ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 38 No.1
January
1993

日本不妊学会雑誌

第38巻 第1号
平成5年1月1日

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

第38回日本不妊学会総会および学術講演会
(第2回予告)

下記により第38回日本不妊学会総会および学術講演会を開催しますので多数の方々がご参加下さいますようお願い申し上げます.

記

期　　日：平成5年9月10日(金)　役員会
　　平成5年9月11日(土)　学術講演会，評議員会，総会
　　平成5年9月12日(日)　学術講演会

会　　場：国立京都国際会館
　　〒606　京都市左京区宝ケ池
　　TEL. (075) 791-3111

学術講演会

本講演会では，会長講演，教育講演，特別講演，シンポジウム，ワークショップ，一般演題を予定しています．シンポジウム，ワークショップの詳細については追ってお知らせします．

一般演題は口演発表とポスターに分かれ，いちおうご希望を伺いますが，その選択は事務局にお任せ願います．多数のお申し込みをお待ちしています．ご応募の方は演題申し込み要領に従い，倫理面を十分に考慮して頂きたく存じます．演題の採否は会長にご一任願います．

Ⅰ　会長講演　女性不妊に対する保存手術療法の歩み
　　杉本　修（大阪医科大学産婦人科教授）

Ⅱ　教育講演　子宮内膜症の病態
　　植木　実（大阪医科大学産婦人科助教授）

Ⅲ　特別講演
　1．疾病における遺伝子解析の新技術と展望
　　林崎良英（理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター）
　2．精巣における細胞機能調節
　　藤沢正人（神戸大学泌尿器科）

Ⅳ　シンポジウム
　下垂体性ゴナドトロピンの基礎と臨床
　　司会：青野敏博（徳島大学産婦人科教授）
　　守殿貞夫（神戸大学泌尿器科教授）

Ⅴ　ワークショップ
　生殖におけるニューテクノロジー
　　司会：広井正彦（山形大学産婦人科教授）
　　片山　喬（富山医科薬科大学泌尿器科教授）
　　森　純一（大阪府立大学農学部教授）

Ⅵ　一般演題

演題申し込み資格

講演者 (共同発表者を含む) は本会会員に限ります．会員以外の方は演題申し込みと同時に，1993年度会費 (8,000円) を納入のうえ会員になって下さい．

演題申し込み要領

1．抄録を所定の抄録用紙にタイプまたはワープロで打ち，書留郵便にて下記にお送りください．

〒569　大阪府高槻市大学町２番７号
大阪医科大学産科婦人科学教室内
第38回日本不妊学会総会事務局

2．抄録は800字以内，図，表はつけないでください．

3．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３部とお送りください．

4．申し込みの締め切り日は**1993年４月20日 (火) (必着)**

演題発表方法

口演発表は講演時間は７分，討論時間は３分の予定です．スライドプロジェクターは各会場とも１台とし，スライドは10枚以内とします．ポスターは発表３分，討論４分とします．

参加申し込み方法

第38回日本不妊学会のみに参加の方は，学会当日下記金額を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

なお，第８回世界体外受精会議と一括前払いされても差し支えありません．当日登録証をお渡しいたします．

懇親会は，学術講演会第１日終了後に国立京都国際会館の「さくらの間」で行います．

1993年１月

第38回　日本不妊学会
会長　　杉　本　　修

連絡先：〒569 大阪府高槻市大学町２番７号
大阪医科大学産科婦人科学教室内
第38回日本不妊学会総会事務局 (植木　実，奥田喜代司)
TEL. 0726-83-1221 (代表)　内線 2685 (研究室)
FAX. 0726-84-1422，0726-84-6540

平成４年度第２回通常総会

平成４年度第２回通常総会は下記の如く東京都新宿区において開催され，飯塚理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採決を行った．

日　　時　　平成４年11月６日 (金) 13時５分～13時25分
場　　所　　東京都新宿区 京王プラザホテル (コンコード)
開会当時の会員数　　4012名
当日の出席会員数　　2041名 (含委任状)

議　　事

第１号議案：名誉会員推薦の件

理事会および評議員会より推薦の別記４名につき審議の結果，全員一致にて名誉会員とすることを承認した．

第２号議案：功労評議員推薦の件

理事会および評議員会より推薦の別記67名につき，審議の結果全員一致にて功労評議員とすることを承認した．

第３号議案：役員改選の件

評議員会の決定した候補者につき審議の上，全員一致にて別記の如く次期理事 (20名)，監事 (3 名) を選出した．

第４号議案：評議員改選の件

定款第19条に定める評議員の支部別定数については理事会，評議員会の原案通り下記の如く定めることを全員一致で承認した．

北海道支部　４名，東北支部　５名，関東支部　16名，中部支部　５名，
北陸支部　４名，関西支部　８名，中国・四国支部　６名，九州支部　７名

第５号議案：平成６年度，平成７年度学術講演会および総会に関する件

平成６年度平成７年度学術講演会および総会は理事会，評議員会の原案通り，下記の如く開催することを全員一致で承認した．

平成６年度　　担当支部　北陸支部
　　会　　長　片山　喬
　　開 催 地　富山市
平成 ７年度　　担当支部　東北支部
　　会　　長　広井正彦
　　開 催 地　山形市

新名誉会員，功労評議員および新役員について

11月 6 日開催された平成 4 年度第 2 回通常総会において次の 4 名の方々が新たに名誉会員として，また，67名の方々が功労評議員として推薦，承認された．また役員(理事および監事) の改選が行なわれたので，11月 7 日臨時理事会を開き，互選により下記の如く理事長，副理事長，常任理事を選出するとともに，新評議員および幹事を選任した．

名誉会員	飯 塚 理 八	(関東支部)		木 下 佐	(関東支部)
	酒 徳 治三郎	(中国四国支部)		高 木 繁 夫	(関東支部)

理 事	理 事 長	入 谷 明	(関西支部)
	副 理 事 長	島 崎 淳	(関東支部)
	〃	水 野 正 彦	(〃)
	〃	毛 利 秀 雄	(〃)
	理 事(常任)	石 田 一 夫	(〃)
	〃 (〃)	佐 藤 和 雄	(〃)
	〃 (〃)	白 井 将 文	(〃)
	〃 (〃)	玉 田 太 朗	(〃)
	〃 (〃)	水 口 弘 司	(〃)
	〃 (〃)	百 瀬 和 夫	(〃)
	〃 (〃)	矢 内 原 巧	(〃)
	〃 (〃)	清 水 哲 也	(北海道支部)
	〃 (〃)	森 崇 英	(関西支部)
	〃 (〃)	片 山 喬	(北陸支部)
	〃	広 井 正 彦	(東北支部)
	〃	八 神 喜 昭	(中部支部)
	〃	友 吉 唯 夫	(関西支部)
	〃	青 野 敏 博	(中国四国支部)
	〃	岡 村 均	(九州支部)
	〃	永 田 行 博	(〃)
監 事	熊 本 悦 明	(北海道支部)	
	佐久間 勇 次	(関東支部)	
	浜 田 宏	(〃)	

功労評議員（順不同）

北海道支部

大越隆一　横尾和夫　小國親久

東北支部

品川信良　宮川コウ　真木正博

関東支部

今道友則　岩城　章　相馬広明　大地隆温
大野虎之進　高田道夫　永瀬弘司　岡本良平
田村昭蔵　中原達夫　小川重男　田村　武
梅津隆子　小畑英助　西　望　陳　泮水
神戸川　明　福井靖典　土屋文雄　加来道隆
古谷　博　高見沢裕吉　久慈直志　増淵一正
中山徹也　小林一夫　松山栄吉　藤井明和
小林拓郎　村山　茂　伊藤光雄　佐伯政雄
目崎鑛太　石原　力　杉山四郎　渡辺　茂
鈴木正彦

中部支部

石原　実　大島　清　野田克巳　大池哲郎
可世木辰夫

北陸支部

河崎屋三郎　藤田幸雄

関西支部

浅野　定　市川茂孝　竹村　喬　下村虎男
山村博三　杉本修一　須川　佶　宮崎　重

中国・四国支部

飯塚修務　武田　秀　林　要　新甲　洋

九州支部

赤嶺正次　門田　徹　迎　俊彦　今村臣正
中山道男

定款評議員

北海道支部

金川弘司　河田啓一朗　小柳知彦　藤本征一郎

東北支部

折笠精一　川越慎之助　高橋克幸　平野睦男
菅原七郎

関東支部

阿曽佳郎　麻生武志　雨宮　章　岩崎寛和
遠藤　克　大島博幸　加藤順三　小林俊文
武谷雄二　津端捷夫　寺島芳輝　豊田　裕
百目鬼郁男　穂坂正彦　町田豊平　森沢正昭

中部支部

川島吉良　玉舎輝彦　友田　豊　中西正美
三宅弘治

北陸支部

泉　徳和　舘野政也　富永敏朗　久住治男

関西支部

礒島晋三　岡田弘二　守殿貞夫　椹木　勇
杉本　修　谷沢　修　森　純一　吉田　修

中国・四国支部

大森弘之　加藤　紘　北尾　学　相良祐輔
竹中生昌　丹羽晧二

九州支部

杉森　甫　立山浩道　中野仁雄　金澤浩二
松浦講平　宮川勇生　山辺　徹

なお，定款評議員上記55名については，1993年1月1日より1994年12月31日まで評議員を委嘱します．本誌面をもって委嘱状とさせていただきます．また，支部評議員については次号(38巻2号)に掲載致します．

幹　事

味香勝也	石島芳郎	伊藤晴夫	苛原　稔
内海恭三	遠藤　克	岡田清己	川越慎之助
楠原浩二	小林俊文	田中昭一	田原隆三
津端捷夫	堂地　勉	百目鬼郁男	中村元一
野田洋一	花田征治	平川　舜	布施秀樹
穂坂正彦	星合　昊	松本　修	三橋直樹
森沢正昭			

日 本 不 妊 学 会 誌
第38巻 第1号
平成5年1月1日

——目　　次——

原　著

ヒト卵胞液中に見いだされるアルギニンアミダーゼに関する研究
1－分子量の異なる3種アルギニンアミダーゼについて－……小林俊文・他……1
ヒト顆粒膜細胞における甲状腺ホルモンレセプターmRNAの発現に関する研究
……岡村昌幸・他……7
ヒト卵胞に於けるatrial natriuretic peptide (ANP) binding site (英文)……臼杵　恭……11
体外受精における抗リン脂質抗体の意義……加藤充弘・他……16
GnRH agonist併用による過排卵刺激法：
Long protocolとShort protocolの有用性に関する比較検討……渡部秀哉……22
LH-RH agonist療法時の更年期症状に対する
代謝性ステロイド製剤 (Metharmon®-F錠) の予防効果の検討……植村次雄・他……28
体外受精・胚移植における過排卵刺激時のホルモン環境と着床率との関係……星合　明……38
配偶子卵管内移植 (GIFT) における妊娠成立に関与する諸因子の検討……北澤正文……45
体外受精に関する培養液と微小環境培養法の基礎的・臨床的研究……藤森　淑……53
GnRHa併用周期におけるpremature luteinizationの体外受精成績に及ぼす影響 (英文)
……児玉英也・他……61
習慣流産患者に対するTRHテストの意義 (英文)……河野雅洋・他……66
習慣流産の免疫療法前後における免疫学的変化について……中塚幹也・他……72
血清CA125及び各種マーカーを使用した切迫流産の予後判定 (英文)……高橋健太郎・他……80
経腟超音波断層法による妊娠初期の予後判定……中町悟子・他……87
子宮卵管造影法 (HSG) の不妊症に対する治療効果の検討……緒方りか・他……91
挙児希望婦人における診断的腹腔鏡検査の有用性……大野洋介・他……95
共通尿生殖洞例における腟入口形成術 (英文)……石丸忠之・他……100
不妊を主訴としたXYY症候群の1例……稲井　徹・他……105
男子不妊症の臨床統計的検討……石田　章・他……109
男性不妊の臨床的観察……大橋正和・他……116
当院における体外受精・胚移植の成績——特に精液性状の観点から——……西村　満・他……123
ヒト精子表面におけるFibronectionの局在と受精への関与……佐々木宏子・他……129
機能性男性不妊症における新しい検査法：
Hypoosmotic Swelling Testと精子Acrosin活性測定の有用性に関する検討……戸田稔子・他……137
静脈性インポテンスに対する拡大鏡下venous ligation surgery (英文)……瀧原博史・他……142
AIHの成績から見た精子濃度の臨床的意義……石原　理・他……147
Transverse Vasovasostomyにより妊娠・出産に成功した無精子症の1例……小林信幸・他……152
hCG連続投与後，精漿中transferrin濃度の増加とともに妊孕性を獲得した
無精子症の一例……吉田謙一郎・他……156
不妊をきたした筋緊張性ジストロフィー (Myotonic dystrophy) の1例……岡田　弘・他……161
停留精巣における精巣上体異常の過去23年間の臨床的検討……鎌田清治・他……164

当科における精索静脈瘤の動物実験モデルの総合的検討 (英文)
……ニコラオス・ソフィキティス・他……168
胚盤胞形成過程のマウス胚における
アクチンとサイトケラチンの組織化学的観察 (英文)……四谷伊公子・他……177
総　説
Hatching現象——形態変化と機序，及びプロスタグランジンとの関係—— ……千田　智・他……183
地方部会講演抄録……193

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 38, No. 1, 1993)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

Studies on Arginine Amidases in Human Follicular Fluid
1-Evidence of Three kinds of Arginine Amidases Having Different Molecular Mass-
..... *T. Kobayashi, S. Kaneko, S. Nozawa, T. Sugiyama, E. Iida, Y. Matsuda & S. Akihama* 1

Studies on the Expression of Thyroid Hormone Receptor m RNA in Human Granulosa Cells
..... *M. Okamura, T. Otani, T. Sugawara & M. Mochisuki* 7

Atrial Natriuretic Peptide Binding Sites on Human Ovarian Follicles ..... *S. Usuki* 11

Significance of Antiphospholipid Autoantibodies in In Vitro Fertilization ..... *M. Kato, H. Kodama, T. Matsui, J. Fukuda, S. Takeda, K. Sekine & M. Maki* 16

Comparison of Long-term and Short-term Protocols in Controlled Ovarian Hyperstimulation with GnRH agonist and hMG for IVF-ET ..... *H. Watanabe* 22

The Effect of a Sex Steroid-thyroid Hormon Mixture (Metharmon-F Tablets) in Prventing Climacteric Symptoms During LH-RH agonist Therapy
..... *T. Uemura, H. Minaguchi, K. Shirasu, Y. Yosimura, T. Negishi, N. Katagiri, T. Yanagihashi, N. Takahashi, K. Nakase, J. Mouri, M. Nakayama, T. Koshimizu, S. Tsutiya, T. Ooyama, K. Satou, A. Matsuyama, O. Kosuge & N. Ootsuka* 28

Relationship between Hormonal Environment and Implantation Rate during the Controlled Ovarian Hyperstimulation with GnRH Agonist and hMG in IVF-ETcycles ..... *A. Hoshiai* 38

Evaluation of the Factors Concerning the Achievement of Successful Pregnancy by Gamete Intrafallopian Transfer ..... *M. Kitazawa* 45

Basic Clinical Study of Medium and Microenviromental Incubation for in Vitro Fertilization-Embryo Transfer ..... *S. Fujimori* 53

The Effect of Premature Luteinization During Pituitary Suppression with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist on the Outcome of in Vitro Fertilization
..... *H. Kodama, J. Fukuda, T. Matsui, K. Sekine, M. Tasdemir & I. Tasdemir* 61

Significance of TRH Test for Habitual Aborters ..... *M. Kawano, T. Ishimaru & T. Yamabe* 66

Immunological Changes after Lymphocyte Injection Therapy for Habitual Aborter
..... *M. Nakatsuka,*

K. Nishikiori, A. Hasegawa, Y. Hirano, T. Katayama, K. Shintani, J. Noma, K. Shimizu, N. Yoshida & T. Kudo ……72

Study on Prognostic Value of Serum CA 125, Hormones Associated with Pregnancy and Ultrasonographic Examination in Threatened Abortion …… *K. Takahashi, S. Okada, K. Yoshino & M. Kitao* ……80

Early Pregnancy Outcome Predicting with Transvaginal Ultrasonography …… *S. Nakamachi, Y. Inoue, H. Fukue, H. Hata, H. Yamamoto, S. Tanaka & R. Kudo* ……87

Therapeutic Efficacy of Hysterosalpingography (HSG) in Infertility, a Prospective, Randomized, Clinical Study …… *R. Ogata, G. Nakamura, Y. Uchiumi, M. Yokoyama, Y. Watanabe, M. Nozaki, M. Sano & H. Nakano* ……91

Usefulness of Diagnostic Laparoscopy for Infertile Women …… *Y. Ohno, T. Tamura, J. Kitawaki, K. Tanaka, T. Yamamoto & H. Okada* ……95

Vaginoplasty for Imperforate Vagina with Vaginourethral Communication …… *T. Ishimaru, H. Masuzaki & T. Yamabe* ……100

A Case of XYY Syndrome with Male Infertility …… *T. Inai, T. Hamao, M. Kajimoto, N. Miyake, S. Naruo & S. Kagawa* ……105

A Clinico-Statistical Study on Male Infertility …… *A. Ishida & T. Tomoyoshi* ……109

Clinical Observation on Male Infertility …… *M. Ohashi, H. Ishikawa, M. Ohya, M. Tachibana, S. Baba, N. Deguchi, S. Jitsukawa, M. Hata & H. Tazaki* ……116

Retrospective Studies on the Semen Characteristics and the Outcome of In Vitro Fertilization-Embryo Transfer in Our Hospital …… *M. Nishimura, H. Okata, A. Nishigaki, Y. Ootani, Y. Torii, S. Aoki & K. Sato* ……123

Localization of Fibronection on the Surface of Human Spermatozoa and Relation to the Fertilization …… *H. Sasaki & K. Hoshi* ……129

Employment of New Assays in the Evaluation of Idiopathic Male Infertility: Hypoosmotic Swelling Test and Sperm Acrosin Activity … *T. Toda, Y. Mio, N. Terakawa, N. Sofikitis, I. Miyagawa & P. M. Zavos* ……137

Microscopic Venous Dissection Surgery for the Treatment of Venous Impotence …… *H. Takihara, T. Ueno, Y. Baba,K. Kamada, S. Shirataki, K. Ishizu & K. Naito* ……142

Retrospective Analysis of Infertile Couples Treated by Artificial Insemination with Husband's Semen …… *O. Ishihara, J. Taya, Y. Iino, M. Saitoh, T. Suno, K. Kinoshita & K. Yoshida* ……147

A Case Report of Transverse Vasovasostomy with Successful Fertilization …… *N. Kobayashi & K. Yoshida* ……152

A Report of Successful Fertilization of Azoospermic Patient Accompanied with the Increase of Seminal Plasma Transferrin Concentration by hCG Treatment

……*K. Yoshida, Y. Uchijima, N. Kobayashi & H. Saitoh*……156
A Case Report of Myotonic Dystrophy with a Complaint of Infertility ……*H. Okada, A. Hayashi, O. Imanishi, O. Matsumoto & S. Kamidono*……161
A Clinical Study on Epididymal Abnormalities Associated with Undescended Testis
……*K. Kamada, H. Takihara, S. Shirataki, T. Ueno K. Ishizu, Y. Baba & K. Naito*……164
Experimental Models for the Study of Varicocele: A Selected Review
……*N. Sofikitis & I. Miyagawa*……168
Histochemical Observations on Actin and Cytokeratin in Mouse Embryos in the Course of Blastocyst Formation ……*I. Yotsutani, S. Niimura & K. Ishida*……177
Hatching of Blastocysts
—Morphology, Mechanism and Prostaglandin Synthesis— ……*S. Chida, M. Suzuki, S. Uehara, A. Yajima, L. Mettler & K. Semm*……183

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

ヒト卵胞液中に見いだされるアルギニンアミダーゼに関する研究
1. 分子量の異なる3種アルギニンアミダーゼについて

Studies on Arginine Amidases in Human Follicular Fluid
1. Evidence of Three kinds of Arginine Amidases Having Different Molecular Mass

慶応大学医学部産婦人科教室
小林俊文　野澤志朗
Toshifumi KOBAYASHI　Shirou NOZAWA
Department of Obstetrics and Genecology, School of Medicine,
Keio University, Tokyo 160, Japan

東京歯科大学市川総合病院産婦人科
兼子智
Satoru KANEKO
Department of Obstetrics and Genecology,
Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College

荻窪病院産婦人科
杉山武　飯田悦郎
Takeshi SUGIYAMA　Eturo IIDA
Department of Obstetrics and Genecology,
Ogikubo General Hospital

明治薬科大学第一生化学
松田兆史　秋浜澄行
Yoshifumi MATSUDA　Sumiyuki AKIHAMA
Department of Biochemistry,
Meiji College of Pharmacy

ヒト卵胞液中よりゲルろ過を用い，3種の分子量の異なるBz-Arg-pNA水解活性を示すアルギニンアミダーゼ画分を分離しその性質を検討した．さらに，これら画分中より酸性および塩基性のアルギニンアミダーゼをそれぞれ分離し，その基質特異性あるいは阻害剤に対する態度等を追究した．その結果，これらヒト卵胞液中から見いだされた酸性および塩基性アルギニンアミダーゼ類は相互に異なる性質を示すことを明らかになった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 1 — 6, 1993)

緒　言

生殖生理における女性側の最も重要な現象は排卵である．排卵機構については種々の説があるが，卵胞内圧の上昇およびタンパク分解酵素によるグラーフ卵胞頂部結合組織の解烈により排卵に至るとの考えが近年支持されてきた．現在，成熟卵胞あるいは卵胞液中には組織プラスミノーゲンアクチベター(EC 3. 4. 21. 68)[1~2]あるいはコラゲナーゼ(EC 3. 4. 4. 19)[3]等が存在することが明らかにされており，LHサージがトリガーとなり，組織プラスミノーゲンアクチベーターからプラスミン(EC 3. 4. 21. 8)を経てコラゲナーゼに至るプロティナーゼ・カスケード系が作用し，排卵が生じるとの考えが示された[4]．このことから卵胞液中のプロティナーゼ類，特にカスケードを形成するトリプシン様アルギニンアミダーゼ類について興味が喚起されてきた．

我々はすでにヒト卵胞液中のプロティナーゼの検索を行い，セルロファインGCL-2000ゲルろ過により分画される，2種の分子量の異なるD-valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitro-anilide (Val-Leu-Arg-pNA)水解活性を示すアルギニンアミダーゼが存在することを明らかにし，このうち主分画(メジャーピーク)中に含まれるアルギニンアミダーゼについてその性質を明らかにした[5]．

本論文では，ヒト卵胞液中に見いだされた分子量の異なる3種のアルギニンアミダーゼ活性画分について若干の検討を行った結果について報告する．

実験材料および方法

ヒト卵胞液：ヒト卵胞液はIVFプログラムにより得，採取については患者の同意を得ている．

IVF時，第一卵採取時に得られる卵胞液を集め，血液の混入の有無を確認した．得られた卵胞液は10,000g，30分間遠心分離を行い，上清はさらに0.45 μmのミリポア・フィルターを通した後，-40℃で保存した．

酵素活性測定：アルギニンアミダーゼ活性の測定はAmundsenらの方法[6]を一部改変し，最終基質濃度1mM，37℃，pH8.5で行った．酵素活性は1分間に加水分解された基質の量(n mol/min)で表示した．

基質の略号として以下のものを用いた．

N-α-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Bz-Arg-pNA); D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (Val-Leu-Arg-pNA); L-Phenylalanyl-L-valyl-L-arginine-p-nitroanilide (Phe-Val-Arg-pNA); N-α-Benzoyl-isoleucyl-glycyl-glycyl-L-arginin-p-nitroanilide (Bz-Ile-Gly-Gly-Arg-pNA); Boc-L-leucyl-glycyl-L-arginine-p-nitroanilide (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA); Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-leucine-p-nitroanilide (Suc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNA.

結　果

ヒト卵胞液のセルロファインGCL-2000ゲルろ過：前報告[5]と同様に，ヒト混合卵胞液をあらかじめ0.05M Tris-HCl緩衝液pH7.5で平衡化したセルロファインGCL-2000ゲルカラムに添加し，ゲルろ過を行った．図1には標準的な結果を示したが，図中に示したごとく，ヒト混合卵胞液中には，分子量の異なる，2種のVal-Leu-Arg-pNA水解活性と，3種のBz-Arg-pNA水解活性を示すアルギニンアミダーゼ画分が存在することが明らかになった．

3種のBz-Arg-pNA水解活性の内で最も高分子量の画分はカラムのVo付近に溶出され，他の2種はVal-Leu-Arg-pNA水解活性のピークとほぼ一致した．これら3種のBz-Arg-pNAおよびVal-Leu-Arg-pNA水解活性それぞれを含む3種のアルギニンアミダーゼ活性画分を分子量の大きい順に，高分子量 (High molecular weight-) (LMW-)，中分子量M (Middle molecular weight-) (MMW-) および低分子量 (Low molecular weight-) (LMW-) アルギニンアミダーゼ画分と仮に命名した(図1)．

ヒト混合卵胞液のセルロファインGCL-2000ゲルろ過で得られた各画分のタンパク量およびVal-Leu-Arg-pNAおよびBz-Arg-pNA両アルギニンアミダーゼ

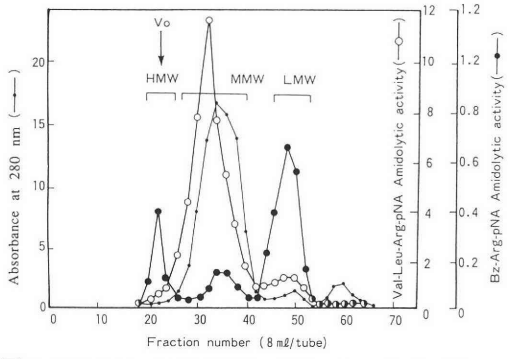


図1　Cellulofine GCL-2000 gel filtration of mixed human follicular fluid
Activity is shown as n mol／min／ml.
-・-, absorbance at 280 nm; -0-, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity; -●-Bz-Arg-pNA amidolytic activity

表1 Summary of Separation of Three Arginine Amidase Preparations from Human Follicular Fluid (40ml) by Cellulofine GCL-2000 Gel Filtration

Preparation	Protein	Amidolytic activity				Ratio
	Total	(1) Bz-Arg-pNA		(2) Val-Leu-Arg-pNA		
	A_{280}	Total activity	Specific activity	Total activity	Specific activity	(2)/(1)
HMW	48	20.9	0.43	178	3.7	8.5
MMW	955	6.5	0.0067	1321	1.4	205
LMW	61	25.0	0.41	98.3	1.6	3.9

Activity was expressed as n mol of substrate hydrolyzed per min.

表2 Summary of Separation of Acidic and Basic Arginine Amidases from Three Preparations of Human Follicular Fluid

Preparation		Protein	Amidolytic activity				Ratio
		Total	(1) Bz-Arg-pNA		(2) Val-Leu-Arg-pNA		
		A_{280}	Total activity	Specific activity	Total activity	Specific activity	(2)/(1)
HMW	Basic	5.9	0.022	0.0036	0.71	0.12	33.0
	Acidic	18.2	0.22	0.012	21.5	1.18	95.5
MMW	Basic	6.2	1.17	0.19	3.52	0.57	3.0
	Acidic	275.8	1.52	0.006	505	1.83	331.0
LMW	Basic	5.4	1.26	0.23	1.45	0.27	1.2
	Acidic	34.3	6.82	0.20	8.38	0.24	1.2

Activity was expressed as n mol of substrate hydrolyzed per min.

活性の標準的な結果をまとめて表1に示した．中分子量アルギニンアミダーゼ画分 (メジャーピーク)[5]のVal-Leu-Arg-pNA水解活性とBz-Arg-pNA水解活性の比 (Val-Leu-Arg-pNA/Bz-Arg-pNA) は約200と大きく，他の2画分から得られた値とは大きく異なっていた．

各画分より酸性および塩基性アルギニンアミダーゼの分離：高分子量および低分子量アルギニンアミダーゼ画分は，伝導度(コンダクティビテー)およびpHをそれぞれ2.0 mS/cm以下および7.0に調整した後，DEAE-セルロースを加え，2時間吸着を行なった．吸着終了後，0.5M NaClを用い溶出し，高分子量および低分子量両画分よりまずそれぞれの酸性アルギニンアミダーゼを得た．中分子量アルギニンアミダーゼ画分についてはプラスミノゲンおよびプラスミンの存在が明らかにされているため[5,7]，リシンセルロファインアフィニテーカラムを用い，あらかじめこれらを除去した後，同様に行い，中分子量酸性アルギニンアミダーゼを得た．

つぎに，各画分のDEAE-セルロース非吸着溶液と洗浄液の合液について，溶液の伝導度をさらに1.0 mS/cm以下に調製した．この各溶液にCM-セルロースを加え，DEAE-セルロースの場合と同様に吸着を行った．吸着終了後，0.05M NaClを用いて溶出を行い，各画分それぞれから塩基性アルギニンアミダーゼを得た．

分子量の異なる3種アルギニンアミダーゼ各画分から得られた酸性および塩基性アルギニンアミダーゼのVal-Leu-Arg-pNAおよびBz-Arg-pNA水解活性をまとめて表2に示した．高分子量画分より得られた塩基性アルギニンアミダーゼ活性は他の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼに比べ微量であった．それぞれのアルギニンアミダーゼのVal-Leu-Arg-pNAとBz-Arg-pNA水解活性の比率は，高および中分子量アルギニンアミダーゼ各画分より得た酸性アルギニンアミダーゼでは高値を示したが，中分子量アルギニンアミダーゼ画分由来の塩基性アルギニンアミダーゼおよび低分子量画分より得られた酸性および塩基性両酵素では低い値を示していた．

各画分より得た酸性および塩基性アルギニンアミダーゼの基質特異性：前記方法により得た酸性および塩基性アルギニンアミダーゼを用いて5種類のアミ

表3 Substrate Specificity of Acidic and Basic Arginine Amidases From Human Follicular Fluid
The ratio of amidolytic activity is given relative to standard Val-Leu-Arg-pNA

Substrate	Enzyme preparation from					
	HMW-		MMW-		LMW-	
	Acidic	Basic	Acidic	Basic	Acidic	Basic
Val-Leu-Arg-pNA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Phe-Val-Arg-pNA	1.2	2.2	1.1	1.3	1.7	0.92
Boc-Leu-Gly-Arg-pNA	0.27	0.31	0.64	0.15	1.5	0.38
Bz-Ile-Gly-Gly-Arg-pNA	0.06	0.61	0.26	0.01	0.60	0.39
Suc-(Ala)2-Pro-Leu-pNA	0.05	2.5	0.27	0.03	2.5	0.91

表4 Behaviour of Some Inhibitors on Val-Leu-Arg-pNA Amidolytic Activity of Acidic and Basic Arginine Amidases from Human Follicular Fluid

Inhibitor	Amount	Enzyme					
		HMW-		MMW-		LMW-	
		Acidic	Basic	Acidic	Basic	Acidic	Basic
				(Inhibition%)			
α_1-Antitrypsin	0.1 μg	12	90	15	28	72	65
Leupeptin	1 μg	50	15	30	32	45	25
Pepstatin	1 μg	65	42	0	35	8	37
Phospharamidon	1 μg	0	16	0	28	0	20
Anti-urokinase	0.01 μg	0	0	0	0	0	0
Anti-plasminogen	0.01 μg	0	0	0	0	0	0

ダーゼ基質に対する特異性の検討を行なった．結果はまとめて表3に示した．それぞれの活性はVal-Leu-Arg-pNA水解活性を1とした場合の比率で示した．

各画分より得た酸性アルギニンアミダーゼそれぞれは良好なPhe-Val-Arg-pNA水解活性を示した．また実験に用いた基質の中で高，中および低分子量各画分より得た酸性アルギニンアミダーゼに対する最良の基質はそれぞれPhe-Val-Arg-pNA (高および中分子量) およびSuc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNA (低分子量) であった．これらヒト卵胞液中より分離した3種酸性アルギニンアミダーゼの基質特異性のパターンは相互に異なっていた．

ヒト混合卵胞液より得られた塩基性アルギニンアミダーゼ3種の基質特異性のパターンも同様に相互に異なっており (表3)，Phe-Val-Arg-pNAは，酸性アルギニンアミダーゼの場合と同様に，各塩基性アルギニンアミダーゼの良好な基質であった．特に，高分子量画分より分画された酸性アルギニンアミダーゼの場合には基準としたVal-Leu-Arg-pNA水解活性の約2.2倍の活性が得られることが明らかとなった．実験に用いた基質中でそれぞれの酸性アルギニンアミダーゼに対して最も良い基質は，Suc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNA (高分子量)，Phe-Val-Arg-pNA (中分子量) およびVal-Leu-Arg-pNA (低分子量) であった．

各種阻害剤に対する態度：得られた6種の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼの各種プロティナーゼ阻害剤および抗体に対する態度の検討結果をまとめて表4に示した．α_1-アンチトリプシンは高分子量酸性および低分子量の酸性および塩基性両アルギニンアミダーゼに対して強い，あるいは比較的強い阻害作用を示したが，これら以外のアルギニンアミダーゼに対しては弱い作用を示したのみであった．ロイペプチンは分離された6種の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼ全てに対して阻害作用を示した．また，メタロプロティナーゼの阻害剤であるフォスファラミドンは3種塩基性アルギニンアミ

ダーゼに対して弱い阻害作用を示すことが認められた．一方，抗ヒトウロキナーゼおよび抗ヒトプラスミノーゲンはこれら酵素のVal-Leu-Arg-pNA水解活性に対してまったく阻害効果を示さなかった．

考　察

我々はすでに，ヒト卵胞液中より2種の分子量の異なるVal-Leu-Arg-pNA水解活性を示すアルギニンアミダーゼ(メジャーピークおよびマイナーピーク)[5]の存在を見いだし報告した．また，このメジャーピーク中にはプラスミノーゲンおよびプラスミン，あるいは組織プラスミノーゲンアクチベーターが存在することも明らかにした[5,7]．本研究では，アルギニンアミダーゼ活性測定の基質としてさらにBz-Arg-pNAを用いて，前報告[5]では見いだされなかった，ゲルろ過カラムのボイドボリウム(Vo)付近に溶出される，Bz-rg-pNA水解活性を示す高分子量アルギニンアミダーゼ活性ピークの存在を新たに明らかにした(図1)．この高分子量活性画分を含む本研究で得られた3種アルギニンアミダーゼ画分(図1)を，それぞれ高分子量 (High molecular weight: HMW-)，中分子量 (Middle molecular weight: MMW-) および低分子量 (Low molecular weight: LMW-) アルギニンアミダーゼ画分と仮に命名した．このうち，中分子量および低分子量アルギニンアミダーゼ画分それぞれは前報告[5]で示したメジャーピークおよびマイナーピークと同一である．高分子量画分におけるVal-Leu-Arg-pNA水解活性はスロープ状であるために(図1)，前報告[5]中ではこれを捕ら得なかったものと考えられる．得られた3種アルギニンアミダーゼ画分の両基質水解活性の比率は大きく異なっており(表1)，これら3種アルギニンアミダーゼ画分の性質が大きく異なることが示唆された．

図1中に示した分子量の異なる3種アルギニンアミダーゼ画分よりそれぞれ得られた3種の酸性アルギニンアミダーゼ画分のVal-Leu-Arg-pNA/Bz-Arg-pNA比(表2)および基質特異性(表3)はそれぞれ互いに異なっていた．3種の酸性アルギニンアミダーゼ画分はそれぞれVal-Leu-Arg-pNAおよびPhe-Val-Arg-pNAを良く加水分解したが，高分子量および中分子量画分より分画された酵素はBz-Ile-Gly-Gly-Arg-pNAおよびSuc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNAに対しては強い活性を示さなかった．一方低分子量画分より得られた酸性アルギニンアミダーゼは実験に用いた基質すべてを良好に加水分解し，特にエラスターゼ様酵素の基質であるSuc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNAを最も良く加水分解することが明らかになった．3種塩基性アルギニンアミダーゼについてもVal-Leu-Arg-pNAおよびPhe-Val-Arg-pNAは良好な基質であり，他の2種のアルギニンアミダーゼ基質はあまり良い基質とは言えなかった．またSuc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNAは高分子量および低分子量由来の塩基性アルギニンアミダーゼに対して良好な基質であった．特に，低分子量由来の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼ両酵素は共に強いSuc-$(Ala)_2$-Pro-Leu-pNA水解活性を示すことが注目される．このことは，この画分中に含まれる低分子量アルギニンアミダーゼ(群)の卵胞液中での特別な役割を持つ可能性を示すとも考えられよう．このようなエラスターゼ様酵素の基質に対する良好な加水分解能を示すアルギニンアミダーゼについては，すでにヒト精漿中[8,9]あるいは尿中[10]より見いだされており，今後，アルギニンアミダーゼが示すエラスターゼ様基質加水分解機能およびその意義について詳細な検討を行う必要があろう．

得られた6種の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼすべては抗ヒトウロキナーゼ抗体および抗ヒトプラスミノーゲン抗体により阻害を受けなかったことから，これらの画分中にウロキナゼあるいはプラスミノーゲンおよびプラスミンが含まれないことは明らかである．本研究において，プラスミノーゲンおよびプラスミンはリシンカラム処理により除去しており，本研究で得られたこれらのアルギニンアミダーゼ分画中に含まれないことは明らかである．一方ウロキナーゼに関しては，マウス・グラニュローザ細胞がウロキナーゼ様プラスミノーゲンアクチベーターを生産するとの報告もあり[1]，今後卵胞液中のウロキナーゼについても詳細な検討を行う必要があると考える．

文　献

1) Canipari, R., O' Connell, M., Meyer, G. and Strickland, S.: Mouse ovarian granulosa cells produce urokinase-type plasminogen activator, whereas the corresponding rat cells produce tissue-type plasminogen activator, J. Cell. Biol., 105: 977, 1987
2) Jones, P. B. C., Vernon, M. W., Muse, K. N. and Curry, T. E.: Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in human preovulatory follicular fluid, J. Clin. Endocrin. Metab., 68: 1039, 1989
3) Curry, T. E., Dean, D. D., Woessner, J. F. and LeMaire, W.: The extraction of a tissue collag-

enase associated with Ovulation in the rat, Biol. Reprod., 33: 981, 1985
4) LeMaire, W. J., Curry, T. E., Morioka, N., Brannstom, M., Clark, M. R., Woessner, J. F. and Koos, R. D.: Regulation of ovulatory processes, in Primate Ovaly, ed. by Stouffer R. L., pp 91 Prenum Publishing, New York, 1987
5) Kobayashi, T., Park, J-Y., Matsuda, Y., Kaneko, S., Nozawa, S. and Akihama, S.: Detection of some arginine amidase activity in human follicular fluid, Human Reprod., 6: 1030, 1991
6) Amndsen, E., Putter, J., Friberger, P., Knos, M., Lansbraten, M., Claseson, G.: Methods for detemination of glandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptide substrate, in Adv. EXp. Med. Biol. 120A, eds by Fujii S. et al., p 83 Prenum Publishing, New York, 1979
7) 松田兆史，秋浜澄行，兼子　智，小林俊文，藤本幸雄：ヒト卵胞液中に見いだされるアルギニンアミダーゼについて，日本薬学会第112年会講演要旨集，pp3-65, 1992
8) Kobayashi, T., Park, J-Y., Matsuda, Y., Hara, I., Kaneko, S., Oshio, S., Akihama, S. and Fujimoto, Y.: Basic arginine amidase from m man seminal plasma: Purification and some properties, Arch. Androl., 27: 197, 1991
9) Kobayashi, T., Hara, I., Matsuda, Y., Park, J-Y., Oshio, S., kaneko, S. and Akihama, S.: Detection and separation of two kinds of acidic arginine amidases from boar sperm using lima bean trypsin inhibitor (LBTI) and aprotinin affinity adsorptions, Arch. Androl., 28: 7, 1992
10) Matsuda, Y., Fujimoto, Y., Miyashita, A. and Akihama, S.: Evidence of two froms of basic arginine amidases from human male urine, Chem. Pharm. Bull., 38: 3407, 1990

Studies on arginine amidases in human follicular fluid 1. Evidence of three kinds of arginine amidases having different molecular mass

Toshifumi Kobayashi and Shirou Nozawa

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

Satoru Kaneko

Department of Obstetrics and Genecology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College

Takeshi Sugiyama and Eturo Iida

Department of Obstetrics and Genecology, Ogikubo General Hospital

Yoshifumi Matsuda and Sumiyuki Akihama

Department of Biochemistry, Meiji College of Pharmacy

Three arginine amidase preparations, having Bz-Arg-pNA hyderolyzing activity and different molecular mass were separated from human mixed follicular fluid by gel filtration on a Cellulofine GCL-2000 gel column and some of their properties were measured. The six acidic and basic arginine amidases from above three preparations were separated and their properties, such as substrate specificity and behaviors of inhibitors, were different from each other.

(受付：1992年9月8日特掲)
(受理：1992年9月16日特掲)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

ヒト顆粒膜細胞における甲状腺ホルモンレセプターmRNAの発現に関する研究

Studies on the Expression of Thyroid Hormone Receptor m RNA in Human Granulosa Cells

神戸大学医学部産科婦人科学教室
岡村昌幸　大谷徹郎　菅原正
Masayuki OKAMURA　Tetsuo OTANI　Tadashi SUGAWARA
望月眞人
Matsuto MOCHIZUKI
Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Kobe University, Hyogo 650, Japan

排卵障害を有する患者では甲状腺機能の低下の見られるものが多く，また，顆粒膜細胞のFSHによる機能分化には甲状腺ホルモンの存在が必須であることは当教室で以前から報告している．今回，我々はT3レセプターをコードしているとされるc-erbA mRNAのヒト顆粒膜細胞での発現につき検討を加えた．その結果，ヒト顆粒膜細胞では約5.7kbの大きさのc-erbA β mRNAが発現していることが判明した．c-erbA β はT3と結合して甲状腺ホルモンの作用に対して促進的な役割を果たす核内転写制御因子として働くことが知られており，今回の知見は顆粒膜細胞の甲状腺ホルモンによる機能制御の遺伝子レベルでの解明に向けた第一歩であるといえよう．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 7—10, 1993)

緒　言

顆粒膜細胞は卵巣の機能分化の要を担う細胞であり，卵胞の成熟，排卵，黄体形成という卵巣機能において最も重要な各ステップのいずれにおいても非常に重要な役割を果たしている．顆粒膜細胞はprimary follicleからgraffian follicleへの卵胞の成熟と共に盛んに増殖し，一部は卵の周囲を囲むcumulus oophorusとなり，他は卵胞壁を形成するmembrane granulosaとなる．この時期のgranulosa cell，特にmembrane granulosaはtheca cellと共同してestrogenを多量に産生する．排卵時に一部のgranulosa cellは卵と共に腹腔内に排出されるが，残ったgranulosa cellは急激な形態学的変化をとげ，周囲のtheca cellと共に黄体を形成するようになり，estrogen，progesteroneを盛んに分泌する．このように，顆粒膜細胞は性周期にあわせてダイナミックな増殖，分化を成し遂げるが，この過程にはLH，FSHといった性腺刺激ホルモン以外にも種々の細胞増殖因子，核内転写制御因子等が関与していると考えられる．

以前より我々の教室では顆粒膜細胞の機能分化には甲状腺ホルモンが大きな役割を果たしていることを報告しており[1]，また，臨床的にも排卵障害を有する患者には甲状腺機能の低下を見ることが多い[2]ことを報告している．このような顆粒膜細胞に対する甲状腺ホルモンの作用は顆粒膜細胞に存在する甲状腺ホルモンレセプターを介したものであろうと考えられるが，今回我々はヒト顆粒膜細胞での3，5，3’-triiodothyronine (T3) レセプターをコードする遺伝子であるc-erbA mRNA発現について検討したので報告する．

研究材料ならびに方法

1. RNAの抽出

in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) 時に得られた卵胞液を1000×gで10分間遠沈し，沈殿をDulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) にて2回洗浄してヒト顆粒膜細胞を得た．この顆粒膜細胞を4 M guadinine thiocyanateを含むsodium acetate buffer (pH 5.2) 中で超音波破砕し，5.7M cesium chlorideのstep gradientに積層し，10,000×gで20時間遠沈してRNAを得た[3]．

2. ノーザン　ブロット

total RNA 10 μ gをdenature後6 %formaldehydeを含む1 % agarose gelにloadし，20mM MOPS buffer (20mM MOPS，50mM sodium acetate，10mMEDTA，pH 7) 中で電気泳動した．泳動後のRNAは10×SSC (1 ×SSC=0.15M NaCl，0.015M sodium citrate) 中でnitrocellulose filterに移行させ，80℃で2時間bakeしcross linkingを行なった．

3. ハイブリダイゼーション

Evans博士より提供を受けたヒトc-erbA-βプローブ[4]はランダム　プライマー法[5]により［α-^{32}P］dCTPでラベルした．ハイブリダイゼーションに際してはRNAを吸着したフィルターをplastic bagに入れ，prehybridization buffer［50%formamide，6×SSC (1×SSC=0.1M NaCl，0.015M Sodium Citrate)，40mM phosphate buffer pH7，1×Denhardt's solution (0.02% polyvinyl pyrolydone，0.02%BSA)，0.1%SDS，1mMEDTA］中にて42℃12時間インキューベートした．その後，prehybridization bufferを除去し，上記bufferに10%dextran sulfateならびにラベルしたプローブを加えた組成のhybridization bufferを加えて42℃，12hハイブリダイズし，フィルターを1×SSC，0.1% SDSにて洗浄後-70℃にてautoradiographyを行なった．

結　果

図1に示すようにヒト顆粒膜細胞由来RNAを泳動したレーンではノーザン　ブロットにおいてヒトc-erbA βプローブとハイブリダイズする約5.7kbの大きさのバンドを認めた．

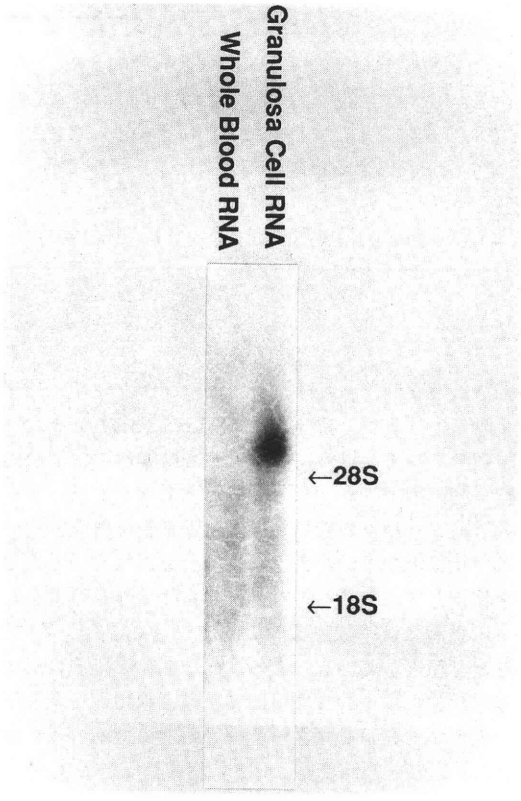


図1　ヒト顆粒膜細胞ならびに全血由来RNAにおけるerbA mRNAの発現。28Sおよび18Sはそれぞれの大きさのtRNAの泳動部位を示す。

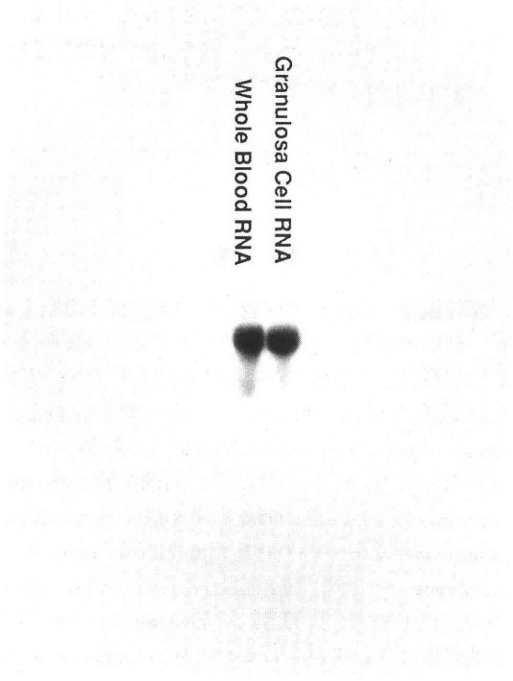


図2　ヒト顆粒膜細胞ならびに全血由来RNAにおけるβaction mRNAの発現。

得られた顆粒膜細胞に血球が混在していたことから全血よりRNAを抽出し同様に泳動してノーザンブロットを行なったがこのレーンにおいてはこのバンドは認められなかった．

また，図2に示すようにβアクチンをプローブとして用いたノーザン　ブロットでは両方のレーンにアクチンのバンドを認めた．

考　察

我々の教室では以前より卵巣機能に甲状腺ホルモンが大きく関与しており，特に排卵障害を有するものに甲状腺機能が相対的に低下しているものが多いこと[2]，また，培養顆粒膜細胞の機能分化には甲状腺ホルモンの存在が必須であること[1]を報告してきた．

今回我々はT3レセプターをコードしているとされるc-erbAプローブを用いてヒト顆粒膜由来のRNAのノーザン　ブロット　ハイブリダイゼーションを行ない，顆粒膜細胞にはc-erbAプローブとハイブリダイズする約5.7kbの大きさのmRNAが発現していることを明らかにした．同時に泳動した全血由来のRNAにはこのようなバンドは認められず，ヒト顆粒膜細胞においてc-erbA mRNAが発現していることが確認された．ところでT3レセプターをコードする遺伝子は別々の染色体に存在する2つのlocusがあり，17番染色体上に存在するものをc-erbAα，3番染色体上に存在するものをc-erbAβと分類されている[4, 6, 7]．今回我々が用いたプローブはc-erbAβプローブであり[4]，バンドのサイズからヒト顆粒膜細胞において発現しているc-erbA mRNAはc-erbAβ由来であろうと考えられる．

c-erbAβのコードする蛋白は細胞核内に存在し，T3と結合すると生物作用が発揮されるようになり，甲状腺ホルモンの影響下の各種遺伝子の転写制御配列に存在するthyroid hormone response element (TRE)と呼ばれる遺伝子配列に直接結合し，これらの遺伝子のmRNAの発現を促進する転写制御因子として働く[8, 9, 10]．

ヒト顆粒膜細胞にc-erbAβmRNAの発現が確認されたことから，顆粒膜細胞での甲状腺ホルモンの作用は，核内に存在する特異的レセプターを介したものであることが明らかとなった．

前述のごとくT3レセプターmRNAには大きく分けてα，βの2種が存在し，ラットではc-erbAα1，c-erbAα2，Rev-erbAα，c-erbAβ1，c-erbAβ2等の各種のerbA関連mRNAが発現していることが知られている[11, 12, 13, 14]．これらはerbAα，erbAβ2つの遺伝子locusからalternate splicingによって作られるとされている．これら各種mRNAが組織特異性をもって発現し[13, 15]，あるものは甲状腺ホルモンの影響下の遺伝子の転写に促進的に，また他のものは抑制的に働いて甲状腺ホルモンの作用を複雑に制御している[12, 14]と考えられている．ヒトではc-erbAα1，c-erbAα2，c-erbAβの存在が報告されており[4, 6, 7]，c-erbAβがT3と結合して甲状腺ホルモンの持つ各種細胞における代謝亢進作用にたいして促進的に働いていることは間違いのないところであるが，その他のc-erbA mRNAもヒトでの甲状腺ホルモンの作用を様々な形で修飾している可能性は強い[16]．

また，c-erbAβ遺伝子に異常を有するヒトでは血中甲状腺ホルモン値が異常高値をとるにもかかわらず，甲状腺機能低下の症状を示すことが報告されており[17]，c-erbAの発現と甲状腺機能との間には強い関連の存在が推察されている．

結　語

今回，ヒト顆粒膜細胞においてc-erbA mRNAの発現が確認されたことから，今後排卵障害その他卵巣機能に異常を有する婦人の卵巣における顆粒膜細胞の機能の異常，特に甲状腺ホルモンの作用との関連を遺伝子レベルで解明する手掛かりを得たものと考えられ，今後の研究の進展が期待される．

謝　辞

卵胞液を御提供いただいた恵生産婦人科，林要先生ならびに山辺晋吾先生に謝意を表します．本研究の一部は文部省科学研究費課題番号03670785によった．

文　献

1) Maruo, T., Hayashi, M., Matsuo, H., Yamamoto, T., Okada, H. and Mochizuki, M.: The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells, Endocrinology, 121: 1233, 1987

2) 阿江　孝，片山和明，望月眞人：　無月経患者における甲状腺ホルモン動態の解析－特に体重減少性無月経患者における性機能との関連性－，日不妊会誌，35: 1，1990

3) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources rich in ribo-

nuclease, Biochem., 18: 5294, 1979
4) Weinberger, C., Thompson, C. C., Dug, E. S., Lebo, R., Groul, D. J. and Evans, R. M.: The c-erb-A gene endoces a thyroid hormone receptor, Nature, 324: 641, 1986
5) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Anal. Biochem., 132: 6, 1983
6) Benbrook, D. and Pfahl, M.: A novel thyroid hormone receptors encoded by a cDNA clone from a human testis library, Science, 238: 788, 1987
7) Nakai, A., Seino, S., Sakurai, A., Szilak, I., Bell, G. I. and Degroot, L. J.: Characterization of a thyroid hormone receptor expressed in kidney and other tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2781, 1988
8) Glass, K. C., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V. R., Evans, R. M. and Rosenfield, M. G.: A c-erbA binding site in rat growth hormone gene mediates trans activation by thyroid hormone, Nature, 329: 738, 1987
9) Barlow, J. W., Voz, M. L. J., Elard, P. H., Hartert, M. M., Nayer, P. D., Dconomidis, I. V., Belayew, A., Martial, J. and Rousseau, G. G.: Thyroid hormone receptors bind to defined regions of the growth hormone and placental lactogen genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 9021, 1986
10) Darling, D. S., Burnside, J. and Chin, W. W.: Binding of thyroid hormone receptor to the rat thyrotropin β gene, Mol. Endocrinol., 3: 1359, 1989
11) Burnside, J., Darling, D. S. and Chin, W. W.: A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements, J. Biol. Chem., 265: 2500, 1990
12) Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. and Chin, W. W.: Identification of a rat c-erbA α related protein which binds deoxy ribonucleic acids but does not bind thyroid hromone, Mol. Endocrinol., 2: 893, 1988
13) Hodin, R. A., Lazar, M. A., Wintman, B. I., Darling, D. S., Koenig, R. J., Larsen, P. R., Moore, D. D. and Chin, W. W.: Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary specific, Science, 244: 76, 1989
14) Lazar, M. A., Hodin, R. A., Cardona, G. and Chin, W. W.: Gene expression from the c-erbA/Rev-erbA α genetic locus, J. Biol. Chem., 265: 12859, 1990
15) Cook, C. B. and Koenig, R.: Expression of erbA α and β mRNAs in regions of adult rat brain, Mol. Cell. Endocrinol., 70: 13, 1990
16) Schueler, P. A., Schwartz, H. L., Strait, K. A., Mariash, C. N. and Oppenheimer, J. H.: Binding of 3, 5, 3' triiodothironine (T3) and its analogs to the in vitro translational products of c-erbA protooncogenes: Differences in the affinity of the α and β forms for the acetic acid analog and failure of the human testis and kidny α 2 products to bind T3, Mol. Cell. Endocrinol., 4: 227, 1990
17) Chatterjee, V. K., Nagaya, T., Madison, L. D., Datta, S., Rentoumis, A., Jameson, J. L.: Thyroid hormone resistance syndorome. Inhibition of normal receptor functions by mutant thyroid hormone receptors, J. Clin. Invest., 87: 1977, 1991

Studies on the expression of thyroid hormone receptor mRNA in human granulosa cells

Masayuki Okamura, Tetsuo Otani,
Tadashi Sugawara and Matsuto Mochizuki

Department of obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Kobe University,
Hyogo 650, Japan

We have previously reported that in patients with menstrual disorders, hypothyroidism is frequently associated. We also showed that thyroid hormone is essential for follicle stimulating hormone (FSH) induced differentiation of porcine granulosa cells cultured in vitro. To see if the effect of thyroid hormone on granulosa cells are mediated through specific receptors, we studied the expression of c-erbA mRNA species in human granulosa cells.

The result indicated that granulosa cells express ample amount of c-erbA β mRNA. The size of this mRNA was about 5.7kb. The product of c-erbA β mRNA is known to be a T3 receptor which,when combined with T3, becomes a trans acting element that enhances transcription of thyroid hormone controlled genes. Therefore, the existence of c-erbA β mRNA in granulosacells indicates that the effect of thyroid hormone is mediated through specific receptors for T3 and that it is positively regulated. Further studies to elucidate molecular mechanism of thyroid hormone action on granulosa cells are expected.

(受付：1992年 6 月16日)
(受理：1992年 9 月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE BINDING SITES ON HUMAN OVARIAN FOLLICLES

Satoshi USUKI

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

Abstract : Binding studies revealed the presence of binding sites for atrial natriuretic peptide (ANP) on 3 human ovarian follicles (7, 12 and 18 mm in diameter, respectively). Values of ANP binding capacities were 2.56 pM/mg protein, 4.92 and 18.46 for 7mm in diameter, 12 and 18, respectively, and the number of binding sites increased in accordance with increases in P4, 17-OHP and E2 in follicular fluid. In contrast, the dissociation constant values were 8.7 pM, 8.12 and 8.54 in 7, 12 and 18 mm in diameter, respectively, without any major difference among the three. The results suggest that ANP binding sites increase with the advance of follicle growth and is involved in events related to the development of ovarian follicles.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 11—15, 1993)

Introduction

Atrial natriuretic peptides (ANPs), recently discovered cardiac hormone, are known to have wide-spread binding sites not only in the vascular system but also in the brain, the lung, the liver, the adrenal gland, the kidney, the placenta, the chorioidea and ciliary bodies and the ovarian granulosa cells[1-13]. However, there is little information about the effects of ANPs in these tissues. Recently, the renin-angiotensin system (RAS) was found in the ovary[14, 15]. It has since been suggested that the RAS plays an important role in events related to the reproductive process, and also that ANPs are involved in the process of folliculogenesis, either as physiological antagonists of the RAS or as regulators of sodium and water transport[16-18]. Furthermore, recently we proposed the ERAANPS (endothelin-renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system) in the ovary[19-21]. In this communication, the specific binding sites for ANP were examined in human ovarian follicles.

Materials and Methods

Ovarian follicles [7 mm, 12 and 18 in diameter] were obtained from patients with myoma during abdominal total hysterectomy with tubo-oophorectomy. ^{125}I-rat ANP and ^{14}C-methylated protein markers were purchased from Amersham, England; synthetic ANP from Peptide Institute, Osaka; disuccinimidyl suberate (DSS) from Pierce, U. S. A.; leupeptin and antipain from Protein Research Foundation, Osaka; X-ray film (RX-50) and developing solutions from Fuji Films, Tokyo.

The follicular tissue was minced and homogenized in a 50 mM Tris-HCL buffer (pH 7.1) containing 5 mM EDTA, 2 μg/ml each of leupeptin and antipain by 5.5 strokes in a Polytron homogenizer. The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4℃ and the supernatant was centrifuged at 105,000 g for 40 min at 4℃. The pellet was suspended in 10 mM PBS (10 mM phosphate, pH 7.4, containing 120 mM NaCl and 10 mM EDTA), again homogenized, and recentrifuged at 105,000 g for 40 min at 4℃. The washed pellet was stored at -80℃ until use.

Membrane suspension was diluted to 50-500-fold for binding assay with PBS containing 20 μg/ml each of leupeptin and antipain. Aliquots of 180 μl of diluted membrane suspensions were incubated with 2

$\times 10^4$ cpm of ^{125}I-rat ANP (10-20 pM) in a total volume of 200 μl containing 10 μl of unlabeled rat ANP of various concentrations. After incubation for 30 min at 22℃, 1 ml of cold PBS containing 0.1% BSA was added and filtered through Whatman GF/F filter. Filters were washed twice with an additional of 2ml of the same buffer. Filters were assayed for radioactivity in a Beckman γ-counter. The binding Scatchard plots were analyzed by nonlinear regression analysis.

For affinity labeling, electrophoresis, and autoradiography, paired tubes containing 50 μl of ^{125} I-rat ANP (2×10^5 cpm) and 500 μl of membrane suspension (5-10 mg membranes in PBS contaning 20 μg/ml each leupeptin and antipain) were allowed to bind membranes for 30 min at 22℃. Replicate incubations were made with the addition of 1.8 μM unlabeled rat ANP to distinguish specific from nonspecific labeling. After washing the membranes twice by centrifugation, the bound ^{125} I-rat ANP was covalently crosslinked by adding 0.5 mM DSS. Following a 10 min incubation at 22℃, the crosslinking reaction was terminated by adding 30 μl of ammonium acetate to a final concentration of 200 mM, and membranes were recovered and washed by centrifugation at 100,000 g for 10 min. Covalently labeled receptors were then analyzed by sodium dodecyl sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed under reducing and nonreducing conditions on gradient slab gels, prepared by mixing equal volumes of 3-13% acrylamide solutions according to the method of Laemmli[22]. For reduction of samples, 5% 2-mercaptoethanol was used. After electrophoresis, the gels were dried and exposed to X-ray film for 36 hrs at -70℃ with enhancing screen.

The follicular fluid progesterone (P4), 17α-hydroxyprogesterone (17-OHP), testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) were determined by RIAs using methods reported previously[23, 24].

Results

Specific binding of ^{125}I-rat ANP was observed when labeled ligand was incubated with follicular membrane preparations, and saturable, high-affinity binding to follicular membranes at 22℃ was rapid, and reached equilibrium between 30 and 60 min. On Scatchard analysis of the binding isoterms, apparent lines were obtained (Fig. 1). The dissociation constant values revealed a single class of binding sites without any major differences among the three (Table 1). However, the binding capacities differed remarkably in these follicles with gradual increases in values with the advance of follicle growth (Table 1). The putative membrane surface receptors for ANP have been identified with a functional crosslinking reagent (DSS). Radioactivity for ^{125} I-rat ANP was specifically detected in the bands of 66,000 and 130,000 M_r proteins under the nonreducing condition. In the presence of 2-mercaptoethanol, however, the 130,000 M_r radiolabeled protein migrated in the gel to the 66,000 M_r protein position.

As shown in Fig. 2, P4, 17-OHP and E2, especially P4 and E2, levels in follicular fluid increased with the advance of follicle growth. The follicular fluid T concentration did not change remarkably.

Discussion

The present study demonstrated the presence of a

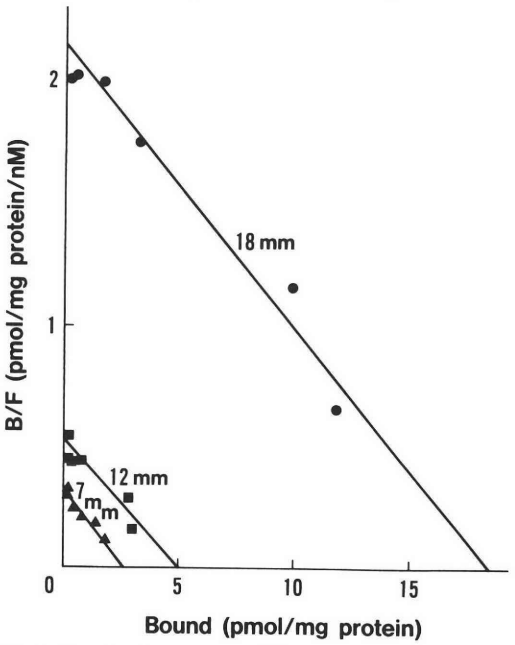


Fig.1 Scatchard analysis of ^{125} I-rat ANP binding to human ovarian follicles.
F-7, follicle (7 mm in diameter); F-12, follicle (12 mm in diameter); F-18, follicle (18 mm in diameter).

Table 1 Binding parameters for ANP of human ovarian follicles

Follicular size (mm)	Kd (pM)	Bmax pM/mg protein	r
7	8.7	2.56	0.87
12	8.1	4.92	0.91
18	8.5	18.5	0.98

Kd, dissociation constants; Bmax, binding capacities; r, correlation coefficients.

large number of binding sites for ANP in the human growing and preovulatory follicles and that the number of binding sites is greater than those previously reported in other target tissues[11, 25-30]. Furthermore, in concert with increases in P4, 17-OHP and E2 in follicular fluid, which are necessarily important for ovarian function such as follicle growth and development, oocyte maturation et al., the number of ANP binding sites in ovarian tissue was increased with the advance of follicle growth.

The findings suggest the close involvement of ANP in the regulation of follicular function containing oocyte function. The previous finding that ANP regulates testosterone or gonadotropin-stimulated P4 secretion in the testis[31, 32] easily leads us to suppose that ANP may also be involved in the steroidogenesis in the ovary. Recently, it has been reported that ANP stimulates P4 secretion in both the basal and the gonadotropin-stimulated state in cultured granulosa cells of human preovulatory follicles[10]. Furthermore, it has been shown that rat granulosa cells have receptors for ANP which may be plausibly produced within the ovary similar to ANP production in the chorioidea and ciliary bodies of the eye[13], that ANP has a possible direct involvement in the control of the meiotic process in oocytes[12], and further that ANP in vitro could increase the maturation rate in hamster oocytes[33]. Since ANP acts as a physiological antagonist of the RAS[34], ANP may also antagonize follicular fluid regulation or steroidogenesis by angiotensin II in the ovary. Furthermore, ANP is supposed to play an enevitably important role in ovarian ERAANPS[19-21]. Further evaluation is still needed to clarify the definite role of ANP in the ovary. Although a physiological role for ANP in the ovary has not yet been established, these results suggest that the circulatory or locally generated ANP plays a cruicial role in events related to the development of ovarian follicles such as steroidogenesis, formation of follicular fluid, follicular growth, oocyte maturation and so on. What physiological role or mechanisms in ANP effects on ovarian follicular function are involved in ovarian differentition and proliferation remains to be elucidated.

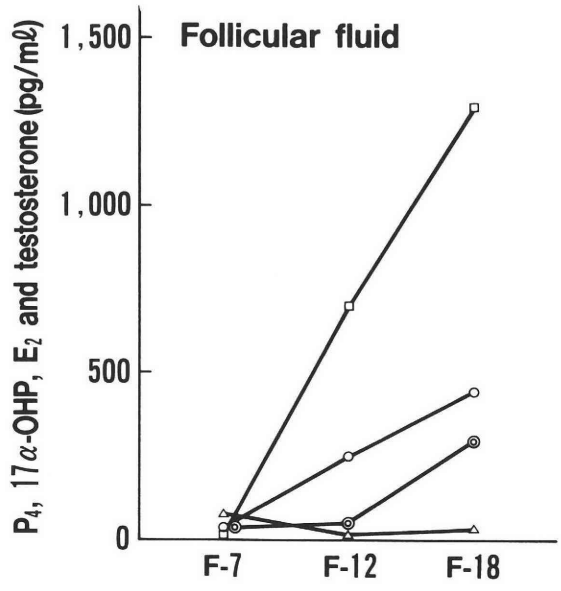


Fig. 2 Steroid concentrations in ovarian follicular fluid. F-7, follicle (7 mm in diameter); F-12, follicle (12 mm in diameter); F-18 follicle (18 mm in diameter); open circles, progesterone; double open circles, 17 α -hydroxyprogesterone; open triangles, testosterone; open quadrangles, 17 β -estradiol.

Acknowledgements

The author wishes to thank Mr. S. -J. Kim, Ph. D. and Mr. M. Shinjo, Ph. D., Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba for discussions, suggestions and much help. Miss J. Tanaka, Mrs. Y. Hayasaka, Mrs. S. Kawamura and Mrs. Y. Kawakura, Ph. D., are also acknowledged for their technical assistance. This work was in part supported by grants from the University of Tsukuba Special Research Project on Metabolism, the University of Tsukuba

Research Project, Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, and Li Shi Zhen International Awards for Outstanding Manuscripts.

References

1) De Lean, A., Racz, K., Gutkpwska, J., Nguyen, T. T., Cantin, M. and Genest, J.: Specific receptor-mediated inhibition by synthetic atrial natriuretic factor of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured bovine adrenal cells, Endocrinology, 115: 1636, 1984
2) Kudo, T. and Baird, A.: Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor, Nature, 312: 756, 1984
3) Napier, M. A., Vandlen, R. L., Albers-Scho"berg, G., Nutt, R. F., Brady, S., Lyle, T., Winquist, R., Faison, E. P., Heinel, L. A. and Blaine, E. H.: Specific membrane receptors for atrial natriuretic factor in renal and vascular tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91: 5946, 1984
4) Quirion, R., Dalpe, M., De Lean, A., Gutkowska, J., Cantin, M. and Genest, J.: Atrial natriuretic factor (ANF) binding sites in brain and related structures, Peptides, 5: 1167, 1984
5) Bianchi, C., Gutkowska, J., Thibault, G., Garcia, R., Genest, J. and Cantin, M.: Radiautographic localization of ^{125}I-atrial natriuretic factor (ANF) in rat tissues, Histochemistry, 82: 441, 1985
6) Schiffrin, E. L., Chartier, L., Thibault, G., StLouis, J., Cantin, M. and Genest, J.: Vascular and adrenal receptors for atrial natriuretic factor in the rat, Circ. Res., 56: 801, 1985
7) Yip, C. C., Laing, L. P. and Flynn, T. G.: Photoaffinity labeling of atrial antriuretic factor receptors of rat kindney cortex plasma membranes, J. Biol. Chem., 260: 8229, 1985
8) Olins, G. M., Patton, D. R., Tjoeng, F. S. and Blehlm, D. J.: Specific receptors for atriopeptin Ⅲ in rabbit lung, Biochem. Biophys. Res. Commun., 140: 302, 1986
9) Sen, I.: Identification and solubilization of atrial natriuretic factor receptors in human placenta, Biochem. Biophys. Res. Commun., 135: 480, 1986
10) Pandey, K. N., Osteen, K. G. and Inagami, T.: Specific receptor -mediated stimulation of progesterone secretion and cGMP accumulation by rat atrial natriuretic factor in cultured human granulosa-lutein (G-L) cells, Endocrinology, 121: 1195, 1987
11) Shinjo, M., Kim, S. J., Miyazaki, H., Usuki, Y. and Murakami, K.: Atrial natriuretic peptide binding sites on hog cilliary bodies and choroid, Biomed. Res., 9: 21, 1988
12) Törnell, J., Carlsson, B. and Billig, H.: Atrial natriuretic peptide inhibits spontaneous rat oocyte maturation, Endocrinology, 126: 1504, 1990
13) Gaspar, L., Fernandez-Durango, R., Seidah, N. G., Che'tien, M., Gutkowska, J.: ANP mRNA is detected by the polymerase chain reaction technique in the chorioidea and ciliary bodies but not in the retina of the rat eye, Endocrinology, 129: 559, 1991
14) Palumbo, A., Jones, C., Lightman, A., Carcanigiu, M. L., DeCherney, A. H. and Naftolin, F.: Immunohistochemical localization of renin and angiotensin Ⅱ in human ovaries, Am. J. Obstet. Gynecol., 160: 8, 1989
15) 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 and estrogen on the regulation of ovarian renin production: The Role of Growth Factors, Oncogenes, and Gonadal Polypeptides, In Frontiers in Reproduction Research, Edited by W.W.L. Li, H.C. Chen, D.W. Hahn, J.L. McGuire, 724-304, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 1992
16) De Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T. and Sonnenberg, H.: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rat, Life Sci., 28: 89, 1981
17) Kleinert, H. D., Maack, T., Atlas, S. A., Januszewicz, A., Sealey, J. E. and Laragh, J. E.: Atrial natriuretic factor inhibits angiotensin-, norepinephrine-, and potassium induced vascular contractility, Hypertension, 6 (Suppl. 1): Ⅰ-143, 1984
18) Cantin, M. and Genest, J.: The heart and the atrial natriuretic factor, Endocrine Rev., 6: 107, 1985
19) Usuki, S., Tanaka, J., Kawakura, Y. and Usuki, Y.: Presence of endothelin in high concentrations in the ovary and its effects on ovarian steroidogenesis and DNA polymerase α activity, and endothelin-renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system (ERAANPS) in ovaries, In Recent Advances in Cellular and Molecular Biology; Vol 4: Molecular Pathways of Kinases, Protein Expression, Blood Pressure Regulators, Ca^{2+} Channels and Molecular Receptors, 147-153, Edited by R.J. Wegmann, M.A. Wegmann, Peeters Press, Leuven, 1992
20) Usuki, S., Tanaka, J., Kawakura, Y. and Usuki, Y.: A proposal of ovarian ERAANPS (endothelin-

renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system) and effects of tokishakuyakusan, keishibukuryogan, shakuyakukanzoto and unkeito on the ERAANPS, AJCM, 20: 65-74, 1992
21) Usuki, S.: ERAANPS (endothelin-renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system) in immature rat ovaries. In Dieretics IV: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications, Edited by J.B. Puschett, A. Lant, J. Greven, B. Materson, R.A.L. Sutton, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, in press, 1992
22) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680, 1970
23) Usuki, S.: Effects of Tokishakuyakusan and its components on rat corpus luteum function in vitro, AJCM, 16: 11, 1987
24) Usuki, S.: Hachimijiogan produces testosterone in adult rat testes, AJCM, 16: 93, 1987
25) Budzik, G. P., Firestone, S. L., Bush, E. N., Connolly, P. J., Pockway, T. W., Sarin, V. K. and Holleman, W. H.: Divergence of ANF analogs in smooth muscle cell cGMP response and aorta vasorelaxation.: evidence for receptor subtypes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 144: 422, 1987
26) Hirose, S., Akiyama, F., Shinjo, M., Ohono, H. and Murakami, K.: Solubilization and molecular weight estimation of atrial natriuretic receptor from bovine adrenal cortex, Biochem. Biophys. Res. Commun., 130: 574, 1985
27) Schenk, D. B., Phelps, M. N., Porter, J. G., Fuller, F., Cordell, B. and Lewicki, J. A.: Purification and subunit composition of atrial natriuretic peptide receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1521, 1987
28) Shimonaka, M., Saeki, T., Hagiwara, H., Ishido, M., Nogi, A., Fujita, T., Wakita, K., Inada, Y., Kondo, J. and Hirose, S.: Purification of atrial natriuretic peptide receptor from bovine lung, J. Biol. Chem., 262: 5510, 1987
29) Shinjo, M., Hirata, Y., Hagiwara, H., Akiyama, F., Murakami, K., Kojima, S., Shimonaka, M., Inada, Y. and Hirose, S.: Characterization of atrial natriuretic factor receptors in adrenal cortex, vascular smooth muscle and endothelial cells by affinity labeling, Biomed. Res., 7: 35, 1986
30) Takayanagi, R., Snajdar, R. M., Imada, T., Tamura, M., Pandey, K. N., Misono, K. S. and Inagami, T.: Purification and characterization of two types of atrial natriuretic factor receptors from bovine adrenal cortex: guanylate cyclase-linked and cyclase-free receptors, Biochem. Biophys. Res. Commun., 144: 244, 1987
31) Bex, F. and Corbin, A.: Atrial natriuretic factor stimulates testosterone production by mouse interstitial cells, Eur. J. Pharmacol, 115: 125, 1985
32) Pandey, K. N., Kovacs, W. J. and Inagami, T.: The inhibition of progesterone secretion and the regulation of cyclic nucleotides by atrial natriuretic factor in gonadotropin responsive murine Leidig tumor cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 133: 800, 1985
33) Hubbard, C. and Price, J.: The effects of follicle-stimulating hormone and cyclic guanosine 3', 5' -monophosphate on cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate phosphodiesterase and resumption of meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes, Biol. Reprod., 39: 829, 1988
34) Saavedra, J. M., Correa, F. M. A., Plunkett, L. M., Israel, A., Kurihara, M. and Shigematsu, K.: Binding of angiotensin and atrial natriuretic peptide in brain of hypertensive rats, Nature, 320: 758, 1986

ヒト卵胞に於ける atrial natriuretic peptide (ANP) binding site

筑波大学臨床医学系産科婦人科
臼杵　悊

ヒト卵胞（直径7mm，12mm，18mm）に於けるANP binding siteについて検討した．ANP binding siteは卵胞直径の増大に従って増加した．以上の事実は，ANPが卵胞の機能調節に重要な役割をはたしていること示唆してる．

(受付：1991年11月19日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

体外受精における抗リン脂質抗体の意義

Significance of Antiphospholipid Autoantibodies in In Vitro Fertilization

秋田大学医学部産婦人科教室
（主任：真木正博）

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

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

不妊患者に抗リン脂質抗体が存在する場合，それが体外受精の治療成績に影響を与え得るか否かを検討した．体外受精施行129例の，女性患者血清中の抗リン脂質抗体（cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, phoshatidylethanolamine）を，ELISAにより測定し，吸光度がMean＋1.5 S. D. 以上を陽性とした．抗体陽性例は129例中20例（15.5%）存在した．体外受精の治療周期を，抗体陽性群20例29周期と抗体陰性群109例121周期で比較検討した結果，両群の平均採卵数（7.9±4.7 vs 7.3±4.8個, Mean±S.D.），平均受精率（64.7±22.5 vs 70.5±24.6%），平均移植胚数（4.0±1.6 vs 3.5±1.8個）に差は認められなかった．妊娠率は移植周期あたり31.0%（9/29）vs 31.4%（38/121），流産率も妊娠周期あたり22.2%（2/9）vs 21.1%（8/38）で有意な差は認められなかった．以上から，抗リン脂質抗体の存在は，体外受精の成績に明らかな影響は及ぼさないものと考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 16—21, 1993)

緒　言

以前よりSLE患者に自然流産や子宮内胎児死亡が多く認められることから，自己抗体の存在が胎児発育を障害する可能性が指摘されてきた[1]．近年，自己免疫疾患を持たない不育症の患者にも，lupus anticoagulantや抗cardiolipin抗体等のリン脂質に対する抗体が高頻度に検出されることが報告され[2]，自己免疫反応が流産の原因の一つであることが確立されてきた．その後，1988年にGleicherらがReproductive autoimmune failureの概念を提唱した．これは，子宮内膜症や原因不明不妊の患者には，高率に自己抗体が検出されるという知見に基づき，自己免疫による生殖機構の障害作用を従来の不育症の範囲から不妊症の範囲まで広げたものといえる[3]．

近年，体外受精は不妊症の治療方法として広く普及してきたが，着床率の改善は長年にわたり大きな問題となっている．着床の研究で常に問題となることは，不妊症の原因としての着床障害のメカニズムが，いまだに明かでないことである．もし，自己免疫反応が不妊の原因として着床障害やその後の胎児の発育に悪影響をもたらしているとすれば，体外受精の治療成績は

自己免疫の存在により影響されると考えられる．しかし，この種の研究は意外に少なく，Gleicherらのグループの他に体外受精に関する統計的な解析の報告はない．そこで今回我々は，抗リン脂質抗体の存在が実際の体外受精の治療成績に影響を与えているかについて，検討を行った．

研究方法

1. 対象

当科で1990年1月より1990年12月に体外受精の治療を受けた129例の不妊女性患者を対象とした．それらの平均年齢は32.4歳，平均不妊期間は7.2年であった．体外受精の適応は，卵管因子56例，男性因子18例，子宮内膜症24例，免疫因子(女性側)8例，原因不明23例であった．

2. 体外受精の方法

当科における体外受精法の詳細については，以前に報告したが，ここでは簡単に述べる[4]．卵巣刺激はhMG単独周期またはBuserelin (Suprecur, ヘキストジャパン) とhMGの併用刺激周期を用いた．hMG製剤は (Pergonal, 帝国臓器, またはhMG日研, 日研製薬) を通常は1日150IUから300IUの使用量で周期の2ないし3日目よりhCG投与日まで連日筋注した．

Buserelinは刺激周期の黄体中期よりhCG投与まで1日900uμgを連日投与した．周期の8日目より経腟的超音波断層法および血中LHにより卵胞発育をモニタリングし，原則的に最大卵胞径が17mm以上，16mm以上の卵胞が3個以上，子宮内膜の肥厚が10mm以上の三つの条件を満たした段階でhMGを中止し，その夜にhCG10,000単位を筋注した．hCG投与の34時間後に超音波断層法を用いて経腟的に卵を採取した．精子はswim up法により回収して，精子濃度5×10^4/mlで媒精した．培養液は10%非働化母体血清を含むHCO_3-buffered human tubal fluid (HTF) を用い，3種混合ガス (5%O_2, 90%N_2) の気相で培養した．媒精の約16時間後に受精を確認し，その翌日に子宮に移植した．黄体刺激療法としては，移植当日，3日目，6日目にhCG 2000単位を筋注した．妊娠の判定は，移植14日目にhCGが検出されたのみのものを化学的妊娠，胎嚢が確認されたものを臨床的妊娠とした．

3. 抗リン脂質抗体の測定方法

患者血清は体外受精当日肘静脈より採取したものを，-20℃にて検査まで凍結保存した．患者血清中の抗リン脂質抗体は，enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (図1) にて測定した．測定したリン

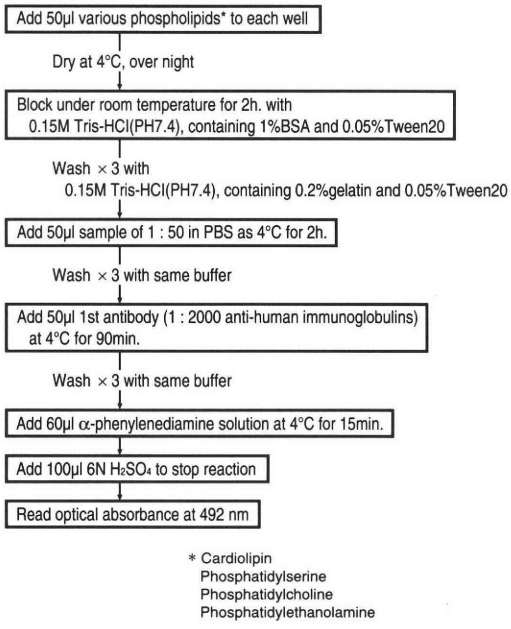


図1　Procedure of an ELISA for measuring antiphospholipid antibodies

脂質抗体は，cardiolipin，phosphatidylserine，phosphatigylcholine，phosphatidylethanolamineに対する抗体で，リン脂質の標品はSigma社より購入した．ELISAプレート (96 well microtiter plate, Nunc社) に，ethanolで50μg/mlに希釈した脂質を加え，4℃で一晩静置して固相化した．この際，plateの一部は脂質を含まないethanolのみを加えたblankとした．固相化後，1% bovine serum albumin (BSA, Sigma社) と0.05% Tween20 (半井社) 加0.15M Tris-HCL (pH 7.4) をplateに加え室温で2時間反応させ，blockingを行った．その後0.2%gelatinと0.05%Tween20を加えた0.15M Tris-HCL (pH 7.4) でプレートを3回洗浄した．ついでPBSで50倍希釈した患者血清50μlをwellに加え，4℃で2時間反応させた後3回洗浄した．その後，2000倍希釈した抗ヒトimmunoglobulin (IgG+IgM+IgA)，proxidase conjugated (Cappel社) を50μlづつ各wellに加え，4℃で90分反応させた後3回洗浄した．洗浄後，α-phenylene diamine solution (Sigma社) 60μlを各wellに加えて発色させ，15分後6N H_2SO_4にて反応を停止した．各wellの吸光度 (492nm) を測定し，blankの吸光度の値を引いた値を，各血清の吸光度とした．

結合阻止試験 (inhibition test) は，プレート上に加える脂質を0.6から2.500μg/mlまで変化させて希釈系列を作成して，抗体強陽性血清を用いて前述の手順

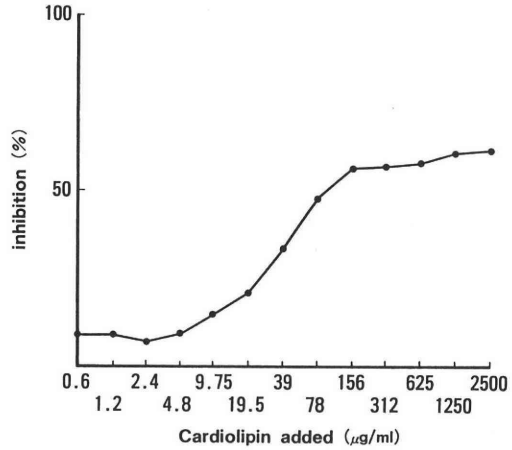


図2　Inhibition of anticardiolipin antibody binding by incubation with cardiolipin at various concentrations

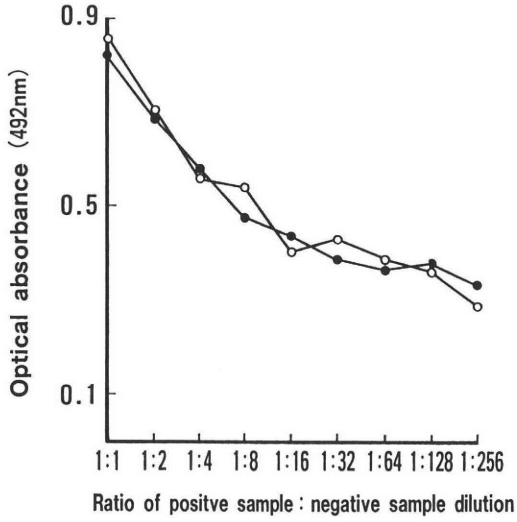


図3　Antibody response curve for anticardiolipin levels obtained by dilution of highly positive samples (●, ○)in negative sample

でELISAを行った(図2，cardiolipinの例)．抗体負荷試験antibody responce testは，抗体強陽性血清を抗体陰性血清で1: 1から1: 256まで希釈したものを，50μg/mlの脂質を固相したplateと反応させて行った(図3)．

結　果

今回用いた4種類の脂質のELISAのinterassayのcoeficient of varianceはそれぞれ10%以下，intra-assayのcoeficient of varianceはそれぞれ5%以下であった．結合阻止試験(図2)および抗体負荷試験(図3)から，今回のassayが血清の抗リン脂質自己抗体を検出していることが確認された．

1) 体外受精症例における抗リン脂質抗体陽性患者の存在の検討

体外受精施行患者の吸光度を，各リン脂質別に不妊因子で比較して図4に示す．各リン脂質で吸光度がMean＋1.5 S. D. 以上を示した血清を陽性検体として検討を行った．すなわち，cardiolipinでは，0.602以上，phosphatidylserineでは0.614以上，phosphatidylcholineでは0.498以上，phosphatidylethanolamineでは0.415以上であった．

4種類のリン脂質のうち少なくとも一つに対して抗体が陽性であった症例を抗リン脂質抗体陽性とす

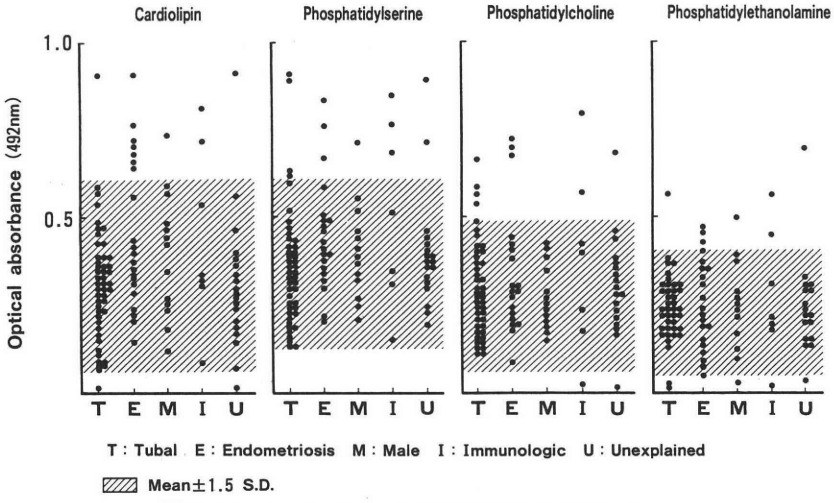


図4　Results of antiphospholipid ELISAs in IVF patients

表1　Incidence of positive antiphospholipid ELISAs by indication of IVF

Indication of IVF	Number of the patients with positive antiphospholipid ELISAs				
	CL	PS	PC	PE	Total*
Tubal(n=56)	1	4	4	1	6/56(10.7%)
Endometriosis(n=24)	7	3	3	3	8/24(33.3%)
Male(n=18)	1	1	0	1	1/18(5.6%)
Immunologic(n=8)	2	3	2	2	3/8(37.5%)
Unexplained(n=23)	1	2	1	2	2/23(8.7%)

CL: Cardiolipin PS: Phosphatidylserine PC: Phosphatidylcholine PE: Phosphatidylethanolamine
*The patients exhibited at least one antiphospholipid ELISA

表2　Comparison of IVF results between antiphospholipid antibody positive and negative patients

	Mean age (Mean±S.D.)	Treatment cycles (Number)	Recovered oocytes (Mean±S.D.)	Fertilized rate (%, Mean±S.D.)	Transfered embryos (Mean±S.D.)	Pregnancies / Treament cycles	Abortions* / Pregnant cycles
Positive patients (n=20)	32.8±2.4	29	7.9±4.7	64.7±22.5	4.0±1.6	9/29 (31.0%)	2/9 (22.2%)
Negative patients (n=109)	32.1±3.1	121	7.3±4.8	70.5±24.6	3.5±1.8	38/121 (31.4%)	8/38 (21.1%)

*chemical abortion or missed abortion

表3　Positive rate of each antiphospholipid antibody in the patients with positive ELISAs by outcome of IVF

Outcome of IVF	Cardiolipin	Phosphatidyl-serine	Phosphatidyl-choline	Phosphatidyl-ethanolamine
Pregnant (n=8)	5/8(62.5%)	5/8(62.5%)	6/8(75.0%)	4/8(50.0%)
Non-pregnant (n=10)	6/10(60.0%)	8/10(80.0%)	4/10(40.0%)	4/10(40.0%)
Abortion (n=2)	2/2(100%)	1/2(50.0%)	0/2(0%)	1/2(50.0%)

ると，体外受精患者の陽性率は，卵管因子で10.7%，子宮内膜症で33.3%，男性因子で5.6%，免疫因子で37.5%，原因不明で8.7%となった．陽性例は，129症例中で合計20例存在した．不妊因子別に各リン脂質抗体の陽性例数を，表1に示す．

2)抗リン脂質抗体陽性例と陰性例の体外受精の成績

抗リン脂質抗体陽性20例と抗リン脂質抗体陰性109例の体外受精の成績を比較検討した結果を表2に示す．それぞれの平均採卵数は7.9±4.7 vs 7.3±7.8個(Mean±1.5 S. D.)，平均受精率は64.7±22.5 vs 70.5±24.6%，平均移植胚数は4.0±1.6 vs 3.5±1.8個，治療周期あたりの妊娠率は31.0 vs 31.4%，妊娠周期あたりの流産率は22.2% vs 21.1%であった．抗体陽性例と陰性例に有意な差は認められなかった．

3)抗リン脂質抗体陽性例の，体外受精の予後からみた抗リン脂質抗体の種類の比較

抗リン脂質抗体が陽性であった例を，妊娠，非妊娠，流産といった体外受精の予後で分類し，陽性となる抗リン脂質抗体の種類に違いがあるか検討した結果を表3に示す．

抗cardiolipin抗体，抗phosphatidylserine抗体，抗phosphatidylcholine抗体，抗phosphatidylethanolamine抗体の陽性率は，妊娠例で62.5%，62.5%，75.0%，50.0%，非妊娠例では60.0%，80.0%，40.0%，40.0%，流産例では100%，50.0%，0.0%，50.0%であった．体外受精の予後と抗リン脂質抗体の種類に特に傾向は認めなかった．また，流産例に特に抗体価が高いような傾向は認められなかった．

考　察

Gleicherらは，reprpductive autoimmune failure syndromeの概念の根拠として次の三つの項目を上げている．第一に，体外受精胚において抗精子抗体保有患者の受精率が低かったり子宮内膜症患者の成績が不良なことから，自己抗体の存在が体外受精胚移植の妊娠率を低下させる因子となっていること，第二に，原因不明不妊症患者と習慣性流産患者で，polyclonalなB-cellの活性化と自己抗体を保有する患者の頻度は，ほぼ一致すること，第三に，精子凝集抗体保有患者において，自己抗体，特に抗リン脂質抗体の陽性率が高いことを上げている[3]．しかしながら，彼らのグループの体外受精の統計的解析は，母集団が26例と極めて低く，統計的な有意差は示されていない[5]．したがって，自己抗体の存在が本当に体外受精の成績を低下させるかどうかについては，さらに検討が必要と考えられる．

今回の129例の検討では，子宮内膜症，免疫性不妊症(抗精子抗体陽性者)において抗リン脂質抗体保有者は多い傾向は認められ，それは過去のGleicherの報告と同様であったが[3]，不妊因子間において自己抗体の陽性率に統計学的な有意差は認めなかった．また，抗リン脂質抗体陽性例と抗体陰性例で体外受精の治療成績を比較した結果，採卵数，受精率，移植胚数，妊娠率，流産率の因子に有意差を認めなかった．また，抗リン脂質抗体陽性例においても，妊娠の予後に関与する特異的な抗リン脂質抗体は認められず，流産例に特に抗体価が高いような傾向も認めなかった．以上から，我々の検討からは，抗リン脂質抗体の存在と体外受精の成績には，明かな関連は無いものと考えられた．

今回，我々の測定系を用いて，リン脂質抗体陽性のSLE患者を測定した機会を得たが，その値はmean＋2.0 S. D. 以上の強陽性であった．今回我々はMean＋1.5 S. D. 以上を陽性としており，体外受精患者の中にはMean＋2.0 S. D. 以上の強陽性例は認めなかった．したがっておそらく，今回我々が陽性とした患者の自己抗体のレベルは，一般的にSLE等の自己免疫疾患で認められる抗体価から比較すればかなり低いものであり，体外受精患者の抗リン脂質抗体陽性患者がSLEの患者と同じような臨床的問題を有するとは考えにくいと考えられる．また，不妊患者が自己抗体を獲得する機序については，ほとんど解明されていない．この点について，Fischらは繰り返し体外受精の治療を受けることで，抗リン脂質抗体を獲得する可能性を報告しており[6]，興味深い．

以上，我々の検討では，少なくとも血栓形成などの他の臨床症状の認められない一般の不妊症患者群においては，抗リン脂質抗体の存在は，着床率の減少，流産率の増加などの原因として有意なものではなく，体外受精の成績に対して明かな影響は及ぼさないと考えられた．

文　献

1) Wallace, D. J. and Dubois, E. L.: Dubois' Lupus Eruthematosus, 567, Lea & Febiger, 1987
2) Lubbe, W. F., Butler, W. S., Palmer, S. J.and Liggins, G. C.: Lupus anti-coagulant in pregnancy, Br. Obstet. Gynecol., 91: 357, 1984
3) Gleicer, N. and El-Roeiy, A.: The reproductive autoimmune failure syndrome, Am. J. Obstet. Gynecol., 159: 223, 1988
4) Kodama, H., Kato, M., Fukuda, J., Sekine, K. and Maki, M.: Initial experience of in vitro fertilization at Akita University, Akita J. M., 16: 631, 1989
5) El-Roeiy, A., Gleicher, N., Friberg, J., Confino, E. and Dudkiewicz, A.: Correlation between peripheral blood and follicular fluid autoantibodies and impact on in vitro fertilization, Obstet. Gynecol., 70: 163, 1987
6) Fish, B., Tadir, Y., Rikover, Y., Ovadida, J., Shohat, L., Witz, I. P., Zurgil, N. and Yron, I.: The relationship between in vitro fertilization and naturally occurring antibodies: evidence for increased production of antiphospholipid autoantibodies, Fertil. Steril., 56: 718, 1991

Significance of antiphospholipid autoantibodies on in vitro fertilization

Mitsuhiro Kato, Hideya Kodama,

Toshihiko Matsui, Jun Fukuda,
Shiho Takeda, Kazuko Sekine
and Masahiro Maki

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

(Director: Prof. M. Maki)

To investigate the effect of antiphospholipid (cardiolpin, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine) antibodies on the in vitro fertilization (IVF), ELISAs with serum were performed on the female partners of 129 infertile couples. Twenty of 129 patients (15.5%) were positive. The incidences of positive antiphospholipid ELISAs by indication of IVF were 10.7% (6/56) by tubal, 33.3% (8/24) by endometriosis, 5.6% (1/8) by male, 37.5% (3/8) by immunological and 8.7% (2/23) by unexplaned. The results of IVF between antibody positive and negative patients were as follows. Recoverd oocytes, fertilized rate, transfered embryos, pregnancies per treatment cycles, abortion per pregnant cycles were 7.9±4.7 vs 7.3±4.8, 64.7±22.5 vs 70.5±24.6%, 4.0±1.6 vs 3.5±1.8, 31.0% (9/29) vs 31.4% (38/121), 22.2% (2/29) vs 21.0% (8/38), respectively. There were no significant differrence between them. There were no significant antiphospholipid antibodiy and immunoglobulin classes to hamper embryonal development and implantation. We conclude that antiphosphlipid antibodies do not seem to affect the outocome of IVF.

