

ISSN  
0029-0629  
CODEN:NFGZAD

# JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

*Vol. 38* No.2

April  
1993

# 日本不妊学会雑誌

第38卷 第2号

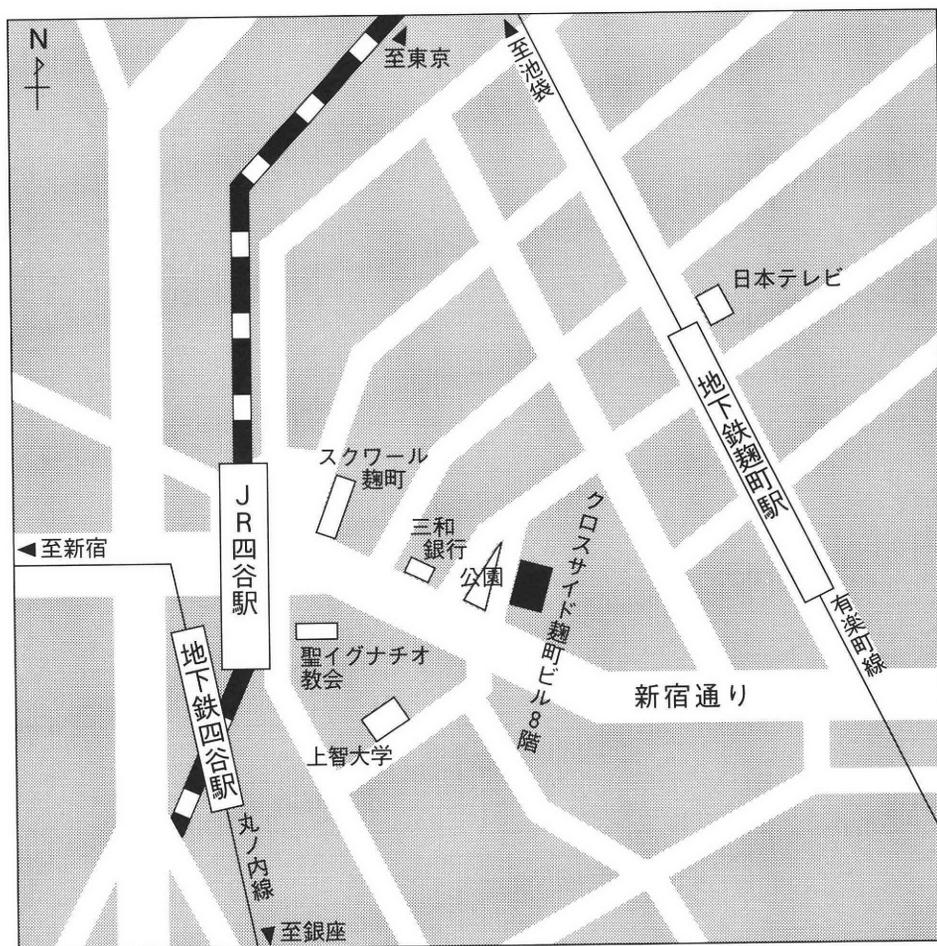
平成5年4月1日

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

# お知らせ

社団法人日本不妊学会の住所が変わります。

〒102 東京都千代田区麹町 5-4  
クロスサイド麹町ビル 8階  
電話03-3288-7266 (ファクシミリ兼用)





## 略 歴

昭和5年3月2日 長野県松本市に生まれる  
昭和28年3月 東京大学医学部医学科卒業  
昭和32年8月 東京大学教務員教員職  
昭和34年4月 日本不妊学会幹事(昭和63年11月迄)  
昭和34年7月 東邦大学医学部講師  
昭和39年4月 日本不妊学会支部評議員(昭和57年12月迄)  
昭和46年12月 東邦大学医学部助教授  
昭和48年4月 日本産科婦人科学会評議員  
昭和54年4月 産婦人科マイクロサージャリー研究会理事(昭和62年7月迄)  
昭和57年3月 東邦大学医学部教授  
昭和57年4月 日本産科婦人科学会東京地方部会編集委員長(平成元年3月迄)  
昭和57年7月 日本産科婦人科内視鏡学会常任幹事  
昭和58年5月 東京母性衛生学会理事  
昭和59年5月 厚生省中央薬事審議会臨時委員  
昭和61年7月 日本産科婦人科内視鏡学会理事  
昭和61年11月 日本不妊学会代表幹事(昭和63年11月迄)  
昭和62年4月 日本産科婦人科学会東京地方部会支部長  
昭和62年7月 産婦人科マイクロサージャリー学会理事  
昭和63年11月 日本不妊学会常任理事  
昭和63年11月 日本不妊学会雑誌編集委員会委員長(平成4年11月迄)  
平成元年2月 昭和63年度外務省派遣巡回医師团团長(平成元年2月迄)  
平成元年7月 日本受精着床学会理事  
平成元年8月 産婦人科マイクロサージャリー学会会長(平成2年7月迄)  
平成2年8月 長春中医学院名誉教授  
平成2年10月 日本産科婦人科学会関東連合地方部会会長(平成3年6月迄)  
平成3年4月 日本産科婦人科学会東京地方部会会長(平成4年3月迄)  
平成3年5月 東京母性衛生学会会長(平成4年5月迄)  
平成4年4月 日本産科婦人科学会東京地方部会運営委員  
平成4年9月 日本母性衛生学会理事  
平成4年12月20日 逝去  
正6位勲4等瑞宝章を叙せられる

## 百瀬和夫先生のご逝去を悼む

名誉会員 木 下 佐

本学会常任理事、東邦大学第一産婦人科教授百瀬和夫先生は1992年も押し詰まった12月20日、心筋梗塞のため急逝された。享年62才、最近ではまだまだ働き盛りといってもよいお歳で、私どもは今後のご活躍を心から期待していたし、ご自身でもなおさまざまな抱負を抱いておられたであろう事を思うと、誠に哀惜の念に堪えない。

百瀬君は1953年東京大学を卒業後長谷川敏雄教授の主催されていた産科婦人科学教室に入局し、当時アメリカ帰りの新進気鋭の講師であった故林基之先生のもとで妊娠成立機序に関する研究、特に卵管機能の問題に取組まれ、子宮卵管造影法を駆使して短期間に素晴らしい成果をあげられた。1959年林先生が教授として東邦大学に赴任された時私は助教授としてお供したが、やがて君も招かれて同期の岩城章君とともに講師として来られ、以後私の定年までの約30年間、本当に苦楽を共にしてきた。子宮卵管造影はその後も君のもっとも得意とする診断手技として不妊症の診療に盛んに用いられたが、そのデータを君が自ら整理した数万枚に及ぶパンチカードは教室の貴重な財産として今後の研究者を益するところ極めて大であろう。

君は決して大言壮語する事なく、表舞台に立つこともあまり好きではなかった。不妊学会に於いては一また産科婦人科学会東京地方部会に於いても一長い間編集幹事として縁の下の力持ち的な役を務めて来られたが、冷静かつ慎重な判断と一旦決めた事をあくまでもやり抜こうという強い意欲、そして周りの人たちへの濃やかな心配りに裏打ちされた君の仕事振りは万人の高く評価するところだった。1988年よりは不妊学会理事に就任されて編集、会計を担当し、会員数4000名に達した学会運営の中枢に立ってこられたのであり、ここで君を失ったことは本学会としてこれ以上はないほどの痛手である。しかし私たちはただ徒らに嘆き悲しんでばかりいるわけには行かない。君は決してそれを喜ばないだろう。君が不妊学会にそそいできた限り無い情熱と努力を思うとき、私たちがいま心を新たにして学会の発展に力を尽くす事を誓う以外君に報いる道はないであろう。

不妊学会にとって1992年は誠に不幸な年だった。7月に会長の帝京大学教授荒井清先生を失った悲しみも癒ぬ間に、君との別れの日が来ようとは思ってもよらぬことだった。奇しくも君は荒井教授とは大学の同期生で、その葬儀の際には弔辞を読まれたという仲であった。煩悩の世を離れ、荒井君そして恩師林先生との再会を果たして安らいでいる君の姿を想像するのが、私にとってせめてもの慰めである。

百瀬先生、改めて心からの哀悼の意を捧げ、ご冥福を祈る。

# 会 告

## 第38回日本不妊学会総会および学術講演会 (第3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, 懇親会  
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 京都市左京区宝ヶ池  
TEL (075) 791-3111

### 学術講演会

本講演会では、会長講演、特別講演、教育講演、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。

一般演題は口頭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。

### 学会プログラム予定

- I 会長講演 座長：飯塚理八  
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)
- II 特別講演
1. 座長：水口弘司 (横浜市立大学医学部産婦人科教授)  
疾病における遺伝子解析の新技术と展望  
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  
ジーンバンク室)
2. 座長：奥山明彦 (大阪大学 泌尿器科教授)  
精巣における細胞機能調節  
藤沢正人 (神戸大学泌尿器科)
- III 教育講演 座長：武谷雄二 (東京大学医学部産婦人科教授)  
子宮内膜症の病態と不妊への関与  
植木 実 (大阪医科大学産婦人科)

#### IV シンポジウム

下垂体性ゴナドトロピンの基礎と臨床

座長：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)

1. GnRH, アクチビンとゴナドトロピン分泌  
田坂慶一 (大阪大学 産婦人科)
2. ゴナドトロピンの遺伝子解析とその臨床応用  
奥田喜代司 (大阪医科大学 産婦人科)
3. 排卵誘発におけるPure FSHの応用  
東敬次郎 (徳島大学 産婦人科)
4. ゴナドトロピンと精巣機能  
伊藤直樹 (札幌医科大学 泌尿器科)
5. 男性不妊に対するhMG- hCG療法  
蓑和田 滋 (東京通信病院 泌尿器科)

#### V ワークショップ

生殖におけるニューテクノロジー

座長：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)

1. 腹腔鏡手術による精索静脈瘤の治療  
松田公志 (関西医科大学泌尿器科)
  2. 女性不妊に対する腹腔鏡直視下手術  
深谷孝夫 (東北大学産婦人科)
  3. 精路障害に対する治療  
風間泰蔵 (富山医科薬科大学泌尿器科)  
加藤 修 (永遠幸マタニティクリニック)
- 追加発言：閉塞性無精子症に対する新しい精子回収法  
—精巣鞘膜内精子貯留法—  
平井 景 (大阪医科大学泌尿器科)
4. 精子および胚の性別判定法とその応用  
内海恭三 (京都大学農畜産学部)
  5. 卵胞卵子の新しい体外成熟  
宮野 隆 (神戸大学農学部)

#### VI 一般演題

##### 演題申し込み資格

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

一般講演の講演時間は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。ポスターセッションでの講演(ポスター説明)時間は3分、討論時間は4分とします。パネルの有効面積は横90cm×縦150cmです。その上部の演題番号は担当校で用意します。

### 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、学会当日下記の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。京都らしいエンターテイメントを用意しておりますので、是非ご参加下さいませようをお願いします。

1993年4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

## 支部評議員について

下記403名について、1993年1月1日より1994年12月31日まで支部評議員を委嘱します。本誌面をもって委嘱状と致します。

### 北海道支部 支部評議員 (20名)

石川 睦男	石島 芳郎	岡部 泰樹	川倉 宏一
菊川 寛	工藤 隆一	小森 昭	千石 一雄
高橋 芳幸	田中 昭一	丹田 均	堤 義雄
野々村 克也	芳賀 宏光	橋本 正淑	林 義夫
平尾 和義	古屋 聖兒	丸田 浩	山下 幸紀

### 東北支部 支部評議員 (35名)

安部 徹良	市川 文隆	一條 貞敏	入澤 俊氏
梅津 元昭	及川 胤昭	太田 博孝	小田 隆晴
利部 輝雄	金杉 浩	木村 正一	木村 行雄
国本 恵吉	児玉 英也	斎藤 良治	佐藤 章夫
佐藤 和宏	白岩 康夫	田中 俊誠	中谷 一夫
中田 瑛浩	永井 宏子	西谷 巖	信永 利馬
深谷 孝夫	福島 峰子	藤井 俊策	古橋 信晃
星 和彦	前原 郁夫	望月 修	矢嶋 聰
柳田 薫	吉田 威	吉松 宣弘	

### 関東支部 支部評議員 (135名)

味香 勝也	天野 久夫	雨森 良彦	荒木 勤
飯田 悦郎	井口 登美子	池本 庸	石井 延久
石川 博通	石田 克美	石田 肇	石橋 晃
伊藤 晴夫	伊藤 治英	伊藤 雅夫	伊藤 元博
伊吹 令人	岩下 光利	岩田 嘉行	岩本 晃明
上野 精	植村 次雄	白杵 愆	梅田 隆
太田 亨二	岡田 詔子	岡田 清己	岡田 耕市
尾川 昭三	冲永 莊一	冲永 洋子	荻野 雅弘
小倉 久男	長田 尚夫	長田 尚夫	押尾 茂
小田 高久	落合 寛	甲斐 祥生	貝原 学
加藤 廣英	金山 喜一	兼子 智	川名 尚
河村 信夫	菊池 三郎	北川 龍一	木下 勝之

木久小小佐杉高田田田豐中西野広星松村柳吉吉	下保磯寺藤村崎口島辺田村島嶽川野本井沼沢田	英春謙重嘉芳和悦政清正幸正茂一	夫海吉行兵昭男司武晴男治雄博正信夫泰郎恣綠機	木久公齋佐塩鈴高竹田土中西畑福牧三目安吉吉	下保平藤藤塚木橋内原橋山田谷野浦崎水村	裕俊昭孝幸秋輝久隆一孝正俊恒一洸謙泰	三郎男裕道彦悦雄彌三慶一人夫子久陽登彦一郎典	楠熊小佐佐始須高武辰田中永根林藤松水森山吉我	原坂柴賀藤関藤山田巳村居田岸井島沼中田妻	浩高正昭吉寛雅佳賢光一壮方儔正英宏英茂	二弘健彦太郎生人臣彦一貴生郎治也子浩樹之寿子堯	久桑小佐末関多田田中野平古松三矢山吉	保原山木藤岡賀崎中村澤川畑本橋追本田	武慶基	士紀昭茂威浩利吉寛一治久雄朗舜彦重樹正一雄
-----------------------	-----------------------	-----------------	------------------------	-----------------------	---------------------	--------------------	------------------------	------------------------	----------------------	---------------------	-------------------------	--------------------	--------------------	-----	-----------------------

中部支部 支部評議員 (28名)

浅押米鈴豐花水	井木谷木田田谷	光貞国正長征栄	興雄男利康治彦	生風澤鈴名福水	田戸田森出島野	克貞富頼金	夫之夫薰男穰一郎	稻河菅辻成藤山	葉上沼井田井本	芳征信弘信稔	一治彦忠収吾彦	今川鈴寺野美余	井村置尾口甘語	篤壽洋俊昌和郁	志一三彦良哉夫
---------	---------	---------	---------	---------	---------	-------	----------	---------	---------	--------	---------	---------	---------	---------	---------

北陸支部 支部評議員 (25名)

赤祖泉加高	父陸修昌	一知修輔	隆一隆也	新居打桑千	居林原鳥	隆忠惣哲	荒木小津	木川辻川	克光文龍	己央和三	飯岡高南	田田林後	和謙晴千	質一郎夫秋
-------	------	------	------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------

西田悦郎  
舟本寛  
山本巖

長谷川真常  
松田春悦

平野章治  
美川郁夫

布施秀樹  
山田良

関西支部 支部評議員 (68名)

足高善彦  
市川文雄  
植木実俊  
岡山伸彦  
奥田明隆  
亀藤康夫  
後繁木瞭  
鈴高島英世  
高角田幸雄  
羽間合稔  
星松田公志  
宮崎和典  
森川肇雄  
山元貴雄

生駒文彦  
一後山尚久  
岡田弘明  
片山和秀  
神崎藤宗  
斎島博基  
泰井俊造  
竹内秀雄  
並木幹夫  
濱田和孝  
堀越順彦  
松本紀修  
宮本本義男  
山本晴宝

石川元春  
伊藤海恭三  
内海田幸雄  
荻加藤征史  
香山浩二  
佐治文隆  
新高倉武三  
高竹中章  
西川井庄潔  
平本三宅博  
三村上旭  
山田雅保  
脇本博

岩動孝一郎  
井上欣也  
大橋一友  
奥田喜代司  
假野隆司  
小松洋輔  
沢田勉  
杉並崎洋  
高都竹登  
野田理  
福岡正一  
前三宅正信  
望月真史  
山田晋人  
渡辺晋三

中国四国支部 支部評議員 (45名)

石部知行  
上大橋輝久  
鎌田正晴  
神保利春  
高橋久寿  
田中啓幹  
内藤克輔  
堀内俊孝  
森岡政明  
湯浅誠  
吉野和男

伊東武久  
上田濱克  
大工藤尚  
菅藤徹  
高柳弘  
寺内賀俊  
奈浦下正  
松森原

稲井徹  
碓井裕二  
岡谷秀元  
己斐田博  
高瀧原直  
寺川實  
中見尾保  
山野修  
横山雅好

今橋經任  
内田昭弘  
香河野一征  
高野橋健太郎  
竹内正文  
寺田隆登  
林川伸旨  
宮本征男  
山田信治  
吉田隆

九州支部 支部評議員 (47名)

安部	宏	井口	厚司	池田	友信	石丸	忠之
伊是名	博之	市丸	俊三	宇津宮	隆史	王丸	鴻一
大井	好忠	長田	幸夫	尾上	敏一	片桐	彦一
金岡	毅	川野	秀昭	楠田	雅弘	熊澤	一郎
熊本	有宏	小池	弘幸	後藤	俊博	佐久本	哲一
佐野	正敏	執行	夫幸	田川	博之	竹内	浩一
田中	温彦	田中	弘一	堂地	勉正	中野	一士
中村	正彦	中村	弘一	納富	廉国	野東	弘明
秦喜八郎	孜	浜野	一隆	比嘉	国ひろみ	增崎	正英
肥田木	勇	姫宮	一康	平森	明人	森	憲
松尾	道明	宮吉	二陽	和氣	徳夫		
薬師寺							

# 日本不妊学会誌

## 第38巻 第2号

平成5年4月1日

### —目 次—

#### 原 著

ヒト精漿中に存在する精子運動抑制因子の研究:

- 男子不妊症患者の精漿中濃度について ..... 岩本晃明・他 ..... 1
- 精液中フマラーゼ (Fumarase) 活性の研究 (英文) ..... 内島 豊・他 ..... 6
- Percoll 2 層法による運動精子回収の有用性と安定性 ..... 飯田 信・他 ..... 11
- メス非使用による精管切断術 (英文) ..... 山本雅憲・他 ..... 17
- ヒト精液性状・妊孕能と精子の先体酵素および尾部構成蛋白の関連 ..... 菅野孝子・他 ..... 20
- ヒト精子Hypoosmotic Swelling Testの精子機能検査法としての臨床的意義 ..... 柴原浩章・他 ..... 27
- 多数回精液検査での精子濃度のばらつきの大きさ ..... 宇津木利雄・他 ..... 36
- 男子不妊症の診断面における臨床統計的検討 ..... 風間泰蔵・他 ..... 40
- ハムスター精巣上体管由来細胞に及ぼす漢方薬の生物効果 ..... 野田洋一・他 ..... 48
- 漢方薬の示す精液所見改善効果の作用機序解析
- ハムスター精巣上体培養細胞による検討— ..... 夏山 知・他 ..... 55
- エンドセリン-3のラット卵巣ステロイドゲネシスに及ぼす影響について (英文) ..... 白杵 愨 ..... 60
- ヒト卵胞液に見いだされるアルギニンアミダーゼに関する研究 2
- 酸性トリプシン様アルギニンアミダーゼについて— ..... 小林俊文・他 ..... 64
- Gonadotropinに対する卵巣の反応性における成長ホルモンの関与 ..... 高崎彰久・他 ..... 71
- 多嚢胞性卵巣症候群の非肥満例におけるインスリン抵抗性について (英文) ..... 宇津宮隆史・他 ..... 77
- GIFTおよびZIFT成績と培養法の工夫 ..... 渡辺栄三・他 ..... 83
- マウスの体外受精および初期胚発育におよぼすインターロイキンの作用 ..... 楊 桂雲・他 ..... 91
- 腹腔鏡で確認したFitz-Hugh-Curtis症候群の1例 ..... 竹内 薫・他 ..... 96
- 血液透析患者に対するGnRH agonistによる子宮筋腫保存療法の1症例 ..... 倉林 工・他 ..... 101
- 未破裂卵管妊娠に対する保存手術 (英文) ..... 石丸忠之・他 ..... 105
- 妊娠初期絨毛における補体および補体制御因子の分布に関する検討 ..... 錦織恭子 ..... 111
- 妊娠時の成長ホルモンおよびリラキシンの分泌パターン (英文) ..... 関 克義・他 ..... 118
- 人工妊娠中絶が初産の妊娠・分娩経過に及ぼす影響について ..... 宮川善二郎・他 ..... 122
- 凍結・融解胚移植の臨床応用の有用性の検討 ..... 山辺晋吾・他 ..... 126
- 地方部会講演抄録 ..... 134

# Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 38, No. 2, 1993)

Japan Society of Fertility and Sterility

## CONTENTS

### Originals

- Biological Activity of Seminal Plasma Motility Inhibitor in Infertile Patients  
..... *T. Iwamoto H. Tanaka & T. Osada* ..... 1
- Studies on Fumarase Activity in Human Semen ..... *Y. Uchijima & K. Yohida* ..... 6
- Evaluation of Two-layer, Discontinuous Percoll Gradient Centrifugation  
for the Selection of Motile Human Spermatozoa ..... *M. Iida, M. Fukuda, C. Okabe,  
H. Takeuchi, M. Machida, S. Itoh,  
M. Takada & Y. Kuwabara* ..... 11
- Experience with No-scalpel Vasectomy ..... *M. Yamamoto,  
Y. Tsuji, H. Hibi & K. Miyake* ..... 17
- Involvement of Human Semen Properties and Fertilizing Capacity  
in the Acrosome Enzymes and Proteinic Tail Components of Spermatozoa  
..... *T. Sugano & K. Hoshi* ..... 20
- Clinical Evaluation of the Human Sperm Hypoosmotic Swelling Test  
..... *H. Shibahara, T. Henmi, M. Akai,  
M. Shigeta, K. Koyama and S. Isojima* ..... 27
- Variation of Sperm Concentration in Multisemen Analysis  
..... *T. Utsugi, Y. Nakajima & Y. Ibuki* ..... 36
- Clinical and Statistical Studies on Male Infertility from Diagnostic Aspect  
..... *T. Kazama, Y. Muraishi,  
T. Yokoyama, A. Okumura, O. Nagakawa,  
M. Iwasaki, S. Satomi, M. Sakamoto,  
T. Terada, H. Fuse & T. Katayama* ..... 40
- Effect of Traditional Herbal Medicines on Cultured Hamster Epididymal Cells  
..... *Y. Noda, S. Natsuyama & T. Mori* ..... 48
- The Effects of Ethical Kanpos on the Culture of Hamster Epididymal Cells  
..... *S. Natsuyama, T. Mori & Y. Noda* ..... 55
- Endothelin-3 Stimulates Rat Ovarian Steroidogenesis ..... *S. Usuki* ..... 60
- Studies on Arginine Amidases in Human Follicular Fluid 2  
-Separation of Trypsin-like Acidic Arginine Amidases- ..... *T. Kobayashi,  
S. Kaneko, S. Nozawa, T. Sugiyama,  
E. Iida, Y. Matsuda & S. Akihama* ..... 64
- The Role of Growth Hormone in Ovarian Responsiveness to Gonadotropins ... *A. Takasaki,  
T. Kuramoto, K. Hiratuka & H. Morioka* ..... 71
- Insulin Resistance in Nonobese Patients with Polycystic Ovary Syndrome ... *T. Utsunomiya,  
T. Taniguchi, A. Sadanaga, K. Iwasato,*

	<i>Y. Mizoguchi, S. Terawaki &amp; T. Hidaki</i> ·····77
Results of GIFT and ZIFT and the Improvement of Culture Condition .....	<i>E. Watanabe, N. Emi, J. Ishiko, Y. Noda &amp; T. Mori</i> ·····83
Effect of Human Recombinant Interleukins on in vitro Fertilization and Early Embryonic Development of Mouse ·····	<i>G. Yang, K. Matsuura, R. Honda, Y. Fukumatsu, T. Kawano &amp; H. Okamura</i> ·····91
Fitz-Hugh-Curtis Syndrome Verified with Laparoscopy: A Case Report .....	<i>K. Takeuchi &amp; T. Iwabe</i> ·····96
Conservative Treatment of Uterine Leiomyoma Using GnRH Agonist for a Woman with Hemodialysis: A Case Report ·····	<i>T. Kurabayashi, M. Yasuda, T. Fujimaki, Y. Yamamoto, K. Oda, H. Yoshizawa &amp; K. Tanaka</i> ·····101
Conservative Surgery for Unruptured Tubal Pregnancy ·····	<i>T. Ihimaru, A. Fujishita, N. Mahmud &amp; T. Yamabe</i> ·····105
Distribution of Compliments and Complement Regulatory Factors in Chorion of Early Pregnancy ·····	<i>K. Nishikiori</i> ·····111
The Secretary Pattern of Growth Hormone and Relaxin in Human Pregnancy .....	<i>K. Seki, C. Miitsui &amp; I. Nagata</i> ·····118
The Influence of Artificial Abortion on Pregnancy and Delivery of Primipara Women .....	<i>Z. Miyakawa, A. Shimizu, A. Taguchi, K. Tamura, M. Funatu, Y. Hada, T. Kimura &amp; Y. Notake</i> ·····122
The Benefits of Clinical Use of Transferring Cryopreserved-Thawed Early Embryos .....	<i>S. Yamabe, S. Yamaguchi, K. Katayama, M. Mochizuki, K. Furukawa, M. Hayashi, S. Hayashi &amp; K. Hayashi</i> ·····126

# ヒト精漿中に存在する精子運動抑制因子の研究: 男子不妊症患者の精漿中濃度について

## Biological Activity of Seminal Plasma Motility Inhibitor in Infertile Patients

聖マリアンナ医科大学泌尿器科

岩本 晃明      田中 宏樹      長田 尚夫  
Teruaki IWAMOTO      Hiroki TANAKA      Takao OSADA  
Department of Urology, St Marianna University School of Medicine,  
Kawasaki 216, Japan

男子不妊症患者の精漿中精子運動抑制因子 (Seminal Plasma Motility Inhibitor以下SPMI) の濃度を biological assayにて測定し精液所見と比較し次の結果を得た。精子濃度 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上かつ運動率60%以上をもつsubfertile Controlの精漿中SPMI濃度は $324.4 \pm 188.1 \text{Units/ml}$  (Mean  $\pm$  SD)であった。精子無力症患者を運動率により3つのグループに分類しGroup 1 (運動率60-40%) のSPMI濃度は $297.6 \pm 128.1 \text{Units/ml}$ , Group 2 (40-20%) は $326.9 \pm 160.3 \text{Units/ml}$ , Group 3 (20%以下) は $343.3 \pm 131.4 \text{Units/ml}$ であった。ControlとGroup群別のSPMI濃度とに有意差を認めずまた運動率とSPMI濃度とで相関関係を認めなかった。精子濃度とSPMI濃度とも有意差を認めなかった。

以上の結果とすでに報告した高濃度のSPMIは活発に運動する正常精子の運動を抑制する事実とを考えると精子の運動が不良となる原因は精漿中のSPMI濃度ではなく精子細胞膜を介してのSPMIの関与が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 1—5, 1993)

### 緒 言

ヒト精漿が精子妊孕能にどのような役割を演じているのか今だ不明である。分割射精による実験<sup>1-2)</sup>からは主として前立腺から由来する前半の分画には精子運動に対して促進因子、精囊から由来する後半の分画は抑制因子が含まれていると言われている。Gagnon一派は除膜モデルの実験を行っているときに精漿中に精子の運動を抑制する因子の存在に気づきこれを精子運動抑制因子 (Seminal Plasma Motility Inhibitor; SPMI) と名づけた<sup>3)</sup>。今回不妊症外来患者より得られた精漿を用いてSPMI濃度を測定し精液所見との関係を検討したので報告する。

### 対象と方法

対象は本院不妊症外来を訪れた204例である。精液所見が精子濃度 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上かつ精子運動率60%以上を有するsubfertile症例44例をControlとし、精子濃度あるいは運動率の一方が不良な症例及び両方が不良な症例について精子濃度および精子運動率別に分けSPMI濃度を比較検討した。また触診上精索静脈瘤を認めた不妊症患者の検体も測定した。

精漿の分離方法：精液は3～4日の禁欲期間をおいたのちマスターベーションにて清潔なガラス瓶に採取させた。精液が液状化したのちマクラーの計算盤を用いて手動的に精子濃度、運動率を測定した。終了後可及的すみやかに精液を $10000g$ で15分間遠沈しその上清を検体として測定する日まで $-20^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。なお精漿は射出後約2時間までに凍結させた。

SPMI濃度 (biological assay) 測定の方法：測定に必要な精子の準備法について述べると300~500gのWistar系ラットを屠殺し直ちに精巣，精巣上体を露出し精巣上体尾部のみを摘出した。精巣上体尾部を楔上に2方向切開しBSA (最終濃度 1 mg/ml Bovine serum albumin) を含んだHBS緩衝液 (130mM NaCl, 4mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 14mM fructose, 10mM HEPES, pH 8.0) 中でよく震とうさせ精子を浮遊させる。浮遊液中に活発に運動する精子を確認する。毛利・柳町らの除膜モデル<sup>4)</sup>の方法に従って (Fig 1), 上記で得られた精巣上体精子浮遊液2.5 $\mu$ lに精

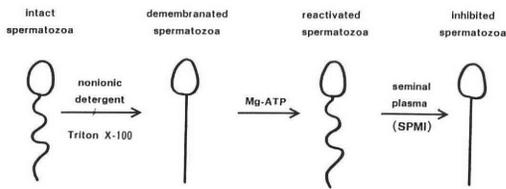


Fig.1 Biological assay system for Seminal Plasma Motility Inhibitor

子除膜液 (200mM sucrose, 25mM potassium glutamate, 1mM dithiothreitol, 35mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8) 250 $\mu$ lを加えると精子の運動が停止する。そこで2.5 $\mu$ lの0.5mM Mg. ATPを添加し除膜された精子が再び運動を開始 (再附活) したことを確認後，解凍した精漿を加えていき除膜精子の運動が5~10秒以内に静止させるのに必要な精漿の最少量を求めた。

1 Unitは精子除膜液 1 ml中に浮遊された再附活精子の運動を停止させるのに必要な精漿蛋白の量として

表した。SPMIのspecific activityはSPMI濃度を精漿蛋白濃度で除して求めた。

精漿蛋白濃度の測定：スタンダードカーブを作製するためにBSA (bovine serum albumin) を使用してLowry<sup>5)</sup>の方法で測定した。

統計学的検討はt-paired検定によった。

## 結 果

精子濃度40X10<sup>6</sup>/ml以上かつ運動率60%以上を有したsubfertile Control 44例の精漿中SPMI濃度は324.4 $\pm$ 188.1 Units/ml (Mean $\pm$ SD), SPMI specific activityは6.31 $\pm$ 2.89 Units/mg proteinであった (Table 1).

精子無力症症例を次の3つのグループに分類しSPMI濃度，SPMI specific activityをそれぞれ求めた。Group 1は運動率60%以下40%以上の52例で297.6 $\pm$ 128.1 Units/ml, 5.79 $\pm$ 2.72 Units/mg proteinであった。Group 2は運動率40%以下20%以上の48例で326.9 $\pm$ 160.3 Units/ml, 5.79 $\pm$ 2.72 Units/mg proteinであった。Group 3は運動率20%以下の高度精子無力症43例で343.3 $\pm$ 131.4 Units/ml, 6.14 $\pm$ 2.07 Units/mg proteinであった。subfertile Controlと各Group及び各Groupとの間に有意差を認めなかった (Table 2).

精子無力症患者全症例の運動率と精漿中SPMI濃度とSPMI specific activityとの相関関係をみると相関係数はそれぞれR=-0.07, R=0.05と相関関係を認めなかった (Fig 2, 3).

乏精子症を次の3つのグループに分類しSPMI濃度，SPMI specific activityをそれぞれ求めた。Group (1)は40X10<sup>6</sup>/ml以下20X10<sup>6</sup>/ml以上の乏精子症22例で330.4 $\pm$ 170.0 Units/ml, 6.42 $\pm$ 2.47 Units/mg proteinで

Table 1 SPMI biological activity and specific activity in seminal plasma of subfertile control, oligozoospermia asthenozoospermia and patients with varicocele

Group	Number	protein <sup>a</sup> mg/ml	SPMI activity <sup>a</sup> Units/ml	SPMI specific activity <sup>a</sup> Units/mg protein
subfertile Control	44	51.8 $\pm$ 12.8 <sup>b</sup>	324.4 $\pm$ 188.1 <sup>b</sup>	6.31 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>
oligozoospermia	95	53.7 $\pm$ 14.1 <sup>b</sup>	324.1 $\pm$ 149.0 <sup>b</sup>	6.15 $\pm$ 2.50 <sup>b</sup>
Asthenozoospermia	143	54.4 $\pm$ 13.3 <sup>b</sup>	321.2 $\pm$ 141.0 <sup>b</sup>	6.12 $\pm$ 2.69 <sup>b</sup>
patient with varicocele	16	57.5 $\pm$ 13.8 <sup>b</sup>	322.0 $\pm$ 87.1 <sup>b</sup>	5.60 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>

a: Data are Mean $\pm$ SD

b: Not significance

Table 2 SPMI biological activity and specific activity in seminal plasma of asthenozoospermia

Motility %	Number	protein <sup>a</sup> mg/ml	SPMI activity <sup>a</sup> Units/ml	SPMI specific activity <sup>a</sup> Units/mg protein
60>M>40	52	53.6±11.4 <sup>b</sup>	297.6±128.1 <sup>b</sup>	5.79±2.72 <sup>b</sup>
40>M>20	48	52.8±12.3 <sup>b</sup>	326.9±160.3 <sup>b</sup>	6.45±3.12 <sup>b</sup>
20>M	43	57.1±16.1 <sup>b</sup>	343.3±131.4 <sup>b</sup>	6.14±2.07 <sup>b</sup>

a: Data are Mean ± SD      b: Not significance

Table 3 SPMI biological activity and specific activity in seminal plasma of oligozoospermia

Density X10 <sup>6</sup> /ml	Number	protein <sup>a</sup> mg/ml	SPMI activity <sup>a</sup> Units/ml	SPMI specific activity <sup>a</sup> Units/mg protein
40>D>20	22	49.8±12.7 <sup>b</sup>	330.4±170.0 <sup>b</sup>	6.24±2.47 <sup>b</sup>
20>D>10	25	57.2±13.9 <sup>b</sup>	327.1±155.2 <sup>b</sup>	6.18±2.50 <sup>b</sup>
10>D	48	53.7±14.5 <sup>b</sup>	327.1±155.2 <sup>b</sup>	6.18±2.50 <sup>b</sup>

a: Data are Mean ± SD    b: Not significance

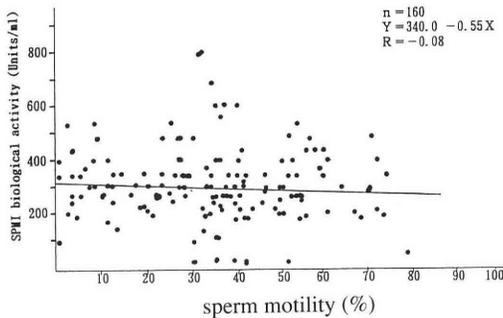


Fig.2 Correlation between the sperm motility and SPMI biological activity

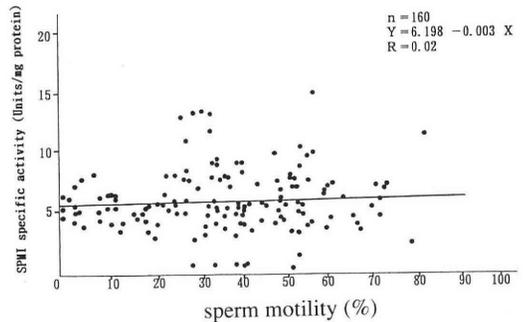


Fig.3 Correlation between the sperm motility and SPMI specific activity

あった。Group (2) は20X10<sup>6</sup>/ml以下10X10<sup>6</sup>/ml以上の乏精子症25例で312.8±119.7Units/ml, 5.86±2.60 Units/mg proteinであった。Group (3) は10X10<sup>6</sup>/ml以下の高度乏精子症48例で327.1±155.2 Units /ml, 6.18±2.50 Units/mg proteinであった。subfertile Controlと各Group及び各Groupとの間に有意差を認めなかった (Table 3)。

精索静脈瘤症例16例のSPMI濃度およびSPMI specific activityは322.0±87.1 Units/ml, 5.60±1.76 Units/mg proteinであった。精索静脈瘤症例とsub fertile Controlとの間に有意差を認めなかった。また精子無力症症例および乏精子症症例とも有意差を認めなかった (Table 1)。

### 考 察

精漿は精巣上体からの精子を希釈し精子の運動を開始させ雌性の生殖器官への輸送に寄与していると言われている<sup>6)</sup>。精漿には精子の機能に影響を与える種々の因子が含まれていることが報告されている。ラビット、ウシ、ヒトの精漿にはdecapacitating factorの存在<sup>7)</sup>、精子無力症の精子をfertile menより得られた精漿とインキュベーションすると精子の運動率が改善し、一方精子無力症患者の精漿にfertile menの活発に運動する精子をインキュベーションするとその運動率が低下する<sup>8)</sup>等の報告から精漿中に精子の運動に促進的あるいは抑制的に働く因子の存在が示唆される。

哺乳類精子の運動は非イオン性中性表面活性剤によって精子細胞膜が取り除かれ停止しMg・ATPの添加によって再び生きた精子と同じような運動を再開(再附活化)出来ることが知られている。Gagnon一派はヒト精子を用いてこの精子の除膜、運動の再附活の研究を行っている時に精漿が存在しているとMg・ATPを添加しても運動が再開しないことに基づき精漿中に再附活を抑制する因子の存在を示唆した。彼らはこの因子を精子運動抑制因子と名づけた<sup>9)</sup>。ヒトSPMIは若本・Gagnon<sup>10)</sup>により最近精製分離され、18000の分子量をもち1つのペプチドからなる蛋白であることが明らかになった。さらにこのヒトSPMIは剖検より得られた精囊、前立腺液及び精巢、精巣上体、前立腺、精囊組織中のSPMI濃度(biological assayおよびELISA)の測定から精囊液中にのみ有意に存在しSPMIは精囊から分泌されることが明らかになった<sup>11)</sup>。従って従来から言われている分割射精による後半の分泌液中の運動精子の不良な原因はSPMIも関与していると考えられる。

