchiyama, Y., Polak, J. M., Masaki, T., Kanazawa, I.: Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system, *Science*, 247: 462, 1990
- 9) Rakugi, H., Nakamura, M., Saito, H., Higaki, J., Ogihara, T.: Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155: 1244, 1988
- 10) Fukuda, Y., Hirata, Y., Yoshimi, H., Kojima, T., Kobayashi, Y., Yanagisawa, M. and Masaki, T.: Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155: 167, 1988
- 11) Hinson, J. P., Kapas, S., Teja, R. and Vinson, G. P.: Actions of endothelins 1 and 3 on rat zona glomerulosa cells in vitro [Abstract], In *Proceedings of VIII International Congress on Hormonal Steroids*, p 17S. Utrecht, The Netherlands, 1990
- 12) Rae, G. A., Trybulec, M., Nucci, G. D. and Vane, J. R.: Endothelin-1 releases eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, (Suppl. 5): S89, 1989
- 13) Goetz, K. L., Wang, B. C., Madwed, J. B., Zhu, J. L. and Leadley, Jr. R. J.: Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs, *Am. J. Physiol.*, 255 (Regul. Integr. Comp. Physiol. 24): R1064, 1988
- 14) Masaki, T., Usuki, S., Yanagisawa, M. and Suzuki, N.: Endothelin in perinatal pharmacology, *Semin. Perinatol.*, 15: 27, 1991
- 15) Usuki, S.: Role of growth hormone in ovarian physiology. *Proceedings of the IInd Sapporo International Symposium on Ovarian Function*, in press, Raven Press, New York, 1991
- 16) Usuki, S.: Presence of endothelin-1 in high concentrations in rat ovaries, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 37: 110, 1992
- 17) Usuki, S., Kubota, S. and Miyakawa, S.: Growth hormone elevates deoxyribonucleic acid polymerase α activity in conjunction with deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat ovaries, *Biomed. Res.*, 10: 267, 1989
- 18) Usuki, S.: Hachimijiogan produces testosterone in adult rat testes, *AJCM*, 16: 92, 1988
- 19) Usuki, S., Kim, S. J., Shinjo, M., Tada, M., Fukamizu, A., Kubota, S., Usuki, Y., Miyazaki, H. and Murakami, K.: Effects of follicle-stimulating hormone on the regulation of ovarian renin production. In *Frontiers in Reproduction Research*. (ed. National Institute of Health), in press
- 20) Usuki, S.: Tokishakuyakusan stimulates cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation and progestin production by corpora lutea, *AJCM*, 16:21, 1988
- 21) Usuki, S. and Iwasaki, H.: Effects of LH and FSH on estrogen, progesterone and testosterone secretion by rat preovulatory follicles in-

cubated or perfused in vitro. In Growth and Differentiation of Cells and Defined Environment. (ed. H. Murakami, I. Yamane, D. W. Barnes, J. P. Mather, I. Hayashi, G. H. Sato), p. 285, Springer-Verlag, Berlin, 1985

- 22) Hsueh, A. J. W., Adashi, E. Y., Jones, P. B. C. and Welsh, Jr., T. H.: Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian cells, *Endocr. Rev.*, 5: 76, 1984

エンドセリン-1のラット卵胞 ステロイド分泌に及ぼす影響について

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 愨

卵巣にエンドセリンが存在することが明かとなり、その生理学的作用が注目されている。今回は、エンドセリン-1 (ET) の卵胞に於けるステロイド産生能について検討を加えた。27日令のWistar-Imamichi系雌ラットにPMS 10 IUを皮下投与し、PMS投与後24ないし48時間目に卵巣を摘出し、0.01-10 $\mu\text{g/ml}$ のETで20, 40, 60, 80, 100, 120, 140ないし180分間インキュベーションし、メジウム中のprogesterone (P), testosterone (T) および estradiol-17 β (E) 濃度をRIAで測定した。同時に、120分のインキュベーション例では、cyclic AMP濃度も測定した。

メジウム中P, TおよびE濃度はETの添加で有意な増加を示し、組織中cyclic AMPも増加した。

ETが卵胞からのP, TおよびEの分泌に直接関与することが示唆された。

(受付: 1991年3月12日)

尿中微量LH半定量測定による LHサージ検出の基礎的・臨床的研究

Basic and Clinical Studies on Detection of LH Surge with a Highly Sensitive and Semiquantitative Urinary LH Assay

山形県立河北病院産婦人科

小田 隆 晴 高橋 一 広 木原 香 織
Takahare ODA Kazuhiro TAKAHASHI Kaori KIHARA
長谷川 剛 志
Takeshi HASEGAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Yamagata Prefectural Kahoku Hospital, Yamagata 999-35, Japan

正常排卵周期を有する不妊婦人 39 名, 48 周期を対象に, 簡易 E I A 法によるゴナール「LH」キットを用い, 検出感度 20mIU/ml の尿中 LH を測定し, その基礎的, 臨床的検討を行なった. 本キットの同時再現性は良好で, HCG 100mIU/ml, TSH 0.1mIU/ml では交叉反応は認められず, 血中 LH とも有意な相関 ($r = 0.7743$) を認めた. 排卵日での早朝尿の 20mIU/ml の LH 陽性率は, 97.9% と高率で, 30mIU/ml では 50%, 40mIU/ml では 16.7% であった. 早朝尿 20mIU/ml 陽性時の卵胞径は平均 18.3 ± 1.7 mm, 子宮内膜の厚さは平均 10.4 ± 1.5 mm, 頸管粘液スコアは平均 8.3 ± 0.9 点, 血中 LH は平均 40.7 ± 4.1 mIU/ml, 血中 E_2 は平均 286.2 ± 12.6 pg/ml であり, 陽性日より 48 時間以内に全例卵胞の消失を確認した. 以上より, 自然排卵周期では, 卵胞径 15 mm の時点で低感度の本法で早朝尿を測定するのみで排卵予知が可能で, 今後不妊症患者への応用が期待される.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 266-271, 1992)

緒 言

排卵時期の予知は, 不妊治療・管理ことに性交日の指導, 人工授精のタイミング決定などに重要であり実際の臨床の場においては, 基礎体温測定, 頸管粘液検査, 超音波 B スコープによる卵胞径や子宮内膜像の計測, 尿中エストロゲンの微量測定などがルーチン化している. これらの検査は基礎体温を除いていずれも卵胞の成熟徴候を判定する検査法であり, 実際の排卵日の予知には LH サージを把握することが理想的であり, 近年 LH サージ検出を目的として各種の尿中 LH 測定キットが普及し, その有用性が検討されている¹⁻⁵⁾. しかし, その多くは, 検出感度が 40~50 mIU/ml で 1 日 1 回の測定では不規則な月

経周期, 短期 LH サージ, 低 LH 濃度を示す婦人では, 排卵が見逃がされたり, 頻回の測定や通院を要し一般臨床において必ずしも役立つ検査とは言い難い. そこで今回, われわれは, 正常月経周期をもつ不妊婦人を対象とし, LH のモノクローナル抗体を用いた簡易免疫酵素抗体法 (E I A 法) による尿中 LH 測定用試薬, ゴナール「LH」(日研化学) を用い, より微量 (検出感度: 20mIU/ml) の尿中 LH を半定量し, LH サージ検出に対する信頼性と臨床的有用性につき検討を行ったので報告する.

対象と方法

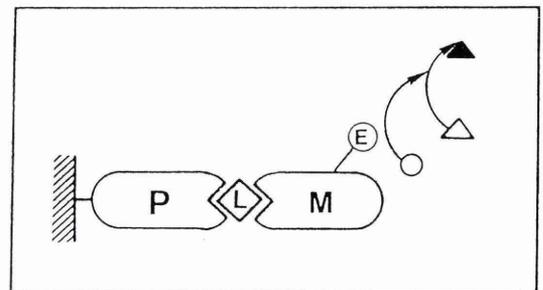
対象は当科不妊外来を受診中の正常月経周期を有する不妊婦人 (20~36 歳) 39 名で, その多くは男性

因子でA I Hを目的とした婦人で、観察は48周期で行い、排卵誘発周期は除外した。卵胞および子宮内膜像の計測は、持田 Sonovista-CS(7.5MHz/5MHz)の経腔プローブで連日行い、最大卵胞径が10~12mmとなった時点より、早朝尿、24時間尿を本法により尿中LHを20mIU/ml, 30mIU/ml, 40mIU/mlで半定量で測定し、同時に尿中エストロゲンは持田製薬のHi-Estrotec法で、血中estradiol-17β(E₂)、LHはR I A法で測定し、頸管粘液スコア(CMS)も算出した(表1)。

表1 頸管粘液スコア(CMS)

1. Amount	
0	= 0
1	= 0.1ml
2	= 0.2ml
3	= 0.3ml or more
2. Spinnbarkeit	
0	< 1 cm
1	1 ~ 4 cm
2	5 ~ 8 cm
3	≥ 9 cm
3. Ferning (Crystallization)	
0	No crystallization
1	Atypical fern formation
2	Primary and secondary stems
3	Tertiary and quarternary stems

測定キットゴナール「LH」は日研化学(株)より提供をうけ、固相化抗体(抗LHポリクロナール抗体)はヒツジより、標識抗体(抗LHモノクロナール抗体)はマウスより作成したもので、LH標準品はIst IRP-LHを使用した。測定原理は図1に示した如くで、酵素免疫抗体法(E I A法)のサンドウィッチ法を用い、操作法は検体尿、標準液(20mIU/ml, 30mIU/ml, 40mIU/ml)を別々のチューブに加え、次いでペルオキシダーゼ標識の抗LHモノクロナール抗体を加え、振盪した後、固相化抗体を挿入し静置した、固相化抗体を洗浄し、これを発色液(3, 3', 5, 5'-テトラメチル・ベンジジン, 0.03%オキシドール)の入ったチューブに加えて放置後ステ



P: 抗LHポリクロナール抗体(固相化抗体)
 L: LH
 M: 抗LHモノクロナール抗体(標識抗体)
 E: ペルオキシダーゼ

図1 測定原理

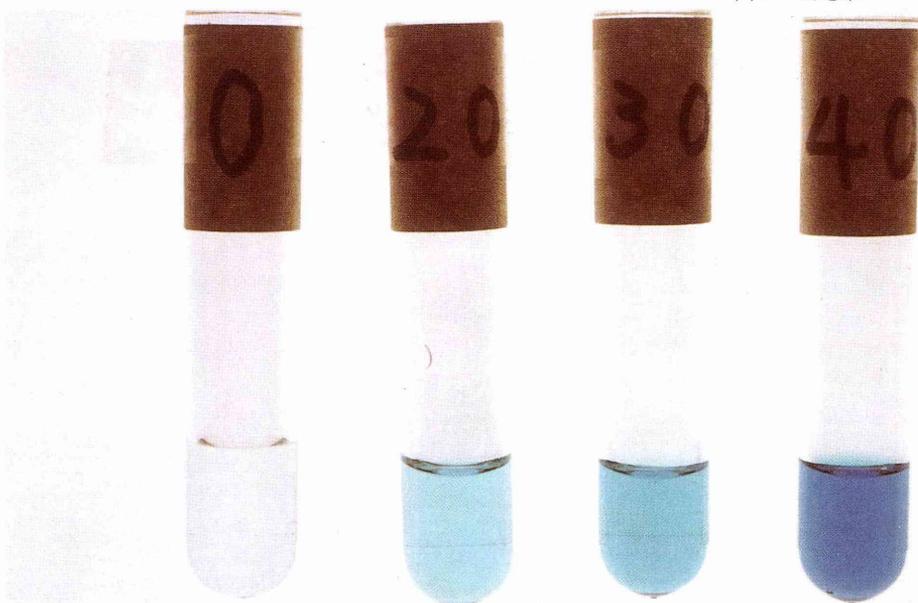


写真1. 各標準液の色調の比較(左より0mIU/ml, 20mIU/ml, 30mIU/ml, 40mIU/ml)

表2 特異性

Hormone	Concentration mIU/ml	Reference Preparation	Visual Result
HFSH	50, 100, 200	WHO, 1st IRP	Negative
HTSH	0.05, 0.02, 0.1	WHO, 1st IRP	Negative
HCG	5, 10, 50, 100	WHO, 2nd I.S.	Negative
HCG	200	WHO, 2nd I.S.	Positive

表3 同時再現性

検体	LH (mIU/ml)		
	20	30	40
1	20	30	40
2	20	30	40
3	20	30	40
4	20	30	40
5	20	30	40
6	20	30	40
7	20	30	40
8	20	30	40
9	20	30	40
10	20	30	40

ティックを除去し、着色に応じて、標準液を比較し肉眼的に判定した。

研究成績

1. 検出感度

WHO標準品(1st IRP)であるLH 20, 30, 40 mIU/mlの各LH希釈液を作成し、本法で測定すると写真1に示すように20mIU/ml以上で明らかな青色の着色が認められ陽性と判定可能で、着色強度はLH濃度に比例し、視覚的な識別は充分可能であり、測定感度は20mIU/mlと考えられた。

2. 特異性(表2)

FSH, TSH, hCGとの交叉反応は表2に示すように、FSH(WHO, 1st IRP) 200mIU/ml, TSH(WHO, 1st IRP) 0.1mIU/ml, hCG(WHO, 2nd IRP) 100mIU/mlの濃度迄は認められなかった。

3. 同時再現性(表3)

同一ロットのキットを用いて、LH濃度20, 30, 40 mIU/mlのそれぞれを10回ずつ測定すると、測定値はすべて一致し、極めて良好な成績が得られた。

4. 血中LH値との相関性(図2)

26名の婦人の早朝尿の尿中LHを本法で、早朝の血中LHをRIAでそれぞれ測定すると、図2に示すように、回帰式は $Y=1.61X-4.44$ 、相関係数は0.7743と1%以下の危険率で有意な相関が得られた。

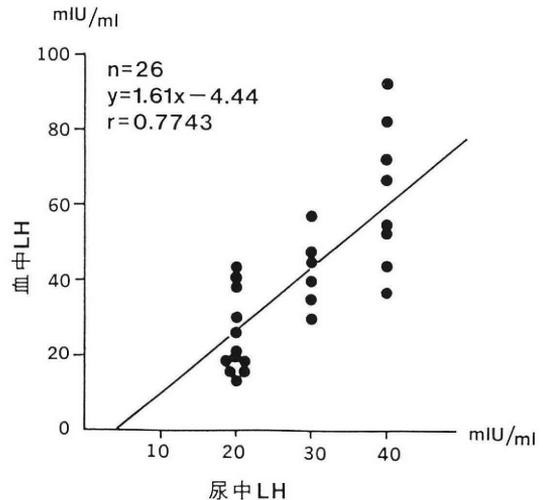


図2 本法における尿中LHと血中LHの相関性

5. 臨床的検討

1) 24時間尿、早朝尿のLH感度からみたLH陽性率(図3)

48例の正常月経周期を有する婦人の排卵前の24時間尿におけるLHサージはDay-2より検出され、Day-2で12例(25%)、Day-1で30例(62.5%)、Day0で44例(91.7%)で感度20mIU/ml陽性となったが、感度30mIU/mlではDay0で21例(43.8%)、40mIU/mlではDay0で7例(14.6%)と陽性率は低率であった。

早朝尿におけるLHサージの検出はDay-1より始まり、感度20mIU/mlではDay-1で20例(41.7%)、Day0で47例(97.9%)で陽性となったが、感度30mIU/mlではDay0で24例(50%)、40mIU/mlではDay0で8例(16.7%)しか陽性とならなかった。Day-2, Day-1では24時間尿の方が、いずれの感度においても、早朝尿より陽性率が高く、Day0においては早朝尿の方が陽性率が高くなった。

2) 排卵前の尿中LH陽性率と血中ホルモン値、排卵モニタリング値の推移

超音波による主席卵胞消失前日(厳密にはDay0の外來受診時よりDay+1の外來受診時の間となる)を排卵日Day0として、前4日間の尿中LH陽性率(≥

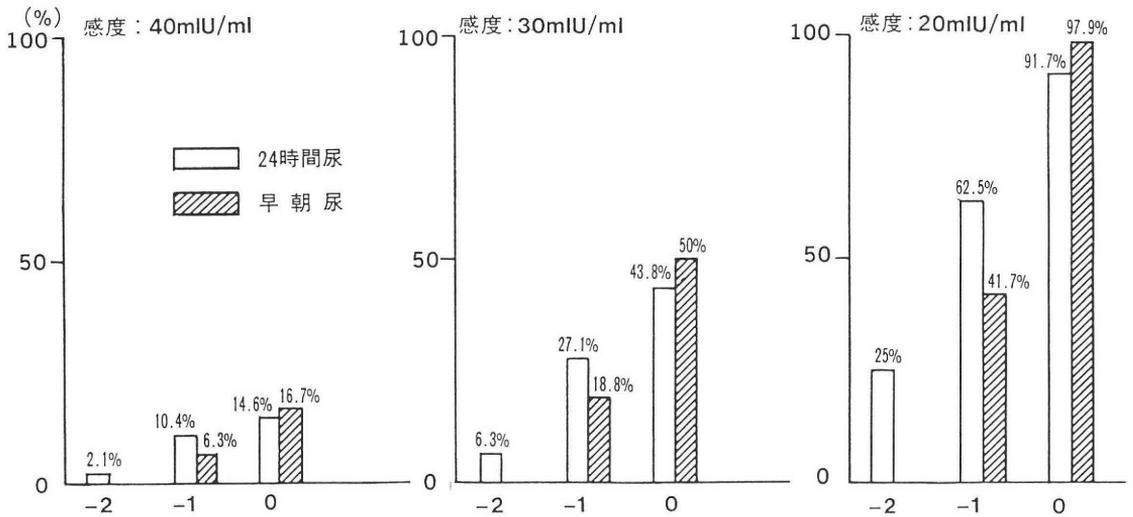


図 3 排卵日 (0day) 前の 24 時間尿, 早朝尿の各感度別の LH 陽性率 (N = 48)

表 4 排卵日前の尿中 LH 陽性率, 血中ホルモン値, 排卵モニタリング値

周期 (日)	尿中 LH 陽性率 (≥20mIU/ml)	血中 LH 値* (mIU/ml)	血中 E ₂ 値* (pg/ml)	卵胞径* (mm) (n = 48)	子宮内膜の厚さ* (mm) (n = 48)	頸管粘液スコア* (n = 48)
- 4	0 % (0 / 48)	18.9 ± 7.8 (n = 12)	160.1 ± 103.4 (n = 12)	11.5 ± 1.5	6.3 ± 1.3	3.4 ± 2.1
- 3	0 % (0 / 48)	20.4 ± 9.4 (n = 15)	184.2 ± 67.2 (n = 15)	12.9 ± 1.7	7.7 ± 1.4	4.1 ± 2.3
- 2	0 % (0 / 48)	19.3 ± 10.1 (n = 16)	245.2 ± 90.5 (n = 16)	14.7 ± 1.4	8.6 ± 1.7	6.1 ± 1.5
- 1	41.7% (20/48)	32.3 ± 16.5 (n = 20)	342.5 ± 67.8 (n = 20)	17.1 ± 1.1	9.8 ± 1.4	8.0 ± 1.3
0	97.9% (47/48)	88.4 ± 46.2 (n = 22)	266.3 ± 71.3 (n = 22)	19.2 ± 1.4	11.0 ± 1.5	8.5 ± 0.7

* M ± SD

表 5 尿中 LH (20mIU/ml) 陽性時の排卵モニタリング値と血中ホルモン値

卵胞径 (mm)	18.3 ± 1.7* ¹ (N = 47)
子宮内膜の厚さ (mm)	10.4 ± 1.5* ¹ (N = 47)
頸管粘液スコア (点)	8.3 ± 0.9* ¹ (N = 47)
Hi-Estrotec (>30ng/ml) (%)	42.6% (20/47) (N = 47)
血中 LH (mIU/ml)	40.7 ± 4.1* ¹ (N = 26)
血中 E ₂ (pg/ml)	286.2 ± 12.6* ² (N = 26)

* 1 M ± SD

* 2 M ± SEM

20mIU/ml), 血中 LH, E₂ 値, 卵胞径, 子宮内膜の厚さ, 頸管粘液スコアの平均値の推移を表 4 に示す。

早朝尿の LH 陽性率は, 前述の様に Day-2 までは検出されず, Day-1 で 41.7%, Day0 で 97.9% 陽性

となったが, 血中の LH も排卵日に近づくにつれ, 上昇し, 排卵日に 88.4 mIU/ml とピークとなり, 血中 E₂ 値は Day-1 にピークとなる傾向が認められた。また Day0 の卵胞径は平均 19.2 ± 1.4 mm, 子宮内膜の厚さは平均 11.0 ± 1.5 mm, CMS は 8.5 ± 0.7 点であった。

3) 尿中 LH 陽性時の排卵モニタリング値と血中ホルモン値 (表 5)

尿中 LH 20mIU/ml 陽性日の卵胞径は平均 18.3 ± 1.7 mm, 子宮内膜の厚さは平均 10.4 ± 1.5 mm, CMS は平均 8.3 ± 0.9 点であり, それらの 95% tile の下限は卵胞径 15.7 mm, 子宮内膜の厚さ 7.7 mm, CMS 6.9 点であった。また尿中エストロゲン 30ng/ml 以上の陽性率は Hi-Estrotec で 42.6% と以外に低く, 血中 LH の平均値は 40.7 ± 4.1 mIU/ml, 血中 E₂

の平均値は 286.2 ± 12.6 pg/ml であった。

考 察

不妊症の治療，ことにAIHやAIDのタイミングを掴まえる際，LHサージを検出する目的としてSPIA法を用いたLHカラーや，EIA法によるゴナール「LH」などの30分程度で測定可能な簡易尿中LH測定法が普及し，その有用性が数多く報告されている¹⁻⁵⁾。しかし実際の診療では40~50 mIU/mlという感度が外国人向けのためか低く，1日1回，月6回の保険診療の枠内ではその有用性は限定され，多くの臨床家にとって排卵日を逃したり，人工授精日が大きくなりすぎたりする症例に遭遇することが数少なくないと推察される。

最近，高感度の尿中LH半定量測定キットのエルチェック®やハイツインクロンLHが開発され，微量LHが測定可能となり，尿中LHの基礎値や，サージの開始値の設定が研究されつつある⁶⁻⁸⁾。エルチェック®は数分で判定可能で非常に簡便で測定感度も20 mIU/mlと鋭敏であるが，hCG 20 mIU/mlで交叉性が認められるため，false positiveが6.5%，false negativeが9.5%存在する為，今後さらに追試が必要である。ハイツインクロンLHは2.5 mIU/mlというRIAにも匹敵する高感度の微量LH半定量キットであり，今後LHサージの数量化による分析が可能に思われるが，操作方法が繁雑で2時間以上の測定時間を要するため，臨床応用には疑問が残る。その点今回われわれが使用した測定法は，従来のゴナール「LH」を少しmodifyし，従来の検出感度を40 mIU/mlより20 mIU/mlに高めることによっても発色度とLH濃度の識別は可能であり，永沼ら⁹⁾のゴナールLHと吸光度の高い相関性ありとの報告からもその有用性も裏付けされよう。また同時再現性も極めて良好で，血中LH濃度も良好な相関が認められるし，hCGとの交叉性も100 mIU/mlの濃度では交叉性も認められない為，通常の日常診療ではLH測定には影響は及ぼすことはないと思われる。

さらに臨床例での排卵日予知の検討では，本法での検出感度を40 mIU/mlより30 mIU/ml，20 mIU/mlと高めることにより，早朝尿のみの測定でLHサージ検出率も16.7%，50%，97.9%と高めることが出来た。LHサージのfalse positive例は皆無であったが，false negative例が1例認められたが，この症例は低LH濃度のサージか，サージ期間が12時間以内の短期LHサージであった可能性が推測される。24時間尿ではLHサージの開始はDay-2より始まり，Day-2，Day-1では早朝尿より高い検出率を示した

が，Day0の検出率は早朝尿より低く，これは蓄尿で尿が希釈されたためと，尿中LHの活性が経時的に減少したためと推察される。サージ開始と陽性率のずれは，24時間尿では当日の早朝尿の1部が前日の蓄尿に入りこんだ為であろう。

現時点においては，排卵日の予知にはLHサージの把握が最も理想的な方法であるのはいうまでもなく，血中のLHサージは排卵の32~36時間前に，LHピークは10数時間前に起こると報告が多く⁹⁾，血中LHサージと尿中LHサージのtime lagは数時間と短い為，血中と尿中のLHピークは，ほぼ一致すると考えられている。このことに関してThomasら¹⁰⁾は尿中LHサージ後約30時間後に，Lopata¹¹⁾は26~28時間後に排卵が生じると報告している。岡村ら⁶⁾，広井ら⁷⁾はハイツインクロンLHで尿中微量LHを測定し，その基礎値は10 mIU/ml以下であると報告しており，今回のわれわれの成績からみても，尿中LH 20 mIU/ml以上に上昇した場合はLHサージの上行脚，ピーク，下降脚のいずれかと考えてよく，12時間以内の短期LHサージの症例でない限り，1日1回の早朝尿のチェックのみでLHサージをキャッチ出来るものと思われる。さらに今回の尿中LHが20 mIU/ml以上になった時点での卵胞径，子宮内膜像，CMSの成績により，自然排卵周期においては，卵胞径15 mm，子宮内膜の厚さ8 mm，CMS 7点位になった時点で，本法で1日1回の早朝尿を測定し，20 mIU/ml以上のLHが確認されれば，48時間以内の排卵の予知が充分可能で，今後不妊症患者，ことに人工授精施行日の決定や性交日指導に極めて有用であると思われる。

稿を終えるにあたり，本研究に御協力いただいた日研化学株式会社の藤中秀臣氏，松田誠氏に謝意を表します。

(なお本論文の要旨は，1991年3月25日第43回日本産科婦人科学会学術講演会(京都)で発表した。)

文 献

- 1) 田辺清男，田村 勉，角ゆかり，飯塚理八：尿中LH簡易検出試薬「オルガノンLHカラー」の基礎的ならびに臨床的検討，日不妊誌，33：760，1988
- 2) 吉松 淳，合阪幸三，友成廉平，多和田哲雄，金田幸枝，国保健太郎，吉田浩介：排卵予知におけるLHカラーの臨床的有用性の検討，日不妊誌，34：425，1985
- 3) 田中 温，戸坂通保，長沢 敢，山本 勉，石上園子，砂川 進，小松朋子，小崎繁昭：尿中LH検出試薬「オルガノンLHカラー」の排卵時期のモニタリングとしての有用性に関する臨床的検討，

- 産と婦, 55:1975, 1988
- 4) 永沼孝子, 高浜一宏, 石川元春, 深谷孝夫, 星合昊, 矢嶋 聡: 酵素免疫法を応用した尿中LH簡易測定キット, ゴナール「LH」の基礎的検討および臨床応用, 産婦の世界, 40:975, 1988
 - 5) 生山 博, 都築浩雄, 木戸 豊, 西 望, 斉藤幹, 大原基弘: 酵素免疫抗体法による尿中LH測定用試薬, ゴナール「LH」を用いてのLH surge検出の臨床的検討, 産婦の世界, 40:1095, 1988
 - 6) 岡村 隆, 気賀沢和子, 柳沼 恣: 新しい尿中LHキットの検討, 産婦の世界, 41:424, 1989
 - 7) 広井正彦, 川越慎之助, 斉藤英和, 大沼知子: 尿中微量LHおよびhCG半定量試薬の臨床への応用, 臨婦産, 44:713, 1990
 - 8) 徳川吉弘, 佐治文隆, 谷澤 修: 新しい尿中LH簡易測定キット(エルチェック®)の基礎的ならびに臨床的検討, 産婦の世界, 42:451, 1990
 - 9) World Health Organization Task Force Investigators: Temporal relationships between ovulation and defined changes in the concentration of plasma estradiol-17 β , lutenizing hormone, follicle stimulating hormone, and progesterone, Am. J. Obstet. Gynecol., 138: 383, 1980
 - 10) Thomas, K. and Ferin, J.: Comparative studies of LH levels in plasma and unconcentrated urine determined by radioimmunoassay and haemoagglutination inhibition, Acta Endocrinol. [suppl] (Copenh), 141: 75, 1970
 - 11) Lopata, A.: In vitro fertilization and embryo transfer in the treatment of infertility, Organorama., 18: 3, 1981

**Basic and clinical studies on
detection of LH surge with
a highly sensitive and semiquantitative urinary LH Assay**

Takahare Oda, Kazuhiro Takahasi,
Kaori Kihara and Takesi Hasegawa

Department of Obstetrics and Gynecology,
Yamagata Prefectural Kahoku Hospital,
Yamagata 999-35, Japan

In 39 fertile females with a normal ovulation cycle, "LH" was measured in the urine with a detection sensitivity of 20mIU/ml for 48 cycles, using the Gonol "LH" Kit to evaluate the basic and clinical investigation. The simultaneous reproductibility of this kit was good. That is, no cross reactions were found at 100mIU/ml of HCG or 0.1 mIU/ml of TSH, while a significant correlation ($r=0.7743$) with the blood LH was confirmed. The LH positive rate of 20mIU/ml in the urine collected in the early morning of the day of ovulation was high (97.9%), whereas it was 50% in 30mIU/ml and 16.7% in 40mIU/ml, respectively. The diameter of the ovarian follicle detected from the early morning urine (20mIU/ml, positive) was 18.3 ± 1.7 mm on average; the thickness of the uterine endometrium was 10.4 ± 1.5 mm on average; the cervical mucus score was 8.3 ± 0.9 points on average; the blood LH was 40.7 ± 4.1 mIU/ml on average; the blood E₂ was 286.2 ± 12.6 pg/ml on average. The disappearance of the ovarian follicle was confirmed in all cases within 48 hours of the day in which positive results were obtained for LH. From the above mentioned facts during the spontaneous ovulation cycle, ovulation can be detected only by a determination based on early morning urine, using this method of High sensitivity when the diameter of the ovarian follicle is 15mm. Accordingly, it is anticipated that this method will be applied to infertile females in the future.

(受付: 1991年8月9日)

ゴナール 20 およびゴナール 30 を用いた 尿中 LH surge 検出の臨床的検討

Ovulation Prediction by Using Urinary LH Test Kit "Gonal 20 and Gonal 30"

名古屋大学医学部分院産婦人科

中村 潔 史	北川 武 司	那波 明 宏
Kiyoshi NAKAMURA	Takeshi KITAGAWA	Akihiro NAWA
稲垣 資 郎	柴田 均	近藤 育代
Sirou INAGAKI	Hitoshi SHIBATA	Ikuyo KONDO
菅沼 信彦	成田 収	友田 豊
Nobuhiko SUGANUMA	Osamu NARITA	Yutaka TOMODA

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

従来のものより高感度となった酵素抗体法を利用した尿中LH検出キット、ゴナール 20 およびゴナール 30 を用いて、18 例の不妊婦人の LH surge の検出および排卵の予知がどの程度可能であるか検討した。月経周期第 10 日目より連続して早朝尿、その 12 時間後の夕方尿を採取し検体とし、同じく血清 LH、超音波による首席卵胞径を連日測定した。両キットとも血清 LH とおおよそ一致し、その陽性となった時点より 48 時間以内に全例排卵をみた。ゴナール 30 は平均陽性回数 2.1 回で、1 度しか陽性を示さない症例も存在し、朝夕の尿検査が必須であった。ゴナール 20 は、平均陽性回数 2.9 回で全例 2 回以上陽性となった。したがって、1 日 1 回の検査でも排卵の予測は可能であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 272-278, 1992)

緒 言

排卵の予知は日常の不妊診療においては必須のことである。従来からの基礎体温、頸管粘液検査のような間接的なホルモンに対する生体の反応をみる検査から、近年の超音波断層法の著しい進歩により直接卵胞発育を観察することが可能となり、これは大変に impact を持った有力な検査となって来た。また種々のホルモン測定方法の進歩により、radioimmunoassay (RIA) 法、Immunoradiometric assay (IRMA) 法、EIA (enzyme immunoassay) 法を用いた血中の estradiol (E₂)、luteinizing hormone (LH)、progesterone (P) の直接測定が可能となり、また、その簡便性から estrogen の半定量や尿中 LH

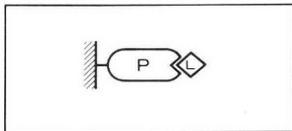
の半定量が日常診療において盛んに行われるようになってきた。しかし、周知のように超音波による卵胞の観察は、個々によって排卵期の卵胞径が異なること、観察しきれない症例あるいは周期のあること、そして卵胞以外の囊腫の紛らわしい存在などにより、排卵の予知に不適當な場合も少なくない。その点、血中のホルモン測定は客観的で、特に血清 LH はその surge を捕らえられれば最も有力なものであるが、即日これを測定のできる施設は限られたものである。このような理由により簡便性と確実性との兼ねあいから尿中 LH の半定量が最も優れ、汎用されている。現在、尿中の LH は、様々のキットが用いられているが、その感度は 40、50 IU/L (2nd IRP-hMG) である。この感度では、surge の小さな場合や短い時に

は、必ずしも捕らえ切れないことがある。そこで、感度を20,30 IU/Lに上げた尿中LHのEIAによる半定量キットを用いて自然周期において、どの程度surgeを捕らえられるか、また排卵の予知にどこまで有用であるかについて検討した。

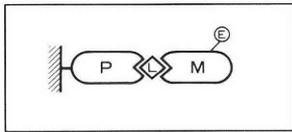
研究対象と方法

対象は1990年4月より1991年3月までに当科を凍結胚融解移植のために訪れた18名の正常月経周期を有する不妊患者である。年齢は27~40歳におよび平均年齢は34.1±4.0 (mean±SD) 歳であった。また、平均不妊期間は7.3年である。これらの症例の月経周期の第10日目より連日、早朝尿およびその約12時間後の夕方尿を採取し、ゴナール20,ゴナール30(日研化学)での測定に供した。本キットは、酵素抗体法(サンドイッチ法)により測定するものでLHの測定感度が20,30 IU/L(2nd IRP-hMG)である。原理は固相化抗体に結合されている抗LHポリクローナル抗体(ヒツジ由来)にLHが抗原抗体反応により結合する。更に抗LHモノクローナル抗体である標識抗体(マウス由来)が抗原抗体反応により結合し、パーオキシダーゼの作用により発色液AおよびBが酵素反応を生じ、青色に発色する(図1)。この着色した青色の程度を参照標準液と陽性対照液を比較して判定するものである。今回は、陽性

- 1 固相化抗体に結合されている抗LHポリクローナル抗体(P)に、LH(L)が抗原抗体反応により結合する。



- 2 更に標識抗体(M)が抗原抗体反応により結合する。(洗浄により固相化抗体に結合されている以外の物質は除去される。)



- 3 パーオキシダーゼ(E)の作用により、発色液A(O)及びB(Δ)が酵素反応を生じ、青色(▲)に発色する。

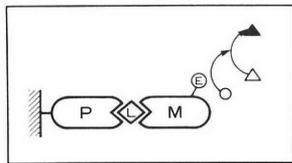


図1 ゴナール20,30の測定原理

対照液と同じ程度またはそれ以上の青色のものを陽性とし、対照液より薄いものはすべて陰性とした。全操作に要する時間はおよそ50分間である。これと同じく月経周期の第10日目より連日、午前9時より12時の間に採血し、血清LH, P, E₂をIRMA法にて測定した。使用したキットは、LHはスパック-スLHキット、PはDPCプロゲステロンキット、E₂は同じくDPCエストロゲンキットである。血清LHの値はWHOの1st IRP-LHの標準品に準じている。超音波断層法も経陰的に第10日目より連日午前9時より12時までの間に行い、首席卵胞の2方向平均径を測定し、この卵胞消失日を以て排卵日とした。

研究結果

- 1. LHピーク日を中心とした内分泌動態とゴナール陽性率

図2に連日採血による血清LHがピークを示した日をday0としてこれ以前の3日間(day-1,-2,-3)およびこれ以後の2日間(day+1,+2)の血清LH, P, E₂の動きをプロットした。この間の早朝尿または夕方尿の少なくともいずれか一方がゴナール20,ゴナール30で陽性となった日を陽性日としてゴナールの陽性率を示した。血清LHは、day-2

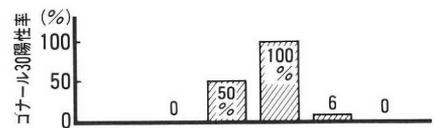
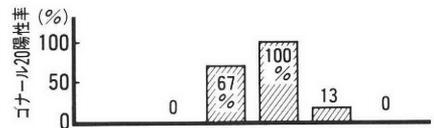
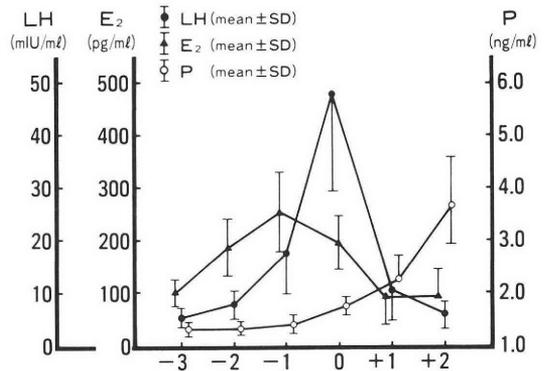


図2 LHピーク日を中心とした内分泌動態とゴナール陽性率

(血中 LH ピーク日 = day 0)

day 症例	- 3		- 2		- 1		0		+ 1		陽性回数
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	
K・G		-	-	-	-	+	+	+	-		3
F・N					-	-	+	+	+	-	3
K・M			-		-	+	+	+	+	-	4
M・N					-	-	+	+	-		2
S・Y	-	-	-	-	+	+	+	-	-		3
M・Oo			-		-	+	+	+	-		3
M・Ok					-	+	+	+	-	-	3
K・S	-	-	-	-	+	+	+	-	-		3
K・I	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	4
S・H			-	-	-	-	+	+	+	-	3
M・K	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	3
Y・T						-	+	+	-		2
K・F			-	-	-	+	+	+	-		3
N・Y				-	+	+	+	+	-		4
K・H					-	+	+	+	-	-	3
A・O						-	+	+	-		2
M・F					-	+	+	+	-	-	3
K・I					-	-	+	+	-		2
陽性回数 (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (17)	12 (67)	18 (100)	16 (89)	4 (22)	0 (0)	*2.9±0.6

(*mean ± S.D.)

図 3 各症例における血中 LH ピーク日からみたゴナール20の成績

(血中 LH ピーク日 = day 0)

day 症例	- 3		- 2		- 1		0		+ 1		陽性回数
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	
K・G					-	+	+	-	-	-	2
F・N					-	-	+	-	-	-	1
K・M					-	-	+	+	-		2
M・N					-	-	-	+	-		1
S・Y	-	-	-	-	-	+	+	-	-		2
M・Oo			-		-	-	+	+	-		2
M・Ok					-	+	+	+	-	-	3
K・S	-	-	-	-	-	-	+	-	-		1
K・I	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	3
S・H			-	-	-	-	+	+	+	-	3
M・K			-	-	-	+	+	-	-		2
Y・T						-	+	+	-		2
K・F			-	-	-	+	+	-	-		2
N・Y					-	+	+	+	-		3
K・H					-	+	+	-	-		2
A・O						-	+	-	-		1
M・F					-	+	+	+	-		3
K・I					-	-	+	+	-		2
陽性回数 (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (50)	17 (94)	10 (56)	1 (6)	0 (0)	*2.1±0.7

(*mean ± S.D.)

図 4 各症例における血中 LH ピーク日からみたゴナール30の成績

(排卵推定日 = day 0)

day 症例	- 3		- 2		- 1		0		+ 1		陽性回数
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	
K・G	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
F・N	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
K・M	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	4
M・N	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2
S・Y	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
M・Oo	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3
M・Ok	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
K・S	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
K・I	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	4
S・H	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3
M・K	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
Y・T	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
K・F	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
N・Y	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	4
K・H	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
A・O	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
M・F	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
K・I	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2
陽性回数 (%)	0 (0)	0 (0)	6 (33)	14 (78)	16 (89)	13 (72)	4 (22)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	*2.9±0.6

(*mean±S.D.)

図5 各症例における排卵推定日からみたゴナール20の成績

(排卵推定日 = day 0)

day 症例	- 3		- 2		- 1		0		+ 1		陽性回数
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	
K・G	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
F・N	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
K・M	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
M・N	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
S・Y	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
M・Oo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
M・Ok	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
K・S	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
K・I	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
S・H	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3
M・K	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
M・T	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
K・F	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
N・Y	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
K・H	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
A・O	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
M・F	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
K・I	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2
陽性回数 (%)	0 (0)	0 (0)	2 (11)	11 (61)	15 (83)	8 (44)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	*2.1±0.7

(*mean±S.D.)

図6 各症例における排卵推定日からみたゴナール30の成績

で平均 8.3 ± 2.8 (mean \pm S D) mIU/ml でゴナール 20, 30 いずれのキットも尿中 LH は陰性であった。同じく day-1 では LH は 18.8 ± 8.1 mIU/ml で最高で 36.8 mIU/ml, 最低で 5.9 mIU/ml であったが 16 例が 10 mIU/ml 以上であった。この日のゴナール陽性率はゴナール 20 が 67%, ゴナール 30 が 50% であった。LH のピーク日では血清 LH は、 47.0 ± 19.1 mIU/ml で、最高が 99.7 mIU/ml, 最低で 19.7 mIU/ml であった。ゴナール陽性率はゴナール 20 が 100%, ゴナール 30 も 100% であった。day+1 では血清 LH は急激に下降し、平均 10.5 ± 5.7 mIU/ml となり、10 mIU/ml 以上のものは 5 例のみであった。ゴナール陽性率も低下し、ゴナール 20 が 13%, ゴナール 30 は 6% となった。day+2 では、血清 LH は更に低下し、 6.0 ± 2.3 mIU/ml でゴナール 20, 30 いずれも陰性であった。

2. 各症例における血中 LH ピーク日からみたゴナール 20 の成績 (図 3)

day-3, -2 では陽性例は皆無であった。day-1 より陽性例が散見され、3 例 (17%) が早朝尿で陽性となった。同じく夕方尿では更に陽性例は増え 12 例 (67%) となった。血中 LH ピーク日の早朝尿では 18 例が全例が陽性となり、夕方尿では 16 例 (89%) が陽性であった。day+1 では陽性例は急に減少し、4 例 (22%) となり、夕方尿では全例陰性となった。平均陽性回数、 2.9 ± 0.6 (mean \pm S D) 回で、全症例ともに少なくとも 2 回は陽性を示し、最高で 4 回陽性となったものがあつた。

3. 各症例における血中 LH ピーク日からみたゴナール 30 の成績 (図 4)

day-3, -2 および day-1 の早朝尿まではすべて陰性であった。day-1 の夕方尿より陽性例がみられ、この時点で 9 例 (50%) が陽性を示した。血中 LH ピーク日の早朝尿では 1 例を除いて 17 例が陽性となり、夕方尿では 10 例 (56%) が陽性であった。day+1 では、やはり陽性例は急に減少し、1 例 (6%) となり、夕方尿では全例陰性となった。平均陽性回数は、 2.1 ± 0.7 (mean \pm S D) 回で、1 回のみしか陽性を示さなかったものが 4 例あり、2 回が 9 例、3 回が 5 例で 4 回以上陽性となったものはなかった。

4. 各症例における排卵推定日からみたゴナール 20 の成績 (図 5)

連日超音波断層法による観察で、卵胞消失日を排卵推定日とし、この日を day0 としてそれ以前の 3 日間 day-3, -2, -1, 以後の 1 日 day+1 の成績をみた。day-3 では陰性であったが、day-2 の早

朝尿より陽性例が 6 例 (33%) にみられ、夕方尿で 14 例 (78%) であった。day-1 の早朝尿では最も陽性例が多く、16 例 (89%) で、夕方尿では 13 例 (72%) であった。day0 では、陽性率は著明に低下し、早朝尿で 4 例 (22%) となり、夕方尿では全例陰性となった。

5. 各症例における排卵推定日からみたゴナール 30 の成績 (図 6)

ゴナール 20 の場合と同じく、day-2 の早朝尿より陽性例がみられ、2 例 11% が陽性であった。夕方尿では 11 例 61% で、day-1 の早朝尿で 15 例 83% とゴナール 20 の場合と同じく最も高い陽性率を示し、夕方尿では 8 例 44% に減じ、排卵推定日の早朝尿では 1 例 6% のみが陽性であった。これ以後陽性を示したものはなかった。

考 察

排卵は血中 LH surge の開始からほぼ 32~38 時間後に起こることが定説となっており、この LH surge を捕らえることが最も排卵時期の推定に有用であると考えられている。尿中の LH と血中 LH との相関に関しては様々の報告がある。Frydman¹⁾らは、尿中では血中の LH に比べて surge の立ち上がりが 3~21 時間遅れるとしている。しかし、Kerin²⁾らは 3 時間毎の R I A による測定では両者間に大変良好な相関があつたとしている。また、Martinez³⁾らはモノクローナル抗体を用いた Ovustick Kit により尿中 LH surge を測定し、RIA により検出した血清 LH surge は 10 例中 7 例でよく一致していたとしている。これらの報告は、血清 LH は律動的に分泌されていることや尿中 LH は検体尿の濃縮の程度、前回の排尿からどの位時間を経て採取した尿であるかなどことから、血中と尿中の両者の比較は難しいとは思われるが、血清中の LH の半減期の短いことからすればもっともな結果と考えられる。今回の我々の検討では、血清 LH は 1 日 1 回のみの採血であり、また尿中の LH も定量的なものでなく随意尿で rough なものであるが、血清 LH ピーク日の早朝尿で最もゴナール 20 および 30 とも陽性率が高く、次にその 12 時間前と 12 時間後の夕方尿で高い陽性率を示したことから、やはり大きなずれはないように思われ、外来レベルでの診療での有用性ということでは満足のゆく結果であろう。

さて、ではゴナール 20 の成績からどのように排卵の予知が可能であろうか。早朝尿と夕方の随意尿を surge の開始前より連続して採取し検体として用いれば、陽性になった場合排卵まで最も時間のかかる症

例でも尿中LHの上昇の立ち上がりが捕らえられれば、早ければその24時間過ぎから、遅くとも48時間後までには、排卵するといえる。このような症例は6例で全体の1/3であった。また、排卵まで最も時間のかからない場合では、陽性になってから24時間以内に卵胞は消失しており、このような症例は4例22%であった。この中間的な症例、すなわち陽性となってから、排卵まで12時間以後36時間以内であったと考えられるものは8例44%であった。いずれにせよ、ゴナール20の陽性になってから48時間以内に排卵するものと考えられる。ただし、連続の測定が重要であり陰性から陽性に移行するところを逃がしてはならない。今回の成績では、全例陽性回数 は2回以上であった。したがって、たとえ早朝尿のみしか測定しなかった場合でも、陰性から陽性になった時点が捕らえられていれば、同じくこれより48時間以内に排卵するということができる。ゴナール30の検討では、陰性から初めて陽性になった時点でその24時間過ぎから48時間以内に排卵したものが2例11%で、12時間以後36時間以内に排卵したものが10例56%、そして24時間以内に排卵したものが6例33%であった。したがって、ゴナール20と同じく陽性になってから48時間以内に排卵するものと言えよう。ただし、ゴナール20に比べてやや感度が低いため、ゴナール20の時と異なり、同じ48時間以内でもより排卵に近い時点で検出されることが多い。陽性回数も少なく、1回しか陽性とならなかったものが4例あり、ゴナール20の時のように早朝尿のみでは不十分で必ず朝、夕の1日2回の採取が必要である。

以上これらの結果は、陽性になってから48時間以内に排卵しうると予知が可能であり、従来用いられているキットより感度が高く、全例LH surgeを検出し得たことからゴナール20、ゴナール30は有用性はより高いものといえよう。しかし、これら尿中のLHの検出が性交のタイミングの指導や人工授精日の決定に参考にはなるが、限界があるように思われる。1つは実際にこれを用いる場合に病院に尿を持参して検査室レベルで測定することとなるが、day-2の夕方尿が陰性でday-1の早朝尿が陽性であったものがゴナール20で4例、ゴナール30で6例存在し、これらの症例に対して、翌日人工授精を指示すればこれは遅い可能性がある。また、同じくday-2の早朝尿が陰性で翌日持参したday-2の夕方尿が陽性を示した場合も同様で翌々日に人工授精を指示すればやはり遅い可能性がある。したがって、さらにこれ以上に望むならば、自己診断の可能なより簡

便なキットの開発が必要となろう。もうひとつには、人工授精や性交のタイミングには様々の意見があり必ずしも一致をみていないためやむをえないものの、尿中のLH surgeを近年の各酵素抗体法のキットによる簡易半定量によって捕らえ排卵の予知に有用であるという報告は多々あるが、これにより実際に妊娠率が明らかに向上したという報告はほとんど見当たらない。今のところ、明らかな有用性についてはこれらにより無用な人工授精は減るといえるところしか言えないように思われる。今後、さらに数多くの検討が必要であろう。

結 語

モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法による尿中LH surge検出キットゴナール20、ゴナール30は従来のものよりも高感度となりこれを用いて臨床的検討を行った。ゴナール20、ゴナール30はともに早朝尿、および夕方尿の1日2回を連続的に測定したが、ゴナール20では全例は少なくとも2回以上陽性を示し、ゴナール30では全例少なくとも1回以上陽性を示した。ゴナール20、ゴナール30はともに陽性となってから排卵は48時間以内に起こるものと考えられた。しかし、あくまでも陰性から陽性となる時期を逃さないことが重要である。ゴナール30は早朝尿、および夕方尿の1日2回の測定が不可欠と思われたが、ゴナール20は早朝尿のみの1日1回の測定でも十分排卵の予知が可能であると考えられた。

謝 辞

本研究にあたり、ゴナール20ゴナール30を提供して頂いた日研化学(株)に謝意を表します。また、検体の処理、管理や本キットの判定に協力していただいた当教室研究助手の江口智子嬢、赤嶺公美嬢に深謝いたします。

文 献

- 1) Frydman, R., Testart, J., Feinstein, M. C.: Interrelationship of plasma and urinary luteinizing hormone preovulatory surge, *J. Steroid Biochem.*, 20: 617, 1984
- 2) Martinez, F., Trouson, A., Besanko, M.: Detection of the LH surge for AID, AIH and embryo transfer using a twice daily urinary dip-stick assay, *Clin. Reprod. Fertil.*, 4: 45, 1986
- 3) Kerin, J. F., Warnes, G. M., Crocker, J., Broom, T. G., Ralf, M. M., Matthews, G. D., Seamark, R. F., Cox, L. W.: 3 hour urinary radioimmunoassay for luteinizing hormone to detect onset of preovulatory LH surge, *Lancet*, 2: 430,

1980

**Ovulation prediction by using
urinary LH test kit
“Gonal 20 and Gonal 30”**

Kiyoshi Nakamura, Takeshi Kitagawa,
Akihiro Nawa, Sirou Inagaki,
Hitoshi Shibata, Ikuyo Kondo
Nobuhiko Saganuma, Osamu Narita, and Yutaka
Tomoda

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

In order to predict ovulation, we tried to detect LH surge by using urinary LH test kit “Gonal 20 and Gonal 30”. These kits use the principle of the sandwich technique to detect LH. A mixture of polyclonal and monoclonal antibodies against LH forms a sandwich. These kits designed to detect

urinary LH at a concentration of 20 and 30mIU/ml respectively. Above these levels, the color of the kit changed blue.

18 normally cyclic infertile women were entered this study. These patients were taken urine twice (early morning and evening) daily continuously since the 10th day of the menstrual cycle. Also blood samples were taken for serum LH. Ultrasonography was performed vaginally at the same day between 9:00 A. M and 12:00 P. M. The ovulation day was defined the day of leading follicle shrunk. We concluded as follows.

(1) The urinary LH surge detected by these kits coincide with serum LH surge completely.

(2) The ovulation occurred within 48 hours since the first detection of urinary LH surge.

(3) Twice daily urine samples are necessary for the detection of urinary LH surge when gonol 30 is used. But using gonol 20 kit, it is enough to take urine once daily.