(受付：1992年3月27日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

GnRH agonist併用による過排卵刺激法：Long protocolとShort protocolの有用性に関する比較検討

Comparison of Long-term and Short-term Protocols in Controlled Ovarian Hyperstimulation with GnRH agonist and hMG for IVF-ET

獨協医科大学産科婦人科学教室
(主任：熊坂高弘教授)
渡 部 秀 哉
Hideya WATANABE
Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine, Tochigi 321-02, Japan

体外受精・胚移植における過排卵刺激法としてGnRH agonist (Buserelin) とhMGの併用療法が主流となっている．今回，Buserelinを前周期の黄体期中期より開始するlong protocol (L群，64名，70周期) と刺激周期の2日目から開始するshort protocol (S群，34名，35周期) の2つのprotocolを行い，両protocolの成績，ホルモン動態，子宮内膜の超音波断層所見を比較検討し，その有用性について再評価を行った．

1) 両群のhMG投与期間，総投与量，採卵数，受精率，移植胚数に有意差はなかった．

2) 胚移植あたりの妊娠率はL群 (44.3%) がS群 (22.9%) より有意に高く，着床率でもL群 (13.1%) がS群 (4.5%) より有意に高かった．

3) hCG投与日の血中LH,estradiolはL群よりS群が有意に高く，血中progesterone (P) 値 (ng/ml) もL群 (0.7±0.5) よりS群 (0.9±0.7) が有意に高かった．P値≧1.0の例はL群 (24.3%) よりS群 (40.0%) に多かった．

4) 子宮内膜厚はL群 (11.7±2.8mm) がS群 (10.1±2.6mm) より有意に厚く，リーフ状内膜を呈する頻度もL群 (71.4%) がS群 (48.6%) より有意に高かった．

以上よりlong protocolの方がshort protocolより妊娠率が高いことが判明した．この理由は前者がホルモン環境，子宮内膜環境において，より着床に適しているためと考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 22—27, 1993)

緒　言

体外受精・胚移植 (In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: IVF-ET) における卵胞刺激法としてclomid-hMG併用療法やhMG単独療法などの方法が試みられてきた．そして現在ではpremature LH surgeの防止のためGnRH agonist (GnRHa) であるBuserelinとhMGの併用療法が主流となっている[1,2]．

このGnRHaの開始時期によりlong protocolとshort protocolの2つの方法が存在し，各施設で選択使用されている．今回この2法のいずれが有用であるかを，IVF-ETの成績と血中ホルモン動態および超音波断層法による子宮内膜の厚さ，内膜像の性状を観察し比較検討した．

対象と方法

獨協医大産婦人科においてIVF-ETを施行した男性不妊を除く98名105周期を対象とした．long protocol (以下L群と略す) では前周期の黄体期初期または中期よりBuserelin (ヘキスト・ジャパン) の投与を開始

し，月経発来後day 3 よりhMGを連日投与した．

short protocol (以下S群と略す) ではday 2 よりBuserelinとhMGを同時に連日投与した．Buserelinは900 μg/dayで経鼻投与し，hMGはPergonal (帝国臓器) 150～300IUを筋注した．平均卵胞径が18mm以上の卵胞が 2 個以上認められた時点でhMG投与を中止し，hCG 10,000 IU筋注後，36時間目に超音波ガイド下，経腟的に採卵した．精子はswim up法にて調整し，媒精精子濃度は10×10^4/mlとした．採卵4～6時間後に媒精した．培養液は非働化患者血清10% (insemination medium) または15% (growth medium) を加えたHTF (Human Tubal Fluid, IRVINE SCIENTIFIC) を用いた．媒精後約18時間後に卵丘細胞を除去し，受精を確認後さらに24時間培養した．採卵から約48時間後に胚移植を施行した．胚移植には富士システムズのIVFカテーテルを使用した．luteal supportとして胚移植時より 3 日おきにhCG 3,000 IU筋注を黄体期11日まで行った．その間hMG投与開始日からhCG投与日まで可及的に採血し血中LH，FSH，estradiol (E_2)，progesterone (P) を測定した．

さらにS群，L群において無作為に7例ずつを選び，hMG投与開始日より連日採血を行いLH，FSH，E_2，Pの推移を検討した．LH，FSH，E_2は第一ラジオアイソトープ社のRIA kitで測定し，Pは日本DPC社のRIA kitで測定した．各kitの測定感度と測定精度 (CV) はLH，FSHが1.0mIU/ml，5%以下，E_2は10pg/ml，6%以下，Pは0.2ng/ml，10%以下であった．さらにhCG投与日に超音波断層法にて子宮内膜厚および内膜の性状を観察した．すなわち子宮正中縦断像にてhyperechogenicな 3 本の線とその間のhypoechogenicな領域の認められるものをリーフ状内膜とした[3-6]．また，子宮内膜像は体部内膜像の最大前後径を計測した．超音波診断装置はSONOVISTA-CS. MEU-1579 (モチダ)，経腟プローブは 6 MH_z，視野角150°のメカニカル・セクターを用いた．黄体期16日目以降に妊娠判定を行い，妊娠 6 週以降に超音波診断で子宮内に胎嚢 (GS) を認めるものを臨床的妊娠とした．推計学的処理はStudent's t-testおよびχ^2-test (Yatesの修正を含む) によって行った．

結　果

L群，S群の対象症例を表 1 に示した．L群64名70周期，S群34名35周期の平均年齢，不妊期間，hMG投与期間，hMG総投与量はいずれも両群に有意差はなかった．表 2 に採卵数と受精率，移植胚数の比較を示した．採卵数はL群8.9±5.0個，S群9.0±6.0個，

表 1　両群における対象症例とhMG投与量

	L protocol	S protocol
患者数	64	34
胚移植周期数	70	35
年齢 (歳)	33.3±4.1	32.6±3.9
不妊期間 (年)	6.1±3.8	6.2±3.0
hMG投与期間 (日)	10.0±2.0	9.6±2.2
hMG総投与量 (IU)	2200.6±773.9	2394.6±707.3

mean±SD

表 2　両群における採卵数，受精卵数，移植胚数

	L protocol	S protocol
採卵数 (個)	8.9±5.0	9.0±6.0
受精卵数 (個)	6.8±4.9	6.6±5.2
受精率 (%)	75.0±25.9	76.5±25.6
移植胚数 (個)	4.9±2.5	4.5±2.2

mean±SD

表 3　両群における妊娠率と着床率

	L protocol	S protocol
胚移植周期数	70	35
妊娠数 (例)	31	8
妊娠率 (%/ET)	44.3	22.9*
総移植胚数 (個)	343	156
着床数 (個)	45	7
着床率 (%)	13.1	4.5**

*P＜0.05，**p＜0.01 vs L protocol

受精率はL群75.0±25.9%，S群76.5±25.6%であり，移植胚数はL群4.9±2.5個，S群4.5±2.2個と，いずれも有意差はなかった．

次に妊娠率と着床率の関係を表 3 に示した．L群において胚移植70周期あたり妊娠例31例，妊娠率44.3%であったのに対し，S群では胚移植35周期あたり妊娠例 8 例，妊娠率22.9%であり，L群がS群に対し有意に高かった ($p<0.05$)．一方着床数を総移植胚数で割った着床率についてみると，L群13.1%に対しS群4.5%であり，これもL群が有意に高かった ($p<0.01$)．

表 4　hMG投与開始時における各ホルモン値

	L protocol	S protocol
LH (mIU/ml)	1.8±0.8	4.0±1.2*
FSH (mIU/ml)	5.4±2.3	8.7±3.4*
E_2 (pg/ml)	21.2±14.6	38.5±23.3*
P (ng/ml)	0.4±0.2	0.5±0.2

mean±SD
*p＜0.001 vs L protocol

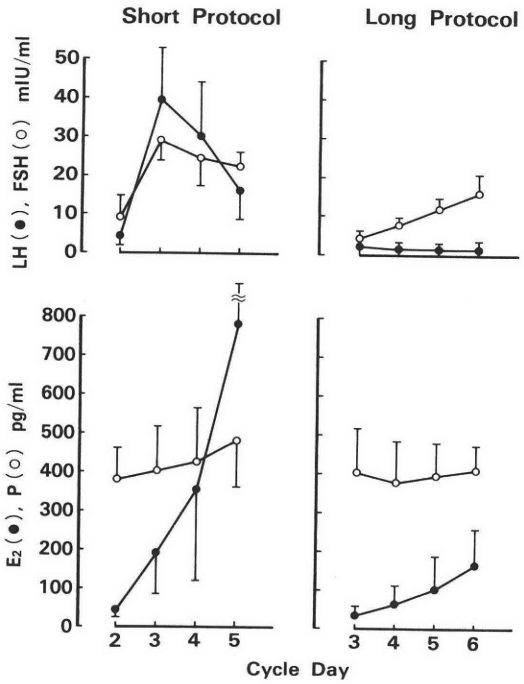


図 1　両群における卵胞刺激開始後のホルモン動態

次にhMG投与開始時における各ホルモン値の比較を表 4 に示した．当然のことながらLH，FSH，E_2値はdesensitizationのかかっていないS群のほうがL群よりも有意に高かった (P＜0.001)．さらに両群におけるhMG投与開始後のホルモン動態を図 1 に示した．S群においてはBuserelin開始後のflare upのためLH，FSHはday 3 には高値を示した．day 4 より下降傾向を示したが，このflare upによりE_2が急速に上昇することがわかった．一方，L群においてLHは低値を持続しFSH，E_2はゆるやかな上昇を示すにとどまった．Pは両群とも変化は認めなかった．

一方hCG投与日における各ホルモン値の比較を表 5 に示した．FSHには両群間で有意差はなかったが，

表 5　hCG投与日における各ホルモン値

	L protocol	S protocol
LH (mIU/ml)	1.8±0.9	3.9±2.1**
FSH (mIU/ml)	16.1±6.5	17.0±7.3
E_2 (pg/ml)	2584.9±1997.0	3662.2±3027.9*
P (ng/ml)	0.7±0.5	0.9±0.7*

mean±SD
*p＜0.05，**p＜0.001 vs L protocol

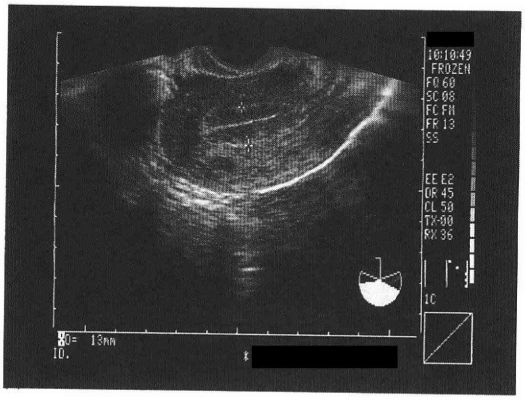


図 2　リーフ状子宮内膜と子宮内膜厚の計測

表 6　両群におけるhCG投与日の子宮内膜厚とリーフ状内膜の頻度

	L protocol	S protocol
子宮内膜厚 (mm)	11.7±2.8	10.1±2.6**
リーフ状内膜の比率 (%)	71.4(50/70)	48.6(17/35)*

mean±SD
*p＜0.025，**p＜0.01 vs L protocol

LHにおいてはS群がL群より有意に高かった (p＜0.001)．さらにE_2，PにおいてもS群が有意に高かった (P＜0.05)．P値≧1.0ng/mlの周期はL群で70周期中17周期 (24.3%)，S群で35周期中14周期 (40.0%) であった．

次にL群，S群のprotocolの違いによって子宮内膜が影響を受けるか否かについて検討した．　図 2 にリーフ状パターンを示す典型的な子宮内膜の超音波像を示した．そこで両群におけるhCG投与日の子宮内膜の超音波像の比較を表 6 に示した．子宮内膜厚

表7 両群における妊娠例と非妊娠例の子宮内膜厚とリーフ状内膜の頻度

	妊娠群	非妊娠群
子宮内膜厚 (mm)		
L群	12.2±3.1	10.6±1.9**
S群	11.9±3.1	9.5±2.1*
リーフ状内膜 (%)		
L群	77.4 (24/31)	66.7 (26/39)
S群	75.0 (6/8)	40.7 (11/27)

mean±SD
*p<0.02, **p<0.01 vs L群

はL群11.7±2.8mm，S群10.1±2.6mmでありL群が有意に厚く (p<0.01)，リーフ状パターンの出現率はL群71.4%，S群48.6%であり，これもL群が有意に高かった (p<0.025).

次に両群の妊娠例と非妊娠例における子宮内膜の超音波像の比較を表7に示した．子宮内膜厚はL群において妊娠群12.2±3.1mm，非妊娠群10.6±1.9mmと妊娠群が有意に厚く (p<0.01)，S群においても妊娠群11.9±3.1mm，非妊娠群9.5±2.1mmと妊娠群が有意に厚かった (p<0.02)．またリーフ状パターンの出現率ではL群において妊娠群77.4%，非妊娠群66.7%，S群において妊娠群75.0%，非妊娠群40.7%と有意差は無かったものの，両群とも妊娠例の方が高い傾向があった．

考　察

近年IVF-ETは世界各地で行われるようになり，妊娠率の向上を目ざして，さまざまな改良改善が加えられている．特にGnRHaを併用した過排卵刺激法はpremature LH surgeを抑制し[2,7]，卵胞発育がsynchronizeし発育卵胞数の増加[7,8]や受精率の増加[8,9]がみられるという面より現在主流となっている．

このGnRHaの併用法には，その開始時期により刺激前周期の黄体中期よりGnRHaを投与し下垂体のdesensitizationを利用したlong protocolと，刺激周期の卵胞期初期よりhMGと同時投与し下垂体のflare upを利用したshort protocolに分けられるが，いずれがより優れているか未だ一定の見解は得られていない．Frydmanら[10]はshort protocolの方が成熟卵の分割率は良好であったものの妊娠率には有意差は認められなかったとしている．Loumayeら[11]はshort protocolではlong protocolに比べ受精率と胚の質の低下を報告しているが，許山ら[12]は採卵数，受精率とも両protocolの間に差はなかったとしている．また一方ではshort protocolの方が成熟卵が多く採取され，形態的に良好な胚が多く得られたとの報告[13]もあり様々である．

今回の検討では採卵数，受精率，移植胚数に差はないものの，L群の方がS群より有意に妊娠率が高いという結果が得られた．さらに移植胚数の影響を除外する意味で検討した着床率においてもL群の方が有意に高かった．この結果を内分泌的に検討してみると，hCG投与日の血中LH，E_2，P値はいずれもS群がL群より有意に高かった．S群において血中Pが有意に高い理由として，P値が1.0ng/mlを越える症例が40%存在したことがあげられる．このhCG投与日のPの増加は軽度な上昇ながら，妊娠成立に重大な影響を及ぼし，妊娠率を低下させることが最近報告されている[14,15].

当教室における検討でも血中P値<1.0ng/ml，E_2<2000pg/mlが着床に最適なホルモン環境であることを報告[16]しており，Mioら[17]もLH上昇と無関係なPの軽度上昇が妊娠成立に悪影響を及ぼすとしている．以上からP上昇の少ないlong protocolの方が着床，妊娠成立に有利であると考えられる．さらにS群では血中E_2が高値となることも着床環境に悪影響を与える因子[18]としてあげられ，卵胞期初期のflare upによるLHの上昇も閉鎖卵胞を増加させる[19]ため，卵胞発育に不適当と考えられる．

一方，妊娠率向上のためには子宮内膜の着床に及ぼす影響についても考慮しなくてはならない．そこで今回hCG投与日の子宮内膜像について検討した結果，妊娠群では非妊娠群より子宮内膜は有意に厚く，リーフ状パターンの出現率も高い傾向がL群，S群ともに認められた．

今回の結果と同様に，妊娠例の子宮内膜は非妊娠例に比べ，より厚く，リーフ状内膜を呈する頻度も，より高いことは諸家の多くの報告[3-6]が指摘しているところである．佐久本ら[6]はリーフ状内膜を呈したあとに排卵した例における黄体期中期の内膜は着床機能が良好であることを子宮鏡にて観察している．以上の結果より子宮内膜の状態が妊娠成立に重要な因子であることが示唆される．

今回の検討で，さらにL群の方がS群より子宮内膜が有意に厚く，リーフ状パターンの出現率も有意に高いという結果が得られた．このことはL郡の方が着床率が高いという結果とよく一致しており，納得のいく結果であった．従って，子宮内膜の環境の面からもL群が着床により有利であることがわかっ

た.

一方，この子宮内膜の性状の違いについて考えてみると，S群においては図1に示すように，Buserelin開始後のLH，FSHのflare upによって急速にE_2が上昇する．このE_2の増加により本来あるべき消退出血が妨げられ，子宮内膜の剥脱不全，ひいては新生内膜の形生不全という結果に陥るのではないかと推定されるが，詳細は今後の検討に待たねばならない．

以上の結果よりlong protocolはshort protocolに比べホルモン環境ならびに子宮内膜環境の両面から着床，妊娠成立により適したprotocolであることが判明した．

(稿を終えるにあたり，御校閲頂きました熊坂高弘教授に深甚なる謝意を表します．また本研究に終始直接の御指導を頂きました正岡　薫助教授に心から感謝致します．

本研究の要旨は第44回日本産科婦人科学会総会(1992，千葉)にて発表した．)

文　献

1) Fleming, R. and Coutts, J. R. T.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression, Fertil. Steril., 45: 226, 1986
2) 谷　啓光, 七里和良, 平沢浩文, 倉林　工, 織田和哉, 荒川　修, 田中憲一：体外受精・胚移植におけるブセレリン併用の意義, 日不妊会誌, 36: 555, 1991
3) Glissnt, A., Mouzon, J. and Frydman, R.: Ultrasound study of the endometrium during in vitro fertilization cycles, Fertil. Steril., 44: 786, 1985
4) Welker, B. G., Gembruch, U., Diedrich, K., Al-Hasani, S. and Krebs, D.: Transvaginal sonography of the endometrium during ovum pickup in stimulated cycles for in vitro fertilization, J. Ultrasound Med., 8: 549, 1989
5) Gonen, Y. and Casper, R. F.: Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF), J.Vitro fert. Embryo Transfer, 7: 146, 1990
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，日本受精着床学会雑誌, 8: 239, 1991
7) Palermo, R., Rosenwaks, Z., Amedeo, G., Cittadini, E. and Navot, D.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple follicles, Fertil. Steril., 49: 290, 1988
8) Neveu, S., Arnal, F., Hedon, B., Humeau, C., Bringer, J., Cristol, P., Chinchole, J-M. and Viala, J-L.: Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization, Fertil. Steril., 47: 639, 1987
9) Chetkowski, R. J., Kruse, L. R. and Nass, T. E.: Improved pregnancy outcome with the addition of leuprolide acetate to gonadotropins for in vitro fertilization, Fertil. Steril., 52: 250, 1989
10) Frydman, R., Forman, R., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., Parnix, I. and Testart, J.: Comparison between flare up and down regulation effects of LH-RH agonists in an in vitro fertilization program, Fertil. Steril., 50: 471, 1988
11) Loumaye, E., Psalti, I., Vankrieken, L., Cooman, S., Depreester, S. and Thomas, K.: Hormonal changes induced by short-term administration of a GnRH agonist during ovarian hyperstimulation for IVF and their consequences for embryo development, Fertil. Steril., 51: 105, 1989
12) 許山浩司, 小田原靖, 川勝雅秀, 安江育代, 楠原浩二, 寺島芳輝：GnRH analog+hMG併用療法による体外受精・胚移植法の検討－特にlong protocolとshort protocolの比較を中心に－, 日本受精着床学会雑誌, 7: 49, 1990
13) Ron-El, R., van-der-Ven, H., Herman, A., Caspi, E., Golan, A. and Diedrich, K.: The comparison of early follicular and midluteal administration of long-acting GnRH agonist, Fertil. Stril., 54: 233, 1990
14) Schoolcraft, W., Huynh, D., Sinton, E., Hamilton, F., Schlenker, T. and Meldrum, D. R.: Lower pregnacy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate, Fertil. Steril., 55: 563, 1991
15) Silverberg, K. M., Burns, W. N., Olive, D. L., Riehl, R. M. and Schenken, R. S.: Serum progesterone levels predict success of IVF-ET in patients stimulated with leuprolide acetate and hMG, J. Clin. Endocrinol. Metab., 73: 797, 1991
16) 星合　明, 正岡　薫, 渡部秀哉, 北澤正文, 熊坂高弘: IVF-ET周期において卵胞成熟時の血中estradiolとprogesterone値が受精，着床に及ぼす影響，日産婦誌, 44: S-150, 1992
17) Mio, Y., Onohara, Y., Sekizima, A., Harada, T., Iwabe, T. and Terakawa, N.: Subtle rise in serum progesterone during the follicular phase as a predictor of the outcome of in vitro fertilization, Fertil. Steril., 58: 159, 1992
18) 小田高久, 吉村慎一, 河野八朗, 原　利夫, 原　澄

子, 泉　康史, 小作みき, 松本千秋, 大野虎之進, 他: 体外受精・胚移植において卵巣過剰刺激は着床障害の原因となるか, 日本受精着床学会雑誌, 6: 94, 1989

19) Brzyski, R. G., Simonetti, S., Muasher, S. J., Jones, G. S., Droesch, K.and Rosenwaks, Z.: Follicular atresia associated with concurrent initiation of GnRH agonist and FSH for oocyte recruitment, Fertil. Steril., 50: 917, 1988

Comparison of long-term and short-term protocols in controlled ovatian hyperstimulation with GnRH agonist and hMG for IVF-ET

Hideya Watanabe

Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan

In an attempt to evaluate the best stimulation protocol for in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), we studied the use of GnRH agonist in two different protocols. Patients were randomized in two protocols: 1) Buserelin 900 μg per day starting in mid-luteal phase followed by hMG starting on day 3 of the following cycle (long protocol, 64 patients, 70 cycles). 2) Buserelin starting on cycle day 2 simultaneously with hMG (short protocol, 34 patients, 35 cycles). There was no difference in the number of oocytes retrieved, fertilization rate and the number of embryos transferred in both protocols.A pregnancy rate per ET was significantly higher in long protocol (44.3%) than in short protocol (22.9%, $p<0.05$). An implantation rate was also significantly higher in long protocol (13.1%) than in short protocol (4.5%, $p<0.01$). Serum levels of progesterone (P) on the day of hCG administration were significantly higher in short protocol compared with those in long protocol. Cycles with P levels$\geqq$1.0ng/ml were more often found in short protocol (40%) than in long protocol (24%). The endometrial thickness measured using transvaginal sonography was significantly greater in long protocol (11.7mm) compared with those in short protocol (10.1mm, $p<0.01$). A leaf-like texture of the endometrium was significantly more often in long protocol than in short protocol.

These results indicate that long protocol is more useful for achieving pregnancy in IVF-ET compared with short protocol, because the hormonal and endometrial environment in long protocol are more suitable for implantation.

(受付：1992年9月10日特掲)
(受理：1992年9月16日特掲)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

LH-RH agonist療法時の更年期症状に対する代謝性ホルモン製剤 (Metharmon®—F錠) の予防効果の検討

The Effect of a Sex Steroid-Thyroid Hormone Mixture (Metharmon-F Tablets) in Preventing Climacteric Symptoms During LH-RH agonist Therapy

横浜市立大学医学部産婦人科
植村次雄 Tuguo UEMURA　水口弘司 Hiroshi MINAGUCHI　白須和裕 Kazuhiro SHIRASU
吉邨泰弘 Yasuhiro YOSIMURA
Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama City Univeristy, Yokohama 236, Japan

横浜市立市民病院産婦人科
根岸達郎 Tatsuo NEGISHI
Department of Obstetrics and Gynecology,
Yokohama Municipal Citizen's Hospital, Yokohama 236, Japan

横浜南共済病院産婦人科
片桐信之 Nobuyuki KATAGIRI　楊箸岳人 Taketo YANAGIHASHI
Department of Obstetrics and Gynecology,
Yokohama-Minamikyousai Hospital, Yokohama 236, Japan

横浜市立港湾病院産婦人科
高橋尚彦 Naohiko TAKAHASHI　中瀬耕作 Kousaku NAKASE
Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama City Kouwan Hospital, Yokohama 231, Japan

済生会横浜市南部病院産婦人科
毛利順 Jun MOURI　中山昌樹 Masaki NAKAYAMA
Department of Obstetrics and Gynecology, Saiseikai-Yokohama Nanbu Hospital, Yokohama 233, Japan

神奈川県立足柄上病院産婦人科
小清水勉 Tsutomu KOSHIMIZU　土屋新一 Shinichi TSUTIYA　大山俊樹 Toshiki OOYAMA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kanagawa Prefectural Ashigarakami Hospital, Ashigara 258, Japan

小田原市立病院産婦人科
佐藤啓治　　松山明美
Keiji SATOU　　Akemi MATSUYAMA
Department of Obstetrics and Gynecology, Odawara Municipal Hospital, Odawara 250, Japan

藤沢市民病院産婦人科
小菅興正
Okimasa KOSUGE
Department of Obstetrics and Gynecology, Fujisawa Municipal Citizen's Hospital, Fujisawa 251, Japan

三浦市立病院産婦人科
大塚尚之
Naoyuki OOTSUKA
Department of Obstetrics and Gynecology, Miura Municipal Hospital, Miura 238-02, Japan

子宮内膜症患者のLH-RH agonist療法時における更年期症状の発症および骨塩量の減少に対するMetharmon®-F錠 (MHF) の予防効果の検討を行った．

方法：子宮内膜症患者を，対照群19例 (LH-RH agonist 900 μg/日，経鼻投与単独)，併用群24例 (LH-RH agonist 900 μg/日，経鼻投与とMHF 2錠/日併用) の2群に分け，24週間連日投与した．

成績：1) 子宮内膜症に対する自・他覚症状および排卵の有無では両群ともに同等の効果が得られた．2) 対照群で強く現れた“のぼせ・ほてり”などの更年期症状が併用群では有意に抑制された．3) 併用群の骨所見ではMD法のΣGS/Dで有意な増加が認められた．

結論：子宮内膜症に対するLH-RH agonist療法時の更年期症状の発症および骨塩量の減少に対し，MHFの併用は有用な治療法であると考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 28—37, 1993)

緒　言

子宮内膜症は，日常診療に際し，しばしば遭遇する疾患のひとつであり，近年その発生頻度が増加傾向にあることが認識されている[1]．本症は，子宮内膜あるいはその類似組織が異所性に増殖し，月経困難症，下腹痛，腰痛などの症状を呈する疾患で，性成熟期の比較的若年層に多発し，上記の疼痛に加えて不妊を伴うことが多い．本症の発生原因や発症機序については，不明な点も多いが，生殖年齢層に発症すること，そして内膜症組織が去勢により萎縮をきたすことからエストロゲンに依存していることは明らかである．したがって両側卵巣の摘出は最も確実な治療法であるが，現実には，不妊例や未婚の若年例も多いことから，卵巣機能を温存する保存療法が要求される．保存療法には保存的手術療法とホルモン療法があるが，そのひとつに強力な性ホルモン産生抑制作用を有するLH-RH agonist製剤による治療が挙げられる．

LH-RH agonist製剤の子宮内膜症の治療における優れた治療効果ならびに高い安全性については既に数多くの報告がある[2,3]．しかしながらLH-RH agonist療法中の血中エストロゲン濃度は閉経後と同一レベルにまで抑制されるため，治療期間中にのぼせ・ほてり，頭痛，肩こりなどの卵巣機能欠落症状の発現が見られる．また，この他，近年特に問題となっている副作用にエストロゲン産生抑制による骨量の減少が挙げられる．

そこで今回我々は，これらLH-RH agonist療法時の卵巣機能欠落症状に対し，従来より更年期障害，卵巣欠落症状の治療に使用されている[4,5]代謝性ホルモン製剤Metharmon-F錠 (MHF) の予防効果の検討を

行ったので報告する.

MHFは向性器作用をほとんど持たない性ホルモンのプレカーサーを主成分とする製剤[6]であるが，近年，骨粗鬆症に対しても優れた効果が認められている.

対象と方法

1. 対象

平成元年3月より2年9月までの18ヵ月間に横浜市立大学およびその関連病院の産婦人科外来を訪れた患者のうち，子宮内膜症 (Beecham分類Ⅱ～Ⅳ期) と診断され，LH-RH agonist投与を行うことが決定された症例を対象とした.

2. 使用薬剤

LH-RH agonistとして，酢酸ブセレリン点鼻液を使用した．本剤は，10ml中に酢酸ブセレリン15.75mg (ブセレリンとして15mg) を含有する.

一方MHFは，1錠中に次の成分を含有する製剤である.

・プレグネノロン……1.0mg
・アンドロステンジオン……1.0mg
・アンドロステンジオール…0.5mg
・テストステロン……0.1mg
・エストロン……0.005mg
・乾燥甲状腺末……7.5mg

3. 投与方法・投与期間

対象症例を封筒法により次の2群に分け投与を実施した.

①対照群 (C群)： LH-RH agonist (900 μg/日) を単独で24週間連続投与した.

②MHF併用群 (M群)： LH-RH agonist (900 μg/日) にMHF (2錠/日) を併用し，24週間連続投与した.

なお，他の併用薬については原則として使用しないこととした.

4. スケジュールおよび観察項目

スケジュールおよび観察項目は，下記のとおりである.

①子宮内膜症に関する自覚症状は下腹痛，腰痛，性交痛，排便痛，内診時の疼痛について試験開始時と24週後までの2週毎および再来月経時に，また他覚所見はダグラス窩硬結，子宮可動性の制限について試験開始時，24週後，再来月経時に観察を行い，それぞれ4段階 (3：重症，2：中等症，1：軽症，0：なし) で評価を行った.

②随伴症状は，のぼせ・ほてり，発汗，四肢冷感，手足のしびれ，易疲労感，頭痛・頭重，心悸亢進，めまい，神経痛，不眠，抑うつ，悪心・嘔吐，食欲不振，腹部膨満感，肩こり，関節痛，乳房緊満感，外陰部掻痒感について試験開始時と24週後までの2週毎に観察を行い，4段階 (3：症状のため，ほとんど何も手につかない，2：症状が気になり，仕事・日常生活に多少影響がある，1：症状がわずかにあるが，ほとんど気にならない，0：全く症状がない) で評価を行った.

③第2中手骨X線所見 (MD法) は，非利き手の第2中手骨のX線撮影を治療前後に実施し，MCI，GSmin，ΣGS/Dの各指標を測定した.

③腰椎骨塩量 (DEXA) の測定は可能な施設においてL_2～L_4につきXR-26 (NORLAND社，USA)で実施した.

④臨床検査は血液一般検査のほか骨代謝パラメーター (血中Alkaline Phosphatase (Al-P), Ca, 尿中Ca/Creatinine (Cr))，ホルモン値 (血中E_2, LH, FSH) および，子宮内膜症の指標となる血中CA125について実施した.

5. 副作用

試験中に発現した副作用はその症状，程度，発現時期，処置および経過，薬剤との因果関係について調査した.

6. 総合判定

1) 全般改善度

子宮内膜症については自覚症状，他覚所見の経過を，また，随伴症状については各症状の経過を総合的に勘案し，それぞれ次の6段階で判定した.

1. 著明改善　2. 中等度改善　3. 軽度改善　4. 不変
5. 悪化　6. 判定不能

2) MHF併用の有用性

全般改善度および副作用を総合的に勘案し，次の6段階で評価した.

1. 極めて有用　2. 有用　3. やや有用　4. 有用と思われない　5. 好ましくない　6. 判定不能

結　果

1. 解析対象例

全投与症例45例のうち解析対象例とされた症例は43例であった．このうち24週間の観察が行われたのは39例で内訳はM群22例，C群17例であった．解析対象例のうち観察期間が24週間未満の4例の内訳はM群2例，C群2例であり，その観察期間はM群では12週間1例，18週間1例，C群では22週間1例，10週間1例であった.

除外例は2例で，除外理由は，初診のみで来院せ

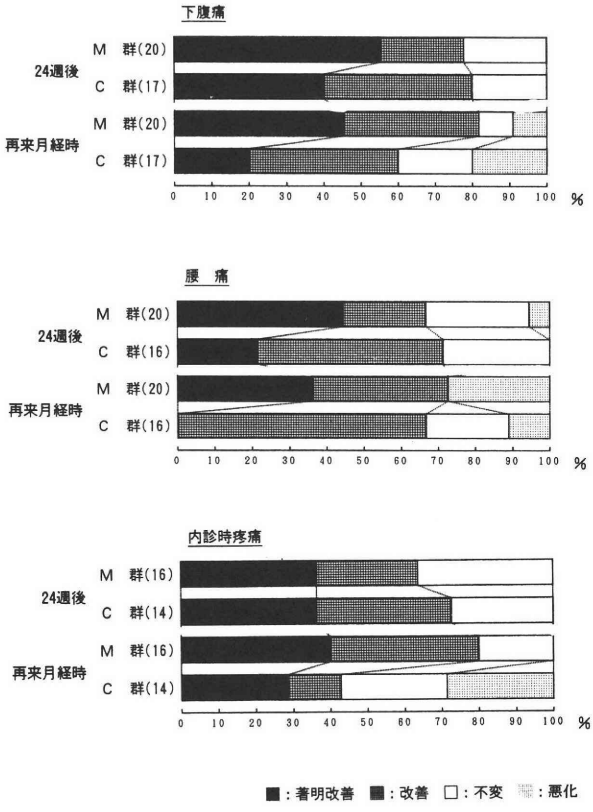


図1　自覚症状の改善度

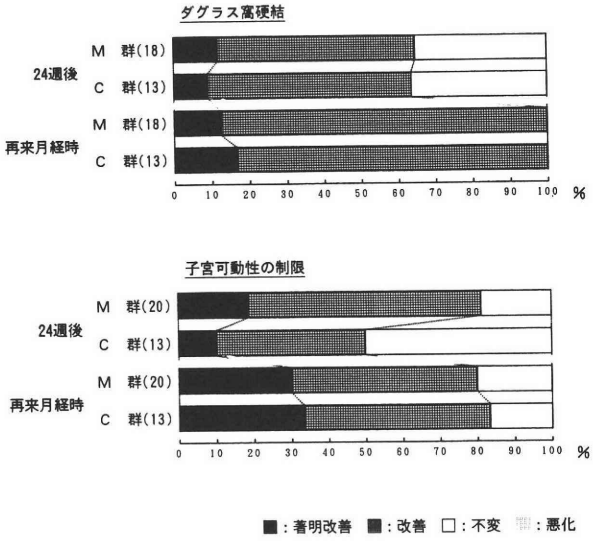


図2　他覚所見の改善度

ず1例，投薬開始数日後妊娠の判明1例であり，いずれもM群であった．24週間観察例，24週間未満観察例および除外例のそれぞれの症例数で，両群間に有意差は認められなかった．

2. 患者背景

解析対象例の患者背景は，以下の通りである．年齢は19～48歳に分布しており，平均年齢はM群38.3±1.5歳，C群39.1±1.4歳であり，両群間に有意差は認められなかった．重症度の内訳は“Beechdm分類Ⅱ期”がM群16例，C群12例で，以下“Ⅲ期”が6例，6例，“Ⅳ期”が2例，1例であり重症度分布で両群間に有意の偏りは認められなかった．発生部位は，卵巣がM群10例，C群8例と最も多く以下，付属器，子宮，骨盤，子宮と卵巣，腹膜，その他などであったが，いずれも両群間に有意差は認められなかった．またその他の患者背景においても両群間に有意の偏りは認められず，両群は同質の集団と考えられた．

3. 子宮内膜症に関する自覚症状，他覚所見および排卵の有無の推移

1) 自覚症状および他覚所見の改善度

試験開始時と比較し，症状の2段階以上の軽減を著明改善，1段階の軽減を改善，同じものを不変，増悪したものを悪化とし，改善度を評価した．その結果いずれの症状，いずれの観察時期においても両群間に有意差は認められず，両群の改善度は同等であった(図1, 2).

2) 排卵の有無

BBTにより観察を実施しえたM群15例，C群13例につき開始時から24週後までの2週毎と再来月経時の排卵率(排卵症例数/観察症例数×100)を図3に示した．両群の排卵の有無に有意差は認められなかった．

4. 随伴症状の推移

各症状の重症度は，各観察時の重症度を重症：3点，中等症：2点，軽症：1点，無症状：0点とし，2週間毎の観察3回の合計点で(6週毎)に評価した．また，このように評価した6週毎の重症度点数は，開始時の重症度点数を3倍したものと比較し，その差を改善度点数とした．

なお，随伴症状のうち両群間に傾向差または有意差の認められたものについてのみ，その推移を図4～6に示し，以下に記述した．

“のぼせ・ほてり”では，C群で投与開始8～12週後以降の症状で有意の($p<0.01 \sim p<0.05$)増悪が見られたのに対し，M群においては症状の変

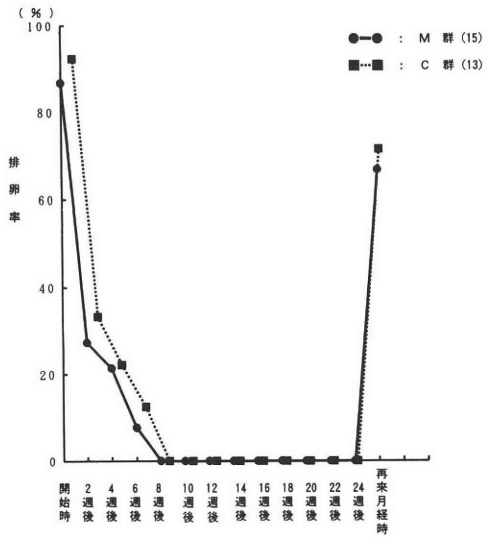


図 3　排卵の有無 (BBTにより観察のできたもののみ)

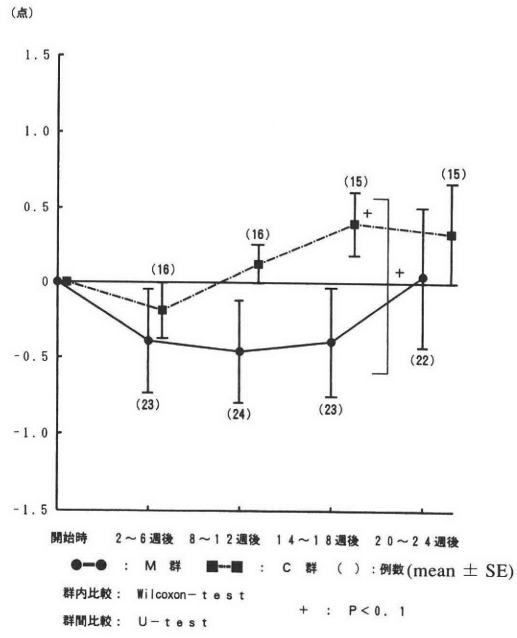


図 5　手足のしびれ

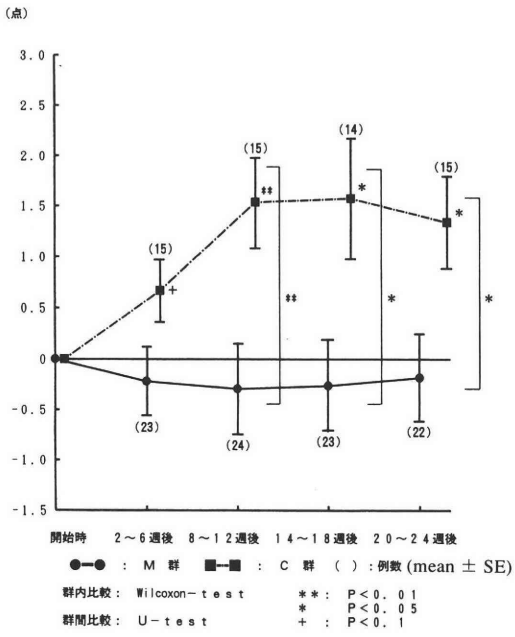


図 4　のぼせ・ほてり

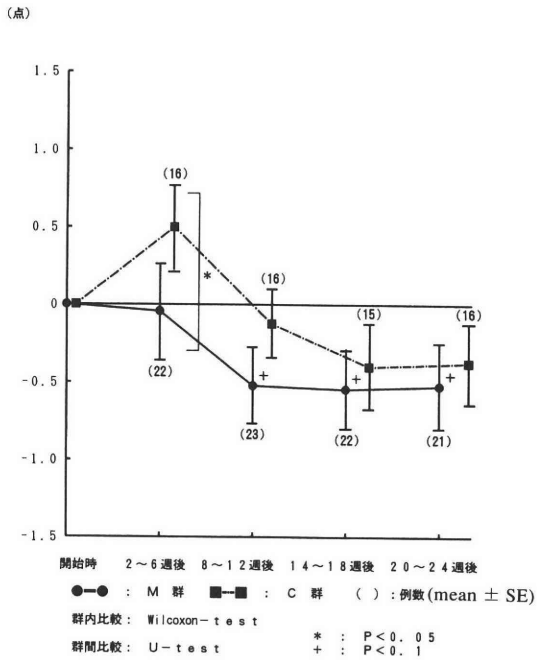


図 6　乳房緊満感

化は見られず，投与 8 ～12週後以降の重症度において，両群間に有意差 ($p<0.01 \sim p<0.05$) が認められた．同様に，“手足のしびれ”においては，投与14～18週後に両群間に傾向差 ($p<0.1$) が認められた．また“乳房緊満感”では投与 2 ～ 6 週後に有意差 ($p<0.05$) が認められた．

5. 骨所見

1) 第 2 中手骨X線所見 (MD法)

MD法の各指標の変化率を表 1 に示した． MCI, GSminについては，両群とも開始時に比し24週後に

表1　MD法による骨所見(開始時の値を0とした変化率の平均値)

	MCI			GSmin			ΣGS/D		
	n	mean±SE	t-test	n	mean±SE	t-test	n	mean±SE	t-test
M群	13	0.081±1.643	NS	13	2.865±2.536	NS	13	2.812±1.312	*
C群	9	-0.082±3.808	NS	9	-2.064±3.562	NS	9	-0.384±2.333	NS

*：p<0.05（vs開始時）

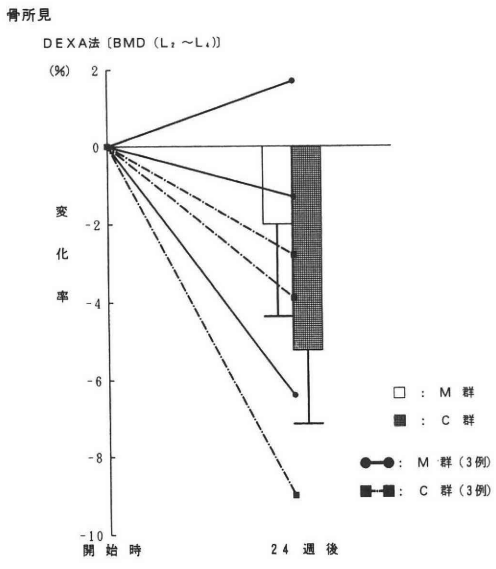


図7　DEXA法による腰椎骨塩量の変化(mean ± SE)

有意な変化は認められなかった．一方骨密度の指標であるΣGS/Dにおいて，M群では開始時に比し，24週後に有意な(p<0.05)増加が認められた．

2) 腰椎骨塩量(DEXA法)

DEXA法により測定を実施しえた症例は，M群3例，C群3例の計6例であった．L_2～L_4の平均BMDの変化率を図7に示した．両群間に有意差は認められなかったが，C群で骨量の減少がより大きかった．

6. 臨床検査値

肝機能検査，骨代謝パラメーター，ホルモン値，CA125を表2に示した．なおAl-Pは施設間の検査方法，正常値が異なるため初期値に対する百分率で示した．

肝機能検査ではGOT, GPTともC群において開始

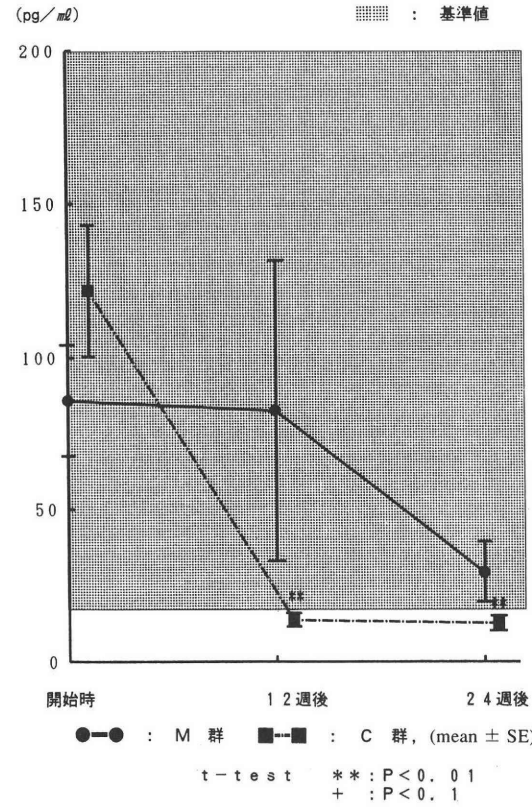


図8　E_2

時に比べ12週，24週後で有意な(p<0.05)上昇が認められた．

骨代謝パラメーターでは，Al-Pが両群ともに開始時に比べ有意に(p<0.05)上昇したが，血中のCaおよび尿中のCa/Crでは大きな変化は認められなかった．

ホルモン値は，図8に示す様にE_2がC群において極めて有意な(p<0.01)低下を示したのに対し，M群では緩やかな低下であった．LHも同様にC群では12週後 (p<0.05)，24週後 (p<0.01) と低下が認められ，M群は24週後に有意ではあるが緩やかな低下で

表 2　臨床検査

項目	群	開始時 n	開始時	24週後 n	24週後	t-test	
GOT (U)	M	19	18.37 ± 2.17	14	22.57 ± 2.20	NS	NS
	C	16	15.56 ± 1.32	13	24.00 ± 2.28	*	
GPT (U)	M	19	14.53 ± 2.53	14	18.50 ± 2.88	NS	NS
	C	15	11.47 ± 1.32	13	20.77 ± 3.63	*	
Al-P (%)	M	23	100.00 ± 0.00	15	141.12 ±12.24	**	NS
	C	18	100.00 ± 0.00	14	127.11 ± 9.04	*	
Ca (mg/dl)	M	17	8.31 ± 0.44	15	8.05 ± 0.55	+	NS
	C	16	8.61 ± 0.74	12	8.53 ± 0.71	NS	
Ca/Cr	M	10	0.15 ± 0.03	9	0.21 ± 0.06	NS	NS
	C	8	0.18 ± 0.07	6	0.20 ± 0.07	NS	
P/Cr	M	9	0.39 ± 0.07	10	0.50 ± 0.09	NS	NS
	C	8	0.45 ± 0.16	7	0.35 ± 0.08	NS	
LH (mIU/ml)	M	19	5.88 ± 1.20	13	1.16 ± 0.20	*	NS
	C	16	8.07 ± 2.27	11	2.35 ± 1.18	+	
FSH (mIU/ml)	M	19	17.26 ± 8.19	13	9.62 ± 1.99	NS	NS
	C	15	13.51 ± 4.92	11	9.03 ± 1.97	NS	
CA125	M	15	57.67 ±12.61	11	13.91 ± 2.30	*	NS
	C	15	48.99 ±19.22	10	11.45 ± 1.17	+	

**: P〈0.01 *: P〈0.05 +: P〈0.1, (mean ± SE)

あった．FSHは，C群，M群とも開始時に比し12週後，24週後で低下を示したが有意な変化ではなかった．

CA125は開始時に比べC群で傾向差 ($p<0.1$)，M群で有意差 ($p<0.05$) をもって低下を示した．

7. 副作用

C群で 1 例，M群で 2 例に認められた．いずれの症状も薬剤との因果関係が‘なし’あるいは‘不明’であり，投与継続可能であった．

8. 総合判定

1) 全般改善度

子宮内膜症に対する全般改善度を表 3 に示した．M群，C群の改善率はほぼ同等で，それぞれ中等度改善以上54.5%，52.9%，軽度改善以上100.0%，94.1%であった．

2) MHF併用の有用性

主治医の判定によるMHF併用の有用性は，表 4 に示すとおりであった．判定症例16例のうち有用以上56.3%，やや有用以上93.8%であった．

考　察

子宮内膜症に対するLH-RH agonistの作用機序は，連続的な高濃度のLH-RH agonist投与により，下垂体ゴナドトロピン分泌細胞が脱感作を受けてゴナドトロピンの分泌量が抑制され，その結果卵巣ステロイド，とくにエストロゲンの分泌低下が引き起こされることによる．その結果，エストロゲン依存性の疾患である子宮内膜症組織が萎縮・壊死に陥り病変の改善をみる．

LH-RH agonist製剤である酢酸ブセレリンは通常 1 日900 μgを 6 か月間連日投与されるが，投与期間中の低エストロゲン状態に起因する副作用として，のぼせ・ほてり，肩こり，頭重などの更年期症状と骨塩量の減少が問題とされている．これらの症状の発

表3　子宮内膜症に対する全般改善度

群	著明改善	中等度改善	軽度改善	不変	悪化	改善率		検定		判定不能*
						中等度以上	軽度以上	U-test	x^2-test	
M	27.3%	29.2%	45.5%	4.2%	0%	54.5%	100.0%	NS	NS	0
	(6)	(7)	(10)	(1)	(0)					
C	23.5%	29.4%	41.2%	11.1%	0%	52.9%	94.1%			1
	(4)	(5)	(7)	(2)	(0)					

*判定不能となった理由：投与10週目で脱落したため

表4　MHF併用の有用性

極めて有用	有用	やや有用	有用とは思われない	好ましくない	有用率		判定不能*
					有用以上	やや有用以上	
0.0%	56.3%	37.5%	6.3%	0.0%	56.3%	93.8%	8
(0)	(9)	(6)	(1)	(0)			

*同施設において取り扱ったコントロール群において、比較判定に十分な随伴症状が発現しなかったため、判定不能とした。

現については既に幾つかの報告[7,8]があり，その発生率は“のぼせ・ほてり”約20%，“肩こり”約13%，“頭重”約8%とされている．

今回の我々の臨床研究において，ブセレリン使用中の更年期症状としては，“のぼせ・ほてり”が各症状の中で最も強く，投与開始後2～6週後より発現し，投薬期間中症状は持続した．また，“手足のしびれ”は投薬8～12週後より発現し，投薬終了時まで持続した．“乳房緊満感”については，投与2～6週後に発現しその後消失した．これらブセレリン投与による更年期症状の発現はMHFの併用投与により，ほとんど抑制され，MHF併用療法は随伴症状に対して優れた抑制作用を示すことが認められた．

一方，子宮内膜症に対する治療効果については自覚症状，他覚所見ともにC群，M群の間に差は認められなかったことや，排卵の抑制に対する効果が両群とも同等であったことより，MHF併用によるブセレリンの治療効果に及ぼす影響は極めて少ないと思われる．

LH-RH agonistの骨塩量に対する影響については，既に幾つかの報告[9,10]があり，いずれも長期の投与による骨塩量の減少が報告されている．また近年DEXAによる計測が広まり，国内でも腰椎骨塩量の減少に関する報告がみられるようになった[11]．骨塩量の減少はLH-RH agonist療法において，現在最も懸念される副作用であり，反復投与や長期投与においては特に留意が必要とされている．今回の検討では，主にMD法を用いたためブセレリン単独投与による大きな骨塩量の変化は認められなかったが，MHFの併用群ではΣGS/Dの有意な ($p<0.05$) 増加が認められた．一方DEXA法では，症例数が少ないが，測定を行った6例の腰椎骨塩量はC群では5.5%の減少であったのに対し，M群では2.4%の減少にとどまった．

MHFの骨粗鬆症に対する成績は既に多数報告されている．福田ら[12]は骨粗鬆症モデルラットに対する効果を報告しており，楊ら[13]は閉経後骨粗鬆症に対する効果を活性型ビタミンDと比較し，その成績を報告している．また，折茂ら[14]は骨粗鬆症に対する効果について，エストリオールを対照とした多施設比較試験成績を，白木ら[15]は結合型エストロゲン，活性型ビタミンDとの3群間での比較検討成績を，

西川ら[16]は卵巣摘出後婦人の骨塩量に対する効果について，結合型エストロゲンと比較した成績をそれぞれ報告している．これらの報告は，いずれもMHFの優れた有用性を認めている．

更年期症状および骨代謝に関するMHFの作用機序についてはまだ十分明確ではないが，次のように考えられる．まず第1に，本研究のエストラジオール値の推移によると，スプレキュア単独投与で極端に低くなるエストロゲンレベルが，MHFの併用により緩和されたことによると考えられる．これは，エストロゲンレベルを完全には抑制することができない600μgのスプレキュア投与によっても，かなりの有効率が得られている[17]ことより，子宮内膜症の治療において必ずしも閉経期レベルの低エストロゲン状態を数カ月にわたり持続させる必要がないと推測される．

第2に，MHFの更年期障害や卵巣機能欠落症状に対する効果には，本剤に含有されている中間代謝物[18]やアンドロゲンの直接的な作用も関与していると考えられる．MHFの更年期障害に対する成績[19]はこの考えを支持するものである．

第3に，骨塩量に対するMHFの作用には，エストロゲンやアンドロゲンと甲状腺ホルモンの相乗作用が考えられている．折茂ら[15]，白木ら[16]の報告によるとMHF投与により骨量の増加とともに軽度のAl-Pの上昇が認められ，これは骨芽細胞機能の亢進の結果であると推察されている．

以上のことから，子宮内膜症に対するLH-RH agonist製剤による治療においてMHF錠は，LH-RH agonist製剤の子宮内膜症に対する臨床効果を低下させることなく，副作用として現れる卵巣機能欠落症状，骨塩量減少を軽減する極めて有用な薬剤であると考えられる．

文　献

1) 鈴木健治：子宮内膜症の頻度，産婦治療，55: 501, 1987
2) 好川元庸，奥田喜代司，飯塚信行，佐伯理男，杉本　修：エンドメトリオージスに対するBuserelinの治療効果，産婦世界，39: 787, 1987
3) 古橋信晃，星合　昊，千葉英俊，古橋信之，渡辺英子，安藤順一：腹腔鏡によるブセレリンの子宮内膜症に対する効果の検討，産と婦，54: 1722, 1987
4) 唐沢陽介，石原　力，斉藤正実，褥寝重隆，長瀬行之，山本晧一，露口元夫，鈴木三郎，柳沼■，二階堂贊，竹松直彦：更年期障害に対する代謝性ステロイド療法剤“メサルモン®—F”の治療効果，産婦世界，29: 237, 1977
5) 杉本　修，植木　実，藤本　昭，池田義人，庄田博至，平井　博，浜田紘一郎：“メサルモン®—F錠”の更年期障害に対する臨床効果，産婦世界，30: 611, 1978
6) 小林拓郎，岡村　隆，池下久弥，岩瀬　一，大川とみ，鈴木三郎，雨森良彦：更年期ならびに去勢夫人の内分泌環境に対するメサルモン®—F錠の影響，産と婦，50: 1440, 1983
7) 水口弘司，高見澤裕吉，川島吉良，杉本　修：子宮内膜症に対するBuserelinの臨床評価，産婦世界，39: 1159,1987
8) Lemay, A., Maheux, R., Faure, N., Jean, C., Fazekas, A.: Reversible hypogonadism induced by a luteinizing hormone-releasing horumone (LH-RH) agonist (Buserelin) as a new therapeutic approach for endometriosis, Fertil.Steril., 41: 863, 1984
9) Steingold, K. A., Cedars, M., Lu, J. K. H., Randle, D., Judd, H.L., Meldrum, D.R.: Treatment of t al endmetriosis with a long acting gonadotropin-releasing hormone agonist, Obstet. Gynecol., 69: 403, 1987
10) Johansen, J. S., Riis, B. J., Hassager, C., Moen, M., Jacobson, J., Christiansen, C.: The effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist analog (nafarelin) on bone metabolism, J. Clin. Endocrinol. Metabol., 67: 701, 1988
11) 平野高明，植村次雄，水口弘司，片桐信之，鈴木直行，毛利　順，長田久文：子宮内膜症に対するGnRH agonist (GnRHa) 療法による骨塩量減少及びその回復について，日内分泌誌，68: 290, 1992
12) Fukuda, K., Sohen, S., Tanaka, S.: Effect of sex steroid-thyroid hormone mixture on an experimental model of osteo-porosis, 骨代謝会誌，3: 226, 1986
13) 楊　鴻生，富永浩司，中野謙吾，宮崎博史，横山正博，中山　明，辻寿：閉経後骨粗鬆症に対する代謝性ホルモン剤 (メサルモン®—F) の有用性の検討，中部整災学会誌，29: 402, 1986
14) 折茂肇，井上哲郎，中野謙吾，大澤仲昭，田中清介，山本吉蔵，川名　尚，大西利夫，白木正孝：メサルモン®—F錠の骨粗鬆症に対する有用性の検討，老年医学，28: 1275, 1990
15) 白木正孝，折茂　肇：老人性骨粗鬆症に対する性ホルモン・甲状腺ホルモン合剤と結合型エストロゲン製剤の効果，日内分泌誌，67: 84, 1991
16) 西川吉仲，広田憲二，大道正英，坂田正博，門脇浩三，三宅　侃，谷澤　修：エストロゲン製剤の骨塩量への影響，産婦進歩，42: 790, 1990

17) 水口弘司，高見澤祐吉，川島吉良，杉本　修：新しい子宮内膜症治療剤ブセレリンの至適用量の検討，産婦世界，39: 1045, 1987
18) 岡田弘二，折野克彦，西村　徹，北嶋正智，田畑久子，加藤忠彦，藤谷栄子，神谷　太：メサルモン®—F錠の使用経験，京府医大誌，77: 346, 1968
19) 北脇　城，伊藤将史，本庄英雄，岡田弘二：更年期障害と卵巣欠落症候群に対するプレマリン錠とメサルモン®—F錠の効果の比較検討，ホと臨，34: 721, 1986

The effect of a sex steroid-thyroid hormone mixture (Metharmon-F Tablets) in preventing climacteric symptoms during LH-RH agonist theapy

Tuguo Uemura, Hiroshi Minaguchi, Kazuhiro Shirasu and Yasuhiro Yosimura

Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama City University,Yokohama 236, Japan

Tatsuo Negishi

Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama Municipal Citizen's Hospital, Yokohama 236, Japan

Nobuyuki Katagiri and Taketo Yanagihashi

Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama-Minamikyousai Hospital, Yokohama 236, Japan

Naohiko Takahashi and Kousaku Nakase

Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama City Kouwan Hospital, Yokohama 231, Japan

Jun Mouri and Masaki Nakayama

Department of Obstetrics and Gynecology, Saiseikai-Yokohama Nanbu Hospital, Yokohama 233, Japan

Tsutomu Koshimizu, Shinichi Tsutiya, and Toshiki Ooyama

Department of Obstetrics and Gynecology, Kanagawa Prefectural Ashigarakami Hospital, Ashigara 258, Japan

Keiji Satou and Akemi Matsuyama

Department of Obstetrics and Gynecology, Odawara Municipal Hospital, Odawara 250, Japan

Okimasa Kosuge

Department of Obstetrics and Gynecology, Fujisawa Municipal Citizen's Hospital, Fujisawa 251, Japan

Naoyuki Ootsuka

Department of Obstetrics and Gynecology, Miura Municipal Hospital, Miura 238-02, Japan

During LH-RH agonist therapy for endometriosis, we assessed the effects of a sex steroid-thyroid hormone mixture (Metharmon-F; MHF) tablets in preventing the onset of climacteric symptoms and in preventing a reduction of the bone mineral content.

Methods: Twenty four patients with endometriosis were treated for 24 consecutive days with a combination of LH-RH agonist (900 μ g/day in) and MHF (2 tablets/day) (the combined treatment group). Ninteen patients with endmetriosis were treated for 24 consective days with LH-RH agonist alone at a daily dose of 900 μ g (the control group).

Results: 1) In terms of ovulation and the subjective and objective symptoms of endometriosis, no differences were observed between the two groups.2) Climacteric symptoms such as a flushed face and hot flushes were intense in the control group, while these symptoms were suppressed significantly in the combined treatment group.3) Bone examination revealed a significantly higher ΣGS/D (which was determined by the MD method) in the combined treatment group.

Conclusion: The results indicate that MHF is useful in preventing the onset of climacteric symptoms and in preventing a reduction of the bone mineral content when combined with LH-RH agonist therapy for endmetriosis.

(受付：1992年8月12日特掲)
(受理：1992年9月16日特掲)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第 1 号 1993

体外受精・胚移植における過排卵刺激時のホルモン環境と着床率との関係

Relationship between Hormonal Environment and Implantation Rate during the Controlled Ovarian Hyperstimulation with GnRH Agonist and hMG in IVF-ETcycles.

獨協医科大学産科婦人科学教室（主任：熊坂高弘教授）
星　合　　明
Akira HOSHIAI
Department of Obstetrics and Gynecology,·
Dokkyo University School of Medicine,Tochigi 321-02, Japan

体外受精・胚移植においてGnRH agonistとhMGによる過排卵刺激の着床に及ぼす影響を明らかにする目的で，男性不妊を除外した83名，100周期におけるhCG投与日の血中estradiol (E_2)，progesterone (P) 値と着床率との関係を検討した．

1) E_2とP値との間にはr=0.595 (P ＜0.001) の正の相関関係があった．

2) E_2とP値により対象周期をⅠ群からⅥ群に分類した場合，各群の受精率，胚移植あたり妊娠率に有意差はなかったが，採卵数，移植胚数はE_2値が高い群ほど多かった．

3) 着床率 (胎嚢数/移植胚数) はE_2値が高い群ほど，またP値の上昇 (≧1.0ng/ml) する群ほど低かった．

4) 対象周期をP上昇群 (≧1.0ng/ml, 33周期) と非上昇群 (<1.0ng/ml, 67周期) に大別すると，上昇群の着床率 (4.9%) は非上昇群 (13.2%) に比べ有意に低かった．

5) 対象周期をE_2高値群 (≧2000pg/m1, 54周期) と非高値群 (＜2000pg/ml, 46周期) に大別すると，高値群の着床率 (5.4%) は非高値群 (19.1%) に比べ有意に低かった．

以上から，過排卵刺激周期におけるE_2の増加はPの上昇を伴いやすく，E_2の高値とPの上昇はいずれも着床を障害する因子となることが判明した．従って過排卵周期における最適ホルモン環境はE_2＜2,000pg/m1，P＜1.0ng/m1の領域にあるといえる．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 38—44, 1993)

緒　言

体外受精・胚移植 (In vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) は現在わが国においても多くの施設で行われるようになり，難治性不妊症治療において中心的な治療法として定着してきている．本法では多数の卵を採取し複数の胚を移植することにより，妊娠率の向上が得られることから，多数の卵胞を発育させるためにclomipheneやhMGを用いた過排卵刺激法が行われてきた．しかしながら，従来の過排卵刺激法ではpremature LH surgeを抑制することができず，妊娠率の低下を招くことから[1-3]，GnRH agonist (GnRHa) を併用した過排卵刺激法が広く普及するに至っている[4-6]．しかし，この方法を用いてもなお，卵胞成熟時の軽度なprogesterone値の上昇 (premature luteini-zation) を完全には抑制することができないことが最近報告されている[7,8]．そこで本研究ではGnRHa併用の過排卵周期において，hCG投与日のホルモン動態を中心に分析を行い，血中estradiol (E_2)，progeste-rone (P) 値からみたホルモン環境の受精，着

床，妊娠予後に及ぼす影響について検討した．

対象と方法

獨協医科大学付属病院でIVF-ETを施行した患者の中で，ホルモン採血をなし得た83例，100回の胚移植周期を対象とした．ただし，男性因子を有する症例は対象から除外した．

過排卵刺激は2種類のprotocolに基づいて行った．short protocolでは刺激周期の月経第2日目よりGnRHa (Buserelin, ヘキスト・ジャパン) 900 μg/dayのnasal sprayとhMG (Pergonal, 帝国臓器) の投与を開始した (30周期)．long protocolでは前周期の黄体期初期または中期よりGnRHaを投与し，月経第3日目からhMGの投与を行った (70周期)．両protocolともhMG 150IU～300IUを連日筋注し，経腟的超音波断層診断法 (SONOVISTA-CS. MEU-1579, モチダ) により卵胞モニタリングを行った．平均卵胞径18mm以上の卵胞を2個以上認めた時点でhCG 10,000IU筋注後，35～36時間目に経腟的に採卵を行った．flushing mediumはヘパリン加PBSを用い，採取卵の洗浄には非動化患者血清を10%含んだmodified (Hepes含有) HTF (Human Tubal Fluid, IRVINE SCIENTIFIC), insemination medium (IM) とgrowth medium (GM) にはそれぞれ10%と15%の血清を加えたHTFを使用した．媒精および培養はすべて37℃，5%CO_2，5%O_2，90%N_2の環境下で行った．

採取した卵は4～6時間の前培養を行った後，swim up法で調節した精子 (最終濃度10×10^4/ml) にて媒精した．媒精約20時間後に卵丘細胞を除去し，2前核の存在により正常受精の確認を行い，GMに交換後約24時間培養を続けた．受精卵の分割状況を確認し富士システム社のIVFカテーテルを用いて胚移植を施行した．黄体期の補充療法として胚移植当日よりhCG 3,000IUを3日毎に黄体期11日目まで投与した．妊娠判定は黄体期の16日以降に行い，妊娠6～7週で超音波下に胎嚢 (GS) を確認できたものを臨床的妊娠とした．採血された血液サンプル中のLH, FSHは第一ラジオアイソトープ社のSPAC-S LH Kit (RIA固相法)，SPAC-S FSH Kit (RIA固相法)，E_2は第一ラジオアイソトープ社のRIA Kit (2抗体法)，Pは日本DPC社のRIA Kit (チューブ固相法) で測定した．血中LH, FSH, E_2, Pの測定感度と測定精度 (CV) はLH, FSHは，ともに1.0mIU/ml, 5%以下，E_2は10pg/ml, 6%以下; Pは0.2ng/ml, 10%以下であった．なお，すべての値はmean±SDで表し，有意差検定にはStudent's t-testあるいはχ^2-test (Yatesの修正を含む) を用いた．

結　果

1. hCG投与日の血中E_2とP値の相関性

対象周期100周期のhCG投与日における血中E_2値とP値の間には$r=0.595$ ($P<0.001$) の正の相関性が認められた (図1)．

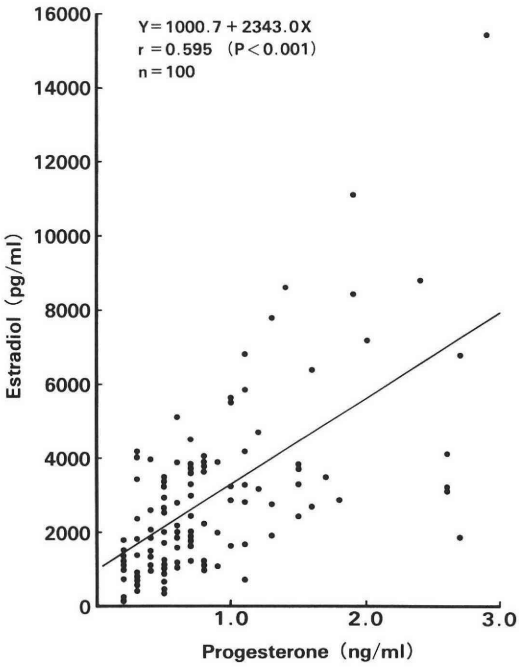


図1　hCG投与日の血中E_2値とP値との相関性

2. 対象100周期のhCG投与日の血中E_2とP値による分類 (Ⅰ群～Ⅵ群)

そこで対象100周期をhCG投与日の血中E_2とP値によりⅠ群からⅥ群に分類して比較検討した．すなわち，Ⅰ群：($E_2<2{,}000$pg/ml, $P<1.0$ng/ml)，Ⅱ群：($E_2<2{,}000$, $P\geqq1.0$)，Ⅲ群 ($2{,}000\leqq E_2<4{,}000$, $P<1.0$)，Ⅳ群：($2{,}000\leqq E_2<4{,}000$, $P\geqq1.0$)，Ⅴ群 ($E_2\geqq4{,}000$, $P<1.0$)，Ⅵ群：($E_2\geqq4{,}000$, $P\geqq1.0$) に分類した．図2はこの分類に従ってプロットした100周期の妊娠成績である．openサークルは妊娠例，closedサークルは非妊娠例を示す．症例はⅠ，Ⅲ，Ⅳ，Ⅵ群に集中しており，妊娠例はこれらの群にほぼ均等な割合で分布していた．

3. 各群における妊娠率の比較

各群における妊娠率をみると (表1)，各群間には有意な差を認めなかった．全体の妊娠率は100回のETあたり39例が妊娠し，妊娠率は39.0%であった．多胎妊娠率は全体として15例の多胎妊娠例を認めた

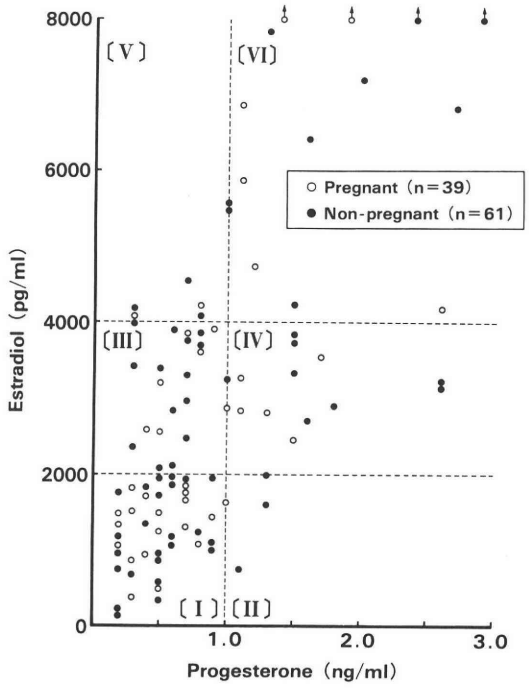


図2　hCG投与日の血中E_2, P値による分類（Ⅰ～Ⅵ群）とIVF-ETの成績

が，そのうちの10例がⅠ群に属し，Ⅰ群は55.6%と，高い値を示した．流産率(前臨床的流産を含む)は全体として28.2%であり，Ⅳ，Ⅴ，Ⅵ群で高い傾向がみられた．

4. 各群における採卵率，受精率，移植胚数の比較

各群における採卵率，受精率，移植胚数を比較すると (表2)，採卵率はⅠ群，Ⅱ群に比べⅢ群からⅥ群において多い傾向を示した．

受精率は各群において有意な差を認めず，全体として75.3±26.0%であった．移植胚数はⅠ群，Ⅱ群に対して群数が増すごとに多くなる傾向を示したが，全体の平均は5.2±3.0個であった．

5. 各群における移植胚数と妊娠成立との関係

各群における移植胚数と妊娠成立との関係を図3に示した．openサークルは妊娠例，closedサークルは非妊娠例を示すが，Ⅰ群においては2個から6個の胚移植で，いずれも良好な妊娠成立がみられたのに対し，Ⅲ群からⅥ群へ群数が増すごとに妊娠成立により多くの移植胚を要することがわかる．特にⅥ群は6例の妊娠すべてが8個以上の移植胚により妊娠が成立している．

表1　各群における妊娠率，多胎妊娠率，流産率，外妊率

Group	妊娠数	妊娠率 (%/ET)	多胎妊娠数 (%)	流産数 (%)	外妊数 (%)
Ⅰ	18	42.9	10 (55.6)	4 (22.2)	0 (0)
Ⅱ	1	25.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ⅲ	6	30.0	2 (33.3)	0 (0)	2 (33.3)
Ⅳ	6	42.9	1 (16.7)	4 (66.7)	1 (16.7)
Ⅴ	2	40.0	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0)
Ⅵ	6	40.0	1 (16.7)	2 (33.3)	1 (16.7)
Total	39	39.0	15 (38.5)	11 (28.2)	4 (10.3)

表2　各群における採卵数，受精率，移植胚数

Group	周期数	採卵数	受精率 (%)	移植胚数
Ⅰ	42	6.3±3.6	76.1±24.1	3.9±2.2
Ⅱ	4	4.5±1.9	58.3±28.9	2.8±2.2
Ⅲ	20	10.4±4.1	68.7±31.2	6.0±3.4
Ⅳ	14	8.0±3.1	78.1±24.2	5.5±2.8
Ⅴ	5	10.2±2.3	92.0±11.1	7.0±1.0
Ⅵ	15	14.8±5.8	77.2±28.0	7.9±2.9
Total	100	8.6±5.0	75.3±26.0	5.2±3.0

(mean±SD)

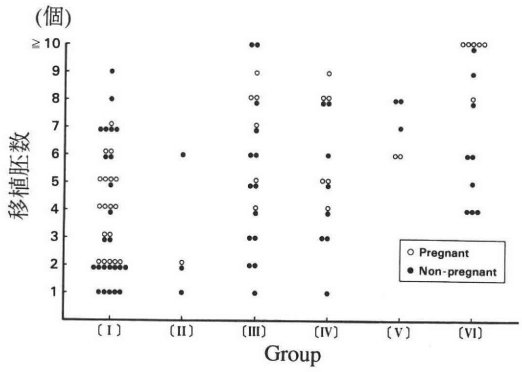


図3　各群における移植胚数と妊娠成立との関係

6. 各群における着床率の比較

すでに述べたように各群における妊娠率には差がなかった (表 1). しかし移植胚数には大きな違いがあった. そこで各群における着床率, すなわち各群の総移植胚数あたりの着床数 (GSの数；前臨床的妊娠と外妊は除外) の割合をみてみると (表3), Ⅰ群の着床率は総移植胚数162個に対して32個の着床を認め, 19.8%と最も高く, 以下群数が増すにつれて減少し, Ⅵ群は, 3.4%と最も低値を示した. Ⅰ群と比較し, Ⅲ群, Ⅳ群, Ⅵ群では有意な着床率の減少が認められた. Ⅱ群, Ⅴ群は例数が少ないためⅠ群との有意差は出なかった.

7. hCG投与日の血中P値 (1.0ng/ml) と着床率との関係

次にⅠ群からⅥ群までをhCG投与日の血中P値が1.0ng/ml未満である, Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ群を合わせた群 (67例) と, P値が1.0ng/ml以上のⅡ, Ⅳ, Ⅵ群を合わせた群 (33例) の2群に大別して比較検討した (表 4). 両群において受精率, 妊娠率には有意差は認めなかったが, 着床率はP<1.0の群が13.2%であり, P≧1.0の群の4.9%に対して約3倍高く, 両群間に強い有意差を認めた. 多胎率はP＜1.0の群がP≧1.0の群より 3 倍以上高く, 逆に流産率はP≧1.0の群がP＜1.0の群と比べ2倍以上高かった. つまり, P値の軽度上昇のみられない例では着床率, 多胎率が高く, 一方, P値の上昇する例では流産率が高いことが判明した.

8. hCG投与日の血中E_2値 (2,000pg/ml) と着床率との関係

さらにⅠ群からⅥ群を血中E_2値が2,000pg/ml未満のⅠ, Ⅱ群を合わせた群 (46例) とE_2値が2,000pg/ml以上のⅢ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ群を合わせた群 (54例) の2群に大別して同様の比較検討をしてみた (表 5). 受精率, 妊娠率に両群間に有意差は認めなかったが, 着床率においてはE_2＜2,000の群が19.1%であり, E_2≧2,000の群に対して3倍以上高く, 両群間に強い有意差を認めた. 多胎率はE_2＜2,000の群が52.6%と高く, 一方流産率はE_2≧2,000の群が35.0%と高い傾向を認めた.

9. 各群におけるhCG投与日のホルモン値の比較

各群におけるhCG投与日のLH, FSH, E_2, P値を表 6

表3　各群における着床率

Group	総移植胚数	着床数	着床率 (%)
Ⅰ	162	32	19.8
Ⅱ	11	1	9.1
Ⅲ	120	8	6.7**
Ⅳ	77	5	6.5*
Ⅴ	35	2	5.7
Ⅵ	118	4	3.4**
Total	523	52	9.9

*p<0.025, ** p<0.005 vs Group Ⅰ

表4　hCG投与日の血中P値と受精率, 妊娠率, 着床率, 多胎率, 流産率との関係

P値 (ng/ml)	周期数	受精率	妊娠率	着床率	多胎率	流産率
P<1.0	n=67	72.4% (370/511)	38.8% (26/67)	13.2%* (42/317)	50.0% (13/26)	19.2% (5/26)
1.0≦P	n=33	76.1% (268/352)	39.4% (13/33)	4.9% (10/206)	15.4% (2/13)	46.2% (6/13)

*p<0.005 vs 1.0≦P群

表5　hCG投与日の血中E_2値と受精率, 妊娠率, 着床率, 多胎率, 流産率との関係

E_2値 (pg/ml)	周期数	受精率	妊娠率	着床率	多胎率	流産率
E_2<2000	n=46	72.7% (197/271)	41.3% (19/46)	19.1%* (33/173)	52.6% (10/19)	21.1% (4/19)
2,000≦E_2	n=54	74.5% (441/592)	37.0% (20/54)	5.4% (19/350)	25.0% (5/20)	35.0% (7/20)

*p<0.005 vs 2,000≦E_2群

表6　hCG投与日における各群の血中LH, FSH, E_2, P値

Group (周期数)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	E_2 (pg/ml)	P (ng/ml)
Ⅰ (n=42)	2.0 ± 1.3	16.4 ± 6.8	1271.9 ± 483.2	0.5 ± 0.2
Ⅱ (n= 4)	2.4 ± 1.2	21.5 ± 8.3	1483.5 ± 521.6	1.2 ± 0.2
Ⅲ (n=20)	2.3 ± 1.0	16.6 ± 6.5	3192.0 ± 647.4	0.6 ± 0.2
Ⅳ (n=14)	3.4 ± 1.9	17.1 ± 7.4	3190.0 ± 444.4	1.3 ± 0.3
Ⅴ (n= 5)	2.8 ± 1.8	14.5 ± 5.6	4202.0 ± 185.8	0.6 ± 0.3
Ⅵ (n=15)	3.3 ± 2.9	16.8 ± 8.0	7072.0 ±3055.5	1.7 ± 0.7

mean±SD

表7　Mid-luteal phaseにおける各群の血中E_2, P値とP/E_2 ratio

Group (周期数)	E_2 (pg/ml)	P (ng/ml)	P/E_2 ratio
Ⅰ (n=42)	1709.8 ±1373.6	108.7 ± 71.3	72.7 ± 42.9
Ⅱ (n= 4)	1153.0 ±716.4	97.8 ± 48.3	96.5 ± 53.3
Ⅲ (n=20)	3122.8 ±1551.7**	217.6 ±103.4***	76.2 ± 33.4
Ⅳ (n=14)	3415.6 ±1507.2**	211.3 ± 95.2***	68.5 ± 33.4
Ⅴ (n= 5)	2772.0 ±916.3	192.0 ± 38.3*	76.2 ± 28.6
Ⅵ (n=15)	4370.0 ±2432.5***	273.8 ±153.6***	67.9 ± 42.6

mean±SD

*p<0.02, ** p<0.01, *** p<0.001 vs Group Ⅰ

に示した．LHはいずれの群も正常卵胞期初期のレベル以下に抑制されており，premature LH surgeを示した例はなかった．各群のFSH値にも有意差は認められなかった．

10. Mid-luteal phaseにおける各群の血中E_2, P値とP/E_2 ratioの比較

次に黄体期7日目の血中E_2, P値とP/E_2 ratioをみてみると (表7)，E_2, P値はⅠ群に対してⅢ群以上の群で有意に高いが，P/E_2 ratioは各群間に有意差はなかった．

考　察

IVF-ETにおいてGnRHaとhMG併用による過排卵刺激は多数の成熟卵が得られ[4-6]，premature LH surgeが抑制される[4-6]など妊娠率の向上に欠かせない方法として広く普及している．しかしながらこの方法を用いて下垂体のdesensitization下にあっても，なおかつhCG投与日に血中Pの軽度な上昇 (premature luteinization) が起こり得ることが最近報告され[7, 8]，妊娠率の低下を招くとして注目されている．同様な現象はClomid-hMG併用周期でLH surgeを欠除した状態においてもみられている[9, 10]．このLH surgeを伴わないpremature luteinizationが何故発生するのか，またIVF-ETのどのprocessを障害するのかといった点は現在のところ未解決である．

今回の検討でhCG投与日に血中P値の上昇する例は33%であった．またこのP値はE_2値と正の相関性を示していた．このことは血中E_2値が高値となるにつれてPの上昇が起こりやすくなることを意味している．そこで対象周期をE_2とP値により6群に分類して検討した結果，各群における受精率，妊娠率には差を認めなかった．しかし各群における移植胚数は大きく異なっているため，これだけで各群の妊娠率を評価するのは危険である．一般にIVF-ETでは移植胚数が多くなるほど妊娠率が高くなるので，胚1個あたりの妊娠率ともいうべき着床率 (着床胚数/総移植胚数) という観点から分析を行った．その結果，E_2 ＜2,000pg/ml, P＜1.0ng/mlのⅠ群が最も着床率が高く，E_2≧4,000, P≧1.0のⅥ群が最低であった．すなわち胚1個あたりの妊娠率あるいは着床率はE_2が高値でPの軽度上昇を伴う群で明らかに障害されていた．この結果はPの上昇する例では妊娠率が低下するという諸家[7-10]の報告と本質的に矛盾していない．また，P値とE_2値は前述したように正の相関が

あるため，P上昇群は大略E_2高値を伴うのは当然であり，この点もSilverbergら[8]やMioら[10]の結果と一致している．しかし，Mioら[10]はP上昇群では受精率も有意に低下するとしており，この点は今回の著者の結果と食い違っていた．この理由は明らかではないが，彼らの対象例に男性不妊が含まれていることがあるいは関係しているのかもしれない．一方，着床率の低下は妊娠させるためにより多くの移植胚を必要とするわけであり，図3に示したようにⅥ群では8個以上の移植にて始めて妊娠例が出ている．逆にⅠ群では着床率(胚移植効率)が高いため，平均3.9個の移植胚に対して55.6%もの多胎妊娠が発生している．

E_2高値とP上昇により着床率が有意に低下することが判明したが，それではE_2とPのいずれの因子がより着床率の低下に関与するのかを明らかにするため，対象周期をP＜1.0とP≧1.0の2群またはE_2＜2,000とE_2≧2,000の2群にそれぞれ大別し検討した．結果はP上昇群の低い着床率と高い流産率が検出された．一方，E_2高値群でも同様の結果が得られた．従って着床率の低下にはPとE_2の両方の因子が個々に関与していることが判明した．しかしPとE_2には正の相関性があることから，Pの上昇にはE_2の高値が伴うことが多いわけであり，この両者の着床率への影響を厳密には分離して評価することは困難と思われる．IVF-ETにおける過排卵周期でE_2が高値となると着床が障害されるという知見は以前にも幾つかみられている[11-13]．小田ら[13]はE_2≧4,000の高度の卵巣過剰刺激周期では着床が障害され，妊娠しても流産率が高いこと，また4個の胚を移植すると妊娠率の低下が防止できることを報告している．Formanら[12]も同様に着床率の低下は移植胚数の増加により対処できるとしている．

着床を論ずる場合，黄体期中期(着床期)のE_2, P値やP/E_2 ratioに注目しなければならない．今回の結果では各群間に黄体期中期の血中E_2, P値に有意差がみられたが，P/E_2 ratioはほぼ一定しており有意差はなかった．Gidley-Bairdら[11]は過排卵周期における着床障害には黄体期中期のE_2，P値そのものより，P/E_2 ratioの低下が関与していると指摘している．今回の結果ではこのratioに有意差がなかったことから，着床期におけるホルモン環境異常が着床障害の原因となっている可能性は一応否定的と考えられる．

さて，GnRHa併用の過排卵周期において何故，permature LH surgeを伴わずにPの上昇が起こるのか，その機序については推論の域を出ない．Schoolcraftら[7]はhMG投与により過剰なFSH刺激を受けると顆粒膜細胞のLH receptorの感受性が亢進し，低レベルに抑制されたLHに対してもluteinizationを起こすのではないかと推定している．著者はE_2とPとの正の相関性からみて，卵胞刺激が過剰となると，E_2が高値となり，E_2の増加に伴って遅れてPの上昇が開始すると考えている．この過程を図4に模式化してみた．

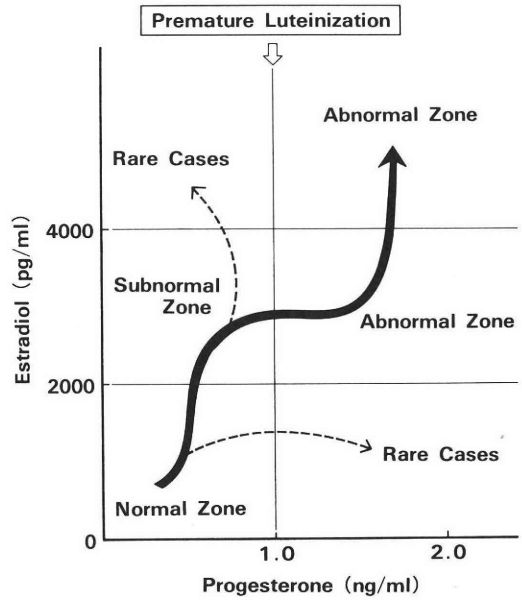


図4　hCG投与日の血中E_2, P値からみたIVF-ETの予後判定

IVF-ETの予後からみて，最も着床率が高く，流産率の低いE_2＜2,000，P＜1.0をnormal zoneとすると，卵胞刺激の過程で過剰刺激あるいは患者の過剰反応によりsubnormal zoneからabnormal zoneへ推移していくのではないかと考えている．従って出来るだけnormal zoneに留めるような卵胞刺激の工夫が必要となるし，abnormal zoneに入った場合には着床率の低下を補うために移植胚数を増加させるか，胚の凍結保存を行い，別の周期に移植するなどの対応が必要になると思われる．

稿を終えるにあたり，御校閲頂きました熊坂高弘教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究に終始直接の御指導を頂きました恩師正岡薫助教授に心から感謝致します．

本論文の要旨は第36回日本不妊学会総会 (1991,

名古屋) および第44回日本産科婦人科学会総会 (1992, 千葉) において発表した.

文　献

1) Stanger, J. D.: Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase, Br. J. Obstet. Gynecol., 92: 385, 1985
2) Lejeune, B., Degueldre, M., Camus, M., Vekemans, M.,Opsomer, L. and Leroy, F.: In vitro fertilization and embryo transfer as related to endogenous luteinizing hormone rise or human chorionic gonadotropin administration, Fertil. Steril., 45: 377, 1986
3) Dodds, W.G., Awadalla, S. G., Hixson, C., Roh, S. I., Friedman, C. I. and Kim, M. H.: Atypical luteinizing hormone rise and associated fertilization failure in nonmale factor in vitro fertilization patients, Obstet. Gynecol., 73: 191, 1989
4) Fleming, R. and Coutts, J. R. T.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression, Fertil. Steril., 45: 226, 1986
5) Palermo, R., Rosenwaks, Z., Amodeo, G., Cittadini, E. and Navot, D.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple follicles, Fertil. Steril., 49: 290, 1988
6) 谷　啓光，七里和良，平沢浩文，倉林　工，織田和哉，荒川　修，田中憲一：体外受精・胚移植におけるブセレリン併用の意義，日不妊会誌，36: 555, 1991
7) Schoolcraft, W., Huynh, D., Sinton, E., Hamilton, F., Schlenker, T. and Meldrum, D. R.: Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate, Fertil. Steril., 55: 563, 1991
8) Silverberg, K. M., Burns, W. N., Olive, D. L., Riehl, R. M. and Schenken, R. S.,: Serum progesterone levels predict success of IVF-ET in patients stimulated with leuprolide acetate and hMG, J. Clin. Endocrinol. Metab., 73: 797, 1991
9) 山野修司，春名　充，加川俊明，坂東律雄，東敬次郎，中山孝善，松下光彦，青野敏博：体外受精・胚移植における卵胞発育状態および内分泌動態の妊娠率に及ぼす影響について，日本受精着床学会雑誌，6:121, 1989
10) Mio, Y., Onohara, Y., Sekijima, A., Harada, T., Iwabe, T. and Terakawa, N.: Subtle rise in serum progesterone during the follicular phase as a predictor of the outcome of in vitro fertilization, Fertil. Steril., 58: 159, 1992
11) Gidley-Baird, A. A., O'Neill, C., Sinosich, M. J., Porter, R. N., Pike, I. L. and Saunders, D. M.: Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: the effects of altered progesterone/estrogen ratio in human and mice, Fertil. Steril., 45: 69, 1986
12) Forman, R., Belaisch-Allart, J., Fries, N.,Hazout, A., Testart, J. and Frydman, R.: Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation, Fertil. Steril., 49: 118, 1988
13) 小田高久，吉村慎一，河野八朗，原　利夫，原澄子，泉　康史，小作みき，松本千秋，大野虎之進，他：体外受精・胚移植において卵巣過剰刺激は着床障害の原因となるか，日本受精着床学会雑誌，6: 94, 1989

Relationship between hormonal environment and implantation rate during the controlled ovarian hyperstimulation with GnRH agonist and hMG in IVF-ET cycles

Akira Hoshiai

Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan

The relationship of serum estradiol (E_2) and progesterne (P) levels on the day of hCG administration to implantation rate was examined during 100 in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) cycles in 83 patients stimulated with GnRH agonist and hMG. Serum P levels≧1.0ng/ml (33 cycles) were associated with a significantly lower rate of implantation (4.9%) compared with<1.0ng/ml (67 cycles, 13.2%, P<0.005). Serum E_2 levels≧2,000pg/ml (54 cycles) were also associated with a significantly lower rate of implantation (5.4%) compared with<2,000pg/ml (46 cycles, 19.1%, P<0.005). A positive correlationship between serum E_2 and P levels on the day of hCG administration was noted in a total of 100 cycles (r=0.595, P<0.001). These results indicate that even a modest increase in P levels and excessive elevation of E_2 concentrations, respectively, have a deleterious influence on implantation and that such a rise in P levels appears to occur concomitantly with an excessive increase in E_2 under the lack of premature LH surge.

(受付：1992年9月10日特掲)
(受理：1992年9月16日特掲)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

配偶子卵管内移植 (GIFT) における妊娠成立に関与する諸因子の検討

Evaluation of the Factors Concerning the Achievement of Successful Pregnancy by Gamete Intrafallopian Transfer

獨協医科大学産科婦人科学教室
(主任:熊坂高弘教授)
北 澤 正 文
Masafumi KITAZAWA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine, Tochigi 321-02, Japan

配偶子卵管内移植 (GIFT) の妊娠成立に関与する因子を検索する目的で，GnRH agonist併用の74例74周期を対象とし，hCG投与日の血中progesterone (P) 値，精子所見，超音波断層法による子宮内膜厚と性状の3つのパラメーターについて検討した．

1) 血中P≧1.0 ng/mlの群ではP＜1.0ng/mlの群に比べ着床率 (GS数/移植卵数)，男性因子を除外した着床率，妊娠例における着床率すべてが有意に低かった．

2) 精子濃度20×10^6/ml以上の群と未満の群の間に妊娠率に有意差はなかったが，精子運動率40%以上の群が未満の群に比べ有意に妊娠率は高かった．運動精子濃度 5×10^6/ml未満の高度男性不妊群でも運動率40%以上であれば妊娠例がみられた．

3) 妊娠群と非妊娠群の子宮内膜厚は前者が厚い傾向にあったが有意差はなかった．リーフ状内膜を呈する頻度は前者が後者より有意に高かった．

以上からGIFTの妊娠成立には，hCG投与日の血中P＜1.0 ng/ml，精子運動率≧40%，子宮内膜がリーフ状を呈することの3つが重要な因子となることが判明した．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 45—52, 1993)

緒 言

Assisted reproductive technologyとして体外受精・胚移植 (IVF-ET) や胚偶子卵管内移植 (GIFT) は不妊症治療の2本柱となってきており，その妊娠率なども以前に比較すると飛躍的に向上してきている．しかし，本邦におけるGIFTでの妊娠率は平成2年度の全国集計の成績[1]で，採卵当たり26.6%と満足のいく結果は得られていない．各施設においてGIFTでの妊娠率向上のために様々な改良および検討が行われている．そこで今回，GIFTでの妊娠率向上を目的とし内分泌所見，精子所見，子宮内膜所見の3つの方向より比較検討した．すなわち，卵胞成熟期における血中エストラジオール (E_2) 値とプロゲステロン (P) 値の着床率への影響，精子濃度，精子運動率よりみた妊娠成立への限界，そして，hCG投与日の子宮内膜厚，子宮内膜の性状の着床への影響，以上の点について検討し，これらの問題点を解明しようと試みた．

対象と方法

獨協医科大学産婦人科不妊外来を受診した不妊患者で，GIFTを施行された74例74周期を対象とした．患者の平均年齢は32.6±4.1歳 (24～43歳)，平均不妊

期間は5.7±3.4年 (2 ～18年) であった．不妊原因としては子宮内膜症が33.8%でもっとも多く，次いで男性因子32.4%，原因不明27.0%の順であった．

卵胞刺激法は，前周期の黄体期中期 (高温相 5 ～ 7 日目) よりGnRH agonist (Buserelin：ヘキスト・ジャパン) 900～1200 μ g/dayを投与し，月経発来第 2 日目から 5 日目の間にhMG (Pergonal：帝国臓器) 150～300単位を連日筋注あるいは携帯用持続皮下注ポンプ (SP- 3：ニプロ社) にて投与した．hMG開始後 1 週間目より経腟的超音波診断装置 (ソノビスタ-CS MODEL MEU-1579：持田) を用いて卵胞発育のモニタリングを行い，平均卵胞径18mmを越えた時点で，尿中エストロジェン (hi-estrotec：持田)，頚管粘液検査および子宮内膜厚，リーフ状パターンの有無を参考としてhCG (HCG：持田) 10,000単位を投与した．子宮内膜像は子宮の矢状断面で観察し出来るだけ子宮内膜から頚管内膜まで連続して描出した．子宮内膜厚は，子宮内膜のもっとも肥厚した部位を測定した．リーフ状パターンについては，3 本の高輝度エコーの間にhypoechogenic areaのあるものをリーフ状パターン (+) とし，高輝度エコーが不明瞭で内膜全体のエコーがhyperechogenicなものをフリー状パターン (－) とした[2-5]．また，hCG投与日の血中LH，FSH，estradiol (E_2) progesterone (P) を測定し，以下の 6 群に分類した．

E_2値＜2,000pg/ml，P値＜1.0ng/mlをI群，E_2＜2,000pg/ml，P≧1.0ng/mlをⅡ群，2,000pg/ml≦E_2＜4000pg/ml，P＜1.0ng/mlをⅢ群，2,000pg/ml≦E_2＜4,000pg/ml，P≧1.0ng/mlをⅣ群，E_2≧4,000pg/ml，P＜1.0ng/mlをⅤ群．E_2≧4000pg/ml，P≧1.0ng/mlをⅥ群とした．

採卵は原則として 2 個以上の卵胞が発育した場合に行った．hCG投与後36時間で，全例，経腟的に採卵した．採卵に用いた経腟プローブは6MHz，視野角150°のTVプローブを使用し，17G 35cmのPTC針 (八光) でガイドラインに沿って卵胞を穿刺採卵した．卵胞洗浄液はD-PBS (GIBCO社) を使用し，成熟卵子は37℃，CO_2 5 %，O_2 5 %，N_2 90%の環境下で 4 ～ 6 時間，前培養された．培養液は10%の非動化患者血清を加えたHTF (IRVINE SCIENTIFIC社) を使用した．

精液は用手的に採取し，室温30分間，静置した．充分液化した精液はマクラー精子計算盤で精子濃度，精子運動率が計算され，それらの所見からⅠ～Ⅵの 6 群に分類した．

精子濃度 (C) ＜20×10^6/mlかつ精子運動率 (M) ＜40%をⅠ群，C＜20×10^6/ml，M≧40%をⅡ群，20×10^6/ml≦C＜40×10^6ml，M＜40%をⅢ群，20×10^6/ml≦C＜40×10^6/ml，M≧40%をⅣ群，C≧40×10^6/ml，M＜40%をⅤ群，C≧40×10^6/ml，M≧40%をⅥとした．精子の調整は10%非動化患者血清を加えたHTFを使用し，2 回遠沈洗浄後swim up法にて良好運動精子を回収した．最終運動精子濃度は10×10^6/mlとした．しかし，最終運動精子濃度が 3 ×10^6/ml未満の場合には，さらに濃縮を加えた．

GIFTは全身麻酔，腹腔鏡下にモニターTVを見ながら行った．配偶子の卵管内への移植には独自に設計したGIFT用カテーテル (八光) を使用し，精子 (20×10^4) および卵 2 ～ 3 個含む培養液30～40 μ lを卵管内約 2 ～ 4 cmの部位に注入した．注入後カテーテルを静かに抜去し，カテーテル内に残存卵子のないことを確認した．

黄体機能の維持は，卵巣過剰刺激症状に十分留意し，hCG 1500単位あるいは3000単位を 3 日毎に投与した．また，経口的にゲスターゲン (Duphaston) 20 mgを14日間併用投与した．

採卵後16日目以降に血中および尿中hCGを測定し妊娠の診断を行った．

採血された血中LH，FSH，E_2は，第一ラジオアイソトープ研究社のRIA kitを使用し測定した．各キットのCVはintrassay 1.0～4.4%interassay 1.6～5.2%であった．Pは日本DPC社RIA kitにて測定し，キットのCVはintrassay 6.6～8.3%，interassay 8.6～9.6%，測定感度は0.2ng/mlであった．

各群の平均値の有意差検定にはstudent's t-test，百分率の検定には χ^2検定 (Yatesの補正を使用) を用いた．

結　果

1．hCG投与日の血中E_2値，P値と妊娠率との関係

図 1 にhCG投与日の血中E_2値とP値を症例ごとにプロットした．E_2とPの間には相関係数r＝0.58と有意な相関性が得られた (P＜0.005)．これらの血中E_2値P値をもとに方法で示したようにⅠ群からⅥ群に分類した (図 2)．血中P値1.0 ng/mlを境界としてみた場合，血中P値1.0 ng/ml以上の偶数群 (Ⅱ群Ⅳ群Ⅵ群) に比較し，血中P値1.0 ng/ml未満の奇数群 (Ⅰ群Ⅲ群Ⅴ群) に68.9%と多数の症例が含まれていた．Ⅰ群からⅥにおける平均採卵後，平均移植卵数を表 1 に示した．Ⅰ群からⅥ群全体での採卵数の平均は，9.7±6.0個であった．各群での平均採卵数をみた場合，Ⅰ群に対しⅢ群からⅥ群で有意に高い値を示し，平均

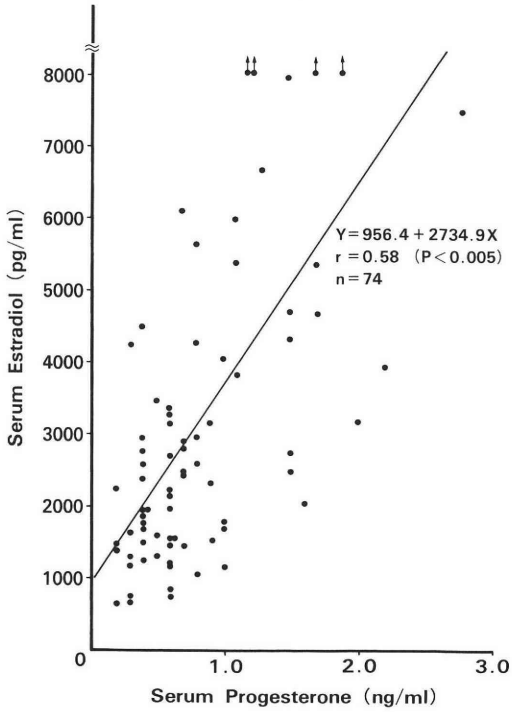


図 1　hCG投与日における血中E_2値とP値の相関性

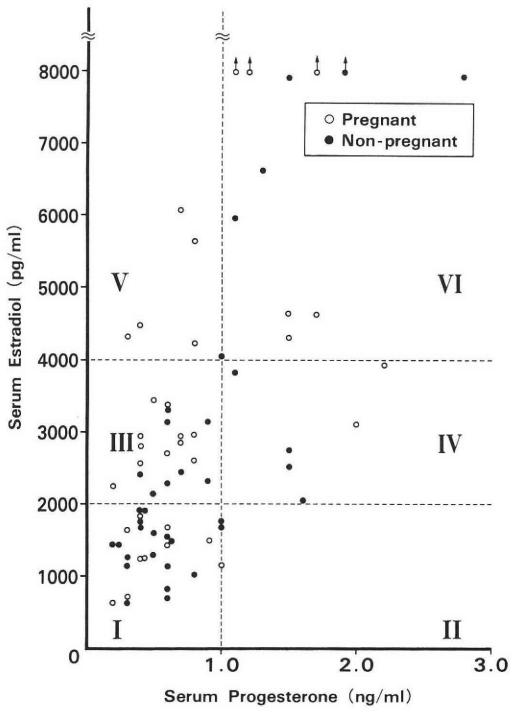


図 2　hCG投与日の血中E_2，P値による分類 (Ⅰ～Ⅵ群) とGIFTの成績

表 1　各群における平均採卵数，平均移植卵数

Group	周期数	平均採卵数	平均移植卵数
Ⅰ	27	6.0±2.6	5.1±1.9
Ⅱ	3	3.7±3.8	3.0±2.7
Ⅲ	19	10.6±5.4**	6.9±1.9**
Ⅳ	6	9.5±5.1*	6.2±2.5
Ⅴ	5	14.4±3.8**	6.8±1.8
Ⅵ	14	15.0±7.3**	8.4±1.7**
Total	74	9.7±6.0	6.3±2.3

*P<0.025, **P<0.005 vs Group Ⅰ

表 2　各群における妊娠率，多胎妊娠率，流産率，外妊率

Group	妊娠数 (%)	多胎妊娠数 (%)	流産数 (%)	外妊数 (%)
Ⅰ	10 (37.0)	6 (60.0)	1 (10.0)	0
Ⅱ	1 (33.3)	0 (0)	0 (0)	0
Ⅲ	11 (57.9)	5 (45.5)	2 (18.2)	0
Ⅳ	2 (33.3)	1 (50.0)	0 (0)	0
Ⅴ	5 (100.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	0
Ⅵ	7 (50.0)	2 (28.6)	2 (28.6)	2 (28.6)
Total	36 (48.6)	17 (47.2)	6 (16.7)	2 (5.6)

移植卵数でもⅠ群に対しⅢ群とⅥ有意に高い値を示した．次に各群における妊娠率，多胎妊娠率，流産率，外妊率を表2に示した．全体での妊娠率は74例74周期で36例の妊娠があり48.6%であった．多胎妊娠率は47.2%と高率で，流産率は16.7%であった．妊娠率にはⅠ群からⅥ群での各群間には特に有意差を認めなかった．さらに各群における移植卵数が異なるため着床率という点に着目し，各群におけるそれぞれの着床率について検討してみた (表3)．36例の妊娠例の総ての胎嚢(GS)数を総移植卵数で除した着床率では，全体で11.8%であり，男性因子を除外した着床率では13.9%，妊娠例での着床率では23.5%であった．各群間でのそれぞれの着床率では，Ⅴ群がⅥ群に対し3つの着床率総てが有意に高かった．Ⅳ群とⅥ群の着床率は他の群に比べ低かった．次に，それぞれの着床率を血中P値1.0ng/ml未満の群と

表 3　各群における着床率，男性因子を除外した着床率，妊娠例での着床率

Group	症例数	着床率[1)] (%)	男性因子を除外[2)] した着床率(%)	妊娠例での[3)] 着床率(%)
Ⅰ	27	14.5	20.9	35.7
Ⅱ	3	11.1	33.3	50.0
Ⅲ	19	12.9	12.0	24.6
Ⅳ	6	8.1	8.1	16.7
Ⅴ	5	23.5***	26.9**	23.5*
Ⅵ	14	5.1	7.1	10.9
Total	74	11.8	13.9	23.5

*P＜0.005，**P＜0.025，***P＜0.01 vs Group Ⅵ
[1)]GS数/移植卵数，
[2)]男性因子を除外したGS数/移植卵数，
[3)]GS数/妊娠例の移植卵数

表 4　hCG投与日の血中P値と着床率，男性因子を除外した着床率，妊娠例での着床率との関係

P値	(周期数)	着床率 (%)	男性因子を除外した着床率 (%)	妊娠例での着床率 (%)
P＜1.0	(n=51)	14.8*	16.0*	28.3*
1.0≦P	(n=23)	6.1	7.5	13.3

*P＜0.025 VS P≧1.0群

1.0ng/ml以上の群，すなわち奇数群と偶数群とで比較検討してみた (表 4)．この結果，奇数群 (P値＜1.0ng/ml) に対し偶数群 (P値≧1.0ng/ml) は総ての着床率において有意に低い値を示した．

2．精子所見と妊娠率との関係

全症例の精子濃度と精子運動率との関係を図 3 に示した．精子運動率40%未満のⅠ群，Ⅲ群，Ⅴ群での妊娠率は 1 例のみであり，さらに精子運動率40%未満で，かつ精子濃度20×10⁶/ml未満のⅠ群では全く妊娠例を認めなかった．これらをまとめたものを表 5 に示した．精子濃度だけでみた場合，20×10⁶/ml未満の群と20×10⁶/ml以上の群との比較では妊娠率に有意差を認めなかった．しかし，精子運動率でみた場合では，40%以上の群が40%未満の群に対し有意に妊娠率が高かった．次に運動精子濃度と精子運動率との関係を図 4 に示した．運動精子濃度 5×10⁶/ml未満の領域と精子運動率40%未満の領域では妊娠例がそれぞれ 1 例ずつで，これらの交叉する領域には全く妊娠例を認めず，絶対不良域と考えることができた．また，GIFTで妊娠可能かどうかを検討する基準として運動精子濃度と精子運動率を比較し

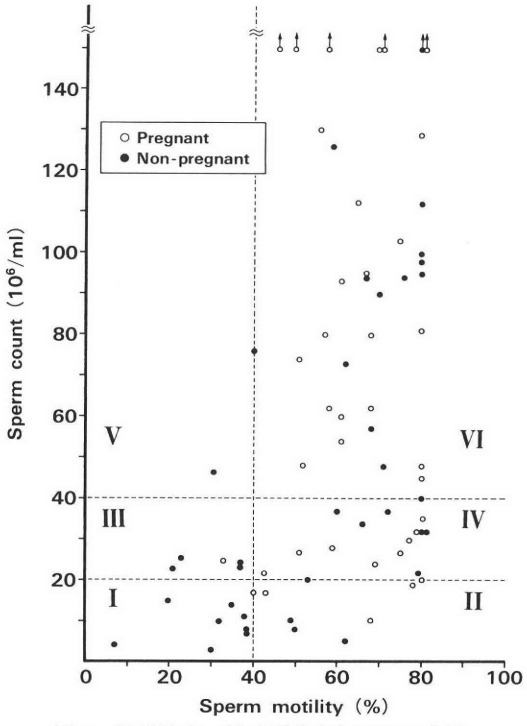


図 3　精子濃度，精子運動率とGIFTの成績

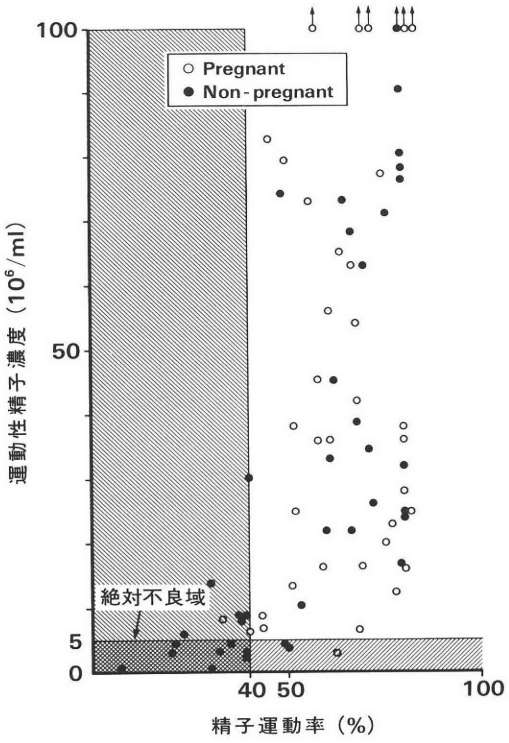


図4　運動精子濃度 5 ×10^6/ml，精子運動率40%を境界値とした場合の妊娠例および非妊娠例

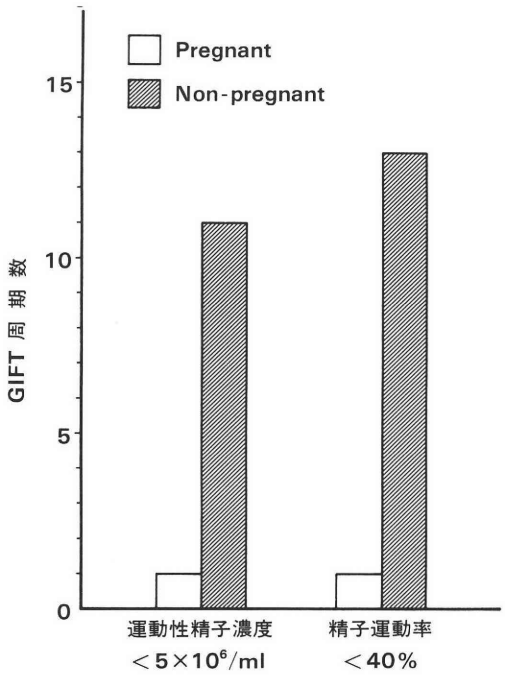


図5　運動精子濃度＜ 5 ×10^6/mlの群と精子運動率＜40%の群における妊娠例および非妊娠例

表5　精子所見と妊娠率との関係

		周期数 (%)	妊娠数 (%)	χ^2-test
精子濃度 (10^6/ml)	20 ≦ C	59 (79.3)	31 (52.5)	NS
	20 ＞ C	15 (20.3)	5 (33.3)	
精子運動率 (%)	40 ≦ M	59 (79.7)	34 (57.5)	P<0.01
	40 ＞ M	15 (20.3)	2 (15.4)	

てみた(図5)．それぞれ5×10^6/ml未満，40%未満でのGIFT周期数における妊娠数，非妊娠数をみた場合，精子運動率40%未満とした場合の方が2周期多くの非妊娠数を含んでおり，運動精子濃度に比べ精子運動率でみたほうが有利と考えられた．

3．子宮内膜所見と妊娠率との関係

表6に妊娠群と非妊娠群とにおける子宮内膜厚，リーフ状パターンの頻度を示した．子宮内膜厚に関しては，それぞれ11.6±2.9mm，10.8±3.8mmであり，妊娠群が厚い傾向を示したが有意差を認めなかった．しかし，リーフ状パターンの出現率は妊娠群で有意に高かった．

考　察

表 6　妊娠群と非妊娠群における子宮内膜厚とリーフ状内膜の頻度

	(周期数)	子宮内膜厚 (mm)	リーフ状
妊 娠 群	(n=36)	11.6±2.9	76.5%*
非妊娠群	(n=38)	10.8±3.8	52.2%

*P＜0.05 VS 非妊娠群

GIFT (Gamete Intra-fallopian Transfer) はAshら[2]が最初に報告した難治性不妊症の治療法であるが，IVF-ETと比べると施行頻度はかなり低い．この理由は全身麻酔下に腹腔鏡を使用して行うのが普通であるため，比較的繁雑な作業となり敬遠されがちになるためであろう．その成績を見ると1990年度の米国での集計[7]では妊娠率29%，本邦での全国集計[1]では26.6%であり，当科での48.6%という妊娠率は一応満足すべきものと思われる．

GnRHaとhMGの併用による卵胞刺激法は従来のhMG単独またはClomidとhMGの併用による刺激法に比べ，1) 成熟卵が多数採取できる[8]，2) premature LH surgeを防止できる[9, 10]，3) 卵巣の反応性不良例に対して反応を改善する[11]などの利点があり，GIFTのみならずIVF-ETでも今や主流となっている．しかし，GnRHaの併用下に下垂体のdesensitizationが起こっているのにもかかわらず，hCG投与日に軽度なP値の上昇 (≧1.0ng/ml) を来す症例が存在し，このような例ではIVF-ETの妊娠率が極端に低下したり，流産しやすいことが最近報告[12, 13]され注目を集めている．

今回の検討ではhCG投与日に血中P値≧1.0ng/mlの例が31.1%みられた．またこのP値はhCG投与日の血中E_2値と正の相関を示した．そこで対象周期をE_2とP値により 6 群に分類してみると，各群の採卵数はE_2が高値となるほど増加し，それにつれて移植卵数も増加した．妊娠率は各群間に有意差はなかったが，これだけでGIFTにおける妊娠率とE_2，P値との関係を評価するのは移植卵数に違いがあるため危険である．そこで着床率 (着床数/移植卵数) に注目し，移植卵 1 個あたりの妊娠率をみてみたところ，P値上昇群のⅣ群，Ⅵ群で着床率が低いことが判明した．これは男性因子の症例を除外した着床率でも，また妊娠例における着床率においても同じ傾向がみられた．そこでさらにP値上昇群と非上昇群に大別して検討したところ，P上昇群では有意に着床率が低いことが判明した．GIFTではIVF-ETと異なり，受精したか否かはblack boxの状態である．それにもかかわらずPの上昇は移植卵 1 個あたりの妊娠率 (着床率) を低下させた．これはIVF-ETにおけるpremature luteinizationは妊娠率を低下させるという知見[12, 13]と本質的に矛盾していない．言い換えれば，P上昇群のⅣ群，Ⅵ群では着床率の低下が移植卵数増加によって補われた結果，周期あたりの妊娠率は低下しなかったと解釈できる．

GIFTの大きな利点として男性不妊症に対して大きな効力をもっていることがあげられる．洗浄濃縮精子によるAIHでも妊娠しない症例において，直接卵と精子をcontactさせ生理的受精の場である卵管膨大部へ注入するわけであるから，成功率が高いのも理論的にみて納得できるところである．今回の検討では正常精液をWHOの基準[14]である精液量2.0ml以上，精子濃度20×10^6/ml以上，運動率50%以上のものとし，このうち 1 つでも異常のものは男性因子とした．対象例の32.4%が男性因子を有しており，そのうち29.2%が妊娠した．精子所見と妊娠率との関係を検討してみると，精子濃度20×10^6/ml以上と未満の間に有意差はなかった．運動率50%以上と未満の間にも有意差はなく，40%以上と未満の間に初めて有意差がみられた．図 3 から分かるように運動率40%未満の14例では精子濃度にかかわらず，1 例しか妊娠していない．一方，40%以上の例では精子濃度 5×10^6/mlの症例が妊娠に至っている．このように運動精子濃度 5×10^6/ml以下の重症男性不妊例でも，精子運動率が40%以上だと妊娠例がでている．以上のごとくGIFTで妊娠し得るには精子濃度でなく，精子運動率が重要なfactorであり，40%以上であることが妊娠の成否判定の基準であると考えられる．たしかに精子濃度は遠沈濃縮により，ある程度補えるであろうが，精子運動率の低下は補いようがなく，基本的には精子のqualityを表していると思われる．

卵胞期後期の子宮内膜の超音波像と妊娠成立との間に密接な関連のあることが知られている[2-5]．今回の結果では妊娠群で子宮内膜のリーフ状パターンを示す頻度が有意に高かった．また，子宮内膜厚もやや厚い傾向を示した．Gonenら[4]や佐久本ら[5]はIVF-ET周期の妊娠例の子宮内膜は非妊娠例に比べ有意に厚く，リーフ状内膜を呈する頻度も有意に高いことを報告している．一方，Welkerら[3]はリーフ状内膜を呈する例に妊娠例が多く，内膜厚は関連性がないとしている．リーフ状内膜は黄体期に入ると速やかに消失する．

GIFTやIVF-ETのように過排卵刺激周期では血中

がE_2が高値となり，子宮内膜のP receptorの感受性が亢進することが十分考えられる．そこに前述したようなpremature luteinizationが起こること，微量なPの上昇に対して反応し，内膜のリーフ状パターンが消失するのではないかと考えられる．事実，Marchiniら[15]は過排卵周期の増殖期末期の子宮内膜の生検から，著名な早期分泌現象が生じていると報告している．

今回，GIFT妊娠の成否判定のパラメーターとして，内分泌的解析，精子所見，子宮内膜像の3つの方向からアプローチを行った．この結果，1) hCG投与日の血中P値＜1.0ng/ml，2) 精子運動率≧40%，3) 子宮内膜のリーフ状パターンの3つがGIFTの成否を左右する重要な因子であることが明らかとなった．

稿を終えるにあたり，御校閲頂きました熊坂高弘教授に深甚なる謝意を表します．

また，本研究に終始直接の御指導を頂きました正岡薫助教授に心から感謝致します．

本論文の要旨は第36回日本不妊学会総会 (1991，名古屋) および第44回日本産科婦人科学会総会 (1992，千葉) において発表した．

文　献

1) 日本産婦人科学会理事会内委員会：平成3年度，生殖医学の登録に関する委員会報告 (第3報) (平成2年度分の臨床実施成績，平成元年度分の治療による出生児の追加調査成績)，日産婦誌，44 (4): 499, 1992
2) Glissant, A., Mouzon, J. D., Frydman, R.: Ultrasound study of the endometrium during in vitro fertilization cycles, Fertil. Steril., 44: 786, 1985
3) Welker, B. B., Gembruch, U., Diedrich, K., Al-Hasani, S., Krebs, D.: Transvaginal sonography of the endometrium during ovum pickup in stimulated cycles for in vitro fertilization, J. Ultrasound Med., 8: 549, 1989
4) Gonen, Y. and Casper, R. F.: Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF), J. vitro Fert. Embryo Transfer, 7: 146, 1990
5) 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　正弘，中山道男：IVF-ETにおける子宮内膜の超音波所見の検討，日本受精着床会誌，8: 289, 1991
6) Asch, R. H., Ellsworth, L. R., Balmaceda, J. P., Wong, P. C.: Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer, Lancet, 2: 1034, 1984
7) Medical Research International, The American Fertility Society Special Interest Group: In vitro fertilization/embryo transfer in the United States, 1990 results from IVF-ET Registry, Fertil. Steril., 57: 15,1992
8) Fleming, R. and Coutts, J. R. T.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression, Fertil. Steril., 45: 226, 1986
9) Palermo, R., Rosenwaks, Z., Amodeo, G., Cittadini, E. and Narot, D.: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of mutiple follicles, Fertil. Steril., 49: 290, 1988
10) 谷　啓光，七里和良，平沢浩文，倉林　工，織田和哉，荒川　修，田中憲一：体外受精・胚移植におけるブセレリン併用の意義，日不妊会誌，36: 555, 1991
11) Neveu, S., Arnal, F., Hedon, B., Humeau, C., Bringer, J., Cristol, P., Chinchole, J. -M. and Viala, J. -L.: Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization, Fertil. Steril., 47: 639, 1987
12) Schoolcraft, W., Huynh, D., Sinton, E., Hamilton, F., Schlenker, T., Meldrum, D.: Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate, Fertil. Steril., 55: 563, 1991
13) Silverberg, K. M., Burns, W. N., Olve, D. L., Riehl, R. M., Schenken, R. S.: Serum Progesterone levels predict success of in vitro fertilization/embryo transfer in patients stimulated with leuprolide acetate and human menopausal gonadotropin, J. Clin. Endocrinol Metab., 73: 797, 1991
14) World Health Organization: World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 27, Cambridge University Press, Cambridge, 1987
15) Marchini, M., Losa, G. A., Fedele, L., Ghisletta, M., Bianchi, S., Candiani, G. B.: Secretory changes in preovulatory endometrium during controlled ovarian hyperstimulation with buserelin acetate and human gonadotropins, Fertil. Steril., 55: 717, 1991

Evaluation of the factors concerning the achievement of successful pregnancy by gamete intrafallopian transfer

Masafumi Kitazawa

Department of Obstetrics and Gynecology,
Dokkyo University School of Medicine,
Tochigi 321-02, Japan

To evaluate the factors concerning the achievement of successful pregnancy by gamete intrafallopian transfer (GIFT), we investigated three parameters, including serum progesterone (P) levels and the endometrial status on the day hCG administration in 74 patients during 74 superovulation cycles with GnRH agonist/hMG, and the semen profiles used in GIFT. Serum P levels ≧ 1.0ng/ml (23cycles) were associated with significantly lower implantation rates (6.1%, No. of gestational sacs per eggs transferred), compared with＜1.0ng/ml (51cycles. 14.8%, P＜0.025). A leaf-like texture of the endmetrium was significantly more often observed using transvaginal sonography in cycles with conception (76.5%) than without conception (52.2%, P＜0.05).