今回の実験結果は乏精子症患者の精子濃度とSPMI濃度とで有意の差を認めなかった。さらに精子無力症患者より得られた精漿中のSPMI濃度は正常の精液所見を持つsubfertile Controlより得られた精漿中SPMI濃度と有意の差を認めなかった。そしてSPMI濃度を精漿蛋白濃度で除して求めたSPMI specific activity (Units/mg protein) で比較しても有意の差を認めなかった。精子運動が不良な精子を含む精漿には高濃度のSPMIが存在するのではと推測していたがFig 2, 3 に示すようにSPMI濃度、SPMI specific activityともに精子運動率とは相関関係を認めなかった。精索静脈瘤患者の精液所見は精子濃度の低下ばかりでなく精子運動率も低下することが知られており<sup>12)</sup>精索静脈瘤患者より得られた精漿についてもSPMI濃度を調べたがsubfertile Control及び他の精子無力症グループのSPMI濃度と同程度であった。これらの所見は精子無力症患者の精漿中に存在するSPMIが精子の運動を不良にさせている原因とはならないことを示唆している。一方同じSPMI濃度で活発に運動している精子が存在している。

それでは精漿中に存在するSPMIは精子に対してどのような生理学的役割を持つのでしょうか。現在のところ不明と言わざるおえない。筆者らは除膜モデルの実験からSPMIがdynein armに存在するdynein ATPaseを濃度依存性に抑制することからSPMIはdynein armの機能を障害し精子運動を抑制することを明らかにしている<sup>13)</sup>。ヒト精漿から精製分離した

SPMIにPercollで精漿を完全に取除いた活発に運動する正常精子をインキュベーションさせ精子自動分析機(Cell Soft series3000, Cryo Resources Ltd, N. Y.)にて観察したところSPMIは精子運動率、Velocity, beat/cross frequencyを濃度依存性に抑制した<sup>14)</sup>。SPMIが精子細胞膜を有する精子の運動を抑制した作用機序について2つの可能性が考えられる。1つはSPMIが直接精子細胞膜を貫通してdynein ATPaseの活性を抑制した、1つはSPMIが精子細胞膜に付着してレセプターからのsecond messengerがdynein ATPaseの活性を抑制し精子の運動をブロックした可能性である。また前記の実験<sup>14)</sup>から正常精子の運動を完全に停止させるのに必要なSPMI濃度は1600 Units/mlであった。このことは除膜精子の運動を停止させるSPMI濃度が1 Unit/mlであることから正常の精子細胞膜を有する精子の運動を停止させるのに1600倍を要することになる。すなわち精子細胞膜はSPMIの作用をブロックする役割を持っている。一方数Units/mlの低濃度のSPMIでも精子運動が停止してしまう精子も存在する。これらの事実と今回の実験から得られた結果すなわち精子無力症患者の精漿中SPMI濃度と精子運動率とは相関しないとの結果を合わせ考えると精子細胞膜自体の障害がSPMIの精子細胞内への貫通を容易にし運動不良な精子をもたらす原因の1つになっているのかもしれない。さらにGagnon一派は精子無力症患者より得られた運動不良な精子の精子内細胞抽出液(Sperm extract)中に除膜精子の運動を抑制する因子の存在を観察している<sup>15)</sup>そして活発に運動する正常精子の精子内細胞抽出液中には抑制因子が含まれていなかった。従ってこの精子細胞抽出液中の運動抑制因子の存在は精子の運動が不良となる理由になり得ると考えられる。もしこの因子がSPMIと同一であるならば精子細胞膜のSPMIに対する透過性が活発に運動する精子より運動不良な精子において高くなり従って精子細胞内に侵入したSPMIが高濃度になれば精子の運動がブロックするという仮説を立てることが出来る。現在のところこの因子がSPMIと同一であるのか不明であり今後の研究を待たねばならない。

## 結 語

精漿中に存在する精子運動抑制因子(Seminal plasma motility inhibitor)の濃度を男子不妊症患者の精漿で測定したところ精子濃度及び精子運動率とSPMI濃度とは相関関係を認めなかった。このことから精子無力症の原因は精漿中のSPMI濃度ではなく精子細

胞膜を介してのSPMIの関与が示唆された。

本論文の要旨は第34回日本不妊学会総会(旭川), 1990年Society for Urology and Engineering Annual Meeting (New Orleans) にて発表した。また本研究の一部は文部省科学研究費国際学術共同研究(課題番号02044143)及び一般研究(B)(課題番号03454390)により援助された。最後に本研究にご協力を戴いた佐藤美紀嬢に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Eliasson R and Lindholmer C, Distribution and properties of spermatozoa in different fractions of split ejaculates. *Fertil Steril* 23: 252, 1972
- 2) Lindholmer CH, Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculate. *Fertil Steril* 24: 521, 1973
- 3) Gagnon C, Lee Y, Bourget L and Bardin CW, Control of sperm cell motility at axonemal level: reactivation of demembrated spermatozoa from rabbit, rat and man. *Can Fed Biol Soc Abstr*, 73, 1981
- 4) Mohri H and Yanagimachi R, Characteristics of motor apparatus in testicular epididymal and ejaculated spermatozoa. *Exp Cell Res*, 127: 191, 1980
- 5) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randal RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265, 1951
- 6) Mann T and Lutwak-Mann C, General features of the seminal plasma. *Male Reproductive Function and Semen*. Edited by T Mann and C Lutwak-Mann, Springer-Verlag, p28, 1981
- 7) Chang MC, A determinial effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 179: 258, 1957
- 8) Rozin S, Studies on seminal plasma. I. The role of seminal plasma in motility of spermatozoa. *Fertil Steril*. 11: 278, 1960
- 9) de Lamirande E and Gagnon C, Aprotinin and a seminal plasma factor provide two new tools to study the reguration of sperm motility. *J Submicrosc Cytol* 15: 83, 1983
- 10) Iwamoto T and Gagnon C, Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *J Androl* 9: 377, 1988
- 11) Luterman M, Iwamoto T and Gagnon C, Origin of

the human seminal plasma motility inhibitor within reproductive tract. *Int J Androl* 14: 91, 1991

- 12) 広川 信, 岩本晃明, 精索静脈瘤の治療: 内精索血管群高位結紮術について. 造精障害の病態と治療. 町田豊平, 医学教育出版社, 東京, 113, 1985
- 13) Iwamoto T, Tsang A, Luterman M, Dickson J, de Lamirande E, Okuno M, Mohri H and Gagnon C, Purification and characterization of sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. *Molec reproduct and develop* 31: 55, 1992
- 14) Iwamoto T and Gagnon C, A human seminal plasma protein blocks the motility of human spermatozoa. *J Urol* 140: 1045, 1988
- 15) de Lamirande E, Sherins RJ and Gagnon C, The presence of a motility inhibitor within spermatozoa may explain the poor sperm motility of some infertile men. *J Androl* 7: 215, 1986

### Biological activity of seminal plasma motility inhibitor in infertile patients

Teruaki Iwamoto, Hiroki Tanaka  
and Takao Osada

Department of Urology, St. Marianna University  
School of Medicine Kawasaki 216, Japan

The presence (biological activity) of seminal plasma motility inhibitor (SPMI) from infertile patients was investigated using demembrated reactivated rat spermatozoa. No difference was found in SPMI biological activity in seminal plasma with low sperm density less than  $<40 \times 10^6/\text{ml}$  or poor sperm motility less than  $<60\%$  when compared with that of subfertile control (sperm density  $>40 \times 10^6/\text{ml}$  and sperm motility  $>60\%$ ). No significant correlation was observed between SPMI biological activity and sperm motility.

It was concluded that the presence of SPMI in seminal plasma could not explain the genesis of the poor motile spermatozoa. Our data and the presence of a motility inhibitor within spermatozoa suggest that the poor motile sperm may be caused by high permeability of the sperm membrane to SPMI.

(受付: 1992年7月15日)

(受理: 1992年12月2日)

## STUDIES ON FUMARASE ACTIVITY IN HUMAN SEMEN

Yutaka UCHIJIMA and Ken-Ichiro YOSHIDA

(Director: Prof. H. Saitoh)

Department of Urology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

---

**Abstract:** Fumarase activity in semen of infertile men was estimated. There appeared to be the tendency that the higher the sperm motility, the higher values of fumarase activity in seminal plasma. But there was no significant correlation between fumarase activity in sperm cell and percentage sperm motility.

The observations suggest that fumarase in seminal plasma must closely related to sperm metabolism through L-malate production.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 ( 2 ), 6 —10, 1993)

---

### Introduction

Sperm motility is one of the most important male factors for fertilization. The primary donor of the energy needed by sperm flagellum for its movement was identified as ATP, which has been synthesized by the fructolysis and the respiration through citric acid cycle coupled with oxidative phosphorylation. Although a number of enzyme and substrates in human semen relating to ATP synthesis have been reported, the studies were limited in either seminal plasma or sperm side, and studies of the enzymes located in both seminal plasma and sperm were less<sup>1)</sup>.

However, fumarase (E. C. 4. 2. 1. 2), a key enzyme of citric acid cycle, being detected not only seminal plasma but also sperm, we have interested in investing the activity in human semen.

In the present study, using the collected samples of human semen from infertile patients, we have measured fumarase activity and analyzed its relation to semen qualities.

### Materials and Methods

Semen specimens were collected from 163 infertile men aged from 28 to 38 after abstinence of 4 days. The volume, sperm density and sperm motility

of each specimen were determined. Semen was centrifuged at 1.200 g for 20 minutes to separate sperm from seminal plasma. The seminal plasma thus obtained was used for the enzyme assay. The sperm pellets were resuspended in 2 ml of the 0.25 M sucrose was performed four times in this manner. Then, sperms were lysed by using sonicator (Biorupture: Cosmo Bio. Co. ). Resulting materials were centrifuged at 10.000 g for 20 minutes and both pellets and supernatant fluid thus separated, were used for the enzyme assay, individually. The fumarase activity in the sperm located almost in lysed partion and little in the supernatant.

Fumarase activity was estimated by the method of Racker<sup>2)</sup>. Test cuvette contained 0.02 ml sample, 50 mM L-malate and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) in a total volume of 3.02 ml. The reaction can be followed by the increase in the absorbance at 240 nm due to the accumulation of fumarate which was formed from the substrate of L-malate. One unit of enzyme activity is defined as the amount of requirement for the formation of 1  $\mu$  mole of fumarate per minutes.

The protein concentration was estimated by the method of Lowry et al<sup>3)</sup> using bovine serum albumin as standard.

### Results

Among 24 of 163 cases, fumarase activity in semen, seminal plasma and lysed sperm was estimated simultaneously. The respective total activity showed  $9140 \pm 921$  mU (Mean  $\pm$  S. E. ),  $7624 \pm 779$  mU and  $1526 \pm 282$  mU. When fumarase activity was calculated by mg protein, the respective activity showed  $1689 \pm 257$  mU/mg protein,  $286 \pm 18$  mU/mg protein and  $1404 \pm 18$  mU/mg protein (Table 1). In human semen fumarase appears mainly in the seminal plasma.

Among 163 cases, 11 cases showed azoospermia, and 43 cases showed severe oligozoospermia (sperm count  $<10 \times 10^6$ ) and 27 cases showed mild oligozoospermia (sperm count  $<20 \times 10^6$ ) and 82 cases showed normozoospermia. The activity in azoospermic patients was  $3456 \pm 264$  mU/ml, and the activity in severe oligozoospermic patients was  $3446 \pm 175$  mU/ml, and the activity in mild oligozoospermic patients was  $3216 \pm 249$  mU/ml and

Table 1 Fumarase activity in semen, seminal plasma and sperm

Samples	Fumarase activity (mU)	Fumarase activity (mU/mg protein)
Semen*	$9140 \pm 921^{**}$	$1689 \pm 257$
Seminal plasma	$7624 \pm 779$	$286 \pm 18$
Sperm	$1526 \pm 282$	$1404 \pm 145$

\*Total number of samples was 24 \*\*Mean  $\pm$  S.E.

Table 2 Fumarase activity in seminal plasma for each sperm density

Sperm Density	Fumarase activity (mU/ml)
azoospermia (N=11)*	$3456 \pm 264^{**}$
severe oligozoospermia (N=43)	$3446 \pm 175$
mild oligozoospermia (N=27)	$3216 \pm 249$
normozoospermia (N=82)	$3515 \pm 212$

\*Sample number \*\*Mean  $\pm$  S.E.

the activity in normozoospermic patients was  $3515 \pm 212$  mU/ml (Table 2, Fig.1). Between each groups there was no significant correlation, respectively. There was also no significant correlation between sperm density and the activity per mg protein in seminal plasma (Fig.2). Additionally, There was no significant correlation between sperm density and the activity per mg protein in lysed sperm cell (Fig.3).

Among 152 cases excluding azoospermia, 8 cases showed percentage sperm motility ranging below 20%, and 56 cases showed percentage sperm motility ranging from 20% to 40%, and 52 cases showed percentage sperm motility ranging from 40% to 60%

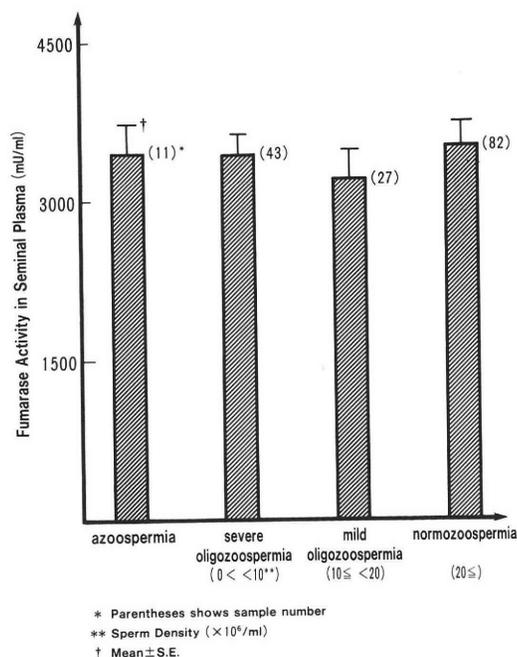


Fig.1 Fumarase activity in seminal plasma for sperm density

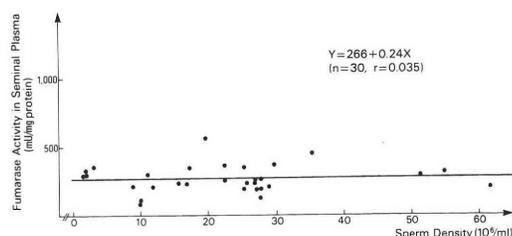


Fig.2 Correlation between fumarase activity (mU/mg protein) in seminal plasma and sperm density

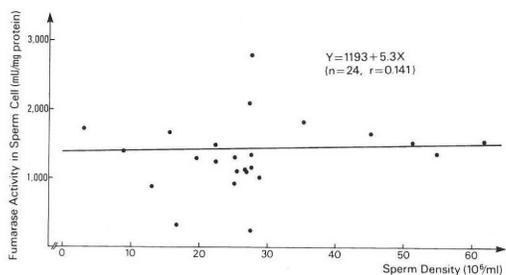


Fig.3 Correlation between fumarase activity (mU/mg protein) in sperm cells and sperm density

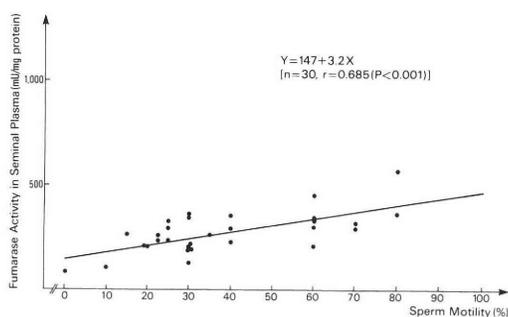


Fig.5 Correlation between fumarase activity (mU/mg protein) in seminal plasma and percentage sperm motility

Table 3 Fumarase activity in seminal plasma for each percentage sperm motility

Sperm Motility (%)	Fumarase Activity (mU/ml)
0 ≤ <20 (n= 8 )	1561 ± 864 <sup>a*</sup>
20 ≤ <40 (n=56)	2575 ± 1129 <sup>b</sup>
40 ≤ <60 (n=52)	3655 ± 1116 <sup>c</sup>
60 ≤ (n=36)	4712 ± 1709 <sup>d</sup>

\* different character means a significant correlation (P<0.05) between each group of sperm motility

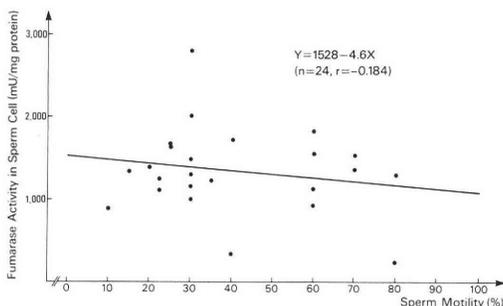


Fig.6 Correlation between fumarase activity (mU/mg protein) in sperm cells and percentage sperm motility

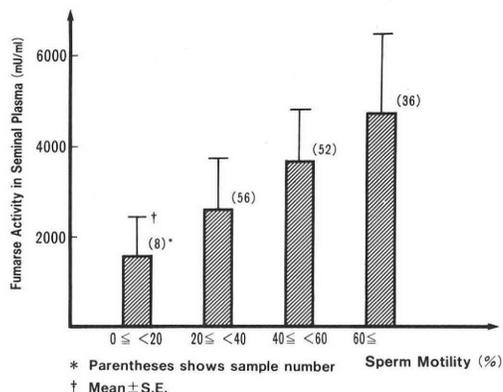


Fig.4 Fumarase activity in seminal plasma for percentage sperm motility

and 36 cases showed percentage sperm motility above 60%. The respective activity 1561 ± 864 mU/ml, 2575 ± 1129 mU/ml, 3655 ± 1116 mU/ml and 4712 ± 1709 mU/ml (Table 3, Fig.4). The average of fumarase activity in seminal plasma increased with the increase of percentage sperm motility. The correlation between each groups showed Table 3. Different alphabetical

character means a significant correlation between each group of percentage sperm motility in Table 3. There was also significant correlation between percentage sperm motility and the activity per mg protein in seminal plasma (Fig.5). But there was no significant correlation between percentage sperm motility and the activity per mg protein in lysed sperm cell (Fig.6)

### Discussion

Fumarase (E. C.4. 2. 1. 2), which catalyzes a reaction of tricarboxylic acids cycles, widely distributed in animals, plants and microorganism<sup>4)</sup> and is known to be localized in the mitochondria as well as in the cytosol<sup>5)</sup>. Crabbe<sup>6)</sup> reported that fumarase purified from human seminal plasma had similar properties to the enzyme purified from other human and animal sources.

The present study has demonstrated that fumarase activity in the seminal plasma was much higher than in lysed sperm cell when their activity was compared.

This result indicated that fumarase activity mainly located in seminal plasma. Additionally, the results were against to the study of Crabbe<sup>7)</sup>, by whom it was reported that fumarase in seminal plasma easily leaked out from sperm cell. Because in the present study fumarase in the washed fluids of sperm cell showed quite low activity and fumarase in seminal plasma of the azoospermic patients showed same activity as much as oligozoospermic patients. The origin of fumarase in seminal plasma may be from the epididymis or testes because fumarase activity declined markedly after vasectomy<sup>8)</sup>. Crabbe<sup>9)</sup> reported that fumarase activity showed a highly significant correlation with both sperm density and percentage sperm motility, and that simple assays for fumarase in semen would be a useful index for evaluation of male infertility.

It is interesting that fumarase activity in seminal plasma showed a significant correlation not with sperm density but with percentage sperm motility. As there was no significant correlation between fumarase activity in sperm cell and percentage sperm motility, the major pathway to form ATP might not be the reaction to L-malate from fumarate by fumarase in human sperm cell. Therefore, the present finding of significant correlation between fumarase activity in seminal plasma and percentage sperm motility may be elucidated from the report<sup>10)</sup> that L-malate formed from fumarate by fumarase, could permeate into the mitochondria membrane and may be further catabolized to pyruvate by malic enzyme. The above concept must be supported by Ikeda et al<sup>11)</sup> who have reported that there was a significant correlation between sperm motility and malic acid dehydrogenase activity.

The another answer for the significant of fumarase in semen may be that L-malate was to be essential for maximal oxidative utilization of pyruvate and lactate<sup>12)</sup>.

The observations suggest that fumarase in semen must closely related to sperm metabolism.

### References

- 1) Uchijima Y, Lactate dehydrogenase isoenzymes and its isoenzyme in human ejaculate. *Jpn J Urol* 72: 643, 1981

- 2) Racker E, Spectrophotometric measurements of the enzymic formation of fumaric and cis-aconitic acids. *Biochim Biophys Acta* 4: 211, 1950
- 3) Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L and Randall R J, Protein measurement with folic phenol reagen. *J Biol Chem* 193: 265, 1951
- 4) Wood S A, Miles J S, Roberts R E and Guest J R, Structural and functional relationships between fumarase and aspartase. *Biochem J* 237: 547, 1986
- 5) Tuboi S, Sato M, Ono H, Kobayashi K and Hiraga K, Mechanism of synthesis and localization of mitochondrial and cytosolic fumarase in rat liver. *Adv Enzyme regul* 25: 461, 1986
- 6) Crabbe M J C, The purification and preliminary investigation of fumarase, peroxidase, diamine oxidase and adenoshin deaminase from human seminal plasma. *Biochem Soc Trans* 5: 735, 1977
- 7) Crabbe M J C, The development of a qualitative assay for male infertility from a study of enzymes in human semen. *J Reprod Fert* 51: 73, 1977
- 8) Mann T and Lutwak-Mann C, Male reproductive function and semen. *Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems*. Springer-Verlage, p269, 1981
- 9) Crabbe M J C, Enzyme assay for sperm motility. *Lancet* ii: 1295, 1977
- 10) Lloyd G M, Energy metabolism and its regulation in the adult liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 93: 217, 1986
- 11) Ikeda M, Nakamura M, Okinaga S and Arai K, Effects of Gossypol on human sperm metabolism. II. Inhibition of MDH. *Jpn J Fertil Steril* 33: 949, 1988
- 12) Mann T and Lutwak-Mann C, Male reproductive function and semen. *Biochemistry of spermatozoa: Chemical and functional correlations in ejaculated semen. Andrologia aspects*. Springer-Verlage, p195, 1981

### 精液中フマラーゼ (Fumarase) 活性の研究

内島 豊 吉田謙一郎

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科  
(主任：斉藤 博教授)

フマラーゼはエネルギー代謝で重要なTCAサイクルの酵素の一員であり、植物および動物組織に広く分布していることが知られている。Crabbeらは精液中フマラーゼ活性を測定し、精子運動率とフマラーゼ活性の間に有意の相関があることを示し、不妊症の評価のパラメーターとして本酵素の測定の意義を

強調している。

我々は、精漿および精子中のフマラーゼ活性を測定することにより精液中の本酵素の意義について検討した。

不妊を主訴として受診した163症例につき、各症例について精液量、精子濃度、精子運動率を測定後、遠心分離して精漿と精子を分離した。精子はリン酸緩衝液で洗浄後、超音波破砕器にて破壊したあと、遠心分離し、その上澄みを酵素試料とした。

酵素活性の測定はRackerの方法に準じて施行した。

精子濃度と精漿中フマラーゼ活性および精子濃度と精子中フマラーゼ活性の間に有意の相関は認められなかった。精子運動率と精漿中フマラーゼ活性の間に有意の相関が認められたが、精子運動率と精子中フマラーゼ活性の間に有意の相関は認められなかった。

以上の結果から精漿中のフマラーゼ活性は精子運動性の良い指標となり、ヒト精子の代謝と密接な関係があることが示唆された。

(受付：1992年7月17日)

(受理：1993年12月2日)

## Percoll 2層法による運動精子回収の有用性と安定性

### Evaluation of Two-layer, Discontinuous Percoll Gradient Centrifugation for the Selection of Motile Human Spermatozoa

順天堂大学医学部産婦人科学教室

飯田 信

Makoto IIDA

武内裕之

Hiroyuki TAKEUCHI

高田道夫

Michio TAKADA

福田 勝

Masaru FUKUDA

町田正弘

Masahiro MACHIDA

桑原慶紀

Yosinori KUWABARA

岡部親宜

Chikanori OKABE

伊藤 哲

Satosi ITOH

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

Percoll 2層法による運動精子回収の有用性と安定性を評価する目的で、この方法により回収された精子の性状と運動精子回収率、さらにその回収率の精液所見による影響について検討した。

Percoll 2層法により精子運動率は処理前の $54 \pm 17\%$ が処理後には $80 \pm 18\%$ に、精子前進運動性のスコアも $1.7 \pm 0.6$ から $2.6 \pm 0.6$ へと著明に改善した。また臨床でも周期あたりの妊娠率が8%、患者あたりの妊娠率が20.9%と良好な成績を示した。精液の精子濃度および運動率の違いにより運動精子回収率に有意な差は認められず、その回収率の平均は $22 \pm 17\%$ であった。また妊娠例と非妊娠例の精子回収率の比較でも妊娠例が $23 \pm 17\%$ で非妊娠例の $21 \pm 17\%$ と差が認められなかった。以上の成績から、Percoll 2層法は前進運動精子を選択的に回収する優れた方法で、またどんな精液所見でも一定した回収率を示す安定した方法であることが明らかにされた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 11-16, 1993)

#### 緒 言

配偶者間人口授精 (artificial insemination with husband's semen; AIH) を行う際に、なんらかの方法で運動良好精子を回収し、これを用いることは最近一般的になってきた。運動良好精子を回収する方法にはAlbumin columns法<sup>1,2)</sup>、Percoll法<sup>3,4,5)</sup>、Glass wool filtration法<sup>6)</sup>およびSwim up法<sup>7)</sup>などがある。さらにPercoll法には精子濃縮を目的とした単層Percoll法<sup>8)</sup>そして運動良好な成熟精子の選択的回収を目的としたPercoll不連続密度勾配法<sup>4,5)</sup>と連続密度勾配法<sup>9)</sup>がある。われわれは外来診療の繁雑さを考え、Percoll不連続密度勾配法を簡便化したPercoll 2層法をAIHの精子回収法として採用している。Percoll 2層法に関しては臨床上、すでにAIHやIVF-ETに用いられてお

り、良好な成績が得られている<sup>10,11)</sup>。しかしながらいまだこの方法による運動精子回収に関する詳細な検討はなされていない。今回、われわれはこのPercoll 2層法の有用性と安定性を評価する目的で、この方法により回収された精子の性状と運動精子回収率、さらにその回収率に対する精液所見の影響について検討した。

#### 対象と方法

##### 1. 対象：

当科不妊外来を受診した夫婦のうち、不妊原因が男性因子のもの、不妊期間が長期におよぶもの、当科で夫婦生活のタイミング指導を3周期おこなうも妊娠に至らなかった268組の夫婦に対しAIHを700周期施行し、AIHに際し採取した精液700検体を研究の

対象とした。

2. Percoll液の調整：

蒸留水100mlにHEPES480mg, HANKS960mg, NaHCO<sub>3</sub> 100mgを加え, NaOHにてpH7.4に調整し精子培養液を作製した。さらに蒸留水10mlにHEPES480mg, NaCl1800mg, NaHCO<sub>3</sub> 100mgを加えPercoll等張化液を作製した。Percoll原液にPercoll等張化液を加え90%Percoll液とし, これに精子培養液を加え80%Percoll液, 40%Percoll液を作製した。これらのPercoll液 9 ml に対しヒト血清アルブミン (HSA) 25mgを添加した。

3. Percoll 2 層法の操作手順：

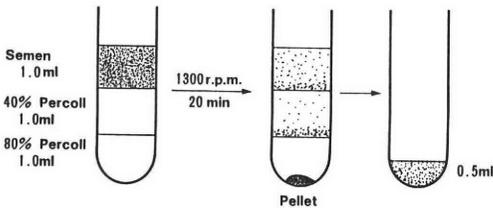


図1 Percoll 2 層法の操作手順

図1のように, 用手法で得られた精液を室温に30分間静置し液化させ, その精液約1mlずつを下層が80%Percoll 1 ml, 上層が40%Percoll 1 mlのPercoll 2 層上に層積した。1300r.p.m. で20分間遠心し, 運動良好精子を管底に沈澱させた。この沈澱精子 (pellet) をピペットで吸い取り, 1.5mgHASを含む0.5ml精子培養液で再懸濁した。精子懸濁液の一部 (5 $\mu$ l) を精子性状の検討に, 残りをAIHに供した。層積した精液は各遠心チューブに約1.0mlとし, 精液量に応じ遠心チューブを増やし, 全ての精液を使用した。

4. 精子の検定法：

Percoll処理前後にMakler counting chamberを用いて, 精子数, 精子運動率, 精子前進運動性をカウントした。運動精子回収率はPercoll処理後の運動精子数を処理前の運動精子数で割ったものとした。精子前進運動性は0(-)がほとんど前進運動がみられないもの, 1(+)が前進運動がゆっくりなもの, 2(++)が普通の前進運動を認めるもの, 3(+++)が活発な前進運動を認めるものとし, これらをスコアで表わした。

有意差検定は $\chi^2$ 検定とt検定を用いた。

結 果

1. Percoll 2 層法処理後の精液性状：

		処理後				
		0(-)	1(+)	2(++)	3(+++)	
処理前	0(-)	1	5	6	1	(13)
	1(+)	0	11	114	92	(217)
	2(++)	1	7	74	304	(386)
	3(+++)	0	0	1	23	(24)
		(2)	(23)	(195)	(420)	(640)

n=640

図2 Percoll処理前後の精子前進運動性

表1 Percoll処理前後の精子パラメータ

	処理前	処理後
Volume (ml)	3.1 $\pm$ 2.1 (0.2-8.0)	0.5
Concentration ( $\times 10^6$ /ml)	82 $\pm$ 59 (2-360)*	57 $\pm$ 53 (1-394)*
Motility (%)	54 $\pm$ 17 (10-94)*	80 $\pm$ 18 (6-100)*
Progression (0-3)	1.7 $\pm$ 0.6 (0-3)**	2.6 $\pm$ 0.6 (0-3)**
Motile sperm count ( $\times 10^6$ )	130 $\pm$ 125 (1-1050)+	23 $\pm$ 25 (0.2-171)+

n=700

Mean  $\pm$  S. D., ( ): Range

\*p<0.05, \*\*p<0.01

+p<0.001

表 1 は Percoll 処理前後の精子パラメータを示したもので、Percoll 処理により精子運動率は  $54 \pm 17\%$  から  $80 \pm 18\%$  へと有意に改善された ( $p < 0.05$ )。また精子前進運動性もスコアが Percoll 処理により  $1.7 \pm 0.6$  から  $2.6 \pm 0.6$  へと有意に改善された ( $p < 0.01$ )。精子の前進運動性は図 2 のように Percoll 処理により多くのスコアを 1 から 2 上げ著明な改善を示した。

2. 運動精子回収率：

700 例の運動良好精子の回収率は平均  $22 \pm 17\%$  であった。図 3 は Percoll 処理前後の運動精子数の相関を示す。相関係数は 0.59、危険率は 0.01% で有意な相関を示した。

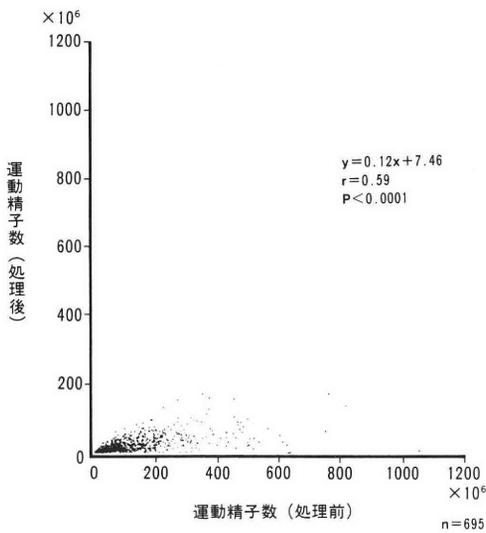


図 3 Percoll 処理前後の運動精子数の相関

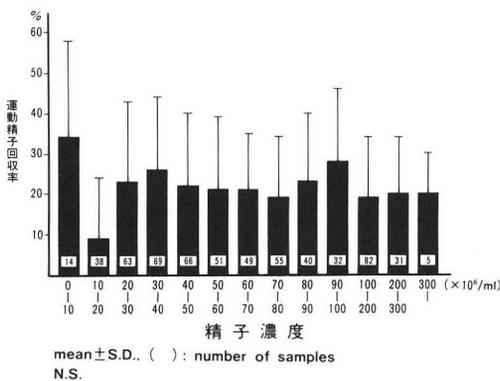


図 4 Percoll 処理前の精子濃度と運動精子回収率との関係

3. 精液性状の運動精子回収率への影響：

図 4 は Percoll 処理前の精子濃度と運動良好精子回収の関係を示している。それぞれの精子濃度において回収率には有意な差は認められなかった。また Percoll 処理前の精子運動率と回収率の関係においても、図 5 のようにそれぞれの運動率での回収率に有意な差は認められなかった。

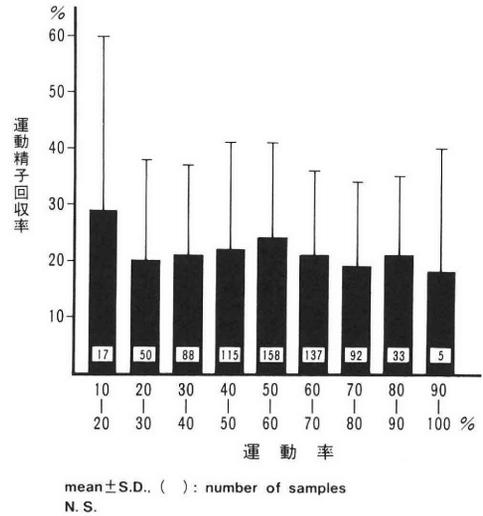


図 5 Percoll 処理前の精子運動率と運動精子回収率との関係

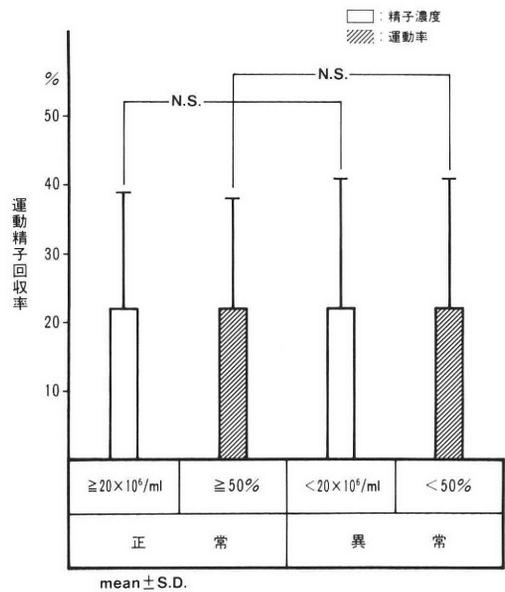


図 6 精子異常と運動精子回収率との関係

## 4. 精子性状異常と精子回収率の関係:

WHOの診断基準に従い精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満を乏精子症, 精子運動率50%以下を運動不良症とし, 正常例と比較した. 図6のように, 乏精子例, 運動不良例とも正常例と回収率に有意な差は認められなかった.

## 5. 妊娠例と非妊娠例における運動精子回収率:

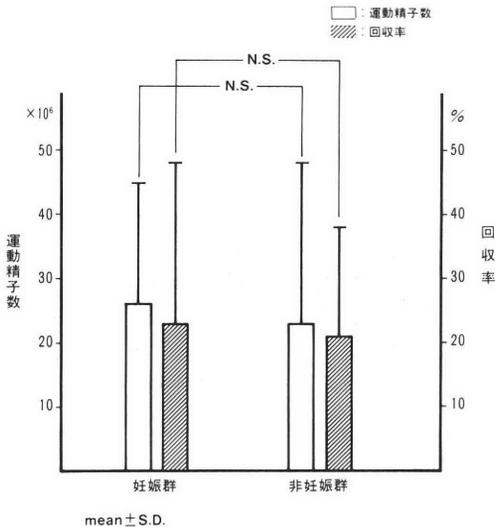


図7 妊娠例と非妊娠例における運動精子回収率

AIHにより53組56周期が妊娠に至った. 周期あたりの妊娠率は8.0%, 患者あたりの妊娠率は20.9%であった. 図7のように, 妊娠例と非妊娠例において子宮腔内注入運動精子数とその回収率に有意な差は認められなかった.

## 考 察

Percollは1963年MateykoとKopac<sup>12)</sup>により遠心分離に使用できる媒体として報告されて以来, 細胞膜に浸透せず細胞に対して無毒であることより血液や各種細胞の分離に用いられてきた. 1981年には精子に対してPercollを使用した密度勾配遠心が応用され<sup>3)</sup>, その後多くの報告がある. Forsterら<sup>4)</sup>はPercoll140%単層により精漿を除去した精子をPercoll60%, 70%, 80%, 90%, 100%の多層上に層積し, 遠心後の各分画での生存精子の割合を検討した. 80%, 90%, 100% Percoll内では生存精子が85%以上存在していること, さらにこれら分画の精子がSAP (Sperm penet-raion assay) で, 他の分画の精子よりもハムスター卵子との受精能力が増してい

ることを証明した. Bergerら<sup>5)</sup>もPercoll不連続密度勾配法の結果, 80%以上のPercollに存在している精子の運動性が改善され, さらにそれら精子の受精能力が増加していることを報告した. このことよりわれわれが用いたPercoll不連続密度勾配法をより簡便化したPercoll 40%, 80%の2層法でも最初に40% Percollで精漿を除去し, つぎに80% Percollで運動良好成熟精子を回収することができると考えられた. 実際, この方法により精子運動率は処理前の54%が処理後には80%に, 精子前進運動性のスコアも1.7から2.6へと著明に改善された. また臨床上也周期あたりの妊娠率が8%, 患者あたりの妊娠率が20.9%と良好な成績を示した. このことよりPercoll 2層法の有用性が証明された. 高橋ら<sup>13)</sup>は80% Percollによる攪拌精子密度勾配法を用いた精子回収率について検討した. その結果, 精子回収率が16%, 運動精子回収率が22%, 直進運動精子回収率が26%となり, 一般精子に比べ運動精子および直進運動精子の回収率が高かったことを報告している. われわれの結果でも精子運動率が80%に改善され, 同時に精子直進運動性も著明に改善された. これらの成績から, Percoll 2層法は直進運動精子を選択的に回収するものと思われた. しかし精子形態に関して, Rossら<sup>14)</sup>は90%, 100% Percoll内に回収された精子で精子形態に改善を見たものは9例中1例のみであったと報告している. 本研究ではPercoll 2層処理後の精子形態の改善の有無については観察していないが, 他のわれわれの研究によればPercoll 2層処理後の精子形態に有意な改善は認められなかった<sup>15)</sup>. このことより精子の卵子への受精には精子の運動性が最も密接に関係しているものと考えられる.

つぎにわれわれはPercoll 2層法の安定性を評価する目的で精液所見の違いによるpercoll 2層法の運動精子回収率について検討した.