(受付：1991 年 8 月 9 日)

遅延性排卵の病態に関する研究 —特に不妊因子としての検討—

Study on the Pathophysiology of Delayed Ovulation —As a Fertilized Factor—

大阪市立大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 須川 信教授)

康 文 豪

Bungou KOU

Department of Obstetrics & Gynecology, Osaka City University
Medical School, Osaka 545, Japan (Director: Prof. Tadashi Sugawa)

不妊症例の臨床統計的検討から、①機能性不妊 (114例) のうち 15.8% (18例) に遅延性排卵が認められ、その中 6例の妊娠成功例は何れも排卵促進ならびにプロラクチン抑制療法を行なったものであった。②排卵日の推定が可能であった妊婦において、遅延性排卵妊娠例 (103例) の流産率は 16.5%と、正常排卵例の 10.8%と比較して高い傾向を示した。

遅延性排卵の背景に関する、内分泌学的検討において、①高PRLならびに潜在性高PRL血症例の 45%に遅延性排卵を認めた。②Gn-RH 負荷によるゴナドトロピン値には異常を認めなかった。

遅延性排卵症例における卵胞の発育過程について、超音波学的に検討した結果、①排卵前卵胞径は、正常排卵例と較べ差はなかったが、②卵胞発育の遅延と成熟卵胞の破裂遅延の 2つのタイプに分類された。

また排卵後の黄体機能はプロゲステロン分泌値において低下する例が多く、平均値に有意差が認められた。

マウスを用いた実験的遅延性排卵モデルを Gn-RH agonist 前処置後のゴナドトロピン投与時期の設定により作成し、卵管膨大部より採取した卵の性状を検討した。その結果、①卵の過熟と解釈される形態異常卵の頻度が上昇し、②体外受精系における受精率の低下ならびに卵分割能の低下が認められた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 279—287, 1992)

緒 言

排卵誘発法の進歩や配偶子操作が不妊症治療に導入され、その効果は著しい。しかしなお原因の明らかでない不妊症例が数多く存在し、治療法についても決め手を欠くのが現状である。

不妊因子に関し、排卵性周期を有する症例における内分泌学的な異常として、いわゆる黄体機能不全が知られているが、原因不明とされる不妊症例 (機能性不妊) の中に遅延性排卵を認める症例が存在する。

しかしながら、卵胞発育や排卵の調節機構が必ずしも解明されていない現状では、遅延性排卵が不妊の原因となるか否かについて明らかでなく、その不妊因子としての病態についても、軽度の黄体機能不全など、受精着床を取り巻く内分泌環境の異常とするか、卵自体の機能異常に求めるべきか、なお検討を要する課題である。

本研究は、遅延性排卵を不妊因子となり得る軽度の排卵障害と捉え、その内分泌学的背景を明らかにするとともに、卵の受精能に関する基礎的検討を行ない、一方臨床例での治療効果を retrospective に検

討し、本症の治療の在り方を提示せんとしたものである。

対象および方法

1. 遅延性排卵に対する臨床的検討

大阪市立大学医学部付属病院産婦人科・不妊外来通院患者で、排卵周期を有する症例を対象とし、基礎体温および経膈超音波断層法より推定排卵日を決定し、排卵日が月経周期第 19 日目以前を正常排卵群、第 20 日目以降を遅延性排卵群とし、比較検討を行った。なお、推定排卵日の決定は、基礎体温曲線は低温最終日を、超音波断層法上は、卵胞の消失あるいは卵胞径の明らかな縮小が認められた日を推定排卵日とした。超音波断層装置は、横河メディカル RT-3000、経膈走査プローブは 5MHz の電子セクタを使用した。ホルモン測定の際の採血は、空腹時安静後肘静脈より行なった。推計学的処理は、Student の t 検定により施行した。

a. 臨床症例の統計学的検討

1) 対象症例より機能性不妊症例を抽出し、そのうち遅延性排卵を示す症例の頻度、及び遅延性排卵例での排卵誘発による妊娠成立周期の排卵日を検討した。

2) 遅延性排卵例の妊娠予後の追跡を目的として、基礎体温曲線等により排卵日の推定が可能であった妊婦の自然流産率の検討を行なった。ただし、年齢因子を考慮し 35 歳以下の症例とした。また、習慣流産症例や子宮筋腫症例等、明らかに流産因子を有すると思われる症例は除外した。

b. 遅延性排卵症例の内分泌学的背景に関する検討

正常排卵周期症例を対象として以下の検討を行なった。

1) 下垂体機能に関する検討

月経周期 3～5 日目の午前 9～10 時に採血後、TRH 250μg を静脈内投与に、LH-RH 100μg を筋肉内に同時投与し、30 分後に採血を行ない、それぞれの血清を凍結保存した。試料中の PRL, LH, FSH を RIA 法にて測定し、各々の負荷前値(基礎値)、負荷後 30 分値を比較した。なお、測定は、第一 RIA キットによった。また、TRH 負荷前 PRL 値 20ng/ml 以上の例を高 PRL 血症、負荷前値 20ng/ml 未満負荷後 30 分値 100ng/ml 以上の例を潜在性高 PRL 血症とした。

2) 卵胞発育過程の超音波学的、内分泌学的追跡

各群において、卵胞期初期から隔日に経膈超音波断層法を用い、主席卵胞の最大径(長径)とそれに垂直な径線(短径)を計測し、その和をもって主席

卵胞径とし、その推移を比較した。また、同時に採血し、血清を凍結保存して血中 LH 値、FSH 値、E₂ 値を第一 RIA キットを用いて RIA 法にて測定し、その推移を比較検討した。

3) 黄体機能に関する検討

正 PRL 血症性症例での黄体期中期(黄体期 6～8 日目)の血中 E₂ 値、Progesterone (P) 値を第一 RIA キットを用いて RIA 法にて測定した。

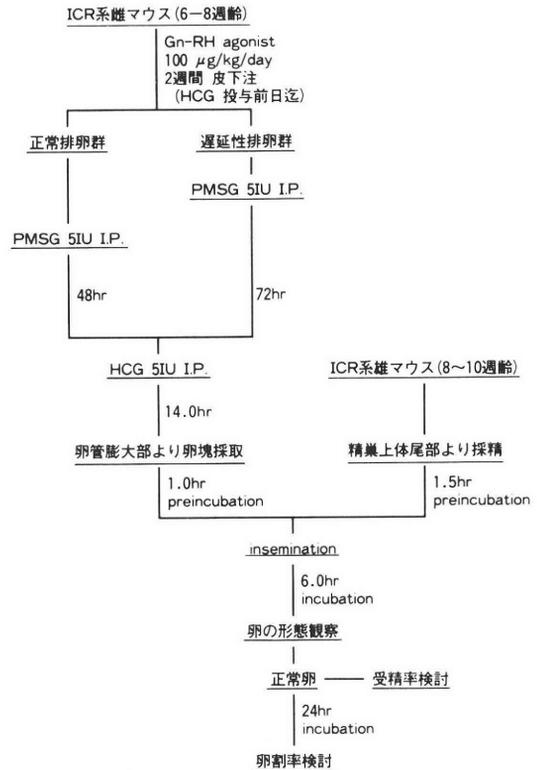
2. マウスにおける遅延性排卵モデルの作成とその受精能に関する検討

a. マウスにおける遅延性排卵モデルの作成

マウスにおける遅延性排卵モデルを作成するために、まず Gn-RH agonist 100, 50, 20μg/kg/day を皮下投与し、発情周期の変化をギムザ染色にて膈垢像により観察し、発情の抑制の有無(卵胞発育の抑制の有無)を検討した。

b. 体外受精系を用いた卵の受精・分割能の検討

卵の受精・分割能の比較に関しては、マウスの排卵を 1 日遅延させることにより検討した。方法は、図-1 に示すごとく 6～8 週齢の ICR 系雌マウスに



注) ① 培養液 HamF-10+5%Fetal bovine serum
 ② motile sperm concentration 1×10⁶~2×10⁶/ml
 ③ incubation 37C, 5%CO₂, 95%air

図1 マウス遅延性排卵実験プロトコル (in vitro)

Gn-RH agonist を100 μ g/kg/day 2週間皮下投与し、その後PMSG 5単位を腹腔内投与した。hCGは、遅延性排卵群ではPMSG投与72時間後に、正常排卵群ではPMSG投与48時間後に5単位腹腔内投与した。両群ともhCG投与14時間後に頸椎脱臼法により屠殺、卵管膨大部より卵塊を採取し、5% fetal bovine serum を含むHam'F-10を培養液とし37°C、5% CO₂、95% airにて1時間前培養した。精子は、8~10週齢のICR系雄マウスを頸椎脱臼法により屠殺し、精巣上体尾部より採取し、1.5時間前培養し、運動精子濃度が1 \times 10⁶~2 \times 10⁶/mlになるように卵培養液中に加えた。授精6時間後、位相差顕微鏡にて卵子の形態を観察し、形態異常卵の割合を比較した。形態正常卵に関しては、一部を任意に抽出しノマルスキー微分干涉顕微鏡にて受精の判定を行ない、受精率を比較検討した。なお、受精の判定は、第2極体の放出と雌雄前核形成の有無を調べ行なった。また、残りの形態正常卵においては、その後24時間の培養を行ない、卵分割率を比較検討した。

結 果

- 1. 遅延性排卵に対する臨床的検討
- a. 臨床症例の統計学的検討

1) 図-2に最近5年間の当科不妊外来症例の不妊原因を示したが、11.5%の原因不明不妊すなわち機能性不妊が存在した。これら不妊症例の背景として表-1のごとき因子が想定された。このうち遅延性排卵

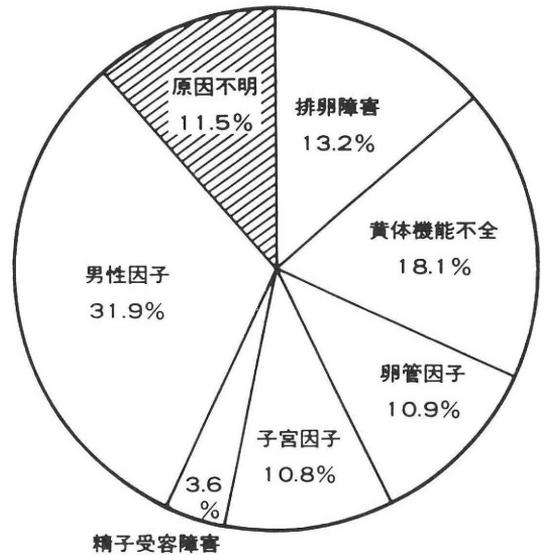


図2 当科における不妊症例の原因別分布 (1983~1987: N=992)

表1 機能性不妊症における背景因子と妊娠率

背景因子	症例数	(%)	妊娠例	妊娠率 (%)
遅延性排卵	18	(15.8)	6	(33.3)
軽度の黄体期短縮	30	(26.3)	10	(33.3)
高プロラクチン血症	6	(5.3)	1	(16.7)
軽症子宮内膜症	16	(14.0)	3	(18.8)
卵管の機能的通過障害	15	(13.2)	3	(20.0)
無症候性性器感染症	1	(0.9)	1	(100)
原因不明の精子受容障害	7	(6.1)	1	(18.2)
軽症精子減少症	10	(8.8)	1	(10.0)
背景因子不明	11	(9.6)	3	(27.3)
総 計	114	(100)	29	(25.4)

表2 遅延性排卵例での妊娠症例

症例	年齢	P/S	排卵日(M-)	他の内分泌異常	有効治療	妊娠時排卵日	子後
1)	26	P	19-26	PRL26.0, 黄体期短縮	BCP	M-20	正期産
2)	27	P	25-28	L/F2.9	BCP+CC	M-17	正期産
3)	30	P	18-27	黄体期短縮	CC	M-15	正期産
4)	28	S	25-32	黄体期短縮	CC	M-18	正期産
5)	30	S	20-24	PRL19.4, L/F2.1	BCP+CC	M-18	双胎
6)	29	S	18-32	PRL24.4	BCP	M-19	正期産

P: 原発性不妊 S: 続発性不妊 PRL: prolactin (ng/ml)
L/F: LH/FSH BCP: bromocriptine CC: clomiphene citrate

表3 排卵日よりみた流産率の比較

排卵日 (月経周期)	妊娠例 (平均年齢)	妊娠継続例 (平均年齢)	流産例 (平均年齢)	流産率 (%)
月経周期 19日目以前	241 (28.9±3.4)	215 (28.7±3.3)	26 (30.6±3.1)	10.8
月経周期 20日目以降	103 (29.7±3.0)	86 (29.2±3.0)	17 (30.6±3.1)	16.5

表4 性機能障害と PRL 値との関係

疾患	症例数	PRL 値 (ng/ml)
黄体機能不全	49	22.3±11.4
稀発排卵	18	21.5± 9.1
無排卵周期症	11	26.5±18.5
第一度無月経	24	16.6± 9.4
第二度無月経	16	13.9± 7.0
遅延性排卵	15	21.5± 7.3

*microadenoma 症例は除く

表5 高プロラクチン血症(潜在性を含む)と排卵日との関係

排卵日	症例数	%
月経周期19日目以前	28	55
月経周期20日目以降	23	45

表6 正 PRL 血症性排卵周期症例における月経周期 3-5 日目に施行した LH-RH 負荷試験の比較

例数		正常排卵群 16	遅延性排卵群 11
基礎値	PRL	14.5± 3.2	14.3± 2.9
	LH	19.7± 6.9	20.8± 8.0
	FSH	12.5± 3.1	10.9± 3.7
LH-RH 後 30分値	LH 反応比	94.8±52.1	137.4±56.9
	FSH 反応比	4.9± 2.1	7.7± 4.2
		22.6± 6.8	24.2± 7.9
LH/FSH		1.6±0.38	2.0± 0.70

註)

- ①単位 ; PRL ng/ml, LH・FSH mIU/ml
- ②反応比=30分値/基礎値
- ③卵胞期初期血中 PRL 値 20ng/ml 未満症例
- ④Hypergonadotropic hypogonadism 例は除外

は 15.8%であった。表-2 は、遅延性排卵例での妊娠症例を示すが、いずれも妊娠周期では卵胞期の短縮が認められた。

2) 妊娠例における流産率を排卵時期別に比較すると、正常排卵群の流産率は、10.8%、遅延性排卵群

のそれは、16.5%と正常排卵群に比して高い傾向はあるが、有意な差は認められなかった。なお流産例の平均年齢は両群において差はなかった(表-3)。
b. 遅延性排卵症例の内分泌学的背景に関する検討
1) 下垂体機能に関して検討した。表-4 には各種性機能障害別の平均 PRL 値を示したが、高 PRL 血症が性機能障害の一因であることが伺える。そこで高 PRL 血症との関係について検討した結果、表-5 に示すごとく、高 PRL 血症症例と潜在性高 PRL 血症症例において、45%に遅延性排卵症例が認められた。このことより高 PRL 血症が、遅延性排卵の

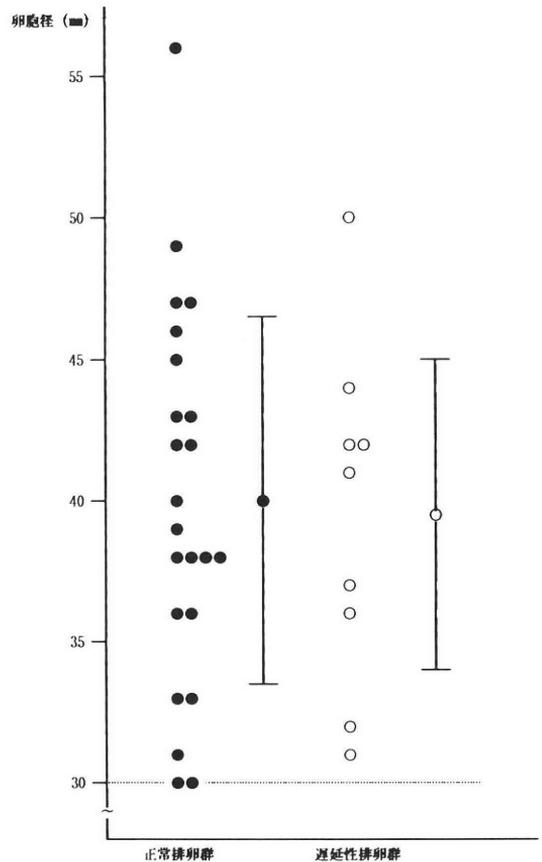


図3 排卵時主席卵胞径(長径+短径)の分布(自然排卵周期)

一因になると考えられた。しかし正PRL血性排卵周期症例において、卵胞期初期に施行したLH-RH 負荷試験を含めた下垂体ゴナドトロピン分泌能の面からは、正常排卵、遅延性排卵の両群においてLH, FSHの基礎値に有意差は無く、LHの負荷後反応値とLH/FSH比は遅延性排卵群でやや高い傾向があったが、有意差は無く、下垂体ゴナドトロピン分泌能の面からは両群に有意な差は認められなかった(表-6)。

2) 正常ならびに遅延性排卵症例のそれぞれに対し卵胞発育過程の超音波学的、内分泌学的追跡を行なった。自然排卵周期における排卵時主席卵胞径の比較では両群に差は認められず、全例30mm以上で排卵していた(図-3)。排卵前内分泌環境に関しては、表-7に示すごとく排卵前の血中E₂, FSH, LH値において両群に差は認められなかった。遅延性排卵例の排卵迄の卵胞径の推移を見ると、図-4に示すごとく

表7 正常排卵症例と遅延性排卵症例の比較

症例	卵 胞 期				
	排卵日	排卵前最大卵胞径(mm)	排卵前血中ホルモン値		
			E ₂ 値	FSH 値	LH 値
①	16	30	159	16.8	30.9
②	19	31	182	11.0	48.4
③	19	40	250	26.3	61.3
④	17	43	230	10.4	30.9
⑤	16	33	165	13.8	56.9
⑥	14	30	173	11.8	31.3
⑦	13	36	335	8.3	20.4
⑧	27	42	113	19.0	62.6
⑨	21	32	174	12.5	46.5
⑩	27	44	374	10.1	65.3
⑪	23	42	293	9.6	25.4
⑫	20	36	261	9.9	27.3
⑬	23	32	133	15.0	39.8

単位：E₂ pg/ml, LH・FSH mIU/ml

く、遅延性排卵症例の個々を各々の印で示すが、ほとんどの症例あるいは時期において正常排卵群に比べ卵胞発育速度の遅延が認められた。

次に、遅延性排卵例で卵胞径30mm以上かつE₂値100pg/ml以上に達した時点、すなわち卵胞が成熟してきていると考えられる時点でのLH値、FSH値およびそれから排卵迄に要した日数を表-8に示した。3日以上要した例が7例中4例あり、これら4例は卵胞破綻遅延と考えられた。なお、正常排卵群でこれらの条件で排卵迄に要した日数は平均2.1日であった。

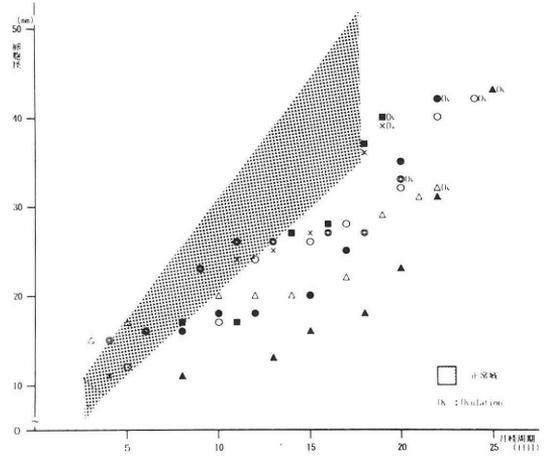


図4 遅延性排卵症例における主席卵胞径(長径+短径)の推移

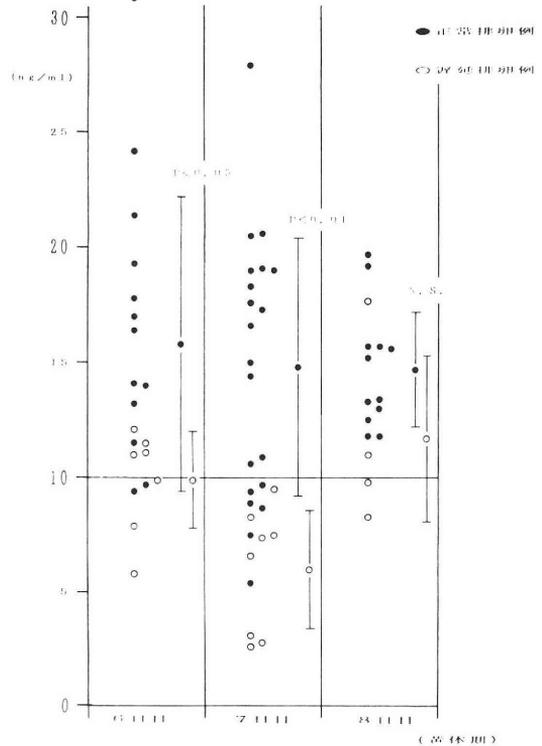


図5 排卵日と黄体期中期プロゲステロン値との関係

3) 正PRL性排卵周期症例において、黄体期中期血中P値を比較すると、図-5に示すごとく、遅延性排卵群では正常排卵群よりP分泌の低下、すなわち黄体機能不全例が多く認められた。なお、これらの症例において、排卵時卵胞径に有意差は認められていない。

2. マウスにおける遅延性排卵モデルの作成とその

表 8 遅延性排卵例における卵胞径 30mm 以上かつ血中 E₂ 値 100pg/ml 以上の時点での LH, FSH 値及び排卵に要した日数

	症例	卵 胞 径 (mm)	E ₂ (pg/ml)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	排卵迄の日数	
遅延性排卵例	1	31	127	10.8	5.9	5 日	卵胞破綻遅延
	2	40	113	62.6	19.0	4 日	
	3	37	356	16.4	4.8	3 日	
	4	35	156	20.3	7.0	3 日	
	5	31	133	39.8	15.0	2 日	卵胞発育遅延
	6	36	261	27.3	9.9	2 日	
	7	32	174	46.5	12.5	1 日	
正常例平均		35	203	30.3	11.7	2.1 日	

受精能に関する検討

a. Gn-RH agonist 100µg/kg/day 投与群において、投与 10 日目より完全に性周期の抑制が認められた(図-6)。このことより、今回 100µg/kg/day を投与量と設定した。その条件下で PMSG 5 単位を投与し、その後の hCG 投与の時期を変えることにより遅延性排卵モデルを作成した(図 1 参照)。

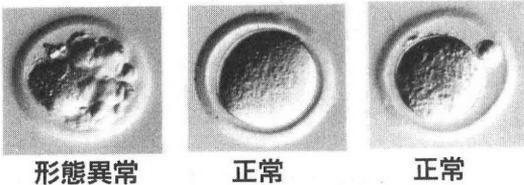
b. 採取された卵について、正常排卵群と遅延性排卵群での形態異常卵の発現比率を検討した。遅延性排卵群においては 30.0% と正常排卵群の 14.5% に比して有意に高かった(表-9)。

c. 形態正常卵の初期受精能に関しては、遅延性排

表 9 正常排卵群と遅延性排卵群における卵の形態比較

	総卵数	正常卵数	異常卵数	異常卵出現率
正常排卵群	165	141	24	14.5%*
遅延性排卵群	150	105	45	30.0%*

* p < 0.01



卵群での受精率が 44.8% に対し正常排卵群では 65.8% と遅延性排卵群で有意に受精率が低かった。また、分割率は、遅延性排卵群の 36.2% に対し正常排卵群では 71.4% と遅延性排卵群で有意に低かった(表-10)。

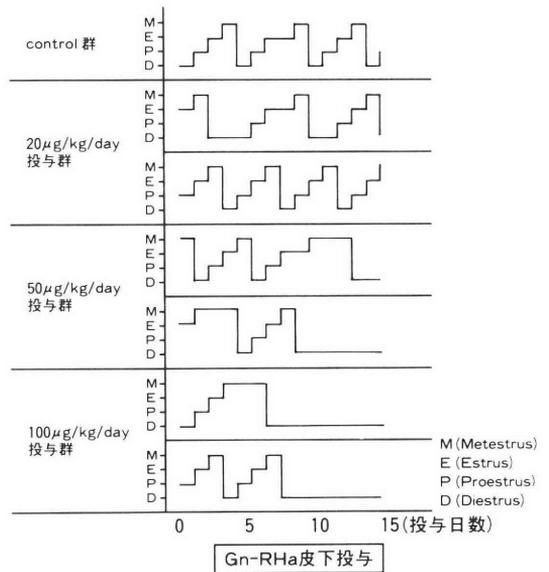


図 6 Gn-RHa 皮下投与によるマウス膣垢像の変化

表 10 A. 正常排卵群と遅延性排卵群との受精率の比較 (in vitro)

	培養卵子数	受精卵子数	受精率
正常排卵群	76	50	65.8%*
遅延性排卵群	58	26	44.8%*

* p < 0.05

B. 正常排卵群と遅延性排卵群との 2 分割卵の比較 (in vitro)

	培養卵子数	2 分割卵数	卵割率
正常排卵群	65	45	71.4%*
遅延性排卵群	47	17	36.2%*

* p < 0.01

考 察

遅延性排卵は、経験的に不妊因子と考えられており、通常排卵促進療法が一定の効果をあげているが、その不妊因子としての病態は未だ明らかでない^{1,2)}。ただし、妊娠成功例では、その周期の排卵日が早くなる傾向にあることより^{1,3)}、遅延性排卵を不妊因子となり得る軽度の排卵障害と捉え検討を加えた。

下垂体機能の面からは、潜在性高PRL血症を含めた高PRL血症が各種性機能障害の原因となることより⁴⁾、高PRL血症と遅延性排卵との関係を検討したところ、45%に遅延性排卵が認められ、遅延性排卵の成因において高PRL血症が一因になると考えられた²⁾。しかし無排卵周期症、無月経の婦人ではFSHレベルがコンスタントで周期的変動を認めないと言われており²⁾、遅延性排卵に関してもFSHの関与が考えられる。しかし今回の検討方法のような単回測定では、負荷テストを含めたゴナドトロピン分泌能、LH/FSH比とLHの負荷後反応値のいずれも、遅延性排卵でやや高い傾向にあるものの有意差は無く、必ずしも明らかにし得なかった。今後、病態を明らかにする上でゴナドトロピンの連続的測定や卵巣自体の機能面よりの検討が必要と考えられた。

排卵時主席卵胞径、排卵前血中E₂、LH、FSH値に関しては、正常、遅延性排卵の両群に有意差は認められなかったが、同様の報告⁵⁾がある一方、遅延性排卵群で主席卵胞径が有意に小さく、排卵期血中E₂レベルが低いという報告もある⁶⁾。今回の検討では、排卵時主席卵胞径は全例30mm以上であったが、諸家の報告^{7,8)}よりしてこれら排卵された卵のうち、未熟卵の頻度は低いと推測された。

卵胞発育に関しては、遅延性排卵では卵胞発育のstartが遅れるのみという報告⁹⁾があるが、今回の検討からは、遅延性排卵群での卵胞発育、排卵過程よりみて、卵胞発育が単に遅れるだけの卵胞発育遅延と、卵胞が十分に発育しているにも関わらず排卵が遅れる卵胞破綻遅延の2つのtypeの存在が示唆された。これらの病態に関しては今後さらに詳細な検討が必要と考えられた。

排卵後の黄体機能に関しても、様々な報告^{2,5,6,9)}があるが、今回の検討では、黄体期中期プロゲステロン値が黄体機能不全レベルを示す頻度が有意に高かった。

また自然流産率の比較では有意差は認められなかったが、遅延性排卵群で高い傾向が認められた。このことに関しては、遅延排卵による卵胞内過熟は受精卵の発育異常、染色体異常の頻度を高めるとい

ことや、顆粒膜細胞の機能ならびに受精・着床における卵管子宮内膜の機能異常に原因するという考え方も存在している^{2,10~12)}。

今回の検討から、遅延性排卵の不妊原因となる機序の一つとして黄体機能不全が示唆されたが、そのみで一元的に捉えることには無理があり、流産率がやや高い点などを考慮すれば、卵自体の機能を検討する必要性が示唆された。

動物実験では、排卵の遅れや受精の遅延が病的な卵子、異常受精卵の発生を助長し、また増加させるという報告は少なくない^{13~16)}。

遅延性排卵モデルとしては、ラットやマウスにペントバルビタールを投与しLH-surgeの出現を遅延させることにより作成されている^{12~17)}。今回ICR系雌マウスにGn-RH agonistを投与し、内因性ゴナドトロピンを抑制¹⁸⁾した上で、PMSGとhCGの投与間隔変更により排卵を遅延させ体外受精系において検討を加えた。Gn-RH agonistを使用した目的は、過排卵刺激での卵発育のsynchronizationを目的としたためである。その結果、遅延性排卵群で形態異常卵の出現頻度が有意に高く、受精率・分割率が有意に低いという結果を得た。マウス卵のAgingによる卵の形態変化(透明帯の表面性状の変化)を電顕にて観察した報告がある¹⁹⁾が、ここで言う形態異常卵は変性卵に分類される。今回電顕的には観察していないが、遅延性排卵群で受精・分割率が低かったということは、光顕では鑑別できない変性卵の前段階にある卵の質的問題が存在すると考えられた。

以上のことより、図-7に示す様に遅延性排卵は、主として卵の質的・機能的異常による卵の受精分割能の低下に求められ²⁰⁾、また、一方では黄体機能不全を伴い、それが不妊症、流産の原因になっていると考えられた。

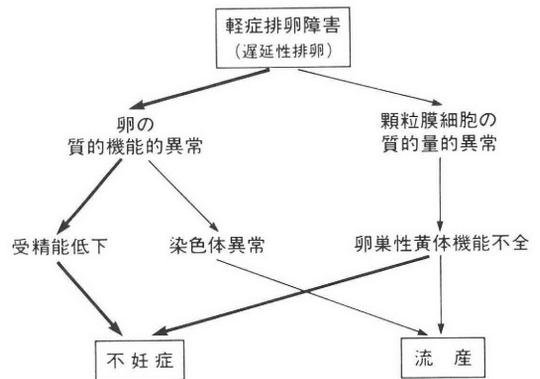


図7 不妊原因としての遅延性排卵に関する考察

稿を終えるに臨み、終始懇切な御指導と御校閲を賜りました恩師須川信教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究において御協力、御助言を頂いた教室員各位に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 志村研太郎, 友田昭二, 中野昌芳, 康 文豪, 藤野祐司, 伊藤文俊, 小嶋哲矢, 梅咲直彦, 宇田 聡: 機能性不妊婦人における背景因子の解析と対策, 産婦進歩, 42: 93, 1990
- 2) 麻生武志, 田中俊誠: 卵胞発育の異常と遅延排卵, Wave on OB-GY., 20: 1, 1989
- 3) 山下三郎, 伊藤武久, 野見山宏寿, 道上文和, 鳥越 正: 遅延性排卵症の内分泌学的背景と治療成績, 日不妊会誌, 29: 349, 1984
- 4) 友田昭二, 康 文豪, 中野昌芳, 追 久男, 河本俊樹, 須川 信: プロモクリプチンを用いた下垂体PRLの合成・分泌能の検討, 産婦進歩, 40: 599, 1989
- 5) 秋田彰一: 遅延排卵周期における卵胞発育の超音波学的検討, 日産婦誌, 36: 2575, 1984
- 6) 荒木重雄, 近澤幸嗣郎, 本山光博, 佐山雅昭, 玉田太郎: ヒト卵胞発育調節機序, ホと臨床, 37: 967, 1989
- 7) Richard, T., Glen, E. H., Suheil, J. M., Anibal, A. A., David, K. K. and Zev-Rosenwaks: Correlation of Follicular Diameter with Oocyte Recovery and Maturity at the Time of Transvaginal Follicular Aspiration, J. Vitro Fert. Embryo Transfer, 6 (2): 73, 1989
- 8) 千石一雄, 玉手健一, 菊川美一, 石川睦男, 清水哲也: 経膈超音波断層法による卵胞計測と卵子成熟度および受精・分割率の検討, 日不妊会誌, 35: 502, 1990
- 9) Juan, B., Montserrat, C., Juan, A. V.: Luteal function after delayed ovulation, Fertil. Steril., 45: 342, 1986
- 10) 佐伯友三: 遅延排卵と妊娠, 日不妊会誌, 25: 122, 1980
- 11) Arrata, W. S. M. and Iffy, L.: Normal and delayed ovulation in the human, Obstet. Gynecol. Surv., 26: 675, 1971
- 12) 佐藤孝道: 遅延排卵の卵および妊娠現象に及ぼす影響に関する基礎的研究, 日産婦誌, 30: 1647, 1978
- 13) Fugo, R. N. W., Butcher, L.: Overripeness and the mammalian ova: I. Overripeness and early embryonic development, Fertil. Steril., 17: 804, 1966
- 14) Roy, L., Butcher, N., Fugo, W.: Overripeness and the mammalian ova: II. Delayed ovulation and chromosome anomalies, Fertil. Steril., 18: 297, 1967
- 15) Butcher, R. L., Blue, J. D., Fugo, N. W.: Overripeness and the mammalian ova: III. Fetal

development at midgestation and at term, Fertil. Steril., 20: 223, 1969

- 16) Butcher, R. L., Collins, W. E., Fugo, N. W.: Altered secretion of gonadotropins and steroids resulting from delayed ovulation in the rat, Endocrinol., 96: 576, 1975
- 17) Van der Schoot, P.: Delay of ovulation in rats with sodium pentobarbitone: apparent differences between rats with 4- or 5-day reproductive cycles, J. Endocr., 86: 451, 1980
- 18) 赤池雅司, 高山和男, 大野広子, 小林孝好, 坂口孝: Buserelin acetate の生殖試験 雌雄マウスの生殖能および次世代への影響, 応用薬理, 33: 723, 1987
- 19) Nogues, C., Ponsa, M., Vidal, F., Boada, M. and Egozcue, J.: Effects of Aging on the Zona Pellucida Surface of Mouse Oocyte, J. Vitro Fert Embryo Transfer, 5 (4): 225, 1988
- 20) 美甘和哉: 初期発生における胚の淘汰, 日本医師会雑誌, 101 (2): 221, 1989

Study on the pathophysiology of delayed ovulation —As fertilized factor—

Bungou Kou

Department of Obstetrics & Gynecology,
Osaka City University Medical School,
Osaka 545, Japan

(Director: Prof. Tadashi Sugawa)

In the clinical and statistical study on fertilized cases, the 18 cases (15.8%) of the unexplained infertility (114 cases) were found to have delayed ovulation. The 6 cases of those got pregnant by the administration of clomiphene citrate or bromocriptine. In the pregnant women (344 cases) in whom the day of ovulation could be estimated, the abortion rate (16.5%) of pregnant cases (103 cases) of delayed ovulation was higher than that of normal ovulation (10.8%).

In the endocrinological study of delayed ovulation, 45% of delayed ovulation was found to have hyperprolactinemia or occult hyperprolactinemia. But the gonadotropin secretory reaction to Gn-RH test was within normal range.

In the ultrasonographic assesment of follicular development of delayed ovulation, there was very little difference in preovulatory follicular diameter between delayed ovulation and normal ovulation. But there were two types, delayed follicular devel-

opment and delayed rupture of mature follicle, in delayed ovulation.

Luteal function of delayed ovulation showed significantly lower secretion of progesterone than that of normal ovulation.

I made use of mouse with pretreatment by Gn-RH agonist and I made delayed ovulation model of mouse by changing interval of administration of

gonadotropin. And I studied qualities of oocytes recovered from oviduct. As the result, the rate of oocytes with abnormal surface was significantly increased and the rate of fertilized oocytes and cleaved oocytes in vitro fertilization was significantly decreased in delayed ovulation.

(受付：1991 年 7 月 29 日)

LH含量変更に伴う hMG (Humegon[®]) の 卵胞機能賦活作用の変化

Changes of Follicular Stimulizing Effects of hMG (Humegon[®]) Associated with Change of LH Content

医療法人 假野クリニック

假野 隆 司
Takashi KANO

Kano Clinic, Osaka 542, Japan

FSH, LH 比率が 1 : 1 から 3 : 1 に変更されたヒュメゴン[®] (オルガノン) 150 IU の卵胞機能賦活作用の差を実質不妊期間 3 年以上で、少なくとも連続して 3 ヶ月以上ヒュメゴン 150 IU 1 : 1 製剤の治療を受け、その後、3 : 1 製剤に変更して同量の治療を受けた 17 例で臨床的に検討した。卵胞機能は直接的卵胞機能の指標としての血中 estradiol 値、最大首席卵胞径、最大首席卵胞径 + 最小首席卵胞径、卵胞数 (5 mm 以上と 16 mm 以上)、間接的指標としての子宮内膜厚、頸管粘液量、黄体機能としての血中 Progesterone 値で評価した。また、排卵日を基礎体温低温最終日から推定した。この結果、1 : 1 製剤から 3 : 1 製剤に変更して各指標に低下、ないし減少傾向が認められたが統計学的な有意差はなかった。基礎体温低温最終日も延長傾向はみとめられるものの有意差はなかった。この結果、1 : 1 製剤と 3 : 1 製剤の卵胞機能賦活作用ならびに排卵誘発作用は臨床的に差はないと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 288-293, 1992)

緒 言

本邦で始めて販売された hMG 製剤、ヒュメゴン (オルガノン) 150 IU が 1991 年 2 月をもって FSH, LH 比率が 1 : 1 から 3 : 1 に変更された。この変更は LH 含量を減じることで卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) 発症の低下、多嚢胞性卵巣症例への安全な運用を狙った措置と考えられるが、LH 含量の低下は卵胞機能賦活作用を低下させる可能性があり、体外受精-胚移植が一般的な不妊症治療になっている今日の状況のなかで投与量がさらに増加する経済的デメリットが問題になる。そこでヒュメゴン 150 IU, 1 : 1 製剤と 3 : 1 製剤の卵胞機能賦活作用を臨床的に比較検討した。

対象と方法

実質不妊期間 3 年以上 (最高 15 年、平均 5.9 年)

の 31 歳から 44 歳 (平均 35.7 歳) で少なくとも 3 ヶ月以上連続してヒュメゴン 150 IU, 1 : 1 製剤の治療を受け、その後、3 : 1 製剤に変更、前周期と同量の投与を受けた 17 例 (原発性 15 例、続発性 2 例) を対象とした。

これらの症例には多嚢胞性卵巣や、過去にヒュメゴン 150 IU によって OHSS を発症した症例は含まれていない。また、これらの症例には随証療法による引き続いた漢方療法¹⁾を除いて他の卵胞賦活療法は行っていない。

1 : 1 製剤使用前 (初診時) の卵巣機能不全型と 1 : 1 製剤投与最終周期のヒュメゴン 150 IU の平均用量は黄体機能不全症²⁾ 0 例、卵巣黄体機能不全症²⁾ 2 例; 300 IU, 無排卵周期症 6 例; 1050 IU, 第 I 度無月経 5 例; 930 IU, 第 II 度無月経 4 例, 1845 IU であった。

卵胞機能の評価は直接的卵胞機能の指標として、

BBT-3~0Day あるいはLHカラーが初めて陽性になった日に測定した血中 Estradiol 値^{2,3)}, 経膈プローベ超音波断層法(プローベ: アロカ社製 UST-946P-5, 本体: SSD-650) で計測した最大首席卵胞径, 最大首席卵胞径+最小首席卵胞径, 卵胞数 (5 mm以上と16 mm以上), 間接的指標として子宮内膜厚 (中心上部), 頸管粘液量, 黄体機能としてBBT+5~8Day に測定した血中 Progesterone 値^{2,3)}で行なった。また, 排卵日を推測するために13例の基礎体温低温最終日を調べた。結果は平均値±標準偏差で示し, 有意性の検定は Student's t-test で行なった。

結 果

17例中1例が1:1製剤を投与中無排卵であったのに対して3:1製剤に変更後4例が無排卵となったが, 直接的卵胞機能指標としての血中 estradiol は 363.9 ± 620.3 pg/lm (M±SD) から 337.2 ± 321.9 pg/ml (Fig. 1), 最大首席卵胞径は 2.0 ± 0.4 cm から 1.8 ± 0.4 cm, 最大首席卵胞径+最小首席卵胞径は 3.7 ± 0.8 cm から 3.4 ± 0.7 cm (Fig. 2), 5 mm以上の卵胞数は 6.6 ± 3.5 個から 6.2 ± 2.6 個, 16 mm以上の卵胞数は 2.3 ± 1.1 から 1.4 ± 1.7 個 (Fig. 3), 間接的指標としての子宮内膜厚は 5.3 ± 1.5 mm から 5.1 ± 1.6

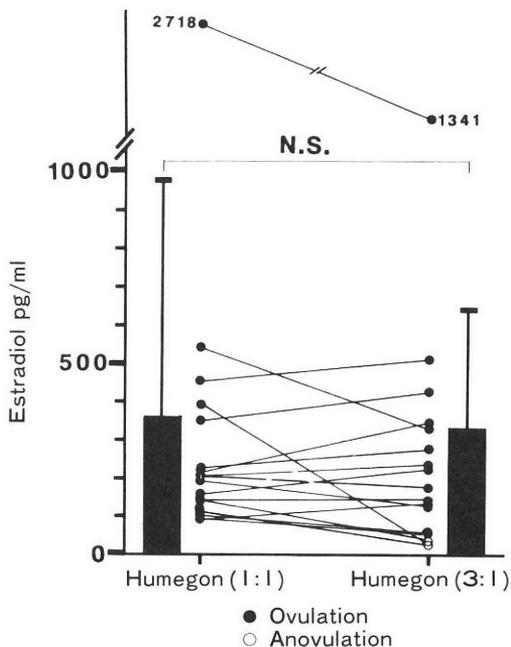


Fig. 1 Effects of Humegon (1: 1) and Humegon (3: 1) on serum estradiol in BBT-3~0 Day or first positive day by LH color. Data are presented as M±SD (N. S.: No significant difference.)

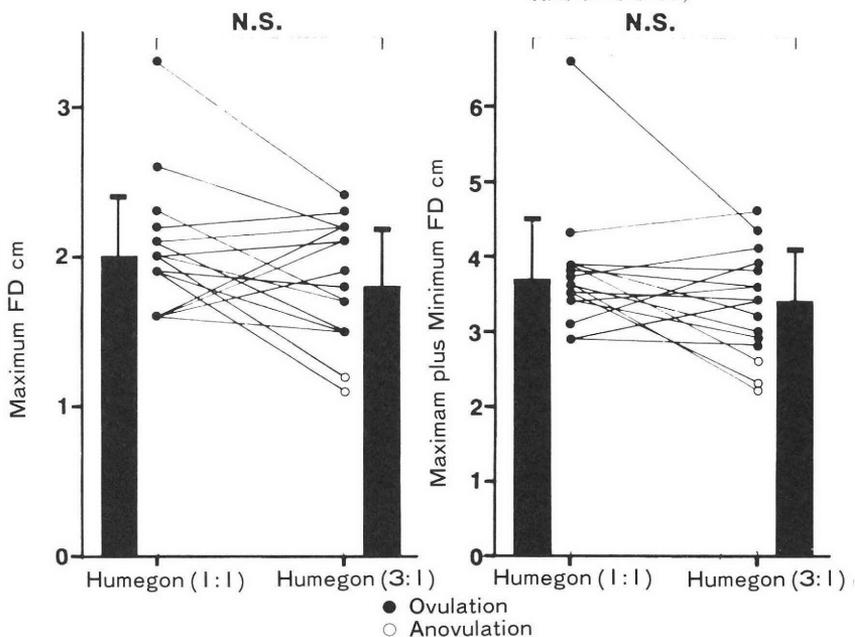


Fig. 2 Effects of Humegon (1: 1) and Humegon (3: 1) on maximum follicle diameter and maximum plus minimum follicle diameter in BBT-3~0 Day or first positive day by LH color. Data are presented as M±SD (N. S.: No significant difference.)

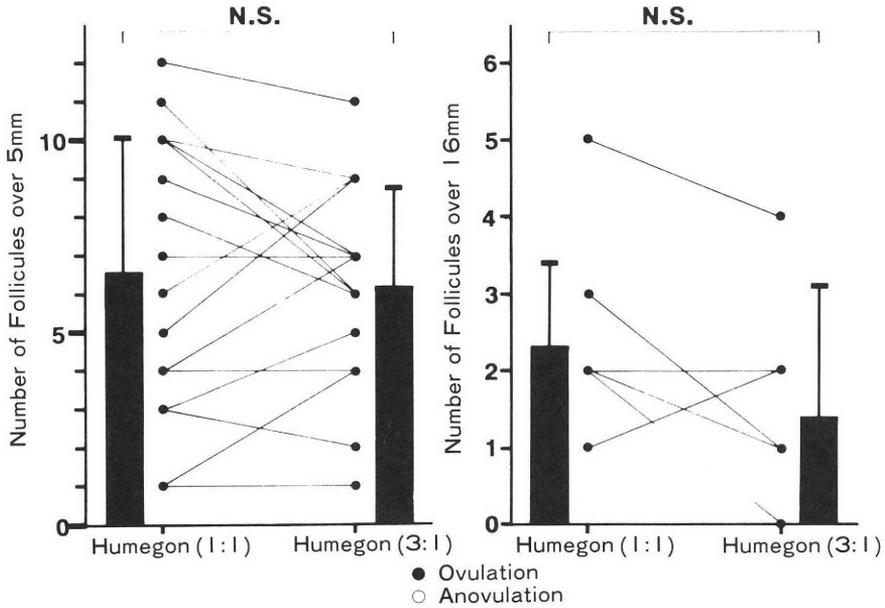


Fig. 3 Effects of Humegon (1: 1) and Humegon (3: 1) on number of follicles in BBT-3~0 Day or first positive day by LH color. Data are presented as $M \pm SD$ (N. S.: No significant difference.)

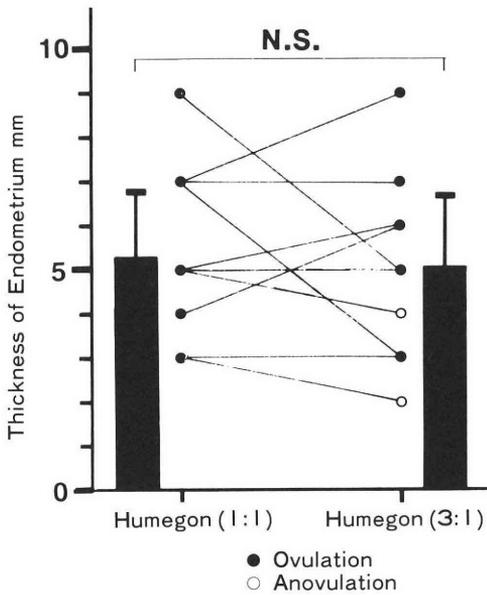


Fig. 4 Effects of Humegon (1: 1) and Humegon (3: 1) on thickness of endometrium measured by trans-vaginal echography in BBT-3~0 Day or first positive day by LH color. Data are presented as $M \pm SD$ (N. S.: No significant difference.)

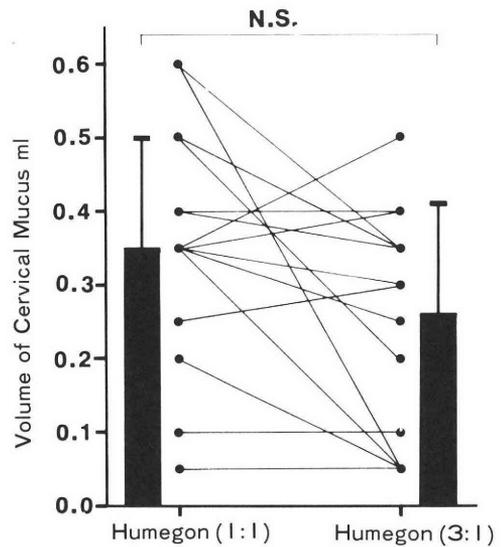


Fig. 5 Effects of Humegon (1: 1) and Humegon (3: 1) on volume cervical mucus in BBT-3~0 Day or first positive day by LH color. Data are presented as $M \pm SD$ (N. S.: No significant difference.)

mm(Fig. 4), 頸管粘液量は 0.35 ± 0.15 ml から 0.26 ± 0.15 ml (Fig. 5), 黄体機能としての血中 Progesterone 値は 53.2 ± 67.1 ng/ml から 51.2 ± 74.3 ng/ml (Fig. 6)と、いずれも低下ないし減少傾向が認められたが、統計学的な有意差はなかった。排卵例の基礎体温低温最終日も 16.2 ± 3.0 から 17.3 ± 3.7 日と延長傾向が認められたものの有意差はなかった(Fig. 7)。

考 察

正常排卵周期では卵胞期, 排卵前期, 排卵期の FSH/LH 比は, それぞれ 1.36, 0.69, 0.69 と異なり⁴⁾, hMG 療法は原則的には各時期で FSH/LH 比の異なる製剤, すなわち卵胞が成熟するにつれて LH 含量が多い製剤を用いるのが合理的で, 卵胞の成熟を正確に把握しつつ FSH/LH 比の異なる製剤を駆使することが可能であれば過排卵, 卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) などの hMG 療法の副作用を最小限にとどめることが期待できる。

1991年1月現在, hMG 製剤は6社から発売されており, その FSH:LH 比は各社ごとに異なっている。その比率は一般的にはヒュメゴン(オルガノン, 1:1), パーゴナル(帝国臓器, 1:1), ゴナドリール(持田, 2:1), HMGフジ(富士, 3:1), HMG日研(日研科学, 100:1), フェルティノー

ム(セローノジャパン, 1000:1)と考えられているが, 各製剤の FSH, LH の immunoassay, bioassay 値は微妙に異なる。

LH に関しては immunoreactivity はヒュメゴン>ゴナドリール>パーゴナル>旧HMG日研(10:1)>HMG日研の順になり, in vivo bioactivity はパーゴナル>旧HMG日研>ヒュメゴン>ゴナドリール>HMG日研の順で, in vitro bioactivity はヒュメゴン>パーゴナル>旧HMG日研>ゴナドリール>HMG日研の順となる⁵⁾。HMGの生物活性を示す指標として in vivo bioactivity が最も重要と考え⁵⁾ても, ヒュメゴンは LH 活性が高い製剤といえる。

LH 活性が高いと卵胞数, 卵胞径, estradiol 分泌量などの各種指標で示される卵胞機能賦活作用が強いと考えられる^{6,7)}反面, OHSS の発症率の増大^{6,8,9)}などの副作用発現が問題となり, 同症発症率が高い多嚢胞性卵巣への運用が制限される欠点がある。

しかし, 各種製剤を比較した報告では, LH 含量低下 (FSH/LH 比の増加) は卵胞機能賦活作用には差をもたらさず^{10,13)}, OHSS 発症率も有意の差はない^{9,10)}とされているばかりか, 却って卵胞機能賦活作用は強まり OHSS 発症率が増加すると反論^{14,15)}もある。これらの反応性の解離は個体の gonadotropine への反応性の差異のためと理解されている¹⁰⁾。

以上の個体の反応性を考慮すると卵胞成熟に最適な FSH/LH 比は 1.2~3.1:1 程度と考えられて¹⁶⁾いる。

いずれにしても, ヒュメゴン 150 IU のみならず, 近年, HMG日研やフェルティノームなど LH 含量が少ない製剤の開発が進んでいる理由は, 卵胞機能賦活作用を犠牲にしても, OHSS の発症率の低下, 多嚢胞性卵巣への安全な運用を配慮しているためと

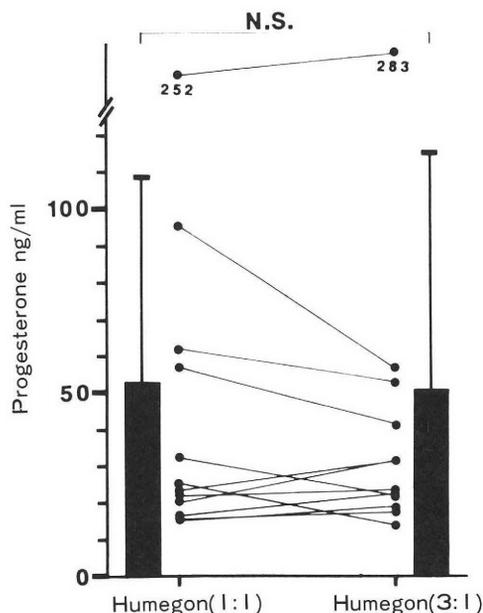


Fig. 6 Effects of Humegon (1:1) and Humegon (3:1) on serum progesterone in BBT+5~8 Day. Data are presented as M±SD (N. S.: No significant difference.)