The sperm motility≧40% was associated with a significantly higher pregnancy rate (57.5%) compared with<40% (15.4%, P＜0.01).

No such relationship was found between the sperm count＜20×10^6ng/ml and≧20×10^6ng/ml.

These results indicate that serum level of P less than 1.0ng/ml, a leaflike texture of the endmetrium and the sperm motility of 40% or more are good indicators of the likelihood of achieving pregnancy in GIFT.

(受付：1992年 9 月10日特掲)
(受理：1992年 9 月16日特掲)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第 1 号 1993

体外受精に関する培養液と微小環境培養法の基礎的・臨床的研究

Basic Clinical Study of Medium and Microenviromental Incubation for In Vitro Fertilization-Embryo Transfer

福島県立医科大学産科婦人科学講座
（主任：佐藤章教授）
藤森　淑
Shuku FUJIMORI
Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan

体外受精・胚移植の妊娠率を向上させるために体外環境改善を目的とした培養液の検討，及び男性不妊症の少ない精子での受精を目的とした微小環境培養法についての検討を行い，実際に体外受精に応用した．ICR系雌マウスより前核期胚を採取しCZB及びmBWWで培養し胚盤胞発育率を比較した．ヒト羊水での培養も試みた．CZBで培養した場合，胚盤胞発育率はmBWWより有意に高率だった．glucose非存在下でも初期胚は十分に発育した．ヒト羊水は培養液に適さないと思われた．次に透明帯除去ハムスター卵を用い微小環境培養法（ベニューラ注射針外筒）と従来法（ペトリ皿）でハムスターテストを行って比較検討した．微小環境培養法での精子侵入率・平均侵入精子数は従来法に比べ高率であった．こらの結果をもとにCZB，微小環境培養法をヒト体外受精に応用したが，どちらにおいても従来までの方法に劣らぬ良好な結果を得ることができた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 53—60, 1993)

緒　言

近年，体外受精・胚移植 (In Vitro Fertilization-Embryo Transfer，以下IVF-ETと略す) は飛躍的に普及し，重症不妊症の治療法として定着しつつある．しかし妊娠分娩に至る率は10～20%で，その成功率は必ずしも満足できるものではない．現行のIVF-ETにおいて妊娠率の低い理由としては胚移植後の低着床率と男性不妊症精子での低受精率があげられている．そのうち低着床率の原因としてin vitroでの培養環境の不良等が考えられている．現在，ヒトの胚を移植する際には2～4細胞期の場合が最も成績が良いとされている．培養条件の進歩に伴い，胚盤胞期 (blastocyst stage) まで発育させた胚を移植して妊娠分娩にまで至ったという報告もある[1]が，その成績は良好ではない．若い時期の胚ほど着床率が高いことは培養が長時間になればなるほど胚のqualityに問題が生じてくることを示唆し，現行の培養条件に改良の余地のあることを示している．著者はマウス胚等の体外培養時にみられる現象として，胚の発育が何らかの原因で2細胞期で停止してしまう，いわゆる2 cell-blockを解除できれば，それがヒト胚の培養条件向上につながると考え，glucoseを含まずglutamineとEthylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) が加えられたCZB培養液[2～4]のマウス初期胚発育に与える効果を検討した．さらに自然が作り出した培養液としてのヒト羊水に着目し，その有用性をマウス前核期胚を培養することにより検討した．

また，IVF-ETの適応に男性不妊症が加えられたのは，in vitroでの受精に必要とされる精子数がin vivoに比べ極めて少なくてすむからである．しかし実際には，重症乏精子症や重症精子無力症におけるIVF-ETの成績は極めて不良と言わざるを得ない．こられの症例では受精能を有していると思われる精子が思

うように回収できないためで，その対策として顕微授精法 (microinsemination) などの研究も進められている．著者は精子の絶対数が少ない場合でも十分な精子濃度が得られる微小環境による培養法を開発し，ハムスターテストでその有用性を検討した．さらにこれら基礎的研究で得られた成果を実際にヒトIVF-ETにも応用し，良好な成績が得られたので報告する．

実験材料および方法

実験 1. CZB培養液によるマウス前核期胚培養

(1) 前核期胚の準備

4 ～ 8 週齢のICR系幼若雌マウスを使用し，pregnant mare's serum (PMS) 8 international units (i. u.) を腹腔に投与，その48時間後にhuman chorionic gonadotropin (hCG) 8 i. u. を腹腔内に投与して過排卵処理し同系雄マウスと交配させ，hCG投与18時間後に開復し卵管内より前核期胚を回収した．これを0.1% hyaluronidaseを含む培養液で 5 ～10分間処理して卵丘細胞を分散除去した．2 回洗浄した後実験に供した．

(2) 培養液の準備

使用したCZB液の組成は表 1 に示す通りである．培養液用蒸留水はSIGMA社製組織培養用蒸留水 (Water, Tissue Culture W-3500) を用い，培養液は実験前日に作成して37℃，5%CO_2大気中に静置した．対照としてはmodified Biggers, Whitten and Whittingham's medium (mBWW) 液を使用した．

(3) 胚の培養

回収した前核期胚を 4 群に分け，CZB，Day 1からDay 2 をCZBそしてCZBでDay 3 にglucoseを加えた培養液，mBWW，mBWWにEDTAを加えた 4 種類の培養液の中で37℃，5%CO_2大気中で培養を行い，24時間毎に胚の形態を観察した．

実験 2. ヒト羊水によるマウス前核期胚培養

(1) 前核期胚の準備

実験 1 の前核期胚の準備と同様に行った．

(2) 羊水の準備

染色体検査を目的とした羊水穿刺の際得られた14から19週の計17例のヒト羊水を用いた．羊水を1000回転で10分間遠心し染色体検査用の細胞成分を除去した上清を使用した．組成を検査し，残りを56℃ 30分で非働化した後 4℃で保存し 3 日以内に実験に供した．

(3) 胚の培養

マウス前核期胚を 2 群に分け，ヒト羊水とCZB (対照) で培養した．

実験 3. 微小環境培養法によるハムスターテスト

(1) 卵の準備

体重90～150gの成熟雌ゴールデンハムスターを使用し，性周期第 1 日目にPMS 30 i. u., 第 3 日目にhCG 30 i. u. を腹腔に注射して過排卵を起こさせ，hCG投与17時間後に開腹し，卵管内より未受精卵を回収した．これを0.1% hyaluronidaseを含むmBWWで15分間処理して卵丘細胞を分散除去し，2 回洗浄した．次に0.1% trypsinを含むmBWWで 3 分間処理して透明帯を完全に溶解除去し，mBWWで 3 回洗浄して透明帯除去ハムスター卵を作成した[5]．

(2) 精子の準備

精液は健康成人男性から用手法により得た．20分間室温に静置して十分に液化させた後，試験管内の45%Percoll上に静かに置き，2500回転20分間遠心し，精漿成分を取り除いた．0.3% human serum albumin (HSA) を含むmBWW内でswim upを行い，運動良好精子を回収した．回収後はmBWW (HSA 3.5% 含) 中 3 ～ 4 時間前培養を行った．

(3) 培養

培養器としてテフロン製のベニューラ注射針外筒 (図 1) を使用した (微小環境培養法)．透明帯除去ハムスター卵を含むmBww (HSA 3.5%含) をベニューラ

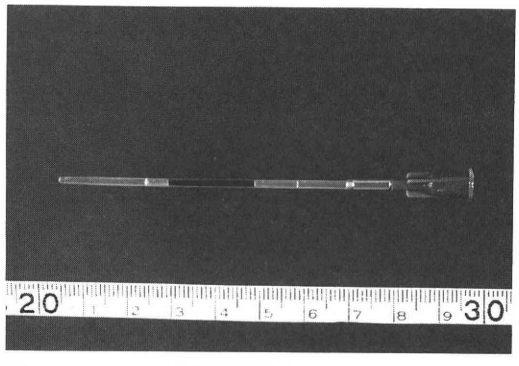


図 1　ベニューラ注射針外筒を用いた微小環境培養法

注射針外筒中に吸引し，次いで 3 ～ 4 時間前培養した精子をほぼ同量吸引し全培養液量を0.01～0.02mlとした．両端をミネラルオイルで封入し，37℃，5%CO_2大気中で 3 ～ 4 時間培養した (図 2)．

対照はペトリ皿を用いた従来の方法 (従来法) で行った．0.3mlのmBWW (HSA 3.5%含) を3.5×10cmのペトリ皿内に入れ，その上をミネラルオイルで覆い，培養液内に透明帯除去ハムスター卵と前培養した精子を加えて培養を行った．培養後，位相差顕微

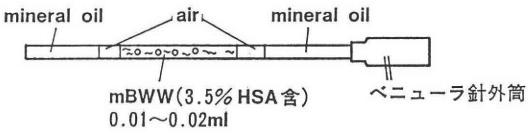


図2　ベニューラ注射針外筒を用いた微小環境培養法

表1　各培養液の組成

Medium	CZB (mM)	mBWW (mM)	HTF (mM)
NaCl	81.62	84.00	101.60
KCl	4.83	4.78	4.69
KH_2PO_4	1.18	1.19	0.20
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.18	1.19	0.37
$NaHCO_3$	25.12	35.71	25.00
$CaCl_2$	1.70	1.71	2.04
Na-lactate	31.30	21.58	21.40
Na-pyruvate	0.27	0.25	0.33
Glutamine	1.00	—	—
EDTA	0.11	—	—
BSA(mg/ml)	5.00	5.00	—
Penicillin G(U/ml)	100.00	100.00	100.00
Glucose	—	5.56	2.78

鏡下に観察して精子侵入の有無を検査した．検鏡時に卵細胞質内が不透明で暗く，種々の顆粒が混在し，細胞外側縁が不明瞭なものは変性卵と記録した．

臨床応用1. ヒトIVF-ETへのCZBの応用

患者の同意を得た上でヒトIVF-ETの培養液としてCZBを使用した．媒精後24時間はglucoseの含まれたHTF (human tubal fluid)[6] (表1) で培養し，受精確認後CZBに移し培養を続け分割状態を確認した．対照はそのままHTFで培養を行った．培養は37℃，5% CO_2大気中で行った．

臨床応用2. ヒトIVF-ETへの微小環境培養法の応用

実験3と同様にベニューラ注射針外筒を用いてヒトIVFを行った．受精後の培養は従来通りペトリ皿を使用した．対照は全過程をペトリ皿内で行い，培養液は両者ともHTFを使用した．

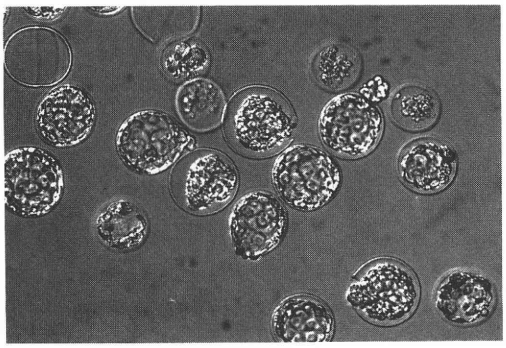


図3　HCG投与114時間後のCZBで培養したマウス胚盤胞 (blastocyst)

表2　hCG投与114時間後のマウス初期胚発育状態 (CZB)

Medium	No of Experiment	No of Embryos	Abnormal (%)	2cell (%)	3-8cell (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
CZB	10	131	31 (23.7)	1 (0.8)	5 (3.8)	25 (19.1)	69 (52.7)
CZB +Glucose (Day3に添加)	12	318	79 (24.8)	14 (4.4)	27 (8.5)	52 (16.3)	146 (45.9)
mBWW	11	157	78 (49.7)	38 (24.2)	14 (8.9)	20 (12.7)	7 (4.5)
mBWW +EDTA	11	120	80 (66.7)	20 (16.7)	16 (13.3)	3 (2.5)	1 (0.8)

＊：χ^2testP<0.01

＊＊：NS

統計学的処理

各実験の結果はχ^2検定を用い，$p<0.05$が得られた場合有意差ありとした．

表 3　ヒト羊水の組成

Na	134 ～ 137	mEq/L
K	3.6 ～ 4.0	mEq/L
Cl	107 ～ 116	mEq/L
Ca	3.4 ～ 4.3	mEq/L
P	2.0 ～ 4.4	mg/dl
Mg	1.3 ～ 1.7	mEq/L
Lactate	7.7 ～ 12.7	mmol/L
TP	感度以下 ～ 0.5	g/dl
ALB	感度以下 ～ 0.4	g/dl
TB	0.4 ～ 2.4	mg/dl
UN	9 ～ 16	mg/dl
Crea	0.4 ～ 0.8	mg/dl
Glu	37 ～ 69	mg/dl
浸透圧	267 ～ 272	mOsm/L
PH	7.50 ～ 7.79	
比重	1.012 ～ 1.014	

（17例）

結　果

実験 1. CZB培養液によるマウス前核期胚培養

hCG投与114時間後の胚発育状態を表 2 に示した．CZBではhCG投与114時間後の胚盤胞 (blastocyst) 発育率は52.7% (69/131) でDay3にglucoseを添加した場合の45.9% (146/318) と比べても有意な差をみなかった (図 3)．対照として用いたmBWWの場合の胚盤胞発育率は4.5% (7/157)，mBWWにEDTAを添加した場合でも0.8% (1/120) でありhCG投与114時間後の胚盤胞発育率はCZBの方が有意に高率 ($p<0.01$) であった．

実験 2. ヒト羊水によるマウス前核期胚培養

分析された羊水の組成は表 3 に示した．

Na, K, P, Mg, UN, Creatinineはヒト血清中の値とほぼ同じであり，Caはやや低値，Clはやや高値であった．また，Total BilirubinとGlucoseは血中の約 2 分の 1，Tatal ProteinとAlbuminは約10分の 1 だった．pHは7.50～7.79とアルカリ性に傾いていた．

このヒト羊水を培養液として用いてマウス前核期胚培養を培養した時，hCG投与114時間後の胚盤胞発育率は0.7% (1/151) でCZB (対照) の44.4%と比較して有意に低率 ($p<0.01$) であった (表 4)．使用した羊水の週数による胚盤胞発育率の差はみられなかった．

実験 3. 微小環境培養法によるハムスターテスト

表 4　hCG投与114時間後のマウス初期胚発育状態 (ヒト羊水)

Medium	No of Experiment	No of Embryos	Abnormal (%)	2cell (%)	3-8cell (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
ヒト羊水	5	151	119 (78.8)	7 (4.6)	19 (12.6)	5 (3.3)	1 (0.7)
control (CZB)	5	153	38 (24.8)	6 (3.9)	15 (9.8)	26 (17.0)	68 (44.4)

＊: χ^2 test $P<0.01$

表 5 微小環境培養法および従来法によるハムスター卵へのヒト精子侵入

	培養器	培養液量 (ml)	実験に用いた卵総数	精子侵入の認められた卵数 (%)	平均侵入精子数
微小環境培養法	ベニューラ針外筒	0.01～0.02	213	191 (89.7)＊	3.36
従来法	ペトリ皿	0.3	217	161 (74.2)	2.58

最終精子温度　$1\sim3\times10^7$

＊$P<0.001$

培養の前後でベニューラ針内の培養液量およびpHには変化を認めなかった．従来のペトリ皿を用いたハムスターテスト(従来法)に比べ，15～30分の1の精子数で十分な精子濃度を得ることが可能であった．ハムスターテストの成績はベニューラ注射針外筒を用いた微小環境培養法の場合，213個の卵のうち191個に精子侵入が認められ，精子侵入率は89.7%，平均精子侵入数は3.36であった．ペトリ皿を用いた従来法では217個の卵で，精子侵入率は74.2%，平均精子侵入数は2.58であった．平均精子侵入数は微小環境培養法で有意に増加($p<0.001$)していた(表5)．

臨床応用1. ヒトIVF-ETへのCZBの応用

7症例の計22個の受精卵をCZBで培養した．分割率は77% (17/22) であり，これはHTFで培養した場合の分割率81% (21/26) と有意差はなかった (表6)．

表6　CZBを用いたヒトIVF-ETの成績

培養液	症例数	卵数	分割卵数（%）	
CZB	7	22	17(77)	N.S.
HTF	7	26	21(81)	

臨床応用2. ヒトIVF-ETへの微小環境培養法の応用

ペトリ皿を用いた従来法によるIVF-ETに比較して，精子の絶対数は50～100分の1で十分であった．微小環境培養法に応用した13個の卵のうち受精した卵は5個で受精率は38%であった．対照の受精率は37% (6/16) であり，両者間に有意差は認めなかった (表7)．

表7　微小環境培養法を用いたヒトIVF-ETの成績

培養法	症例数	卵数	受精卵数（%）	
微小環境培養法	5	13	5(38)	N.S.
従来法	5	16	6(38)	

考　察

ヒトIVF-ETは卵管性不妊症はもちろん乏精子症や精子無力症に対する治療法として確率されてきている．各施設によってその成績は若干異なるもののIVF-ETの妊娠・出産率は10～20%程度で成功率向上のためにはまだまだ基礎的検討が要求されている．

IVFでは高率に受精が認められるにもかかわらず妊娠率が低い理由としては着床率の悪さが考えられ，その原因としてin vitroでの培養環境の不良等が考えられている．現在行っているIVF-ETでは2～4細胞期の段階でETを行なった場合の成績が最も良いとされている．Boltonら[1]は前核期胚の40% (78/197) が胚盤胞 (blastocyst) まで発育し，胚盤胞をETした結果4人の生児を得，10%の妊娠，出産率であったと報告している．このように胚盤胞の状態で子宮内に戻す方が自然に近いのではあるが，まだ十分良好な成績ではなく，今後胚盤胞までの発育率を上昇させることが妊娠率向上に役立つものと思われる．

これまでに低酸素下胚培養が種々の哺乳類胚発生に促進的影響を与える報告がなされている．野田ら[7]はO^2-の消去系酵素であるsuperoxide dismutase (SOD) を培養液に添加することによりマウス2-cell blockが解除されることを発見し，活性酵素の毒性が2-cell blockの成立に関与していると報告した．マウス2-cell blockについては成立機序の詳細は未だ解明されていないが，Goddardら[8]は“Culture induced block to development”であると述べている．in vitroでの胚発育を向上させる目的で，本研究では環境条件の中でも最も基本となる培養液に着目し実験を行った．CZBがmBWW等他の培養液と比較して大きく異なる点はglucoseを含まず，glutamineとEDTAが含まれていることである．glutamineはグルタミン酸がアミノ化されたものであり，核酸合成に関与する重要なアミノ酸である[9～15]．このglutamineは胚発育の最初の48時間で重要なエネルギー源として働くが，8細胞期以降は特に重要視されてはいない．また一方，Abramczukら[16]はマウス2-cell blockに対するEDTAのもつ解除効果を報告しているが，これはCaやMg以外の金属イオンをキレートすることによるとしている．Glucoseはマウスやハムスターの初期胚発育に必要ではないと考えられているばかりではなく，胚発育の最初の48時間では発育を阻害する可能性も指摘されている[17～18]．本研究はマウスの2-cell blockを解除することが培養条件向上に寄与するものと考えて行われたが，CZBがマウス前核期胚の2-cell blockを解除し高い胚盤胞発育能を示した．培養48時間後にCZBにglucoseを添加しても胚盤胞発育率の上昇はみとめられなかったが発育速度が若干速くなる印象を受けた．マウスでは4～8細胞期以降でエネルギー源としてglucoseの取り込みが激しくなるとされており[19, 20] Chatotら[2]も48時間後にglucoseを加えた方の成績が良かったと述べている．しかし本研究の結果からglucose非存在下でも初期胚は十分

に発育することが示唆された．また，mBWWにEDTAを加えた培養液でも胚は発育せず，EDTA単独の2-cell block解除に対する効果は否定的であった．CZBの基礎的研究の結果をもとに実際にヒトのIVF-ETにも応用してみた．媒精後24時間はglucoseを含んだHTFで培養し，受精確認後CZBに移して培養を続け分割状態を観察した．7症例の計22個の卵を対象としたが分割率は77%でHTFの81%と有意差はなかった．受精卵は全例胚移植の対象にしたため胚培養は受精確認後ETまでの16～24時間までとした．CZBで妊娠に至った症例は未だ認めていないが，分割率に関してはHTFに劣らぬ成績を得ることができた．一方，生理的な培養液として着目したのがヒト羊水である．Coetzeeら[21]はマウスの前核期胚をヒト羊水中で培養し92.0% (Ham's F-10; 86.0%) の胚盤胞発育率を得ている．さらにGianaroliら[22]はヒト羊水を実際にヒトIVF-ETに使用し9人の患者のうち4例に妊娠に成功したとしている．本研究では染色体分析のために細胞成分を取り除き，不要になった羊水を患者の了解を得て培養液として基礎的実験に使用した．羊水中でのマウス前核期胚の胚盤胞発育率は0.7% (1/151) でCZBの44.4%と比較して有意に低率であった．患者の条件，採取された羊水の性状等に関しさらに詳しい分析が必要ではあるが，ヒト羊水を培養液として利用することは有用でないと思われた．

男性不妊症に対するIVF-ETの低成功率が問題視されている．精子回収法としてのswim up法やpercoll法の開発・改良に伴い，受精能を有する精子の回収も容易になったが，重症乏精子症や重症精子無力症ではなかなか満足できる精子濃度を得ることが出来ない．そこで限られた精子数で十分な精子濃度を得，また精子と卵の接触の機会を増やすことを目的に微小環境培養法を考えてみた．方法についてはcapillary tubeを用いた同様の方法がいくつか報告されているが[23~26]，著者の方法はベニューラ注射針外筒を用いるために特殊なadaptorを必要とせず，直接注射器に接続可能で容易に培養液を吸引することができる．基礎的研究としてハムスターテストでその有用性を調べたが，ペトリ皿を用いた従来法と比較して良好な結果を得ることが出来た．この成績をもとに実際に重症な男性不妊症患者のIVF-ETに応用したが13個の卵のうち受精した卵は5個で受精率は38%で，対照と差を認めなかった．しかし，通常の媒精に必要な精子の50～100分の1という極めて少ない精子数で媒精したにもかかわらず従来までの方法との間に受精率に差を認めなかったことは，微小環境培養方が非常に優れた培養法であることを示している．培養環境が極めてせまいため卵に付着する卵丘の体積が大きい場合は培養液がさらに少なくなり，その是非に関してはさらに検討しなければならないが，顕微授精法が技術的に困難であり，機械的操作が加わるという倫理的問題が含まれているために実用化が遅れている現在，配偶子に直接機械的操作の加わらない本法を試みる価値は十分あると思われる．今後は重症な男性不妊症に対し微小環境培養法で受精を試み，受精確認後CZBにて培養することにより高い妊娠率を得たいと考えている．

結　論

1，CZBがマウス2-cell blockを解除し，高い胚盤胞発育能を示した．48時間培養後CZBにglucoseを添加しても胚盤胞発育率に有意差は認めなかった．glucose非存在下でも初期胚は十分に発育することが判明した．

2，CZBをヒトIVF-ETに応用したが，分割率は77%であり対照と有意差なく良好な結果が得られた．

3，ヒト羊水中でのマウス胚盤胞発育率は0.7%でCZBに比べて優位に低率であり培養液には適さないと考えられた．

4，微小環境培養法でのハムスターテストでは，従来法に比較して精子の侵入を認めた卵が有意に多かった．微小環境であるため卵子と精子の接触の機会が増加したことが示唆された．

5，ヒトIVF-ETにおける微小環境培養法では精子数を従来の50～100分の1に減少させることが可能であり，極端に少ない精子数でも従来法と変わりない受精率を得ることができた．

文　献

1) Bolton, V. N., Wren, M. E. and Parsons, J. H.: Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts, Fertil. Steril., 50: 830, 1991
2) Chatot, C. L., Ziomek, C. A., Bavister, B. D., Lewis, J. L. and Torres, I. : An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro, J. Reprod. Fertil., 86: 679, 1989
3) Chatot, C. L., Lewis, J. L., Torres, I. and Ziomek, C. A. : Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium, Biol. Reprod., 42: 432, 1990
4) Chatot, C. L., Tasca, R. J. and Ziomek, C. A. :

Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium, J. Reprod. Fertil., 89: 335, 1990

5) 鳴瀬　淑，星　和彦，渡辺清彦，佐々木宏子，大越美希子，阿部利明，佐藤　章：冷蔵および凍結保存ハムスター卵使用によるハムスターテスト，日本受精着床雑誌，7: 101, 1990

6) 柳田　薫，星　和彦，村岡栄一，菅野　薫，会田都美子，吉松宣弘，佐藤　章：ハムスターテストとマウス受精卵初期発生成績からみた対外受精用培養液の検討，哺乳卵研誌，3(2): 114, 1986

7) 野田洋一，松本　央，森　崇英：Superoxide Dismutaseによるマウス2-cell blockの解除，日産婦会誌，41: 751, 1989

8) Goddard, M. J. and Pratt, H. P. H. : Control of events during early cleavage of the mouse embryo; an analysis of the 2-cell block, J. Embryol. Exp. Morph., 73: 111, 1983

9) Brinster, R. L. : Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo, J. Reprod. Fertil., 27: 329, 1971

10) Eagle, H., Oyama, V. I., Levy, M., Horton, C. L. and Fleischman, R. : The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid, Biol. Chem., 218: 607, 1955

11) Reitzer, L. J., Wice, B. M. and Kennell ,D. : Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured Hela cells, J. Biol. Chem., 254: 2669, 1979

12) 吉田光敏，番場公雄，小島義夫：ブタ体外成熟・体外受精卵の雄性前核形成に及ぼすグルタチオン合成阻止剤の影響，哺乳卵学誌，8(1): 57, 1991

13) McKiernan, S. H. :Energy substrate requirements for in-vitro development of hamster 1-and 2-cell embryos to the blastocyst stage, Human Reprod., 6: 64, 1991

14) McKiernan, S. H. and Bavister, B. D. : Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage, Biol. Reprod., 43: 404, 1990

15) Carney, E. W. and Bavister, B. D. : Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight-cell embryos in vitro, J. In Vitro Fert Embryo Transfer, 4: 162, 1987

16) Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowskey, A.: The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium, Dev. Biol., 61: 378, 1977

17) Seshagiri, P. B. and Bavister, B. D.: Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro, Biol. Reprod., 40: 599, 1989

18) Schini, S. A. and Bavister, B. D.: Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose, Biol. Reprod., 39: 1183, 1988

19) Brinster, R. L. and Thomson, J. L.: Development of eight-cell mouse embryos in vitro, Exp. Cell. Res., 42: 308,1966

20) Wales, R. G. and Brinster, R. L.: The uptake of hexoses by preimplantation mouse embryos in vitro, J. Reprod. Fertil., 15: 415,1968

21) Coetzee, J. C., Sevenster, C. B. V. O., Fourie, F. L., van der Merwe, J. V. and Helberg, L. A.: In vitro culture of mouse embryos in human amniotic fluid, SAMJ, 76: 62, 1989

22) Gianaroli, L., Seracchioli, R., Ferraretti, A.P., Trounson, A. and Flamigni, C.: The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer, Fartil. Steril., 46: 907,1986

23) Hans, H., van der Ven, H., Hoebbel, K., Al-Hasani, S., Diedrich, K. and Krebs, D.: Fertilization of human oocytes in capillary tubes with very small numbers of spermatozoa, Human Reprod., 4: 72, 1989

24) van der Ven, H., Hoebbel, K., Al-Hasani, S., Diedrich, K. and Krebs, D.: Fertilization of human oocytes in capillary tubes using very small numbers of spermatozoa, Annales D'Urologie, 23: 317, 1989

25) 吉村慎一，松本千秋，富山達夫，郡山　智，竹原裕志，原　利夫，泉　康史，小田高久，兼子智，矢作みき，大野虎之進：IVFにおける微小環境受精，日本受精着床雑誌，8(1): 30,1991

26) Hammitt, D. G., Walker, D. L., Syrop, C. H., Miller, T. M. and Bennett, M. R.: Treatment of severe male-factor infertility with high concentrations of motile sperm by microinsemination in embryo cryopreservation straws, J. In Vitro Fert. Embryo., 8: 101, 1991

Basic and clinical study of medium and microenviromental incubation for in vitro fertilization-embryo transfer

Shuku Fujimori

Department of Obsterrics and Gynecology,
Fukushima Medical College,
Fukushima 960-12, Japan

In Vitro Fertilization-Embryo Transfer (IVF-ET) was

established as the therapy for infertility, but we are not satisfied with the pregnancy rate. The success rate of IVF is dependent on embryo viability. Probably a improvement of environment lead to make the high pregnancy rate. We examined the usefulness of CZB and human amniotic fluid for IVF-medium. Pronuclear embryos of ICR mice have been cultured in CZB and mBWW medium at 37℃ under 5% CO_2 in air. The rate of development to the blastocyst stage is 4.5% in mBWW, 0.8% in mBWW containing EDTA, 52.7% in CZB, 45.9% in CZB with a Day 3 exposure to glucose. Glutamine may be a preferred energy substrate during early development for mouse embryos. The cleavage success of mouse embryos in human amniotic fluid was 0.7% compared with 44.4% in CZB medium. It is concluded that human amniotic fluid is not a viable alternative culture medium for mouse embryos. IVF-ET has also been applied to the treatment of male infertility. However, at present, the fertilization rate is still lower than hoped for. If a microenviromental incubation is employed, even a low-density sperm concentration can be expected to achieve fertilization. This culture system is described which enables successful fertilization by the hamster test using very small quantities of spermatozoa. The penetration rates of spermatozoa into the oocytes significantly increased compared with a former system.

(受付：1992年4月23日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

THE EFFECT OF PREMATURE LUTEINIZATION DURING PITUITARY SUPPRESSION WITH GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE AGONIST ON THE OUTCOME OF IN VITRO FERTILIZATION

Hideya KODAMA, Jun FUKUDA, Toshihiko MATSUI,
Kazuko SEKINE, Murat TASDEMIR, and Isik TASDEMIR

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

Abstracts: Whether the premature luteinization is associated with a reduction of pregnancy ratein in vitro fertilization (IVF) or not has been a controversial issue. In this study, the outcome of 120 cycles treated by a combination of gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone agonist (buserelin) was studied in relation to the level of serum progesterone (P) on the day of hCG injection. Premature luteinization (the level of P on the day of hCG injection increased more than 2.0ng/ml) occurred in 22 cycles (18.3% of total cycles), and the majority of these cycles had no evidence of premature lutinizing hormone (LH) rise. There was a significant correlation ($r=0.34$, $p<0.05$) between P and estradiol levels on the day of hCG injection. The outcome of IVF was compared among three groups which were classified by the P levels on the day of hCG injection; low P ($P<1.0$ng/ml) group; medium P ($1.0 \leqq P <$ 2.0ng/ml) group; and high P (=premature luteinization, $2.0 \leqq p$ ng/ml) group. The number of oocytes fertilized, embryos transferred, and the clinical pregnancy rate (27.7 vs 27.5 vs 33.3%, per transfer) were not significantly different among three groups. Therefore, we conclude that most of the premature luteinization cases occur under the condition in which endogenous LH secretion was suppressed successfully by GnRHa, and excessive ovarian hyperstimulation is likely to trigger premature luteinization. However, the elevation of P itself is considered not to be a detrimental factor in IVF treatment.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 61—65, 1993)

Introduction

Nowadays, most of in vitro fertilization (IVF) teams adopt cycles stimulated with a combination of gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa). GnRHa is able to induce temporary suppression of pituitary gonadotropin secretion and successfully suppress premature luteinizing hormone (LH) rise, contributing to the improvement of pregnancy rate in IVF[1-4]. Recently, some investigators have reported that, even though endogenous LH secretion remained suppressed by GnRHa. the level of progesterone (P) sometimes increased before hCG administration[5-8]. This early P rise is called premature luteinization. Although premature LH rise is generally believed to decrease the oocyte quality and pregnancy rate in IVF, there is no agreement on the effect of premature luteinization on the outcome of IVF. If premature luteinization affects the outcome of IVF adversely, we should monitor serum P on the day of hCG injection more carefully and consider a countermeasure against this phenomenon. In this study, the outcome of IVF treatment was studied in relation to the level of serum P on the day of hCG injection, in order to investingate the influence of premature luteinization on the outcome of IVF.

Materials and Methods

Patients

One hundred and twenty cycles of 111 infertile patients, treated during the period between January 1991 and June 1991, were included in this study. All patients received ovarian hyperstimulation with a combination of gonadotropin and GnRHa in either long (n=74) or short (n=46) protocol. The mean age of the female partners was 32.8±4.3 years old and the mean length of infertility periods was 6.6±3.3 years. The indications of IVF were tubal in 44, male in 26, endometriosis in 18, immunologic (female) in 2, and unexplained in 21 patients.

Method of IVF

Our protocol of IVF was described previously[4]. Briefly, a GnRHa (Buserelin, Sprecur, Hoechst Japan), 900 μg daily, was administered intranasally, beginning from the mid-luteal phase of the previous cycle (long protocol) or the onset of menstruation (short protocol). Ovarian stimulation with human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, Teikokuzouki), 225 IU daily, was started on the second day of menstruation. When diameter of a leading follicle reached 17mm or more, 10,000IU of human chorionic gonadotropin (hCG) was administered on the evening of that day. Ten ml of blood was collected from each patient at the time of hCG injection and the serum was stocked at -20℃ until hormone determination. Oocytes were harvested by ultrasound-guided follicle aspiration through transvaginal approach 34 hours after the hCG administration. The oocytes were immediately defined and cultured in 2ml of human tubal fluid medium containing 10% heat-inactivated maternal serum, under a mixed gas condition (5% CO_2, 5%O_2 and 90% N_2) at 37℃. Spermatozoa was prepared using the swim-up technique and inseminated at the concentration of 10×10^4 motile spermatozoa/ml.

The occurrence of fertilization was examined 15 to 18 hours following insemination, and the embryos were transferred to the uterus 32-34 hours following the recognition of fertilization. During that time, up to 4 embryos were transferred at the same time and we were not performing the cryopreservation of surplus embryos.

Luteal function was supported by injection of 2,000 IU of hCG on 0, 3 and 6 days after transfer. Pregnancy was detected by urine hCG test (Testpak, Dinabot), 18 days after embryo transfer, and only clinical pregnancy was regarded as the establishment of pregnancy in this study.

Assay

Serum P, estradiol (E_2), or LH was determined by an enzyme immunoassay (ELMOTEC P, Mochida, SEROZYME E_2, Serono, or Stratus LH, Baxter). The intra-assay coefficients of variation of P at 3.0 ng/ml, E_2 at 1000pg/ml or LH at 10mIU/ml was 6.6%, 3.0% or 6.6%, respectively. Reference preparation of LH determination was the World Health Organization 1st IRP human pituitary LH 68/40. Means were expressed with standard deviation and compared by the Student's t-test. Statistical significance was assessed at 5% level.

Results

In this study, we regarded the cycles in which the level of P increased more than 2.0ng/ml as the occurrence of premature luteinization. Such premature luteinization occurred in 22 cycles (18.3% of total 120 cycles). Premature LH rise (the level of LH on the day of hCG injection was more than 10mIU/ml) occurred in 5 cycles (4.1%), and all of these cycles were accompanied with premature luteinization. The incidence of premature LH rise and premature luteinization in long protocol or short protocol is shown in Table 1. Premature LH rise occurred only in short protocol. There was no significant difference in the incidence of premature luteinization between two protocols.

The correlation coefficient value between P and E_2 levels on the day of hCG injection was 0.37, and there was a significant correlation between two ($p<0.05$). On the other hand, There was no significant correlation between P and LH levels (correlation coefficient value of 0.05, not significant).

The outcome of IVF is compared among three groups which were classified by the P levels on the day of hCG injection; low P group, P＜1.0ng/ml; medium P group, 1.0≦P＜2.0ng/ml; and high P group (coincide with the cases with premature luteinization, 2.0≦Png/ml) (Table 2).

There was no significant difference in patient's age

Table 1 Incidence of premature luteinization and premature LH rise in long protocol or short protocol

	premature luteinization	primature LH rise
long protocol (n=74)	12/74 (16.2%)$^{n.s.}$	0/74 (0%)$^{p<0.05}$
short protocol (n=46)	10/46 (21.7%)	5/46 (10.9%)
total(n=120)	22/120 (18.3%)	5/120 (4.2%)

We regarded the increase of serum P level higher than 2.0 ng/ml on the day of hCG injection as premature luteinization, and the increase of serum LH higher than 10 mIU/ml as premature LH rise.

Table 2 Outcome of IVF in relation to the level of P on the day of hCG injection

	low P group	medium P group	high P group
Number of cycles	47	51	22
P on the day of hCG (ng/ml)	0.72±0.20	1.42±0.34	3.38±1.50
(range, ng/ml)	P<1.0	1.0≦P<2.0	2.0≦P
Age of patients (y. o.),$^{n.s.}$	33.4 ± 4.7	32.6 ± 4.2	31.4 ± 3.8
LH on the day of hCG (mIU/ml)$^{n.s.}$	3.60 ± 3.21	3.50 ± 1.78	4.98 ± 4.46
E_2 on the day of hCG (pg/ml)*	1634 ± 1587	2014 ± 1472	3519 ± 2116
Number of oocytes recovered**	6.2 ± 4.5	7.1 ± 4.1	9.5 ± 6.8
Number of oocytes fertilized$^{n.s.}$	2.7 ± 2.6	3.1 ± 2.8	3.7 ± 2.6
Number of embryos transferred$^{n.s.}$	1.9 ± 1.5	2.3 ± 1.3	2.6 ± 1.6
Clinical pregnancy rate			
per aspiration$^{n.s.}$	10/47 (21.3%)	11/51 (21.6%)	6/22 (27.3%)
per transfer $^{n.s.}$	10/36 (27.7%)	11/40 (27.5%)	6/18 (33.3%)

n. s.: not significant.

*: significant ($p<0.01$) between high P group and low P, or medium P group.

**: significant ($p<0.05$) between high P group and low P group.

and indications of IVF among three groups. The level of E_2 in the high P group is significantly ($P<0.01$) higher than that in medium P or low P group. There is no significant difference in the level of LH on the day of hCG injection among three groups. The mean number of oocytes retrieved in high P group was slightly higher ($P<0.05$) than that in low P group. The number of oocytes fertilized, embryos transferred. and the clinical pregnancy rate were not significantly different among these three groups.

Discussion

There has been no agreement on the normal range of the P levels on the day of hCG injection in the cycles stimulated with a combination of gonadotropin and GnRHa.

However, some investigators have proposed the normal P value of less than 0.5[5], or 1.0[6]ng/ml, based on their studies. In this study, we observed the P levels higher than 1.0ng/ml on the day of hCG more frequently (more than half of our treatment cycles). So, we determined the level of P higher than 2.0ng/ml as premature luteinization.

The reason why such premature luteinization occurred in the cycles with GnRHa remains unknown. The majority of cycles with premature luteinization had no evidence of premature LH rise. We could not find any relation between P and LH levels on the day of hCG injection. Therefore, most of the premature luteinization cases were considered to occur under the condition in which endogenous LH secretion was suppressed successfully byGnRHa. The serum P and

E_2 levels on the day of hCG injection were significantly correlated. This finding means that excessive ovarian hyperstimulation is likely to trigger premature luteinization. Under the condition of ovarian hyperstimulation, granulosa cells might become easy to acquire hypersensitivity to LH.

Whether the premature luteinization is associated with a reduction of pregnancy rate in IVF or not has been a controversial issue. Schoolcraft et al.[5] reported that P levels higher than 0.5ng/ml were associated with a significantly lower pregnancy rate in IVF, and this higher P cycles were associated with older patient's age and higher hMG dose. de Ziegler et al.[7] or Mio et al.[6] reported a reduction in pregnacy rate in GnRHa suppressed cycles when serum P level exceed 0.9 or 1.0ng/ml. They reported that the reduction of pregnancy rate was attributable to the change of endometrial receptivity, since the higher P cycles were not associated with a decrease in oocyte number and cleavage rate. Contrary to these reports, Loughlin et al.[8] reported that the elevation of P itself did not adversely affect the pregnancy rate. They compared the pregnancy rate in relation to three different P levels: 0.9ng/ml; 1.25ng/ml; and 1.5ng/ml, and found no significant differnce in the pregnancy rate, regardless of the definition of "high" P cycles. Our study support Loughlin's idea, since there was no statistically significant correlation between outcome of IVF and P level.

Premature LH rise occurred in several cycles which were treated by short protocol, although the percentage of its occurrence was low, commpared with the cycles stimulated with hMG alone[4]. The result of oocyte retrieval was very poor in these cycles with premature LH rise, and all of these cycles were accompanied with P rise. However, the majority of premature luteinization occurred regardless of premature LH rise, and the pregnancy rate in such cases was not reduced. Therefore, we conclud that the elevation of P itself is considered not to be a detrimental factor in IVF treatment, as long as premature LH rise does not occur simultaneously. We believe that monitoring of P around hCG injection have less valuable than the monitoring of LH. The long protocol seems to be superior to short protocol, since this protocol suppress premature LH rise almost completely.

References

1) de Ziegler, D., Lu, J. K. H., Cedars, M. I., Judd, H. L., Randle, D. and Meldrum, D. R.: Suppression of ovary using a gonadotropin-releasing hormone agonist prior to stimulation for oocyte retrieval, Fertil. Steril., 48: 807, 1987
2) Porter, R. N., Smith, W., Craft, J. L., Abdulwahid, N. A. and Jacobs, H. S.: Induction of ovulation for in-vitro fertilization using buserelin and gonadotropin, Lancet., 2: 1284, 1984
3) Meldrum, D. R., Bultlay, A. L., Wisot, A., Kempton, W., Hamilton, F. and Huynh, D. H.: Routine pituitary suppression with leuprolide before ovarian stimulation for oocyte retrieval, Fertil. Steril., 51: 455, 1989
4) Kodama, H., Kato, M., Sekine, K., Matsui, T. and Maki M.: Efficacy of a gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for in vitro fertilization, Jpn. J. Fertil. Steril., 36: 389, 1991
5) Schoolcraft, W., Huynh, D., Sinton, E., Hamilton, F., Schlenker, T. and Meldrum, D. R.: Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate, Fertil. Steril., 55: 563, 1991
6) Mio, Y., Harada, T., Sekijima, A., Iwabe, T., Onohara, Y., Tanikawa, M., Terada, H., Toda, T. and Terakawa, N.: Subtle rise in progesterone during ovarian hyperstimulation with combined GnRH analog and exogenous gonadotropin influences outcome of in vitro fertilization, 47th annual meeting of the American Fertility Society (abstruct), S 154, 1991
7) de Ziegler, D., Fanchin, R., Christin, S., Bergeron, C., Bouchard, P. and Frydman, R.: Consequences of pre-hCG elevation of plasma progesterone on IVF Outcome and proposed mechanism of action, 47th annual meeting of the American Fertility Society (abstruct). S 157, 1991
8) Loughlin, J. S., McClure, N., Chervenak, J. L., Schmidt, C. L. and Haning, R. V. Jr.: Elevated progesterone on the day of human chorionic gonadotropin administration in IVF/ET cycles does not adversely affect the pregnancy rate, 47th annual meeting of the American Fertility Society (abstruct). S 17, 1991

GnRHa併用周期における premature luteinizationの 体外受精成績に及ぼす影響

秋田大学産科婦人科学教室

児玉英也，福田　淳，松井俊彦，関根和子，
タシュデミル・ムラト，タシュデミル・イシュク

GnRHa併用卵巣刺激による体外受精で，hCG投与以前の早期の血中progesterone (P) の上昇 (premature luteinization) の影響を明らかにすることを目的とした．120周期のGnRHa併用体外受精周期のhCG投与時の血中P，estradiol (E_2)，luteinizing hormone (LH) 値を測定した．P≧2.0ng/mlの上昇は，22周期 (18.3%) に観察されたが，その中でLHの上昇 (≧10mIU/ml) を伴っていたのは5周期のみであった．PとE_2の間に有意 (r＝0.37，$p<0.05$) な相関が認められた．P＜1.0，1.0≦P＜2.0，2.0ng/ml≦Pの3群間で体外受精の結果を比較したが，平均の受精卵数，移植卵数，臨床的妊娠率 (対移植，27.7 vs 27.5 vs 33.3%) に有意な差は認めなかった．

結論：GnRHa併用周期でのPの上昇は，多くが内因性LHが抑制された状態で起こり，特に卵巣が高度に刺激された場合に起こりやすい．しかし，Pの上昇それ自体は，体外受精の治療成績に有意な影響を与えない．

(受付：1992年5月22日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

SIGNIFICANCE OF TRH TEST FOR HABITUAL ABORTERS

Masahiro KAWANO, Tadayuki ISHIMARU and Toru YAMABE

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

Abstract: We saw five cases of habitual abortion thought to be caused by abnormal secretion of PRL: One case had drug induced hyperprolactinemia and four cases had occult hyperprolactinemia. The patient with drug induced hyperprolactinemia was non-responsive to bromocriptine and experienced a further abortion, but in four patients with occult hyperprolactinemia, abortions were averted by bromocriptine therapy. Bromocriptine was prescribed before conception until 12 weeks and 4 days of gestation in the shortest case and until 15 weeks and 6 days of gestation in the longest case. In three of the five patients, oral administration caused severe gastrointestinal side effects, so the vaginal route was used. These case studies suggest that habitual abortion may result from abnormal secretion of PRL and that TRH test can be useful for the diagnosis of abnormal secretion of PRL. Vaginal administration of bromocriptine is useful in patients who have problems with oral administration.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 66—71, 1993)

Introduction

Habitual abortion can be the result of various causes and therefore it is necessary to identify possible causes prior to starting treatment. Anatomical abnormalities, endocrine abnormalities, metabolic abnormalities, autoimmune diseases, infections, blood type incompatibilities and chromosomal abnormalities are all possible causes, but in most cases causes can not be detected by ordinary tests. Recent progress in reproductive immunology has suggested the possibility that some cases of abortion without explained causes might be the result of an abnormal maternal-fetal immune respones[1, 2]. However, its etiological mechanism has not yet been clarified, and in some cases abortion can still occur after having immunotherapy. Thus it appears that we cannot attribute all abortions with unexplained causes to maternal-fetal immunological abnormality.

It is known that prolactin (PRL) has various biological activities, and that luteal insufficiency and menstrual abnormality can occur because of abnormal secretion of PRL. It assumed that abnormal secretion of PRL could be a cause of habitual abortion.

Since January 1986, the Department of Obstetrics and Gynecology of Nagasaki University School of Medicine has been conducting a thyrotropin-releasing hormone (TRH) test as a screening test for habitual abortion (Table 1). We have given bromocriptine therapy to patients diagnosed as having abnormal secretion of PRL and have obtained good results. This paper reports on the course of patients with abnormal secretion of PRL and discusses the clinical meaning of TRH test for habitual abortion.

Methods and Subjects

Diagnosis for abnormal secretion of PRL TRH test was conducted in the midfollicular phase. TRH 500 μg was administered intravenously and serum PRL levels were measured before the injection and 15 minutes and 30 minutes after the injection. Cases with a PRL basal level measured by radioimmunoassay (RIA) over 30ng/ml or cases with a PRL peak level over 150ng/ml after TRH administration were diagnosed as having abnormal secretion of PRL. Since

Table 1 Screening Tests for Habitual Abortion

1. Tests for anatomical abnormalities
   Hysterosalpingography, Ultrasound examination
2. Tests for endocrine and metabolic abnormalities
   BBT, Endometrial dating in the midluteal phase, Serum estrogen and progesterone levels in the midluteal phase, Serum free T_3, free T_4 and TSH levels, TRH test, 75gGTT
3. Tests for autoimmune diseases
   Antinuclear antibody, LE test, RA test, ASLO, C_3, C_4, CH_{50}, Anticardiolipin antibody, Lupus anticoagulant
4. Blood clotting time
   PT, APTT
5. Tests for infections
   Serologic tests for hepatitis B, syphilis, toxoplasmosis, mycoplasmal infection and chlamydial infection, Cervical scraping test for chlamydial antigen, Culture of menstrual flow
6. Tests for blood group antigen
7. Chromosomal analysis
8. HLA typing
9. Others

February 1990, immunoradiometric assay (IRMA) has been used to measure PRL, so abnormal secretion of PRL was diagnosed in cases with basal levels of over 15ng/ml or peak levels of over 75 ng/ml.

Cases

As a result of screening tests conducted between January 1986 and January 1992, 68 cases of habitual abortion (average age: 29.8 years, the mean frequency of abortion: 4.03 times) were identified. Abnormal secretion of PRL was observed in five of these cases (7.4%) (Tables 2, 3).

Case 1

Family history: Father-malignant lymphoma, Mother-hypertension.

Past history: The patient had been taking α-methyldopa, clonidine hydrochloride and propranolol hydrochloride for hypertension caused by chronic glomerulonephritis from age of 17.

Menstrual history: Menarche at the age of 14, 27 day intervals, 4-5 days of bleeding.

Obstetrical history: She had conceived six times, but all pregnancies aborted spontaneously.

Results of screening tests: Besides the result of TRH test, no other abnormalities were found. Renal function and blood pressure were well controlled.

Treatment course: She conceived in the second menstrual cycle of bromocriptine therapy, but was non-responsive to the drug. PRL level at 7 weeks and 6 days of gestation (calculated from the last menstruation) was high, 99.6ng/ml. We observed the course till 9 weeks and 5 days of gestation, but an embryo was not observed by ultrasonography, nor was growth of gestational sac observed. We conducted dilatation and curettage (D&C). Drug induced hyperpro-lactinemia was suspected with this patient because of her prolonged use of α-methyldopa. After the D&C, administration of both α-methyldopa and bromo-criptine was ceased. As a result, her PRL levels decreased and the level was 17.5ng/ml one month after drug cessation and 8.0ng/ml three months after drug cessation (Fig. 1).

Table 2 Cases of Abnormal Secretion of PRL

Patient No.	Age	Obstetrical history*	Serum PRL levels (ng/ml) before and after intravenous injection of TRH		
			before	after 15 minutes	after 30 minutes
1	33	G6 P0	60.4	167.2	207.0 (RIA)
2	27	G4 P0	16.0	154.6	127.6 (RIA)
3	31	G4 P1	19.6	172.0	115.6 (RIA)
4	28	G5 P0	16.3	194.6	150.0 (RIA)
5	30	G9 P1	7.2	79.9	73.4 (IRMA)

*G: Gravidity, P: Parity

Table 3 Bromocriptine Therapy in the Cases of Abnormal Secretion of PRL

Patient No.	Dosage of bromocriptine	Method of bromocriptine administration	Serum PRL levels (ng/ml) during bromocriptine administration	Time of bromocriptine administration
1	5.0mg/day	Oral	66.8-99.6 (RIA)	Preconception-9w5d of gestation*
2	2.5mg/day	Oral	4.8-13.5 (RIA)	Preconception-13w5d of gestation
3	2.5mg/day	Oral→Vaginal	10.8-18.6 (RIA)	Preconception-15w6d of gestation
4	2.5mg/day	Oral→Vaginal	1.0- 3.0 (RIA)	Preconception-15w6d of gestation
5	2.5mg/day	Oral→Vaginal	2.8- 5.7 (IRMA)	Preconception-12w4d of gestation

*Case 1 was conducted D&C at 9 weeks and 5 days of gestation because of blighted ovum.

Case 2

Family history: Mother-rheumatoid arthritis.

Past history: Not significant.

Menstrual history: Menarche at the age of 14, 32-40 day intervals, 7 days of bleeding.

Obstetrical history: She had conceived four times, but all pregnancies aborted spontaneously.

Results of screening tests: Besides the result of TRH test, no other abnormalities were found.

Treatment course: She conceived in the first menstrual cycle of bromocriptine therapy. The drug was prescribed orally until 13 weeks and 5 days of gestation, and during this period PRL levels were maintained at around 10ng/ml. After termination of therapy, PRL levels rose rapidly, but she did not have any problems in the prenatal course and delivered a male infant of 3,564g by cesarean section (Fig. 2). No abnormalities were seen in the postpartum period or in the neonate.

Case 3

Family history: Father-hypertension and bronchial asthma, Mother-hypertension.

Past history: Not significant.

Menstrual history: Menarche at the age of 12, 29 day intervals, 6 days of bleeding.

Obstetrical history: After one normal vaginal delivery, she conceived three times, but all subsequent pregnancies aborted spontaneously.

Results of screening tests: Besides the result of TRH test, no other abnormalities were observed.

Treatment course: She conceived in the second menstrual cycle of bromocriptine therapy. The drug was administered orally till 7 weeks and 0 day of gestation, but because of hyperemesis, administration was changed to the vaginal route from 7 weeks and 1 day of gestation, and was continued till 15 weeks and 6 days of getation. During therapy, PRL

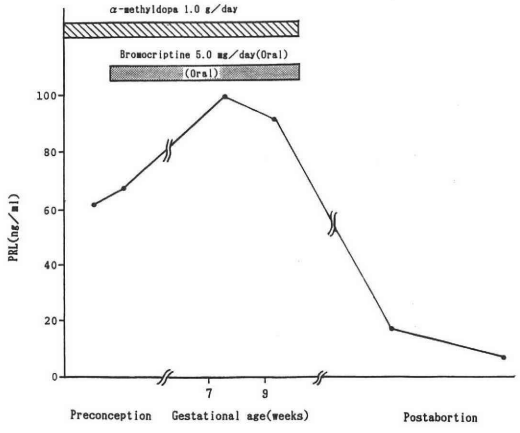


Fig. 1 Serum PRL Levels during Bromocriptine Administration (Case 1)

α-methyldopa 1.0g/day
Bromocriptine 5.0mg/day (Oral)
PRL (ng/ml)
Peconception
Gestational age (weeks)
Postabortion

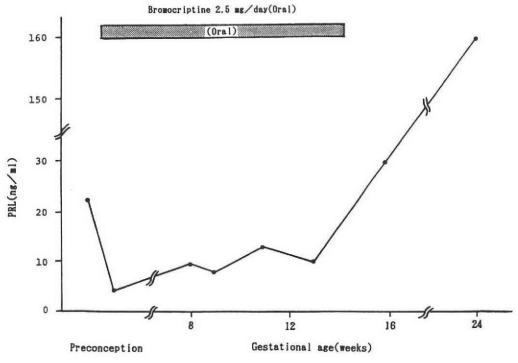


Fig. 2 Serum PRL Levels during Bromocriptine Administration (Case 2)

Bromocriptine 2.5mg/day (Oral)
PRL (ng/ml)
Peconception
Gestational age (weeks)

levels were maintained at around 17ng/ml. After termination of therapy, PRL levels rose rapidly, but no problems were seen in the prenatal course (Fig. 3). She delivered a female infant of 3,480g by normal vaginal delivery. No abnormalities were observed in the postpartum period or in the neonate.

Case 4

Family hitsory: Father-HTLV-I associated myelopathy.

Past history: Not significant.

Menstrual history: Menarche at the age of 11, 31 day intervals, 7 days of bleeding.

Obstetrical history: After twice having artificial termination of pregnancy, she conceived three times, but all subsequent pregnancies aborted spontaneously.

Results of screening tests: Besides the result of TRH test, no other abnormalities were observed.

Treatment course: She conceived in the third menstrual cycle of bromocriptine therapy. The drug was administered orally till 9 weeks and 5 days of gestation, but because of hyperemesis, administration was changed to the vaginal route, and was continued till 15 weeks and 6 days of gestation. During therapy, PRL levels were maintained at around 2ng/ml. After termination of therapy, PRL levels rose rapidly, but no problems were seen in the prenatal course. She delivered a female infant of 3,090g by normal vaginal delivery. No abnormalities were observed in the postpartum period or in the neonate.

Case 5

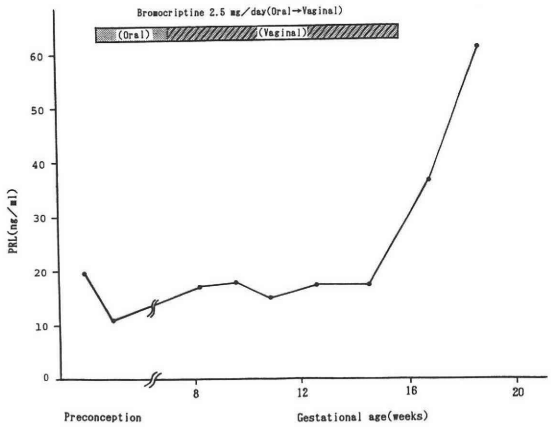


Fig. 3 Serum PRL Levels during Bromocriptine Administration (Case 3)

Family history: Not significant.

Past history: Not significant.

Menstrual history: Menarche at the age of 13, 32 day intervals, 5-7 days of bleeding.

Obstetrical history: After having artificial termination of pregnancy three times, she conceived three times, but all subsequent pregnancies aborted spontaneously. After that, she was put on bromocriptine therapy at a clinic, and she delivered a male infant of 3,150g. During her 8th and 9th pregnancy, she did not receive any treatment, and both pregnancies aborted spontaneously.

Results of screening tests: In addition to TRH test, abnormality was observed in her chromosomal karyotype [46, XX, t ($1p^+$; $6q^-$)].

Treatment course: She conceived in the second menstrual cycle of bromocriptine therapy. The drug was administered orally till 5 weeks and 5 days of gestation, but because of hyperemesis, administration was changed to the vaginal route, and was continued till 12 weeks and 4 days of gestation. During therapy, PRL levels were maintained at around 3ng/ml. At the time of writing, she was 24 weeks of gestation with a good prenatal course.

Discussion

It has been reported that luteal function is influenced not only by hyperprolactinemia but also by extreme decline of PRL[3-5]. This suggests that PRL plays a part in maintaining luteal function. However, luteal insufficiency, galactorrhea, ovulatory disturbance and amenorrhea caused by hypersecretion of PRL are often discussed clinically, while hyposecretion of PRL is not. These morbid states are considered to occur not only in apparent hyperprolactinemia, but also in occult hyperprolactinemia.[6-8]. Thus, it is possible that patients with abnormal secretion of PRL might have abortions caused by luteal insufficiency. Although diagnostic criteria for luteal insufficiency have not yet been established, looking at our five cases, basal body temperature, serum progesterone levels and endometrial dating in the midluteal phase were all within the normal range (hyperthermic phase 12 days or over, progesterone level 10 ng/ml or over, lag time in endometrial dating within two days), and the presence of luteal in-

Bromocriptine 2.5 mg／day (Oral→Vaginal)
PRL (ng／ml)
Preconception
Gestational age (weeks)

sufficiency could not be traced clinically from these data. It is not known whether abnormal secretion of PRL without luteal insufficiency could be a cause of abortion. However, PRL has various biological effects and it is thought that PRL has some influence on the endometrium[9] and immune system[10, 11] which could be associated with the implantation of a fertilized egg and the preservation of early pregnancy. It has also been reported that a high concentration of PRL prevents eggs from becoming fertilized and interferes with the cleavage of human oocyte[12]. Further, Ben-David et al.[13] have reported that transient hyperprolactinemia observed during the menstrual cycle hinders fertilization, implantation and subsequent reproductive phenomenon. However, there are also negative reports concerning PRL influences on the fertilization and the cleavage of human oocyte[14-16]. Looking at our patients, Case 1, who maintained a high level of PRL in early pregnancy, aborted again, suggests that a high concentration of PRL might have an adverse influence on the maintenance mechanism after implantation and therefore result in abortion. These findings indicate that the mechanism of abortion in the presence of abnormal PRL secretion cannot be explained simply by luteal insufficiency alone. Regardless of the presence of luteal insufficiency, it seems that abnormal secretion of PRL is a disorder that can be considered as a cause of abortion in early pregnancy.

Occult hyperprolactinemia is defined as a disorder in which PRL levels are normal during the day time but a hyperprolactinemic state occurs for a few hours at night[17]. Thus in order to diagnose occult hyperprolactinemia, examination of circadian profile is essential. However, it is difficult to conduct this examinatioin in patients with habitual abortion as a screening test. In our department, TRH test has been conducted instead as a simpler method. As the result of TRH test in our patients, Cases 2, 3, 4 and 5 were diagnosed as having occult hyperprolactinemia. Three of the four cases had no other abnormalities in their screening tests and may have been treated as unexplained habitual abortion cases, if TRH test had not been conducted. Considering the fact that bromocriptine therapy was effective in these four cases, the TRH test seems useful in identifying patients with habitual abortion in whom bromocriptine therapy might be effective.

The time and dosage of medication are essential for therapy. We prescribed the drug till 12 to 15 weeks of gestation when the hormonal environment becomes stable. As for dosage, we start from a small dosage (2.5mg/day) and determine the maintenance dose after checking PRL levels. In Cases 2, 3, 4 and 5, a dose of 2.5mg/day was sufficient to control PRL secretion. Main side effects of bromocriptine are digestive symptoms (nausea and vomiting in particular). Patients on bromocriptine therpy often have hyperemesis in early pregnancy. In such cases, oral administration is difficult and some other means has to be used. According to the study on vaginal administration of bromocriptine by Vermesh et al.[18], PRL inhibition appears 4-5 hours later than that achieved by oral administration, and while vaginal administration finally gave the same level of inhibitory effect as oral administration, it caused few digestive symptoms. We also obtained similar results from vaginal administration[19]. This suggests that bromocriptine therapy can be maintained with patients having hyperemesis. In Cases 3, 4 and 5, hyperemesis was improved by the change to vaginal administration and it was possible to continue bromocriptine therapy. Also, PRL levels were controlled as effectively as oral administration. Thus it was found that vaginal administration of bromocriptine was useful in early pregnancy.

References

1) Scott, J. R., Rote, N. S. and Branch, D. W.: Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death, Obstet. Gynecol., 70: 645, 1987
2) Hill, J. A.: Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy, Am. J. Reprod. Immunol., 22: 33, 1990
3) Schulz, K. D., Geiger, W., Del Pozo, E. and Kunzig, H. J.: Pattern of sexual steroids, prolactin and gonadotropic hormones during prolactin inhibition in normally cycling women, Am. J. Obstet. Gynecol., 132: 561, 1978
4) Garcea, N., Campo, S., Siccardi, P., Panetta, V., Venneri, M. and Dargenio, R.: Effect of drug-induced hyper- and hypoprolactinemia on human corpus luteum, Acta Eur. Fertil., 14: 35, 1983

5) Ishimaru, T., Huang, H. J., Kawano, M., Kajimura, K., Masuzaki, H., Fujishita, A., Imamura, S. and Shigematsu, J.: Role of Prolactin in Human Reproduction, 148, Kargar, 1988
6) Peillon, F., Vincens, M., Cesselin, F., Doumith, R. and Mowszowicz, I.: Exaggerated prolactin response to thyrotropin-releasing hormone in women with anovulatory cycles; possible role of endogenous estrogens and effect of bromocriptine, Fertil. Steril., 37: 530, 1982
7) Suginami, H., Hamada, K., Yano, K., Kuroda, G. and Matsuura, S.: Ovulation induction with bromocriptine in normoprolactinemic anovulatory women, J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 899, 1986
8) Aisaka, K., Ando, S., Kokubo, K., Yoshida, K. and Mori, H.: Effects transient or occulted hyperprolactinemia on luteal function, Folia Endocrinol., 62: 117, 1986
9) Aso, T., Negami, A., Inaki, H. and Tominaga, T.: Role of Prolactin in Human Reproduction, 191, Kargar, 1988
10) Hiestand, P. C. and Mekler, P.: Mechanism of action: ciclosporin- and prolactin-mediated control of immunity, Prog. Allergy, 38: 239, 1986
11) Grossman, C.: Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis, J. Steroid Biochem., 34: 241, 1989
12) Azuma, K. and Yamano, S.: Correlation between serum prolactin secretion patterns and the ability of fertilization and cleavage of human oocyte (Effects of transient hyperprolactinemia on fertilization and cleavage of human oocyte), Acta Obst. Gynaec. Jpn., 37: 2097, 1985
13) Ben-David, M. and Schenker, J. G.: Transient hyperprolactinemia: a correctable cause of idiopathic female infertility, J. Clin. Endocrinol. Metab., 57: 442, 1983
14) Taylor, P. J., Trounson, A., Besanko, M., Burger, H. G. and Stockdale, J.: Plasma progesterone and prolactin changes in superovulated women before, during and immediately after laparoscopy for in vitro fertilization and their relation to pregnancy, Fertil. Steril., 45: 680, 1986
15) Gonen, Y. and Casper, R. F.: Does transient hyperprolactinemia during ovarian hyperstimulation interfere with conception or pregnancy outcome, Fertil. Steril., 51: 1007, 1989
16) Hummel, W. P., Clark, M. R. and Talbert, L. M.: Transient hyperprolactinemia during cycle stimulation and its influence on oocyte retrieval and fertilization, Fertil. Steril., 53: 677, 1990
17) Mori, H., Aisaka, K., Matsuoka, R. and Kigawa, T.: Co-relation of prolactin-secreting-capacity to circadian profil of prolactin in euprolactinemic women with ovulatory disturbances, Acta Obst. Gynaec. Jpn., 37: 287, 1985
18) Vermesh, M., Fossum, G. T. and Kletzky, O. A.: Vaginal bromocriptine pharmacology and effect on serum prolactin in normal women, Obstet. Gynecol., 72: 693, 1988
19) Ishimaru, T., Huang, H. I., Fan, I., Kajimura, H. and Yamabe, T.: A comparative study between vaginal and rectal routs of bromocriptine administration, Acta Med. Nagasakinensia, 35: 77, 1990

習慣流産患者に対するTRHテストの意義

長崎大学産科婦人科学教室

河野雅洋　石丸忠之　山邉　徹

PRL分泌異常が原因と思われる習慣流産の5例を経験した．1例は薬剤性高PRL血症であり，残り4例は，いわゆる潜在性高PRL血症であった．薬剤性高PRL血症の1例はbromocriptineに不応で再度流産したが，潜在性高PRL血症の4例はbromocriptine療法により流産を免れた．Bromocriptineは妊婦前より最短例では妊娠12週4日まで，最長例では15週6日まで投与した．5例中3例においては，経口投与で消化器症状が強く発現したため，経腟投与に変更した．経腟投与へ変更後には消化器症状が軽快し，bromocriptineの継続投与が可能であった．しかもPRLの抑制効果は経口投与と同程度にみられた．以上の症例の治療経験より，PRL分泌異常が習慣流産の原因となりうること，また，その診断にはTRHテストが有用であることなどが示唆された．また，bromocriptineの経口服用が困難な例に対しては，経腟投与が有用であると思われた．

(受付：1992年3月6日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

習慣流産の免疫療法前後における免疫学的変化について

Immunological Changes after Lymphocyte Injection Therapy for Habitual Aborter

岡山大学産科婦人科

中塚幹也 Mikiya NAKATSUKA
錦織恭子 Kyoko NISHIKIORI
長谷川淳 Atsushi HASEGAWA
平野由紀夫 Yukio HIRANO
片山隆章 Takaaki KATAYAMA
野間純 Jun NOMA
新谷恵司 Keiji SHINTANI
清水健治 Kenji SHIMIZU
吉田信隆 Nobutaka YOSHIDA
工藤尚文 Takafumi Kudo

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

1991年1月～8月に夫リンパ球による免疫療法を施行した反復・習慣流産12例で，妊娠予後，治療前後のリンパ球混合培養(MLR)，リンパ球接種部位の紅斑，末梢血リンパ球subsetを検討した．妊娠継続率は71.4%で5例が妊娠継続，2例が自然流産，5例が治療後未妊娠であった．妻血清の夫婦間MLR抑制効果は全例で有意に増加(平均-8.9%から65.9%)し($p<0.01$)，夫リンパ球に対する妻リンパ球のMLRは83.3%の症例で有意な抑制が認められた($p<0.05$)．また対照リンパ球に対する妻リンパ球のMLRも63.6%の症例で抑制されたが有意ではなかった．皮膚紅斑は90.6%の症例で有意な縮小(平均1,570から700mm^2)が認められた($p<0.01$)．末梢血T細胞subset，NK細胞は有意な変化はなかったが，helper T/suppressor T細胞比は有意に低下(平均0.73から0.66)していた($P<0.05$)．良好な妊娠継続率が得られ各種の免疫学的指標が有意に変化したが，これらと個々の症例の妊娠予後とは一定の相関を示さなかった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1) 72—79, 1993)

諸　言

習慣流産に対して施行される夫リンパ球を用いた免疫療法は，すでに臨床的には多くの施設で施行され効果も実証されている[1～4]が，依然としてその機序の詳細は不明である．習慣流産症例中に，妊娠維持に有利に作用するとされる父親由来の抗原に対するblocking antibodyの産生が，夫婦間のHLA抗原の相似性のため障害されているものがあることが報告されている．免疫療法によりblocking antibodyが産生されると言われているが，これだけで治療効果の全てを説明することは困難であり理論的根拠の検討が急がれる．今回，私達は習慣流産に対する免疫療法の全身に及ぼす免疫学的影響の一端を探るため，その臨床効果とともに治療前後の各種免疫学的指標の変化を比較検討したので報告する．

対象および方法

当科不育症外来を受診した2回以上連続して流産を繰り返した反復および習慣流産で，子宮奇形，染

色体異常，その他の流産の原因となる異常を認めなかった症例のうち1991年1月～8月に夫リンパ球皮内接種による免疫療法を施行した12症例を対象とした．12例の年齢は平均32.3歳，治療前の妊娠回数は平均3.8回，流産回数は平均3.5回であった(表1)．

夫リンパ球による免疫療法は夫の感染症検査(HBsAg，TPHA等)後，夫婦の同意のもと施行した．Ficoll-Conrayを使用した比重遠心法により，夫のHeparin加末梢血30mlよりリンパ球を分離し，滅菌生理食塩水により2.0×10^7/mlの濃度に調整したのち，妻の前腕内側に0.3mlずつ3ケ所に分けて皮内接種した．これを2週間間隔で4回施行した．免疫療法前後のリンパ球混合培養(MLR: Mixed Lymphocyte Reaction)を施行するとともに接種部位の皮内反応(紅斑)の面積の計測，また末梢血リンパ球subsetを測定した．

1．リンパ球混合培養 (MLR: Mixed Lymphocyte Reaction)

免疫療法前および第4回接種の2週間後に，夫，妻，第三者男性(control)のmitomycin C処理リンパ球をstimulator，また夫，妻，第三者男性(control)の無処理リンパ球をresponderとして各組合せで一方向MLRを施行した．同時に妻血清および同一第三者男性の血清(control)を加えた系でも，夫のmitomycin C処理リンパ球をstimulator，妻の無処理リンパ球をresponderとした一方向MLRを施行した．培養は96穴U底プレートでtriplicateで施行した．5日間の培養中，終了前の約18時間は［^{3}H］thymidineを加えて培養し，その後Harvestingし，scintilation counterにて［^{3}H］thymidineの取り込みを測定した．

2．皮内反応

皮内反応は初回と第4回接種後にそれぞれ観察し，免疫療法時に接種した部位に出現した紅斑の最長径とそれに直行する方向の最長径を接種の24時間後および48時間後に計測した．この計測値を用いて3ケ所それぞれの面積を楕円として概算し総面積を求めた．

3．T細胞subset

免疫療法前および第4回接種の2週間後に妻より採血しFlowcytometer (FACScan. Becton Dickinson, CA, USA)を用いた二重染色法にてT細胞のsubsetおよびNK活性を測定した．

suppressor T細胞 (Ts) はLeu $2a^+$＋Leu 15^+，suppresor inducer T細胞 (Tsi) はLeu $3a^+$+Leu 8^+，helper T細胞 (Th) はLeu $3a^+$＋Leu 8^-，cytotoxic T細胞 (Tc) はLeu $2a^+$＋Leu 15^-により分類した．またNK活性についてはLeu 7 / Leu 11cにより測定した．

結　果

1．臨床効果

免疫療法後に12症例中の7例が妊娠し，そのうち2例が無事分娩に至り，1例は3rd trimester，2例は2nd trimesterであり，既往流産週数をすでに経過し妊娠継続中である(妊娠継続率71.4%)．残りの2例に

表1　Profile of the patients

No.	age	before immunotherapy		outcome
		gestation	abortion	
1	32	4	4	delivery
2	29	2	2	delivery
3	25	3	2	3rd trimester
4	33	6	5	2nd trimester
5	28	3	3	2nd trimester
6	37	6	6	abortion
7	30	3	3	abortion
8	35	6	5	not pregnant
9	32	4	3	not pregnant
10	44	3	3	not pregnant
11	32	3	3	not pregnant
12	30	3	3	not pregnant
mean±S.D.	32.3±4.7	3.8±1.3	3.5±1.2	

ついては免疫療法にも拘らず流産に終わった．その他の5例は免疫療法後，妊娠に至っていない (表1)．

2．リンパ球混合培養 (MLR)

種々のparameterを設定し治療前後の変化を比較した．以下，例えば夫，妻，第三者男性 (control) のmitomycin C処理リンパ球をstimulator，妻の無処理リンパ球をresponderとして一方向MLRを施行した場合を各H→W，W→W，C→Wと表わす．

(1) 妻血清のMLR制御効果 (B. E.: blocking effect)

B. E. = [1- {妻血清加 (H→W) /control血清加 (H→W) }]×100 (%)

妻血清のB. E. は，夫リンパ球に対する妻リンパ球の幼若化反応を抑制する妻血清の効果を表す指標である．この指標が増加するほどcontrol血清に比して抑制効果が強いことを意味する．

B. E. は免疫療法前-8.9±72.5 (mean±S. D.)%，免疫療法後65.9±26.5%であり，12例全ての症例で増加し免疫療法により有意な増加を示した (Wilcoxon test, $p<0.01$)．しかし妊娠予後との関係を検討すると治療後妊娠継続例では7.7±27.7%から74.5±25.7%へ，治療後流産例でも-8.3±25.2%から60.8±23.5%へと増加しており前値，後値，変化率とも妊娠予後との関係では有意な差は認められなかった (図1)．

(2) (H→W) / (W→W)

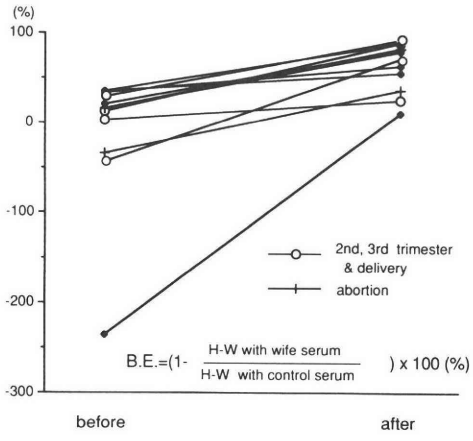
夫リンパ球に対する妻リンパ球の幼若化反応の程度を表す指標である．治療前は23.5±36.3 (mean±S. D.)，治療後は9.18±12.2であり，12例中10例 (83.3%) で低下しており，治療による有意な低下が認められた (Wilcoxon test, $p<0.01$)．しかし妊娠予後との関係で見ると治療後妊娠継続例では32.3±48.8から11.9±16.8%へ (5例中4例が低下)，治療後流産例では39.7±3.0から6.4±1.2へ (2例中2例が低下) と変化しており，一定の関係は認められなかった (図2)．

(3) (C→W) / (W→W)

controlリンパ球に対する妻リンパ球の幼若化反応の程度を表す指標である．治療前は20.6±26.9 (mean±S. D.)，治療後は26.5±37.1であり12例中6例 (50.0%) で低下したが，6例 (50.0%) で逆に上昇し一定の傾向は認められなかった (図3)．

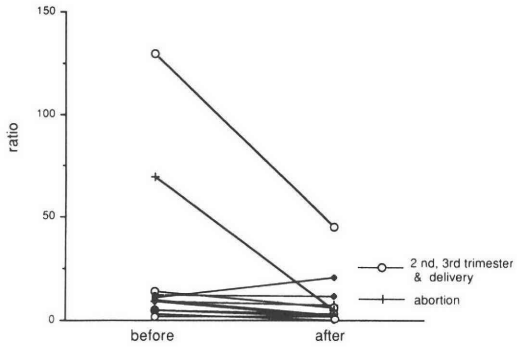
(4)) (H→W) / (C→W)

夫リンパ球とcontrolリンパ球をstimulatorとした時の，妻リンパ球の幼若化反応の程度を表す指標である．治療前は1.47±1.22 (mean±S. D.)，治療後は0.68±0.60であり，12例中10例 (83.3%) で低下しており，治療後の妻リンパ球の幼若化反応はcontrolリンパ球に比して夫リンパ球に対しての方がより抑制さ



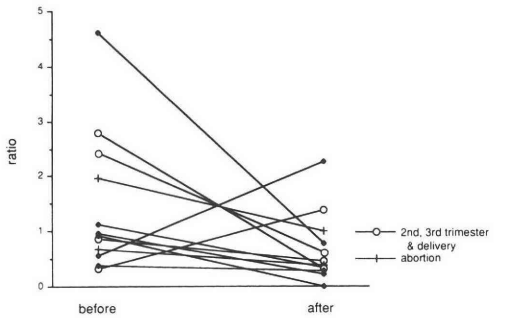
abbreviation	stimulator	responder	addition of serum
H - W	husband	wife	wife
H - W	husband	wife	control

図1　Blockng effect



abbreviation	stimulator	responder
H-W	lymphocyte of husband	lymphocyte of wife
W-W	lymphocyte of wife	lymphocyte of wife

図2　H-W/W-W



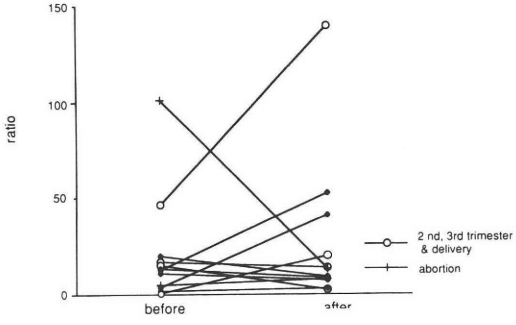
abbreviation	stimulator	responder
H - W	lymphocyte of husband	lymphocyte of wife
C - W	lymphocyte of control	lymphocyte of wife

図3　H-W/C-W

れる傾向にあった (Wilcoxon test, $p<0.1$). しかし妊娠予後との関係で見ると治療後妊娠継続例では1.5±0.9から1.0±0.4へ (5例中4例が低下), 治療後流産例では1.3±0.6から0.7±0.3へ (2例中1例が低下) と変化しており, やはり一定の関係は認められなかった (図4).

3. 皮内反応

リンパ球皮内接種後24時間と48時間の皮膚紅斑の面積の和は第1回から第4回接種後で1,570±1,160 (mean±S. D.) から700±1,200mm^{2}へ変化しており12例中11例 (90.6%) で縮小し, 治療による有意な縮小が認められた (Wilcoxon test, $p<0.01$). しかし妊娠予後との関係で見ると治療後妊娠継続例では1,780±1,500 (mean±S. D.) から1,070±1,740mm^{2}へ (5例中4例が縮小), 治療後流産例では1,660±770から460±320へ (2例中1例が縮小) と変化しており, やはり予後との間に一定の関係は認められなかった (図5).



abbreviation	stimulator	responder
C - W	lymphocyte of control	lymphocyte of wife
W -W	lymphocyte of wife	lymphocyte of wife

図4　H-W/C-W

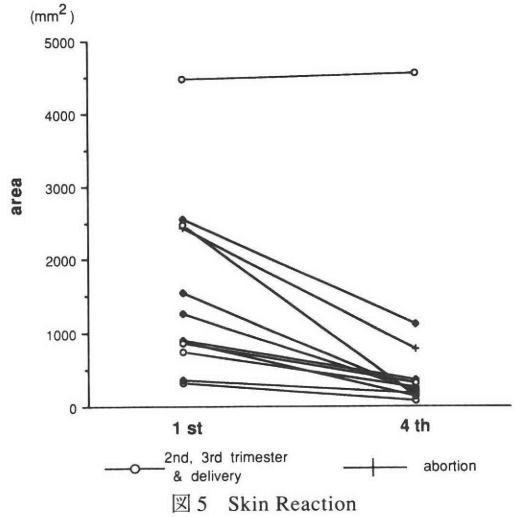


図5　Skin Reaction

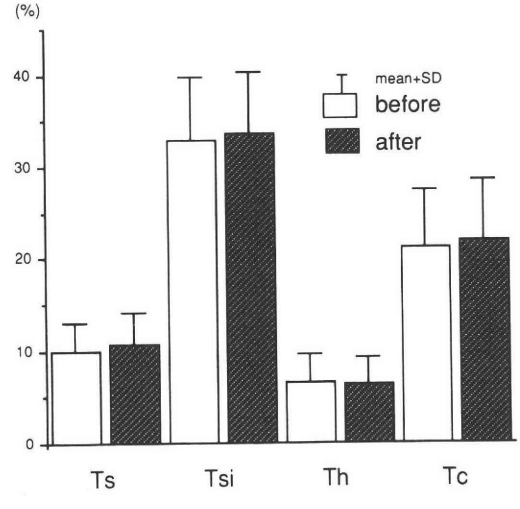
4. 末梢血リンパ球subset

治療前値, 後値の平均は, Tsでは各10.0±3.0 (mean±S. D.) %, 10.6±3.4%, Tsi細胞では各32.9±6.8%, 33.5±6.7%, Th細胞では各6.5±3.2%, 6.3±3.0%, Tc細胞では各21.0±6.3%, 21.8±6.7%であり, いずれも有意な変化を認めなかった (図6).

helper T細胞とsupressor T細胞の比 (Th/Ts) についてみると, 治療前値, 後値は各0.73±0.44 (mean±S. D.), 0.66±0.38であり, 治療後に有意に低下していた (Wilcoxon test, $p<0.05$). Th/Tsは治療後妊娠継続例では0.75±0.40から0.66±0.33へ (5例中4例が低下, 1例が不変), 治療後流産例では0.91±0.64から0.90±0.55へ (2例中1例が低下) と変化していたが, 症例数が少なく有意差は認められなかった. またTc/Ts比は治療前値, 後値は各2.2±0.9 (mean±S. D.), 2.3±1.0であり変化は見られなかった (図7). NK活性についても, 治療前後で有意差を認めなかった (図8).

考　察

1981年にTaylorら[1]やBeerら[2]が習慣流産症例に対する夫リンパ球を使用した免疫療法を開始して10年以上が経過し多くの施設からその有効性を示唆する報告が見られる[3,4]が依然としてその理論的根拠は不明である.



Ts; suppressor T cell　　Tsi; suppressor inducer T cell
Th; helper T cell　　Tc; cytotoxic T cell

図6　T-cell subset

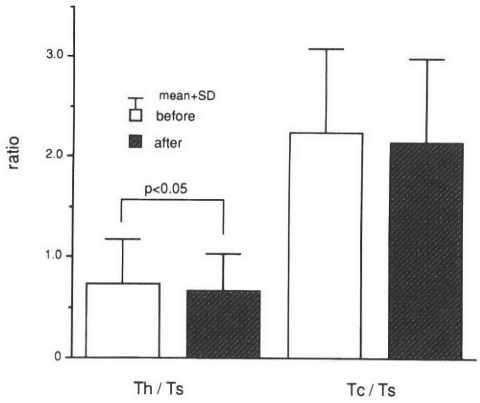


図7　Th/ and Tc/Ts

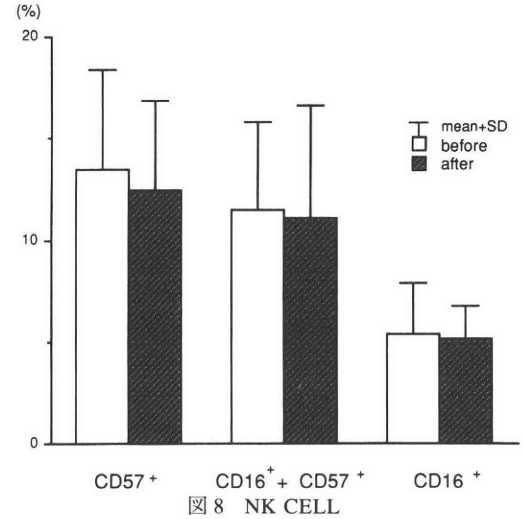


図8　NK CELL

免疫療法の効果を判断する方法としてはMLR[2]や，MLRを利用したB.E.測定[5]や培養上清のmigration inhibitory factor測定[6]，補体依存性細胞障害試験 (CDC)[7]，あるいは接種時の皮内反応[8]等が使用されるが，施設により方法や基準が異なっている．これらの検査結果も治療後の妊娠の予後とが必ずしも一致しない事があり[5]一定の確立した基準がない．

今回検討したB. E. の増大効果は血清中の何によるものかは依然不明であるがblocking antibodyと呼ばれる抗体の存在が考えられている．blocking antibodyとして抗 HLA-D/DR 抗体[4]，絨毛とリンパ球の共通抗原 (Tropho-blast- lymphocyte crossreactive antigens: TLX抗原) に対する抗TLX抗体[9] (夫リンパ球を標的としたCDC活性として測定)，HLA-D/DR抗原に対する母体T細胞receptor (TCR) に対する自己抗体としての抗indiotype抗体[10]，Cold-B cell抗体[11] (4 ℃でB細胞を標的としたCDC活性として測定) 等が想定されている．正常妊娠においても妊娠初期から妊婦血清中に胎児や夫の抗原に特異的な抑制因子が出現するとする報告がある[12]．しかし妊婦血清は夫リンパ球をstimulatorとした場合のみならず非特異的にMLRを抑制し妊娠初期には明らかではなく，中期，後期と増大して行き (これには，ホルモンの影響も関与すると思われる．)，また母体のリンパ球自体の変化は少なく血清中の因子の影響が大きいとする報告もある[13]．また妊婦血清はMLRにおいてinterleukin- 2 産生を抑制する[14]とされるが，これにも抗idiotype抗体等が関与している可能性がある．今回データとして示していないが，免疫療法後の妊娠継続例では，妊娠後には免疫療法後よりもさらにB. E. の上昇が認められる例が多く見られた．施設によっては妊娠初期のみに免疫療法を施行し良好な成績を得ており妊娠初期のB. E. 上昇が，原因か結果かは不明であるが妊娠の維持と深く関与していると考えられる．今回の12症例は全ての症例でB. E. の抑制がみられ統計学的にも有意差が認められたが，B. E. の増加の程度には個人差が大きかった．純粋に妻血清中のblocking antibodyの増加を測定するには凍結保存した治療前後の妻血清を同時に同一培養系に添加し比較することが必要であるが，今回はB. E. として第3者control血清による抑制と比較することで変化を観察した．治療前と治療後で施行した妻血清加MLR (H→W) の比較ではblocking antibodyの産生に加えて治療による妻リンパ球自体の変化も包括して観察していることになる．今回 (H→W) / (W→W) の有意な低下が認められたが，妻リンパ球自体のsubset等の構成あるいは活性の変化によるだけでなく，これにもblocking antibodyが影響している可能性もある．生体内でしきりにimmunoglobulinが産生されている状態では末梢血中 B 細胞もimmunoglobulin産生状態のものが増加しており，リンパ球を培養すると何の刺激を加えなくても培養液中にimmunoglobulinが大量に産生される．また腎移植におけるdonorからの輸血 (donor specific blood transfusion: DST) の場合も抗idiotype抗体が産生され，既にin vivoでTCRに対して抗idiotype抗体が作用しているために，recipient血清を加えないMLRでもDST後に抑制が見られる[15]とされる．このような抗idiotype抗体を人工的に投与することにより胎児に対する拒絶反応を抑制し妊娠を維持させることも可能であるかもしれない．非特異的なpolyclonal immunoglobulinの静注による習慣流産の治

療報告[16]はあるが，blocking antibodyの効果が低いと考えられる場合 (例えば，母体の無γ-globulin血症) でも妊娠が維持することから，blocking antibodyのみで妊娠の維持機構を説明するのは困難である．今回治療前にB. E. が正の値をとったもの，すなわちcontrol血清よりも抑制効果を既に示していた症例が13例中 9 例 (69.2%) に見られた．しかしB. E. が50%を超えていた症例はなく，これに比して治療後は 9 例 (69.2%) が50%以上のB. E. を示していた．治療前に既にB. E. が正の値であった症例では流産を繰り返したことで胎児抗原に接したため低値ながらB. E. を発現していた可能性や，何か他の不明因子が関与した習慣流産であった可能性がある．治療後B. E. 上昇例でも流産がみられB. E. だけではその治療効果が評価できない可能性もあるが少なくとも治療前に50%以上のB. E. を示していた場合は他の病因を考慮すべきであろう．

今回示された (H→W) / (C→W) の有意な低下は免疫療法によって夫に特異的な抑制効果が得られた事を示唆し，免疫療法では第 3 者リンパ球よりも夫リンパ球を使用した方が好成績である[4]ことを裏付けるものと考えられる．(C→W) / (W→W)も低下する症例が見られたが，controlリンパ球と夫リンパ球との間に偶然に抗原性の一致あったためか，あるいは非特異的な抑制機序が発動されたためかは不明である．

リンパ球接種時の紅斑は，ほとんどの症例で治療経過とともに縮小が認められた．この縮小が妊娠の予後を正確に反映[8]していれば簡便な方法であるため有用であるが，今回の検討ではその縮小が必ずしも予後と相関しておらず，これのみを指標としたのでは不十分であろう．

正常妊婦の末梢血のTh/Ts比はTs細胞の増加により低下するが習慣流産症例ではTh/Ts比が高値である．[17]今回の検討でも免疫療法により有意にTh/Ts比が低下しており，妊娠継続に有利に作用していると考えられた．一般にTs細胞は妊娠維持に有利に，Tc細胞，NK細胞などは不利に作用すると考えられるが，今回の検討だけでは胎児成分に対して特異的な活性をどの程度有していたかは不明であり，必ずしも比率のみでは十分とは言えないかもしれない．Wegmannは胎盤をimmunotrophic organと考え，夫のHLAによる免疫は妻のT細胞を活性化し絨毛の増殖，分化に促進的作用のあるIL 3 やGM-CSFを放出させるとしている[21]．またマウスにおいてGM-CSFやIL- 3 投与により流産を防止し，胎児や胎盤重量の増加効果があったとしている[22]．脱落膜中の成熟T細胞は活性化されたTs細胞かTc細胞が主体でOKT-4/OKT-8 (CD 4/CD 8) 比は低下しており，また未成熟T細胞はNK細胞様であり脱落膜T細胞全体としてのIL-2の産生やIL-2に対する高い増殖能はこの細胞に由来する[20]と言われる．また免疫学的流産の機序としては抗体やTc細胞のような特異的な反応よりもNK細胞やMacrophageのような非特異的な反応の方が重要である[18, 19]との報告もある．今回検討したような末梢血中の比率がそのまま局所の状態を反映しているかどうか，それらが妊娠の継続に促進的に作用しているのか，阻害的に作用しているのか，また流産に関与しているとしても，直接，胎児成分に対して攻撃的に作用するのか，胎児成分の変性に伴い出現するのか等不明な点も多い．

以上のような免疫療法に関しての臨床成績や基礎的知見に基づく肯定的な見解に反して，妻自身のリンパ球による接種でも37%の有効率が認められた[4]こと等よりplacebo効果の可能性を指摘する向きもあり，この方向での臨床研究も行われつつある．今回の検討でも妊娠継続率71.4%であり，全体としては免疫学的諸検査は妊娠維持に有利と考えられる方向に変化していたが，臨床的予後とは必ずしも一致していなかった．症例数が少なく今後の追加検討が必要ではあるが，やはり治療対象の再検討や，臨床予後を予測し得る新たな指標の検討が必要であろう．

まとめ

反復および習慣流産症例に対して夫リンパ球皮内接種による免疫療法を施行した．12例中 5 例が妊娠継続，2 例が自然流産，5 例が治療後未妊娠であった (妊娠継続率71.4%)．治療前後のMLR，末梢血リンパ球subset検査を施行し，接種部位の皮膚紅斑の変化を比較検討した．治療前後の血清による夫婦間MLRの抑制効果 (B. E.) は全例で有意に増加した ($p<0.01$)．MLRでの夫リンパ球に対する妻リンパ球の幼若化反応は治療前後で12例中10例 (83.3%) が抑制され，有意な抑制が認められた ($P<0.05$)．これに対して対照リンパ球に対する妻リンパ球の反応も63.6%の症例で抑制されたが有意ではなかった．皮内接種後24時間と48時間の紅斑面積総和は第 1 回から第 4 回接種後で12例中11例 (90.6%) で縮小し，治療による有意な縮小が認められた ($p<0.01$)．末梢血リンパ球subsetに関しては，Th，Tc，Ts，Tsi細胞，NK細胞ともに有意な変化は認められなかったが，Th/Ts比は有意に低下していた ($P<0.05$)．今回の検討では

治療前後の各免疫学的変化と予後との間に一定の関係は認められなかった．今後更なる治療対象の再検討や臨床予後を予測し得る新たな指標の模索が必要である．

文　献

1) Taylor, C. and Faulk, W. P.: Prevention of recurrent abortion with leukocyte transfusions, Lancet, 2: 68, 1981
2) Beer, A. E., Quebbeman, J. F., Ayers, J. W. T. and Haines, R. F.: Major histocompatibility complex antigen, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortion in humans, Am. J. Obstet. Gynecol., 141: 987, 1981
3) Mowbray, J. F., Underwood, J. L., Michel, M., Forbes, P. B. and Beard, R. W.: Immunization with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage, Lancet, 2: 1398, 1985
4) Mowbray, J. F., Gibbings, C., Liddell, H., Reginald, P. W., Underwood, J. L. and Beard, R. W.: controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells, Lancet, 1. : 941, 1985
5) Gatenby, P. A., Moore, H., Cameron, K., Doran, T. J. and Adelstein, S.: Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: correlates with outcome, Am. J. Reprod. Immunol., 19: 21, 1989
6) Rocklin, R. E., Kitzmiller, J. L., Carpenter, C. B., Garovoy, M. R. and David, J. R.: Maternal-fetal relation. Absence of an immunologic blocking factor from the serum of women with chronic abortions, N. Engl. J. Med., 295: 1209, 1976
7) McIntyre, J. A., McConnachie, P. R., Taylor, C. G. and Faulk, W. P.: Clinical, immunologic, and genetic definitions of primary and secondary recurrent spontaneous abortions, Feril. Steril., 42: 849, 1984
8) 藤井知之，高見澤勝，川好　尚，十字猛夫，水野正彦：初期習慣流産の夫リンパ球による免疫療法とその評価法に関する研究，日産婦誌，41: 115, 1989
9) Faulk, W. P. and McIntyre, J. A.: Immunological studies of human trophoblast: Markers, subsets and functions, Immunol. Rev., 75: 139, 1983
10) Suciu-Foca, N., Reed, E., Rohowsky, C., Kung, P. and King, W.: Anti-idiotypic antibodies to anti-HLA receptors induced by pregnancy, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 80: 830, 1983
11) Aoki, K., Tanaka, H., Katahira, T. and Yagami, Y.: Specific immunotherapy for habitual abortion of unknown etiology, Am. J. Reprod. Immunol. Proc., 7: 137, 1985
12) Kasakura, S.: A factor in maternal plasma during pregnancy that suppresses the reactivity of the mixed leukocyte cultures, J. Immunol., 107: 1296, 1971
13) Bissenden, J. G., Ling, N. R. and Mackintosh, P.: Suppression of mixed lymphocyte reactions by pregnancy serum, Clin. exp. Immunol., 39: 195, 1980
14) Domingo-Garcia, C. G., Domenech, N., Aparicio, P. and Palomino, P.: Human pregnancy serum inhibits proliferation of T8-depleted cells and their interleukin-2 synthesis in mixed lymphocyte cultures, J. Reprod. Immunol., 8: 97, 1985
15) 安尾美年子，東間　紘，斎藤典子，田辺一成，高橋公太，寺岡　慧，太田和夫：ドナー・レシピエント間Mixed Lymphocyte Reactionに及ぼすDonor Specific Blood Transfusion後患者血清中の抑制因子の検討，移植，24: 249, 1989
16) Mueller-Eckhardt, G., Heine, O., Kunzel, W. and Mueller-Eckhardt, C.: Prevention of recurrent spontaneous abortion by intravenous immunoglobulin, Vox Sang, 56: 151, 1989
17) Virag, I., Schecter, E., Elgat, M., Zakut, H. and Meytes, D.: Lymphocyte subsets in habitual abortion, Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 12: 7, 1986
18) Gendron, R. L. and Baines, M. G.: Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice, Cell. Immunol. , 113: 261, 1988
19) Gendron, R. L. and Baines, M. G.: Morphometric analysis of the histology of spontaneous foetal resorption in a murine pregnancy, Placenta, 10: 309, 1989
20) Kanzaki, H., Sato, S. and Mori, T.: Maternal T lymphocytes in human decidualized endometrium. Developement of Preimplantation Embryos and Their Environment, p447, Alan R. Liss, Inc., 1989
21) Wegmann, T. G.: Placental immunotrophism: Maternal T cells enhance placental growth and function, Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 15: 67, 1987
22) Wegmann, T. G., Athanassakis, I., Guilbert, L., Branch, D., Dy, M., Menu, E. and Chaouat, G.: The role of M-CSF and GM-CSF in fostering placental growth, foetal growth, and foetal sur-

vival, Transplantation Proc., 21: 566, 1989

Immunological changes after lymphocyte injection therapy for habitual aborter

Mikiya Nakatsuka, Kyoko Nishikiori,
Atsushi Hasegawa, Yukio Hirano,
Takaaki Katayama, Keiji Shintani,
Jun Noma, Kenji Shimizu,
Nobutaka Yoshida and Takafumi Kudo

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

Although immunotherapy using husband lymphocyte has been reported to be effective for habitual aborters, the mechanism is still obscure.