Pardoら<sup>16)</sup>はPercoll不連続密度勾配法により回収した精子を用いてIUI (intrauterine insemination) を行い, その精子回収率と妊娠率について検討している. 精子回収率は中等度運動不良症で36.4%, 高度運動不良症で70%, 乏精子症で42.2%, 乏精子運動不良症で53.2%で, 高度運動不良症における精子回収率が有意に高いこと, また運動不良症における妊娠例と非妊娠例の回収率の比較では妊娠例が61.2%と非妊娠例の22.3%に比べ有意に高いことが明らかにされた. しかし精液の精子濃度および運動率の違いにより運動精子回収率に差があるか否かというわれわれの検討では, それぞれの精液所見での運動精

子回収率に有意な差は認められず、その運動精子回収率は平均22%であった。さらに精液所見が正常の場合、異常の場合での運動精子回収率にも差がないことが証明された。また妊娠例と非妊娠例の運動精子回収率の比較でも、妊娠例が23%で非妊娠例の21%との間に差は認められなかった。以上のわれわれの研究結果からはPardoらの報告と異なり、Percoll 2層法での運動精子回収率はどんな精液所見でも一定であることが示された。このことは2層のPercoll上に層積した精液量がほぼ1mlと一定していたことによると思われる。したがって精液所見よりどのくらいの運動精子が回収できるかPercoll処理前に予測できる利点はあるが、精液所見が非常に悪いときに回収される運動精子数には限界があることも明らかにされた。したがって運動精子回収率の向上が必要であり、回収率向上のための工夫の1つとして、操作が複雑にはなるが、層積する精液量を少なくし、遠心チューブの数を増やすことにより回収される総運動精子数を多くし、運動精子回収率を向上させることができる<sup>15)</sup>。今回、われわれは、Percoll不連続密度勾配法の簡便法ともいえる40%、80% Percoll 2層法について検討し、比較的短時間で行えるこの方法が複雑な外来診療に適し、前進運動精子の選択的回収に優れていることを認め、またどんな精液所見でも一定した回収率を示す安定した方法であることを証明しえた。しかし他の方法と同様、その回収率はさほど高くなく、限界のあることも明らかにされ、精液所見が悪い場合の回収の向上にはさらなる工夫が必要である。

## 文 献

- 1) Ericsson RJ, Isolation and storage of progressively motile human sperm. *Andrologia* 9: 111, 1977
- 2) Koper A, Evans PR, Whiterow RO, Flynn J T, Bayliss M and Blandy JP, A technique for selecting and concentrating the motile sperm from semen in oligozoospermia. *Br J Urol* 51: 587, 1979
- 3) Gorus FK and Pipeleers DG, A rapid method for the fraction of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 35: 662, 1981
- 4) Forster MS, Smith WD, Lee WI, Berger RE, Karp LE and Stenchever MA, Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* 40: 655, 1983
- 5) Berger T, Marrs RP and Moyer DL, Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa.

*Fertil Steril* 43: 268, 1985

- 6) Paulson JD and Polakoski KL, A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril* 28: 178, 1977
- 7) Lopata A, Patullo MJ, Chang A and James B, A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 27: 677, 1976
- 8) 小埜 清, 人工授精, 体外授精に供する精子調整法に関する研究—とくにPercoll密度勾配法を使用した精子洗浄濃縮法と良好精子の選択法—。慶応医学62: 351, 1985
- 9) Lessley B A and Garner DL, Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Research* 7: 49, 1983
- 10) Rhemrev J, Jeyendran RS, Vermeiden JPW and Zaneveld LJD, Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 51: 685, 1989
- 11) Vermeiden LPW, Statema-Lohmeijer CH, Bernardus RE, Willemsen-Brugma AM, ten-Brug C S and Schoemaker J, Pregnancy rate is significantly higher in in vitro fertilization procedure with spermatozoa isolated from nonliquefying semen in which liquefaction is induced by  $\alpha$ -amylase. *Fertil Steril* 51: 149, 1989
- 12) Mateyko GM and Kopac MJ, Cytophysical studies on living normal and neoplastic cells. *Annals New York Academy of Sciences* 105: 185, 1963
- 13) 高橋正明, 石川 洋, 山本陽子, 森川重敏, 越智正憲, 千原 啓, 永田哲朗, 米谷国男, Percoll攪拌密度勾配法による選択精子性状の検討。日不妊会誌34: 119, 1989
- 14) Hyne RV, Stojanoff A, Clarke GN, Lopata A and Johnston WIH, Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 45: 93, 1986
- 15) 福田 勝, 男性不妊; 私たちの行っている方法; Glass wool法。産婦人科治療62: 959, 1991
- 16) Pardo M, Buxaderas C, Barri PN, Pomerol Jr JM, Bancells N, Sabater J and Coroleu B, Spermatozoa selection in discontinuous Percoll gradients for use in artificial insemination. *Fertil Steril* 49: 505, 1988

## Evaluation of two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation for the selection of motile human spermatozoa

Makoto Iida, Masaru Fukuda,

Chikayosi Okabe, Hiroyuki Takeuchi,  
Masahiro Machida, Satosi Itoh  
Michio Takada and Yosinori Kuwabara

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

In a study of 700 ejaculates, changes in motility and progression before and after sperm separation by two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation were

evaluated. Both parameters improved significantly ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) in Percoll-separated spermatozoa. The recovery rate of motile sperm was  $22\pm 17\%$ . This recovery rate was not influenced by semen characteristic. In a second stage, 268 couples underwent AIH of separated sperm by Percoll gradient. An overall 20.9% pregnancy rate was achieved. Sperm separation by two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation is a useful and stable technique for AIH.

(受付：1992年 7月20日)

(受理：1992年12月 2日)

## EXPERIENCE WITH NO-SCALPEL VASECTOMY

Masanori YAMAMOTO, Yoshikazu TSUJI, Hatsunori HIBI  
and Koji MIYAKE

From the Department of Urology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466, Japan

**Abstract:** No-Scalpel vasectomy was developed to increase acceptability of vasectomy by deletion of the fear of the incision. The vas deferens is isolated from the internal spermatic vessels and an extracutaneous fixation clamp is used to stabilize the vas deferens. A sharpened curved hemostat is then used to puncture the scrotal skin, isolate the vas from perivasal tissues and deliver the vas deferens through a tiny midline puncture hole. Once the vas is delivered, the vasal stump is occluded by double-back ligation. The entry site usually contracts down to approximately 2 to 3 mm in size at the end of the procedure and needs no sutures for closure. No hematoma, which is most common complication after vasectomy, was recognized in the twenty five no-scalpel vasectomies. The operating time has ranged from 20 to 32 minutes. The drawback of this technique is the additional training required to get capability. However, no-scalpel vasectomy is a rapid and economic alternative to standard vasectomy with fewer complications.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 ( 2 ), 17—19, 1993)

### Introduction

Vasectomy is a simple and effective method of permanent surgical sterilization for males. Although this procedure is less costly and affiliated with much lower morbidity than tubal ligation in women, some men will be afraid of postoperative pain and possible complications consorted with standard scrotal incision which involves a certain amount of manipulation of the male genitalia. Conventional standard techniques of vasectomy need scrotal incision with a scalpel followed by exposing vas deferens. In China percutaneous method for achieving access to the vas deferens for vasectomy was developed.<sup>1)</sup> This no-scalpel technique increases acceptability of vasectomy by elimination of the fear of the incision and reduces morbidity by limiting the extent of dissection. We compared no-scalpel vasectomy with standard incisional vasectomy in regard to postoperative complication.

### Surgical technique

The no-scalpel vasectomy was performed in ex-

actly the same manner as the method described by Li, S-Q. et al.<sup>2)</sup> The no-scalpel technique needs two specialized tools. These are an extracutaneous vas fixation clamp (Figure 1A) and a sharpened curved hemostat (dissecting clamp) (figure 1B). The former is used to stabilize the vas deferens and the latter is

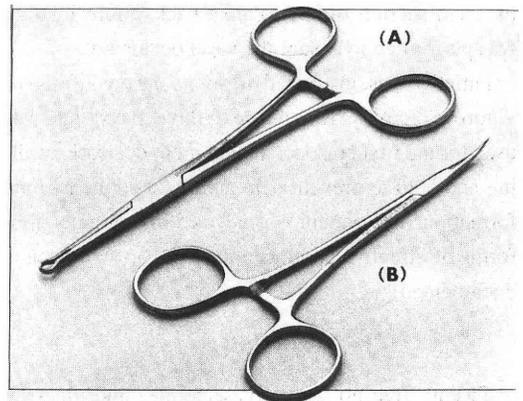


Fig.1 Two specially designed stainless steel instruments for performing vasectomies through a single puncture site. A, extracutaneous vas deferens fixation ring clamp. B, sharpened curved dissecting clamp.

used to puncture the scrotal skin. The scrotal skin was shaved and the penis was withdrawn upward onto the abdomen. Under 1% xylocaine anesthesia, the fixation clamp was used to grasp the vas deferens beneath the skin in the median raphe of the scrotum. With one blade of the dissecting clamp, the scrotal skin was punctured above the anterior aspect of the fixed vas, the dissecting clamp was introduced into the puncture site, and the blades were opened to expand skin and tissues over the vas. Using one of the blade of the dissecting clamp, the bare vas wall was skewered and the vas was delivered through the puncture hole while simultaneously releasing the extracutaneous fixation clamp. The dissecting clamp was then used to gently isolate the vas from encompassing structures. The vasal vessels may then be separated from the vas deferens itself. The vas was divided and a 1 cm segment of vas was excised. Each end was ligated with 2-0 silk. Contact between the two cut ends was avoided by folding the ends of the vas (double-back ligation). After both vasa have been occluded and returned to the scrotum, the puncture site was pinched tightly and inspected for bleeding. The puncture hole will have contracted and be invisible to the patient.

The standard incisional technique, after administration of local anesthesia, consisted of a single 1 cm incision made with a scalpel in the median raphe of the scrotum. Each vas was dissected from circumsccribing tissues, isolated, and divided. After excision of 1 cm section of vas, double-back suture ligation was performed to ensure the vasal occlusion.

Patients was instructed to avoid heavy lifting or vigorous activity for the next three days. Ice was used for the first postoperative night to decrease swelling and help to prevent pain and potential hematoma formation. The patient was advised to continue other forms of effective contraception until azzospermia is documented.

## Results

Twenty five no-scalpel vasectomies and nineteen conventional incisional vasectomies have been done. Four complications were noted: 3 occurred after use of the standard method and 1 after the no-scalpel technique. Three hematomas were identified among

the men who underwent conventional vasectomy and 1 infection was recognized in the men who had no-scalpel vasectomy. Postoperative edema and pain in the no-scalpel vasectomy group was much less than those in the standard incisional vasectomy group. The mean operating time for the no-scalpel vasectomy was 28.5 minutes while that for the standard incisional technique was 37.6 minutes. This operating time shows a 25% reduction compared to the operating time for the standard incisional vasectomy.

## Discussion

Vasectomy has become an increasingly popular method of male contraception. It is simple, relatively economical, safe, reliable, and potentially reversible. However, its acceptance is far from universal because some men are afraid of postoperative pain and discomfort associated with incisional vasectomy. No-scalpel vasectomy is a novel technique, originated in the China.<sup>1)</sup> The Chinese have performed over 8 million vasectomies using this technique. One advantage of this technique is that the risk of bleeding and local complications is minimized. Secondly, because of the minimally invasive nature of this technique, less postoperative edema and pain occur.

Hematoma is the most common and bothersome complication of standard incisional vasectomy, with an average incidence of 2% and a range of 1 to 29%.<sup>3)</sup> In a 1991 report by Li and associates,<sup>2)</sup> incidence of hematoma after no-scalpel vasectomy is 0.09%. In our series, no hematoma was recognized in the no-scalpel vasectomy group, while three cases of hematoma occurred after standard incisional vasectomy. This minimal rate of hematoma is probably a reflection of the minimal dissection necessary to separate the vas deferens from contiguous structures in the no-scalpel vasectomy. Infection following incisional vasectomy is surprisingly common with an average rate of 3.4%<sup>3)</sup> but several series report rates from 12 to 38%.<sup>4~6)</sup> Li et al. have described that the incidence of infection with the no-scalpel method is significantly lower than that reported after conventional vasectomy.<sup>2)</sup> In the present study, only one infection was identified in the no-scalpel vasectomy group.

The United States surgeons have recognized that

no-scalpel vasectomy reduces operating time, bleeding and postoperative pain when they switched from a conventional to no-scalpel technique.<sup>2)</sup> The no-scalpel technique was compared with a scrotal incisional technique in a recent prospective study consisting of 1203 men and 28 surgeons.<sup>7)</sup> The complication rate was 0.4 of 100 for the no-scalpel vasectomies and 3.1 of 100 for the incisional technique.<sup>7)</sup>

The only drawback of no-scalpel vasectomy is the additional training required to develop expertise in handling the two specialized instruments which are used with the no-scalpel vasectomy technique. The technique is rather difficult in those who have thick scrotal skin, retracted spermatic cord and scars from previous operations. These can be dealt with by making the puncture hole first and then inserting ring clamp into the hole to grasp the vas deferens. Although our experience with this new technique is limited, patients appear to have significantly less pain and less complication after the procedure than conventional vasectomy. Minimal dissection ensures minimal complications from bleeding and infection. Small puncture wounds requiring no sutures heal very quickly and infection is rare because of minimal tissue injury. It is now our method of choice for vasectomy. In terms of cost, no-scalpel vasectomy compared favorably to the standard incisional technique. It requires the use of only 2 inexpensive instruments. The no-scalpel method of vasectomy will gain more popularity as permanent contraception in the advanced country because it has a significantly lower complication rate and much less cost than those of the standard incisional technique.

In conclusion, no-scalpel vasectomy technique has broad applicability to virtually every candidate for vasectomy, helps to make vasectomy more attainable and reduces the number of complications that influence its acceptance. Future studies will continue making evaluations of such aspects as well as the impact of this technique on the attitude of medical staff and potential users of this contraceptive method.

## References

- 1) Li SQ, Sterilization Techniques, Teaching Material for the National Standard Workshop. Chongqing, People's Republic of China. Scientific and Technical Literature Press, p.176, 1988
- 2) Li SQ, Goldstein M, Zhu J and Huber D, The no-scalpel vasectomy. J Urol 145: 341, 1991
- 3) Kendrick JS, Gonzales B, Huber DH, Grubb GS and Rubin GL, Complications of vasectomies in the United States. J Family Pract 25: 245, 1987
- 4) Appell RA and Evans PR, Vasectomy: etiology of infectious complications. Fertil Steril 33: 52, 1980
- 5) Randall PE, Ganguli L and Marcuson RW, Wound infection following vasectomy. Brit J Urol 55: 564, 1983
- 6) Randall PE, Ganguli LA, Keaney MGL and Marcuson RW, Prevention of wound infection following vasectomy. Brit J Urol 57: 227, 1985
- 7) Nirapathpongporn A, Huber DH and Krieger JN, No-scalpel vasectomy at the King's birthday vasectomy festival. Lancet 335: 894, 1990

## メス非使用による精管切断術

名古屋大学医学部泌尿器科

山本雅憲 辻 克和 日比初紀  
三宅弘治

メスを用いない精管切断の術式は、切開に対する不安を除去する意味で患者にとって容易に受け入れられる手術法である。まず用手的に精管を精索血管系より分離し、先端が円形となった鉗子を用いてこれを把握する。ついで、先端がとがった鉗子を用いて陰のう皮膚を穿刺し精管を周囲組織よりはく離れた後、穿刺孔より創外へ取り出す。精管を一部切除した後、断端を二重に結紮する。穿刺孔は自然に縮小し、縫合の必要はない。精管切断後の合併症として最も多い血腫形成は、25例の本術式の経験では認められなかった。手術時間は、20～32分であった。本術式の唯一の欠点は何例かのトレーニングが術式の習得のために必要ということである。しかし、本術式は手術時間も短く合併症も少いため、皮膚切開を必要とする標準的な精管切断術に変わりうる治療法と考えられる。

(受付：1992年7月29日)

(受理：1992年12月2日)

## ヒト精液性状・妊孕能と精子の先体酵素 および尾部構成蛋白の関連

### Involvement of Human Semen Properties and Fertilizing Capacity in the Acrosome Enzymes and Proteinic Tail Components of Spermatozoa

福島県立医科大学産科婦人科学講座

(主任：佐藤章教授)

菅野孝子

星和彦

Takako SUGANO

Kazuhiko HOSHI

Department of Obstetrics and Gynecology,

Fukushima Medical College, Fukushima 960-12, Japan

不妊症80例の精子に免疫蛍光染色法を施し、精子の主要構成酵素と蛋白質であるacrosin (AC)・hyaluronidase (HY)・tubulin (TU)・dynein (DY)・actin (ACT)を同定した。精液性状の不良な群では、これらの酵素・蛋白の欠損する精子が多く認められた。乏精子症では特にHYとACT、精子無力症ではTU、DYとACT、また奇形率の高い症例ではTUとACTの欠損する精子が有意に多く認められた。

良好な精液性状を示す精子の免疫蛍光染色陽性率の<平均値-1.5x標準偏差>を正常下限値と設定し、AC・HY・TU・DY・ACTのいずれか一つでも下限値未満を示すものを染色不良群と仮定した。80例のうちAIHやIVF-ETの治療により14例が妊娠し、妊娠成立・不成立と精液性状の良・不良に関連は認められなかったが、免疫染色良好群に妊娠成立例が有意に多く認められた。

精子の妊孕能検索法として、免疫蛍光染色法による酵素・蛋白の同定は有益である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 20-26, 1993)

#### 緒言

哺乳動物の精子は頭部と尾部からなる形態的にも機能的にも特殊に分化した細胞である。

精子の頭部先端には先体 (acrosome) が位置している。その内部には卵子周囲の保護層を溶解するために必要な酵素と酵素様物質が含まれ、数種類がすでに同定されているが、中でも重要なものはhyaluronidase (HY) と、trypsin様作用を有するacrosin (AC) である。頭部の大部分を占めるのは核で、DNAとS-S結合に富む塩基性蛋白質から形成されている。核と先体との間には蛋白質actin (ACT) を含む穿孔器 (perforatorium) があり、先体反応 (acrosome reaction) にかかわっている。

尾部の主要構造は軸糸 (axoneme) と呼ばれ、細胞

膜に囲まれたマトリックス中に存在している。axonemeは中心に2本の中心小管と、これを取り囲むように存在する9対の微小管 (周辺小管：A小管とB小管) からなり、A小管は13本、B小管は10~11本の原繊維 (protofilament) からできている<sup>1)</sup>。原繊維を構成する蛋白質はtubulin (TU) で<sup>2,3)</sup>、A小管には蛋白質のdynein (DY) が腕のように付着している<sup>4,5)</sup>。axonemeの先端は中心小体 (centriole) と呼ばれている部分で、TUとACTから構成され、尾部運動発現の引き金の役割を果たしている。尾部の前方は体部 (mid portion) と呼ばれる部分であり、外側はmitochondriaで囲まれている。mid portionの後方、すなわち尾部の大部分を占める主部 (principal portion) はACTからなるspiral sheathに取り囲まれている<sup>6)</sup>。

精子が受精するためには先体反応と尾部の運動性

が不可欠であり、これには前述した先体酵素と尾部構成蛋白質が欠損することなく正常に機能することが必要となる。

今回われわれは、精子のAC, HY, DY, TU, ACTを免疫蛍光染色法で同定し、その存在様式と精液性状および妊孕性との関連について検討を加えてみた。

## 研究方法

### 1. 対象

福島県立医科大学附属病院産婦人科にて、人工授精 (Artificial Insemination with Husband's semen; AIH) もしくは、体外受精-胚移植 (In Vitro Fertilization and Embryo Transfer; IVF-ET) を行った80例の不孕症夫婦の精子を対象とした。

### 2. 精子の回収

精液は用手法にて回収し、室温で30分間静置して十分に液化させた。精液分析はWHO精液分析の正常値にもとづいて行なった。精液に同量の Sperm washing medium (modified Human Tubal Fluid medium with human albumin (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca))<sup>7)</sup> を加えて遠心洗浄 (300×g, 10分間) 後、上清を除去し、pelletに0.5mlのmediumを加え攪拌し、高濃度精子浮遊液を作成した。この精子浮遊液に2.0mlのmediumを層積し、37℃ 5% CO<sub>2</sub> in air中でswim up法<sup>8)</sup> を施行した。1時間後、運動良好精子を回収し精子数と運動率を調べた。回収精子はAIHやIVF-ETに用いたが、その一部をphosphate buffered saline (PBS) solutionで2回遠心洗浄 (150×g, 5分間) して免疫蛍光染色検査に供した。

### 3. 免疫蛍光染色法

Gatenby's glue (alcohol solution with gelatin and chrome aluminum) を塗布したスライドガラスに精子浮遊液を塗抹し室温で自然乾燥させた。標本を、pure methanol (-20℃, 15分間) と、pure acetone (-20℃, 5分間) に浸して固定し、室温にて乾燥させた。その後、PBS solutionに5分間ずつ2回浸してrehydrationを行い、50μlの山羊血清 (normal goat serum) を滴下して室温で15分間反応させた。normal goat serumを除去後、50μlの第一次抗体 (Anti-acrosin antibody, Anti-hyaluronidase antibody, Anti-tubulin antibody, Anti-dynein antibody, Anti-actin antibody (Serono, Italy)) をそれぞれの標本に滴下し、高湿度下に4℃で一晩放置した。再び、PBS solutionで洗浄 (10分間, 3回) した後、50μlの第二次抗体 (Anti-rabbit gamma globulin second antibody FITC) を滴下し遮光下に室温で1時間反応させた。その後PBS solutionで10分間

ずつ3回洗浄し、10% PBS solutionを含むglycerol solutionを滴下しカバーガラスをのせ、観察に供した。

### 4. 標本の観察

蛍光顕微鏡は0-530 barrier filter, DM-500+0515 dichronic-mirror, BG12 excitation filterを使用した。1000倍油浸レンズを用いて視野内のすべての精子を観察し、1標本につき精子数が100個以上になるまで視野を追加観察した。精子頭部の観察ではacrosome capの部分に明らかに蛍光を認めるものを、また尾部の観察では明らかにprincipal portionに蛍光を認めるものを免疫蛍光染色陽性とした。

図1に、各酵素、各蛋白質の染色箇所を、写真1-5にそれぞれの染色陽性精子を示した。

なお、統計学的処理には $\chi^2$ 検定を用いた。

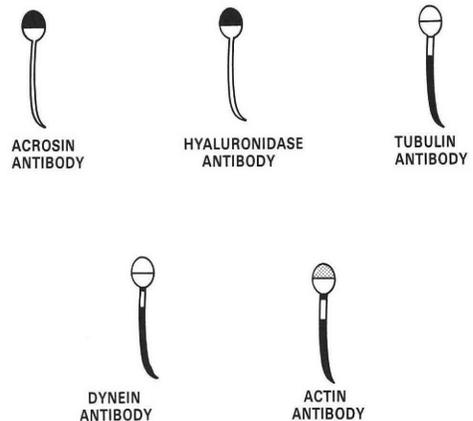


図1 免疫蛍光染色法による抗体別染色部位

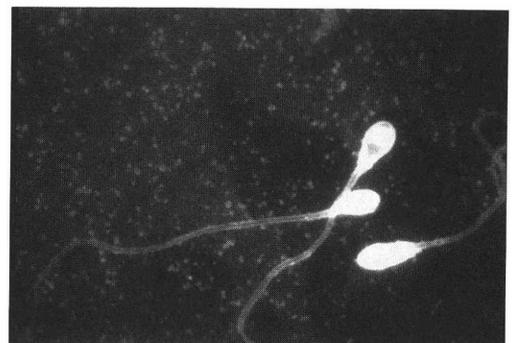


写真1 免疫蛍光染色法によるacrosin陽性精子  
acrosinは先体部に染色される。

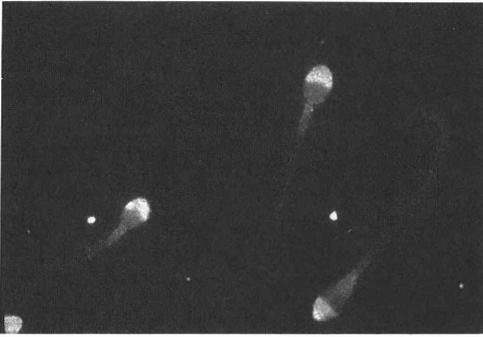


写真2 免疫蛍光染色法によるhyaluronidase陽性精子  
hyaluronidaseは先体部に染色される。

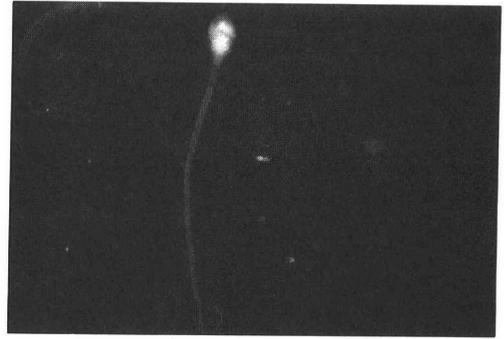


写真4 免疫蛍光染色法によるdynein陽性精子  
dyneinはmid portionより後方の尾部に染色される。

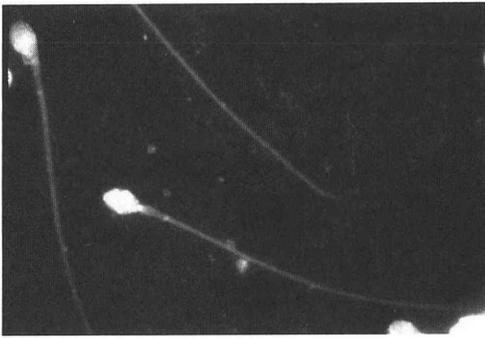


写真3 免疫蛍光染色法によるtubulin陽性精子  
tubulinはmid portionより後方の尾部に染色される。

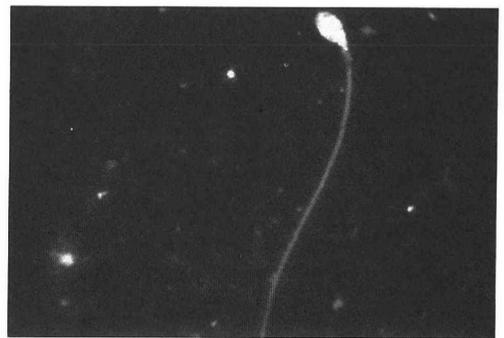


写真5 免疫蛍光染色法によるactin陽性精子  
actinはmid portionより後方の尾部と、わずかに先体に染色される。

研究成績

今回対象とした80症例を、1987年に定められたWHO精液分析基準<sup>9)</sup>にもとづいて分類すると、精液所見が良好なものは39例、不良例は41例であった。不良例の内訳は、乏精子症 (Oligozoospermia) 3例、精子無力症 (Asthenozoospermia) 27例、乏精子-精子無力症11例であった。しかし、精子奇形率が50%以上の奇形精子症 (Teratozoospermia) は含まれていなかった。

1. 精液所見不良症例の免疫蛍光染色成績

精液所見が良好な39例(良好群)と、精子濃度、運動率もしくは奇形率が正常範囲になく、精液性状から男性不妊と診断された41例(不良群)の免疫蛍光染色検査成績を表1に示した。すべての酵素、蛋白質とも不良群の陽性率が低下していた。なかでも、HYとACTは統計学的にも有意 (P<0.01, P<0.01) に低下していた。

2. 乏精子症症例の免疫蛍光染色成績

精子濃度が $20 \times 10^6/ml$ 未満で乏精子症と診断された14例(乏精子-精子無力症を含む)と、それ以外の66例について免疫蛍光染色成績を比較し、その結果を表2に示した。陽性率はいずれも乏精子症群で低値を示し、HYとACTでは有意 (P<0.01, P<0.01) に低下していた。

3. 精子無力症症例の免疫蛍光染色成績

精子運動率が50%未満で精子無力症と診断された38例(乏精子-精子無力症を含む)とそれ以外の42例について免疫蛍光染色成績を比較し、その結果を表3に示した。いずれも精子無力症群で低値を示したが、とくに尾部構成蛋白質のTU, DY, ACTが有意 (P<0.01, P<0.05, P<0.05) に低下していた。

4. 精子奇形率の高い症例の免疫蛍光染色成績

今回対象とした症例の中には精子奇形率が50%以上を示す奇形精子症が含まれていなかったため、奇形率が25%以上を示す8例と、25%未満の72例で

表1 精液性状不良例の免疫蛍光染色成績

精液性状	症例数			免疫蛍光染色陽性率 Mean±SD %					
	濃度 ×10 <sup>6</sup> /ml	運動率 %	奇形率 %	AC	HY	TU	DY	ACT	
不良群	<20 or	<50 or	50≤	41	83.2±22.5	81.6±18.1	84.5±22.2	86.4±18.5	88.3±17.1
良好群	20≤&	50≤ &	<50	39	92.8±7.1	95.1±5.8	95.5±4.1	93.1±13.0	96.7±5.9
p value				ns	<0.01	ns	ns	<0.01	

AC: acrosin      HY: hyaluronidase      TU: tubulin  
 DY: dynein      ACT: actin      ns: not significant

表2 乏精子症症例の免疫蛍光染色成績

精液性状	症例数		免疫蛍光染色陽性率 Mean±SD %				
	精子濃度 ×10 <sup>6</sup> /ml		AC	HY	TU	DY	ACT
乏精子症	<20	14	81.1±18.2	75.7±17.9	87.2±15.1	81.3±19.5	84.9±11.2
	20≤	66	89.0±17.9	90.9±13.2	91.1±17.3	91.9±15.3	94.5±12.4
p value			ns	<0.01	ns	ns	<0.01

AC: acrosin      HY: hyaluronidase      TU: tubulin  
 DY: dynein      ACT: actin      ns: not significant

表3 精子無力症症例の免疫蛍光染色成績

精液性状	症例数		免疫蛍光染色陽性率 Mean±SD %				
	精子運動率 %		AC	HY	TU	DY	ACT
精子無力症	<50	38	81.9±23.1	84.9±18.2	83.4±26.6	85.9±19.0	88.1±17.3
	50≤	42	93.2±6.9	93.9±8.6	95.5±4.4	94.1±12.6	96.7±5.8
p value			ns	ns	<0.01	<0.05	<0.05

AC: acrosin      HY: hyaluronidase      TU: tubulin  
 DY: dynein      ACT: actin      ns: not significant

免疫蛍光染色成績を比較した。いずれの酵素、蛋白質も奇形率の高い群に低下が認められ、TUとACTは有意(P<0.05, P<0.05)に低下していた(表4)。

5. 妊娠成立例と免疫蛍光染色成績

80症例中治療により14例の妊娠が得られた。

精液所見が良好であった39例について、それぞれの免疫蛍光染色陽性率の<平均値-1.5×標準偏差(Mean-1.5SD)>を求めると、ACは82%、HYは86%、TUは89%、DYは73%、およびACTは87%となる。そこでこれらの値を正常下限値と設定し1種類

表4 精子奇形率の高い症例の免疫蛍光染色成績

精液性状 精子奇形率 %	症例数	免疫蛍光染色陽性率 Mean±SD %				
		AC	HY	TU	DY	ACT
25≤	8	82.4±32.1	83.0±17.6	62.2±41.2	80.0±32.4	81.3±29.8
<25	72	88.2±15.5	88.5±15.2	93.8±9.2	91.4±13.9	94.6±8.2
p value		ns	ns	<0.05	ns	<0.05

AC: acrosin      HY: hyaluronidase      TU: tubulin  
 DY: dynein      ACT: actin      ns: not significant

表5 精液性状および免疫蛍光染色成績と妊娠成立の関連

免疫蛍光染色成績	精液性状	
	良好	不良
良好	8/31 (26%)	4/18 (22%)
不良	1/8 (13%)	1/23 (4%)

妊娠成立数/症例数 (妊娠成立率%)

表6 精液性状と妊娠成立の関連

精液性状	妊娠	成立	不成立	計
不良	5	36	41	
計	14	66	80	

X<sup>2</sup>検定 not significant

表7 免疫蛍光染色成績と妊娠成立の関連

免疫蛍光染色成績	妊娠	成立	不成立	計
不良	2	29	31	
計	14	66	80	

X<sup>2</sup>検定 p<0.05

でも下限値未満を含むものを免疫蛍光染色検査不良群と仮定してみた。

表5は精液性状から良好と不良に、および免疫蛍光染色検査から良好と不良に分類した各群の症例数、妊娠成立例数および妊娠成立率を示したものである。精液性状の良好・不良にかかわらず免疫蛍光染色検査良好の群に妊娠成立率が高いことが示されている。

表6は精液性状と妊娠成立の関連を、表7は免疫蛍光染色検査の良好・不良と妊娠成立の関連をみたものである。精液性状の良好・不良と妊娠の成立あるいは不成立の間に関連性は認められないが、免疫蛍光群には妊娠成立例が有意に多いという成績が得られた。

考案

哺乳動物の受精には、精子の受精能獲得 (capacitation)<sup>10)</sup>、先体反応 (acrosome reaction) そして運動性の活発化 (hyper-activation) が不可欠といわれている<sup>11,12)</sup>。卵子の周囲には保護層として顆粒膜細胞群と透明帯が存在するが、精子がこれらの卵保護層を通過するためには、hyperactivationによる精子尾部の力強い運動力と、acrosome reactionにより放出される先体酵素<sup>13)</sup>の溶解作用が必要となる。

先体に含まれる酵素もしくは酵素様物質は、すでに10種類以上のものが検出同定されている<sup>14)</sup>。McRorieとWilliamsは顆粒膜細胞群のマトリックスを溶解する酵素としてhaluronidase (HY) を抽出し、報告した<sup>15)</sup>。また、Baccettiは卵透明帯に作用するtrypsinによく似た蛋白分解酵素のacrosin (AC) を同定している<sup>16)</sup>。

一方、精子尾部鞭毛の基本構造は、1959年に Afzeliusによってはじめて電顕レベルで明らかにされ、その後、種々の尾部構成蛋白質が抽出同定されている。Gibbonsはmyosin様作用をもつATPase蛋白質のdynein (DY) を抽出した<sup>4)</sup>。DYはダブルレット微小管のA小管から隣のB小管へ向かってのびる1対の腕を形成しており、精子のmid portionで行われる呼吸と解糖に反応して、対小管との間に一時的な架橋を形成し、微小管間に“すべり”運動を起こす<sup>17)</sup>。微小管(A小管、B小管)の壁は直径4nmほどの球状単位が螺旋状に配列して形成されており、この微小管を構成する蛋白質が毛利らにより分離同定されたtubulin (TU) である<sup>2)</sup>。また、OchsとWolfは、微小管構造を取り囲むspiral sheathや、subacrosomal space、centrioleにactin (ACT) が存在することを報告している<sup>6)</sup>。hyperactivationは受精直前にみられる哺乳動物精子の運動性の昂進で、その発現機構はいまだ不明な点が多いが、DY、TU、ACTなどの尾部構成蛋白質が相互に作用し“すべり運動”が最高潮に発動していることはまちがいない。

今回用いた染色法は、精子にとって重要な酵素や蛋白質であるAC、HY、TU、DY、ACTの存在を蛍光抗体法により光顕レベルで観察可能にしたものである。本研究では不妊症夫婦の精子に対して免疫蛍光染色法を施行してみた。

運動性の低下している精子では、TU、DY、ACTの染色陽性率が、また奇形率の高い精子ではTU、ACTの染色陽性率が低く、これらの精子では尾部構成蛋白質に器質的あるいは機能的異常の存在していることがうかがわれる。つまりTU、DYの欠損は尾部の構造異常をもたらす、尾部の正常な運動が障害されると考えられる。毛利らは、不妊症男性精子で運動能を欠如したもののうち、DY腕を欠くものがあることを観察しており、これらはimmotile cilia症候群と呼ばれている<sup>18)</sup>。また、subacrosomal region、centrioleそしてspiral sheathを構成するACTの欠損は、尾部の運動性の低下とともに精子の形態的異常を引き起こすと考えられる。

精子濃度とこれらの蛋白質との関連をみると、乏精子症の症例でHYとACTの陽性率が低下していた。これらの原因は明かではないが、乏精子症では奇形率も高くなる傾向があり、ACTの欠損はそのためかもしれない。しかし、HYが低下する原因は不明であり、乏精子症に特徴的なものか否かについては検討していかなければならない。

80症例に対しAIHまたはIVF-ETの治療が行われ、

14例の妊娠が得られた。妊娠成立例と不成立例について精液性状と免疫傾向染色法の成績を比べてみると、妊娠成立と精液性状には関連性が認められない(表6)が、蛍光染色成績とは有意な相関が認められた(表7)。すなわち妊娠例は免疫蛍光染色検査法陽性率の良好な症例に有意に多くみられている。

これらの事実は妊孕能すなわち精子の機能を評価する方法として免疫蛍光染色法が精液分析よりはるかに優れていることを示すものである。精液分析の結果が正常と診断される症例の中にも、精子の酵素や主要蛋白質に器質的あるいは機能的な異常を伴うことがあり、そのような場合は受精する可能性は少ないはずである。精子の機能検査法として先体酵素や尾部構成蛋白質を同定する本法の果たす役割は今後大きくなるものと考えられる。

## 文 献

- 1) 吉田重雄, 精子の運動と代謝. 代謝16:107, 1979
- 2) Mohri H, Amino-acid composition of "Tubulin" constituting microtubules of sperm flagella. Nature 217: 1053, 1968
- 3) Yanagisawa T, Hasegawa S and Mohri H, The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement. Exp Cell Res 52: 86, 1968
- 4) Gibbons IR, Studies on the protein components of cilia from tetrahymena pyriformis. Proc Nat Acad Sci 50: 1002, 1963
- 5) 毛利秀雄, 織毛・鞭毛関連タンパク質. 生体の科学41: 319, 1990
- 6) Ochs D and Wolf DP, Actin in ejaculated human sperm cells. Biol Reprod 33: 1223, 1985
- 7) Quinn P, Kerin J F and Warners GM, Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fert Steril 44: 493, 1985
- 8) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 齊藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造, われわれの行っている精液静置法"layering method"による精液中からの良好精子の分離. 日不妊会誌28: 101, 1983
- 9) WHO, Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, Published on behalf of the World Health Organization. Cambridge New York New Rochille Melbourne Sydney, 27, 1987
- 10) 星 和彦, 精子の受精能獲得. 細胞17: 13, 1985

- 11) Yanagimachi R, Mammalian Fertilization, In Knobil, E. and Neill J eds. The Physiology of Reproduction. P135, Raven press, 1988
- 12) 佐藤 章, 吉松宣弘, 星 和彦, 哺乳動物の受精機構. 福島医誌38: 203, 1988
- 13) Yanagimachi R, Mechanisms of fertilization in mammals, In Mastroianni L and Biggers JD eds. Fertilization and Embryonic Development in Vitro. P81, Plenum Press, 1981
- 14) Baccetti B and Afzelius BA, The biology of the sperm cell, In Wolsky A ed. Monographs in Developmental Biology. Vol.10, S karger, 1976
- 15) McRorie RA and William WL, Biochemistry of mammalian fertilization. Ann Rev Biochem 43: 777, 1974
- 16) Baccetti B, The evolution of the acrosomal complex, In Fawcett DW and Bedford JM eds. The Spermatozoon. P305, Urban & Schwarzenberg, 1979
- 17) Summers KE and Gibbons IR, Effects of trypsin digestion on flagellar structures and their relationship to motility. J Cell Biol 58: 618, 1973
- 18) 毛利秀雄, 精子の生物学. 東京大学出版会 52, 1991

**Involvement of human semen properties and fertilizing capacity in the acrosome enzymes and proteinic tail components of spermatozoa**

Takako Sugano and Kazuhiko Hoshi

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

Acrosome enzymes and proteins constituting the tail of sperm cells withdrawn from male patients of infertile couples were chromatically examined to investigate the involvement of semen properties and the fertilizing capacity in chromatically positive rate.