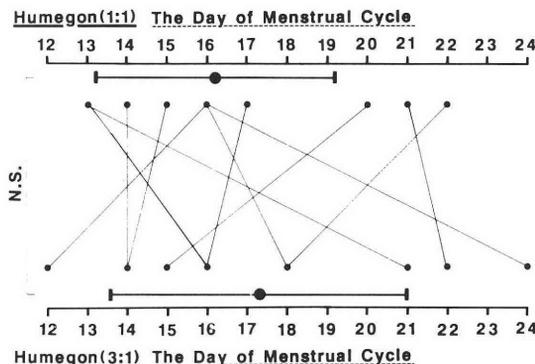


Fig. 7 Effects of Humegon (1:1) and Humegon (3:1) on the last day of low thermia. Data are presented as M±SD (N. S.: No significant difference.)

考えられる。

安全性の拡大は喜ばしいが、卵胞機能賦活作用の低下は体外受精-胚移植例や第II度無月経例など大量投与が余技なくされる症例では経済的デメリットが問題である。そこで、今回はLH含量変更に伴うヒュメゴンの卵胞機能賦活作用の変化について臨床的に検討してみた。

HMG製剤の卵胞機能賦活作用として考えられるのは、直接的作用としては卵胞の発育であり、それに伴う指標として卵胞径、卵胞数、血中estradiol値が考えられ、間接的指標としてはestradiolによって変化する子宮内膜厚、頸管粘液量が挙げられる。さらに排卵後の黄体機能も重要である。

今回の研究では1:1製剤で治療の最終周期で1例が無排卵であったが、3:1製剤に変更して、先の症例を含めて4例が無排卵になった。この事実のみを重視すれば3:1製剤の力価は1:1製剤より低下していると考えられるが、各種直接的、間接的指標は新たに加わった3例の無排卵例に引き下げられて低下ないし減少傾向が認められるものの統計学的な有意差はなかった。指標毎には増加した症例もあり、1:1製剤と3:1製剤の卵胞機能賦活作用には臨床的な差はないと考えられた。

また、1:1製剤投与中は低LH製剤と比べて排卵が早くなる傾向があることが経験的に知られているが、基礎体温低温最終日を検討してみると、延長の傾向は認められるものの有意差はなかった。

しかし、有意差が認められないといっても卵胞機能の指標全てに低下、ないし減少が認められた事実から、大量投与が必要な体外受精-胚移植症例や第II度無月経例での1:1製剤の経済的メリットは無視できず、それらの症例を適応とする限り1:1製剤は依然としてhMG製剤のなかで最も重要な位置を占めると考えられた。

文 献

- 1) 假野隆司: 卵巣機能不全不妊症に対する漢方療法, 日不妊誌, 33: 617, 1988
- 2) 假野隆司: AIDの妊娠成功例と不成功例の解析によるLHカラーの有用性と限界, 日不妊誌, 35: 512, 1990
- 3) Kano, T. and Nishikawa, K.: Etiological study on hyopsecretion of progesterone in the aspect of echographically measured follicle diameter and estradiol and progesterone in the patient categorized by BBT patterns, Jap. J. Fertil. Steril., 30: 5, 1985
- 4) 仲野良介: 排卵とFSH:LH比—新しいゴナドトロピン療法の試み—, 産と婦, 42: 43, 1975
- 5) 浜田雄行, 杉並洋, 松浦俊平: 種々のHMG製剤中に含有されるFSHおよびLHの免疫学的活性と生物学的活性, 日不妊誌, 33: 298, 1988
- 6) Jacobson, A. and Marshall, J. R.: Ovulatory response rate with human menopausal gonadotropins of varying FSH/LH ratios, Fertil. Steril., 20: 171, 1969
- 7) Hoffman, D. I., Lobo, R. A., Compeau, J. D., Tsai, H. M., Holmberg, E. A., Ono, T., Frederick, J. J., Platt, L. D. and DiZerega, G. S.: Ovulation induction in clomiphene-resistant anovulatory women: Differential follicular response to purified urinary follicle-stimulating hormone (FSH) versus purified urinary FSH and lutenizing hormone, J. Clin. Endocrinol. Metab., 60: 922, 1985
- 8) Crooke, A. C., Blutt, W. R., Palmer, R. F. and Morris, R.: Clinical trial of human gonadotropins, J. Obstet. Gynecol., 70: 604, 1963
- 9) 五十嵐正雄, 鈴木勉, 宮本薫, 浅野日和宏: 精製HMGによる卵巣腫大・多発排卵予防効果, 日産婦誌, 36: 1692, 1984
- 10) 藤田善子, 田坂慶一, 三宅侃, 谷沢修: LH含量の異なるHMG製剤を用いた排卵誘発成績の比較検討, 日不妊誌, 34: 69, 1989
- 11) Kurachi, K., Aono, T., Suzuki, M., Hirao, M., Kobayashi, T. and Kaibara, K.: Results of HMG (Humegon)-HCG therapy in 6096 treatment cycles 2166 Japanese women with anovulatory infertility, Europ J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., 19: 43, 1985
- 12) Kase, N., Mroueh, A. and Buxton, C. L.: Pergonal therapy of anovulatory infertility, Am. J. Obstet. Gynecol., 100: 176, 1968
- 13) Venturoli, S., Paradisi, R., Fabbri, R., Magrini, O., Porcu, E. and Flamigni, C.: Comparison between human urinary follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropin treatment in polycystic ovary, Obstet. Gynecol., 63: 6, 1984
- 14) Taymor, M. L., Sturgis, S. H., Goldstein, D. P. and Lieberman, B.: Introduction of ovulation with human postmenopausal gonadotropine, Fertil. Steril., 18: 181, 1967
- 15) 淵利雄, 石丸忠之, 黄宏駿, 増崎英明, 鮫島哲朗, 藤下晃, 山辺徹: HMG-HCG投与時の副作用発現因子に関する考察—家兎による実験的検討—, 臨産婦, 39: 895, 1985
- 16) 小山嵩夫, 鎌田周作, 久保田俊郎, 大原基弘, 市村三紀男, 齊藤幹: FSHとLH比を変えたhMG製剤の卵胞成熟, 排卵への効果について, 日産婦誌, 40: 445, 1988

**Changes of follicular stimulating
effects of hMG (Humegon[®])
associated with change
of LH content**

Takashi Kano

Kano Clinic, Osaka 542, Japan

The changes of effects of hMG (Humegon[®], Organon) associated with LH content were investigated in 17 cases undertook continuous treatment with Humegon 150I. U. (FSH: LH=3: 1) after treatment with Humegon 150I. U. (FSH: LH=1: 1) over at least 3 months. For assessment of follicular stimulating effects, serum estradiol level, maximal chief follicular diameter, maximal chief follicular

diameter plus minimal chief follicular diameter, and number of follicles (over 5mm and over 16mm) as the index of direct follicular functions were employed and endometrial thickness and volume of cervical mucous as the indirect index, and serum progesterone level as luteal function were employed. Ovulatory day was estimated from the last day low thermia in basal body temperature. Reduction of each index or declining tendency was noted in accordance with the change from 1: 1 preparations to 3: 1 preparations, but there was no statistical significant difference. No significant difference was noted on the last day of the low thermia in basal body temperature. Consequently, it was considered that there was no clinical difference on the follicular stimulating effect and the action inducing ovulation between the 1: 1 and 3: 1 preparations.

(受付: 1991年7月18日)

Buserelin acetate 投与中に突発性難聴型の 聴力障害を来した症例

Sudden Hearing-Loss Type of Auditory Disorder During Buserelin Acetate Administration, a Case Report

産業医科大学 産婦人科 (主任：岡村靖教授)

吉田 耕 治 草 野 秀 一 石 明 寛
Kohji YOSHIDA Shuichi KUSANO Meikan SEKI
岡 村 靖
Yasushi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Occupational
and Environmental Health, School of Medicine, Kitakyushu 807, Japan
(Director: Prof. Y. Okamura)

ブセレリンの神経系に対する副作用として耳鳴が起こることがあるとされているが難聴の報告はほとんどないようである。

患者は37歳の婦人で過多月経と腰痛を主訴に婦人科を受診し、子宮筋腫と子宮内膜症と診断され、ブセレリンの投与を開始した。ブセレリンの900 μ g/日を開始して11~12週頃に突然、右耳の緊張感と難聴が出現した。ブセレリンの服用を中止し、耳鼻科に入院、右耳の感音性難聴と診断された。入院後、デカドロン、メチコバル、ATP、ラシックスの点滴と、高圧酸素療法を13回施行したところ難聴は著明に改善された。頭部CTや平衡機能等には異常を認めなかった。

その後、患者は子宮全摘術を受けて婦人科的症状はほぼ消失し、耳鼻科的には、治療後半月頃まで時に軽い耳鳴をみる程度であった。ブセレリン投与と難聴との間の因果関係について文献的に考案した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 294-298, 1992)

はじめに

生来健康で耳の病気を経験したことのない人が、ある時何のきっかけもなく、突然一側の耳が聞こえなくなる病態を突発性難聴という⁵⁾。1975年の厚生省研究班の診断基準によれば突然発生した感音難聴で原因が不明であることとなっている³⁾。外国の報告では、Hunt症候群、ムンプス、中耳炎生内耳炎のように原因が確実なものや、糖尿病、梅毒、妊娠・産褥、白血病、聴神経腫瘍⁹⁾等のように原因が推定されるものも含めて突発性難聴として記述されているものもある^{3,12)}。

子宮内膜症に使用されるLH-RH agonist 剤であ

るブセレリンは精神・神経系に対しては、ときに目まい、耳鳴の副作用を起こすとされているが難聴を起こしたという報告はないようである^{2,10)}。因果関係があると断定はできないがブセレリン900 μ g/日を2カ月半程点鼻した時点で、突発性難聴型の感音難聴を来した症例を経験したので報告する¹⁰⁾。

症 例

患者：U. K. ██████████ 37歳女性、歯科衛生士。

主訴：右耳の突発性難聴、月経障害。

既往症：特記すべきことなし。

家族歴：父親が69歳の時、肺癌で死亡。母は糖尿病、

姉にメニエール病がある。未婚。

現病歴：1989年夏頃より仕事中に時折、身体が揺れるような感じがあったが数分で消失するため放置していた。過多月経、月経痛は32~33歳頃よりあって開業産婦人科で子宮筋腫に子宮内膜症が合併していると診断され、1985年頃にダナゾールを3カ月程内服したことがある。その後、特に積極的な治療はしていなかったが、1989年10月より、やはり過多月経、月経痛に対してブセレリンの投与を開始した。ブセレリン900 μ g/日を2カ月半程使用していた1990年1月5日の夜11時に、新聞を読んでいて一寸顔を上げた時突然右耳が聴こえないことに気付いた。その時、耳痛、耳漏や目まいはなかった。また発熱、感冒、その他の炎症もなく使用していた薬物はブセレリンのみであった。

に近くの開業耳鼻科を受診し、突発難聴の診断の下にビタミンB₁、B₆、B₁₂製剤、ペントキシフィリン、カルナクリン、 β -メサゾンの投与を受けた。難聴発現時にブセレリンは自己中止した。同耳鼻科医よりに産業医科大学耳鼻科を紹介されそのまま入院となった。

耳鼻咽喉科入院時現症：

局所所見と体格：耳・鼻・咽頭・喉頭部に特記すべき異常なし。身長151.5cm、体重62.5kg。

臨床検査成績：1月9日の血算で、白血球12,600(分類ではSeg. 93%, Lympho. 7%), 赤血球476万、ヘモグロビン14.3g/dl、ヘマトクリット42.6%, 血小板21.4万と白血球増多を認めた。肝機能検査ではGOT35, GPT45, アルカリフォスファターゼ11.4, γ -GTP146, 総コレステロール253とGOT以外は異常高値を示していた。血清蛋白質分画は正常パターン、血清梅毒反応は陰性、尿定性検査も異常はなかった。

平衡機能検査：Romberg徴候陰性、Blind folded vertical writing testは正常と異常のborderlineでやや左に偏倚傾向を示した。Eye tracking test, Optokinetic nystagmus test, Optokinetic pattern test, Pendular rotation testはすべて正常であった。聴力検査：表1と図1に、1月9日から26日までおよび退院後外来で行った純音オーディオメトリーの成績を示す。1月9日の入院時の検査では右耳の著明な難聴が明らかである。

Tympanogram検査：1月9日、1月26日、退院後の2月22日と3回行いすべて正常であったので本症例は感音性の難聴であることが明らかとなった。なお入院加療中の1月17日の頭部CT所見も正常であった。

入院後の治療経過：

表1 本患者の純音オーディオグラムの経過表

Air	(right year)							(left year)
	Jan. 9	12	16	23	26	Feb. 8	22	Jan. 9
125	70	60	55	15	20	15	10	15
250	90	75	60	20	20	15	15	20
500	75	75	65	20	20	20	15	20
800								
1000	65	70	50	30	15	10	10	15
1500								
2000	65	60	40	10	10	10	5	15
3000								
4000	65	50	25	20	20	20	20	15
6000								
8000	60	50	35	25	25	20	25	20
(Hz)							(dB)	(dB)
Bone								
250	55	55	45	10	5	15	10	15
500	65	60	50	10	15	15	15	15
1000	55	50	45	10	5	5	5	5
2000	55	55	40	5	5	10	5	5
4000	50	45	25	15	15	15	15	5
(Hz)							(dB)	(dB)

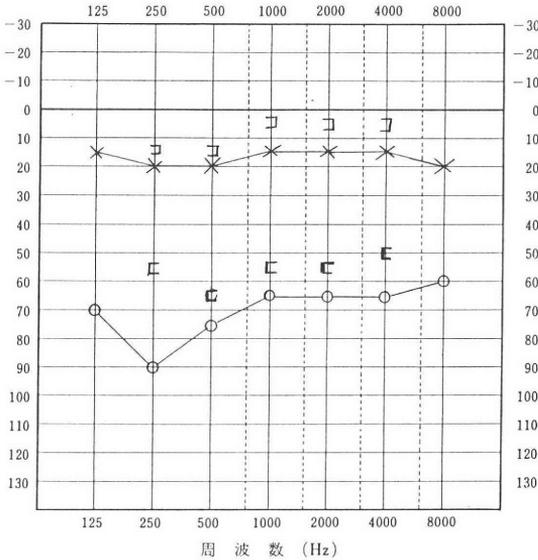


図1 耳鼻咽喉科入院時のオーディオグラム
 1990年1月9日耳鼻咽喉科入院時のオーディオグラム。
 右耳の強度の難聴が明らかである。
 ○：右耳の気道オーディオグラム、X：左耳の気道オーディオグラム。
 □：右耳の骨道、□：左耳の骨道オーディオグラム

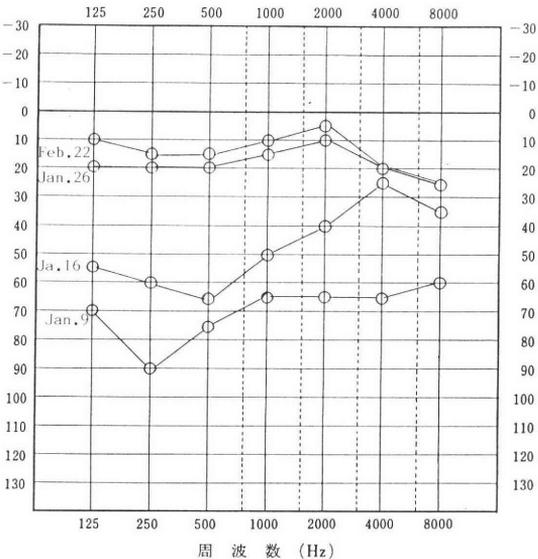


図2 右耳の気道オーディオグラムの変化
 右耳の気道オーディオグラムの改善を、1月9日の入院時より1月16日、26日、2月22日の変化で示す。高温域の回復がやや早い傾向を示し1月26日にはほとんど正常聴力に回復している。

入院後直ちに、ステロイド剤（デカドロン 6 mg）、ビタミンB₁₂剤（メチコバル）、ATP40mg、利尿剤（ラシックス 20 mg）を血漿代用剤入りの輸液剤（レオマクロテックス）に混合して点滴を開始し、デカドロンは漸減、ATPは漸増させていった。同時に1月10日から26日までの間に計13回高圧酸素療法（HBO）も行った。1月26日には図2の様に右耳の難聴はほぼ正常に回復したが時々起る軽い耳鳴は最後の外来診察日の1991年6月15日の時点でも残っていた。白血球数、GPT、アルカリフォスファターゼ、総コレステロール等の異常値は1月23日にはすべて正常化していた。1月27日に耳鼻咽喉科より退院。

産婦人科疾患（子宮内膜症）の経過：
 既に耳鼻科の現病歴の中でも述べたが、32～33歳頃、過多月経、月経痛、月経不順があり子宮内膜症の診断の下にダナゾールや子宮鎮痙剤の投与を受けていた。1989年10月頃からはブセレリンの投与を受けて上記の月経困難症状は抑制されていた。耳鼻科入院中の1991年1月11日に産業医科大学産婦人科を初診。内診で子宮は鶯卵大で表面に凸凹を認めた。超音波断層法で子宮の大きさは12.2×7.2 cm、表面は不整であったが付属器腫瘍は認めなかった。1月25日からはブセレリンの代わりにダナゾール 400 mg/日を6週間内服させた。その後婦人科に入院させ、3月9日に開腹、子宮全摘出術を行った。左側卵巢・卵管・腹膜が一塊となってダグラス窩は閉鎖しておりR-AFS分類で子宮内膜症 Stage IV (severe)であった。摘出子宮の病理組織所見から、子宮腺筋症と、漿膜面の子宮内膜症像が確認された。発症から5カ月後の1991年6月15日のウイルス性疾患の抗体検査値はムンプスのIgG-S (EIA)は964倍でIgM-C (EIA)は0.8未満の(-)であった。単純ヘルペス、麻疹、水痘は弱陽性、風疹、アデノウイルス、インフルエンザA、B、は陰性であった。

考案

本症例の難聴の発生様式・経過は厚生省の突発性難聴研究班の診断基準にはほぼ合致しているので突発性難聴型の聴力障害と言える。しかしながらブセレリンと因果関係があるならば難聴の原因が不明であることという診断基準からははずれるので突発性難聴の疑い例ということになる。

緒論でも述べたように、耳の病気を経験したことの無い人が誘因なく突然一側の耳が聞こえなくなる病態を突発性難聴という^{7,8,12)}。目まいの訴えを伴う場合もあるがメニエール病のように回転性の激しいも

のであることは少なく数分程度の軽いふらふら感であることが多い⁵⁾。年齢的には30歳より59歳までの壮年期に多く男女差はない。難聴は原則として一側性で高度で60dB以上である³⁾。内耳の病理組織学的検査の報告によればウイルス性内耳炎の所見に近いとされている⁷⁾。

本症例の症候は突発性難聴の特徴によく合っているが、ブセレリン投与開始前(?)と思われる1989年夏頃より仕事中に時々身体が揺れるような感じがあったが数分で消失していたという病歴は問題点の1つである。症候性の難聴⁹⁾の可能性を完全には否定できず、1990年1月9日入院時の血算で白血球増多が認められていた(但し分節核が93%でリンパ球は7%)。それから少し時間が経過してからの検査ではあるが、ウイルス学的スクリーニングでは単純ヘルペス、麻疹、ムンプス、水痘ウイルスの抗体価が軽度の上昇を示していた。症候性難聴と関係の深いとされるムンプスについては抗体価は新鮮な感染を示すものではなく、また本人と親の間診から幼児期に兄といっしょにムンプスに罹患したことがあることがわかった。その他の検査値の異常としてGPT, アルカリフォスファターゼ, γ -GTP, 総コレステロールの上昇は一過性で1月の耳鼻科退院時には消失していたので、同科入院前に開業医で処方されていたペントキシフィリン(トレンタール), カルナクリン, β -メサゾン(リンデロン)等の薬物の影響の方が疑わしいと思われる。

ブセレリンがもしも今回の難聴と因果関係があるとするれば、本薬剤が精神神経系に対して時に目まい・耳鳴の副作用を起し得るという点に注目したい²⁾。またブセレリンの投与法は点鼻であるので、投与される場所が中耳・内耳に近いという点も勘案する必要があろう。中耳腔内に抗生物質を点耳したり顔面神経のアルコールブロックの後に難聴が起こることがあるからである⁵⁾。

次に本例はブセレリンを2カ月半程使用してきており実際の測定はされていないが、血中の性ホルモン上ではhypogonadotropic hypogonadismの状態にあったと考えられる。産褥時にも突発性の難聴が起こることが報告されており⁴⁾、あるいは性ステロイドホルモンの急激な低下が難聴の誘因になり得るのかも知れない。同様の变化を起すダナゾール使用でも感音性難聴が起こったことを1984年にEnyeart, J. J.とPrice, W. A.が¹¹⁾、また1987年には濱田ら¹⁾が報告している。前者では¹¹⁾25歳の子宮内膜症の患者にダナゾール800mg/日を4カ月投与後に両耳に強度の感音性難聴が起こったが、ダナゾール⁹⁾投与を

中止して徐々に難聴は改善され、3カ月後にはほぼ正常に復している。濱田ら¹⁾の症例は28歳の子宮内膜症の患者にダナゾール400mg/日を24日内服させたところで耳鳴と難聴が起こっている。難聴は左耳の方が主体で、いずれも低音部の感音性難聴であったという。ダナゾール投与を中止して薬物療法を行い、3カ月後にはほぼ正常に回復したという。この2つの報告の発症は突発性難聴型ではないが、ブセレリン同様性ホルモンの強い揺さぶりが難聴と関係している可能性はあるだろう。製薬メーカーの調査によると²⁾とブセレリンによる耳鳴の報告は3例あり、その中の1例では難聴も併発したが、もともとブセレリン投与前より軽い難聴のあった患者で投薬は中止しないで症状は消失したとのことである。なお本患者の姉にメニエール病があり、家系的に平衡聴覚系に何等かの弱点があった可能性も否定はできない。(症例の耳鼻咽喉科的診療の情報を提供いただいた産業医科大学耳鼻科の金崎幹人氏に感謝する。)

文 献

- 1) 濱田和孝, 三好敏裕, 杉山正夫, 宮本一良: ダナゾール投与中に感音性難聴を来した1症例, エンドメトリオージス研究会会誌, 8: 163-166, 1987
- 2) ヘキストジャパンKK: スプレキュア(酢酸ブセレリン)薬品説明書, 東京, 1990
- 3) 神崎仁: 突発性難聴, モダンメディシン, 20(6): 24-29, 1991
- 4) 白岩俊雄: 耳鼻咽喉の症状, 難聴, 現代産科婦人科学体系6B, 婦人科症候学II, p 162, 中山書店, 東京, 1973
- 5) 立木孝: 新難聴の診断と治療, 中外医学社, 東京, 1986
- 6) 東京田辺製薬KK学術部: ボンゾール副作用等の調査報告書, 東京, 1989
- 7) 泰地秀信, 神崎仁: 突発性難聴の予後の回帰分析, 日耳鼻, 91: 1023, 1988
- 8) 柳田則之, 鈴木康之, 村橋けい子, 三宅弘: 突発性難聴 Scale out 症例の予後と病態, 耳鼻臨床, 75: 769, 1982
- 9) 横田淳一, 吉本裕, 吉野英夫, 太田聡, 小野美那: 嚥型で発症後, 著明な聴力改善をみた突発難聴型神経腫瘍例, 耳展, 34(1): 87, 1991
- 10) 吉田耕治, 草野秀一, 石明寛, 岡村靖, 金崎幹人: Buserelin acetate 服用中に難聴と耳鳴を来した一症例, 第3回 GnRH 研究会講演抄録集, p 28, 1991
- 11) Enyeart, J. J. and Price, W. A.: Bilateral sensorineural hearing loss from danazol therapy, a case report, J. Reproduct. Med., 29(5): 351, 1984
- 12) Jerger, S. and Jerger, J.: Sudden (idiopathic) sensorineural hearing loss. Auditory disorders, a manual for clinical evaluation, Little Brown

and Company, Boston, p153, 1981

**Sudden hearing-loss type of
auditory disorder during
buserelin acetate administration,
a case report**

Kohji Yoshida, Shuichi Kusano,
Meikan Seki and Yasushi Okamura

Department of Obstetrics and Gynecology,
University of Occupational and Environmental
Health,
School of Medicine, Kitakyushu 807, Japan
(Director: Prof. Y. Okamura)

It is said that Buserelin acetate has a side effect of tinnitus on the neural system, however, there have been no report of hearing loss during or after its administration. A thirty-seven year old woman,

complaining of hypermenorrhea and lumbago, started the intranasal administration of Buserelin ($900\mu\text{g}/\text{day}$) after diagnoses of uterine myoma and endometriosis. From eleven to twelve weeks later, the patient suddenly noticed tension and hearing loss at her right ear. The patient stopped taking the drug and was diagnosed as a sensorineural hearing loss after the admission to the Department of Oto-Rhino-Pharyngo-Laryngology.

The symptom of hearing loss almost disappeared after Dexamethasone, Vitamin B₁₂, ATP and Furosemide therapies and thirteen times of Hyperbaric-Oxygen treatment. Computed tomographic findings and balance function were normal from the beginning of admission. Gynecological complaints ceased after hysterectomy with slight and sometime tinnitus in half a month after discharge.

A correlation between Buserelin administration and hearing loss was discussed bibliographically.

(受付: 1991 年 9 月 18 日)

ステロイド合成による α -tocopherol および β -carotene の役割～ヒト黄体，ヒト胎盤での検討

The Roles of α -tocopherol and β -carotene in the Steroid-producing Cells with Emphasis on the Human Luteal Cells and Placental Chorion

滋賀医科大学産科学婦人科学教室 (主任：吉田吉信教授)

横江 保彦 竹中 章
Yasuhiko YOKOE Akira TAKENAKA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shiga University of Medical Science, Shiga 520-21, Japan

α -tocopherol (VE) および β -carotene (β -CA) は、free radicals に対応して生体内の過酸化防止に重要な役割を示すことが知られている。黄体中に多量に含まれるこれらの抗酸化物質の役割を検討するために、ヒト黄体中の VE および β -CA の変動を月経周期中の黄体活動期を通して検討した。さらに steroid 合成での役割を検討する目的で、ヒト胎盤の microsome を用いて testosterone から estradiol (E_2) への変換を行なう aromatization の過程で、VE および β -CA がどのような役割を果たすのかを in vitro で検討した。以下にその成績を示す。

1) ヒト黄体中の VE および β -CA は、黄体形成の初期から徐々に増加し、黄体期中期に最大となり、黄体退縮とともに後期に急減する curve を描いた。また同じ carotenoid である α -carotene および lycopene が黄体中に検出され、これらも同様の変動を示した。

2) ヒト胎盤 microsome を用いた aromatization の過程で、superoxide (O_2^-) の発生が見られることが明らかとなった。

3) aromatization の反応過程で、microsome 中の VE 量は、生成した E_2 量の増加に応じて減少したが、 β -CA に関しては減少は認められなかった。

以上のことから、VE および carotenoids はステロイド産生に伴って発生する O_2^- およびそのほかの free radical に対応して、細胞内 membrane system、特に microsome 膜を保護する役割を営むことが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 299-304, 1992)

緒 言

β -carotene (β -CA) および α -tocopherol (VE) は、代表的な抗酸化物質として知られている。ヒト黄体には、 β -CA や VE が多量に含まれているが¹⁾、その存在理由は明らかではない。ウシおよびブタの黄体細胞では、progesterone 産生と黄体中 β -CA 濃度に相関があることが報告され^{2,3)}、ステロイド合成に関与することが推測されるが、ヒト黄体での VE および β -CA のステロイド合成に対する役割は未知のま

までである。これらの抗酸化物質の役割を明らかにする一助として、ヒト黄体中の VE および β -CA が月経周期の黄体活動期間でどのように変動するかを調べた。さらにステロイド合成との関連を検討する目的で、ヒト胎盤 microsome を用いて estrogen 合成 (aromatization) の過程で superoxide (O_2^-) を検出し、さらにこれらの抗酸化物質の影響について検討したので報告する。

材料と方法

1. 黄体およびその処理

子宮単純全摘術を施行した子宮筋腫および子宮頸癌 0 期の正常月経周期の 34~44 歳の婦人 28 例から、開腹時その卵巣中の黄体のみ摘出した。さらに、少量付着する周囲卵巣組織より黄体を分離し、液体窒素中で凍結し、測定まで -80°C に保存した。また黄体は、術後摘出子宮内膜標本の日付診断で、子宮内膜分泌期初期・中期・末期のものに分けて検討に供した。なお、全例で黄体を実験目的で使用することを術前に説明し了解を得た。

2. 胎盤からの microsome 採取

aromatization と VE および β -CA の関係では、大量の microsome を必要とすることからヒト胎盤を用いて行なった。正常分娩例から得た妊娠 38 週から 39 週の胎盤は、血球成分を除去するために冷生理食塩水中で洗い、脱胎膜および羊膜を取り除いた絨毛組織を液体窒素中で凍結し、 -80°C に保存した。湿重量 4 g の絨毛組織を 3 倍量の 0.25 M ショ糖中で homogenize し、粗核および mitochondria 分画を取り除いた上清を、さらに $105,000 \times g$ (10 分間) で遠心分離し、得られた pellet を microsome として使用した。microsome は、0.25% triton X-100 を含む 50mM potassium phosphate buffer (PH 7.4, 1mM EDTA を含む) 3ml に懸濁したのち、aromatase 活性の反応に供した。なお、glucose-6-phosphatase 活性を用いた回収率は約 95% であった。

3. 測定機器

使用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、医理化社製 Model $\Sigma 871$ solvent delivery pump, $\Sigma 80$ injector, $\Sigma 875$ electrochemical detector を用い、定量は Σ CD-12 data processor を使用して、peak area より解析した。分離は、ナカライテスク社製の 5C-18AR packed analysis column (4.6mm i. d. \times 25cm, $5\mu\text{m}$) で行なった。また、spectrophotometer は、島津製作所製 UV-200S を用いた。

4. 試薬

HPLC grade の ethanol, hexane, methanol, dichloromethane および acetonitrile は、ナカライテスク社より購入した。lycopene (LP), α -carotene (α -CA), β -CA, glucose 6-phosphate (G6P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), testosterone (T), estradiol (E_2), epinephrine, cytochrome C および superoxide dismutase (SOD) は、Sigma 社製を購入し標準品の VE は、エーザイ社から提供を受けた。

5. ヒト黄体中 VE, LP, α -CA および β -CA の測定

方法

MacCrehan による HPLC 法を一部改変して測定した⁴⁾。黄体を、10 倍量の 0.25M sucrose で homogenize 後、その $100\mu\text{l}$ を採り ethanol (0.025% butyl hydroxytoluene (BHT) を含む) 0.5ml を加え 3 分浸漬、さらに hexane (0.025% BHT) 2.5ml を加え 3 分間浸漬し遠心分離した。その上層 2.0ml を N_2 gas で蒸発乾固させ、ethanol $200\mu\text{l}$ に溶解し、 $20\mu\text{l}$ を HPLC に注入した。carrier は、methanol: acetonitrile: chloroform (50: 45: 5 NaClO₄ 7.0g/l を含む) で、流量は 2.0ml/min. で行なった。

6. aromatization に伴う superoxide 発生の検出

2.5mM G6P, 0.25 unit G6PDH および $50\mu\text{M}$ の濃度の基質 T を含む 50mM potassium phosphate buffer (PH 7.4) の 1.0ml 中に、microsome (100-200 μg protein) 100ml を加え、さらに、epinephrine を最終濃度 $200\mu\text{M}$ または cytochrome C を $20\mu\text{M}$ のとなるように加え、 37°C で 5 分間静置した後、10mM NADPH $20\mu\text{l}$ を加え、epinephrine では、 $480\text{nm}^{5)}$ 、cytochrome C では $550\text{nm}^{6)}$ での吸光度変化を連続測定した。

7. aromatase 活性の測定および aromatization 反応による VE および β -CA 濃度の変化

aromatase 活性の測定には、Taniguchi らの方法を用いた⁷⁾。2.5mM G6P, 0.25 unit G6PDH, そして 10^{-8} ~ 10^{-5} M の T を含む 50mM potassium phosphate buffer (PH 7.4) 1.0ml に microsome (50-500 μg protein) $100\mu\text{l}$ を加え 5 分間 37°C で静置後、10mM NADPH $20\mu\text{l}$ を加え 37°C で 1 時間の incubation 後、生成した E_2 を dichloromethane 1.0ml で抽出し、HPLC で測定した。反応後の microsome は上に示した方法により、VE および β -CA の測定を行なった。

対照には estrogen に転換されない dihydrotestosterone (5α -androstano- 17β -ol-3-one) を基質として用い、 O_2^- の発生から見られないことを確認した。

結果

1. HPLC による VE, LP, α -CA および β -CA の分離

図 1 にヒト黄体抽出中の VE, LP, α -CA および β -CA の chromatograph を示す。retention time は、それぞれ 5.15, 8.36, 12.6 そして 13.4 分で明瞭に分離された。

2. ヒト黄体抽出中の VE, LP, α -CA および β -CA の濃度の変動

図 2-1 および図 2-2 に黄体中の VE, LP, α -CA

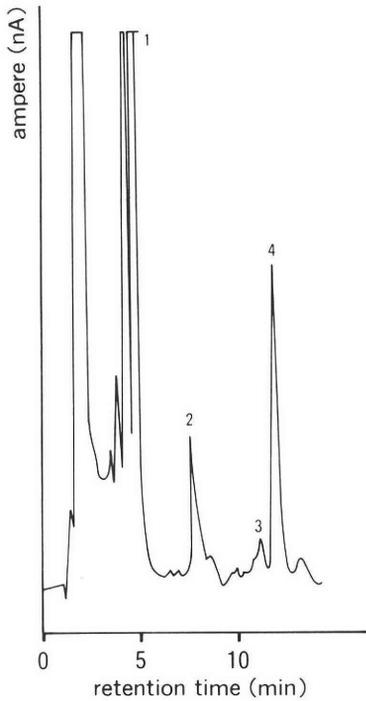


図 1 黄体中の VE, LP, α -CA および β -CA の chromatograph を示す. retention time は, それぞれ 5.15, 8.36, 12.6 そして 13.4min. で明瞭に分離された.

および β -CA 濃度の変動を示した. これらの抗酸化物質は, 黄体形成の初期から徐々に増加し, 黄体期中期に最大となり, 黄体の退縮とともに急減する curve を描いた.

3. 胎盤 microsome fraction における aromatase 活性と O_2^- の発生

O_2^- 発生の指標として epinephrine を用いた aromatization の反応で, epinephrine が O_2^- で酸化されて生じる adrenochrome が 480nm で検出された. また, この反応は O_2^- の scavenger である SOD 0.1m unit の添加により, 完全に抑制された (図 3) ことから, O_2^- の発生が明らかになった. また O_2^- 発生の指標として cytochrome C を用いた場合, O_2^- により還元され 550nm の吸光度の増加が見られ, かつ SOD 添加により反応は完全に抑制された (図 4).

4. 産生 estradiol 量と microsome 中 VE および β -CA の変化

上記の方法により, 胎盤 microsome 中で aromatization の反応を行なったところ, 基質 T 量 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M の間では, E_2 生成量は容量依存的に増加した (表 1). また, microsome 中の VE 濃度は, 添加した基質 T の容量に依存して有意に減少していた (図 5).

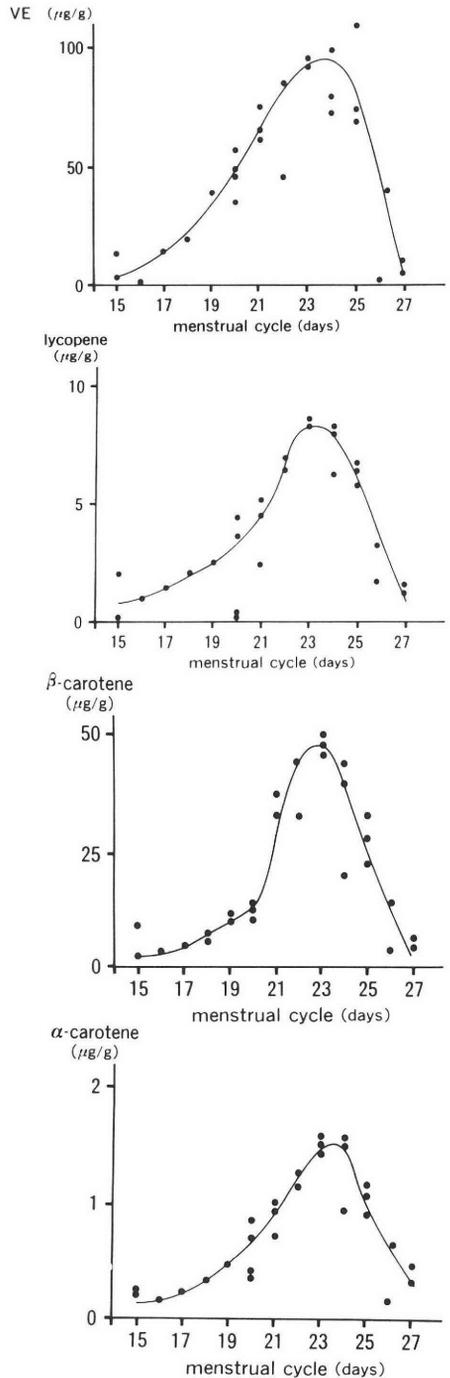


図 2 黄体活動期におけるヒト黄体中の抗酸化物質の変動

図 2 は VE および LP 濃度の変動と, 黄体中の β -CA および α -CA 濃度の変動を示す. これらは, すべて黄体期において, その形成の初期から徐々に増加し, 中期に最大となり, 後期には急減する curve を描いた.

この減少は生成 E_2 量の増加に応じて大きく (図 6), estrogen 合成に伴う O_2^- の発生により消費されたものと解釈された。

表 1 testosterone (T) と E_2 生成の関係

testosterone (M)	E_2 生産量 (pM) (means \pm S.E.)
10^{-8}	9.82 ± 1.70
10^{-7}	31.3 ± 3.52
10^{-6}	251 ± 12.8
10^{-5}	330 ± 25.1

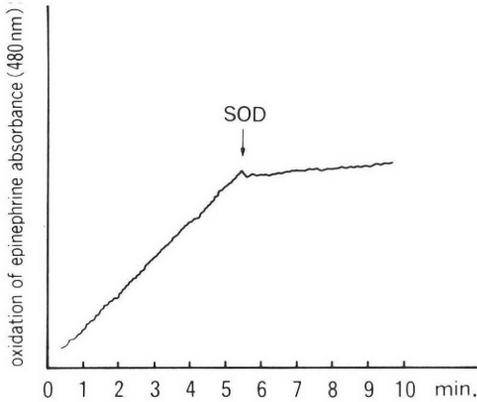


図 3 ヒト胎盤 microsome における aromatase 活性と O_2^- の発生

O_2^- 発生の指標として epinephrine を加えた系では, epinephrine が O_2^- で酸化されて生じる adrenochrome が, 480nm で検出された。また, この反応は O_2^- の scavenger である SOD の添加により完全に抑制された。

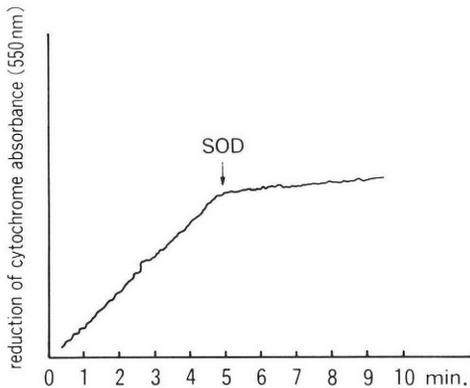


図 4 胎盤 microsome fraction における aromatase 活性と O_2^- の発生

O_2^- 発生の指標として cytochrome C を用いた場合, O_2^- により還元され 550nm の吸光度の増加が見られ, かつ SOD 添加により反応は完全に抑制された。

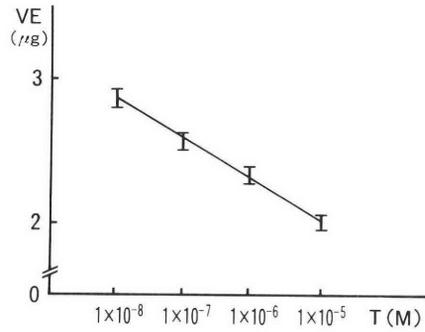


図 5 胎盤 microsome による aromatization 反応時の VE の減少

基質 T の添加量に応じて VE が減少した。

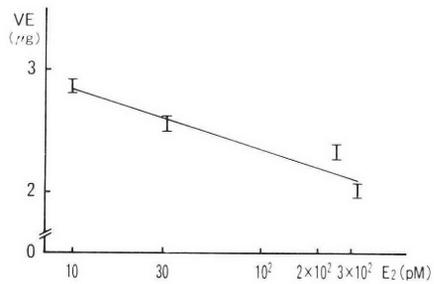


図 6 胎盤 microsome による aromatization 反応時の VE の減少

生成 E_2 量に応じて microsome 中 VE は減少した。

考 察

ヒト黄体中には VE および β -CA などの黄色物質が多く含まれていることは古くから報告が見られる¹⁾。VE, LP および β -CA は, ともに代表的な抗酸化物質であり, VE は O_2^- やそのほかの活性酸素分子種による脂質過酸化を防止し, 細胞膜や microsome 膜の保護に当たると考えられている^{8,9)}。また, β -CA は同じ活性酸素分子種である一重項酸素の消去¹⁰⁻¹²⁾、さらに, 過酸化脂質の除去¹³⁻¹⁵⁾の働きがある。しかし, これらの物質の役割は現在まで全く解明が見られておらず, ウシおよびブタの黄体細胞で β -CA 添加により progesterone 分泌が増加すること^{2,3)}から, 黄体中に取り込まれた β -CA が, ステロイド合成になんらかの役割を果たすことが示唆されているに過ぎず, VE の役割については全く不明のままである。

今回の検討でヒト黄体中の VE, LP, α -CA および β -CA の濃度は, 黄体期の発達とともに徐々に増加し, 黄体期中期に最大値をとり, そして後期には急減する特徴的な curve を描いた。この変動は, やや黄体期後期に偏位しているが, 黄体期における血中 progesterone

terone 濃度曲線に類似しており、やはりステロイド合成とこれらの抗酸化物質との関連が強く示唆される。

従来から、17 α および 21-hydroxylation によるステロイド分子の水酸化反応には、活性酸素が関与することが示唆されている¹⁶⁾。今回の検討では、aromatase による E₂ の生成にも、O₂⁻ が発生することが明らかとなった。ステロイド合成の rate limiting である、cholesterol side-chain cleavage には、aromatization と同様に分子状酸素、NADPH が必要とされ、同じく cytochrome P-450 による反応であることから、やはり O₂⁻ が発生することが考えられる。つまり性ステロイド合成反応にはその何段階かで活性酸素が深くかかわっているものと考えられる。

このように活性酸素が、ステロイド合成時に発生すれば、脂質を基本とする生体膜は当然過酸化を受け、細胞膜、microsome 膜および mitochondria 膜は過酸化刺激により細胞機能は大幅に障害されることになる。VE および β -CA などの抗酸化物質が黄体に大量存在することは、このような過酸化刺激による生体膜障害に対応した防御機構を示すものと解釈可能であろう。過排卵処理後ラット卵巣中の SOD 活性の急激な上昇¹⁷⁾ もこの解釈を強く支持する。この解釈は副腎・胎盤のほかのステロイド産生細胞にも適応可能であろう。

胎盤 microsome を用いた今回の in vitro の検討で aromatization の反応過程で VE が減少したことは、この解釈をさらに強く裏付けるものであろう。この意味で、VE は黄体細胞のみならずステロイド合成細胞の機能維持に不可欠な物質であろうと推定される。一方、 β -CA は今回の検討では aromatization の反応過程で明らかな減少を示さず、この反応との関わりは不明である。 β -CA は、あくまで一重項酸素の quenching agent であり、aromatization 時に一重項酸素の発生するか否かが不明である以上、 β -CA とステロイド合成との具体的な関わりを示すことは困難であろう。しかし、microsome 中にありステロイド合成時の水酸化反応を司る cytochrome P-450 cam は自動酸化されるときに、一重項酸素が生じて化学ルミネセンス現象がみられることが報告されており¹⁸⁾、aromatization 反応ではなくステロイド水酸化反応による一重項酸素発生に対応して microsome 膜などを保護する役割を持つとも考えられる。

以上のごとく、ヒト黄体でそのステロイド合成能に応じた抗酸化物質の変動が見られたことから示唆をえて、ステロイド合成時に活性酸素が発生することを明らかとし、VE などの抗酸化物質の存在が、

生体膜の過酸化刺激に対応した防御機構であることを示した。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、ご指導、ご校閲を賜りました産科学婦人科学教室吉田吉信教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Escher, H. H.: Über den Farbstoff des Corpus Luteum, Z. Physiol. Chem., 83: 198, 1913
- 2) Pethes, G., Horvath, E., Kulcsar, M., Huszenica, G. Y., Somorjai, G. Y., Varga, B. and Haraszti, J.: In vitro progesterone production of corpus luteum cells of cows fed low and high levels of betacarotene, Zentbl. Vet. Med. A., 32: 289, 1985
- 3) Talavera, F. and Chew, B. P.: Comparative role of retinol, retinoic acid and β -carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum in vitro, J. Reprod. Fert., 82: 611, 1988
- 4) MacCrehan, W. A. and Schonberger, E.: Determination of retinol, α -tocopherol, and β -carotene in serum by liquid chromatography with absorbance and electrochemical detection, Clin. Chem., 33: 1585, 1987
- 5) Misra, H. P. and Fridovich, I.: The role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, J. Biol. Chem., 247: 3170, 1972
- 6) McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), J. Biol. Chem., 244: 6049, 1969
- 7) Taniguchi, H., Feldmann, H. R., Kaufmann, M. and Pyerin, W.: Fast liquid chromatographic assay of androgen aromatase activity, Anal. Biochem., 181: 167, 1989
- 8) Kornbrust, D. J. and Mavis, R. D.: Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: Correlation with vitamin E content, Lipids, 15: 315, 1979
- 9) Ingold, K. U. and Burton, G. W.: Kinetic and mechanistic studies of vitamin E and some analogues in vitro and in vivo. In "Clinical and Nutritional Aspects of Vitamin E", ed by Hayaishi, O. and Mino, M. 15, Elsevier Science Publishers, 1987
- 10) Krinsky, N. I.: Carotenoid protection against oxidation, Pure and Appl. Chem., 51: 649, 1979
- 11) Foote, C. S. and Denny, R. W.: Chemistry of singlet oxygen VII. Quenching by β -carotene, J. Amer. Chem. Soc., 90: 6233, 1968
- 12) DiMascio, P., Kaiser, S. and Sies, H.: Lycopene as the most efficient Biological carotenoid

- singlet oxygen quencher, Arch. Biochem. Biophys., 274: 532, 1989
- 13) Burton, G. W. and Ignold, K. U.: β -Carotene; Unusual type of lipid antioxidant, Science, 224: 569, 1984
 - 14) Burton, G. W.: Antioxidant action of carotenoids, J. Nutr., 119: 109, 1989
 - 15) Vile, G. F. and Winterbourn, C. C.: Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by β -carotene, α -tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures, FEBS Lett., 238: 353, 1988
 - 16) Kumar, R. P., Ravindranath, S. D., Vaidyanathan, C. S. and Rao, N. A.: Mechanism of hydroxylation of aromatic compounds: Evidence for the involvement of superoxide anion in model system, Biochem. Biophys. Res. Commun., 48: 1049, 1972
 - 17) 須戸龍男: 排卵過程における過酸化脂質および free radical scavenger 活性の変動と scavenger enzymes による排卵阻害効果—過排卵処理幼若ラットにおける検討—, 日本不妊学会雑誌, 35: 349, 1990
 - 18) Sligar, S. G., Lipscomb, J. D., Debrunner, P. G. and Gunsalus, I. C.: Superoxide anion production by the autoxidation of cytochrome P450 cam, Biochem. Biophys. Res. Commun., 61: 290, 1974

The roles of α -tocopherol and β -carotene in the steroid-producing cells with emphasis on the human luteal cells and placental chorion

Yasuhiko Yokoe and Akira Takenaka

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shiga University of Medical Science, Ohtsu,
Shiga 520-21, Japan

α -tocopherol (VE) and carotenoids are known as anti-oxidative agents against free radicals. In order to examine the roles of VE and carotenoids, abundantly contained in the steroidogenic cells such as the human luteal cells, the levels of VE and β -carotene (β -CA) in the human corpus luteum were estimated during the period from early- to late-luteal phase using an HPLC system. VE, β -CA and α -carotene (α -CA) and lycopene were detectable in the human corpus luteum. The level of VE increased with the development of the corpus luteum, reaching the maximum in the mid-luteal phase. The level subsequently decreased with the regression of the luteal cells. α -, β -CA and lycopene showed the similar change as VE during the luteal phase. Then, VE and β -CA were examined in vitro whether these compounds have a role in the steroidogenesis using the human placental microsome. In the process of aromatization from testosterone to estradiol, it was demonstrated that placental microsome yielded superoxide radicals, which were detectable by employing cytochrome C and epinephrine as indicators of superoxide. Furthermore, VE concentration in the microsome dose-dependently decreased to the amount of estradiol produced by the placental microsome, but β -CA showed no significant change in the process of aromatization. Therefore, it was estimated that VE play a role in the protection of the microsome and other cytoplasmic membrane against superoxide radicals yielded by the microsomal aromatization. It has long been postulated that singlet oxygen participates in the hydroxylation of steroids, such as 17- α hydroxylation. Carotenoids may also play a role in the protection of cytoplasmic membrane against singlet oxygen generated by the steroid-hydroxylation. Anti-oxidants may be indispensable in maintaining the functions of the steroid-producing cells.

(受付: 1991 年 11 月 28 日特掲)

DNA ANALYSIS OF HEMOPHILIA A —A Trial to Establish the Optimum Strategy for Carrier and Prenatal Diagnosis in the Japanese Population—

Naoki TAKESHITA

First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University,
School of Medicine, Tokyo 143, Japan

Abstract: We examined the most effective strategy for the carrier and prenatal diagnosis of hemophilia A in the Japanese population using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) analysis. Five genomic probes were used for RFLPs analysis by Southern blotting, and PCR-RFLPs analysis was also performed for four regions. The diagnostic applicability increased as more probes or amplified regions were used and reached 100% when all nine tests were combined. Carrier status was determined in 6/7 subjects (86%) at risk for hemophilia A, by PCR-RFLPs analysis alone in four females and by Southern blotting analysis in two females. Prenatal diagnosis was performed in one family and the fetus was shown to be a female carrier by PCR-RFLPs at the 11th week of gestation.

Key Words: hemophilia A, RFLPs analysis, PCR-RFLPs, carrier diagnosis.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 305—315, 1992)

Introduction

Hemophilia A is an X-linked recessive disorder caused by a defect in coagulation factor VIII protein and is the most common of the congenital coagulation disorders¹⁾. Its frequency is one in 10,000 live male births and it is assumed that there are about 5,000 hemophilia A patients in Japan.

Patients frequently develop abnormal bruising during infancy as the first sign of the disease. The most characteristic symptom is intra-articular hemorrhage and recurrent hemorrhage may cause joint destruction with contracture formation. Intracranial hemorrhage is the most serious complication and may result in death. Since the cause of hemophilia A is a defect in coagulation protein synthesis based on the genetic mutation, there is no effective therapy available at present. Pallia-

tive therapy is performed by replacement of coagulation factor VIII, but there are several problems with this such as the formation of factor VIII inhibitor and the development of infections like hepatitis or the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Because hemophilia A is such a severe disease, mothers of affected children must seriously consider whether or not to have a second or third child, while other at-risk females in the family need to know their carrier status. Prenatal diagnosis, which determines the carrier status of the fetus, has important implications from the point of view of the genetic counseling when at-risk mothers become pregnant.

Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A have long been performed by measuring the activity of coagulation factor VIII (F VIII: C) and von Willebrand factor antigen

(vWF: Ag) levels by immunological methods. However, the reliability of these methods is limited since 30% of carriers show levels in the normal range²⁾. In prenatal diagnosis, the coagulation activity of fetal blood can be measured, but the usefulness of this procedure is limited since fetal blood sampling is only possible after 18 weeks of gestation³⁾.