Twelve Patients who experienced 2 or more unexplained spontaneous abortions were treated in Okayama University Hospital. Husband's lymphocytes (2.0×10^7 cells) were injected to his wife (aborter) 4 times with 2 weeks intervals.

One way mixed lymphocyte Reaction (MLR) was carried out before and after treatment. The skin reaction was estimated as the area of red flush 24 and 48 hours after injection. Subsets of wife's peripheral lymphocytes were analyzed with flowcytometry using double staining.

Seven pregnancies were recognized after immunotherapy. Two of them were accomplished as full term deliveries, 1 is now on 3rd trimester and 2 are on 2nd trimester. But 2 pregnancies were terminated as early abortions.

After immunotherapy each 12 patients' sera had significantly elevated blocking effect in oneway MLR (husband to wife) ($p<0.01$). Mean ratio of blastogenesis in MLR (husband to wife)/MLR (wife to wife) was significantly declined from 23.5 to 9.2 ($p<0.01$). The ratio of MLR (control to wife)/MLR (wife to wife) revealed no changes. The mean value of skin reaction was significantly declined from 1,570 to 700 mm^2 ($p<0.01$). Subsets of T lymphocyte and Natural killer cells revealed no specific changes in cell populations after immunotherapy but the ratio of helper T cell/suppressor T cell was declined significantly ($p<0.05$).

(受付：1992年4月20日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

STUDY ON PROGNOSTIC VALUE OF SERUM CA 125, HORMONES ASSOCIATED WITH PREGNANCY AND ULTRASONOGRAPHIC EXAMINATION IN THREATENED ABORTION

Kentaro TAKAHASHI, Saori OKADA, Kazuo YOSHINO and Manabu KITAO

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

Abstract: In a prospective study, the predictive values of serum CA 125, nine hormones (serum β-hCG, serum HPL, serum E_1, serumE_2, serumE_3, urine hCG, urine estrogen) and ultrasonograhic examination were evaluated ranging from 4 to 12 weeks of gestation in 256 pregnant women with threatened abortion. Of the 256 patients, 166 carried to term and 90 aborted. At 4 to 6 weeks of gestation, the predictive value of abortion of serum CA 125 was 70%.

When combined, the predictive value of abortion of serum CA 125, serum β-hCG and urine E was 92%. At 7 to 9 weeks of gestation, the predictive value of abortion of ultrasonographic examination, urine hCG and serum progesterone was 97%. At 10 to 12 weeks of gestation, the highest predictive value of abortion of ultrasonographic examination was 99%. It is concluded that the prognosis of patients with threatened abortion can be predicted with a high degree of accuracy after 4 weeks of gestation using serum CA 125 determination in combination with hormones associated with pregnancy.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 80—86, 1993)

Introduction

Although hormonal determinations have been used to predict the course of pregnancy for many years, it is difficult to diagnose the outcome of threatened abortion when fetal heart movement cannot be detected by means of ultrasonographic examination (i. e., prior to 8 weeks of gestation). On the other hand, together with the remarkable advances in therapy for infertility in recent year, such as IVF-ET, to avoid expensive and lengthy hospitalization, a much quicker prediction of threatened abortion is necessary. Kabowat et al.[1] reported that alternations in serum CA 125 levels may be related to secretory functions of the amnion or dissolution in amniotic fluid from the fetal coelomic epithelium and that CA 125 exists in the fetal coelomic epithelium. We[2] have previously reported that the levels of serum CA 125 change during pregnancy with high levels particularly evident at the early stage of pregnancy. We[3] also reported that the serum CA 125 levels in patients with a favourable prognosis satisfied the following criteria: ① the CA 125 level prior to 6 weeks of gestation was over 40 u/ml, ② a tendency toward a gradual decrease after 7 weeks of gestation, and ③ the CA 125 level after 13 weeks of gestation was less than 40 u/ml.

We previously examined changes in serum CA 125, β-hCG, progesterone, cortisol, HPL, E_1, E_2, E_3, urine hCG, E and ultrasonographic examination in patients with threatened abortion and we[4] confirmed the usefulness of serum CA 125 in the very early weeks of gestation. In this study, we tried to estimate the diagnostic and predictive value in patients with threatened abortion using serum CA 125, nine hormones and ultrasonographic examination.

Materials and Methods

From 1982 to 1986 a prospective randomized study was carried out on 256 pregnant women with threatened abortion ranging from 4 to 12 weeks of gestation. In all of the women, monitoring was done of serum CA 125 and nine hormones associated with pregnancy {serum human chorionic gonadotropin β subunit (β-hCG), serum progesterone, serum cortisol, serum human placental lactogen(HPL), serum estrone(E_1), serum estradiol-17 β(E_2), serum estriol (E_3), urine human chorionic gonadotropin (hCG) and urine estrogen (E)}, as well as determination of fetal heart movements by ultrasonographic examination.

All subjects had regular ovulatory cycles of 26～30 days, and the gestational age was defined as the time elapsed since the first day of the last menstrual period. Vaginal bleeding originating from the uterus, lumbago or lower abdominal pain due to uterine contraction were taken as clinical signs defining threatened abortion. Conservative treatment for patients with threatened abortion consisted of hospitalization and bed rest only, without hormonal therapy. Of the 256 patients, 90 aborted and 166 delivered normalsize babies (Apgar score over 8 points) without malformation, from 37 to 41 weeks of gestation. Therefore, we made a retrospective comparison of the 90 patients with abortion and the 166 patients with successful outcome. In these patients, after the diagnosis of pregnancy (positive qualitative pregnancy test in urine) weekly blood samples from an antecubital vein and urine samples were obtained from 8 to 10 a. m.. Blood samples were immediately centrifuged and stored at -20℃ until analyzed and urine samples were analyzed soon after collection. Serum CA 125, serum β-hCG, serum progesterone, serum cortisol, serum HPL, serum E_1, serum E_2, serum E_3, urine hCG and urine E were measured using, respectively, a CA 125 RIA kit (Centocor Inc., USA; detection limit: 8 U/ml), a β-hCG test (CIS Inc., France; detection limit: 1 ng/ml), a DAIICHI progesterone kit (DAIICHI RIA, Inc., Japan; detection limit: 0.2 ng/ml), a SPAC cortisol Ⅱ RIA kit (CIS Inc., France; detection limit: 0.1 ng/ml), GESTEFOLLOW-H semiquantitation method (TANABE Inc., Japan; detection limit: 0.02 μg/ml), an estorone test set (BAXTER TRAVENOL Inc., USA; detection limit: 10 pg/ml), an estradiol H-3 kit (CIS Inc., France; detection limit: 10 pg/ml), an estriol test set (BAXTER TRAVENOL Inc., USA; detection limit: 10 pg/ml), GONAVIS semiquantitation method (MOCHIDA Inc., japan; detection limit: 1 IU/L), and HI-ESTROTEC SLIDE (MOCHIDA Inc., Jpan; detection limit: 10 ng/ml). The apparatus used for ultrasonographic examination was a Sonovista-PH (3.5 MHz). The ultrasonographic examination was carried out after 6 weeks of gestation.

The cut-off value for each hormone was determined as the most significant difference levels in patients with abortion and with successful outcome. A positive ultrasonographic examination was defined no detection of fetal heart movements (Table 1). On the basis of the cut off value defined, each parameter was classified as positive or negative and as good or poor prognosis, and was assessed to the following gestational ages: 4 to 6 weeks, 7 to 9 weeks and 10 to 12 weeks of gestation. The predictive significance (predictive value of abortion, predictive value of successful outcome,

Table 1 Cut-off value of each marker

	marker		gestational age (weeks) 4-6	7-12
serum	CA 125	U/ml	50	50
	β-hCG	ng/ml	30	120
	progesterone	ng/ml	13	13
	cortisol	ng/ml	17	17
	HPL	μg/ml	0.2	0.2
	E_1	pg/ml	400	400
	E_2	pg/ml	800	800
	E_3	pg/ml	40	40
urine	hCG	IU/L	5×10^3	30×10^3
	E	ng/ml	100	200
F. H. M.			Ultrasonographic examination without fetal heart movement	

For each of the hormones, a "positive" result was recorded when a level below the respective cut-off value was obtained.

Ultrasonographic examination was carried out after 6 weeks of gestation.

sensitivity, specificity) of the eleven parameters individually and in combination were then calculated. The predictive value, sensitivity and specificity were defined by the following formulae:

$$\text{Predictive value for abortion} = \frac{TP}{TP+FP}$$

$$\text{Predictive value for successful outcome} = \frac{TN}{TN+FN}$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP+FN}$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN+FP}$$

where true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP) and false negative (FN) were defined as;

TP: abnormal values with pregnancy ending in abortion,

TN: normal values with pregnancy carried to term,

FP: abnormal values with pregnancy carried to term,

FN: normal values with the pregnancy ending in abortion.

The χ^2 test with Yates' correction was used for the statistical analysis.

Results

1) Predictive values ranging from 4 to 6 weeks of gestation in patients with threatened abortion.

Serum CA 125 and β-hCG had the highest predic-

Table 2 Predictive values, sensitivities and specificities by marker measurments and ultrasonographic examination ranging from 4 to 6 weeks of gestation

marker	Pre.ab (%)	Pre.su (%)	Sen. (%)	Spec. (%)	Significance P
serum CA 125	70	89	81	81	<0.001
β-hCG	70	83	75	79	<0.001
progesterone(P)	57	84	64	79	<0.001
cortisol	30	78	57	54	ns
HPL	27	67	95	4	ns
E_1	13	86	67	33	ns
E_2	18	90	92	15	ns
E_3	19	78	87	11	ns
urine hCG	39	87	76	56	<0.001
E	59	78	71	68	<0.001
F.H.M.	41	100	100	26	ns
CA125+E	84	85	84	85	<0.001
β-hCG+P	82	87	79	89	<0.001
CA125+P	81	88	81	88	<0.001
CA125+ β-hCG	80	89	88	82	<0.001
CA125+ β-hCG+E	92	88	89	92	<0.001
β-hCG+P+E	88	87	85	90	<0.001
CA125+ β-hCG+P	85	93	92	87	<0.001
CA125+P+E	84	86	84	86	<0.001
CA125+ β-hCG+P+E	92	90	91	90	<0.001

Pre. ab: Predictive value of abortion
Pre. su: Predictive value of successful outcome
Sen.: Sensitivity
Spec.: Specificity
F.H.M.: Ultrasonographic examination was carried out after 6 weeks of gestation.
Significance: χ^2 test with Yates' correction

tive values of abortion (70%), whereas serum CA 125 and serum β-hCG had the highest predictive values of a successful outcome 89% and 83%, respectively. The highest predictive value was obtained using a combination of three parameters (serum CA 125, β-hCG and urine E) (Table 2).

2) Predictive values ranging from 7 to 9 weeks of gestation in patients with threatened abortion.

Serum β-hCG had the highest predictive value of abortion (74%). On the other hand, the negative level of ultrasonographic examination signified successful outcome in 94% of the cases. High predictive value and high sensitivity were obtained when combining the parameters, urine hCG, serum progesterone and ultrasonographic examination or serum β-hCG, progesterone, urine hCG and ultrasonographic examination (Table 3).

3) Predictive value ranging from 10 to 12 weeks of gestation in patients with threatened abortion.

Ultrasonographic examination had a 99% predictive value of both abortion and successful outcome. Combinations of parameters produced similarly good results (Table 4).

Discussion

In our study, CA 125 and β-hCG had the highest

Table 3 Predictive values, sensitivities and specificities by marker measurments and ultrasonographic examination ranging from 7 to 9 weeks of gestation

marker	Pre. ab (%)	Pre.su (%)	Sen. (%)	Spec. (%)	Significance P
serum CA 125	31	76	50	59	ns
β-hCG	74	86	85	92	<0.001
progesterone(P)	65	90	75	84	<0.001
cortisol	31	76	53	56	ns
HPL	34	90	98	10	ns
E_1	55	86	77	69	<0.001
E_2	46	87	81	58	<0.001
E_3	38	86	88	35	<0.05
urine hCG	67	83	69	82	<0.001
E	55	83	73	68	<0.001
F.H.M.	67	94	83	88	<0.001
β-hCG+P	90	91	92	95	<0.001
F.H.M.+P	88	98	96	95	<0.001
F.H.M.+β-hCG	88	98	96	93	<0.001
F.H.M.+hCG	78	97	92	96	<0.001
F.H.M.+hCG+P	97	99	97	99	<0.001
F.H.M.+hCG+β-hCG	97	97	94	99	<0.001
β-hCG+P+hCG	96	96	90	99	<0.001
F.H.M.+β-hCG+P	94	100	100	97	<0.001
F.H.M.+β-hCG+P+hCG	100	100	100	100	<0.001

Pre. ab: Predictive value of abortion
Pre. su: Predictive value of successful outcome
Sen.: Sensitivity
Spec.: Specificity
F.H.M.: Ultrasonographic examination was carried out after 6 weeks of gestation.
Significance: χ^2 test with Yates' correction

predictive values of abortion (70%) of any single parameter at 4 to 6 weeks of gestation respectively. With combined determination, the predictive value of abortion of serum CA 125, serum β-hCG and urine E was 92%.

Single or combined hormone determinations have been widly used to predict the course of pregnancy in cases of threstened abortion, but almost all reports have dealt with this problem after 6 weeks of gestation.

Gerhard and Runnebaum[5] had the only one to report on the diagnostic value of β-hCG ranging from 4 to 6 weeks of gestation. They found that a disturbed course of pregnancy was diagnosed correctly with the help of β-hCG in only 26% of the cases. Their results 26% was sensitivity of abortion, lower than our results 75%. The reason was that they dealt with randomly chosen pregnant women (both women with symptoms and women without symptoms), otherwise we dealt with patients of threstened abortion (have uterine contraction or genital bleeding).

It has been reported that CA 125 can be localized immunohistochemically in the decidua[5], in the invasive trophoblast[7], in the fetal coelomic epithelium at an early stage of gestation[1]. CA 125 may be producted in these places, and leak into the amniotic fluid and maternal blood. CA 125 in early pregnancy suggests a role in the establishment of pregnancy. The

Table 4 Predictive values, sensitivities and specificities by marker measurments and ultrasonographic examination ranging from 10 to 12 weeks of gestation

marker	Pre. ab (%)	Pre.su (%)	Sen. (%)	Spec. (%)	Significance P
serum CA 125	42	71	70	43	ns
β-hCG	82	86	89	78	<0.001
progesterone (P)	90	89	78	95	<0.001
cortisol	54	75	66	65	ns
HPL	63	90	91	61	<0.001
E_1	90	93	90	93	<0.001
E_2	89	98	97	91	<0.001
E_3	69	91	88	74	<0.001
urine hCG	85	67	64	87	<0.001
E	68	78	68	77	<0.001
F.H.M.	99	99	97	99	<0.001
F.H.M.+P	100	99	97	100	<0.001
F.H.M.+E_1	97	100	100	98	<0.001
F.H.M.+E_2	96	100	100	98	<0.001
E_1+E_2	93	97	96	95	<0.001
F.H.M.+E_1+P	100	100	100	100	<0.001
F.H.M.+E_2+P	100	100	100	100	<0.001
S-E_1+E_2+P	100	97	95	100	<0.001
F.H.M.+E_1+E_2	96	100	100	97	<0.001
F.H.M.+E_1+E_2+P	100	100	100	100	<0.001

Pre. ab: Predictive value of abortion
Pre. su: Predictive value of successful outcome
Sen.: Sensitivity
Spec.: Specificity
F. H. M.: Ultrasonographic examination was carried out after 6 weeks of gestation.
Significance: χ^2 test with Yates' correction

exact mechanism of CA 125 production in early stage of pregnancy and passage into blood fluid still remain uncertain.

In this study we have found that serum β-hCG and fetal heart movement by ultrasonographic examination were useful to predict the threatened abortion ranging from 7 to 9 weeks of gestation and ultrasonographic examination had a high predictive value ranging from 10 to 12 weeks of gestation.

After 6 weeks of gestation, predictive values of abortion with single hormone determination were reported, as follows: serum β-hCG, 89%[8,9] and 74%[5]; serum progesterone, 86.7%[10], 85%[9] and 58%[11]; serum HPL, 62%[12] and 34%[5]; serum E_2, 95%[8], 82%[5] and 52%[11]; serum E_3, 65%[5]; serum pregnancy-specific β-glyco-protein (SP-1), 92%[12] and 82.1%[1]. On the other hand, with combined determination, the predictive value of abortion of serum hCG and E_2 were 100%[13] and 90% [9]; serum hCG and progesterone, 100%[9]; serum hCG and HPL, 94%[12]; serum hCG and E_3, 100%[13]; serum hCG and SP-1, 100% [12]; serum HPL and SP-1, 93%[12]; serum E_2 and progesterone, 100%[9]; and serum hCG, progesterone and E_2, 100%[9]. Eriksen and Philipsen[11] reported that ultrasonographic examination has a high diagnostic accuracy from 6 weeks of gestation and seems to be 100% reliable after 9 weeks of gestation in patients with threatened abortion. After 7 weeks of gestation, our results were similar to those results of some previous reports.

We therefore conclude that measurement of serum CA 125 is effective for diagnosing the outcome of threatened abortion ranging from 4 to 6 weeks of gestation. In summary, the stage of gestation must be taken into consideration in selecting the parameter with the highest predictive value of abortion in patients with threatened abortion. The prognosis of the course of pregnancy can be predicted with high accuracy at an early stage of gestation using the above methods with serum CA 125 determination in combination with hormons associated with pregnancy.

References

1) Kabawat, S. E., Bast, R. C., Bhan, A. K., Welch, W. R., Knapp, R. C. and Colvin, R. B.: Tissue distribution of a coelomic epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC 125, Int. J. Gynecol. Pathol., 2: 275, 1983

2) Takahashi, K., Yamane, Y., Yoshino, K., Shibukawa, T., Matsunaga, I. and Kitao, M.: Studies on serum CA 125 levels in pregnant women, Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., 37: 1931, 1985

3) Yamane, Y., Takahashi, K., Yoshino, K., Shibukawa, T., Shirai, T., Nishigaki, A. and Kitao, M.: Prognostic potential of serum CA 125 levels in patients with threatened abortion, Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., 38: 1781, 1986

4) Yamane, Y., Takahasi, K. and Kitao, M.: Prognostic potential of serum CA 125 levels and pregnant markers in threatened abortion, Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., 41: 1999, 1989

5) Gerhard, I. and Runnebaum, B.: Predictive value of hormone determinations in the first half of pregnancy, Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., 17: 1, 1984

6) Ikarashi, T. and Takeuchi, S.: Immunohistochemical localization of placental proteins and tumor-associated antigens in endometrial cancer and endometrial hyperplasia, Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., 39: 1634, 1987

7) Ohkubo, Y.: Localization of CA 125 in human female genital tract and tissues of fetal origin, J. Nihon Univ. Med. Asso. (with abstract in English), 46: 1263, 1987

8) Dessaive, R., de Hertogh, R. and Thomas, K.: Correlation between hormanal levels and ultrasound in patients with threatened abortion, Gynecol. Obstet. Inves., 14: 65, 1982

9) Jouppila, P., Huhtaniemi, I. and Tapanainen, J.: Early pregnancy failure; Study by ultrasonic and hormonal methods, Obstet. Gynecol., 55: 42 1980

10) Salem, H. T., Ghaneimah, S. A., Shaaban, M. M. and Chard, T.: Prognostic value of biochemical tests in the assessment of fetal outcome in threatened abortion, Brit. J. Obstet. Gynaecol., 91: 382, 1984

11) Eriksen, P. S. and Philipsen, T.: Prognosis in threatened abortion evaluated by hormone assays and ultrasound scanning, Obstet. Gynecol., 55: 435, 1980

12) Dessole, S., Posadino, P. M., Pirisi, G., Cossu, L., Riggio, V. and Cherchi, P. L.: SP-1, HPL and HCG determination in the prognostic evaluation of threatened abortion, J. Foetal Med., 4: 43, 1984

13) Hertz, J. B.: Diagnostic procedures in

threatenend abortion, Obstet. Gynecol., 64: 223, 1984

血清CA125及び各種マーカーを使用した切迫流産の予後判定

島根医科大学医学部産科婦人科学教室
(主任：北尾　学教授)

高橋健太郎　岡田さおり　吉野和男
北尾　学

切迫流産の予後診断法を確立するために，妊娠4週から12週までの切迫流産患者256名) 正常児を得た予後良好例：166名，流産に終った：90名) を対象とし，従来より用いられている血中β-hCG，progesterone，cortisol，HPL，E_1，E_2，E_3，尿中hCG，Eの測定及び超音波診断法に加えて血中CA125を測定し，retrospectiveに，検討し，以下の結果を得た．1．血中CA 125測定は単独で，妊娠4週から6週の流産を70%予測できる．2．妊娠4週から6週で血中CA 125，血中β-hCG，尿中hCGのcombination assayは流産を92%予測できる．3．妊娠7週から9週では超音波検査，尿中hCG，血中progesteroneのcombination assayで流産を97%予測できる．4．妊娠10週から12週では超音波検査が最も有効であり，単独でも流産を99%予測できる．

以上より血中CA 125を測定し，従来からのホルモン測定を組み合わせることにより妊娠初期 (4 ～ 6 週) の切迫流産の予後判定が可能である。

(受付：1992年4月20日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

経腟超音波断層法による妊娠初期の予後判定

Early Pregnancy Outcome Predicting with Transvaginal Ultrasonography

札幌医科大学産婦人科学講座

中町悟子 Satoko NAKAMACHI
井上雄子 Yuko INOUE
福江ひろみ Hiromi FUKUE
幡洋 Hiroshi HATA
山本弘 Hiroshi YAMAMOTO
田中昭一 Shoichi TANAKA
工藤隆一 Ryuichi KUDO

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

当科不妊外来通院中に妊娠した161例を対象とし経腟超音波断層法にてGS (gestational sac), FHM (fetal heart movement) を観察測定し，妊娠初期の予後との関係を検討した．予後良好な妊娠継続例では，GSは妊娠4週前半から陽性になり，5週でほぼ100%陽性となった．FHMは妊娠4週後半から確認され，7週でほぼ100%確認された．GS最大径11mmでFHMが確認されはじめ，25mmでほぼ100%確認された．妊娠5週後半でGSの確認ができない症例，7週以降あるいはGS最大径26mm以上でFHMが確認できない症例は流産の可能性が高く，妊娠6週前半までにFHMが確認できた症例では流産はなかったが，6週後半以降に確認された場合，7週で9.0%，8週で3.2%が流産した．最初のFHM確認が妊娠6週後半以降の場合，妊娠8週以降まで慎重な経過観察が必要であることが示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 87—90, 1993)

緒　言

流産の可能性を妊娠初期に判定するために，今日では超音波断層法による画像診断と尿中hCG測定などによる生化学的診断が行なわれている．このうち超音波断層法では，予後判定のためにGS (gestational sac)，CRL (crown rump length) 等の増大程度も重要な因子であるが，FHM (fetal heart movement) の有無が最も重要であると考えられている[3,4]．経腹超音波断層法では，予後良好な妊娠継続例では妊娠6週よりFHMが確認されはじめ，妊娠8週では，ほぼ100%FHMが確認される．また，FHMが確認できた症例では，その後の流産率は，1～2%，多くても3%と極めて低い[5-7]．しかし，経腟超音波断層法により，FHMの確認は妊娠4週後半より可能となった．そして，妊娠6週以前にFHMが確認された場合その後の流産率は，6%になり，さらにより早く5週でFHMが確認された例の22%が流産に至ったなどの報告[5-8]もあり，妊娠初期にFHMが確認できても，流産に至る症例は意外に多いと考えられる[5,8]．そこで今回我々は妊娠週数を推定し得る症例で，経腟超音波断層法により，FHMを観察，GSを測定し，妊娠初期の予後について検討したので報告する．

対象および方法

札幌医科大学産婦人科不妊外来通院中に妊娠した21歳から40歳までの婦人のうち，基礎体温の高温相への移行，もしくは，経腟超音波断層法による主席成熟卵胞の消失及びその後の黄体形成により排卵日を推定し得た161症例を対象とした．妊娠週数はこの排卵日より推定した．これらの症例の中には，排卵誘発剤を使用した症例も含まれているが，GSが2

個以上確認された多胎および子宮外妊娠の例は除外した．また，妊娠22週以降まで妊娠が継続した症例を妊娠継続例とした．なお，経腟超音波断層法は，アロカSSD-650.モチダソノビスタMEU-1579を使用した．

成　績

1) 流産率

妊娠例161例の予後は，妊娠継続124例，流産37例で全流産率は23.0%であった．流産例のうち，FHMが確認できた後，流産に至った症例は13例 (35.1%) であった．また，FHMが確認できずに流産に至った症例が24例 (64.9%) であった．なお，平均年齢は，妊娠継続例で30.7歳であり，流産例の31.7歳と差はなかった (表1).

表1　(対象：流産率と年齢)

対象	札幌医大産婦人科不妊外来通院中に妊娠し，排卵日を特定できた161例 妊娠継続率　124例 流産率　37例			
全流産率	161例中	37例	23.0%	(100%)
	FHM (+)	13例	8.0%	(35.1%)
	FHM (−)	24例	15.0%	(64.9%)
年齢	妊娠継続例	23〜40歳	(平均30.7歳)	
	流産例	21〜39歳	(平均31.2歳)	
	FHM (+) 13例	21〜39歳	(平均31.2歳)	
	FHM (−) 24例	24〜39歳	(平均31.5歳)	

2) 妊娠継続例での週数別GS陽性率

GSは，妊娠4週0日より陽性となりはじめた．そして，妊娠4週3日までにすでに58.8%の症例でGS陽性になり，妊娠5週0日までには90.6%に確認された．妊娠5週以降では，妊娠5週3日になってもGSが認められなかった1例を除く全症例で，GS陽性となった (図1).

3) 妊娠継続例の週数別FHM陽性率

妊娠5週5日まではFHM陽性率は10%以下と低率であった．その後，妊娠6週0日で累積陽性率は38.5%，妊娠6週1日で60.0%，妊娠6週2日で80.5%，妊娠6週3日で90.6%と急速に上昇した．その後，妊娠7週以降では，7週0日までFHMが確認できなかった1例を除く全症例でFHMが確認できた (図2).

4) 妊娠継続例のGS最大径とFHM陽性率

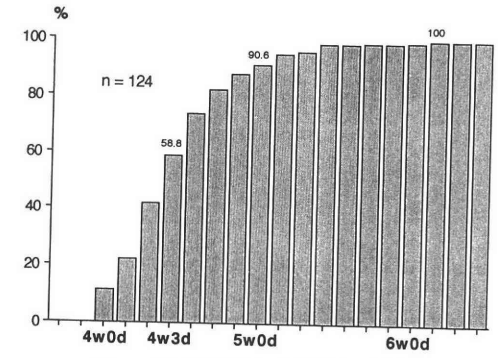


図1　妊娠継続例の週数別GS陽性率

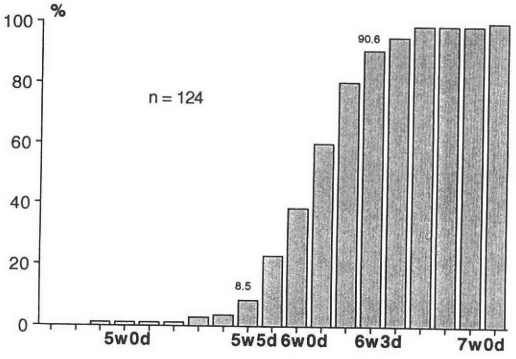


図2　妊娠継続例の週数別FHM陽性率

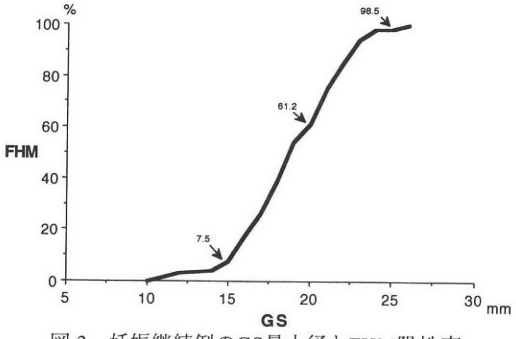


図3　妊娠継続例のGS最大径とFHM陽性率

GS最大径11mmでGS陽性になりはじめ，GS最大径15mmまではFHM陽性率は7.5%と低率であった．その後，GS最大径が，25mmになると，FHMの累積陽性率は98.5%と高率となり，25mmでFHMが確認できなかった1例を除く全症例でFHMが確認できた．逆に，GS最大径26mm以上でFHMが確認できなかった症例は全例流産に至った (図3).

5) 最初にFHMが確認できた週数とその予後妊娠6週前半までにFHMが確認できた症例では流産に至っ

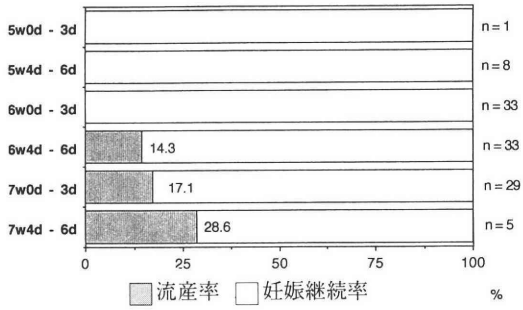


図4　最初のFHM陽性の週数と流産率

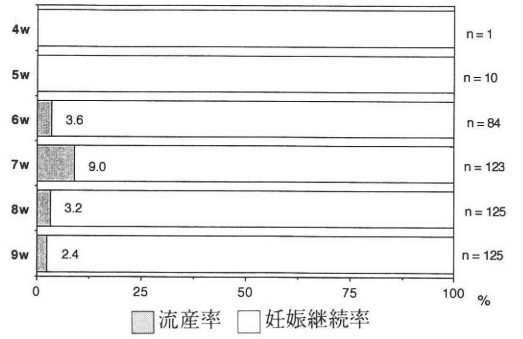


図5　FHM陽性例の週数別流産率

た症例はなかった．一方，最初にFHMが妊娠6週後半に確認できた33症例中の3例14.3%，7週前半に確認できた29症例中の6例17.1%，7週後半に確認できた5症例中の2例28.6%が流産に至った (図4)．

6) FHM陽性例の週数別流産率

妊娠7週においてFHM陽性である全症例のうち123症例中11例9.0%が，妊娠8週においてFHM陽性である125症例のうち4例3.2%が流産に至った (図5)．

考　察

近年，超音波断層法の発達により産婦人科領域の画像診断は著しく進歩してきた．さらに，女性の解剖学的特徴をうまく利用した経腟超音波断層法の急速な普及により[9]，妊娠初期の診察は一変し，診断精度も画期的に向上した．

今回，我々は妊娠週数を推定し得る症例で，経腟超音波断層法により，GSおよびFHMを観察測定し，妊娠初期症例の妊娠継続の予後について検討した．症例のなかには排卵誘発剤を使用した症例も含まれるが，多胎の症例は除外しており不妊の治療法や年齢などにより流産率に有意差はなかった．Bohrer [1]らは，hMG-hCG療法での流産率は25.6%であったと報告しているが，Ben Rafae [2]らは卵巣刺激により流産率が高くなるのはかなり過剰に刺激したごく一部の症例に限られるとしている．今回の流産率は23.0%と自然流産率10～15%に比較し高率な結果となったが，対象が習慣流産症例や排卵誘発症例が含まれているため流産率が高くなったとおもわれる．今回の成績では，予後良好な妊娠継続例では，妊娠4週前半よりGS陽性となりはじめ，5週になるとGS陽性率は，ほぼ100%となった．これは，妊娠4週でGS陽性となり始め，妊娠5週では，GS陽性率は，ほぼ100%になるという諸家の報告と同様の結果であった[4,8,10,11]．FHMについては高階[4]らによると，妊娠4週後半よりFHMの点状像の存在にて，胎児を判定できるとしている．清水[10]によるとFHM検出率は，妊娠5週で28.9%，6週前半で71%，6週後半で97.4%，7週前半で100%であると報告している．また，石原[12]によると，FHMは，妊娠5週より検出可能で，6週後半までに100%検出されたとしている．竹内[9]らは，妊娠5週末ですでにほぼ100%の心拍検出率が期待できるとしている．このように，FHMが確認される時期は，妊娠4週後半～5週後半まで多少のばらつきはあるが，妊娠6週後半までにFHMは，90%以上で確認され，妊娠7週になると，FHMはほぼ100%確認されている．以上の報告や今回の結果より，妊娠5週後半でGSが確認できない症例，妊娠7週以降でFHMが確認できない症例は，流産の可能性が非常に強いと考えられた．

予後良好な妊娠継続例では，GS最大径が11mmでFHMが確認されはじめ，24mmでは，ほぼ100%にFHMが確認された．GS最大径とFHMの確認については，de-Crespingny[13]らは，GS平均最大径12mmでほぼ100%の精度でFHMの検出が可能であると報告している．

また，高階[4]らは，GS最大径17mmで100% FHMが確認できたと報告している．しかし，今回の我々の結果では上述のようにGS最大径25mmでほぼ100%FHMが確認される成績であった．これは，Goldstein[14]らのblighted ovumの診断基準が25mmであることにほぼ一致した．もちろん，妊娠初期症例の予後の判定において予後不良であると確定的に診断するには，総合的かつ経時的な測定が必要であり，GS最大径とFHM検出との関係についてGS26mmをもって絶対的な診断基準とすることはできない．しかし，GS最大径26mm以上でFHMが確認できなければ，流産の可能性が非常に強いと考えられた．

今回の成績では，FHMが妊娠6週前半までに確認

された症例で流産に至った症例はなかった．Rosen[15]らは，FHMが早期に確認されるほど，妊娠の予後が良好であると報告している．そして，FHMは心脈管系の発育を適切に表現し，どんな因子であろうがこの発育を遅らせるということは，流産の危険を増加させるとしている．我々の結果でもFHMが早期に確認されるほど，流産率が低いという結果が得られたが，妊娠4，5週でFHMが確認できた症例数が少ないこともあり，この点については今後さらに検討が必要とおもわれる．また，妊娠7週においてFHM陽性である全症例のうち9.0%，妊娠8週において3.2%の症例が流産に至った．以上の結果より，最初のFHM確認が妊娠6週後半以降である場合，8週以降まで慎重な経過観察が必要であることを示していると考えられた．

本論文要旨は，第36回日本不妊学会総会 (名古屋 1991) において発表した．

文　献

1) Bohrer, M., Kemmann, E.: Risk factors for spontaneous abortion in menotropin-treated women, Fetil. Steril., 48: 571, 1987
2) Ben-Rafael, Z., Dor, J., Mashiach, S., Blankstein, J., Lunenfeld, B., Serr, D. M.: Abortion rate in pregnancies following ovulation indeced by human menopausal gonadtropin/human chorionic gonadtropin, Fetil. Steril., 39: 157, 1983
3) 石川睦男，西野共子，浅川竹仁，笠茂光範，清水哲也：超音波学的にみた予後判定，産婦実際，36: 1441, 1987
4) 高階俊光，神谷博文，東口篤司，森若　治：経腟プローブによる画像診断，産婦の実際，39: 947, 1990
5) 高田道夫，吉田幸洋：初期流産の診断と処置，産と婦，56: 656, 1989
6) 千葉喜英，佐々木記久子：妊娠初期の超音波診断，産婦治療，49: 285, 1984
7) 衛藤真理：GS－切迫流産の診断と予後判定，産婦人科Mook, 20, 金原出版，29, 1982
8) 佐藤孝道，児島孝久，安田摂子，高橋敬一，笠井剛：経腟超音波法による初期妊娠像とその予後，産婦治療，56: 649, 1989
9) 竹内　久爾，吉田幸洋：体腔内走査法～産婦人科領域，日超医論文集，49: 21, 1986
10) 清水哲也：流産，外妊の超音波診断，産婦治療，62: 279, 1991
11) 中村　靖，伊藤　茂他：経腟法による妊娠初期超音波所見について，日超医論文集，57: 381, 1990
12) 石原楷輔，菊池三郎：経腟，経直腸超音波検査法，産婦治療，57: 560, 1988
13) Goldstein, S. R.: Early pregnancy scanning with endovaginal probe, Obstet. Gynecol., 31: 54, 1988
14) Rosen, G. F., Asch, R. H., Silva, P. D., Yee, B., Patrizio, P.; Predicting pregnancy outcome by the ovservation of a gestational sac or of early fetal cardiac motion with transvaginal ultrasonography, Fertil. Steril., 54: 260, 1990

Early pregnancy outcome predicting with transvaginal ultrasonography

Satoko Nakamachi, Yuko Inoue,
Hiromi Fukue, Hiroshi Hata,
Hiroshi Yamamoto, Shoichi Tanaka
and Ryuichi Kudo

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

To predict early pregnancy, we observed gestational sac and fetal heart movement. The object was 161 couples who were treated for infertility, had become pregnant, and could estimate the date of ovulation. In the successive going cases, GS was visible at the former half of 4th week of gestation. The rate that GS was visible at 5th week of gestation was about 100%. FHM could be detected at the latter half of 4th week of gestation. The rate of FHM detection was about 100% at 7th week of gestation. And FHM began to be detected when the largest diameter of GS was 11mm, the rate of FHM detection was about 100% when the largest diameter of GS was 25mm. So the cases that GS was invisible at the latter half of 5th week of gestation, or FHM could not be detected when the largest diameter of GS was 26mm were thought to have much possibility of the abortion. None of the cases in which FHM were detected by the first half of 6th week of gestation resulted in the abortion. But the rate of the abortion at 7th week was 90%, and at 8th week was 3.2%. We concluded that the careful observation until after 8th week was necessary to the cases which the first FHM was detected after the latter half of 6th week of gestation.

(受付：1992年6月1日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

子宮卵管造影法 (HSG) の不妊症に対する治療効果の検討

Therapeutic Efficacy of Hysterosalpingography (HSG) in Infertility, a Prospective, Randomized, Clinical Study

九州大学医学部婦人科学産科学教室
緒方りか　中村元一　内海善夫
Rika OGATA　Gen-ichi NAKAMURA　Yoshio UCHIUMI
横山幹文　渡辺良嗣　野崎雅裕
Motofumi YOKOYAMA　Yoshitsugu WATANABE　Masahiro NOZAKI
佐野正敏　中野仁雄
Masatoshi SANO　Hitoo NAKANO
Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine,
Kyusyu University, Fukuoka 812, Japan

不妊症に対する子宮卵管造影法 (HSG) の治療効果を評価するために無作為に分けた2群においてHSGの有無によって妊娠率に差があるか否かを検討した．HSGには油性造影剤 (リピオドールウルトラフルイド®) を用い，透視下で行った．全症例302例を初診後速やかにHSGを施行する群 (HSG群) 148例と初診後4周期以内には施行しない群 (対照群) 154例とに分け，観察期間の4周期に満たない症例を除外しHSG群105例，対照群85例を得，それぞれの4周期間の妊娠率を比較した．両群の背景として，年齢・不妊期間・原発性不妊の割合・男性不妊の割合・性交後試験不良の割合について検定したところ有意差を認めなかった．その結果，HSG群の妊娠率23.8% (105例中25例) 対照群の妊娠率8.2% (85例中7例) で両群間に有意差を認めた (P<0.01)．したがってHSGは妊娠成立に何らかの治療的意義を持つものと考えた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 91—94, 1993)

緒　言

子宮卵管造影法 (hysterosalpingography: HSG) は不妊症の重要な検査のひとつであるが，同時に治療法としても有効であるといわれている[1-10]．しかしHSGは不妊症の検査開始後早期に行われることが多く，同時に他の検査治療も行われるため，HSGのみが治療に及ぼす効果の判定は困難である．過去の報告でもprospectiveにHSGの効果のみを検討したものはほとんど見られない．そこで我々は，不妊を主訴とした症例において，油性造影法を用いたHSG施行の有無によって妊娠率に差があるか否かをprospective，無作為に検討したので報告する．

対象および方法

九州大学医学部附属病院産科婦人科不妊外来を1989年11月から1991年2月までに挙児希望を主訴として初診した症例のうち，無排卵症例，習慣流産，他院での検査治療後の紹介例を除き，また患者の同意の得られた302症例を無作為に，初診後速やかにHSGを施行する群 (HSG群) 148例と初診後4周期以内には施行しない群 (対照群) 154例とに分けた．妊娠の成立しなかった対照群についてはその後HSGを施行し，その妊娠率についても検討した．この間のHSG以外の検査・治療は同等に行い，HSGは油性の造影剤 (リピオドールウルトラフルイド®，小玉製薬)

を用いて透視下で行った．HSG群のHSG後4周期以内の妊娠率と対照群の初診後4周期以内の妊娠率を比較した．有意差検定にはカイ二乗検定を用い，5%以内の危険率を有意差ありとした．

結　果

観察期間の4周期に満たない症例を対象から除外したところHSG群は105例，対照群は85例であった．各群の平均年齢は，HSG群30.7±4.1歳，対照群30.5±3.5歳，平均不妊期間は，HSG群4.2±4.5年，対照群3.9±2.7年であった．原発性不妊の割合は，HSG群 105例中71例 (67.6%)，対照群 85例中59例 (65.4%)，性交後試験不良例の割合はHSG群87例中33例 (37.9%)，対照群67例中29例 (43.3%)，男性不妊の症例はHSG群 70例中7例 (10.0%)，対照群 55例中7例 (12.7%) と，以上いずれにおいても両群間に有意差は認められなかった (表1)．初診後4周期以内に妊娠した症例は，HSG群105例中25例 (23.8%)，対照群85例中 7 例 (8.2%) で両群間に 1 %以下の危険率で有意差を認めた (表2)．妊娠の予後については両群間に差はなかった．

対照群のうち4周期までに妊娠しなかった症例の32例に 5 周期目以降にHSGを施行したところ (対照－HSG群)，9 例に妊娠が成立し (28.1%)，HSG群に近い成績が得られた (表3)．

またHSG後妊娠の成立周期についてみるとHSG群でも対照－HSG群でもHSG施行周期に妊娠が成立した例が多かった (表4)．

表1　両群の背景の比較

	HSG群 (n=105)	対照群 (n=85)	
年齢	30.7 ± 4.1	30.5 ± 3.5	NS
不妊期間	4.2 ± 4.5	3.9 ± 2.7	NS
原発性不妊の割合	71/105 (67.6%)	59/85 (65.4%)	NS
男性不妊の割合	7/70 (10%)	7/55 (12.5%)	NS
性交後試験不良の割合	33/87 (37.9%)	29/67 (43.3%)	NS

表2　両群における妊娠率

	4周期以内の妊娠例	4周期以内の非妊娠例	妊娠率
HSG群 (n=105)	25	80	25/105* (23.8%)
対照群 (n=85)	7	78	7/85* (8.2%)

* P＞0.01

表3　対照－HSG群の妊娠率

	4周期以内の妊娠例	4周期以内の非妊娠例	妊娠率
対照－HSG群 (n=32)	9	23	9/32(28.1%)

表4　HSG後妊娠の成立周期

	HSG群 (n=25)	対照－HSG群 (n=10)	計(n=35)
HSG施行周期	9	5	14 (40.0%)
次周期	5	1	6 (17.1%)
次々周期	6	3	9 (25.7%)
次々々周期	5	1	6 (17.1%)

考　察

我々は油性造影剤を用いた透視下でのHSGを不妊症に対するルーチン検査のひとつとして行っており，日常HSG施行後に妊娠成立が多いという印象を持っていた．しかしながら不妊を主訴として来院した患者に対しては，当然基礎体温法や尿中・血中ホルモン測定による受胎指導，性交後試験，排卵誘発やluteal supportなども並行して行われることが多く，妊娠に関与した治療を同定することはもちろん，治療が妊娠に関与したか否かを判断することも困難である．このためHSGの治療法としての有用性を説いた文献は多いが[1-10]，統計的に論じたものは少なく，調べた範囲ではWeirらの他の検査所見には異常のない32例についてHSG後2周期以内の妊娠例が27例中9例で来院後HSGを行わなかった2周期以内の妊娠例29例中2例に比べ高かったという報告[5]と，PalmarらのHSG後4周期以内の妊娠例が258例中147例 (57%)，1年以内の妊娠例が258例中193例 (75%) と同病院でHSGをしていない時期の約3倍の妊娠率であったという報告[10]があるに過ぎない．造影剤の種類についての比較をした報告は近年比較的多く[11-15]，妊娠率については油性造影剤のほうが高いという報告[15]もあるが，prospective randamized study[12,13]では有意差はないと報告されている．

我々は油性造影剤によるHSG施行群と初診後ただちには施行しない対照群とをprospectiveに設定し，それぞれの4周期以内の妊娠率を比較した．無作為に分けた二群についてその背景を比較し原発不妊の割合，年齢，不妊期間については有意差はなかった．限られた期間の症例すべてに性交後試験・精液検査を十分行うことやHSGのみで卵管疎通性を正確に診断することは困難であるが，得られた検査結果の範囲では両群間の背景に有意差はないと考えられた．その結果HSG群の妊娠率23.8%，対照群の妊娠率8.2%とHSG群のほうが危険率1%以下で有意に高いという結果を得た．したがってHSGは妊娠成立に何らかの治療的意義を持つと考えられる．表3のごとく対照群のうち妊娠の成立しなかった症例にHSGを行いHSG群と近似の妊娠率を得たことは，このことと矛盾しない結果と思われる．

HSGが妊娠成立に関与する機序については不明であるが，造影剤の通過による卵管の通過経路の解放という物理的効果については古くより推測されている[9]．また卵管運動や腹水組成への影響[16]などによる卵の取り込みや輸送に対する機能的効果も関与しているのかもしれない．この点については今後の基礎的検討が必要である．

妊娠の成立した周期についてみると予想されたとおりHSG施行周期にもっとも多かった．過去の報告[9)17)]でもHSG施行周期の妊娠例は高い比率を占めているようである．HSG後どのくらいの期間をHSGの関与した妊娠と仮定するかは難しい問題であるが，臨床的治療効果があると考えた場合HSGを待機できる限界があるので今回は両群を4周期ずつとして検討した．HSG以外の検査・治療についても全く行わないほうがより正確なcontrol studyとなるが臨床上不可能であり倫理的にも許容されることではないので同等に行うこととした．HSG後の妊娠率は21%[17)]～75%[10)]と報告によりかなり異なるが，前述のようにHSG後何周期について検討しているかはもちろん，不妊期間など患者背景についてもまちまちであるので当然のことと考えられる．

文　献

1) Weisman, A. I.: Some commemts on hysterosalpingography, Am. J. Obst. Gynec., 54: 902, 1947
2) Matters, R. F.: Transuterine injection of lipiodol in the treatment of sterility, M. J. Australia, P740, 1948
3) Rutherford, R. N.: The therapeutic value of repetitive lipiodol tubal insufflations, West. J. Surg., 56: 145, 1984
4) King, E. L. and Hering, J. S.: Sterility studies in private plactice, Am. J. Obst. Gynec., 58: 258, 1949
5) Weir, W. C. and Weir, D. R.: Therapeutic value of salpingogram in infertility, Fertil. Steril., 2: 514, 1951
6) Wortz, J. H. E., Bradford, W. Z., Bradford, W. B. and Brawn, C. W.: The treatment of infertirity in private practice with emphasis on hysterosalpingography, Am. J. Obst. Gynec., 66: 801, 1953
7) Gray, L. A.: Hysterosalpingography, Radiology, 61: 189, 1953
8) Öhlinger, Foreign Letters: Meeting on Gynecdogy and Obstetrics J. A. M. A., 156: 1099, 1954
9) Vogt, C. J.: Hysterosalpingography -a safe diagnostic and therapeutic gynecological prosedure, Am. J. Obst. Gynec., 67: 1298, 1954
10) Palmer, A.: Ethiodal hysterosalpingography, Internat. J. of Fertil., 4: 365, 1959

11) Soules, M. R. and Spandoni, L. R.: Oil versus aqueous media for hysterosalpingography-a continuing debate based on many opnions and a few facts, Fertil. Steril., 38: 1, 1982
12) Alper, M. M., Garner, P. R., Spence, J. E. H. and Quarrington, A. M.: Pregnancy rates after hysterosalpingography with oil -and water-soluble contrast media, obstet. Gynecol., 66: 6, 1986
13) Boer, A. D., Vermer, H. M., Willemsen, W. N. P. and Sanders, F. B. M.: Oil or aqueous contrast media for hysterosalpingography: a prospective, randomized, clinical study, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 28: 65, 1988
14) Randall, A. L., Frederick, G. W. and Machelle, M. S.: Hysterosalpingogaphy in perspective: the predictive value of oil-soluble versus water-soluble contrast media, Fertil. Steril., 51: 170, 1989
15) 田巻勇次，井澤美彦，片山純男，木曽原宏之，栗原 洋：油性および水性造影剤による子宮卵管造影法後の妊娠率の比較，日不妊学会雑誌，30 (4): 677，1985
16) 猿渡善治，堀井高久，笠野有里，高瀬規久也，星合 昊，野田起一郎：子宮内膜症合併不妊に対する油性造影剤の治療効果の基礎的検討，日本不妊学会雑誌，36 (4): 988，1991
17) Rasmussen, F., Justesen, P. and Nielsen, D. T.: Therapeutic value of hysterosalpingography with lipiodol ultrafluid, Acta Radiologica, 28: 319, 1987

Therapeutic efficacy of hysterosalpingography (HSG) in infertility, a prospective, randomized, clinical study

Rika Ogata, Gen-ichi Nakamura, Yoshio Uchiumi, Motofumi Yokoyama, Yoshitsugu Watanabe, Masahiro Nozaki, Masatoshi Sano and Hitoo Nakano

Department of Ghynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyusyu University, Fukuoka 812, Japan

In order to assess the therapeutic efficacy of hysterosalpingography (HSG) in infertility, we divided the subjects into two groups in randomized manner according to whether HSG was performed or not, and evaluated the outcome on the basis of the difference in pregnancy rates. We used an oil-soluble contrast medium (lipiodol Ultra-Fluid®) and performed HSG through fluoroscopic observation. Three hundred and two patients were divided into two groups; 148 who underwent HSG immediately after initial dignosis (HSG group), and 154 patients who did not undergo HSG within the four ovulatory cycles after their initial diagnosis (control group). Those who failed to complete the 4 ovulatory cycles of observation were excluded.

Consequently, 105 patients in the HSG group and 85 patients in the control group were evaluated of their pregnancy rates during first 4 ovulratory cycles. When statistically analyzed, no significant differences were found between the two groups with respect to age, duration of infertility, primary infertility rate, male infertility rate or poor results of post-coital tests. The results showed a pregnancy rate of 23.8% in the HSG group (25 out of 105) and of 8.2% in the control group (7 out of 85 cases). The difference between the two groups was statistically significant ($P<0.01$).Thus HSG appeared to have some sort of therapeutic significance in achieving pregnancy.

(受付：1992年3月25日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

挙児希望婦人における診断的腹腔鏡検査の有用性

Usefulness of Diagnostic Laparoscopy for Infertile Women

京都府立医科大学産婦人科学教室
大野洋介 Yohsuke OHNO
田村尚也 Takaya TAMURA
北脇城 Jo KITAWAKI
北川一郎 Ichirou KITAGAWA
田中一範 Kazunori TANAKA
山元貴雄 Takao YAMAMOTO
岡田弘二 Hiroji OKADA
Department Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602, Japan

1987年6月から1990年5月までの3年間に，当科で診断的腹腔鏡検査を受けた挙児希望婦人で，検査後1991年5月まで追跡調査の可能であった125例を対象としその妊娠予後について検討した．

腹腔鏡診断では骨盤腔内正常例が40例と最も多く，卵管因子 (37例)，子宮内膜症 (29例) と続いた．検査前診断と比べると腹腔鏡後には子宮内膜症が1.5倍に増加していた．検査後観察期間の妊娠率は32%で，子宮内膜症群では59%が妊娠したが，卵管因子群や骨盤腔内正常例ではそれぞれ30%，20%であった．

治療別妊娠の内訳は検査後3周期以内に無治療または7～12周期にGnRHアナログ投与後に妊娠したものが各々20%，18%と多く，また配偶子操作による妊娠が20%を占めていた．診断別では軽度卵管因子や初期子宮内膜症群で検査後1年以内に妊娠しているものが最も多かった．

診断的腹腔鏡検査により初期子宮内膜症が発見されればその後の妊娠率はきわめて良好であり，検査後に早期に妊娠に至ることが多い．また卵管因子群では配偶子操作の適応および選択を決定する上で重要であると考えられた．また検査そのものが妊娠成立に寄与すると思われた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 95—99, 1993)

諸　言

挙児希望婦人に対して腹腔鏡検査を行う施設が近年急速に増加している．その理由のひとつとしては子宮内膜症と不妊の関係がクローズアップされたことがあげられる．さらに配偶子卵管内移植法 (GIFT) などを含めた不妊治療目的での腹腔鏡下処置の必要性から腹腔鏡検査を導入した施設もあると考えられる．すなわち不妊診療を行う以上は腹腔鏡検査は欠かせないという概念が現在形成されつつあるように思われる．確かに医師の側から見れば腹腔鏡検査はきわめて短時間に腹腔内の様子が観察でき，得られる情報量は多いと言える．しかしながら検査を受ける婦人にしてみれば一大決心が必要であり，さらに夫の心配も相当なものと察せられる．挙児希望婦人のほとんどが腹腔鏡検査を受けることによる利益すなわち妊娠，出産が腹腔鏡検査そのものによって受ける不利益を遥かに上回ることを期待して検査を受けることに同意している．我々も1987年より挙児希望婦人に対して腹腔鏡検査を導入し，すでに300例以上にこれを施行した．これらの婦人がその後どのように治療され，またどのくらい妊娠したのかを検討することは腹腔鏡検査の有用性を知る上できわめて重要と思われる．そこで腹腔鏡検査後1年以上経

過した挙児希望婦人を対象にその後の妊娠の成立について検討した．

対象と方法

対象症例は1987年6月から1990年5月までの3年間に当科で腹腔鏡検査を受け，1991年5月までの1年以上にわたる追跡調査が可能であった125例である．当科における腹腔鏡検査の適応は他の検査にて卵管因子の存在の可能性がある場合，子宮内膜症の疑い，原因不明不妊症で不妊期間が4年間以上，体外受精やGIFTの施行前検査，子宮奇形，子宮筋腫，卵巣異常である．

今回対象にした婦人は全例全身麻酔下にオリンパス細型腹腔鏡にて観察し，軽度な卵管周囲癒着の剥離術とインジゴカルミンによる卵管通色素検査，生理食塩水による腹腔内洗浄以外の処置は行っていない．これらの症例で検査後最長4年間から最短1年間に妊娠した症例は40例であった．これらの妊娠症例について診断別に解析し，さらにその治療内容，検査後妊娠成立までの期間について検討した．

成　績

腹腔鏡検査前診断と検査後診断の分布をみると(図1)，検査前診断では原因不明不妊症が32例26.4%，卵管因子の疑い31例25.6%，子宮内膜症の疑い20例16.5%の順で，以下排卵障害，男性因子，子宮筋腫，付属器腫瘍，子宮奇形と続いた．腹腔鏡後の診断は骨盤腔内に異常を認めなかった正常例が40例32%，卵管の癒着や閉塞といった卵管因子が37例29.6%，子宮内膜症29例23.2%であった．検査前診断に比べると卵管因子が6例増加し，子宮内膜症の診断例が1.5倍に増加していた．診断的腹腔鏡検査後にそれぞれの症例に応じて治療方針を決定した．正常例や初期子宮内膜症(R-AFS Ⅰ期)，卵管の軽度癒着症例には最低3周期の待機的治療法が，中等症子宮内膜症(R-AFS Ⅱ期，Ⅲ期)にはGnRHアナログ療法が，重症内膜症(R-AFS Ⅳ期)や重症卵管因子に対してはIVF-ETやGIFT法が選択された．

検査後観察期間4年から1年の間の妊娠例は40例で，妊娠率は32%であった．妊娠例を腹腔鏡診断別

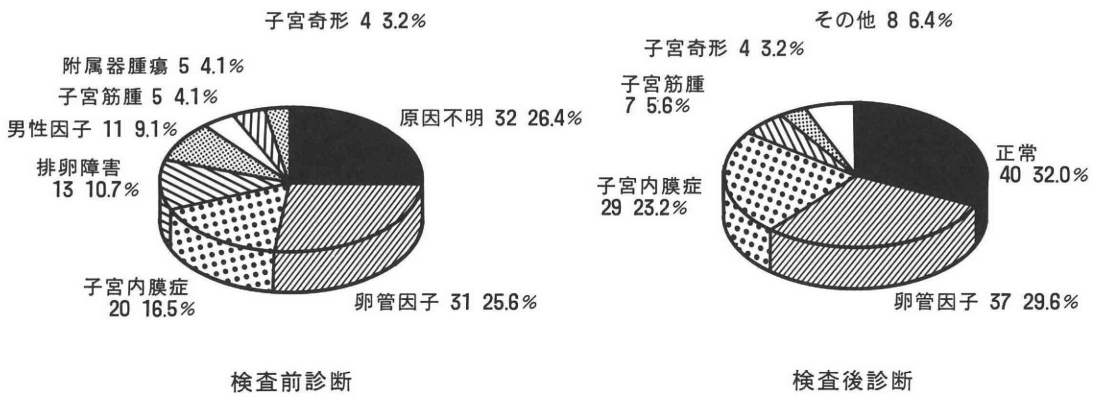


図1　腹腔鏡検査前診断と検査後診断

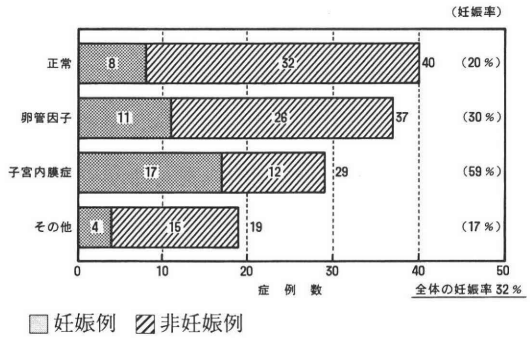


図2　腹腔鏡診断と妊娠成立

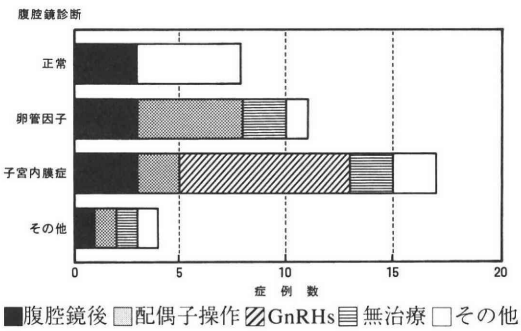


図3　腹腔鏡診断と妊娠時治療内容

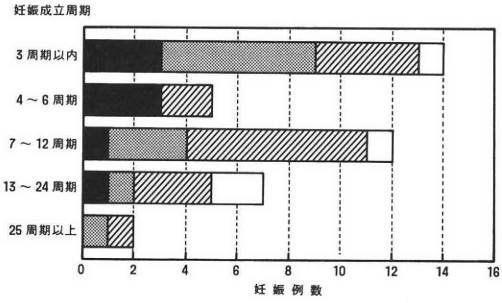


図4　腹腔鏡診断と妊娠成立周期

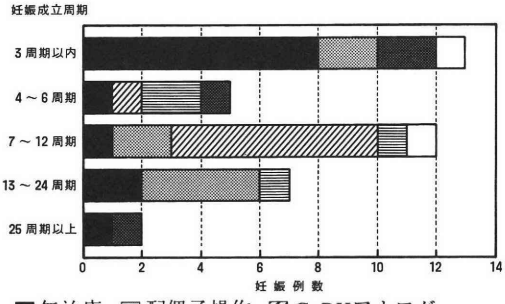


図5　腹腔鏡後妊娠成立周期と治療内容

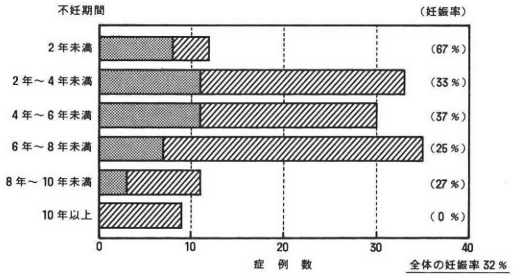


図6　不妊期間と妊娠成立

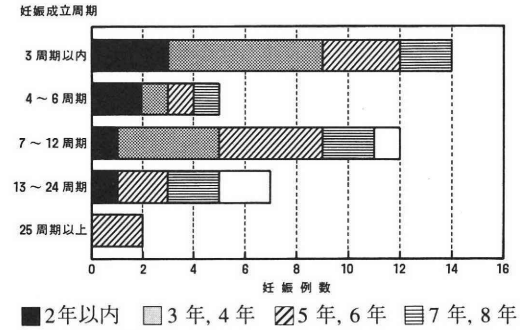


図7　腹腔鏡後妊娠成立周期と不妊期間

にみると(図2)，骨盤腔内正常群では20%，卵管因子群では30%，子宮内膜症群で59%と正常群での妊娠率がきわめて低く，子宮内膜症での妊娠率が高率であった．

次にこれらの妊娠例はどのような治療法により妊娠したのかを検討した(図3)．卵管因子では配偶子操作によるものが多く，子宮内膜症ではGnRHアナログ治療例が多かった．ここでは腹腔鏡検査後特に治療をおこなわず6周期以内に自然妊娠した10例を腹腔鏡後妊娠とした．妊娠例で腹腔鏡後いつごろ妊娠したのかを診断別に検討したところ14例，妊娠例の実に35%が検査後3周期以内に妊娠していた(図4)．これらはおもに軽度な卵管因子や子宮内膜症で占められていた．さらに7～12周期の間にも12例(30%)が妊娠していた．この期間の妊娠例はGnRHアナログ投与終了後の子宮内膜症が7例と多くを占めていた．12周期以内に全妊娠例の75%が妊娠し，25周期以上では2例が妊娠したのみであった．さらにその治療内容は3周期以内では無治療による妊娠が13例中8例を占めており，7～12周期では12例中7例がGnRHアナログ治療後の妊娠であった(図5)．13～24周期には7例中4例が配偶子操作によって妊娠していた．

次に腹腔鏡検査までの不妊期間とその妊娠率について検討した(図6)．不妊期間2年未満での妊娠率が67%と高く，不妊期間2年以上10年未満では25%から37%とほぼ同様の妊娠率を示したが，不妊期間10年以上では妊娠例が1例も無かった．さらに妊娠例の不妊期間と検査後妊娠成立周期の関係を検討した(図7)．腹腔鏡検査後3周期以内の妊娠例では不妊期間の4年未満の例が多く，7～12周期では4年以上の割合が増加し，13～24周期では不妊期間4年以上の症例がほとんどを占めていた．

考　察

外来における不妊原因の検索法は超音波検査等の画像診断の進歩により格段に向上した．それでもなお診断的腹腔鏡検査のもたらす情報量は多大で，現在のところこれに並ぶべくものはない．今回の検討においても子宮内膜症の診断例が検査前の1.5倍に増加したことや，新たに卵管因子が明らかになったもの，卵管因子の存在が疑われたにもかかわらず卵管にはまったく異常の無かった症例等が多くみられた．しかしその一方で骨盤腔内に異常所見の見られ

なかった検査正常例が40例32%と最も多くを占めていたことも注目される[1].

腹腔鏡検査後には症例に応じて治療方針が決定された．その結果125例中40例，32%に妊娠が成立した．この妊娠率はほぼ同時期の我々の不妊症外来における妊娠率である25%を上回っているが[2]，それほど高いとは言えない．その理由としては腹腔鏡検査例では不妊期間の平均が長いことなど，いわゆる難治性の不妊症の占める割合が多いことなどが考えられる．なかでも骨盤腔内正常例での妊娠率は20%と極めて不良であった．当然正常例には不妊因子に男性側の原因が関与していることが考えられる．

しかしこれらの40例のうち重度な乏精子症 (精子濃度1,000万未満) はわずかに2例しかなく，これらを除外してもその妊娠率は21%とほとんど変わらない．これらの症例の中にはその後体外受精を試みた症例もあり，この中には精子受精障害と考えられるものもあった．

このように腹腔鏡検査正常例でのさらなる不妊原因の検索ならびに治療法の選択は困難で，今後の問題として残った．骨盤腔内に異常の見られたものでは子宮内膜症における妊娠率が59%と圧倒的に高く，妊娠例17例のうち4例が腹腔鏡検査後無治療にて3周期以内に妊娠し，さらに8例がGnRHアナログ投与終了後3周期以内に妊娠した．このように子宮内膜症群においては腹腔鏡診断後の妊娠率が極めて良好であった．卵管因子群での妊娠率は配偶子操作による妊娠例も含めて30%と期待されたほど高くはなかった．その内訳は軽度な卵管周囲癒着や片側通過障害例で腹腔鏡後，無治療 (5例) で妊娠したものと，両側不通過例や強度癒着例で配偶子操作 (5例) または開腹癒着剥離術 (1例) による妊娠とに大きくふたつに分かれていた．

これらをまとめると腹腔鏡検査後の妊娠例は骨盤腔内に異常の発見された群，特に子宮内膜症群なかでも腹腔鏡検査によって初めて発見されるような初期子宮内膜症群でその妊娠率が高い事が明らかとなった[3]．さらに腹腔鏡検査後3周期以内に無治療で妊娠したものが妊娠例の20%を占めたことは診断的腹腔鏡検査そのものが妊娠成立に寄与するのではないかと考えられた．この理由としては検査中に行なう卵管通色素検査が軽度卵管通過障害を改善し，生理食塩水による腹腔内洗浄が初期子宮内膜症例等では骨盤内環境の改善をもたらしたとも考えられる[4]．

次に不妊期間と妊娠成立の関係は不妊期間2年未満では妊娠率67%と高いが，2年未満の症例数はわずかに125例中12例と少ない．大多数は不妊期間2年以上8年未満で占められており，これらの婦人では不妊期間と検査後妊娠率に関係は見られなかった．しかし不妊期間と検査後妊娠成立周期までの期間で検討すると，不妊期間が長いほど妊娠成立までの期間が長いように思われた．例えば不妊期間4年未満では妊娠例の19例中18例が検査後12周期以内の妊娠であった．12周期以内の妊娠時治療内容は無治療あるいは待機的治療 (排卵誘発剤，人口授精等)，またはGnRHアナログ療法がほとんどで，その診断内容も子宮内膜症，卵管因子群が多かった．これらのことからごく当たり前ではあるが，不妊期間が短い子宮内膜症婦人で腹腔鏡検査後に最も妊娠率が高く，さらに検査後の妊娠成立も比較的早期であることがわかる．

このことからも診断的腹腔鏡検査は子宮内膜症，特に腹腔鏡でしか診断できない初期子宮内膜症群に最も有用であると考えられた．また重症子宮内膜症や卵管因子群では腹腔鏡検査によって自然妊娠がきわめて困難と考えられた場合にはすみやかに体外受精やGIFTといった配偶子操作治療の選択が可能となる．検査後に26例に配偶子操作が行われ，その妊娠率は30%と高く，腹腔鏡検査を行わず配偶子操作を受けた婦人の妊娠率をはるかに上まっていた．一方腹腔鏡検査に異常が見られなかったケースでは，免疫学的因子や内分泌因子，精液所見についてもう一度見直し，さらに検索を進める必要があると考えられた．

挙児希望婦人の腹腔鏡検査にたいする期待は相当大きなものがある．しかし我々は最初に診断的腹腔鏡検査はあくまで検査であることを十分に挙児希望婦人と夫に説明している．また腹腔鏡検査でも異常のみられない，すなわち不妊原因の特定できないことがあることも言っておく必要がある．しかし腹腔鏡検査直後に少なからず自然妊娠例のあることを付け加え，子宮内膜症なかでも初期子宮内膜症と判明すればその妊娠率が高いこと，重症子宮内膜症や卵管因子の疑われる婦人では妊娠に向けての今後の治療方針決定に大変役立つことなどを時間をかけて説明するようにしている．

文　献

1) Cunanan, R. G., Courey, N. G. and Lippes, J.: Laparoscopic findings in patients with pelvic pain. Am. J. Obstet. Gynecol., 146: 587, 1983

2) 大野洋介，田村秀子，田村尚也，福岡正晃，細田修司，北脇城，井上滋夫，岡田弘二：不妊症夫婦における妊娠例の解析，日不妊誌，35：420，1990
3) 田村尚也，大野洋介，北脇　城，福岡正晃，山本宝，岡田弘二：挙児希望症例における腹腔鏡検査と子宮内膜症，エンドメトリオージス研究会誌，11: 284，1990
4) 大野洋介：子宮内膜症と不妊，産婦の進歩，44: 139，1992

Usefulness of diagnostic laparoscopy for infertile women

Yohsuke Ohno, Takaya Tamura,
Jo Kitawaki, Kazunori Tanaka,
Takao Yamamoto and Hiroji Okada

Department of Obsteterics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine,
Kyoto 602, Japan

We have reviewed 125 infertile women who had a diagnostic laparoscopy from June 1, 1987 to May 31, 1990. In 40 women laparoscopy did not reveal any pelvic pathology. In 37 women tubal adhesion and/or stenosis were confirmed. In 29 women laparoscopy revealed endometriosis. Diagnoses of endometriosis were increased to one and a half times after laparoscopy. A total of 40 (32%) women conceived until May 31, 1991. The conception rate in women with endometriosis was 59%, 30% in tubal factor and 20% in normal pelvis. Of the total number of women who conceived, 33% did so within 3 cycles and 75% within 12 cycles. Seventy three percent of pregnant women within 12 cycles were endometriosis or tubal factor and 62% of them within 3 cycles had no treatment after laparoscopy. In 26 women who underwent IVF-ET or GIFT eight women conceived. These results showed diagnostic laparoscopy was valuable to decide the treatment for endometriosis and tubal damage. In addition we feel that a diagnostic laparoscopy contribute to a conception with therapeutic effect by the evaluation of tubal patency and washing peritoneal cavity.

(受付：1992年4月16日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

VAGINOPLASTY FOR IMPERFORATE VAGINA WITH VAGINOURETHRAL COMMUNICATION

Tadayuki ISHIMARU, Hideaki MASUZAKI and Tooru YAMABE

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

Abstract: We experienced two rare cases of imperforate vagina with vaginourethral communication without adrenogenital syndrome or any other virilizing symptom. In the first case, a 22 year-old single woman had a thick membrane (vaginourethral membrane) covering the urethral and vaginal introitus, while the external genitalia and remainder of the physical examination were otherwise normal. In the second case of a 12 year-old female child, symmetrical excrescence with the scrotum-like appearance existed beneath the nonhypertrophic clitoris. In both the cases, a communication between the urethra and the vagina was recognized. Vaginal introitoplasty was performed for these two cases. Results in both the cases have been satisfactory.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 100—104, 1993)

Introduction

The presence of a common terminal channel for the lower urinary and genital tracts is most commonly seen in adrenogenital syndrome. This anomaly is due to the persistence of the urogenital sinus. But on rare occasions, a common terminal channel for the urogenital tract is also seen in otherwise normal females with imperforate vagina. We experienced two cases of imperforate vagina with vaginourethral communication without virilizing symptoms. The surgical approach by which introito-plasty was performed on these two patients is described in this report.

Case 1

A 22-year old single woman visited our clinic because of periodic hematuria. She often suffered from cystitis. On clinical examination the vaginal and urethral openings were found to be covered by a thick membrane (vaginourethral membrane) (Fig 1). These openings could be visualized only by the retraction of this membrane toward the anus (Fig 2). The external genitalia and remainder of the physical examination were otherwise normal.

Case 2

A 12 year-old female child visited our clinic for abnormalities of external genitalia. The periodic hematuria has been recognized for 4-5 days a month since last one year. On clinical examination, sparseness of pubic hair and a normal looking clitoris was noted. The urethral opening, which could be visualized by spreading out symmetrical excrescence resembling the labia minora, was noted under the clitoris (Fig 3). Genetic analysis revealed a sexchromosome of 46, XX and breast development was stage Ⅲ according to Tanner's classification. A cystourethrogram revealed a communication between the urethra and the vagina (Fig 4). Furthermore a right renal agenesis was found by pyelonephrogram. Serum testosterone, estradiol, urinary 17-KS and pregnanediol were within normal limit.

Operative technique

Case 1

The wall of the urogenital sinus was incised vertically, using Jones & Jones' method (1), and the remaining mucosa was removed. The hemostatic suture

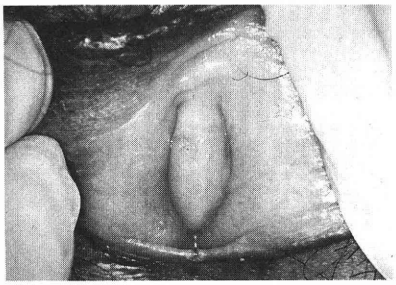


Fig. 1 Case 1 Age-22 years
Pre-operative finding of external genitalia, showing a thick membrane (urogenital sinus membrane) covering the vaginal and urethral opening.

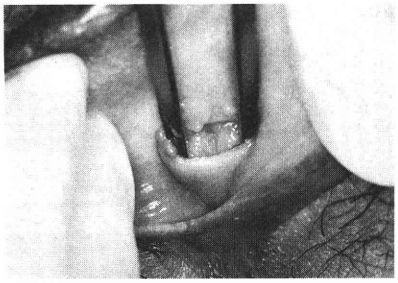


Fig. 2 Case 1 Vaginal and urethral opening can be visualized only on retraction of the membrane.

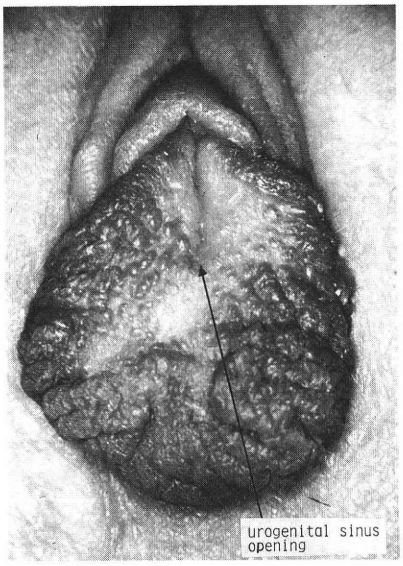


Fig. 3 Case 2 Age-12 years
Symmetrical excrescence like labia minora is noted under the clitoris. The arrow indicates the urogenital sinus opening existing in the center of excrescence.

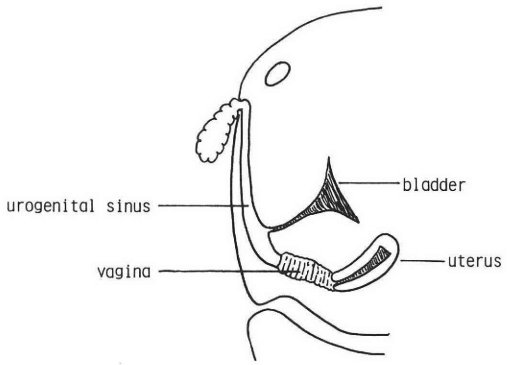


Fig. 4 Schematic representation of genital organ of case 2. The channel of urogenital sinus runs almost vertically and the low placed vagina and urethra opens separately into the urogenital sinus.

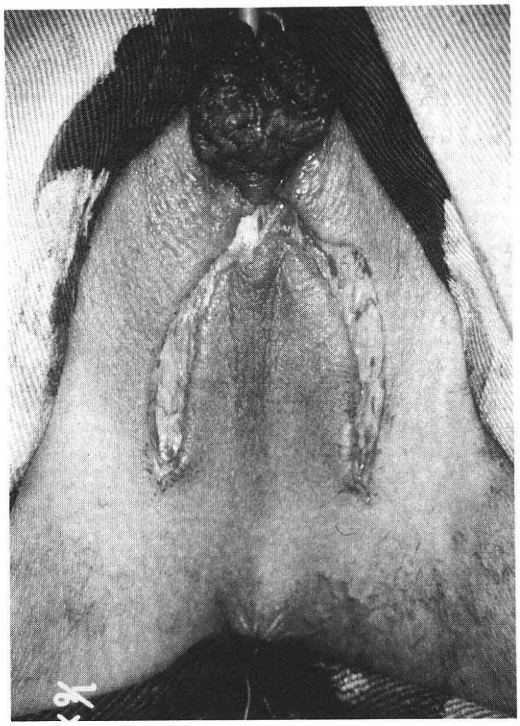


Fig. 5 Inverted U-shaped incision with the apex placed below the symmetrical excrescence is made on the perineal skin.

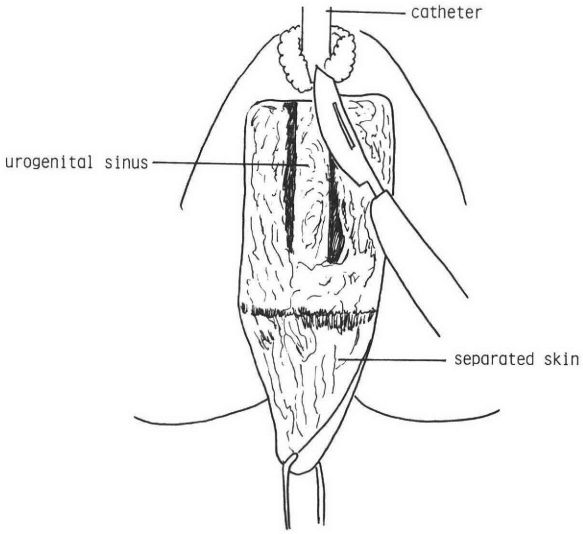


Fig. 6 U-shaped skin separated from the floor of the urogenital sinus and the flap of skin was everted toward the anus. Urogenital sinus swells up by the catheter introduced through the urogenital sinus opening.

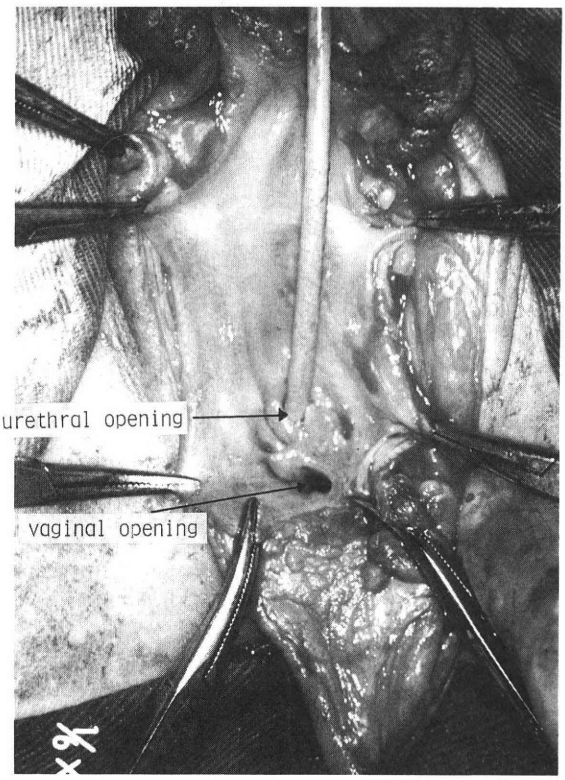


Fig. 7 The arrows point to the separate opening of the urethra and vagina exposd after dividing the urogenital sinus.

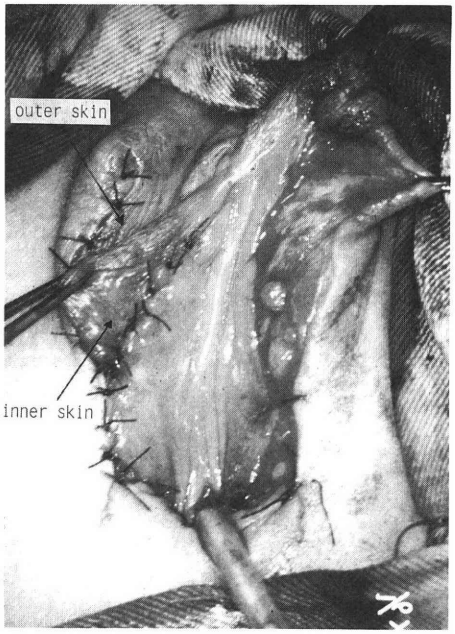


Fig. 8 The inner aspect of the skin of labia minora facing the urogenital mucosa is sutured to the urogenital mucosa of the sinus floor and outer skin is approximated to the perineal skin remaining after U-shaped skin.

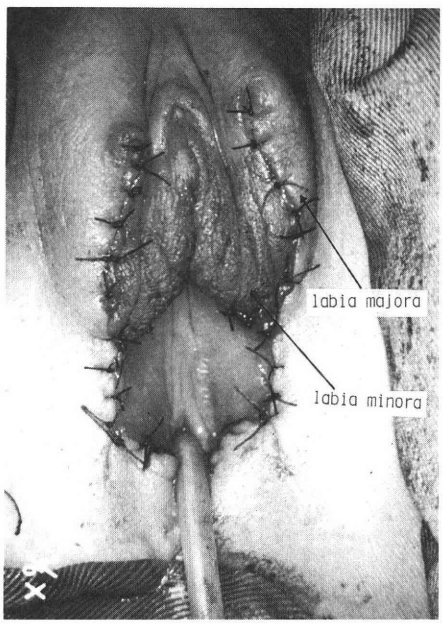


Fig. 9 The view of the external genitalia after the completion of operation. The catheter introduced into the urethra can be visualized.

was made at the cut edge of the urogenital mucosa. It was possible to insert a middle-sized speculum into the new vaginal opening after operation.

Case 2

1. Introduction of Nelaton's catheter into urogenital sinus opening

Nelaton's catheter was inserted into urogenital sinus opening to identify the direction and its depth, in addition, to use as an indicator for incision of the urogenital sinus wall. In this case, the channel of urogenital sinus ran almost vertically along the perineal skin. This condition indicates a lower urinary tract of female configuration with a low placed vagina (Fig 4).

Therefore, we performed the modified Fortunoff's method (2).

2. incision of perineal skin

Inverted U-shaped incision with the apex placed below the symmetrical excrescence, or rather the labia minora as implied by the author, was made on the perineal skin. Each limb of U incision was extended downward to the point midway between ischial tuberosity and anus (Fig 5). The level of the limbs of U incision corresponds to the point of the first resistence recognized on insertion of the catheter.

3. Ablation of perineal skin and incision of urogenital sinus

A U-shaped skin was separated from the floor of the urogenital sinus and the connective tissue, and another vertical incision was made along the floor of it from the urogenital sinus opening until the separate orifices of the urethra and vagina were seen clearly (Fig 6, 7).

4. Formation of labia majora and minora

The separated skin flap of U-incision was removed and cut edge of the urogenital mucosa was sutured to the cut edge of skin with 3-0 dexon. The lower edge of labia minora was pulled downward and vartically and was approximated to the margin at midposition of urogenital mucosa. After the fixation of the lower edge of labia minora, the inner aspect of skin of labia minora facing to the urogenital mucosa was sutured to the urogenital mucosa (Fig 8), while outer skin was approximated to the perineal skin remaining after U-shaped incision. This sutured portion swelled and looked like labia majora (Fig 9). Finally, the cut edge of the skin of the U-shaped incision and the urogenital mucosa, corresponding to vestibule, were approximated.

Discussion

There are two types of the configuration of lower uninary tract with persistence of the urogenital sinus. One type is the female configuraton of urogenital sinus into which open separately the vagina and the urethra. An another type is the male configuration with the vagina entering the urethra proximal to external sphincter (Fig 10). The former has a low placed vagina, while the latter has a high placed one.

A method of extending an incision until the sepa-

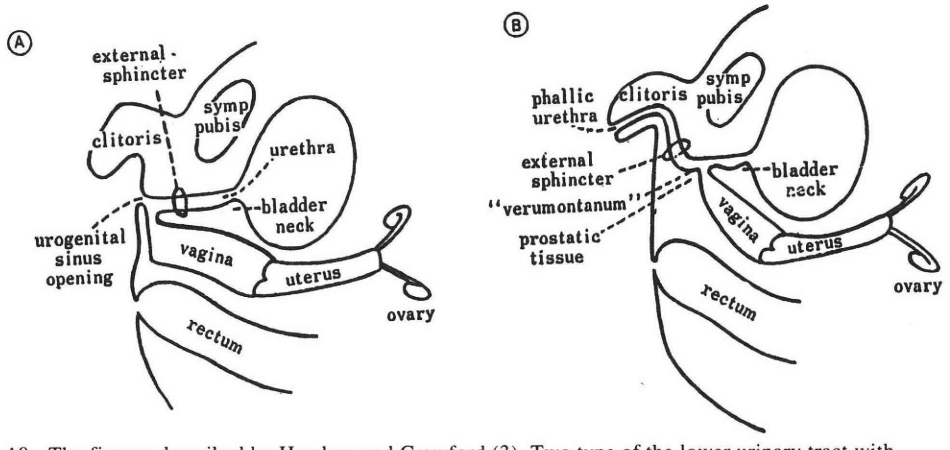


Fig. 10 The figures described by Hendren and Crawford (3). Two type of the lower urinary tract with the persistent urogenital sinus.

A: The vagina and the urethra open separately into the urogenital sinus(female type configuration).

B: The vagina enters the urethral proximal to the external sphincter(male type configuration).

rate openings of the urethra and the vagina are seen, which was considered by Jones or Lattimer, should be employed only in the case of the female type configuration. If this method is made in the male type, stress continence may be caused by the division of the external sphincter and moreover, it is difficult to bring the vaginal introitus to the perineum without tension.

A catheterization through the urogenital sinus opening is useful for the differential diagnosis of high or low placed vagina.

Summary

Introitoplasty was made for two cases with persistence of the urogenital sinus without adrenogenital syndrome and any other virilizing symptom.

Vertical incision in the urogenital sinus wall was performed in one case where the urethral and vaginal opening was covered by the thick membrane (urogenital membrane).

The skin flap technique was employed for the other case where the vagina and the urethra open separately into the urogenital sinus. Results in both the cases have been satisfactory.

References

1) Jones, H. W. and Jones, G. E. S.: The gynecological aspects of adrenal hyperplasia and allied disorders, Am. J. Obst. Gynec., 68: 1330, 1954
2) Fortunoff, S., Lattimer, J. Technique K. and Edson, M.: Vaginoplasty Techniqe for female pseudohermaphrodites, Surgery Gynecology and Obstetrics, 118: 545, 1964
3) Hendren, W. H. and Crawford, J. D.: Adrenogenital syndrome: The anatomy of the anomaly and its repair, J. Pediatric Surgery, 4: 49, 1969

共通尿生殖洞例における腟入口形成術

長崎大学産婦人科教室

石丸忠之　増崎英明　山辺　徹

私どもは副腎性器症候群や他の男化徴候を呈さない外陰奇形で、尿道と腟が共通の排泄口に開口する2症例に対し、腟入口形成術を施行した。第1例は22歳の独身女性。尿道および腟口は厚い粘膜で被われ、共通の排泄口に開口していた以外に異常は認められなかった。第2例は12歳の少女で、陰核の直下に小陰唇と思われる陰嚢様外観を呈する左右対称性の隆起物が認められ、尿道口および腟口は認められなかった。以上の2例に対し、腟入口形成術を施行し、十分に満足できる結果が得られた。

(受付：1992年6月29日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

不妊を主訴としたXYY症候群の1例

A Case of XYY Syndrome with Male Infertility

徳島大学医学部泌尿器科学教室
(主任：香川　征教授)

稲井　徹 (Tohru INAI)　浜尾　巧 (Takumi HAMAO)　梶本昌昭 (Masaaki KAJIMOTO)
三宅範明 (Noriaki MIYAKE)　鳴尾精一 (Seiichi NARUO)　香川　征 (Susumu KAGAWA)

Department of Urology, School of Medicine,
The University of Tokushima, Tokushima 770, Japan
(Director: Prof. S. Kagawa)

不妊を主訴としたXYY症候群の1例を報告した．

症例は36歳の男性，職業はガス会社勤務で，不妊期間は2年4カ月．身長187cm，高校卒業，知能障害なく，社会適応は良好，性格に凶暴性なく，犯罪歴はなかった．精液検査は，精子数1×10^6/mlと高度乏精子症で，染色体検査は47，XYYであった．

XYY症候群における妊孕性は，大部分の症例で低下しており，自験例でも高度乏精子症であった．

XYY症候群は，犯罪者や精神障害者に多く見られると報告されているが，凶暴性もなく社会に適応している症例もあり，XYY症候群のすべてが社会適応異常と考えてはならない．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1) 105—108, 1993)

緒　言

Y染色体を2個保有するXYY症候群は，1961年Sandbergら[1]により報告され，その後，犯罪者や精神障害者に多く見られるとされてきた．

しかし，XYY症候群の中には，不妊などを主訴とした社会適応の良好な例も存在しており，XYY症候群のすべてが社会的不適応と考えてはならない[2-4]．

われわれは不妊を主訴としてを当科を受診し，染色体分析にて47，XYYと判明した1例を経験したので，若干の文献的考察を加えて報告する．

症　例

患　者：36歳，男性，ガス会社勤務．
主　訴：挙児希望．
家族歴：双生児の妹がいる．妹の染色体検査は施行できていないが，子供が2人いる．
配偶者は26歳で，婦人科的異常なし．
既往歴：7年前，十二指腸潰瘍．
　　6ヵ月前，椎間板ヘルニア．
現病歴：昭和62年12月に結婚．
不妊期間：2年4ヵ月．
現　症：身長187cm，体重75kg．高卒．知能障害なし，社会適応良好．性格は凶暴性なく，犯罪歴なし．女性化乳房なく，恥毛は男性型．精巣容積は両側共10mlとやや小さく，触診上精巣上体，前立腺に異常なし．
精液検査：液量3.6ml，精子数1×10^6/ml，運動率10%，奇形率80%．
染色体検査：末梢血染色体分析の結果，すべての細胞において47，XYYの核型が認められた (Fig. 1)．
内分泌検査：
LH-RH負荷テスト (Fig. 2)
　LHは基礎値10.5mIU/mlと高く，60分52.1mIU/mlと

過剰反応を示した．FSHも基礎値31.3mIU/mlと高値を示し，精細管障害が考えられた．

hCG負荷テスト (Fig. 3)

テストステロンは基礎値5.9ng/mlと正常で，hCGに対して良好な反応を認めた．

精巣生検：精子形成の見られる精細管はごくわずかであり，大部分は低形成を示し，造精機能低下と判定した．間質のLeydig cellの増加が見られた (Fig. 4).

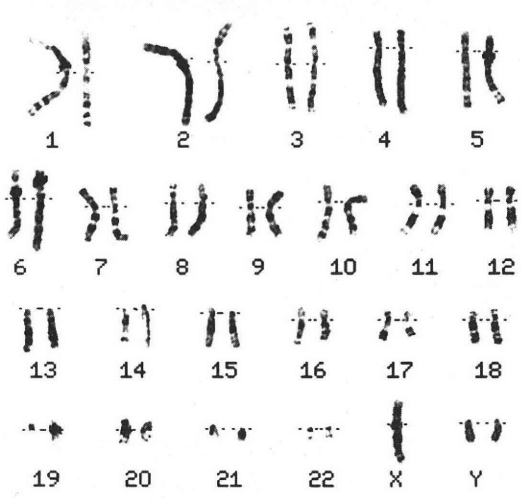


図1　染色体検査　47, XYYの核型を示す

考察

XYY症候群は性染色体の数的異常であり，この発生機序は，父親の性腺での成熟分裂meiosisによる精子形成の際，染色体不分離によって，Y染色体を過剰にもつ精子ができた場合と，正常受精卵がその有糸分裂mitosisの初期に染色体不分離をおこすことが考えられている[5].

XYY症候群の報告は，Sandbergら[1]により最初に報告された．その後，犯罪者や精神障害者に多く見られると報告されてきた[6]．本邦においては，1969年端[7]により報告され，XYY症候群の臨床的な標徴は，1) 長身であること，2) 知能が境界線級であること，3) 攻撃的かつ粗暴といった精神病質的傾向(異常な性格) をあげている．その後の報告の多くが，非行および犯罪者の収容施設から発見されている．しかし，犯罪内容を調べると攻撃的であるとはいえず，高い犯罪率はむしろ知能障害に由来することが示唆されている[5].

XYY症候群の発生頻度は，男子新生児集団におい

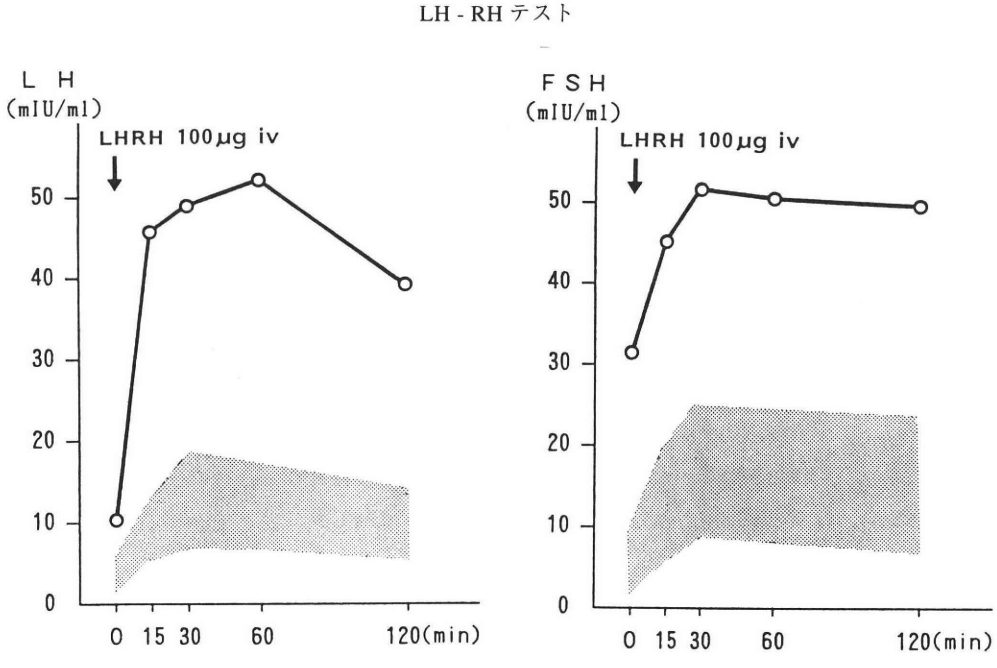


図2　LH - RH負荷試験で過剰反応を示した

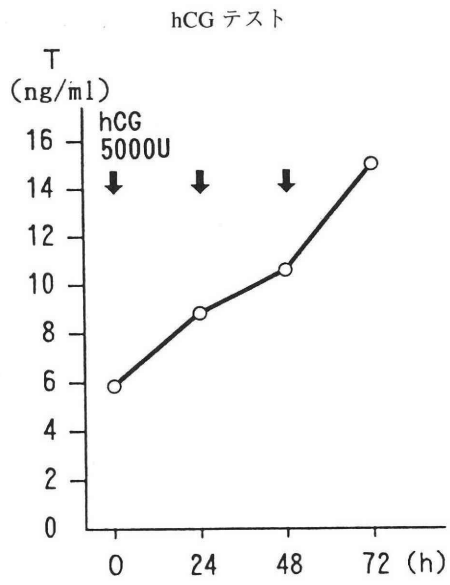


図3　hCG負荷試験で正常反応を示した

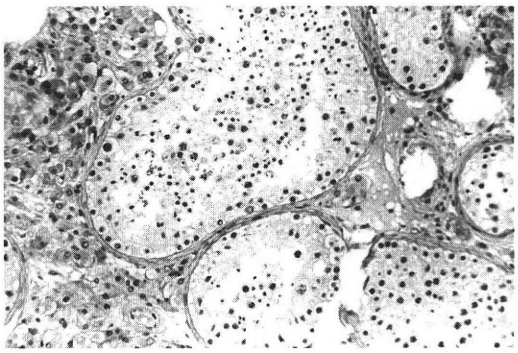


図4　精巣生検では，造精機能低下と判断された．
(Johnsen score count 7.0, H. E. 染色200倍)

て，0.06%と報告されている[5]．一方，男性不妊症における染色体異常の頻度は高く，立木ら[8]によると男性不妊症874例中64例 (7.3%) であり，そのうちXYY症候群は2例 (0.23%) と，新生児集団より高頻度であった．

本邦における不妊を主訴としたXYY症候群の報告は自験例を含めて4例であった[2-4] (Table 1)．症例報告以外に，染色体異常のひとつとして報告されている例もあり，今後，XYY症候群の報告は増加すると予測される[8-10]．

症例報告の4例について検討してみると，身長は，176から187cmといずれも高く，平均181cmと長身であった．また，学歴は，高卒3例，中卒1例であった．IQは2例で検査されており，68と85で軽度低下が認められた．身長，知能に関しては端らの述べている特徴に一致していた．

表1　本邦における不妊を主訴としたXYY症候群の報告例

報告者	年齢	学歴	身長	精子数 ($\times 10^6$)	精巣生検
門脇	31	高卒	176	1	造精機能低下
羽間	36	中卒	179	0.8	精子成熟停止
寺田	29	高卒	181	0	精子成熟停止
自験例	36	高卒	187	1	造精機能低下

しかし，不妊を主訴としたXYY症候群のいずれの症例にも，攻撃的かつ粗暴といった精神病質的傾向(異常な性格) は認められなかった．XYY症候群のすべての症例に，端らの臨床的な特徴を示すわけではなく，特に不妊を主訴とした症例に，性格的異常の報告はなかった．かつて，XYY症候群は，精神異常あるいは危険人物と見なされていたこともあったが，社会に適応している症例もあり，XYY症候群症例すなわち危険人物と判断することは避けるべきである．

XYY症候群の妊孕性に関してみると，4例の精液検査で，高度乏精子症3例，無精子症1例であった．精巣生検では，造精機能低下2例，精子成熟停止2例であった．文献的にも，乏精子症が多く，無精子症は少なかった[3]．精巣生検では，正常例もあるが，造精機能低下例あるいは精子成熟停止例が大部分であった．したがってXYY症候群での妊孕性障害は，ほとんどの例が無精子症であるKlinefelter症候群に比較してみると比較的軽度であった．男性不妊症の中で，無精子症に対しては染色体検査が多くの施設で行われており，Klinefelter症候群はよく診断されている．しかし，XYY症候群は乏精子症を呈することが多いので，XYY症候群の診断においては，乏精子症に対する染色体検査の必要性が再認識された．

文　献

1) Sandberg, A. A., Kopef, G. F., Ishihara, T. and Hauschka, T. S.: An XYY human male, Lancet, 2: 488, 1961
2) 門脇和臣，石橋　晃：XYY症候群の1例，泌尿紀要，26: 465, 1980
3) 寺田為義，柳　重行，中田瑛浩，片山　喬：不妊と停留精巣を主訴としたXYY症候群の1例，泌

尿紀要，30: 701, 1984
4) 羽間　稔，岡　伸俊，浜口毅樹，岡田　弘，松本修，守殿貞夫，石神襄次：染色体異常をともなう男性不妊　第1報：XYY症候群，泌尿紀要，31: 165, 1985
5) 浅香昭雄：XYY症候群，日本臨床，40臨時増刊号：120, 1982
6) Jacobs, P. A., Brunton, M., Melville, M. M., Brittain, R. P. and McClemont, W. F.: Aggressive behaviour, mental subnormality and the XYY male, Nature, 208: 1351, 1965
7) 端　宣夫：XYY症候群，遺伝，23 (5): 10, 1969
8) 立木　仁，熊本悦明，斎藤誠一，宮尾則臣，丸田浩：男性不妊症における染色体異常の検討，日不妊会誌，36: 157, 1991
9) Ishida, H., Isurugi, K., Fukutani, K., Hosoi, Y., Nanko, S., Asaka, A., Nijima, T.: Studies on pituitarygonadal endocrine function in XYY men, J. Urol., 121: 190, 1979
10) Nakatsuka, S., Kawahara, H., Tanaka, H., Nanba, M.: Chromosomal aberrations in male infertility Nishinihon J. Urol., 51: 497, 1989

A case of XYY syndrome with male infertility

Tohru Inai, Takumi Hamao
Masaaki Kajimoto, Noriaki Miyake
Seiichi Naruo and Susumu Kagawa

Department of Urology, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770, Japan

We report a case of XYY syndrome with male infertility. A 36-year-old man was 187 cm height with a non-violent personality. He had no delinquent or criminal history. Semen analysis revealed severe oligozoospermia. Both testes were 10 ml in size, and the secondary sex characters were normal. Chromosomal analysis of the peripheral leucocytes showed 47, XYY karyotype.