After swim-up treatment of eighty samples, acrosin (AC), hyaluronidase (HY), tubulin (TU), dynein (DY) and actin (ACT) of the sperm cells were detected by immunofluorescence techniques.

In cases diagnosed as male infertility through semen analysis, positive rates of AC, HY, TU, DY and ACT were all lower than those in case of normozoospermia. In particular, HY and ACT positive rates were significantly lower ( $p < 0.01$ ). In cases diagnosed as oligozoospermia, HY and ACT were significantly less ( $p < 0.01$ ). In cases diagnosed as asthenozoospermia, TU, DY and ACT were significantly less ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.05$ , respectively). In cases whose semen contained numerous morphologically abnormal sperms, TU and ACT exhibited a significant reduction ( $p < 0.05$ ).

Fourteen pregnancies were obtained by AIH or IVF-ET. The result of pregnancy showed a good correlation with chromatically positive rates of the acrosome enzymes or proteinic tail components, but did not show any correlation with the semen analysis.

(受付: 1992年7月31日)

(受理: 1992年12月2日)

## ヒト精子Hypoosmotic Swelling Testの 精子機能検査法としての臨床的意義

### Clinical Evaluation of the Human Sperm Hypoosmotic Swelling Test

兵庫医科大学産科婦人科学教室

(主任：磯島晋三教授)

柴原浩章	辺見貴至	赤井マリ子
Hiroaki SHIBAHARA	Takashi HENMI	Mariko AKAI
繁田実	香山浩二	磯島晋三
Minoru SHIGETA	Koji KOYAMA	Shinzo ISOJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College, Hyogo 663, Japan

(Director: Prof. S.Isojima)

Hypoosmotic swelling test (HOS test) は簡便な精子機能検査法であるが、報告者により他の精液パラメーターや受精試験との相関性に不一致がみられる。我々は今回の検討の結果、次の見解をえた。

(1) 総精子膨化率(T%)は精子運動率、運動精子数、精子数と良く相関(P<0.01)したが、ハムスター試験との相関性(P=0.25)は乏しかった。

(2) AIH治療患者の妊孕性との検討でもT%、精子運動率、運動精子数が良い相関(P<0.01)を示した。

(3) T%は体外受精率ともよく相関し(P<0.01)、また精液所見不良例でもT%が50%以上を示せば高率に受精した。

(4) g型精子膨化率は他の精液パラメーターや体外受精率と相関性を示さなかった。

以上よりHOS testは条件を一定とすれば、精子機能検査のスクリーニング法として、あるいは体外受精施行前に受精の可能性を知る手段の1つとして十分に利用しうると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 27—35, 1993)

### 緒言

不妊症原因検査のうち男性因子の検索を行うことは必須で、従来射精精液中の精子数、精子運動率、奇形率を測定することでスクリーニングが行われている。しかし一般不妊治療上、その結果と妊孕性は必ずしも一致しないことが経験される。また体外受精-胚移植(IVF-ET)においても、受精の成立の有無がヒト精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入テスト(ハムスター試験)などによる術前の予想に反することがある<sup>1)</sup>。一方、1984年Jeyendranら<sup>2)</sup>により開発されたhypoosmotic swelling test (HOS test)は射精ヒト精子に150mOsmolの低浸透圧負荷をかけ、精子の

尾部細胞膜の形態学的変化を観察することにより、間接的に精子の機能面も判定できる簡便かつ経済的な検査法である。しかしながら、その後の追試報告者によりHOS testに対する見解が一致しておらず<sup>3-11)</sup>、臨床的意義は不明といわざるを得ない。そこで今回、当科において配偶者間人工授精(AIH)及びIVF-ET時の精子をHOS testに供し、そのヒト精子機能検査法としての臨床的意義に関して検討したので、他の文献と比較して報告する。

### 対象および方法

#### 1) 研究対象

対象は兵庫医科大学産科婦人科不妊および体外受

精外来受診中の夫婦のうち、1989年8月から1990年6月までの間にAIH治療を受けた70名及びIVF-ET治療を受けた40名の男性である。このうち43名が治療前にハムスター試験を受けていた。

2) AIHの方法

通常のAIH法は射精後、室温に30分放置液化した精液0.5mlを子宮腔内に注入した。精子数や運動率が不良である患者精液は、10%非働化患者血清添加Ham's F-10 medium (Irvine scientific社, USA) を用い、適時swim-up法や濃縮法で精子の調整を行いAIHを行った。

3) ハムスター試験の方法

ハムスター試験はYanagimachiら<sup>12)</sup>の方法に準じて、我々が以前に報告した手順<sup>13)</sup>により行った。ハムスター卵の雌性前核と共に、ヒト精子の膨化頭部並びに尾部が観察された時、ヒト精子がハムスター卵に侵入したと判定し侵入率を計算した。

4) IVF-ETの適応および手順

IVF-ETを受けた40名の患者の適応のうちわけは、卵管因子18名、免疫因子5名、原因不明6名、子宮内膜症4名、男性因子7名であった。排卵刺激法は、LH-RH agonist (buserelin) -HMG併用療法によった<sup>14)</sup>。連日RIA法による血中estradiol (E<sub>2</sub>) 測定と、経腔の超音波断層法(東芝SAL-77B)による卵胞発育のモニタリングを行い、最大卵胞径が18mm以上、血中E<sub>2</sub>値が600pg/ml以上となれば、buserelinの投与を中止しhCG 5000IUを投与。38時間後に局所麻酔下、超音波ガイド下に経腔採卵した<sup>14)</sup>。配偶者精液は、非働化した患者血清又は臍帯血清を添加したHam's F-10培養液中で運動精子濃度5~10×10<sup>4</sup>/mlに調整し、採卵後5~6時間後に培養した。その18時間後に培養液を交換し、更に24時間後に卵丘細胞を機械的に剥がして受精、分割の判定を行い<sup>15)</sup>、正常形態を示す2~8 cell stageの胚移植を行った。

5) Hypoosmotic swelling testの方法

HOS testの方法は、Jeyendranら<sup>2)</sup>の方法により行った。AIH又はIVF-ET時に用手的に採取された精液の一部を患者の同意を得た上で使用した。精液を室温で約30分液化させ、量、精子数、精子運動率、奇形率等の検査後、精液0.1mlと150mOsmol低浸透圧液(sodium citrate 2 H<sub>2</sub>O 7.35g + fructose 13.5g/D<sub>2</sub>W 1 L) 1 mlを混和した後、incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air) 内で30~60分放置し、倒立位相差顕微鏡(X400)で精子尾部の変化を観察した。

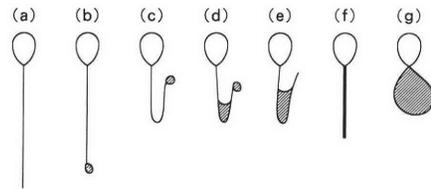
図1に示すa~g型に分類し、尾部に変化の認められたb~g型精子が占める百分率(総精子膨化率, T%)と、g型精子が占める百分率(g型精子膨化率, g%)を計算した。

6) 有意差検定

student's t-test, 回帰分析を用いて統計的処理を行い、危険率p<0.05を有意差ありと判定した。

結果

(1) AIH患者精液所見及びハムスター試験とHOS



Schematic representation of typical morphological changes of human spermatozoa subjected to hypo-osmotic stress; a = no change; b - g = various types of tail changes. Tail region showing swelling is indicated by the hatched area.

図1 HOS testにおける膨化精子尾部の分類 [Jeyendran R. S. et al. (文献2) より引用]

表1 AIH患者精液所見及びハムスター試験とHOS testとの相関関係

症例数	総精子膨化率(T%)		g型精子膨化率(g%)		
	相関係数	P	相関係数	P	
精子運動率	70	0.449	0.0001*	0.192	0.111
精子数	70	0.350	0.003*	0.217	0.071
運動精子数	70	0.409	0.0004*	0.229	0.057
ハムスター試験	29	0.221	0.250	0.349	0.063

\*: Values are significant (p<0.05)

testとの相関性

各種AIH時の精液所見(精子運動率, 精子数, 運動精子数)とHOS testとの相関性, およびハムスター試験結果とHOS testの相関性を調べた(表 1). 70名の精液所見の平均±S. D. は, 精子数 $43.7 \pm 30.2 \times 10^6 / \text{ml}$ , 精子運動率 $54.7 \pm 19.5\%$ , 運動精子数 $26.5 \pm 22.8 \times 10^6 / \text{ml}$ であった. 一方HOS testでのT%, g%の平均±S. D. は各々 $50.2 \pm 17.1\%$ ,  $14.7 \pm 10.5\%$ であった. 検定の結果, T%は精液所見の3つのパラメーターいずれとも有意な相関関係を示し, 特に精子運動率と強く相関した $r=0.45$ . 一方g%は精液所見のいずれのパラメーターとも相関関係が認められなかった. また, ハムスター試験とHOS test (T%, g%)を同時に施行した29名の結果では, 両試験の間にいずれのパラメーターにおいても相関はしなかった.

(2) AIH治療男性の妊孕性の有無とHOS testおよびハムスター試験の相関性

AIHを受けた70名の男性のうち, 配偶者間の妊娠既往があり, その後特記すべき異常のない男性7名と, 治療期間中に妊娠に至った15名(重複1名), 計21名を”妊孕性あり”群とし, 妊娠既往がなく治療期間中にも妊娠に至らなかった49名(女性側に特記

すべき異常なし)を”妊孕性なし”群とした. 妊孕性の有無と精液所見, HOS test及びハムスター試験の結果を比較したところ(図 2), 精子数, 精子運動率, 運動精子数及びHOS testのT%は”妊孕性あり”群で”妊孕性なし”群に比し有意な高値を示した. また”妊孕性あり”群7名と, ”妊孕性なし”群22名, 計29名が以前にハムスター試験を受けていたが, ハムスター試験の精子侵入率は妊孕性の有無で差はなかった.

(3) 体外受精率と精液所見, HOS testおよびハムスター試験の相関性

IVF-ET治療を受けた40名から計254個(平均6.4個)の卵が採取され, このうち169個(66.5%)が正常に受精し胚分割していると判定された(平均4.2個). 患者当りの採取卵子数別に受精率をみると(表 2)卵子1個だけが回収された2症例はいずれも受精せず, うち1症例は正常精液所見を示していたが受精しなかった. 従って媒精される卵子数が1個の際には受精に至らなかった責任が卵子側に存在する確率が極めて高くなると考えられるので, これら2症例は今回の検討から除外した. 残り38症例の体外受精結果と精液所見, HOS testおよびハムスター試験(14症

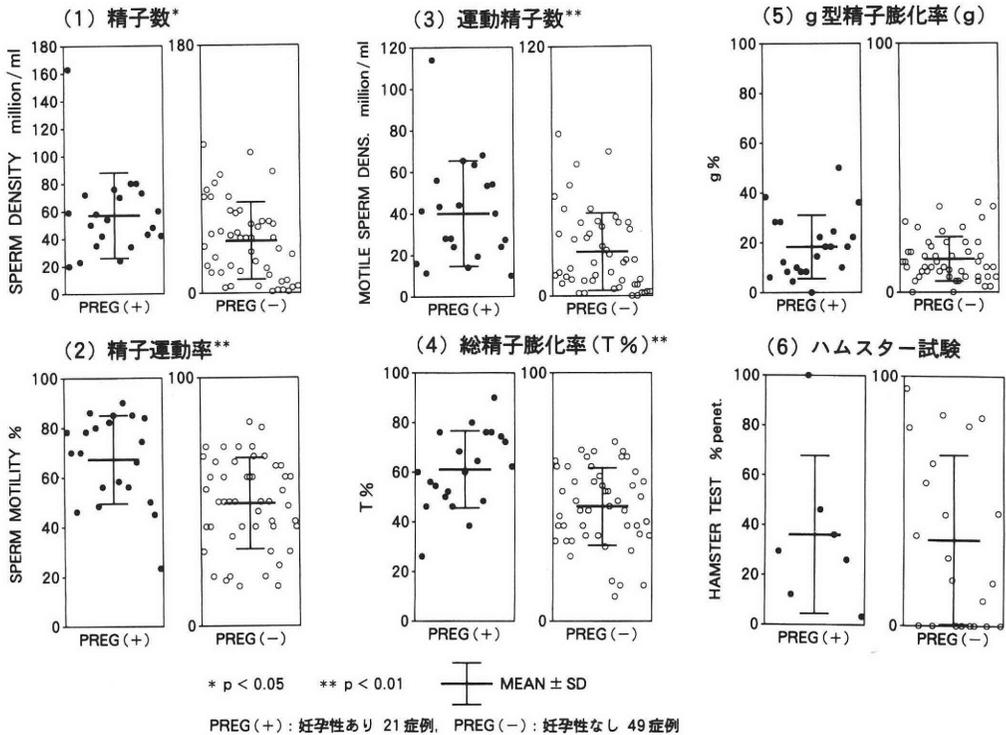


図 2 AIH治療男性の妊孕性と精液所見, HOS testおよびハムスター試験との相関性

表2 体外受精における採取卵子数別にみた受精率

採取卵子数	症例数	総卵子数	受精卵子数	受精率 (%)
1	2	2	0	0
2	6	12	9	75.0
3	5	15	13	86.7
4	3	12	9	75.0
5	4	20	8	40.0
6	4	24	11	45.8
7	3	21	16	76.2
8	2	16	9	56.3
9	3	27	19	70.4
10	2	20	11	55.0
12	1	12	12	100.0
13	1	13	7	53.8
14	1	14	11	78.6
15	2	30	25	83.3
16	1	16	9	56.3
合計	40	254	169	66.5

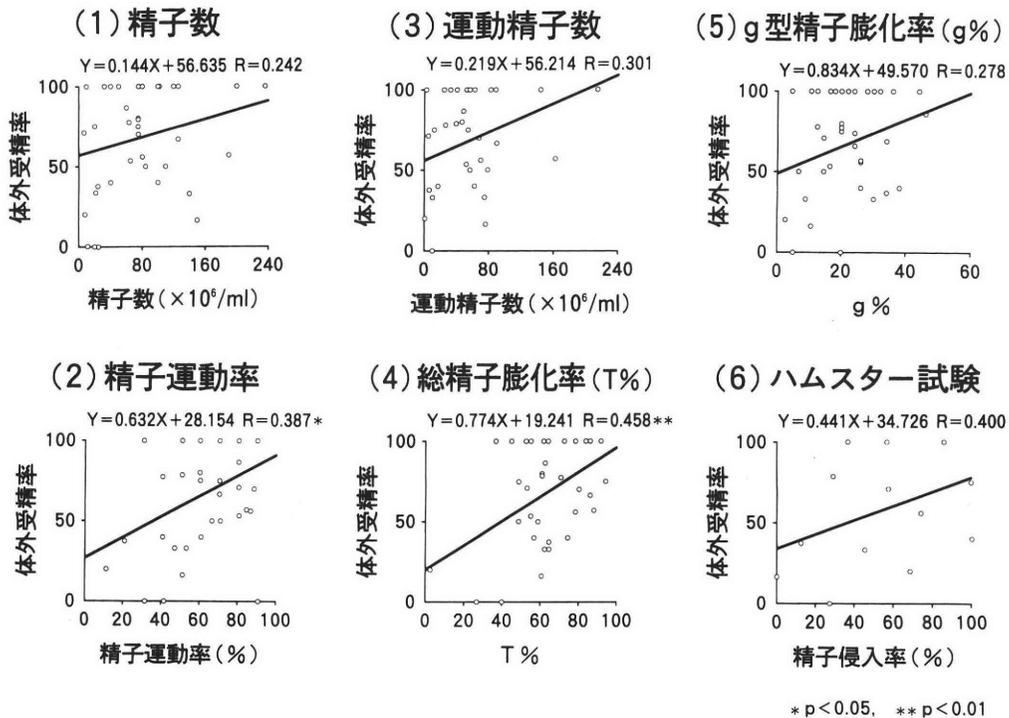


図3 体外受精率と精液所見, HOS testおよびハムスター試験との相関性

例)の相関関係を検討したところ(図3), HOS testのT% ( $r=0.46$ ) および精子運動率 ( $r=0.39$ ) が体外受精率と有意に相関した。しかし精子数, 運動精子数, g% およびハムスター試験は受精率と相関しなかった。38症例のうち3症例(卵子数は各々2, 5, 6個)で全く受精が起こらなかったが, うち2症例は男性因子の症例であった。他の1症例は卵管因子であったがIVF時の精液所見不良(精子数 $10 \times 10^6/\text{ml}$ , 運動率90%)の症例であった。

HOS testのT%とIVF-ETにおける受精率を詳細に検討したところ, 症例数は少ないが, T%が30%未満での受精率は非常に低く, 30%以上を示せばおよそ50%以上の受精のえられることが判明した(表3)。

(4) 精液所見不良10症例の体外受精率と総精子膨化率の関係

IVF-ET施行時の精液所見不良(精子数 $<20 \times 10^6/\text{ml}$  and/or精子運動率 $<50\%$ ) 10症例の体外受精とT%の関係につき検討を加えた。これらはいずれも体外受

表3 総精子膨化率(T%)別にみた体外受精率(採取卵子数が2個以上の38症例)

T%	症例数	総卵子数	受精卵子数	受精率(%)
0~	1	5	1	20.0
10~	0	—	—	—
20~	1	6	0	0
30~	1	6	6	100.0
40~	5	17	8	47.1
50~	6	40	24	60.0
60~	10	77	51	66.2
70~	6	46	34	73.9
80~	5	37	29	78.4
90~100	3	18	16	88.9
合計	38	252	169	67.1

表4 精液所見不良10症例の体外受精率と総精子膨化率(T%)との関係

症例	精子数 ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	精子運動率 (%)	体外受精率 (%)	T% (%)
1	10	90	0	26
2	25	30	0	40
3	20	40	0	40
4	8	10	20	2
5	20	46	33	62
6	24	20	38	64
7	40	40	40	56
8*	7	80	71	52
9	63	40	78	70
10	8	30	100	72

\*: 単胎妊娠, 満期分娩

精で受精できるか否かを媒精前に判断するのに苦慮した症例であった。検討の結果、T%が40%以下では運動率が極めて良好な精子でも受精は成立しにくい、T%が50%以上では重症の乏精子症 ( $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満)でも高率に受精が起こることが明らかであった(表4)。

### 考 察

男性不妊症の診断や経過観察に精液検査は不可欠であり、従来精液量、精子数、精子運動率、奇形率などが検査されてきた。しかし正常精液所見を示しても不妊症であることがしばしば経験される。これは一般精液検査のみで(1)精子の頸管粘液、子宮及び卵管等の女性性器管内におけるpenetrationやmigrationといった能力や、(2)受精能力までを確実に予想することはできないことに起因するものと考え

えられる。従って我々の教室では前者に対しては腹腔鏡検査時あらかじめAIHを行い、腹水中の運動精子の有無を検査することにより、精子の子宮、卵管内移動能力について検討している<sup>16-18)</sup>。また後者についてはYanagimachiら<sup>12)</sup>の開発した透明帯除去ハムスター卵を用いたハムスター試験<sup>13)</sup>や、Burkmanら<sup>19)</sup>のヒト卵子を用いたhemizona assayを行っている。更にこれらの方法は、不妊婦人血中に存在する受精障害抗体の検出にも有用であることを報告した<sup>20,21)</sup>。

しかし一般不妊診療においては、より簡便で多施設で施行できる精子の機能検査法の開発が望まれ、1984年、Jeyendranら<sup>2)</sup>によりhypoosmotic swelling test (HOS test)が報告された。この検査法は正常精子が低浸透圧溶液中で尾部が膨化することを原理として、その形態的变化から精子の運動機能や受精能を

表5 HOS test [総精子膨化率(T%)] との相関性に関する報告のまとめ

報告者	例数	精子運動率	精子数	AIHによる 妊孕性の有無	ハムスター 試験	体外受精
1) Jeyendran R.Sら (1984, U.S.A)	40	S	nt	nt	S	nt
2) Chan S.Y.W.ら (1985, Hong Kong)	270	S	NS	nt	NS	nt
3) Van der Ven H.H.ら (1986, Germany)	83	S	NS	nt	nt	S
4) Liu D.Y.ら (1988, Australia)	106	nt	nt	nt	nt	NS
5) Barratt C.L.R.ら (1989, U.K.)	56	nt	nt	nt	nt	NS
6) 吉野, 高橋ら (1989, 島根医大)	46	S	NS	S	NS	nt
7) Zaneveld L.J.D.ら (1990, South Africa)	200	nt	nt	nt	S	S
8) Chan S.Y.W.ら (1990, Hong Kong)	97	nt	nt	nt	nt	NS
9) 著者ら	110	S	S	S	NS	S

S: Significant, NS: Not Significant, nt: not tested

推定しようとするものである。しかし表5に示すように諸家の報告<sup>4-11)</sup>により見解に相違があり、その臨床的意義を明瞭とするため、AIH及びIVF-ET施行時の精液を用いた我々の検討結果と他の報告を比較し分析を行った。尚HOS testのg%と他のパラメーターに一部相関が認められたとする報告もみられるが、我々の検討ではg%は一般精液所見やハムスター試験、体外受精率のいずれとも相関せず、臨床的意義は少ないという結論に至ったため、T%と他のパラメーターの相関性について述べる。

まず一般精液所見とHOS testの関係についてみると、表1の如く今回の結果からT%は精子運動率、精子数とも有意な相関関係を示した。諸家のいずれの報告でも表5の如くT%は精子運動率と相関を認めており、運動能力を持つ精子はその尾部膜機能が正常で、低浸透圧負荷により形態の変化が生じるものと考えられた。一方精子数との相関については我々は正の相関を認めたが、相関を認めないとする報告<sup>5-7)</sup>もみられ、今後検討を要すると考えられた。

ハムスター試験とHOS testについては、Jeyendranら<sup>(r=0.90)<sup>2)</sup></sup>、Zaneveldら<sup>(r=0.42)<sup>11)</sup></sup>は正の相関を認めているが、我々<sup>(r=0.25)</sup>やChanら<sup>(r=0.05)<sup>10)</sup></sup>や高橋ら<sup>4)</sup>は相関を認めていない。ハムスター試験の方法は、いずれの施設でもYanagimachiら<sup>12)</sup>の方法で施行され、精子の調整法、penetrationの判定法も同様に行われており、見解の不一致を説明するのは困難である。

また体外受精とHOS testについても見解が一致せず、Van der Venら<sup>(r=0.56)<sup>7)</sup></sup>、Zaneveldら<sup>(r=0.24)<sup>11)</sup></sup>らは正の相関を認めたと報告しているが、相関を認めなかったとする報告もある<sup>8-10)</sup>。我々の検討の結果では $r=0.46$ と正の相関を認めた。この点については報告者により体外受精法についての相違がみられ、Van der Venら<sup>7)</sup>はCC(+HMG)法による過排卵刺激を用い、平均卵子回収数については記載せず、卵回収が1個だけの症例も含んでの分析を行い、受精率0%の群と1%以上の群に分けてT%と正の相関を報告している。Liuら<sup>8)</sup>はCC-HMG法による過排卵刺激により平均5.8個の卵子を得て、受精率(% fertilization)とHOS testのT%の相関を検討の結果、相関しないと述べている。Barrattら<sup>9)</sup>は過排卵刺激を行わず、自然周期で1個の卵子の受精の有無での検討結果、やはり相関しないと記載している。またZaneveldら<sup>11)</sup>は体外受精の具体的な方法については述べていないが相関を認めたと報告している。Chanら<sup>10)</sup>はVan der Venら<sup>7)</sup>と同様の検討法を用いた分析を行っている

が、相関性を認めなかったと報告している。彼らはまた、HOS testのa~g%の個々の結果すべてについても体外受精率との相関を検討したが、いずれも相関を認めなかった。

一方我々はGnRH agonist+HMG法で過排卵刺激を行い、2個以上卵子を回収できた38症例の受精率(% fertilization)とHOS testの相関性を検討した。その結果、T%と体外受精率との間に正の相関性を認めた。

このように体外受精とHOS testとの相関性についての見解の相違は、(1)施設間での過排卵刺激およびそれに伴う卵子の回収数の違い、および(2)受精率(% fertilization)との比較か、あるいは1個でも卵子が受精したか否かとの比較かといった検討法の相違により生じたものと考えられた。

更に我々は精液所見不良(精子数 $<20 \times 10^6/\text{ml}$  and/or精子運動率 $<50\%$ )であった10症例の体外受精率とT%の関係につき詳細に検討した結果、T%が40%以下では受精率が0%か極めて低率であるが、それ以上特にT%が50%以上を示せば高率に受精することが明らかとなった。

以上の結果から臨床的に簡便で経済的な精子機能検査法として、妊孕性の有無や体外受精率と正の相関を示すHOS testは、スクリーニング検査法の1つとして十分に利用しうるものと考えられた。

本論文の要旨は、第84回近畿産科婦人科学会学術講演会(1991.5月、神戸)において発表した。

## 文 献

- 1) 子安保喜, 長谷川昭子, 伊田昌功, 別所健史, 繁田 実, 磯島晋三, ハムスターテストとヒト体外受精における精子受精能の比較. 日産婦誌(抄録集) 42: S-124, 1990
- 2) Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG and Zaneveld LJD, Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fert 70: 219, 1984
- 3) 柳沢洋二, 吉田竹郎, 津端捷夫, 高木繁夫, 精子の機能テストとその有用性. 臨産婦40: 195, 1986
- 4) 高橋健太郎, 草刈万寿夫, 内田昭弘, 山崎裕行, 白井孝昭, 吉野和男, 北尾学, ハムスターテストとHypoosmotic swelling testとの関連性について. 日不妊会誌34: 113, 1989
- 5) 吉野和男, 高橋健太郎, 白井孝昭, 西垣 新, 内田昭弘, 北尾 学, 異常精液患者における精

- 子機能テスト (Hypoosmotic swelling test) に関する研究. 日産婦誌41: 149, 1989
- 6) Chan SYW, Wang C, Fox EJ, Tang LCH, Chan MMC, Tang GWK, Tsoi W and Ho PH, The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil Steril* 44: 668, 1985
  - 7) Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K and Zaneveld LJD, Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J Androl* 7: 190, 1986
  - 8) Liu DY, Johnston WIH, Plessis YPD, Baker HW G and Nayudu PL, The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. *Fertil Steril* 49: 272, 1988
  - 9) Barratt CLR, Osborn JC, Harrison PE, Monks N, Dunphy BC, Lenton EA and Cooke ID, The hypoosmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. *Hum Reprod* 4: 430, 1989
  - 10) Chan SYW, Wang C, Chan STH and Ho PC, Differential evaluation of human sperm hypoosmotic swelling test and its relationship with outcome of in-vitro fertilization of human oocytes. *Hum Reprod* 5: 84, 1990
  - 11) Zaneveld LJD, Jeyendran RS, Krajeski P, Coetzee K, Kruger TF and Lombard CJ, Relationship between male fertility and HOS: the Tygerberg experience, in *Human spermatozoa in assisted reproduction*. Williams & Wilkins, p225, 1990
  - 12) Yanagimachi R, Yangimachi H and Rogers BJ, The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15: 471, 1976
  - 13) 高田喜嗣, 長谷川昭子, 香山浩二, 磯島晋三, 乏精子症患者精子の受精能に関する研究: 洗浄濃縮精子による受精率および透明帯除去ハムスター卵に対する in vitro に於ける受精能について. 日産婦誌33: 2041, 1981
  - 14) 別所健史, 繁田実, 小林真一郎, 平 省三, 香山浩二, 磯島晋三, 体外受精-胚移植における buserelin-HMG併用による卵巣刺激法の有効性. 日受着会誌 7: 57, 1990
  - 15) 繁田 実, 自然排卵を有する不妊婦人に過排卵処置を行った場合の卵成熟について. 産婦進歩 40: 101, 1988
  - 16) 柴原浩章, 松浦泰明, 子安保喜, 小林真一郎, 平 省三, 繁田 実, 磯島晋三, 抗精子抗体による生殖器管内精子輸送障害について. 産婦進歩 41: 129, 1989
  - 17) 柴原浩章, 山田 聖, 緒方高志, 巽 利昭, 繁田 実, 平 省三, 香山浩二, 磯島晋三, 初期外性子宮内膜症と卵管精子通過症について (AIH&Laparoscopyによる検討). 産婦進歩41: 275, 1989
  - 18) 霞 弘之, 柴原浩章, 繁田 実, 磯島晋三, AIH後腹腔内細菌混入の有無に関する分析. 産婦進歩42: 253, 1990
  - 19) Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Krugar TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD, The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 49: 688, 1988
  - 20) Shibahara H, Shigeta M, Koyama K, Burkman LJ, Alexander NJ, Isojima S, Inhibition of sperm-zona pellucida tight binding by sperm immobilizing antibodies as assessed by the hemizona assay (HZA). *Acta Obst Gynaec Jpn* 43: 237, 1991
  - 21) Shibahara H, Burkman LJ, Isojima S, Alexander NJ, Effects of sperm immobilizing antibodies on sperm-zona pellucida tight binding. *Fertil Steril* (Submitted)

#### Clinical evaluation of the human sperm hypoosmotic swelling test

Hiroaki Shibahara, Takashi Henmi  
Mariko Akai, Minoru Shigeta  
Koji Koyama and Shinzo Isojima

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Hyogo Medical College, Hyogo 663, Japan  
(Director: Prof. S. Isojima)

The hypoosmotic swelling (HOS) test is a simple laboratory test to evaluate the functional integrity of the membrane of human spermatozoa. This test was performed on 110 samples of human semen obtained from the patients who were treated for infertility with AIH or IVF-ET, and the following results were obtained.

(1) There were significant correlations ( $p < 0.01$ ) between the rate of total swollen sperm and the results of semen analysis in the sperm motility, the motile sperm density and the total sperm density, but the results of the human sperm penetration test to zona-free hamster ova did not correlate with the total sperm swollen rate. ( $p = 0.25$ )

(2) The rate of pregnancy in the infertile patients who were treated with AIH correlated with the total sperm swollen rate, the sperm motility and the motile sperm den-

sity ( $p < 0.01$ ).

(3) The total sperm swollen rate also correlated with the rate of in vitro fertilization ( $p < 0.01$ ), and the fertilization rate in patients whose HOS test showed above 50% in the total sperm swollen rate was always high, even if their routine semen characteristics were poor.

(4) The rate of the g type swollen sperm did not show any correlation with other semen analysis parameters.

We concluded that the HOS test could be used as a clinical screening test of sperm function for evaluation of male factors for sterility.

(受付：1992年 8 月21日)

(受理：1992年12月 2 日)

## 多数回精液検査での精子濃度のばらつきの大きさ

### Variation of Sperm Concentration in Multisemen Analysis

群馬大学医学部附属病院周産母子センター

宇津木 利雄

Toshio UTSUGI

羽生病院産婦人科

中島 敬和

Yoshikazu NAKAJIMA

群馬大学医学部産科婦人科学教室

伊吹 令人

Yoshito IBUKI

Maternal-Fetal and Perinatal Center, Department of Obstetrics and Gynecology,  
Gunma University Hospital, Maebashi 371, Japan

精子濃度のばらつきの大きさを知る目的で、何も薬物投与をしていない状態で3日以上禁欲日数を有する不妊症例において、20回の精液検査での平均精子濃度が4000万/ml以上の正常精子濃度群と、13回の精液検査での平均精子濃度が2000万/ml以下の乏精子症群で、各測定回数までの平均値が20回、13回の平均値の何パーセントに当たるか各々、10症例、9症例で、MEAN-2SD, MEAN-SD, MEAN, MEAN+SD, MEAN+2SDの推移について検討した。正常精子濃度群では5回、10回、15回の測定回数でのMEAN-2SDからMEAN+2SDの値は各々、54.5-125.9%, 64.4-135.7%, 81.9-117.9%であった。乏精子症群での5回、10回の測定回数でのMEAN-2SDからMEAN+2SDの値は各々、40.3-148.4%, 77.0-117.0%であった。精子濃度のばらつきは大きく、精子濃度決定にはできるだけ多くの測定回数が望ましく、得られた精子濃度の結果を評価する場合、測定回数でのばらつきの大きさを考慮する必要がある。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 36-39, 1993)

#### 緒言

乏精子症による男性不妊患者に薬物療法を施して、その効果判定をする場合、精子濃度が持続的に増加または減少を示せば判定は容易であるが、不変、増加、減少のいずれもが認められ、精子濃度の変動の大きさに判定に苦慮することが多い。そこで、何も薬物を投与しない症例で、精液検査や人工授精時の精液所見結果で、多数回の結果を得られた症例での精子濃度のばらつきについて検討したので報告する。

#### 対象及び方法

対象は当科不妊外来通院中のカップルの夫で、何も薬物投与を行っていない期間の精液検査による結果を用いた。精液検査方法は少なくとも3日以上禁欲期間の後、手動的に採取した精液を30分以上融解の後、makler counting chamberを用いて顕微鏡下に肉眼で行った。なお、乏精子症の症例では薬物投与終了後3ヶ月以上の期間のあいた検査結果のみを用いた。全測定結果より平均精子濃度が4000万/ml以上(正常精子濃度群:  $53.3 \times 10^6$ /mlから $118.5 \times 10^6$ /ml)と

4000万/ml以下 (乏精子症群:  $5.1 \times 10^6$ /mlから $34.9 \times 10^6$ /ml) の 2 群に分け, 正常精子濃度群では20回測定症例10症例 (41.8±3.7歳, Mean±SD, 妊娠例 1 例), 乏精子症群では13回測定症例 9 例 (38.4±5.2歳, 妊娠例 3 例) の検査結果を使用した. 正常精子濃度群で, 各測定回数までの平均値を20回測定平均値で割り, 100を乗じて20回測定平均値に対するパーセントを出し, 10症例の間で平均値及び標準偏差を算出した. 乏精子症群では13回で同様に 9 症例の間で算出した.

結 果

正常精子濃度群での各測定回数までの平均値 (MEAN) 及び標準偏差 (SD) より MEAN-2SD, MEAN-SD, MEAN, MEAN+SD, MEAN+2SD を表 1 に示した. 平均値は測定回数の増加につれて, 100%に近づいた. MEAN-2SDとMEAN+2SDの幅は測定回数が少ないうちは大きく, WHOにおける測定方法) による 2 回の平均では, 得られた値の20.3%から129.1%

に分布する確率が95%であることが判明した. 5 回, 10回, 15回の測定回数でのMEAN-2SDからMEAN+2SDの値は各々, 54.5-125.9%, 64.4-135.7%, 81.9-117.9%であった. これらをグラフに示すと図 1 の如くであり, 測定回数が増すことによってばらつ

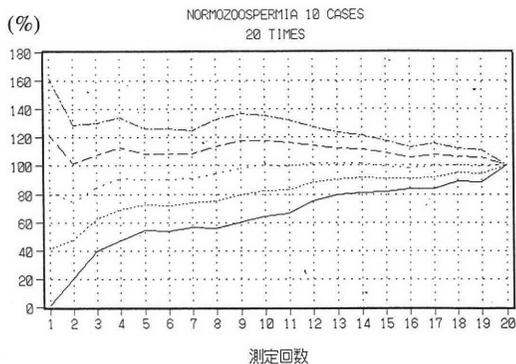


図 1 表 1 のグラフ. 下方からMean-2SD, Mean-SD, Mean, Mean+SD, Mean+2SD

表 1 正常精子濃度群における20回精液検査平均に対する各測定回数までの平均のパーセントのMean-2SD, Mean-SD, Mean, Mean+SD, Mean+2SD

測定回数	MEAN-2SD	MEAN-SD	MEAN	MEAN+SD	MEAN+2SD
1	1.5	41.5	81.5	121.4	161.4
2	20.3	47.5	74.7	101.9	129.1
3	40.1	62.6	85.1	107.7	130.2
4	47.1	69.0	90.8	112.6	134.4
5	54.5	72.3	90.2	108.0	125.9
6	53.9	72.0	90.0	108.1	126.1
7	56.5	73.7	90.8	108.0	125.1
8	55.6	74.9	94.2	113.4	132.7
9	60.5	79.5	98.5	117.5	136.6
10	64.4	82.2	100.0	117.9	135.7
11	66.7	83.2	99.6	116.0	132.4
12	75.4	88.3	101.3	114.3	127.3
13	79.5	90.4	101.4	112.4	123.4
14	81.4	91.3	101.3	111.3	121.2
15	81.9	90.9	99.9	108.9	117.9
16	83.6	91.0	98.4	105.7	113.1
17	83.6	91.6	99.5	107.5	115.5
18	88.9	94.7	100.5	106.2	112.0
19	88.6	94.2	99.8	105.4	110.9
20	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

きが小さくなる傾向がうかがえた。乏精子症群においては、表2に示した如く、2回測定の平均値ではMEAN-2SDは0以下でありMEAN+2SDは204%と正常精子濃度群よりもばらつきはさらに大きく、正規分布を逸脱していた。5回、10回の測定回数でのMEAN-2SDからMEAN+2SDの値は各々、40.3-148.4%、77.0-117.0%であった。正常精子濃度群と同様に測定回数を増すに従ってばらつきは減少した。(図2)

考 察

男性不妊症の中で、乏精子症と診断されると精子

濃度増加を目的として非ホルモンのないしホルモンの薬物投与が行われるのが一般的である。治療中あるいは治療後、精子濃度の増加を認め、薬物効果があったと判定した症例でも、次回検査で精子濃度が再び減少を認め、判定に苦慮することも多い。そこで、一切の薬物投与を行わない症例と、薬物投与中止後3ヶ月以上の期間のあいた症例のみで、精子濃度の分布を測定回数毎に検討してみた。正常精子濃度群と乏精子症群で検討し、どちらも大きなばらつきを示した。測定回数毎に95%信頼限界(-2SDから+2SD)を図示した。

乏精子濃度群では3回測定までのMEAN-2SDは0以下になり、少ない測定回数で単純に平均値を求め、評価することは難しいと思われた。精子濃度を決定するにはできるだけ多くの測定回数が望ましく、また、得られた平均値を評価する場合、測定回数を考慮すべきと考えられる。薬物治療の効果判定においては、治療後の精子濃度が、治療前の測定回数より得られる+2SD以上を示したときに有効とすべきと考えられる。

様々な男性不妊症治療が試みられ、精子濃度を用いて薬物効果を判定する基準<sup>2,3,4)</sup>が報告されているが統一した判定基準はいまだ確立されていない。マクラー板を用いた同一検体の繰り返し測定による精子濃度のバラツキは最大±7.2%であり、3分以内、5 μl以下での分析も推奨<sup>5)</sup>され、同一検体の精子濃

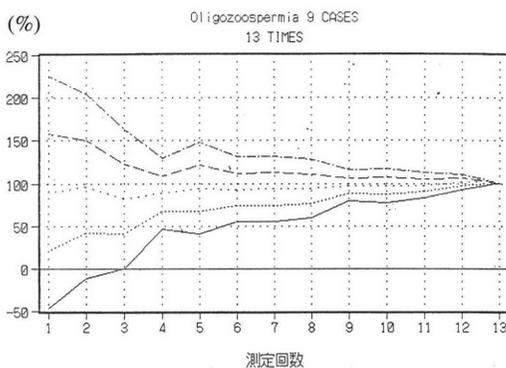


図2 表2のグラフ。下方からMean-2SD, Mean-SD, Mean, Mean+SD, Mean+2SD

表2 乏精子症群における13回精液検査平均に対する各測定回数までの平均のパーセントのMean-2SD, Mean-SD, Mean, Mean+SD, Mean+2SD

測定回数	MEAN-2SD	MEAN-SD	MEAN	MEAN+SD	MEAN+2SD
1	-47.2	21.1	89.4	157.7	226.0
2	-11.6	42.3	96.3	150.2	204.2
3	-0.1	40.9	81.9	122.8	163.8
4	46.3	67.1	88.0	108.8	129.6
5	40.3	67.4	94.4	121.4	148.4
6	54.9	73.9	93.0	112.1	131.2
7	55.1	74.3	93.4	112.5	131.6
8	59.3	76.5	93.7	110.9	128.1
9	79.3	88.4	97.5	106.6	115.7
10	77.0	87.0	97.0	107.0	117.0
11	83.0	90.4	97.8	105.2	112.6
12	92.9	97.2	101.4	105.7	110.0
13	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

度測定自体ばらつきが大きく、3日以上の禁欲日数では測定毎に値が大きく変化すること、時には正規分布を逸脱することなどを考慮した判定基準が求められていると思われる。

### 文 献

- 1) WHO, Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1987
- 2) 熊本悦明, 丸田 浩, 石神襄次, 守殿貞夫, 折笠精一, 木村正一, 志田圭三, 山中英寿, 根岸壮治, 新島端夫, 大島博幸, 島崎淳, 白井將文, 町田豊平, 今村一男, 吉田英機, 穂坂正彦, 広川 信, 三矢英輔, 三宅弘治, 片山 喬, 吉田 修, 園田孝夫, 大森弘之, 酒徳治三郎, 大井好忠, 男子不妊症に対するMecobalamin (Ea-0302) の多施設共同研究による臨床的検討. 西日泌尿 50: 331, 1988
- 3) 中村幸雄, 浅岡 健, 黒川博厚, 飯塚理八, 男性不妊に対するミオアクチンC注の効果. 日本不妊学会雑誌 18: 61, 1973
- 4) 広川 信, 岩本晃明, 精索静脈瘤の治療 内精索血管群高位結紮術について. 造精障害の実態と治療P114, 医学教育出版社, 1985
- 5) 柳田 薫, 星 和彦, 月川 奏, 佐々木宏子, 遠藤 力, 佐藤 章, 精液分析方法の検討 (Semen Auto Analyzerによる分析法とMaklar counting chamberの特性). 日本不妊学会雑誌 34: 893, 1989

### Variation of sperm concentration in multisemen analysis

Toshio Utsugi, Yoshikazu Nakajima  
and Yoshito Ibuki

Maternal-Fetal and Perinatal Center,  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Gunma University Hospital,  
Maebashi 371, Japan

The variation of sperm concentration was estimated in 10 normozoospermic and 9 oligozoospermic patients. In normozoospermic patients, from MEAN-2SD to MEAN+2SD at 5, 10, 15 times mean of semen analysis, the results were 54.5-125.9%, 64.4-135.7%, 81.9-117.9%, respectively, compared to the mean of 20 times analysis. In oligozoospermic patients, from MEAN-2SD to MEAN+2SD at 5 and 10 times mean compared to the mean of 13 times analysis, the results were 40.3-148.4%, 77.0-117.0%, respectively. Many times of semen analysis is recommended to determine the accurate sperm concentration, and we should take into account the number of semen analysis and the wide variation to estimate the sperm concentration.