With the rapid progress in the field of genetic technology in recent years, the factor VIII gene was localized to Xq28ter and was cloned in 1984^{4,5)}. This large and complex gene is 186 kbp in length, contains 26 exons, and codes for 2,332 amino acids. In 1985, Gitschier et al. reported the first analysis of hemophilia A restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) using intron 18 as a genomic DNA probe⁶⁾. Since then, analyses using other DNA fragments of the factor VIII gene or flanking segments have been carried out. Carrier detection and prenatal diagnosis have been performed by Southern blotting analysis, and reports of new PFLPs have increased⁷⁻¹⁰⁾.

The polymerase chain reaction (PCR) is able to amplify a specific target region of a DNA sequence in a short period time, and was developed by Saiki¹¹⁾. Carrier detection of hemophilia A by PCR-RFLPs analysis, in which the amplified DNA fragments are digested with restriction endonucleases, has been reported recently¹²⁾.

However, RFLPs analysis might vary in effectiveness between the Caucasian and Japanese populations, since RFLPs may differ in their fragment sizes or allele frequencies among the races. Data on RFLPs analysis using genomic probes is still inadequate for Japanese hemophilia A families and there are no reported observations on the efficacy of PCR-RFLPs analysis.

We performed RFLPs analysis by Southern blotting using genomic probes and also performed PCR-RFLPs analysis, with the aim of establishing the most efficient and reliable method for the carrier and prenatal diagnosis of hemophilia A in the Japanese population.

Materials and Methods

The allele frequencies of every RFLP were calculated for a total of 39 unrelated subjects (16

Japanese males and 23 Japanese females), and then the polymorphism information content (P. I. C.) and observed P. I. C. were calculated from these data. PFLPs analysis was performed on 7 families with hemophilia A (32 family members). Five of the families had hereditary disease with at least two hemophilia A patients, and the other two had sporadic hemophilia A with only one patient in the family pedigree. Prenatal diagnosis was performed in one case. Genomic DNA for analysis was extracted from peripheral white blood cells by the standard method¹³⁾.

RFLPs analysis by Southern blotting using genomic probes

We used a total of 5 genomic probes, which included three intragenic probes (exons 17-18, intron 22 and exon 26) and two extragenic probes (ST 14-1 and DX 13). We obtained these probes from the American Type Culture Collection (NIH) and the Genetics Institute, and amplified them by cloning with *E. coli* when necessary. Seven micrograms of DNA were digested with the appropriate restriction endonucleases and separated by electrophoresis on 1% agarose gel at 35 V for 12 hr. The gels were immersed in 0.25 N HCl for 15 min and then in 1.5 M NaCl-0.4 N NaOH for 30 min. DNA was then transferred for 3 hr from the gels to Hybond-N+nylon filters (Amersham, U. K.) by the Southern transfer method using 0.4 N NaOH transfer buffer. The filters were washed twice in 2×SSPE [0.36 M NaCl, 0.02 M NaH₂PO₄, (pH 7.7), 2 mM EDTA] for 5 min and dried in air. Prehybridization was done at 65°C for 3 hr with 5×SSPE, 5×Denhardt's, 1% SDS and 1% poly (A). The filters were hybridized overnight (12 hr) at 65°C with genomic probes labeled by random priming (Takara, Co. Ltd.) and with [α -³²P] dCTP. The filters were then washed twice at room temperature for 20 min and twice at 65°C for 15 min in 1×SSPE and 1% SDS. Autoradiography was performed by exposing the filters to Kodak X-OMAT AR films overnight at -80°C and RFLPs were analyzed.

PCR-RFLPs analysis

We investigated four regions by PCR-RFLPs analysis, i. e., intron 18a, intron 18b, exon 20, and intron 22. Primers were obtained from a commer-

cial laboratory outside. One hundred microliters of the total reaction mixture [1.0 μ g of template DNA, 1.5 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 \times reaction buffer, 50 pmol of each primer, and 2.5 U of Taq polymerase] was amplified for 30 cycles. Each cycle consisted of 1 min of denaturation at 94 $^{\circ}$ C, 1 min of annealing at 60 $^{\circ}$ C, and 1.5 min of elongation at 72 $^{\circ}$ C. Ten microliters of the amplified products were digested with the appropriate endonucleases, electrophoresed on 6% or 12% polyacrylamide gel (14 mA, 45 min), stained with ethidium bromide, and photographed with a polaroid camera for analysis. Figure 1 shows the approximate position of the factor VIII gene on the X chromosome together with the location of the DNA probes and the regions amplified by the PCR.

Prenatal diagnosis

At 11 weeks of gestation (from the last menstrual period), chorionic villi were obtained by transcervical chorionic villus sampling (CVS) under ultrasonic guidance. Fetal sex was determined by amplifying Y-specific repeat sequences of the DNA extracted directly from the villi, using a total reaction volume of 20 μ l and primers Y1.1 and Y1.2¹⁴⁾.

Results

RFLPs analysis by genomic probe

The allele frequencies were 0.76/0.24 (n=33, n being the number of X chromosomes studied) for exons 17-18, 0.39/0.61 (n=31) for intron 22, 0.84/0.16 (n=31) for exon 26, 0.03-0.54 (n=39) for ST 14-1, and 0.79/0.21 for DX 13. The P. I. C. for each probe (exons 17-18, intron 22, exon 26, ST14-1, and DX 13) was 36%, 48%, 27%, 75% and 33%, respectively. The observed P. I. C. for each probe was 38%, 48%, 28%, 72% and 31%, respectively. Table 1 summarizes the results. The diagnostic applicability of combinations of the probes was 68% when exons 17-18 and intron 22 were combined, 77% when exon 26 was added, and 94% when ST14-1 was combined with the other three probes. The total observed P. I. C. was raised to 96% when all five probes were combined (Table 3).

PCR-RFLPs analysis

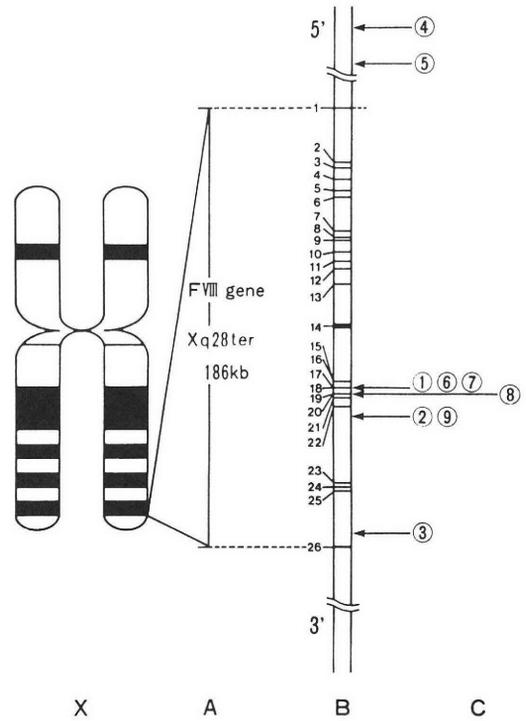


Fig. 1 Genomic map of the F VIII gene. The locus of the F VIII gene on the X chromosome is shown along with the approximate positions of the genomic probes and the regions amplified PCR. The F VIII gene is at the tip of the long arm of the X chromosome. X, X chromosome; A, F VIII gene (186 kbp) scale; B, Exons are represented by solid boxes. The F VIII gene has 26 exons. C, Number ①-⑤ show the five genomic probes and the four regions amplified by the PCR. ① exons 17-18, ② intron 22, ③ exon 26, ④ ST14-1, ⑤ DX13, ⑥ intron 18a ⑦ intron 18b, ⑧ exon 20, ⑨ intron 22.

The allele frequencies for each amplified region were 0.27/0.73 (n=30) for intron 18a, 0.32/0.68 (n=50) for intron 18b, 0.72/0.28 (n=61) for exon 20, and 0.84/0.16 (n=61) for intron 22. The P. I. C. was 39%, 44%, 40% and 26%, respective, and the observed P. I. C. was 39%, 43%, 38%, and 15%. The results of PCR analysis are listed in Table 2. The diagnostic applicability was 65% when introns 18a and 18b were combined, and reached 78% when exon 20 was also added. The total diagnostic applicability achieved 89% when intron 22 was added to the above three tests (Table 3).

Results of hemophilia A RFLPs analysis

When RFLPs analysis of seven families with hemophilia A was performed, polymorphisms

were detected in four families by PCR-RFLPs analysis. Two of the remaining three families had RFLPs detectable by Southern blotting, but the

Table 1 Allele frequencies and polymorphism information content of restriction fragment length polymorphisms obtained using genomic DNA probes.

a: Values in parentheses represent the number of independent chromosomes counted in individuals related by marriage and not genetically.

probe	restriction enzyme	symbol	allele size (kb)	allele frequency	P.I.C.	observed P.I.C.
exons 17-18	Bcl I	A 1	0.9	0.76	36	38
		A 2	1.2	0.24		
intron 22	Xba I & Kpn I	B 1	6.2	0.39	48	48
		B 2	4.8+1.4	0.61		
exon 26	Bgl I	C 1	5.0	0.84	27	28
		C 2	20.0	0.16		
ST14-1	Taq I	D 1	6.6	0.03	75	72
		~D 10	~3.4	~0.54		
DX13	Bgl II	E 1	2.8	0.79	33	31
		E 2	5.8	0.21		

Table 2 Allele frequencies and polymorphism information content of restriction fragment length polymorphisms obtained using PCR-RFLPs analysis.

a: Values in parentheses represent the number of independent chromosomes counted in individuals related by marriage and not genetically.

region	primer /restriction enzyme	DNA products (bp)	symbol & allele size (bp)	allele frequency	P.I.C.	observed P.I.C.
intron 18a	8.1	142	F1 142	0.27	39	39
	8.2		F2 99+43	0.73		
intron 18b	Bcl-A	948	G1 514+434	0.32	44	43
	Bcl-B		G2 514+286+148	0.68		
exon 20	20-1	730	H1 480+250	0.72	40	38
	20-2		H2 480+160+90	0.28		
intron 22	7.1	96	I 1 96	0.84	26	15
	7.10		I 2 68+28	0.16		

Table 3 Diagnostic applicability of the various combinations of Southern blotting and the PCR method for hemophilia A.

RFLPs	applicability (%)	
	P.I.C.	observed P.I.C.
1. Southern method		
exons 17-18	36	38
exons 17-18/intron 22	67	68
exons 17-18/intron 22/exon 26	77	77
exons 17-18/intron 22/exon 26/ST14-1	94	94
exons 17-18/intron 22/exon 26/ST14-1/DX13	96	96
2. PCR method		
intron 18a	39	39
intron 18a/intron 18b	66	65
intron 18a/intron 18b/exon 20	80	78
intron 18a/intron 18b/exon 20/intron 22	85	89
total	99	100

Table 4 Results of carrier diagnosis by RFLPs analysis in 7 females from 7 unrelated families.

total no. of families	no. of informative families		no. of noninformative families	
7 (100%)	6 (86%)		1 (14%)	
	PCR method	4	carrier*	2
			noncarrier	1
	Southern method	2	carrier	1

* Prenatal diagnosis was performed in 1 case and the fetus was shown to be a female carrier.

remaining family had no detectable RFLPs. Polymorphisms were detected in 6/7 families (86%), using these two methods with a total of nine RFLPs being found (Table 4). Among the three females from three families who underwent determination of carrier status, two were diagnosed as carriers and one as a noncarrier. Prenatal diagnosis showed that the fetus was a female carrier. Figures 2-4 show examples of RFLPs analysis.

Figure 2 shows a hereditary family with three hemophilia A patients in the pedigree. The mother (II-2) was heterozygous for intron 18a (F1/F2), intron 18b (G1/G2), and exon 20 (H1/H2) by PCR-RFLPs analysis, although she was homozygous for intron 22 (I1/I1). Since the patient (III-2) had a haplotype of H2, the genetic mutation was considered to be linked to the H2 fragment. The haplotype of the daughter (III-1) was H1/H1. She inherited a H1 allele from her mother and so was a noncarrier.

Figure 3 shows a hereditary family with two affected males in the pedigree. Polymorphisms

were detected in the mother (I-2) by PCR-RFLPs in three regions, i. e., intron 18a (F1/F2), intron 18b (G1/G2), and exon 20 (H1/H2). Her son (II-2) had hemophilia A and was hemizygous for exon 20 (H2), indicating that the genetic mutation was linked to the H2 fragment. Since the daughter (II-1) was heterozygous for H1/H2, she was considered to be a carrier.

Figure 4 shows a family that had three males affected with hereditary hemophilia A. The mother (II-2) was a definite carrier and her first son developed hemophilia. She visited us at 11 weeks of gestation for prenatal diagnosis. She was polymorphic for three regions in intron 18a, intron 18b, and exon 20 by PCR-RFLPs analysis. She was heterozygous for H1/H2, the father (II-1) was hemizygous for H2 and the affected child (III-1) was hemizygous for H1 in the family analysis of exon 20. Thus, the hemophilia A gene was presumably linked to the X chromosome marked by H1. The sex of the fetus (III-2) was determined to be female by amplification of the Y-specific repeat region with primers Y1.1 and Y1.2. The

fetus was heterozygous for exon 20 (H1/H2) and was considered to be a carrier, since she inherited

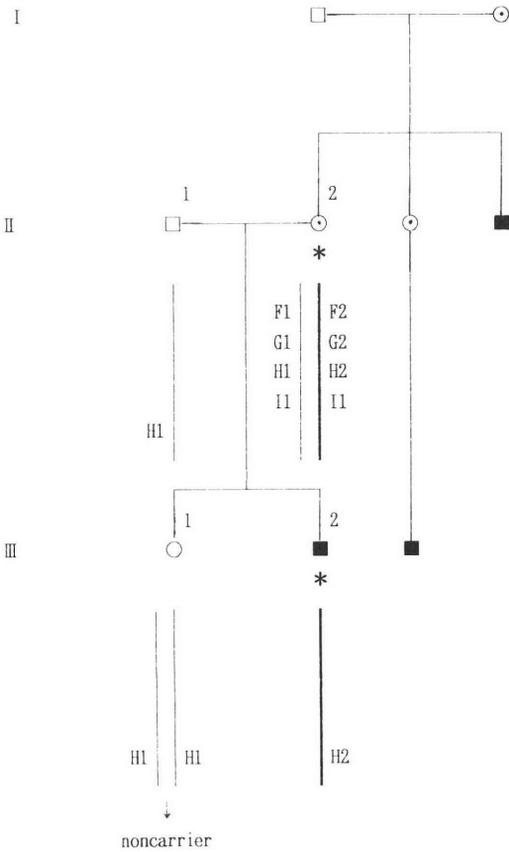


Fig. 2 A family with inherited hemophilia A informative for intron 18a, intron 18b, and exon 20. □, Males, ○, Females, ■, Hemophilia A, ⊙, Obligate carrier, *, The X chromosome carrying the hemophilia A locus. III-2 was shown to be H2 hemizygous for exon 20. The daughter (III-1) was diagnosed as a noncarrier because she did not possess the H2 allele.

the H1 allele from the mother which was also transmitted to the hemophilic child (III-1).

Discussion

We examined the efficacy of PFLPs analysis for carrier detection and the prenatal diagnosis of hemophilia A in the Japanese population using a total of nine RFLPs (five by Southern blotting and four PCR-RFLPs).

In Caucasians, ST14-1 had the highest observed P. I. C. of 80%, followed by DX 13, intron 22,

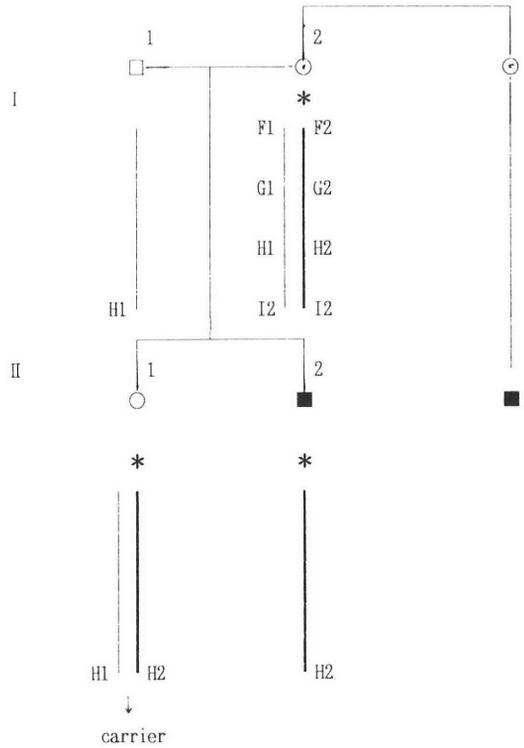


Fig. 3 A family with inherited hemophilia A informative for intron 18a, intron 18b, and exon 20. □, Males, ○, Females, ■, Hemophilia A, ⊙, Obligate carrier, *, The X chromosome carrying the hemophilia A locus. II-2 was shown to be H2 hemizygous for exon 20. The daughter (II-1) was diagnosed as a carrier because she had the H2 allele.

exone 17-18, and exon 26 (50%, 48%, 42%, and 18%, respectively)⁷⁻¹⁰. Suzuki et al. have reported that the observed P. I. C. for the Japanese population was the highest for ST14-1 (75%) followed by intron 22, exons 17-18, DX 13, and exon 26 (49%, 38%, and 17%, respectively)¹⁵. In the another report by Saito et al., the observed P. I. C. was 76% for ST14-1, and the values were 48%, 42%, 27%, and 16% for intron 22, exons 17-18, DX 13, and exon 26, respectively¹⁶. When comparing our results to these reports, the observed P. I. C. of 31% for DX 13 can be seen to be similar to other data on the Japanese population but lower than the value of 50% for Caucasians. Thus, DX 13 appears less useful in the Japanese population than in Caucasians. On the other hand, our obser-

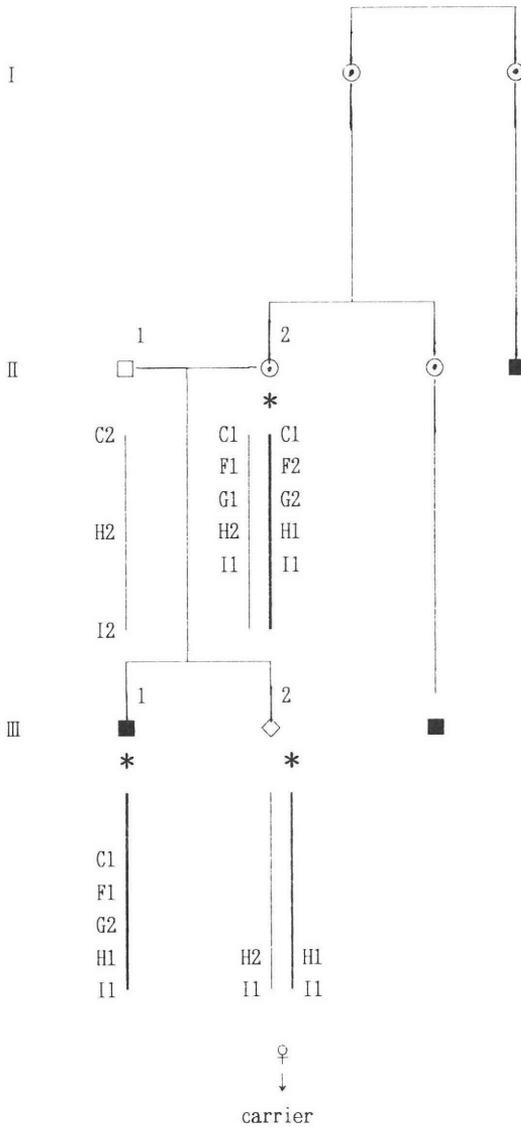


Fig. 4A Prenatal diagnosis in a family with inherited hemophilia A informative for intron 18a, intron 18b, and exon 20. □, Males, ○, Females, ■, Hemophilia A, ⊙, Obligate carrier. *, The X chromosome carrying the hemophilia A locus. The mother (II-2) was shown to have F1/F2, G1/G2, and H1/H2 alleles. The affected son (III-1) was H1 hemizygous. The fetus was determined to be female and H1/H2 heterozygous, so she was considered to be carrier.

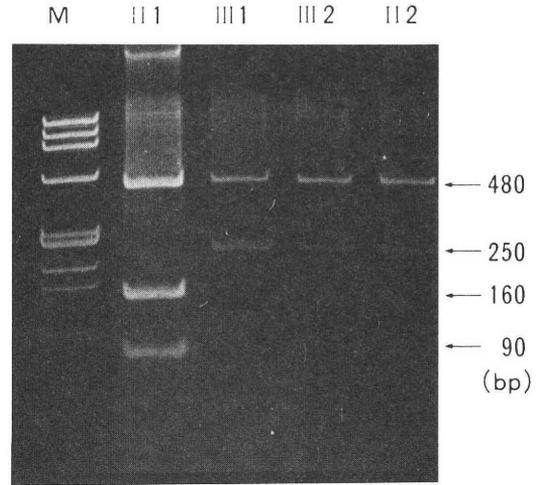


Fig. 4B Prenatal diagnosis in a family using PCR-RFLPs (exon 20). The lane numbers correspond to the pedigree numbers. M indicates the size markers produced by Hae III digestion Φ X174. Using the Hind III specific primers, a 730 bp DNA fragment was amplified. This fragment was cleaved by Hind III into a constant 480 bp fragment. In the presence of the polymorphic Hind III site, the 250 bp fragment provides a 160 bp fragment and a 90 bp fragment. The mother (II-2) was 480bp+250bp/480bp+160bp+90bp (H1/H2) heterozygous. Her son (III-1) had received the F VIII gene marked by the H1 fragment. The fetus (III-2) was female and received the F VIII gene marked by H1 fragment, so she was diagnosed as a carrier.

and the other reports of 17% and 16% for Japanese studies. The reason for this might be a difference in the number of chromosomes examined. However, the order of priority in the efficacy of each probe was same as in the other reports on Japanese subjects.

In the study of Duchenne muscular dystrophy, another X-linked recessive disease, RELPs with high P. I. C. and observed P. I. C. values were shown to be more effective and efficient for carrier detection and prenatal diagnosis in actual family analysis¹⁷⁾. In our analysis of hemophilia A families, RFLPs were detected in 3/4 families by PCR-RFLPs analysis. In them RFLPs were detected in all three regions (intron 18a, intron 18b, and exon 20) with relatively high P. I. C. and

ved P. I. C. for exon 26 was 28%, which was slightly higher than that of 18% for Caucasians

observed P. I. C. values, resembling the findings in Duchenne muscular dystrophy. Although polymorphisms were detected for intron 22 in the remaining one family (25%), the informative rate obtained with these polymorphisms might decrease with an increase of family numbers because both the P. I. C. and the observed P. I. C. were low. However, the polymorphism was detected in intron 22 only and not in other regions in this family. Thus, we may detect polymorphism in this intron when we cannot detect other polymorphisms (i. e., no linkage disequilibrium), possibly making RFLPs analysis of this intron worthwhile. However, we need to increase the number of analyses and observe whether there is linkage disequilibrium between intron 22 and other regions.

The total P. I. C. of RFLPs analysis by Southern blotting and that of PCR-RFLPs analysis was 96% and 85%, respectively, and the observed P. I. C. was 96% and 89%. When the two methods of RFLPs analysis were combined (a total of 9 tests), the total P. I. C. and the total observed P. I. C. were theoretically 99% and 100%, respectively. In actual family analysis, RFLPs were detected in 4/7 families by PCR-RFLPs analysis also, and in 2 out of the remaining 3 families by Southern blotting analysis of RFLPs. Since the diagnostic rate was raised to 86% (6/7 families close to the theoretical diagnostic value) when the two methods were combined, we can expect to improve the rate of diagnosis by using a combination of these two analyses.

Compared to Southern blotting, PCR-RFLP analysis is technically simpler, does not require the handling of radioactive materials, and can give results in a short time. Therefore, in the clinical setting analysis should be done first by PCR-RFLPs and then by Southern blotting if RFLPs are not detected. Especially in prenatal diagnosis, PCR-RFLPs analysis can amplify DNA from a small amount of fetal tissues, and thus has an advantage over Southern blotting analysis because the amount of fetal DNA obtained by biopsy is very limited.

One of the main advantages of RFLPs analysis is that it may detect spontaneous new mutations

in sporadic cases (30% of hemophilia A). This is a real advantage because if a hemophilia A patient turns out to be a spontaneous new mutation, anxiety about future pregnancies can be eliminated. However, in the present family analysis we could not confirm any spontaneous new mutations since male patients and normal brothers were not both available for investigation. Patients with hemophilia A sometimes die of their disease. Another advantage of RFLPs analysis is that we can perform carrier and prenatal diagnosis by assessing the X chromosomes of normal males in the family even in such cases.

The reliability of RFLPs analysis, which is an indirect diagnostic method, depends on the rate of recombination which occurs between the polymorphic regions and the actual factor VIII gene mutations. Recombination occurs at the rate of once per 1,000 kbp of genetic distance between homologous chromosomes at each meiosis¹⁸⁾. Since the factor VIII gene is 186 kbp long, the recombination rate of the intragenic probes (exons 17-18, intron 22, or exon 26) is considered to be less than 0.2%. The extragenic probes are reported to have a 9% recombination rate for DX13 and a 2-3% for ST14-1¹⁹⁾. We did not note any recombinations in the 13 meiotic events studied from the 7 families. However, Suzuki et al. reported a case with one recombinant who was diagnosed as normal by probe ST14-1 (normal value of 1.36 for F VIII: C/vWF: Ag) but as a carrier by DX13 and explained that recombination occurred at a point between the two probes. Thus, we need to carefully assess the possible occurrence of recombination in the carrier and prenatal diagnosis of hemophilia A. Combining intragenic and extragenic probes is an additional method for the detection of recombination. We also need to measure coagulation activity in clients and refer to its results as one supplementary method when making a diagnosis of carrier status.

A direct method for detecting the mutation in the factor VIII gene has been reported. Mutations in hemophilia A such as deletions, point mutations, and insertions have been found in 10% of the patients to date²⁰⁾. Point mutations were noted

in about 6% of the patients. However, we cannot detect all point mutations because those studies have been limited to the Taq I sites only, so-called hot spots, where such mutations are easily identifiable. Deletions were not detected in the 7 patients we studied. Deletions detected by the direct method have only been reported in 4% of these patients. Thus, the direct detection of muta-

tions in the base sequences of the factor VIII gene is not easy to perform because this is a large gene with various mutations within each family. Hence, the indirect method of RFLPs analysis appears to be the only practical method of carrier and prenatal diagnosis available currently.

Based on the observations mentioned above, we propose the following as the most efficient strat-

Carrier and prenatal diagnosis of hemophilia A using nine RFLPs with Southern and PCR methods

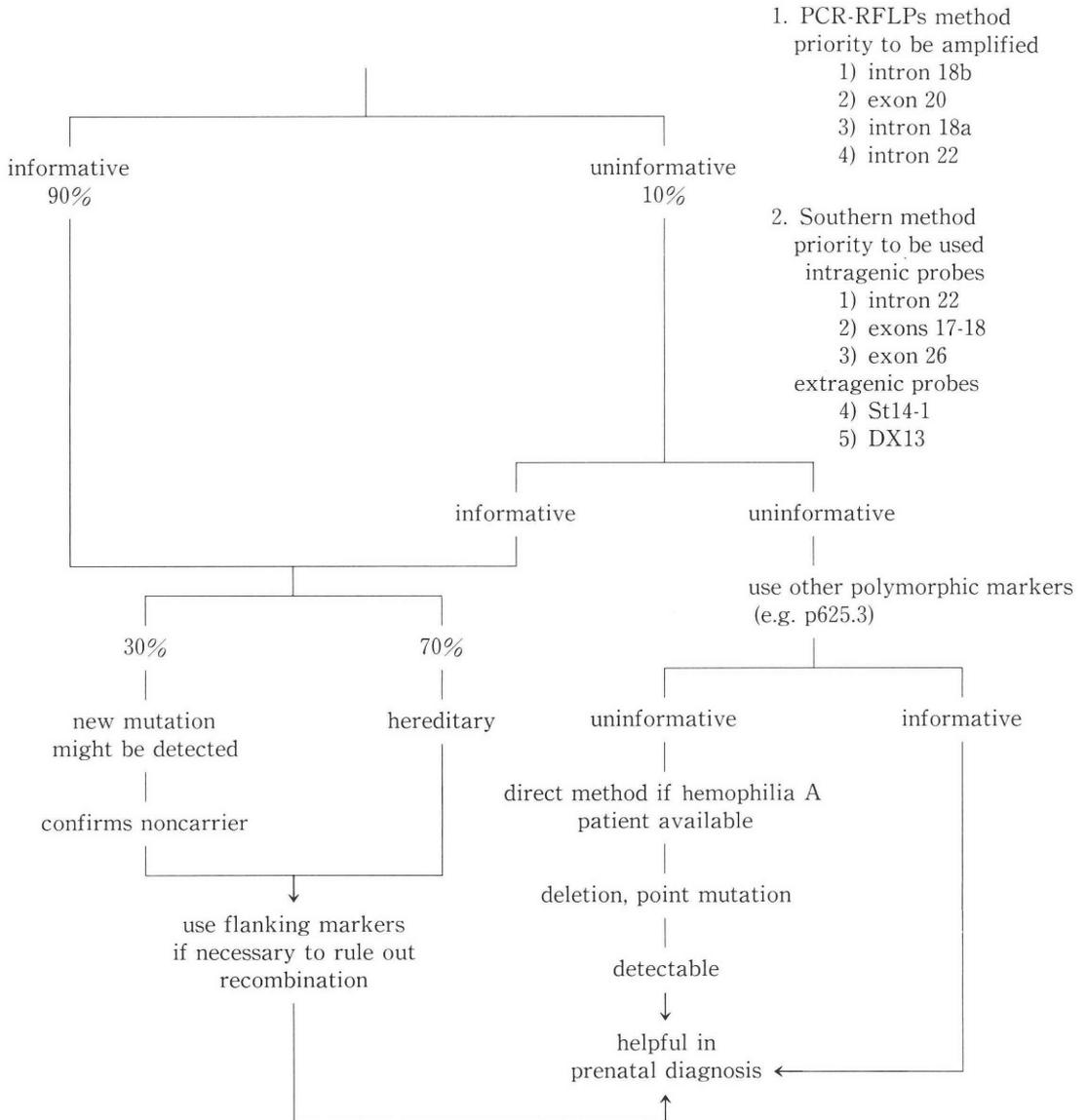


Fig. 5 Diagnostic algorithm for the detection of Japanese hemophilia A carriers.

egy for diagnosing carrier and prenatal status in Japanese hemophilia A families. As the total P. I. C. and the total observed P. I. C. were the same with both methods of analysis, PCR-RFLPs analysis should be used first, since it is technically simple, safe and rapid. The priority of the RFLPs tested should be in the order of 1) intron 18b, 2) exon 20, 3) intron 18a, and 4) intron 22. At this point, 90% of the clients will theoretically have shown at least one of the four RFLPs. When RFLPs cannot be detected by PCR-RFLPs analysis, Southern blotting should be used. Since the possibility of recombination between the extragenic probes and the factor VIII gene mutation is higher, intragenic probes with their lower recombination rate should be used first. The order of the genomic probes to be used is 1) intron 22, 2) exons 17-18, and 3) exon 26. If no RFLPs are detected, the extragenic probe ST 14-1 should be used and then DX 13 should be tried. At this point, almost 100% of the clients will theoretically have shown one of the RFLPs. Finally, where RFLPs are not detectable by these nine tests, the use of other flanking probes (e. g. p625. 3) or the direct sequencing method should be considered. This strategy is shown as a diagnostic algorithm in Figure 5.

Acknowledgments

We thank Professor K. Momose for his critical review of the manuscript, Dr. S. Katayama of First Department of Obstetrics and Gynecology for his guidance, Dr. Mukaiyama for providing access to patients under his care, and Mr. T. Ubagai of Department of Microbiology for his valuable suggestions and technical advice. This work was supported in part by a Grant for Project Research from Toho University School of Medicine (No. 2-6).

References

- 1) Tuddenham, E. G. D., ed.: Factor VIII and haemophilia A. Baillieres, Clin. Haematol., 2: 849, 1989
- 2) Graham, J. B., Rizza, C. R., Chediak, J., Mannucci, P. M., Briet, E., Ljung, R., Kasper, C. K., Essien, E. M., Green, P. P.: Carrier detection in hemophilia A: cooperative international study. I. The carrier phenotype, *Blood*, 67: 1554, 1986
- 3) Mibashan, R. S., Rodeck, C. H., Thumpston, J. K., Edwards, R. J., Singer, J. D., White, J. M., Campbell, S.: Plasma assay of fetal factor VIII C and IX for prenatal diagnosis of haemophilia., *Lancet*, 6: 1309, 1979
- 4) Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Vehar, G. A., Capon, D. J., Lawn, R. M.: Characterization of the human factor VIII gene, *Nature*, 312: 326, 1984
- 5) Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C. B., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N., Hewick, R. M.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor VIII, *Nature*, 312: 342, 1984
- 6) Gitschier, J., Drayna, D., Tuddenham, E. G. D., White, R. L., Lawn, R. M.: Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene, *Nature*, 314: 738, 1985
- 7) Antonarakis, S. E., Waber, P. G., Kittur, S. D., Patel, A. S., Kazazian, Jr. H. H., Mellis, M. A., Counts, R. B., Stamatoyannopoulos, G., Bowie, E. J. W., Fass, D. N., Pittman, D. D., Wozney, J. M., Toole, J. J.: Hemophilia A detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis, *N. Engl. J. Med.*, 313: 842, 1985
- 8) Drayna, D., Davis, K., Hartley, D., Mandel, J. L., Camerino, G., Williamson, R., White, R.: Genetic mapping of the human X chromosome by using restriction fragment length polymorphisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 2836, 1984
- 9) Wion, K. L., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M.: A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A, *Nucl. Acid. Res.*, 14: 4535, 1986
- 10) Oberle, I., Camerino, G., Heilig, R., Grunebaum, Cazenave, J. P., Crapanzano, C., Mannucci, P. M., Mandel, J. L.: Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe, *N. Engl. J. Med.*, 312: 682, 1985
- 11) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239: 487, 1988
- 12) Kogan, S. C., Doherty, M., Gitschier, J.: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences, *N. Engl. J. Med.*, 317: 985, 1987
- 13) Kunkel, L. M., Smith, K. D., Boyer, S. H.,

- Borgaonkar, D. S., Wachtel, S. S., Miller, O. J., Breg, W. R., Jones, Jr. H. W., Rary, J. M.: Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 1245, 1977
- 14) Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M., Nakagome, Y.: A human Y-chromosome-specific repeated DNA family (DYZ 1) consists of a tandem array of pentanucleotides, Nucl. Acid. Res., 14: 7569, 1986
- 15) Suzuki, N., Nagao, T., Nakahori, Y.: Carrier detection of hemophilia A in the Japanese population by use four intragenic and extragenic RFLPs, Jpn. J. Clin. Hematol., 29: 19, 1988
- 16) Suehiro, K., Tanimoto, M., Hamaguchi, M., Kojima, T., Takamatsu, J., Ogata, K., Kamiya, T., Saito, H.: Carrier detection in Japanese hemophilia A by use of three intragenic and two extragenic factor RIII DNA probes: A study of 24 kindred, J. Lab. Clin. Med., 112: 314, 1988
- 17) Ubagai, T., Katayama, S.: DNA analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using pERT87 genomic probes and dystrophin cDNA probes. Establishing the optimum strategy for carrier diagnosis in the Japanese population, Jpn. J. Human Genet., 36: 211, 1991
- 18) Renwick, J. H.: Progress in mapping human autosomes, Br. Med. Bull., 25: 65, 1969
- 19) Harper, K., Winter, R. M., Rembrely, M. E., Hartley, D., Davis, K. E., Tuddenham, E. G. D.: A clinically useful DNA probe closely linked to hemophilia A, Lancet, 2: 6, 1984
- 20) White, G. C., II., Shoemaker, C. B.: Factor VIII gene and hemophilia A, Blood, 73: 1, 1989

血友病 A の DNA 診断

東邦大学医学部第1産婦人科学教室

竹下直樹

日本人血友病Aの家系を対象とし、制限断片長多型(RFLPs)分析により、保因者診断および出生前診断を行う際に最も効率的な診断法の確立を試みた。

5種類の genomic probe と 4種類の PCR-RFLPs を用いて RFLPs 分析を行った。各 RFLPs 分析の組合せによる diagnostic applicability は、組合わせる数を増すと上昇し、9種類全てを組合わせると、理論的には100%となった。

7家系内の7名のクライアントを対象に保因者診断の行ったところ、PCR-RFLPs 単独で4名、サザン法による RFLPs で2名、合計6名86%で診断が可能であった。このうち1名は出生前診断例で、PCR-RFLPs で女兒の保因者と診断された。

(受付: 1991年11月25日, 特掲)

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES IN PATIENTS WITH HABITUAL ABORTION AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ASSOCIATED WITH FETAL LOSSES

Motomu ANDO, Yasunori YOSHIMURA, Akari YOSHINAGA
Norihiro KOYAMA, Yoshinobu UBUKATA, Shigetatsu SHIOKAWA
Hisaki OKAMIYA and Yukio NAKAMURA

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

Abstract: The frequency of positive anticardiolipin antibodies and the presence of lupus anticoagulant were investigated in patients with habitual abortion and systemic lupus erythematosus (SLE). Elevated levels of anticardiolipin antibodies of at least one immunoglobulin class were found in 16 of 44 patients with habitual abortion and 12 of 16 patients with SLE. The percentage of positive anticardiolipin antibodies in patients with SLE was significantly ($p < 0.02$) greater than that found in patients with habitual abortion. The mean IgG level of positive anticardiolipin antibodies in patients with SLE (38.0 ± 9.4 GPL units/ml) was significantly ($p < 0.05$) greater than that found in patients with habitual abortion (13.3 ± 0.5 GPL units/ml). The presence of lupus anticoagulants was observed in 7 patients (43.8%) with SLE and 8 patients (18.2%) with habitual abortion. Lupus anticoagulant was found in 12 of 21 patients with elevated IgG class antibody, while only 2 cases of 10 patients with elevated IgM class antibody had lupus anticoagulant. The mean value of IgG in patients with lupus anticoagulant was significantly ($p < 0.001$) higher than that of lupus anticoagulant negative groups. In conclusion, the anticardiolipin antibody and lupus anticoagulant may provide the means for identifying and classifying patients with antiphospholipid antibody syndrome, including habitual abortion.

Key words: Antiphospholipid antibody, habitual abortion, systemic lupus erythematosus, fetal loss, lupus anticoagulant.

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 37 (2), 316–322, 1992)

Introduction

The lupus anticoagulant is a spontaneously acquired inhibitor of blood coagulation that interferes with the activation of prothrombin by the activator complex^{1,2}. This inhibitor is present mostly in the plasma of patients with autoimmune disorders and has been associated with a high risk for pregnancy loss^{3,4}. The presence of lupus

anticoagulant recently has been implicated as an important clinical marker for patients with three or more unexplained abortions^{4,6}.

Recent studies have revealed a high incidence of repeated fetal loss in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and concomitant antibodies against negatively charged phospholipids, primarily cardiolipin^{5,7,8}. In contrast, many patients with recurrent fetal losses and anti-phos-

pholipid antibodies do not have SLE, and, in some, recurrent fetal loss is the only clinical complaint^{9,10}. Antibodies to cardiolipin also have been demonstrated in healthy control subjects. In these cases, however, the anticardiolipin antibodies seem to occur transiently whereas in patients with SLE, the production of these antibodies is constant and relatively independent of disease activity^{7,11}.

Recently, Harris et al. have developed a simple and highly sensitive double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring IgG and IgM anticardiolipin antibodies^{11,13}. We have investigated the occurrence of anticardiolipin antibodies in sera and the presence of lupus anticoagulant in plasma from 44 patients with habitual abortion and 16 patients with SLE.

Materials and Methods

Subjects

We studied serum and plasma samples from patients with habitual abortion, and SLE. Forty-four women who had experience of at least three consecutive abortions were studied retrospectively. All patients were considered to have primary habitual abortion, having three to six abortions and no live births. Clinical investigations, including genetic karyotyping of the couples, hysterosalpingography and/or hysteroscopy or laparotomy, and endocrine evaluation, had failed to reveal any cause for the abortions. Endometrial biopsies and midluteal progesterone levels were determined for luteal phase evaluation. Histocompatibility typing for both partners was performed for loci A, B, C, and D/DR and did not reveal excessive compatibility. One of the patients met any of the major or minor criteria for a systemic autoimmune disease. These women had experienced a total of 154 pregnancies. One hundred thirty-two (85.7%) pregnancies had resulted in the first-trimester miscarriages and 22 (14.3%) were second trimester abortions. No patient with habitual abortion was pregnant during the investigation. Sixteen patients with SLE fulfilled the revised American Rheumatism Association criteria for the classification of SLE.

Fourteen patients had experienced one or more spontaneous abortion or intra-uterine fetal death with a total of 26 fetal losses. The fetal losses had occurred at any time during the pregnancies; 14 in the first trimester, 8 in the second trimester and 4 in the third trimester. Blood samples for serum tests were obtained by venipuncture and collected into glass tubes without anticoagulant. The blood was allowed to clot at room temperature and then centrifuged at 180 g for 10 minutes to obtain serum. Blood samples for coagulation studies were obtained by venipuncture and collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate (0.129 mol/l). Platelet-poor plasma was obtained by two successive periods of centrifugation at 2000 g for 10 minutes at 4°C. Serum and plasma samples were stored at -70°C until analysis.

Serum samples from 104 normal controls (female, male) also were studied. These controls were selected from hospital and laboratory personnel; all were less than 55 years old, had no history of treponemal disease, recent viral, or other illness, and were not taking any drugs. All samples were investigated blind.

Assay of anticardiolipin antibody

Antibodies against cardiolipin as a target phospholipid were determined essentially as described by Harris et al.^{12,13}. We used the Anti-Cardiolipin Antibodies Assay Kit (Melisa) provided by Walker Laboratories Ltd. (Cambridgeshire, England). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgM binding to the cardiolipin was used with the modification that the standard curve was obtained with the use of appropriate dilution of standard sera provided by Dr. Harris which had known immunoglobulin subclasses as anticardiolipin antibodies. Results are calibrated against the standard curves in GPL unit/ml for IgG and in MPL unit/ml for IgM, respectively. One GPL unit and one MPL unit are defined as the cardiolipin binding activity of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of affinity purified IgG and IgM from standard sera, respectively. The highest dilutions were chosen to yield an optical density of 1.8 for IgG and 1.4 for IgM at 492 nm. These highest dilutions were assigned an arbitrary value of 10 units/ml for

IgG and 60 units/ml for IgM. Under these conditions, a linear curve was obtained for the Harris standard when plotted on a log-logarithmic probability scale. Control sera with normal, elevated IgG, and elevated IgM antibody levels and blank wells with no sera were measured during each assay. The mean and standard deviation (SD) for normal control subjects was established for both IgG and IgM class antibodies, and the mean + 3SD was used as the upper limit of normal. The upper limits of normal control subjects were 11.5 units/ml for IgG antibodies and 5.0 units/ml for IgM antibodies, respectively. The intraassay coefficient of variation (CV) were 6.0% for IgG antibodies and 5.2% for IgM antibodies, respectively. The interassay CV was 11.0% for IgG antibodies and 9.0% for IgM antibodies, respectively.

Elevated IgG and IgM antibody concentrations were divided into three groups according to the report¹³⁾ of an international workshop held April 4 1986: high positive—above 80 units/ml for IgG antibody and above 50 units/ml for IgM antibody; medium positive—between 15 and 80 units/ml for IgG antibody and between 13 and 50 units/ml for IgM antibody; low positive—below 15 units/ml for IgG antibody and below 13 units/ml for IgM.

Detection for lupus anticoagulants

The presence of lupus anticoagulants was detected by the inhibitory effect of the patients plasma on the clotting time of normal plasma, according to the method of Deutsch¹⁴⁾. The activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) were measured using American Dade Cephalin (Actin) and American Dade Thromboplastin, respectively, on an automated coagulation analyzer, Sysmex CA 4000, according to manufacturer's instructions. The both assays were performed on mixtures (0:100, 20:80, 50:50, 80:20, 100:0) of normal plasma with the patient's plasma either immediately or after incubation for two hours at 37°C. Clotting times were measured in duplicate. The normal range for APTT and PT were 28 to 38 seconds (mean ± 2SD) and 80 to 100%, respectively. The presence of the lupus anticoagulant was confirmed by the prolongation of APTT and/or PT

that were not corrected by the addition of normal plasma.

Statistical analysis

The levels of anticardiolipin antibodies are represented as the mean ± SE. Statistical differences were analyzed by Student's t test. Chi-square with Yates' correction was used to assess the incidence of elevated anticardiolipin antibodies levels. The level of significance was taken as $P < 0.05$.

Results

Elevated levels of anticardiolipin antibody of at least one immunoglobulin class were found in 16 of 44 patients with habitual abortion and 12 of 16 patients with SLE (Fig. 1). A greater percentage of SLE patients with elevated levels of anticardiolipin antibodies had IgG class antibodies. In patients with habitual abortion, IgM, IgG and mixed type of anticardiolipin antibodies were found in 7 (15.9%), 7 (15.9%), and 2 of 44 patients (4.5%), respectively. The percentage of positive anticardiolipin test for at least one immunoglobulin class in patients with SLE was significantly greater than that found in patients with habit-

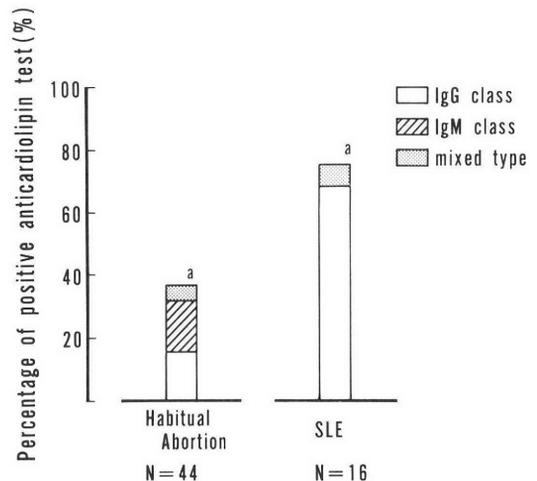


Fig. 1 Percentage of patients with habitual abortion or SLE with elevated levels of anticardiolipin antibody of at least one immunoglobulin class. Patients categorized as mixed type had elevated of both IgG and IgM antibodies. Groups with a like superscript are significantly different; $a = p < 0.02$.

ual abortion ($P < 0.02$).

Eight of 16 patients (50.0%) with SLE had serum levels of IgG anticardiolipin antibody that exceeded medium-positive levels (> 15 GPL units/ml), while a greater percentage of patients with habitual abortion who had elevated levels of IgG anticardiolipin antibody had values less than 14.9 GPL units (Table 1). IgM anticardiolipin antibody was found in only one patient (6.3%) with SLE (Table 2). Although nine of 44 patients (20.5%) with habitual abortion had elevated levels of IgM anticardiolipin antibody, all patients had serum low-positive levels less than 12.9 MPL units. The mean IgG level in anticardiolipin antibody-positive patients with SLE (38.0 ± 9.4 GPL units/ml) was significantly greater than that found in patients with habitual abortion (13.3 ± 0.5 GPL units/ml) ($P < 0.05$).

Lupus anticoagulant was present in 7 patients with SLE (43.8%) and 8 patients with habitual abortion (18.2%). The percentages of positive lupus anticoagulant in patients with elevated levels of anticardiolipin antibodies are summarized in Table 3. Although the positive rate of lupus anticoagulant in patients with elevated anticardiolipin antibodies was greater in SLE patients than in patients with habitual abortion, this difference was not significant. Lupus

anticoagulant was found in 12 of 21 patients with elevated IgG antibodies, while only 2 of 10 patients with elevated IgM antibodies had lupus anticoagulant. Two patients with habitual abortion who had lupus anticoagulant had normal levels of IgG and IgM anticardiolipin antibodies. All SLE patients with lupus anticoagulant had elevated levels of anticardiolipin antibodies. The mean IgG concentration in patients with lupus anticoagulant was significantly higher than in the lupus anticoagulant-negative group ($P < 0.001$) (Table 4). However, the mean IgM concentration in patients with lupus anticoagulant was comparable to that in patients without lupus anticoagulant.

Comment

The potential clinical significance of autoantibodies against complex lipid antigens in SLE patients has been increased by evidence that similar antibodies may be associated with recurrent fetal loss^{5,6,15}) and thrombocytopenia^{2,16}). The present study has demonstrated that the incidence of elevated anticardiolipin antibodies is increased in patients with three or more unexplained abortions as well as in SLE patients. Antiphospholipid antibodies found in the sera from patients whose only complaint was pregnancy loss were either

Table 1 Elevated IgG anticardiolipin antibody levels in patients with habitual abortion and SLE.

	No. of Subjects	IgG anticardiolipin antibody (GPL unit/ml)			
		No. of positive tests	Low-positive (11.5–14.9)	Medium-positive (15–79.9)	High-positive ($80 \leq$)
Habitual abortion	44	9 (20.5) ^a	8 (18.2)	1 (2.3)	0
SLE	16	12 (75.0)	4 (25.0)	5 (31.2)	3 (18.8)

^a Percentage of positive test in parenthesis.

Table 2 Elevated IgM anticardiolipin antibody levels in patients with habitual abortion and SLE.

	No. of subjects	IgM anticardiolipin antibody (MPL unit/ml)			
		No. of positive tests	Low-positive (5–12.9)	Medium-positive (13.0–49.9)	High-positive ($50 \leq$)
Habitual abortion	44	9 (20.5) ^a	9 (20.5)	0	0
SLE	16	1 (6.3)	0	1 (6.3)	0

^a Percentage of positive test in parenthesis.

Table 3 Percentage of positive lupus anticoagulant in patients with habitual abortion and SLE.

	Lupus anticoagulant	
	No. of positive tests	Percentage
Habitual abortion		
IgG class	4/7	57.1%
IgM class	1/7	14.3%
Mixed type	1/2	50.0%
SLE		
IgG class	7/11	63.6%
Mixed type	0/1	0%

Table 4 Mean levels of IgG and IgM anticardiolipin antibodies in patients with or without lupus anticoagulant.

	No. of subjects	IgG antibody (GPL unit/ml)	IgM antibody (MPL unit/ml)
Positive LA ^a	15	33.4 ± 9.3*	2.7 ± 0.8
Negative LA	45	8.6 ± 1.1	1.9 ± 0.3

a Lupus anticoagulant

* $P < 0.001$

IgM or IgG, while a greater percentage of patients with SLE had elevated IgG anticardiolipin antibody levels.

ELISA assays have the advantages of providing measurements which are as sensitive as radioimmunoassay without the hazards of radioactive materials. Since ELISA assays are specific for immunoglobulin binding, they directly measure the quantity of antibody capable of reacting with a specific antigen without interference by nonimmunoglobulin binding materials¹². However, the upper limit of normal above which an anticardiolipin antibody test is considered positive remains controversial, and laboratory values have from 2 to 5 standard deviations above the mean for healthy controls^{9,11-13}. Harris et al. have demonstrated that the distribution of anticardiolipin Antibody levels in a healthy population depends on assay conditions and the population studied: low-positive samples may be defined as "positive" in one laboratory and "negative" in another^{13,17}.

In an effort to standardize the ELISA assay, Harris et al. have created standards and units for the quantification of both IgG and IgM anticardiolipin antibody levels^{12,13}. In the present study,

the levels of anticardiolipin antibodies were low or moderately elevated in sera from women with habitual abortion. The half of the anticardiolipin antibodies in patients with habitual abortion were IgM. Our data are consistent with the findings of Gleicher et al. who have shown that patients with unexplained infertility and pregnancy wastage demonstrate a preponderance of IgM antiphospholipid antibody¹⁸. Although IgM activity was lower than that of IgG in the present study, the frequency of patients with elevated IgM concentrations was higher in habitual abortion than in SLE patients. These results suggest that an IgM fraction as well as an IgG antibody may be detrimental to the development and growth of the normal fetal-placental unit and may be implicated in repeated early pregnancy loss¹⁹.

Elevated levels of IgM anticardiolipin antibody appear to be distributed more widely than IgG anticardiolipin antibody and have been found in several diseases, including autoimmune, drug-induced and infectious disorders²⁰. In contrast, very high levels of IgG anticardiolipin antibody have been relatively restricted to patients with SLE patients with the antiphospholipid antibody syndrome²⁰. As expected, in the present study, patients with SLE demonstrated a preponderance of IgG anticardiolipin antibody. The outcome of the ELISA determination has been shown to be influenced by the presence of both IgM and IgG antibodies, which might be of different affinities and avidities¹⁰. Nonspecific binding also is a recognized problem in IgM antibody determination by ELISA. Since the current cohort was too small to permit conclusion, further studies are necessary to determine the clinical significance of elevated IgM antibodies levels in patients with habitual abortion.