This case demonstrates that XYY syndrome does not always involve anti-social behaviour.

(受付：1992年6月11日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

男子不妊症の臨床統計的検討

A Clinico-Statistical Study on Male Infertility

滋賀医科大学泌尿器科学教室
（主任：友吉唯夫教授）
石田　章　　友吉唯夫
Akira ISHIDA　　Tadao TOMOYOSHI
Department of Urology,
Shiga University of Medical Science, Shiga 520-21, Japan
(Director: Prof. T. Tomoyoshi)

滋賀医科大学附属病院開院後10年間 (1978年～1988年) 男子不妊症患者477人につき，臨床統計的検討をおこなった．

1) 初診時年齢は30～34歳が最も多く，不妊期間は2年までと2～3年が最多でった．既往歴は，流行性耳下腺炎が全体の38.8%を占めたが，精巣炎合併は2例のみであった．

2) 原因では，いわゆる特発性男子不妊症が70.6%を占め，精索静脈瘤が23.1%であった．

3) 精巣容量は精子濃度が低いほど有意に小さかった．

4) FSH，LHは精子濃度が低いほど有意に高値を示したが，テストステロン，プロラクチンは大部分が正常範囲内であった．

5) 452例にアンケート方式による追跡調査をおこなった．回答を得た209例につき妊娠率を検討した．精子濃度が低いほど妊娠率は低下し，全体の妊娠率は38.8%であった．治療法別妊娠率は，精子濃度40×10^6/ml未満の乏精子症群についてみると，薬物治療群の妊娠率 (32.0%) が，非治療群の妊娠率 (36.4%) とほぼ同様であったが，精索静脈瘤手術群では妊娠率50.0%であった．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 109—115, 1993)

緒　言

近年泌尿器科外来において，不妊を主訴として訪れる患者は徐々に増加傾向にあるといわれ，泌尿器科診療の中でも重要な分野になっている．しかし男子不妊症に対する確実な治療法は少なく，また，はたして治療後来院しなくなった場合に，妊娠が成立しているのかどうかも確認していないことが多い．そこでわれわれは，当科開設以来10年間の男子不妊症患者の臨床統計的観察をおこない，さらにアンケート方式による追跡調査をおこない，治療成績について検討したので報告する．

対象および方法

1978年10月より1988年12月までの10年間に滋賀医科大学附属病院泌尿器科を受診した男子不妊症患者477名を対象とした．

患者の初診時年齢，不任期間，既往歴，原因疾患，内分泌学検査，精液検査，治療成績について検討した．

精液検査は5日間以上の禁欲期間をおき，用手法で採取し精子濃度を算定した．精子濃度によって477例を次の5群に分類した．

第1群：正精子症．精子濃度40×10^6/ml以上．

第2群：精子濃度10×10^6/ml以上40×10^6/ml未満の乏精子症．

第3群：精子濃度10×10^6/ml未満の乏精子症．

第4群：閉塞性無精子症．

No.（　　）　おなまえ（　　殿）

□内に○をつけたり（　）内に記入したりしてください。

妊娠のあった方はこの欄をごらんください	妊娠のなかった方はこの欄をごらんください
1．□出産した（　年　月　日、男児・女児） □流産した（　年　月　日、妊娠　か月） （流産の原因：　） □現在妊娠中（現在妊娠　か月）	1．クスリ主としてホルモン剤による治療を： □過去にうけた（期間は＿＿か月つづいた） □現在うけている □うけていない
2．その妊娠は □自然妊娠であった □人工授精によるものであった	2．その治療は □滋賀医大病院泌尿器科でうけた □それ以外のところでうけた （　病院 医院　）
3．人工授精の場合 □夫の精液を用いた □他人の精液を用いた □滋賀医大婦人科でうけた □それ以外のところでうけた 回数は（　）回目に成功した	3．人工授精をうけたことは □ ある　□ ない
4．ご主人がホルモン療法、その他の治療をうけられたことはありますか □ある　□ない ある場合それは □滋賀医大泌尿器科でうけた □それ以外のところでうけた 期間は約（　）か月つづいた	4．ある方はその場合 □夫の精液を用いた □他人の精液を用いた □滋賀医大婦人科でうけた □それ以外のところでうけた 回数は（　）回試みた
	5．養児を □もらった　□もらっていない

第5群：原発性無精子症.

治療は，薬物治療としては，ビタミン剤 (B_1, B_{12}, B_6, E)，カルナクリン，ATP，クロミッド，HCG，HMG，テストステロン製剤を主として使用した．また，精索静脈瘤に対する内精巣静脈高位結紮術の治療成績についても検討した．すなわち1989年春，全症例に表1のようなアンケート方式にて追跡調査をおこない，妊娠率を算出した．

結　果

初診時の年齢は，23歳から45歳に分布し，30～34歳が250例と最も多く，25～29歳が118例と続き，両者を合わせると全体の77%を占めた．また平均は31.8歳であった (図1).

不妊期間 (結婚より来院までの期間) は，5ヵ月から15年に分布し，2年までと2～3年が99人と最も多く，5年以内に全体の71%が受診していた．平均は3.9年であった (図2).

既往歴では流行性耳下腺炎が185例 (38.8%) と最も多かったが精巣炎の合併は2例のみであった．次いで，虫垂炎78例，鼠径ヘルニア術後34例，胃・十二指腸潰瘍11例，尿道炎10例などが多かった (表2).

配偶者の産婦人科的異常として流産22例，卵巣機

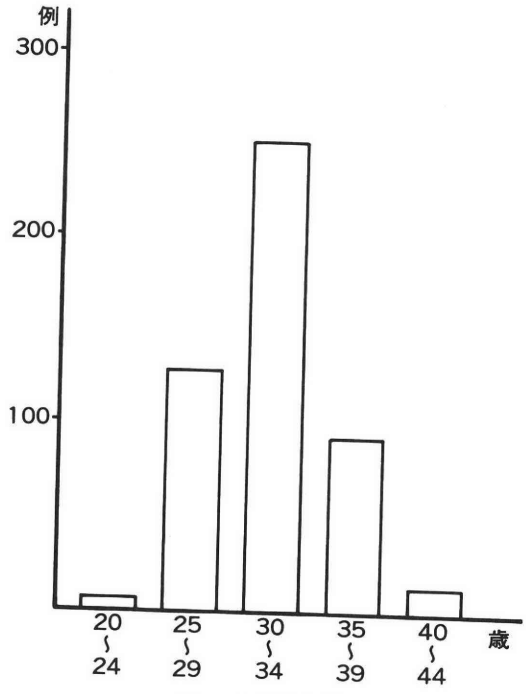


図1　初診時年齢

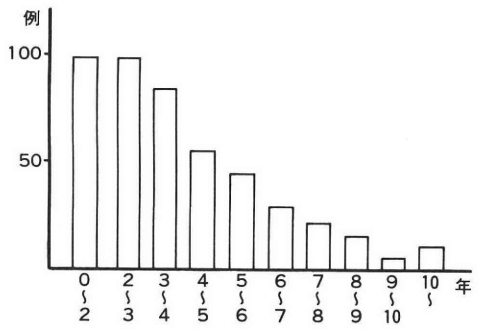


図2　不妊期間

表2　既往歴

	例数	%
流行性耳下腺炎	185	38.8
虫垂炎	78	16.4
鼠径ヘルニア術後	34	7.1
胃・十二指腸潰瘍	11	2.3
尿道炎	10	2.1
肺炎	6	1.3
痔疾	5	1.0

表3　男子不妊症の原因疾患

	例数	%
精索静脈瘤	110	23.1
精路閉塞，欠損	10	2.1
停留精巣	7	1.5
逆行性射精，射精障害	5	1.0
精管結紮後	4	0.8
性染色体異常 Klinefelter症候群	4	0.8
特発性男子不妊症	337	70.6
計	477	

表4　症例の分類と分布

	例数	%
第1群：正精子症 (40×10⁶/ml以上)	162	35.8
第2群：乏精子症 (10～40×10⁶/ml)	72	15.9
第3群：乏精子症 (10×10⁶/ml未満)	138	30.5
第4群：閉塞性無精子症	10	2.2
第5群：原発性無精子症	70	15.5
計	452	
不明または未検査	25	
総計	477	

能不全9例，卵管狭窄3例が記載されていた．

原因疾患としては，精索静脈瘤が110例 (23.1%) と最も多かった．次いで精路閉塞または精管欠損が10例，停留精巣7例であった．しかし原因不明のいわゆる特発性男子不妊症が大部分であり，全体の70%以上を占めた (表3)．

精子濃度によって分類した5群の分布は，第1群が162例 (35.8%)，第2群が72例 (15.9%)，第3群が138例 (30.5%)，第4群が10例 (2.2%)，第5群が70例 (15.5%)であった (表4)．

精巣容量は，左右精巣のうち，大きい方をorchidometerを用いて測定したが，その平均値は，第1群17.5ml，第2群16.2ml，第3群14.3ml，第4群16.4ml，第5群10.3mlであった．第5群と他の全群との間に，また第1群と第2群および第3群の間に，さらに第2群と第3群の間に統計学的に有意差を認めた (図3)．

血清FSHの平均値は，第1群 7.2 mIU/ml，第2群 10.7 mIU/ml，第3群 17.6 mIU/ml，第4群 10.9 mIU/ml，第5群 32.1 mIU/mlであった．第5群と他の全

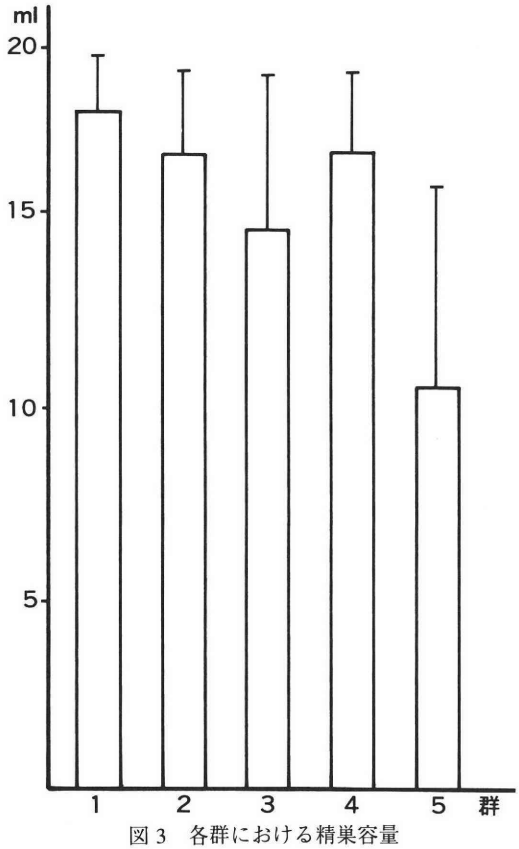


図3　各群における精巣容量

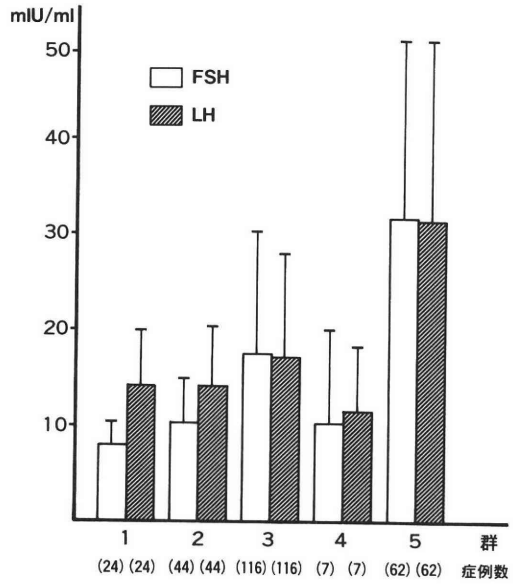


図 4　各群におけるFSH，LH値

群，この第 1 群と第 2 群の間，第 1 群と第 3 群との間，さらに第 2 群と第 3 群との間に，統計学的に有意差を認めた (図 4). 血清LHの平均値は，第 1 群14.3mIU/ml，第 2 群 14.7mIU/ml，第 3 群 17.5mIU/ml，第 4 群 11.7mIU/ml，第 5 群 31.3mIU/mlであった．第 5 群と他の各群との間に統計学的に有意差を認めた (図 4).

血清テストステロンの平均値は第 1 群494ng/dl，第 2 群638ng/dl，第 3 群616ng/dl，第 4 群540ng/dl，第 5 群540ng/dlであった．各群間に統計的な有意差は認めなかった (図 5).

血清プロラクチンの平均値は，第 1 群11.7ng/ml，第 2 群10.7ng/ml，第 3 群9.7ng/ml，第 4 群7.1ng/ml，第 5 群12.2ng/mlであり，各群間に統計学的な有意差は認めなかった (図 5).

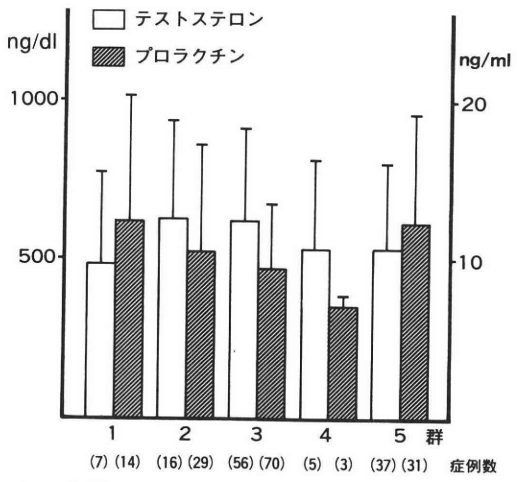


図 5　各群におけるテストステロン，プロラクチン値

治療成績を検討するために，1989年春に全症例にアンケート方式にて追跡調査をおこなって妊娠の有無を確認したが，452例中，209例 (46.2%) より回答がえられた．この209例に対する精子濃度別妊娠率を表 5 に示す．第 1 群の妊娠率は，54.4%，第 2 群は50.0%，第 3 群は28.6%と精子濃度が低いほど妊娠率も低かった．第 4 群の閉塞性無精子症 7 例中 1 例に妊娠を認めたがこれは，顕微鏡下精巣上体精管吻合術後の妊娠によるものであった．第 5 群の原発性無精子症24例中 3 例に妊娠を認めた．この 3 例の妊娠の内訳は，1 例が精索静脈瘤手術後 3 年目に自然妊娠し，1 例は両側停留精巣に対して両側精巣固定術後 4 ヵ月目にAIHにて妊娠した．残りの 1 例は，HCG，HMG療法後約半年で自然妊娠を認めた．ア

表 5　精子濃度別妊娠率

群	精子濃度/ml	症例数	アンケート回答数	妊娠例 (AIH妊娠)	%
1	40×10⁶以上	162	68	37 (4)	54.4
2	10～40×10⁶	72	40	20 (4)	50.0
3	10×10⁶	138	70	20 (4)	28.6
4	0 (閉塞性)	10	7	1	14.3
5	0 (原発性)	70	24	3 (1)	12.5
	計	452	209	81	38.8

表6　治療法別妊娠率

群	精子濃度/ml	精索静脈瘤手術群			薬物治療群			非治療群		
		症例数	妊娠率	%	症例数	妊娠率	%	症例数	妊娠率	%
1	40×10⁶以上	1	0	0	9	3	33.3	58	34	58.6
2	10～40×10⁶	7	4	57.1	29	14	48.3	4	2	50.0
3	10×10⁶未満	17	8	47.1*	46	10	21.7*	7	2	28.6
4	0	5	1	20.0	6	1	16.7	21	0	0
	2群＋3群	24	12	50.0	75	24	32.0	11	4	36.4
	総計	30	13	43.3	90	28	31.1	90	38	42.2

*<0.05

ンケート回収症例209例中，81例に妊娠成立を認め，自然妊娠は68例，AIH妊娠は13例で，妊娠率は38.8%であり，452症例に対する妊娠率は17.9%であった．

次に治療法別妊娠率を表6に示す．第1群では，非治療群の妊娠率が58.6%と薬物治療群の33.3%を上まわっており，第2群では，非治療群50.0%，薬物治療群48.3%とほぼ同等の成績であるが，精索静脈瘤手術群では，57.1%とやや高値を示した．第3群では，非治療群28.6%，薬物治療群21.7%であるのに対し，精索静脈瘤手術群では，47.1%という非常に高い妊娠率をみた．なお薬物治療群と精索静脈瘤手術群との間に統計学的に有意差を認めた．また第2群と第3群の合計すなわち精子濃度40×10⁶/ml未満の乏精子症では薬物治療群が32.0%の妊娠率をみ，非治療群の36.4%とほぼ同じような値であるが，精索静脈瘤手術群では薬物治療群および非治療群と比較して統計学的に有意差は認められないものの，50.0%の高い妊娠率を認めた．

考　察

1) 初診時年齢と不妊期間

初診時年齢は25～34歳が全体の77%を占め，諸家の報告と一致した[1-5]．不妊期間は5年目までに71%が受診し諸家の報告[1,3,5]と一致するが2年目までと2～3年目が同数で最も多く，2～3年目が最も多いとする報告[1,3,4]とやや異なった結果となったが，これは産婦人科よりの紹介が最近増加しているため比較的早期に受診する傾向にあると思われる[5]．

2) 既往歴

流行性耳下腺炎が諸家の報告のように最多で[1-5]，38.8%を占めた．またその多くは小児期での罹患であり，成人してから罹患し精巣炎を合併した症例はわずかに2例であった．さらに鼠径ヘルニアに対する手術既往は34例 (7.1%) にみられた．

3) 原因疾患

原因不明のいわゆる特発性男子不妊症は70～90%と報告[2,3,6]されておりわれわれの統計でも圧倒的に多い点，諸家の報告と一致した．明らかな原因疾患としては，精索静脈瘤が最も多いとされていて，布施ら[3]は，男子不妊症660例中139例 (21.1%)，寺田[6]は男子不妊症700例中146例 (20.9%) と報告しているが，自験例も23.1%とほぼ同様な割合であった．精索静脈瘤発見のための診察上の留意点としてわれわれが心がけている点は，1) 仰臥位のみでなく立位にしてValsalva法による怒責を指示しながら再度陰嚢を診察する．2) 立位にして前方のみでなく陰嚢の後面をも注意深く視診と触診により診察する (このような精索静脈瘤を後面型と呼称している)[7]．また最近では，正確性と客観性を保つために陰嚢シンチグラム[8]，超音波検査法 (断層法，ドプラー法)[9,10]，陰嚢皮膚接触式温度測定法[11]および静脈造影法[12,13]が応用されているが，われわれはまだルーチンにはおこなっていない．吉井ら[5]は，サーモグラフィー等を積極的に施行し，男子不妊症331例中155例 (47%) が精索静脈瘤であったと報告している．またYarborough ら[14]は，静脈造影により男子不妊症40例中22例 (55%) に subclinical varicocele を診断し，治療として閉塞術を施行した患者の精子数の上昇を報告しているが，今後はsubclinical varicoceleに対しても評価が加えられるべきであろうと思われる．

精路閉塞症例は男子不妊の原因として明確に診断されることが多く，男子不妊症の1.4%[3]，2.0%[6]，4.7%[2]と報告されている．今後顕微鏡下手術を積極的に導入することにより精路再開通から妊娠に至る症例が増えていくと思われる．

4) 精巣容量と内分泌検査

精巣容量は精子数が少ないほど，有意に小さかった．われわれと同じような精子濃度別の症例の群別で，石川ら[4]は，精巣容量の平均値は第1群15.3ml，第2群13.4ml，第3群12.6ml，第4群13.6ml，第5群7.6mlと報告しているが，われわれの結果とほぼ一致している．また三宅[15]は，精巣生検の集計より，治療して妊娠が期待できる条件として精巣容量が12ml以上であることと述べている．12mlというとわれわれの症例では，精子濃度10×10⁶/ml未満の高度乏精子症群 (精巣容量の平均値14.3ml) と原発性無精子症群 (精巣容量の平均値10.3ml) との中間値をとり，興味深い結果である．

血清FSH，LHについて検討すると，一般にFSHとLHではFSHがより鋭敏に造精障害に反応するといわれている[16]．つまり正常男子では，従来の国際単位では，FSHがLHの1/2－1/3の値を示し，男子不妊症では，まずFSHが正常範囲内で上昇を始め，LHの値に追いつき，FSHもLHも正常値でありながらFSH≒LHとなり，さらに病勢が進むとFSHもLH異常高値となり，FSH＞LHとなる[15]．さらに妊娠が期待できる条件として三宅[15]は，FSH/LHが0.99以下，さらに寺田[6]は，FSH＜16，LH＜21と報告している．自験例では，精子濃度が10×10⁶/ml未満症例群 (第3群) の平均値が，FSH 17.6mIU/ml，LH 17.5mIU/mlであり，臨床的にも先に三宅および寺田が述べた妊娠が期待できるFSH，LHの値は的を得ているように思われた．

テストステロンおよびプロラクチンについては精子数との間に関連性は少なく，Klinefelter症候群，Sertoli cell only症例でテストステロンの軽度の低下が報告されている[16]．

5) 治療法および治療成績

男子不妊症に対する治療法は薬物療法と手術法に大別される．

薬物療法について石神[17]は，非内分泌療法より開始し，内分泌療法に移行する方法をとっている．われわれもこの方法に従ったが，高度乏精子症のような精液所見の悪い症例には，内分泌療法を主体とした．

非内分泌療法としては，カリクレイン製剤，メチルB_{12}製剤，ビタミンE，ATP，アミノ酸製剤さらに漢方製剤として八味地黄丸，補中益気湯，牛車腎気丸等が用いられる．内分泌療法としては，クロミフェン，HCG，HMG，テストステロンなどがある．

薬物療法に臨床効果について，熊本ら[18]は，プラセボ投与でも3ヵ月後には有意な精子数の増加をみたことより二重盲検法による比較試験を行わなければ，薬剤の有効性を正確に証明できないと報告し，さらに，メチルB_{12}使用時，精子濃度20×10⁶/ml以下かつ運動率50%以下，LH13.5mIU/ml以下の群でプラセボに比し有意に高い有効率を上げたと報告している．他に二重盲検比較試験での報告として，Shill[19]は，乏精子症 (精子数40×10⁶/ml以下) に対してカリクレイン600U/day，7週投与にて精子数および運動率の有意な増加をみたとしている．また寺田[6]は，薬物療法では各薬剤に有意な差はなく，妊娠率においても満足できる成績は得られなかったが，精子濃度10～40×10⁶/mlの乏精子症に限れば薬物治療群の妊娠率は有意差をもって非治療群に勝っており，軽～中等度の乏精子症に対する治療の有用性を示したと報告している．自験例においては無精子症以外で薬物治療群は非治療群よりも妊娠率が低く，妊娠率という観点のみからすると，薬物療法の有用性は見いだしにくいといわざるをえない．

男子不妊症の手術療法として最も頻度の高いものは精索静脈瘤に対する内精巣静脈高位結紮術である．術後の精液改善率60～80%，妊娠率は20～68%[20-24]とかなりよい成績が報告されている．寺田[6]は精子濃度10～40×10⁶/mlにおいて妊娠率43.5% (自験例は57.1%)，精子濃度10×10⁶/ml未満においては妊娠率38.9% (自験例は47.1%) と報告しており，とくに精子濃度10×10⁶/ml未満の乏精子症群でもそのような高い妊娠率が得られたことは特筆されると寺田は述べ，著者も当初予想もしていなかったことである．

特発性男子不妊症が男子不妊症の7割程度を占める中で妊娠成立には女性側の因子を含めて多くの因子が関与しているが，今後の治療方針として，精索静脈瘤に対しては積極的に高位結紮術を施行していくことが望ましいと思われた．

結　語

1978年より1988年の10年間に滋賀医科大学附属病院泌尿器科を受診した男子不妊症患者477名について臨床統計的検討をおこなった．またアンケート方式による追跡調査をおこない，回答のあった209例に対して，治療成績を妊娠率より検討した．

本論文の要旨は第34回日本不妊学会総会 (1989年9月，旭川市) において発表した．

文　献

1) 小松洋輔，友吉唯夫，岡田謙一郎，高山秀則：男子不妊症の臨床統計的観察ならびその追跡調査成績について，日不妊会誌，14(4)：346，1969
2) 山本雅憲，三宅弘治，欄　芳郎，筧　英雄，後藤百万，高村真一，葵　紹謨，三矢英輔：男子不妊症の臨床統計的観察，日不妊会誌，27(3)：369，1982
3) 布施秀樹，皆川英雄，伊藤春夫，島崎淳：男子不妊症の臨床的観察，日不妊会誌，28(2)：197，1983
4) 石川博道，相川　厚，武島　仁，小山雄三，中村聡：男子不妊症の臨床統計学的検討，日不妊会誌，29(3)：329，1984
5) 吉井慎一，友政　宏，武島　仁，石川博道，小磯謙吉：過去5年間の男子不妊症の臨床統計，日不妊会誌，34(3)：454，1989
6) 寺田為義：男子不妊症治療面からの問題点，泌尿紀要，34：1979，1988
7) 友吉唯夫，新井　豊，石田　章，九嶋麻優美：精索静脈瘤診断上の問題点，泌尿紀要，34：1935，1988
8) 広川　信，岩本晃明，藤井　浩，日下部きよ子：精索静脈瘤の臨床的研究，陰嚢シンチグラムによる診断について，日泌尿会誌，70：53，1979
9) 三浦一陽：特発性精索静脈瘤に関する研究，第一報各種診断法の比較検討，日泌尿会誌，75：1225，1984
10) Greenberg, S. H., Lipshultz, L. I., Morganroth, J. and Wein, A. J.: The use of Doppler stethoscope in the evaluation of varicoceles, J. Urol., 117: 296, 1977
11) 森山堅重，三浦一陽，村上憲彦，白井将文，安藤弘：接触式高度温度計による陰嚢皮膚温の測定，日泌尿会誌，70：1034，1979
12) 勝岡洋治，星野英章，中島　登，白水　幹，栗林幸夫，大滝　誠：精索静脈瘤における精巣静脈造影法の診断的意義と治療への応用，臨泌，38：973，1984
13) Coolsaet, B. L. R. A.: The varicocele syndrome: Venography determining the optimal level for surgical management, J. Urol., 124: 833, 1980
14) Yarborough, M. A., Burns, J. R. and Keller, F. S.: Incidence and clinical significance of subclinical scrotal varicoceles, J. Urol., 141: 1372, 1989
15) 三宅弘治：Male Fertilityの諸問題－組織学的考察－，泌尿紀要，34：1949，1989
16) 大橋輝久，森岡政明：男子不妊症の内分泌環境，西日泌尿，44：545，1982
17) 石神襄次：男子不妊症の治療，臨泌，31：475，1979
18) 熊本悦明，丸田　浩，石神襄次，守殿貞夫ほか：Oligozoospermiaに対するMecobalaminの臨床効果，泌尿紀要，34：1109，1988
19) Schill, W. B.: Treatment of idiopathic oligozoospermia by Kallikrein: Results of a double blind study, Arch. Androl., 2: 163, 1979
20) Greenberg, S. H.: Varicocele and male fertility, Fertil. Steril., 28: 699, 1977
21) Gunter, D.: The Palmo operation for varicocele and its effects on fertility, Br. J. Urol., 47: 230, 1975
22) Saypol, D. C.: Varicocele (review article), J. Androl., 2: 61, 1981
23) 武島　仁，友政　宏，吉井慎一，石川博通，小磯謙吉，小山雄三：男子不妊症における精索静脈瘤－手術成績と精液所見の関連について，西日本泌尿，48：461，1986
24) Dubin, L. and Amelar, R. D.: Varicocelectomy as therapy in male infertility: a study of 504 cases, J. Urol., 113: 640, 1975

A clinico-statistical study on male infertility

Akira Ishida and Tadao Tomoyoshi

Department of Urology,
Shiga University of Medical Science,
Shiga 520-21, Japan
(Director: Prof. T. Tomoyoshi)

Statistical observations were made on 477 patients with male infertility who had visited Shiga University Hospital from 1978 to 1988.

1) The peak of age distribution was from 30 to 34. Childless period before hospital visit was mostly within 3 years after their marriage.

2) As to causes, so-called idiopathic male infertility occupied 70.6% of the entire cases. Varicocele testis occupied 23.1% of them.

3) Testicular volume showed good relation to sperm count.

4) The levels of FSH and LH reversely related to sperm count, but the levels of testosterone and prolactin were within normal range in most of cases.

5) A follow up survey as to pregnancy was tried for 452 cases and 209 responded to inquiry. Pregnancy was verified in 38.8%. This rate also related to sperm count. In oligozoospermia (less than 40×10^6/ml), the rate of pregnancy in the group receiving medications was 32.0%, whereas that in the untreated group was 36.4%. The rate of gregnancy after high ligation of varicocele was 50.0%.

(受付：1992年3月23日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

男性不妊の臨床的観察

Clinical Observation on Male Infertility

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室
(主任：田崎　寛教授)

大橋正和　石川博義　大家基嗣
Masakazu OHASHI　Hiroyoshi ISHIKAWA　Mototsugu OHYA
橘　政昭　馬場志郎　出口修宏
Masaaki TACHIBANA　Shiro BABA　Nobuhiro DEGUCHI
実川正道　畠　亮　田崎　寛
Seido JITSUKAWA　Makoto HATA　Hiroshi TAZAKI

Department of Urology,
Keio University School of Medicine, Tokyo 160, Japan
(Director: Prof. H. Tazaki)

東京歯科大学市川総合病院泌尿器科
石川博通
Hiromichi ISHIKAWA
Department of Urology,
Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

国立埼玉病院泌尿器科
織田孝英
Takahide ODA
Department of Urology,
Saitama National Hospital

1989年1月より1991年12月に至る3年間に慶応義塾大学病院泌尿器科不妊外来を受診した486例について臨床的観察を試みた.

1) 不妊外来受診患者は全新患の4.2%，全男性新患の6.3%を占め，この比率は増加傾向にあった.
2) 初診時年齢は30歳以上35歳未満が，不妊期間は2年以上3年未満が最多であった.
3) 486例中60例 (12.3%) の配偶者に婦人科的異常が認められた.
4) 精液所見上479例中430例 (89.8%) の症例になんらかの異常が認められた.
5) 486例中253例 (52.1%) に精液所見に影響を及ぼすと考えられる疾患が認められ，精索静脈瘤が156例 (32.1%) と最多であった.
6) 第6群 (Primary azoospermia) において精巣容積は有意に小であり，FSHは有意に高値を呈した.
7) 染色体異常は第6群 (Primary azoospermia)のみに認められ，第6群93例中12例 (12.9%) を占めた.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 116—122, 1993)

緒　言

不妊治療が社会的認知を受けるようになり，男性サイドの診療の重要性が益々増してきたといえる．当科でも男性不妊症患者は年々増加しつつある．今回過去3年間における不妊外来の臨床的観察を試みたので報告する．

対　象

1989年1月より1991年12月に至る3年間に慶応義塾大学病院泌尿器科不妊外来を受診した486例を対象とした．ただしこの中には勃起障害を主訴とする者は含まれていない．

方　法

a) 問診

初診時年齢，結婚期間，既往歴の他，妻の年齢，妻の既往歴，妻の婦人科的異常の有無などを問診した．

b) 理学的所見

まず外性器の視触診を施行した．精巣容積はオーキドメータを用いて測定した．精索静脈瘤の有無は立位での触診により行い，さらにValsalvaの手技をとらせた．また経直腸的に前立腺を診察した．

c) 精液検査

精液検査は3～5日間の禁欲期間の後，広口容器にマスターベーションにより採取させた精液を，室温で30分間放置して充分に液化させ，精液量の測定，そしてSPエースG®[1]を用いて精子濃度，精子運動率の算定を行った．なお当科では精液自動分析装置セルソフトシリーズ3000[2,3,4]を用いた分析も同時に施行している．今回の検討ではSPエースG®を用いた精液検査値を採用し“WHOの基準[5]”を参考にして精子濃度，精子運動率所見より患者を第1群～7群に分類した．

第1群：Normozoospermia (精子濃度20×10^6/ml以上，精子運動率50%以上)

第2群：Oligozoospermia (精子濃度20×10^6/ml未満，精子運動率50%以上)

第3群：Asthenozoospermia (精子濃度20×10^6/ml以上，精子運動率50%未満)

第4群：Oligoasthenozoospermia (精子濃度20×10^6/ml未満，精子運動率50%未満)

第5群：Obstructive azoospermia (精液所見は無精子症で精巣生検上ほぼ正常の造精機能が認められ，明らかな精路通過障害が認められたもの)

第6群：Primary azoospermia (精液所見は無精子症で精巣生検上明らかな造精機能障害が認められたもの，あるいは精巣生検は行っていないが精巣容積やホルモン検査で明らかに原発性造精機能障害が疑われたもの)

第7群：Aspermia (精液採取が自宅でも病院でも不可能で，勃起障害は認めないが外尿道口よりの精液の射出が認められないもの)

d) 内分泌学的検査

血清FSH, LH，テストステロン (以下Tと略す)，プロラクチン (以下PRLと略す) 測定は，全例においてRIA法にて施行した．

e) 精巣生検

Azoospermia症例にできるだけ施行し，生検材料はH-E染色後検鏡した．組織像は"Normal"，"Hypospermatogenesis"，"Maturation arrest"，"Germ cell aplasia"に分類した[6]．

f) 染色体検査

Azoospermia症例にできるだけ施行した (G - band法)．

結　果

a) 患者数：1989年1月より1991年12月に至る3年間の慶応義塾大学病院泌尿器科初診患者総数は11,522人であり，その内男性初診患者総数は7,759人であった．同期間に不妊を主訴として当科不妊外来

表1　過去3年間における慶応義塾大学病院泌尿器科男性不妊初診患者数

年度	男性不妊初診患者数	新患総数	男性新患総数	対新患総数比	対男性新患総数比
1989	143	3875	2710	3.7%	5.3%
1990	161	3959	2652	4.1	6.1
1991	182	3688	2397	4.9	7.6
合計	486	11522	7759	4.2	6.3

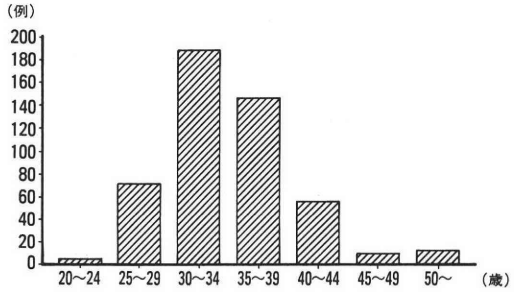


図1　初診時年齢

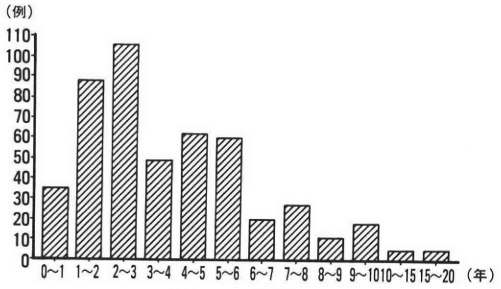


図2　不妊期間

を受診した患者は486人で，初診患者総数の4.2%，男性初診患者総数の6.3%であった (表1).

b) 初診時年齢：不妊外来受診患者の初診時年齢は21歳から55歳に及び平均34歳で，30歳代が334例 (68.7%) を占め，5歳間隔に分けると30歳以上35歳未満が188 (38.7%) と最多であった (図1).

c) 不妊期間：不妊期間は6ヵ月から20年に及び2年以上3年未満が106例 (21.8%) と最多であった (図2). なお第1子を既に有し，さらに第2子を希望して当科不妊外来を受診した例が7例があり，この場合の不妊期間とは第1子誕生後よりの期間とした.

d) 妻の婦人科的異常：486例中392例 (80.7%) の妻が当院産婦人科にて診察を受け，56例 (11.5%)が他院産婦人科を受診しており，合計448例 (92.2%) の妻において産婦人科的検査がなされていた．表2に示すごとく，60例の妻に婦人科的異常が発見された.

e) 精液検査：精液検査は486例中479例で可能であった (表3). 第1群Normozoospermiaは49例であり，479例中430例(89.8%) に精液所見上なんらかの異常が認められた．第2群Oligozoospermiaが11例 (2.3%)，第3群Asthenozoospermiaが155例 (31.9%)，第4群Oligoasthenozoospermiaが138例 (28.4%) であった．Azoospermiaは126例 (25.9%) であり，その内訳は第5群Obstructive azoospermiaが33例 (6.8%)，第6群Primary azoospermiaが93例 (19.1%) であった．また7例が第7群Aspermiaであった．以後は精液所見各群別に検討した.

f) 各群の精液所見に影響を及ぼすと考えられる疾患：表4に各群の精液所見に影響を及ぼすと考えられる疾患 (既往歴を含む) を頻度順に列挙してみた．全体としては486例中253例 (52.1%) になんらかの疾患，既往歴が発見された．第5群Obstructive azoospermiaと第7群Aspermiaは全例になんらかの原因疾患が発見された．最頻の疾患は精索静脈瘤であり，

表2　配偶者婦人科的異常

子宮内膜症	15例
卵巣機能不全	12
子宮筋腫	12
卵管閉塞／狭窄	10
流産	5
人口流産	3
高齢 (40歳以上)	3
合計	60

486例中60例 (12.3%) の配偶者に異常あり.

表3　精液所見による分類

	Sperm concentration (/ml)	Sperm motility rate	例数　(%)
第1群Normozoospermia	20×10^6以上	50%以上	49 (10.1)
第2群Oligozoospermia	20×10^6未満	50%以上	11 (2.3)
第3群Asthenozoospermia	20×10^6以上	50%未満	155 (31.9)
第4群Oligoasthenozoospermia	20×10^6未満	50%未満	138 (28.4)
第5群Obstructive azoospermia	0	−	33 (6.8)
第6群Primary azoospermia	0	−	93 (19.1)
第7群Aspermia	−	−	7 (11.4)
合計			486 (100)

表4　各群の精液所見に影響を及ぼすと考えられる疾患

	第1群 (%)	第2群 (%)	第3群 (%)	第4群 (%)	第5群 (%)	第6群 (%)	第7群 (%)	合計 (%)
1. 精索静脈瘤	8[a] (53.3)	2 (18.2)	52[b) c) d)] (33.5)	65[e) f)] (47.1)	5[h] (15.2)	24[i) j)] (25.8)	0	156 (32.1)
2. 精索静脈瘤術後 (他施設)	3 (20.0)	0	8 (5.2)	4 (2.9)	0	3 (3.2)	0	18 (3.7)
3. 精巣上体閉塞	0	0	0	0	13 (39.4)	0	0	13 (2.7)
4. 染色体異常	0	0	0	0	0	12[i] (12.9)	0	12 (2.5)
5. 不完全逆行性射精	1 (6.7)	0	5[b] (3.2)	5[g] (3.6)	0	1 (1.1)	0	12 (2.5)
6. 小児期ソケイヘルニア (両側) 術後精管閉塞	0	0	0	0	8 (24.2)	2 (2.2)	0	10 (2.1)
7. 前立腺炎	1 (6.7)	0	2[c] (1.3)	4[e] (2.9)	0	0	0	7 (1.4)
8. 内分泌 (下垂体) 異常	0	0	0	0	0	4 (4.3)	1 (14.3)	5 (1.0)
9. 精管欠損	0	0	0	0	4 (12.1)	0	0	4 (0.8)
10. 完全逆行性射精	0	0	0	0	0	0	4[k] (57.1)	4 (0.8)
11. インポテンス	1 (6.7)	0	2[d] (1.3)	0	0	0	0	3 (0.6)
12. 停留精巣	0	0	0	1 (0.7)	1 (3.0)	1 (1.1)	0	3 (0.6)
13. 停留精巣術後	0	0	0	1[f] (0.7)	1 (3.0)	1 (1.1)	0	3 (0.6)
14. 陰嚢水腫	0	0	0	2 (1.4)	0	0	0	2 (0.4)
15. 片側ソケイヘルニア術後	0	0	0	0	0	2 (2.2)	0	2 (0.4)
16. 精巣腫瘍術後 (含RPLND後)	0	0	0	0	0	0	2[k] (28.6)	2 (0.4)
17. 片側除睾術後	1[a] (6.7)	0	0	1 (0.7)	0	0	0	2 (0.4)
18. 慢性腎不全 (透析中)	0	0	0	1 (0.7)	0	1[j] (1.1)	0	2 (0.4)
19. 尿道下裂	0	0	0	1 (0.7)	0	1 (1.1)	0	2 (0.4)
20. 精巣炎	0	0	0	0	0	1 (1.1)	0	1 (0.2)
21. 精嚢欠損	0	0	0	0	1 (3.0)	0	0	1 (0.2)
22. 精嚢拡張	0	0	0	1[g] (0.7)	0	0	0	1 (0.2)
23. 精管結紮後	0	0	0	0	1[h] (3.0)	0	0	1 (0.2)
24. 糖尿病	0	0	0	0	0	0	1 (14.3)	1 (0.2)
25. 特発性射精障害	0	0	0	0	0	0	1 (14.3)	1 (0.2)
26. 潰瘍性大腸炎 (サラゾピリン内服中)	0	0	1 (0.6)	0	0	0	0	1 (0.2)
合計	14	2	66	82	33	49	7	253
対患者総数比 (%)	(28.6)	(18.2)	(42.6)	(59.4)	(100)	(52.7)	(100)	(52.1)
患者総数	49	11	155	138	33	93	7	486

a) 精索静脈瘤，片側除睾術後の合併1例あり．
b) 精索静脈瘤，不完全逆行性射精の合併2例あり．
c) 精索静脈瘤，前立腺炎の合併1例あり．
d) 精索静脈瘤，インポテンスの合併1例あり．
e) 精索静脈瘤，前立腺炎の合併2例あり．
f) 精索静脈瘤，停留精巣術後の合併1例あり．
g) 不完全逆行性射精，精嚢拡張の合併1例あり．
h) 精索静脈瘤，精管結紮後の合併1例あり．
i) 精索静脈瘤，染色体異常の合併3例あり．
j) 精索静脈瘤，慢性腎不全 (透析中) の合併1例あり．
k) 精巣腫瘍術後 (RPLND後)，完全逆行性射精の合併2例あり．

486例中156例 (32.1%) に認められた．精液所見正常の第1群にも49例中14例 (28.6%) になんらかの疾患が認められた．

g) 精巣容積：各群における精巣容積を検討した (図3)．第6群Primary azoospermiaは他のどの群に比しても精巣容積が小であった ($P<0.05$)．第4群Oligoathenozoospermiaも精巣容積が小の傾向を示したが有意差はなかった．

h) 内分泌学的検査：各群における血清FSH，LH，T値を検討した (図4)．T値は全群において有意差がなかった．第6群 Primary azoospermia と第4群Oligoasthenozoospermiaはいずれもも FSH値，LH値両者とも第1群に比して有意に高値をとっていた ($P<0.05$)．なおPRL値は全群において有意差がなく，第7群の1例に下垂体マイクロアデノーマよりの高プロラクチン血症が発見された．

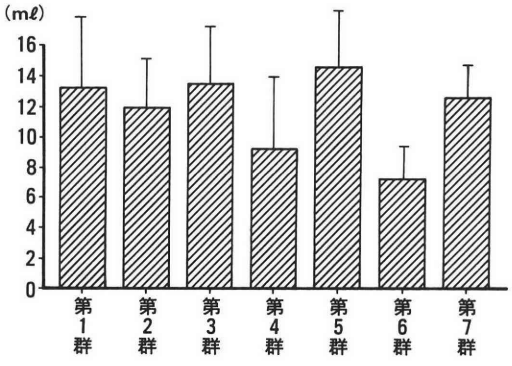


図3　各群における精巣容積 (M±SD)

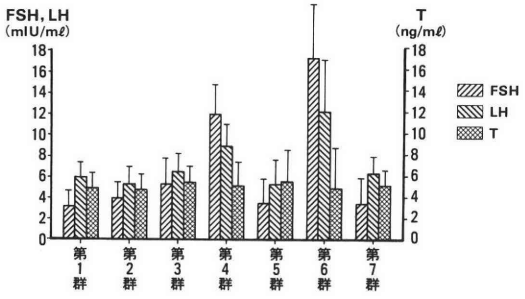


図4　各群におけるFSH，LH，T濃度 (M±SD)

i) 精巣生検：表5に第4群Oilgoasthenozoospermia，第5群 Obstructive azoospermia，第6群 Primary azoospermiaと精巣生検結果の関係を示した．第5群Obstructive azoospermia は全例 Normal もしくは Hypospermatogenesisと良好な精巣組織であるのに対して，第6群Primary azoospermiaは83例中57例 (68.7%) がGerm cell aplasiaもしくはMaturation arrestであり精巣障害が高度であった．

j) 染色体検査：発見し得た染色体異常を表6に挙げてみた．全例第6群 Primary azoospermia より発見され，第6群93例中12例 (12.9%) に染色体異常が認められたことになる．12例中7例が47XXY であった．

考　察

a) 患者数：男性不妊患者の泌尿器科男性新患総数に占める割合は，諸家の報告では10%前後[7,8,9]のようである．当科では6.3%前後であったが，この割合は年々増加しつつある．これは男性不妊という領域が社会的認知を受けるようになり，一方で男性不妊外来担当医師が固定し，親密なるcommunicationが可能になったためと考えられる．

b) 初診年齢：30歳代前半が最多であり諸家の報告[7,8,10,11,12]と一致していた．しかし，一方で40歳代，50歳代も散見され，ここに第1子を既に有し第2子を希望されて不妊外来を受診される方々が含まれている．

c) 不妊期間：今回我々はこの不妊期間を“結婚期間”として集計し，2年以上3年未満が21.8%と最多であったが，なかには20年もの結婚生活後不妊外来を初めて受診するcaseもあり，妻の年齢も考慮するとこの領域の社会的啓蒙の必要性を痛感させられる．今西ら[7]は不妊期間を“結婚期間”ではなく，

表5　精巣生検結果

	第4群 Oligoasthenozoosprmia	第5群 Obstructive azoospermia	第6群 Primary azoospermia	合計
Normal	0	17	0	17
Hypospermatogenesis	8	13	26	47
Maturation arrest	0	0	17	17
Germ cell aplasia	2	0	40	42
合　計	10	30	83	123

表6　染色体異常

45 XY, t(13q14q)	1例
46 X, +mar	1
46 XY, inv(9p+, q−)	1
46 X, Y ? dicentricY ?	1
46 X, psu dic(Y)pter-q11, q11-pter	1
47 XXY	7
合計	12

(全例第6群．第6群93例中12例 (12.9%) に染色体異常あり．)

挙児を希望してから不妊外来を受診するまでの期間と定義している．しかし期間が長くなると記憶が曖昧になるカップルが多く，両方の期間とも問診で押さえておく必要がある．

d) 妻の婦人科的異常：486例中60例 (12.3%) に妻のなんらかの異常が発見された．486例中448例 (92.2%) が産婦人科的精査を受けており，今後益々の産婦人科と我々泌尿器科との連携が必要になってこよう．

e) 精液検査：まず精液検査法であるが，我々はこのところ20 μ mの厚みで0.1mmの格子を有するSPエースG®を使用している．従来法 (血球算定盤による精子濃度測定，カバーグラス法による精子運動率測定)　の測定値との間に良好なる相関関係を確認し，測定法も簡便であり今回の精液検査データはSPエースG®法によった．

次に精液所見による分類はWHOの基準[5]を参考にして分けてみた．今までの諸家の報告では精液所見による分類はまちまちであったが，今後はこの基準が一般化してゆくだろう．

精液所見上の第1群Normozoospermiaが49例 (10.1%) 認められた．妻側の婦人科的要素もあろうが，数字としては現れてこない精子の質的異常も考慮する必要がある．

f) 各群の精液所見に影響を及ぼすと考えられる疾患：表4は精液所見に影響を及ぼすと考えられる疾患を頻度順に列挙したものであるが精索静脈瘤が174例 (35.8%) と圧倒的であった．第1群Normozoospermia 49例中に11例 (22.4%) と効率に本症が認められたことは，本症と質的精子機能を考える上で興味深い[4]．

第5群Obstructive azoospermiaと第7群Aspermiaは全例にその原因疾患が発見された．両群とも泌尿器科的に治療可能であり，その原因検索は徹底的におこなうべきと考える．

頻度的には第5番目の“不完全逆行性射精”は最近になって話題となっている病態である[13]．少量の精液が外尿道口より射出されるが，大部分の精液は膀胱内に逆行性に射出されるもので，精液量が1 mlに満たない例では，射精後尿中の精子の有無を検索しておくべきである．

g, h) 精巣容積，内分泌学的検査：第6群Primary azoospermiaは他のどの群に比しても精巣容積が小であり，FSH値，LH値両者とも第1群に比して高値をとっていた．これは諸家の報告[14]と一致するところであり，後述の精巣生検の必要の是非という問題につながっていく．

i) 精巣生検：今回の検討ではAzoospermiaを第5群Obstructive azoospermiaと第6群Primary azoospermiaに分けたが，そう整然と分けられない症例が存在することも事実である．我々の精巣生検結果も，第5群Obstructive azoospermia 30例中13例 (43%) が，第6群Primary azoospermia 83例中26例 (31%) が“Hypospermatogenesis”と同様の所見ということになった．守殿[15]は，一部の精巣組織像のみから，全体の精巣機能を推測するのは極めて危険であると述べている．やはり病歴，精巣容積，内分泌学的検査などを含め，幅広い視野より総合的な判断をすべきだろう．

j) 染色体検査：発見し得た染色体異常は全例第6群Primary azoospermiaであり，全無精子症126例に対する比率は9.5%であり，これはおおむね諸家の報告[16]と一致する．通常の理学的所見のみで染色体異常を推測することはほとんど不可能であり，無精子症症例では全例染色体をチェックしておく必要がある．

おわりに

過去3年間の男性不妊の臨床的観察を行った．今後男性不妊診療の重要性が高まる中で，産婦人科医と我々泌尿器科医とのより親密なる連携が益々必要となってくることを強調したい．

文　献

1) 川路成穂，大橋正和，西村春男，大久保ミサ，飯島正巳，織田孝英，中尾卓郎，堺　正長，塚崎克巳，馬場謙介：専用チャンバーを用いた精子濃度，精子運動率の同時測定，医療，45：1041，1991
2) 大橋正和，石川博義，橘　政昭，田崎　寛：

Computer assisted semen analyzer (CASA) を用いた精子運動能の分析，日不妊会誌，34：707，1989
3) 田崎 寛，大橋正和，石川博義，橘 政昭：精子機能検査法，産婦人科治療，62：909，1991
4) 大橋正和，大家基嗣，石川博義，橘 政昭，田崎寛，織田孝英，石川博通：Computer assisted semen analyzer (CASA) を用いた精子運動能の分析，第1回泌尿器科細胞解析研究会抄録集：63，1992
5) WHO labolatory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, Published on behalf of the World Health Organization, Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, 1987
6) 守殿貞夫，松本 修：男性不妊－検査－，泌尿外，4：763，1991
7) 今西 治，奥田喜啓，篠崎雅文，藤澤正人，岡本恭行，岡 伸俊，浜口毅樹，岡田 弘，羽間稔，松本 修，石神襄次，守殿貞夫：男性不妊の臨床統計的観察，日不妊会誌，36：281，1991
8) 布施秀樹，皆川秀夫，伊藤晴夫，島崎 淳：男性不妊症の臨床的観察，日不妊会誌，28：197，1983
9) 山本雅憲，三宅弘治，欄 芳郎，算 英雄，後藤百万，高村真一，蔡 紹謨，三矢英輔：男性不妊症の臨床統計的観察，日不妊会誌，27：369，1982
10) 石川博通，何 仲濤，真鍋文雄，吉井慎一，小磯謙吉：男性不妊症の臨床統計，泌尿外，4：961，1991
11) 吉井慎一，友政 宏，武島 仁，石川博通，小磯謙吉：男性不妊症の臨床統計，西日泌尿，49：487，1987
12) 石川博通，相川 厚，武島 仁，小山雄三，中村聡：男性不妊症の臨床統計学的検討，日不妊会誌，29：329，1984
13) 大橋正和，石川博義，大家基嗣，橘 政昭，田崎寛，織田孝英，石川博通：嚢胞腎と部分的逆行性射精を合併した精嚢嚢状拡張症，泌尿外，5：151，1992
14) 篠崎雅文，今西 治，奥田喜啓，藤澤正人，松本修，守殿貞夫：無精子症における精巣生検及び精嚢造影，日本アンドロロジー学会第9回学術大会講演抄録集：130，1990
15) 守殿貞夫：精巣－とくに男性不妊での解釈－，泌尿外，4：457，1991
16) 原 啓，北角嘉徳，佐藤 稔，松橋 求，高波真佐治，石井延久，三浦一陽，白井将文：無精子症における染色体異常の検討，日本アンドロロジー学会第10回学術大会講演抄録集：45，1991

Clinical observation on male infertility

Masakazu Ohashi, Hiroyoshi Ishikawa,
Mototsugu Ohya, Masaaki Tachibana,
Shiro Baba, Nobuhiro Deguchi,
Seido Jitsukawa, Makoto Hata,
and Hiroshi Tazaki

Department of Urology,
Keio University School of Medicine, Tokyo 160, Japan
(Director: Prof. Hiroshi Tazaki)

Hiromichi Ishikawa

Department of Urology,
Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

Takahide Oda

Department of Urology, Saitama National Hospital

From January 1989 to December 1991, 486 male patients visited our clinic complaining of infertility, which corresponded to 6.3% of total male outpatients.

The peak of the age distribution was from 30 to 34 years old, and the peak of the infertile period was from 2 to 3 years after marriage. 12.3% of the wives had some gynecological disorders.

The semen was analysed on 479 patients, and 430 (89.8%) patients revealed to have some abnormality. 52.1% of 486 patients had some influential causes of their infertility, and the varicocele testis was the most common (32.1%).

"Primary azoospermia" group had smaller testicle volume and higher level of serum FSH concentration than any other groups with statistically significant differences, and chromosomal abnormality was found from 12.9% of this group.

(受付：1992年6月1日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

当院における体外受精・胚移植の成績
——特に精液性状の観点から——

Retrospective Studies on the Semen Characteristics and the Outcome of In Vitro Fertilization-Embryo Transfer in Our Hospital

聖隷浜松病院産婦人科

西村 満 Mitsuru NISHIMURA
岡田 久 Hisashi OKATA
西垣 新 Arata NISHIGAKI
大谷嘉明 Yoshiaki OOTANI
鳥居裕一 Yuuichi TORII
青木 智 Satoru AOKI

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

同臨床検査部
佐藤 和文
Kazufumi SATO
Laboratory of Biology,
Seirei Hamamatsu Hospital, Hamamatsu 430, Japan

1989年11月からの2年間で197症例，383周期に採卵を実施し327周期で受精が成立，胚移植により以下の結果を得た．

1) 妊娠率は胚移植あたり22.0%，症例あたり34.0%，流産率は16.7%，子宮外妊娠率は5.6%であった．また，妊娠継続率は胚移植あたり17.1%，症例あたり28.4%，多胎妊娠率は30.4%であった．

2) 卵管性不妊，子宮内膜症性不妊の妊娠率は，ともに症例あたり46.2%と良好であったのに対し，男性不妊では21.3%と低率であった．

3) 精液性状で精子濃度2000万/ml以下，精子運動率30%以下でそれぞれ受精率の低下を認めた．受精例，妊娠例の最低精子濃度は，それぞれ200万/ml，1100万/ml，最低精子運動率は，それぞれ10%，23%と受精例と妊娠例とで精液性状に差を認めた．

以上，原精液性状の改善をはかる努力も重要であると判断された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 123—128, 1993)

緒 言

1978年，Steptoe and Edwards[1]により世界で初めて体外受精・胚移植 (IVT-ET) による出産例が報告されたが，本邦でもその5年後の1983年に初めてIVF-ETの成功例が報告[2]されるに至った．以後，卵巣刺激法，採卵法，培養法等に急速な変革，進歩がもたらされたことにより，IVT-ETプログラムが徐々に系統化され，さらに簡略化も可能になるにしたがい，不妊症治療のひとつとして着実に広がり定着してきている．一方，その適応も卵管性不妊に限らず，子宮内膜症性不妊や男性不妊等の難治性不妊へと拡大されてきているが，男性不妊に関しては満足できる成績には遠く及ばない．

当院では，1989年11月よりこれら難治性不妊症例に対しIVF-ETを導入し治療に当たっているが，1991年10月で2年経過したのを機会に成績向上のための問題点を探ることを目的として，特に精液性状の観点からその成績を分析，検討したので報告する．

対象および方法

1989年11月から1991年10月までの2年間に当院においてIVF-ETを実施した197症例，383周期を対象とした．適応は，卵管性不妊のほかに子宮内膜症性不妊，男性不妊，原因不明長期不妊等の難治性不妊症例とした．卵巣刺激法は，刺激前周期の黄体中期よりGnRH agonist 900μg/dayを開始し，月経周期3日目よりhMG 300IUを連日筋注するlong (down regulation) protocol法を原則とした (図1)．

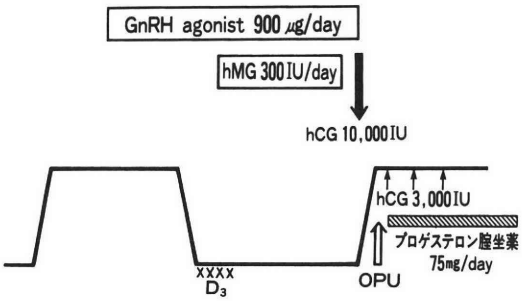


図1　体外受精・胚移植スケジュール

刺激中止基準はdominant follicle径が18～20mmに達した時点とし，30～50時間後にhCG 1万単位を筋注した．hCG投与の36時間後に超音波ガイド下，経腟的に採卵を行った．培養液はHTFを用い，非働化患者血清を精子調整用には5％，ET用には75%，それ以外には10%添加した．精子調整法はswim up (精液静置) 法を原則としたが，必要に応じ80% Percollによる攪拌密度勾配法を用い，媒精精子濃度を50万/mlとした．培養環境は，37℃でCO_2 5％，O_2 5％，N_2 90%とした．媒精14～18時間後に前核の有無を確認，培養液を交換し，媒精2日後に2～8細胞期胚を子宮内に移植することを基本としたが，場合により媒精開始翌日に前核期の受精卵を移植した．黄体期の管理は，採卵日よりhCG 3千単位隔日3日間筋注およびprogesterone膣坐薬75mg/day 12日間の使用により行った．なお移植胚数は，IVF-ET開始後1990年10月までの1年間は特に制限せずに施行したが，それ以降は原則として4個を上限とし余剰胚を凍結保存している．

成　績

1．症例の背景 (表1)

原発性不妊症132例 (平均年齢33.3歳，平均不妊期間7.4年)，続発性不妊症65例 (平均年齢34.6歳，平均不妊期間5.8年)，計197例 (平均年齢33.7歳，平均不妊期間6.9年) であった．

2．体外受精・胚移植の成績 (表2)

197症例に対し383周期の採卵を実施し，327周期 (85.4%) で受精が成立，72周期 (67症例) の妊娠を得た．5症例は2度の妊娠成立をみており，妊娠率はETあたり22.0%，症例あたり34.0%であった．自然流産12周期 (流産率16.7%)，子宮外妊娠4周期 (子宮外妊娠率5.6%) を除いた56症例が妊娠継続または分娩となっており，妊娠継続率はETあたり17.1%，症例あたり28.4%であった．17症例が多胎妊娠 (双胎13症例，品胎2症例，四胎2症例) であり，妊娠継続56症例中の30.4%を占めた．

3．適応別にみた体外受精・胚移植の成績 (表3)

表1　症例の背景

	症例数	年齢 (歳)	不妊期間 (年)
原発性不妊	132	33.3±4.2	7.4±3.8
続発性不妊	65	34.6±4.3	5.8±3.5
計	197	33.7±4.3	6.9±3.7

(M±SD)

表2　体外受精・胚移植の成績

症例数	197	
周期数	383	
総採卵数 (個)	3368	
総受精卵数 (個)	1544	
受精周期数	327	
移植胚総数 (個)*	1168	
移植あたり胚数	3.6	
受精率 (%)	45.8	(1544/3368) /採卵数
	85.4	(327/383) /周期
妊娠率 (%)	22.0	(72/327) /ET
	34.0	(67/197) /症例
妊娠継続率 (%)	17.1	(56/327) /ET
	28.4	(56/197) /症例
多胎妊娠率 (%)	23.6	(17/72) /妊娠例
	30.4	(17/56) /妊娠継続例

*　移植凍結胚を含む

表3　適応別にみた体外受精・胚移植の成績

適応	症例数	妊娠例	率(%)	流産例	率(%)	妊娠継続例	率(%)
卵管因子	65	30	46.2	6	20.0	26*	40.0
子宮内膜症	39	18	46.2	4	22.2	16*	41.0
男性因子	61	13	21.3	2	15.4	11**	18.0
原因不明	25	5	20.0	3	60.0	2	8.0
その他	7	1	14.3	0	0	1	14.3
計	197	67	34.0	15	22.4	56	28.4

流産率＝流産例／妊娠例
妊娠継続率＝妊娠継続例／症例数

* 流産後，再度のIVF-ETでの妊娠継続例が各々2例
** 凍結胚移植による妊娠1例を含む

表4　精子濃度よりみた体外受精・胚移植の成績

調整前精子濃度 ($\times 10^6$/ml)	採卵周期	採卵数 (個)	受精卵数 (個)	受精率 (%)	受精周期 数	受精周期 率(%)	妊娠周期 数	妊娠周期 率(%)	流産 数	流産 率(%)
～ 4	14	107	10	9.3	6	42.9	0	0	0	0
5～ 9	11	91	26	28.6	6	54.5	0	0	0	0
10～19	39	266	98	36.8	29	74.4	7	24.1	1	14.3
20～29	32	305	133	43.6	26	81.3	4	15.4	1	25.0
30～49	52	439	180	41.0	47	90.4	13	27.7	4	30.8
50～99	148	1315	666	50.6	132	89.2	27	20.5	6	22.2
100～	87	845	431	51.0	81	93.1	21	25.9	4	19.0
計	383	3368	1544	45.8	327	85.4	72	22.0	16	22.2

表5　精子運動率よりみた体外受精・胚移植の成績

調整前精子運動率 (%)	採卵周期	採卵数 (個)	受精卵数 (個)	受精率 (%)	受精周期 数	受精周期 率(%)	妊娠周期* 数	妊娠周期* 率(%)	流産** 数	流産** 率(%)
～ 9	3	19	0	0	0	0	0	0	0	0
10～19	5	28	7	25.0	4	80.0	0	0	0	0
20～29	19	106	24	22.6	14	73.7	2	14.3	0	0
30～39	30	216	79	36.6	21	70.0	2	9.5	1	50.0
40～49	43	347	153	44.1	34	79.1	6	17.6	1	16.7
50～	283	2652	1281	48.3	254	89.8	62	24.4	14	22.6
計	383	3368	1544	45.8	327	85.4	72	22.0	16	22.2

* 妊娠周期率＝妊娠周期数／受精周期数
** 流産率＝流産数／妊娠周期数

不妊因子が複数の症例も存在するが，主たる不妊因子(適応)別に成績を分析すると，卵管因子，子宮内膜症ではそれぞれ65症例，39症例に対し30例および18例の妊娠を得ており，ともに46.2%の妊娠率となり良好な成績を得ているのに対し，男性因子では61症例に対し13例，妊娠率21.3%と低率であった．

4．精子濃度よりみた体外受精・胚移植の成績(表4)

調整前精子濃度2000万/ml以下で受精率は徐々に低下傾向を示し，500万/ml未満での受精率は9.3%と極

表6　移植胚数と妊娠，流産

移植胚数	胚移植 (周期)	妊娠 (周期)	流産 (周期)	妊娠率 (%)	流産率 (%)	正常妊娠率 (%)
1	29	3	0	10.3	0	10.3
2	26	5	2	19.2	40.0	11.5
3	22	5	1	22.7	20.0	18.2
4	20	7	1	35.0	14.3	30.0
5	18	6	1	33.3	16.7	27.8
6	14	6	1	42.9	16.7	35.7
7<	31	11	4	35.5	36.4	22.6
全体	160	43	10	26.9	23.3	20.6

妊娠率＝妊娠周期数／胚移植周期数
正常妊娠率＝流産を除く正常妊娠周期数／胚移植周期数

低値であった．受精を認めた周期での最低精子濃度は200万/mlであった．また，1000万/ml未満での妊娠例は存在せず，妊娠成立症例における最低精子濃度は1100万/mlであった．

5．精子運動率よりみた体外受精・胚移植の成績 (表5)

調整前精子運動率30%以下で受精率の低下を認め，10%未満での受精例は存在しなかった．受精を認めた周期での最低精子運動率は10%であった．また，20%未満での妊娠例は存在せず，妊娠成立症例における最低精子運動率は23%で逆行性射精例であった．

6．移植胚数と妊娠

IVT-ETに着手してから1990年10月までの1年間は，移植胚数を特に制限せずに施行していた時期である．表6はその1年間の移植胚数と妊娠についてまとめたものである．移植胚数の増加に伴い妊娠率も上昇するが，4個以上ではほとんど差を認めていない．一方，妊娠例における移植胚数 (図2) についてみると5個以上で多胎妊娠の増加を認めた．この成績より，原則として移植胚数は4個を上限とすることが望ましいと判断された．

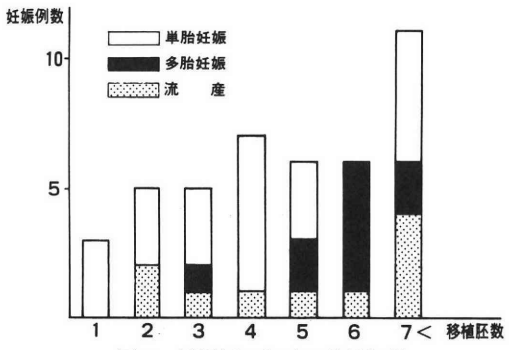


図2　妊娠例における移植胚数

考　察

平成2年度，生殖医学の登録に関する委員会報告[3]によると，本邦では平成元年中に68施設でIVF-ETが実施されており，125施設の登録があることを考慮すると，その後のIVF-ET実施施設数はさらに増加しているものと思われる．このように多くの施設でIVF-ETが実施されている現状は，まさに本法が不妊治療法のひとつとして定着したことを意味するものである．

その間，IVF-ETプログラムには大きな変革があったが，中でも採卵法および卵巣刺激法の進歩が重要であったと思われる．まず，採卵法では，当初腹腔鏡下採卵であったものが超音波ガイド下経腹・経膀胱的採卵が導入された後，経腟プローブの開発に伴い経腟採卵へと変化し，これにより比較的容易かつ頻回の採卵が可能となった[4]．また，卵巣刺激法ではGnRH agonistを併用することでLHサージ発現の抑制が可能となり[5,6]，hCG投与により採卵時間を自由に設定し良質の卵を採取できるようになった．さらに，経腟プローブにより卵胞のmonitoringもきわめて容易になった．当院でIVF-ETに着手したのは1989年11月であり，このような変革を経てIVF-ETプログラムがかなり系統化されてからのことになる．

1989年度の米国の集計[7]によると，IVF-ET実施160施設において胚移植あたりの妊娠率18%，自然流産率23%，子宮外妊娠率5%，分娩率14%であり，一方，1989年度の本邦の集計[3]によると，IVF-ET実施68施設において胚移植あたりの妊娠率19.3%，自然

流産率34.9%，子宮外妊娠率3.8%，分娩率11.8%となっており，当院における胚移植あたりの妊娠率22.0%，自然流産率16.7%，子宮外妊娠率5.6%，妊娠継続・分娩率17.1%という成績は，時期的な差はあるものの世界のトップレベルに達しているとする千田ら[8]の成績と近似している．特に，自然流産率が16.7%と比較的低値に抑えられていることは注目に値しよう．一方，多胎分娩率は，米国で32.9%[7]，本邦で23.1%[3]，千田らで17.1%[8]となっており，当院の30.4% (ただし，多胎妊娠率) は米国同様やや高い傾向にある．しかし，胚の凍結保存法の導入により移植胚数を制限してからの約1年間は，多胎妊娠 (すべて双胎) は5例のみで減少傾向にある．移植胚数については多胎発生防止のため3～4個が望ましい[8,9]と思われるが，我々はIVF-ET開始後1年間の移植胚数と妊娠率，多胎発生率の関係から原則として上限を4個とするのが望ましいという結論を出したが，施設によって培養環境や操作手技の流れに差があるため，各施設で適性な線を出す必要があろう．

さて，IVF-ETは当初，卵管性不妊に対する治療法として開発されたが，その後子宮内膜症性不妊，男性不妊，原因不明長期不妊等のいわゆる難治性不妊にまで適応が拡大されているのが現状と思われ，我々もIVF-ET開始当初からこれらを適応として不妊治療にあたってきた．しかし，卵管性，子宮内膜症性不妊ともに症例あたり46.2%の高い妊娠率を得たのに対し，男性不妊では21.3%と期待に反し低い妊娠率にとどまっており，福岡ら[9]の成績と一致している．これは男性不妊例の多くを占める乏精子症や精子無力症での受精率が低いためと判断され，受精率を上げるための工夫として微少環境受精[10]や再媒精[11]などが試みられている．織田ら[12]の報告と同様，当院での成績も調整前精子濃度が2000万/ml以下で受精率が低下傾向を示し，同様に調整前精子運動率が30%以下で受精率の低下を認めた．また受精周期での最低精子濃度や運動率と妊娠成立症例での最低精子濃度や運動率との間に差を生じたことは，強度の乏精子症や精子無力症例では受精が成立しても妊娠にまでいたる可能性が低下することを意味している．男性不妊症例では精子のqualityの低下，即ち精子形態そのものの異常率が増加するためであるとの報告があり[13,14]これらの理由付けになっているものと思われる．一方，精液性状が正常でも約一割で受精を認めない症例が存在するが，sperm-egg interactionの問題[15]以外に精子濃度や運動率では判断できない要素があると思われ，精子形態や精子の運動様式を知ることが重要になろう[16]．受精能力に乏しい症例に対し最近microfertilizationが試みられるようになったが，131症例，771個の新鮮卵に対し囲卵腔内に精子注入を行ったNgら[17]の報告をみても，受精率は卵あたり16.6%，症例あたり44.3%，ET施行58例あたりの妊娠率は5例，8.6%であるが，対象症例あたりでは3.8%，さらに分娩例は1例のみと妊娠・分娩成功率は極めて低く，本法は男性因子に対する治療法のひとつではあるが決定的ではない．

したがって，できる限り原精液性状の改善をはかる努力もまた重要で，これにより精子形態にも変化，改善が得られる可能性もあるものと思われ，男性不妊におけるIVF-ETでの妊娠率向上につながるものと判断する．現在我々は，原精液性状の改善を目的とした薬物療法として八味地黄丸，補中益気湯をはじめとする漢方療法やclomiphene，hMG等のホルモン療法を中心に施行しており，著しい改善は望めないまでも有効であった症例を少なからず経験している．

以上，当院におけるIVF-ETの成績について報告したが，男性不妊ばかりではなく年齢の問題やpoor responder対策など解決すべき問題点が多々残されており，成績向上をめざし一層の努力を重ねたい．

御校閲を賜りました聖隷浜松病院顧問，前田一雄鳥取大学名誉教授に深謝します．なお，本論文の要旨は第36回日本不妊学会学術講演会 (名古屋) において発表した．

文　献

1) Steptoe, P. C. and Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of a human embryo, Lancet, 2 (8085): 366, 1978
2) 鈴木雅洲，星　和彦，星合　昊，斎藤　晃，桃野耕太郎，森良一郎，京野広一，対木　章，今泉英明，長池文康，上原茂樹，永沼孝子，広瀬洋子：体外受精・胚移植により受精・着床に成功した卵管性不妊症の1例，日不妊会誌，28: 439, 1983
3) 生殖医学の登録に関する委員会報告：日産婦誌，43: 470, 1991
4) 谷川正浩，岩部富夫，関島秋男，寺戸博文，戸田稔子，和田　省，菊川章仁，見尾保幸，前田一雄：体外受精・胚移植時の超音波採卵の総合的評価－各種探触子を用いた成績の比較検討－，日本受精着床学会雑誌，5: 25, 1988
5) Fleming, R. and Coutts, J. R. T.: Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression, Fertil. Steril., 45: 226, 1986

6) 谷 啓光，佐藤芳昭，織田和哉，七里和良，荒川修，竹内正七：ブセレリンを併用した卵巣刺激法による体外受精・胚移植の試み，日不妊会誌，34: 413, 1989
7) Medical Research International, the Society for Assisted Reproductive Technology, and The American Fertility Society: In vitro fertilization-embryo transfer in the United States: 1989 results from the IVF-ET Registry, Fertil. Steril., 55: 14, 1991
8) 千田 智，小田原靖，森 滋，蛭田益紀，飯田修一，鈴木雅洲：当院における体外受精・胚移植成績－妊娠・分娩および出生児についての検討－，日不妊会誌，36: 562, 1991
9) 福岡正恒，野田洋一，辰巳賢一，高倉賢二，神崎秀陽，泰井俊造，成本勝彦，馬岡 陽，後藤康夫，岸 淳二，野々垣多加史，夏山 知，森 崇英：当科における最近2年間の体外受精・胚移植法実施成績の解析，日不妊会誌，36: 781, 1991
10) 吉村慎一，松本千秋，富山達夫，郡山 智，竹原裕志，原 利夫，泉 康史，小田高久，兼子智，矢作みき，大野虎之進：IVFにおける微少環境受精，日本受精着床学会雑誌, 8: 30, 1991
11) 高塚亮三，藤波隆一，豊北美穂，林 政宏，加藤修：再媒精は受精率をどこまで改善できるか？，第8回日本受精着床学会講演抄録集，108, 1990
12) 織田和哉，谷 啓光，荒川 修，七里和良，佐藤芳昭，竹内正七：精液性状よりみたIVF-ETの予後，日不妊会誌，34: 875, 1989
13) 松井俊彦，児玉英也，加藤充弘，関根和子，武田志保，真木正博：男性不妊患者の体外受精における受精能予測の為の各種精液パラメーターの有用性，日不妊会誌，36: 571, 1991
14) 神野正雄，大澤淑子，杉村和男，小林俊文，北村誠司，岩田壮吉，赤星晃一，野澤志朗：ヒト体外受精における精子形態分析の重要性，日産婦誌，44: 203, 1992
15) 星 和彦，柳田 薫，吉松宣弘，鳴瀬都美子，月川 奏，佐々木宏子，菅野孝子，矢沢浩之，片寄治男，藤森 淑，佐藤 章：精子の形態的・機能的成熟，日本受精着床学会雑誌，8 : 4, 1991
16) 上田克憲，熊谷正俊，大浜紘三，己斐秀豊：Motility Analyzer HT-M2030による精子運動能解析の成績と精子受精能の関連，日本受精着床学会雑誌，8 : 252, 1991
17) Ng, S-C., Bongso, A. and Ratnam, S. S.: Microinjection of human oocytes: a technique for severe oligoasthenoteratozoospermia, Fertil. Steril., 56: 1117, 1991

Retrospective studies on the semen characteristics and the outcome of in vitro fertilization-embryo transter in our hospital

Mitsuru Nishimura, Hisashi Okata
Arata Nishigaki, Yoshiaki Ootani
Yuuichi Torii and Satoru Aoki

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

Kazufumi Sato

Laboratory of Biology,
Seirei Hamamatsu Hospital, Hamamatsu 430, Japan

The in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program was initiated in Seirei Hamamatsu Hospital on November 1989. The results obtained in 2 years (1989-1991) were analyzed in this paper. Oocytes were retrieved in 383 cycles, and embryos have been transfered in 327 cycles, 197 women. There were 72 pregnancies, the pregnancy rates being 22.0% per embryo transfer and 34.0% per patient. The abortion and ectopic pregnancy rates were 16.7% and 5.6% per embryo transfer, respectively. Fifty six pregnancies showed normal progress, the rates being 17.1% per embryo transfer and 28.4% of the patient, respectively. Multiple pregnancy rate was 30.4% per patient of normal progress of gestation.

The pregnancy rate was 21.3% per patient in the group of infertility due to male factor, and it was lower than the rate of 46.2% both in the infertile groups due to tubal factor and endometriosis. Oocyte fertilization rate was low, if initial sperm concentration was $2,000\times10^4$/ml or less, or the sperm mortility was 30% or less.

The minimum sperm characteristics was 200×10^4/ml or 10% in the oocyte fertilization, whereas it was $1,100\times10^4$/ml or 23% in the cases of pregnancy, showing clear difference of sperm finding between these two groups.

The results suggest that the efforts for the improvement of original sperm condition in the cases of oligoasthenozoospermia, e. g. the treatment with medication, is also important in the procedure of IVF-ET.

(受付：1992年3月16日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

ヒト精子表面におけるFibronectionの局在と受精への関与

Localization of Fibronection on the Surface of Human Spermatozoa and Relation to the Fertilization

福島県立医科大学産科婦人科教室
(主任：佐藤　章教授)
佐々木　宏　子　　星　　和　彦
Hiroko SASAKI　　Kazuhiko HOSHI
Department of Obstetrics and Gynecology,
Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan
(Director: Prof. A. Sato)

ヒト精子表面におけるfibronection (FN) の存在を走査型電子顕微鏡反射電子モードによって観察した．先体反応の有無に関わらず，ヒト精子表面の赤道部 (equatorial segment) に限局してFNの局在が観察された．また，透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子接着試験および侵入試験を抗FN抗体存在下で行い，精子－卵融合 (sperm-egg fusion) におけるFNの役割を検討した．卵への接着精子数は，抗FN抗体存在下で4.6±2.62で対照の7.4±3.61に比較して有意に減少していた．透明帯除去ハムスター卵への精子侵入率・平均精子侵入数は抗FN抗体存在下でそれぞれ34%・0.53であり対照の35%・0.53と比較して差を認めなかった．

以上の成績より，FNは精子頭部のequatorial segmentに局在しており，精子－卵融合には関与しないが，精子の卵への補足・接着因子の一つとして，重要な役割を担っていることが示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 129—136, 1993)

諸　言

受精とは精子が単純に機械的に卵に侵入することではなく，精子と卵という二つの配偶子の対等な関係からなる複雑な連続する過程である．受精するためにはまず両配偶子は成熟しなければならないし，精子は受精能獲得 (capacitation)，先体反応 (acrosome reaction) そして運動性の活性化 (hyper-activation) という過程を経ねばならない[1-4]．受精に対する両配偶子の条件が整った時点で，精子ははじめて卵表に到達し，卵原形質膜に接着する．その後両細胞膜の融合が起こり，雌雄両前核の形成の後，核融合をもって受精が完了する．

しかしこの受精現象にとって極めて重要な過程である精子－卵接着の機序についてはこれまで解明されていない．ヒトを含む哺乳動物の精子では卵原形質膜と最初に融合する部位は精子頭部の赤道部 (equatorial segment) といわれ[5]，この赤道部に卵の接着を促進させる特殊な機構の存在が示唆されている．そこで著者は細胞接着因子に着目し，その一つであるfibronection (FN)の存在について検討することにした．

FNは多くの組織や体液中に分布しており，細胞の移動，分化，増殖，癌化といった多彩な生物現象の接着因子として重要な役割を果たしているglycoproteinである[6-9]．精子とFNの関わりについては，免疫組織学的手法により光学顕微鏡レベルで観察したいくつかの報告がみられる[10-12]が，著者は反射電子モードを用いた電子顕微鏡レベルでその詳細な局在を観察してみた．さらに精子と卵の接着そして融合におけるFNの役割を検討するため，抗FN抗体による抑制効果を調べてみた．本来受精には種特異性が存在し，精子の卵への侵入は同種間でしかおこらないが，透明帯が除去されたハムスター卵だけ

は例外でヒト精子を含めた異種間の精子－卵融合 (sperm-egg fusion) が確認されている[13,14].

本研究ではその使用が倫理的に困難なヒト卵の代わりに，透明帯除去ハムスター卵を用い，ヒト精子の卵への接着，融合実験を行った.

研究材料ならびに方法

実験 1．精子表面のfibronectionの局在観察

(1) 精子の調整

精液は 5 名の健常男性より用手法によって採取し，室温に静置して十分に液化させた.

精子の回収は，percoll法[15]とswim-up法[16]を組み合わせた方法で行った[17]．まず45% percoll 3.0mlを試験管にとり，液化した精液を層積して，600×gで15分間遠心し，精漿を除去した (Percoll法)．pelletにhuman serum albumin (HSA) を0.3%含むmodified Biggers, Whitten and Whittingham液[18] (以後mBWWと略し，断らない限り0.3%のHSAを含む) を5.0ml加え，よく攪拌した後300×gで10分間遠心した．上清を捨て，試験管底のsperm pelletに0.5mlのmBWWを加えて精子浮遊液を作り，2.0mlのmBWWの下層にそれを置き，試験管を30°に傾け，37℃ 5 % CO_2大気中に 1 時間静置した (swim-up法)．その後運動性良好精子が含まれた上清を回収し，230×g 5 分間遠心し，HSAを3.5%含む1.0mlのmBWW中に浮遊させた．ついで精子浮遊液をcapacitationとacrosome reactionを誘起させるために37℃ 5 % CO_2大気中で 6 時間培養した[1]．培養後300×gで 5 分間遠心し，0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) にて洗浄し，最終精子濃度が10^7～10^8/mlになるように調整して電子顕微鏡試料に供した.

(2) 電子顕微鏡試料の作製

Polylysinをcoatしたガラス板に浮遊液を数滴滴下して精子を接着させ，Zamboni液[19]で固定した (4 ℃，20分)．ガラス板を80% ethanolで洗浄することでpicric acidを除去し，PBSにて 3 回洗浄後，normal goat serum中に 3 時間置いてblockingを行い (4 ℃)，一次抗体のanti-human fibronectin rabbit antibody (抗FN抗体：和光) に反応させた (1000倍希釈，4 ℃，一昼夜)．PBSで 3 回洗浄後金コロイド標識二次抗体 (Auro-Probe EM GARIgG: Janssen Life Sciences Products) を反応させた (37℃，30分)．反応後の標本は，ethanol上昇系列によって脱水し，臨界点乾燥を行い，carboncoatingを施し，電顕用試料とした.

(3) 電子顕微鏡による観察

反射電子モードによる走査電子顕微鏡像では，試料を構成する物質の原子番号に比例した信号量が得られる．したがって免疫組織学的方法で付着させた金コロイドが識別可能になる[20]．本研究では，反射電子モードを用い，走査型電子顕微鏡Hitachi S-800にて加速電圧15KVで観察した．なお，精子表面の微細構造観察には二次電子モードを用いた.

実験 2．ハムスター卵細胞表面へのヒト精子接着に対する抗FN抗体の影響

(1) 透明帯除去ハムスター卵の作製[21]

体重90～150gの成熟雌ゴールデンハムスターを用いた．Pregnant mare serum gonadotropin (PMS) 30iuを腹腔に投与し，48～56 時間後 human chorionic gonadotropin (hCG) 30iuを投与して過排卵をおこさせ，hCG投与17時間後に開腹して，卵管中から実体顕微鏡下に卵丘細胞に包まれた卵子を採取した．これを0.1% hyaluronidaseで15分間処理して卵丘細胞を分散，次いでmBWWで 3 回洗浄後，0.1% trypsinで 3 分間処理して透明帯を溶解除去した．その後 3 回mBWWで洗浄し，出来た透明帯除去ハムスター卵を実験に供した.

(2) 精子の準備

精液は 3 名の健常男子から用手法にて採取し，室温に静置して十分に液化させた．次いでmBWWを用いて 1 時間のswim-up法を行い運動良好精子を回収した．回収精子を1.0mlのmBWW (3.5% HSA含) に浮遊させ，acrosome reaction誘起のため37℃ 5 % CO_2大気中で 5 時間培養した．培養後，精子浮遊液に抗FN抗体をその濃度が20% (V/V) になるように加え，さらに 2 時間培養した．対照には同量のnormal rabbit serum (Cedarlane Lab. Ltd.)を加え，同様に処理した.

(3) 卵への精子接着試験

別に20%の抗FN抗体を含むmBWW 0.3mlをプラスチック製ペトリ皿に入れ，その中に抗体処理精子と透明帯除去ハムスター卵を入れ，ミネラルオイルで覆い，37℃ 5 % CO_2大気中で 2 時間培養した．対照には20% normal rabbit serumを含むmBWWを用い透明帯除去ハムスター卵と対照精子を加えた．最終精子濃度は 1 ～ 5 ×10^6/mlになるように調節した.

(4) 精子接着の判定

培養後，300 μm以上の大きな口径をもつピペットを用いて接着精子が離脱しないよう静かに卵をスライドグラス上にとり出し，位相差顕微鏡下に卵表面への接着精子を算定した.

実験3．透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入(ハムスターテスト[21])に対する抗FN抗体の影響

(1) 透明帯除去ハムスター卵の作製

実験2と同じ様に作製した．

(2) 精子の準備

3名の健常男性の精液を用いた．mBWW中にて1時間のswim-up法を行い，運動良好精子を回収して，mBWW (3.5% HSA含) に浮遊させて6時間前培養した．

(3) 媒精並びに培養の方法

実験2と同様に20%の抗FN抗体を含むmBWWとnormal rabbit serumを含むmBWW，さらにハムスターテストの原法[21]である3.5% HSAを含むmBWWをそれぞれ0.3mlづつプラスチック製ペトリ皿に用意し，その中に透明帯除去ハムスター卵と精子浮遊液を加え，37℃ 5 % CO_2大気中で6時間培養した．最終精子濃度は1～2×10^7/mlになるように調節した．

(4) 精子侵入の判定

培養後卵を少量の溶液と共に，スライドガラス上に置き，上からカバーガラスで適当な圧をかけて押しつぶし，出来た標本について位相差顕微鏡下に精子侵入の有無を観察した．1個以上の膨化精子頭部もしくは雄性前核が尾部を伴っている場合，侵入していると判定し，侵入精子数をも算定した．精子侵入の認められた卵の割合すなわち精子侵入率，および平均侵入精子数は以下のようにして算定した．

精子侵入率 (%) ＝侵入卵数÷検査総卵数×100

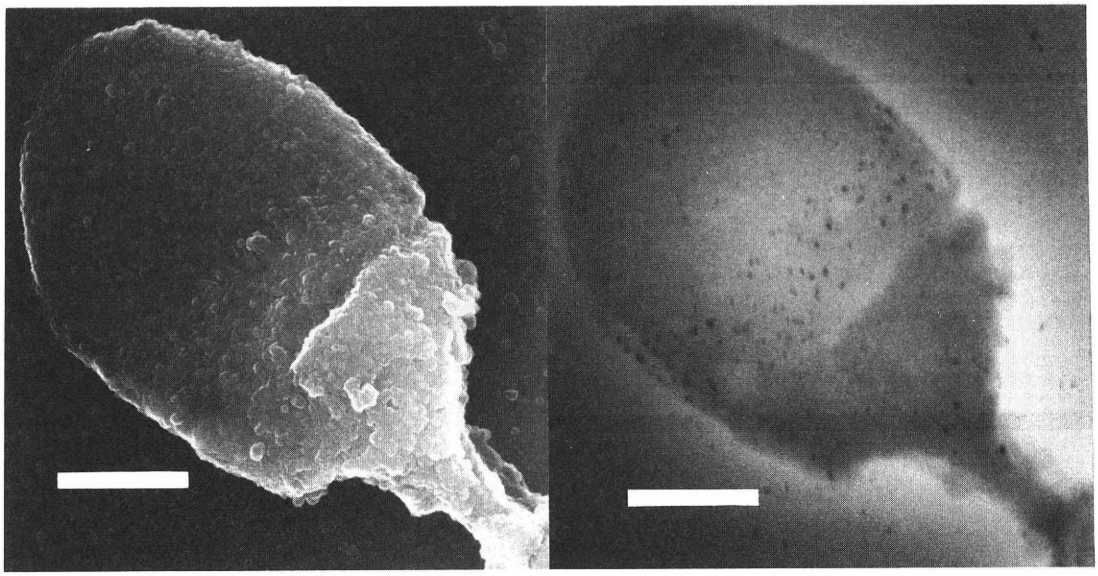
平均侵入精子数＝侵入総精子数÷検査総卵数

結　果

実験1．精子表面のfibronectin局在観察

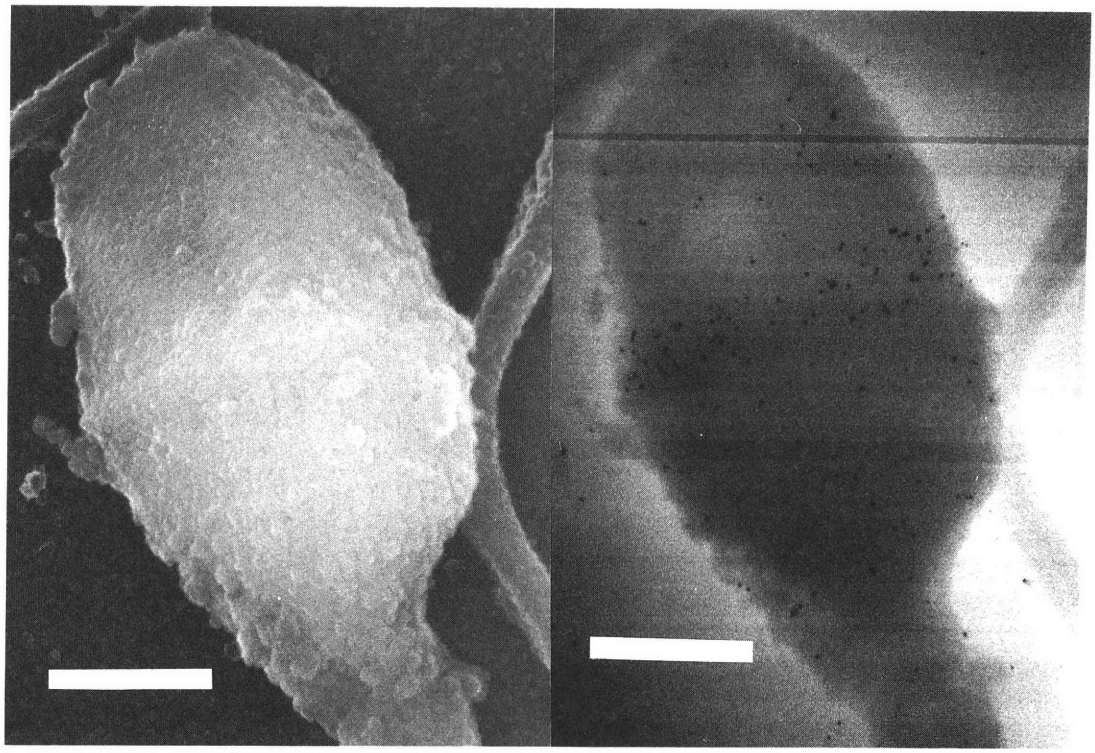
二次電子モードによる観察では，精子の外形，表面形態が比較的よく描出されていた．円盤状の頭部 (head) と細長い鞭毛を尾部 (tail) に持ち，その間に短い頸部 (neck) とそれにつづく中片部が認められた．精子頭部には赤道部 (equatorial segment) が認められ，先端の先体 (acrosome) と後部先体域 (post-acrosomal region) を明瞭に分けているのが観察された．先体をみると，先体帽 (acrosome cap) が無傷のままのもの (acrosome intact sperm：図1 a)，acrosome capが完全に取れた先体反応完了精子 (acrosome reacted sperm：図2 a)，またacrosome reaction進行中と思われる精子 (図3 a) と様々な過程が観察された．

反射電子モードによる観察では，acrosomeとpostacrosomal regionは電子密度の差から比較的容易に区別できた．金コロイドは極めて電子密度の高い直径15nm程度の微細顆粒として明瞭に描出された．acrosome intact sperm (図1 b)，acrosome reacted sperm (図2 b) およびacrosome reaction進行中のsperm (図3 b)のいずれのequatorial segmentにも金コロイドの局在が認められた．精子頭部先端，後部先体域，頸部，尾部にもわずかながら金コロイドが観察された



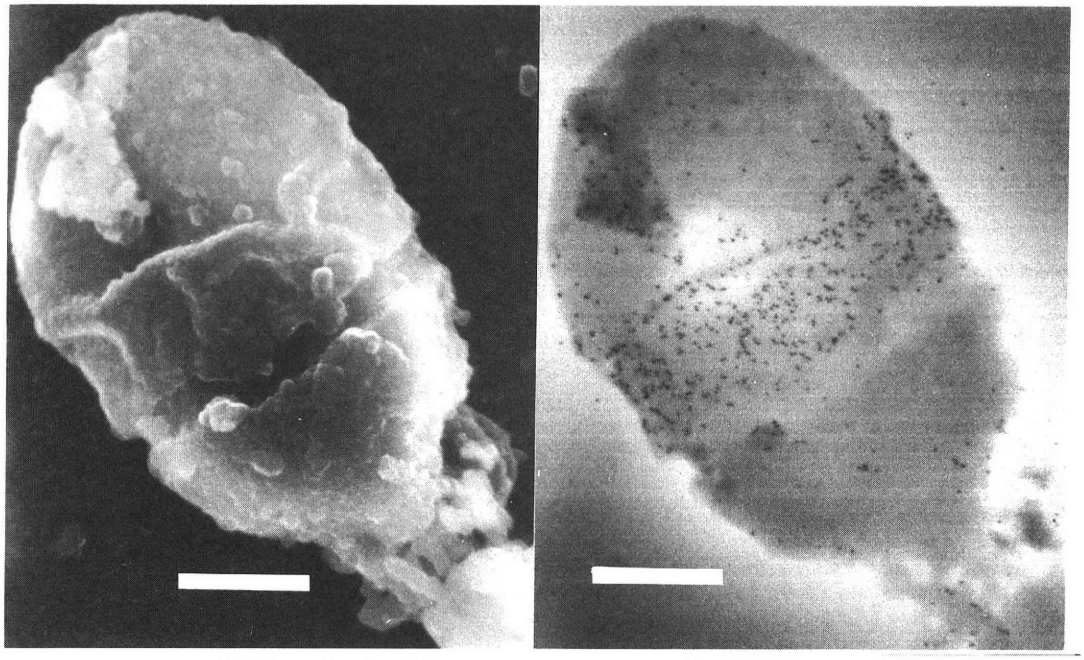
a. 二次電子モードによる観察　　b. 反射電子モードによる観察

図1　acrosome intactの精子　　Scale Bar: 1 μm



a. 二次電子モードによる観察　　b. 反射電子モードによる観察

図2　acrosome reaction後の精子　　Scale Bar: 1 μm



a. 二次電子モードによる観察　　b. 反射電子モードによる観察

図3　acrosome reaction進行中の精子　　Scale Bar: 1 μm

表1　ハムスター卵細胞表面へのヒト精子接着に対する抗fibronectin抗体の影響

培養液	実験回数	検査卵数	培養精子数 (m±SD)
anti-human fibronectin rabbit antibody	3	31	4.56±2.62 *
normal rabbit serum	3	43	7.44±3.61 *

*p<0.01

表2　透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に対する抗fibronectin抗体の影響

培養液	実験回数	精子侵入率%	(侵入卵数/総卵数)	平均侵入精子数
anti-human fibronectin rabbit antibody	5	34 *	(36/107)	0.53
normal rabbit serum	5	35 *	(36/104)	0.53
human serum albumin	5	* 37	(40/108)	0.62

*N. S.