(受付: 1992年9月18日)

(受理: 1992年12月2日)

## 男子不妊症の診断面における臨床統計的検討

### Clinical and Statistical Studies on Male Infertility from Diagnostic Aspect

富山医科薬科大学泌尿器科学教室

風間 泰蔵

Taizo KAZAMA

奥村 昌央

Akio OKUMURA

里見 定信

Sadanobu SATOMI

布施 秀樹

Hideki FUSE

村石 康博

Yasuhiro MURAIISHI

永川 修

Osamu NAGAKAWA

酒本 護

Mamoru SAKAMOTO

横山 豊明

Toyooki YOKOYAMA

岩崎 雅志

Masashi IWASAKI

寺田 為義

Tameyoshi TERADA

片山 喬

Takashi KATAYAMA

Department of Urology, Toyama Medical and Pharmaceutical University,  
Toyama 930-01, Japan

(Director: Prof. T. Katayama)

1979年10月より1991年9月までの12年間に富山医科薬科大学付属病院泌尿器科に、不妊を主訴に受診した患者1018名に対して、診断面を中心とした臨床的検討を行なった。

1) 患者数は、全男子新来患者の13.0%を占めた。

2) 最近、初診時年齢の上昇や結婚後5年以内に受診する患者の割合の増加が認められ、結婚年齢の高齢化を示すものと思われた。

3) 男子不妊症の原因では、特発性症例の占める割合が、67.8%と最も高かったが、最近精索静脈瘤などの増加に伴う減少傾向を認めた。

4) 精巣容積および血清FSH値は、精子濃度500万/ml未満の群で、500万/ml以上の群に比して有意にそれぞれ低値および高値をとったが、精子濃度2000万~4000万/mlの群と4000万/ml以上の群の間にも有意の差が認められた。

5) 精液検査2回施行例での検討においては、精子濃度、奇形率に比し、運動率の検査間での変動が大きかった。また、精子濃度、運動率、奇形率の全てが2回とも同じ判定(正常または異常)であったのは、55.1%であった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 40-47, 1993)

#### 緒言

男子不妊症に対しての、近年の産婦人科領域の進歩はめざましく、超乏精子症など従来ほとんどあきらめられていた患者の治療にも道が開けつつある。しかし、一方泌尿器科サイドはと見ると、特発性男子不妊症症例に対する治療には見るべき進歩は得られておらず、現在の所はやはり閉塞性無精子症をば

じめとして不妊となった原因を明らかにすべく精査を行ない、その結果判明した原因に対する根本的な治療を行なうことが一義的と考えられる。つまり特発性症例の減少に努めることが泌尿器科医としてまず必要であろう。

また、治療の適応の決定や治療上の効果を判定するためになされる精液検査については、そのばらつきの大さきなどから未だ十分な信頼性を持つには

表1 2回の精液検査における各パラメーターのばらつき基準

パラメーター	Category	I	II	III
精液量		1 ml未満の変動	1 ml以上 2 ml未満の変動	2 ml以上の変動
精子濃度		1/2から 2 倍までの変動	1/2以下1/5まで、あるいは 2倍以上 5 倍未満の変動	1/5以下あるいは 5 倍以上の変動
運動率		10%未満の変動	10%以上、20%未満の変動	20%以上の変動
奇形率		10%未満の変動	10%以上、20%未満の変動	20%以上の変動

至っていない。

今回われわれは、以上のことなどをふまえて今後の不妊臨床に生かすべく、当科における男子不妊症の、主として外来における診断面からの臨床統計的検討を行なったので、若干の考察を加えて報告する。

#### 対象と方法

対象は1979年10月の富山医科薬科大学付属病院泌尿器科開設以来1991年9月までの12年間に、不妊を主訴として当科を受診した患者1018名である。

患者数、初診時年齢、結婚から来院までの期間、来院の動機、夫婦のどちらが先にまず医療機関を受診したか、そして男子不妊症の原因の、以上6項目については、時間による変化を見る意味で、12年間を大体4年づつの3期に分けて検討した。

精子濃度と精液量、精巣容積と精子濃度、血中LH、FSHおよびテストステロン値と精子濃度については、相関を検討した。

精液検査は原則として5日間の禁欲期間をおき、用手法にて採取した。採取した精液は室温にて30-60分放置して十分に液化させたのち、精液量、Makler chamberを用いた精子濃度、運動率および奇形率算定を行なった。なお、精子奇形率に関しては、可能な限りPapanicolaou染色変法あるいはすでに染色液の塗布されている市販のスライドグラス等を用いて算定したり、精液検査は最低2回以上行なうのを原則とした。

また今回、緒言においても述べた精液検査のばらつきについても検討すべく、2回以上精液検査を行なった症例で、2回の結果の間の比較を行なった。ばらつきの大きさに関しては、精液量、精子濃度、運動率および奇形率について表1に示す基準を試み

に設定した。

精液所見の分類は、WHO laboratory manualに従った<sup>2)</sup>。すなわち、精子濃度2000万/ml未満をoligozoospermia、前進運動率50%未満をasthenozoospermia、奇形率50%以上をteratozoospermiaとし、これら3つのうち2つもしくは3つを併せ持つ場合はそのように分類した。

血中LH、FSH、テストステロンの測定は平成元年3月まではRIA法で行なっていたが、その後測定法がIRMA法に変更となりそれに伴って正常値にも変更があった。したがって今回この前後での値をひとまとめにして比較検討するのは若干無理があると考え、各ホルモンのデータはこの変更前後の2つを示した。

#### 結 果

##### 1) 患者数(表2)

全体では、全男子新患総数7852人に対し、不妊を主訴として受診した患者は1018名であり、13%を占めていた。4年づつの3期に分けて見た場合は、開院時より順に、13.4%、14.1%、11.1%と、最近の4年間でやや割合の減少が見られた。

表2 不妊主訴患者数

年	男子新患総数	不妊主訴患者数	(%)
1979~1983	2528	339	13.4
1984~1987	2897	410	14.1
1988~1991	2427	269	11.1
計	7852	1018	13.0

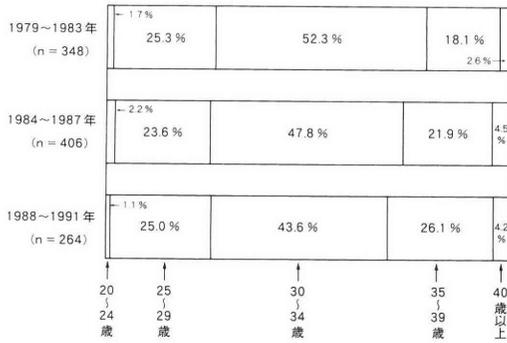


図1 初診時年齢

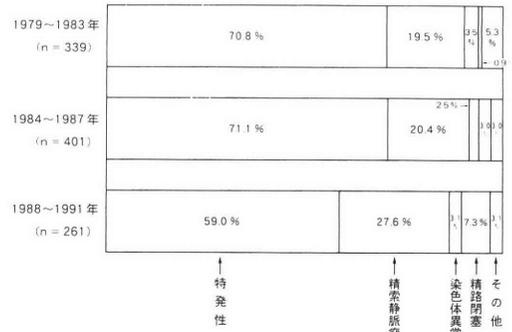


図5 男子不妊症の原因

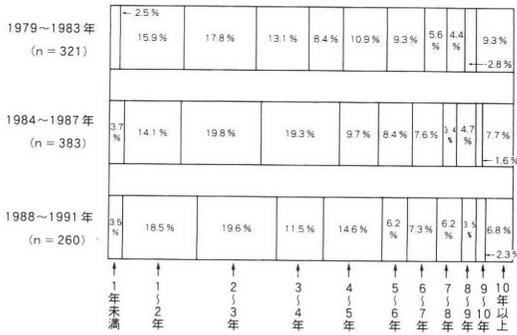


図2 結婚から来院までの期間

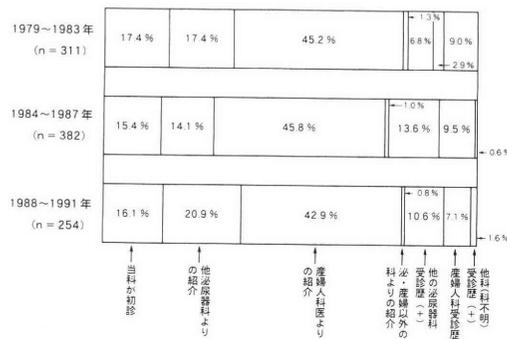


図3 来院の動機

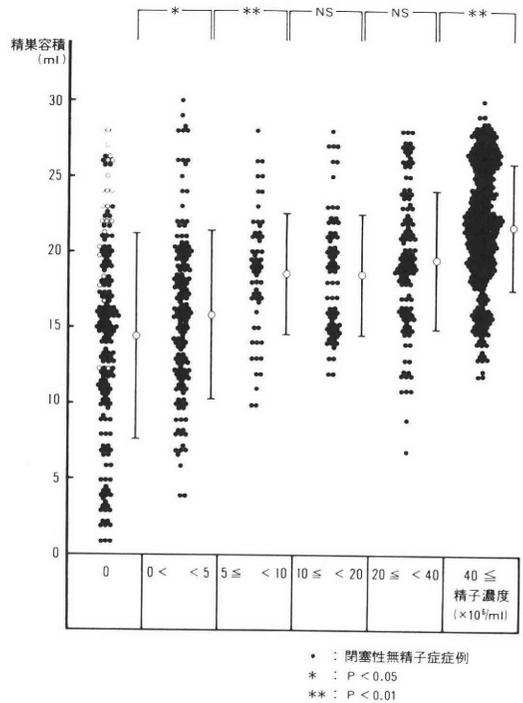


図6 精巣容積と精子濃度

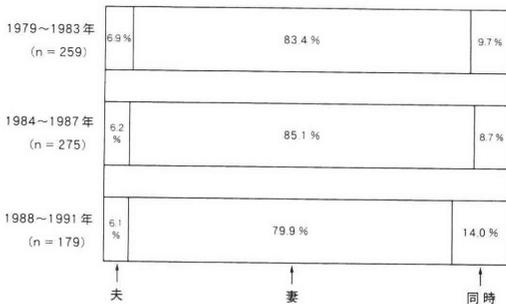


図4 夫婦のどちらが先に医療機関を受診したか

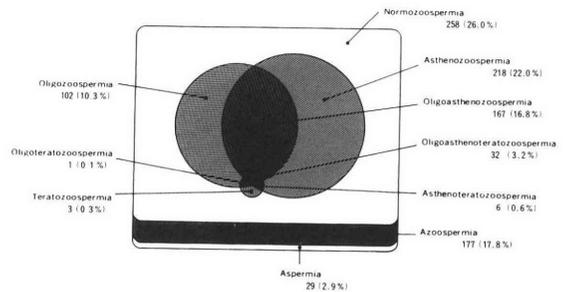


図7 精液所見 (n=993)

2) 初診時年齢 (図1)

3期を通して30~34歳の患者の占める割合が最も多かったが、35歳以上の患者の占める割合が増加してきていた。

3) 結婚から来院までの期間 (図2)

結婚後5年以内に受診する患者の割合の増加傾向が認められた。これと、前項の初診時年齢が高くなってきていることを考え合わせると、これらは結婚年齢の高齢化しつつあることを示すものと思われた。

4) 来院の動機 (図3)

不妊外来を設けて、積極的に検査加療を行なっているため、他院よりの紹介患者あるいは他科受診の経験を持つものが80%以上を占めていた。

5) 夫婦のどちらが先に医療機関を受診したか (図4)

妻が先に受診し、そこで産婦人科医に勧められて夫が受診というパターンが、3つの時期を通して圧倒的に多かった。

6) 男子不妊症の原因 (図5)

全体を通しての特発性症例の割合は、67.8%と高かったが、ここ4年間のそれは、59.0%と低下していた。逆に精索静脈瘤症例、精路閉塞症例の増加が認められた。

7) 精子濃度と精液量 (表3)

両者の間には明らかな関係は認められなかった。

8) 精巣容積と精子濃度 (図6)

精子濃度の減少に伴って精巣容積の減少が認められた。特に精子濃度1000万/ml未満500万/ml以上、500万/ml未満および無精子症の3群では各群間に有意差を認めた。また、4000万/ml以上の群と、

4000万未満2000万/ml以上の群の間にも有意差が認められた。

9) 精液所見 (図7)

方法の項にて述べたごとくWHOマニュアルにそって分類したものである。Normozoospermiaを除くと、asthenozoospermia, oligoasthenozoospermia, oligozoospermiaの順に多かった。

10) 血中FSH値 (図8)

精子濃度別に分けて比較したものであるがRIA法での値をみると、精巣容積と精子濃度を比較した場合とほぼ同様の結果であり、精子濃度1000万/ml未満500万/ml以上、500万/ml未満および無精子症の3群で各群間に有意差を認めた。また、4000万/ml以上の群と、4000万未満2000万/ml以上の群の間に有意差を認めたことも同様であった。

11) 血中LH値 (図9)

同じくRIA法での値をみると、精子濃度1000万/ml未満500万/ml以上、500万/ml未満および無精子症の3群で各群間に有意差を認めた。

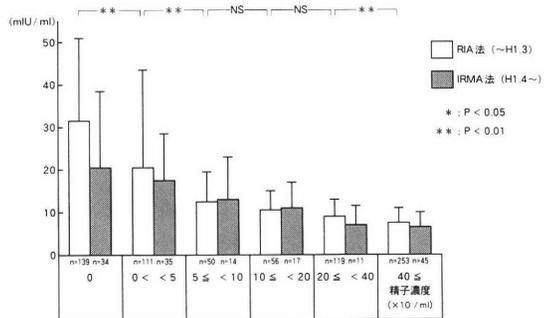


図8 血中FSH値

表3 精子濃度と精液量

精子濃度 (×10 <sup>6</sup> /ml)	精液量 (ml)								計
	<1	1~2	2~3	3~4	4~5	5~7	7~10	10≤	
40≤	6	56	90	102	48	45	4	0	351
20≤ <40	2	13	29	30	17	29	4	0	124
10≤ <20	2	17	10	18	15	13	0	0	75
5≤ <10	4	10	13	20	11	6	2	1	67
0< <5	5	27	41	26	22	18	3	0	152
0	16	21	30	41	24	17	5	0	154
計	35	144	213	237	147	128	18	1	923

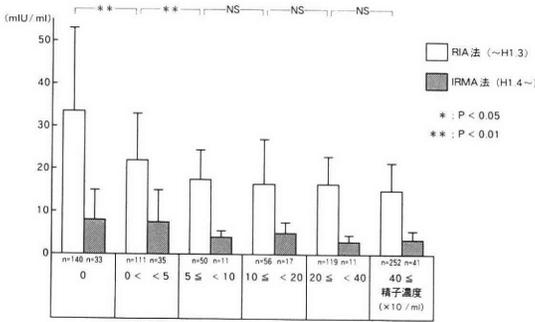


図9 血中LH値

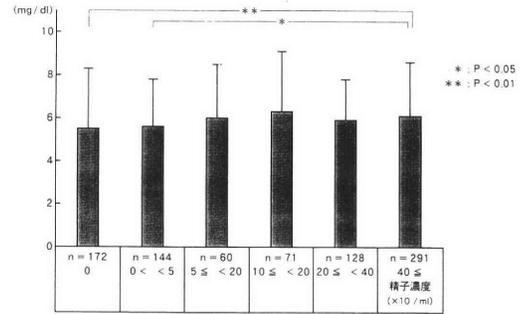


図10 血中テストステロン値

## 12) 血中テストステロン値 (図10)

精子濃度4000万/ml以上の群で、無精子症群および500万/ml未満の群に比べて高い値が得られた。

## 13) 2回の精液検査における各パラメーターのばらつき (表4)

表1の基準にしたがうと、Iが最もばらつかないことを示すわけであるが、精液量、精子濃度、運動率および奇形率の全てがIであった、つまり1回目と2回目と同じ結果であった症例は全体の12.7% (38/299) にすぎなかった。パラメーター別では、運動率においてIが少なくⅢが多い結果であり、最もばらつきが大きかった。

## 14) 2回の精液検査における各パラメーターの判定結果 (表5, 表6)

精子濃度2000万/ml、運動率50%、奇形率50%を基準にして正常以上の判定を行なった場合に、2回の検査でどう判定されたかを検討した。2回の検査間で異なった判定になった割合は、奇形率で最も少なく、運動率で最も高かった。不妊治療の現場において迷うのは、このように判定の不一致が起こった場合である。原則としてこのような場合には3回目の検査を行なって判断を下すことが望ましいとされている。しかし、治療すべきか否かということだけを考えた場合には、例えば1つのパラメーターでは不一致になったが、あとのどれかは2回とも異常であったという症例は、3回目をするまでもなくその時点で治療を要するということになる。つまり、1つあるいは2つのパラメーターに不一致が起きたが、残りは正常であったという場合のみ、治療の是非がこの時点では決められないので3回目の検査を、ということになるものと考えられる。今回の検討ではこのような症例は全体の23.2% (73/314) であった。ちなみに3つのパラメーター全てにおいて2回の検査で判定が一致しなかった症例はなかった。

## 考案

不妊を主訴として当科を受診した患者の、総男子新来患者に対する割合は13%であり、従来の報告3.4,5,6,7)に比してやや多いかまたはほぼ同じという結果であった。時間的な推移をみると一時的には、不妊外来の定着によると思われる増加が認められたが、最近の4年間はふたたび減少が見られており、安定しつつあるようである。

初診時の患者の年齢は、30~34歳にピークを認めしたが、4年毎に区切ってみるとそのピークは徐々に減少してきており、逆に35歳以上の患者の占める割合が増えつつある。結婚から来院までの期間は、5年以内のものが増加してきていると考えあわせると、これらのことは結婚年齢の高齢化しつつあることを示すものと思われた。

最近では、不妊症に関する報道や解説書なども多くみられ、不妊症に男性因子も深くかかわっていることなどが記されており、一般人の本症に対する知識も増してきているのではないかと考えられる。そのことが、来院の動機、および不妊カップルの妻と夫のどちらが先に医療機関を受診したかに影響しているように思われる。この点に関しては、妻が先に産婦人科を受診し、そこで勧められて夫が受診という、従来多いと考えられていたパターンが相変わらず一番多いことが示された。当科の位置する場所が、一般に比較的保守的とされる地方であり、このデータには当然影響しているものと考えられる。しかし、最近の4年間では、最初から両方の精査を求めてほぼ同時に受診したという患者の割合がやや増加しており、今後さらに増加していくことも予想され、興味深いところである。

不妊症の原因に関して目についたのは、ここ4年間で特発性症例の割合の減少が大きいことである。

表4 2回の精液検査における各パラメーターのばらつき

	n	I	II	III
精液量	307	207 (67.4%)	74 (24.1%)	26 ( 8.5%)
精子濃度	305	190 (62.3%)	75 (24.6%)	40 (13.1%)
運動率	307	143 (46.6%)	84 (27.4%)	80 (26.0%)
奇形率	299	190 (63.5%)	71 (23.8%)	38 (12.7%)

Category I を全て満たす症例 38/299例 (12.7%)

Category I, II までを全て満たす症例 172/299例 (57.5%)

表5 2回の精液検査における各パラメーターの判定結果(1)

	n	2回とも異常	1回が正常1回が異常	2回とも正常
精子濃度	308	106 (34.4%)	52 (16.9%)	150 (48.7%)
運動率	302	150 (49.7%)	89 (29.5%)	63 (20.8%)
奇形率	294	19 ( 6.5%)	17 ( 5.8%)	258 (87.7%)

表6 2回の精液検査における各パラメーターの判定結果(2)

3つのパラメーター(精子濃度, 運動率, 奇形率)とも, 2回の精液検査で同じ判定のなされたもの	① 3つとも正常と判定	40例 (12.8%)
	② 1つのみ異常と判定	77例 (24.5%)
	③ 2つ異常と判定	44例 (14.0%)
	④ 3つとも異常と判定	12例 (3.8%)
2回の精液検査で, 3つのパラメーター何れかに判定の不一致(EX. 1回目正常, 2回目異常)のあったもの	⑤ 1つのパラメーターのみ不一致, あとの2つは2回とも正常と判定	56例 (17.8%)
	⑥ 1つのパラメーターのみ不一致, あとの2つのいずれかあるいは両方で, 2回とも異常と判定	64例 (20.4%)
	⑦ 2つのパラメーターで不一致, 残り1つは2回とも正常	17例 (5.4%)
	⑧ 2つのパラメーターで不一致, 残り1つは2回とも異常	4例 (1.3%)
	⑨ 3つとも不一致	0例 (0%)
計		314例 (100%)

緒言にも述べたごとく、現在泌尿器科サイドからの不妊カップルへのアプローチとして、特発性とされる症例の原因を追及し明らかにすることは重要である。精子形成に関してわれわれの持つ知識は未だ十分ではなく、男性不妊の原因をすべて明らかにするのはなかなか難しいが、精索静脈瘤など日常診療の場でちょっとした注意をはらえば、簡単に発見できるようなものは当然見逃すべきでない。今回の特発性症例の減少が見られた原因の一つとして、以前に行なった検討<sup>8)</sup>がある。すなわち、精索静脈瘤患者の手術成績が薬物療法に比較して良好であったため、立位での視診触診を徹底して行ない、またドプラー血流測定などをルーチンに行なうことによって、精索静脈瘤患者発見の割合が増加したことである。このことは裏を返すなら、ドプラー検査により、subclinicalな精索静脈瘤が見つかるということだけではなく、これまでに触知可能な精索静脈瘤を持ちながら見逃されていた症例がかなりあったことを示すものでもあり、反省すべきところである。また、2つ目には、精巣上体精子吸引に体外受精を組み合わせたこと<sup>9)</sup>で閉塞性無精子症症例の治療に幅ができ、精路閉塞をもつ患者の紹介が最近若干増加したこともあるものと思われた。

精巣容積は、精子濃度の減少にしたがって減少していた。精子濃度500万/ml未満においては、有意に精巣容積が低く、これは他の報告<sup>10)</sup>で見られた傾向と一致した。この検討に関して、興味深かったのは、精子濃度のWHOによる基準ではいずれも正常域に入る4000万/ml以上の群と、2000万/ml以上4000万/ml未満の群の間に、有意差の見られたことである。この差は血中のFSH値についても同様に認められた。現在、われわれは精液検査所見について、精子濃度2000万/ml以下の症例を、WHOの定義にしたがってoligozoospermiaとしている。しかし、上記の結果から考えられることは、この境界はあくまでも妊孕性というパラメーターについてのことであり、精巣機能あるいは代謝が正常というわけではないのではないか、つまり精子濃度2000~4000万/mlの間は、妊孕性は保たれているが、すでに精巣の機能は正常よりやや落ちてきている状態なのではないかということである。この群の患者を見た場合に、造精機能障害に対する治療をすべきかどうかについては、その後どれくらいで精子濃度が2000万/mlを割ってくるのか、とか、もちろん精子機能など他のパラメーターとのかねあいなど未解決の部分も多く難しいが、妊孕性の障害に先だって精巣機能あるい

は代謝のどこかに支障をきたしているとするれば、それが個々の精子の機能など、ルーチンには検査していないパラメーターにすでに影響している可能性も十分に考えられ、現時点では、治療したほうがよいのではないかと思われた。

最後に、精液検査の各パラメーターについてのばらつきに関しての検討であるが、このために今回、精液量、精子濃度、運動率、奇形率のばらつきの大きさに対して独自に表1を設定した。各パラメーターのばらつきの大きさはI、II、IIIにわけたが、これらは主観的に決めたもので、例えば精子濃度のIIと運動率のIIが、なるべく臨床的に同じ重みを持つ、つまりわれわれが、それぞれのパラメーターについて経験的にこれくらいならしかたないかと日常考えているばらつきを元に作成したものである。これによると、全てのパラメーターでIを満たした症例は、13%弱、さらにIIを満たすものまでに広げても、やっと57.5%にすぎず、精液検査の結果の解釈の難しいことが再確認された。また、中でも運動率は非常にばらつきが大きく、1回施行しただけではあてになりにくいことがわかった。検査時の体調など患者自身に原因のあるばらつきとは別に、禁欲期間、保存温度、採取から検査までの時間、あるいは液化の状況など検査手技による測定結果への影響は、運動率に最も出やすいことが考えられ、よって、初診時の精液検査で運動率の低下している症例は、必ず2回、3回の再検査が必要と考えられる。運動率の低下ありとして、他科より当科を紹介された患者の精液検査を、当科の方法で行なってみると、正常の運動率であったという例はかなりあり、検査手技の影響が大きいことを示す一例と思われる。

判定の不一致に関しては、WHOの基準で正常異常を区切った場合、3回目の検査がどうしても必要な症例、つまり1つあるいは2つのパラメーターで、1回目と2回目の検査間で不一致が見られたが、残りのパラメーターでは正常であったものは、全体の23.2%であった。精子濃度が、2000万/mlの付近で正常異常に別れたという場合には、先ほど述べたことからしてまず治療したほうがいだろう、また運動率が50%前後で食い違った場合には、運動率がかなりばらつくということから推して、まず正常と見なしていいのではないかなど、この3回目の必要な症例の割合はもうすこし少なくできる可能性もある。精液検査を何回施行すべきかというのは非常に難しい問題であるが、患者数、患者の負担などと今

回の検討を考え合わせて、原則として2回、また必要があれば3回目を施行するという方針でいいのではないかと結論した。

本論文の要旨は第80回日本泌尿器科学会総会にて発表した。

## 文 献

- 1) 片山 喬, 風間泰蔵, 精子形態異常とその治療. 産婦治療62: 922, 1991
- 2) WHO, Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1987
- 3) 堀 夏樹, 山崎義久, 有馬公伸, 柳川 真, 杉村芳樹, 田島和洋, 栃木宏水, 加藤広海, 齊藤薫, 多田 茂, 男子不妊症の臨床統計的観察. 日不妊会誌27: 161, 1982
- 4) 木内弘道, 大田修平, 田中啓幹, 男子不妊症の臨床的観察. 日不妊会誌27: 170, 1982
- 5) 山本雅憲, 三宅弘治, 欄 芳郎, 寛 英雄, 後藤百万, 高村真一, 蔡 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: 369, 1982
- 6) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴夫, 島崎 淳, 男子不妊症の臨床的観察. 日不妊会誌28: 197, 1983
- 7) 今西 治, 奥田喜啓, 篠崎雅史, 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, 守殿貞男, 男性不妊の臨床統計的観察. 日不妊会誌36: 281, 1991
- 8) 風間泰蔵, 寺田為義, 里見定信, 布施秀樹, 片山 喬, 男性不妊の治療—その現状と問題点—. 泌尿紀要37: 1355, 1991
- 9) 寺田為義, 片山 喬, 高塚亮三, 加藤 修, 精巢上体吸引精子による体外受精の試み. 臨泌45: 487, 1991
- 10) 吉井慎一, 友政 宏, 武島 仁, 石川博通, 小磯謙吉, 過去5年間の男子不妊症の臨床統計. 日不妊会誌34: 454, 1989

## Clinical and statistical studies on male

## infertility from diagnostic aspect

Taizo Kazama, Yasuhiro Muraishi,  
Toyoaki Yokoyama, Akio Okumura,  
Osamu Nagakawa, Masashi Iwasaki,  
Sadanobu Satomi, Mamoru Sakamoto,  
Tameyoshi Terada, Hideki Fuse  
and Takashi Katayama

Department of Urology, Toyama Medical  
and Pharmaceutical University,  
Toyama 930-01, Japan  
(Director: Prof. T. Katayama)

A statistical analysis was performed from diagnostic aspect on 1018 patients with male infertility who had visited the Toyama Medical and Pharmaceutical University for 12 years from October 1979 to September 1991.

- 1) The peak of age distribution was from 30 to 34 years old, while the proportion of patients over 34 years old has slightly increased in these years.
- 2) In etiology, 70.8% of the patients were diagnosed as idiopathic in the first 4 years, which decreased to 59.0% in the last 4 years because of the increase of the patients with varicocele or obstructive azoospermia.
- 3) Significantly decreased testicular volumes and elevated serum FSH levels were observed in the patients with severe oligozoospermia ( $<5 \times 10^6/\text{ml}$ ). There also existed significant differences in the testicular volumes and serum FSH levels between the patients with high-normozoospermia ( $>40 \times 10^6/\text{ml}$ ) and low-normozoospermia (20 to  $40 \times 10^6/\text{ml}$ ).
- 4) At least 2 semen specimens were analyzed in each patient, and sperm motility showed most remarkable variability in the 3 semen parameters (semen volume, sperm motility and sperm morphology).

(受付: 1992年9月21日)

(受理: 1992年12月2日)

## ハムスター精巢上体管由来細胞に及ぼす 漢方薬の生物効果

### Effect of Traditional Herbal Medicines on Cultured Hamster Epididymal Cells

京都大学医学部婦人科学産科学教室

野田 洋一      夏山 知      森 崇英  
Yoichi NODA      Satoshi NATSUYAMA      Takahide MORI

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

臨床的に有効性が認められている、漢方薬の乏精子症あるいは無力精子症に対する改善効果が、どのような機序によるものであるかを明らかにするために、ハムスター精巢上体管由来細胞の培養系に各種の漢方薬エキス(八味地黄丸, 小柴胡湯, 紫胡加竜骨牡蛎湯, 当帰芍薬散, 加味逍遥散, 桂枝茯苓丸, 人参湯, 補中益気湯, 十全大補湯, 桃核承気湯, 芍薬甘草湯, 六味丸, 柴朴湯, 温経湯, 人参養榮湯, 小柴胡湯加桔梗石膏, 柴苓湯)を加え, その効果を観察した。まず細胞の増殖に及ぼす効果を形態で判定し, ついで蛋白合成に及ぼす効果を<sup>3</sup>H-Leucineの取り込み量で測定し対照群と比較した。その結果, 細胞増殖に及ぼす効果を形態で判定した場合は桃核承気湯, 六味丸, 柴朴湯, 温経湯, 人参養榮湯, および柴苓湯の計6種に有効性(促進効果)が認められたが, 残りの11種には効果は認められなかった。蛋白合成促進効果は加味逍遥散, 桂枝茯苓丸, 人参湯, 補中益気湯, 十全大補湯および六味丸の6種の漢方薬において認められ抑制効果は芍薬甘草湯に認められた。増殖効果と蛋白合成促進効果の両方を示したのは六味丸であった。蛋白合成の促進効果は補中益気湯で最も著名であり, 臨床的に認められた精液所見改善効果と一致した。よって補中益気湯の効果は精巢上体管由来細胞の蛋白合成を促進することによって精巢上体管中を移動する精子に何等かの効果をもたらされたことによるものである可能性が示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 48—54, 1993)

#### 諸 言

近年生殖医学の進歩は著しく, 体外受精・胚移植法をはじめとしてGIFT法など配偶子操作を伴う不妊治療が我国はもとより広く全世界に定着してきている。各国における不妊治療担当者の努力にもかかわらず妊娠率(挙児率)は15%前後<sup>1)</sup>と低率にとどまっている。この低い妊娠率のもたらされる原因はいくつも挙げられるが, 大別して考えると配偶子形成過程の異常, 胚培養条件の設定に関する問題および胚移植のタイミングや方法に関する未解決部分に

よることなどが考えられる。これまでに蓄積された諸家の報告をまとめると, 雄性配偶子の形成不全(乏精子症)がヒト体外受精・胚移植法における最も低い治療効率<sup>2,3,4)</sup>であることが明かとなっており, 雄性配偶子形成異常に対する対策が急務であることが判る。

我々の教室で行っている体外受精プログラムでも正常精液由来の精子で媒精した場合は75%程度の受精率であるのに対して乏精子症由来の精子を用いた場合は40%程度の受精率<sup>5)</sup>しか得られず, また妊娠率に関しても精液正常群で30%前後であるのに対して

精液異常群では5%とこれも有意に低い値を得ている<sup>5)</sup>。この傾向は我々の教室に於けるのみならず世界各国の体外受精センターにおける結果とも一致している<sup>2,3)</sup>。この対策として精液中より運動良好精子を効率よく回収することを目的としていくつかの方法が考察され試みられているが、決定的な受精率および妊娠率の向上は達成されていない。これは精液中に存在する比較的少数の運動良好精子を用いて問題の解決を図ろうとする考え方には基本的に無理があることを示しているものと理解される。これまで我々は造精機能そのものを促進する観点からツムラ補中益気湯を乏精子症の患者に服用せしめ有効であるとの結果を得ている<sup>5)</sup>。補中益気湯を含めた他の漢方薬についても同様の結果が報告されている<sup>6-10)</sup>。この効果がツムラ補中益気湯に含まれている如何なる成分の如何なる機序による効果を観察していることになるのかを明らかにする目的で、ハムスター精巣上体管由来細胞の培養系を用いてこれにツムラ補中益気湯はもとより他の各種のツムラ漢方薬エキス（八味地黄丸、小柴胡湯、柴胡加竜骨牡蛎湯、当帰芍薬散、加味逍遥散、桂枝茯苓丸、人参湯、十全大補湯、桃核承気湯、芍薬甘草湯、六味丸、柴朴湯、温経湯、人参養榮湯、小柴胡湯加桔梗石膏、紫苓湯）を加え何等かの生物効果が観察されるかどうかを検討した。

### 実験材料および方法

#### I 実験動物および精巣上体の摘除

ゴールデンハムスター成熟雄（15週～20週齢）を25℃の恒温環境下で飼育した。エーテル麻酔下で頸椎脱臼法により屠殺し、クリーンベンチ内で70%アルコールで消毒したあと下腹部切開により精巣および精巣上体を一塊として摘出し、血管、結合織および脂肪塊を可及的に除去したあと精巣および精巣上体を切離し、精巣上体尾部をナイフで切離し、これを培養操作に用いる出発材料とした。なお一回の培養操作に要する出発材料を得るのにハムスター2匹から精巣上体を回収した。

#### II 培養液および化学薬品

##### 1) 精巣上体由来細胞培養液の調整

溶液 A1:

アンドロステロン	5.8mg	10mlの 純アルコール溶解
レチノール	20mg	

A2:

ヒドロコチゾン	14.5mg	10mlの 純アルコール溶解
テストステロン	11.5mg	

A3:

IN塩酸	500 $\mu$ l
超純水	10ml
インスリン	12mg

B:

RPMI 1640	500ml
ストレプトマイシン	25mg
ペニシリン	31mg
トランスフェリン	2.5mg

C:

RPMI 1640	10ml
Na-Pyruvate	55mg

$$\text{基本培養液} = 500\text{ml} \times \text{B} + 10 \mu\text{l} \times \text{C} + 250 \mu\text{l} \times \text{A1} + 25 \mu\text{l} \times \text{A2} + 250 \mu\text{l} \times \text{A3}$$

これをよく混和しフィルターを通したあと冷蔵庫内に保存した。

使用に際しては牛胎児血清 (FCS) を10%加え再びフィルターを通したのち24穴の培養プレートに各well 1mlずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> in air, 37℃の条件で一晩平衡化させた後培養に供した。

##### 2) 漢方薬添加の培養液の調整

漢方薬添加RPMI 1640培養液の調整は17種のツムラ漢方薬（八味地黄丸、小柴胡湯、柴胡加竜骨牡蛎湯、当帰芍薬散、加味逍遥散、桂枝茯苓丸、人参湯、補中益気湯、十全大補湯、桃核承気湯、芍薬甘草湯、六味丸、柴朴湯、温経湯、人参養榮湯、小柴胡湯加桔梗石膏、紫苓湯）を用いて3種の濃度を設定し、これを用いて基本培養条件下で培養を行い、同様の観察項目と判定基準で評価を行った。まず漢方薬エキス原末 1 gを30mlの超純水に溶解せしめvortex mixerでよく攪拌したのち37℃で20分間静置し、遠心操作で不溶解部分を除去し、上澄液を濾過した。濾液をサンプルびんに分注し、冷凍保存する。濃度の設定はRPMI 1640 100mlに対して濾液100  $\mu$ lを加え（濃度A）、これをよく混和したあとA濃度のもの10mlをRPMI 90mlと混和し（濃度B）、さらにこれの一部10mlをRPMI 90mlと混和し（濃度C）、3種の濃度を設定した。なお漢方薬加培養液はC濃度のもので褐色を呈している。

なお培養に際しては、この様に調整した培養液を各wellに1 mlずつ注入し、あらかじめ温度、気相に平衡化させたのち基本培養液におけると同様に取り扱った。

### Ⅲハムスター精巣上体管由来細胞の培養

ハムスター精巣上体細胞の回収および培養は Moore, H. D. M等の方法によって<sup>20)</sup>, クリーンベンチ内で回収したハムスター精巣上体尾部の被膜を除去したあと35mm dishの中で10mgコラゲナーゼ 1 ml RPMIにより酵素処理を行う. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> in airの条件下で2時間反応させた後ピンセットで糸状にほぐれた精巣上体管のみを別に用意した洗い用dishへ

移し, コラゲナーゼを可及的に除去する. この操作を3回繰り返したのち10%FCSを含むRPMI 1640中へ移しまずピンセットで可及的に短い精巣上体管断片を得たあと, パスツールピペットでさらに細かい組織片(約0.5~1mm角)にまで細切し培養に用いた.