Lupus anticoagulant is an autoantibody which was first described in patients with SLE^{1,2}. The lupus anticoagulant is an immunoglobulin, either IgG or IgM, that may act by inhibiting phospholipid activity in the clotting cascade²¹. The detection of lupus anticoagulant is based on its ability to prolong phospholipid-dependent coagulation tests. However, several inherent disadvantages have been demonstrated in coagulation as-

says for lupus anticoagulant¹¹⁾. The instability of certain coagulation factors precludes the testing of other than fresh samples, and the mechanics of the assays hinders the simultaneous determination in large numbers of samples¹¹⁾.

The presence of lupus anticoagulant usually is suspected when the APTT of a 1:1 mixture of patient and control plasma is prolonged and confirmed by characteristic findings in one or more additional coagulation assays. Unfortunately there is no international consensus as to the best assay to detect lupus anticoagulant. It is worth noting that a prolonged APTT with failure of normalization in a 1:1 mixture is not specific for lupus anticoagulant; other immunoglobulin inhibitors of coagulation including factor VIII inhibitors exist²²⁾. Fortunately, these factors are rare and usually occur in a characteristic clinical setting, such as in patients with a hemorrhagic diathesis. In our coagulation test, the presence of lupus anticoagulant is established by the findings of prolonged APTT and PT with failure of normalization in four different mixtures. Lupus anticoagulant was detected in more than 60% of patients with elevated levels of IgG anticardiolipin antibody. The degree of prolongation in the present clotting assays used to detect lupus anticoagulant correlated closely with the levels of IgG, but not IgM, antibody, as determined by ELISA.

The elevated levels of anticardiolipin antibodies usually are associated with lupus anticoagulant and lupus anticoagulant usually goes with anticardiolipin antibodies⁷⁾. Although growing evidence indicates that lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies have closely related specificities and probably are part of the same family of autoantibodies^{19,23,24)}, the exact relationship between the two has not been established yet. Harris et al. have demonstrated that if anticardiolipin antibodies include subpopulations of antiphospholipid antibodies with lupus anticoagulant activity, then standardization of the anticardiolipin antibodies test will be a better instrument for detecting and measuring antiphospholipid antibodies than the lupus anticoagulation test^{13,17,20)}. Significant variations in

the test used to detect the lupus anticoagulant may make standardization and reliable quantification difficult. However, the question of whether lupus anticoagulant or anticardiolipin antibody is superior as a predictor of fetal loss cannot be determined based on current data. At the present time, therefore, we agree with Scott et al. that all patients with history of repeated abortion should be tested by both a sensitive coagulation assay for the presence of lupus anticoagulant and an immunoassay for anticardiolipin antibody²²⁾.

In conclusion, both the incidence of a positive anticardiolipin test and the presence of lupus anticoagulant are increased in patients with habitual abortion as well as SLE. The present study demonstrates that anticardiolipin antibody and lupus anticoagulant may provide the means for identifying and classifying patients with antiphospholipid antibody syndrome, including habitual abortion. However, large, prospective, randomized, multicenter trials are needed to set normal and abnormal levels and to establish the clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with habitual abortion.

References

- 1) Conley, C. L., Hartman, R. C.: A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus, *J. Clin. Invest.*, 31: 612, 1952
- 2) Feinstein, D. I., Rappaport, S. I.: Acquired inhibitors of blood coagulation, *Prog. Hemost. Thromb.*, 1: 75, 1972
- 3) Nisson, I., Astedt, B., Hedner, V., Berezin, D.: Intrauterine death and circulating anticoagulant ('antithromboplastin'), *Acta. Med. Scand.*, 197: 153, 1975
- 4) Lubbe, W. F., Butler, W. S., Palmer, S. J., Liggins, G. C.: Lupus anticoagulant in pregnancy, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 91: 357, 1984
- 5) Branch, D. W., Scott, J. R., Kochenour, N., Hershgold, E.: Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant, *Engl. J. Med.*, 313: 1322, 1985
- 6) Lubbe, W. F., Liggins, G. C.: Lupus anticoagulant and pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 153: 322, 1985
- 7) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Boey, M. L., Patel, B. M., Mackworth-Young, C. G., Loizou, S.,

- Hughes, G. R. V.: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus, *Lancet*, 2: 1211, 1983
- 8) Lockshin, M. D., Druzin, M. L., Goei, S., Qamar, T., Magid, M. S., Jovanovic, L., Ferenc, M.: Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.*, 313: 152, 1985
- 9) Cowchock, S., Smith, J. B., Gocial, B.: Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 155: 1002, 1986
- 10) Unander, A. M., Norberg, R., Hahn, L., Arfors, L.: Anticardiolipin antibodies and complement in ninety-nine women with habitual abortion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 156: 114, 1987
- 11) Branch, D. W., Rote, N. S., Scott, J. R.: The demonstration of lupus anticoagulant by an enzyme-linked immunoadsorbent assay, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 155: 1002, 1986
- 12) Loizou, S., McCreary, J. D., Rudge, A. C., Reynolds, R., Boyle, C. C., Harris, E. N.: Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results, *Clin. Exp. Immunol.*, 62: 738, 1985
- 13) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Patel, S. P., Hughes, G. R. V.: Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986, *Clin. Exp. Immunol.*, 68: 215, 1987
- 14) Deutsch, E.: Über eine eigentümliche hämorrhagische diathese: Die Hemmkörperhamophilie, *Klin. Wochens.*, 28: 326, 1950
- 15) Firkin, B. G., Howard, N. A., Radford, N.: Possible relationship between the lupus inhibitor and recurrent abortion in young women, *Lancet*, 2: 366, 1980
- 16) Schleider, M. A., Nachman, R. L., Jaffe, E. A., Coleman, M.: A clinical study of the lupus anticoagulant, *Blood*, 48: 499, 1976
- 17) Harris, E. N., Hughes, G. R. V.: Standardizing the anti-cardiolipin antibody test, *Lancet*, 1: 277, 1987
- 18) Gleicher, N., El-Roeiy, A., Confino, E., Friberg, J.: Reproductive failure because of autoantibodies: unexplained infertility and pregnancy wastage, *Am. Obstet. Gynecol.*, 160: 1376, 1989
- 19) Gleicher, N., Friberg, J.: IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual aborters, *JAMA*, 253: 3278, 1985
- 20) Harris, E. N., Gharavi, A. E., Hughes, G. R. V.: Anti-phospholipid antibodies, *Clin. Rheum. Dis.*, 11: 591, 1985
- 21) Yin, E. T., Gaston, L. W.: Purification and kinetic studies on a circulating anticoagulant in a suspected case of lupus erythematosus, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 14: 88, 1965
- 22) Scott, J. R., Rote, N. S., Branch, D. W.: Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death, *Obstet. Gynecol.*, 70: 645, 1987
- 23) Thiagarajan, P., Shapiro, S. S., De Marco, L.: Monoclonal immunoglobulin M coagulation inhibitor with phospholipid specificity. Mechanism of a lupus anticoagulant, *J. Clin. Invest.*, 66: 397, 1980
- 24) Harris, E. N., Loizou, S., Englert, H., Derue, G., Chan, J. K., Gharavi, A. E., Hughes, G. R. V.: Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant, *Lancet*, 2: 1099, 1984

習慣流産及び SLE 患者における 抗リン脂質抗体の臨床的意義

杏林大学医学部産科婦人科学教室

安藤 索 吉村泰典 吉永明理

小山典宏 生方良延 塩川滋達

岡宮久明 中村幸雄

習慣流産 (HA) 44 例, SLE 患者 15 例の血清中 anticardiolipin (CL) 抗体を ELISA にて測定し, SLE や習慣流産における抗体価の意義について検討した。抗 CL 抗体の標準血清を使用することにより, IgG 抗体価は GPL unit/ml, IgM 抗体価は MPL unit/ml で表示した。また同時に lupus anticoagulant (LA) の有無も検討した。抗 CL 抗体陽性率は, HA 36.3% (16 例), SLE 75.0% (12 例) を示し, SLE で有意 ($P < 0.02$) に高率であった。抗体のタイプは, HA 陽性者の 56.2% が IgM 型を示していたのに対し, SLE では 1 例を除き全例 IgG 型であった。抗 CL 抗体陽性者の IgG 抗体価は, SLE 38.0 ± 9.4 GPL units/ml であり, HA (13.3 ± 0.52) に比し有意 ($P < 0.05$) に高値を示していた。LA は HA の IgG 抗 CL 抗体陽性者の 57.1%, IgM 陽性者の 20.0%, SLE の IgG 抗 CL 抗体陽性者の 63.3% にみられた。抗 CL 抗体及び LA の測定は, 習慣流産を含む抗リン脂質抗体症候群の管理に有用な可能性が示唆された。

(受付: 1991 年 8 月 9 日)

チョコレート嚢胞に対するエタノール注入療法の成績

Results of Ethanol Injection Therapy in Patients with Chocolate Cyst

市立秋田総合病院産婦人科

望月 修 成田 晶裕 斉藤 寛
Osamu MOCHIZUKI Masahiro NARITA Hiroshi SAITO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Akita City Hospital, Akita 010, Japan

チョコレート嚢胞9症例, 10嚢胞に対し, 経腔超音波ガイド下に嚢胞内容液の吸引およびエタノール固定を実施し, その予後について検討した。患者の平均年齢は31歳, 主訴は挙児希望が6例, 下腹部痛が3例であった。エタノールの固定時間は全例15分間とし, 固定量は平均39mlで穿刺時間は平均35分であった。固定後挙児希望の6例中4例に妊娠が成立した。3例は自然経過観察中に妊娠し, そのうちの1例は既に正常男児を出産した。現在他の2例も妊娠経過は順調である。残る1例は不妊原因として卵管因子も合併しており, 固定後に体外受精・胚移植法で妊娠が継続している。また下腹部痛の3例も固定後, 全例に症状の軽減ないし消失を認めた。副作用は急性アルコール中毒症状を3例に認めただけで, 極めて軽微であった。一方, 固定後の再発が2例(22%)に認められた。以上の成績からチョコレート嚢胞に対する経腔超音波下のエタノール固定は, 簡便な手技にて有効な成績が得られ, 有望な治療法と思われた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 323-326, 1992)

はじめに

最近の子宮内膜症の治療は, 従来の薬物および手術療法に加え, いくつかの新しい方法が導入され, 症例の個別化をはかることが可能となりつつある。例えば難治性の内膜症性不妊患者に対しては配偶子操作の実施により, ある程度の妊娠率を期待できることがわかってきた¹⁾。しかし, チョコレート嚢胞に対する薬物治療はあまり効果がなく, 日常臨床で頭の痛い問題である。これに対し, 最近では嚢胞内容液を吸引除去したのちに, エタノールを注入して固定する新たな治療法が目ざされている^{2,3)}。この報告を得て, 我々もエタノール^{2,3)}注入・固定療法を経腔超音波下に施行した9症例, 10嚢胞に対する治療成績につき検討を加え, 若干の知見を得たので報告する。

対象と方法

対象は1990年1月から12月までに当院で経験し

たチョコレート嚢胞9症例, 10嚢胞である。主訴は挙児希望が6例, 下腹部痛が3例であり, 患者の年齢は25-39歳, 平均31歳であった。未婚婦人が2例含まれており, その主訴は下腹部痛であった。

一方, 挙児希望の6例では, 全例エタノール固定前に腹腔鏡検査が施行されており, R-AFS分類はIII期4例, IV期2例であった。なおBeecham分類はII期3例, III期5例, IV期1例で, III期症例が大部分を占めていた(表1)。

固定方法は硬膜外麻酔にて, 経腔超音波ガイド下にPTC針(17ゲージ)を嚢胞に穿刺して行った。まず生理食塩水にて, くり返し嚢胞内を洗浄し, 内容液が清澄となったら吸引を終了して, 吸引容量の約70%のエタノールを注入した。なお吸引および注入には30mlのディスプレイ注射器を用い, エタノールは99.5%の滅菌無水アルコールを使用した。固定時間は全例15分間とし, 固定後エタノールの回収を十分に行うため, 吸引と同様に生理食塩水による洗浄をくり返し行なった(図1)。また悪性卵巣腫

表1 症例一覧

No.	症例	年齢(歳)	結 婚	妊 産	主 訴	R-AFS	Beecham
1	K. Y.	27	(+)	0 - 0	拳児希望	III	III
2	M. H.	25	(-)	1 - 0	下腹部痛	/	II
3	M. S.	30	(+)	0 - 0	拳児希望	III	III
4	K. A.	33	(+)	0 - 0	"	IV	IV
5	S. A.	35	(+)	0 - 0	"	III	III
6	R. O.	39	(+)	3 - 2	下腹部痛	/	II
7	J. M.	32	(+)	1 - 0	拳児希望	III	III
8	M. D.	26	(-)	0 - 0	下腹部痛	/	II
9	K. S.	28	(+)	0 - 0	拳児希望	IV	III

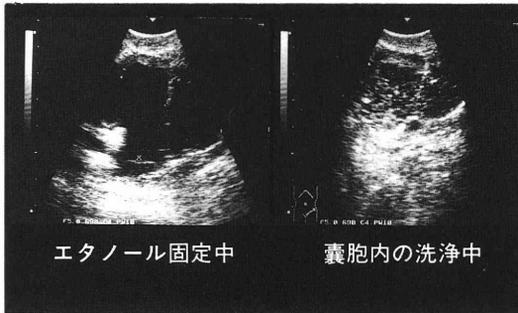


図1 エタノール注入療法の経膈超音波像

瘍との鑑別のため、吸引された嚢胞内容液の一部は遠心分離後、術中迅速細胞診の検査を行い、また固定前の血清 CA125 値のチェックをあわせて実施した。

成 績

内容液の吸引量は 21~141 ml (平均 58 ml) で、エタノールの固定量は 10~100 ml (平均 39 ml) であった。また平均穿刺時間は 35 分であった。なお超音波断層法による嚢胞サイズは平均 4.8×3.7 cm で、全例

がチョコレート色の内容液であった (表 2)。

固定前の血清 CA125 値は平均 37U/ml で、カット・オフ 35U/ml 以上を示したものが 4 例 (44%) 認められた。しかし、いずれも軽度上昇例で、その最高値も症例 9 の 56U/ml に過ぎなかった。これら異常高値を示した症例の術中迅速細胞診の結果は、未提出の症例 1 を除き、全て陰性であった。

エタノール固定後の予後を見ると、拳児希望の 6 例中 4 例に妊娠が成立した。一方、下腹部痛の軽減も 3 例すべてに認められたが、そのうちの 1 例は治療後 5 カ月にて、嚢胞の再増大を認めた。しかし、下腹部痛の消失は引き続き継続している。また拳児希望の症例 3 にも嚢胞の再増大が治療後 6 カ月目にあり、現在ダナゾールを投与中である。すなわち、9 例中 2 例、22% に再発を認めた。なお症例 9 は R-AFS 分類にて IV 期症例のため、エタノール固定に引き続いてダナゾールを投与中である (表 3)。

一方、不妊症例 6 例の妊娠の有無をもう少し詳しく検討してみると、症例 1, 5, 7 の 3 例に固定後の待期療法にて妊娠が成立した。

これらの妊娠までの周期をみてもみると、固定後 2,

表2 エタノール注入療法の成績

No.	症例	固定時間(分)	固 定 量 (ml)	吸 引 量 (ml)	穿刺時間(分)	嚢胞サイズ (cm)
1	K. Y.	15	10	21	33	3.3×2.4
2	M. H.	15	17	28	20	4.7×3.6
3	M. S.	15	50	61	25	7.2×5.1
4	K. A.	15	15	24	45	3.8×2.4
5	S. A.	15	60	85	35	6.3×4.3
6	R. O.	15	25	59	42	5.3×4.0
7	J. M.	15	28	35	23	4.2×4.0
8	M. D.	15	100	141	55	6.2×5.4
9	K. S.	15	30+15	39+26	36	3.2×3.4 3.4×2.6
平 均		15	39	58	35	4.8×3.7

4, 5周期となっており、いずれも比較的早期での妊娠例であった。このうちの症例1は、すでに妊娠39週にて経陰自然分娩で2750gの男児を出産しているが、児に異常は認めていない。また他の2例も現在、妊娠が継続中である。一方、症例4は固定後8カ月目にGnRH_a/hMG周期(short term法)下の経陰採卵にて3個の卵子が採取され、2個の分割卵の胚移植にて妊娠が成立し、やはり現在妊娠が継続中

い治療方法である。実際に卵巢表面の大部分が癒着により被覆されてしまうと、IVFの目的で卵巢刺激を行っても卵胞の発育が悪く、採卵のキャンセル率が有意に上昇することが知られている⁴⁾。そこで、より望ましい治療法として、腹腔鏡下にチョコレート嚢胞を処置する方法が登場した。初めてMettler⁵⁾らにより報告されて以来、技術の進歩により嚢胞の摘出まで可能となっている。また治療成績も腹腔鏡下

表3 CA125値, 細胞診および予後について

No.	症例	主 訴	R-AFS	CA125値(U/ml)	細 胞 診	予 後
1	K. Y.	拳児希望	III	44	/	妊娠・分娩
2	M. H.	下腹部痛	/	55	(I)	5ヵ月後再発
3	M. S.	拳児希望	III	19	/	6ヵ月後再発のため ダナゾール投与中
4	K. A.	"	IV	34	(II)	妊娠
5	S. A.	"	III	21	/	妊娠
6	R. O.	下腹部痛	/	28	(I)	疼痛軽減
7	J. M.	拳児希望	III	52	(II)	妊娠
8	M. D.	下腹部痛	/	28	(I)	疼痛軽減
9	K. S.	拳児希望	IV	56	(I)	ダナゾール投与中

表4 不妊症例の一覧

No.	症 例	年齢(歳)	不妊期間(年)	転 帰
①	K. Y.	27	2	固定後2周期で妊娠・出産(39週, 2750g, 男児)
3	M. S.	30	3	再発:ダナゾール投与中
④	K. A.	33	6	体外受精・胚移植にて妊娠
⑤	S. A.	35	6	固定後4周期で妊娠
⑦	J. M.	32	4	固定後5周期で妊娠
9	K. S.	28	2	ダナゾール投与中

(○印:妊娠症例)

である(表4)。

今回のエタノール固定による副作用としては、急性アルコール中毒が3例、33%に出現した。この他には固定中および固定後に問題となるような副作用はみられなかった。しかもこのアルコール中毒症状は、すべて翌日には完全に消失しており、特に治療を必要としなかった。

考 察

子宮内膜症の治療は、薬物療法と手術療法に二大別できる。しかし、チョコレート嚢胞を有する子宮内膜症では薬物がなかなか著効を示さないことは、臨床上しばしば経験される。そのため、このような難治性のチョコレート嚢胞に対する治療としては、これまで開腹ないし腹腔鏡下の手術が行われてきた。しかし、開腹手術は術後の二次癒着の原因となりやすく、特に不妊婦人においては、できるだけ避けた

手術の単独療法のみで、20例のうち12例、60%に妊娠が成立したとの報告もある⁶⁾。しかし、本法は全てのチョコレート嚢胞に実施できる訳ではなく、frozen pelvisの状態で卵巢が全く直視できない例には不可能である。

しかし、最近婦人科領域で試みられているエタノールの注入・固定療法^{2,3)}を用いると、かなりひどい癒着の症例にも応用が可能である。この方法は腎嚢胞や肝癌の治療として^{7,8)}、すでに他科では定着しており、有効な方法と言われている。チョコレート嚢胞の場合も、嚢胞の硬化・萎縮を目的として用いる訳であるが、経陰超音波ガイド下に行うことにより、簡便に実施が可能である。

我々も9例、10嚢胞全例に経陰超音波下の治療を行ったが、本法による重篤な副作用はみられず、急性アルコール中毒症状が、わずか3例に認められただけであった。しかし、エタノールが穿刺孔から漏

出して腹腔内に拡散する危険性をたえず考慮に入れ、注入時には吸引量の約 70 % 程度のエタノールをなるべくゆっくり注入すると同時に、超音波断層法でエタノールの漏出が実際に観察されない事を確かめる慎重が必要である。

今回、不妊症例の 6 例のうち 4 例に本法を施行後、妊娠が成立した。しかも 3 例は自然経過を観察している間、すなわち待期中に妊娠したものであった。また、固定から妊娠までの周期をみると、いずれも 6 カ月以内の早期であった。このことから、エタノール固定を実施した不妊症例では、少なくとも最低 6 カ月間は待期して、治療の効果を判定する必要があると思われる。残る 1 例は、固定後 8 カ月目に体外受精・胚移植を実施しているが、この症例は R-AFS 分類 IV 期のいわゆる frozen pelvis の状態で、卵管因子も不妊原因の一因であった。このためエタノール固定のみでは、妊娠が得られない症例と考えられた。しかし、体外受精にさきだち、卵巣刺激前に本法を行ってチョコレート嚢胞を縮小させておくことは、採卵の向上につながる可能性もあり、今後十分に検討する価値があろう。

一方、固定後の再発が 2 例、22 % あった。やはり再発も、固定後約 6 カ月と比較的早期に出現する傾向にあった。しかし本法は簡便な経膈超音波ガイド下に実施でき、不妊症例の 6 例中 3 例に、その後自然妊娠が成立したことや下腹部痛の軽減ないし消失が全例に認められたことを考慮すると、十分臨床的価値を有する方法と思われる。ただし本法の実施にあたっては、エタノールの腹腔内への漏出の防止と悪性卵巣腫瘍との鑑別が極めて大切である。

文 献

- 1) Medical Research International, The American Fertility Society Special Interest Group: In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1989 results from the IVF-ET Registry, *Fertil. Steril.*, 55: 14, 1991
- 2) 赤松信雄, 平井武, 正岡博, 林伸旨, 占部清, 関場香: Endometrial cyst に対する超音波ガイド下穿刺による内容液の吸引とエタノール注入, *エンドメトリオーシス研究会誌*, 9: 212, 1988
- 3) 山賀明弘, 上杉健哲, 田中尚武, 高野昇: Endometrial cyst に対する超音波ガイド下穿刺, 無水エタノール注入治療経験, *エンドメトリオーシス研究会誌*, 9: 218, 1988
- 4) Molly, D., Martin, M., Speirs, A., Lopata, A., Clarke, G., McBain, J., Ngu, A. and Johnston, I. H.: Performance of patients with a frozen pelvis in an vitro fertilization program, *Fertil. Steril.*, 47: 450, 1987
- 5) Mettler, L. and Semm, K.: Three step medical and surgical treatment of endometriosis, *Ir. J. Med. Sci.*, 152: 2, 1983
- 6) Reich, H. and McGlynn, F.: Treatment of ovarian endometriosis using laparoscopic surgical techniques, *J. Reprod. Med.*, 31: 577, 1986
- 7) Bean, W. J.: Renal cyst: Treatment with alcohol, *Radiology*, 138: 329, 1981
- 8) 小高通夫, 山本宏: 肝細胞癌のエタノール局所注入療法, *日本臨床*, 46: 167, 1988

Results of ethanol injection therapy in patients with chocolate cyst

Osamu Mochizuki, Masahiro Narita and Hiroshi Saito

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita City Hospital, Akita 010, Japan

Ten chocolate cysts in nine patients were treated with ethanol injections under transvaginal ultrasound guidance. The prognosis of patients was analyzed. The mean age of patients was 31 years. Six patients presented with infertility and three complained of pelvic pain. Ethanol fixation time was 15 minutes in all cases. The average amount of ethanol was 39ml and average operating time was 35 minutes.

In six infertile women, four pregnancies were established post-treatment. Three of them achieved pregnancy following ethanol injection procedure alone. One has already delivered live male infant. Other two pregnancies are ongoing. The remaining one patient had tubal infertility with ovarian endometriosis, so that she became pregnant after in vitro fertilization and embryo transfer treatment.

All patients with pelvic pain also reported improvement or resolution. Three of nine patients appeared acute alcoholism but its side effect of treatment was minimal. Otherwise, there were two recurrence (22%) of chocolate cyst after ethanol treatment.

These results indicated that ethanol injection using transvaginal ultrasound guidance was a simple and effective form of treatment of women with chocolate cyst.

(受付: 1991 年 7 月 29 日)

体外受精患者における抗透明帯抗体検査の意義

Examination of Anti-zona Pellucida Antibody in the Infertile Women who Underwent In Vitro Fertilization

秋田大学医学部産科婦人科学教室

児玉英也	加藤充弘	関根和子
Hideya KODAMA	Mitsuhiro KATO	Kazuko SEKINE
福田淳	松井俊彦	武田志保
Jun FUKUDA	Toshihiko MATSUI	Shiho TAKEDA
	真木正博	
	Masahiro MAKI	

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

体外受精を施行した189例の女性血清中の抗透明帯抗体について、その有無をブタ透明帯抗原で標識したウシ赤血球を用いた受身赤血球凝集反応 (passive hemagglutination reaction, PHAR) にてスクリーニングした。その結果、8例(4.2%)の陽性例を認め、陽性例の体外受精の成績を検討した。体外受精のinsemination mediumには10%非動化患者血清を添加していたが、陽性例全例に受精が成立しており、陽性例の平均受精率(受精卵数/採卵数)は $62.2 \pm 34.2\%$ で、同時期の卵管因子患者の平均受精率 $60.8 \pm 27.4\%$ と比較して有意な差は認められなかった。胚移植の結果、6例に妊娠が成立していた。Hemizona assayを応用して精子の透明帯結合抑制試験を行った結果、20%抗透明帯抗体陽性血清(強陽性例2例)中での透明帯結合精子数は 75.5 ± 11.1 個および 88.3 ± 22.1 個で、control血清の 78.4 ± 14.7 個と比べて有意差は認めなかった。今回の結果からは、実際の体外受精の治療において抗透明帯抗体が受精阻害の因子となっている可能性は、少ないものと考えられるが、従来のブタの抗原を用いた検出法そのものにも問題がある可能性が考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 327-331, 1992)

緒言

卵細胞の周囲を取り囲むゼリー状の物質である透明帯に対する抗体は、精子の透明帯への結合を抑制する場合があることが、動物実験で確認されている^{1,2)}。ヒトでは透明帯に対する免疫寛容は成立しておらず、何等かの原因で抗透明帯抗体が女性に産生された場合、それが不妊の原因となる可能性が推測されてきた^{3,4,5)}。近年体外受精の治療経験を通して、精子や卵子に明かな異常が存在せず、抗精子抗体も関与しない、原因不明の受精障害例が不妊患者の一部に存在することが明らかになってきた。この原因不明の受

精障害は、主にまだ解明されていない精子の機能異常に起因するものと想定されるが、中には抗透明帯抗体等の未知の免疫学的要因が原因となっている症例も存在する可能性がある。しかし、実際の体外受精の治療成績に、患者の抗透明帯抗体が影響を与えているのか否かを検討した報告は、これまで無かった。そこで、我々は、当科の体外受精患者に関して抗透明帯抗体のスクリーニングを行い、抗透明帯抗体の体外受精の治療成績への影響を分析することにした。

研究方法

1) 抗透明帯抗体のスクリーニング

1988年10月から1990年7月までの期間に当科で体外受精の対象患者となった189例について、患者血清中の抗透明帯抗体の有無をスクリーニングした。当科の体外受精の方法は、以前に報告した⁶⁾。抗体のスクリーニングには、Kamada et al.⁵⁾の報告によるブタ透明帯を用いた受身赤血球凝集反応 (passive hemagglutination reaction, PHAR) を用いた。以下その方法を簡単に述べる。

ブタ透明帯抗原は、Dunbar et al.⁷⁾の報告に基づいて抽出した。すなわち、秋田県食肉流通センターより提供された大量のブタ卵巣に、2 mM EDTA を含むリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS, pH7.2) を加えて、フードプロセッサーおよび剃刀の刃を用いてできるだけ細かく粉碎した。その懸濁液をガーゼで濾過した後、径200 μ m, 150 μ m, 75 μ mのメッシュで順に濾過した。75 μ mのメッシュ上に卵子は回収されるが、この状態では卵子はまだ不純物を多く含むので、さらにもう一度150 μ mのメッシュを通して75 μ mのメッシュで再回収した。回収された卵子は、3,000rpmで5分間遠心して沈渣とし、Bounce型ホモゲナイザーで軽くホモゲナイズしてそれを40 μ mのメッシュで濾過し、メッシュ上に透明帯のみを回収した。透明帯は蒸留水で透析した後、凍結乾燥して保存した。一度の処理には約100個の卵巣を処理し、約200個のブタ卵巣から350mgの透明帯乾燥品を得た。

PHARに使用する透明帯抗原標識赤血球は、以下のように作製した。透明帯乾燥品15mgを10mlの0.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) に懸濁し、60 $^{\circ}$ C・2時間で可溶性処理した。10,000 rpm 6分間遠心後上清を回収し、Sephadex G 200にてゲル濾過し、ピークの主要部分を回収した。回収液は、0.1 Mリン酸ナトリウム pH 7.2 に透析して、蛋白濃度10 μ g/mlに調整した。ウシ赤血球は、PBSで遠心洗浄して5%赤血球浮遊液とした後、等量の2.5%グルタルアルデヒド加PBSを加え室温で3時間反応させた。洗浄後、等量の0.01%タンニン酸加PBSを加えて37 $^{\circ}$ C 15分で反応させて洗浄した。次いで、等量の透明帯抗原を加えて、室温で2時間反応させた。洗浄後、1%BSAにて4 $^{\circ}$ C一晩 blocking し、翌日、新しい1%BSAを含むPBSで1%赤血球浮遊液として調整し使用した。

PHARは、以下の手順で行った。まずマイクロタイタープレート (Corning社, 96 well, round bottom

well diameter 6.4mm) を用いて、患者血清の希釈系列を2倍希釈から2⁸倍希釈まで、25 μ lづつPBSで倍々希釈しながら作製した。次いで、透明帯抗原標識赤血球25 μ lを加えて1時間精置した後、凝集の有無を判定した。沈降リングを形成せず凝集を認めた最大希釈濃度をその血清の抗体価とした。抗体価8倍以上を陽性と判定した。

2) Hemizona assay を応用した透明帯への精子結合抑制試験

本来、精子の透明帯の結合能力を評価する方法として考案されたhemizona assayを応用して、抗透明帯抗体陽性血清の精子の透明帯結合に対する影響を検討した^{8,9)}。抗透明帯抗体価が強陽性であった2検体、強力価の精子不動価抗体陽性血清2検体 (いづれもSI₅₀128倍以上) を被検血清とし、妊孕性の確認されている正常女性血清1検体をcontrolとした。体外受精の治療時に男性因子の存在により受精しなかった成熟卵を、患者の同意を得て実験に使用した。透明帯を実顕顕微鏡下に半切し、一方は20%の抗透明帯抗体陽性血清または精子不動価抗体陽性血清を含むPBS 200 μ lに、一方は20% control血清に投入した。各検体には、それぞれ3個づつの透明帯を投入した。その後、それぞれに妊孕性の確認された男性の精子を1 \times 10⁶/mlの濃度で添加し、4時間後に透明帯に強固に付着した精子数を倒立顕微鏡で算定した。

研究結果

1) 抗透明帯抗体スクリーニングの結果と、陽性例の体外受精の成績

189例のスクリーニングの結果、8例 (4.2%) の陽性例を認めた。この内2例は、抗体価256倍以上の強陽性例であった。陽性例8例の平均年齢は31.9歳、一例を除き原発性不妊で平均不妊期間は5.9年であった。体外受精の適応因子は、卵管因子4例、男性因子1例、子宮内膜症2例、原因不明1例であった (表2)。付属器に手術の既往がある例が4例存在した。

抗体陽性例8例の体外受精の成績を表2に示した。治療は合計15周期行われ、1周期当りの採卵数は平均5.2個で、同時期の体外受精の平均採卵数6.8個⁶⁾と比較するとやや少なかった。体外受精のinsemination mediumには10%非動化患者血清を添加していたが、受精率は平均62.2 \pm 34.2%で、同時期の純粋な卵管因子患者の体外受精の平均受精率60.8 \pm 27.4%と比較して有意な差は認められなかった。胚移植の結果、6例に妊娠が成立していた。

表1 受身赤血球凝集反応 (PHAR) の結果

不妊因子	例数	PHAR 陽性患者 (%)
卵管	72	4 (5.6)
男性	45	1 (2.2)
子宮内膜症	27	2 (7.4)
免疫性	11	0 (0.0)
不明	34	1 (2.9)
全体	189	8 (4.2)

抗透明帯抗体がヒトの不妊原因となる可能性が推測され、これまで不妊患者血清からは高頻度で抗透明帯抗体が検出されるとする報告がなされてきた^{3-5,10)}。スクリーニングの方法には、ヒト透明帯を大量に抽出することが不可能なことから、ヒト透明帯と共通抗原が多い¹¹⁾といわれるブタ透明帯が用いられてきた。検出方法としては、これまで間接蛍光抗体法^{1,3,4)}、PHAR⁵⁾および enzyme linked immunosorbent assay¹¹⁾の3つの方法が報告されてい

表2 抗透明帯抗体陽性患者のプロフィール

患者	年齢 (歳)	妊娠歴	不妊期間 (年)	適応	付属器の手術歴	PHAR	周期	採卵数	受精卵数	受精率	妊娠
K. K.	31	0	2	卵管	+	1:256	1	4	3	75%	-
							2	4	3	75	-
							3	4	1	25	単胎
Y. M.	32	0	5	卵管	+	1:8	1	4	3	75	-
							2	5	3	60	稽留流産
							3	2	2	100	-
T. S.	32	0	8	卵管	+	1:8	1	2	0	0	-
							2	4	4	100	-
J. M.	35	0	8	卵管	-	1:8	1	3	2	67	-
							2	4	3	75	稽留流産
C. K.	31	0	6	男性	-	1:8	1	19	4	21	双胎
S. Y.	29	0	3	内膜症	+	1:256	1	2	0	0	-
							2	1	1	100	単胎
R. K.	29	1	6	内膜症	-	1:8	1	15	12	80	単胎
M. T.	36	0	9	不明	-	1:8	1	5	4	80	-

受精率 = 受精卵数 / 採卵数 × 100

2) Hemizona assay の結果 (表3)

抗透明帯抗体陽性血清中の透明帯への結合精子数は 75.5 ± 11.1 個および 88.3 ± 22.1 % 個で、control 血清の 78.4 ± 14.7 個と比べて有意差はなかった。一方、精子不動化抗体陽性血清 2 検体での透明帯への精子の結合は 23.3 ± 5.1 および 16.7 ± 3.1 で、control 血清と比較して有意に (p < 0.01) 抑制された。

考 察

表3 透明帯結合抑制試験 (hemizona assay) の結果

	結合精子数 (個)	
正常女性血清 (control)	78.4 ± 14.7	
抗透明帯抗体陽性血清 1	75.0 ± 11.1	N.S.
抗透明帯抗体陽性血清 2	88.3 ± 22.1	N.S.
精子不動化抗体陽性血清 1	23.3 ± 5.1	p < 0.01
精子不動化抗体陽性血清 2	16.7 ± 3.1	p < 0.01

Mean ± S.D. N.S. : Not Significant

る。当科でこの3つの方法を行った結果、PHARが最も再現性、特異性に優れると考えられたことから、この方法で体外受精患者のスクリーニングを行った。その結果、体外受精患者の4.2%に陽性例を認めしたが、同様の方法で不妊患者のスクリーニングを行った Kamada et al.⁵⁾の88例中8例(9.1%)の陽性例が認められたとする報告より若干低率であった。今回の陽性8例中4例に付属器手術の既往、また2例に子宮内膜症性嚢胞の存在が認められ、手術や子宮内膜症による卵の物理的障害が抗体産生の誘因となる可能性が示唆された。さて問題は、この抗透明帯抗体が、実際に患者の受精成立を抑制する可能性があるかという点であるが、それに関しては現時点では否定的な見解しか得られていない。抗透明帯抗体陽性例の体外受精の成績を retrospective に検討した所、患者血清を insemination medium に添加しているにもかかわらず抗体陽性例でも全例に受精が成立しており、その受精率も正常であった。また、hem-

izona assay を応用した実験では、従来の報告⁹⁾通り不動態抗体陽性血清の精子透明帯結合の抑制作用は確認されたが、抗透明帯抗体陽性血清にはそのような作用は示されなかった。従って、受精阻害作用の存在が確認された抗精子抗体と同じように、抗透明帯抗体を受精障害の原因として位置づけるのは困難と考えられた。

実験的に作製されたある種の抗透明帯抗体に受精阻害作用が認められるのに、今回不妊患者より検出された抗透明帯抗体には受精阻害作用が認められない原因は、いくつか考えられる。最も大きな問題は、今回検出された抗体があくまでもブタ透明帯に対する抗体であり、ヒト透明帯とは反応しない抗体を検出している可能性があることである。この点について Kamada et al.⁵⁾は、PHAR で陽性であった 8 例中 4 例が、ヒト卵子を用いた間接蛍光抗体法でも陽性だったと報告している。一方、Nayudu et al.¹²⁾は、ブタ透明帯抗原を使用した蛍光抗体法で検出された抗体は、最終的にヒト透明帯とは結合しなかったと報告し、ブタ透明帯抗原を用いた方法に疑問を投げかけている。我々も、蛍光抗体法を検討したが、検査法そのものの特異性に疑問が残り、確信できる結果は得られなかった。また、かりに今回ヒト透明帯抗原と反応する抗体を検出していたとしても、抗体の対応抗原には多様性があることから、その抗体が必ずしも受精阻害作用を有するものではないものと考えられる。Isojima et al.²⁾は、ブタ透明帯に対する 5 種類の monoclonal antibodies を作製したが、その中で受精阻害作用が強く認められたのは 2 種類だけだったと報告している。

以上の検討からは、実際の体外受精の治療において抗透明帯抗体が受精阻害の因子となっている可能性は、少ないものと考えられる。しかし、上述のように従来のブタの抗原を用いた抗透明帯抗体の検出法そのものが、実際にヒトの受精阻害に働く抗体を検出するには問題がある可能性も大きい。著者らは、実際に抗透明帯抗体による不妊が存在するのか否かについても再検討の時期に来ており、この問題は原点にかえて議論する必要があると考えている。今後、この分野の発展には、ヒト透明帯に反応する抗体を特異的に検出する方法、できればヒトの受精を阻害する抗体を特異的に検出する方法を開発するのが急務と考えられる。

本論文の要旨は、平成 3 年度第 8 回受精着床学会(四日市市)で発表した。尚、実験に協力していただいた吉岡知巳先生に深謝致します。

文 献

- 1) Shivers, C. A., Dudkiewicz, A. B., Franklin, L. E. and Fussel, E. N.: Inhibition of sperm-egg interaction by specific antibody, *Science*, 178: 1211, 1984
- 2) Isojima, S., Koyama, K., Hasegawa, A., Tsunoda, Y. and Hanada, A.: Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigen and their inhibitory effects on fertilization, *J. Reprod. Immunol.*, 6: 77, 1984
- 3) Shivers, C. A., and Dunbar, B. S.: Autoantibodies to zona pellucida; A possible cause for infertility in women, *Science*, 197: 1082, 1977
- 4) Nishimoto, T., Mori, T., Yamada, I. and Nishimura, T.: Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women, *Fertil. Steril.*, 34: 552, 1980
- 5) Kamada, M., Hasebe, H., Irahara, M., Kinoshita, T., Naka, O. and Mori, T.: Detection of anti-zona pellucida activities in human sera by the passive hemagglutination reaction, *Fertil. Steril.*, 41: 901, 1984
- 6) Kodama, H., Kato, M., Kazuko, S., Matsui, T., Takeda, S. and Maki, M.: Efficacy of a gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for in vitro fertilization, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 36: 389, 1991
- 7) Dunbar, B. S., Wardrip, N. L. and Hedrick, J. L.: Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes, *Biochemistry*, 19: 356, 1980
- 8) Oehninger, S., Burkman, L. J., Coddington, C. C., Acosta, A. A., Scott, R., Hodgen, G. D. and Franken, D. A.: Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome, *Fertil. Steril.*, 51: 665, 1989
- 9) Shibahara, H., Shigeta, M., Koyama, K., Burkman, L. J., Alexander, N. J. and Isojima, S.: Inhibition of sperm-zona pellucida tight binding by sperm immobilization antibodies as assessed by the hemizona assay, *Acta Obst. Gynaec. Jap.*, 43: 237, 1991
- 10) Singh, J. and Mhaskar, A. M.: Enzyme-linked immunosorbent determination of autoantibodies to zona pellucida as a possible cause of infertility in women, *J. Immunol. Methods*, 79: 133, 1985
- 11) Sacco, A. G.: Antigenic cross-reactivity between human and pig zona pellucida, *Biol. Reprod.*, 14: 354, 1976
- 12) Nayudu, P. L., Freemann, L. E. and Trounson,

A. O.: Zona pellucida antibodies in human sera,
J. Reprod. Fertil., 65: 77, 1982

**Examination of anti-zona pellucida
antibody in the infertile women who
underwent in vitro fertilization**

Hideya Kodama, Mitsuhiro Kato,
Kazuko Sekine, Jun Fukuda,
Toshihiko Matsui, Shiho Takeda
and Masahiro Maki

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

Anti-zona pellucida (AZP) activities in sera from
infertile women who underwent in vitro fertiliza-
tion (IVF) treatment were determined by passive

hemagglutination reaction using bovine eryth-
rocyte coated with purified porcine zona pellucida.
Eight of 189 women (4.2%) gave positive reaction,
and the results of IVF in the eight women were
retrospectively investigated. Although 10% patient
serum was added in insemination medium, fertiliza-
tion occurred in each of them, and the average of
fertilization rate in these women was not signifi-
cantly different from that in women with tubal
infertility. Six of them conceived after embryo
transfer. The spermatozoa exposed to the serum
with high level of AZP activity were not inhibited
in their ability to bind to human ZP as assessed by
the hemizona assay. Therefore, as far as we
examined, AZP antibodies seem to have no clinical
significance as a causal factor in blocking fertiliza-
tion in human IVF treatment. The assay using
porcine zona pellucida might be difficult to detect
AZP antibodies, which specifically inhibit fertiliza-
tion in human IVF.

(受付: 1991年9月1日)

体外受精・胚移植による妊娠例における 採卵法の意義に関する検討

A Study on Significance of The Ovum Collection Method in Pregnancies Due to In Vitro Fertilization and Embryo Transfer (IVF・ET)

大阪医科大学産科婦人科学教室

宮崎 和典	奥田 弘賢	金子 卓嗣
Kazunori MIYAZAKI	Hiroataka OKUDA	Takuzi KANEKO
太田 栄	鈴木 佳彦	杉山 修成
Sakae OOTA	Yoshihiko SUZUKI	Shusei SUGIYAMA
	杉本 修	
	Osamu SUGIMOTO	

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka Medical College, Osaka 569, Japan

体外受精・胚移植において妊娠の成立に及ぼす採卵法の意義を検討する目的で、腹腔鏡下穿刺法、超音波下経膀胱穿刺法、経膈穿刺法の採卵成績や採卵時間につき比較した。また採卵手技が実際に妊娠の成立に直接関与するかどうかを知るために、経膈法例において妊娠群と非妊娠群の採卵成績を比べ、乏精子症例、経子宮穿刺例の採卵成績を検討した。三方法の回収卵数は、それぞれ 3.8 ± 2.1 、 2.8 ± 1.7 、 4.3 ± 2.4 個であり、卵胞当りの採卵率は 74.6、78.9、85.1% と経膈法で最も良好であった。回収卵 1 個当りの採卵時間は、それぞれ 34.9 ± 26.5 、 29.3 ± 22.3 、 11.7 ± 12.2 分とやはり経膈法が最短であった。経膈法における非妊娠群の採卵率、移植胚数は $81.9 \pm 23.3\%$ 、 2.2 ± 1.7 個であったのに対し、妊娠群では $90.0 \pm 15.9\%$ 、 3.3 ± 2.2 個と有意に良好な結果を示した。乏精子症の妊娠例では受精率は 17.6% と低かったが平均 8.5 個と多数の卵が回収できていたのが特徴であった。従来、採卵不能であった例が経子宮穿刺法で採卵を行ない妊娠例が得られたことより採卵の技術が妊娠の成立に大きく関与していることがわかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 332-336, 1992)

緒 言

体外受精・胚移植 (In Vitro Fertilization・Embryo Transfer: IVF・ET) は、排卵から着床にいたる一連の生殖生理学上の諸問題の解明に、著しい進歩と、挙児希望の婦人にとって大きな福音をもたらし、不妊症の不可欠な治療法としても定着してきた。しかし、その成功率は平均 15~30%にとどまり、完結した治療法として確立されるまでには、未だ多くの検

討を要する。そのために卵巣刺激法、培養技術、採卵法、胚移植法及び黄体期の管理法などについて多くの研究がなされてきた。中でも採卵法に関しては、経膈採卵法の導入により飛躍的な進歩を遂げ、IVF・ET が一般病院にまで普及した大きな原動力にもなっている。すなわち、内視鏡下とくに腹腔鏡直視下採卵法より始まった卵採取法¹⁾は、腹腔鏡検査にともなう種々の機器や技術、吸入全身麻酔のための麻酔医など多大な設備、労力を必要としていたが、超音波

断層装置の進歩により、採卵法の主流となったエコーガイド下の採卵法は経腹²⁾、経膈法^{3,4)}ともに、多くの機材を必要とせず、特別な技術も不要で、誰もが容易に行なうことの出来る術式となった。そこで、当科にてIVF・ETのプログラムを開設以来、行なってきた採卵法のうち、腹腔鏡下穿刺法（以下、腹腔鏡法）、エコーガイド下経膀胱穿刺法（経膀胱法）、経膈穿刺法（経膈法）の3方法につき、その成績や相違点を比較し、また現在主流となっている経膈法採卵における妊娠例および乏精子症の妊娠例や経子宮穿刺法による採卵例につき採卵成績が妊娠の成立に及ぼす影響を検討した。

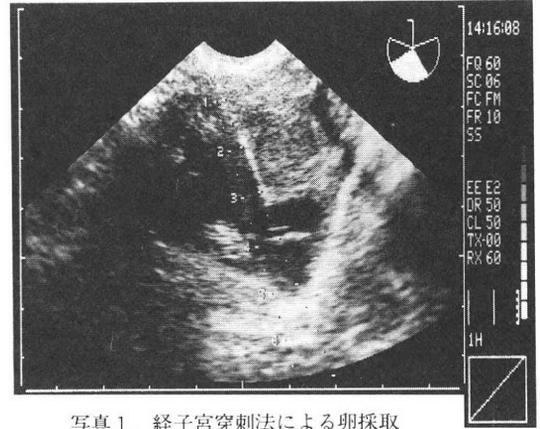


写真1. 経子宮穿刺法による卵採取

表1 採卵方法

	腹腔鏡法	経膀胱法(超音波下)	経膈法(超音波下)
麻酔法	循環式吸入全麻	脊椎麻酔	旁頸管ブロック膈壁浸潤麻酔
装置	腹腔鏡 Machida オリンパス	超音波 横河メディカル RT3000	超音波 持田 Luketron sonovista SLC
プローベ		V型セクタ (5MHz)	TV型メカニカルセクタ (5, 6, 7.5MHz)
穿刺針	Cook社製 double lumen needle	八光エラストー製 18G PTC 針 200mm	八光エラストー製 17G PTC 針 300mm

対象・方法

対象は、昭和60年より平成元年までに当科で施行したIVF・ET症例のうち、腹腔鏡法は28例36周期、経膀胱法は38例48周期、経膈法は118例157周期、計148例241周期である。採卵法の具体的方法は、表1に示したとおり、腹腔鏡法では吸入全麻下にCook社製double lumen採卵針を用い、経膀胱法では脊椎麻酔下に18Gの採卵針で、経膈法では旁頸管ブロック等、局所麻酔下に17Gの採卵針を用いて行った。それぞれ採卵率、受精率、穿刺時間、麻酔時間について比較した。さらに採卵の技術が、その後の妊娠成績に影響するかどうかを知るために、経膈法例につき、妊娠群と非妊娠群の採卵成績を比較検討した。また、経膈法例のうち高度乏精子症を合併し妊娠した例、経子宮穿刺例(写真1)の採卵成績を検討した。なおIVF・ETの適応は卵管性不妊81例153周期、男性不妊33例36周期、原因不明不妊7例12周期、術後不妊24例29周期、免疫性不妊3例11周期であり、明らかに受精成績の劣る男性因子は、受精率の検討から省いた。卵巣刺激法はClomid-hMG周期88例116周期、hMG周期69例116周期、GnRHa-hMG周期44例48周期でありhMG投与後35時間で採卵を行った。

成績

穿刺対象となる直径15mm以上の成熟卵胞数は、表2に示したとおり腹腔鏡法で平均 6.1 ± 2.2 、経膀胱法 5.9 ± 1.7 、経膈法 6.4 ± 2.5 個と各方法間で有意な差はなかった。実際に穿刺した卵胞数は、腹腔鏡法 5.1 ± 2.1 (穿刺率83.6%)、経膈法 5.7 ± 2.6 個(89.1%)と差がなかったのに対し、経膀胱法では 3.5 ± 1.6 (59.3%)と有意に少なかった。採卵成績をみると周期当りの回収卵数は腹腔鏡法で 3.8 ± 2.1 、経膀胱法 2.8 ± 1.7 、経膈法 4.3 ± 2.4 個で3方法間で有意差があったのに対し、卵胞あたりの採卵率は経膈法で85.1%と最も高く、腹腔鏡法74.6%、経膀胱法78.9%に対し良好な採卵成績が得られた。また実際の卵胞穿刺に要した時間と、そのための全麻酔時間

表2 各採卵法における発育卵胞、穿刺卵胞数(穿刺率)

	腹腔鏡法	経膀胱法	経膈法
発育卵胞数 (≥ 15 mm)	6.1 ± 2.2 個	5.9 ± 2.0 個	6.4 ± 2.5 個
穿刺卵胞数 (穿刺率)	5.1 ± 2.1 (83.6%)	3.5 ± 1.6 (59.3%)	5.7 ± 2.6 (89.1%)

* $p < 0.01$

表3 各採卵法による採卵成績

	腹腔鏡法 n = 36	経膀胱法 n = 48	経膈法 n = 157
周期あたりの 回収卵数	3.8±2.1* 個	2.8±1.7* 個	4.3±2.4* 個
卵胞あたりの 採卵数	** 74.6%	*** 78.9%	** *** 85.1%

* < 0.005
 ** < 0.01
 *** < 0.05

を示したのが表4であるが、麻酔導入より終了までの全時間は腹腔鏡法で98.3±22.4分から経膀胱法の61.3±20.5分、経膈法の33.9±13.6分と極端に短縮され、また実際の穿刺時間も腹腔鏡法の57.9±17.0分から、それぞれ40.7±17.6、24.6±14.6分と有意に短時間となった。また、これらの採卵法の進歩が体外受精そのものの成績に直接関係するかどうかを知る目的で、培養方法などが確立され一定の方法で行われた経膈法の120周期において妊娠群と非妊娠群の採卵成績を比較したものが表5である。非妊娠

表4 方法別採卵時間(分)

	腹腔鏡法	経膀胱法	経膈法
麻酔導入時間	39.6±13.2	20.6±9.9	6.1±4.2
穿刺時間	57.9±17.0	40.7±17.6	24.6±14.6
採卵全時間	98.3±22.4	61.3±20.5	33.9±13.6
回収卵 1個あたりの採卵時間	34.9±26.5	29.3±22.3	11.7±12.2

表5 妊娠群と非妊娠群の採卵成績(経膈法)

	妊娠群 (n = 24)	非妊娠群 (n = 96)
採卵数	5.8±2.7個	NS 5.0±2.4個
採卵率	90.0±15.9%	* 81.9±23.3%
移植胚数	3.3±2.2個	* 2.2±1.7個