が，その程度はback ground levelであった．back guroundに認められるわずかな金コロイドは除蛋白操作の不十分さに起因すると考えられた．

実験2．ハムスター卵細胞表面へのヒト精子接着に対する抗FN抗体の影響

透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子接着数は，抗FN抗体存在下で4.6±2.62個で対照の7.4±3.61個と比較して有意に減少していた (Student's t test: $p<0.01$; 表1)．

実験3．透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入(ハムスターテスト)に対する抗FN抗体の影響

透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入率は，抗FN抗体存在下で34%，normal rabbit serum含有群で35%，3.5% HSA含有群では37%であった．また平均精子侵入数はそれぞれ0.53，0.53，0.62であり，いずれも有意な差は (x^2 test) は認められなかった (表2)．

考　察

受精とは，精子と卵という二つの配偶子の対等な関係からなる複雑な連続する過程である．卵は第二成熟分裂の中期で排卵され，生物学的に静止状態にあるが，精子侵入と同時に再度賦活状態になる．一方精子は，哺乳動物では雄の身体から放出された時点では卵に受精できる状態になく，受精するためには受精能獲得 (capacitation)，先体反応 (acrosome reaction) そして尾部の活発な運動性 (hyperactivation) を得なければならない．精子原形質膜を安定化させるために精子表面に吸着していた物質が除去あるいは変化することがcapacitationであり，1951年にAustin[22]とChang[23]がそれぞれ別個に発見した現象である．受精能獲得後，精子は頭部先体内に含まれる先体酵素を放出または露出させる現象を引き起こす．これがacrosome reactionである．卵の保護層である卵丘と透明帯を先体酵素が分散もしくは溶解させ，それに精子尾部の強い運動性が加わって，精子はようやく卵原形質膜に到達することになる．ついで精子は卵原形質膜に接着し，精子と卵の膜融合が起こり，卵細胞質内に精子が侵入していく．以上が受精現象の概略であるが，この一連の過程中でもsperm-egg fusionは，key pointといえよう．

Acrosome reactionを終了した精子が卵原形質膜と最初に融合する部位は精子頭部の赤道部 (equatorial segment) といわれている[5]．走査電顕を用いて，ヒト精子の透明帯除去ハムスター卵への侵入過程を経時的に観察した対木ら[24]は，卵表面への付着は精子頭部の先端から始まるが，卵表面のmicrovilliに最初に補足されるのは精子のequatorial segmentであると報告し，ヒトでも他の哺乳動物と同様の機序でsperm-egg fusionの進行することを示唆している．しかし，何故equatorial segmentで開始するのか，その理由は不明である．

受精は精子と卵の融合であり本質的には細胞融合の形態をとるが，細胞接着因子の存在を示唆する報告がみられる．すなわち，Glander et al.[10]やVuento et al.[11]によるとヒト精子の頭部にはfibronection (FN) が認められている．FNは分子量約25万のポリペチドがC末端付近でs-s結合したもので，2量体を形成する可溶性の血漿FNと，多量体を形成して不溶性傾向を強くした細胞表面の細胞性FNがよく知られているが，両者の生理活性は殆ど同様である．細胞性FN

は細胞膜に直接結合している典型的な膜タンパクではなく，コラーゲンやプロテオグリカンのような，細胞の外周に形成される細胞外マトリックス(extracellular matrix)の一員である．FNの生理機能を理解する上で最も重要な性質はその細胞接着活性であり，もう一つの重要な性質は種々の生体物質に対する多彩な結合活性である．コラーゲン(またはその熱変性物であるゼラチン)，フィブリン，ヘパリン及び一部のグルコサアミノグリカン，DNA，ガングリオシド，一部の細菌，アクチン，補体成分C 1 q 等約20種の生体高分子と結合することが知られている[6, 25]．FNの分子構造と機能上のドメインもすでに明らかにされている[26, 27]．基本的には6つの異なるドメインからできており，細胞の接着活性は，ドメインⅣにのみ認められ，その細胞接着活性部位はArg-Gly-Aspというアミノ酸配列(トリペプチドRGD)であることも解明されている[28]．そしてこのRGDの部分はFN-レセプターの特異的認識部位であることも判っている[25, 29]．Glander et al. はFNの欠如と男性不妊との関連性にまで言及している[10]が，精子におけるこのようなFNの存在を示すこれまでの観察はすべて光顕レベルであった．今回著者らは，新しい手法である反射電子モードを用いた走査型電子顕微鏡[20]で，FNの分布を調べてみた．それによると，精子細胞表面のequatorial segmentに一致してFNの局在を認め，acrosome reacted spermにも観察できた．卵へ最初に侵入する部位に細胞接着因子として多彩な生理作用を有するFNの局在がみられることは，sperm-egg fisionへのFNの関与を示唆するものである．

そこでその役割を確認するため，精子と卵の接着・融合に対する抗FN抗体の影響を調べることにした．本来受精には種特異性があるため，配偶子融合は同種の精子と卵でなければ起きないが，透明帯を除去されたハムスター卵は特別でヒトを含め多数の異種哺乳動物精子の侵入を許し[13, 14]，同種間の受精と殆ど同様の機序で接着・侵入が進行することが知られている．本研究ではその使用が社会的・倫理的に困難なヒト卵の代わりに，透明帯除去ハムスター卵を用いて，ヒト精子の接着・侵入に対する抗FN抗体の作用を検討してみた．抗FN抗体はヒト精子の接着を有意に抑制したが，融合に影響を与えることはなかった．

すなわち，equatorial segmentに局在するFNは，卵の精子捕捉に関与するが融合には関与しないことが示されたことになる．

卵表面に接着した精子が全て融合に至るわけではないのは，実験2と実験3の成績から明らかである．実験2では，接着精子を算定し易くするため，精子濃度を実験3よりはるかに少なく設定しているが，それにもかかわらず実験3の平均侵入精子数は，実験2の接着精子数よりはるかに少なくなっている．卵への精子侵入を抑制する機構は捕捉・接着に働く機序とは全く異なるものであろう．また抗FN抗体が，精子の接着を完全に阻止し得ないことも，sperm-egg fusionに影響を与えなかった一つの原因と考えられる．おそらくFNだけが精子捕捉に働いているのではなく，多数ある中の1つのfactorである可能性が高い．

FN以外のsperm-egg interactionに関与する物質としては，IgG-Fc receptorがハムスターやヒトの卵細胞膜に証明されているし[30]，ある種の哺乳動物精子でのC3 receptorの存在も報告されている[31]．また，FNの細胞接着活性部位であるトリペプチドRGDを含むオリゴペプチドが，ヒトおよびハムスター精子の透明帯除去ハムスター卵への接着・侵入を阻害することから，精子表面のRGD receptorの存在を示唆するデータもある[30, 32]．さらに最近，補体のclassical pathwayの成分であるClqを透明帯除去ハムスター卵とヒト精子の共培養液に加えると，精子と卵の接着は促進するが，侵入を阻害すると言う報告がある[33]．しかもClqは前述したFNに結合する生体高分子の一つであり[34]，RGDとともにFNとの関連を考えても興味深い．ところで，FN[35]・IgG-Fc receptor[30, 32]・C3 receptor[31]・RGD receptor[36, 37] Clq[34, 35]などは全てphagocytosisの際に利用される細胞膜表面のreceptorでもあり，精子と卵の相互作用がphagocytosisの一連のシステムを利用している可能性も示唆される．

本研究により，FNが精子頭部のequatorial segmentに局在し，受精のなかでも重要な過程である精子と卵の接着に深く関与していることが明らかにされた．今後は他の接着因子・精子認識レセプター等との相互作用についての検討が必要であろう．

文　献

1) 星　和彦：精子の受精能獲得，細胞，17: 563, 1985
2) 佐藤　章，吉松宣弘，星　和彦：哺乳動物の受精機構－精子を中心として－，福島医学雑誌，38: 203, 1988
3) 星　和彦，柳田　薫，会田都美子，吉松宣弘，遠藤　力，佐藤　章：精子の受精能，臨床婦人科産科，42: 881, 1988

4) 星　和彦，柳田　薫，会田都美子，吉松宣弘，佐々木宏子，遠藤　力，佐藤　章：ヒト精子のcapacitation, acrosome reaction, hyperactivation，日受精着床会誌，6: 13，1989
5) Yanagimachi, R.: The Physiology of Reproduction, 135, Raven Press, 1988
6) 関口清俊：フィブロネクチン－その細胞接着因子としての分子的基礎－，細胞工学，4: 485，1985
7) Yamada, K. M.: Cell surface interactions with extracellular materials, Annu. Rev. Biochem., 52: 761, 1983
8) 林　正男：フィブロネクチンと細胞，発生，神経，蛋白質核酸酵素，29: 1964，1984
9) 林　正男：フィブロネクチンの物質的実体と取扱法，最新医学，39: 1988, 1984
10) Grander, H. J., Herrmann, K., Haustein, U. F.: The equatorial fibronection band (EFB) on human spermatozoa - a diagnostic help for male fertility?, Andrologia, 19: 456, 1987
11) Vuento, M., Kuusela, P., Virkki, M., Koskimies, A.: Characterization of fibronectin on human spermatozoa, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365: 757, 1984
12) Miranda, P. V., Tezon, J. G.: Equatorial segment fibronectin is a marker for sperm maturation in humans, Paper presented at the CONRAD-WHO International Workshop On Gamete Interaction, Bariloche, Argentina, November 27, 1989
13) Ynagimachi, R.: Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster egg in vitro, J. Reprod. Fertil., 28: 477, 1972
14) Yanagimachi, R., Ynagimachi, H., Roger, 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
15) 兼子　智，小塙　清，小林俊文，飯塚理八：対外受精に共する精子の調整について，受精・着床'83，51，学会誌刊行センター／学会出版センター，1984
16) 星　和彦，長池文康，桃野耕太郎，京野広一，対木　章，斉藤　晃，鈴木雅州，林　恵子，柳町隆造：われわれの行っている精液静置法“layering method”による精液からの良好精子の分離，日不妊会誌，28: 101, 1983
17) 星　和彦，吉松宣弘：Sperm preparationによるAIH，産と婦，57: 39，1990
18) Overstreet, J. W., Yanagimachi, R., Katz, D. F., Hayashi, K., Hanson, F. W.: Penetration of human spermatozoa into the zona-free hamster egg. A study of fertile donors and infertile patients, Fertil. Steril., 33: 534, 1980
19) Stefanini, M., DeMartio, C., Zamboni, C.: Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy, Nature, 216: 173, 1967
20) Harven, E., Soligo, D.: Scanning electron microscopy of cell surface antigens labeled with colloidal gold, Ame. J. Anatomy, 175: 277, 1986
21) 星　和彦，斉藤　晃，京野広一，対木　章，桃野耕太郎：ハムスター卵子を用いた精子の受精能検査，細胞工学，3: 595，1984
22) Austin, C. R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg, Aust. J. Sci. Res. B. 4: 581, 1951
23) Chang, M. C.: Fertilization capacity of spermatoza deposited into fallopian tubes, Nature, 168: 997, 1951
24) 対木　章，星　和彦，斉藤　晃，京野広一，星合昊，鈴木雅州，堀内俊孝：透明帯除去ハムスター卵子へのヒト精子の侵入機序－走査型電子顕微鏡による経時的観察－，日産婦誌，35: 1705，1983
25) 長谷川孝幸，林正男：フィブロネクチンレセプターと細胞表面，蛋白質核酸酵素，31: 425，1986
26) Hayashi, M., Yamada, K. M.: Domain structure of the carboxyl-terminal half of human plasma fibronection, J. Biol. Chem., 258: 3332, 1983
27) Sekiguchi, K., Hakomori, S.: Functional domain structure of fibronectin, Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 2661, 1980
28) Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronection can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, Nature, 309: 30, 1984
29) 山口祐，伊勢村護：フィブロネクチンレセプター，代謝，23: 975，1986
30) Bronson, R. A., Fleit, H. B., Fusi, F.: Identification of an oolemmal IgG Fc receptor: Its role in promoting binding of antibody-labelled human sperm to zona-free hamster eggs, Am. J. Reprod. Immunol., 23: 87, 1990
31) Auderson, D. J., Wang, H., Jack, R. M.: A possible role of the complement component C3 and its receptor, membrane cofactor protein, in human sperm/egg interaction, Paper presented at the 37th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, St Louis, March 21, 1990
32) Bronson, R. A., Fusi, F.: Sperm-oolemmal interaction: role of the RGD adhesion peptide, Fertil. Steril., 54: 527, 1990
33) Fusi, F.,Bronson, R. A., Hong, Y., Ghebrehiwet,

B.: Complement component Clq and its receptor are involved in the interaction of human sperm with zona-free hamster eggs, Mol. Reprod. Dev., 29: 180, 1991
34) Reid, K. B. M.: Proteins involved in the activation and control of the two pathways of human complement, Biochem. Soc. Trans., 11: 1, 1983
35) Sorvillo, J. M., Gigli, I., Pearlstein, E.: The effect of fibronectin on the processing of Clq and C3b/bi-coated immune complexes by peripheral blood monocytes, J. Immunol., 136: 1023, 1986
36) Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D.: Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal, Cell, 44: 517, 1986
37) Hynes, R. O.: Integrins: A family of cell surface receptors, Cell, 48: 549, 1987

Localization of fibronectin on the surface of human spermatozoa and relation to the fertilization

Hiroko Sasaki and Kazuhiko Hoshi

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan (Director: Prof. A. Sato)

Human Spermatozoa were treated with the anti-human fibronectin rabbit antibody and the secondary antibody labelled with the colloidal gold.

Spermatozoa were observed by the back scattered electron imaging mode of the scanning electron microscopy. The localization of fibronectin (FN) was recognized in the equatorial segment of the spermatozoa. Secondly, human spermatozoa were incubated with zona-free hamster eggs in the media contained the anti-FN antibody or not contained (control). After incubation the number of spermatozoa attached to the egg surface and the rate of sperm penetration into eggs were examined. Sperm attachment to the eggs was significantly reduced by anti-FN antobody (4.58±2.62 vs 7.44±3.61; control), but the sperm penetration was not influenced. These results suggest that the FN localized on the equatorial segment of the spermatozoa participates in sperm-egg interaction especially sperm-egg binding process.

(受付：1992年3月26日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

機能性男性不妊症における新しい検査法：Hypoosmotic Swelling Testと精子Acrosin活性測定の有用性に関する検討

Employment of New Assays in the Evaluation of Idiopathic Male Infertility: Hypoosmotic Swelling Test and Sperm Acrosin Activity

鳥取大学医学部産科婦人科学教室
戸田稔子 Toshiko TODA
見尾保幸 Yasuyuki MIO
寺川直樹 Naoki TERAKAWA
Department of Ob/Gyn,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

鳥取大学医学部泌尿器科学教室
ニコラス ソフィキティス Nikolaos SOFIKITIS
宮川征男 Ikuo MIYAGAWA
Department of Urology,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

パナヨティス ザボス
Panayiotis M. ZAVOS
Department of Animal Science,
University of Kentucky and Andrology Institute of Lexington

男性不妊症における，hypoosmotic swelling test (HOST) と精子acrosin活性測定の意義を検討するため，妊孕性を有する男性13名 (対照群) と，機能性男性不妊の男性19名 (不妊群) において，これらの検査を行った．HOSTにおける精子膨化率とacrosin活性は，不妊群において対照群より有意に低値だった．対照群におけるHOSTとacrosin活性の最小値を正常値の最低限界値とみなすと，機能性男性不妊患者の37%，26%がそれぞれHOSTと精子acrosin活性測定で異常と診断された．以上の結果より，HOSTと精子acrosin活性測定は，機能性男性不妊の診断に有用であることが示された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 137—141, 1993)

緒　言

不妊症の治療はめざましく進歩しているが，男性不妊症の診断と治療には依然として不明の点が多く，診断や治療に困難を感じることも多い．その根本には，一般的な精液検査からでは精子の受精能力を推定しえないことが問題のひとつとしてあげられる．そのため，一般精子検査以外の様々な精子機能を評価する検査法が応用され始めている．精子adenosine triphosphate測定[1]，頸管粘液貫通試験[2]，zona free hamster egg penetration assay [3]，human hemizona attachment assay [4]，triple stain法[5]，

hypoosmotic swelling test (HOST)[6]，精子acrosin活性測定[7]等は，精子受精能力の指標として現在最も一般的に行われている検査法である．

さらに臨床的な問題点として，一般精液検査で正常所見を示す男性不妊患者に対しては，多くの場合，現行の精子機能検査では，存在しうる精子の物理的または生化学的異常因子をそれ以上同定できないことがあげられる．一定の不妊原因が明確にできない機能性不妊症は，医師にとっては，適確な治療法選択などの臨床的取扱いに苦慮するばかりでなく，患者にとってもfrustrationとなることは明らかである．

HOST[6]と精子acrosin活性測定[7]は，比較的新しく確立された精子受精能力に関与するパラメーター，すなわち精子細胞膜機能およびacrosome酵素活性の指標である．これらの検査が，日常的に一連の精液検査として行われないのは，検査に要する時間的問題のほか，その臨床的意義が確立されていないためと思われる．本研究では，これらの検査を機能性不妊症患者に施行して，精子細胞膜機能およびacrosome酵素活性の異常を示す症例の有無を調査し，機能性不妊症患者におけるHOSTと精子acrosin活性測定の有用性について検討することを目的とした．

方　法

妊孕性の確認された健康な男性13名から，36 - 48時間の禁欲期間の後に用手法によって採取された精液 (n =13) を対照群とし，室温で30分間から1時間放置して充分液化させた．その後，World Health Organizationのマニュアル[8]に従い，精子数，精子形態 (正常精子率)，量的 (%運動率) および質的 (grade; 0 - 4) 運動能を判定した．質的運動能 (直進運動能) は，運動の型または活動性により0から4の5段階[9]で評価した．機能性男性不妊症は，妻側に不妊原因がみられず，一般精液検査で正常所見を示す症例とし，19名の患者から同様に採取した精液を不妊群 (n =19) として検査を行った．女性因子の検査は，抗精子抗体を含む一般検査および腹腔鏡検査を行ない，精液検査の正常値の最低値は，精子濃度40×10^6/ml，形態正常精子率50%，精子運動率50%，直進運動能2とした．HOSTと精子acrosin活性測定は，全例射精の約75分後に行い，検査中は37℃に保温した．

Hypoosmotic swelling test (HOST)

Jeyendranら[10]の方法で行った．Fructose溶液とsodium citrate溶液を等量混合して150m Osmの低浸透圧溶液を作成した．精液0.1mlと低浸透圧溶液1.0mlを37℃で30分間培養した後，尾部の形態的変化について少なくとも200個の精子を位相差顕微鏡にて観察し，精子膨化率を算出した．

精子acrosin活性測定

Zaneveltら[11]の方法に準じてtotal acrosin活性を測定した．acrosin活性に影響するproteinase inhibitorを除去するため，Ficollで遠心分離して精漿を除去した．精子沈渣は，acrosomeの崩壊を助長する浄化剤Triton X-100 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)，および加水分解時に発色物質を放出するarginine amid (N - α - benzoyl - DL - arginine - p - nitroanilide; BAPNA, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) を含む塩基性緩衝液に懸濁した．3時間の培養後，吸光度の変化を分光光度計で測定した (410nm). Acrosin活性1IUは，1μmolのBAPNAを加水分解する酵素量と定義され，μIU/10^6 spermatozoaの単位で表した．

統計学的検討

結果はMean±SDで表し，対照群と不妊群における検査結果の比較検討には，Student's t-testを用いた．

結　果

精子濃度 (×10^6/ml)

対照群61.3±9.1，不妊群57.5±6.9で有意差はなかった (表1).

量的・質的精子運動能

%精子運動率は対照群61.3±8.1，不妊群59.1±4.1，直進運動能はそれぞれ2.9±0.4，2.8±0.1で有意

表1　不妊群，対照群の精液所見とHOSTおよび精子acrosin測定値 (Mean±SD)

	精子濃度 (10^6/ml)	運動率 (%)	直進運動能 (0-4)	形態正常精子率 (%)	精子膨化率 (%)	Acrosin活性 (μIU/10^6 sperm)
対照群 (n=13)	61.3±9.1	61.3±8.1	2.9±0.4	57.6±7.9	72.2±6.3	32.3±7.1
不妊群 (n=19)	57.5±6.9	59.1±4.1	2.8±0.1	59.4±4.1	55.9±8.2*	19.2±3.9*

*　$p<0.05$

差はなかった (表1).

正常精子率

形態正常精子率 (%) は対照群57.6±7.9，不妊群59.4±4.1で有意差はみられなかった (表1).

Hypoosmotic swelling test (HOST)

平均精子膨化率 (%) は，対照群72.2±6.3，不妊群55.9±8.2で，不妊群で有意に低値 ($p<0.05$) だった (表1)．精子膨化率のrangeは，対照群，不妊群でそれぞれ57 - 91，13 -73であった．不妊群のうち7症例は対照群の最小値57以下の値を示した．この7症例の精子acrosin活性は，正常群のrange内にあった．

精子acrosin活性 (μIU/10^6 spermatozoa)

平均精子total acrosin活性は，対照群32.3±7.1，不妊群 19.2 ± 3.9 で，不妊群で有意に低値 ($p<0.05$) だった (表1)．精子total acrosin活性のrangeは，対照群，不妊群でそれぞれ15 - 46，6 - 31であった．不妊群のうち5症例は対照群の最小値15以下の値を示した．この5症例のHOSTの精子膨化率は，正常群のrange内にあった．

考　察

HOSTは，精子に低浸透圧負荷をかけることにより起こる尾部細胞膜の形態学的変化から，精子の生化学的な特性の一つである細胞膜の透過性を調べる検査[10]である．精子細胞膜機能は，精子の代謝，capacitation，acrosome reaction，および受精における卵子との接着，侵入に重要な役割を果たしている．そのため，精子の膜機能は，精子の受精能力を判定する指標とされている[6]．HOSTの結果と体外受精における受精率の検討では，HOSTの結果は，false positive 12.0%，false negative 7.7%で体外受精における受精成績を予測できるとの報告[6]もある．HOSTの結果は，一般精液検査からは正確に予測できない[10]ため，HOSTは一般精液検査とは異なる精子特質を判定する検査といえる．本研究において，機能性不妊症の群では対照群より有意に精子膨化率が低かったことは，不妊群の中に精子細胞膜機能の異常に起因する不妊例が含まれていたことを示唆している．今回の対照群の精子膨化率の最小値は57%であり，ヒト精液で精子膨化率＞60%を正常，＜50%を異常と分類している報告[6]とほぼ一致した．Specificity 100%として，対照群の最小値を正常値の最低限界値とみなすと，精子膨化率57%未満は精子細胞膜機能の異常症例とみなすことができる．不妊群の精子膨化率は13 - 73%にわたり，57%未満は7症例であったことより，機能性不妊症例の37% (7 /19) が精子細胞膜機能の異常に関連する不妊例と推定される．

Acrosinはserine proteinaseと定義される酵素で，精子頭部に存在し，受精過程における精子の透明帯への侵入のほか，acrosome reactionに関与している[7]．acrosinの大部分はproacrosinの形で存在し，受精過程において活性化される[12]．in vitroでは，pH 8.0でproacrosinからfree acrosinへ急速に変化する[11]．受精現象におけるacrosinの重要性を示す報告は多く，精子のacrosinレベルはin vitroにおける受精能力と有意に相関する[13]．またhemi-zona assayの際にacrosinの阻害剤 4 -acetamidophenyl 4' -guanidinobenzoateを使用すると，ヒト精子の透明帯への侵入は阻害される[7]．acrosinレベルと妊孕性の相関は，家畜においても報告[14]されている．本研究ではtotal acrosinの活性を測定したが，臨床的立場からはproacrosinとnon-zymogen (free) acrosinの区別は重大な問題ではないと思われる．total acrosin活性は受精過程の多くの段階に活発に関わる酵素活性の指標であり，臨床的にも意義深い．acrosin活性値は，一般精液検査結果とは相関しないため[15]，acrosin活性は一般精液検査とは異なる精子機能を判定する検査といえる．本研究において，不妊群で対照群より有意に精子acrosin活性値が低かったことは，機能性不妊群に精子acrosin活性の異常に起因する不妊症例が存在することを示唆している．HOSTと同様に，対照群の最小値を正常値の最低限界値と設定すると，精子acrosin活性15 μIU/10^6 spermatozoa未満は精子acrosin活性低値の症例とみなすことができる．不妊群の精子acrosin活性は6 - 31 μIU/10^6 spermatozoaのrangeにあり，15 μIU/10^6 spermatozoa未満は5症例であったことから，機能性不妊症例の26% (5/19) に精子acrosin活性不全が関与していると推定された．acrosin活性14 μIU/10^6 spermatozoa以下の精子では，受精が起こらないとの報告[7]もあり，今回得られた正常限界値とはからずも一致する結果となった．

以上，HOSTと精子acrosin活性測定を機能性不妊症の診断に応用し，正常限界値をそれぞれ57%，15 μIU/10^6 spermatozoaと設定することにより，機能性不妊症の37%，26%に異常がみられた．この結果より，HOSTと精子acrosin活性測定は一般精液検査で正常を示す機能性不妊患者の精査に有用であり，治療法選択[9,16,17]の立場からも有意義と思われた．さらに，これらの精子機能検査を臨床的にルーチン化することにより，潜在的な男性不妊をより適確に診断することが可能と思われた．

文 献

1) Comhaire, F. H., Vermeulen, L. and Schoonjans, F.: Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen in vivo, Int. J. Androl., 10: 653, 1987
2) Pretorius, E., Franken, D. R., De-Wet, J. and Grobler, S.: Sperm selection capacity of cervical mucus, Arch. Androl., 12: 5, 1984
3) Margalioth, E. J., Navot, D., Laufer, N., Yosef, S. M., Rabinowitz, R., Yarkoni, S. and Schenker, J. G.: Zona-free hamster ovum penetration assay as a acreening procedure for in vitro fertilization, Fertil. Steril., 40: 386, 1983
4) Oehninger, S., Coddington, C. C., Scott, R., Franken, D. A., Burkman, L. J., Acosta, A. A. and Hodgen, G. D.: The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in vitro fertilization (IVF) treatment, J. In Vitro Fertil. Embryo Trans., 6: 44, 1989
5) Talbot, P. and Chacon, R. S.: A triplestain technique for evaluating normal acrosome reactions of human spermatozoa, J. Exp. Zool., 215: 201, 1981
6) Zaneveld, L. J. D., Jeyendran, R. S., Krajeski, P., Coetzee, K., Kruger, T. and Lombard, C. J.: Hypoosmotic swelling test. In Human Spermatozoa in Assisted Reproduction, p233, Williams & Wilkins, 1990
7) Zaneveld, L. J. D., Jeyendran, R. S., Kaminski, J. M. and Pleban, P.: Biochemistry: Acrosin. In Human Spermatozoa in Assisted Reproduction, p189, Williams & Wilkins, 1990
8) World Health Organization: Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, pl, Press Concern, Singapore, 1980
9) Sofikitis, N., Miyagawa, I., Toda, T., Harada, T., Mio, Y. and Terakawa, N.: The effect of kallikrein on human sperm membrane function, Tohoku J. Exp. Med., 164: 23, 1991
10) Jeyendran, R. S., Van-der-Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. and Zaneveld, L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, J. Reprod. Fertil., 70: 219, 1984
11) Kennedy, W. P., Kaminski, J. M., Van-der-Ven, H., Jeyendran, R. S., Reid, D. S., Blackwell, J., Bielfeld, P. and Zaneveld, L . J. D.: Simple clinical assay to evaluate acrosin assay in human spermatozoa, J. Androl., 10: 221, 1989
12) Green, D. P. L.: The activation of proteolysis in the acrosome reaction of guinea pig sperm, J. Cell Sci., 32: 153, 1978
13) Tummon, I. S., Yuzpe, A. A., Daniel, S. A. J. and Deutsch, A.: Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro, Fertil. Steril., 56: 933, 1991
14) Pace, M. M., Sullivan, J. J., Eliot, F. I., Graham, E. F. and Coulter, G. H.: Effect of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5ml French straws, J. Anim. Sci., 53: 693, 1981
15) Goodpasture, J. C., Zavos, P. M., Cohen, M. R. and Zaneveld, L. J. D.: Relationship of human sperm acrosin and proacrosin to semen parameters. Ⅱ. Correlations, J. Androl., 8: 267, 1987
16) Sofikitis, N., Miyagama, I., Zavos, P. M., Inaga, S., Iino, A., Toda, T., Harada, T., Mio, Y. and Terakawa, N.: Acrosin profiles of human spermatozoa recovered from the new SpermPrep™ Ⅱ filtration column, Tohoku J. Exp. Med., 166: 451, 1992
17) Sofikitis, N., Toda, T., Zavos, P. M. and Miyagawa, I.: Human chorionic gonadotropin and human menopausal gonadotropin increases sperm acrosin profiles and pregnancy rates in idiopathic infertile men with subnormal acrosin profiles, Presented at the 9th International congress of endocrinology, in Nice (France), Aug. 30-Sep. 5, Supplement P455, 1992

Employment of new assays in the evaluation of idiopathic male infertility: Hypoosmotic swelling test and sperm acrosin activity

Toshiko Toda, Yasuyuki Mio and Naoki Terakawa

Department of Ob/Gyn,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

Nikolaos Sofikitis and Ikuo Miyagawa

Department of Urology

Panayiotis M. Zavos

Department of Animal Science, University of Kentucky
and Andrology Institute of Lexington

Semen samples collected from fertile donors (n=13) and pooled samples from idiopathic infertile men (n=19) were used in this study. Measurements of the total sperm acrosin activity and the hypoosmotic swelling test (HOST) were performed in all the samples. The percentage of swollen spermatozoa and acrosin profiles were significantly lower in the infertile men than in the fertile donors.

Considering the lowest values of the outcome of the HOST and the acrosin activity assay in the group of fertile men as the lowest normal values, it was proven that HOST and acrosin activity assay could identify subpopulations of idiopathic infertile men of 37% and 26%, respectively. The present results tend to support the employment of the HOST and the acrosin activity assay in the evaluation of idiopathic infertile men.

Key words: acrosin; hypoosmotic swelling test; idiopathic male infertility.

(受付：1992年4月16日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

MICROSCOPIC VENOUS DISSECTION SURGERY FOR THE TREATMENT OF VENOUS IMPOTENCE

Hiroshi TAKIHARA, Takuya UENO, Yoshikazu BABA
Kiyoharu KAMADA, Satoshi SHIRATAKI, Kazuhiko ISHIZU
and Katsusuke NAITO

The Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755, Japan

In the surgical treatment of venous impotence, ligation of the deep dorsal has bee chiefly performed, however, the effectiveness of this procedure is not satisfactory. We applied a new technique for the treatment of a 71-year-old venous impotent patient. With this technique, the deep dorasl vein and its emissary and circumflex branches are ligated under direct vision, along with ligation of the cavernous vein under a microscope and plication of the crura cavernosum. This technique allows surer and safer creation of outflow resistance when compared to the conventional method.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 142—146, 1993)

Introduction

Venous impotence due to reduced outflow resistance accounts for a high percentage of cases of erectile impotence.[1-8] The diagnostic and therapeutic methods for venous impotence have advanced markedly in recent years. Ligation of the deep dorsal vein to increase outflow resistance is a technique that has frequently been used in the treatment of venous impotence. However, its efficacy of approximately 60% is not satisfactory.[2] In some patients, impotence recurs after this type of surgery. In such cases, the minimum blood flow through the corpus cavernosum required for the onset and maintenance of erection is high at the time of recurrence, although it was normal soon after surgery. Dynamic infusion cavernosometry and cavernosography (DICC) sometimes revealed marked venous leakage from the deep dorsal vein or the crural cavernosum in such patients. We have recently used a new technique to increase outflow resistance in patients with venous impotence, which involves ligation of the deep dorsal vein, its emissary and circumflex branches, and the cavernous vein. This technique was advocated by Lue[9] and we have found that it gives excellent results. This paper describes the procedure.

Case Report

A 71-year-old male was referred to us with the chief complaint of erectile dysfunction. Physical examination was normal. The penile brachial pressure index was 1.0 (160mmHg/160mmHg) and the serum testosterone level was 585 ng/dl (normal; 250-1100). Serum gonadotropin levels were within the normal range. Biochemistry tests revealed normal liver and kidney function. The intracavernous injection of papaverine hydrochloride (40mg) produced partial erection of the penile shaft. Duplex color Doppler examination, performed according to the procedure previously reported,[10] showed normal deep arterial blood flow (velocity; 65cm/sec, acceleration; 244cm/sec).

DICC and measurement of the so-called maintenance flow rate were performed.[2-4,10] Before the injection of papaverine hydrochloride (40mg), the flow needed to induce penile erection was 165ml/min (normal: 〈150ml/min), and the flow rate to maintain erection was 80ml/min (normal: < 50ml/min). After the in-

jection of papaverine, the flow rate necessary to maintain an intracorporeal pressure above 80 mmHg was 80ml/min (normal: < 60ml/min). Cavernosography revealed marked venous leakage (Fig. 1).

These findings indicated a diagnosis of venous impotence and venous dissection surgery was performed on August 8, 1991.

Surgical procedure: Under epidural anesthesia, the patient was placed in a modified low lithotomy position, because this offers better access for dissection of the hilum and crura from the pubic bone. A slightly oblique incision was made along the course of the spermatic cord at the upper part of the scrotum, approximately 2 to 3 cm lateral to the base of the penis. The last half of the incision was made transversely across the midline of the scrotum to expose the corpus spongiosum. This skin incision was only made down to the dartos layer (Fig. 2).

With blunt dissection, the entire penile shaft was extruded through the incision by invaginating the distal part of the penis and the glans. The suspensory ligament was completely dissected from the pubic bone with electrocautery.

Buck's fascia was opened vertically. The deep dorsal vein and its branches were identified. Dissection was performed along the deep dorsal vein, and the circumflex veins and emmissary veins were ligated close to the tunica albginea. The deep dorsal vein was dissected out and resected from 1 cm proximal to the glans to just beneath the pubic bone (Fig. 3). The

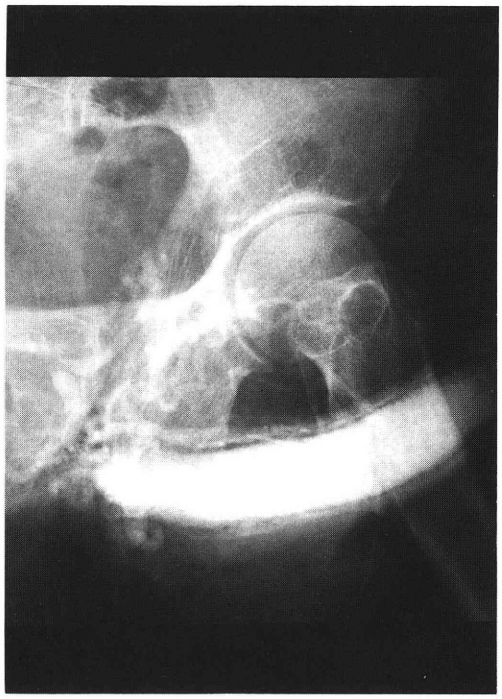


Fig. 1 Cavernosography revealed marked venous leakage from the deep dorsal vein or the crural cavernosum.

Fig. 2 A slightly oblique skin incision was made along the course.

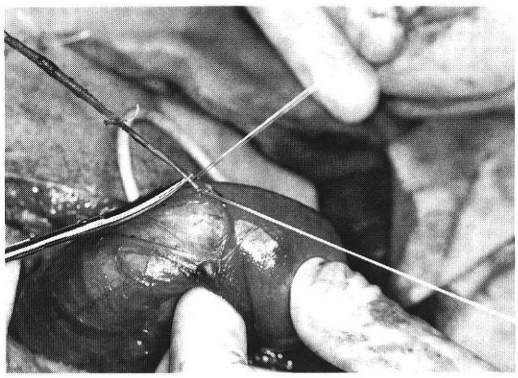


Fig. 3 The deep dorsal vein was dissected out and resected from 1 cm proximal to the glans to just under the pubic bone.

proximal stump of the deep dorsal vein was ligated with a double 2-0 silk tie.

Using a three-power loupe, dissection of the penile hilun was performed. After division of the suspensory ligament, the base of the penile shaft was drawn upwards. Three branches of the cavernous vein were exposed and were very carefully ligated with 5-0 vicryl sutures (Fig. 4). The greatest care must be taken not to injure the cavernous nerves and arteries, because the relations of the cavernous arteries, nerves, and veins are complex. Accordingly, meticulous microscopic dissection and a careful surgical technique are necessary. Plication of the crura was added bilaterally. Then papaverine (40 mg) was injected into the corpus cavernosum and full erection was confirmed within 3 minutes (Fig. 5).

The suspensory ligament was reattached at a more distal site with 2-0 silk to prevent postoperative shortening of the penile shaft.

Fig. 4 Branches of the cavernous veins (arrow) were observed under the microscope and carefully suture-ligated.

Fig. 5 The intracavernous injection of 40mg of papaverine produced a prompt and perfect response within 3 minutes.

Buck's fascia was carefully approximated again to prevent postoperative adherence of the penile shaft to the skin. The subcutaneous tissue and the skin were closed in layers with 2-0 Surgeron after a penrose drain was placed.

An indwelling urethral catheter was used, and an elastic adhesive dressing was applied loosely to the penile shaft and scrotum to decrease edema.

Postoperative care: The urethral catheter was removed 5 days after surgery and the adhesive dressing was removed 7 days postoperatively. No hematoma or color changes of the penile shaft were noted, although edema persisted for approximately one month and then spontaneously resolved. There was no postoperative discomfort or numbness near the incision and at the base of the penis. Shortening or twisting of the penis secondary to excessive scarring at the base was not observed during a follow-up period of 15 months. The patient complained of a painful erection following even slight stimulation of the penis, which was controlled by low doses of analgesics for about 2 months after the operation. During 15 months of follow up at the outpatient clinic of our medical center, the patient had been satisfied with the level of sexual activity possible with his wife.

Discussion

Outflow resistance plays an important role in the elevation of pressure within the cavernosum during penile erection. Outflow resistance is not produced actively. Instead, it is thought to be produced passively by venous compression (between the corpus cavernosum and the corpus spongiosum, between the corpus cavernosum and the fibrous tunic, and at the sites of perforation of the fibrous tunic) and by the extension of blood vessels below and above the fibrous tunic. Incomplete erection due to the insufficient development of venous outflow resistance is called venous impotence. Venous impotence can be suspected when the injection of a smooth muscle relaxant like papaverine hydrochloride does not induce completion erection despite normal arterial blood flow in the deep dorsal artery on duplex color Doppler imaging. The diagnosis is established by DICC.[2-4] Figure 6 shows the 4 major routes of venous drainage from the corpus

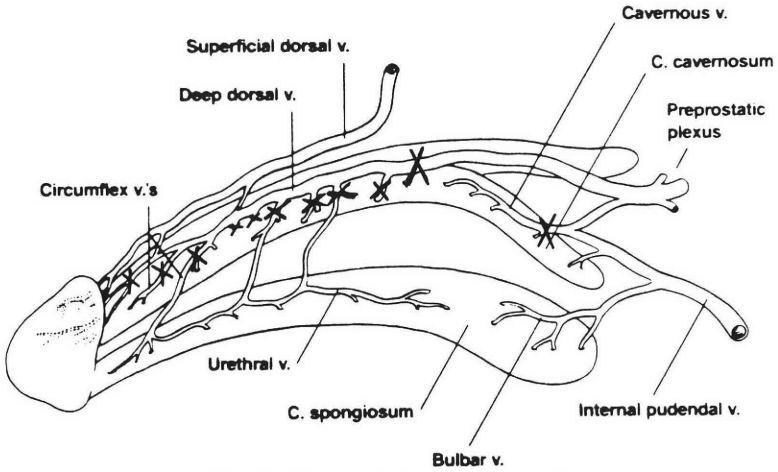


Fig. 6 Venous drainage of the penis

cavernosum: One route leads from the deep dorsal vein to the prostatic plexus, another is from the crural cavernosum to the internal pudendal vein, a third leads from the superficial dorsal vein, and the last route arises from the corpus spongiosum. These 4 routes communicate with each other in a complicated manner. In the surgical treatment of venous impotence, some part of these routes must be occluded to increase the outflow resistance. In the past, ligation of the deep dorsal vein was chiefly performed for this purpose, but the effectiveness of this method was not satisfactory (60%)[2, 11] Even when some of the routes are occluded, outflow resistance will still be insufficient if there is marked venous leakage via the other routes. The occasional recurrence of venous impotence after this operation may be attributed to increased outflow via the other routes or to the formation of new collateral pathways.[6-8] Other surgical techniques for venous impotence include ligation of the crura cavernosum[4,12] and spongiolysis.[13] However, two-thirds of the patients developed perineal discomfort or penile numbness after ligation of the crura covernosum.[11] We used a new technique[9] for the surgical treatment of venous impotence in this patient. With this technique, the deep dorsal vein and its emissary and circumflex branches are ligated under direct vision, along with ligation of the cavernous vein under a microscope and plication of the crura covernosum. This technique allows surer and safer creation of outflow resistance when compared to the conventional methods. The new method is simple and can be completed in a short time. The incidence of complications with this method has been reported to be low.[9] Although postoperative edema of the penis is frequently noted, it is transient. When 68 patients were followed up for 2 to 26 months after this surgery, the success rate was 82%.[9] In a recent follow-up study, Lue et al. reported that venous impotence recurred only within the first six months after this surgery, perhaps because collateral circulation sometimes develops within this period.[8] Our patient did not show any recurrence of venous impotence or any complication during follow up for 15 months. Thus, his postoperative course was excellent.

Conclusion

This paper describes a safe and useful surgical method for venous impotence. In Japan, the use of penile prostheses has been authorized by the Ministry of Health and Welfare. However, because the provision of this device is not covered by the national health insurance system, the penile prosthesis is an economic burden to many patients.

The surgical treatment of venous impotence has only recently been attempted and it still has many unresolved problems. However, since quality of life is increasingly being recognized to be important in medical practice, the sexual function of patients will receive more attention in the future. Surgical treatment of venous impotence is therefore likely to increase. Thus, it is desirable to establish criteria for the assessment patients suitable for surgical intervention. If these condi-

tions are fulfilled, the surgical treatment of venous impotence will become important in the fields of andrology and urology in Japan.

References

1) Lue, T. F., Hricak, H., Schmipt, R. A. and Guieu, J. D.: Functional evaluation of penile veins by cavernography in papaverine induced erection, J. Urol., 135: 479, 1989
2) Wespes, E., Delcour, C. and Struyven, J.: Cavernometry-cavernography: its role in organic impotence, Eur. Urol., 10: 229, 1984
3) Virag, R., Spencer, P. P. and Erydman, D.: Artificial erection in diagnosis and treatment of impotence, Urology, 24: 469, 1984
4) Puech-Leao, P., Glina, R. S. and Reichelt A. C.: Leakage through the crural edge of the corpus cavernosum, Eur.Urol., 13: 163, 1987
5) Wespes, E. and Schulman, C. G.: Venous leakage: surgical treatment of a curable cause of impotence, J. Urol., 133: 796, 1985
6) Jeffcoate, W. J.: The investigation of impotence, Brit. J. Urol., 68: 449, 1991
7) Sharlip, I. D.: The incredible result of penile vascular surgery, Int. J. Impotence Res., 3: 1, 1991
8) Lue, T. F.: What factors affect venous surgery outcome? A. U. A. Today, 4(7): 1, 1991
9) Lue, T. F.: Penile venous surgery, Urol. Clin. North Amer., 16: 607, 1989
10) Kamada, K., Takihara, H., Ueno, T., Baba, K., Shirataki, S. and Koshido, Y.: Evaluation of the penile blood flow of potent men using color Doppler ultrasonography, Jpn. J. Fertil. Steril., 36: 876, 1991
11) Kawanishi, Y., Imagawa, A., Kagawa, S. and Kurokawa, K.: Diagnosis of impotence. Report 7: Dynamic cavernography, Jpn. J. Urol., 78: 1354, 1987
12) Bar-Moshe, O. and Vandendris, M.: Treatment of impotence due to perineal venous leakage of crural penis, J. Urol., 139: 1217, 1988
13) Gilbert, P. and Stief, C.: Spongiolysis: A new surgical treatment of impotence caused by distal venous leakage, J.Urol., 138: 784, 1987

静脈性インポテンスに対する拡大鏡下 venous ligation surgery

山口大学医学部泌尿器科教室

瀧原博史　植野卓也　馬場良和
鎌田清治　白瀧　敬　石津和彦
内藤克輔

静脈性インポテンスに対して人工的に陰茎からの血液流出路に抵抗を作製し，生理的な閉鎖機構の補助を行う方法として，従来からの深陰茎背静脈および分枝の結紮術に加え，拡大鏡下に陰茎海綿体静脈の結紮術を同時に施行し，良好な術後経過を得たので，術式を中心に報告した．

硬膜外麻酔下に，陰茎根部に沿った皮膚切開を加え，陰茎を反転，脱転させた．陰茎提靭帯を切断，陰茎海綿体脚部を露出させ，深陰茎背静脈と回旋枝等のすべての分枝を結紮切断し，亀頭部の1 cm中枢側から陰茎根部までの深陰茎背静脈を海綿体白膜床から剥離摘出した．さらに拡大鏡下に陰茎海綿体動脈，神経を損傷しない様に注意深く陰茎海綿体静脈を白膜近接部でsuture-ligateし，陰茎海綿体脚部にpulicationを加えた．

術後，一過性の陰茎部浮腫以外には合併症も見られず，full erectionが得られており，本術式は拡大鏡下に動，静脈を確認しつつ施行できる点が安全，確実と考えられた．

(受付：1992年5月15日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

AIHの成績から見た精子濃度の臨床的意義

Retrospective Analysis of Infertile Couples Treated by Artificial Insemination with Husband's Semen

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

石原 理 Osamu ISHIHARA
田谷順子 Junko TAYA
飯野好明 Yoshiaki IINO
斎藤正博 Masahiro SAITOH
須野敏章 Toshiaki SUNO
木下勝之 Katsuyuki KINOSHITA

Department of Obstetrics & Gynaecology,
Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

同泌尿器科
吉田謙一郎 Ken-ichiro YOSHIDA
Department of Urology

男性不妊の治療指針を明確にするため1990年12月から1992年3月迄に当科不妊外来で施行したパーコール処理精子によるAIH症例122例410周期について，臨床成績と精液所見を検討した．AIH妊娠例は25例で，成功率は対患者当り20.5%，対周期当り6.1%であったが，AIH施行時精子濃度40×10⁶/ml以下あるいは精子運動率40%未満の症例は3例に過ぎなかった．原因不明長期不妊の適応でAIHを施行した症例の多くは3回以内のAIHで妊娠が成立したが，乏精子症例は，治療後精液所見の改善の見られた症例に限られ，平均6.3回のAIHを要した．妊娠周期と非妊娠周期の精液所見を比較すると，乏精子症では妊娠周期の所見が良好で，他群では非妊娠周期と差がなかった．泌尿器科的治療に不応の乏精子症およびAIHを5回以上施行した原因不明長期不妊症例では，早期にIVF-ETなど他の方法を考慮する必要が示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 147—151, 1993)

緒言

配偶者間人工授精 (AIH) は，男性因子を有する不妊カップルや原因不明の長期不妊症例の治療として広く施行されている．しかし，その成績は必ずしも良好とは言えず，特に乏精子症においては，AIHによる妊娠成功率は2%に過ぎず流産が多いとする報告がある[1]．近年，一定の臨床成績を収めるに至ったIVF-ETを中心とするいわゆるassisted reproductive technologiesは，男性因子を有するカップルの治療として期待されるが，その適応，特に症例選択の際のAIHとの使い分けに関しては意見が一致していない．本研究では当科における男性不妊患者に対するIVF-ETの適応を確立するために，90年12月より導入したパーコール処理精子によるAIHの成績をretrospectiveに検討し，当科におけるAIH治療による妊娠限界を明らかにすることを試みた．

対象および方法

1990年12月から1992年3月の間に，不妊を主訴と

して当科を受診し精査治療を受けた患者のうちAIHによる治療を受けた122例を対象とした．AIHの適応は，男性因子あるいは治療に抵抗性の原因不明長期不妊 (治療期間2年以上) である．これらの患者のうちAIHにより妊娠の成立した25例と，5回以上のAIHにもかかわらず妊娠に成功しなかった23例を選択し，精液検査あるいはAIHを施行した全周期の精液所見を検討した．

AIHは，症例に応じてクロミフェンやhMGなどによる排卵誘発を行い超音波断層法による卵胞計測で18mm以上の卵胞を認めた時点でhCGを投与後，約24時間後に施行した．精液の調整はKanekoらの方法[2]に準じ，80%パーコール 5 mlに精液を層積攪拌後2000rpmで20分間遠心し，上清を除去後精子を洗浄し，培養液 (HTF+0.4% HSA) 0.5mlに懸濁して子宮内に注入した．

精液検査はスクリーニングとして全例に，またAIH施行時に毎回，マクラー精子算定盤を用いて行った．精液スクリーニング検査において精子数の減少や運動性の低下を認める症例は，原則として泌尿器科において精索静脈瘤や前立腺炎などの器質的な疾患の有無について検索後，適切な手術療法および薬物療法を行った．

結　果

AIHを施行した122症例269周期のうち25例に妊娠が成立し，妊娠率は対患者当り20.5%，対周期当り6.1%であった．また，5回以上のAIHによっても妊娠の成立しなかった症例は，乏精子症16例，原因不明長期不妊7例であった．このうち妊娠例とAIH 5回以上の不成功例を，A群：妊娠成功乏精子症例 (7例)，B群：妊娠成功した射精障害，逆行性射精など他の男性因子症例 (5例)，C群：妊娠成功原因不明不妊症例 (13例)，D群：妊娠不成功乏精子症例 (16例)，E群：妊娠不成功原因不明長期不妊症例 (7例) に分類した．

各群において，不妊期間および男性因子の治療開始前の精液所見を比較すると，表1に示す通りになる．乏精子症症例のうちAIHにて妊娠の成立した群 (A群) と妊娠に至らなかった群 (D群) 間に，男性因子治療前の精液所見に差は認められなかったが，不妊期間はD群においてやや長い傾向が認められた．原因不明長期不妊症例においても妊娠群 (C群) と非妊娠群 (E群) 間に同様の傾向が認められた．

妊娠成立までのAIH回数をAIHの適応別に検討すると (図1)，射精障害などの男性因子によるAIH (平均3.6回) および原因不明長期不妊症例 (同2.5回) では3回以下の少数回のAIHで妊娠する症例が多いのに対して，乏精子症例では比較的多数回のAIHを要した (同6.3回)．

全ての精液検査所見を各症例毎にひとつのカラムとして示すと (図2)，乏精子症では，妊娠は各症例の，各回でばらついた精液所見の比較的良好な周期において成立する傾向があるのに対して，他の男性

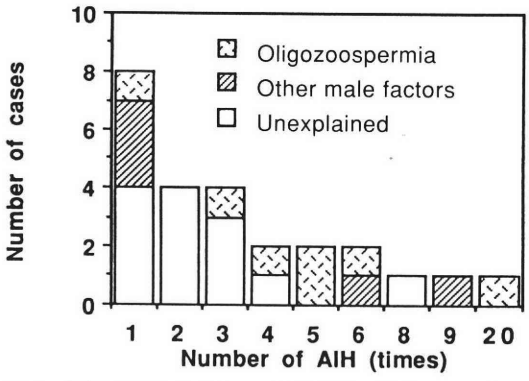


図1　妊娠に至るまでのAIH施行回数の適応による相違

表1　泌尿器科的治療前の精液所見の比較

Group	Age of wives (years old)	Length of infertility (years)	Conc. of sperm (×10E6/ml)	Motility (%)	Pregnancy
A (n= 7)	30.0 ± 3.7	2.6 ± 0.9	21.9 ± 15.3	46.1 ± 26.2	+
B (n= 5)	28.8 ± 1.9	2.4 ± 1.1	127.6 ± 62.9	63.0 ± 21.6	+
C (n=13)	32.2 ± 2.6	4.7 ± 2.5	105.8 ± 32.5	76.9 ± 5.2	+
D (n=16)	31.7 ± 3.9	4.5 ± 1.9	29.8 ± 21.2	45 ± 16.3	-
E (n= 7)	32.4 ± 3.0	6.0 ± 2.2	95.1 ± 19.4	72.3 ± 8.6	-

A群：妊娠成立した乏精子症例，B群：妊娠成立した射精障害，逆行性射精など他の男性因子症例，C群：妊娠成立した原因不明長期不妊症例，D群：妊娠不成功の乏精子症例，E群：妊娠不成功の原因不明長期不妊症例

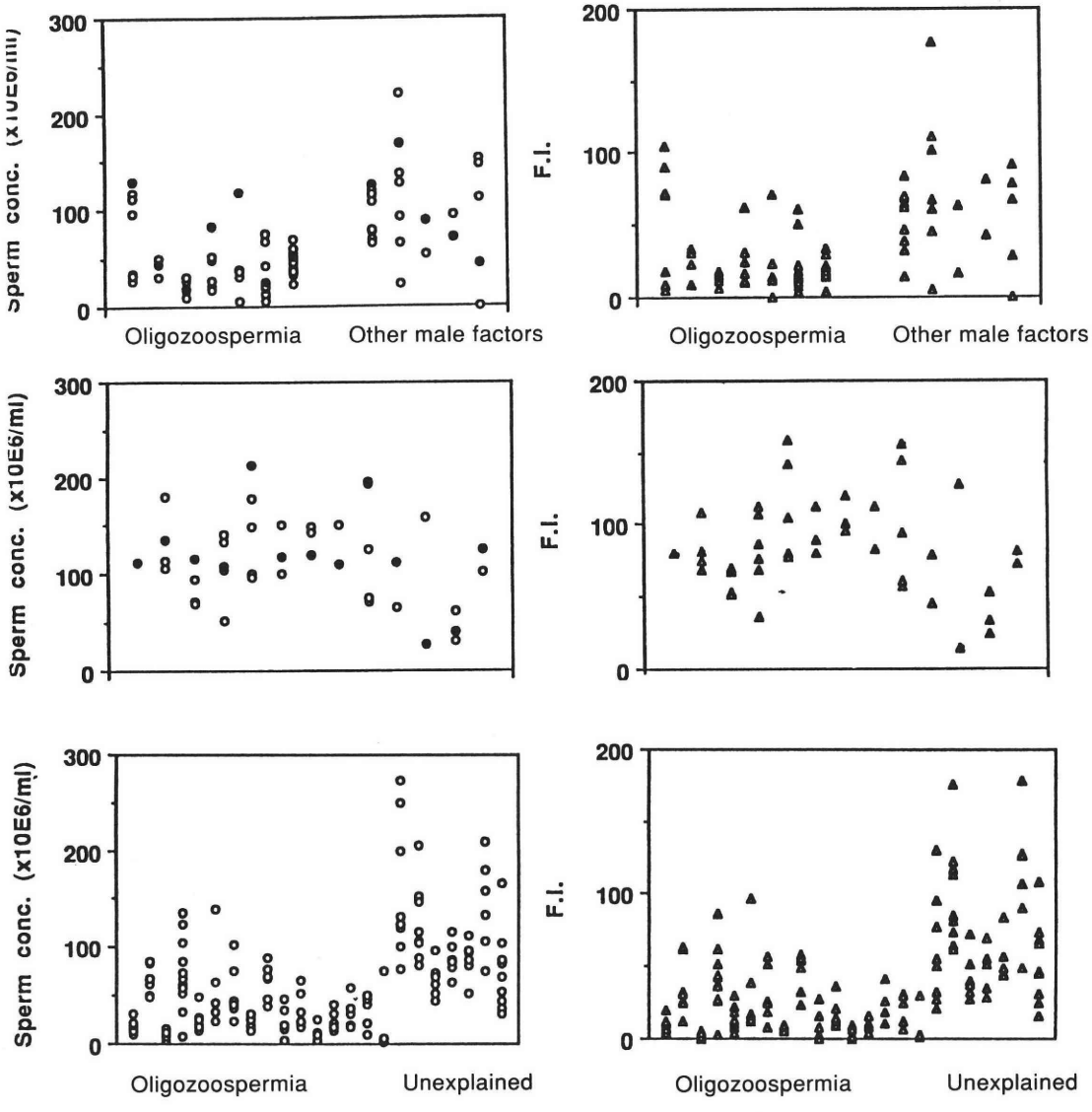


図2　AIH施行患者各例の精液所見の変動
一つのカラムが一人の患者を示す
上段：乏精子症および他の男性因子の適応によるAIH症例 (●▲は妊娠成立周期)
中段：原因不明長期不妊の適応によるAIH症例 (●▲は妊娠成立周期)
下段：5回以上のAIHで妊娠の成立しなかった症例

因子や原因不明長期不妊の適応でAIHを施行した症例では一定の傾向を示さない．一方，5回以上のAIHで妊娠の成立しない乏精子症症例では，精液所見が毎回良好でない症例が大半を占める．また，AIH妊娠症例のうち，AIH施行時の精液所見で精子濃度40×10^6/ml以下あるいは精子運動率40%未満の症例は3例に過ぎず，それらの例の精液所見は，それぞれ精子濃度5.2×10^6/ml，運動率65%，精子濃度20×10^6/ml，運動率60%，精子濃度28×10^6/ml，運動率50%であった．

さらに図3に明らかなように，妊娠成立周期と非成立周期の精子数を比較すると乏精子症症例では妊娠成立周期に精子数が比較的多数であるのに対し，他の適応によるAIHでは妊娠時と妊娠不成立時で差

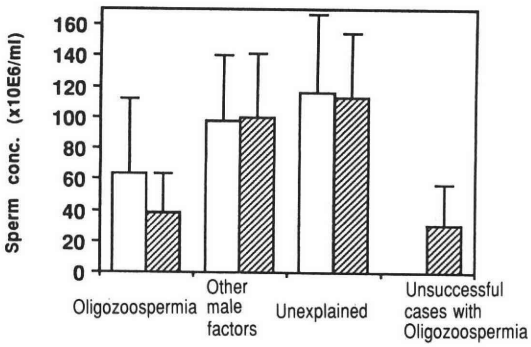


図3　妊娠成立周期と非成立周期の精液所見の比較
(□：妊娠，▨：非妊娠)

が認められない．妊娠に成功した乏精子症症例7例には，精索静脈瘤手術後例1例，前立腺炎などの抗生物質治療後の症例5例が含まれている．

考　察

他施設の報告[3,4,5]と同様に，当科ではパーコール攪拌密度勾配法を用いたAIHを導入してからAIHの成功率は約3%から，6.1%に向上した．しかし，AIH施行時に精子濃度40×10⁶/mlあるいは運動率40%未満を示す乏精子症の症例は，妊娠した25例中3例(12%)にすぎなかった．また，AIH回数では，乏精子症例では7例中5例(71%)，それ以外の適応では，18例中15例(83%)の症例が5回以内に妊娠していることから，多数回のAIHを続けて行くことは，少数の例外を除いて妊娠に結び付くことは少ないと思われる．特に，乏精子症以外の適応によるAIHによる妊娠は，大半が3回目迄に成立していることからも，排卵のタイミングなど精液以外の要因を，超音波断層法および血中ホルモンの測定により調整した上で，5回以上AIHをしても妊娠の成立しない場合は，IVF-ETの適応となると思われる．また同様に，泌尿器科的治療後5回以上のAIHにより妊娠しない乏精子症例に対しては，IVF-ETを考慮してよいと思われる．

当科における乏精子症(精子濃度40×10⁶/mlあるいは運動率40%未満)に対するIVF-ETでは，14例中10例(71.4%)に受精卵を得ており，そのうち3例がon-going pregnancyとなっている(未発表)が，広井らの報告[6]にあると同様に，精子濃度10×10⁶/ml未満の症例におけるIVF-ETの成績は満足できるものではない(ET率2/4(50%)，on-goingは1例のみ)．したがって，精液所見を少しでも改善してからAIHあるいはIVF-ETに臨むことが重要と考えられ，いわゆるmale factorの中には，泌尿器科的治療に反応するものがあり，それらの症例の多くは妊娠に結び付いていることから，泌尿器科不妊専門医との緊密なcollaborationが必要と思われる．また，IVF-ETの成績を見ても精子濃度10×10⁶/ml以上の精子濃度を有する乏精子症，また原因不明の長期不妊の適応によるAIHを5回以上施行した症例にはIVF-ETを勧めてよいと思われた．費用対効果の高い不妊治療を目指すために，これらの症例に対するAIHあるいはIVF-ETの選択基準として，ここにのべた知見は参考になると思われた．

文　献

1) 後藤康夫，野田洋一，成本勝彦，野野垣多加史，井田憲司，辰巳賢一，馬岡　陽，岸　淳二，都倉　隆，夏山　知，塩谷雅英，福岡正恒，高倉賢二，神崎秀陽，泰井俊造，森　崇英：当科妊孕外来における男性不妊治療の現状，日不妊会誌，36: 191, 1991
2) Kaneko,S., Sato,H., Kobanawa,K., Oshio,S., Kobayashi, T., Iizuka, R. : Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen, Arch. Androl., 19: 75, 1987
3) 飯塚理八，原　唯純，兼子　智：精子洗浄濃縮法，産と婦，57: 1310, 1990
4) 内野美知子，内野直樹，大河原聡，田所義晃，田口　明：パーコールを用いた精子洗浄濃縮法の人工授精への応用，周産期医学，19: 111, 1989
5) 佐藤博久，木村裕幸，斎藤優，樋口泰彦，遠藤芳広，大山俊雄，山口光哉：Percoll攪拌密度勾配法のAIH (配偶者間人工授精) への応用とLife table法による妊娠率の検討，日産婦誌，42: 149, 1990
6) 広井正彦，斎藤英和，佐藤文彦：IVF-ETと乏精子症，産と婦，57: 1320, 1990

Retrospective analysis of infertile couples treated by artificial insemination with husband's semen

Osamu Ishihara, Junko Taya
Yoshiaki Iino, Masahiro Saitoh
Toshiaki Suno and Katsuyuki Kinoshita

Department of Obstetrics & Gynaecology,
Saitama Medical Center, Saitama Medical School,
Saitama 350, Japan

Ken-ichiro Yoshida

Department of Urology

In order to standarize the indication of artificial insemination with husband's semen (AIH) and in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) for oligozoospermia in our department, the records of patients treated with AIH from 12/90 to 3/92 were extracted.

Retrospective analysis revealed that the patients treated by AIH using Percoll continuous-step density gradient method scored 20.5% pregnancy per patients (25/122) and 6.1% pregnancy per cycles (25/410). Semen analysis at the time of AIH, however, presented all but three semen provided the concentration> 40×10^6/ml and motility > 40%. Though the couples with oligozoospermia factor needed 6.3 times of AIH in average, over 70% of cases bacame pregnant less than five times. Therefore, IVF-ET might be indicated for the couples who have oligozoospermia refractory to surgical or medical treatment or have been treated with AIH more than five times.

(受付：1992年6月8日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

Transverse Vasovasostomyにより妊娠・出産に成功した無精子症の1例

A Case Report of Transverse Vasovasostomy with Successful Fertilization.

埼玉医科大学総合医療センター　泌尿器科
小林信幸　　吉田謙一郎
Nobuyuki KOBAYASHI　　Ken-ichiro YOSHIDA
Department of Urology,
Saitama Medical Center of Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

対側の精管を交叉性に端々吻合するtranseverse vasovasostomyの報告は少ない．われわれは無精子症患者に対し同術式を行い，妊娠・出産に成功したので報告する．症例は28歳，精巣生検にて右側は比較的良好な精子形成像を示したが，左側はSertoli cell only tubulesを呈した．一方精管精嚢造影では，右は幼児期のヘルニア根治術の合併症と思われる精管閉塞を認めたが，左は通過性は良好であった．Transeverse vasovasostomyを施行後，一過性の精子出現をみたが，その後再び無精子症を呈したため，約1年後に再吻合術を行った．精液所見は徐々に改善し，2年半後には精子濃度45×10^6/ml，運動率45%となり，妊娠，1990年4月に健康な女児を出産した．Transverse vasovasostomyの適応は限られているが，片側精巣の精子形成障害と対側精管通過障害による男子不妊症患者に対しては，有用な治療法であると言える．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 152—155, 1993)

緒　言

Vasovasostomyは主として精管結紮術後の症例，あるいは鼠径ヘルニア手術後の合併症としておきる精管離断に対し行なわれているが，一側の精管を対側の精管と交叉性に吻合するtransverse vasovasostomyはほとんどその報告をみない．われわれは，鼠径ヘルニア術後の無精子症の症例に対し，transverse vasovasostomyを施行し，妊娠・出産に成功したので報告する．

症　例

患　者：28歳，男性
主　訴：不妊
既往歴：4歳　流行性耳下腺炎
　　右鼠径ヘルニア手術
家族歴：特記すべきことなし
現病歴：結婚後避妊せずに約1年経過しても妊娠がみられず，夫婦で近くの産婦人科医を受診した．精査の結果，妻は特別な異常を認めなかったが，患者は無精子症と診断され，[redacted]に当センター泌尿器科に紹介された．
現　症：全身的には特別な異常所見は見られず，二次性徴も正常であった．右鼠径部にヘルニア手術後の瘢痕を認める．精巣容量は右25ml，左12mlと明らかな左右差を認めた．また，右精管は一部硬く肥厚していた．精索静脈瘤は認めず，前立腺は正常所見であった．
検査所見：精液所見は，精液量3.3ml，精液の遠心沈渣で精子を認めず．尿・一般血液検査所見に異常はなく，ゴナドトロピン・テストステロン・プロラクチンも正常範囲であった (表1)．精管精嚢造影では，左の精管通過性は良好であったが，右側は造影されず，鼠径ヘルニア手術の合併症としての精管閉塞が疑われた (図1)．精巣生検を施行したところ，左精巣組織像はほぼSertoli cell only tubulesの所見

表1　血液検査所見

血算：白血球5,600/mm³，ヘモグロビン15.3g/dl	
血小板22.1×10⁴/mm³	
血液生化学：すべて正常範囲	
内分泌検査：	
LH	10.7 mIU/ml (6.5 - 34.5)
FSH	7.3 mIU/ml (2.0 - 22.0)
プロラクチン	18.2 ng/ml (2.0 - 30.0)
テストステロン	479 ng/dl (300 - 850)

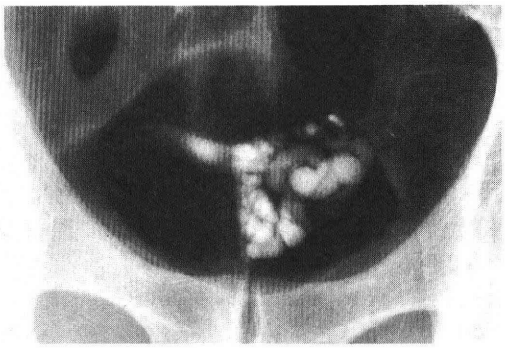


図1　精管精嚢造影

で，精細管壁の肥厚はほとんど認められなかった(図2)．これに対し右精巣では，比較的良好な精子形成像が認められた(図3)．

治療経過　治療経過の概要を図4に示す．上記の検査結果より，右精巣の精子形成能と左精管の通過性に期待し，[redacted]，transverse vasovasostomyを施行した．図5のごとく，右近位精管と左遠位精管とを7-0プロリン糸にて端々吻合した．退院後外来で精液所見を追跡したところ，術後約1か月で精液量3.0ml，精子濃度1.46×10⁶/ml，運動率30%の精子出現を認めた．しかし術後約2か

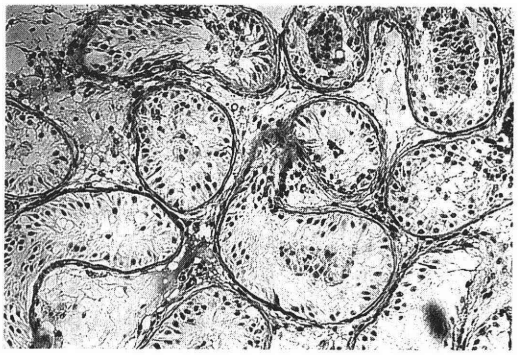


図2　左精巣組織像 (×400)

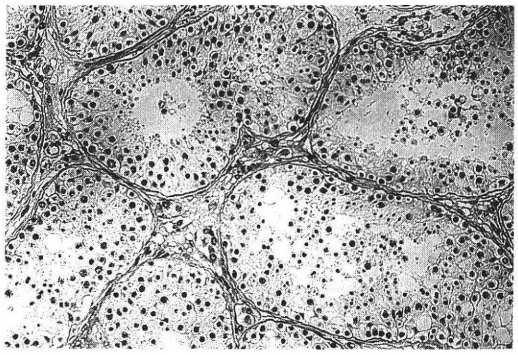


図3　右精巣組織像 (×400)

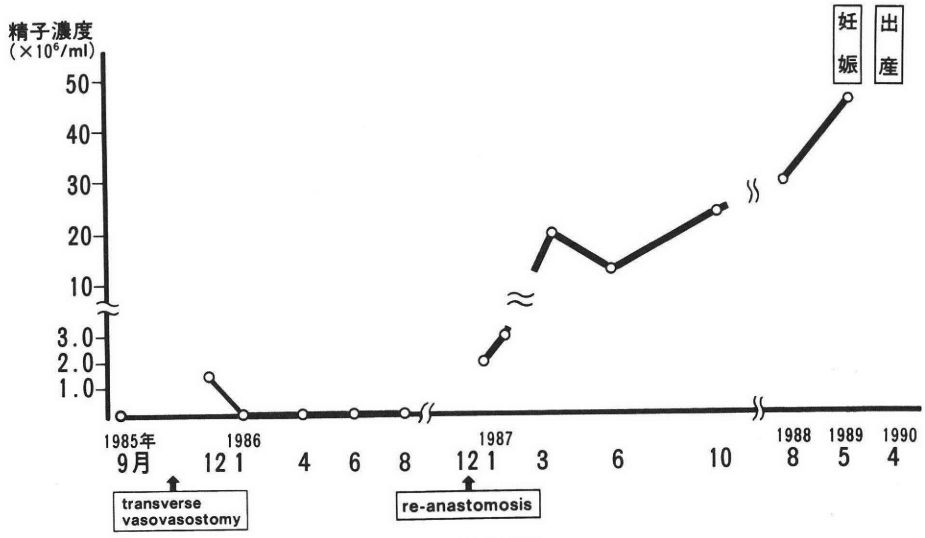


図4　治療経過

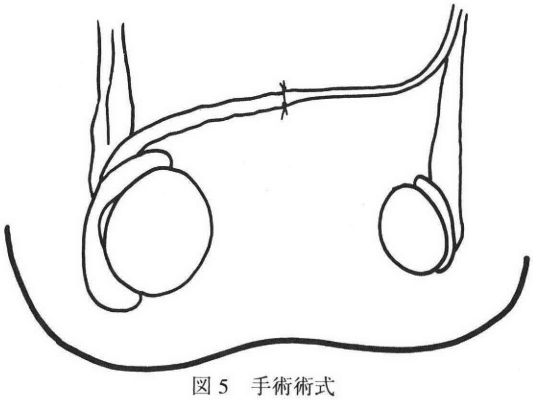


図5　手術術式

月半で再び無精子症を呈し，以後半年以上経過を追っても精子の出現はみられなかった．

このため，術後約1年1か月にあたる[redacted]，2回目の手術を行った．前回の吻合部を約2cm切除し，9-0ナイロン糸を用いて端々吻合を行った．術後約2か月の精液検査で，精液量3.0ml，精子濃度2.0×10⁶/ml，運動率30%であったが，術後約4か月では，精液量2.1ml，精子濃度20×10⁶/ml，運動率40%にまで増加した．さらに長期にわたってフォローしたところ，1987年10月で精子濃度24×10⁶/ml，1988年8月には29×10⁶/mlとなり，2回目の手術後約2年半にあたる1989年5月には精液量4.0ml，精子濃度45×10⁶/ml，運動率45%と精液所見の著明な改善がみられた．

この時点で，患者らの希望もあり他院の産婦人科にAIHを依頼・紹介したが，その直後，1989年6月に妊娠，1990年4月8日に無事女児を出産した．現在のところ，特別な疾患はなく，発育，発達も順調である．

考　察

Transverse vasovasostomyの報告は少なく，われわれが検索し得た限りでは，藤岡ら[1]の1症例を見いだせるのみである．これは，この術式があまり知られていないと言うより，むしろ適応症例が非常に限られており，実際に行う症例が無いためと思われる．

当術式の適応となる条件としては，無精子症あるいは乏精子症を呈する男子不妊症患者のうち，

Ⅰ　a) 一側の精巣は良好な造精機能を認め，

　　b) その同側の精管は閉塞しているが，近位側はある程度の長さで通過性が保たれている．

Ⅱ　他方，対側では，

　　a 1) 精巣で精子形成が高度に障害されているか，または

　　a 2) 精巣上体や精管の近位の部位での閉塞があるため精管への精子の流入がみられず，一側のvasovasostomyやvasoepididymostomyは困難である場合で，かつ

　　b) 精管の遠位側は相当の長さで通過性が保たれている．

といった条件が挙げられる．

Ⅰa) およびⅡa 1)，a 2) の条件を来す場合としては，一側の精巣や精巣上体の障害すなわち停留睾丸精巣・単精巣症などの先天性疾患や外傷，精索捻転症を含めた血行障害，ウィルス性・細菌性炎症，精巣腫瘍などが挙げられる．また，Ⅰb)・Ⅱb) の病態については先天性精管欠損症や，本症例の如く，鼠径ヘルニア手術後の合併症のような医原性のものが考えられる．以上はいずれも比較的稀な病態であり，これらの精巣・精巣上体の異常と精管の異常とが同一症例に，しかも丁度逆の側に起こる確率はきわめて低いものと推定される．

手術手技としては，通常のvasovasostomyと大きく変わるところはないが，もし吻合する精管の長さの余裕が少ない場合は，剥離を充分するなどして，吻合部に緊張がかからないように配慮する必要があろう．しかしながら，本症例のように一方の精管は精巣上体に至るまで正常に保たれており，他方の精管も遠位側に充分な長さが保たれていることが普通で，交叉性に吻合するにしてもこの点はあまり問題にならないことが多いと思われる．吻合を施行する前に精管精嚢造影で通過性や閉塞部位を確認しておくことは言うまでもないが，精子形成を期待する側の精管を切断した際内容液の流出と，そのなかの運動精子の存在を確認することも重要である．本症例では手術後約1か月で少数の精子出現が認められたが，その後再び無精子症となり，術後約1年1か月で再手術を施行した．以後再び精子の出現をみ，次第に増加，妊娠・出産に成功した．今回の経験より，vasovasostomy後一度少数でも精子の出現を認めたものがその後再び無精子症を呈した場合，断念せずに再度吻合を試みる価値があると思われる．

本症例に対し人工精液瘤を造設し精子を採取し，AIHを行うという選択も考えられるが，現在のところこの方法の成功率は低く，本邦では僅か3例の妊娠報告例をみるのみである[2]．本症例の経過を見ても精液所見の改善にはかなりの期間を要しており，人工精液瘤では精子採取の回数と期間が大きく制限されることが成功率が低い理由のひとつではないか

と思われる．この点transverse vasovasostomyは，長期にわたって精液所見の経過を見ることができ，また精巣上体から精管へと精子が通過する過程がより自然なかたちで保たれている点で優れていると思われる．

なお本症例では，何故一側のみがSertoli cell only tubulesを来したのか，その理由は不明であり，左精巣に障害を及ぼし得る特別な既往・所見はみいだせなかった．また，電顕や特殊染色による検討は行っていないが，組織像で精細管壁の肥厚が著明でないことやSertoli細胞の形態が比較的未熟であることなどからは，primaryなものである可能性も考えられ[3,4]，Sertoli cell only tubulesの成因を考えるうえで興味深い症例であると思われる．

いずれにせよ，このように左右で精子形成能に顕著な差異を有する症例が存在することを考えると，精巣生検を常に一側のみにしか行わないことに疑問が生ずる．少なくとも精巣容積に左右差を認める症例に対しては，両側の生検を行う必要があると考えられる．

結　語

Transverse vasovasostomyを施行し，妊娠・出産に成功した無精子症の1例を報告した．

本論文の要旨は第36回日本不妊学会（名古屋，1991年）に於て発表した．

文　献

1) 藤岡秀樹，高　栄哲，近藤宣幸，土井康裕，松井孝之，竹山政美，奥山明彦：特異な精路通過障害に対するTransvasovasostomyの経験，第32回日本不妊学会，1987
2) 小松　潔，山口秋人：人工精液瘤による妊娠成功例，日泌尿会誌，81: 1430，1990
3) Nistal, M., Jimenez, F. and Paniagua, R.: Sertoli cell types in the Sertoli-cell-only syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and aetiology, Hysto pathology, 16: 173, 1990
4) Terada, T. and Hatakeyama, S.: Morphological evidence for two types of idiopathic "Sertoli-cell-only" syndrome, Int. J. Androl., 14: 117, 1991

A case report of transverse vasovasostomy with successful fertilization

Nobuyuki Kobayashi and Ken-ichiro Yoshida

Department of Urology,
Saitama Medical Center of Saitama Medical School,
Saitama 350, Japan

Reports of transverse vasovasostomy have been rare. We report a 28-year-old man of azoospermia, who was successfully operated with transverse vasovasostomy. Histologically, the patient's right testis showed fairly good spermatogenesis, while the left testis represented Sertoli cell only tubules. Radiological examination revealed complete obstruction of the right ductus deferens, probably due to the complication of herniorrhaphy in his childhood. First operation of transverse vasovasostomy had failed after temporary appearance of spermatozoa in his ejaculate. Re-anastomosis of bilateral ducts transversely was performed about one year after the first operation. Long-term follow-up showed gradual increase in sperm concentration, and about two years and a half after the second operation, when the sperm count was 45 $\times 10^6$/ml with 45% of motility rate, his wife got pregnant. A healthy baby was born in April, 1990. Transverse vasovasostomy, although its indication is rare, is a useful method for the treatment of patients with unilateral impaired spermatogenesis associated with contralateral obstruction at ductus deferens.

(受付：1992年3月18日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

hCG連続投与後，精漿中transferrin濃度の増加とともに妊孕性を獲得した無精子症の一例

A Report of Successful Fertilization of Azoospermic Patient Accompanied with the Increase of Seminal Plasma Transferrin Concentration by hCG Treatment

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科
吉田 謙一郎 Ken-ichiro YOSHIDA
内島 豊 Yutaka UCHIJIMA
小林 信幸 Nobuyuki KOBAYASHI
斉藤 博 Hiroshi SAITOH
Department of Urology,
Saitama Medical Center of Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

精漿中transferrin濃度が13 μg/mlと低値を示し，精巣の生検像がspermatidの成熟障害を示した無精子症のhMG治療無効例に対し，hCG 3,000Uを週一回，10回の投与を行った．投与終了後，精漿中transferrin濃度は40 μg/mlまで増加した．精子は出現したばかりではなく，投与終了後2ヶ月目にはその濃度は108×10⁶/mlまで達し，妻は妊娠し健康な女児の誕生をみた．長期の経過観察により，精漿中transferrin濃度の低下にともない精子数も低下することが示された．本報告は精子形成においてtransferrinが重要であること，特にspermatidの成熟には重要であることを示した．またhCG投与により精漿中transferrin濃度の増加がみられたことから，Leydig細胞とSertoli細胞間に相互作用が存在することが示唆された．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 156—160, 1993)

緒 言

男子不妊症の治療はその成因究明のもと適切に治療することが望ましい．精索静脈瘤[1]，精路閉塞[2]あるいは精路，副性器の炎症にもとずく不妊症[3]，または低gonadotropinにもとずく不妊症[4,5]等については一定の治療指針が存在するものの，特発性として総称される多くの精子形成障害例に対する治療は，正常な精子形成機構の解明が充分になされていない現在，未だ確立された方法はない．一方，最近培養細胞を用いた基礎的研究から精子形成におよぼす精巣内構成細胞の個々の機能が解明されつつある[6]．その一つにSertoli細胞の生成分泌するtransferrinがあげられる[7]．著者らは臨床例において精漿中transferrin濃度が精巣機能の指標として，おそらくはSertoli細胞機能の指標となり得ることを報告[8-10]してきたが，今回，精漿中transferrin濃度が極めて低値を示す精子成熟障害に起因する無精子症を経験し，これにhCGを投与することにより精漿中transferrin濃度の増加がみられ，妊孕性の獲得に成功し一児の父親となった興味ある症例を経験したので本症例を報告するとともに，hCG投与にともなうtransferrin濃度の増加，精子形成能の獲得について精巣内構成細胞のparacrine作用から解説を試みたい．

症 例

患 者：男性，初診時35歳．
主 訴：1年4ヵ月来の不妊．婦人科より無精子症の診断を受け当科受診す．妻は26歳，婦人科的には異常はないとのことであった．

既往歴：耳下腺炎は6歳時に罹患．これを除けば結核，性病などの既往はない．このほかに20歳時にスキーにて右下腿骨折の既往がある．

家族歴：特記すべきことなし．

現　症：身長167cm，体重63kg，体型は正常な成人男性型を示す．外陰部に異常無く，精巣容積は両側とも15mlにて正常硬であった．両側に精索静脈瘤を認めず．また両側の精巣上体，精管，前立腺に異常を認めない．その他の理学的所見に異常を認めなかった．

一般検査：一般血液検査，生化学検査には異常を認めず．胸部レントゲン写真，心電図に異常を認めなかった．

血中hormone濃度

血中gonadotropin値および血中testosterone濃度の測定はRIAにより行った．血中hormone採血は午前9時，9時30分，10時の三回に分け3 ccずつ行い，それらを一つにまとめてRIAに供した．RIAは二抗体法により行った．初診時のLH値は14.5mIU/ml，FSH値5.9mIU/ml，prolactin値22.2mIU/ml，testosterone値495ng/dlと，いずれも妊孕性を有する成人男子例と同値を示した(表1)．

精液検査および精漿中transferrinの測定について

精液検査はCell-softにて行った．初診時の精液検査では精液量3.1mlで無精子症を示した．精漿中transferrin濃度の測定については精液が充分液化した後，800×Gにて20分間遠心し，その上澄である精漿につきtransferrin濃度の測定に供した．測定には免疫拡散法を原理とするLC-Partigen transferrin (ベーリング社製) を用いた．すなわちプレートの抗原穴に検体20 μlを注ぎ48時間反応させた後，その直径から面積を算出し検量線のそれと比較し濃度の測定を行った．これにより精漿中transferrin濃度は13 μg/mlとの値が得られたが，妊孕性を有する成人男子に比し著しく低い値であった(表1)．以上の検査所見からは無精子症の原因として精路通過障害によるものなのか，あるいは精子の成熟障害によるものなのかを鑑別できないため，精巣生検と精管精嚢造影を行った．

手術時の検査成績および精巣の組織像について：精巣，精巣上体および精管の肉眼的観察では異常は認めなかった．また両側の精管精嚢造影では図1のごとく閉塞を認めなかった．精巣生検は左側についてのみ行った．Bouin氏液固定後の組織のH. E. 染色を図2に示す．精細管は充分拡張しており，管壁の肥厚はなくhyaline化も認めなかった．管腔には多くの精細胞を数えるが，その分化はspermatidまでであり精子は認められなかった．Sertoli細胞は成熟型を呈し形態的には異常を認めなかった．また間質に存在するLeydig細胞は成熟型を呈していた．

以上より本症例は精子成熟障害による無精子症と診断した．

表1　血中ホルモン濃度と精漿中トランスフェリン濃度について

測定項目		本症例の値	妊孕能を有する群での値
LH	(mIU/ml)	14.5	9.0 ±1.4 (n=14)
FSH	(mIU/ml)	5.9	6.5 ±1.6 (n=14)
PRL*	(mIU/ml)	22.2	not determined
T**	(ng/dl)	495	551 ±121 (n=14)
Trans.#	(μg/ml)	13.0	77.5 ±49.0 (n=19)

*Prolactin, ** Testosterone, #Transferrin.

図1　症例の両側精管精嚢造影
両側の精管精嚢ともよく造影されており，通過障害を認めない．

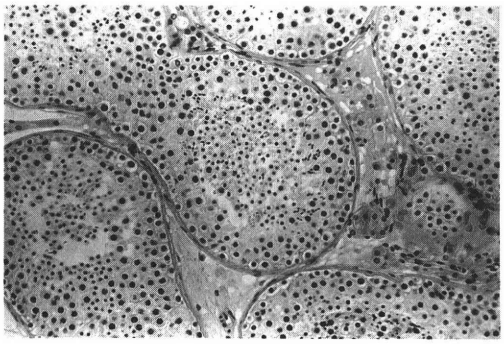


図2　症例の精巣生検像
精細胞の分化はspermatidまでであり，精子を認めない．Sertoli細胞およびLeydig細胞は成熟型を呈す．また管壁にはhyaline化を認めない．

治療経過の概要

治療法と治療にともなう精液検査所見を図3に示す．本症例は正常な男性型を呈しており，血中gonadotropin値は妊孕性を有する成人男子と同値であること，精巣の組織学的検査では精細胞はspermatidまでの分裂がみられことから，本症例に対しては精子成熟に関与するとされるFSH，すなわちhMG投与が適切と考え，週1回の割りで，1回，150Uの投与を10回行った．投与終了後3ヵ月間，毎月精漿中transferrin濃度を測定するとともに，精子の出現を観察したがtransferrin濃度は13～17μg/ml前後を示すのみでほとんどその増加がみられず，精液検査では無精子状態のままであった．以上のごとくhMG投与が効果を示さないため，hMG投与終了後5ヵ月を経た後hCG投与を開始した．hCGは週1回投与で1回，3,000Uとし10回投与を行った．10回投与後の精漿中transferrin濃度は27μg/mlと増加を示したが，精液検査ではやはり無精子状態であった．しかし投与終了後2ヵ月後より精液中に精子の出現がみられ，精液量4.8ml，精子濃度4.4×10⁶/ml，運動率7％を示した．この時点での精漿中transferrin濃度は40μg/mlを呈した．更に投与終了後5ヶ月目の精液検査では精液量3.8ml，精子濃度108.5×10⁶/ml，運動率26.4%，精漿中transferrin濃度は38μg/mlを示した．この時，妻の妊娠が確認された．投与終了後6ヶ月目では精液量2.2ml，精子濃度76.2×10⁶/ml，運動率25%，transferrin濃度は33μg/mlを示した．その後4ヵ月間は精子濃度は 高い値を保ったが，漸次late stageのspermatid (形態的には精子の尾部を欠く) が多くを占め運動率は漸減した．またtransferrin 濃度も漸減した．投与終了後1年目には精子濃度2.56×10⁶/ml，運動率15%，transferrin濃度は20μg/mlを示した．90年5月5日に健康正常女児の誕生をみたが，患者の協力により精液検査はhCG投与終了後1年2ヵ月目

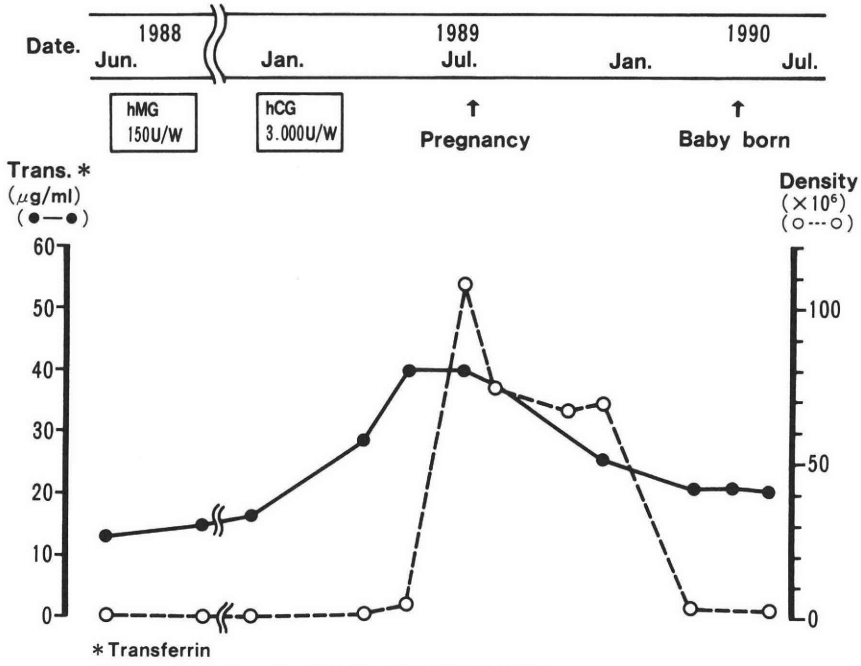


図3　ゴナドトロピン投与後の精子濃度と精漿中transferrin濃度の変効

まで行った．最後の精液検査では精液量3.0ml，精子濃度2.0×10⁶/ml，全てlate stageのspermatidだけであり，運動精子はみられず，transferrin濃度は21μg/mlを呈した(図3参照)．

考　案

精子形成は精細胞に対するLeydig細胞，Sertoli細胞の相互作用により導入，維持される．いずれの細胞機能に障害があっても精子形成能は低下するとされるが，臨床例においてこれらの細胞機能の障害部位を特定することは困難であった．わずかにisotopeを用いたandrogen生成に関する基礎的研究から，特発性精子形成障害と呼ばれる症例の中にはLeydig細胞機能の障害に起因するもののあることが示唆[11]されているにすぎない．一方，Sertoli細胞機能については有用な指標はないためその検討は困難とされてきた．しかしながらラットを用いた基礎的研究からSertoli細胞は比較的多量のtransferrinを生成することが報告[7]され，またヒト精漿中にも高い濃度のtransferrinが検出され，かつその多くは精巣由来であることが報告[12]されるにおよび，精漿中transferrin濃度測定の臨床的有用性が注目されるに到った．事実，精漿中transferrin濃度は精子濃度と有意に相関するとの報告[10,13]や精漿中transferrin濃度を一つの指標とした特発性精子形成障害の分類も試みられている[10]．本症例は初診時，精漿中transferrin濃度が13μg/mlを示したが，この値は妊孕性の確認されている症例と比較し極めて低値であった．精漿中transferrinが低値を示す疾患としては精路通過障害にもとずく無精子症[12]があげられるが，本症例では無精子症を呈したものの精路に通過障害のないことから，精漿中transferrin濃度の低下の原因としてSertoli細胞機能の障害が考えられた．

transferrinは鉄の移送に関与する蛋白であるが，精細胞においては鉄はpachytene spermatocyteとspermatidに高濃度に取り込まれることが，^{59}Feを用いた基礎的研究から報告[14]されている．またpachytene spermatocyteにはtransferrin receptorが存在するとの報告[15]もあり，transferrinは鉄をこれらの細胞に移送することにより，その成熟に関与しているものと思われる．精細胞の分化とtransferrin濃度の関連について本症例の組織像とhCG投与後の経過は，精巣内でtransferrin濃度が低くとも，精細胞はspermatidまで分化し得るが，精子の完成にはより高濃度のtransferrinが必要であることを示唆している．

特発性精子形成障害に対する内分泌療法としてはhMG投与とhCG投与が主として行われている．その効果については前者が有効であるとするもの，後者が有効であるとするもの，あるいは両者の併用が有効であるとするもの等で，その評価は一定していない[16]．これはおそらく乏精子症の成因が一律でないことに起因しているものと思われる．本症例に対してhMG投与は無効であったが，hCG投与が精漿中transferrin濃度を増加させ，かつ精液所見を改善させたことは興味深い．hCGはLeydig細胞に作用しtestosterone産生を高めるが，Sertoli細胞への直接的作用は有しない．このためhCG投与による精漿中transferrin濃度の増加，すなわちSertoli細胞への作用はtestosteroneを介し作用したと考えるべきと思われる．現在のところtestosteroneが直接的にSertoli細胞へ作用し，transferrinの生成を高めることについてはin vitro実験から否定的である[17]．一方，間接作用については testosterone → peritubular cell 由来の“P-Mod-S” → transferrin産生，という図式の成り立つことが報告されている[18]．臨床的には未だこの“P-Mod-S”物質につき検討した報告はみられておらず，本症例において果たしてこのparacrine物質が関与したかどうか確証はないが，hCG投与とtransferrin濃度，および精液所見の改善に時間差を有したことは上記の様ないくつもの細胞間作用を経た結果であることが示唆される．

Skinnerらは最近，思春期後期のSertoli細胞を用いた実験から，成熟したSertoli細胞ではFSH添加を行ってもtransferrinの産生増加はみられず，“P-Mod-S”の添加によりその生成が増加するという報告[19]を行っているが，“P-Mod-S”がandrogen依存性に生成されるという事実に立てば，hMG投与が無効でhCG投与が有効であった本症例は上記のSkinnerらの報告を臨床面から支持したものと考えられる．

精巣内構成細胞の機能は最近の基礎研究の進歩により加速度的に解明されつつある．これらの研究成果は未だ臨床においては充分取り入れられていないが，乏精子症の成因にもとずいた治療を行うためには，今後これらの研究成果を臨床面において大いに活用すべきものと思われる．

文　献

1) 田中啓幹，木内弘道，酒徳治三郎，滝原博史，岩本晃明，吉田謙一郎，藤尾幸司，伊藤晴夫：精索静脈瘤の治療成績，西日泌尿，48: 1147，1986
2) 吉田謙一郎，中目康彦，金親史尚，根岸壮治，内島　豊：Organic obstructive azoospermia 11例に

対する副睾丸精管吻合術：その臨床的検討，日不妊会誌，29: 311，1984
3) 佐藤和宏，折笠精一，前原郁夫：男子不妊症における膿精液症 (pyospermia) の診断と治療について，日不妊会誌，35：568，1990
4) 吉田謙一郎，大島博幸，高木健太郎，東　四雄，安藤正夫，横川正之：Gonadotropin療法により造精機能導入に成功したKallman症候群の一例，日不妊会誌，26: 116，1981
5) 吉田謙一郎，根岸壮治：hCG投与により妊孕性を獲得したisolated LH deficiency (fertile eunuchoidism) の一例，日不妊会誌，28: 353，1983
6) 吉田謙一郎，大島博幸：男性性腺－内分泌学の現状と将来－，ホと臨，夏期増刊号: 58，1989
7) Skinner, M. K. and Griswold, M. D.: Sertoli cells synthesize and secret transferrin-like protein, J. Biol. Chem., 255: 9523, 1980
8) Yoshida, K. I., Nakame, Y., Uchijima, Y. and Saitoh, H.: Seminal Plasma transferrin concentration in normozoospermic fertile men and oligozoospermic men associated with varicocele, Int. J. Fertil., 33: 432, 1988
9) Yoshida, K. I., Uchijima, Y. and Saitoh, H.: Seminal plasma transferrin concentration in patients with idiopathic oligozoospermia, Urology, 33: 395, 1989
10) 吉田謙一郎：ヒト精漿中のtransferrin濃度についての検討，日泌尿会誌，80: 216，1990
11) Yoshida, K. I., Lanasa, J. A., Takahashi, J., Winters, S. J., Oshima, H. and Troen, P.: Studies of the human testis XVI. Evaluation of multiple indexes of testicular function in relation to advanced age, idiopathic oligospermia, or varicocele, Fertil. Steril., 38: 712, 1982
12) Holmes, S. D., Bucci, L. R., Lipshulz, L. I. and Smith, R. G.: Transferrin and gonadal dysfunction in man, Fertil. Steril., 38: 600, 1982
13) Foresta, C., Manoni, F., Businaro, V., Donadel, C., Indino, M. and Scandellari, C.: Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men, J. Androl., 7: 77, 1986
14) Morales, C., Sylvester, S. R. and Griswold, M. D.: Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo, Biol. Reprod., 37: 995, 1987
15) Holmes, S. D., Bucci, L. R., Lipshulz, L. I. and Smith, R. G.: Transferrin binds specifically to pachytene spermatocyte, Endocrinology, 113: 383, 1983
16) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy male subfertility - a review, Andrologia, 11: 77, 1979
17) Skinner, M. K. and Griswold, M. D.: Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids, Biol, Reprod., 27: 211, 1982
18) Skinner, M., K. and Fritz, I. B.: Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 114, 1985
19) Anthony, C. T., Rosselli, M. and Skinner, M. K.: Actions of testicular paracrine factor (P-Mod-S) on Sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development, Endocrinology, 129: 353, 1991

A report of successful fertilization of azoospermic patient accompanied with the increase of seminal plasma transferrin concentration by hCG treatment

Ken-ichiro Yoshida, Yutaka Uchijima
Nobuyuki Kobayashi and Hiroshi Saitoh

Department of Urology,
Saitama Medical Center of Saitama Medical School,
Saitama 350, Japan

Azoospermic patient, whose seminal plasma transferrin concentration was as low as 13 μg/ml and whose testicular histology was spermatid maturation arrest, was successfully treated with hCG treatment of weekly 3,000U for 10 times, following the failure of hMG treatment, After the completion of hCG treatment, seminal plasma transferrin concentration increased up to 40 μg/ml and not only sperm was observed in his ejaculate but the density increased up to 108×10^6/ml after 2 months of the last injection of hCG. Then, his wife got pregnant and healthy female baby was born. Longterm follow-up study revealed that sperm density was gradually decreased with the concomitant decrease of the seminal plasma transferrin concentration. The present report indicated the importance of transferrin in spermatogenesis, especially in spermatid maturation, and also suggested the presence of interactions between Leydig cell and Sertoli cell, as hCG treatment increased seminal plasma transferrin concentration.

(受付：1992年3月26日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

不妊をきたした筋緊張性ジストロフィー (Myotonic dystrophy) の1例

A Case Report of Myotonic Dystrophy with a Complaint of Infertility

神戸大学医学部泌尿器科学教室
岡田 弘　林 晃史　今西 治
Hiroshi OKADA　Akifumi HAYASHI　Osamu IMANISHI
松本 修　守殿貞夫
Osamu MATSUMOTO　Sadao KAMIDONO
Department of Urology,
Kobe University School of Medicine, Hyogo 650, Japan

筋力低下，男性不妊を主訴とする筋緊張性ジストロフィーの1例を報告した．本症例においては，骨格筋萎縮，白内障，精巣機能障害，糖尿病，筋電図上の特徴的な所見のdive bomber sound，心筋の伝導障害，特徴的な顔貌などの筋緊張性ジストロフィーに典型的なほとんどの症状を呈していた．精巣生検では大部分の精細管がSertoli cell only tubulusであったため，不妊治療としてはAIDを選択した．分子生物学の進歩にともない，本症の原因が遺伝子レベルで解明されれば，進行性に精子形成障害をきたす本疾患は無精子症の成因究明の一助になると考えられた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 161—163, 1993)

緒　言

高ゴナドトロピン性性腺機能障害をきたす遺伝疾患である筋緊張性ジストロフィーの1例を経験したので報告する．

症　例

患　者：49歳，男性
主　訴：上肢の萎縮，歩行障害と10年来の不妊
家族歴：兄3人とも挙児に恵まれていないが筋萎縮などの筋疾患を思わせるものはなく，両親は血族結婚ではない．
既往歴：37歳時より高血圧
現病歴：タクシーの運転手をしていたが1985年頃より握力の低下を自覚していたが放置していた．1989年頃より目のかすみが出現し1991年3月頃より歩行時に右膝関節および右下肢にしびれ感と運動時呼吸困難が出現してきた．神戸大学医学部附属病院内科に筋疾患の精査目的で入院し，泌尿器科へは不妊症の精査と両腎の占拠性病変の精査のため紹介された．
現　症：体格栄養状態良好．前額部から頭頂部にかけて禿頭 (26歳ごろより)．両眼ともに軽度白内障を

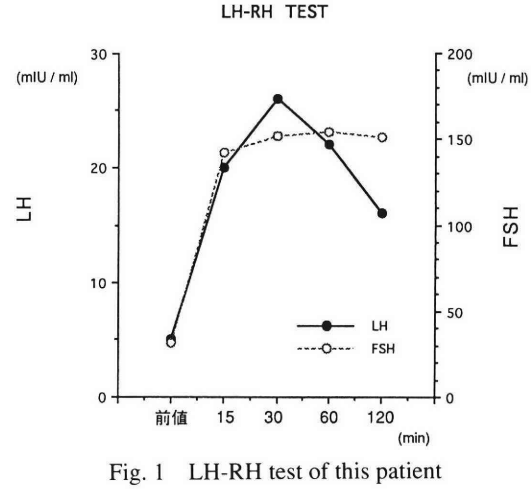


Fig. 1　LH-RH test of this patient

認めた．左右上腕から前腕にかけて萎縮があり握力の低下と母指球筋の萎縮がみられた．下肢には異常はみられなかった．外陰部では陰嚢陰茎に異常なく精巣上体，精管は正常，精巣容量も左右とも14mlと異常はなかった．

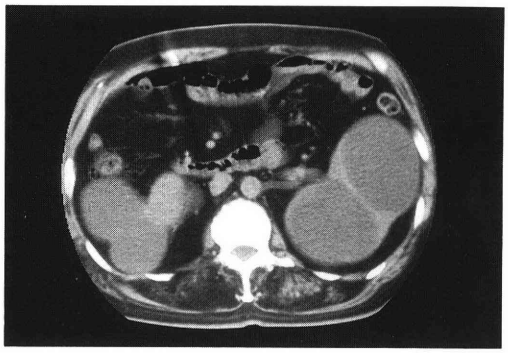


Fig. 2　Abdominal CT shows bilateral large renal cyst

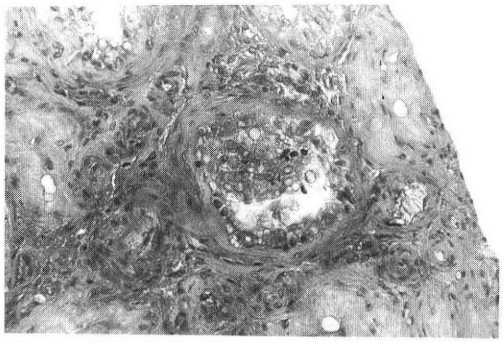


Fig. 3　Pathological section of a testicular biopsy specimen. A small amount of spermatogenesis and marked peritubular fibrosis are seen

臨床検査所見：一般検血異常なく血液生化学検査でLDH 528IU/l, CPK 506IU/l と高値であった．内分泌学的検査でFSH 26.0mlIU/ml，LH 4.1mIU/ml，PRL 10.1ng/ml，Testosterone 3.4mg/ml，コルチゾール17.7 μg/ml，尿中170H-CS 35mg/day，尿中17-KS 1.5mg/day，75g OGTTで境界型の糖尿病．LH-RHテストでFSHの反応は亢進し，LHの反応もやや亢進していた (fig. 1).

筋電図：rt M. bicepsにdive bomber soundを認めた．心電図：1 度のA-V blockを認めた．脳波：異常なし．臨床症状ならびに筋電図所見よりMyotonic dystrophyと診断された．

画像診断：胸腹部単純X-P上左右横隔膜の挙上を認めた，腹部超音波断層上右腎に直径15cm左腎に直径10cmの球型の低エコー領域を認め，腹部CTでは両側腎嚢胞と考えられた (fig. 2).

精液検査で無精子．精巣生検上大部分の精細管に精子形成を認めずほとんどがSertoli cellのみで占められており，ごく一部の精細管に極めて少数の精子を認めた．Leydig cellの増生はなくperitubular fibrosisが著明であった (fig. 3)．肺機能検査で拘束性障害を認めた．前述の腎嚢胞による圧迫がその原因と考えられたので両側経皮的腎嚢胞穿刺エタノール固定をおこなったところ，呼吸障害は軽快した．不妊症に関しては21歳時に現在の配偶者に妊娠の成立をみるも自然流産している．現状ではインポテンスの訴えもなく，挙児に関してはAIDの方針で不妊外来通院中である．

考　案

筋緊張性ジストロフィーとは進行性に全身の骨格

Table 1　Systemic involvement in myotonic dystrophy

Organ or system	Clinical
Muscle	Myotonia, Weakness, Dystrophy
Cardiac	Bradycardia, Complete A-V block*, Prolonged P-R interval
Lens	Posterior subcapsular scintillating cataract
Eye	Decreased vision (independent of cataracts and diabetic retinopathy)
CNS	Mental retardation, Hypersomnolence
Endocrine	Abnormal carbohydrate metabolism, testicular (and ovarian) atrophy
Integument	Frontal balding
Gastro-intestinal	Dysphagia, Abdominal pain
Skeretal	Cranial and facial abnormalities
Respiratory	Hypoventilation

* underlined symptoms were seen in this patient

筋の筋力低下，筋萎縮をきたす常染色体性優性遺伝疾患である．本症例では，眼症候の白内障，内分泌臓器障害の精巣機能低下および糖尿病をみとめた．また，中枢神経症候の1つである病識の欠如が著明にみられ，心電図上のA-Vブロック，横隔膜の挙上および早期頭髪脱毛など筋緊張性ジストロフィーに特徴的な症候を呈していたため診断は容易であった(Table 1)．FSH高値，LHやや高値，testosterone低値という内分泌環境や精巣生検所見も他の報告[1,2,3]と同様であった．本症は現在，全国で症例の集積がおこなわれ，その病態の解明が遺伝子レベルで進められている[4]．後天的に進行性に無精子症の成立する本症は筋ジストロフィーのジストロフィン産生遺伝子[5]と同様に原因遺伝子が明らかになれば，その遺伝子座の近傍にazoospermia producing factorとでも呼ぶべき遺伝子が存在する可能性を秘めており，男子不妊症の原因究明のbreak throughになるのではないかと考えられた．

文　献

1) Takeda, R. and Ueda, M.: Pituitary gonadal function in male patients with myotonic dystrophy-Serum lutenizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone levels and histological damage of the testis, Acta Endocr., 84: 382, 1977
2) Fetterweit, W. and Mechanick, J. I.: Myotonic dystrophy presenting as male infertility: A case report, Int. J. Fertil., 32: 142, 1987
3) 松岡幸彦：多系統疾患としての筋緊張性ジストロフィー，内科MOOK，41，88，金原出版，1989
4) 松岡幸彦：わが国の筋緊張性ジストロフィー症の臨床症候と障害度－全国アンケート調査の解析－厚生省神経疾患研究委託費筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究昭和61年度研究報告書，75，1987
5) Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Middlesworth, W., Ochs, H. D. and Latt, S. A.: Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patients with a X chromosome deletion, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 4778, 1985

A case report of myotonic dystrophy with a complaint of infertility

Hiroshi Okada, Akifumi Hayashi
Osamu Imanishi, Osamu Matsumoto
and Sadao Kamidono

Department of Urology,
Kobe University School of Medicine,
Hyogo 650, Japan

A 49-year-old male was referred from the department of internal medicine. He had developed weakness of grip and shortness of breath and he had a long term history of infertility. Physical examination revealed atrophy of his forearm muscles and frontal baldness. Electromyogram showed decreased resting membrane potential and typical 'dive bomber sound'. His serum hormonal assay showed high level of FSH and LH and low testosterone and hyperreactivity to LH-RH test.

Testicular biopsy showed that almost all the seminiferous tubli contained only Sertoli cells and few of them had small amount of spermatogenesis. He had bilateral large renal cysts and marked elevation of the diaphragm and these were corrected by the percutaneous sclerotherapy of renal cysts. Semen analysis revealed azoospermia, however, his wife had been pregrant with him when he was 21 years old and had a spontaneous abortion. Now they are under counselling to enter the AID program.

If the chromosomal deficits of this disease and its relation to the impairment of spermatogenesis were clarified with a rapid progress of molecular biology, this rare disease can be a crue to solve the etiology of azoospermia.