24穴のmultiplate (cell wells, Falcon) に基本培養液(10%FCSを含むRPMI 1640), ならびに漢方薬の濃度A, BおよびCを一例に設定し, 十分に培養条件下に

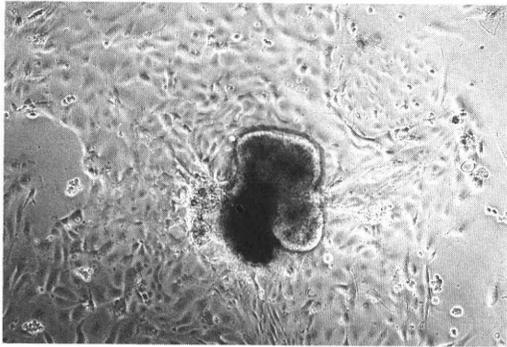


写真 1

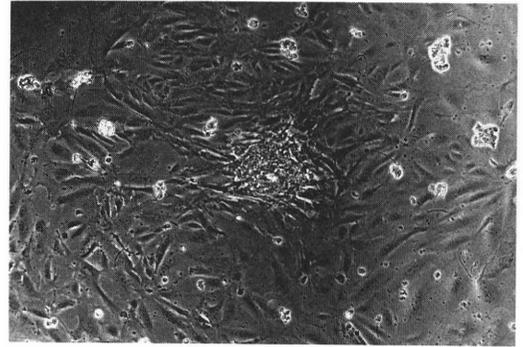


写真 2

表 1

漢方薬エキス	濃度A		濃度B		濃度C		対照	
	Day4	Day5	Day4	Day5	Day4	Day5	Day4	Day5
八味地黄丸	±	+	±	+	±	+	±	+
小柴胡湯	+	++	++	+	±	+	±	+
柴胡加竜骨牡蛎湯	+	+	+	++	+	++	+	+
当帰芍薬散	±	+	±	+	±	+	±	+
加味逍遙散	+	±	+	+	+	+	+	+
桂枝茯苓丸	+	+	+	±	+	+	+	+
人參湯	+	±	+	+	+	+	+	+
補中益気湯	±	+	±	+	±	+	±	+
十全大補湯	±	++	±	±	±	+	±	+
桃核承気湯	±	++	++*	+	±	+	±	+
芍薬甘草湯	+	+	+	+	+	+	+	+
六味丸	±	±	++*	±	±	±	±	+
柴朴湯	±	±	++*	+	±	±	±	+
温経湯	++*	++	++*	++	±	++	±	+
人參養榮湯	±	++	++*	++	±	++	±	+
小柴胡湯加桔梗石膏	±	+	++	+	±	±	+	+
茯苓湯	±	±	++*	++	±	±	±	+

\*対照群に対し2段階以上の差を認め有効と判定したもの.

平衡させたのち各wellに、上述した精巢上体尾部組織片をそれぞれ3~4ヶ導入し初代培養を行った。培養条件は5% CO<sub>2</sub> in air, 37℃とし、培養液の交換は培養開始48時間後より毎48時間に半量(0.5ml)ずつ行った。観察は毎24時間に行い、培養成績を対象群である基本培養液中のものと比較した。観察項目として組織の接着性、細胞の形態、周辺への増殖、底面の占有率および変性傾向等について記録し、また

写真撮影を行った。このうち比較検討を試みた項目は細胞の増殖度、および変性の程度であった。尚、増殖効果および変性度は(-):組織片の生着が殆ど認められないもの、(±):組織片の生着を認めるが、細胞層の広がりかwell底面の50%に満たないもの、(+):細胞層の広がりかwell底面の50%を越えるがconfluencyに達さないもの、(++):細胞層がconfluencyに達するもの、の4段階に分類し、対照群と2段階以上の差が認められた場合に有効と判定した。

IV 精巢上体管由来細胞の蛋白合成能の測定

培養開始5日目以後の培養細胞を用い、confluencyに達したwellを選び、これに0.5%トリプシン加D-PBS (-)を加え、38℃で処理して培養細胞を剥離した。細胞は遠心分離し、培地に再浮遊させ、96穴の培養プレートに各wellあたり3×10<sup>4</sup>個まき、48時間培養した後、3H-Leucine取り込み実験に供した。培地量を500μlとし、A濃度及びC濃度の漢方薬を加え、1μci/mlの<sup>3</sup>H-Leucineをさらに加えてから8時間後に培地を除去し、0.5%トリプシン加D-PBS (-)を加えて細胞を浮遊状態にし、cell harvesterを用いて細

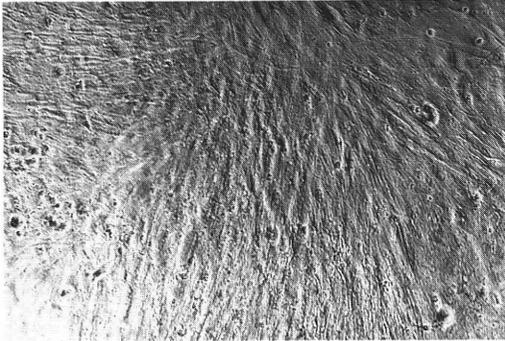


写真 3

表 2

添加漢方薬 (濃度A)	well数	<sup>3</sup> H leucine 取り込み (cpm)	sd (cpm)	効果判定
八味地黄丸	6	1326	297	ns
小柴胡湯	6	1435	226	ns
柴胡加竜骨牡蛎湯	6	1841	613	ns
当帰芍薬散	6	1770	344	ns
加味逍遥散	6	1993	362	+ *
桂枝茯苓丸	6	2083	406	+ *
人參湯	6	2008	378	+ *
補中益気湯	6	2275	647	+ *
十全大補湯	6	2015	446	+ *
桃核承気湯	6	1655	334	ns
芍薬甘草湯	6	1174	415	- *
六味丸	6	1953	381	+ *
柴朴湯	6	1240	406	ns
温経湯	6	1472	235	ns
人參養榮湯	6	1546	443	ns
小柴胡湯加桔梗石膏	6	1515	362	ns
柴苓湯	6	1398	229	ns
対照	6	1559	257	

t 検定: \*p<0.05, ns有意差無し

表 3

添加漢方薬 (濃度C)	well数	<sup>3</sup> H leucine 取り込み (cpm)	sd (cpm)	効果判定
八味地黄丸	4	1252	204	ns
小柴胡湯	4	1441	179	ns
柴胡加竜骨牡蛎湯	4	1528	142	ns
当帰芍薬散	4	1720	142	ns
加味逍遙散	4	1621	108	ns
桂枝茯苓丸	4	1745	124	ns
人參湯	4	1887	217	ns
補中益気湯	4	2058	86	+ **
十全大補湯	4	1953	170	+ *
桃核承気湯	4	1922	248	ns
芍薬甘草湯	4	1410	399	ns
六味丸	4	1912	182	+ *
柴朴湯	4	1398	294	ns
温経湯	4	1639	387	ns
人參養榮湯	4	1605	344	ns
小柴胡湯加桔梗石膏	4	1562	468	ns
柴苓湯	4	1326	114	ns
対照	4	1571	285	

t 検定: \* p<0.05, \*\* p<0.01, ns有意差無し

胞をグラスファイバー濾紙上に回収, 液体シンチレーションカウンターにて放射活性を計測した。

## 結 果

I 基本培養条件下におけるハムスター精巣上体管由来細胞の生育

基本培養条件下では組織片は培養24時間後に底面に付着し, その後急速に細胞が組織片より周辺に向かって増殖し培養5日目以降7日目にかけてほぼ confluent となった。その後培養14日目頃にまでかけて徐々に細胞数が減少した。増殖した細胞の形態は4日目～6日目頃には典型的な敷石状の形状を呈していたが(写真1), 7日目頃より徐々に紡垂状の細胞に置き変わり(写真2), 14日目頃には細長い長紡垂形の細胞が主体を占めた(写真3)。

II 漢方薬添加培養の効果

前後計3回行った漢方添加培養の結果から対照群に比してDay4の時点で増殖促進効果のみられた漢方薬は桃核承気湯, 六味丸, 柴朴湯, 温経湯, 人參

養榮湯, および柴苓湯の計6種であった。

形態的観察による増殖促進効果の判定は, 一つのwellのなかでも増殖度の高い部分と低い部分とが混在しているため, well全体を観察して, 対照群との比較により判定された。このため結果を明瞭に数値化して判定することはできなかったが, 対象群と濃度A, BおよびC群のそれぞれのwellを連日観察することにより細胞増殖に対する基本的な傾向はつかむことができたと考えられる。(表1)

III 漢方薬による蛋白合成促進効果の測定

表2,3にそれぞれ示したごとく, 漢方薬添加培養液の濃度Aにおいて6種(補中益気湯, 加味逍遙散, 桂枝茯苓丸, 人參湯, 十全大補湯, 六味丸), Cにおいて3種(補中益気湯, 十全大補湯, 六味丸)が有意の蛋白合成促進効果を示し, 濃度Aにおいて1種(芍薬甘草湯)が有意の抑制効果を示した。

## 考 察

造精機能異常による不妊症は一般にその治療が困

難であることがすでに明らかになっている。この理由は大部分の精液異常を示す患者(乏精子症或は無精子症)における造精機能異常自体が特発性(原因不明)のものであり、治療法が確立していないからである。

精巣で形成された精子はRete testisより精巣上体頭部に移行する。精子が移動する精巣上体管は延長8mにもおよびこの管中をおよそ4週間かけて移動し、最後に射出精液中に移行することになる。この間精子は巣に移動するのみならず種々の機能的変化(成熟)をとげることが知られている。

精巣上体を通過することによって精子は運動能を獲得し、さらに受精能を獲得する。受精が成立する為には精子の鞭毛運動は必須であるから運動能の獲得は受精能の獲得につながるが、単に運動性の獲得を通じて受精能を獲得するのみならず精子自体の他の成分の変化をもこの間に示すようになる。

精子膜の構成脂質が変化しコレステロールが相対的に増加する、或は精巣上体管由来の高分子(蛋白)が精子に移行し、或はこの間に精子鞭毛構成成分のdynein活性が出現するなどであり、他に同定されていない低分子のものを含めて精巣上体管(上皮)から分泌されて精子へ移行し、精子の成熟に影響を与える物質は多数存在するものと理解されている<sup>21)</sup>。

先にヒト乏精子症に対して行ったツムラ補中益気湯投薬のopen trialでは有効との判定が得られているが、複雑な生薬構成とさらに各生薬の持つさらに複雑な薬物構成の中から造精機能促進活性を同定することは極めて困難であろう。補中益気湯の乏精子症に対する効果の機序についてはいくつかの報告があるが<sup>22-24)</sup>、本研究では漢方薬が精巣上体管由来細胞に直接何等かの生物効果を与えるかどうかについて焦点をあてて検討した。

細胞増殖に及ぼす効果判定では6種の漢方薬に促進効果が認められた。また<sup>3</sup>H-Leucineの取り込みという蛋白合成の促進活性からみると6種の漢方薬に効果が認められた。

今後さらに精巣上体管由来細胞に対する生物作用の機序を解析するためには、漢方薬を添加した場合にどのような蛋白合成が誘導されるのか、それは分泌型の蛋白であるのかどうかといった観点をもつ必要がある。また今後精巣上体管上皮と精子との共培養など通じて、どのような成分が精子に移行するのかも検討する必要がある。

本研究を遂行するにあたり助力いただいた米田千智、人見見代の両氏に感謝致します。またツムラ株

式会社より漢方薬エキス原末の提供を受けました。ここに謝意を表します。

## 文 献

- 1) World Collaborative Report. 7th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Procreation. June 30-July 3, Paris, 1991
- 2) Cohen J, Purdy J, Edward R, Rowland G, Fehilly C, Steptoe P, Fishel S, Webster J, and Hewitt J, In vitro fertilization: a treatment for male infertility. *Fertil Steril* 43: 422, 1985
- 3) Hirsch I, Young RL, Gibbons WE, Poindexter AN, Lipshultz LI, Dodson MG, Rossavik KK, and Findley WE, In vitro fertilization in couples with male factor infertility. *Fertil Steril* 45: 659, 1986
- 4) Matson PL, Turner SR, Blackledge DG, Yovich J M, Richardson PA and Yovich JL, The role of gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the treatment of oligospermic infertility. *Fertil Steril* 48: 608, 1987
- 5) 野田洋一, 井田憲司, 神崎秀陽, 秦井俊造, 高倉賢二, 成本勝彦, 馬岡陽, 森崇英, 当科妊孕外来における男性不妊治療の現況. 産婦人科漢方研究のあゆみ 8: 63, 1991
- 6) 光川史郎, 木村正一, 石川博夫, 折笠精一, 男性不妊患者に対する補中益気湯の使用経験, 日不妊会誌, 29: 458, 1984
- 7) 奥山明彦, 並木幹夫, 園田孝夫, 林知厚, 男性不妊症に対する八味地黄丸及び人参湯の効果. 泌尿器紀要30: 409, 1984
- 8) 吉田英機, 谷藤匠, 桜井秀樹, 田代博紹, 小川肇, 今村一男, 乏精子症に対する補中益気湯の臨床的效果について. 泌尿器紀要32: 297, 1986
- 9) 玉舎輝彦, 大野洋介, 岡田弘二, 乏精子症の補中益気湯による治療と随証療法指針. 日不妊会誌32: 385, 1987
- 10) 大橋一友, 上浦祥司, 鮫島義弘, 亀田隆, 東千尋, 松崎昇, 根来孝夫, 佐治文隆, 谷澤修, 補中益気湯の乏精子症に対する治療効果. 産婦人科の世界11: 1189, 1987
- 11) 太田博孝, 福島峰子, 児玉英也, 真木正博, 乏精子症に対する補中益気湯の効果. 日不妊会誌32: 624, 1987
- 12) 太田博孝, 福島峰子, 乏精子症に対する補中益気湯・八味地黄丸の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ 5: 60, 1988
- 13) 木村正一, 佐藤滋彰, 前原郁夫, 石川博夫, 佐藤和宏, 折笠精一, 男性不妊症の治療における補中益気湯の投与量の検討. 産婦人科漢方研究のあゆみ 4: 48, 1987

- 14) 岡谷裕二, 相良祐輔, 男性不妊に対するKal-likreinならびに補中益気湯の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ 6: 41, 1987
- 15) 木村正一, 男性不妊症に対するツムラ補中益気湯の基礎的検討. 漢方医学13 (5): 142, 1989
- 16) 佐藤和宏, 折笠精一, 前原郁夫, 佐藤滋彰, 平松正義, 高橋 勝, 男性不妊症患者に対する補中益気湯, コウジン末併用療法の経験. 泌尿器外科 2 (6): 641, 1989
- 17) 森 明人, 堂地 勉, 山元慎一, 竹内一浩, 福元清吾, 沖 利通, 永田行博, 八味地黄丸の乏精子症に対する効果. 日不妊会誌35: 329, 1990
- 18) 山野修司, 村山真治, 西田莊哉, 加川俊明, 坂東律雄, 青野敏博, 男性不妊患者の精子性状に対するツムラ補中益気湯の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ 7 44, 1990
- 19) 白井孝昭, 高橋健太郎, 吉野和男, 草刈満寿夫, 北尾 学, ツムラ補中益気湯投与が有用であった乏精子症の1症例. 漢方医学14 (9): 327, 1990
- 20) Moore HDM, Hartman TD and Smith CA, *In vitro* culture of hamster epididymal epithelium and induction of sperm motility. J Reprod Fertil 78: 327, 1986
- 21) 岡部 勝, 柳町隆造, 精子の受精能獲得. 精子学(毛利英雄監修) P152 東京大学出版会, 1992
- 22) 田代真一, 赤澤好温, 小倉啓司, 福山拓夫, 中川清秀, 補中益気湯の精子安定化作用. 和漢医薬学会誌 2: 592, 1985
- 23) 水田哲也, 小栗久典, 石原 豊, 菅沼信彦, 松澤克治, 友田 豊, 中村潔史, 近藤育代, 林隆行, 木村敏男, 大沢正己, 成田 収, 八味地黄丸, 人參湯, 補中益気湯のヒト精子アクトゾーム反応に及ぼす影響. 産婦人科漢方研究のあゆみ 5: 97, 1988
- 24) 須藤一彦, 本多一裕, 滝 昌之, 蟹谷昌尚, 藤

井祐一, 油田正樹, 細谷英吉, 木村正一, 折笠精一, マウスにおけるAdriamycinによる造精機能障害におよぼすTJ-4 (ツムラ補中益気湯) の効果. 日薬理誌92: 251, 1988

### Effect of traditional herbal medicines on cultured hamster epididymal cells

Yoichi Noda, Satoshi Natsuyama  
and Takahide Mori

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

The aim of this study is to investigate the effect of the traditional herbal medicines (Kanpo) on epididymal epithelial cells. 17 Kanpo extracts (Hachimijio-gan, Shosaiko-to, Saikokarykotsuborei-to, Toukishakuyakusan, Kamishouyou-san, Keishi-bukuryou-gan, Ninjinto, Hochuekikito, Juzentaiho-to, Toukakujouki-to, Shakuyakuzanzo-to, Rokumi-gan, Saiboku-to, Unkei-to, Ninjinyouei-to, shousaiko-to-kakikyousekko and Sairei-to) are studied for their effects on proliferation and 3H-leucine uptake of cultured hamster epididymal epithelial cells. Six Kanpo extracts (Toukakujouki-to, Rokumi-gan, Saiboku-to, Unkei-to, Ninjinyouei-to and Sairei-to) showed growth promotive effect and 6 Kanpo extracts (Kamishouyou-san, Keishi-bukuryou-gan, Ninjinto, Hochuekiki-to, Juzentaiho-to, and Rokumi-gan) showedm significant increase in 3H-leucine uptake.

Our results suggest that these Kanpo extracts have stimulative effects on epididymal functions which may explain their clinical effects on male infertility.

(受付: 1992年9月4日)

(受理: 1992年12月2日)

# 漢方薬の示す精液所見改善効果の作用機序解析 —ハムスター精巣上皮培養細胞による検討—

## The Effects of Ethical Kanpos on the Culture of Hamster Epididymal Cells

京都大学医学部婦人科学産科学教室

夏山 知 森 崇英  
Satoshi NATSUYAMA Takahide MORI

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

滋賀医科大学産科婦人科学教室

野田 洋一  
Yoichi NODA

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

いくつかの漢方薬は乏精子症に対し一定の効果を持つことが報告されているが、この効果の機序については必ずしも明らかではない。今回、漢方薬の乏精子症改善効果の機序を明らかにするために、ハムスター精巣上皮管細胞の培養系を作成し、7種の漢方薬エキス(人參湯、柴苓湯、人參養榮湯、柴胡加竜骨牡蠣湯、補中益氣湯、小柴胡湯、八味地黄丸)を培地に加え、その細胞増殖に及ぼす効果を形態的に調べた。また培養細胞の蛋白合成に及ぼす効果を<sup>3</sup>H-Leucineの取り込み量で測定し対照群と比較した。4種の漢方薬エキス(人參湯、柴苓湯、補中益氣湯、八味地黄丸)に細胞増殖促進効果が認められ、5種の漢方薬エキス(人參湯、人參養榮湯、柴胡加竜骨牡蠣湯、補中益氣湯、小柴胡湯)に<sup>3</sup>H-Leucineの取り込み量の増加(促進効果)が認められた。これらの結果から、各種の漢方薬の効果は、精巣上皮管上皮の増殖能や蛋白合成を促進することによって精巣上皮管を移動しつつある精子に何等かの効果を及ぼす可能性が示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 55 - 59, 1993)

### 緒 言

近年、出生率低下の現況もあいまって、不妊症治療に対する社会的要請は相対的に高まりつつあるものと考えられる。一方、生殖医学の進歩により、不妊症領域に体外受精・胚移植法をはじめとする配偶子操作を伴う高度な技術が導入され、不妊症治療は新たな局面を迎えている。しかしながら、これらの治療方法においても妊娠成功率を阻害する困難な要

因の一つとして雄性配偶子の形成不全(乏精子症)があげられる。実際、AIH, GIFT, IVF-ETのいずれにおいても、特発性造精機能障害による乏精子症では受精率の低下が治療成功への大きな障害となっている<sup>1-3)</sup>。しかも乏精子症例の大多数は原因不明の造精機能障害であり<sup>4,5)</sup>、その根本的な治療法は殆ど確立されていない。したがって今後の不妊症治療においては、このような造精機能障害例に対する有効な治療法を確立することが極めて重要であると考えられ

る。

近年、漢方薬の男性不妊症への効果が注目されるようになり、補中益気湯、八味地黄丸、人参湯、牛車腎気丸などの臨床使用が報告されている<sup>6-12)</sup>。我々はカネボウ補中益気湯を乏精子症の患者に投与し、その臨床的な有効性を示す結果を得ている<sup>13)</sup>。この効果がどのような機序によるかを明らかにする目的で、ハムスター精巢上体管細胞の培養系を用い、培地に補中益気湯をはじめとする各種の漢方薬エキスを加え、その細胞増殖に及ぼす影響を形態的に判定し、さらに蛋白質合成能に対する効果を<sup>3</sup>H-Leucine取り込み能を指標として検討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験動物

ゴールデンハムスター成熟雄 (15~20週齢) は日本クレア社より購入し25℃の恒温環境下で飼育した。

#### 2. 試薬

アンドロステロン、ヒドロコチゾン、レチノール、テストステロン、インスリン、ストレプトマイシン、ペニシリン、トランスフェリンはSigma社より、Na-Pyruvateはナカライテスクより、RPMI 1640培地はFlow社より購入した。漢方薬エキス末はカネボウ薬品より提供を受けた。

#### 3. 培養液

アンドロステロン5.8mg, レチノール20mg, ヒドロコチゾン14.5mg, テストステロン11.5mgはそれぞれ100%エチルアルコール10mlに溶解し、インスリン12mgは1N塩酸500 $\mu$ lを加えて酸性とした超純水10mlに溶解して使用した。RPMI1640培地500mlに対しストレプトマイシン25mg, ペニシリン31mg, トランスフェリン2.5mg, Na-Pyruvate55 $\mu$ gを加え、これにアンドロステロン145 $\mu$ g, レチノール500 $\mu$ g, ヒドロコチゾン36.3 $\mu$ g, テストステロン28.8 $\mu$ g, インスリン300 $\mu$ gの割合で上記の溶液を添加し基本培養液とした。培養液はよく混和しフィルターを通したのち4℃で保存した。使用時にはこの基本培養液に不動化した牛胎児血清 (FCS) を10%添加しフィルターで濾過したのちwellに分注し、37℃5%CO<sub>2</sub> in airにて一夜平衡化させた後培養に用いた。

#### 4. 漢方薬エキス添加培養液の作成

漢方薬エキス添加培養液は7種の漢方薬 (人参湯、柴苓湯、人参養栄湯、柴胡加竜骨牡蠣湯、補中益気湯、小柴胡湯、八味地黄丸) を用いて3種の濃度を設定した。漢方薬エキス原末1gは30ml超純水

に加えてVoltex mixerでよく攪拌し、37℃で20分間静置した。これを遠心沈殿して上澄液を得、さらに濾過を行った。得られた水溶液は冷凍して保存した。これをRPMI 1640で1000倍希釈したものを濃度A、これをさらに10倍希釈したものを濃度B、さらにこれの一部を培地で10倍希釈したものを濃度Cとして実験に用いた。

#### 5. 精巢上体尾部の採取

ゴールデンハムスター成熟雄はエーテル麻酔下に頸椎脱臼法により屠殺した。クリーンベンチ内で70%アルコールで消毒したあと下腹部切開により精巢および精巢上体を一塊として摘出し、血管、結合組織および脂肪塊を可及的に除去したあと精巢および精巢上体を切離し、これから精巢上体尾部を切離して培養材料とした。

#### 6. 精巢上体の培養

ハムスター精巢上体尾部は被膜を除去をしたあとcollagenase10mg/ml添加RPMI1640により37℃、5%CO<sub>2</sub> in airで2時間処理した。糸状の精巢上体管をdishへ移し数回洗浄してcollagenaseを除去した。さらにこれを10%FCS加RPMI 1640へ移しピンセット、パストールピペットを使用して約1mm角の組織片になるまで細切した。これを各well, 3~4個播き、培地量1ml, 5%, CO<sub>2</sub> in air, 37℃で培養した。観察は24時間間隔で行い、培地は培養開始後48時間間隔で半量ずつ交換した。

#### 7. 漢方薬の細胞増殖に与える影響

24穴のmultiplateに、incubatorで十分気層に平衡させた基本培養液とA, B, Cの各濃度の漢方薬添加培地をそれぞれ1ml加え、上記の培養方法で精巢上体組織片を培養した。組織片から周囲のwell底面に増殖する島状の細胞層を倒立位相差顕微鏡で形態的に観察し、底面を占拠する細胞層の面積を対照群と比較した。なお、判定は培養第5日におこない、増殖効果は、(-): 組織片の生着が殆ど認められないもの、(±): 組織片の生着を認めるが、細胞層の広がりWell底面の50%に満たないもの、(+): 細胞層の広がりWell底面の50%を越えるがconfluencyに達さないもの、(++): 細胞層がconfluencyに達するもの、の4段階に分類し各群3wellを用いて判定した。

#### 8. 漢方薬の蛋白合成能に与える影響

培養後5日目以降の、培養細胞がconfluencyに達したwellの培養液を除去し、0.5%トリプシン加D-PBSを加えて、約20分間incubator内に置いて培養細胞を底面から剥離し浮遊状態にした。粗大な細胞塊と組織片を除去した細胞浮遊液を遠心分離し、沈降

した細胞を培地に浮遊させ、各wellあたり  $3 \times 10^4$  個の率で96 well multiplateにまき、48時間培養してwell底面に生着させた。A及びC濃度の漢方薬添加培地に  $1 \mu\text{Ci/ml}$  の<sup>3</sup>H-Leucineを加え、培地量をwellあたり  $500 \mu\text{l}$  として8時間培養した。培地除去後、0.5%トリプシン加D-PBS (-) にて培養細胞を剥離、浮遊状態としこれをcell harvesterにてグラスファイバーフィルターに回収し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測った。

結 果

I ハムスター精巣上体の培養結果

組織片は培養約24時間後にdishに付着し、組織片より周辺に細胞が増殖し、培養細胞層を形成した。細胞の形態は4日目～6日目頃には典型的な敷石状の上皮様形状を呈したが7日目以降には変性傾向が出現し、徐々にfibroblastと考えられる細胞に置き変わった。

II 漢方薬の細胞増殖に与える影響

表1 カネボウ漢方薬の精巣上体培養細胞の増殖能に及ぼす影響

実験群	Dose A	Dose B	Dose C
対照	+	+	+
人參湯	++	++	+
柴苓湯	++	+	++
人參養榮湯	+	+	+
柴胡加竜骨牡蠣湯	+	+	+
補中益気湯	++	+	+
小柴胡湯	+	+	+
八味地黄丸	+	++	+

漢方薬添加培養の結果では、対照群に比して増殖促進効果のみられた漢方薬は人參湯、柴苓湯、補中益気湯、八味地黄丸の4種であった(表1)。

III 漢方薬の蛋白合成能に与える影響

A濃度においては2種の漢方薬エキス(柴胡加竜骨牡蠣湯、小柴胡湯)に、C濃度においては4種の漢方薬エキス(人參湯、人參養榮湯、柴胡加竜骨牡蠣湯、補中益気湯)に<sup>3</sup>H-Leucineの取り込み量の増加(促進効果)が認められた。

残りの2種(柴苓湯、八味地黄丸)には効果は認められなかった(表2)。

考 察

乏精子症の受精率低下の原因は運動精子数の極度の不足のみではなく、精子の受精能低下をきたす何等かの機能異常もあると考えられ、精子の量、質双方の異常があいまって治療の障害となっていると考えられる。

このような精子機能の獲得について考察すると、精細管上皮で形成された精子はRete testisから精巣上体頭部に移行する。過去には精巣上体は単に精子の貯留と通過のための器官と考えられていた時代もあったが、現在では精子が運動能と受精能を獲得する精子成熟の場であることが知られている。また、精巣上体は様々な蛋白質を分泌し<sup>15,16,17,18,19</sup>、これらは精子成熟過程において重要な役割を果たすと考えられる。

我々は、ヒト乏精子症に対しカネボウ補中益気湯の投薬を行い、臨床的な有効性を示唆する結果を得た<sup>13</sup>。そこで今回は漢方薬が精巣上体管に直接効果を与えるかどうかについて細胞増殖能と蛋白質合成能から検討した。細胞増殖能からは人參湯、柴苓

表2 カネボウ漢方薬の精巣上体培養細胞<sup>3</sup>Hロイシン取り込みに及ぼす影響

実験群	Dose A			Dose C		
	No. of wells	cpm	sd	No. of wells	cpm	sd
対照	6	1661	37	4	1639	18
人參湯	6	1819	217	4	2089	328*
柴苓湯	6	1810	254	4	1618	291
人參養榮湯	6	1677	74	4	2359	275**
柴胡加竜骨牡蠣湯	6	1980	368*	4	2132	179**
補中益気湯	6	1825	244	4	2018	275*
小柴胡湯	6	2046	328*	4	1711	186
八味地黄丸	6	1791	238	4	1612	322

対照群に対するt検定: \*p<0.05, \*\*p<0.01

湯, 補中益気湯, 八味地黄丸の4種, <sup>3</sup>H-Leucineの取り込みによる蛋白合成促進活性からは人参湯, 人参養榮湯, 柴胡加竜骨牡蠣湯, 補中益気湯, 小柴胡湯の5種の漢方薬に効果が認められた。

両者には効果の重なるものと、逆のものがあるが、蛋白合成能の上昇は必ずしも細胞増殖とは一致しないと考えられ、むしろ、分泌能など細胞の分化機能の反映を考えねばならない。また今回の細胞増殖能の形態的評価はやや主観的であったため評価方法には改善の余地があると考えられる。実際、柴苓湯と八味地黄丸では濃度依存性に問題があり、今後、継代した細胞等を用い、増殖曲線などによりさらに詳細な効果濃度の検討が必要と考えられる。またさらに精巢上皮管上皮に対する生物作用の機序を解析するためには、漢方薬を添加した場合にどのような蛋白合成が誘導されるのか、それは分泌型の蛋白であるのかどうかについて検討する必要がある。

これらの漢方薬の効果の本体は必ずしも明らかではないが、例えば、補中益気湯や人参湯に含まれるニンジンや補中益気湯に含まれるサイコ、カンゾウにはステロイド様の効果が有るとされており<sup>11,20)</sup>、これらが精巢上皮由来細胞に効果を示した可能性がある。またニンジンには骨髓に対しDNAおよび蛋白合成を促進すると報告されており<sup>21)</sup>、同様の機序が働いた可能性もある。しかし、含まれるどの様な物質が効果を示しているかについては、さらに細胞レベルでの検討が必要と考えられる。

本研究の遂行にあたり助力いただいた米田千智、人見見代、の各氏に感謝致します。また漢方薬エキス原末の提供をうけましたカネボウ株式会社に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Matson PL, Turner SR, Blackledge DG, Yovich JM, Richardson PA and Yovich JL, The role of gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the treatment of oligospermic infertility. *Fertil Steril* 48: 608, 1987
- 2) Cohen J, Purdy J, Edward R, Rowland G, Fehilly C, Steptoe P, Fishel S, Webster J and Hewitt J, In vitro fertilization: a treatment for male infertility. *Fertil Steril* 43: 422, 1985
- 3) Hirsch I, Young RL, Gibbons WE, Poindexter AN, Lipshultz LI, Dodson MG, Rossavik KK and Findley WE, In vitro fertilization in couples with male factor infertility. *Fertil Steril* 45: 659, 1986
- 4) 広井正彦, 小田隆晴, 長谷川剛志, 男性不妊の治

療. 産科と婦人科56: 795, 1989

- 5) 堀 夏樹, 山本逸夫, 有馬公伸, 林 宣男, 加藤雅史, 多田 茂, 男性不妊の臨床 統計的観察(II). *日不妊会誌*31: 127, 1986
- 6) 吉田英機, 内藤善文, 藤井徳照, 渡辺政信, 田代博紹, 吉田 徹, カネボウ補中益気湯エキス顆粒の内服療法により妊娠に成功した1例. *医学と薬学*10: 769, 1983
- 7) 奥山明彦, 並木幹夫, 園田孝夫, 林 知厚, 男性不妊症に対する八味地黄丸及び人参湯の効果. *泌尿器紀要*30: 409, 1984
- 8) 光川史郎, 木村正一, 石川博夫, 折笠精一, 男性不妊患者に対する補中益気湯の使用経験. *日不妊会誌*29: 458, 1984
- 9) 吉田英機, 谷藤 匠, 桜井秀樹, 田代博紹, 小川 肇, 今村一男, 乏精子症に対する補中益気湯の臨床的效果について. *泌尿器紀要*32: 297, 1986
- 10) 大橋一友, 上浦洋司, 鮫島義弘, 亀田 隆, 東千尋, 松崎 昇, 根来孝夫, 佐佐文隆, 谷澤修, 補中益気湯の乏精子症に対する治療効果. *産婦人科の世界*11: 1189, 1987
- 11) 太田博孝, 福島峰子, 乏精子症に対する補中益気湯・八味地黄丸の効果. *産婦人科漢方研究の歩み* 5: 60, 1988
- 12) 森 明人, 堂地 勉, 山元慎一, 竹内一浩, 福元清吾, 沖 利通, 永田行博, 八味地黄丸の乏精子症に対する効果. *日不妊会誌*35: 329, 1990
- 13) 夏山 知, 野田洋一, 野々垣多加史, 馬岡 陽, 高倉賢二, 成本勝彦, 泰井俊造, 神崎秀陽, 森 崇英, 補中益気湯の乏精子症に対する効果. *日不妊会誌*36: 843, 1991
- 14) 辰巳賢一, 野田洋一, 松本 央, 馬岡 陽, 矢野樹理, 福田愛作, 江見信之, 高井一郎, 泰井俊造, 神崎秀陽, 森 崇英, Migration-Gravity Sedimentation Methodを利用した運動精子回収法, 及び同法のAIHへの応用. *日不妊会誌*33: 645, 1988
- 15) Paz G and Homonnai ZT, Functional anatomy of the male accessory sex organs, in *Infertility, Male and Female*. eds. Insular V and Lunenfeld B p129, Churchill Livingstone, 1986
- 16) Hamilton D, UDP-galactose, N-acetyl glucosamine galactosyltransferase in fluids from rat rete testis and epididymis. *Biol Reprod* 23: 377, 1980
- 17) Hamilton D, Evidence for alpha lactalbumin-like activity in reproductive tract fluids of the male rat. *Biol Reprod* 25: 385, 1981
- 18) Kohane AC, Carberi JC, Cameo MS and Blaquier JA, Quantitative determination of specific proteins in rat epididymis. *J Steroid Biochem* 11: 671, 1979

- 19) Sheth AR, Gunjukur AN and Shah GV, The presence of progressive motility sustaining factor (PMSF) in human epididymis. *Andrologia* 13: 142 1981
- 20) 山本昌弘, ニンジン (人參) - 薬用ニンジンの基礎と臨床. *治療学* 7: 685, 1977
- 21) 山本昌弘, 武内 望, 熊谷 朗, 山村雄一, Prostisol (朝鮮人參有効成分) の骨髓細胞, コレステロール, 蛋白およびDNA生合成に及ぼす影響について. *日本血液学会誌* 32, 18, 1969

**The effects of Ethical kanpos  
on the culture of hamster epididymal Cells**

Satoshi Natsuyama and Takahide Mori

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

Yoichi Noda

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

To examine the effects of Ethical kanpos on epididymal cells, extracts of Ethical Kanpos (Ninjin-to, Sairei-to, Ninjineiyō-to, Saikokaryukotsuborei-to, Hochuekiki-to, Shosaiko-to, Hachimijio-ganryo) were supplemented to the medium of hamster epididymal cell culture and their effects were evaluated by growth of the cells and incorporation of <sup>3</sup>H-leucine to them. Four extracts (Ninjin-to, Sairei-to, Hochuekiki-to, Hachimijio-ganryo) showed growth promotive effect and five extracts (Ninjin-to, Ninjineiyō-to, Saikokaryukotsuborei-to, Hochuekiki-to, Shosaiko-to) showed significant increase of <sup>3</sup>H-leucine uptake. These results suggest that these Ethical kanpos have direct promotive effects on epididymal function in cellular levels.

(受付: 1992年9月4日)

(受理: 1992年12月2日)

## ENDOTHELIN-3 STIMULATES RAT OVARIAN STEROIDOGENESIS

Satoshi USUKI

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

**Abstract:** Ovarian follicles of immature rats primed with 10 IU PMS for 24 (F-24) or 48 h (F-48) were incubated with or without 1  $\mu$ g/ml endothelin-3 (ET-3) in the presence or absence of 1  $\mu$ g/ml ovine NIH-FSH (FSH) or -LH (LH) for 3 h. ET-3 significantly stimulated medium P4, but not T and E2, in F-24, while medium P4, T and E2 were significantly increased by ET-3 in F-48h. In F-24, at 1  $\mu$ g/ml LH, P4, T and E2 concentrations were stimulated more than those by LH alone, while at 1  $\mu$ g/ml FSH, ET-3 reduced medium P4 and E2 concentrations increased by FSH alone. In F-48, concomitant treatment with ET-3 and LH increased medium P4 and T more than those by LH alone but decreased E2 more than that by LH alone. In contrast, concomitant treatment with ET-3 and FSH increased T more than that by FSH alone, while E2 was less than that by FSH alone and P4 was almost the same as that by FSH alone.