* p < 0.01

群の採卵率が81.9%、移植卵数が2.2個であったのに対し、妊娠群ではそれぞれ90.0%、3.3個と妊娠群が有意に良好な成績を示した(表5)。また、経膈法の妊娠例のうち受精率が25%以下であった4症例の成績を表6に示した。症例4では、精子濃度は46.0×10⁶/mlと比較的良好であったが運動率は25.7%と不良でいずれも乏精子症の範疇に入るものであった。受精率は9~25%と低く受精卵は1~2個であった。経子宮穿刺法を用いた6症例の成績を表7に示した。6症例とも経膈プローブによる超音波断層像で、プローブ先端と卵胞の間に子宮が介在するもので従来は穿刺が不可能であったものである。全例、子宮内膜症などの手術歴を有し、片側卵巣例

表6 乏精子症における体外受精・胚移植妊娠例

	年齢 (歳)	精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	運動率 (%)	穿刺卵胞数	採卵数	受精卵数 (移植胚数)
症例1	37	7.5	20.0	6	6	1
症例2	30	22.0	40.9	13	11	1
症例3	32	11.6	22.4	11	9	2
症例4	36	46.0	25.7	8	8	2
平均				7.5	8.5	1.5
				採卵率(89.5%)		受精率(17.6%)

表7 Transuterine puncture の成績

症例	穿刺卵胞数	採卵数	受精卵数	移植胚数
6	25	20	14	13
/症例	4.2/	3.3/	2.3/	2.2/
		採卵例	移植例	妊娠例
		6	5	2

で癒着などが原因であると想像された、平均3.3個の卵を回収し、症例別では全例、採卵でき2例が妊娠に至った。

考 察

近年、体外受精・胚移植は不妊症治療において確

立した地位を得たというよりむしろ、中心的治療法として広く受け入れられるようになった。この普及した原因として、培養技術の改良などによってもたらされた成功率の向上に加えて、経腔超音波断層法の進歩が寄与する点大きい。すなわち、新しい超音波診断機器の開発により卵胞成熟のモニタリングが容易あるいは的確になったこと、および採卵成績が向上したという側面だけでなく、採卵の手法に関して、大幅に労力が軽減されたことが、一般に広く受け入れられる原動力となったことは否めない。我々の成績でも腹腔鏡法から経膀胱法になった時点で、膀胱と卵巣の位置関係から穿刺率が83.6%から59.3%と低下したものの、卵胞あたりの採卵率は経膀胱法の方が優れていた。さらに経腔法になってからは、穿刺率も腹腔鏡法と同等になり、採卵率85.1%、回収卵数4.3個と、最も良好な成績を得られるようになった。このように採卵成績が格段に向上したのは、超音波断層法下では、卵巣周囲の癒着があっても穿刺が可能であること、腹腔鏡法ではdouble lumen needleを使っていたのに対し、経膀胱、経腔法ではsingle lumenであるため断面が丸くleakが少ないこと、超音波断層法では卵胞の内部が描写可能なため、穿刺針の先端の位置を自由にコントロール出来るなどの理由が考えられる。また、この様な成績の向上だけでなく大幅な労力の軽減も無視できない。これは、吸入全麻から脊椎麻酔を経て局所麻酔にいたる、おもに麻酔法の変更に依るところが多い。すなわち、腹腔鏡法では吸入全麻が不可欠で、麻酔医をはじめ多くの人員を必要とすること、多くの機器を用いるため準備のための人手、時間を要する。脊椎麻酔ではこのような煩わしさは軽減できるものの、麻酔のための消毒、膀胱内への生食注入、術後の頭痛などの問題点が残る。経腔法では殆どが局所麻酔で、必要があれば静脈麻酔を追加すれば良く、場合によっては無麻酔でも可能である。腔内の消毒のみの処置で開始できるなど利点が多い。そこで採卵時間の大幅の短縮が出来、経腔法では腹腔鏡法に較べ約3分の1の時間で終了している。卵1個当りの時間も約8分で、これは麻酔など、全ての時間を含んでおり、卵胞を穿刺している実際の時間ははるかに短い時間である。このような採卵時間の短縮は採卵に携わる術者の負担を肉体的、精神的に軽減するのは当然であろう。

採卵方法の違いが体外受精そのものの成績に及ぼす影響を比較検討することは難しく、またあまり意味も持たない。なぜなら採卵方法の変遷と共に培養技術など他の重要な側面も少なからず進歩している

からである。そこで培養法などが全く同じな時期におこなった経腔法において、妊娠の有無によりその採卵成績を比較した。妊娠群が非妊娠群に較べ採卵成績が有意に良好であったのは、採卵技術の優劣が妊娠の予後に大きく関係している事を物語っており、これは主席卵胞から成熟した卵を的確に採取することの重要性が示されている。特に乏精子症例では受精率が低く、多くの卵が回収出来た例でも1~2個の受精卵しか得られない事も多いが、これらの卵子は全て同様な操作を行なったものであることを考えると、この卵の採取に失敗した場合は妊娠に至らなかったこととなり、1個の卵の採取の可否が妊娠の成立に大きく関与していることが良くわかる。現在まで採卵法で受精や着床に対する影響が考えられているものは1)使用する麻酔剤⁹⁾、2)吸引する圧力、3)消毒薬、4)気腹した場合の気相¹⁰⁾5)卵胞洗浄による黄体機能への影響などが挙げられるが必ずしも明確な結論は得られていない。最も安全なものを最も安全な方法で用いるのが現状であり極端な操作を避けることは当然である。

またこれら採卵法に特有の副作用、合併症の発生も考慮しなければならない。腹腔鏡法では腹腔鏡手術が潜在的に持つ気腹の事故、腹腔内臓器、血管の損傷が考えられる。また吸入式全麻に伴う合併症も無視できない。経膀胱法、経腔法では腸管、膀胱の損傷、穿刺部の出血などがあり、経腔法では骨盤内感染(PID)の可能性があるが、いずれも充分注意すれば防げる問題であろう。われわれも経膀胱法で数例の血尿を見ただけで、重篤な副作用は一例も経験していない。経腔法では、ときに腔壁の小動脈よりの拍動性出血を見ることがあるが、細心の注意を払って観察すれば避けることは難しくない。経腔法での問題点は卵巣の位置が到達不能な場合であるが、最近では経子宮穿刺法⁷⁾も提唱され採卵が可能となっており、この点は腹腔鏡法より格段に優れた方法であることが明らかとなっている。

今回の報告では明らかなように、今後とも採卵法の主流が経腔法であることは間違いないが、我々の採卵率85%を更にたかめ100%に近づけるためには超音波断層機器の進歩が大きな意義を持つてゐることは明白である。

文 献

- 1) Steptoe, P. C., Edwards, R. G.: Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotropins, Lancet, 1: 683, 1970

- 2) Lenz, S., Lauritsen, J. G.: Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia: a new method of collecting oocytes for in vitro fertilization, *Fertil. Steril.*, 38: 673, 1982
- 3) Gleicher, N., Friberg, J., Fullan, N., Giglia, R. V., Mayden, K., Kesky, T., Siegel, I.: Egg retrieval for in-vitro fertilization by sonographically controlled vaginal culdocentesis, *Lancet*, 2: 508, 1983
- 4) Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Feger, B., Plumere, C., Gerlinger, P., Brun, B., Rumppler, Y.: Transvaginal sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval, *Lancet*, 1: 1467, 1984
- 5) Hayes, M. F., Hosoi, Y.: Effect of general anesthesia on fertilization and cleavage of human oocytes in vitro, *Fertil. Steril.*, 48: 975, 1987
- 6) Mastroyannis, C., Hosoi, Y., Yoshimura, Y., Atlas, S. J. and Wallach, E. E.: The effect of a carbon dioxide pneumoperitoneum on rabbit follicular oocytes and early embryonic development, *Fertil. Steril.*, 47: 1025, 1987
- 7) Arjoko, Wisanto., Nico, B., Michel, C., Esther, De-G., Devroey, P. and Van-Steirteghem, A. C.: Effect of transuterine puncture during transvaginal oocyte retrieval on the results of human in-vitro fertilization, *Human Reproduction*, 4: 790, 1989

A study on significance of the ovum collection method in pregnancies due to in vitro fertilization and embryo transfer (IVF・ET)

Kazunori Miyazaki, Sakae Oota,
Hirotaoka Okuda, Yoshihiko Suzuki,
Takuzi Kaneko, Shusei Sugiyama
and Osamu Sugimoto

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka Medical College, Osaka 569, Japan

With the purpose of studying the significance the ovum collection method exerts on the realization of pregnancy in in vitro fertilization and embryo transfer, we compared the laparoscopic puncturing method, the ultrasonic transvesical puncturing method, and the transvaginal puncturing method in regard to ovum collection results and ovum collection time. Also, in order to learn whether or not the ovum collection technique is actually directly involved in the realization of pregnancy, in transvaginal cases, we compared ovum collection results in the pregnant group and non-pregnant group, and we studied ovum collection results in oligozoospermia cases and in transuterine puncture cases. The recovered ovum count by these 3 methods was respectively 3.8 ± 2.1 , 2.8 ± 1.7 and 4.3 ± 2.4 ova, and the ovum collection rate per follicle was 74.6, 78.9, and 85.1% so that the transvaginal method was the most favorable. The ovum collection time per each recovered ovum was respectively, 34.9 ± 26.5 , 29.3 ± 22.3 , and 11.7 ± 12.2 minutes, so that the transvaginal method was after all the shortest. Although the ovum collection rate and embryo transfer count in the non-pregnancy group by the transvaginal method was $81.9 \pm 23.3\%$ and 2.2 ± 1.7 , in the pregnancy group they were 90.0 ± 15.9 , and 3.3 ± 2.2 displaying favorable results. In pregnancy cases with oligozoospermia, the fertilization rate was low being 17.6%, but it was also characterized by the fact that on the average 8.5 ova were recovered, a rather large number. Since previously in cases in which ovum collection was not possible, it is possible to obtain pregnancies by conducting ovum collection by the transuterine puncture method, the techniques of ovum collection have been found to be closely involved in the realization of pregnancy.

(受付: 1991 年 9 月 26 日)

IVF-ET における月経時遺残内膜吸引除去の有用性について

Effects of the Removal of Menstrual Endometrium in IVF-ET

琉球大学医学部産科婦人科学教室 (指導: 中山道男教授)

新 崎 盛 雄

Morio ARASAKI

Department of Obstetrics & Gynecology
University of the Ryukyus, School of Medicine,
Okinawa 903-01, Japan (Director: Prof. Michio Nakayama)

月経時の内膜吸引除去を IVF-ET 患者に無作為に行い、その後の妊娠成立への影響を検討した。

対象は平成 2 年 5 月から 7 月までの IVF-ET 患者で、内膜吸引除去した 18 例(吸引群)と対照群 21 例である。内膜吸引除去は、月経 3 日目に 14 Fr ネラトンカテーテルを用いて行ない、卵巣刺激法として GnRH agonist を前周期黄体中期より、hMG は月経 3 日目より投与した。hCG に切り換え時の血中 estradiol (E_2), progesterone (P_4)の測定と超音波による子宮内膜の観察を行なった。

吸引群と対照群において平均年齢、不妊期間、不妊因子に差はなかった。超音波上 3 本の高輝度の線と、その間の低輝度の領域のあるリーフ状内膜の出現頻度は、吸引群で 11/15 例 73.3% で、対照群 6/16 例 37.5% に比して有意に多かった ($P < 0.05$)。吸引群では 5/18 例 27.8% で妊娠が成立し、対照群 1/21 例 4.8% に比して有意に多かった ($P < 0.05$)。

以上の成績より、IVF-ET において月経時子宮内膜の吸引除去は、妊娠成立に有用であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 337-340, 1992)

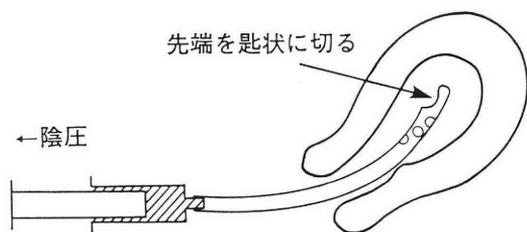
緒 言

近年、体外受精胚移植 (IVF-ET) において卵巣刺激法の改良に伴い、妊娠率が向上してきたが¹⁾、その成功率はいまだ不十分である。その原因の 1 つとして、着床期子宮内膜の問題が指摘されている²⁾。子宮内膜の機能異常として、月経時子宮内膜の剥脱不全、卵巣発育不全による不全増殖期内膜の分泌期内膜への移行、黄体ホルモン分泌不全などがある^{3,4,5)}。我々は、これまで IVF-ET で 3~4 個の胚を移植した例の分析より、妊娠成立群は非成立群に比べて、hCG 投与時の子宮内膜が厚く、その超音波像に違いがあることを報告した⁶⁾。ところが hCG 切り換え時の血中 estradiol (E_2), progesterone (P_4)値には差がないことから、この違いは月経時内膜の遺残が影響しているのではないかと推察した。そこで 3~4 個胚移植できたにもかかわらず数回 IVF-ET に失敗した例に、試験的に月経時内膜を卵巣刺激前に吸引除去を

行なったところ、3 例で妊娠が成立した。本研究においては、IVF-ET 患者に対し、この月経時の内膜除去を無作為に行ない、子宮内膜像や妊娠成立に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。

対象・方法

平成 2 年 5 月~7 月までに IVF-ET を施行した患者のうち同意を得た 39 例である。この 39 例を内膜吸引除去を行なった群 18 例 (以下吸引群と略す) と対照群 21 例の 2 群に分けた。内膜吸引除去は、月経周期 3 日目に施行した。14 フレンチサイズのネラトンカテーテル先端を有窓に加工し、他端には 20 ml の注射器をつけ、子宮腔内をまんべんなく吸引した (図 1)。卵巣刺激法は、gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) である Buserelin Acetate (スプレキュア、ヘキストジャパン) を刺激前周期の黄体中期より 7 日まで 1 日 1200 μ g を点鼻し、hMG (ヒュメゴン、三共または hMG、日研) の投与は、



14Fr 有窓ネトランカテーテルで内膜吸引除去

図1 内膜吸引除去法

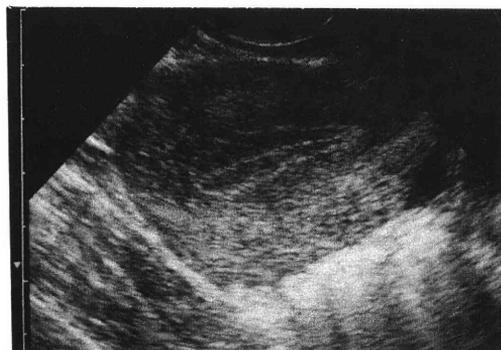


図2 リーフ状内膜

月経周期3日目より開始した, 平均卵胞径 18 mm 以上の卵胞が2個以上認めた時点で, hCG10,000 単位投与し, 32~35 時間後に経腔的に採卵した。また hCG 投与時の血中 E₂, P₄ 値を RIA 法にて測定した。同時に超音波上の子宮内膜厚と子宮内膜が超音波上 3 本の高輝度エコーのラインに囲まれ, その囲まれた部分が高輝度エコーになっている, リーフ状内膜(図2)の出現頻度を調べた。これらの結果は, χ^2 検定を用いて統計処理を行なった。发育卵胞が1個の場合は, その周期はキャンセルした。

結 果

表1に両群における背景因子を示した。年齢は, 36.8歳と36.4歳で, 両群に差はなく, 不妊期間も9.6年と8.6年で, 同様に差はなかった。不妊因子の比較でも卵管性不妊が約70%を占め, 両群間で差はなかった。平均採卵個数は吸引群で7.0±7.1個に対し, 対照群では6.1±4.7個, ET個数も3.2±1.2個に対し3.0±1.3個と, 両群間で有意差を認めなかった。キャンセル率も同様に有意の差はなかった。

また採卵術を施行した吸引群15例, 対照群16例におけるhCG切り換え時の血中E₂値, P₄値を表2に示した。E₂は吸引群1924±1900 pg/mlに対し, 対照群1537±1214 pg/mlと, 両群では差はなく, P₄値も0.2±0.2 ng/mlと0.1±0.1 ng/mlで, 有意な差

は認めなかった。

同様に表3にhCG切り換え時の子宮内膜の厚みを示す。吸引群で9.4±1.5 mmに対し, 対照群で10.1±1.8 mmと, 対照群でやや厚いものの有意差はなかった。またリーフ状内膜の出現頻度は, 吸引群で15例中11例73.3%と対照群の37.5%に比して有意に多かった。

一方, 両群間における妊娠成功例を表4に示す。刺激周期当りの妊娠成立例は, 吸引群では5例27.8%に対し, 対照群は1例4.8%と有意に吸引群で多く妊娠が成立した (P<0.05)。

表1 両群における背景因子の比較

	吸引群	対照群	
平均年齢(歳)	36.8±2.8	36.4±3.8	NS
不妊期間(年)	9.6±5.1	8.6±4.1	NS
不妊因子			
卵管性(例)	14(77%)	14(67%)	NS
男性因子(例)	3	5	NS
その他(例)	1	2	
平均採卵数(個)	7.0±7.1	6.1±4.7	NS
平均ET数(個)	3.2±1.2	3.0±1.3	NS
キャンセル率(%)	17	23	NS

表2 hCG切り換え時の血中E₂, プロゲステロン値(採卵術施行例)

	吸引群(15例)	対照群(16例)	
E ₂ (pg/ml)	1924.6±1900	1537.2±1214	NS
P ₄ (ng/ml)	0.2±0.2	0.1±0.1	NS

表3 hCG切り換え時の子宮内膜厚および内膜超音波像

	吸引群(15例)	対照群(16例)	
内膜厚(mm)	9.4±1.5	10.1±1.8	NS
リーフ状内膜像(例数)	11(73.3%)	6(37.5%)	P<0.05

表4 両群における妊娠成立

	吸引群	対照群
妊娠例/刺激周期	5/18 (27.8%)	1/21 (4.8%)

P<0.05

考 察

1978年, Steptoe and Edwards等⁷⁾によって初めて体外受精児が出生以来, IVF-ETは世界各地で行なわれるようになり, その方法も徐々に改善されてきている。排卵誘発法は, GnRH-aの導入により,

premature LH surge が抑えられ、多数の成熟卵子採取ができ、また採卵キャンセル率の減少により高い受精率が得られるようになった^{8,9)}。しかし妊娠率は内外の報告をみても、まだ満足すべきものではない^{1,10)}。我々の施設における IVF-ET の成績も、刺激周期あたりの妊娠率 13.4%、胚移植あたりのそれは 17.9%と同様に不十分である¹¹⁾。この大きな原因として、IVF-ET では自然妊娠に比べて排卵後早期に胚を移植するため、子宮内膜が十分に着床に適した状態になっていないことが推察できる。

我々は、これまで IVF-ET で 3~4 個胚移植した 30 例 34 周期の分析より、妊娠成立群は非成立群に比べて、hCG 投与時の内膜が厚く、子宮内膜の超音波像に違いがあることを報告した⁶⁾。ところが hCG 切り換え時の血中 E₂、P₄ 値には差がないことから、この違いは月経時内膜の遺残が影響しているのではないかと推察した。そこで 3~4 個胚移植できたにもかかわらず IVF-ET に数回失敗した例に、試験的に月経時内膜を卵巣刺激前に吸引除去を行なったところ 3 例で妊娠が成立した。これは移植胚数が妊娠成立に及ぼす影響を除去することを考慮したものである。この preliminary trial として、月経周期 3 日目に内膜を吸引除去した 3 例は、月経周期 3 日目に 5~6 mm 内膜の厚みが、2~3 mm となり、3 例ともその周期で妊娠した。

そこでこの発想に基づき、本研究では月経時の内膜吸引除去を無作為に行なってみた。その結果 hCG 切り換え時の E₂、P₄ 値、子宮内膜厚に両群間で有意の差はなかった。しかしリーフ状内膜の出現頻度は、吸引群で 15 例中 11 例 73.3%で対照群の 37.5%に比して有意に多かった。また妊娠した 6 例は全例このリーフ状内膜を呈していたところから、この子宮内膜像は良好な着床期子宮内膜を反映しているものと思われた。また吸引群と対照群間で、不妊因子の背景に差はなく、平均採卵個数、ET 個数に差がないにもかかわらず、刺激周期あたりの妊娠率は、吸引群で 5/18 例 27.8%、対照群で 1/21 例 4.8%、ET 当りの妊娠率は、それぞれ 33.3%と 6.3%と、有意に吸引群で多く妊娠が成立した。

平成 2 年度生殖医学の登録に関する委員会の報告によると、わが国の IVF-ET における刺激周期当りの妊娠率は 13.3%、ET あたりのそれは 19.3%である(患者の平均年齢 32.0 歳)¹⁰⁾。委員会報告の妊娠率に比べ、対照群の妊娠率は低い。我々の対象患者の平均年齢 36.4 歳を考慮すると、あまり差はないかと思われる。それに対し吸引群における 27.8%という妊娠率の高さは、遺残内膜が着床になんらかの

悪影響を与えており、それを除去することにより、妊娠が成立しやすくなったと考えられる。

以上のことより遺残内膜吸引除去では、良好な内膜の発育を促し、妊娠を成立させやすくしていると思われる。我々はこの考え方をさらにすすめて、遺残内膜の吸引除去の代わりに、estrogen, progesterone の交替療法 (Kaufmann 療法) による medical curettage を IVF-ET 刺激周期前に行ない、その後、通常の卵巣刺激を行なう方法を検討した。その結果、対照群では、ET 26 周期中 3 例 (11.5%) の妊娠率に対し、Kaufmann 群では 22 周期中 9 例 (40.9%) と、後者で有意に高い妊娠率がえられた¹²⁾。

月経時遺残内膜の吸引除去が、IVF-ET の妊娠成立に有用であるという報告は、これまでになく、したがって今後超音波による子宮内膜像の違いを、病理組織学的、ホルモンの、組織化学的に検討していくことが着床期子宮内膜の解明に必要であり、IVF-ET の成績を向上させる 1 つの方法であると思われる。

まとめ

1. IVF-ET 患者において月経周期 3 日目に月経時遺残内膜の吸引除去を無作為に施行した。

2. リーフ状内膜の出現頻度は、吸引群で 11/15 例 73.3%と、対照群の 6/16 例 37.5%に比して有意に多かった。また妊娠した 6 例は全例このリーフ状内膜を呈していたところから、この子宮内膜像は良好な着床期子宮内膜環境を反映しているものと思われた。

3. 内膜吸引除去群では 18 例中 5 例 (27.8%) で妊娠が成立し、対照群 21 例中 1 例 (4.8%) より有意に多かった。

以上の成績より、月経時遺残内膜の吸引除去は、IVF-ET の着床機能を改善し妊娠成立に有用であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師中山道男教授、直接御指導いただいた佐久本哲郎講師に深謝し、また、本研究に協力していただいた教職員各位に厚くお礼申し上げます。なお、本論文の要旨は、第 44 回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

- 1) 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

- 2) Rogers, P. A., Milne, B. J. and Trouson, A. O.: A model to show human uterine receptivity and embryo viability following ovarian stimulation for in vitro fertilization, *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3:93, 1986
- 3) Johnes, G. S., Aksel, S. and Wentz, A. C.: Serum progesterone values in the luteal phase deficits, *Obstet. Gynec.*, 44: 26, 1974
- 4) Palmer, A.: The diagnosis use of the basal body temperature in gynecology and obstetrics, *Obstet. Gynec. Survey*, 4:1, 1949
- 5) Moszkowski, E., Woodruff, J. D. and Jones, G. E. S.: The inadequate luteal phase, *Obstet. Gynec.*, 83: 363, 1982
- 6) 佐久本哲郎, 稲福 薫, 佐久川政男, 山城一也, 前浜俊之, 新崎盛雄, 東 政弘, 中山道男: IVF-ET における子宮内膜の超音波所見の検討, *日受精着床会誌*, 8 : 239, 1991
- 7) Steptoe, P. C., Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of a human embryo, *Lancet*, 2: 366, 1978
- 8) Porter, R. N., Smith, W., Craft, I. L., Abdulwahid, N. A. and Facobs, H. S.: Induction of ovulation for in vitro fertilization using busserelin and gonadotropins, *Lancet*, 2: 1284, 1984
- 9) Serafini, P., Batzofin, J., Stone, B., Quinn, P., Kerin, J., Marrs, R. P.: An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responder": pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog, *Fertil. Steril.*, 49: 90, 1988
- 10) 森 崇英: 平成 2 年度生殖医学の登録に関する委員会報告, *日産婦会誌*, 43 : 470, 1991
- 11) 山城一也, 花城可信, 佐久川政男, 新川唯彦, 新崎盛雄, 佐久本哲郎, 東 政弘, 中山道男: 当科における体外受精-胚移植の検討, *日産婦沖繩地方部会雑誌*, 13 : 17, 1991
- 12) Sakugawa, M., Sakumoto, T., Takamiyagi, N., Miyara, M., Arasaki, M., Higashi, M., Nakayama, M.: Suppressing ovulation before ovarian hyperstimulation with flare-up protocol of GnRH agonist improves the results of IVF treatment, *J. Fertil. Implant.*, (Tokyo) in press

Effects of the removal of menstrual endometrium in IVF-ET

Morio Arasaki

Department of Obstetrics & Gynecology
University of the Ryukyus, School of Medicine,
Okinawa 903-01, Japan
(Director: Prof. Michio Nakayama)

The role of endometrial factors in controlling embryo implantation is poorly understood. To clarify the affects of residual endometrium during menstruation in patients undergoing IVF-ET, the endometrium was removed by thorough aspiration (suction curettage) on the third day of menstrual cycle. Thirty nine patients were randomly divided into two groups; aspirated (18cases) and control (21cases) groups.

The tip of 14Fr-sized catheter was processing as a curettage. The catheter was inserted into uterine cavity and aspirated endometrial tissue so as to cover eventually all of the uterine cavity using 20ml of disposable syringe. GnRH agonist administration was initiated during luteal phase. The hMG was begun on day 3 of the menstrual cycle. The hCG 10,000 IU was given when at least two follicles measured 18 mm in the largest diameter. There were no significant differences in mean age, infertile factors, cancelled cycle, mean number of collected oocyte and transferred embryos, serum E₂, progesterone and endometrial thickness on the day of hCG administration between both groups.

On the day of hCG administration, eleven of 15 cases (73%) in the aspirated group showed sonographically leaf-like endometrium characterized by prominent outer and midline hyperechogenic lines and inner hypoechoic regions, while 6 of 16 cases (38%) in control group showed.

Pregnancy rate of 27.8% in the aspirated group was significantly higher than that of 4.8% in control group ($p < 0.05$). These data suggest that the aspirated removal of menstrual endometrium was favorably effective on achieving pregnancy in IVF-ET.

(受付: 1991 年 11 月 18 日特掲)

子宮外妊娠の保存的手術に関する検討： 特に手術手技について

Conservative Surgery for Ectopic Pregnancy with Special Reference to the Techniques

虎の門病院産婦人科

佐藤孝道 児島孝久 高橋敬一
Kodo SATO Takahisa KOJIMA Keiichi TAKAHASHI
小川恵吾 東梅久子
Keigo OGAWA Hisako TOUBAI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Toranomon Hospital, Tokyo 105, Japan

1986年4月1日から1991年3月31日までに、虎の門病院産婦人科で行なった54例59件の子宮外妊娠の保存手術術式について検討し以下の結果を得た。なお、卵管妊娠の54件は全て顕微鏡下に行なった。1) 1件のみ、膨大部妊娠破裂で強い浮腫と破損のため保存手術を断念したが、他は保存手術を行ない得た。2) 保存手術59件中33件は対側卵管が肉眼的に正常であったが、他は切除後、閉塞、癒着等の異常があった。3) 膨大部の保存手術が47例で最も多かった。4) 峡部、間質部妊娠には卵管の部分切除・端々吻合を行なった。膨大部妊娠の47件中42件にはまず膨大部縦切開を行なったが、粘膜の欠損部が卵管全周にわたった10件中5件は部分切除・端々吻合に術式を変更した。5) 卵管内容を除去後の出血点は粘膜欠損部に限られており、太めの糸をかけて修復する方が合理的と考えられた。6) 保存手術で最も大切な点は 粘膜面の確実な修復で、そのためには顕微鏡下に手術を行なうことが不可欠と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 341-346, 1992)

緒 言

子宮外妊娠は緊急を要する手術であることが多いために今日でも一般には患側の卵管切除が行なわれている。しかし、反対側の卵管が一見正常に見える症例でも患側の切除が結果として不妊症の原因になることは少なくない¹⁾。また、既に一侧の卵管が何らかの理由で切除された症例については、患側の切除は体外受精以外に挙児への希望を断つことになる²⁾。体外受精が発展しても子宮外妊娠の保存的療法の意義がなくなることはない。

今日まで保存的手術療法についての報告は散見されるが、手術術式についてはなお見解の相違がある³⁻⁵⁾。

比較的多数例での報告もあるが、多くはかなり古い時代からの症例の積み重ねで、肉眼的に行なった手術も、顕微鏡下の手術も混在して報告されている⁶⁻⁹⁾。また、手術用顕微鏡下に術野を詳細に観察して行なわれた報告は少ない。さらにそれぞれの施設で取り扱われた子宮外妊娠症例のせいぜい20-30%が保存的に手術されているに過ぎず、症例の選択規準も不明確である^{6,7)}。

われわれは5年間という比較的短期間に同期間内に取り扱われた子宮外妊娠70件の84%に当たる59件に対し保存的手術を、特に卵管妊娠については全例を顕微鏡下に行なう機会を得た。本研究では顕微鏡下の観察から得られた所見を踏まえて保存的手術

の術式について検討し、新たな知見を得たので報告する。

対象および方法

1986年4月1日から1991年3月31日までに、虎の門病院産婦人科で保存的手術療法を行なった54例59件の子宮外妊娠を対象とし、その手術術式について検討した。なお、症例数については「〇〇例」、子宮外妊娠数や手術数については「〇〇件」の如く示した。

同一期間内に当科で計64例70件が子宮外妊娠と診断され、残りの8件には患側の切除が、3件にはMethotrexate (以下、MTX) 単独療法が行なわれた。また、MTX療法施行中、超音波断層法上、腹腔内血腫の増大がみられ保存的手術療法に切り替えた1件があったが、これは保存手術に含めた。

保存手術の適応は、将来の挙児を希望し、かつ保存手術について十分な理解が得られたものとし、残存卵管数、予想腹腔内出血、着床部位は考慮しなかった。保存手術を予定し、手術時患側の卵管の破損が大きく、切除に切り替えたものが1件あったが、これは切除手術の8件に含めた。

保存的手術は卵巣妊娠や腹膜妊娠の5件を除いた54件を手術用顕微鏡下に行なった。

保存的療法としては原則としてMTX療法ではなく手術療法を選択した。4件にMTX療法をまず選択したのは尿中hCGが1,000 IU/L以下と低値で、かつ既往に数回の手術歴があったためである。

成 績

1. 術式の選択

患側の切除を行なった8件中5件は既に複数の健康な児がおり保存手術を希望しなかったものである(表1)。健児がいなくても拘らず患側の切除手術を行なった3件中2件は、高齢のために将来の挙児を希望しなかったものである。残りの1件は卵管峡部端々吻合の手術既往のある子宮外妊娠で、膨大部の大部分が、強い浮腫を伴って広範囲に破裂・破損し

表1 患者が持っている健康な児の数と子宮外妊娠治療法の選択

健児数	保存手術	切除手術	MTX療法
0人	47	3	3
1人	12	0	0
2人	0	4	0
3人	0	1	0
4人以上	0	0	0

注：数値は件数

ており患者の希望にかかわらず保存手術を断念した。なお、ショックのために保存手術を断念した子宮外妊娠はなかった。手術は夜間の緊急手術の場合も麻酔科の協力を得て必要があれば顕微鏡下に保存的手術を行なった。また、54症例中31症例(57.4%)は保存的手術のために他院から当院に紹介されてきたものである。

未婚で保存手術を行なったのは16件であった。

2. 保存手術例の既往

15件は子宮外妊娠の既往があり、うち12件は付属器切除、もしくは患側の卵管の切除が行なわれていた。また、卵管留水症のために片側の卵管切除が行なわれていたものが2件あり、計14件は片側の卵管が既に切除されてきた(表2)。

表2 手術時対側卵管の状態と子宮外妊娠治療法の選択

対側卵管の状態	保存手術	切除手術	MTX療法
正 常	33	7	2
切 除 後	14	0	0
閉 塞	4	0	0
軽い周囲癒着	1	0	0
高度の周囲癒着	5	0	1
閉塞と癒着	2	0	0
そ の 他	0	1	0

注：数値は件数

子宮外妊娠で卵管切除の既往のある12件中2件は2回づつ子宮外妊娠の既往があり、初回は患側卵管の切除が行なわれ、2回目は保存的手術が行なわれていた。子宮外妊娠の既往のある15件中の残りの3件は保存手術だけが行なわれていたが、前記した2件の保存手術を含め5件の既往の保存手術は全て当科で研究期間内に行なったものである。したがって手術数は59件、症例数は54例になる。なお、保存手術既往のあった6件中4件(うち2件は片側卵管切除後)は前回と同一部位での子宮外妊娠であり、2件は健常と思われた対側での子宮外妊娠であった。

また、不妊症治療中に子宮外妊娠になって保存手術を行なったものは10件あり、うち5件は顕微鏡下手術の既往があった。

3. 妊娠週数

妊娠週数が明らかであったのは53件である。これらの妊娠週数は4週から10週に分布していた。

4. 対側卵管の状態

保存手術を行なった59件中対側卵管の状態(卵管妊娠以外では両側)についてみると、切除後が14件、閉鎖していたのが4件、軽い卵管周囲癒着が1件、高度の癒着が5件、閉塞しておりかつ高度の癒着を

伴ったものが2件あった(表2).

5. 着床部位

保存手術例の着床部位は膨大部が47件で最も多く(表3),うち23件は膨大部の子宮側に,10件は膨大部の先端,ほとんど卵管采の部分に着床していた.また,5件は峡部,2件は間質部に着床していた.その他は流産状態のために部位が同定不可能であったり,卵巣,あるいは腹腔内妊娠と考えられた.

表3 着床部位と子宮外妊娠治療法の選択

着床部位	保存手術	切除手術	MTX 療法
卵管膨大部	47	3	2
卵管峡部	5	1	1
卵管間質部	2	4	0
卵 巢	2	0	0
その他腹腔内	3	0	0

注:数値は件数

6. 胎芽の状態

術前に心拍が認められたり手術時に明らかに胎児が認められたものは5件,胎嚢が認められたものは3件あった.一方,流産,あるいはそれに近い状態と考えられたものは15件あった.また,卵管破裂は2件あった.

術前の尿中hCGは測定し得たものが40件あったが,50 IU/Lから500,000 IU/Lに分布し,うち14件は10,000 IU/L以上であった.

7. 術式

卵巣妊娠,腹腔内妊娠あるいは流産した卵管妊娠と考えられた5件を除いて54件に顕微鏡下手術を行なった.

術式は,間質部,あるいは峡部妊娠の7件については卵管部分切除・端々吻合を行なった.特に間質部妊娠の場合は非妊娠時の切除・端々吻合に比較して血流が豊富で,針状の電気メスで切断しつつ出血部位に丹念に針糸をかけて止血を計る必要があった.吻合は8-0吸収糸で粘膜面を4点固定し,漿膜面は6-0ナイロン糸で縫合した.

膨大部についても,5件については最初から卵管部分切除・端々吻合を行なった.どのような膨大部妊娠について最初から部分切除・端々吻合を選択するかの基準は決めていなかった.それ以外の膨大部妊娠については卵管間膜の反対側で,卵管に平行に針状の電気メスで卵管内容物が十分に露出するまで通常2-3cmの切開を加え内容をピンセットで除去した.このように卵管に平行に切開を加えた症例は42件あった.内容の除去は比較的容易な場合もあったが,しっかりと着床し,顕微鏡下に生理食塩水を

かけながら丹念に操作しないと完全に除去できない症例もあった.内容を除去すると,顕微鏡下に粘膜面の欠損部位が確認可能で,出血は粘膜面の欠損部位に限られていた.この出血は顕微鏡下では視野を確保することが困難なぐらい多いこともあり,また粘膜面の欠損部,すなわち,その下面の筋層からの出血に限られていたので,6-0程度の太めの吸収糸をかけて止血を計った.続いて粘膜面の縫合を8-0吸収糸で,漿膜面を6-0ナイロン糸で行なった.

卵管の縦切開を行なった膨大部妊娠について卵管表4 手術用顕微鏡下所見による卵管膨大部妊娠の粘膜損傷程度のカテゴリ

分類	分類の基準
I型	・卵管粘膜の欠損部分が卵管断面円周の1/2未満 ・妊卵排除後の出血は一般にわずか
II型	・卵管粘膜の欠損部分が卵管断面円周の1/2以上 ・妊卵排除後の出血は一般に多いが容易に止血可能
III型	・卵管粘膜は卵管断面円周の全周にわたって欠損 ・妊卵排除後の出血は一般に多い
IV型	・卵管は破裂している

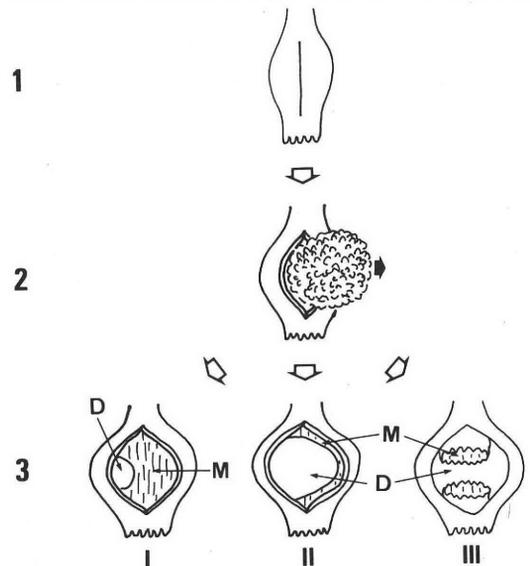


図1 卵管膨大部縦切開・内容除去後の粘膜面の状態
1:卵管に縦切開を加え,2:内容を除去すると,3:卵管粘膜の状態(Mは健全な粘膜部,Dは粘膜面欠損部)は粘膜面の欠損の状態からI型,II型,III型の3型に分類できる.ここには破裂した場合(IV型)を記載していない.

表 5 卵管膨大部妊娠の保存的手術の内訳

術式 (1)	粘膜面の分類	件数	術式 (2)	件数
膨大部縦切開	I 型	16	内容の除去 粘膜の修復 漿膜縫合	16
	II 型	15	内容の除去 粘膜の修復 漿膜縫合	15
	III 型	10	内容の除去 粘膜の修復 漿膜縫合	5
			卵管部分切除 端々吻合	5
IV 型	1	内容の除去 粘膜の修復 漿膜縫合	1	
卵管膨大部 部分切除・端々吻合 を直接実施				5

粘膜面の状態をその欠損部位の大きさと出血の状態から I ~ IV 型に分類した(表 4, 図 1)。すなわち卵管粘膜の欠損部分が卵管断面円周の 1/2 未満の I 型, 1/2 以上の II 型, 全周にわたる III 型, 卵管破裂の IV 型に分けて検討すると, I 型は 16 件, II 型は 15 件, III 型は 10 件, IV 型は 1 件あった(表 5)。I 型, II 型, IV 型の計 27 件については, 縦切開のうえ内容の除去, 粘膜の修復, 漿膜の縫合を行なったが, III 型の 10 件中 5 件は粘膜の欠損部と健常部の境界を出血をコントロールしながら確認するのが困難で, 改めて卵管の部分切除と端々吻合を行なった。この 5 件のうち 2 件は胎児心拍が認められており, また 1 件は尿中 hCG が 250,000 IU/L であった。なお, 胎児心拍が認められた膨大部妊娠は 5 例あったが, 残りの 3 件中 1 件は最初から部分切除・端々吻合を行ない, 2 件は卵管を切開後内容を除去し, 粘膜面, 漿膜面の縫合を行なった。

子宮外妊娠を反復し, 前回保存手術を行なった同一の部位での子宮外妊娠についても, 前記の術式は同じように行なうことができた。

手術に伴う出血は, 術前の腹腔内出血を含めて 20 ml から 2,040 ml に分布し, 1,000 ml 以上のものが 6 件, 500-999 ml のものが 6 件あった。術前の腹腔内出血が含まれるために手術そのものによる出血量は明らかでないが, 全ての保存的手術で, およそ 200 ml 以下にとどまったものと推測された。

8. 術後経過

保存手術後ふたたび出血し再開腹を行なったものはない。また, 術後の熱型, 血算・生科学検査等は

切除手術と変わりはない。

考 察

子宮外妊娠の保存的手術に関する報告は散見されるが, 症例の選択基準が明確でなかったり, 肉眼での手術も含まれていたりする⁶⁻⁸⁾。取り扱った子宮外妊娠症例の大部分を顕微鏡下に詳細に観察しつつ系統的に保存手術を行ない, その術式について検討したのものとしては本研究は最初の報告と考えられる。本研究の結果, 卵管の破損の激しい破裂症例の一部では保存手術が無意味と考えられたが, それ以外の場合には緊急の場合を含めて保存手術を選択し得ることがまず明らかになった。

保存的手術の適応については意見の分れるところである^{3,5)}が, われわれは, 将来の挙児を希望し, かつ保存手術について十分な理解が得られたもの全例を対象とし, 残存卵管数, 予想腹腔内出血量, 着床部位は考慮しなかった。これは不妊症の臨床に携わっていると, 子宮外妊娠で患側の卵管を切除された症例にしばしば遭遇するためである。何らかの理由で片側の卵管や卵巣が既に切除されている場合は, 保存的療法を行なうことについて異存がない²⁾と思われるが, 対側の卵管が健常と考えられる状態で残っている場合, 患側を保存すべきか否かは本研究では結論が得られていない。この点については手術後の子宮外妊娠の再発率だけではなく不妊症の発症率を含めて検討が必要である⁹⁾。

保存手術の適応を明確にしておくことは, 成績を比較検討する上で不可欠のことと考えられるが, 残

念ながらこの点を明確に報告したものはない。

子宮外妊娠の保存療法としては手術療法だけではなくMTX療法が報告されており、比較的良い成績も報告されている⁵⁾。しかし、手術療法は急性腹症の状態にも対応できること、効果が確実なこと、術後薬剤が卵に及ぼす影響を考慮しなくてよいことからMTX療法に比べて応用範囲が広い。今回の保存的手術療法の中にも1件だけではあったが、MTX療法施行中に腹腔内の血腫の増大がみられ、手術療法に変更した症例があった。また、本研究でも明らかのように妊卵の着床部位には粘膜の欠損が必ずみられ、卵管の全周にわたるものも少なくない。次回以降の妊娠の予後に、粘膜面の状態が大きく影響することが考えられるが、MTX療法を行なった場合、欠損した粘膜面が確実に修復されるかどうかは未解明である。

膨大部妊娠の手術術式としてmilkingと呼ばれる内容の絞り出し法を提唱するものがある⁸⁾。また、止血が困難な卵管内面からの出血に対しバゾプレシンの局所注入を提唱するものもある⁹⁾。しかしこれらのいずれの方法も選択すべき方法ではないことが明らかになった。すなわち、着床部位には程度の差はあれ必ず粘膜の欠損が存在する¹⁰⁾。この欠損を正確に修復することが保存手術の基本であり、milkingのみで粘膜面の欠損がほとんど残らない症例は本研究のI型のさらに一部に過ぎず、極めて稀と考えられた。近年、超音波断層法や尿中hCGの微量測定法が進歩し子宮外妊娠も本研究のように多くの場合破裂前に診断可能になった。このことは保存療法の対象になり得る患者が増加していること、すなわちmilkingのみで対処し得る程度の症例が相対的に減少していることを意味している。また、特にII型やIII型では卵管内容を除去した部分から広範囲の出血がみられることがしばしばある。しかしこの部分は粘膜面が欠損しており、太めの糸を大きくかけて止血を行なっても健全な粘膜が障害されることはない。また、実際にこの粘膜の欠損した出血部位を閉鎖するように縫合を行なわないと、欠損部をはさむ健全な粘膜部分が近接せず粘膜同士の縫合が困難である。すなわち薬剤による一時的止血は、術後の再出血の危険性があるばかりではなく手術手技上も何の意味も持っていない。さらにIII型のように粘膜面の欠損が広範囲で出血が多い場合はむしろ部分切除に切り替え、端々吻合を行なった方が効果的と考えられた。

本研究では粘膜面の正確な同定と縫合が子宮外妊娠の保存手術の基本であることが明らかになったが、このためには顕微鏡下に手術を行なうことが不可欠

であると考えられた。

文 献

- 1) Mitchell, D. E., McSwain, H. F., McCarthey, J. A. and Peterson, H. B.: Hysterosalpingographic evaluation of tubal patency after ectopic pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 157: 618, 1987
- 2) Valle, J. A. and Lifchez, A. S.: Reproductive outcome following conservative surgery for tubal pregnancy in women with a single fallopian tube, *Fertil. Steril.*, 39: 316, 1983
- 3) Schenker, J. G. and Evron, S.: New concepts in the surgical management of tubal pregnancy and the consequent postoperative results, *Fertil. Steril.*, 40: 709, 1983
- 4) Tulandi, T. and Guralnick, M.: Treatment of tubal ectopic pregnancy by salpingotomy with or without tubal suturing and salpingectomy, *Fertil. Steril.*, 55: 53, 1991
- 5) Vermesh, M.: Conservative management of ectopic gestation, *Fertil. Steril.*, 51: 559, 1989
- 6) Hallatt, J. G.: Tubal conservation in ectopic pregnancy: A study of 200 cases, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154: 1216, 1986
- 7) Langer, R., Golan, A., Raziell, A., Bukovsky, I., Ron-El, R. and Caspi, E.: Reproductive outcome after conservative surgery for unruptured tubal pregnancy—a 15 year experience, *Fertil. Steril.*, 53: 227, 1990
- 8) Sherman, D., Langer, R., Herman, A., Bukovsky, I. and Caspi, E.: Reproductive outcome after fimbrial evacuation of tubal pregnancy, *Fertil. Steril.*, 47: 420, 1987
- 9) Tuomivaara, L. and Kauppila, A.: Radical or conservative surgery for ectopic pregnancy? A follow-up study of fertility of 323 patients, *Fertil. Steril.*, 50: 580, 1988
- 10) Senterman, M., Jibodh, R. and Tulandi, T.: Histopathologic study of ampullary and isthmic tubal ectopic pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159: 939, 1988

Conservative surgery for ectopic pregnancy with special reference to the techniques

Kodo Sato, Takahisa Kojima,
Keichi Takahashi, Keigo Ogawa
and Hisako Toubai

Department of Obstetrics and Gynecology,
Toranomon Hospital, Tokyo 105, Japan

Conservative surgery was carried out in 59 out of

a total of 70 cases of ectopic pregnancy treated at Toranomom Hospital from 1986 to 1991. Except 1 case, the involved tube was preserved in 54 cases of tubal pregnancy under a microscope.

Following results were obtained; 1) In 33 cases, the opposite tube was observed to be normal, but in the others the contralateral tube was obstructive and/ or in adhesions, or already removed. 2) Of the 54 tubal pregnancy, 47 were ampullary and 7 were isthmic or interstitial. 3) In 7 of isthmic and interstitial pregnancy and in 5 of ampullary pregnancy, segmental resection was carried out. In the other 42 cases of ampullary pregnancy, linear salpingos-

tomy was attempted at first. In 5 out of the 42, additional segmental resection was needed to repair the large mucosal defect and to control bleeding. 4) Under a microscope, bleeding was observed only from the part of mucosal defect where products of conception had attached. This observation suggested that the defective part should be sutured to control bleeding and to achieve complete mucosal repair. Thus local injection of vasopressin or the procedure of 'milking' were suggested to be avoided. Also microsurgical operation was suggested to be of importance.

(受付：1991年8月7日)

子宮鏡による子宮頸部癒着症の手術

Lysis of Cervical Adhesion by Hysteroscopy

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

秋田大学医療技術短期大学部

福島峰子

Mineko FUKUSHIMA

Akita University School of Allied Medicine, Akita 010, Japan

子宮頸部癒着症は子宮腔癒着症の1つであるが、その報告は意外と少ない。本症はHSGや子宮消息子が数cmしか挿入できないことより疑診がもたれ、子宮鏡により診断が確定される。今回、子宮頸管上部が癒着し、強度に狭窄した3症例に子宮鏡による癒着剥離手術を行い、うち1例妊娠に成功したので報告する。

子宮鏡は切離鉗子を装着できる新しい子宮鏡を使用した。子宮腔の拡張には32%デキストラン液を用いた。子宮鏡による癒着剥離手術は腹腔鏡、あるいは超音波断層法で子宮鏡の方向を確認しながら行なった。術後1カ月間は再癒着防止のためIUDを挿入した。

子宮鏡による癒着剥離手術は開腹手術による方法と比べより確実で、出血も少なく、患者への負担も少ないなど、今後大いに試みられるべき治療法と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 347-351, 1992)

緒言

子宮頸管、特にその上部が強度に癒着し狭窄している症例では月経血の流出はあるものの、子宮消息子は挿入できない。したがって、配偶者間人工授精(AIH)などの治療もできない。本症は子宮卵管造影(HSG)などで疑診がもたれ、子宮鏡により確定診断がなされる。本症の治療は手術的に子宮頸管内膜の癒着を剥離することになるが、盲目的操作では子宮穿孔、血管損傷などの危険がある。今回、我々は鉗子を装着できる新しい子宮鏡を用い、子宮頸部癒着症の3例に治療を試みたので報告する。

対象と方法

対象は秋田大学病院産婦人科、および秋田組合総合病院産婦人科不妊外来を受診した3例である。

3症例の手術は硬膜外麻酔、静脈麻酔の併用下に行なわれた。すなわち、腰部第2、第3椎体間の硬膜外で下向きに0.25%マーカイン15mlを、上向きに0.5%マーカイン6mlを注入後、持続硬膜外チューブを挿入した。さらに静脈麻酔としてドロペリドール5mg、ペンタゾシン30mgを側管より緩徐に注入した。また鼻腔マスク下に酸素3L/分、笑気3L/分の吸入ガス麻酔を併用した。

用いた子宮鏡は3種類である。観察用子宮鏡には硬性子宮鏡(オリンパス光学工業、東京)、軟性子宮

鏡 (フジノン HYS-FT; 富士写真光機, 埼玉) を, 手術用子宮鏡には切離鉗子を装着できる子宮鏡 (新興光器製作所, 東京) を用いた (図 1)¹⁾. このテレスコプの直径は 6.8 X 5.0 mm, 長さ 330 mm, 視野角 50°, 視野方向 0° でロッドレンズを使用している. これに鉗子を装着し, 外套 (直径 7.5 mm) 下に挿入するものである. 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は 10% グルコース液を, 硬性子宮鏡検査時には 32% テキストラン液 (キセラン®; シオノギ製薬, 大阪) を用いた.

結 果

症例 1 Y. S. (30 歳) 0 妊 0 産

昭和 58 年に結婚. 以来不妊のため某医を受診, ヒューナーテスト不良, 乏精子症の診断で AIH を計 6 回受けた. しかし, 妊娠せず昭和 63 年 5 月当科を紹介された. 前医で施行した HSG では子宮頸上部で約 1 cm にわたり頸管は強度に狭窄し, 癒着が疑われた (図 2, 左図). 24 時間後の像では左右附属器周囲に軽度の造影剤の貯留がみられ, 附属器の癒着が疑われた. このため腹腔鏡, 子宮鏡による診断・治療が試みられた.

手術は始めに腹腔鏡を行なった. 子宮は超鶏卵大と軽度に腫大し, 子宮体部左後壁に母指頭大の筋腫結節を認めた. 右卵管は峽部で約 3 cm にわたり周囲腹膜と癒着していた. しかし, 左卵管, 左右卵巣は正常であった. 癒着部位は補助鉗子で鋭的に剝離した. 次に子宮鏡を施行した. 子宮鏡は約 4 cm 挿入可能であったが, 頸管は図 3 に示すように強度に狭窄, 周囲血管は怒張し, 以前の炎症の存在を示唆した. 灌流圧を高めることにより頸管の方向を徐々にはっきりと確認できた (図 4, 5). ついで切離鉗子を挿入, 癒着部位を切断した. 子宮体部内膜は全く正常であった (図 6). 手術終了に際し, 子宮内避妊器具

(IUD) を 1 カ月間挿入した. 術後 2 カ月目の HSG では子宮頸上部はやや狭窄はあるものの著明に改善していた (図 2, 右).