(受付：1992年6月19日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

停留精巣における精巣上体異常の過去23年間の臨床的検討

A Clinical Study on Epididymal Abnormalities Associated with Undescended Testis

山口大学医学部泌尿器科学教室
(主任：内藤克輔教授)

鎌田清治 Kiyoharu KAMADA
瀧原博史 Hiroshi TAKIHARA
白瀧敬 Satoshi SHIRATAKI
植野卓也 Takuya UENO
石津和彦 Kazuhiko ISHIZU
馬場良和 Yoshikazu BABA
内藤克輔 Katsusuke NAITO

Department of Urology, School of Medicine,
Yamaguchi University, Ube 755, Japan
(Director: Prof. K. Naito)

当科にて過去23年間に施行した精巣固定術症例において精巣上体の異常および鼠径ヘルニアの有無について検討した．鼠径ヘルニアはその有無について記載のあった88精巣中66精巣 (75%) に認められ，移動精巣群に比し停留精巣群で有意にその合併率が高く ($p<0.01$)，さらに停留精巣群では精巣の停留部位が高位のものに有意に高率に合併していた ($p<0.01$)．精巣上体の異常はその有無について記載のあった58精巣中16精巣 (28%) に認められ，移動精巣群に比し停留精巣群で有意にその合併率が高く ($p<0.01$)，さらに停留精巣群では精巣の停留部位が高位のものに高率に合併する傾向にあった ($p<0.1$)．鼠径ヘルニアの合併率と精巣上体異常の合併率との間には有意の関係は認められなかった．停留精巣の成因に精巣上体の異常が関与しているという報告があり，我々の検討結果はこれを示唆するものと思われた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 164—167, 1993)

緒　言

停留精巣は小児泌尿器科領域ではよくみられる先天異常の1つであるが，近年精巣上体の付着，形態異常を高率に合併することが報告されてきた[1-6]．それに伴い，停留精巣の成因および術後の造精機能における精巣上体異常の関与が示唆されるようになったが[1,2]未だ結論は出ていない．そこでこの点を臨床的に明らかにするため，今回我々は当科における過去23年間の精巣固定術施行例において精巣上体の異常と鼠径ヘルニア (腹膜鞘状突起の開存) の合併について検討したので報告する．

対象および方法

山口大学医学部附属病院泌尿器科で1968年4月より1990年10月までの23年間に精巣固定術を施行した停留精巣，移動精巣のうち鼠径ヘルニアの有無については停留精巣では確実に記載のあった88精巣，移動精巣では確実に記載のあった59精巣について検討した．また精巣上体の異常については停留精巣では確実に記載のあった58精巣，移動精巣では確実に記載のあった40精巣について検討した．精巣上体の形態異常および精巣との付着異常の分類は術中肉眼所見より角谷ら[3]に従った．鼠径ヘルニアについては術中腹膜鞘状突起を検索し，開存の有無を記載し

た．精巣の停留部位については術中所見より外鼠径輪以下の末梢側，鼠径管内，腹腔内の三つに分類した．

統計学的処理はχ^2検定およびFisherの直接確率計算法により行った．

結　果

鼠径ヘルニアの合併は停留精巣群88精巣中66精巣(75%)に認められた(表1)．移動精巣群では59精巣中8精巣(14%)にヘルニアの合併が認められ，停留精巣群の方が有意に高率に合併していた($p<0.01$，表1)．停留精巣群において精巣の停留部位別にヘルニアの合併率を比較すると，外鼠径輪以下の末梢側では60%，鼠径管内では90%，腹腔内では100%と停留部位が高位になるほど高かったが，腹腔内症例が2精巣と少ないため停留部位を外鼠径輪以下の末梢側と鼠径管以上の中枢側の二群に分けて統計学的に検定すると後者に有意に高率に合併していた($p<0.01$，表2)．

精巣上体の付着，形態異常は停留精巣群58精巣中16精巣(28%)に認められ，うち体部の遊離が8精巣(50%)と最も多く，次いで尾部の延長が5精巣(31%)，体尾部の遊離が3精巣(19%)に認められ，他の異常は認められなかった(表3)．移動精巣群では40精巣中1精巣(2.5%)にのみ精巣上体の異常が認められ，停留精巣群の方が有意に高率に合併していた($p<0.01$，表4)．停留精巣群において精巣の停留部位別に精巣上体異常の合併率を比較すると，外鼠径輪以下の末梢側では19%，鼠径管内では36%，腹腔内では50%と停留部位が高位になるほど高かったが，腹腔内症例が2精巣と少ないため停留部位を外鼠径輪以下の末梢側と鼠径管以上の中枢側の二群に分け

表1　停留精巣群および移動精巣群における鼠径ヘルニアの合併率の比較 (*Chi square test)

	移動精巣	停留精巣
ヘルニア(+)	8 (14%)	66 (75%)
ヘルニア(−)	51	22
計	59	88

*p<0.01

表2　停留精巣群において精巣の停留部位別にみた鼠径ヘルニアの合併率 (*Fisher's exact probability test)

	鼠径管外	鼠径管内	腹腔内
ヘルニア(+)	27 (60%)	37 (90%)	2 (100%)
ヘルニア(−)	18	4	0
計	45	41	2

*p<0.01

表3　停留精巣群における精巣上体異常

精巣上体の異常：58精巣中16精巣 (28%)

付着異常の内訳 (角谷らの分類[3])

体部遊離　：8精巣 (50%)

体尾部遊離　：3精巣 (19%)

尾部延長　：5精巣 (31%)

頭部遊離
完全遊離
頭部尾部遊離
頭部体部遊離　→ なし

表4　停留精巣群および移動精巣群における精巣上体異常の合併率の比較 (*Fisher's exact probability test)

	移動精巣	停留精巣
精巣上体異常(+)	1 (2.5%)	16 (28%)
精巣上体異常(−)	39	42
計	40	58

*p<0.01

表5　停留精巣群において精巣の停留部位別にみた精巣上体異常の合併率 (*Chi square test)

	鼠径管外	鼠径管内	腹腔内
精巣上体異常(+)	6 (19%)	9 (36%)	1 (50%)
精巣上体異常(−)	25	16	1
計	31	25	2

*NS (p<0.1)

表6　停留精巣群における鼠径ヘルニアと精巣上体異常との関係 (*Chi square test)

	精巣上体異常(+)	精巣上体異常(−)
ヘルニア(+)	8 (50%)	20 (48%)
ヘルニア(−)	8	22
計	16	42

*NS

て統計学的に検定すると有意差は認められないものの後者に高率に合併する傾向にあった ($p<0.1$，表5)．

停留精巣群において精巣上体異常の合併率とヘルニアの合併率を比較したが，両者に有意の関係は認められなかった (表6)．

考　察

停留精巣に合併した精巣上体の異常については1851年に初めて報告されており[7]，以後その報告例が増加し，その頻度は34～66%とされている[1-6]．我々の検討では停留精巣の28%に精巣上体の異常を認め，移動精巣における精巣上体の異常の頻度 (2.5%) よりも有意に合併率が高く，やはり精巣上体の異常は停留精巣に比較的高頻度に合併するものと思われた．我々の検討における精巣上体異常の合併率が他の報告[1-6]よりも低い理由としては術者により精巣上体異常の認識が異なっており，軽度の異常を見逃したり，記載しなかったりしたためと思われる．

精巣上体の異常と鼠径ヘルニアの関係については，精巣上体異常群に高頻度にヘルニアの合併が認められると報告されているが[4]，我々の検討では精巣の停留部位が高いほど鼠径ヘルニアの合併率が高かったものの精巣上体異常の頻度とは有意の関係は認められなかった．

精巣上体異常の報告が増加するにつれ，その意義についても検討されるようになり，現在のところ主として次のように考えられている．胎生7週で性の分化が始まり，生殖隆起髄質より精巣が分化し，胎生10週には内鼠径輪近くに位置するようになる．一方，胎生5週までに生殖隆起の外側に中腎管 (Wolf管) が発達し，胎生13週より精管，精嚢，精巣上体へと分化していき，胎生3カ月以降に精巣網と連絡する．同じ頃，精巣導帯と腹膜鞘状突起が形成される．胎生6カ月頃，まず精巣導帯が陰嚢内に下降し，引き続いて腹膜鞘状突起および精巣上体の下降がおこり，最後に精巣が下降する[8]．精巣上体異常の原因の一つとしては胎生期に何らかの原因で子宮内の胎児にluteinizing hormoneの分泌障害がおこりそのためtestosteroneの合成障害によりWolf管の分化発育異常がおこるためではないかと考えられている[9]．精巣上体が精巣下降に果たす役割としてBedford[10]は精巣下降の前に精巣上体尾部が下降することが必要としており，精巣上体に異常があれば精巣下降が障害されるのではないかと考えている．諸家の報告[1,5]では精巣上体の異常は精巣の停留部位が高くなるほど多く認められ，事実我々の検討でも有意差はないものの停留部位が高位のものに精巣上体異常の合併率が高い傾向にあった．また我々は症例数が少ないため検討していないが，精巣上体の付着，形態異常の程度も停留部位が高くなるほど高度になる傾向にあると報告されている[2]．これらの事実は精巣上体の精巣下降への関与を示唆するものと言えよう．

停留精巣の成因としては上述の精巣上体の異常の他に精巣導帯の関与が考えられている[3,11,12]．角谷ら[3]は停留精巣に高率に精巣導帯の付着異常を認めており，また男性ホルモンの標的臓器の一つとして精巣導帯が挙げられることから[12]，内分泌的な要因により精巣導帯の異常をきたし，その結果停留精巣になりうると考えている．

精巣固定術後の妊孕性については長期予後観察にてその低下がかなり認められ，特に両側固定術症例は片側固定術症例に比べ妊孕性の低下が著しいと報告されている[13,14]．我々は精巣上体の閉鎖については検討していないが，Marshallら[6]は38例中15例に精巣上体の異常を認め，うち8例に精巣上体の閉鎖を認めており，この事実が妊孕性の低下に少なからず関与しており，特に両側固定術症例において術後の妊孕性の低下が著しい理由の一つとして精巣上体の両側性の閉鎖によるのではないかという考え方もある[1]．

精巣上体異常の治療についてはMicrosurgery下に精巣上体精巣吻合術を行った報告がみられるが[15]，未だ確固とした治療が行われていないのが現状であろう．

結　語

当科での精巣固定術施行例において精巣上体の異常および鼠径ヘルニアの有無につき検討し，以下の結果を得た．

1．停留精巣における精巣上体の異常は確実に記載のあったものの28%に，鼠径ヘルニアは75%にみられた．

2．停留精巣群は移動精巣群に比べ精巣上体の異常と鼠径ヘルニアの合併率が有意に高かった．

3．停留精巣群では精巣の停留部位が高いものに鼠径ヘルニアの合併率が高く，精巣上体異常の合併率も高い傾向にあった．

4．停留精巣の成因に精巣上体の異常が関与していることが示唆された．

文　献

1) 三崎博司，臼田和正：停留睾丸における副睾丸異常について，日泌尿会誌，79: 104, 1988
2) 牧　佳男，池　紀征：停留睾丸に合併した副睾丸・精管接合異常，西日泌尿，51: 1437, 1989
3) 角谷秀典，高原正信，布施秀樹，島崎　淳：停留睾丸における睾丸導帯・副睾丸の異常，西日泌尿，50: 1853, 1988
4) Mininberg, D. T. and Schlossberg, S.: The role of the epididymis in testicular descent, J. Urol., 129: 1207, 1983
5) 高橋　章，沖永功太，和田信明，吉沢康男，駿河敬次郎：睾丸・副睾丸接合異常，日小児外科会誌，17: 1067, 1981
6) Marshall, F. F. and Shermeta, D. W.: Epididymal abnormalities associated with undescended testis, J. Urol., 121: 341, 1979
7) Dean, A. L. Jr., Major, J. W. and Ottenheimer, E. J.: Failure of fusion of the testis and epididymis, J. Urol., 68: 754, 1952
8) 加藤哲郎：副睾丸，精管の先天異常，新臨床泌尿器科全書，3B，150，金原出版，1984
9) Walsh, P. C.: Plasma androgen response to h-CG stimulation in prepubertal boys with hypospadias and cryptorchidism, J. Clin. and Metb., 42: 52, 1976
10) Bedford, J. M.: Anatomical evidence for the epididymis as the prime mover in the evolution of the scrotum, Am. J. Anat., 152: 483, 1978
11) 和久正良：停留睾丸の研究，日泌尿会誌，48: 149, 1957
12) Elder, J. S., Isaacs, J. T. and Walsh, P. C.: Androgenic sensitivity of the gubernaculum testis: evidence for hormonal/mechanical interactions in testicular descent, J. Urol., 127: 170, 1982
13) 瀧原博史，馬場良和，酒徳治三郎：停留睾丸の治療成績，思春期学，4: 117, 1986
14) 瀧原博史，鎌田清治，植野卓也，石津和彦，馬場良和，酒徳治三郎：停留精巣固定術の思春期以後における長期追跡調査成績，西日泌尿，53: 613, 1991
15) 土屋博之，長島金二，川満富裕，杉山直史，小笠原忠彦：停留睾丸に合併する副睾丸形態異常の治療の検討，小児外科，20: 865, 1988

A Clinical study on epididymal abnormalities associated with undescended testis

Kiyoharu Kamada, Hiroshi Takihara
Satoshi Shirataki, Takuya Ueno
Kazuhiko Ishizu, Yoshikazu Baba
and Katsusuke Naito

Department of Urology, School of Medicine,
Yamaguchi University, Ube 755, Japan
(Director: Prof. K. Naito)

Epididymal abnormalities and inguinal hernias associated with undescended testis were reviewed in the last 23 years. Of the 88 undescended testes, 66 (75%) were confirmed to be associated with the inguinal hernias. The incidence of the inguinal hernia associated with undescended testis was significantly higher than that with migratory testis ($p<0.01$). Among undescended testes, the group with higher located testes showed significantly high incidence of associated inguinal hernias ($p<0.01$). Of the 58 undescended testes, 16 (28%) were confirmed to be associated with the epididymal abnormalities. The incidence of the epididymal abnormality with undescended testis was significantly higher than that with migratory testis ($p<0.01$). Among undescended testes the group with higher located testes tended to show higher incidence of associated epididymal abnormalities ($p<0.1$). There was no correlation between the incidence of hernias and that of epididymal abnormalities in undescended testes. These results might imply that there would be some cause-and-effect relationship between the associated epididymal abnormalities and the pathogenesis of undescended testis.

(受付：1992年5月14日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

EXPERIMENTAL MODELS FOR THE STUDY OF VARICOCELE: A SELECTED REVIEW

Nikolaos SOFIKITIS and Ikuo MIYAGAWA

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

Abstract: Creating experimental varicoceles in Wistar rats by partly occluding the left renal vein and ligating the collateral vein between the left testicular vein and the left common iliac vein, it was proven that drugs which increase the testosterone synthesis in the testis (human chorionic gonadotropin, clomiphene citrate, and indomethacin) or improve the blood supply of the testis (kallikrein) are effective in improving sperm parameters. Additionally, it was found that secondary right varicocele in rats with a primary left varicocele is a constant finding and not an occasional one, Surgical repair of secondary right varicocele in rats with a primary left varicocele improved the function of the right testis. We postulate that a secondary right varicocele contributes to the development of right testicular lesion observed in left varicocele subjects. Left adrenalectomy in rats with left varicocele did not inhibit the development of varicocele-related alterations, suggesting that retrograde flow of adrenal metabolites via the left testicular vein is not important for the pathophysiology of varicocele. Varicoceles were created in rabbits by partly ligating the left lumbotesticular trunk.

A defect in glucose metabolism preceding the stage of pyruvate formation was proven in the varicocelized testis. Human chorionic gonadotropin or clomiphene citrate stimulation restored that metabolic defect. Our findings are compared with those from other laboratories.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 168—177, 1993)

Definition

Varicocele is abnorml dilation of either the pampiniform or cremasterium venous plexus of the testis. The venous return from the testis classically is described as including the testicular, cremasteric, and vasal veins, and venography or anatomical studies demonstrate an even more extensive network[1]. The left testicular vein (LTV; internal spermatic vein) opens into the left renal vein. The cremasteric vein (external spermatic vein) empties into the inferior epigastric vein near the termination of the latter at the femoral vein. The vasal veins empty via the vesical veins into the internal iliac vein.

Frequency

Varicocele occurs in 10-20% of the general population[1]. Unilateral varicocele occurs on the left side in about 90% of the patients, while the remainder have bilateral lesions or, rarely, a unilateral varicocele on the right side. The cause for the high proportion of unilateral varicocele on the left side is that the LTV runs vertically in an upright man and inserts into the left renal vein at a right angle, whereas the right vein runs tangentially to insert into the inferior vena cava.

Etiology

1. The smooth muscle fibers in the tunica media of the wall of the LTV are not well developed and sometimes absent. Performing 49 autopsies in our laboratory we found absence of smooth muscle fibers in the LTV wall in four cases[2]. We also found that valves

were absent in 37% of the LTVs examined post portem. When we evaluated the competence of the valves of the LTV it was demonstrated that in approximately 30% the present valves were incompetent[2]. Our study confirmed previous findings of Ahlberg and co-wokers who found that valves were absent in 40% of the LTVs examined post mortem[3]. Absent or incompetent valves may be an important contributor to the development of varicocele since man's upright posture may couse an increase in the pressure of LTV when valves are incompetent, thus, leading to vessel distension and dilation.

2. Compression of the left renal vein between the superior mesenteric artery and the aorta (nutcracker phenomenon) increases the intravenous pressure in the left renal vein and LTV leading to dilation of the LTV and establishment of varicocele.

3. Contractions of the LTV due to action of catecholamines[4] produced in the left adrenal gland and drained into the left renal vein via the left adrenal vein. Such contractions of the LTV may increase the pressure in the LTV causing retrograde blood flow within it. However, such contractions in the LTV have never been proven during venography.

4. Renal or retroperitoneal tumors exerting pressure on the LTV or on the renal vein may lead to varicocele development. Therefore, in varicoceles in males less than five year old, the left kindey must be examined by an ultrasound scan.

Varicocele and infertility

Varicocele has been considered to be responsible for 30-40% of male infertility cases[1]. There are many theories proposed to explain the detrimental effect of varicocele on fertility.

1. Elevation of testicular temperature

Increase in testicular temperature leads to a damage in spermatogenesis in human and other animals. Retrograde blood flow via LTV may affect the physiologic counter-current heat exchange system in the pampiniform plexus. It was proven[1] that intratesticular temperatures are increased in varicocelized testicles.

In our laboratory[5-11], we proved that the testicular versus intraabdominal temperature difference decreases in varicocelized rats and rabbits. The increase in testicular temperature in varicocelized subjects is bilateral, fact that explains the bilateral testicular damage.

2. Insufficiency of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis

Weiss and Rodriguez-Rigau[12] found that in vivo testosterone synthesis by biopsies of testes with varicocele was significantly less than in testes free of varicocele. However, these studies lack appropriate controls. On the other hand, there are many studies indicating that LH, FSH, and testosterone levels in peripheral serum of varicocele patients are within normal values[1]. However, peripheral androgen levels are not good indicators of Leydig cell function[13], because they fail to indicate delicate changes in androgen synthesis.

Rajfer and co-workers found that a decrease in intratesticular testosterone concentration occurs in varicocelized rats suggesting that Leydig cell dysfunction[14] develops. Furthermore, we proved that there are significantly less testosterone levels in blood aspirated from the LTV in varicocelized rabbits than in control rabbits[7]. Low intratesticular testosterone concentrations might be resposible for the impaired spermatogenesis observed in varicocelized subjects.

3. Low oxygen pressure in the testis

It has been presumed that dilation of the LTV with retrograde blood flow from the renal vein may result in testicular venous stasis which, in turn may exert detrimental effects on spermatogenesis[1]. However, when the role of testicular hypoxia in varicocele was examined no differences were found in oxygen pressure or carbon dioxide pressure in blood from testicular vein when compared to peripheral vein values from the same patients[1]. In addition, we excluded the probability of testicular hypoxia in varicocelized rabbits by measuring the levels of pyruvate and lactate in LTV blood[7].

4. A metabolic defect in the varicocelired testis

We reported that there is a metabolic defect in the varicocelized testis preceding the stage of pyruvate formation [7]. We found that pyruvate and lactate concentrations in blood aspirated from the LTV in varicocelized animals are significantly lower than in control animals.

5. Retrograde flow of adrenal or renal metabolites

down the spermatic vein

Javert and Clark suggested that retrograde blood flow occurs in men with varicocele[15]. Mac Leod presented venographic evidence of this phenomenon[16]. However, a summary of available evidence in the human does not allow the unequivocal acceptance of the theory that retrograde blood flow is an important aspect of the varicocele lesion[1]. Comhaire and Kunnen[4] presented venographic evidence that vascular anastomoses exist beween the left and right spermatic veins and they claimed that refluxing metabolites cause a bilateral antispermatogenic effect. However, close examination of venography films does not present convincing evidence of cross-anastomoses, which will affect the contralateral testis. Additionally, we proved that left adrenalectomy in varicocelized rats does not inhibit the development of varicocele-related physiologic alterations suggesting that retrograde flow of adrenal metabolites via the LTV cannot be important in varicocele pathophysiology [9]. Furthermore, we recently created an experimental varicocele model in the rabbit and we confirmed the varicocele related alterations which had been established in other experimental animals[6-7]. However, in the rabbit the LTV does not drain into the renal vein, but it empties into the left lumbotesticular trunk which collects blood mainly from the retroperitoneal wall. It appears that the role of adrenal or renal metabolites in the development of infertility in the varicocelized rabbit is disputable. Contrary, other investigators found increased catecholamines in LTV blood than in peripheral blood in patients with varicocele[1]. Renin concentrations might be expected to be elevated if renal vein blood was refluxing down the LTV to any significant degree, yet Lindholmer and co-workers found no difference between renin concentrations, and peripheral blood and spermatic vein blood in men with varicocele[16]. Ito and co-workers concluded that reflux of renal vein blood down the spermatic vein caused elevated prostaglandin (PGE and PGF) concentrations in spermatic vein blood of varicocele patients[17]. Prostaglandins may impair spermatogenesis by one of the following three mechanisms[17]: a) direct inhibition of spermatogenesis, b) decreased testicular blood flow, c) effect on sperm maturation. These authors found no elevation of spermatic vein cortisol concentrations and, thus, take the position that adrenal metabolites do not reflux but renal metabolites do. Another substance which was considered to be responsible for the development of the detrimental effect of left varicocele on fertility is serotonin.

Increased concentrations of serotonin were found in LTV blood in varicocele patients[1]. Serotonin may impair spermatogenesis due to alterations in the metabolism of androgens or due to its action on the testicular vasculature resulting in spermatozoal sloughing.

Classification of varicocele (Degrees of varicocele)

There are many attempts to grade varicocele. In Tottori University we use the following classification: 1st degree-palpable varicocele but not visible, 2nd degree-palpable and visible varicocele, and 3rd degree-venous mass which fullfils the scrotum.

Diagnosis of varicocele

The diagnosis of varicocele is usually established by scrotal palpation after increase in the intraabdominal pressure. There is a feeling of "a bag with worms" during palpation of the dilated veins. Venography, thermography, and the Doppler stethoscope are used to improve the accuracy of diagnosing small varicoceles and to identify subclinical internal spermatic vein reflux.

Semen parameters and testicular biopsies in varicocele patients

Mac Leod described changes in seminal parameters in varicocele patients. His studies and many other studies showed at least one abnormal seminal parameter in men with varicocele.

It is suggested that both spermatogenesis and sperm maturation processes are disturbed in men with varicocele.

The testicular biopsy profile of the varicocele patient seems to involve the elements of premature sloughing of immature germinal cells, tubular thickening, Leydig cell hyperplasia or hypoplasia, maturation arrest and decreased spermatogenesis, either singly or in any combination. Testicular biopsy for routine varicoceles other than as a research tool is probably of limited benefit.

In our laboratory, we evaluated the total acrosin activity of spermatozoa pooled from fertile donors and from varicocele patients.

Significantly lower values were found in men with varicocele than in fertile donors. Considering the great importance of acrosin for acrosome reaction, and sperm penetration and binding to the zona pellucida, lower acrosin profiles in men with varicocele may contribute to their lower capacity for fertilization.

Children and varicocele

Puberty appears earlier in children with varicocele. These children are taller than those of the same age. It is remarkable that varicocele is absent among fat children. Perhaps obesity due to anatomical and hormonal factors prevents the development of varicocele. Children with varicocele have much stress and they are anxious about their fertility and sexual behavior in the future. Twenty-five boys with varicocele visiting our department had body weight within normal values.

Mysteries of varicocele

1. Although varicocele is a left testicular lesion, there is a bilateral defect in spermatogenesis. To explain the bilateral response in a unilateral varicocele lesion it was supposed that there are anastomoses between the left and right testicular venous system.

However, such anastomoses were proven to exist beween the superficial testicular venous systems. If there are no anastomoses in the deep veins beween the left and the right testis, no theory can attribute the bilateral effect of a left varicocele on spermatogenesis to a retrograde flow of renal or adrenal metabolites. We proved that secondary right varicocele in animals with a primary left varicocele is a common finding and not an occasional one[7, 11] suggesting that a secondary right varicocele due to a primary left varicocele may contribute to the development of right testicular damage in left varicocele subjects.

2. Some varicocele patients show abnormal one, two, or three parameters of their spermodiagrams whereas there are many men with varicocele showing normal semen parameters.

3. Some men with varicocele and low sperm quality improve one, two, or three parameters of their spermodiagrams postoperatively, whereas others do no show any changes.

Treatment of varicocele

A. Conservative treatment

Human chorionic gonadotropin (hCG) administration for stimulation of the Leydig cell function has been often used for the treatment of varicocele especially when infertility remains after surgical treatment. There are many studies showing improvement in sperm concentration and/or sperm motility after hCG administration in varicocele patients[18]. HCG is sometimes combind with human menopausal gonadotropin (hMG) for simultaneous stimulation of the Sertoli cell function, since it is well known that there is a dysfunction of the Sertoli cell in varicocele patients[19]. In addition, the development of secretory dysfunction of the Sertoli cell[20] after an increase in testicular temperature supports the administration of hMG in varicocele patients. Kallikrein has been reported to have beneficial effects on spermatogenesis in varicocele patients probably due to its vasodilating action [19]. In our laboratory we proved that administration of hCG, kallikrein, indomethacin, or clomiphene citrate has beneficial effects on spermatogenesis in varicocelized rats[8, 21]. HCG plus kallikrein administration was proven to be the most effective treatment. However, the results of the various conservative treatments applied in the varicocelized rats were always inferior to those of surgical treatments. Furthermore, we proved that hCG or clomiphene administration are effective in improving sperm parameters and restoring the metabolism of the varicocelized testis in the rabbit.

B. Surgical treatment

The purpose of every surgical procedure is to reduce the increased pressure in the pampiniform or the cremasterium plexus.

1. Ivanissevitch operation

An incision of 6 cm is performed in the middle third of the inguinal cacal. The aponeurosis is freed and opened over a similar length. Introducing the middle-finger towards the inner inguinal canal easily localizes the transverse muscle that can be elevated with a retractor, exposing the spermatic cord. Opening of the cord allows spermatic veins to extrude easily. The plexus pampiniform is then transected, divided ,and ligated. Improvement in sperm parameters after the Ivanissevitch procedure was reported by many investigators[22].

2. Palomo operation

It follows the same principle but is performed at a higher level and consists of freeing the spermatic vein retroperitoneally by an incision at the level of the iliac crest. It offers the advantage of being above the pampiniform plexus and thus in a better position to ligate the total venus testicular circulation. Improvement of sperm parameters was reported after the Palomo surgical procedure by many authors[22]. We proved that the retroperitoneal ligation of the LTV improves sperm parameters in varicocelized rats and rabbits[6, 8]. The Palomo operation is more popular than the Ivanissevitch operation because the LTV and the internal spermaic artery are better visualized in the retroperitoneal area than in the inguinal canal or in the scrotum and therefore it is easier to avoid injuring them. If the internal spermatic artery becomes injured, the presence of the external spermatic artery and the vasal arteries do not guarantee the normal nutrition of the testis. We found that although the diameter of the internal spermatic artery is more or less stable (0.7-1.1.mm), the diameters of the cremasterium and vasal arteries show a remarkable variation (0.1-1.0mm and 0.1-0.7mm, respectively). However, in some cases the inguinal approach of the LTV seems to be mandatory. In extreme obesity the retroperitoneal approach is difficult. Studies in our laboratory have shown the presence of more than one LTV in the lumbar level[2] indicating the necessity for attentive identification of all the testicular veins during the Palomo operation for the treatment of varicocele. The results of that study also indicate the necessity for venography before Palomo operation. It was found that in 20% of a big number of varicoceles there was dilaton of the veins of the cremasterium plexus and not of the pampiniform plexus[23]. These varicoceles can be dealt with only through an inguinal approach.

To avoid injury of the internal spermatic artery during the inguinal approch the usage of Doppler is advised. When it is difficult to recognize the left internal spermatic artery by palpation, the inguinal vessels can be selectively evaluated under Doppler control.

Doppler control of varicocelectomy is essential if there is difficulty in identifying the internal spermatic artery, a finding that could apply not only to inguinal varicocelectomy but also to the suprainguinal approach.

3. By-pass procedures

The LTV is doubly ligated, resected and the peripheral segment is anastomosed with the femoral vein or with the saphenous vein. This new precedure offers a new pathway for the testicular venous drainage and is followed by an improvement in sperm parameters[24].

C. Percutaneous occlusion of the internal spermatic vein

It is an alternative to surgery. The spermatic vein can be occluded with sclerosing solutions, steel coils, or baloon catheters.

Percutaneous sclerotherapy is technically feasible in about 80% of patients with midiopathic varicocele. Persistence must be reckoned within 3-5% of the cases. Sclerotherapy is a low-risk technique which can be applied on an outpatient basis in the vast majority of cases. In about 40% of the cases an improvement in fertility can be attained by raising the spermatozoal density and the total motility. Morphology of the spermatozoa can only be slightly improved by this therapy[25].

Percutaneous sclerotherapy is to be recommended as an alternative to surgery since it provides equally good results, is cheaper and causes hardly any complications. Embolization with hot contrast material is easily performed without special embolization devices and is proven to be safe and effective technique. Recently, embolization devices are proven to be safe and effective technique. Recently embolization of the spermatic vein has been applied to avoid the complications of surgery.

Additionally, it permits,the treatment of varicocele patients on an out-patient basis. Embolization of the spermatic vein is carried on by injection of iso-buty1-2 zyano acrylat. Catheterization starting in the right femoral vein allows the surgeon to bring the catheter into the LTV under radioscopic control. The procedure is similar to the retrograde venography so that diagnosis and immediate therapy by embolization can be combined. Nowadays several devices have been applied to obliterate the LTV. Smith performed spermatic venography with hot contrast material in 81 patients with varicoceles and inferility. Long-term follow-up information was available in 91% of the patients and there was an overall conception rate of 40.5%[22].

Netto Junior[25] compared the spermograms of varicocele patients who received medical treatment to the spermograms of men with varicoceles who underwent surgical treatment. The spermograms of all the patients reported sperm counts, percentage of motile sperm, and percentage of morphologically normal spermatozoa, before treatment and after it.

The results showed that there was an improvement in all the spermogram parameters in both groups. Except for one variable all the others failed to show a significant difference by statistical analysis between both treatments, however the surgical treatment resulted in higher values when compared to the medical one. Pregnancy rate, while higher for the surgical group was not significantly different in both groups. In our laboratory creating varicoceles in rats, it was proven that surgical treatment of varicocele was superior to each of the conservative treatments applied[8].

D. Laparoscopic ligation of internal spermatic veins

Mehan and co-workers recently reported that varicoceles can be precisely isolated and ligated through the laparoscope with avoidance of any arterial injury[26].

Varicocelectomy and improvement of sperm quality

There are many studies demonstrating significant improvement in one or more sperm parameters after conservative or surgical treatment of varicocele. However, increases in pregnancy rates after such treatments are not sighificant[22, 25]. Macomber and Sanders were among the earliest to report favorable results following varicocelectomy[22].

Brown reported that semen quality improved in a meaningful manner in 58% of men undergone varicocelectomy[25]. The effect of varicocelectomy on semen quality and pregnancy rates in various andrology centers is shown in Table 1. Despite the proven effectiveness of varicocelectomy, certain inconsistencies continue to exist. Varicoceles are admittedly not uniformly detrimental. Many men with varicoceles are fertile.

Those men with varicoceles who remain fertile in all likelihood would have even better sperm quality without their varicoceles. Additionally, these same fertile men may at a later age, when they are no longer desirous of offspring, unknowningly be rendered infertile.

Varicocelectomy is not always beneficial. This failure may be attributed to an irreversible testicular damage or to dilation of the cremasterium plexus. In the latter case high LTV ligation can not be benificial. Therefore, venography is necessary before varicocelectomy to indicate whether the varicoses concern the pampiniform plexus, the cremasterium plexus, or the vasal veins.

Such an identification may be done with inguinal surgical approach.

Many authors suggest that the clinical degree of varicocele has no relation to the degree of impairment of spermatogenesis.

Contraindications for surgical treatment of varicocele

Contraindications for surgery are an abnormal karyotype, an elevated FSH, and occurrence of cryptorchidism in the anamnesis. Other contraindications are age over 40 years and of course general poor health.

The value of right varicocelectomy in patients with left varicocele

Table 1 Alterations in semen quality and pregnancy rate after varicocelectomy in various andrology centers.

Investigator	n	% improved semen quality	Pregnancy rate
Tulloch[35]	30	66	30
Hanley[36]	60	70	30
Mac Leod[37]	77	74	42
Brown[38]	251	58	41
Dubin[39]	986	70	53
Cockett[40]	56	-	25

A clinical important question is what the incidence of bilateral varicocele is. Some authors claim that bilateral varicoceles are very common, although historically it has been felt they were very uncommon. Chatel and co-workers demonstrated right -sides reflux in 60% of 76 men with a clinical left varicocele[27]. Amelar and Dubin claimed that selected infertile patients who failed to improve after left varicocelectomy and are found subsequently to have a right varicocele may yet improve following correction of the right varicocele[28]. We recently reported that right varicocele in rats with left varicocele is a common finding and contributes to the development of the detrimental effect of left varicocele on the right testis. In that study, we proved that right varicocelectomy in rats with a primary left varicocele improves the fertilizing capacity of spermatozoa received from the right epididymis[11, 32].

Furthermore, we extended the above observations in rabbits by proving that right varicocelectomy improves sperm parameters in rabbits with left varicocele [5]. Therefore, we suggest that right varicocelectomy may be an alternative solution in patients with left varicocele who remained infertile after left varicocelectomy.

Experimental varicocele models

Concerning that research in human is sometimes limited due to moral barriers, many investigators created experimental varicoceles in rats, dogs, rabbits, and monkeys and studied the development of varicocele-related physiologic alterations[29-31]. Increase in testicular temperature bilaterally, defects in spermatogenesis and sperm maturation, changes in testicular blood flow were proven in varicocelized animals. Many new theories regarding the pathophysiology of varicocele were established in varicocelized animals proving their utility for the study of varicocele.

Sexual behavior and varicocele

There are no reports describing changes in sexual behavior in men with varicocele. In our laboratory, we did not find any significant differences in the number of mounts and intromissions before ejaculation during sexual intercourse between varicocelized rats and control rats[33].

Testicular volume and varicocele

There is much controversy concerning changes in testicular volume in patients with varicocele. There are many reports indicating significant decreases in left tesicular volume in men with varicoceles, whereas other authors present opposite results [22].

Furthermore, same controversy exists in varicocelized animal models. Studies in University of Virginia, USA[1] and Yamaguchi University, Japan[34] did not show any effects of left varicocele on testicular weight, whereas in our laboratory we proved that a significant decrease in bilateral testicular weight occurs three months after creation of left varicocele in the rat[32] and five months after varicocele induction in the rabbit[7].

These differences may be explained by the different experimental periods used, the different species used, and the different surgical procedures applied for varicocele creation.

Nowadays varicocele is the most frequent cause of male infertility.

However, there are many unkown subjects in the pathophysiology of varicocele. Hopefully clinical and experimental research will illustrate the dark points of this enigma-disease.

References

1) Turnel, T. T.: Varicoceles: still an enigma, J. Urol., 129: 695, 1983
2) Sofikitis, N., Dritsas, k., Koutselinis, A., Agapitos, E., Miyagawa, I. and Kakulakis, A.: Variations in the anatomic characteristics of the left testicular venous system. Presented at the 47h Annual Meeting of the American Fertility Society, in Orlando, Florida, October 21 to 24, 1991, published by the American Fertility Society, in the program supplement, p 26, 1991
3) Ahlberg, N. E., Bartley, O. and Chidekel, N.: Retrograde contrast filling of the left gonadal vein:a roentgenologic and anatomical study, Acta Rad. Diagn., 3: 385, 1965
4) Comhaire, F. and Kunnen, A.: Varicocele sterility: Cortisol and catecholamines, Fertil. Steril., 25: 28, 1974
5) Sofikitis, N., Takahashi, C., Nakamura, I. and Miyagawa, I.: Lightion of right testicular vein

improves sperm parameters in rabbits with left varicocele. Presented at the 7th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, in Paris, France, June 28 to 30, 1991, Published by the European Society of Human Reproduction and Embryology, in the supplement of Human Reproduction, p 98, 1991

6) Sofikitis, N., Takahashi, C., Nakamura, I., Shimamoto, T. and Miyagawa, I.: Repair of experimental varicocele in the rabbit. Presented at the 46th Annual Meeting of the American Fertility Society, in Washington D. C., October 15 to 18, 1990, Published by the American Fertility Society, in the program supplement p 63, 1990
7) Sofikitis, N., Nakamura, I. and Miyagawa, I.: Clomiphene citrate or human chorinic gonadotropin administration is effective in improving sperm parameters in varicocelized rabbits. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Fertility Society, in Orlando, Florida, October 21 to 24, 1991, Published by the American Fertility Society, in the program supplement p 104, 1991
8) Sofikitis, N., Takahashi, C., Okazaki, T., Kadowaki, H., Nakamura, I., Shimamoto, T., Saeki, H. and Miyagawa, I.: Medical treatment versus surgical repair of experimental varicocele in rats. Presented at the 46 th Annual Meeting of the American Fertility Society, in Washington D. C., October 15 to 18, 1990, Published by the American Fertility Society, in the program supplement, p 136, 1990
9) Sofikitis, N., Takahashi, C., Nakamura, I. and Miyagawa, I.: The importance of retrograde adrenal metabolite flow on testicular function in rats with left varicocele. Presented at the 7th World Congress on IN Vitro Fertilization and Assisted Procreations, in Paris, France, June 30 to July 3, 1991, Published in the supplement of Human Reproduction, p 322, 1991
10) Sofikitis, N., Nakamura, I. and Miyagawa, I.: The effect of clomiphene citrate on spermatogenes is and sperm maturation in varicocelized rats, Jpn. J. Fertil. Steril., 36: 859, 1991
11) Sofikitis, N., Takahashi, C., Nakamura, I., Hirakawa, S. and Miyagawa, I.: Dilation of the right testicular vein in rats with left varicocele. Presented at the 16th Annual Meeting of the American Society of Andrology, in Montreal, Canada, April 27 to 30, 1991, Published by the American Society of Andrology in the program supplement p33, 1991
12) Weiss, D. B., Rodriguez-Rigau, L. J., Smith, K. D. and Steinberger, E.: Leydig cell function in oligospermic men with varicocele, J. Urol., 120: 427, 1978
13) Steinberger, E. and Steinberger, A.: The testis; basic and clinical aspects. In Reproductive-Biology, Edited by H. Balin and S. Glasser, Excerpta Medica, p 144, 1972
14) Rajfer, J., Turner, T. T., Rivera, S. S. and Sicca, S. C.: inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats, Biol. Reprod., 36: 933, 1987
15) Javert, C. T. and Clark, R. L. Jr.: Combined operation for varicocele and inguinal hernia; preliminary report, Surg. Gynec. and Obst., 79: 644, 1944
16) Lindholmer, C., Thulin, L. and Elliason, R.: Concentrations of cortisol and renin in the internal spermatic vein of men with varicocele, Andrologia, 5: 21, 1973
17) Ito, H., Fuse, H., Minagawa, H., Kawamura, K., Murakami, M. and Shimazaki, J.: Internal spermatic vein prostagladins in varicocele patients, Fertil. Steril., 37: 218, 1982
18) Mehan, D. and Chahval, M. J.: Human chorionic gonadotropin in the treatment of the infertile men, J. Urol., 128: 60, 1982
19) Shinoda, M.: A pharamacological manipulation of testicular function for rational therapeutic approach to male infertility: Experimental and clinical data, Keio J. Med., 34: 31, 1985
20) Sofikitis, N. and Miyagawa, I.: Effect of testicular temperature on Leydig and Sertoli cells function, Jpn. J. Fertil. Steril., 36: 1117, 1991
21) Sofikitis, N., Nakamura, I. and Miyagawa, I.: Indomethacin is effective in improving sperm parameters in varicocelized rabbits. Pressented at the thertienth National Scientific Conference of The Australian Society for Medical Research in Canberra, Australia, December 15 to 18 1991, Published by The Australian Society for Medical Research in the Program Supplement, p 56, 1991
22) Schoysman, R.: Surgical treatment of male infertility. In Infertility Male and Female, by V. Insler and B. Lunenfeld., Churchill Livingstone, p 574, 1986
23) Hanley, H. G. and Harrison, R. G.: Nature and surgical treatment of varicocele, Br. J. Surg., 50: 64, 1982
24) Ishigami, K., Yoshimi, Y., Horooka, M. and Mohri, K.: A new opertion for varicocele: Use

of microvascular anastomosis, Surgery, 67: 620, 1970
25) Sherings, R. J. and Howards, S. S.: Male infertility. In Campbell's Urology, Edited by P. C. Walsh, R. F. Gittes, A. D. Perlmutter, and T. A. Stamey, W. B., Saunders Company, p 640, 1986
26) Mehan, D. J., Hagood, P., Andrus, C. and Parra, R.: Laparoscopic ligation of internal spermatic veins. A new surgical approach to the correction of varicocele. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Fertility Society, in Orlando, Florida, October 21 to 24, 1991, Published by the American Fertility Society, in the program supplement p 25, 1991
27) Chatel, A., Bigot, J. M., Helenon, C. H., Dectot, H., Rotman, J. and Salat-Baroux, J.: Interet de la phlebographie spermatique dans le diagnostic des sterilites d'orgine circulatoire (varicocele). Comparison avec les donnees cliniques thermographieques et anatomiques, Ann. Radiol. (Paris), 21: 565, 1978
28) Amelar, R. D. and Dubin, L.: Right varicocelectomy in selected infertile patients who have failed to improve after privious left varicocelectmoy, Fertil. Steril., 47: 833, 1987
29) Al-Juburi, A., Pranikoff, K., Dougherty, K. A., Urry, R. L. and Cockett, A. T. K.: Alterations of semen quality in dogs after creation of varicocele, Urology, 13: 535, 1979
30) Green, K. F., Turner, T. T. and Howard, S. S.: Varicocele: Reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair, J. Urol., 131: 1208, 1984
31) Harrison, R. M., Lewis, R. W. and Roberts, J. A.: Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular changes, Fertil. Steril., 46: 500, 1986
32) Sofikitis, N., Takahashi, C., Nakamura, I., Hirakawa, S. and Miyagawa, I.: Effect of surgical repair of secondary right varicocele in rats with primary left varicocele on testicular temperature, spermatogenesis, and sperm maturation, Arch. Androl., 28:43, 1991
33) Sofikitis, N., Nakamura, I. and Miyagawa, I.: Sexual behavior in varicocelized rats, Nishi Nihon J. Urol., 54: 315, 1992
34) Takihara, H., Ishizu, K., Ueno, T., Isoyama, R., Baba, Y. and Sakatoku, J.: Pathogenesis of varicocele: experimental study using flow cytometric DNA analysis, Andrologia, 22: 137, 1990
35) Tulloch, W. S.: Varicocele in subfertility: results of treatment, Br. Med. J., 59: 29, 1955
36) Hanley, H. G. and Harrison, R. G.: Nature and surgical treatment of varicocele, Br. J. Surg, 50: 64, 1962
37) Mac-Leod, J.: Seminal cytology in the presence of varicocel. Fertil. Steril., 16: 735, 1965
38) Brown, J. S.: Varicocelectomy in the subfertile male: a ten-year experience with 295 cases, Fertil. Steril., 27: 1046, 1976
39) Dubin, L. and Amelar, R. D.: Etiologic factors in 1,249 consequtive cases of male infertility, Fertil. Steril., 22: 469, 1971
40) Cockett, A. T. K., Urry, R. L. and Dougherty, K. A.: The varicocele and semen characteristics, J. Urol., 121: 435, 1979

当科における精索静脈瘤の動物実験モデルの総合的検討

鳥取大学医学部泌尿器科
ニコラオス・ソフィキティス　宮川征男

Wistar系ラットにおいて，左腎静脈の部分結紮及び，左精巣静脈と左総腸骨静脈間の側副静脈を結紮することにより，精索静脈瘤の実験モデルを作製した．testosterone合成を促進する薬剤 (hCG，クロミフェン，インドメサシン) や精巣血流を改善する薬剤 (カリクレイン) は精液所見を改善した．さらに，原発性左精索静脈瘤には恒常的に二次的な右精索静脈瘤が発症し，続発性右精索静脈瘤の外科的修復は，右精巣の機能を改善することが確認された．この結果より，左精索静脈瘤の際の右精巣機能の障害は二次的な右精索静脈瘤の発症に起因するものと思われた．左精索静脈瘤を有するラットに左副腎切除を行っても，精索静脈瘤に付随する変化を阻止できなかったことから，左精巣静脈を介した副腎の代謝物の逆流は精索静脈瘤の病態生理学に関与しないことが示唆された．

また左腰精巣静脈の部分結紮により，ウサギ精索静脈瘤モデルを作製した．精索静脈瘤に罹患した精巣では，ピルビン酸形成に先行するグルコース代謝が障害されており，hCGまたはクロミフェンはこれを回復させた．

以上，現在までの我々の実験結果を文献的に比較考察した．

(受付：1991年12月2日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON ACTIN AND CYTOKERATIN IN MOUSE EMBRYOS IN THE COURSE OF BLASTOCYST FORMATION

Ikuko YOTSUTANI

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

Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

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

Abstract: In order to examine the changes in cytoskeletal proteins in the blastomeres during blastocyst formation, histochemical detection of actin and cytokeratin was performed using mouse embryos from the 8-cell to blastocyst stages. Fluorescence showing the presence of phallacidin-reactive actin was bright in the cytoplasm of all the blastomeres of uncompacted and compacted embryos, and in that of trophoblast cells and inner-cell-mass cells of blastocysts, though it was brighter in the peripheral cytoplasm of these cells; it was the brightest in the outer flattened blastomeres and the inner round ones of compacted embryos as well as in the trophoblast cells of blastocysts, where two of such cells adhered to each other. The fluorescence showing the presence of rabbit anti-keratin serum-reactive cytokeratin polypeptides (Molecular weights, 50,000, 54,000 and/or 57,000) was granular when observed in uncompacted embryos, spread throughout the cytoplasm of all the blastomeres; while it was filamentous in compacted embryos, spread throughout the cytoplasm, though brighter in flattened blastomeres than in round ones; it was filamentous, also, in the cytoplasm of blastocysts, either in trophoblast cells or in inner-cell-mass cells. Filamentous fluorescence showing the presence of mouse anti-cytokeratin peptide 14-reactive cytokeratin polypeptide (Molecular weight, 50,000) was seen in blastocysts only, and brighter in the cytoplasm of trophoblast cells than in inner-cell-mass cells. These findings indicate that actin plays an important role in the formation of *zonula adherens* between any two trophoblast cells in blastocysts, and that cytokeratin polypeptide (Molecular weight, 50,000) in the formation of desmosomes between any two trophoblast cells.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 177—182, 1993)

Introduction

In mouse embryos during blastocyst formation, some blastomeres become flattened while others stay round after compaction has occurred[1, 2], and a few kinds of junctional complexes are formed between any pair of blastomeres in such embryos[2, 3]. Actin and cytokeratin generally known as cytoskeletal filaments are the constituents, the former of *zonula adherens* and the latter of desmosomes[4], and therefore changnes in the intracellular location of these filaments can be expected during the course of blastocyst formation.

The intracellular location of actin in mouse embryos during blastocyst formation has histochemically been examined using phallacidin[5-8] or anti-actin antibody[5, 9]. Investigations using phallacidin[6-8] proved

the presence of actin in all the blastomeres both in uncompacted and compacted embryos, as well as in trophoblast cells and inner-cell-mass cells of blastocysts; it was especially abundant in compacted embryos and blastocysts at the peripheries of the cytoplasm where two cells adhered. Investigations using anti-actin antibody, however, showed that actin in compacted embryos was especially abundant in the peripheral cytoplasm of outer flattened blastomeres, facing zona pellucida.

Intracellular location of cytokeratin polypeptides (Molecular weights (MWs), 46,000, 50,000, 54,000, 55,000, 57,000 and 61,000) in mouse embryos during blastocyst formation has been examined immunohistochemically[10-15]. In uncompacted and compacted embryos, cytokeratin polypeptide of 57,000 in MW was said to be found in all the blastomeres, whereas in blastocysts, it was observed only in the trophoblast cells [13, 15], while no cytokeratin polypeptides of other MWs were found in uncompacted embryos [11, 12, 14]. Some reported those of 50,000 and 55,000 in MWs were found in some blastomeres of compacted embryos and in all the trophoblast cells and in some inner-cell-mass cells of blastocysts[10, 11]. Those of 46,000, 54,000 and 61,000 in MWs were said to be observed in outer blastomeres of morulae and trophoblast cells of blastocysts[12]. As for cytokeratin polypeptide of 54,000 in MW, though, there is a report with different results stating that it was found in all the blastomeres of uncompacted 8-cell embryos[15]. In these investigations described above, however, there is no exact description on flattened and round blastomeres in compacted embryos.

This investigation, then, dealt with histochemical detection of actin and cytokeratin in mouse embryos at 8-cell to blastocyst stages considering the matter of flattened and round blastomeres, and discussed the relationship between cytoskeletal proteins and junctional complexes.

Materials and Methods

A hundred and five female mice of the ICR strain were kept and fed normally in a room at 24℃, lit 14 hrs a day from 4 a. m. till 6 p. m. Superovulated with 5 IU PMSG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan), and with 5 IU hCG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) 48 hrs later, they were mated with ICR males of proven fertility. Embryos were collected either from oviducts or from uteri 68, 80 and 96 hrs after hCG injection, so that they were at the uncompacted 8- and 16-cell, compacted 8- and 16-cell, and at the blastocyst stages, respectively.

For the detection of actin, about one third of the embryos at each stage were fixed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)[16] containing 3.7% formaldehyde, at room temperature for 30 min. Rinsed in PBS, they were immersed in PBS containing 0.25% Tween-20 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, U. S. A.). Again rinsed with PBS, the embryos were immersed in 100 μl PBS containing 16.5 ng NBD-phallacidin (Molecular Probes Inc., Junction City, U. S. A.) at room temperature for 20 min. As for the controls, some embryos were immersed in PBS devoid of phallacidin.

For the detection of cytokeratin, the remaining embryos whose zonae pellucidae were removed with pronase (Sigma, St. Louis, U. S. A.) were fixed in PBS containing 2% paraformaldehyde at room temperature for 30 min. After being rinsed in PBS containing 100 mM glycine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) and 0.3% bovine serum albumin (BSA, Sigma) (BSA-PBS), they were immersed in BSA-PBS containing 0.25% Tween-20 at room temperature for 5 min. Again rinsed in BSA-PBS, and then half of the embryos were immersed in rabbit anti-keratin serum (Transformation Research Inc., Framingham, U. S. A.) that reacts with cytokeratin polypeptides (MWs, 50,000, 54,000 and 57,000) and the rest in mouse anti-cytokeratin peptide 14 (Sigma) reacting with cytokeratin polypeptide (MW, 50,000), at room temperature for 60 min (the primary antibody treatment), these primary antibodies being diluted 50 and 200 times with PBS respectively. The embryos treated with the antiserum were rinsed in PBS, and immersed in FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel, West Chester, U. S. A.) at room temperature for 60 min, while those treated with the monoclonal antibody were immersed in FITC-conjugated goat anti-mouse IgM (Cappel) under the same conditions (the secondary antibody treatment), these secondary antibodies being diluted 64 times with PBS. As for the controls, a few embryos were treated with either of the two sec-

ondary antibodies previously treated with normal rabbit serum or normal mouse serum respectively, or treated simply with one of the secondary antibodies.

Each of the embryos thus prepared was placed in the center of vaseline spots on a slide. A cover slip was then carefully placed on the vaseline spots and pressed gently to anchor the embryo in between the cover slip and the slide. Observation was carried out under a reflected-light fluorescing microscope (Nikon, Tokyo, Japan)

Results

Actin

Fluorescence appeared in the cytoplasm of almost all the embryos (Figs. la and 2) when immersed in phallacidin solution, but not in embryos immersed in a solution devoid of phallacidin (Fig. lb). This fact has been understood to ascertain the fluorescence shows the presence of actin. In uncompacted 8- and 16-cell embryos, the fluorescence showing the presence of actin was seen to be bright in the peripheral cytoplasm of blastomeres (Fig. la); the fluorescence was the same in compacted 8- and 16-cell embryos, but it was much brighter in the peripheral cytoplasm where two blastomeres adhered (Fig. 2). In such compacted embryos, however, blastomeres sometimes appeared with no fluorescence. In blastocysts, the fluorescence appeared in both the trophoblast cells and inner-cell-mass cells, and were especially bright in peripheral areas where two trophoblast cells adhered to each other.

Cytokeratin

Fluorescence showing the presence of cytokeratin appeared in the cytoplasm of almost all the embryos either when immersed in rabbit anti-keratin serum (the primary antibody), and then in FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (the secondary antibody), or when immersed in mouse anti-cytokeratin peptide 14 (the primary antibody) and later in FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (the secondary antibody) (Figs. 3a and 4), but none such appeared when immersed in normal rabbit serum or normal mouse serum, or when treated with either one of the secondary antibodies only (Fig. 3b). These facts have been understood to ascertain that the fluorescence shows the presence of cytokeratin. In the blastomeres of uncompacted 8- and 16-cell embryos, the fluorescence showing the presence of rabbit anti-keratin serum-reactive cytokeratin was granular, but was filamentous in flattened and round blastomeres of compacted 8- and 16-cell em-

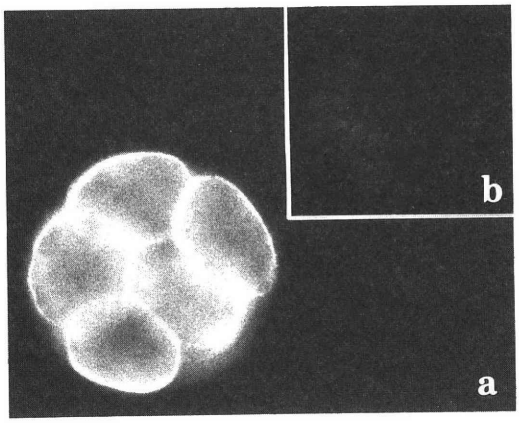


Fig. 1-a An uncompacted 8-cell mouse embryo treated with phallacidin. The fluorescence showing the presence of actin is seen in the cytoplasm of each blastomere, and is especially strong in the peripheral cytoplasm. ×300.

Fig. 1-b A mouse blastocyst treated with PBS devoid of phallacidin (control). The fluorescence is not seen in the cytoplasm of any blastomere. ×200.

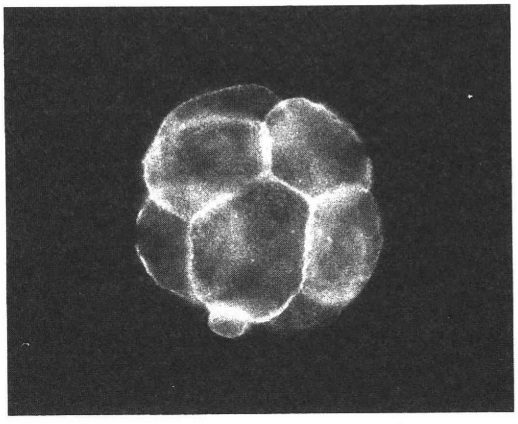


Fig. 2 A compacted 8-cell mouse embryo treated with phallacidin. The fluorescence showing the presence of actin is seen in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres, and is especially strong in the peripheral cytoplasm where two blastomeres adhering to each other. ×300.

bryos and in trophoblast cells and inner-cell-mass cells of blastocysts (Fig. 3a); also, it was brighter in flattened blastomeres than in round ones in compacted embryos. Fluorescence showing the presence of mouse anti-cytokeratin peptide 14-reactive cytokeratin was found in blastocysts only; it was filamentous both in trophoblast cells and in inner-cell-mass cells (Fig. 4), this fluorescence being brighter in trophoblast cells than in inner-cell-mass cells.

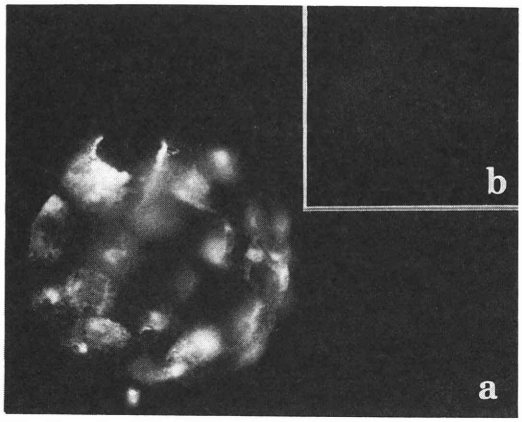


Fig. 3-a A mouse blastocyst treated with rabbit anti-keratin serum that reacts with cytokeratin polypeptides (MWs, 50,000, 54,000 and 57,000). The filamentous fluorescence showing the presence of the cytokeratin is seen in the cytoplasm of both trophoblast and inner-cell-mass cells. ×300.

Fig. 3-b A compacted 16-cell mouse embryo treated only with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (control). No fluorescence is seen in the cytoplasm of any blastomere. ×200.

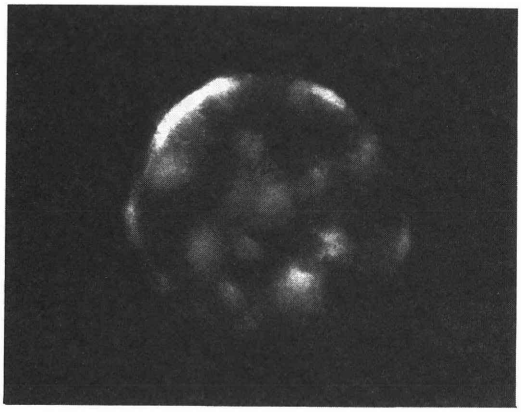


Fig. 4 A mouse blastocyst treated with mouse anti-cytokeratin peptide 14 that reacts with cytokeratin polypeptide (MW, 50,000). The filamentous fluorescence showing the presence of the cytokeratin is seen in the cytoplasm of both trophoblast and inner-cell-mass cells. ×300.

Discussion

While uncompacted mouse embryos have no junctional complexes between any pair of blastomeres, compacted embryos have gap junctions between every pair of blastomeres; that is, between two outer flattened blastomeres, two inner round blastomeres, and between a flattened blastomere and a round one, *zonula occludens* and predesmosomes also appear though only among pairs of flattened blastomeres[2,3,17]. Blastocysts, now, have *zonula occludens*, *zonula adherens*, desmosomes and gap junctions between each pair of trophoblast cells, and predesmosomes and gap junctions between every pair of inner-cell-mass cells, and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell[3,12,17].

The facts which this investigation clarified were that the fluorescence showing the presence of actin was especially abundant at the spots where different junctions are formed, that is, in the areas of the cytoplasm where blastomeres in compacted embryos and trophoblast cells in blastocysts meet. This must mean that actin is participating in the formation of *zonula adherens*, as a constituent of the apparatus. The results of our investigation agree with those of the former investigators[6-8], though not with those of Johnson and Maro[5] and Lehtonen and Badley[9].

The present results showing that cytokeratin polypeptides of 54,000 and/or 57,000 in MWs were present in all the mouse embryos from the 8-cell to blastocyst stages, while cytokeratin polypeptide of 50,000 only in blastocysts, may suggest that it plays a role in the formation of desmosomes between trophoblast cells. Lehtonen et al.[15] who employed immunoblotting, reported that cytokeratin polypeptides of 54,000 and 57,000 were present in uncompacted and compacted mouse embryos, morulae and blastocysts, and that of 50,000 also in the last two. After immunohistochemical studies, Lehtonen et al.[15] further reported that cytokeratin polypeptide of 54,000

was detected only in uncompacted 8-cell mouse embryos, their results, as a whole, support our findings stated above.

Fluorescence showing the presence of cytokeratin polypeptides of 50,000 and 54,000 in MWs was reported to be filamentous in outer blastomeres of mouse morulae and trophoblast cells of blastocysts[12], in blastomeres of compacted 8-cell embryos and in trophoblast cells and inner-cell-mass cells of mouse blastocysts[10, 11]. As for uncompacted 8-cell mouse embryos, the fluorescence of cytokeratin polypeptide of 54,000 was reported to be granular in their blastomeres[15]. These results also support our present findings. Concerning the cytokeratin polypeptide of 57,000, the fluorescence showing its presence was said to be granular in blastomeres of mouse embryos from uncompacted 8-cell to morula stages, but to be filamentous in trophoblast cells of blastocysts[13, 15], disagreeing with our results; in which the fluorescence was granular in uncompacted embryos, but filamentous in compacted embryos and blastocysts. This discrepancy may have been caused by the fact that we used different detergent; the former investigators[13, 15] using Triton X-100 as a detergent, and the present authors, Tween-20, because it had been reported that Tween-20 was better than Triton X-100 for the maintenance of the cytoskeletal system in mouse embryos[18].

References

1) Johnson, M. H.: How are two lineages established in early mouse development, Prog. Clin. Biol. Res., 294: 189, 1989
2) Pratt, H. P. M.: Marking time and marking space: chronology and topography in the early mouse embryo, Int. Rev. Cytol., 117: 99, 1989
3) Larsen, W. J. and Wert, S. E.: Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development, Tissue and Cell, 20: 809, 1988
4) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D.: Cell adhesion, cell junctions, and the extracellular matrix. In Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., Robertson, M. ed., 792, Garland Publishing, Inc., 1989
5) Johnson, M. H. and Maro, B.: The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres, J. Embryol. Exp. Morph., 82: 97, 1984
6) Lehtonen, E., Ordonez, G. and Reima, I.: Cytoskeleton in preimplantation mouse development, Cell Differ., 24: 165, 1988
7) Lehtonen, E. and Reima, I.: Changes in the distribution of vinculin during preimplantation mouse development, Differentiation, 32: 125, 1986
8) Reima, I. and Lehtonen, E.: Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse embryos, Differentiation, 30: 68, 1985
9) Lehtonen, E. and Badley, R. A.: Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos, J. Embryol. Exp. Morph., 55: 211, 1980
10) Chisholm, J. C. and Houliston, E.: Cytokeratin filament assembly in the preimplantation mouse embryo, Development, 101: 565, 1987
11) Emerson, J. A.: Disruption of the cytokeratin filament network in the preimplantation mouse embryo, Development, 104: 219, 1988
12) Jackson, B. W., Grund, C., Schmid, E., Burki, K., Franke, W. W. and Illmensee, K.: Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis, Differentiation, 17: 161, 1980
13) Lehtonen, E.: A monoclonal antibody against mouse oocyte cytoskeleton recognizing cytokeratin-type filaments, J. Embryol. Exp. Morph., 90: 197, 1985
14) Lehtonen, E.: Cytokeratins in oocytes and preimplantation embryos of the mouse, Curr. Top. Dev. Biol., 22: 153, 1987
15) Lehtonen, E., Lehto, V. --P., Vartio, T., Badley, R. A. and Virtanen, I.: Expression of cytokeratin polypeptides in mouse oocytes and preimplantation embryos, Dev. Biol., 100: 158, 1983
16) Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, J. Exp. Med., 99: 167, 1954
17) Yotsutani, I., Niimura, S. and Ishida, K.: The incidence and morphologly of transformed embryos in the course of blastocyst formation in four mammalian species, Jpn. J. Fertil. Steril., 37: 74, 1992
18) Gallicano, G. I., McGaughey, R. W. and Capco, D. G.: Cytoskeleton of the mouse egg and embryo: re-organization of planar elements, Cell Motil. Cytoskeleton, 18: 143, 1991

胚盤胞形成過程のマウス胚における アクチンとサイトケラチンの

組織化学的観察

新潟大学自然科学研究科
四谷伊公子
新潟大学農学部家畜生産学教室
新村末雄　石田一夫

8細胞期から胚盤胞期までのマウス胚について，アクチンとサイトケラチンの検出を組織化学的に行い，これらの細胞骨格系蛋白質が胚盤胞形成過程でどのように変化するかを調べた．ファラシジン陽性アクチンの存在を示す蛍光は，小型化していない胚ではすべての割球の細胞膜直下の細胞質で強かったが，小型化した胚の割球と胚盤胞の栄養膜細胞では細胞同士が接している部位の細胞膜直下の細胞質でとくに強かった．ウサギ抗ケラチン血清に反応するサイトケラチン (分子量50,000，54,000および57,000) の存在を示す蛍光は，小型化していない胚の割球では顆粒状を呈して細胞質全域に分布していたが，小型化した胚の割球と胚盤胞の細胞では線維状を呈して分布していた．また，小型化した胚では，この蛍光は球形割球に比べ扁平割球で強かった．一方，マウス抗サイトケラチンペプチド14に反応するサイトケラチン (分子量50,000) の存在を示す蛍光は，胚盤胞にのみ認められ，栄養膜細胞と内細胞塊細胞で線維状を呈して細胞質全域に分布していた．また，この蛍光は内細胞塊細胞に比べ栄養膜細胞で強かった．

(受付：1992年5月7日)
(受理：1992年9月16日)

日本不妊学会雑誌
第38巻 第1号 1993

Hatching現象
——形態変化と機序，及びプロスタグランジンとの関係——

Hatching of Blastocysts
—Morphology, Mechanism and Prostaglandin Synthesis—

医療法人社団　スズキ病院産婦人科
千田　智　Satoru CHIDA
鈴木雅洲　Masakuni SUZUKI
Department of Infertility Unit,
Suzuki Hospital, Miyagi 989-24, Japan

東北大学医学部産科学婦人科学教室
上原茂樹　Shigeki UEHARA
矢嶋聰　Akira YAJIMA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Tohoku University School of Medicine, Miyagi 980, Japan

Kiel大学産婦人科
リゼロッテ・メトラー　Liselotte METTLER
クルト・ゼム　Kurt SEMM
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kiel University Hospital, 2300 Kiel, FRG

哺乳動物受精卵の着床前現象である透明帯からの胞胚の脱出現象，いわゆるhatchingは胞胚自体の発育成熟の結果であると同時に着床前に必要不可欠の現象である．Hatching前に胞胚は十分に拡張し，透明帯の一部が溶解しその裂孔より脱出する．また，hatching前後にはtrophoblast内ではエネルギー産生や蛋白合成能が高まり子宮内膜への着床準備にとりかかる．一方では，胞胚におけるプロスタグランジン(PGs)産生が，子宮内膜と呼応してhatchingを始めとする，着床予定部位の決定や血管透過性の亢進，脱落膜化促進等に作用するといわれている．

本稿では以上のことについて，走査型及び透過型電子顕微鏡を用いたhatchingの経時的形態変化観察と，着床前胞胚とPGsの関係について総説を試みた．

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (1), 183—192, 1993)

はじめに

哺乳動物における受精卵は，卵管膨大部で受精後分割を続けながら卵管内を子宮側へ移動し，透明帯につつまれたまま桑実胚，胞胚期に子宮腔内へ到達する．ここまでの透明帯の役割は多精子受精防御，分割期での各割球の離散防止，受精卵の保護，卵管内着床の防止である[1]．しかし着床期には不要となり胞胚は透明帯より脱出する．この現象をzona shedding (脱皮)，zona denudation (露出) あるいは鳥

類の孵化に似ていることからhatching (孵化) と呼ばれている．このhatching及び胞胚着床機構にプロスタグランジン (PGs) が関与しており，その産生母体は胞胚と子宮内膜の両者が考えられている．

本稿では，hatchingの経時的形態変化とその機序およびPGsの役割について概説する．

Hatchingの形態と機序

Hatching現象は1929年LewisとGregory[2]によって家兎の胞胚で観察されたのが最初であり，1938年にPincusとWerthessen[3]が追試し確認している．その後Coleが透明帯からの脱出を連続的顕微鏡映画としておさめ[4]，近年では走査型および透過型電子顕微鏡を用いて，詳細に形態学的変化が調べられている[5,6,7,8]．マウス胞胚のhatchingはヒト胞胚と類似しているといわれており，本稿ではマウス胞胚を中心に論じる．Hatchingの機序として，1) 胞胚内腔への水分の取り込み (fluid accumulation) が胞胚内腔圧を上昇させ，胞胚腔が拡張 (expansion) する．2) 透明帯の一部がtrophoblastより産生される蛋白分解酵素により溶解され脆弱部分に裂孔ができ，そこから胞胚の一部が圧出され，機械的herniationによって胞胚が脱出する (図1，図2)．

1) Fluid accumulation (水分流入) とExpansion (胞胚拡張)

Hatching直前になると透明帯外よりNa^+やCl^-がtrophoblastのNa/Kポンプを介して胞胚内腔へ能動的に取り込まれ貯蓄し，この浸透圧の上昇によって水分が流入される[9,10]．Cyclic-AMPやPGs[11]，Estrogen等[12,13]がこの調節作用を有しているとの研究がある．

この時期の胞胚のtrophoblastは単層扁平化し，自由面 (透明帯側表面) に多数の微絨毛 (villi) を有し，表面積が大となり水分の流入やイオン類の吸収能力を高めている[7,8] (写真1.3)．さらにtrophoblast間は透明帯側よりtight-junction, gap-junction, desmosomeが存在し強固な結合をしており，特にtight-junctionがより強固になることでtrophoblastを通って流入した胞胚腔内の水分流出を阻止し，内圧を保持していると考えられる[14]．これらの細胞間結合はCa^{2+}の介在のもとでcompaction後に形成される[15]．直径40Å以上の物質のtrophoblast間隙の通過を否定している報告もある[16]．

2) 透明帯分解酵素

透明帯はシアル酸を含む中性から酸性のムコ多糖類より成り[17]，これはproteinaseで溶解する．走査型

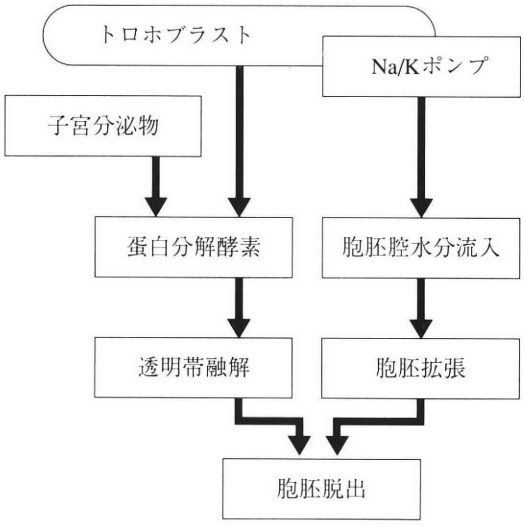


図1　Hatchingの機序
Trophoblastを通して胞胚腔へ水分が流入 (fluid accumulation) し，胞胚が拡張 (expansion) する．一方では子宮内膜やtrophoblastから産生される蛋白分解酵素によって透明帯の融解が始まる．

電顕観察において表面はスポンジ状の網状構造を呈し[7]，受精卵のstageにかかわらず違いを認めず[12]，フィルターの役割はするもののかなり大きな分子量のものまで通過できる．また透過型電顕観察においては一層の均一構造である[7] (写真1.3)．

透明帯融解蛋白分解酵素がtrophoblastや子宮内膜[18]より産生されるといわれているが，胞胚がin vitroにて蛋白分解酵素を含まない培養液中でもhatchingすることより，胞胚自身にその産生能があるといえる．Plasminogen activatorがtrophoblast内で作用し，蛋白分解酵素を産生し，着床の際内膜へのtrophoblastのinvasionに働くという報告がある[19,20]．

また初期胞胚より後期拡張胞胚の方が，トリプシン様活性，キモトリプシン様活性が高くなるという報告もあり[21]，胞胚自身の酵素産生を示唆している．さらに，in vitroにてマウスtrophoblastの細胞膜に存在するstrypsinというトリプシン様蛋白分解酵素が透明帯を局所的に融解し，その部位よりhatchingが開始すると組織化学的に証明した実験がある[22]．

Hatching前後の透過型電顕観察では，ミトコンドリア，遊離リボゾーム，ゴルジ体の増加が認められ，エネルギー代謝や蛋白合成能が上昇していると思われる[7,8]．また，hatching後着床前には脂肪滴様分泌顆粒や大小空胞が著明となり，ステロイド (エストロジェンやプロゲステロン？) 産生能を有して

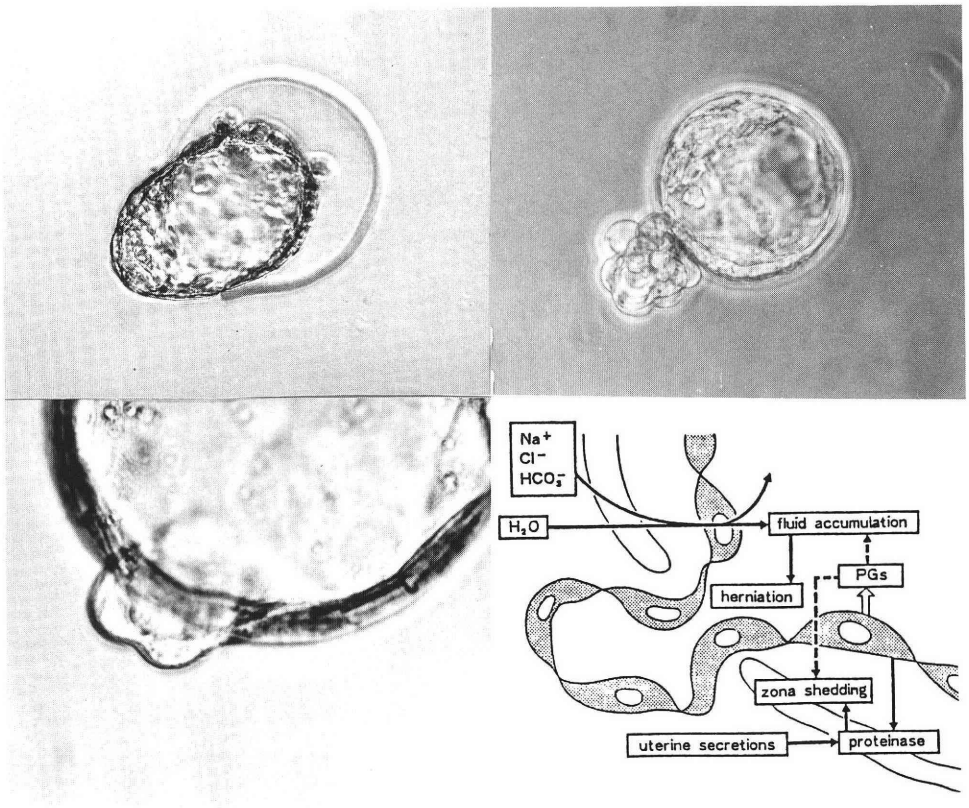


図2　内細胞塊側 (左上) とtrophoblast側 (右上) からのhatching.
Hatchingの開始 (左下) とその機序 (右下). Hatchingの開始部位に一定の局性はない.

いる可能性もある. しかし, これらの形態変化は全trophoblastに観察され, 特にhatching開始部位に著明とはいえず, 局所における酵素産生の増加を認める所見はない[7] (写真2. 5).

この時期にマウスtrophoblast内に特徴的な格子状構造, lattice-like structureがみられるようになるが本態は不明である (写真3).

3) Hatchingの意義

マウスとヒト受精卵の共通点は,「排卵時から胞胚期までの大きさが近く, 球状に膨脹し増加率も同じである. 両者とも子宮腔内でhatchingし, 完全に脱出してから接着, 着床が開始する. Hatchingは1ケ所から始まり一定の極性をもたず, 内細胞塊の位置に関係なく開始する. 体外受精・胚移植で産子を得ている」等であるが, 受精卵の形態変化やhatchingの形態は哺乳動物の種による差違もあり, 不明な点も多い[5, 23, 24].

Hatchingには酵素産生と同時に胞胚脱出の為のエネルギーが必要であり, hatchingする胞胚のqualityは高いといえ[25], 体外受精卵の培養条件や環境についてのquality controlとしても用いられる[26, 27].

倒立顕微鏡下に正常とみえてもhatchingしない胞胚のtrophoblastは, 透過型電顕で観察すると, 殆どが変性している. ただしhatchingしている胞胚のtrophoblastにも変性はたびたびみられ, 胞胚の全trophoblastの約1/2が正常ならhatching可能と思われる (未発表データ) (写真4). さらに, hatchingした胞胚の90%以上は, dish上にattachmentしtrophoblastの発育増殖を認めることからhatchingは胞胚のtrophoblastの発育成熟の指標となる. しかし, 内細胞塊についての評価はできず, hatching後の内細胞塊の発育をin vitroにて追跡観察するか[28, 29, 30], 胞胚を偽妊娠受容雌の子宮に胚移植し生存胎仔について検討するしかない[26, 27].

胞胚着床期に透明帯は不要となるが, trophoblastのqualityが低い場合や透明帯が厚く硬い場合, 内細胞塊が正常でもhatchingできず着床できないことがあり得る. その際, hatcingしやすいようにあらかじめ, 人工的に受精卵 (4 ～ 8細胞期) の透明帯に裂孔を作っておく顕微鏡下操作がある (micromanupilated

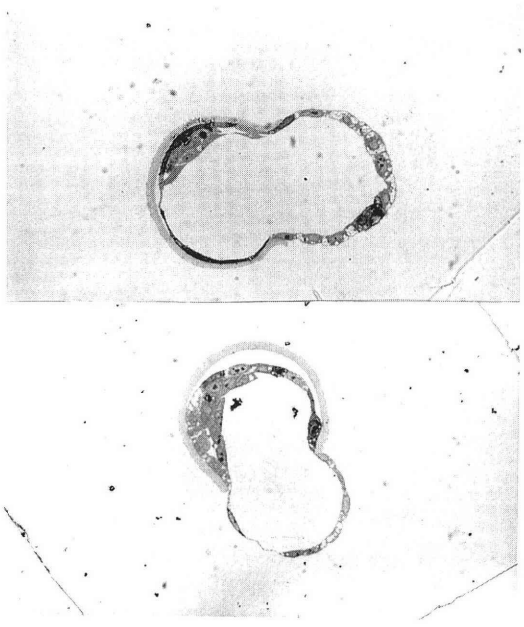


写真4　光学(倒立)顕微鏡下に，正常にhatchingしている胞胚においてもtrophoblastの変性が観察される．(透過型電子顕微鏡用切片標本，×300).

assisted hatching)[53]．この操作をすると，自然のhatchingと比較して透明帯の裂孔は小さく丸く，また透明帯は厚く小さいままで残る[54]．すなわち胞胚が十分に拡張しないままで透明帯脱出ができるわけで必要エネルギーも少なくてすみ，qualityの低い胚では有効な手段と考えられる．

着床前胞胚とプロスタグランジン

プロスタグランジン(PGs)は1960年にBergströmによって羊の精のう腺より純粋分離され，不飽和脂肪酸であるprostanoic acidを基本構造としている．PGsは神経伝達物質やホルモンとは違い，細胞や組織内で局所調節的に作用し(paracrine, autocrine)，前2者の中間に位置するものでautacoidとも呼ばれる．PGsの前駆体はいわゆる必須脂肪酸，あるいは高度不飽和脂肪酸で，2重結合を3個もつものから1群のPGs，4個もつもの(アラキドン酸)から2群のPGs，5個もつものから3群のPGsが生合成される．特に重要なのは2群のPGsであり，細胞形質膜のリン脂質の加水分解により遊離したアラキドン酸が細胞質内のミクロソームにあるシクロオキシゲナーゼの酵素反応によって直ちにPGエンドペルオキシド(PGG_2/PGH_2)となり，さらに酵素反応が続いて産生される．この反応が速やかなことより「アラキドン酸カスケード(滝)」といわれている(図3)．

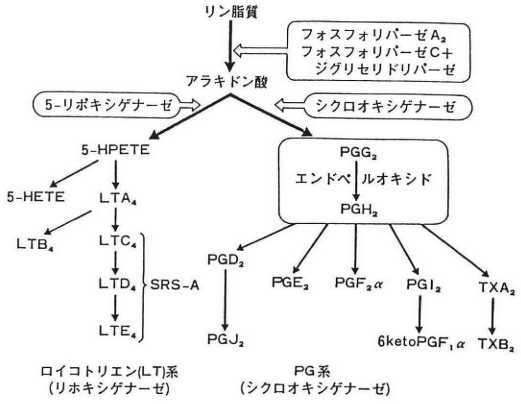


図3　アラキドン酸カスケード

このシクロオキシゲナーゼ活性は酸性非ステロイド性抗炎症剤(aspirinやindomethacin)によって特異的に阻害され，2群のPGs生合成が抑制される．2群のPGsは，癌細胞の増殖抑制や促進，胎芽の発育，催奇形性，さらには細胞膜におけるC-AMPやCa^{2+}輸送等，細胞膜透過性，流動性等について検討されており，胞胚のfluid accumulationとの関係が注目される．

近年，着床機構にPGsが関与しているとの報告がなされ，その産生母体は子宮内膜と胞胚の両者が考えられており，着床における胞胚側と子宮内膜側との相互のシグナル的作用をしているともいわれている．

Kennedyらは着床前期および初期の子宮内膜における局所的PGs産生が，着床予定部位や着床部位の血管透過性を亢進し，脱落膜化を促進するとしており，胞胚のspacing(間隔どり)，apposition(定位付着)を決める作用をするとも考えられる[31](図4)．また，PGs生合成阻害剤であるindomethacin (cyclo-oxygenase活性抑制)は，着床前初期子宮内膜におけるPGs産生を抑制することにより着床阻害に働くとされ[32,33]，この内膜より産生されるPGsはPGE_2．$PGF_{2\alpha}$．PGI_2等と推定されている[34,35,36]．

一方では1975年DickmannとSpilmanによって家兎胞胚中のPGsの存在がRIAを用いて発見され[37]，以後牛[38]や羊[39]の胞胚にも証明された．さらに，それらの胞胚を培養することで胞胚内のPGs含有量が増加したとか[38,40]，培養液中に放出されるPGsの増加をみたとする報告や[39,41]，培養液にアラキドン酸を添加しPGsへの転換を検討した実験がある[42]．

いずれも哺乳動物の胞胚におけるアラキドン酸代

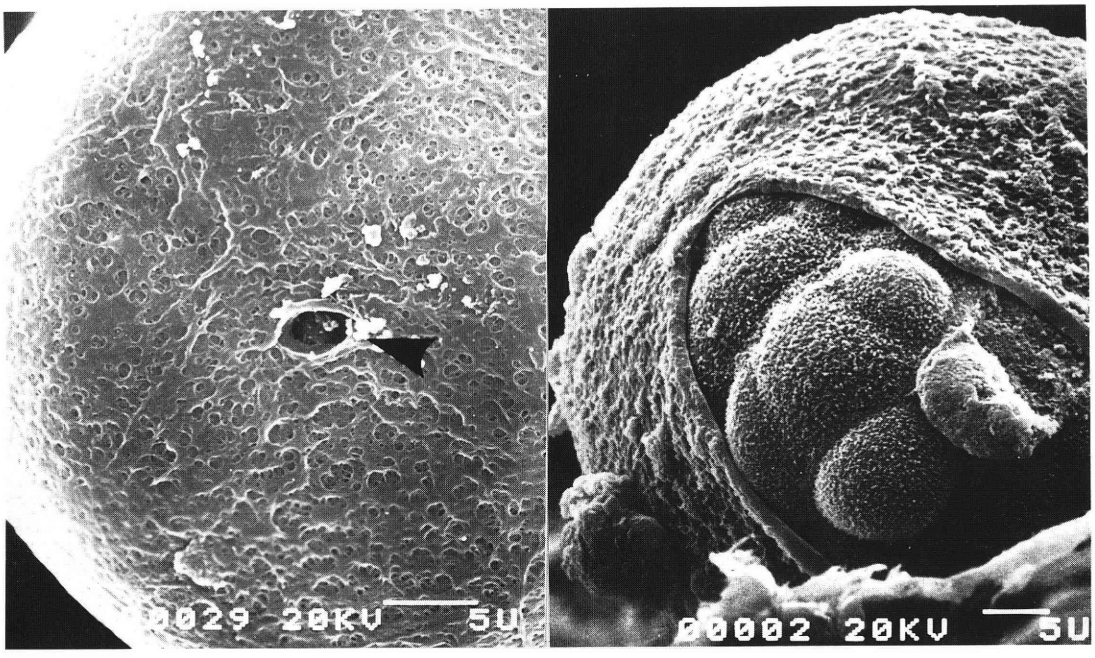


写真1　透明帯は多孔網状のスポンジ状構造を呈し，局所の融解よりhatchingは開始する (左，矢印)．多数の微絨毛を有したtrophoblastが胞胚内腔の圧力のため，裂孔部より圧出される (右) (5μ＝5μm)[7,8].

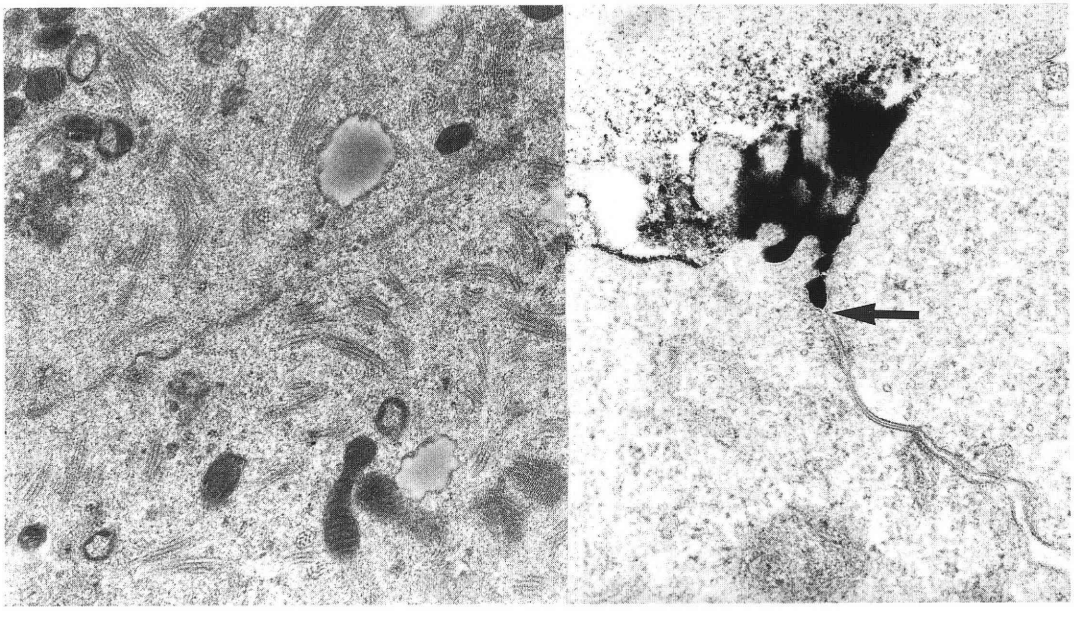


写真2　拡張した胞胚のtrophoblast内には，多数の遊離リボゾームやミトコンドリアが存在し，蛋白合成やエネルギー代謝が亢進している (左，×17.000)[7]．ランタン (分子量138.9) をtracerとして培養液に添加し，胞胚内侵入を観察すると，tight-junction (矢印) にて停止した (右，×30.000) (上方は透明帯)[14].

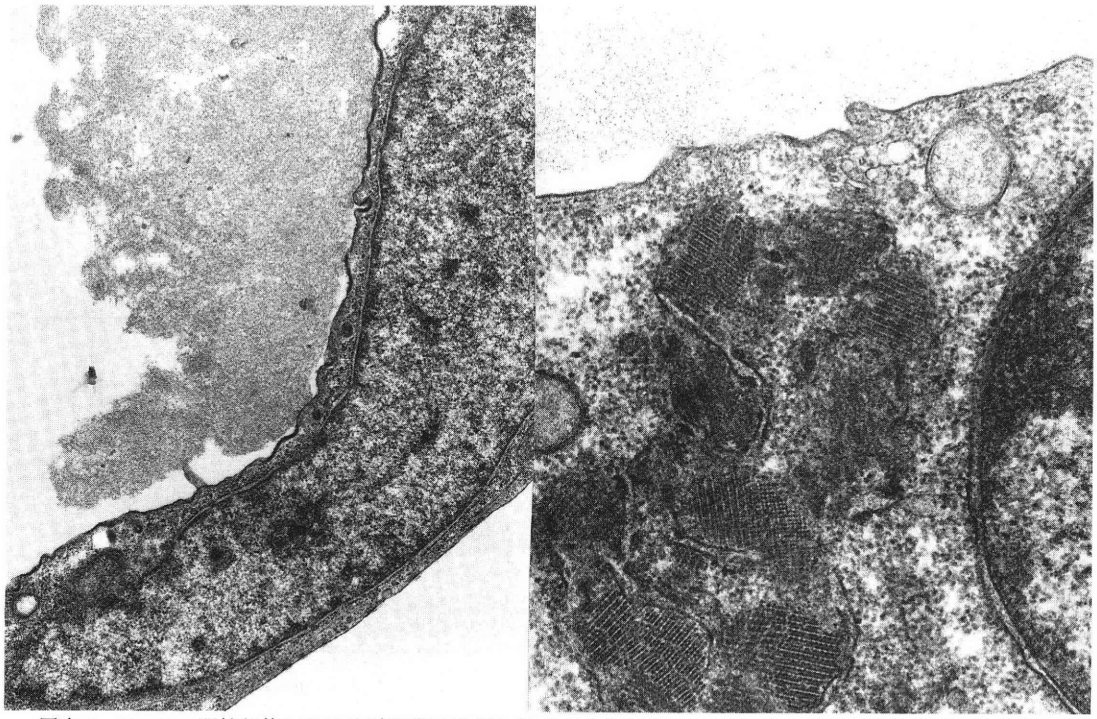


写真3　Hatching開始部位における透明帯は融解し始めているが，trophoblast内には他部位と比較して著名な差異を認めない (左，×10.000) [7]．胞胚期になるとmouse trophoblast内に格子状構造 (lattice-like structure) が観察されるが本態は不明である (右，×30.000).

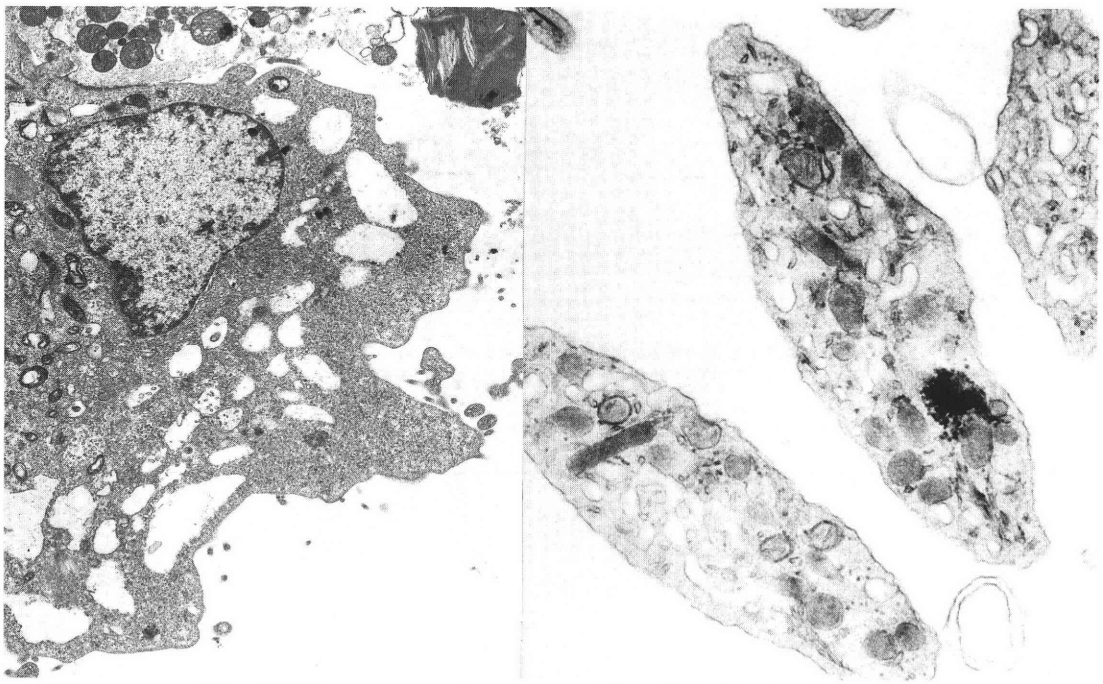


写真5　Hatching後着床前胞胚のtrophoblast (左，×6.000)．多数の分泌顆粒や大小空胞の増加が著名であり，この形態は凝集前の血小板と類似している (右，×8.000) (旧西独Regensburg大学解剖学教室提供).

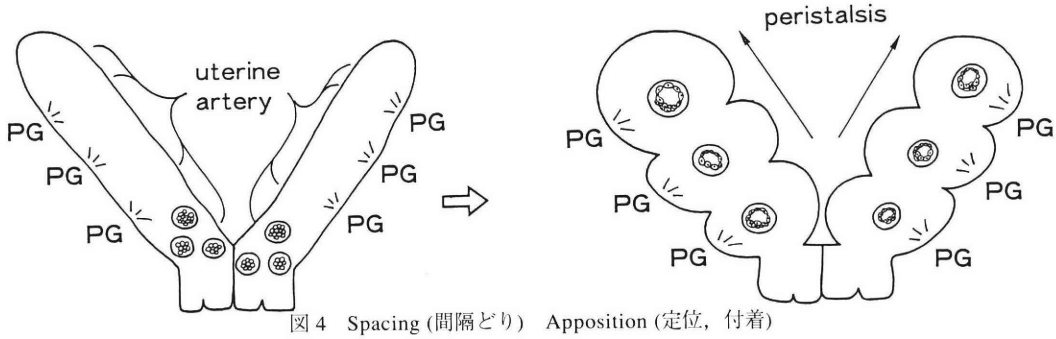


図4　Spacing (間隔どり)　Apposition (定位，付着)

謝の存在を示すものではあるが，その産生されるPGsの種類や作用機序は不明な点が多い．微量のPGs測定にはgas chromatography-mass spectometryとRIAがあるがいくつかの問題点がある．—— 1) PGsは化学的に不安定なものが多い．2) 生合成，代謝，排泄が速い．3) 機械的，化学的刺激 (保存や抽出操作) でアラキドン酸の遊離が容易に起こる．4) 複雑な抽出，分離，精製操作を必要とする．——などより確実な微量測定は難しく，増減についての比較検討は慎重を要する．また測定したとするPG，あるいはその代謝産物が，目的とするPGを正確に反映しているか疑問が残る．

ところで，in vitroにおいて，hatchingは種々のPGs生合成阻害剤 (7-oxa-13 prostanoic acid, melcofenamic acid, indomethacin, aspirin, etc.)にて抑制されることがわかっている[43,44]．Indomethacinにて抑制されたhatchingは$PGF_2\alpha$，PGE_2の添加にて，抑制は改善されその作用は$PGF_2\alpha$の方が優位である[45,52]．同様に，培養液に添加した [^{3}H] uridineの胞胚内への取り込み実験でも，indomethacineによる抑制が$PGF_2\alpha$の添加にて改善を認めている[46,47]．このことは間接的に，胞胚がPGsを産生しており，その中で$PGF_2\alpha$が胞胚の拡張と，hatchingの促進に関与していることを示している．

さらに，hatching後の胞胚のin vitroでのdish上への接着やtrophoblastの発育増殖もindomethacinによって抑制されるが，この抑制は$PGF_2\alpha$，PGE_2の両者によって改善される[48]．このことは，胞胚から産生される$PGF_2\alpha$と子宮内膜より産生されるPGE_2の両者が胞胚の着床促進に働いているとする説[31,49,50]を支持するものである．しかし，indomethacinの胞胚のhatchingや着床の抑制が$PGF_2\alpha$とPGE_2で完全にとれたわけではなく[45,48]，その他の2群のPGs (PGI_2やTXA_2) についての検討が必要である．ただしPGI_2やTXA_2は化学的に不安定であり，極めて短時間のうちに非酵素的に6-keto-$PGF_1\alpha$およびTXB_2に転換され不活化することから添加実験には不適当である．

培養液に添加した [^{3}H] PGE_2，[^{3}H] $PGF_2\alpha$は胞胚のtrophoblast内より胞胚腔内に多量に取り込まれていたとする報告がある[51]．このことはtrophoblastや子宮内膜から産生された$PGF_2\alpha$やPGE_2は，胞胚腔に一時的に貯えられ，数時間後に放出されることでhatchingを含む着床前現象 (spasing, orientation, endometrial vascular permability) や着床初期現象 (attachment, adhesion, decidualization) に作用していると思われる．

おわりに

胞胚のhatching前後の形態変化とPGs産生との間に何らかの関連がありそうである．電顕的酵素抗体法を用いて，trophoblast内の分泌顆粒にPGsの存在を認めることはできないであろうか．透明帯融解の始まる部位はどのようにして決定され，そのtrophoblastは他と比較してどのように違うのであろうか．胞胚着床前のtrophoblastにおける分泌顆粒や大小空胞の増加は，血小板の凝集直前の形態変化と類似している (写真5)．また血小板の凝集促進や抑制，血管壁への付着には2群のPGs (PGI_2，TXA_2) の関与は不可欠である．これら両者に共通する形態的変化とPGsの作用は，異種細胞への接着現象に必要なものかも知れない．

文　献

1) Modlinski, J. A.: The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo, J. Embryol. exp. Morph., 23: 539, 1970
2) Lewis, W. H. and Gregory, P. W.: Cinematographs of living developing rabbit eggs, Science, 69: 226, 1929
3) Pincus, G. and Werthessen, N. T.: The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and vitro, J. Exp. Zool., 78: 1, 1938
4) Cole, R. J.: Cinemicrografic observations on the

trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst, J. Embryol. exp. Morph., 17: 481, 1967

5) Matthew, A. G. and Yu-chih, H.: Correlative scanning electron, transmission electron, and light microscopic studies of the in vitro development of mouse embryos on a plastic substrate at the implantation stage, J. Embryol. exp. Morph., 56: 23, 1980

6) Bergström, S. and Nilsson, O.: Blastocysts attachment and early invasion during oestradiol-induced implantation in the mouse, Anat. Embryol., 149: 149, 1976

7) Chida, S., Uehara, S., Hoshiai, H. and Yajima, A.: Time sequential observation on hatching of mouse blastocysts by scanning and transmission electron microscopy, Jap. J. Fertil. Steril., 32: 228, 1987

8) Chida, S., Grillo, M., Mettler, L. und Uehara, S.: Beobachtung der Schlüpvorgänge bei Mäuseblastozysten durch Raster (REM) und Trans-missionselektronenmikroskopie (TEM), Fertilität, 5: 204, 1989

9) Borland, R. M., Biggers, J. D. and Lechene, C. P.: Fluid transport by rabbit preimplantation blastocysts in vitro, J. Reprod. Fert., 51: 131, 1977

10) Borland, R. M., Biggers, and Lechene, C. P.: Kinetic aspects of rabbit blastocoele fluid accumlation: An application of electron probe microanalysis, Develop. Biol., 50: 201, 1976

11) Benos, D. J. and Biggers, J. D.: Sodium and chloride co-transport by preimplantation rabbit blastocysts, J. Physiol., 342: 23, 1983

12) Begström, S.: Shedding of zona pellucida in normal pregnancy and in various hormonal stages in the mouse, Z. Anat. Entwickl. Gesch., 136: 143, 1972

13) Mclaren, A.: The fate of the zona pellucida in mice, J. Embryol. exp. Morph., 23: 1, 1970

14) Uehara, S., Chida, S., Tsuiki, A., Hoshiai, H. and Yajima, A.: Ultrastructural study on intracellular junction and lanthanum penetration in mouse blastocyst, Acta. Obst. Gynaec. Jap., 38: 2187, 1986

15) Ducibella, T. and Anderson, E.: Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryos : prerequisites for morphogenesis of the blastocyst, Develop. Biol., 47: 45, 1975

16) Enders, A, C. and Schlafke, S.: Surface coats of the mouse blastocyst and uterus during the preimplantation period, Anat. Res., 180: 31, 1974

17) Kane, M. T.: Influence of the mucin coat on rabbit blastocysts in culture, J. Physiol., 236: 30, 1973

18) Beier, H. M. and Maurer, R. R.: Uteroglobin and other proteins in rabbit blastocyst fluid after development in vitro and in vivo, Cell Tiss. Res., 159: 1, 1975

19) Fazleabas, A. T., Geisert, R. D., Bazer, F. W. and Roberts, R. M.: Relationship between release of plasminogen activator and estrogen by blastocysts and secretion of plasmin inhibitor by uterine endometrium in the pregnant pig, Biol. Reprod., 29: 225, 1983

20) Striokland, S., Reich, E. and Sherman, M. I.: Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm, Cell, 9: 231, 1976

21) Andary, T. J., Dabich, D. and Vanwinkle, L. J.: Changes in proteinase activity in early vs. late mouse blastocysts, J. Cell. Biol., 55: 3a, 1972

22) Perona, R. M. and Wassarman, P. M.: blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoectoderm, Develop. Biol., 114: 42, 1986

23) Enders, A. C. and Sclafke, S.: Differentiation of the blastocysts of the rhesus monky, The American J. Anatomy, 162: 1, 1981

24) Flechon, J. E. and Renard, J. P.: A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro, J. Reprod. Fert., 53: 9, 1978

25) Dickman, Z. and Noyes, R. W.: The zona pellucida at the time of implantation, Fertil. Steril., 12: 310, 1961

26) Chida, S. and Mettler, L.: Screening test for mouse blastocysts as an index of the vitality of embryos, J. In vitro Fert. Embryo Transfer, 6: 310, 1989

27) Chida, S. und Mettler, L.: Lebensfähigkeit von Mausblastozysten nach In-vivo und In-vitro Fertilisation, Fertilität, 6: 40, 1990

28) Chida, S., Suzuki, M., Mettler, L. and Semm, K.: The origin of blighted ovum, Jpn. J. Fertil. Steril., 37: 70, 1992

29) Chida, S.: Monozygous double inner cell masses in mouse blastocysts following fertilization in vitro and in vivo, J. In vitro Fert. Embryo Transfer, 7: 177, 1990

30) Chida, S. und Mettler, L.: Monozygote Zwillingsembryoblastentwicklung von Mausembryonen nach in vitro und in vivo Fertilisation, Reprod. Dom. Anim., 25: 173, 1990

31) Kennedy, T. G.: Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat, Biol. Repord., 16: 286, 1977
32) Philips, C. A. and Poyser, N. L.: Studies on the involvement of prostaglandins in implantation in the rat, J. Repord. Fert., 62: 73, 1981
33) Hoffman, L. H., Dipietro, D. L. and Mackenna, T. J.: Effects of indomethacin on uterine capillary permeability and blastocyst development in rabbits, Prostaglandins, 15: 823, 1978
34) Kennedy, T. G.: Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation, Aust. J. Biol. Sci., 36: 531, 1983
35) Kennedy, T. G.: In cellular and molecular aspect of implantation. ed. by Glasser, S. R. and Bullock, D. W., p. 356, Plenum Press, New York & London, 1981
36) Kennedy, T. G. and Doktorick, P. E.: Effects of analogues of prostaglandin E2 and F2α on the decidual cell reaction in the rat , Prostaglandins, 35: 207, 1988
37) Dickmann, Z. and Spilman, C. H.: Prostaglandins in rabbit blastocysts, Science, 190: 997, 1975
38) Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon, N. and Hansel, W.: Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts, J. Reprod. Fert., 56: 181, 1979
39) Hyland, J. H., Manns, J. G. and Humphrey, W. D.: Prostaglandin production by ovine embryos and endometrium in vitro, J. Reprod. Fert., 65: 299, 1982
40) Pakrasi, P. L. and Dey, S. K.: Blastocysts is the source of prostaglandins in the implantation site in the rabbit, Prostaglandins, 24: 73, 1982
41) Harper, M. J. K., Norris, C. J. and Rajkumar, K.: Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbit, Biol. Reprod., 28: 350, 1983
42) Dey, S. K., Chien, S. M., Cox, C. L. and Crist, R. D.: Prostaglandins in the rabbit blastocyst, Prostaglandins, 19: 449, 1980
43) Biggers, J. D., Leonov, B. V., Basker, J. F. and Fried, J.: Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by prostaglandin antagonists, Biol. Reprod., 19: 519, 1978
44) Basker, J. F., Torchiana, D. F.: Biggers, J. D.., Corey, E. J., Anderson, N. H. and Subramanian, N. : Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by various prostaglandin antagonists, J. Reprod. Fert., 63: 359, 1981
45) Chida, S., Uehara, S., Hoshiai, H. and Yajima, A.: Effects of indomethacin, prostaglandin E2, prostaglandin F2α and 6-keto-prostaglandin F1α on hatching of mouse blastocysts, Prostaglandins, 31: 337, 1986
46) Uehara, S., Villee, C. A. and Hoshiai, H.: Effect of estradiol, prostaglandin E2 and prostaglandin F2α on incorporation of [^{3}H] uridine by preimplantation mouse embryos in vitro, Tohoku J. exp. Med., 144: 305, 1984
47) Uehara, S., Villee, C. A. and Hoshiai, H.: Effect of indomethacin and prostaglandin F2α on incorporation of [^{3}H] uridine by preimpalantation mouse embryo, Tohoku J. exp. Med., 143: 319, 1984
48) Chida, S. and Mettler, L.: Effects of indomethacin, prostaglandin E2 and prostaglandin F2α on mouse blastocyst attachment and trophoblastic outgrowth in vitro, Prostaglandins, 37: 411, 1989
49) Holmes, P. V. and Gordashko, B. J.: Evidence of prostaglandin involvement in blastocyst implantation, J. Embryol. exp. Morph., 55: 109, 1980
50) Hoffman, L. H., Strong, G. B., Davenpor, G. R. and Frolich, J. C.: Deciduogenic effect of prostaglandins in the pseudopregnant rabbit, J. Reprod. Fert., 50: 231, 1977
51) Jones, M. A. and Harper, M. J. K.: Rabbit blastocysts accumulate [^{3}H] prostaglandins in vitro, Endocrinology, 115: 817, 1984
52) Spilman, C. H.: Effect of prostaglandins on the development of rabbit embryos, J. Reprod. Fert., 39: 403, 1974
53) Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Massey, J., Mayer M. P. and Wimer, K.: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. Hum. Reprod., 5: 7, 1990
54) Cohen, J.: Assisted hatching of human embryos. J. In vitro Fert. Embryo Transfer, 8: 179, 1991

Hatching of blastocysts —Morphology, mechanism and prostaglandin synthesis—

Satoru Chida and Masakuni Suzuki

Department of Infertility Unit,
Suzuki Hospital, Miyagi 989-24, Japan

Shigeki Uehara and Akira Yajima

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

Liselotte Mettler and Kurt Semm

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

As the mechanism of hatching, an increase in internal pressure of the blastocoele due to inflow of water and production of the zona pellucida lytic enzyme by the trophoblast are involved. Scanning electron microscopy shows that hatching starts with opening of a part of the zona. The pit thus formed is extended and then a structure is observed in which the trophoblast with numerous homogeneous microvilli on its surface is projecting from the inside of the zona. Transmission electron microscopy demonstrates that hatching starts from the embryonic or abembryonic pole of the blastocysts. Regarding the starting site, no special changes are seen in the zona pellucida or the trophoblast compared with the other sites. Especially after hatching, a striking increase is seen in the number of large and small vacuoles and secretory granules. So hatching starts with lysis of the zona and trophoblast cells are active in energy metabolism and protein synthesis before implantation. PGs would participate in the hatching process of preimplantation embryos. Indomethacin has an inhibiting effect on hatching, attachment and outgrowth of blastocysts in vitro. The inhibition of hatching is improved by exogenous $PGF_2\alpha$, suggesting that blastocyst can produce PGs and $PGF_2\alpha$ has an inductive effect on hatching. Addition of PGE_2 and/or $PGF_2\alpha$ reduces the inhibitory effects of indomethacine, indicating its inductive effect on attachment and outgrowth of trophoblasts in vitro. These results confirm that blastocysts can produce $PGF_2\alpha$ that has an inductive effect on hatching and PGE_2 production from the endometrium is also necessary in the preparation of endometrium for early implantation.