Tissue cAMP accumulation was also significantly increased by ET-3. The data point toward the direct involvement of ET-3 in the regulation of steroidogenesis by rat ovarian follicles, possibly through the partial mediation of the cAMP, and it is further suggested that ET-3 regulates FSH or LH effect on follicular steroidogenesis.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 ( 2 ), 60 - 63, 1993)

### Introduction

Recently, endothelin-3 (ET-3) was found to possess nervous and endocrine functions other than vasoconstriction and pressor response and to play an important role in ovarian function as well within the testis<sup>1-3</sup>). Our previous report shows that ET-3 stimulates steroid secretion in ovarian follicles perfused and is closely involved in ovarian function<sup>3</sup>). In this communication, the effect of ET-3 on ovarian follicular steroidogenesis with or without LH and FSH was investigated *in vitro* to know the possible direct involvement of ET-3 in steroidogenesis by ovarian follicles.

### Materials and Methods

ET-3 were obtained from Peptide Institute, Osaka. Twenty-seven days old female Wistar-Imamichi rats were given s.c. 10IU of pregnant mare's serum go-

nadotropin (PMS) to induce follicular development. The ovaries were removed 24 or 48 h after PMS administration, and the large follicles removed under a dissecting microscope. Thirty follicles per each experimental chamber room were incubated *in vitro* with or without ET-3 in the presence or absence of ovine NIH-FSH (NIADDK-oFSH-15, AFP-5529C) or ovine NIH-LH (NIADDK-oLH-24, AFP-0754) for 3 h after a 1-h preincubation as described previously<sup>4</sup>). Briefly, thirty follicles were preincubated for 1 h in 2.0 ml of synthetic TC-medium 199 (1.0% glucose and 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4) at 37°C in an atmosphere of 95% oxygen -5% carbon dioxide. Then ET-3 or ovine FSH or LH was added to the medium at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml, and incubation was continued for 3 h. After the end of the incubation period, medium progesterone (P4), testosterone (T) and estradiol-17  $\beta$  (E2) concentrations and tissue cyclic AMP (cAMP)

were measured by RIA using methods reported previously<sup>5-8</sup>). The data were statistically analyzed using Student's *t*-test.

**Results**

As shown in Fig. 1, significant stimulation of P4 concentrations in media was obtained with 1  $\mu$  g/ml ET-3 in F-24 ( $P < 0.001$ ), while T and E2 were not stimulated by ET-3. Concomitant treatment with ET-3 and LH increased P4, T and E2 more than those LH alone ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ , respectively), while at 1  $\mu$  g/ml FSH, ET-3 decreased P4 and E2 more than those stimulated by FSH alone ( $P < 0.01$  and  $P < 0.01$ , respectively) (Fig. 1).

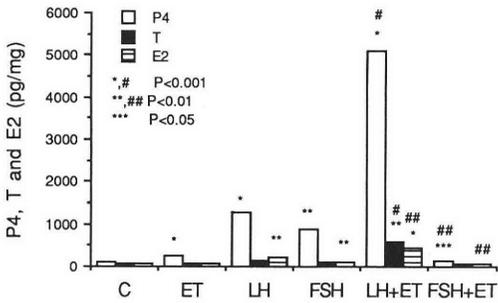


Fig. 1 Effect of endothelin-3 (ET) and/or FSH and LH on progesterone (P4; open bars), testosterone (T; closed bars) and 17  $\beta$ -estradiol (E2; striped bars) concentrations in ovarian follicles, incubated in vitro, of immature rats treated with PMS for 24 h. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of 8 observations. \*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.05$  compared with untreated control group (C). #,  $P < 0.001$ ; ##,  $P < 0.01$  compared with FSH or LH alone [(FSH + ET) vs FSH; (LH + ET) vs LH].

In F-48, 1  $\mu$  g/ml ET-3 significantly increased medium P4, T and E2 compared with the untreated group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ , respectively) (Fig. 2).

As shown in Fig. 2, at 1  $\mu$  g/ml LH, concomitant treatment with ET-3 in F-48 stimulated medium P4 and T more than those by LH alone ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively) but decreased E2 more than by LH alone ( $P < 0.05$ ), while at 1  $\mu$  g/ml FSH, concomitant treatment with ET-3 increased medium T ( $P < 0.05$ ) but decreased medium E2 more than by FSH alone ( $P < 0.001$ ). However, the medium P4 concentra-

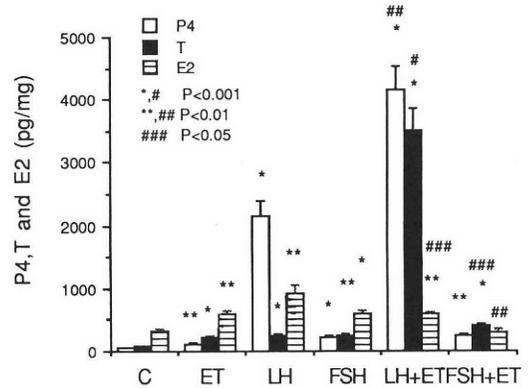


Fig. 2 Effect of endothelin-3 (ET) and/or FSH and LH on progesterone (P4; open bars), testosterone (T; closed bars) and 17  $\beta$ -estradiol (E2; striped bars) concentrations in ovarian follicles, incubated in vitro, of immature rats treated with PMS for 48 h. Data are expressed as mean  $\pm$  SE of 8 observations. \*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$  compared with untreated control group (C). #,  $P < 0.001$ ; ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.05$  compared with FSH or LH alone [(FSH + ET) vs FSH; (LH + ET) vs LH].

tion increased by concomitant treatment with ET-3 and FSH was almost the same as that by FSH alone (Fig. 2). Significant concentrations of tissue cAMP accumulation in F-48 ( $355.89 \pm 51.08$  fM/mg wet weight; mean  $\pm$  SE,  $n = 8$ ) were obtained with 1  $\mu$  g/ml ET-3 ( $P < 0.05$ ). The same data were obtained for F-24 (data not shown).

**Discussion**

Recent several lines of evidence suggest the various hormonal effects of ET-3 other than the novel vasoactive properties<sup>1-3,9,10</sup>). In this study, ET-3 stimulated medium P4, but not T and E2, in F-24, corresponding to follicles prior to proestrus, and in F-48, corresponding to follicles on early proestrus<sup>11</sup>), medium P4, T and E2 were stimulated by ET-3. The results suggest that ET-3 stimulates ovarian follicles to produce P4, T and E2 with the advance of follicle growth in a similar way to endothelin-1 (ET-1)<sup>3,12</sup>). Furthermore, ET-3 had the propensity to suppress FSH-stimulated steroidogenesis except for stimulation of T in F-24, while ET-3 had the tendency to increase steroidogenesis except for suppression of E2 in F-48, indicating the close in-

volvement of ET-3 in gonadotropic regulation of follicular steroidogenesis around proestrus. Interestingly, ET-3 tends to suppress gonadotropin-stimulated estrogen secretion in preovulatory follicles when it is treated with FSH or LH in together, for which further evaluation is needed to clarify the mechanism(s). Recently it was shown that ET-1 stimulates ovarian DNA polymerase  $\alpha$  activity in relationship to DNA synthesis<sup>13</sup>). Since ET-3 also stimulates the DNA polymerase  $\alpha$  activity and its effect is somewhat weaker than that of ET-1 without statistical significance (unpublished data), ET-3 is also thought to be involved in ovarian cell proliferation.

Whether or not ET-3 acts on ovarian steroidogenesis via a versatile regulatory agent mediating a host of hormonal effects is another very intriguing problem to be solved. In this study, the tissue cAMP accumulation was stimulated by ET-3, the dose of which was less effective than that which increased P4, T and E2. This indicates that ET-3 may also bring about a direct steroidogenic effect on the ovarian follicles at least partially via the mediation of cAMP as other peptide hormones do in the ovaries and that there may also exist other pathways to steroidogenesis such as IP<sub>3</sub>, diacylglycerol, and so on in ovaries.

These results lead to the conclusion that ET-3 stimulates cAMP accumulation and brings about a direct steroidogenic effect on the ovarian follicles as a local mediator hormone. However, it remains to be clarified what mechanisms in ET-3 action are involved in ovarian differentiation and proliferation or whether the presence of ET-3 is due to the local production or the pool of the circulating ET-3 in the ovary.

#### Acknowledgements

The author wishes to thank the Hormone Distribution Office, NIADDK, Torrance, CA, for providing with the ovine FSH and ovine LH. The technical assistance of Miss J. Tanaka, Mrs. M. Kanzaki, Mrs. Y. Hayasaka, Mrs. S. Kawamura and Mrs. Y. Kawakura, Ph. D., is also gratefully acknowledged. This study was supported in part by grants from the University of Tsukuba Research Project, the University of Tsukuba Special Research Project on Metabolism, and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (62570741,

02670731).

#### References

- 1) Matsumoto H, Suzuki N, Onda H and Fujino M, Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 74, 1989
- 2) Masaki T, Usuki S, Yanagisawa M and Suzuki N: Endothelin in perinatal pharmacology. *Semin Perinatol* 15: 27, 1991
- 3) Usuki S, Saitoh T, Suzuki N, Kitada C, Goto K and Masaki T, Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate ovarian steroidogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 (Suppl. 7): S256, 1991
- 4) Usuki S, Gonadotropic regulation of estrogen secretion by rat ovarian follicles. *Acta Obst Gynaec Jpn (in Japanese)* 34: 863, 1982
- 5) Usuki S, Effects of hachimijiogan, tokishakuyakusan and keishibukuryogan on the corpus luteum function and weights of various organs in vivo. *A J C M* 15: 99, 1987
- 6) Usuki S, Kubota S and Usuki Y, Effects of luteinizing hormone-releasing hormone on induction of DNA polymerase  $\alpha$  activity and DNA synthesis in hypophysectomized immature rat ovaries. *Biomed Res* 9: 133, 1988
- 7) Usuki S, Tokishakuyakusan stimulates cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation and progesterone production by corpora lutea. *A J C M* 16: 21, 1988
- 8) Usuki S, Hachimijiogan produces testosterone in adult rat testes. *A J C M* 16: 92, 1988
- 9) Hinson JP, Vinson GP, Kapas S and Teja R, The role of endothelin in the control of adrenocortical function: stimulation of endothelin release by ACTH and the effects of endothelin-1 and endothelin-3 on steroidogenesis in rat and human adrenocortical cells. *J Endocrinol* 128: 275, 1991
- 10) Samson WK, Skala KD, Alexander B and Huang FLS, Possible neuroendocrine actions of endothelin-3. *Endocrinology* 128: 1465, 1991
- 11) Pucell AG, Bumpus FM and Husain A, Rat ovarian angiotensin II receptors: characterization and coupling to estrogen secretion. *J Biol Chem* 262: 7076, 1987
- 12) Usuki S, Effects of endothelin-1 on steroidogenesis by rat ovarian follicles. *Jpn J Fertil Steril* 37: 260, 1992
- 13) Usuki S, Putative induction by endothelin-1 of deoxyribonucleic acid polymerase  $\alpha$  activity

in immature rat ovaries. Jpn J Fertil Steril 37: 561, 1992

**エンドセリン-3の  
ラット卵巣ステロイドゲネシスに  
及ぼす影響について**

筑波大学臨床医学系産科婦人科

白杵 哲

27日令のWistar-Imamichi系雌ラットにPMS 10 IUを皮下投与し、PMS投与後24ないし48時間後の摘出卵巣を $1\mu\text{g/ml}$ のエンドセリン-3 (ET-3) でインキュベーションし、ステロイドゲネシスに及ぼす影響について検討した。ETは24時間後の卵巣 (F-24) ではメジウム中のProgesterone (P) 濃度を有意に増加させたが、Testosterone (T) ないしEstra-

diol-17 $\beta$  (E2) 濃度には影響を与えなかった。更に発育の進んだ48時間後の卵巣 (F-48) では、ETはP、T及びE2濃度を有意に増加させた。ついで、LHないしFSHに及ぼす影響をみるためにETとLHないしFSH ( $1\mu\text{g/ml}$ ) を混合投与した。ETはF-24ではLHでP、T、E2濃度をLH単独作用よりも増加させたが、FSH単独作用よりも弱い作用を示した。F-48では、LHでLHの単独作用に比べP、T濃度を増加させたが、E2濃度は減少した。一方、FSHではT濃度は増加したが、E2濃度は減少し、P濃度には影響を与えなかった。更に、ETは卵巣組織内CyclicAMP濃度も増加させた。以上の事実は、ETが卵巣のステロイドゲネシスを直接調節するとともに、LH、FSHのステロイドゲネシスにも影響を及ぼすことを示唆している。

(受付：1991年11月28日)

(受理：1992年12月2日)

## 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 2 —酸性トリプシン様アルギニンアミダーゼについて—

### Studies on Arginine Amidases in Human Follicular Fluid 2 -Separation of Trypsin-like Acidic Arginine Amidases-

慶應大学医学部産婦人科学教室

小林 俊文                      兼子   智                      野澤 志 朗  
Toshifumi KOBAYASHI                      Satoru KANEKO                      Shiro NOZAWA  
Obstetrics and Gynecology,  
School of Medicine, Keio University, Tokyo 160, Japan

荻窪病院産婦人科

杉 山   武                      飯 田 悦 郎  
Takeshi SUGIYAMA                      Eturo IIDA  
Obstetrics and Gynecology,  
Ogikubo General Hospital

明治薬科大学第一生化学教室

松 田 兆 史                      秋 浜 澄 行  
Yoshifumi MATSUDA                      Sumiyuki AKIHAMA  
Department of Biochemistry, Meiji College of Pharmacy

ヒト混合卵胞液のセルロフィンGCL-2000ゲルろ過によって得られる3種の分子量の異なるアルギニンアミダーゼ活性画分のDEAE-セルロース吸着画分中より得られたアルギニンアミダーゼについて、リマ豆トリプシンインヒビター (LBTI) およびアプロチニンを用いた親和吸着法により分析した。その結果、それぞれの画分よりLBTIおよびアプロチニンカラムに親和性を示す2種の酸性トリプシン様アルギニンアミダーゼと両カラムに親和性を示さないアルギニンアミダーゼをそれぞれ分離した。親和吸着処理により回収された酸性アルギニンアミダーゼ活性についてVal-Leu-Arg-pNAを基質として用い検討したところ、高および低分子量画分中の酸性アルギニンアミダーゼ活性の約64%および93%は両トリプシンインヒビター親和吸着カラムに親和性を示さない酵素であったが、中分子量画分中の酵素の約70%は酸性のトリプシン様アルギニンアミダーゼであることが明らかになった。しかし、Bz-Arg-pNA水解活性で見た場合には、どの画分についても約90%以上の活性は両インヒビターに親和性を示さなかった。得られた9種類のヒト卵胞液中の酸性アルギニンアミダーゼについて若干の性質の検討を行った。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 64 - 70, 1993)

#### 緒 言

女性における排卵機構の最終段階においては、プラスミノゲンアクチベーター、プラスミンおよび

コラゲナーゼ等から成るプロテイナーゼ・カスケード系が作用し、グラーフ卵胞細胞基底膜のコラーゲン繊維を分解し、排卵に至ると考えられているが、いまだ明らかではない。そこで著者らは、この

問題を解明すべく、卵胞液中に含まれるプロテイナーゼの検索を試みた<sup>2)</sup>。その結果、著者ららすでは、ヒト卵胞液のセルロフィンGCL-2000ゲルろ過では、D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (Val-Leu-Arg-pNA)を加水分解する2種のアルギニンアミダーゼ画分が存在することを明らかにし、主分画中にはプラスミノゲンおよびプラスミン(EC 3. 4. 21. 7)を含む種々のアルギニンアミダーゼ画分存在することを明確に示した<sup>2,3)</sup>。また前報<sup>4)</sup>においては、同ゲルろ過によって得られる3種のN- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Bz-Arg-pNA)水解活性を示すアルギニンアミダーゼについて報告した。

本論文では、前報<sup>4)</sup>で報告した3種画分のDEAE-セルロース吸着画分から、2種の異なるトリプシンインヒビターを用いた親和吸着法により分画される、トリプシン様酸性アルギニンアミダーゼ類について検討し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プログラムによって入手した。入手については患者の同意を得た。

卵胞液はIVF時第一卵採取時に集め、血液の混在の有無を確認した後、10000rpm、30分間の遠心分離を行った。上清は0.45 $\mu$ mのミリポアフィルターを通した後、-40°Cで使用時まで保存した。

**アルギニンアミダーゼ活性測定**：アルギニンアミダーゼ活性の測定はAmundsenらの方法<sup>5)</sup>を一部変更して行った。酵素活性は、基質濃度0.5mM、37°C、pH 8.5の条件下で1分間に加水分解される基質の量(n mol/min)で示した。

基質の略号として以下のものを用いた。

N- $\alpha$ -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); Boc-L-leucyl-glycyl-L-arginine-p-nitroanilide (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA); Benzoyl-L-isoleucyl-glycyl-glycyl-L-arginine-p-nitroanilide (Bz-Ile-Gly-Gly-Arg-pNA); Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-leucine-p-nitroanilide (Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Leu-pNA)

**ヒト卵胞液中の3種酸性アルギニンアミダーゼの分取**：ヒト卵胞液中のBz-Arg-pNA水解活性を示す3種の分子量の異なるアルギニンアミダーゼ活性画分のセルロフィンGCL-2000ゲル・カラムを用いたゲルろ過による分離分画は、すでに報告した方法<sup>2,4)</sup>と同一の方法で行った。その結果、前報<sup>4)</sup>と同様に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得た。

セルロフィンGCL-2000ゲルろ過で得られた3種のアルギニンアミダーゼ画分(HMW-, MMW-およびLMW-画分; 前報<sup>4)</sup>参照のこと)はそれぞれ伝導度およびpHを2.0mS/cm以下および7.0にそれぞれ調整した後、2時間、DEAE-セルロースに吸着させた。吸着終了後、カラムを0.02M Tris-HCl緩衝液pH 7.5を用い十分洗浄し、次に0.5M NaClを含む同緩衝液を用い、各画分から酸性アルギニンアミダーゼ活性を溶出した。各画分から得られた3種の酸性アルギニンアミダーゼは以下の実験に用いた。

#### 結 果

**3種酸性アルギニンアミダーゼ画分からトリプシン様アルギニンアミダーゼの分取**：

ヒト卵胞液中の分子量の異なる3種の酸性アルギニンアミダーゼ活性画分に含まれるトリプシン様酵素の分取は、2種の異なるトリプシンインヒビター(リマ豆トリプシンインヒビター(LBTI)およびアプロチニン)を用いた親和吸着カラムを連結使用して行った。それぞれの画分から得た結果を図1(HMW-画分)、図2(MMW-画分)および図3(LMW-画分)に示した。各画分の結果(図1~3)はそれぞれ共に、第一の活性ピーク(第一カラム)が両親和吸着カラムに非吸着のアルギニンアミダーゼ活性を、第二のピーク(第二カラム)および第三のピーク(第三カラム)は、それぞれLBTIおよびアプロチニンカラムに親和性を有するトリプシン様アルギニンアミダーゼ活性が溶出された位置を示した。

HMW-酸性画分のLBTIおよびアプロチニン両カラムによる親和吸着の結果(図1)、大部分のBz-Arg-pNA水解活性は非吸着部に認められることが明らかになった。一方Val-Leu-Arg-pNA水解活性の場合には、約60%の活性が非吸着部に認められたが、約30%の活性はアプロチニンに親和性を示すトリプシン様アルギニンアミダーゼであり、LBTIに親和性を示す同様酵素は微量のみ存在することも明らかとなった。

図2に示したMMW-酸性画分の場合には、約70%のVal-Leu-Arg-pNA水解活性がLBTIおよびアプロチニン親和吸着カラムに吸着されるトリプシン様酵素であることが明らかになった。しかし、Bz-Arg-pNA水解活性で見た場合には約10%の活性が両カラムに吸着されたのみであり、この活性の大部分はトリプシン様酵素に由来するものではないことが明らかと

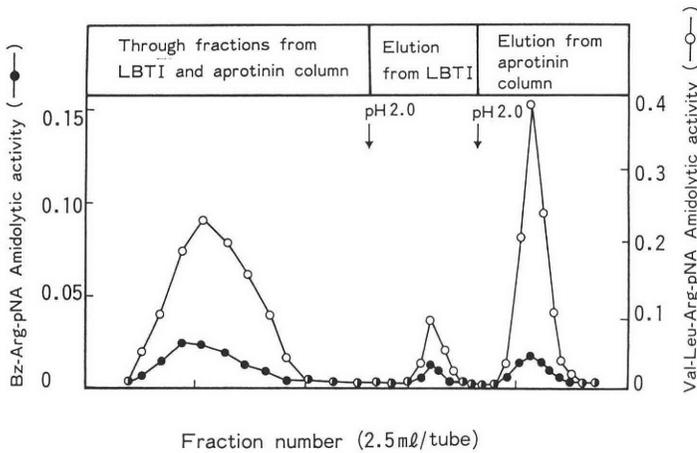


図 1 Lysine and Aprotinin affinity Adsorption of HMW-acidic arginine amidase preparation from human follicular fluid

Amidolytic activity is shown n mol/min/ml.  
Elution with HCl solution at pH 2.0 is shown arrow

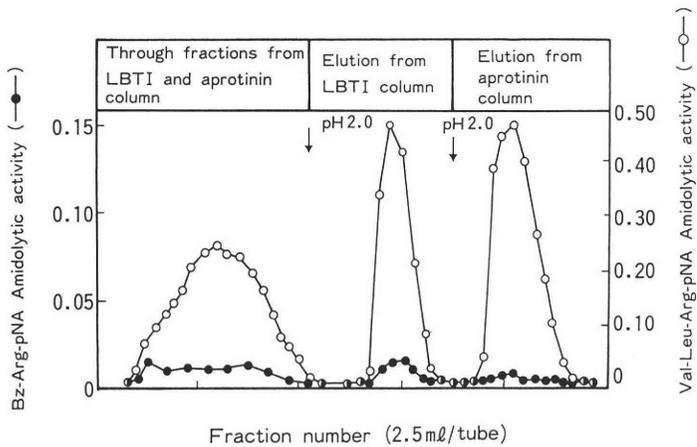


図 2 Lysine and Aprotinin affinity Adsorption of MMW-acidic arginine amidase preparation from human follicular fluid

Amidolytic activity is shown n mol/min/ml.  
Elution with HCl solution at pH 2.0 is shown arrow

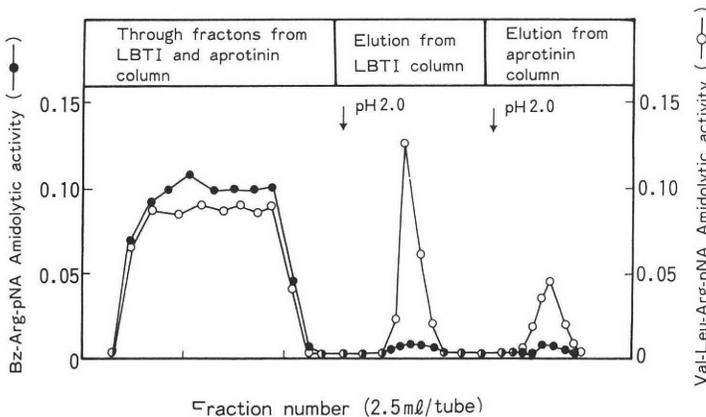


図 3 Lysine and Aprotinin affinity Adsorption of LMW-acidic arginine amidase preparation from human follicular fluid

Amidolytic activity is shown n mol/min/ml.  
Elution with HCl solution at pH 2.0 is shown arrow

なった。

LMW-酸性画分の場合には、ほとんどのBz-Arg-pNA水解活性および約90%のVal-Leu-Arg-pNA水解活性は非吸着部に認められ、同画分の酸性アルギニ

ンアミダーゼ活性の大部分はLBTIおよびアプロチニンカラムに親和性を示さない、トリプシン様酵素では無いことが明らかになった。しかし、約7%のVal-Leu-Arg-pNA水解活性は両カラムに親和性を示

すトリプシン様アルギニンアミダーゼであることも示された。

以上のヒト混合卵胞液中に含まれる分子量の異なる3種酸性アルギニンアミダーゼ画分からのトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼの分離分画の結果をまとめて表1に示した。表中の両親和吸着カラムに非吸着画分はThと、LBTI親和性酵素画分はLBTIと、またアプロチニンカラム親和性酵素画分はAproとそれぞれ表示した。

**各酸性アルギニンアミダーゼの比活性：**

各画分より得られた、非トリプシン様(非吸着の活性)(Thと表示)、LBTIカラム親和性トリプシン様(LBTIと表示)およびアプロチニンカラム親和性トリプシン様(Aproと表示)の各アルギニンアミダーゼの比活性および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)を

まとめて表2に示した。MMW-酸性画分より得られたLBTIおよびアプロチニンに親和性を示す酵素の比活性は、他の画分から得られた同様酵素に比べてかなり高値を示した。一方LMW-酸性画分より得られた両カラムに親和性を示す酵素のBz-Arg-pNA水解活性の比活性はかなり低値を示し、それぞれのVal-Leu-Arg-pNA/Bz-Arg-pNA比は149(LBTIカラム親和性酵素)および61(アプロチニンカラム親和性酵素)と大きな値を示した。

**各酸性アルギニンアミダーゼの基質特異性：**

HMW-, MMW-およびLMW-各画分より得られた、それぞれ2種のトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼ(LBTIおよびAproと表示)と非トリプシン酸性アルギニンアミダーゼ(Thと表示)の基質特異性の検討結果をまとめて表3に示した。活性はVal-Leu-Arg-pNAを1とした場合の比率で示した。

表1 Summary of Separation of Acidic Arginine Amidases from LBTI and Aprotinin Affinity Adsorptions and Elutions of Human Follicular Fluid

Preparation	Protein (%)			Bz-Arg-pNA (%)			Val-Leu-Arg-pNA (%)		
	Th	LBTI	Apro	Th	LBTI	Apro	Th	LBTI	Apro
HMW acidic	84.8	4.0	11.2	95.6	1.6	2.8	64.4	3.1	32.5
MMW acidic	99.0	0.3	0.7	89.4	6.5	4.1	29.5	27.4	43.1
LMW acidic	98.7	1.0	0.3	99.8	0.1	0.1	92.7	4.6	2.7

表2 Specific Activity of Acidic Arginine Amidases from LBTI and Aprotinin Affinity Adsorptions and Elutions of Human Follicular Fluid

Preparation	Bz-Arg-pNA (1)			Val-Leu-Arg-pNA (2)			Ratio (2)/(1)		
	Th	LBTI	Apro	Th	LBTI	Apro	Th	LBTI	Apro
HMW acidic	1.13	0.39	0.25	0.76	0.76	2.92	0.7	2.0	11.7
MMW acidic	0.90	22.8	5.90	0.30	95.6	62.5	0.3	4.2	10.6
LMW acidic	1.01	0.03	0.16	0.94	4.46	9.80	0.9	149	61.1

Activity was expressed as n mol/min/A280

表3 Substrate Specificity of Acidic Arginine amidases from Human Follicular Fluid

Substrate	Enzyme from								
	HMW-acidic			MMW-acidic			LMW-acidic		
	Th	LBTI	Apro	Th	LBTI	Apro	Th	LBTI	Apro
Val-Leu-Arg-pNA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Phe-Val-Arg-pNA	2.4	13.3	1.6	1.1	1.7	1.8	1.3	1.4	2.2
Boc-Leu-Gly-Arg pNA	0.62	3.6	0.39	0.59	0.08	0.28	2.8	1.5	1.3
Bz-Ile-Gly-Gly-Arg-pNA	0.33	0.55	0.08	0.15	0.02	0.03	8.9	0.10	0.02
Bz-Arg-pNA	0.37	1.9	0.28	0.12	0.01	0.02	0.46	1.4	2.3

The Ratio of amidolytic activity is given relative to standard Val-Leu-Arg-pNA

測定したすべての酵素のPhe-Val-Arg-pNA水解活性は良好であり、それぞれ、基準としたVal-Leu-Arg-pNAに対してよりも高い水解能を示した。特に、HMW-酸性画分から得たLBTIカラム親和性の酵素は約13倍高い水解能を示した。LMW-酸性画分中の非トリプシン様アルギニンアミダーゼ(非吸着酵素)のSuc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Leu-pNA水解活性は非常に高い値を示し、基準としたVal-Leu-Arg-pNA水解活性の約8.8倍であった。

各画分より得たトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼが最も良く加水分解した基質は、LMW-のLBTI親和性酵素を除き、Phe-Val-Arg-pNAであった。LMW-画分のLBTI親和性の酵素の場合は、Boc-Ile-Gly-Gly-Arg-pNA水解活性の方が上記基質の水解能よりも若干良好であった。

### 考 察

卵胞あるいは卵胞液中にはすでに、組織プラスミノゲンアクチベーター<sup>6,7)</sup>、コラゲナーゼ<sup>8)</sup>あるいはジペプチジルペプチダーゼIV<sup>9)</sup>等の存在が知られており、これらのプロテイナーゼ類がカスケードを形成し、排卵の最終段階において重要な役割を果たすと考えられている。すでに我々は、ヒト卵胞液中には、このカスケードの重要な構成因子の一つであるプラスミンあるいはプラスミノゲンアクチベーターを含む、種々の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼが存在することを明らかにした<sup>2-4)</sup>。さらに我々は、前報において、Val-Leu-Arg-pNA水解活性とBz-Arg-pNA水解活性の比率(Val-Leu-Arg-pNA/Bz-Arg-pNA)が異なる高、中および低分子量画分由来の酸性および塩基性アルギニンアミダーゼの存在も明らかにした<sup>4)</sup>。本研究においては、卵胞液中のプロテイナーゼカスケードにおいて重要な役割を果たすと考えられるトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼの分離分析を試みたものである。

その結果、高分子量および低分子量画分から2種の親和吸着法を用いて回収して得られるトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼ活性は、Val-Leu-Arg-pNA水解活性を基準とした場合、約35%(高分子量、図1)あるいは8%(低分子量、図3)程度であることが明らかになった(表1)。一方、卵胞液中に存在する組織プラスミノゲンアクチベーター、プラスミノゲンあるいはプラスミン等を含んでいる、中分子量画分<sup>2,3)</sup>(旧メジャーピーク：文献2参照)ではLBTI親和性活性、約27%、アプロチニンカラム親和性活性、約43%、総合約70%の高率でトリプシン様

酸性アルギニンアミダーゼが見いだされることが明らかになった(図2, 表2)。

中分子量画分より得られたLBTIおよびアプロチニンカラム親和性トリプシン様酸性アルギニンアミダーゼのVal-Leu-Arg-pNAおよびBz-Arg-pNA水解活性の比活性は約96および23(LBTI)および63, 5.8 n mol/min/A<sub>280</sub>(アプロチニン)であり、他の画分より得られたトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼ群に比べて約40-200倍高値を示すことが明らかになった(表3)。これらの結果は、中分子量画分(メジャーピーク)中に見いだされた2種のトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼが、卵胞液中で他の画分中に見いだされたトリプシン様アルギニンアミダーゼよりも、より重要な役割を果たすことを示している一つの現れではないかとも考えられる。

高分子量および低分子量画分中に含まれるVal-Leu-Arg-pNA水解活性およびBz-Arg-pNA水解活性を示す非トリプシン酸性アルギニンアミダーゼは、同画分中のこれらの活性の大部分を占めることが明らかとなった(図1, 3)。これらの酵素の性質については、今回検討を行わなかったが、卵胞液中のジペプチジルペプチダーゼに関する報告もあり<sup>9)</sup>、今後性質の解明と共に、その役割についても追求を行いたいと考える。

Veselskyらは、ウシ卵胞液中にはアプロチニンより低分子量のアクロシン・インヒビターが存在することを報告した<sup>10)</sup>。このインヒビターの役割についてはまだ明らかではないが、本研究で得られたヒト卵胞液中のトリプシン様アルギニンアミダーゼの一部を阻害することは十分考えられよう。すでに卵胞液中の組織プラスミノゲンインヒビター<sup>6,11)</sup>あるいはコラゲナーゼインヒビター<sup>12)</sup>が見いだされ、その役割の追及がなされている。一方、我々は、精漿中にも多くのアルギニンアミダーゼを見いだしてきたが<sup>13-16)</sup>、精漿中には多数のプロテイナーゼインヒビターの存在が明らかにされており<sup>17-19)</sup>、これらの相互作用についても興味を持たれている。今回見いだしたこれらトリプシン様酸性アルギニンアミダーゼに対する卵胞液中のプロテイナーゼインヒビターとの関連についても今後同様に検討する必要があると考える。

### 文 献

- 1) LeMaire WJ, Curry TE, Morioka N, Brannstrom M, Clark MR, Woessner JF and Koos RD, Regulation of ovulatory processes, in The pri-

- mate Ovary. ed. by Stouffer RL, p91, Penum Publishing, 1987
- 2) Kobayashi T, Park J-Y, Matsuda Y, Kaneko S, Nozawa S, Fujimoto Y and Akihama S, Detection of some arginine amidase activity in human follicular fluid. *Human Reprod* 8 : 1030, 1991
  - 3) 松田兆史, 秋浜澄行, 兼子 智, 小林俊文, 藤本幸男, ヒト卵胞液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 p 3 -65, 1992
  - 4) 小林俊文, 兼子 智, 野澤志朗, 杉山 正, 飯田悦郎, 松田兆史, 秋浜澄行, ヒト卵胞液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—. 日不妊会誌38: 1, 1993
  - 5) 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*, eds. Fujii S et al., p83 Plenum publishing, 1979
  - 6) Jones ES, Vernon MW, Muse KN and Curry TE, Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocri Metab* 68: 1039, 1989
  - 7) Canipari R, O'Connell ML, 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
  - 8) Seliger VE, Blumenauer V, Heins J, Neubert K and kaltwasser P, Determination of dipeptidyl-peptidase IV in human follicular fluid. *Z Bl Gyn* 110: 1312, 1988
  - 9) Curry TE, Dean DD, Woessner JF and LeMaire WJ, The extraction of a tissue collagenase with ovulation in the rat. *Biol Reprod* 33: 981, 1985
  - 10) Veselsky L, Matousek J, Stanek E, Cechova D and Hoskova M, Immunosuppressive factor and low molecular mass proteinase inhibitor in cow follicular fluid. *Acta Vet (Belgr)* 39: 87, 1989
  - 11) Reinhaller A, Kirchheimer JC, Deutinger J, Bieglmayer C, Christ G and Binder BR, plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor, and fibronectin in human granulosa cells and follicular fluid related to oocyte maturation and intrafollicular gonadotropin levels. *Fertil Steril* 54: 1045, 1990
  - 12) Curry ET, Sanders SL, Pedigo NG, Ester RS, Wilson E A and Vernon MW, Identification and characterization of metalloproteinase inhibitor activity in human ovarian follicular fluid. *Endrocri* 123: 1611, 1988
  - 13) Kobayashi T, Matsuda Y, Park J-Y, Kaneko S, Oshio S, Nozawa S, Fujimoto Y and Akihama S, Amidase activity: Arginine amidase in human seminal plasma. *Mol Androl* 3: 145, 1991
  - 14) Kobayashi T, Matsuda Y, Oshio S, Kaneko S, Mhori H, Iizuka R, Akihama S and Fujimoto Y, human acrosin: purification and some properties. *Arch Androl* 27: 9, 1991
  - 15) Kobayashi T, Park J-Y, matsuda Y, Hara I, Kaneko S, Oshio S, Nozawa S, Fujimoto Y and Akihama S, Basic arginine amidase in human seminal plasma: purification and some properties. *Arch Androl* 27: 197, 1991
  - 16) 松田兆史, 秋浜澄行, 押尾 茂, 梅田 隆, 精子・精漿の生化学, 2—精子・精漿中のプロテイナーゼについて—. *ペリネイタルケア* 11 : 432, 1992
  - 17) Liedbolm P and Astedt B, Fibrinolytic inhibitors in human seminal plasma. *Experientia* 30: 1113, 1974
  - 18) Von-Fellenberg R, Zweifel HR, Grunig G and Pellegrini A, Proteinase inhibitors of horse seminal plasma. A high molecular mass, acid-soluble protei nase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 366: 705, 1985
  - 19) Veselsky L, Jonakova V and Cechova D, A kunitz type proteinase inhibitor isolated from boar seminal vesicle fluid. *Andrologia* 17: 532, 1985
- Studies on arginine amidases  
in human follicular fluid 2  
-Separation of trypsin-like acidic arginine  
amidases-**
- Toshifumi Kobayashi, Satoru Kaneko  
and Shiro Nozawa
- Obstetrics and Genecology,  
School of Medicine, Keio University, Tokyo 160, Japan
- Takeshi Sugiyama and Eturo Iida
- Obstetrics and Genecology,  
Ogikubo General Hospital
- Yoshifumi Matsuda and Sumiyuki Akihama

Department of Biochemistry,  
Meiji College of Pharmacy

The three acidic arginine amidase preparations from human follicular fluid were analyzed by the techniques of affinity adsorptions using lima bean trypsin inhibitor (LBTI) and aprotinin columnus.

About 64 and 93% of acidic arginine amidase activity of Val-Leu-Arg-pNA hydrolysis in high and low molecular weight preparation were came through the above men-

tioned columnus, and about 70% of activity in middle molecular weight preparation was shown affinity to those columnus. However, more than 90% of Bz-Arg-pNA amidolytic activity in three preparations was no affinity to LBTI and aprotinin columnus.

Some characteristics of separated enzymes were measured.