症例 2 T. S. (35 歳) 0 妊 0 産

結婚は昭和 48 年 3 月, 昭和 62 年より某医で高度の乏精子症のため AIH を 3 回施行した. しかし, 妊娠せず昭和 63 年 9 月当科を受診した. HSG では子宮頸上部で約 1 cm の範囲で強度の狭窄を認めた (図 7, 左). 24 時間後の造影剤の拡散は比較的良好であった. 他に異常所見はなく, 手術目的で入院となった.

腹腔鏡では骨盤内臓器に特に異常所見はなかったため, 腹腔鏡下に監視しながら子宮鏡を行った. 子宮鏡を挿入してみると, 外子宮口より約 4 cm の部位で子宮頸管はほぼ閉鎖し, 内膜も肥厚していた (図 8). 灌流圧を高めることでようやく強度に狭窄した頸管を確認し得た (図 9). そこで切離鉗子を挿入, あまり抵抗のない繊維性の癒着部位を切断した (図 10). 子宮体部は正常であった (図 11). 最後に子宮頸管上部に IUD を挿入し, 手術を終了した. 術後 1 カ月目に IUD を抜去した. 術後 3 カ月目にとった HSG では頸上部の狭窄は著明に改善していた (図 7, 右).

症例 3 Y. S. (31 歳) 1 妊 1 産

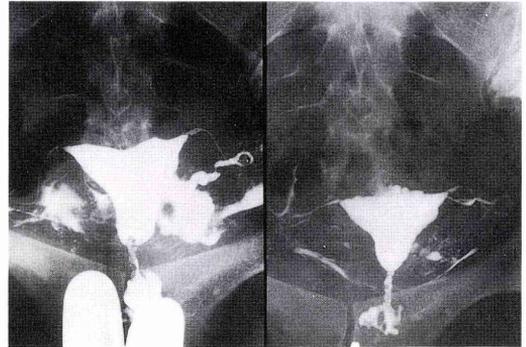


図 2 症例 1. 左; 治療前, 右; 治療後.

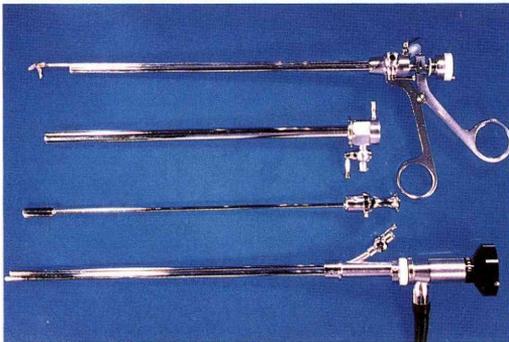


図 1 鉗子内蔵型の子宮鏡.

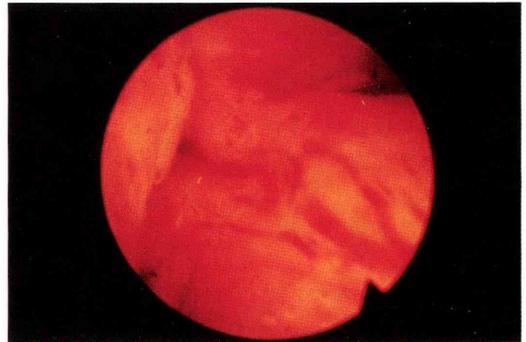


図 3 症例 1. 子宮頸部内膜の血管怒張像.

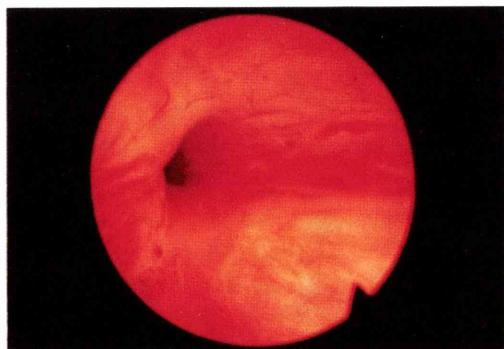


図 4 症例 1. 灌流圧をやや上げた時の子宮頸管.

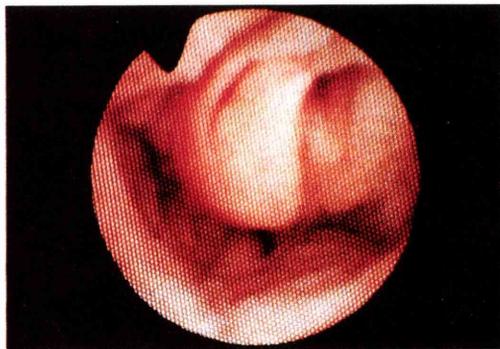


図 8 症例 2. 軟性子宮鏡でみた子宮鏡頸管癒着部.

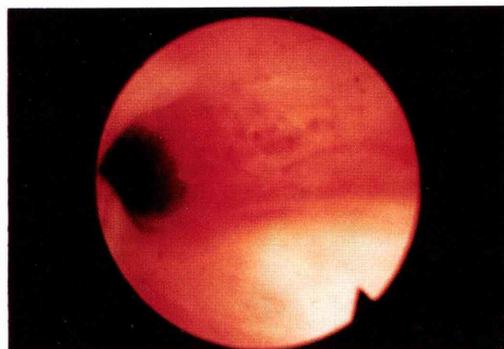


図 5 症例 1. 灌流圧を強く上げた時の子宮頸管.



図 9 症例 2. かるうじて確認された子宮頸管.

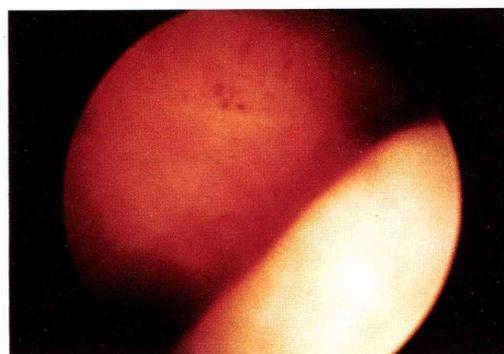


図 6 症例 1. 切離直後の子宮体部内膜.



図 10 症例 2. 頸管癒着部を切断した直後.

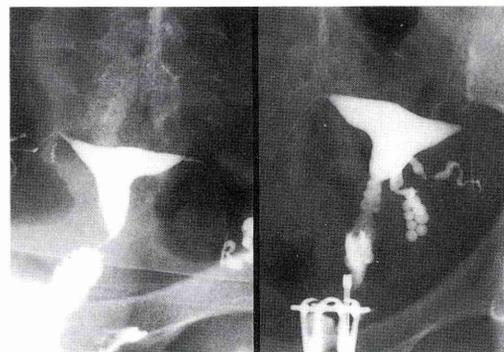


図 7 症例 2. 左;治療前, 右;治療後.

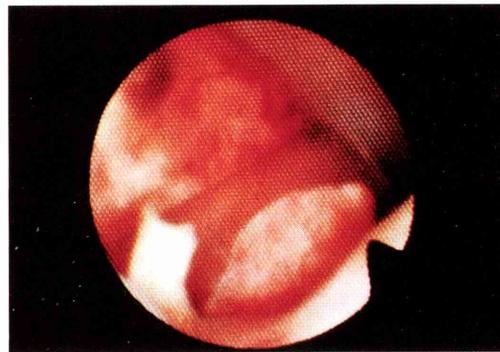


図 11 症例 2. 切離直後の子宮体部内膜.

本症例は続発性不妊症である。昭和 57 年女児を自然分娩している。分娩後より月経痛、過多月経、頻発月経が次第に増強した。その後妊娠せず某医で黄体機能不全症、乏精子症の診断で、ホルモン療法、AIH を行ったが妊娠しなかった。そこで昭和 60 年不妊外来を受診した。HSG、超音波断層法、双合診より腹腔内癒着、子宮内膜症性嚢胞の存在が疑われた。さらに人工授精針を挿入できないことから子宮頸部癒着症を疑い、精査・治療の目的で入院となった。入院時の検査では末梢血中 CA 125 は 62 U/ml、CA 19-9 は 39 U/ml と軽度に上昇していた。右卵巣は 74×59 mm、左卵巣は 48×33 mm と多房性に腫大していた。

開腹してみると右卵巣は鶏卵大、左卵巣は鳩卵大に腫大し周囲腹膜に慢性性に癒着しており、R-AFS 分類では III 期であった。両側卵巣の子宮内膜症性嚢胞を核出、癒着をすべて剥離した。次に子宮鏡による子宮頸部の癒着剥離を行った。癒着部位は外子宮口より約 3 cm の位置からであった。頸管は強度の狭窄のためわかりにくかった。切離鉗子を挿入し、約 3 cm 切断すると正常の子宮体部内膜を確認できた。インジゴカルミン 10 ml を注入し、両側卵管の疎通性を確認後子宮頸管上部に IUD を挿入した。最後にダグラス窩にキセラン 100 ml を散布し手術を終了した。術後 1 カ月目に IUD を抜去した。本症例は術後 3 カ月目に自然排卵で妊娠し、妊娠 38 週で男児を自然分娩した。

考 察

子宮腔癒着症、いわゆる Asherman 症候群のうち子宮頸部癒着症は意外と少なく、報告もほとんどみられない。頸部が強度に癒着し狭窄している症例では月経血の流血はあるものの、子宮消息子は入らず、AIH などの治療が不可能になる。本症の診断は HSG などで疑診がもたれ、子宮鏡により確定診断される。しかし、一般に月経血の流出はあるため、見逃されやすい。

本症の治療は手術的に子宮内膜の癒着を剥離することになるが、盲目的操作では子宮穿孔、ひいては腸管・動静脈損傷の危険がある。例えば、ヘガールによる鈍的剥離の方法がある。しかし、本法は癒着部の切離が十分なされず、再狭窄が起こりやすく不確実である。また、開腹後子宮を切開し、癒着部位を切離する方法がある²⁾。しかし、本法は患者への侵襲が大きく、術後子宮表面などへの再癒着の可能性があり、新たな不妊原因を作り得る。また、妊娠し得ても分娩時子宮破裂の危険性も否定できない。

子宮鏡による癒着剥離手術では腹腔鏡や超音波断層法を併用するため開腹手術の必要性がなく、患者への侵襲・負担が大幅に軽減される。子宮内、特に体部の部分癒着や中隔、筋腫結節などの切離・切除などではその部位がよく見えるため、子宮鏡による手術がよく行われている³⁻⁷⁾。しかし、子宮消息子やヘガールの挿入ができない強度の頸部癒着症に対して、子宮鏡による有効な治療法は我々の知る限りではみられない。これは鉗子などの操作を奥に向けて操作するため、危険を伴うと考えられるからである。今回、我々は症例に応じ、腹腔鏡や超音波断層法を併用しリアルタイムに鉗子の先端を確認しつつ、手術を行なった。特に頸部の場合、体部での操作と異なり超音波断層法を駆使することにより、より明確に鉗子の位置を確認し得た。

本法による手術の合併症として出血、子宮穿孔、腸管損傷、動・静脈損傷、感染などの危険が考えられる。しかし、子宮鏡やその鉗子のモニターを行い、術後抗生物質を十分に投与することでこれらの危険は避け得ると考えられた。

文 献

- 1) 福島峰子, 秋山康夫: 腹腔鏡と子宮鏡を組み合わせて行った子宮中隔手術の経験, 日産婦内視鏡誌, 2, 3: 18, 1987
- 2) 百瀬和夫: 外傷性子宮腔癒着症と不妊, 産婦人科 Mook 5, 不妊の診断と治療 (坂元正一ら編), p 135, 金原出版, 東京, 1979
- 3) 杉本 修: Hysteroscopy (6), 外傷性子宮腔癒着症の診断と予後追跡, 産婦治療, 24: 457, 1972
- 4) 林 保良, 宮本尚彦, 友松守彦, 齊藤寿一郎, 栗林 靖, 鄭 琿琿, 関 賢一, 岩田嘉行: 新しい婦人用レゼクトスコープの開発—経頸管的切除術 (TCR) および子宮内膜破壊術 (EA) への応用—, 日産婦内視鏡誌, 4: 56, 1988
- 5) Edstrom, K.: Intrauterine surgical procedures during hysteroscopy, Endoscopy, 6: 175, 1974
- 6) March, C. M., Israel, R. and March, A. D.: Hysteroscopic management of intrauterine adhesions, Am. J. Obstet. Gynecol., 130: 653, 1978
- 7) Siegler, A. M. and Kontopoulos, V. G.: Lysis of intrauterine adhesions under hysteroscopic control: A report of 25 operations, J. Reprod. Med., 26: 372, 1981

Lysis of cervical adhesion by hysteroscopy

Hiroataka Ota

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

Mineko Fukushima

Akita University, School of Allied Medicine,
Akita 010, Japan

Cervical adhesion is rare in Asherman's syndrome. The disease is suspected because of the difficulty in insertion of the probe or the findings from hysterosalpingography. We performed lysis of cervical adhesion using hysteroscopy in 3 cases, in which one woman succeeded in pregnancy.

We used a new-type hysteroscope with rigid scissors available through the sheath. The operation was monitored by laparoscopy and/or ultrasonography. The patients were inserted IUD after operation for a month.

Adhesiolysis by hysteroscopy reduces risk such as bleeding, adhesion or perforation. We believe this technique should be more employed.

(受付：1991年6月21日)

CORRELATION BETWEEN SPERM CONCENTRATION AND MIGRATION DISTANCE IN BOVINE CERVICAL MUCUS

Toshio UTSUGI, Yoshikazu NAKAJIMA and Yoshito IBUKI

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

Abstract: In sperm migration test using bovine cervical mucus, concentration dependency was observed in six normozoospermic samples. The sperm migrated distance was 58.6 ± 3.4 mm (MEAN \pm SE) in 160×10^6 /ml, 56.4 ± 3.5 mm in 80×10^6 /ml, 50.8 ± 6.2 mm in 40×10^6 /ml, 43.0 ± 4.2 mm in 20×10^6 /ml, 33.6 ± 5.4 mm in 10×10^6 /ml and 20.3 ± 3.3 mm in 5×10^6 /ml respectively. The same tendency was also observed in the oligozoospermic samples. In sperm migration distance test, the sperm concentration should be taken into account.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 352–355, 1992)

Introduction

Among various conventional sperm function tests, motility is considered better factor for the prediction of male fertility than other ones, such as semen volume, concentration, pH, morphology and round cell count per field. It is also considered that motility has strong correlation with sperm concentration. However, accurate and objective evaluation of sperm motility and concentration is not easy without expensive automatic sperm analyzer¹⁾. Recently, bovine cervical mucus (BCM) is utilized to measure the sperm migration distance, as an approach for sperm motility assessment for the substitute for Huhner test²⁾ or slide technique test^{1,2)} or Kremer test³⁾ with human cervical mucus. This test is reported to be not only easy, simple and inexpensive, but also well correlated with sperm motility function^{4–7)}, because BCM is remarkably similar to midcycle human cervical mucus in its biochemical composition, viscoelasticity and ferning⁸⁾. Furthermore human sperm penetrate BCM and display a pattern of movement very similar to that in human

midcycle cervical mucus^{9–11)}. In this study, the washed sperm migration distance was measured in BCM (PENETRAK, SERONO JAPAN), and the relationship between migration distance and sperm concentration was evaluated in six normozoospermic samples. Moreover, oligozoospermic samples were studied in the same way.

Material and method

Study I. Human semen samples were obtained by masturbation from six patients, undergoing fertility evaluation and treatment in our clinic, and analyzed by Makler counting chamber for manual analysis in the conventional way after more than 30 minutes liquefaction. All samples were normozoospermic concentration more than 20×10^6 /ml, the results are shown in Table 1. First, 0.2ml of the original semen was used for the PENETRAK test without sperm washing. Secondly, to get the washed sperm, three times in volume of human tubal fluid (HTF) medium¹³⁾ was added to the rest of the semen. The semen was well mixed with medium by vortex, then centrifuged 300xg for 15 minutes. Supernatant

Table 1 Results of semen analysis of six normozoospermic patients.
(Motility is the value of progressive, nonprogressive and static sperm percent)

	abstinence (days)	semen volume (ml)	concentration ($\times 10^4/\text{ml}$)	motility (%)	abnormality (%)	WBC/F	PENETRAK (mm)
1. T . Y .	3	4.0	11400	61- 9 -30	5	10	57, 47
2. K . Y .	4	5.5	8600	44- 6 -50	23	2	53, 55
3. E . T .	8	4.5	5300	19- 9 -72	17	2	43, 61
4. M . R .	2	2.5	2900	24- 3 -73	14	15	65, 45
5. K . T .	5	3.5	10800	47- 2 -51	12	1	44, 47
6. T . N .	4	3.0	8500	25- 5 -70	18	1	65, 46

Table 2 Results of semen analysis of six oligozoospermic patients.

	abstinence (days)	semen volume (ml)	concentration ($\times 10^4/\text{ml}$)	motility (%)	abnormality (%)	WBC/F	PENETRAK (mm)
1. K . M .	3	4.5	240	8- 8-84	25	2	27, 23
2. I . I .	10	7.0	800	26-37-37	12	many	56, 58
3. F . M .	7	4.0	350	11- 3-86	20	1	28, 3
4. S . S .	10	2.5	570	23- 5-72	21	0	8, 5
5. K . K .	6	4.0	330	36- 6-58	18	2	12, 7
6. N . N .	4	6.0	910	41-17-42	19	0	23, 17

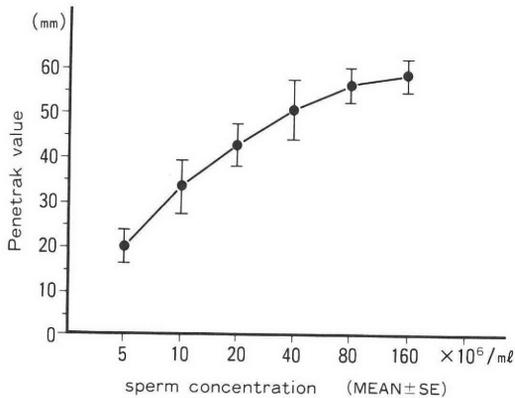


Fig. 1 Correlation between sperm concentration and sperm penetration distance of washed sperm in normozoospermic patients. (N=6)

was discarded and sperm pellet was resuspended at a concentration of $160 \times 10^6/\text{ml}$ by HTF medium. Washed sperm was diluted by serial dilution in order to $5 \times 10^6/\text{ml}$. 0.2ml of washed sperm in each concentration was poured to the well, and two PENETRAKs were placed vertically in the well for 90 minutes in room temperature. Distance sperm migrated was measured under microscope at 100x magnification. The mean value of two PENETRAKs was considered

to be estimated sperm distance in each well.

Study 2. Six oligozoospermic semen samples were examined in the same method mentioned above. Original sperm concentration of all samples were below $10 \times 10^6/\text{ml}$, and semen analysis result is shown in Table 2. The level of maximal sperm concentration after washing was low and different in each sample, the concentration-fold value compared to the original was used instead of washed sperm concentration. Washed sperm was diluted from maximal concentration to the level of $2 \times 10^6/\text{ml}$ around.

Results

In study 1, original unwashed sperm penetrated $52.3 \pm 1.3\text{mm}$ (MEAN \pm SE). Washed sperm penetrated $58.6 \pm 3.4\text{mm}$ ($160 \times 10^6/\text{ml}$), $56.4 \pm 3.5\text{mm}$ ($80 \times 10^6/\text{ml}$), $50.8 \pm 6.2\text{mm}$ ($40 \times 10^6/\text{ml}$), $43.0 \pm 4.2\text{mm}$ ($20 \times 10^6/\text{ml}$), $33.6 \pm 5.4\text{mm}$ ($10 \times 10^6/\text{ml}$) and $20.3 \pm 3.3\text{mm}$ ($5 \times 10^6/\text{ml}$) as shown in figure 1. In study 2, original unwashed sperm penetrated $22.3 \pm 6.8\text{mm}$, and washed sperm penetrated as shown in figure 2 in each concentration-fold compared to the unwashed original concentration.

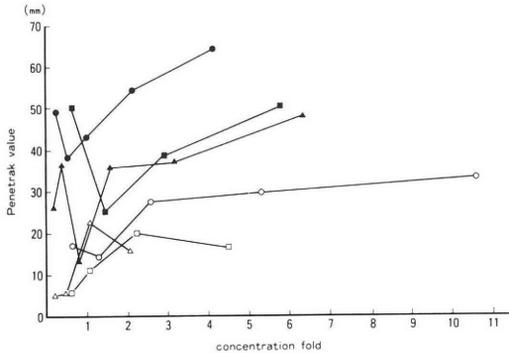


Fig. 2 Correlation between sperm concentration fold and sperm penetration distance in six oligozoospermic patients. The value of concentration fold was calculated compared to the original sperm concentration.

Discussion

In semen analysis, motility is considered as one of the most essential factors of sperm function. Also concentration is an important factor of male fertility function. Compared to sperm concentration, sperm motility is not so easy to evaluate objectively¹⁾. Recently, automated semen analyzer is available with a small aliquot and is considered to judge the sperm motility objectively. However, it is expensive and is not available in any laboratory and outpatients clinic. In our clinic, we can assess sperm motility by postcoital test²⁾ in vivo, and slide technique test¹²⁾ in vitro. These two tests have shortcoming. The results vary depending on the partners' menstrual status. And to overcome this disadvantage, BCM is conveniently used instead of human cervical mucus. Estrous BCM is remarkably similar to midcycle human cervical mucus in its biochemical composition, viscoelasticity, ferning and structure⁸⁾. And human sperm penetrates BCM and moves similarly to that in human cervical mucus¹¹⁾. Moreover, many semen samples are able to be tested at the same time, because a great deal of volume of BCM can be available.

There are several reports showing that sperm penetration distance in BCM and sperm concentration has correlation in different many samples⁵⁻⁷⁾. So we tested the relationship between sperm penetration distance and sperm concentra-

tion by changing the sperm concentration using sperm washing and serial dilution. In study 1, the sperm concentration in normozoospermic infertile patients showed good correlation to sperm penetration distance. When the sperm was diluted below $40 \times 10^6/\text{ml}$, penetration distance decreased dramatically. Unwashed original sperm penetrated $52.3 \pm 1.3\text{mm}$ by mean. This penetration value corresponds with that of $45 \times 10^6/\text{ml}$ concentration in washed sperm. In study 2, the more the concentration, the longer distance was also observed in oligozoospermic infertile patients' sperm. In clinical fields in general 20 or $40 \times 10^6/\text{ml}$ of sperm concentration is used as criteria for male fertility. However, theoretically only one sperm can fertilize an ovum, it is hard to be pregnant in severe oligozoospermic partner in clinic. Sperm migration distance is considered as one of the sperm motility functions, and it is interesting that sperm migration distance is affected by sperm concentration.

References

- 1) Katz, D. F., Overstreet, J. W.: Sperm motility assessment by videomicrography, *Fertil. Steril.*, 35: 188, 1981
- 2) Huhner, M.: Necropermia and viability of spermatozoa in cervical canal, *J. Am. Med. Assoc.*, 107: 1581, 1936
- 3) Kremer, J.: Preliminary report, A simple sperm test, *Int. J. of Fertil.*, 10: 209, 1965
- 4) Alexander, N. J.: Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test, *Fertil. Steril.*, 36: 201, 1981
- 5) Moghissi, K. S., Segal, S., Meinhold, D., Agronow, S. J.: In vitro sperm cervical mucus penetration: studies in human and bovine cervical mucus, *Fertil. Steril.*, 37: 823, 1982
- 6) Moeslein, S., Taubert, H. D.: A comparison of the bovine cervical mucus penetration test and the postcoital test, *Andrologia*, 19: 528, 1987
- 7) Schutte, B.: Penetration ability of human spermatozoa into standardized bovine cervical mucus (PENETRAK) in patients with normal and pathological semensamples, *Andrologia*, 19: 217, 1986
- 8) Lee, W., Blandau, R. J. and Verdugo, P.: Laser light-scattering studies of cervical mucus, in Insler V and Bettendorf G (eds): *The Uterine Cervix in Reproduction*, Thieme Publishers, Stuttgart, 68, 1967

- 9) Bergman, A., Amit, A., David, M. P., Paz, Z. T.: Penetration of human ejaculated spermatozoa into human and bovine cervical mucus, I. Correlation between penetration values, Fertil. Steril., 36: 363, 1981
- 10) Gaddum-Rosse, P., Blandau, R. J., Lee, W. I.: Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II. Human spermatozoa in bovine mucus, Fertil. Steril., 33: 636, 1980
- 11) Blandau, R. J., Gaddum-Rosse, P. and Lee, W. I.: Letter to the editor, Fertil. Steril., 29: 707, 1978
- 12) WHO Report: Laboratory manual for the examination on human semen and semen-cervical mucus interaction, Singapore, Press Concern, 1980
- 13) Quinn, P., Kerin, J. F., Warnes, G. M.: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, Fertil. Steril., 44: 493, 1985

精子濃度と精子移動距離の相関

群馬大学医学部産科婦人科学教室

宇津木利雄 中島敬和 伊吹令人

精子の運動機能を反映するとされているウシ頸管粘液中（ペネトラック）にて、精子濃度と精子移動距離の相関を検討した。2000万/ml以上の精子濃度を有する6症例の精液を、HTFメEDIUMで1回洗浄し、 $160 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整し、倍々希釈にて $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度まで作製した。各濃度の洗浄精液0.2ml中にペネトラックを2本90分間立て、その平均を精子移動距離とした。精子移動距離は濃度依存性が認められ、 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下では濃度減少に従い急速に減少した。一般に精子濃度が多い症例ほど、ペネトラック中の精子移動距離は大きいと言われているが、同じ精液の洗浄精子でも精子濃度が多いほど、精子移動距離が大きくなることが明らかになった。

また、同じ傾向は $10 \times 10^6/\text{ml}$ の乏精子症の6症例においても認められた。人工授精などでは、精子濃度を増加させてから子宮内注入を行うことは意義があると思われる。

(受付：1991年7月25日)

OUTCOME OF PREGNANCY AFTER OVULATION INDUCTION

Mitsuyoshi NAGAE and Motoi SAITO

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

Takahiro KUMASAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Dokkyo
Medical College, Tochigi 321-02, Japan

Abstract: Retrospective studies concerning gestational outcome were performed on 153 pregnancies following ovulation induction (OI). These were compared with 641 control pregnancies following spontaneous ovulation (SO).

(1) OI showed a higher tendency to abort, and an increased incidence of multiple pregnancy, especially when human menopausal gonadotropin (hMG) was used, which showed a 33.3% rate of abortion and a 12.5% rate of multiple pregnancy, both of which were significantly higher than those rates for SO ($P < 0.001$ & $P < 0.01$).

(2) The effects of maternal age on the incidence of abortion and multiple pregnancies showed no difference among age groups or between OI and SO.

(3) The actualization of abortion in threatened abortors was significantly higher in OI than SO (70.0% vs 33.1%, $P < 0.001$), especially in hMG (88.9% vs 33.1%, $P < 0.005$) and clomiphene (58.7% vs 33.1%, $P < 0.05$).

(4) On obstetric history, primary or secondary infertility showed no resulting differences, but habitual abortion resulted in a 15.4% rate of premature delivery, which is significantly higher than that for primary infertility ($P < 0.05$).

(Jpn. J. Fertil. Steril., 37 (2), 356-361, 1992)

Introduction

There have been many reports regarding abortion rates and/or multiple pregnancy rates, in both spontaneous and induced conception under various conditions. Almost all of them reported that fetal loss and multiple pregnancy rates were increased in ovulation induction.

Therefore, the prognosis of pregnancies following ovulation induction is still one of the most important problems in obstetrics. In this study, unfavourable effects of ovulation induction to the

following pregnancy are analyzed retrospectively from various aspects.

Materials and Methods

Subjects studied were 153 pregnant women who, underwent four kinds of ovulation induction as treatment for infertility at Tokyo Medical and Dental University Hospital, Department of OB/GYN (between 1982 and 1987). As a control group, 641 pregnant women, whose pregnancies followed spontaneous ovulation during the same period, were recruited to investigate the effects of ovula-

tion induction on gestational outcome. The subjects had various infertility disorders, including ovarian insufficiency, tubal problems, male factors and so on. Studies were made on abortion rates (before 23 weeks and 6 days of gestation), preterm delivery (between 24 weeks and 36 weeks and 6 days), term delivery (36 weeks or more), and the incidences of ectopic and multiple pregnancies. The subjects were classified into four groups according to their age, and the effects of the maternal age factor were studied. Furthermore, the history of primary, secondary infertility and habitual abortion (which is defined as three consecutive abortions), and the gestational outcome of cases in which the subjects showed symptoms of threatened abortion with genital bleeding possibly accompanied by cramping pain were also analyzed. All study and control subjects recorded basal body temperature (BBT) charts. A chi-square test was used for statistical analysis. The method of Yates was applied when the number of subjects was small.

Results

Ovulation induction using hMG resulted in a significantly high incidence of abortion in comparison to both the spontaneous ovulation (33.3% vs. 10.1%, $P < 0.001$) and the clomid/sexovid group (33.3% vs. 11.4%, $P < 0.01$). Ovulation induction also resulted in a significantly high incidence of multiple pregnancies in comparison to spontaneous ovulation (12.5% vs. 1.2%, $P < 0.001$). All patients who underwent ovulation induction utilizing LH-RH analogue, although few, resulted in a good gestational outcome. Pregnancies utilizing CB-154 (bromocriptine) showed no significantly different results when compared to the control and other groups (Table 1).

Effects of maternal age on the incidence of abortion were studied among those who underwent ovulation induction or spontaneous ovulation, as well as the four age groups. There were no significant differences among the 4 age groups or between those who underwent ovulation induc-

Table 1 Effects of ovulation induction on gestational outcome

	Outcome No of cases	Abortion (~23W6D)	Preterm (24W~36W6D)	Term (37W~)	Ectopic pregnancy	Multiple pregnancy
Induced Ovulation	153	15.0%	2.6%	80.3%	1.3%	3.3%
Ⓐ Gonadotropins (HMG)	24	33.3%***	0 %	66.4%	0 %	12.5%*
Ⓑ Clomid or Sexovid	114	11.4%	3.5%	83.3%	0.9%	1.8%
Ⓒ CB-154	10	20.0%	0 %	70.0%	10.0%	0 %
Ⓓ LH-RH etc	5	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %
Spontaneous Ovulation <Control>	641	10.1%	6.9%	80.1%	1.4%	1.2%

* $P < 0.001$ vs Control by chi-square test

** $P < 0.01$ vs Ⓑ by chi-square test

Table 2 Effects of maternal age on abortion incidence

Age	Induced Ovulation	Spontaneous Ovulation
① 20~24	0 % (0/8 cases)	2.2% (1/45 cases)
② 25~29	16.9% (12/71)	12.8% (40/312)
③ 30~34	13.5% (7/52)	10.1% (22/218)
④ 35~	9.1% (2/22)	6.1% (4/66)

Table 3 Effects of maternal age on the incidence of multiple pregnancy

Age	Induced Ovulation	Spontaneous Ovulation
① 20~24	12.5% (1/8)	2.2% (1/45)
② 25~29	2.8% (2/71)	0.3% (1/312)
③ 30~34	0 % (0/52)	0 % (0/218)
④ 35~	4.5% (1/22)	0 % (0/66)

Table 4 Effects of obstetric history on gestational outcome

Obstetric History \ Outcome	Abortion	Preterm	Multiple pregnancy
Primary Infertility	11.4% (10/88)	3.4% ^a (3/88)	2.3% (2/88)
Secondary Infertility	10.3% (4/39)	2.6% (1/39)	0 % (0/39)
Habitual Abortion	15.4% (4/26)	15.4% ^β (4/26)	0 % (0/26)
Control	10.1% (65/641)	6.9% (44/641)	1.2% (8/641)

^aP < 0.05 vs ^β

tion and those who had spontaneous ovulation (Table 2). Effects of maternal age on the incidence of multiple pregnancy were also analyzed, no significant differences were found between those underwent ovulation induction and spontaneous ovulation (Table 3). The history of primary or secondary infertility or habitual abortion was taken into consideration when examining the incidences of abortion, preterm delivery and multiple pregnancies. The incidence of the preterm delivery rate was significantly lower in the primary infertility group than habitual abortion group (3.4% vs 15.4%, P < 0.05) (Table 4).

Although threatened abortion was observed in ovulation induction as well as spontaneous ovulation groups, threatened abortion rate itself showed no significant difference between ovulation induction and spontaneous ovulation. However, the outcome of threatened abortion of ovulation induction was significantly poorer than that of spontaneous ovulation (70.0% vs. 33.1%, P < 0.001), hMG vs spontaneous ovulation (88.9% vs. 33.1%, P < 0.005) and clomid/sexovid vs. spontaneous ovulation (58.7% vs. 33.1%, P < 0.05) (Table 5).

Discussion

It is well known that women with a history of infertility have a higher mean age, a low parity, more spontaneous abortions, extra-uterine pregnancies and still births than women without a history of infertility¹⁾. Moreover, ovulation induction using hMG apparently causes an increased incidence of both spontaneous abortion and multi-

Table 5 Outcome of threatened abortion ; Comparison between spontaneous ovulation and induced ovulation

	Threatened Abortion / Pregnancy	Poor Outcome / Threatened Abortion
Induced Ovulation	32.7% (50/153 cases)	70.0% ^{***} (35/50 cases)
Gonadotropins (HMG)	37.5% (9/24)	88.9% ^{**} (8/9)
Clomid or Sexovid	25.4% (29/114)	58.6% [*] (17/29)
Spontaneous Ovulation <Control>	27.8% (178/641)	33.1% (59/178)

* P < 0.05 vs Control by chi-square test

** P < 0.005 vs Control by chi-square test

*** P < 0.001 vs Control by chi-square test

ple pregnancy, even when compared with ovulation induction using clomiphene/sexovid. Regarding these data, although numerous studies have been published, Adashi, et al²⁾, reported a 26.5% spontaneous abortion rate and a 12.8% multiple pregnancy rate in 86 clomiphene related conceptions. In our data on the clomiphene/sexovid group, the abortion rate was 11.4% and the multiple pregnancy rate was 1.8%, both of which were far lower than those cited by Adashi. Regarding clomiphene related conceptions, Japanese studies have generally reported a lower incidence of spontaneous abortion than either American or European studies. However, this may be due to differences in the dose administered, the method of administration, and the racial factor. On the other hand, Schenker, et al.³⁾, after having reviewed 154 articles, concluded that the incidence of multiple pregnancy was approximately 6% in clomiphene-treated conceptions and 20-30% in hMG treated conceptions. Other authors have reported abortion rate of 17%-31% in hMG treated pregnancies.⁴⁻⁹⁾ Our data for hMG related conceptions were compatible with these figures. According to interesting data reported by Ben-Rafael, et al.¹⁰⁾ a 28.5% abortion rate was observed in 203 first conceptions following hMG treatment, and a 11.9% abortion rate was observed in

84 women who conceived a second time with hMG treatment. We speculated on several causative factors, such as endometrial insufficiency due to prolonged periods of infertility or the imbalance of hormonal milieu. Campana, et al.¹¹⁾ insist that the principal cause of abortion proved to be an existing corpus luteum deficiency and/or former menstrual disorders.

Deutinger, et al.¹²⁾ investigated 37 pregnancies after in vitro fertilization utilizing hMG, and reported that 16 aborted: 9 as clinical abortions and 7 as biochemical abortions, as detected by the continuous measurement of beta-hCG. Thus, there is a probability that the high incidence of abortion in ovulation induction is due in part to biochemical abortion. In our daily outpatient practices, we pay far more attention to ovulation induction patients, especially hMG treated patients, than to ordinary patients, whose biochemical abortions can easily be overlooked.

The most striking finding of this study is that once symptoms of a threatened abortion appear in early pregnancy after ovulation induction, the prognosis becomes very poor. Speculating on this etiology is perplexing but this threatened abortion may be due to atrophy of the endometrium¹³⁾ and/or luteal insufficiency^{11,14)}, because in principle, ovulation induction by hMG is common in cases of severe hypogonadotropic hypogonadism or primary infertility. From these data, we recommend intensive care for detecting preclinical signs of threatened abortion in early pregnancy after ovulation induction: for example, low urinary hCG and low serum progesterone levels. So intensive luteal support by hCG should be done. This concept is also emphasized by Buvat, et al.¹⁵⁾ for pregnancies after ovulation induction by luteinizing hormone releasing hormone. On the other hand, Kadar, et al.¹⁶⁾ reported that measurement of the doubling time of serum hCG is significant in early asymptomatic pregnancy. A poor hormonal environment is a major concern in programs for fertilization by ovulation induction where early pregnancy loss may be more common than in a natural conception cycle¹⁷⁾. Recent field studies found that more than one fifth of the pregnancies detected by such a sensitive hCG assay were lost before being

recognized by the women¹⁷⁾. Furthermore, Baird, et al.¹⁷⁾ reported that serum hCG tended to be detected later in cycles of early pregnancy loss than in successful conception cycle¹⁸⁾.

Contrary to our expectation, effects of maternal age on gestational outcome were found to be negligible in the present study. It is believed that the incidence of chromosomal anomaly of fetus increases in proportion to maternal age. Therefore, the abortion rate might be expected to increase in elderly pregnant women. Data from Naylor, et al.¹⁹⁾ in a study of 33, 255 cases, showed a higher tendency to abort in the age group over 40, but it was not statistically significant. Our study shows lower abortion rates in the 20-24 years old group than in those over 25. With advancing age, there appears to be a decrease in ovarian response to an increased amount of stimulation, as measured by steroidogenesis and follicular recruitment²⁰⁾. However, at least with regard to multiple pregnancy, our results indicated no significant differences between any age groups. Concerning the effects of obstetric history on gestational outcome following ovulation induction, preterm delivery rates were higher in habitual abortion group than in the primary and secondary infertility groups. This result may be expected, because habitual abortion in the second trimester may be due to cervical insufficiency.

Harrison²¹⁾ suggests the efficacy of hCG in habitual abortion in early pregnancy, and Gerhard, et al.²²⁾ proved the efficacy of progesterone for patients before the 7th gestational week, especially for older and risky pregnant women. Still many reports showed negative data concerning the therapy of threatened abortion in early pregnancy. Recently large doses of hCG and progesterone have been recommended to prevent an abortion after in vitro fertilization, and even beta-mimetic preparations are used as a treatment for threatened abortion in the first trimester.

In conclusion, we also emphasize the necessity of early detection and intensive care of patients with threatened abortion who have undergone ovulation induction.

References

- 1) Ghazi, H. A., Spelberger, C. and Kallen, B.: Delivery outcome after infertility—a registry study, *Fertil. Steril.*, 55: 726, 1991
- 2) Adashi, E. Y., Rock, J. A., Sapp, K. C., Martin, E. J., Wentz, A. C., Jones, G. S.: Gestational outcome of clomiphene-related conceptions, *Fertil. Steril.*, 31: 620, 1979
- 3) Schenker, J. G., Yarkoni, S., Granat, M.: Multiple pregnancies following induction of ovulation, *Fertil. Steril.*, 35: 105, 1981
- 4) Spadoni, L. R., Cox, D. W., Smith, D. C.: Use of human menopausal gonadotropin for the induction of ovulation, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 120: 988, 1974
- 5) Hack, M. B., Brish, M., Serr, D. M., Insler, V., Lunefeld, B.: Outcome of pregnancy after induced ovulation, *JAMA*, 211: 791, 1970
- 6) Marshall, J. R., Wider, J. A.: Results of human menopausal gonadotropins (hMG) therapy for anovulatory infertility using a nonvariable treatment schedule: comparison with previous reports, *Fertil. Steril.*, 22: 19, 1971
- 7) Capsi, E., Levin, S., Bukovsky, J., Weinraube, Z.: Induction of pregnancy with human gonadotropins after clomiphene failure in menstruating ovulatory infertility patients, *Isr. J. Med. Sci.*, 10: 249, 1974
- 8) Schwatz, H., Jewelewicz, R., Dyrenfurth, I., Tropper, P., Vande-Wiele, R. L.: The use of human menopausal and chorionic gonadotropin for induction of ovulation, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138: 801, 1980
- 9) Ben-Rafael, Z., Mashiach, S., Oelsner, G., Farine, D., Lunerfeld, B., Serr, D. M.: Spontaneous pregnancy and its outcome after human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin-induced pregnancy, *Fertil. Steril.*, 36: 560, 1981
- 10) Ben-Rafael, Z., Dor, J., Maschiach, S., Blankstein, J., Lunefeld, B., Serr, D. M.: Abortion rate in pregnancies following ovulation induced by human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin, *Fertil. Steril.*, 39: 157, 1983
- 11) Campana, A., Gurtner, P., Schwarz, W., Stamm, O.: Abortfrequenz und Abortursachen bei Schwangerschaften nach heterologen Inseminationen, *Geburtsh u Frauenheilk.*, 36: 421, 1976
- 12) Deutinger, J., Neumrk, J., Reinhaller, A., Riss, P., Muller-Tyl, E., Fschl, F., Bieglmayer, C., Janisch, H.: Pregnancy-specific parameters in early pregnancies after in vitro fertilization: prediction of the course of pregnancy, *Fertil. Steril.*, 46: 77, 1986
- 13) Tanaka, T., Fujimoto, F., Sakuragi, N., Ichinoe, K.: Correlation between dosage or duration of clomid therapy and abortion rate, *Int. J. Fertil.*, 24: 193, 1979
- 14) Weinberg, C. R. and Wilcox, A. J.: Induce rate of implantation in “nonpregnant” patients, *Fertil. Steril.*, 50a: 993, 1988
- 15) Buvate, J., Herbaut, J. C., Marcoli, G., Louvet, A. L., Guittard, C. and Dehaene, J. C.: Luteal support after luteizing hormone-releasing hormone agonist for in vitro fertilization: superiority of human chorionic gonadotropin over progesterone, *Fertil. Steril.*, 53: 490, 1990
- 16) Kadar, N., Freedman, M. and Zacher, M.: Further observation on the doubling time of human chorionic gonadotropin in early asymptomatic pregnancy, *Fertil. Steril.*, 54: 783, 1990
- 17) Baird, D. D., Weinberg, C. R., Wilcox, A. J., McConnaughey, D. R., Musey, P. I. and Collins, D. C.: Hormonal profile of natural conception cycle ending in early, unrecognized pregnancy loss, *J. Clin. Endocrinol. metab.*, 72: 793, 1991
- 18) Wilcox, A. J., Weinberg, C. R. and OCnner, J. F.: Incidence of early loss of pregnancy, *N. Engl. J. Med.*, 319: 198, 1988
- 19) Naylor, A. F.: Sequential aspects of spontaneous abortion: maternal age, parity and pregnancy compensation artifact, *Soc. Biol. Summer.*, 21: 195, 1974
- 20) Jacobs, S. L., Metger, D. A., Dodson, W. C. and Haney, A. F.: Effect of age on response to human menopausal gonadotropin stimulation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71: 1625, 1990
- 21) Harrison, R. F.: Treatment of habitual abortion with human chorionic gonadotropin: results of open and placebo-controlled studies, *Europ J. Obstet. Gynec. reprod. Biol.*, 20: 159, 1985
- 22) Gerhard, I., Gwinner, B., Eggert-Kruse, W., Runnebaum, B.: Double-blind controlled trial of progesterone substitution in threatened abortion, *Biological Reserch in Pregnancy*, 8: 26, 1987

排卵誘発による妊娠の予後

東京医科歯科大学産婦人科学教室

長江光芳 齊藤 幹

独協医科大学産婦人科学教室

熊坂高弘

排卵誘発 (OI) 後の 153 例の妊娠に対し、自然排卵 (SO) 後の 641 例の妊娠を対照として、妊娠転帰に関するレトロスペクティブな研究をした。(1) OI は高い流産傾向と双胎率を示した。特に hMG 使用群では各々 33.3%、12.5% を示し両数値とも SO に比し有意に高

値であった($P < 0.00$ & $P < 0.01$)。 (2)流産率, 多胎率に対する母体年齢の影響をみると, 各年齢層間で, OIとSOとの比較でも差異はなかった。(3)切迫流産例の中で実際に流産となった率はOIがSOに比し高く(70.0% vs 33.1%, $P < 0.001$), 特にhMG(88.9% vs 33.1%, $P < 0.005$)とクロミフェン(58.7% vs 33.1%, $P < 0.05$)で高い。(4)産科既往歴では原発不妊と続発

不妊は差異が見られなかったが, 習慣性流産では15.4%の早産率を示し, 原発不妊に比し有意($P < 0.05$)に高かった。

(受付: 1991年10月19日特掲)

地方部会講演抄録

平成3年度日本不妊学会
東北支部総会学術講演会

日 時：平成3年11月2日（土）
会 場：山形グランドホテル

1. 子宮内膜の厚さが妊孕性に及ぼす影響

齊藤英和・佐藤文彦・平山寿雄
椎名有二・杉内明子・齊藤隆和
(山形大産婦)

子宮の内膜は発育してきた胚が着床する部位であり、妊孕性にとって重要な要素の1つである。今回我々はhMG中止日の子宮内膜の厚さより、妊孕性について検討した。

子宮内膜の厚さを < 6 mm, $6 \leq < 8$, $8 \leq < 10$, $10 \leq < 12$, $12 \leq < 14$, $14 \leq$ の6群に分け検討すると、検討周期1576周期中460周期が $8 \leq < 10$ で、最も高頻度であった。年齢は < 6 の群で最高値を示し、35.9歳であった。

採卵数は内膜が厚くなるにつれて多くなり、 $8 \leq < 10$ 群で4.3個とほぼプラトーに達した。受精卵数でも $8 \leq < 10$ で平均2.0個と、ほぼプラトーに達した。妊娠は6mm以上の群に認め、内膜の厚さが厚くなるにつれて妊娠率も高くなり、内膜の厚さが14mm以上において32%の妊娠率であった。また、妊娠継続率においては、どの群間にも有意な差は認めなかった。

よって、子宮内膜の厚さは、その厚さが厚くなる程、胚の着床環境としてはよい状態になると考えられた。

2. 不妊症における尿中LH簡易測定キットの臨床的検討

木原香織・太田信彦・沼崎政良
小田隆晴（山形県立河北病院産婦）

正常排卵周期を有する不妊婦人39名、48周期を対象に、簡易EIA法によるゴナール「LH」キットを用い、検出感度20mIU/mlの尿中LHを測定し、その基礎的、臨床的検討を行なった。

本キットの同時再現性は良好で、HCG 100mIU/ml、TSH 0.1mIU/mlでは交叉反応は認められず、血中LHとも有意な相関 ($r=0.7743$) を認めた。排卵

日での早朝尿の20mIU/mlのLH陽性率は97.9%と高率で、30mIU/mlでは50%、40mIU/mlでは16.7%であった。早朝尿20mIU/ml陽性時の卵胞径は平均 18.3 ± 1.7 mm、子宮内膜の厚さは平均 10.4 ± 1.5 mm、頸管粘液スコアは平均 8.3 ± 0.9 点、血中LHは平均 40.7 ± 4.1 mIU/ml、血中 E_2 は平均 286.2 ± 12.6 pg/mlであり、陽性日より48時間以内に全例卵胞の消失を確認した。

以上より、自然排卵周期では、卵胞径15mmの時点で低感度の本法で早朝尿を測定することにより排卵予知が可能で、今後不妊症患者への応用が期待される。

3. 難治性無排卵症に対するブセレリンの併用

寺田幸広・渡辺 正・田村みどり
陳 偉業・千田定則・村上 節
萬代泰男・戸沢秀夫・対木 章
C. マンスフィールド・深谷孝夫
矢嶋敬一（東北大産婦）
星 敬一（竹田総合病院）

今回我々は、高ゴナドトロピン値を示す無排卵症例つまりPOF例に対し、Gn-RH analog（ブセレリン）を併用した排卵誘発を試みたので、その経過を報告した。

POF 3例に対して、ブセレリン $900 \mu\text{g}/\text{day}$ を1~2か月投与し、内因性のゴナドトロピンレベルを抑制したのち、FSH製剤の大量投与を行なったが、数回僅かな反応があったのみで、有効な排卵誘発までにはいたらなかった。今回の経過中2例にブセレリン連日投与にもかかわらずゴナドトロピンレベルの下降が芳しくない事が目立った。

今回の経験では、このようなPOF例に対してはホルモン療法だけではどうしても限界がある事が感じられた。今後の展望としては、免疫抑制療法の確立等が考えられるが、どうしても治療抵抗性で開腹卵巣生検にても原始卵胞が見られないような場合のためにdonor-oocyteの使用も前向きに考えてゆかなければならないであろう。

4. 排卵障害患者における男性ホルモンの測定の意義

清水 靖・児玉英也・福田 淳
松井俊彦・武田志保・関根和子
真木正博 (秋田大産婦)

今回、当科不妊外来通院中の排卵障害患者で、明らかな高PRL血症、卵巣性無排卵症を除いた51名、正常の月経周期を有する正常コントロール22名を対照にとり、テストステロン(以下T)、アンドロステネジオン(以下 Δ^4 A)、デハイドロエピアンドロステロンサルフェイト(以下DHEA-S)を測定し、排卵障害患者に対する高アンドロゲン血症の臨床的問題を検討した。

その結果、排卵障害患者51例中少なくとも3種類のアンドロゲンのうち、ひとつが上昇しているものが27例に見られ、その27例を、上昇しているアンドロゲンの種類により卵巣型、副腎型、混合型に分けた。すなわちT、もしくは Δ^4 Aが高値を示すのを卵巣型、DHEA-Sが高値を示すのを副腎型、両者とも高値を示すのを混合型とした。

各群間で、副腎型および混合型の患者は卵巣型と比較して重症の病態を示し、クロミフェン治療に抵抗するものが多かった。

5. 反復卵管妊娠に対してMTX療法を行ない、生児を得た症例

吉崎 陽・小山俊司・井筒俊彦
利部輝雄・西谷 巖
(岩手医大産婦)

最近子宮外妊娠にたいするメソトレキセート(MTX)療法が広く行なわれるようになった。われわれは反復した卵管妊娠にたいしMTX療法を行ない生児を得た症例を経験したので報告する。

患者は初診時27歳、2回の人工妊娠中絶、左卵管妊娠による左卵管切除術、1回の自然流産の既往があった。主訴は無月経、下腹部痛、不正性器出血であった。双合診で右付属器部に母指頭大の腫瘍を触知、超音波断層法で同部にGS様エコーを認めた。尿中hCGは640IU/Lであった。右卵管妊娠と診断し、MTX 15mg/body、レギュラーインスリン4u/bodyを5日間投与した。

尿中hCGは投与後14日でLHレベルに下降した。治療後3か月目に施行したHSGで右卵管の疎通性を確認した。その後28歳、妊娠38週0日、3298g男児を正常分娩、29歳、妊娠34週4日、2070g女児を早産した。児に奇形等の異常はなく発育は正常

である。31歳時、右卵管妊娠破裂で、右卵管切除術を施行された。インスリン併用によりMTX投与等を減少することができた。

6. 子宮卵管造影法の所見と妊娠率について

国井兵太郎 (国井産婦人科病院)

773例の挙児希望の来院者のうち、子宮卵管造影(HSG)を行なって6カ月以上経過を見た301例について子宮、卵管および造影剤の拡散の所見と妊娠率、流産率の相関を見た。

油性造影剤を用いて透視下に撮影を行ない、24時間後の再撮影で拡散を判定した。子宮の所見を正常、小さい、大きい、形態異常、子宮内癒着と分類すると、小さい場合は妊娠率が高かったが($P < 0.05$)、流産率も高く($P < 0.01$)、挙児率に差はなかった。正常な場合は流産率が有意に($P < 0.005$)低かった。

卵管の所見は両側通過、片側のみ通過、両側不通過、両側留水症と分類すると、片側が通れば両側通る場合と妊娠率、挙児率に差はなかった。両側通らない場合は当然ながら妊娠率は低かった($P < 0.005$)。

造影剤の拡散については良、やや良、不良、卵管内残留、通過量の少ないもの、不整拡散の6つに分類すると、拡散不良の群で妊娠率が有意に($P < 0.05$)低かった。

7. 子宮腔内病変に対するヒステロレゼクトスコープの応用

渡辺 正・寺田幸広・田村みどり
千田定則・陳 偉業・村上 節
萬代泰男・戸沢秀夫・村木 章
C. マンスフィールド・深谷孝夫
矢嶋 聡 (東北大産婦)