(受理：1992年5月27日)
(受付：1992年9月16日)

地方部会講演抄録

第3回日本不妊学会春季九州支部会

日　時：平成4年4月26日（日）8:30～13:00
会　場：ニュースカイホテル
会　長：岡村　均
（熊本大学医学部産婦）

1．Primary hypothalamic ovarian failureと思われる1症例

○楠田雅彦・井村睦規
（佐世保共済病院産婦）

無排卵性無月経のうち，軽症の視床下部性無排卵の頻度は高いが，重症の原発性視床下部無排卵症は稀であり，clomipheneはおろかhMG-hCG療法にさえ抵抗性を示し，対応に苦慮することが多い．演者は最近本症に属すると思われる1症例を経験したのでこれまでの知見について報告し，諸賢の御教示を仰ぎたい．

症例：31歳主婦　主訴：続発？無月経，挙児希望

病歴：15歳の時1日，以来10年間に2回の少量の月経様出血（1～8日間）を認めたのみで25歳以降無月経持続．

現症：LH 2.2～2.7，FSH 5.8～8.0IU/ml，E_2＜5 pg/ml，PRL 0.7 ng/ml，第2度無月経，Clomid 150 mg×5日，DXM 1 mg×12日とhMG 1,200IU＋hCG 10,000IU併用投与でも血中E_2値は増加せず，排卵も起こらない．卵巣は25×14×6 mm程度の発育不全型で，相当数の原始卵胞からhMGによる刺激によると思われる発育卵胞を認めた．現在，Gn-RHの律動的持続注入法を検討中である．

2．血中LH分泌状態からみた思春期月経異常例の検討

○松浦講平・本田律生・西村　弘
岡村　均　　（熊本大産婦）

機能性原発性無月経（PA）5例（Ⅰ度：4例，Ⅱ度：1例）と続発性無月経（SA）7例（Ⅰ度：6例，Ⅱ度：1例）において，午後1時から4時間15分間隔で連続採血を行い血中LHの分泌動態を検討した．年齢は14歳から22歳までで，PA例は全例，不完全な二次性徴の発現を認めている．SAのうち4例は初経開始から周期が不順であり，2例は体重減少，1例は環境の変化を契機として無月経となっている．LHパルスの頻度はPAの1例が全く認められず，残り4例は1回から3回認め，強度は3.8から11.8m IU/mlであった．3回のパルスを認めた1例は無治療で月経が自然発来し，1例にLH-RHパルス療法を行い月経初来をみた．SAのパルス頻度は1回から3回，強度は2.0から6.8mIU/mlであった．初経から不順周期の1例は血中T値が75 ng/dlで，LHの平均値（14.4 mIU/ml），パルス頻度（3回），強度（4.7mIU/ml）はPCOパターンを示した．治療はLH分泌状態と二次性徴の発現度に個別化し経過を観察している．

3．精巣性女性化症候群2症例のアンドロゲン受容体遺伝子の点突然変異に関する検討

○有馬隆博・今村利朗・本多つよし
佐々木雅弘・加藤秀則・宮本新吾
和気徳夫
（九州大生体防御医学研究所産婦）

精巣性女性化症候群（TF）とは，遺伝的には46XYの男性型であるにもかかわらず，表現型が全く女性である劣性遺伝病である．その原因の1つとして，アンドロゲンレセプター（AR）の異常が指摘されている．ARは，ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属し，N末端ドメイン，DNA結合ドメイン，ステロイド結合ドメインから成り，8つのエクソンで構成される蛋白である．今回我々は，TFの2家系のAR遺伝子について，PCR-SSCP解析法を用い，点突然変異の起こる領域を同定し，塩基配列を決定した．2症例とも，ステロイド結合ドメインに異常を認めた．うち1症例は点突然変異であり，その母親ではMetとValのHeterozygous mutationを有していた．この結果このアミノ酸の置換が，ARへのアンドロゲンの結合活性を低下させ，TFを引き起こさせたものと推察された．

4．マウス体外受精系に及ぼす子宮内膜症患者腹水の検討

○本田律生・松浦講平・岡村　均
（熊本大産婦）

ヒト腹腔マクロファージ（MΦ）が受精や初期胚発育に及ぼす影響を検討する目的で腹水よりMΦを分

離し，これをマウス体外受精系，2細胞胚培養系に生体内濃度にて添加共培養した．

（方法）BDF 1 雌マウスにPMSG，hCGによる過排卵刺激を行い卵を採取，同系雄の精子を媒精し24時間後に2細胞化率を検討した．2細胞期胚はhCG投与当日に同系雄と交配させ2日後に採取し，72時間後の胚盤胞化数を判定した．MΦは腹水を遠沈後，Gey's solutionにて赤血球を除去して回収し，細胞数を算定後実験に供した．

（結果）子宮内膜症群の24時間後2細胞化率は61.3% (49/80) であり対象群75.9% (221/291) に比べ有意に低率であったが，非子宮内膜症群は69.2% (164/226) で対象群と有意差はなかった．2細胞期胚の胚盤胞化率は子宮内膜症群は91.3% (55/61) であり対象群の90.2% (42/46)と差はなかった．

5．性交困難症を伴った子宮内膜症に対するDanazol療法の臨床的検討について

○石　明寛・吉田耕治・岡村　靖
（産業医大産婦）

子宮内膜症は性成熟期婦人に好発する疾患であり，我国に近年増加傾向にあるといわれている．その原因，臨床像，診断および治療などについては，数多くの報告が見られている．周知のように臨床像としては月経困難，性交痛などの疼痛症状が中心である．しかし性交痛についての検討はあまり行われていないようである．今回われわれは性交困難症を訴えている7名の子宮内膜症患者を経験したのでDanazol投与前後の変化を報告する．対象は平成3年1月7日より平成3年12月28日までに当科外来を受診した患者中より臨床的にあるいは開腹や腹腔鏡で診断した子宮内膜症患者7名である．内訳は性交不能は1名，性交痛6名，性交嫌悪3名 (重複例あり) で，Danazol 400mg/dayを4カ月間投与後，全例性交困難症がかなり改善され，性交不能の患者はその後妊娠に至った．Danazolによる低エストロゲンによる性交困難症の増悪と思われる症状は認められなかった．

6．子宮鏡下内膜ポリープ切除後に妊娠した続発不妊の1例

○寺尾公成・江川久枝・本田正之
（宮崎県立延岡病院産婦）

子宮腔内の肉眼形態を直視下に観察する手段として，子宮鏡は唯一無二のものである．近年，子宮鏡の普及により，子宮腫瘍や不妊症領域の診断・治療において新しい局面を迎えるようになった．

今回，34歳，1G1P，不正性器出血および3年間の続発不妊を主訴として来院し，まず不正性器出血の原因検索の一環として，子宮鏡を施行したところ，左卵管子宮口近傍に子宮内膜ポリープを認め，ポリープ除去により止血，そして直後の月経周期で妊娠成立した症例を経験した．

不妊原因検索の中で子宮鏡の占める役割および子宮内膜ポリープが不妊に及ぼす影響について，考察を交え発表する．

7．当科における過去10年間の腹腔鏡検査の検討

○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）

昭和57年1月から平成3年12月までの10年間に222例の診断的腹腔鏡検査を行った．当院には救命救急センターが設置してあるためか定時の検査が147例，66.2%であるのに対して，非定時は75例，33.8%と比較的多かった．従って検査を子宮外妊娠の疑いで行ったものが77例，34.7%と最も多く，次いで不妊症59例，26.6%，子宮内膜症43例，19.3%の順であった．子宮外妊娠の正診率は79.3%で，検査により早期に診断できる場合が多いが，治療は卵管の切除を行うことが多く，一次的に機能温存手術を行う例は少なく，今後改善せねばならないと思っている．不妊症59例中，腹膜因子の検査目的で行ったものは41例，69.4%であったが，子宮内膜症18例，炎症性癒着5例，ダグラス窩溜血3例，子宮筋腫2例等が主なものであり，特別の異常のないものも10例あった．

卵管因子を考えて行ったものは14例，23.7%であったが，左右の卵管の通過性がHSGとインジゴカルミン液注入の場合で逆のものもあった．

8．子宮外妊娠に対する腹腔鏡下MTX療法および開腹手術後のhCG値の推移に関する検討

○藤下　晃・中村恒一・山下　洋
小濱正彦・鮫島哲郎・増崎英明
石丸忠之・山辺　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) 注入を行い，注入前後の血中および尿中hCG値の推移を調べた．また，controlとして開腹手術を行った外妊例と比較した．

〔対象〕腹腔鏡下にMTXを注入した7例および開腹

手術を施行した9例を対象とし，術前および術後のhCG値の推移を検討した．

〔結果〕MTX療法7例中3例はMTX単独注入で尿中hCG値は順調に下降したが，3例は尿中hCG値が再上昇したため，MTXの全身投与を併用した．また，1例はその後破裂したため再開腹した．開腹手術の内訳は保存手術5例，根治手術4例であった．なお尿中hCG値が50IU/L以下になるまでに要した日数は腹腔鏡下MTX注入例で平均24日，開腹手術例では7日であった．

〔考察〕腹腔鏡下MTX注入療法は，未破裂の卵管妊娠に対して有用と思われる．ただし，尿中hCG値の下降は開腹手術に比べて遷延し，また，再上昇する例もあることから，厳重な管理が必要と思われた．

9．抗リン脂質抗体陽性の6例

○河野雅洋・石丸忠之・山辺　徹
（長崎大産婦）

最近5年間に当科を受診した不育症のうち，抗リン脂質抗体が陽性であったものは6例であった．抗核抗体陽性，抗ssDNA抗体陽性およびIgGクラス抗cardiolipin抗体 (ACA) 陽性は6例に共通した所見であり，さらに5例ではlupus anticoagulant (LA) も検出された．また，2例では抗dsDNA抗体が検出され，1例では抗ENA抗体が検出された．経過中に3例が妊娠した．ステロイド・アスピリン併用療法 (SA療法) を施行し，LA陰性の1例 (ACA陰性化) では生児を得たが，LAが陰性化できなかった2例 (ACA陰性化1例，陽性持続1例) ではいずれも妊娠中期に子宮内胎児死亡をきたした．以上の検査所見および臨床経過より，抗リン脂質抗体陽性の不育症では，抗リン脂質抗体以外の自己抗体も検出される可能性が高いこと，およびSA療法時には，LAが妊娠予後の指標となりうることが示唆された．今後，SA療法失敗例には，ヘパリン療法などを考慮していく必要があると思われる．

10．相同染色体間ロバートソン転座を示した習慣流産の1例

○横山幹文・佐野正敏・野崎雅裕
中村元一・中野仁雄　（九州大産婦）

習慣流産夫婦における染色体異常の頻度は，3—6％と言われている．我々は，13番相同染色体間ロバートソン転座の症例を経験したので報告する．

症例は，初診時28歳．26歳で結婚後，26歳，27歳で2回の連続する妊娠初期の自然流産歴があり，今回他院にて妊娠12週5日で胎内死亡との診断を受け，当科紹介となった．子宮内容除去術後の原因検索を施行したところ，本人の染色体分析で，45XX, t (13q13q) の核型であることが判明した．夫の核型は，46XYで異常を認めなかった．流産絨毛の染色体分析では細胞増殖不良のため，母体細胞の混入と考えられる45XX, t (13q13q) であった．他の原因検索では，抗核抗体価40X以外異常所見はなかった．本症例では，受精卵は全て13トリソミーか13モノソミーとなり，正常児を出生する確立はゼロのため，注意を要するものと考えられた．

11．経腟的卵管内カテーテル法の臨床応用に関する研究

○森　明人・沖　利通・竹内一浩
山元慎一・福元清吾・砂原昭一
堂地　勉・永田行博（鹿児島大産婦）

我々はJansen-Anderson Intratubal Transfer Setを用い経腟的卵管内胚移植 (TV-TEST) を試みた．またAIH不成功例に対して，このカテーテルで卵管内AIHも試みた．IVF-ETを2回以上施行し妊娠しなかった症例のうちで，少なくとも片側の卵管の疎通性が保たれている15例にTV-TESTを施行した．IVF-ETの適応は男性因子が5例，原因不明が10例であり，年齢は33.2±2.5歳，不妊期間は8.9±2.4年であった．媒精後20～24時間で前核期胚を片側卵管に最高3個TV-TESTした．卵管内AIHは従来のAIHを10回以上施行しても妊娠に至らなかった男性不妊7例および機能性不妊6例の13例 (16周期) に試みた．そして，卵管内カテーテル挿入成功率や妊娠率などを検討した．28周期中25周期 (89.3%) が卵管内に2分以内に容易に挿入でき，経腹超音波でも確認された．しかし，3例は挿入不可能であった．TV-TESTを施行した11例中3例 (27.3%) に妊娠した．うち1例は子宮外妊娠に終わった．卵管内AIHでは12例中3例 (25.3%) が妊娠した．TV-TESTは極めて簡便で侵襲が少ないことからIVF-ETRやGIFTにとって変わる方法であることが示唆された．また，このカテーテルは卵管内AIHへの応用も可能である．

12．精子無力症におけるペントキシフィリンの有用性

○蔵本武志・高崎彰久・平塚圭祐
森岡　均（済生会下関総合病院産婦）

精子無力症の精子を精子中のcAMPを増加させると報告のあるペントキシフィリン (PF) で処理し，そ

の精子運動能改善に対する有用性について検討した．

（方法）精子無力症8例を対象とし，以下を検討した．(1) Sedimentation法による精子調整とPFの効果：原精子懸濁液を10% HTFを加えたwell内で1時間培養後，上清をcontrol (sC) 群とPF 2 mg/ml添加 (sPF) 群に分け，さらに30分間培養後遠心し，再懸濁後カウントした．(2) Percoll法による精子調整とPFの効果：80% Percoll液による攪拌密度勾配法にて精子処理を行い，(1) と同様pC群とPF添加 (pPF) 群に分け検討した．

（成績）Sedimentation法では，sPF群はsC群に比べ，精子運動率，直線運動精子率とも改善された．Percoll法でも同様の所見が見られた．数回のPercoll AIHで妊娠しなかった精子無力症において，精子をPF処理しAIHを施行したところ，3例が妊娠した．

（結論）PFは精子無力症の精子運動能を改善させることが明らかとなった．

13. Sperm survival testに及ぼす精漿の影響について

○布施正樹・藤下　晃・山下隆則
石丸忠之・山辺　徹　（長崎大産婦）

最近，精漿中に精子運動促進および抑制因子が存在すると言われている．そこでspermsurvival (SST) の結果に及ぼす精漿の影響について検討した．

［対象］当科でSSTを施行した31例を対象とした．SST別の内訳は，Grade Ⅰ 12例，Grade Ⅱ，ⅢおよびⅣは19例であった．

［方法］対象から精液を用手的に採取し液化させた．この液化精液を二分し，以下の2方法でSSTを施行した．すなわち，A法：orriginal SSTおよびB法：液化精液に精漿を1：1に混和し，SSTを施行した．すなわちGrade Ⅰの例ではGrade Ⅱ，ⅢあるいはⅣの精漿，Grade Ⅱ，ⅢあるいはⅣの例ではGrade Ⅰの精漿を混和した．そして，AおよびB法のSST結果を比較検討した．

［結果］SST Grade Ⅰを呈した12例は，B法がA法に比べSSTの陽性時間は全例短くなった．またGrade Ⅱ，ⅢおよびⅣを示した19例は，B法がA法に比べSSTの陽性時間はすべて長くなった．

［考察］精漿中には，SST結果に影響をあたえる因子が存在する．

14. 精巣上体尾部精子回収法の開発とその臨床成績

○山田義治・田中　温・出嶋秀明
末吉　基・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）

精子運動率が20%以下の重症精子無力症に対しては有効な治療法がないのが現状である．この重症精子無力症76症例に対し我々は，精巣上体尾部精子の回収法を開発し，臨床に応用し有用な結果を得たので報告する．腰椎麻酔下に陰嚢正中部を切開し，精巣上体尾部を露出させた後に，内径約100～200 μm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．吸引した精子を50～100 μmのHTFに注入し，その1～2時間後に媒精した．媒精後は症例に応じZIFTまたはIVF-ETを施行した．

［結果］①培養液中の精子濃度が50×10^4/ml以上，精子運動率が50%となりえた症例は46例 (60%) であった．②良好精子が回収された46例に体外受精を行い，前核形成を認めた32例に対し，IVF-ET21例，ZIFT11例施行した．③IVF-ET21例施行中10例，ZIFT施行11例中5例で妊娠に成功した．流産例はそれぞれ1例ずつであった．ZIFT施行中1例は正常分娩 (双胎) に至った．

15. 体外受精胚移植後の子宮内外同時妊娠

○堂地　勉・沖利　通・森　明人
山元慎一・福元清吾・王谷英仁
竹内一浩・砂原昭一・永田行博
（鹿児島大学産婦）

子宮内外同時妊娠は，30000例に1例といわれる．今回，我々は体外受精胚移植 (以下，IVF-ET) 後に子宮内外同時妊娠した症例を経験し，若干の知見を得たので報告する．

症例は29歳．両側卵管閉塞の診断でIVF-ETを行い，4回目で妊娠．妊娠4週時，軽度OHSSの診断で入院．入院後OHSSも軽快し，子宮内に胎児心拍を確認したため，妊娠8週で退院した．しかし，退院後，突然の下腹痛とショック状態で再入院．既に子宮内に胎児心拍はなく，子宮外妊娠の診断で緊急開腹した．左卵管峡部妊娠破裂で左卵管切除を行った．OHSSがあったため，初回入院時外妊の診断をしえなかった．

IVF-ETでは複数個の胚を移植するために，子宮内妊娠が確認されても子宮外妊娠の可能性も考えておくことが重要と思われた．

16. IVF-ETを行ったPCO 3症例の検討

○詠田由美・吉満陽孝・池田景子

小山雅子・白川光一
(福岡大産婦)

PCO例におけるIVF-ETに関する報告は少ない．当科にて3例のPCOに対してIVF-ETを行ったので，その結果を正常卵巣機能群と比較検討した．3例はそれぞれ26歳，27歳，36歳の排卵障害を有する不妊症で，PCOの診断は内分泌学的検査および腹腔鏡検査にて確認された．2例に卵管因子，1例に男性因子を認めたためIVF-ETを行った．卵胞刺激には3例ともブセレリン併用による下垂体脱感作後にhMG投与を開始した．hMG投与量は正常群とほぼ同量であり，発育卵胞数および採卵数は正常群より多かった．しかし，採卵された卵の成熟度は，未熟な傾向を認め，3例の受精率は20%以下となった．なおhCG投与直前のLH値1.5mIU/ml以下と低値であった．さらに3例中2例にOHSSを併発した．以上の結果より，PCOにおけるIVF-ETでの卵胞刺激法に関してさらなる検討が必要であると思われた．

17．IVF-ETにおける一卵性双胎の1例

○伊波　忠・山城竹信・佐久本哲郎
東　政弘・中山道男　(琉球大産婦)
内間栄行　(同　法医学)

自然排卵後の双胎例は，本邦では一卵性が62%と多いが，IVF-ETによる双胎例で一卵性を呈する報告は少ない．今回我々は，IVF-ETにて4個の胚移植を行い，一卵性双胎の1症例を経験したので，妊娠経過中の超音波像を加え，若干の文献を交えて報告する．

症例は38歳，16年不妊．男性不妊と診断し，IVF-ET初回で妊娠した．妊娠初期はGSが1個のため単胎と思われたが，妊娠14週で双胎と判明した．妊娠15週には，超音波にて毛髪状の隔膜を確認した．妊娠後期に入り，入院管理を行ったが，両児ともAGAで切迫早産の徴候もごく軽度であった．妊娠37週4日に帝王切開術を行い，両児とも女児で，2354g，2210gの生児を得た．胎盤は1個で，両臍帯血管は胎盤内での第3血行を確認した．両児の血液型，因子型，DNAフィンガープリント法はすべて一致し，一卵性双胎であった．

18．IVF-ETの成績からみた卵巣のagingに関する検討

○砂原昭一・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)

［目的］ヒト卵巣が，加齢の影響をどのように受けるかを，当科IVF-ETの治療成績から検討した．
［方法］IVF-ET症例を年齢により29歳以下22周期，30歳以上34歳以下51周期，35歳以上39歳以下37周期，40歳以上10周期の4群に分けた．そして卵胞発育に要したhMG総投与量，穿刺卵胞数，回収卵数，穿刺卵胞あたりの卵回収率，男性因子を除いた回収卵あたりの受精率に関し，各群で比較検討した．
［結果］hMG総投与量は，若い年齢群より順に(以下同様)，平均1377，1387，1539，3008IUであった．穿刺卵胞数は，平均9.2，8.2，7.9，3.7個であった．回収卵数は，平均6.7，6.1，5.1，1.0個であった．卵回収率は，76.5，76.0，68.3，27.3%であった．受精率は，63.2，72.2，54.0，33.3%であった．
［結論］加齢により，ゴナドトロピンに対する卵巣の反応性の低下，卵子発育および受精能の低下が認められる．これらは，特に40歳以上で顕著である．

19．過排卵刺激に対する反応性に及ぼす因子の検討

○西村　弘・松浦講平・田中信幸
河野哲郎・本田律夫・小山伸夫
岡村　均　(熊本大産婦)

体外受精・胚移植(IVF-ET)による妊娠率向上には分割可能な良好な卵をより多く採取する必要がある．当科において平成3年までにIVF-ETを施行し得た171例の採卵数を採卵率，卵の分割率に及ぼす因子を検討した．今回検討したのは，1)年齢，2)不妊因子，3)不妊期間，4)GnRHa投与法，5)hMG投与量，6)既往手術歴である．
(結果) 1) 採卵数には，年齢とGnRHaの投与法が関与しており40歳以上，GnRHa未投与例ではその採卵数が少ない．2) 卵の分割率は，年齢，不妊因子(男性因子，機能性不妊等)，hMG投与量，GnRHa投与法が関与している．3) 採卵率には，各因子で差がなかった．4) 既往手術歴のうち，片側卵巣摘除の例で，有意に採卵数が減少した．以上の結果より，年齢や不妊因子を考慮したhMG投与量が必要であり，GnRHaの併用が望ましいものと考えられた．

20．マウス，サルにおけるEmbryo BiopsyとPCR：着床前遺伝子診断モデル

○竹内一浩・永田行博
(鹿児島大学産婦)
Hodgen, G. D.

(Jones Institute, Eastern
Virginia Medical School)

Polymerase chain reaction (PCR) 法とmicromanipulation法の開発により着床前に胚より，抜き取った一つの割球を使って遺伝病を診断することが可能となった．我々はヒトEmbryo Biopsyの動物モデルとしてマウス (B_6 D_2 F_1) およびサル (Macaca Fascicularis) の4ないし8細胞期胚を用いてEmbryo Biopsyを行った．方法は我々の考案したEnucleation, Aspitation, Extrusionの3法を用いて行い，その有用性，安全性ならびにEmbryo Biopsyが2世代にわたって胎仔の発育等に影響を及ぼさないことは既に報告した (K. Takeuchi et al. Fertility and Sterility, 57; 425, 1992). PCR法はSaikiらの方法を一部modifyし，マウスDNAについてはOTC gene (88bp)，サルについてはヒトと共通のTS exonll mutation (159BP) のprimerを用いた．PCRによりDNA productsは100%検出可能であり，これらは着床前遺伝子診断モデルとして極めて有意義であると言える．

21．重症男性不妊症に対する顕微授精の臨床応用

○田中　温・山田義治・出嶋秀明
末吉　基・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)

射出精子濃度が500万/ml以下および精子運動率が20%以下の重症男性不妊症に対し顕微受精を施行したのでその成績について報告する．顕微受精は①透明帯開孔術，②囲卵腔内精子注入，③卵細胞質内精子注入の3法とし，媒精時の精子運動率が30%以上では①，30%以下では②または③を施行した．採卵後5～12時間の前培養後，0.1%ヒアルロニターゼで顆粒膜細胞を外し，①，②においては0.3 M sucrose浸漬後，施行した．②における注入精子数は1～30匹とした．③における注入精子数は1匹とした．先体反応を誘起する方法として，凍結融解，A_{23187}-Caイオノフオア，卵胞液を使用した．

各々における臨床成績を発表する．

22．顕微授精における先体反応誘起のための各種精子処理法の検討

○田中威づみ・田中　温・山田義治
出嶋秀明・末吉　基・吉田一郎
竹本洋一・鷹野和哉
(セントマザー産婦)

精子が透明帯を通過し，卵子と授精するためには精子の運動性の変化および先体反応の発生が必要である．顕微授精の成功のための要因の一つとして，いかに高率に，しかも精子の運動能を低下させずに，先体反応を誘起できるかが注目されている．今回我々は当院において行われている，先体反応誘起のための各種精子処理法を検討したので報告する．①凍結融解法，②A_{23187}-Caイオノフオア，③卵胞液を各々使用した．①：凍結保護剤としてはKS-Ⅱを用い急速凍結し急速に融解した．②：Caイオノフオアは，1～5μMを2—5分間作用させた．③：HFF，PFFを精子の状態に応じ使用した．以上の各種精子処理における発生率は① 14% (28/200)，31% (62/200)，② 1～31%，2～43%，③ 11% (33/300)，3% (8/300)であった．

23．IVF-ET，GIFT，ZIFTにおける凍結・融解精子の有用性について

○鷹野和哉・田中　温・山田義治
出嶋秀明・末吉　基・田中威づみ
吉田一郎・竹本洋一
(セントマザー産婦)

排卵日にどうしても夫が来院できない場合，我々は精子の凍結を行ってきた．凍結・融解精子は射出精子に比べ，受精・卵割率は劣るであろうと考えていた．しかし，今回，これまでの凍結・融解精子を用いた臨床成績をまとめた結果，凍結・融解精子の方が妊娠率が高い結果となった．その結果を報告する．

凍害保護剤はKS－Ⅱを使用し，急速凍結および融解は兼子らの方法に従った．融解後HTFで洗浄後，100～200万/mlの濃度に調整し，直ちに媒精に供した．

現在までに凍結精子を用いたIVF-ET，GIFT，ZIFTにおける妊娠率は41% (21/61)，50% (4/8)，44% (7/16)で，射出精子を用いたIVF-ET，GIFT，ZIFTにおける妊娠率は24% (721/3004)，31% (263/848)，35% (117/334) であった．

24．当科におけるIVF-ET 4年間の成績

○新川唯彦・中里和正・宮良美代子
高宮城直子・佐久川政男・新崎盛雄
佐久本哲郎・東　政弘・中山道男
(琉球大産婦)

当科にてIVF-ETを導入した1988年1月より1991年12月までの4年間に同法を施行した症例について

その成績を報告する．

症例総数は322例，710周期，平均年齢は36.6歳であった．ET総数483例で妊娠数は96例，妊娠率は周期当たり13.5%，ET当たり19.7%であった．妊娠96例の予後は，分娩40例 (41.7%)，on-going 25例 (26.0%)，流産31例 (32.3%)であった．年次別治療成績の傾向として，治療周期数，ET数，妊娠数，妊娠率の増加と流産率の低下がみられた．不妊原因別妊娠率は卵管因子16%，男性因子30%，原因不明30%，卵管＋男性因子13%，その他33%であった．刺激法別妊娠率はHMG単独9.1%，GnRHa短期併用23%，GnRHa・Long 18%，でGnRHa併用群で良好な成績であった．ET施行時の内膜厚別妊娠率では，8 mm以上で23%，8 mm未満で2%となり，妊娠の成立には一定以上の内膜の発育が必要と考えられた．その他各種因子別の妊娠成績についても検討した．

特 別 講 演

哺乳類初期胚発生に及ぼす環境因子の解析

野田洋一（京都大産婦）

第34回日本不妊学会北海道地方部会総会

日　　時：平成4年2月29日（土）
場　　所：株式会社ムトウ会議室
例会長：北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座
　　金川弘司

1．ウシ凍結精液の受胎率と体外受精率および先体反応誘起率との関係

○河口真知子・高橋芳幸・菱沼　貢
金川弘司
（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）
岩住安晃　（北海道家畜改良事業団）

ウシ凍結精液を用いた人工授精時の受胎率における種雄牛差と，体外受精率および精子の生体反応誘起率との相関を，ヘパリンの影響に着目して検討した．9頭のウシ凍結精液を用いて体外受精試験を行うとともに，これらの種雄牛の人工授精成績を授精台帳をもとに調べた．種雄牛により体外受精率に大きな差が見られたが，受胎率との間に有意な相関は認められなかった．4頭のウシ凍結精液についてはヘパリン存在下で培養し，ナフトールイエローS/エリスロシンB染色法で先体反応が誘起された精子の割合を求め，受胎率との相関を調べた．培養時間の延長に伴い，ヘパリンの有無による先体反応誘起率に差異が現われ，6時間目ではヘパリンの有無による先体反応誘起率の差と受胎率の間に$r=0.913$で有意な相関が認められた ($p<0.05$)．しかし，この方法については検討例が少なく，現在残り5頭について検討中である．

2．豚体外受精の雄性前核形成に及ぼすβ－メルカプトエタノールの効果

○鈴木啓太・森　匡
（北海道大農学部畜産学科）

目的：体外受精した時，卵細胞質に侵入した精子の前核形成不全が観察される．受精時に卵子の細胞質成熟が完了していれば，侵入した精子は雄性前核を形成できると考えられる．グルタチオン合成を間接的に促進すると考えられるβ－メルカプトエタノール (β－ME) を種々の濃度で成熟用培地に添加し，前核形成率を比較した．

方法：豚屠場卵巣より吸引採取した顆粒層細胞に包まれた卵子を48時間成熟培養した (成熟培地：FCS 10%，pFF 10%，FSH 0.025mg/ml，LH 1 mg/ml，A.B.を添加したWaymouth培地)．成熟培地にはβ－MEを0，20，50，100μMになるように添加した．成熟培養後，精巣上体精子 (4×10^6/ml) により5時間媒精し，その5時間後に卵子の固定標本を作成した．

結果：成熟率と受精率はβ－MEの濃度によらず高率であった．平均侵入精子数は3.2から5.4であり，雄性前核形成率は，0，20，50，100μM濃度で各々12.3%，28.4%，78.2%，89.0%と，β－ME濃度の上昇に伴って高まった．

3．ウシ体外受精卵の発育に及ぼすインスリンの影響

○松井基純・菱沼　貢・高橋芳幸
金川弘司
（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

マウス胚の発育を促進するインスリンがウシ初期胚の発育に及ぼす影響を調べるために，合成卵管液 (SOF) を基礎培地として体外受精卵の体外培養を行った．

血清添加培地における桑実胚への発育率は，インスリン (5 μg/ml) を添加した場合 (27.3%)，無添加

(13.8%) に比べ有意に増加した．アミノ酸を含む合成培地で培養した場合，桑実胚への発育率は，インスリンの添加用量に依存して増加する傾向がみられた．インスリンの添加によって胚盤胞への発育率は改善されなかった．しかし，桑実胚期以降 (媒精後5日目) に1 mMのグルコースとインスリン (1あるいは10μg/ml) を添加した場合，胚盤胞の平均細胞数 (116.3あるいは122.8個) はインスリン無添加対照群 (76.1個) に比べて有意に増加した．

以上のことから，ウシ体外受精卵の培養において，培養液へのインスリンの添加は桑実胚への発育を促進することが示された．また，桑実胚期以降において，グルコースとインスリンによる協力的な効果により胚の発育促進が認められた．

4．各種GnRHa投与法別のIVF-ET周期 (1991年) における成績の検討

○内潟芳之・高岡康男・玉手健一
千石一雄・石川睦男・清水哲也
(旭川医大産婦)

従来，体外受精・胚移植周期においては多数の卵胞を発育させるためにclomiphenやhMGを用いた過排卵刺激法が施行されてきたが，同方法においてはprematureluteinizationやlow responseなどが比較的多いことが明らかとなり，近年ではこれらを防ぐ目的でgonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) の併用が行われ，良好な結果が報告されつつある．しかしながらGnRHaの投与時期，期間等には施設により種々のprotocolがあり，その成績，適応等に関し，まだ確立されたものはない．今回我々は91年1月より12月までに当科において種々のGnRHa投与方法により行ったIVF-ET周期80症例，110周期における投与方法別の背景因子および採卵中止率，卵胞数，採卵数，受精率，妊娠率等を比較検討したので報告する．

5．ヒト唾液中プロゲステロン測定の有用性に関する検討

○高岡康男・内潟芳之・玉手健一
千石一雄・石川睦男・清水哲也
(旭川医大産婦)

今回，体外受精・胚移植の患者から連日採取した唾液中のプロゲステロン値を，Enzyme immunoassay (EIA) 法を用いて測定し，血清プロゲステロン値との比較を含め，その有用性に関し，検討した．唾液中のプロゲステロン値は，卵胞期，hCG投与日，採卵日および黄体期で比較すると，hCG投与日以降，著明な上昇を認め，測定値は血清プロゲステロン値の約1/10の値を示し，相関係数は，EIA法とでは，r=0.857，RIA法とでは，r=0.776と，ともに高い相関を示した．本法は，非侵襲的に連日検体を採取することが容易であり，黄体機能の評価や，排卵予測に関する有用性が示唆された．

6．IVF症例における未受精卵の染色体分析

○西岡共子・高岡康男・内潟芳之
玉手健一・千石一雄・石川睦男
清水哲也（旭川医大産婦）
立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉
（同　生物学）

従来ヒト卵子染色体異常に関して多くの報告があるが，標本作製法の不備により，その結果の信頼性は必ずしも高くない．今回我々はIVFの際，媒精後に受精せずに残った卵について漸進固定・空気乾燥法 (Mikamo & Kamiguchi, 1983) を用いて標本化し染色体分析を行った．標本作製された未受精卵116個のうち，退化卵，分析不能卵を除いて76卵 (65%) が核型分析された．染色体異常頻度は，異数性8例 (10.5%)，構造異常4例 (5.2%)，倍数性異常2例 (2.6%) であった．異数性の内訳は高数性4例 (5.2%)，低数性3例 (3.9%)，複合型の異常1例 (1.3%) であった．

今回の結果を含めてこれまで発表された研究のうち，我々と同じ方法を用いたものとそれ以外の方法を用いたものとの間の異常頻度の差異に関して検討を加えた．

7．哺乳類卵子の成熟段階に依存した放射線感受性とDNA修復能の変化

○立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉
(旭川医大生物学)

チャイニーズハムスターでは排卵の十数時間前 (LHサージ後) から卵子染色体の放射線感受性が急激に増加し，構造異常が高頻度で出現するようになる．この放射線感受性の変化に卵子DNA修復能が関与していることが考えられる．そこで我々は，DNA修復阻害剤であるカフェイン (50～100μg/g体重) を卵子が放射線抵抗性である時期の雌チャイニーズハムスターの腹腔内に注射して，卵子染色体に対するX線 (2 Gy) の影響が変化するか否かを検討した．X線単独処理群，カフェイン単独処理群に比べカフェインとX線の二重処理群で顕著な染色体異常頻度の

増加を認めた．これはカフェインがX線照射後の不定期DNA修復を阻害したために生じた変化と考えられる．この結果から，卵子では成熟段階に依存してDNA修復能が変化していて，それが卵子染色体の放射線感受性を少なからずコントロールしていると解釈することができる．

8．制癌剤のヒト精子染色体異常誘発能

○上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉
（旭川医大生物学）
飯沢禎之　（福島医大産婦）

ヒト精子とハムスター卵子の間の異種間体外受精法を応用して，6種の制癌剤，ブレオマイシン (BM)，サイクロフォスファミド (CP)，ダウノマイシン (DM)，メタンスルホン酸メチル (MMS)，マイトマイシンC (MMC)，トリエチレンメラミン (TEM) のヒト精子染色体に及ぼす影響をin vitroで調査した．分析例数は実験群で2,368精子，対照群で2,055精子である．

BM処理群 (50μg/ml，90分)，DM群 (0.1μg/ml，90分)，MMS群 (100μg/ml，120分) およびTEM群 (0.1μg/ml，120分) における構造的染色体異常精子の出現率はそれぞれ24.3%，47.3%，54.1%，50.7%で，対照群での異常精子出現率 (10.1—14.1%) より有意に高かった．また，誘発された染色体異常の種類および頻度は薬品の種類によってかなり異なっていた．

一方，CP群 (1-1000μg/ml，120分) とMMC群 (0.1-100μg/ml，120分) では異常精子の増加は認められなかった．

9．ウシ精子におけるウシ発情頸管粘液通過試験の臨床応用の可能性

○山本康朗・中尾敏彦・中尾　茂
森好政晴・河田啓一郎
（酪農学園大学・獣医臨床繁殖学）
吉井健五郎（ジャパン　ホルスタイン
ブリーディングサービス）

ウシ頸管粘液通過試験 (sperm-mucus penetration test) はヒトにおける客観的で信頼性の高い精子活力検査法として臨床応用されている．今回，本法を牛精液の検査に応用する目的でホルスタイン種牛12頭の凍結精液を用い，Penetration値の再現性，精子活力および精子濃度との相関について検討するとともに，臨床応用の可能性について検討した．

牛凍結精液のPenetration testは1回の検査にストロー粘液を2本用い，37℃で15～120分間のインキュベーションを行った．Penetration値は120分まで時間の経過とともに上昇し，2本のストローの15～120分におけるPenetration値の間に$r=0.98212$ ($P<0.01$) と高い正の相関が認められた．また，精子活力とPenetration値の相関は，時間の経過にともない負の相関から正の相関に移行し，120分値においては$r=0.69936$ ($P<0.001$) の有意な正の相関が認められた．精子濃度とPenetration値の相関は，時間の経過にともない正の相関から負の相関に移行し，精子濃度が高い場合，初期のPenetration値は高くなることが示唆された．さらに重回帰分析により120分値が精子活力と精子濃度の影響を最も良く反映していることが示唆された．以上の結果より，ウシ頸管粘液を用いたPenetration testは牛の精液でも応用可能であり，その場合インキュベーションの条件は37℃，120分間であることがわかった．

10．抗精子抗体を有する不妊婦人血清と反応するヒト精子抗原の検討

○吉田　博・田中俊誠・藤本征一郎
（北海道大産婦）
鎌田正晴・S.S.Koide
（Population Council）

（目的）抗精子抗体が不妊の原因となり得るという説は現在広く受け入れられている．数多くのモノクローナル抗体が精子を用いて作られたが，その多くは精子凝集，不動化作用を示さなかった．抗精子抗体の対応抗原の検討をするために本研究では抗精子抗体含有不妊婦人血清と反応する2種のヒト精子抗原を純化した．

（方法）洗浄後凍結保存した精子をPBS中で4℃，30分攪拌し上清を得た (PBSE)．以後，$NaClO_4$ (CLE)，DOC (DE)，SDS (SE) と漸次強力な可溶化を行った．用いた不妊血清は精子不動化，凝集を示した．抗原の検出はWestern blotting法により行った．抗原の精製はMonoQおよびSuperose 12を用いたFPLC system (Pharmacia)により行った．

（成績）不妊婦人の血清とのみ反応する特異的抗原として，PBSEに50KD，33KDのバンドを，またCLEに33KDのバンドをWestern blotting法により検出した．

11．ダナゾール療法中に認められる肝機能障害の取り扱いに関する検討

○林　正路・桜田芳弘・田中俊誠

藤本征一郎　　（北海道大産婦）

ダナゾール療法中に認められる肝機能障害は，同療法を継続する上で最も重要な要因である．そこで今回，ダナゾール療法に伴う肝機能障害の程度によって，未治療群と肝庇護剤併用群とに分けて，同療法施行中の肝機能の推移を検討したので報告する．

（研究方法）対象は '89. 9 ～ '91. 11までの間に当科ならびに関連施設を受診し，子宮内膜症と診断された55名 (20歳～49歳) の婦人である．

ダナゾールは原則として 1 日400mgを16週間投与し，肝機能は投与前後および投与中 4 週毎にチェックした．

（成績）肝機能障害は55名中10例 (18.2%) に認められた．このうちGOT，GPTともに90・IU/l以下の例を未治療群としたが，いずれにも16週まで未治療のままダナゾール投与を継続できた．GOT，GPTのどちらかが90・IU/l を超えた症例にはその時点で肝庇護剤を併用投与したが，併用によって16週まで投与可能であった．投与中止例は投与後 4 週目でGPT 392・IU/l と上昇した 1 例のみであった．

12．非観血的な方法による子宮内膜症実験モデルの作製

○室城宸一・桜田芳弘・林　正路
田中俊誠・藤本征一郎
（北海道大産婦）

外科的操作を必要としないマウスを用いての実験的子宮内膜症の発生が可能か否かを検討することを本研究の目的とした．以下の方法で作製した．① 6 — 8 週齢の雌 (♀)，雄 (♂) の近交系のC 3 H/HcとBALB/cマウスを用いた，②ネンブタール麻酔下の♀の子宮口から耳鼻科用オトスコープを用いて♂より採取した下垂体を右子宮角に挿入した，③移植直後および 5 週後より胡麻油に溶解したestradiol (E_2) を10回 (1 /週) 腹腔内投与した．なお移植後約20週において開腹し，両側の子宮を採取し，内膜症の発生を肉眼的ならびに組織学的に検討した．

成績として①移植後15週以内では内膜症の発生は認められなかった，②内膜症の発生は，移植17週以降で確認された，③移植後17週で20% (1 / 5)，以下同様に20週で33% (10/30)，23週で43% (16/37)，25週で90% (9 /10) に内膜症が発生した．

13．不妊症におけるクラミジア感染

○桜田芳弘・林　正路・古田伊都子
田中俊誠・藤本征一郎
（北海道大産婦）

（目的）不妊症とクラミジア感染との関係を明らかにするため，1) クラミジア抗原検出法および抗体測定法の意義，2) 不妊婦人の抗原および抗体陽性率，3) 卵管因子と抗体価との関係について検討した．

（研究方法）対象は1988. 5 ～1991. 10までに不妊外来を受診した500名の不妊婦人である．クラミジアザイム法とイパザイム法にて抗原検出および抗体測定を行った．卵管因子については腹腔鏡ないし開腹手術にて確認した．

（結論）1) 抗原検出法は初期感染に，抗体測定法は活動性や上行性感染の診断および治療効果の判定に有用であると思われた．2)不妊婦人では抗体陽性率が高かった．3)クラミジア感染が卵管性不妊に関与していることが示唆された．

14.当科不妊外来におけるクラミジア感染と卵管因子

○福江ひろみ・山本　弘・木谷　保
西川　鑑・武田智幸・林　卓宏
田中昭一・工藤隆一（札幌医大産婦）
幡　洋　　（東豊病院産婦）

当科の不妊症統計によると，不妊原因の中で卵管因子が最も高い頻度を占めている．その卵管性不妊の原因の 1 つとして，Ch.trachomatis感染が注目されている．今回我々は，1991年 7 月から11月まで当科不妊外来を受診した214症例に対してクラミジア抗体 (IgA，IgG) を調べ，その抗体の有無と，HSG，Rubin test，腹腔鏡検査での異常所見の有無について比較検討した．

また，流産や子宮外妊娠がクラミジア感染と関係があるという報告もあり，クラミジア抗体の有無と流産および子宮外妊娠の既往の有無について比較検討した．

さらに今回，クラミジア治療後に妊娠した症例も経験したので報告する．

15．当科における昭和63年，平成元年度の不妊統計

○東口篤司・森　若治・高階俊光
神谷博文　　（斗南病院　産婦）

IVF-ET，GIFTあるいはSwim-upによるAIHなどによって最近の不妊外来における検査・成績の状況には格段の変化がおきてきている．

第32回の本学会で昭和61・62年度の不妊統計を発

表したが，引き続き，その後の2年間の成績を検討し傾向を比較した．

昭和63年・平成元年度に不妊を主訴として当科外来を受診した289例を対象とし，既往歴，HSG，PCT，子宮内膜検査などの所見，あるいは排卵誘発，AIHなど各種治療法による成績の差異について検討した．

対象289例中125例 (43.3%) が妊娠したが，直接妊娠の契機になった治療法・検査法の種類にも検討を加えたので報告する．

16. 男子不妊外来患者における精漿中の抗C. trachomatis IgA抗体に関する検討

○小六幹夫・熊本悦明・林　謙治
佐藤隆志・広瀬崇興・伊藤直樹
（札幌医大　泌尿器）
神谷博文　（斗南病院　産婦）

男性不妊症の原因の1つに，前立腺や精嚢腺など副性器の炎症があり，中にはC.trachomatisを起因菌とするものもある．そこで男子不妊外来患者112例の血清・精漿中のC. trachomatis特異抗体価をELISA (HITAZYME) にて測定し，精液所見 (運動率，白血球数) との関係を検討した．局所の炎症を反映していると思われる精漿中IgAの陽性率は全体では8.0% (9 /112) であった．精子濃度別に検討すると20×10^6/ml以下では13.6% (3 /22)，20×10^6/ml以上では6.7%が陽性であった．また性液中白血球数5×10^6/ml未満の98例では6.1%が精漿中IgA陽性であった．以上から男子不妊外来を受診する患者のおよそ10%にC. trachomatis感染の可能性が考えられ，特に精液中白血球数の多い患者に抗体陽性例の多い傾向が見られた．また精子運動率との間には有意な関係はなかった．今後さらに症例を増やし，血清での検討を含めて報告する予定である．

17. 高齢者および不妊症における精巣組織所見の検討——特に血管壁の変化を中心として——

○赤樫圭吾・伊藤直樹・南部明民
立木　仁・丸田　浩・熊本悦明
（札幌医大泌尿器）

（目的および方法）精子形成障害に及ぼす血管変化の影響を調べるため，高齢者および不妊症の精巣組織所見を，特に血管壁の変化を中心に検討した．精細管はgerminal cell indexを用いて定量的に分析した．血管壁は小動脈の内腔の直径に対する動脈壁の比を用いて評価した．

（結果および考察）加齢に伴い小動脈壁の肥厚が認められた．この高齢者での小動脈の変化は動脈硬化性変化が主体であった．一方不妊症でも小動脈壁の変化が認められたがその主体は硝子化であった．高齢者では精子形成障害と小動脈の変化は相関し，血管壁の肥厚が精子形成障害の原因の1つと推測された．不妊症では関係を両者の間に認めなかったが，小動脈変化の軽度な症例で治療に対する反応が良好で小動脈変化と薬剤の浸透性との関係が示唆された．なお現在毛細血管について検討しており，あわせて報告する予定である．

18. 捕獲エゾシカの精巣，精巣上体，精嚢腺および精管膨大部の組織学的観察

○増田　泰・菱沼　貢・高橋芳幸
金川弘司
（北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学）

北海道足寄郡足寄町で1991年3月，5月，7～8月に捕獲された野生雄エゾシカ (cervus nippon yesoensis HUDE) 47頭について，精巣，精巣上体，精嚢腺および精管膨大部の組織学的観察，精巣上体尾部精子の採取，そして組織中の精嚢腺果糖量の測定を行い，野生雄エゾシカにおける生殖器の生後発達および季節変化を調べた．

未成熟雄エゾシカでは推定9カ月齢以降，生殖腺および副生殖腺の発育が始まり生後2回目の繁殖期にあたる10月 (推定月齢16カ月齢) には，精巣における精子形成および精嚢腺における果糖量の増加が認められ春機発動を迎えることが確認された．

推定月齢16カ月齢以降では，雄エゾシカの生殖腺と副生殖腺は，亜寒帯および温帯域に生息する他種の雄ジカと同様に繁殖期と非繁殖期とで，発達と退縮を繰り返すことが確かめられた．

特　別　講　演

ヒト血液細胞の保存：現状と将来

高橋恒夫（北海道赤十字血液センター）

ヒト血液細胞の中で赤血球はその保存法が確率されており，液状保存 (4℃) では最近開発された保存液の添加により42日間，グリセリン添加凍結により−80℃で10年間保存が可能である．従来血液センターでは稀な血液型の濃厚赤血球を凍結保存し必要に応じて融解・脱グリセリンし供給してきたが，最近は多くの手術においてエリスロポエチン投与と組み合わせて液状・凍結保存した自己血が輸血に用い

られる様になってきている．血小板は液状振盪保存により現在22℃で3日間保存可能であるが我々は二重バッグを用いたシステムにより23日間血小板機能を維持することに成功している．一方血小板の凍結保存は融解後の回収率は90%あるものの機能は50%以下に低下する．この理由は長く不明であったが我々は凍結過程で血小板膜上の糖蛋白GPIbが特異的に損失することを見いだし，これが血小板凝集能と密接に関与していることを明らかにした．顆粒球の保存は顆粒球輸血が副作用，また抗生物質の改良により従来ほど行われなくなったためその重要性は高くないが，顆粒球は凍結保存が現在でも不可能な細胞の代表例である．一方顆粒球と同じ機能を合わせ持つ単球は耐凍性が極めて高く，ビトリフィケーション (vitrification) による保存が可能である．リンパ球は一般には凍結保存が可能とされているが一部のサブポピュレーションは機能低下すると報告されている．血液細胞の保存で現在最も注目されているのは末梢血中に僅かに存在する造血幹細胞であろう．化学療法後一時的に末梢血幹細胞数は増大するが健常人においてもG-CSFの投与により幹細胞の増加がみられている．末梢血あるいは臍帯血中の造血幹細胞の保存，そして増幅が可能になれば現在問題となっている骨髄バンクドナーの安全性，また血液センターそのものの在り方に大きな影響を与えるものと考えられる．

第106回　日本不妊学会関東地方部会

日　　時：平成4年6月27日 (土)
場　　所：笹川記念会館

1．当科家族計画外来における妊娠例の分娩様式の検討

○吉原　一・川内博人・石川雅一
西島正博・中居光生
（北里大産婦）

家族計画外来で妊娠が成立し，当科で分娩した198例について分娩時の状態を，対照群200例と比較検討した．分娩時に年齢は不妊群が32±3歳で対照群の31±4歳に比べて有意に高齢であった．しかし分娩時週数と出生児体重は両群間で有意差はなかった．両群の分娩様式を比較してみると，不妊群の帝切率は対照群と有意差はなかったが，吸引分娩が高率に行われていた．帝王切開の適応は不妊群では子宮筋腫，骨盤位によるものが多く，対照群では前回帝王切開によるものが多かった．早産率は両群間に有意差はなく，低出生体重児の頻度も有意差はなかった．1分後，5分後のアプガースコアを比較してみると，両群間に有意差はなかった．頭位分娩例について比較してみると，分娩第2期の長さが不妊群で有意に延長していた．以上の結果から当科における分娩では不妊群と対象群の間に大きな違いはなく，おそらく全例に分娩誘発を行っているためと考えられた．

2．当院における不妊症例の検討

○近藤信隆・釵持　稔・三谷　仁
高橋正敏　　（大和市立病院）

昭和58年から平成3年までの大和市立病院産婦人科外来を受診した443名を対象とした．原発性不妊は60.3%，初診時平均年齢は28.9歳，続発性不妊は39.7%と31歳であった．月別初診患者数は1月と10月が10.8%の最多数で，2月が6.1%最少数，6月に9.7%のピークが見られた．原発性不妊の結婚後挙児希望で来院までの期間は20代前半で1～2年で，20代後半は3～4年で，30代前半は2～3年で来院するのが多い．

不妊検査正常は33.1%，男性因子12.6%，排卵因子11%，頸管因子6.8%，卵管因子4.1%，検査来院が34.7%．全例妊娠率は32%．機能性不妊20.8%．初診から妊娠までの年数は1～2年までが85.8%．妊娠例の子宮卵管造影施行率は79.6%．精子数4000万未満でも20%の妊娠率．2000万代11%，6000万代11%と妊娠率は上昇せず．精子運動率80%以上で妊娠率63.2%，運動率40%以下では6.6%と，精子減少症よりも運動率低下が不妊因子として大きい．腹腔鏡でPFA，POAの治療で妊孕性向上温存により不妊症の自然妊娠への治療としている．

3．腹腔鏡後の妊娠例の検討

○望月愛郎・松信　晶・三宅崇雄
佐藤芳昭・大沢章吾
（相模原協同病院産婦）

不妊症の原因は複雑で，診断も困難な症例も多く，治療法は多岐にわたる．腹腔鏡は，手術侵襲の少ない適切な不妊症の診断および治療法である．今回我々は，妊娠成功例の腹腔鏡所見と治療法について検討を加えた．

症例は，原発性不妊症16例，続発性不妊症15例の31例．不妊期間は平均3年1ヵ月．腹腔鏡前後の不

妊原因を比較してみると，排卵障害11例中4例にPCOを認め楔状切除を施行．卵管因子10例中4例には異常なく，原因不明の9例には，PID 4例，子宮内膜症1例を認めた．術前には診断のつかなかったPID 5例，子宮内膜症3例，子宮筋腫3例，卵巣嚢腫1例を確認した．各々の症例に癒着剥離や，エタノール注入，筋腫核出術等，腹腔鏡下手術を行った．腹腔鏡後妊娠までの期間は，平均6.5ヵ月で，正常分娩4例，帝王切開1例，流早産5例，21例は妊娠継続中である．不妊症に対する腹腔鏡診断と，適切な治療が重要と思われた．

4．Asherman症候群治療後に妊娠・分娩に至った1例

梁　善光・塩津英美・大須賀穣
羽田成彦・三橋直樹・武谷雄二
（東京大産婦）

症例は38歳，2G0P．自然流産によるD&C後の月経量減少・挙児希望を主訴に当院受診となった．子宮卵管造影(HSG)によって子宮内腔は両側卵管開口部を含む約6割の部分が癒着による変形を認めたためAsherman症候群と診断し，子宮鏡下に癒着剥離を試みた．しかし内腔の癒着は広範かつ強固を極めたため，胎盤鉗子によって子宮内腔を若干拡張させた程度に留まった．術後のHSGでも卵管は描出できず，その後はestrogen製剤の投与によって子宮内膜増生を促しIVF-ETを施行する方針で経過を観察していたが，約1年後に自然周期にて妊娠が成立した．妊娠経過には特に異常なく妊娠38週で帝王切開にて生児を得るに至った．分娩4ヵ月後のHSGにより癒着した子宮内腔の先端はピンホールを通じ子宮底・卵管開口部と連絡していることが判明した．癒着範囲が50%を超え，両側卵管口に病変が及ぶ重症のAsherman症候群の妊娠例の報告は極めて少ない．本例の経過を特に発症前を含むHSG所見を中心に報告する．

5．子宮鏡下卵管形成術234例の予後と現況

○長田尚夫・山田祐士・角田郁夫
鳥山太志・宮川典子・本田利江
藤井トム清・吉田孝雄・佐藤和雄
（日大産婦　駿河台日大病院）

この10年間に不妊外来を訪れた2875例の不妊分類とその頻度は，子宮・卵管因子による不妊症が最も多く，38.3%であり，続いて排卵障害，男性不妊が各々34.2%，27.4%であった．卵管性不妊症の主な原因は，感染症によるものが最も多く，他に子宮内膜症，卵巣嚢腫や筋腫核出術後の癒着によるものである．性行為感染症が蔓延している今日，子宮鏡下卵管形成術の臨床的意義は大きい．

この子宮鏡下卵管形成術は，非観血的卵管形成術とも言われ，卵管閉塞，特に間質部閉塞例に対して行う新しい治療法で，本法には，選択的卵管造影法ならびに子宮鏡下卵管形成術がある．

われわれは，子宮卵管造影によって卵管閉塞と診断された症例34例に選択的卵管造影ならびに子宮鏡下卵管形成術を実施した．

講演では，これらの術後成績の分析と今後の課題について述べるとともに現在，開発されつつある新しい子宮鏡下卵管形成術の機器についても紹介する．

6．AIH施行カップルの性行動に関する調査

○秋山芳晃・後藤　誠・川勝雅秀
松本和紀・楠原浩二・寺島芳輝
（慈恵医大産婦）

AIHを長期に継続することにより，性交回数の減少をきたすカップルが少なくないものと思われる．今回我々はAIH施行前とAIH周期の性交回数を比較検討した．

当院外来にてAIHを行っている症例のうち，AIH前，AIH周期の各1周期以上の基礎体温表より性交回数を検討し得た11症例を対象とした．

低温相最終日を排卵日と仮定し，その前後2日間を排卵期とし，卵胞期，排卵期，黄体期の各周期における性交回数を自然周期およびAIH施行周期で比較すると，全周期において性交回数の減少を認め，特に排卵期においては著しく減少した．また卵胞期あるいは黄体期に性交回数が50%以上減少した性交回数減少群(6例：54.5%)において同様に比較すると，全周期で90%前後の著明な減少を認めた．特に性交回数減少群のように著明な減少を示す症例においては，夫婦関係に問題を生じないよう充分な指導が必要であると思われた．

7．AIHによる妊娠86例の臨床的検討

○飯田　信・福田　勝・岡部親宜
武内裕之・町田正弘・伊藤　哲
高田道夫　　（順天堂大産婦）

当教室ではAIHに際してPercoll 2層法により回収された運動精子を用いている．今回，妊娠例79組，86周期について臨床的検討を加えた．

（結果）1．不妊夫婦362組，AIH 1310周期についてAIHの周期あたりの6.6%，患者あたり妊娠率は23.8%であった．2．妊娠に至ったAIHの最短周期は1周期で最長周期は11周期であった．平均周期は2.7周期であった．3．妊娠例の子宮腔内注入最少運動精子数は100万，平均子宮腔内注入運動精子数は2600万であった．4．妊娠例86周期の精子性状は，正常が54周期 (63%)，運動不良が28周期 (33%)，乏精子運動不良が3周期 (3 %)，乏精子が1周期 (1 %) であった．5．妊娠例86周期の流産率は19.8%，多胎妊娠率10.8%であった．また男女比は1対1でPercollによる性別差はなかった．

8．乏精子症におけるAIH妊娠例の分析

○鈴木隆弘・小林善原・本田育子
井上正人・藤井明和　（東海大産婦）

配偶者間人工授精 (AIH) は男性不妊症に対する有力な治療法であるが，その妊娠率は決して高くない．今回1985年10月から1992年3月の間で妊娠が成立したAIH施行時の精子濃度が20×10^6/ml以下の61例を分析しその限界について検討した．

妻側の因子として腹腔鏡所見を検討すると，正常腹腔は23.9%にすぎなかった．妊娠に至るまでのAIH回数は，ほとんどが7回以内であった．精子濃度は$10\sim20\times10^6$/mlが44例 (72.1%)，それ未満が17例 (27.9%) で，最低は0.2×10^6/mlであった．洗浄濃縮後の子宮内注入総運動精子数は，40例 (65.6%) は1×10^6以上であるが，0.1×10^6以下でも4例 (16.6%) が妊娠し，最低は0.01×10^6が2例存在した．

ZSPTによる分析では，一般に乏精子症では受精率が低下しているが，今回の妊娠例では1.7%はZSPT正常群であった．CASAによる分析では，妊娠例は精子数，受精率にかかわらず，Velocity，Linealityに差がなかった．

9．慶應健康相談センター婦人科におけるAIDによる興味ある妊娠例

○田辺清男・斎城綾子・荘隆一郎
菊池正晃位・小林俊文・野澤志朗
（慶應大産婦）

昭和62年1月より平成4年5月までのAIDにて妊娠した887例，計1036回の妊娠を分析したところ，30周期までの受精で98%が妊娠していた．そこで，31周期以上で妊娠した症例のうち22例を分析したところ，初診時の年齢の平均は30歳11ヵ月であり，妊娠までの期間は平均4年11ヵ月であった．正期産 (および生児が得られたと考えられる例の合計) は13例65%でり，流産は7例31%であった．妊娠時に受けた処置には排卵誘発が6例，HSGなどの卵管の処置が4例，腹腔鏡が3例であり，未処置例は7例31%のみであった．また，不妊を惹起すると考えられる異常所見は子宮内膜症の3例のみであった．

以上より，AID長期不妊後の妊娠例を分析したところ，特徴ある所見は発見できなかった．このような機能性不妊の原因解明が今後の重要な課題であるが，AID長期不妊例の分析はそのための有用な方法と考えられる．本来はこれらはIVF等が適応であろう．

10．糖尿病における無月経の病態

○佐倉まり・小林万利子・中山摂子
安達知子　（東京女子医大産婦）
岩下光利・武田佳彦
（同母子総合医療センター）
本田正志・大森安恵
（同糖尿病センター）

糖尿病で排卵障害を有する症例の病態の解析を試みた．症例はNIDDM 5例とIDDM 13例で，NIDDM群では月経不順が80%を占め，IDDM群では無月経が77%を占めていた．また，ゲスターゲンテストによる無月経Ⅰ°とⅡ°の頻度ではNIDDMは全例Ⅰ°，IDDMではⅡ°が77%を占めていた．内分泌学的データで，NIDDMは80%でLH/FSH＞1.0とPCO型であったのに対して，IDDMの85%でLH/FSH＜1.0であった．T3値においては，視床下部型排卵障害といわれる体重減少性無月経とも比べた場合，IDDMではNIDDMに比べて有意に低く，体重減少性無月経と同レベルであった．BMIの比較では，NIDDMはIDDMに比べて有意に高値であったが，体重減少性無月経ではIDDMに比べてさらに低かった．

以上より糖尿病の排卵障害はIDDMとNIDDMでその動態が大きく異なることがわかった．NIDDMではインスリン抵抗性のあるPCOとの関係で興味深い．

IDDMでは中枢性の排卵障害が示唆されたが，その発症病態はなお詳細な検討を要する．

11．hMG律動的皮下投与法の着床周期におけるP/E_2比の意義

○山田春彦・小山典宏・安藤　索
生方良延・塩川滋達・苅部正隆
南野智徳・神野正雄・吉村泰典

中村幸雄　　（杏林大産婦）

［目的］clomiphene抵抗性無排卵症に対してhMG律動的皮下投与法を行った時の着床，非着床周期間の血清Progesterone (P)，Estradiol (E_2) 値を測定し，着床周期におけるP/E_2比の意義について検討した．
［対象］hMG律動的皮下投与を行った17症例中，着床18周期，非着床42周期と正常排卵周期を有する婦人14症例中，着床14周期，15周期とした．
［結果］hMG律動的皮下投与法における血清LH，FSH値は着床，非着床周期間に有意差はなかった．また，血清P，E_2値は正常排卵周期より有意に高かった．P/E_2比はhMG律動的皮下投与法と正常排卵周期との間で有意差はなかったが，黄体期中期 (day 7)　のP/E_2比はhMG律動的皮下投与の着床88.0±13.6，非着床52.8±9.1，正常排卵周期の着床99.2±22.2，非着床67.8±8.5どちらも着床の方が有意に高かった．
［考案］血清P，E_2の絶対値より黄体期中期のP/E_2比が着床にとって重要であると考えられた．

12. WHO 3rd IRP-PRL 84/500標準品を用いた血中プロラクチンの化学発光免疫測定法 (CLIA) (チバコーニングACS180) による基礎的・臨床的検討

○清水　篤・木村武彦・船津雅幸
羽田義信・田口　敦・田村和司
宮川善二郎・野嶽幸正
（昭和大藤が丘病院産婦）

現在，血中プロラクチンの測定は不妊症において必須の検査である．当院の測定法を化学発光免疫測定法のACS180に変更したため，SPAC-sとの測定値を比較し，その変動を調べ，TRH負荷試験の判定値について検討を行った．ACS180の最小検出感度は，0.08～0.37ng/mlであり，200ng/nlまで希釈せずに測定可能であった．希釈試験，交差反応性試験，ヘモグロビンとビリルビンの混入試験，回収試験，変動係数，精度，正確度など，いずれも満足できる結果であった．当科を受診した正常者，高プロラクチン血症，潜在性高プロラクチン血症を含む成熟女性352名を対象とした．ACS180とSPAC-sの相関はR=0.994と高い相関を示し，Y＝2.905 X＋2.44とSPAC-sの約2.9倍と高値であった．正常値は内分泌的・臨床的に正常と思われた40検体の値から，4.82～38.96 (平均14.47) ng/mlであった．ACS180で測定したTRH500 μg負荷試験では，145ng/ml以上が潜在性高プロラクチン血症と思われた．

13. 高TSH値を伴った高PRL血症の1妊娠例

○小川恵吾・永井聖一郎・笠井　剛
木下俊彦・加藤順三（山梨医大産婦）

高PRL血症性不妊の中には高TSH血症を伴い，いわゆる潜在性甲状腺機能低下状態を認めるものがあり，その治療に甲状腺ホルモン剤が有効なことがある．今回我々は同療法で妊娠に至った1例を経験したので報告する．

症例は34歳，0妊0産．5年の不妊を主訴に当科受診．44ng/mlと顕性高PRL血症を認めたため，Bromocriptin (2.5mg/day) 投与を12週間施行したが，PRLの低下傾向は見られず妊娠には至らなかった．甲状腺機能検査ではfree T 3，free T 4は正常範囲であったが，TSH　14 μU/mlと高値を認めためBromocriptinの投与を中止し，Clomid (100mg/日)＋Thyradin S (0.05mg/日) 投与開始．1周期目で双胎妊娠成立．以後Thyradin S内服を継続し，妊娠34週0日，前期破水のため帝王切開施行．第1子：1932 g Apgar：9 男，第2子：2098g Apgar：8 男と，2児の健児を娩出した．両児とも異常顔貌，外表奇形等は認めなかった．

14. 習慣性流産患者におけるER B-variantの解析 variant specific PCR法による検討

笠井　剛・平田修司・加藤順三
（山梨医大産婦）

（目的）　エストロゲン受容体（ER）遺伝子のB-domainに変異遺伝子をもつ乳癌坦癌患者には，流産の頻度が高いという報告がある．今回我々は，かかるER遺伝子の構造解析するにあたり，白血球を検体として，variant specific PCR法を用いて，同時に多数の検体を簡便に解析する系の確立を試みた．
（方法）白血球から得られたgenomic DNAを鋳型として，ヒトERcDNAの塩基番号475番から633番までを規定する2種類のprimer setを用いてPCRを行った．すなわち，sense primerの3' 末端側に変異点がくるようにwild type specific sense primerとvariant type specific sense primerを設定すると，wild typeでは前者でのみ遺伝子増幅され，variant typeでは後者で増幅されることを利用した反応系である．
（結果）検討した範囲では，variant typeは存在しなかった．
（考察）突然変異の検出法として本法は多数検体を同時にしかも簡便に解析可能であるという点で今後

有力な研究方法となると考えられた.

15. 腟式超音波断層法による妊娠初期の着床部位の検討

○川上裕子・安藤一道・山田清彦
伊藤理廣・小原満雄・水沼英樹
伊吹令人　（群馬大産婦）

目的：腟式超音波断層法を用いて正常妊娠例における妊娠初期の着床部位を検討した.

方法：対象は当科不妊外来を受診し妊娠成立した30例で，すべて単胎妊娠であった．方法は卵胞期中期から後期に超音波診断にて主席卵胞の存在する卵巣を同定し，基礎体温表にて排卵日［妊娠 2 (0) 週］を決定後，妊娠成立を確認し妊娠 4 (2) 週から 6 (0) 週までに腟式超音波断層法を施行し，子宮内着床部位と妊娠黄体を同定した．子宮内の着床部位の決定は胎嚢の位置により行い，子宮の矢状断像にて前・後壁を，横断像で左・右壁を決定し，左右の判別が困難な場合，中央壁と判定した.

結果：右側卵巣から排卵された場合19例中18例は子宮の右側壁に着床し，左側卵巣の場合は11例中 8 例が左側壁に着床した ($\chi^2=22.093$, $P<0.01$).

結論：妊娠初期の腟式超音波断層法により，正常単胎妊娠例では排卵された卵巣と同じ側の子宮の前壁または後壁に着床することが明らかになった.

16. 80%パーコール法および凍結保存の精子受精能に与える影響

○近藤俊彦・房間茂由・栗林　靖
斉藤寿一郎・大野祐子・堀越裕史
石塚文平・浜田　宏
（聖マリアンナ医大産婦）
胡田　通・岩本晃明・長田尚夫
（同泌尿器科）

洗浄濃縮および凍結保存の精子機能に与える影響を知る目的で，これらの処理前後の一般精液検査，ハムスターテスト (HAM)，eosin-Y超生体染色法 (EOY)，hypoosmotic swelling test (HOST) の変化を検討した．当科不妊外来受診中の100例を対象とし，1回の射精精液を用い精子濃度2000万/ml以上で運動率50%を正常群，それ以外を異常群とした．同時にHAM，EOY，HOSTを施行し続いて80%パーコール攪拌密度勾配法 (P) を行い，同上の 4 法を行った．これを凍結保存し融解後，同 4 法を行った．その結果としてHAM侵入率では凍結融解後正常群，異常群ともに有意に低下した．EOY非染色体率，HOST総膨化率ではともに異常群のみ融解後有意な低下が見られた．この結果として精子凍結保存は運動機能，受精能を低下させ，特に精液所見異常例において顕著であることがわかった.

16. 精子運動特性からみた妊孕能についての検討

八ッ橋良三・植村次雄・水口弘司
（横浜市立大産婦）

精子運動自動解析装置　Cell Softを用いて精子運動能の正常基準作成を試みた．55例の妊娠群と60例の非妊娠群 (1 年半以上不妊) 間で，各種運動特性を比較し，またROC判別分析を試みた．2 群間の各種運動能は，運動率と運動速度が有意差を示した．さらに運動精子のうち40 μ m/sec以上で運動する高速運動精子の濃度を求めたところ$P<0.005$で有意差を示した．次に各種運動ROC判別分析を試みたところ，40 μ m/sec以上で運動する高速運動精子の濃度が最も判別力が強く，誤診率37.8%で，その判別値は，360万/mlであった．次に判別力の強い特性は，運動率で，誤診率は39.8%で，その判別値は25%であった．直進性は判別に殆ど有効ではないという結果になった．以上より，妊娠の成立には高速で運動する精子が関与していることが示唆された.

18. Endometrial cyst 穿刺吸引処置後のIVF-ET治療成績

○小林善宗・本田育子・井上正人
藤井明和　（東海大産婦）

子宮内膜症Ⅲ期，Ⅳ期合併難治性不妊に対して，IVF-ETは有力な治療法であるが，endometrial cystを有している場合，卵胞発育不良でキャンセルになることが少なくない．そこでこの様な症例に対して，あらかじめ外来で経腟的にcyst穿刺吸引を行い，再度過排卵刺激を試みた．1989年 2 月～91年12月までに行った20例の経腟endometrial cyst穿刺吸引後のIVF-ET 成績を検討した.

吸引cyst 数は平均1.5個，吸引量は平均41.8mlであった．吸引後再刺激時のhCG注射決定時の血中estradiol 値および最大径14mm以上の卵胞数は改善がみられた．18例にIVF-ETが行え，8 例 (44.4%) が妊娠した．妊娠後は，分娩 4 例 (品胎 1，双胎 2，単胎 1)，ongoiny単胎 1 例，2 例が流産，1 例が外妊であった.

endometrial cyst存在にて卵胞発育が不良の場合，あらかじめ cyst 吸引し過排卵刺激を行うと，良好なIVF-ET成績がえられた.

19. 体外受精・胚移植法により，子宮外妊娠を生じたと考えられた1症例

○宮下　進・吉木尚之・清水康史
大原基弘・久保田俊郎・麻生武志
（東京医歯大産婦）

今回我々は，卵管因子にてIVF-ET施行後妊娠成立をみたが，妊娠7週にて大量の腹腔内出血を来し，開腹所見などから卵巣または腹膜妊娠と考えられた症例を経験したので報告する．

症例は39歳，1回経妊1回経産の主婦で，29歳時に正常分娩以降，約10年の不妊歴を有する．他院にて両側卵管采形成術を施行されたが，諸検査の結果両側卵管閉塞との診断を受け，当科にてIVF-ETを施行し妊娠に至ったが，妊娠7週に大量の腹腔内出血を来し，開腹所見および病理組織学的所見より，着床部位は卵巣または腹膜と考えられた．妊娠経過中の経腟的超音波断層像等の所見からは，術前の着床部位の診断は困難であった．病的卵管，特に卵管留水症や卵管疎通性再建術後例で，卵管閉塞と診断し，IVF-ETを行った症例では子宮外妊娠を発症する可能性があることを念頭に置き，IVF-ET前に卵管疎通性については充分に評価し，慎重な妊娠初期管理が必要と思われる．

シンポジウム

「難治性不妊に対する最新の治療方式」

1．排卵誘発法：特にPCOに対する排卵誘発法

水沼英樹（群馬大医産婦）

PCOは最も頻度の高い排卵障害の一つであり，またの排卵誘発上の問題点として(1)卵巣過剰刺激症候群，(2)低い妊娠率，高い流産率，(3)多胎妊娠など今なお未解決な問題点を有している．最近，LHをほとんど含まないFSH製剤(pure FSH)が発売されるようになり，PCOへの応用が期待されるようになってきた．しかしながら，pure FSHの使用にもかかわらず，卵巣過剰刺激症候群は依然として重要な問題として残り，また妊娠率も著明に改善したという報告はなされていない．本発表ではPCOにおける副作用発生の機序および特質を明らかにし，臨床的にどの様な対応を示すことにより，副作用の軽減および妊娠率の向上が期待できるかを検討した．

2．卵管性不妊治療法

○斎藤真一・川島夕美・武井成夫
矢野義明・森田峰人・百瀬和夫
（東邦大第一産婦）
松島弘充　（東邦大佐倉病院産婦）
小島栄吉（カーネギー小島産婦人科）

卵管性不妊の治療は，閉塞性疾患や癒着に対する手術療法が主体であり，手術方法としては，顕微鏡下のマイクロサージャリーの評価が定着している．

最新の治療法に該当する術式としては，腹腔鏡下での開口術，癒着剥離術や，主として間質部閉塞の診断と治療を兼ね備えた，経頚管的疎通術が適切と思われる．疎通術は腹腔鏡下でhysteroscopeまたはhysterofiberscopeで，卵管口を確認しながら間質部にcatheterを挿入し，軽く圧力をかけながら緩やかにprobingを行って，卵管内腔のplugや軽い癒着を物理的に除去する方法である．

留水症の術後の疎通性は良好ながら妊娠率は著しく不良であり，留水症は難治性卵管性不妊の代表的疾患である．実験的家兎卵管留水症を作製し，光顕，電顕的に形態を観察するとともに，マウス初期胚と留水症組織との共培養を行って機能状態を検討し，臨床的，基礎的の両方面から留水症について追及する．

3．AIH

石川雅一（北里大産婦）

4．子宮鏡下卵管内人工授精法（Hysteroscopic Insemination into Tube，HIT法）

杉村和夫（慶應義塾大産婦）

AIH，洗浄AIH，AID等の人工授精法を頻回施行しても妊娠の成立しない，難治性の不妊症症例に対し，子宮鏡観察下に直接精子を卵管内へ注入する子宮鏡下卵管内人工授精法（Hysteroscopic Insemination into Tube，HIT法）の臨床応用を行い，現在までに41例の妊娠例を得た．41例中の1例は，精子濃度100万～500万/ml，運動率10%前後と高度の乏精子症の症例で，HIT法7回目より冷凍保存精子も用いたHIT法を行い，HIT法計19回目に妊娠が成立し，満期正常分娩した．また，他の1例は逆行性射精の症例で，膀胱内容液を洗浄した精子を用いたAIHを15回行うも妊娠せず，HIT法に切り換えて3回目に妊娠に至り，現在順調に経過中である．この様な症例においても妊娠例を得たことにより，本法は難知性の不妊症症例の治療に関し，有用であると考えられ

る．

5．体外受精・胚移植

佐藤孝道（虎の門病院産婦）

難治性不妊に対する体外受精・胚移植というよりは，体外受精・胚移植を行っても，なお難治性の不妊が問題になりつつある．このような不妊としては，①高度造精障害のある男性不妊，②poor responder，③高齢の患者があげられる．ここでは③の高齢の患者を中心に検討した．

当科では現在，体外受精患者の1/4は40歳以上であるが，このような患者では採卵数の低下，移植胚数の低下がみられる．同じ様な変化は，程度は軽いが35歳を過ぎる頃から観察される．5回以上体外受精を行った患者24例についてみると，初回体外受精時34歳未満の8例中6例 (75.0%)，35－39歳の12例中3例 (25.0%)，49歳以上の4例中0例 (0.0%) が，5回以上の体外受精時に妊娠した．体外受精を5回以上行っても妊娠に至らない，特に40歳以上の症例では，体外受精そのものを漫然と反復することがないよう留意する必要があると考えられた．

6．顕微授精法

井上正人（東海大産婦）

顕微授精は男性不妊に対する究極の治療法として大きな期待が寄せられている．しかし現在のところ，その成績は極めて不満足なものである．原因としては適応の問題と技術的な問題の2つがあげられよう．

まず透明帯開孔術，囲卵腔内精子注入では，精子に先体反応誘起能力のあることが必要条件である．しかし，Ca ionophore A23187を用いたZSPT 3926例の分析では，乏精子症の40.8%に受精能力障害 (先体反応誘起不能) が認められた．透明帯開孔術，囲卵腔内精子注入ではこのような症例を適応から除外することが先決問題である．これに対して，卵子内精子注入では先体反応を必要としないが，精子を単純に注入するだけでは，卵子の活性化は不十分で，受精率，分割率とも極めて低い．精子注入後の卵子をいかにして活性化するかが今後の重要な課題である．この点に関してはA23187処理や電気パルス印加による卵子の活性化が試みられている．

1991年日本不妊学会北陸支部学術総会

日　　時：1991年12月14日 (土) 午後1時15分

場　　所：金沢シティモンドホテル

1．腎透析にて妊娠・分娩に成功した2症例

○丹野治郎・吉田勝彦・高林晴夫
桑原惣隆　　（金沢医大産婦）

2．ダナゾールの副腎，卵巣性ステロイドに及ぼす影響について

○村上弘一・山城　玄・赤祖父一知
（金沢医大産婦）

〔目的〕Danazol (D) の副腎・卵巣機能に及ぼす影響について，血中ホルモン動態面から検索し，併せて，D代謝産物の各ホルモン測定法への影響についても検討した．

〔方法〕子宮内膜症患者13名に対し，D (300～400 mg/日) を投与し，投与前，投与2，4，8，12週目，投与終了1か月後に採血した．血中LH，FSH，PRL，ACTH，E_2，P_4，17OH-P_4，T，cortisol (F)，DHA-Sは市販のキットにて，DHA，androstenedione (AD)，11-deoxycortisol (S) はエーテル抽出後Sephadex LH-20にて分離し，それぞれRIA法にて測定した．なお，TはHPLCによる分離前後の測定値を比較した．Dとその代謝産物である$\triangle^1$-2-hydroxymethyle thisterone (eT) ($\triangle$ 2 eT)，2-hydroxymethyle T (2eT)，eTはHPLCにて測定した．

〔成績〕D投与により，血中F，17 OH-P_4は有意に低下した ($p<0.05$)．DHA-Sは有意に上昇した ($p<0.01$)．DHA，ADは低下傾向を示した．血中Tは著明に上昇したが ($p<0.01$)，HPLC施行後の測定値は有意に低下した ($p<0.05$)．LH，FSH，PRL，ACTH，E_2，P_4，Sに有意の変化がみられなかった．血中DHA-S/DHA，S/Fは有意に上昇し，血中17 OH-P_4/S，17 OH-P_4/ADは有意に低下した ($p<0.05$)．血中DHA/AD，AD/Tには変化を認めなかった．血中Dは150～200ng/ml，$\triangle$ 2 eTは80～140ng/ml，2 eTは500～800ng/mlの濃度を示し，eTは測定感度以下であった．また，Tキット (CIS) とD代謝産物との間の交叉率は0.1～1%であった．

〔結論〕Dの投与により，副腎・卵巣性ステロイドの減少が認められ，これにはDによる11β-hydroxylase，17α-hydroxylase，C_{17}，C_{20}-lyase，21-hydroxylase活性の阻害作用が示唆された．血中DHA-Sの上昇は，Dの副腎および末梢におけるuslfatase活性の阻害作用に起因するものと考えられた．また，D投与中の血中Tは，D代謝産物により高値に測定されるので注意が必要と考えられた．

3．硫酸結合型ステロイド，特に硫酸結合型デハイドロエピアンドロステンの簡易測定法

小川誠一（可世木病院）

尿中に大量に排泄されるステロイドの抱合体を臨床の場で随時観察するには，RIAよりもChemical assayが時に好適なものと言える．尿中のSteroid-Sulfate，とくにDHA-Sの定量測定は簡便なものが少ない．DHAのみが硫酸との結合型が主であるため尿中での把握の方法を模索した結果，より簡便で比較的精度の高い測定方法が得られた．

24時間尿量をはかり一部をとり酸加熱法にもとづき尿の酸性化と脱蛋白をおこない，遠沈後上清をとりDHA-Sulfate水溶液を加えた標準液，コントロールを含め3本のtest tubeに燐酸2水素カリウムと硫酸混液を加え再酸性化と安定化をはかり，メチールグリーン溶液を注加後クロロホルムで抽出，測定波長580-630-680mμで比色測定しAllenの補正値を算出．CV＝7.617%，回収率＝80%以上を得，抽出物をフロリジールカラムクロマトグラフィでC_{19}とC_{21}フラクションに分離，GLC (TMSi)，TLCによりDHAを64.6%に認め，尿中のC_{21}ステロイドでは糖質と鉱質ステロイドが主体で両者を同時にBlue-Tetrazoliumによる$C_{20\text{-}21}$ Ketol 発色させたところ僅かな発色をみたので，17-KSとの比を求めると，17-KS＝85.9%：Bt 発色物質＝14.1%となり，C_{19}がきわめて大きく，C_{19}フラクション中ではDHAの含有比は他のものと比較してきわめて多い．

Zimmerman - ChromogenについてはLess P. A. ＝22.1% High P.A.＝13.3%，DHA＝64.6%で，Sulfate Conjugationのステロイドの少なくとも85.9×0.646＝55.5%以上がDHAであることを証明した．故に本法は臨床的なレベルでのDHA-Sulfateの把握には充分な精度をもつ測定法であると言える．

4．当院におけるIVF-ET，GIFTの成績

○船木　寛・大口昭英・佐竹紳一郎
小嶋康夫・舘野政也
（富山県立中央病院産婦）

IVF-ETおよびGIFTは大学などの大病院や体制づくりの容易な私的病院のみで行われる事が多く，我々の施設のような一般公的病院では実施困難な治療法であった．しかしTVプローブを用いた経腟採卵法の開発やGnRHa併用の卵巣刺激法の導入により，IVF-ETおよびGIFTは以前に比べて容易に行われるようになっている．

当院では1990年9月に倫理委員会を設置し，同年10月よりIVF-ET，GIFTを開始した．本年9月までの1年間にIVF-ET 24症例 (34周期)，GIFT 19症例 (19周期) に施行したもので，それらの成績について報告する．

IVF-ET　24症例の平均年齢は妻31.4±3.7歳，夫35.2±3.9歳，平均不妊期間は6.1±2.8年であった．また，GIFT 19症例の平均年齢は妻32.9±4.4歳，夫36.1±3.9歳，平均不妊期間は8.5±3.9年であった．

IVF-ET 31周期の適応は卵管因子のみが16周期と半数以上を占めた．妊娠例は10例であったが7例が卵管因子のみ，2例が免疫性不妊症，1例が長期の原因不明不妊症であり，男性因子の症例では妊娠例はなかった．

IVF-ET 24症例31周期の成績を示す．採卵率77.5%，平均採卵数7.6±4.5個であった．採卵した卵はすべて受精を試みたが，全体の分割率は62.4%，男性因子を除く分割率は70.5%，男性因子6周期の分割率は29.5%であった．胚移植周期数は26周期であり，妊娠成功例は10例であった．対周期あたりの妊娠率は32.3%，対胚移植あたりの妊娠率は38.5%，対症例あたりの妊娠率は41.7%であった．また男性因子を除く対胚移植あたり，対症例あたりの妊娠率はそれぞれ43.5%，50.0%であった．流産は2例，多胎は1例であり，2例が分娩を終了し，現在6例が順調に妊娠継続中である．

GIFT 19周期の適応は男性因子が9例と最も多く，次いで長期の原因不明不妊が8例，子宮内膜症2例であった．妊娠成功例は5例であり，原因不明不妊が3例，男性因子が2例であった．

GIFTは全例，腹腔鏡下に採卵して行った．採卵率は81.7%，平均採卵数は5.6±2.6個であった．妊娠成功例は5例であり，対周期あたりの妊娠率は26.3%，男性因子を除く妊娠率は30.0%，男性因子のみの妊娠率は22.2%であった．1例が流産し，多胎は2例であった．現在までのところ1例が分娩を終了し，3例が順調に妊娠継続中である．

5．稀発月経を伴った多毛症例

○佐川哲生・道倉康仁・高橋義弘
福岡哲二・原田文典・飯田和質
（福井県立病院産婦）

症例は，26歳，身長159cm，体重70.0kg，Ferriman & Gallweyの多毛スコアでは28点，13歳の初経以後60～100日型の稀発月経が持続していた．同時に外陰，四肢の多毛に気付き徐々に増悪したの

で稀発月経，多毛症を主訴に来院した．

乳房の発育は良好で乳汁漏出なし．BBTは一相性で無排卵周期．陰核肥大を認めず，子宮は正常大，両側卵巣は軽度腫大，超音波にて多嚢胞像を認めた．腹部CTで，副腎は正常大で腫瘍，過形成なし．

内分泌検査所見では，LH，FSHの基礎値は各々12.8 mIU/ml，3.1 mIU/ml，LH-RHに対する反応性はFSHがやや不良であった．PRL値は2.4ng/mlでTRHに対する反応は正常であった．estrogen分画ではE_1 72pg/ml，E_2 34pg/ml と$E_1/E_2 > 1$ であった．androgenに関してはandrostenedion ($\triangle^4$) が3.62ng/mlと高値を示したが，testosterone，DHA，DHA-Sは正常範囲であった．$\triangle^4$はdexamethasone投与にて50%低下したが，HCG同時投与にて低下はみられなかったため，卵巣由来と考えられた．さらに血中SHBG値は39nmol/lと比較的低値を示し，free-testosteroneの高値が推定されるため多毛症の原因と考えられた．

以上，本症は排卵障害に加え著しい多毛症を合併した症例で血中$\triangle^4$値の増加が主であった．Dexamethasone-HCG抑制試験により，これらは卵巣由来である可能性が示唆された．画像診断で副腎に異常はみられなかったが，両側卵巣にPCOを示唆する所見がみられた．今後は皮膚Andorogen recepterなどの検討も必要と思われる．治療に関しては，酢酸シプロテロン，経口避妊薬投与などを予定している．

6．超音波下卵胞穿刺にて加療した重症OHSSの 1 例

○小嶋康夫・大田　悟・谷村　悟
大口昭英・佐竹紳一郎・船木　寛
舘野政也　（富山県立中央病院産婦）

卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) は卵巣の嚢胞性腫大，胸腹水貯留，循環血漿量減少，血液濃縮などの症状を呈し，重症例では呼吸不全，ショック，腎不全，血栓症などを併発する．軽症例ではまず保存的に治療され，重症例や卵巣出血，茎捻転などを合併した場合は外科的治療法を選択することが多いが，最近では比較的安全で有効な超音波下卵胞穿刺療法が報告されている．今回我々は呼吸不全を呈した重症OHSS症例に超音波下卵胞穿刺法を施行し，血中E_2の減少と臨床症状の改善をみた興味ある 1 例を経験したので報告する．

症例は25歳．稀発月経，挙児希望のため 2 年前より某医にて加療中であった．平成 3 年 2 月15日よりHMG-HCG療法が開始され，HMG150iu/日 6 日間，計900iu投与ののち，HCGを 2 月22日 10000 iu，2 月26日5000iu投与された．3 月 1 日頃より下腹部痛，腹部膨満感，卵巣腫大，呼吸困難などの症状が出現し，卵巣過剰刺激症候群の診断で同医入院．3 月11日頃より38-39℃の発熱，乏尿 (300-400ml)，腹囲の急激な増加，浮腫，胸水貯留，Hctの上昇 (69%) を認め．補液でHctは徐々に低下したが，呼吸困難，両側卵巣腫大などの症状が増悪してきたため 3 月13日当科入院となった．入院時右肺野は胸水貯留によりほとんど含気を認めず，動脈血ガス分析ではO_2投与下で$P_a O_2$ 63.9mmHgと低O_2血症を認め，低蛋白血症，全身浮腫が著明であった．O_2投与トロッカー挿入，水電解質管理，アルブミン製剤投与などと並行して超音波下卵胞穿刺法を 2 回施行し総量3000mlの卵胞液を排除したところ，血中E_2は24,835pg/mlから11,693pg/mlまで減少し，臨床所見の速やかな改善を認めた．

OHSSの治療法として，超音波下卵胞穿刺法は比較的侵襲も少なく，卵巣茎捻転や卵巣出血など外科的治療法が必須の場合を除けば，かなり有効な治療法であると思われる．

7．体重減少性卵巣性機能低下症のGnRH療法後の臨床経過とゴナドトロピン分泌パターンの推移

○久保　真・小辻文和・富永敏朗
（福井医大産婦）

我々は，難治性の体重減少性無月経症例において，GnRH療法はClomiphene/hCG (C. C/hCG) に対する反応性をもたらすことを報告してきたが，いずれの症例もGnRH療法後，自然排卵回復には至っていない．そこで，こういった症例の下垂体機能の推移を知る目的で，GnRH療法前後およびC. C投与周期のGn分泌動態を検討した．

GnRH療法は，GnRH 1 回100 μ gの隔日投与を 1 コースとし，直後のC. C/hCG療法による排卵を認めるまでに反復した．GnRH療法前には，LH，FSHとも低値を示していたが，治療の反復により先ずFSH，続いてLHの上昇を認めるとC. Cが有効となった．LHの脈動性分泌も出現したが，頻度は正常人に比し減少しており，C. C投与時にのみPulse頻度の増加を認めた．即ち，こういった症例ではLH脈動性分泌障害があり，GnRH療法による下垂体－卵巣機能の改善後にも残存することが示唆された．

8．酢酸ゴナドレリン間欠投与による視床下部性性

腺機能低下症の治療経験

李　秀雄・打林忠雄・久住治男
(金沢大学泌尿器)
西野昭夫　(小松市民病院泌尿器)

症例は19歳男性，主訴は思春期遅発の精査，外見上，腋毛，恥毛，髭は認められず，外性器は小児様で，精巣容積はオーキドメーターによる測定で左右とも3 mlであり，Tanner分類2度と判定した．内分泌学的検査では，LH，FSH，テストステロンの低値が認められたが，他のホルモンの基礎値は正常範囲内であった．Insulin，TRH，LH-RHの負荷試験を行い，GH，Cortisol，TSH，PRL，LH，FSHの有意な上昇を認めた．HCG試験では，やや低反応であるが，ゴナドトロピン刺激の長期欠乏の影響と考えられ，性腺のゴナドトロピン反応性は保たれていると判定した．一方精巣生検では，精細管はほぼ支持細胞で占められており，精子形成は全く認められなかった．また，間質にはLeydig細胞は殆ど認められなかった．その他，色盲，視野障害，臭覚異常などは認められなかった．

以上より，視床下部性性腺機能低下症と診断し，自動注入ポンプによるLH－RHの間欠的皮下注を開始した．投与量は，1回10μg，2時間間隔で1日12回とした．治療開始6週後，テストステロン値は健常成人男性レベルに達し，10週後，精巣容積は8 mlと増大し，15週後，恥毛の発現および変声が認められた．20週後，精巣容積は左右とも12mlと増大し，陰茎の発育，腋毛および髭の発現が認められ，Tanner分類3度と判定した．30週後には，精子形成には至らないまでも射精が可能となった．視床下部性性腺機能低下症の治療として，LH－RH微量間欠投与法は，本来欠損しているものを補う点，下垂体に対する性腺ステロイドによるnegative feedbackが期待できる点において，従来のhCG-hMG療法や性腺ステロイド補充療法に比してより生理的であり，今回治療により良好な二次性徴の発現が認められた．

9．Makler計測盤を用いた精液検査所見の経時的変動について

里見定信・風間泰蔵・布施秀樹
片山　喬　(富山医薬大泌尿器)

最近精液検査に際し，その簡便性からMakler計測盤が多用されつつあるが，Makler計測盤に精液を滴下した時から，分析開始までに要した時間の分析結果に及ぼす影響について検討した．

当科の不妊外来を受診した男性から用手法で精液を採取し，液化のため室温で30分間放置．マッチ棒でMakler計測盤に1滴の精液を滴下．直ちにmanual countingで判定した．

そして，10分後，30分後，60分後と経時的に精子濃度と運動率の変動を調べた．

滴下直後の精子濃度により，2000万/ml未満，2000万/ml以上4000万/ml未満，4000万/ml以上の3群に分類し，直後の精子濃度を100%として，その変化率を調べた．

精子濃度のいかんを問わず，10分後で5.8%から23.0%の増加を示すことより，Makler計測盤に滴下後，10分以内に分析を終了する必要があると思われた．また精子濃度のいかんを問わず，経時的に運動率は減少した．

運動率異常精子は，運動率正常精子に比べ経時的に運動率は著明に減少した．このことから精子の妊孕性と運動能保持性は関連性があると推定された．

シンポジウム

「体外受精・胚移植――患者の選択から媒精まで――」

西　修 (福井赤十字病院産婦)，竹内　譲 (福井医大産婦)，加藤　修 (永遠幸クリニック)，千場　勉 (石川県立中央病院産婦)，荒木良平 (荒木病院)，脇　博樹 (富山医薬大産婦)，船木　寛 (富山県立中央病院産婦)
追加発言：旭　敏秋 (国立高田病院産婦)

関連学会のお知らせ

第33回日本先天異常学会学術集会

第33回日本先天異常学会学術集会を下記のごとく開催いたします．多数の方々の演題応募と学術集会へのご参加をお待ちいたします．

第33回日本先天異常学会学術集会
会　長　　三　浦　隆　行
(名古屋大学医学部整形外科学教授)

記

会　　期　　平成5年7月21日 (水)・22日 (木)・23日 (金)
会　　場　　名古屋市中小企業振興会館 (吹上)

学術集会

1．会長講演
「手の先天異常」　三浦　隆行（名古屋大学整形外科）

2．招待講演
「Cellular Positional information in chemical and genetic teratogenesis」
Nigel A. Brown, Ph. D. (St. George's Hospital Medical School)

3．シンポジウム
(1) 先天異常における最近の染色体研究
(2) 顎顔面先天異常の臨床
(3) 先天性骨系統疾患の基礎と臨床――小人症を中心に――
(4) 臓器別胎児異常の出生前診断とその治療
(5) 神経提細胞と先天異常
(6) 四肢の先天異常――その基礎的・臨床的研究の発展――

※学会出席，研修講演など，各科の臨床認定医資格継続申請に必要な手続きを行なっております．詳細はプログラムに掲載いたします．

演題募集

日本先天異常学会誌「先天異常32巻4号 (12月発行予定)」に綴込みの案内に従い，同誌に綴込みの用紙を使用してください．なお2題以上出題予定の方，未入会で出題希望の方は送付先住所・氏名を明記して，返信用切手¥175を同封のうえ12月1日以降に下記事務局まで直接応募用紙を請求してください．

演題応募締切り　平成5年3月31日 (水) 必着

連絡・問い合わせ・応募用紙請求先
〒461　名古屋市東区白壁1-45　白壁ビル6階
(株) セントラルコンベンションサービス内
第33回日本先天異常学会学術集会事務局
TEL　052-971-5552　FAX　052-951-3600

第16回産婦人科マイクロサージャリー学会学術講演会

第16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5年8月3日(火)
会　　場：愛知県芸術文化センター
〒461　名古屋市東区東桜一丁目13-2
TEL (052) 971-5511 (内751～753)
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5年4月30日(金)
問い合わせ先：愛知医科大学産婦人科学教室・浅井　光興
〒480-11　愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21
TEL (0561) 62-3311　　FAX (0561) 62-2991

第16回産婦人科マイクロサージャリー学会
会長　野　口　昌　良
(愛知医科大学産婦人科教授)

第33回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会

第33回日本産科婦人科内視鏡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5年8月4日(水)，5日(木)
会　　場：愛知県芸術文化センター
〒461　名古屋市東区東桜一丁目13-2
TEL (052) 971-5511 (内751～753)
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5年4月30日(金)
問い合わせ先：藤田保健衛生大学産婦人科学教室・廣田　穣
〒470-11　愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪1-98
TEL (0562) 93-9294　　FAX (0562) 93-3711

第33回日本産科婦人科内視鏡学会
会長　河　上　征　治
(藤田保健衛生大学産婦人科教授)

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. 論文の審査，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とする．
4. 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．
5. 原著，総説，論説，臨床報告などには必ず，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．
6. 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．
7. 記述は和文または欧文とし，和文は横書き，口語体，平がなを用い，現代かなづかいによる．
8. 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．
9. 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，特に原著の場合の著者名は極端に多数の場合を除き全員あげる．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. Sacks PC, Simon JA, Infections complications of intranterine insemination. Int J Fertil 36: 331, 1991
      2. 足高善雄，竹村　喬，美並　義博，最近1か月年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察．日不妊誌　4: 13, 1959
   b. 単行本の場合
      著者名，題名．版数，ページ数，発行所，年次
      例1. Rovinsky JJ, Guttmacher AF, Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnacy. 2 ed, p 68, Williams & Wilkins Co, 1965
10. 英語5語以内のKey wordsを付記する．
11. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする．
12. 著者校正は原則として初校のみ1回とする．なお，構成は字句の訂正にとどめる．
13. 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．
14. 掲載原稿に対しては，別冊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．
15. 投稿のさいは，原稿とともにコピー2部を添付する．ただし写真は原稿を含めてオリジナルを3部とする．
16. 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　事務所とする．

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，組版に差し支えないよう清書してください．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)

○論文にはKey Wordsを付け，査読用コピー2部を添えることにしました．また英文については専門家の査読を受ける(費用，著者負担)ことがありますので，ご注意下さい．(平成4年9月)

○論文をワープロ，パーソナルコンピューター等で作成された場合は，出来れば文書フロッピーをいっしょにお送りください．その際，機種とソフト名をお書き添えください．MS-DOSのテキストファイル出力が可能であればその形式でお願いします．(平成4年10月)

編集委員

白井将文（委員長）

味香勝也	伊藤晴夫	石島芳郎
遠藤克	楠原浩二	小林俊文
平川舜	穂坂正彦	三橋直樹
水口弘司	毛利秀雄	百瀬和夫

EDITORIAL BOARD

Masafumi SHIRAI (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Haruo ITO	Yoshiro ISHIJIMA
Tsuyoshi ENDO	Koji KUSUHARA	Toshihumi KOBAYASHI
Shun HIRAKAWA	Masahiko HOSAKA	Naoki MITSUHASHI
Koji MINAGUCHI	Hideo MORI	Kazuo MOMOSE

日本不妊学会雑誌　38巻1号

1992年12月26日　印刷
1993年1月1日　発行

編集兼発行者　白井将文

印刷者　武田昭彦

印刷所　株式会社　デンプロ
東京都台東区元浅草4-9-13

発行所　社団法人　日本不妊学会
東京都中央区日本橋二丁目14-9
加商ビル㈱アイシーエス企画内
Tel (03) 3272-7077
振替口座番号　東京　7-93207