1) 今回我々は、子宮内腔病変に対してヒステロレゼクトスコープを使用する機会を持ち、若干の症例を経験することができたので報告する。

2) 使用機種はオリンパス社製のヒステロレゼクトスコープで、シースの外径は7mmと細く、持続灌流式であるため、良好な視野のもと操作を進めることが可能であった。

3) 対象期間は平成2年6月より平成3年9月までの間。以下に述べる13例にヒステロレゼクトスコープを使用した。子宮奇形の2例、Asherman syndromeの疑われた5例、筋腫分娩の4例、粘膜下筋腫の2例である。

4) 実際の手技は、全身麻酔下にヒステロレゼクトスコープを挿入し、テレビカメラのモニタリングを併用して処置を行なった。術中は原則として腹腔鏡

を併用して、監視した。

5) 考案；従来、子宮腔内の病変に対するアプローチは経腔的盲目的な操作が主体であった。ヒステロレゼクトスコープの登場は子宮腔内の病変部の診断のみならず、妊孕性を温存した処置を直視下に行なえるという点で、意義の大きい手技であると思われる。今後とも症例数を増やし、新たな工夫と改善を加えて行きたいと思う。

8. 当院における腹腔鏡 578 例の検討

角田千恵子 永井 宏 (向仁会永井病院)

腹腔鏡検査は不妊症のみならず種々の疾患の確定診断、治療方針決定に極めて有用な検査である。

今回我々は平成 2 年までの 7 年間に実施した 578 例 (開腹手術 1334 例の 43.3 % に相当) の検査成績をまとめ検討を行なったので報告する。

施行患者の年齢は、16~55 歳までで、25~29 歳 29.6 %、次いで 30~34 歳が 27.7 % を占めた。主訴別では、不妊が 34.7 %、次いで月経困難症 17.9 %、下腹部膨隆感 16.2 % となっている。不妊症例 237 例は年齢別にみると 30~34 歳が 40.9 %、次いで 25~29 歳 28.9 %、35~39 歳 20.3 % を占めた。腹腔鏡施行後の診断は、子宮内膜症 35.4 %、子宮筋腫 16.7 %、卵管因子、異常なしが、おのおの 13.3 %、PID 8.3 % を占めた。術前に機能性不妊と臨床診断された 130 例中、異常を認めなかった症例は 30 例 (23 %) にすぎなかった。子宮内膜症 72 例は、R-AFS I 期 35 %、II 期 26 %、III 期 22 %、IV 期 17 % を占めた。妊娠例は 37 例であり、I 期、II 期おのおの 11 例、III 期 9 例、IV 期 6 例であった。

9. 排卵時期予測としての血中プロゲステロン値の有用性について

立崎達夫・池田史郎・藤井俊策
鍵谷昭文・斎藤良治 (弘前大産婦)

当科不妊外来で治療を行なった自然排卵群 5 例、clomiphene 群 19 例、hMG-hCG 群 6 例を対象に、血中 LH、P₄ の連日測定と卵胞径計測を行なった。超音波断層法で、①卵胞径の縮小または消失、②卵胞の変形、③子宮内膜の肥厚像をもって排卵後とした。

LH surge または hCG 投与時とその 24 時間後の血中 P₄ は自然排卵群で 1.83 ± 0.63 ng/ml → 3.45 ± 0.78 ng/ml へ、clomiphene 群で 2.08 ± 0.92 → 4.01 ± 0.58 ng/ml へ、hMG 群で 1.24 ± 0.9 → 6.23 ± 3.7 ng/ml へ上昇していた。また超音波像上排卵後と診断された日の P₄ は、自然排卵群 3.49 ± 0.87

ng/ml、clomiphene 群 4.14 ± 1.74 ng/ml、hMG 群 7.42 ± 3.85 ng/ml であった。

これより排卵時血中 P₄ は自然排卵群で平均 3.45~3.5 ng/ml、clomiphene 群 4.01~4.1 ng/ml、hMG 群で 6.2~7.4 ng/ml の範囲と推測された。

10. RU486 により分娩誘起したラットの

血中プロゲステロン濃度について

藤村達也・梅津元昭・菅原七郎
(東北大農学部家畜繁殖学)

RU 486 により分娩誘起を行ない、その至適投与時刻を決定し、血中プロゲステロン濃度の変化を調べることを目的とした。

供試動物にはウイスター系ラットを用いた。交配した翌日を妊娠第 1 日とし、妊娠 20 日目の 18:00 から妊娠 21 日目の 18:00 まで 6 時間毎に RU 486 を 5mg/kg BW で皮下注射した。その後 3 時間毎に分娩の有無、産子数を観察した。妊娠 21 日目の 6:00 に投与した区のみが明の時間帯に分娩しており、1 週間後の産子の生存率も 79.3 % と他の区より、よい成績であった。

この結果をもとにして RU 486 を投与し、投与してから 36 時間後まで 6 時間毎に採血し血清を得た。後に臓器の重量を測定した。血中プロゲステロン濃度は RIA により測定した。臓器重量は RU 486 投与による変化は見られなかったが、血中プロゲステロン濃度は、投与後 30 時間で対照区と比べ有意に減少した。

以上のことより、RU 486 で分娩誘起すると血中プロゲステロン濃度は分娩と平行して減少することがわかった。

11. 産婦人科内分泌外来における DEXA による骨塩密度測定の意義

対木 章・寺田幸弘・渡辺 正
田村みどり・千田定則・陳 偉業
村上 節・萬代泰男・戸沢秀夫
C. マンスフィールド・深谷孝夫
矢嶋 聡 (東北大医学部産婦)

目的および方法：無月経の症例では長期間のエストロゲン分泌低下により、骨塩量の減少が起こる可能性が危惧される。そこで、各種病態の無月経の患者 33 名と正常月経周期婦人 23 名について、DEXA 法により第 2 - 4 腰椎の正面および側面から測定した骨塩密度 (APBMD, VBBMD) を比較検討した。無月経の症例では LH, FSH, PRL を測定し、各種病態別の骨塩密度との関係を比較検討した。

成績：1) コントロール群に比べ、無月経群では APBMD および VBBMD は有意に低かった。2) 年齢との相関ではコントロール群で APBMD との正の相関を認められたが、VBBMD との相関は認められなかった。無月経群ではいずれとも相関を認めなかった。3) 無月経群では骨塩量とゴナドトロピン値と密接な関係性を認め、LH および FSH レベルと負の相関を認めた。hMG 療法抵抗性の POF 症例では顕著な骨塩密度の低下を認めた。これに対し、PCO 症例では軽度の減少に留まった。

結論：20-30 歳台の無月経症例で骨塩の減少を示す症例が存在する事が DEXA により確認された。こうした症例には骨塩量保持の立場からすると排卵誘発法やエストロゲン補充療法などが必要であり、骨塩法の微妙な変化を検知する事が可能な DEXA 法は無月経症例の follow up に有効な方法であることが示唆された。

12. 体外受精患者における血小板の PAF に 対する感受性の測定

武田志保・児玉英也・福田 淳
松井俊彦・関根和子・真木正博
(秋田大産婦)

血小板活性化因子 (PAF) に曝露された血小板は、PAF に対する感受性が一過性に減少するとの報告がある。そこで血小板に対する PAF の感受性を経時的に調べる事により、胚由来の PAF の活性を評価できるのではないかと考え以下の検討を行った。

方法：体外受精施行 33 例 (うち妊娠例 13 例) に対し、胚移植時、移植後 3 日、6 日、16 日後に採血した。platelet rich plasma を $2 \times 10^{-4} M \sim 2 \times 10^{-7} M$ の 10 倍ずつの希釈系列の PAF と反応させ、血小板凝集能測定装置で測定し、凝集反応が最大凝集能の 50% に減弱する PAF 濃度を最大反応濃度とした。

成績：PAF に対する感受性の低下が認められたのは、妊娠群で 13 例中 3 例 (23.1%)、非妊娠群で 16 例中 4 例 (25%) であり、両群で同率に存在した。対象中で卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) を呈した症例では、4 例に PAF に対する感受性の増強がみられた。

結論：今回の方法は胚由来の PAF 活性の評価法としては限界がある。また OHSS 症例で PAF に対する感受性の増強が高頻度に観察された。

13. 年齢が妊孕性に及ぼす影響

斉藤英和・佐藤文彦・平山寿雄
椎名有二・杉内明子・斉藤隆和
(山形大産婦)

自然でも年齢が高くなると妊娠しにくくなるが、体外受精、胚移植法においても同様の傾向が認められるか検討した。

年齢を ≤ 30 歳、 $30 < \leq 35$ 、 $35 < \leq 40$ 、 $40 <$ の 4 群に分けて検討した。 $30 < \leq 35$ の群で最も頻度が高く 721 周期あった。子宮内膜の厚さは ≤ 30 の群で最も厚く 10.0 mm であった。採卵数は ≤ 30 の群で最も多く 4.6 個であり、年齢が高くなるに従いが少なくなり、 $40 <$ で 2.9 個と最も低い値を示した。受精卵数においても周期あたり、 ≤ 30 では 2.3 個であるのに対して、 $40 <$ では 1.1 個と減少した。受精率でも 40 歳以下では 47-49% であるのに対し、 $40 <$ では 37% と減少した。移植胚数も ≤ 30 で 2.5 個であるのに対し、年齢が高くなるにつれ減少し $40 <$ で 1.8 個となった。妊娠率においても ≤ 30 が 18.2% であるのに対し、 $40 <$ では 3.2% と減少した。妊娠継続率では年齢間に差を認めなかった。年齢は体外受精の治療法においても大きな影響を与える因子であると考えられた。

14. 受精のタイミングと polyploidy について

佐藤文彦・杉内明子・椎名有二
(山形大産婦)

妊娠初期流産の原因には染色体異常が関与していると言われているが、このうち polyploidy は受精前後での卵子や精子の状態がとくに影響しているものと思われる。今回、排卵より受精までのタイミングによる polyploidy 発生の違いを検討した。

B6C3F1 雌マウスに PMS 10 単位を投与し、48 時間後に hCG 10 単位を投与後、それぞれ 14 時間、16 時間、18 時間に卵管より未受精卵を取り出し、90 分前培養していた T6 雄マウスの精子と媒精した。14 時間群および 16 時間群では polyploidy はほとんど認められなかった。18 時間群では、変性卵の割合が 12.5%、polyploidy 卵が 9.6% と増加した。この polyploidy の原因としては多精子受精より、卵子の極体放出障害が多かった。したがって、受精初期の異常の原因として受精のタイミング、とくに老化した卵子の受精による異常が考えられ、老化卵子では極体放出や減数分裂に影響がでるものと思われた。

15. ヒト精子受精能への Pentoxifylline の影響

佐々木宏子・中木純子・藤森 淑
星 和彦・佐藤 章 (福島医大産婦)

Pentoxifylline (Ptf)は、精子の運動賦活作用を有することが知られているが、今回 Ptf の精子受精能に対する効果をハムスターテストで検討してみた。精子回収は、45% Percoll (P法)と 50% Nycodenz (N法)で行なった。N法で精子を回収し、swim up 時に 1mg/ml の Ptf を添加したときのハムスターテストの成績が最も良好であった。しかし、精液に直接 Ptf を添加してもハムスターテストへの効果が認められず、Ptf は精液へではなく、洗浄後の精子に添加した方が有効であると思われた。また、Ptf の精子運動性促進効果は、今回の検討では認められず、Ptf によるヒト精子受精能促進は、運動に対するよりは、先体反応への直接効果であることが示唆される。

16. 精管のカテコールアミン

沢村俊宏・山口寿功・渡辺博幸
安達裕一・中田瑛浩

(山形大泌尿器)

精管の収縮にはノルエピネフリンが重要である。また末梢動脈内にある非コラーゲン蛋白も平滑筋の収縮に関与する事が示唆されている。これらを人の精管にて年齢による変化を検討した。

ノルエピネフリン、非コラーゲン蛋白は加齢とともに減少し、両者と年齢には負の相関が見られた。コラーゲン、エラスチンは加齢とともに増加し、コラーゲン、エラスチンと年齢との間には正の相関が見られた。ノルエピネフリン、非コラーゲン蛋白は組織の神経活性と平滑筋の収縮に関与すると見做されており、加齢とともに減少するノルエピネフリン、非コラーゲン蛋白は精管の収縮運動に関与すると推測した。

17. A23187 による卵子 activation 後の、ハムスター卵細胞質内精子核顕微注入による受精

柳田 薫・矢沢浩之・片寄治男
星 和彦・佐藤 章

(福島医大産婦)

哺乳動物の卵細胞質内顕微注入法による受精では受精率・初期発生率の低下が認められる。ハムスターでの顕微注入による受精では第2極体が放出され雄性前核が作られるが、表層顆粒の消失が極めて軽微で、賦活刺激の不足が考えられる。そこで、卵子を賦活させる A23187-Ca イオノフォアで処理した

卵子で顕微受精を行ない、その効果を検討した。

ゴールデンハムスターの未受精卵を 10 μ M イオノフォアで 3 分間処理し洗浄後培養すると、賦活した卵の割合は 120 分後で 93.6% (コントロールは 6.5%) とその効果は著明で、表層顆粒の消失も良好であった。イオノフォア処理卵へ、ハムスター精巢上体尾部精子核を顕微注入し前核期卵あるいは 2 細胞期卵への発生する割合を調べたところ、イオノフォア処理では、賦活された卵子の後の受精過程は助長しないが、卵を効果的に賦活することで間接的に前核期卵が多く得られることが判明した。顕微注入法の受精成績を向上させるためには、イオノフォア処理が有効と思われた。

18. 無精子症を合併したロバートソン転座の 1 例

加藤智幸・石郷岡学・笹川五十次
渡辺博幸・中田瑛浩

(山形大泌尿器)

近年、常染色体の転座と男子不妊症との関連が注目されているが、今回我々は無精子症を合併したロバートソン転座の 1 例を経験したので報告する。

症例は 30 歳男性。3 年間の不妊を主訴に当科受診。入院時検査所見では第 2 次性徴は正常、精巢容量は右 22ml、左 19ml、精液検査では精液量 2.3ml、精子数 0/ml、内分泌学的検査では LH、FSH、テストステロン、プロラクチンいずれも正常範囲内であった。末梢リンパ球の染色体検査では、45 X Y, -13, -14, +t (13 q, 14 q) の核型を示した。両側精巢生検では第 1 次精母細胞の段階で spermatogenesis が停止しており、精細管では精細胞の精細管上皮からの剝離脱落が認められたが、ライディッヒ細胞、セルトリ細胞は正常であった。

19. 男性不妊患者の精子尾部の微細構造異常と精子運動能との関連性

松井俊彦・児玉英也・福田 淳
武田志保・関根和子・真木正博

(秋田大産婦)

目的：精子尾部の微細構造異常が、精子の運動機能および精子の受精能に及ぼす影響を明らかにする。
方法：体外受精を施行した男性不妊患者について、精子尾部の微細構造を透過電顕で観察し、正常尾部および各種異常所見（微細管の欠損および過剰、配列異常、変性）の 100 精子あたりの出現頻度を算定した。また、精子の運動機能は、swim-up 法で回収された精子（精子洗浄 1 時間後）を自動露出位相差顕微鏡を用いて、頭部の前進速度、振幅、振動回数

および直進率を検討した。精子尾部の各種微細構造所見の頻度と、運動率および運動の上記パラメーターとの関連性を検討した。また、体外受精の受精成立の有無との関連も検討した。

結果：正常尾部の出現頻度は、運動率と相関 ($r = 0.55$) が認められた。精子尾部の異常所見では、辺縁双微細管の欠損が速度 ($r = -0.44$) との間で相関が認められた。透過電顕では、正常尾部 ($P < 0.05$) および辺縁双微細管の欠損 ($P < 0.02$) の出現頻度において、体外受精の受精成立例と不成立例間で有意差を認めた。

考察：精子尾部の微細構造で、正常尾部および周辺微細管の欠損所見の頻度は、精子の運動機能および体外受精の受精成績に最も相関が認められ、男性不妊の精子機能異常に関与する重要な所見と考えられた。

20. 精子の機能評価としての Sperma Screen の使用経験

菅野孝子・吉松宜弘・菅野 薫
星 和彦・佐藤 章

(福島医大産婦)

精子先体酵素には acrosin (AC) と hyaluronidase (HY) が含まれ、精子尾部鞭毛は、tubulin (TU), dynein (DY), actin (ACT) 等から構成されている。これらの蛋白は受精時の先体反応や hyperactivation に重要な役割を果していることが推定される。5種類のプロテインを蛍光染色できる Sperma screen を用い、不妊症患者の精子について検討した。

不妊症患者 55 名の Swim-up 精子を Sperma screen 染色し、各々の蛋白の陽性率を精液分析成績と比較検討した。

男性不妊の精子に先体酵素や鞭毛構成蛋白の減少が認められ、各蛋白の欠損が示唆された。

21. Makler 計算盤による精子運動能指数(SMEI)の測定——血球計算盤を用いた従来法との比較検討——

中角尚誉・前原郁夫・蓮田精之
平松正義・高橋 勝・折笠精一
(東北大学泌尿器)

蛭田益紀・鈴木雅洲
(スズキ病院)

光川史郎 (泉中央病院)
佐藤和宏 (船岡今野病院)

目的：精液検査の中で、精子運動性は受精能を評価する上で最も重要な要素の1つである。従来より我々

は運動性を客観的に評価する指標として精子運動能指数 (sperm motile efficiency index: SMEI) を用いてきた。今回我々は、東北大学泌尿器科不妊外来を受診した患者の精液 178 検体を対象とし、同一検体の SMEI を従来の方法 (SMEI-H) と Makler 計算盤を用いた方法 (SMEI-M) で算定して、2 つの測定結果を比較検討した。更に精子自動分析装置を用いて得た精液検査の各種パラメーターと比較しこの指数の持つ意味について検討した。SMEI = $N / d \times 100$ (N : 1 mm の線上を 1 分間に通過する精子数, d : $d \times 10^6 = 1 \text{ml}$ 中の精子数)

結果：SMEI-M と、SMEI-H は有意の正の相関を示した ($r = 0.783$, $P < 0.001$)。SMEI-M は、精子自動分析装置で測定した精子速度、運動率のそれぞれと有意の正の相関を示した ($P < 0.001$)。SMEI は精子の運動速度と運動率を反映すると思われた。

特別講演

I. 体外受精における assisted technology

平山寿雄 (山形大産婦)

顕微操作による assisted fertilization techniques, 特に透明帯開孔術, 囲卵腔内精子注入法について実験動物を用いて基礎的研究を行ない、臨床応用について検討した。これらの方法について透明帯通過までを省略させた場合、マウス精子はその先体反応進行状態により卵細胞内での結合部位が異なり、卵細胞膜に直接結合する先体反応完了精子の場合が受精率は高率である。囲卵腔内精子注入法で受精率を向上させるには、注入精子の先体反応を最大限に誘起させるか、注入精子数を増加させるかのいずれかが考えられる。注入精子を 1-12 匹までで検討すると、受精率は注入精子数が増加するに従い向上する。多精子受精率は極めて少なく、hCG 投与後の aging により digynic triploidy の頻度が増加する。これらの顕微操作により受精した胚の発育、姉妹染色分体交換をみると、対照群と有意な差は認められなかった。

ヒト精子を適切な前培養条件下で受精能獲得、先体反応を誘起し、その先体反応率およびハムスター 囲卵腔内注入による精子侵入率を調べてみると、前培養環境により各個人間で先体反応率はかなりのばらつきがみられ、精子侵入率にもその影響がみられた。ヒト卵子の 囲卵腔内へ各種培養液で前培養した精子を 1-20 匹注入して受精率を検討すると、受精率、多精子受精が前培養条件により異なってくる。したがって、適切な前培養法と適切な注入精子数の決定が、ヒト卵子 囲卵腔内精子注入法では必要とな

ってくる。

これらのふたつの方法で受精率を向上させるためには、精子受精過程の透明帯通過までを機械的操作にて補助すると同時に、適切な培養条件下で精子自体を先体反応完了状態まで同調させる機能面での操作も必要となってくる。

II. 精液中に出現する細胞の臨床的意義

前原郁夫 (東北大泌尿器)

精液中には精子以外に種々の細胞が出現する。1) 精索静脈瘤患者や精巣障害性を持つ薬剤を投与された患者、そして特発性不妊症において、しばしば精液中に未熟な精上皮細胞が認められ、精巣生検では精上皮細胞の剥落が認められる。精液中の精上皮細胞の出現は造精機能障害の存在を示唆する。2) 精液中に多数の白血球が出現している膿精液症患者では、精子運動性は低下しており、SPA や IVF の成績も不良である。白血球は活性酸素やライソゾーム酵素を放出して精子を傷害し、受精能を低下させると考えられる。3) 精巣腫瘍患者で、ときに精液中に malignant cell が認められる。現状では、出現率が低いことから、あるいは細胞の変性のために陽性率が低い。今後、精液細胞診は CIS の診断で有効な手段となる可能性がある。また精巣腫瘍患者の精液検査は、腫瘍による対側精巣の造精機能障害と術後・化学療法後の回復を評価する上で重要である。

第 36 回 日本不妊学会九州支部総会

日 時：平成 3 年 11 月 24 日 (日)
場 所：長崎県医師会館 3 F 大会議室
会 長：長崎大学医学部産婦人科助教授 石丸忠之

1. 培養液中のエンドトキシンに関する検討

詠田由美・吉満陽孝・池田景子
白川光一 (福岡大産婦)

培養液中のエンドトキシンの存在が、ヒト体外受精の治療成績に影響を及ぼすという報告がある。われわれは、市販の培養液に対してリムルス試験を行ない、培養液中のエンドトキシン濃度を測定した。さらに、エンドトキシンを添加した培養液を用いてマウス体外受精を行ない、受精およびその後の胚発生に対するエンドトキシンの影響を検討した。

3 種類の市販培養液 (GPM, Ham'sF-10, HTF) のエンドトキシン濃度を測定した結果、GPM で 7 ロット 16 検体中 10 検体、Ham F-10 で 2 ロット 5 検体すべてに、0.5~4 EU/ml の範囲でエンドトキ

シンが検出された。また、マウス体外受精では、1EU/ml 以上の添加で受精率が低下し、さらに 0.1EU/ml の添加で胚発生率が低下した。

市販培養液にはエンドトキシンが検出される可能性があり、ヒト体外受精・胚移植においてもエンドトキシンの影響を考慮する必要があると思われた。

2. Enzyme immunoassay 法を用いた卵胞刺激時の血中プロゲステロン濃度の測定

河野康志・吉松 淳・松井尚彦
宮川勇生 (大分医大産婦)

IVF-ET における妊娠成功率との関連から、卵胞刺激時の血中プロゲステロン濃度が注目されている。

今回、その正確性、迅速性が報告されているモノクローナル抗体を用いた enzyme immunoassay (EIA) による血中プロゲステロン測定試薬 (MS-17, 持田製薬) を用いて、特に、排卵誘発時における低レベルの血中プロゲステロン (2.0ng/ml 以下) の測定を行ない、その正確性および動態につき検討したので報告する。

対象は IVF-ET を行なった症例より卵胞刺激時に採血した 47 検体を用いた。MS-17 を用いて血中プロゲステロンを測定し、同時に R I A にての測定を行なった。

その結果、両者は有意に相関し ($r=0.62$, $p<0.01$), 低レベルでの血中プロゲステロンの測定における MS-17 の正確性が確認された。また、IVF-ET 成功例の血中プロゲステロン濃度が不成功例と比べ幾らか低値であった。

3. Double zona dissection と Single zona dissection の比較

山田義治・田中 温・出嶋秀明
田中威づみ・吉田一郎・竹本洋一
鷹野和哉 (セントマザー産婦人科医院)

目的：射出精子濃度が 500 万/ml 以下、精子運動率が 20% 以下の重症男性不妊症における GIFT, IVF-ET の妊娠率は極端に低値となる。このような症例に対し、透明帯に裂け目をつけ、この間隙より運動精子が進入し、受精に至る Zona dissection が開発された。

今回我々は、受精率をさらに上昇させる目的で、透明帯を 2 か所で dissect する Double zona dissection を試みたので、その結果について従来の Single zona dissection と比較した。

方法：過去の IVF-ET で全く受精を認めず、ハム

スターテストが10%以下であった症例を対象とし、夫婦の了承のもとに施行した。

方法：採卵4～5時間後の卵子を0.1%ヒアルロンダーゼ内で裸化とした後、0.3M Sucrose in HTFに注入し、実体顕微鏡下に1～2時と4～5時方向の2か所で透明帯をdissectした。

結果：Double dissection および Single dissection の無傷率、受精率、卵割率はそれぞれ、85%–35%–28%、87%–28%–13%であった。現在のところこの受精卵、分割卵の胚移植は行っていない。

4. 超急速凍結法によるヒト初期胚の凍結保存

鷹野和哉・田中 温・山田義治
出嶋秀明・田中威づみ・吉田一郎
竹本洋一

(セントマザー産婦人科医院)

目的：ヒト受精卵の凍結保存の最大の目的は、過排卵処理下の子宮内に移植するのではなく、自然周期の子宮内に戻すことによる着床率の向上にある。しかし、現状におけるヒト受精卵の凍結融解後の妊娠率は約10%と低値にとどまっている。この妊娠率の低さは従来のプログラムフリーザーを用いる凍結手技の複雑さが原因の1つと考えられる。

今回我々は超急速凍結法が臨床に応用できないかと検討した。

方法：凍結は室温にて、受精(卵割)卵を直接、凍害保存液DAP(D: dimethyl sulphoxide, A: acetamide, P: propylene glycol)に移し、直ちにガラス製のキャメラリーに吸引し、5秒以内に液体窒素中に浸漬した。融解は液体窒素内よりとり出し、直ちに指先で加温後、37°C、0.5M Sucrose内へ注入した。

結果：モル濃度差における比較ではD:A:P=2:1:3が最も成績がよく、融解後の生存率は77%(54/70)で、発生率は32%(12/37)であった。

5. 各種精子処理法における先体反応性に関する検討

田中威づみ・田中 温・山田義治
出嶋秀明・吉田一郎・竹本洋一
鷹野和哉

(セントマザー産婦人科医院)

目的：精子が透明帯を通過し、卵子と受精するためには、精子の先体反応の発生が必要である。今回我々は当院にて使用している各種精子処理法における先体反応の発生率について検討を行なったので報告する。

方法：①Swim up法、②Percoll法、③ヒト卵胞液、④カフェイン、⑤カフェイン+ヘパリン、⑥凍結融解の6種類にて処理した精子の先体反応の有無をTriple stainにて検討した。

結果：各種精子処理後の先体反応の生存精子および死滅精子における発生率は、①8.5%(17/200)–2.5%(5/200)、②6.5%(13/200)–0.5%(1/200)、③11.7%(35/300)–3.3%(10/300)、④2.5%(5/200)–13%(26/200)、⑤3%(6/200)–5%(10/200)、⑥14%(28/200)–31%(62/200)であった。

各種精子処理法における生体反応の発生率は凍結融解が最も高く、ヒト卵胞液、カフェイン、Swim up法、カフェイン+ヘパリン、Percoll法の順であった。

6. AIHにより妊娠に至った高度乏精子症の4症例

川口日出樹・戸板通保・大淵浩子
三部正人・小池弘幸・池ノ上 克
森 憲正 (宮崎医大産婦)

近年、不妊症治療の分野においてはIVF-ET・GIFT等が広く行なわれるようになってきているが、現在でもAIHは不妊症の重要な治療法の1つである。さらに、排卵モニタリング法、良好精子選別法の進歩やAIH針の改良などにより、その妊娠率も向上しつつある。しかしながら、このような各種の改良にも関わらず、高度乏精子症例においてはAIHによる妊娠は極めて困難であるといわれており、通常はIVF-ET、GIFTなどが行なわれることが多い。

今回我々は、1990年9月～1991年8月の1年間にAIHを施行した症例のうち、精子数1000万/ml未満の高度乏精子症例(精子濃度200万～900万/ml)で、4例の妊娠例を得る事ができたのでその詳細を述べるとともに、軽度～中等度の乏精子症例、あるいは正常精子症例における成績との比較検討を行なったので、その結果を合わせて報告する。

7. Sperm survival testで自然妊娠成立を予知できた高度乏精子症の2例

小濱正彦・布施正樹・岡本純英
石丸忠之・山邊 徹

(長崎大産婦)

今回、私どもは一般的精液検査では、高度乏精子症を呈するものの、SST結果から精子妊孕能良好と判定し、その後自然妊娠が成立した2例を経験したので報告する。

症例1：夫33歳・妻28歳。精液検査の所見は、初回は精子数80万/ml、運動率25%、正常形態率

50%, 2回目のそれは、それぞれ110万/ml, 54.5%, 63.6%であった。またSSTは2回とも36時間陽性を示した。すなわち精子妊孕能は良好と判定した。配偶者は、視床下部性第1度無月経および高プロラクチン血症を認めた。そこでクロミフェン、およびプロモクリプチンを投与し、性交のタイミング設定を行ない、第3周期目に自然妊娠が成立した。

症例2: 夫46歳・妻32歳、高度乏精子症(200万/ml)を呈するものの、SST結果から精子妊孕能は良好と判定した。症例1と同様に、タイミング設定のみで、自然妊娠が成立した。

[結論] SSTは高度乏精子症を示す例においても精子妊孕能を事前に予知できることが示された。

8. 当科における AIH の治療成績

西村 弘・松井幹夫・小山伸夫
河野哲郎・田中信幸・松浦講平
岡村 均 (熊本大産婦)

AIHは従来の適応から、機能的や難治性の不妊例に対する妊孕亢進策として繁用されてきている。そこで最近4年間の当科におけるswim-up法による洗浄精子によるAIHの成績を検討したので報告する。

妊娠例49例の適応では機能的な不妊が15例と最も多く、次に難治性13例、男性因子10例の順であった。妊娠成立までのAIH回数は、1回目が18例と最も多く、以下回数と共に減少しており、71%が3回目までの妊娠例であった。しかし、5回目以上の例も13例みられた。妊娠例の原精子濃度で最少の例は500万/mlで、最低の運動率は36.5%であった。洗浄回収後で最も少ない精子濃度は200万/ml, 79%の運動率症例であった。

不妊患者では複数の不妊因子を有していることが多く、妊娠率向上の手段として卵胞発育異常を発見してそれに対する手段を講じると共に排卵時期を的確に予想しAIHを併用していくことが有効であると考えられる。

9. penetrak の臨床的有用性に関する検討

森 明人・沖 利通・山元慎一
福元清吾・竹内一浩・堂地 勉
永田行博 (鹿児島大産婦)

不妊症の治療においては、精液検査は最も基本的な検査である。しかしこれだけで精子の受精能や運動能を評価することは困難である。われわれはウシの頸管粘液を用いたヒト精子の頸管粘液貫通検査で簡単に行なえるpenetrakが、IVF-ETにおける精子受精能の評価法になるか否かを精子濃度や運動率と

比較検討した。

対象は当科でIVF-ETを試みた17例で、IVF-ETの適応は卵管因子7例、男性因子5例、機能的な不妊5例である。媒精はswim-up法で行ない最終精子濃度を 1×10^5 /mlとした。penetrak値は30mm以上を良好群、30mm以下を不良群とした。17例中、penetrak良好群は10例、不良群は7例であった。良好群の平均精子濃度は $89.3 \pm 27.2 \times 10^6$ /ml、運動率は $66.9 \pm 20.8\%$ であったのに対し、不良群はそれぞれ $46.1 \pm 46.2 \times 10^6$ /ml、 $36.1 \pm 27.1\%$ と、いずれも良好群の方が有意に高かった。良好群と不良群の受精率は、症例あたりそれぞれ100%(10/10)、28.6%(2/7)、回収卵あたりそれぞれ78.4%(40/51)、18.9%(7/37)であった。また精子濃度や運動率が全く正常であったにもかかわらず、penetrak値が14mmと不良であった症例で、受精を認めないものがあった。以上のことよりpenetrakは精子の受精能を評価する上で極めて有用な検査法である。

10. 精巣上体尾部精子回収法の開発とその臨床成績

田中 温・山田義治・出嶋秀明
田中威づみ・吉田一郎・竹本洋一
鷹野和哉

(セントマザー産婦人科医院)

目的: 精子運動率が20%以下の重症男性不妊症に対しては有効な治療法がないのが現状と思われる。今回我々はこの重症男性不妊症に対し、精巣上体尾部より良好な精子を回収する方法を開発したので、その臨床成績について報告する。

方法: 腰椎麻酔下で陰囊正中部を切開し、精巣上体尾部を露出させた後に、内径約100~200 μ mのガラス針をマイクロスコープ下に管腔内に刺入し、精子を吸引した。この精子をミネラルオイルで覆った50~200 μ lのHTF内に注入し、採卵しておいた卵子を媒精した。媒精後約6時間でMedium changeを行ない、症例に応じてZIFT、IVF-ETを施行した。対象は精子運動率が20%以下で、過去のIVF-ETで一度も卵割の認められなかった25周期とした。

結果: 25周期中良好精子が16周期で採取でき、そのうち5周期で4細胞期胚に達し、2周期で妊娠を認め、第1の妊娠例は双胎で男児の正常児を分娩した。第2例は現在妊娠30週である。

11. 円靱帯に発生した外性子宮内膜症

堂地 勉・森田洋一郎・森 明人
飯尾一登・有馬直見・永田行博
(鹿児島大産婦)

患者は40歳の主婦、主訴は月経時の右鼠径部硬結の腫大、疼痛である。元来、軽度の月経痛はあったが薬を飲む程のことはなかった。ところが3年前から右鼠径部に径3cmの硬結を触知し、月経時には腫大し圧痛が出現するようになったため、3/27/■当科受診す。右鼠径部に小指頭大の硬結を認めた。4月福岡転居、某大学で子宮内膜症を疑われボンゾール400mg/日を5カ月間服用したが、右鼠径部の硬結は全く縮小せず、疼痛の期間が月経の4～5日前から月経終了までと長引くようになり、しかも右側腹部に放散するようになったため、4/11/■当科を再診す。7/22/■、鼠径部に発生した外性子宮内膜症を疑い腹腔鏡施行。右円靱帯の鼠径部入口部にほぼ孤立して発生した外性子宮内膜症であった。

この稀な外性子宮内膜症に文献的考察を加え報告する。

12. 着床期子宮内膜の内視鏡的評価と各種パラメーターによる分析

宮良美代子・正本 仁・高宮城直子
新川唯彦・稲福 薫・佐久本哲郎
東 政弘・中山道男 (琉球大産婦)

我々は、着床期子宮内膜の評価を従来の方法に加え、血管パターンと腺開口所見に基づき行なっている。

今回、30例の不妊症患者に、子宮鏡検査を行ない、良好と判定した12例と、不良とした18例について、子宮内膜厚、排卵期最大卵胞径、血中P値との関係を検討した。子宮鏡所見良好群では、排卵期最大卵胞径、子宮内膜厚、E₂値および着床期P値の平均は、18.2mm、8.6mm、235.2pg/ml、14.8ng/mlであった。子宮鏡不良群18例の上記のパラメーターの平均値は良好群と有意差はなかった。各パラメーター毎に検討すると、最大卵胞径が16mm未満が4例、着床期P値が10ng/ml未満が2例見られた。残り12例中、排卵期子宮内膜厚が8mm未満の例が3例、月経3日目の内膜厚が5mm以上と厚い例が6例あった。

以上より、子宮鏡不良群では、卵胞発育不全、progesterone 低値以外に、子宮内膜そのものに起因すると思われる例が見られた。

13. エルチェックによる排卵予知

沖 利通・森 明人・山元慎一
福元清吾・竹内一浩・堂地 勉
永田行博 (鹿児島大産婦)

不妊症治療において、排卵時期を正確に予知することは極めて重要である。従来から、排卵予知に基礎体温測定、頸管粘液検査、超音波検査等が用いられてきたが、個人差もあり、その判定は必ずしも容易ではなかった。最近では、より正確な排卵時期を予知する目的でLHサージを検出する方法が開発されてきた。今回、我々はその一つである尿中LH測定キット“エルチェック”を排卵モニターに用い、その有用性に関し検討したので報告する。

対象は、正常排卵周期を持つ6例と不妊症10例である。症例に対し、基礎体温、血中LH、エルチェックによる1日2回の尿中LH測定と超音波による卵胞モニタリングを行なった。

その結果、エルチェックは①反応時間が短い、②判定が容易である、③排卵時期を確実に捕捉できる、④手技が容易で患者自ら判定できるといった利点があるという結論を得た。

14. 多嚢胞卵巣症候群とインスリン抵抗性について

宇都宮隆史・貞永明美・岩里桂太郎
溝口洋一・寺脇信二・谷口一郎
肥田木 孜 (大分県立病院産婦)

多嚢胞性卵巣症候群(PCO)は、卵巣機能不全症のうちの3割を占めるといわれるほど高頻度にみられるが、その病態は依然として不明な点が多い。われわれは内分泌学的にPCOと診断された症例に糖代謝異常を示す症例が多いことに着目し、肥満例を除外してインスリン代謝と、PCOの関連性を検討した。

その結果、経口的糖負荷試験(GTT)で血糖値については、PCO例は明らかに糖尿病(DM)の境界域を示す例が81%を占め、これに比し、コントロール群は90%が正常域であった。またGTTにおける血中インスリン値の変動は、コントロール群に比べ、PCO群では明らかに過剰な反応を示し、なおかつインスリン分泌が遅延していた。

以上の点よりPCOの成因のひとつにインスリン抵抗性が強く示唆された。

15. 女性重症心身障害者の生殖内分泌機能について

石 明寛・密山高宏・吉田耕治
岡村 靖 (産業医大産婦)

目的：近年日本における医療水準は上昇し、周産期死亡率は顕著に低下してきた。しかしながら生存はしても周産期における障害を有する児は増加してきているという現状がある。現在までの障害者の療育は乳幼児小児を中心としていたが、彼等の年長化が進むにつれて障害者の生存のみではなく、成人としての自立という面についても考えなければならなくなってきた。

今回我々は18歳以上の重症心身障害女性24名を対象とした。無月経の患者は血中LH、FSH、PRL、E₂をRIAで測定した後LH-RH testも行なった。対象者の2次性徴をTanner分類で検討した。

結果：24名中の10名(41.7%)は続発性無月経症で血中FSH、LH、E₂値からほぼ全例Hypogonadotropic hypogonadismであった。LH-RHに対する反応は正常であった。

考察：対象者には高頻度に無月経(41.7%)が合併していることが分かった。第2次性徴は全員がほぼ正常であった。視床下部の反応も正常であることが分かった。

16. 自然妊娠が成立した早発閉経の1例

市丸俊三・荒木真佐子・宮村伸一
福島泰斗・田山親行・清田祐史
(熊本赤十字病院産婦)
松浦講平 (熊本大産婦)

抗甲状腺抗体が高値を示す早発閉経の患者に自然妊娠が成立したので報告する。

既往歴に特記するものはなく、初経14歳、月経は不順で60~180日型、2~3年来無月経となる。昭和57年5月従兄と結婚、58年2月より近医で排卵誘発が試みられていた。58年8月5日当科初診、身長164cm、体重70kg、BBT1相性、LH60mIU/ml、FSH67mIU/ml、PRL13ng/ml、甲状腺の腫大はなくT₃23.7%、T₄10.3μg/dl、TSH2.5μg/mlとほぼ正常であったが、サイロイドテスト1600倍、マイクロゾームテスト25600倍陽性と高値を示した。LH-RHテストはLH、FSHともhigh-good型であった。腹腔鏡検査で左卵巣はstreak、右側は1.5×0.7cm程度と小さく、生検で原始卵胞は認められなかった。排卵を試み成功しなかったが5年後、推定妊娠26週2日で再度来院して3月29日、41週

1日にて3740gの男児を出産した。分娩後は本年1月7日現在、抗甲状腺抗体はさらに高値となり、LHは正常化した。FSHは依然高値である。

17. 本院の不妊診療における妊娠拳児例の検討

范 育仁・濱崎哲史・下村恭子
中橋隆次郎 (国立嬉野病院)

昭和60年1月から平成3年5月までの本院における不妊診療で、妊娠および拳児に至った例を検討したところ、幾つかの興味ある傾向が認められたので報告する。

①妊娠成立の因子としては、自然経過とHSGによるものが極めて多く、次いでBromocriptine、Clomiphene、Danazolであり、HMGによるものは極めて少なかった。②妊娠率は40.6%で、推定拳児率は33.6%であった。③子宮内膜症の妊娠例には、女児が多い。④高プロラクチン血症の妊娠例の約1/3が流産した。⑤極めて少ない精子数でも妊娠した例がある。⑥新生児は女児が多く(男：女=3：4)先天異常も少し多いように思われた。⑦妊娠しても拳児に至らなかったのが7%であった。⑧不妊対象で腹腔鏡を施行した例は91件あり、子宮内膜症の所見が1/3に認められた。全くの正常所見は11例のみであった。施行例で妊娠したのは22例である。腹腔鏡は、不妊の診療では重要な手技と考えられる。

18. 子宮鏡下選択的卵管内カテーテル挿入術後の妊娠例の検討

佐久本哲郎・稲福 薫・高宮城直子
正本 仁・東 政弘・中山道男
(琉球大産婦)
伊是名博之 (那覇市立病院)

我々は不妊症の原因検索のための腹腔鏡施行時に、子宮鏡下選択的卵管内カテーテル挿入術を併用し、術後に18例の妊娠成立を得た。この妊娠例の患者背景および内視鏡所見を中心に検討した。

対象は、1990年1月~4月に腹腔鏡施行時に本法を併用した51例中、術後妊娠成立した18例である(妊娠率35.3%)。

妊娠成立した18例の年齢は平均33.1歳(26~40歳)、不妊期間は平均5.3年(2~11年)で原発性不妊症が11例(61.1%)であった。腹腔鏡所見では18例中13例(72.7%)が両側卵管采が正常であったが、子宮鏡所見では18例中12例(66.7%)に両側卵管口の異常を認めている。また、術後4周期以内の妊娠成立が15例(83.3%)で、自然周期での妊娠が14例(77.8%)であった。

不妊症において腹腔鏡を施行する場合、本法を併用することにより、原因検索のみではなく治療効果も得られることが示唆された。

19. 卵管妊娠における MTX 保存療法の検討

中野龍夫・福田久信・坂井秀隆
加瀬泰昭 (諫早総合病院産婦)

子宮外妊娠の大部分を占める卵管妊娠は、腹腔内に大出血を起こすことから、その多くは緊急手術の対象として卵管切除または付属器摘除術が行われてきた。この手術は将来の妊孕性に対して重大な侵襲といえる。

最近、中絶症状発現前の卵管妊娠に対してMTXによる保存療法が広く行なわれている。我々も1986年10月より1991年4月までに挙児希望の既婚10例、未婚6例(その内、重複例1人)の患者にMTXによる保存療法を行ない、13例中8例(61.5%)に明らかな疎通性を認め、疎通性はあるが卵管周囲癒着や卵管留水症を疑わせる症例を含めれば11例(84.6%)に良好な卵管疎通性を認めた。また治療後の妊娠について最近の1例を除き、既婚者9人中6人の分娩、妊娠中1人、自然流産1人、計8人(88.9%)の妊娠を確認した。

以上の結果より、妊孕性保持にMTXによる保存療法は有用と考えられる。

20. 子宮外妊娠に対する腹腔鏡下卵管内 MTX 注入法と hCG 値の推移に関する検討

藤下 晃・小浜正彦・山下 洋
中村恒一・鯨島哲郎・増崎英明
石丸忠之・山邊 徹
(長崎大産婦)

(目的)卵管妊娠の未破裂例に対して、腹腔鏡下に病巣部にMTX(メソトレキセート)注入を行ない、手術前後の血中および尿中hCG値の推移を検討した。(対象)腹腔鏡下に診断された卵管妊娠7例を対象とした。年齢は18~33歳、妊娠週数は5週4日~9週6日であり、いずれも未破裂例であった。腹腔鏡下にMTX 10~30mgを卵管内に注入し、術前および術後にhCG値を測定した。

(結果)術前の尿中hCG値は512~9,600IU/L、血中hCG値は340~4,700mIU/mlに分布していた。MTX注入後、尿中hCG値が再上昇した3例には、MTX 20mgの全身投与を4日間追加した。初回のMTX注入2週間後に、腹腔内出血による下腹痛が出現した1例は、開腹手術を行なった。MTX単独投与のみでhCG値が順調に下降したのは3例であった。ま

たhCG値が陰性化するまでには約30日を要した。(考察)未破裂の卵管妊娠に対するMTX局所注入法は有用と思われるが、その効果判定には尿中のみならず、血中hCG値の測定も併用することが望ましい。

関連学会のお知らせ

第 32 回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会

- 会 期：平成 4 年 7 月 24 日（金）・25 日（土）
会 場：パシフィコ横浜・会議センター（横浜国際平和会議場）
横浜市西区みなとみらい 1-1
（J R 京浜東北線，市営地下鉄，東急東横線；桜木町駅下車）
電話 045(221)2121
会 長：横浜市立大学医学部産婦人科教授 水口弘司

学術プログラム：

特別講演「LAPAROSCOPIC SURGERY」

演者 Professor J. Donnez
University of Louvain
Department of Gynecology and Obstetrics
St. Luc University Hospital, Belgium

座長 横浜市立大学 水口弘司教授

解説講演「LASER CHARACTERISTICS IN GYNECOLOGICAL LAPAROSCOPIC SURGERY」

演者 Mr. J. L. Williams
Clinical Consultant
Laserscope Company, U. S. A.

座長 藤田保健衛生大学 河上征治教授

シンポジウム：「産婦人科内視鏡下レーザー手術」

座長 聖マリアンナ医科大学 浜田 宏教授

一般講演募集要項：

- (1) 演題：演題名・所属・氏名（演者に○印）
400 字以内の抄録をお送り下さい。
- (2) 締切：平成 4 年 4 月 30 日（木）
- (3) 宛先：〒 236 横浜市金沢区福浦 3-9
横浜市立大学産婦人科学教室
内視鏡学会係
電話 045(787)2690-2
FAX 045(701)3536

第 15 回産婦人科マイクロサージャリー学会学術講演会

第 15 回産婦人科マイクロサージャリー学会を下記のとおり開催致しますので奮って御参加下さいますよう御案内申し上げます。

会 期：平成 4 年 7 月 23 日(木)

会 場：パシフィコ横浜 (会議センター)

特別講演, 一般演題, シンポジウムを予定しております。

一般演題募集締切：平成 4 年 4 月 30 日(木)

問い合わせ先：〒 228 相模原市北里 1-15-1

北里大学医学部産婦人科学教室

川内博人

TEL：0427-78-8414 FAX：0427-78-9433

第 15 回産婦人科マイクロサージャリー学会

会長 西島正博

(北里大学医学部産婦人科学教授)

不妊症新治療ワークショップ 1992

会 期：平成 4 年 8 月 29 日(土), 30日(日)

会 場：仙台国際ホテル

〒 980 仙台市青葉区中央四丁目 6-1

TEL：022(268)1111

主 催：不妊症新治療ワークショップ

〈世話人〉鈴木雅洲 東北大学名誉教授

水野正彦 東京大学前教授

武谷雄二 東京大学教授

なお、プログラム御希望の方は下記にご連絡下さい。

問い合わせ先：不妊症新治療ワークショップ 1992 事務局

〒 989-24 宮城県岩沼市押分字志引 38-4

医療法人社団スズキ病院内

TEL：0223(23)3111 FAX：0223(23)3123

第 14 回国際不妊学会議 (IFFS)

期 日：1992 年 11 月 22 日 (日) ~ 27 日 (金)

会 場：カラカス (ベネズエラ)

Hilton Convention Center

Teresa Carreño Cultural Complex

抄 録：1992 年 5 月 31 日締切 (現地必着)

不妊学会事務局で演題送付を受け賜ります。5 月 25 日までに事務局へご連絡下さい。

登 録 費：

(単位 US\$)

	1992 年 7 月末日まで	1992 年 8 月 1 日から
IFFS 会員	400	450
非 会 員	450	500
同 伴 者	150	200

会議の詳細および登録用紙・アブストラクトフォームを含む Second Announcement は日本不妊学会事務局 (tel: 03-3272-7077) へご請求下さい。

第 9 回国際内分泌学会議

期 日：1992 年 8 月 30 日 (日) ~ 9 月 5 日 (土)

会 場：ニース (フランス)

(Nice Convention Center-Acropolis)

登 録 費：

(単位 FF)

	1992 年 4 月 30 日まで	1992 年 5 月 1 日から
一 般	2,250	2,750
研 修 生	1,100	1,400
同 伴 者	1,000	1,200

(1 FF ≒ 23 円)

会議の詳細および登録用紙は不妊学会事務局 (tel: 03-3272-7077) へご請求下さい。

第 37 回日本不妊学会学術講演会・総会

〈1992 年 11 月 6 日（金）～7 日（土）〉

宿泊のご案内

この度、(株)アイシーエス企画では第 37 回日本不妊学会総会の宿泊のお取り扱いをさせていただきますことになりました。ここに下記の通り、宿泊ホテルのご案内を申し上げます。多数のお申込みをお待ちいたしております。

1. 宿泊のご案内

タイプ	ホテル名	ルームタイプ	料 金
A	京王プラザホテル または同等クラスホテル	ツインルーム	34,445円
		シングルルーム	30,480円
B	ワシントンホテル または同等クラスホテル	ツインルーム	20,910円
		シングルルーム	13,855円
C	ニューシティーホテル または同等クラスホテル	シングルルーム	10,610円

※上記料金は 1 室 1 泊（朝食付）税金サービス料込みの料金です。

※ 3～6%の消費税がチェックアウト時に加算されます。

ご連絡を賜りましたら申し込み用紙とともに詳細をお送り申し上げます。

2. お申し込み締切り日：平成 4 年 9 月 30 日（水）

3. お申し込み方法・お問い合わせ先

ご宿泊ご希望の人数とご所属をお電話またはファクシミリで下記へご連絡下さい。

(株)アイシーエス企画 不妊学会デスク

〒103：東京都中央区日本橋 2-14-9 加商ビル 2 F

TEL：03-3272-2818 FAX 03-3275-2945

担 当：島村・小松

折り返し申込用紙兼用の宿泊費振込用紙（郵便振替）をお送り致します。

ご入金を確認後、予約確認書をお送り致します。

投稿規定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある原著、総説、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、原則として未発表のものに限る。
3. 1論文は、原則として刷り上り6ページ以内とし、超過は4ページ(計10ページ)までを認める。超過ページならびに特に費用を要する図、表、写真は実費を著者負担とする。
4. 原著、総説、論説、臨床報告などは必ず、400字以内の和文抄録ならびに、ダブルスペース2枚以内の欧文抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付する。
5. 図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。
6. 記述は和文または欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。

a. 雑誌の場合

著者名：題名、誌名、巻数：ページ数、年次
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。誌名は規定または慣用の略名に従うこと、特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に入れて括弧で囲む、すなわち

著者名：題名、誌名、巻数(号数)：ページ数、

年次

例1. Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy, Amer. J. Obstet. Gynec., 25: 104, 1933

2. 足高善雄, 竹村 喬, 美並義博: 最近1カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察, 日不妊会誌, 4: 13, 1956

b. 単行本の場合

著者名：著書名、ページ数、発行所、年次

例1. Rovinsky, J. J. and Guttmacher, A. F.: Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy, 68, Williams & Wilkins Co., 1965

9. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする。
10. 著者校正は原則として初校のみ1回とする。なお、校正は字句の訂正にとどめる。
11. 原稿の採否、掲載順位その他、編集に関する事項は編集会議で決定する。掲載は原則として受付順にする。
12. 特別掲載を希望する論文は、受付順序によらず、速やかに掲載される。この場合は掲載に要する実費は全額著者負担とし、かつ特別掲載料を納付する。
13. 掲載原稿に対しては、別刷30部を贈呈する。これ以上を必要とする場合は、原稿に別刷総部数を朱記する。なお、30部を越す分についての実費は著者負担とする。
14. 投稿先および諸費用の送付先は、東京都中央区日本橋2丁目14番9号 加商ビル(株)アイシーエス企画内 社団法人 日本不妊学会 事務局とする。

編集会議からのお知らせ

原稿用紙はB5判横書き400字詰のものを使用し、組版に差支えないよう清書して下さい。ワープロを使用しても結構です。(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2号

1991年3月25日印刷
1992年4月1日発行

編集兼発行者	百瀬和夫
印刷者	安永修
印刷所	東京都文京区関口1-43-5 有限会社ループ社
発行所	東京都文京区関口1-43-5 社団法人 日本不妊学会 東京都中央区日本橋二丁目14-9 加商ビル (株)アイシーエス企画内 Tel (03) 3272-7077 振替口座番号 東京 7-93207