(受付:1992年9月8日)

(受理:1993年12月2日)

# Gonadotropinに対する卵巣の反応性における成長ホルモンの関与

## The Role of Growth Hormone in Ovarian Responsiveness to Gonadotropins

済生会下関総合病院産婦人科

高崎 彰久  
Akihisa TAKASAKI

蔵本 武志  
Takeshi KURAMOTO

平塚 圭祐  
Keisuke HIRATUKA

森岡 均  
Hitoshi MORIOKA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Saiseikai Shimonoseki General Hospital, Yamaguchi 751, Japan

gonadotropinに対する卵巣の反応性におけるGHの関与を検討する目的で、当科不妊外来にてHMG-HCG療法中の患者18名に対し、GH分泌刺激試験であるクロニジン負荷試験または成長ホルモン刺激因子(GRF)負荷試験を行った。HMGは月経周期の3～5日目より開始し、最大卵胞径が18mmを越える時点まで投与した。少なくとも2周期のHMG投与を行い、HMGの総投与量が1500IU未満の群をgood responder群(以下G群)8例、1500IU以上の群をpoor responder群(以下P群)10例とした。それぞれの群で無治療周期に2種類のGH分泌負荷試験を施行し、血中GHのピーク値を比較検討した。両群間で年齢、身長、体重および血中の各種ホルモン基礎値(LH, FSH, E<sub>2</sub>, Prolactin, GH)に差は認められなかった。

しかしながら、クロニジン負荷試験時の血中GHのピーク値はP群では $8.8 \pm 2.2$  ng/ml (mean  $\pm$  SE)とG群の $19.3 \pm 4.3$  ng/ml (mean  $\pm$  SE)に比べ、有意に低値を示した。また、GRF負荷試験においても同様の結果であった(P群;  $11.4 \pm 3.4$  ng/ml, G群;  $48.1 \pm 7.6$  ng/ml, mean  $\pm$  SE)。

また、poor responder群の中でGHの分泌不全を呈する6症例に対し、HMGとともに月経周期の3, 5, 7, 9日目にそれぞれrecombinant human GH4単位を投与するとHMG投与中の血中E<sub>2</sub>値は有意に上昇し、卵胞発育までのHMG総投与量および投与日数も減少した。また、GH投与により1例が本邦で初めて妊娠に至った。

以上の成績より、poor responder群においてGH分泌不全を呈する症例が存在し、それらの症例に対し、GH投与が有効となる可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 71 - 76, 1993)

### 緒言

近年、GIFTやIVF-ETの進歩に伴い、種々の卵胞刺激法が開発され、数多くの良好な卵を得ることが可能となってきた。しかしながら、これらの治療に抵抗する、いわゆるgonadotropinに対するpoor responderが存在し、その取扱いには苦慮することが多い。現在、これらのpoor responderに対し、HMGの増量や長期投与、LH-RH analogの併用等が行われ

ているが、未だ有効な卵胞刺激法が認められないというのが現状だと思われる。

しかしながら、最近、growth hormone (GH) がgonadotropinに対する卵巣の反応性に関与しているという報告がなされ<sup>1,2)</sup>、gonadotropinに対するpoor responderに対するGHの臨床応用が試みられている<sup>3,4)</sup>。

今回、我々はgonadotropinに対するpoor responder群およびgood responder群に対し、他の報告よりも更

に詳細な検討を加えるため2種類のGH分泌刺激試験を行い、両群間でGHの反応性に違いがあるかどうか、両負荷試験間で反応性に違いがあるかどうかを検討した。また、GH分泌刺激試験でGH分泌不全パターンを示した症例に対しGH併用療法を施行し、その有用性について検討した。

### 対象および方法

#### 1. 対象

当科不妊外来受診患者の内、HMG-HCG療法を行っている患者18例を対象とした。HMG(ヒュメゴン®)投与は月経周期3~5日目より150~300IUを初期量として開始し、反応不良症例に対しては、随時HMGを増量した。HCGは最大卵胞径が18mmを越えた時点で投与した。少なくとも2周期のHMG投与を行い、HMGの総投与量が1500IU未満の群をgood responder群(以下G群)8例、1500IU以上の群をpoor responder群(以下P群)10例とした。

#### 2. ホルモン基礎値およびGH分泌刺激試験

両群間の血中ホルモン基礎値(LH, FSH, E<sub>2</sub>, Prolactin(PrI), GH)およびGH分泌刺激試験における血中GHのピーク値を比較検討した。ホルモン基礎値の測定およびGH分泌刺激試験は月経周期の3~5日目に行った。

絶食で午前9時に来院させ、30分の安静後に採血し、各ホルモンの基礎値を測定した。その後、塩酸クロニジン(カタプレス®)300 $\mu$ gを経口投与、またはGH releasing factor (GRF) 100 $\mu$ gを静注し、30, 60, 90, 120分後の血中GH値を測定し、血中のGHピーク値を求めた。また、一部の症例に対し、異なる周期に両負荷試験を施行し、血中GHのピーク値を比較検討した。

血中LH, FSH, PrI, GHの測定はSRL社に依頼し、血中E<sub>2</sub>はセロノ社製のセロザイム®<sup>5)</sup>を用いて測定した。

#### 3. GH投与の効果

P群の中でGH分泌刺激試験において低反応を示す6症例(クロニジン負荷試験:血中GHのピーク値<10ng/ml, またはGRF負荷試験:血中GHのピーク値<20ng/ml)に対し、月経周期の3, 5, 7および9日目にrecombinant human GH (rhGH; ノルデイトロピン®)をそれぞれ4単位筋注し(図1)<sup>4)</sup>、血中E<sub>2</sub>値、HMG投与量を前回のHMG投与周期(CONTROL周期)と比較した。また、IVF-ET患者5例に対しては、採卵数および受精数を比較した。

HMG投与は、GH非投与周期と同様のプロトコル

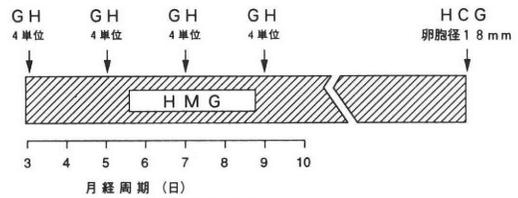


図1 GH投与方法および卵胞刺激法

で行い、採卵は同一人物が同一手技で行なった。また、媒精精子数は20万前後となるように調節した。

#### 4. 統計処理

統計処理は、student's T testまたはnew Duncan's multiple range testを用い、 $P<0.05$ をもって有意の差とした。

### 結果

G群, P群間で、年齢、体重および身長に差は認められなかった。HMG総投与量はG群では平均994単位(900~1200単位)、P群では平均3075単位(1800~6450単位)であった(表1)。

#### 1. ホルモン基礎値

LH, FSH, PrIおよびE<sub>2</sub>の基礎値は両群間で有意の差は認められなかった(図2)。

#### 2. GH分泌刺激試験

表1 両群の対象の比較

	good responder 群	poor responder 群
症例数	8	10
年齢(歳)	31 $\pm$ 2.2	33 $\pm$ 1.4
体重(kg)	49.7 $\pm$ 1.6	49.1 $\pm$ 1.0
身長(cm)	155.4 $\pm$ 2.2	156.6 $\pm$ 3.0
HMG総投与量(IU)	994 $\pm$ 65	3075 $\pm$ 419*

mean $\pm$ SE, \* $p<0.01$

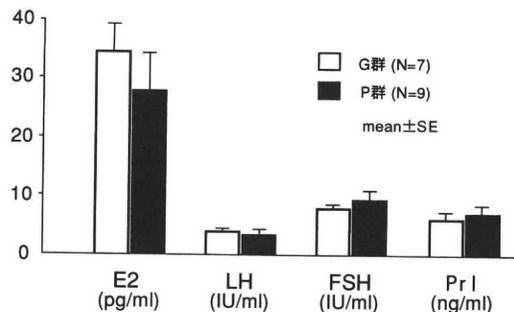


図2 両群における各種ホルモン基礎値

クロニジン負荷試験は18例中14例 (G群; 5 例, P群; 9 例) に施行した。

G群およびP群の血中GHの基礎値は、それぞれ、 $3.9 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ ,  $4.9 \pm 2.3 \text{ ng/ml}$  (mean  $\pm$  SE) と有意差は認められなかったが、ピーク値はP群では、 $8.8 \pm 2.2 \text{ ng/ml}$  (mean  $\pm$  SE) とG群の  $19.1 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$  (mean  $\pm$  SE) とG群と  $19.1 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$  (mean  $\pm$  SE) に比べ有意に低値を示した (図3)。

また、GRF負荷試験は18例中14例 (G群; 7 例, P群; 7 例) に施行した。

クロニジン負荷試験と同様に両群間で血中GHの基礎値には差は認められないものの、ピーク値ではP群 ( $11.4 \pm 3.4 \text{ ng/ml}$ , mean  $\pm$  SE) はG群 ( $48.1 \pm 7.6 \text{ ng/ml}$ , mean  $\pm$  SE) に比べ、有意に低値を示した (図4)。また、血中GHのピークは全例、負荷後30~90分

認められ、血中GHのピーク値に達するまでの平均時間、および反応パターンは、両群間で明らかな差は認められなかった。

一方、両負荷試験を施行できた10例 (G群: 4 例, P群: 6 例) では、P群の6例中4例が両負荷試験とも低反応を示したが、1例はクロニジン負荷試験における血中GHのピーク値は  $2.2 \text{ ng/ml}$  と低値を示すにもかかわらず、GRF負荷試験では、血中GHのピーク値は  $33.0 \text{ ng/ml}$  と高値を示した (図5)。

### 3. GH投与の効果

HMG総投与量は、CONTROL周期の  $5700 \pm 693$  単位 (mean  $\pm$  SE) に比べ、GH投与周期では  $4350 \pm 493$  単位 (mean  $\pm$  SE) と有意に減少した。また、HMG投与日数も約3日間短縮された (表2)。しかしながら、卵胞数は両周期とも3個前後で有意の差は認められなかった (表2)。また、直径15mm以下の卵胞も含めた総卵胞数にも変化は認められなかった。

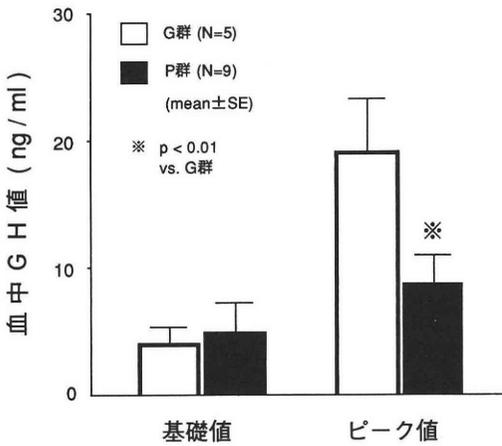


図3 クロニジン負荷試験における血中GHの反応性 (ピーク値)

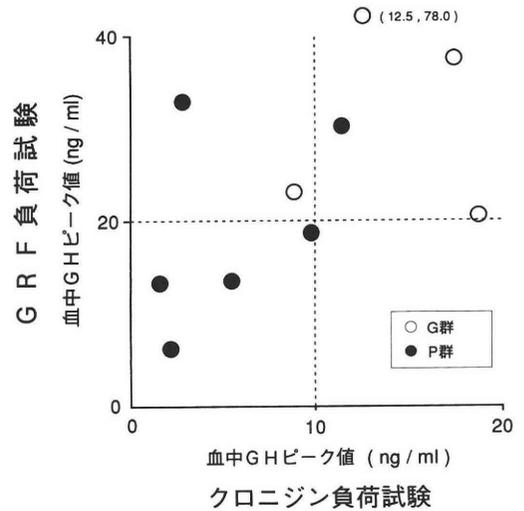


図5 同一症例におけるGRF負荷試験及びクロニジン負荷試験

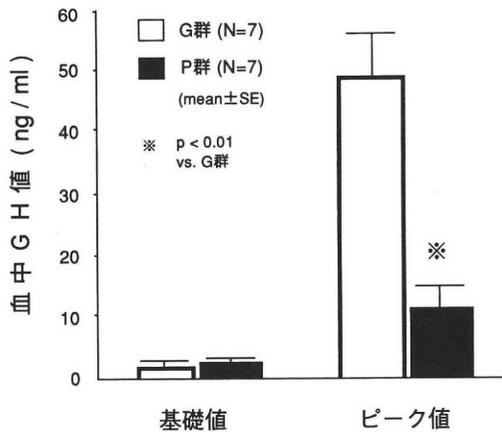


図4 GRF負荷試験における血中GHの反応性

表2 GH投与の効果

	CONTROL周期	GH投与周期
総HMG量	$5700 \pm 693$	$4350 \pm 493^*$
HMG投与日数	$14.2 \pm 1.2$	$11.0 \pm 0.8$
卵胞数 (>15mm)	$3.4 \pm 0.2$	$3.4 \pm 0.5$
IVF症例	採卵率	2/5
	受精率	0/2
妊娠率	0/6	1/6 (妊娠例はAIH症例)

mean  $\pm$  SE, \*p<0.05

一方、血中E<sub>2</sub>値はHMG投与前 (GH投与前) には、CONTROL周期、GH投与前周期ともそれぞれ24.2±1.2pg/ml/follicle, 28.2±6.4pg/ml/follicle (mean±SE) と低値を示していたが、GH投与前周期では、HMG投与前 8日目より増加し始め、10日目 (GH16単位投与前後)、およびHCG投与前日にはCONTROL周期に比べ、有意に高値を示した (図6)。

GH投与前例のうちIVF-ET症例 (5例) を検討したところ、卵胞数はCONTROL周期とGH投与前周期で差は認められなかったが、採卵し得た症例数はCONTROL周期では2例 (採卵数: 2個, 1個) であったのに比べ、GH投与前周期では4例 (採卵数: 2個, 2個, 2個, 1個) と増加した (表2)。

また、CONTROL周期では2例とも受精しなかったが、GH投与前周期では1例が受精した (表2)。なお、媒精精子濃度はCONTROL周期とGH投与前周期で

差は認められなかった。

また、GH投与前後にAIHを施行した症例で妊娠を認めた。以下、妊娠症例を呈示する (図7)。

妊娠症例は、クロミッド無効の排卵障害例で数回のHMG-HCG療法を試みるもHMGに対する反応性不良で卵胞発育までに多量のHMGを必要とした。また、卵胞発育を認めてもほとんどの周期で排卵が認められなかった。CONTROL周期でも2550単位のHMG投与前を行い、HCGを投与前したが排卵は認められなかった。GH投与前周期では、CONTROL周期に比較して血中E<sub>2</sub>値は早期より上昇し、HCG投与前日には251pg/ml/follicleとCONTROL周期の150.5pg/ml/follicleに比べ高値を示した。また、HMG総投与前量も1950単位とCONTROL周期に比べ減少した (図7)。GH投与前周期には排卵を認め、妊娠に至った。

考 察

今回の検討でgonadotropinに対するpoor responderにはGHに分泌不全が存在する可能性が示唆された。この結果は、クロニジン負荷試験で検討したMenasheらの報告と一致している<sup>2)</sup>。今回我々は、GH刺激試験として、クロニジン負荷試験と共にGRF負荷試験を行った。これは、単独の刺激試験では疑陽性が10~40%認められ<sup>6,7)</sup>、GHの分泌不全を正確に診断するためには少なくとも2種類の刺激試験を行う必要があると考えられているためである。今回の検討では両負荷試験ともP群で低反応を示したことより (図3, 4, 5)、P群でGHの分泌不全が存在する可能性が高いと考えられる。

また、クロニジンはαアドレナリン作動薬で主に視床下部からのGRF分泌を促進することによりGH分泌を促進し<sup>8)</sup>、GRFは直接下垂体に作用してGH分泌を促進すると考えられている。この2種類の負荷試験を組み合わせることにより、障害部位を鑑別することがある程度可能である。

今回の検討でも両負荷試験を行い得たP群6例中1例は、クロニジン負荷試験では低反応を示すものの、GRF負荷試験では正常な反応を示し、その障害部位が視床下部にある可能性が示唆された。

一方、卵胞発育に対するGHの作用は近年徐々に明らかになってきている。

Jia等<sup>9)</sup>はGHはFSHによって誘導されるラット顆粒膜細胞の分化を促進することを報告し、Davoren & Hsueh<sup>9)</sup>はGH投与前によってラット卵巣内のinsulin-like growth factor I (IGF I) 濃度が増加すると報告している。

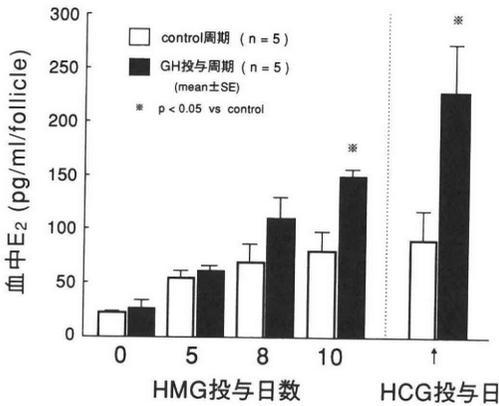


図6 GH投与前による血中E<sub>2</sub> 値の変化

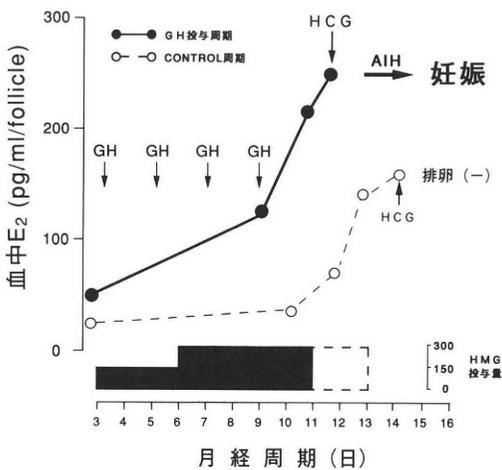


図7 妊娠症例の治療経過

上段に血中E<sub>2</sub> 値の推移を、下段にHMG投与前量を示す。

また、顆粒膜細胞にはIGF I receptorが存在し<sup>10)</sup>、IGF IはFSHと協同して顆粒膜細胞のprogesterone産生<sup>11)</sup>、LH receptor数<sup>12)</sup>を増加させるとともにアロマターゼ活性<sup>13)</sup>を増加させると報告されている。この様に、GHは直接、またはIGF Iを介して間接的に卵胞発育に関与しているものと考えられる。これらの研究をもとにgonadotropinに対するpoor responderに対するGHの投与が臨床的に行われてくるようになった。今回の検討では、GH投与により、血中E<sub>2</sub>値は有意に増加し(図6)、HMG総投与量および投与日数は有意に減少したが(表2)、これらは他の報告と一致している<sup>3,4)</sup>。

また、採卵数や受精率における検討では症例数も少なく十分な比較はできなかったものの採卵数、受精率とともに改善傾向を示し(表2)、GHの卵の発育や受精能に対する影響につき、今後さらに症例を増し、検討する必要があると思われる。

また、成熟卵胞数に変化が認められなかったことは(表2)、GHは卵胞発育の初期(卵胞のselectionの時期)には関与せず、主に発育卵胞のselection以後の卵胞の発育に関与していると推測される。

また、rhGHは現時点では非常に高価であり、その投与量、および投与期間が問題となっている<sup>3,4)</sup>。我々は、HMGの投与開始日よりノルデイトロピン® 4単位を4日間隔日投与した。これはノルデイトロピン® 4単位投与により血中の最高GH濃度が30ng/ml前後<sup>14)</sup>と比較的生理的な血中濃度が得られると考えたからである。しかしながら、至適な投与方法および投与期間については今後さらなる検討が必要であると思われる。

また、最近、GH投与の代わりにより安価なGRFを投与する方法<sup>15)</sup>が報告されているが、今回の検討ではpoor responder群ではGRFに対する低反応を認める症例が多く(図3)、その適応は限られると考えられる。

最後に、今回の検討で妊娠に至った1例は多量のHMG投与により卵胞の発育は認めるものの、HCG投与によっても排卵が認められなかったが、GH投与により排卵を認めた。最近、排卵障害患者においてGHの分泌不全が存在すると言う報告<sup>16)</sup>もあり、排卵に対するGHの関与についても興味をもたれるところである。

## 結 論

1. gonadotropinに対するpoor responderではGHの分泌不全を呈する症例が多く認められた。

2. GHの分泌不全を伴うpoor responderに対し、GH投与をすることにより、血中E<sub>2</sub>値は有意に増加し、卵胞発育までのHMGの総投与量および投与日数は減少した。
3. GH投与により1例の妊娠を認めた。
4. GHはgonadotropinに対する卵巣の反応性に関与している可能性、およびpoor responderに対し、GH投与が有効となる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Jia X Ch, Kalmijin J and Hsueh, AJW, Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cell. *Endocrinology* 118: 1401, 1986
- 2) Menashe Y, Frenkel Y, Lunenfeld B, Mashiah S and Pareiente C, Can growth hormone increase, after clonidine administration, predict the dose of human menopausal hormone needed for induction of ovulation? *Fertil Steril* 53: 432, 1990
- 3) Homburg R, Eshel A, Abdalla HI and Jacobs HS, Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotrophins. *Clin Endocrinol* 29: 113, 1988
- 4) Volpe A, Coukos G, Barreca A, Artini PG, Minuto F, Giordano G and Genazzani AR, Ovarian response to combined growth hormone-gonadotropin treatment in patients resistant to induction of superovulation. *Gynecol Endocrinol* 3: 125, 1989
- 5) 佐藤和雄, 藤本征一郎, 田中俊誠, 矢嶋 聡, 星合 昊, 廣井正彦, 川越慎之助, 五十嵐正雄, 山田清彦, 木下勝之, 小島俊行, 水野正彦, 武谷雄二, 高見澤裕吉, 稲葉憲之, 水口弘司, 植村次男, 飯塚理八, 牧野恒久, 武田佳彦, 岩下光利, 矢内原巧, 小松崎一則, 高木繁夫, 津端捷夫, 寺島芳輝, 落合和徳, 藤井明和, 井上正人, 友田 豊, 後藤節子, 森 崇英, 泰井俊造, 谷澤 修, 三宅 侃, 望月真人, 片山和明, 中野仁雄, 中村元一, ELISA法(磁気分離法)による血中エストラジオール測定キットの基礎的および臨床的検討. *薬剤の臨床* 3: 169, 1991
- 6) 月館孝一, 森 理, 小川正道, 三輪憲治, 矢澤武, Clonidineによる成長ホルモン分泌試験について. *小児科臨床* 36: 2095, 1983
- 7) 高野加寿恵, 助川 泉, 肥塚直美, 鎮目和夫, 健常男性および女性におけるSM-8144負荷試験の検討. *ホルモンと臨床* 35: 1, 1987
- 8) Miki N, Ono M and Shizume K, Evidence that opiate and  $\alpha$ -adrenergic mechanisms stimu-

late rats growth hormone release via growth hormone-releasing factor (GRF). *Endocrinology* 114: 1950, 1984

- 9) Davoren JB and Hsueh AJW, Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I in vivo. *Endocrinology* 118: 888, 1986
- 10) Poretsky L and Kalin MF, The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev* 8: 132, 1987
- 11) Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ, Somatomedin-C synergizes with follicle-stimulating hormone in the acquisition of progesterin biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116: 2135, 1985
- 12) Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ, Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116: 2369, 1985
- 13) Erickson GF, Garzo VG and Magoffin DA, Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 716, 1989
- 14) 高野加寿恵, 肥塚直美, 浅川久美子, 助川 泉, 堀川玲子, 鎮目和夫, ヒトにおける生合性ヒト成長ホルモン (YM-17798) 皮下及び筋肉内投与時の血中動態及び生物学的効果についての検討. *ホルモンと臨床* 35: 1265, 1987
- 15) Hugues JN, Martin-Pont B, Torresani T, Tamboise A, Herve F and Santarelli J, Interest of growth hormone-releasing hormone administration for improvement of ovarian responsiveness to gonadotropins in poor responder women. *Fertil Steril* 55: 945, 1991
- 16) Ovesen P, Christiansen JS, Moller J, Orskov H, Moller N and Jorgensen JOL, Growth hormone secretory capacity and serum insulin-like growth factor I levels in primary infertile, anovulatory women with regular menses. *Fertil Steril* 57: 97, 1992

### The role of growth hormone in ovarian responsiveness to gonadotropins

Akihisa Takasaki, Takeshi Kuramoto  
Keisuke Hiratuka and Hitoshi Morioka  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Saiseikai Shimonoseki General Hospital  
Yamaguchi 751, Japan

To investigate the role of growth hormone (GH) in the ovarian responsiveness to gonadotropins, the growth hormone responses to clonidine and/or growth hormone releasing factor (GRF) were studied in patients who had been treated with human menopausal gonadotropin (HMG).

Patients were divided into two groups according to the doses of HMG to induce ovulation, eight good responders (total dose of HMG required < 1500 IU) and ten poor responders (total dose of HMG required  $\geq$  1500 IU).

There was no difference in the basal serum GH levels between the two groups.

However, the peak levels of serum GH in poor responders were significantly lower than those in good responders in either GH stimulation test (clonidine test: 8.8 ng/ml versus 19.3 ng/ml, GRF test: 11.4 ng/ml versus 19.3 ng/ml,  $p < 0.01$ ).

Six poor responders with GH insufficiency were treated with recombinant human GH (4 IU on alternate days, total dose 16 IU) along with HMG, which improved in peak serum estradiol levels from 92.7 pg/ml/follicle to 230 pg/ml/follicle ( $p < 0.05$ ) and reduced the total doses of HMG from 5700 IU to 4350 IU ( $p < 0.05$ ) and one patient became pregnant.

In summary, poor responders were likely to have GH insufficiency and in these patients GH treatment improved ovarian response to gonadotropins.

(受付: 1992年10月8日特掲)

(受理: 1992年12月2日特掲)

## INSULIN RESISTANCE IN NONOBESE PATIENTS WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Takafumi UTSUNOMIYA  
Keitarou IWASATO

Ichirou TANIGUCHI  
Youichi MIZOGUCHI  
Tsutomu HIDAKI

Akemi SADANAGA  
Sinji TERAWAKI

Department of obstetrics and Gynecology,  
Oita Prefectural Hospital, Oita 870, Japan

**Abstract:** To determine whether insulin resistance occur in polycystic ovary syndrome (PCOS) in the absence of obesity, circulating levels of Testosterone, LH, FSH, insulin and glucose were measured in response to oral 75g glucose tolerance test (GTT) in 20 nonobese PCOS, 14 nonobese amenorrhea patients and 9 control infertile patients. Mean serum testosterone level was elevated in the PCOS than amenorrhea and control patients. In response to GTT, glucose and insulin levels were greater in PCOS than in amenorrhea and control patients.

During GTT, borderline pattern was observed in 1 of amenorrhea and 14 of PCOS. Testosterone level was correlated with the levels of glucose and insulin response to GTT and not correlated with the basal levels. These results indicated that in PCOS patients, insulin resistance exists which is not related to obesity and may be a consequence of hyperandrogenism.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 ( 2 ), 77 - 81, 1993)

### Introduction

It has been reported that patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) have increased serum insulin concentrations which correlate with hyperandrogenism<sup>1-4)</sup>. We have reported a 14 year-old girl with diabetes mellitus (DM) and PCOS<sup>4)</sup>, and have described 5 patients with PCOS and insulin resistant<sup>4)</sup>. In these studies, the clinical features of PCOS have also included obesity, which is a recognized cause of insulin resistance.

In order to determine if insulin resistance occurs in nonobese patients with PCOS, we evaluated the change in insulin secretion induced by oral glucose administration to patients with PCOS who were not obese.

### Material and Methods

Thirty-four nonobese patients with anovulatory

cycle or amenorrhea were admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology, Oita Prefectural Hospital, Oita City for this study. Anovulatory cycles were diagnosed by basal body temperature (BBT), serum concentrations of testosterone, luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), and clinical features. Twenty patients out of the 34 patients were diagnosed as having PCOS. Fourteen patients had amenorrhea due to causes other than PCOS. The diagnosis of PCOS was based on a history of anovulatory irregular menses, a high serum LH concentration (normal: 1.5-7.5 mIU/ml of 1st IRP-LH), a low or normal FSH concentration (normal: 3.0-10.5 mIU/ml of 2nd IRP-hPG), a ratio of LH to FSH of over 1, and a serum testosterone concentration close to or slightly higher than the upper limit of normal (60 ng/ml).

The control group consisted of patients with ovulatory regular menses who were admitted to our hospital for the evaluation of infertility. In this group, concen-

Table 1 The Criteria for Inclusion in the Patients Groups

- Polycystic ovary syndrome (n=20)
1. Anovulation and/or amenorrhea.
  2. High serum LH (normal: 1.5-7.5mIU/ml of 1st IRP-LH).
  3. Low or normal serum FSH (normal: 3.0-10.5mIU/ml of 2nd IRP-hPG)
  4. High serum Testosterone (normal: <60ng/ml)

## Amenorrhea group (n=14)

Amenorrhea grade I: n=10

Anovulatory cycle: n=4

(Patients did not meet the criteria for polycystic ovary syndrome)

## Control group (n=9)

Infertility, no abnormal hormonal changes.

\* LH denotes luteinizing hormone, FSH follicle-stimulating hormone.

trations of serum LH, FSH, prolactin and testosterone were all within the normal ranges.

Since obesity has an important effect on the results of the glucose tolerance test (GTT), all patients entered into this study were nonobese and had no clinical evidence of acanthosis nigricans. Table 1 shows the criteria of the entry of patients into each group.

Serum LH, FSH, testosterone and insulin levels were measured by radioimmunoassay used the assay kit of Daiichi RI.

Blood glucose was measured by the GOD-electrode method.

Statistical analysis was performed using the chi-square test.

A 75g glucose tolerance test (GTT) was done when patients were in the follicular phase of their menstrual cycle. It was performed after an overnight fast. The GTT was interpreted using the 1982 guidelines of the Japanese Diabetes Mellitus Society. DM was diagnosed when the basal blood glucose concentration was greater than 120mg/dl before the test, and greater than 180mg/dl 2 hours after glucose administration. Normal glucose tolerance was diagnosed when the basal concentration of glucose was less than 100mg/dl, the concentration after 1 hour was less than 140mg/dl and the

concentration after 2 hours was less than 110mg/dl. A borderline response to the GTT lies outside both the DM and normal categories.

## Results

Table 2 shows the characteristics of the 43 patients studied. There were no significant differences among three groups with regard to age, height, weight, or serum concentration of FSH. However, the mean serum LH and testosterone concentrations were significantly ( $p < 0.001$ ) higher in the PCOS group than in the other groups. No other difference was found among three groups.

Table 2 Clinical and Laboratory Data in Patients with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Patients with Amenorrhea without PCOS, and Control Patients

	Polycystic ovary Syndrome group	Amenorrhea group	Control group
No. of subjects	20	14	9
Age (years)	26.2 ± 3.9	27.2 ± 5.7	28.6 ± 3.2
Height (cm)	154.7 ± 3.1	154.8 ± 4.5	157.3 ± 4.5
Weight (kg)	48.8 ± 5.5	49.1 ± 6.3	52.6 ± 7.4
LH (mIU/ml)	13.5 ± 4.7	9.8 ± 3.1	5.8 ± 3.2
FSH (mIU/ml)	7.8 ± 1.5	8.8 ± 2.3	7.2 ± 1.8
LH/FSH	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.4
Testosterone** (ng/ml)	77.2 ± 16.6	36.7 ± 9.2	37.6 ± 15.6

\* Plus-minus values are mean ± SD. LH denotes luteinizing hormone, FSH follicle-stimulating hormone.

\*\* PCOS vs Amenorrhea,  $p < 0.001$   
PCOS vs Control,  $p < 0.001$

Table 3 Blood Glucose Response to a 75g Glucose Tolerance Test in Patients with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Patients with Amenorrhea without PCOS, and Control Group Patients

	Polycystic ovary Syndrome group n=20	Amenorrhea group n=14	Control group n=9
Diabetic	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Borderline	14 (70.0%)	1 (5.3%)	0 (0%)
Normal	6 (30.0%)	13 (94.7%)	9 (100%)

Table 4 Glucose and Insulin Responses to a 75g Glucose Tolerance Test in Patients with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Patients with Amenorrhea without PCOS, and Control Patients

		Blood glucose (mg/dl)				Insulin (mcU/ml)				IRI/BG
		before	30	60	120min.	before	30	60	120min.	
PCOS group	mean	88.5	155.4	147.9	112.3	10.3	75.9	99.5	83.1	1.08
	±S. D.	7.8	18.2	26.8	14.4	6.2	50.8	76.0	45.7	0.97
Amenorrhea group	mean	83.9	115.0	107.4	92.4	8.5	49.2	56.3	41.0	1.87
	±S. D.	6.8	16.4	27.0	13.9	4.0	16.3	34.1	24.7	1.92
Control group	mean	85.6	134.0	113.2	97.0	7.6	54.4	55.9	52.8	1.09
	±S. D.	7.6	18.8	18.0	14.4	2.8	22.2	25.7	30.9	0.60
PCOS vs Amenorrhea	p<	ns	0.001	0.001	0.001	ns	0.02	0.05	0.01	
PCOS vs Control	p<	ns	0.05	0.001	0.02	ns	ns	0.05	0.05	

Table 3 shows the results of the GTT in the 3 groups. No subject in the control group showed a diabetic pattern, and only one patient with amenorrhea without PCOS showed a borderline pattern. Thirteen of the 14 patients with amenorrhea but without PCOS (94.7%) showed a normal response. This result, which is similar to that observed in control normal young women, suggests that abnormal insulin resistance, is not common in this type of anovulatory condition.

In the group of patients with PCOS (Table 3), we also found that none of the patients showed a diabetic pattern of response to the GTT. However, 14 of the 20 patients (70.0%) had a borderline pattern, and only 6 displayed a normal pattern (30.0%).

Table 4 shows the results of the GTT in detail in the 3 groups. Mean basal blood glucose concentrations were within the normal range in each group, but the patterns of response were significantly different. Mean blood glucose concentration in the PCOS group at 60 and 120 minutes after glucose administration were above the upper limits for the normal response. The mean blood glucose concentrations measured at all time points in the two other groups remained within the normal response. The groups also showed significant differences in the response of blood insulin concentration to a

GTT. Basal concentrations were normal in the 3 groups. Mean peak insulin concentration, which was attained 120 minutes after glucose administration, was significantly greater in the group of patients with PCOS than in the group of patients with amenorrhea without PCOS ( $p<0.01$ ) or in the control group ( $p<0.05$ ).

Fig. 1 shows the response of blood glucose and insulin concentrations to the administration of 75g of glucose in individual patients with PCOS. The shaded area shows the

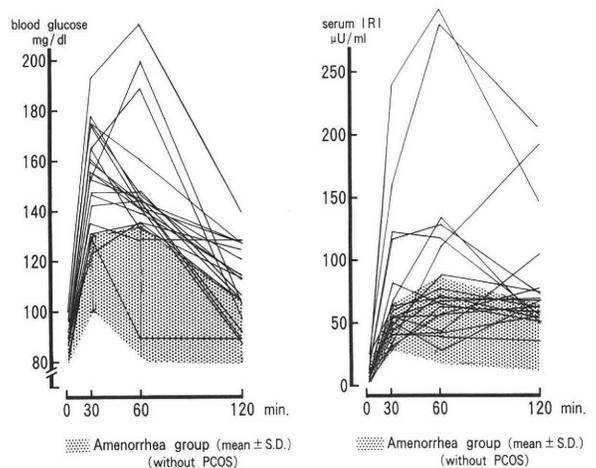


Fig. 1 Circulating levels of glucose and immuno-reactive insulin (IRI) in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) in response to a 75g glucose tolerance test (GTT). The shaded area shows the mean ± standard deviation of the concentrations of glucose and insulin in a group of patients with amenorrhea but without PCOS, who were also given a 75g GTT.

mean  $\pm$  standard deviation of the group of patients with amenorrhea without PCOS. The basal concentrations of both glucose and insulin were within this range. However, the pattern of many of the individual responses shows a rise in concentration above this range. Further, the time course of the rise in concentration appears delayed.

Fig. 2 shows the correlation between the serum testosterone concentration and the concentration at 60 minutes after glu-

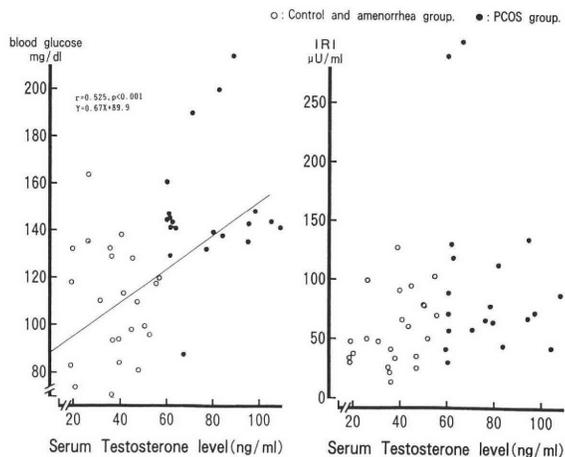


Fig. 2 Correlation between serum testosterone levels and response of circulating glucose and immuno-reactive insulin (IRI) concentrations 60 minutes after initiation of a 75g glucose tolerance test given to patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), patients with amenorrhea without PCOS and control patients.

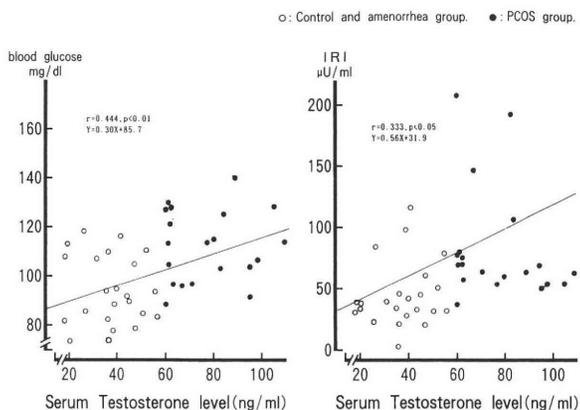


Fig. 3 Correlation between serum testosterone levels and the response of circulating glucose and immuno-reactive insulin (IRI) concentrations 120 minutes after initiation of a 75g glucose tolerance test given to patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), patients with amenorrhea without PCOS and control patients.

cose administration. Significant correlation was recognized between the serum testosterone concentration and blood glucose concentration ( $p<0.001$ ,  $r=0.525$ ).

Fig. 3 shows the correlation between the serum testosterone concentration and the concentration of glucose and insulin at 120 minutes after glucose administration. Significant correlation was noticed between the testosterone and blood glucose concentrations ( $p<0.01$ ,  $r=0.444$ ), and between the testosterone and insulin concentrations ( $p<0.05$ ,  $r=0.333$ ).

### Discussion

Some reports have suggested correlations between PCOS and hyperinsulinemia or acanthosis nigricans<sup>7,8</sup>. However, there is a clear relationship between obesity and hyperinsulinemia<sup>5</sup>. This may obscure a relationship between PCOS and hyperinsulinemia, as many patients with PCOS are obese. In fact, in obese patients with PCOS, a relationship between high insulin levels and hyperandrogenism has been suggested.

Only one previous report<sup>6</sup>) has suggested that there is a positive correlation between serum concentrations of testosterone and androstenedione, and insulin concentration in nonobese patients with PCOS. To isolate the effect of PCOS on insulin resistance, all patients in the present study were nonobese (within 20% of ideal body weight) and had no clinical evidence of acanthosis nigricans. In response to a GTT, insulin concentration was significantly greater in patients with PCOS than in patients with amenorrhea without PCOS and control patients, indicating the presence of insulin resistance in the absence of obesity. Moreover, the result summarized in Fig. 1 demonstrate that glucose metabolism in patients with PCOS may be different from that in patients with other causes of amenorrhea.

In vitro studies have suggested an association between insulin and ovarian function<sup>9,10</sup>. Chang et al.<sup>8</sup>) have reported that in basal secretion of progesterone by porcine granulosa cells

in culture was maintained or increased under the influence of insulin, and that gonadotropin stimulated progesterone secretion was significantly enhanced by insulin. Poretsky et al.<sup>11)</sup> have directly measured insulin receptors in the ovarian stroma of three patients who underwent surgery for PCOS. <sup>125</sup>I-insulin binding found to be easily detectable in fragments of ovarian stroma. Furthermore, specific binding was totally inhibited by pretreatment with serum containing specific antibodies to the insulin receptor.

These reports suggest that insulin has effects upon ovarian function. Our data demonstrate a correlation between the concentration of testosterone and the response of glucose and insulin to glucose administration. This was demonstrated even though there was no significant difference between the basal concentrations of glucose and insulin of the three groups. This suggests that it is the presence of insulin resistance in PCOS, rather than the concentrations of glucose and insulin themselves, that is affecting the testosterone concentration.

The mechanisms of insulin resistance in PCOS are of considerable interest and remain largely unexplored. Nagamani et al.<sup>12)</sup> have reported that insulin resistance persisted after removal of the ovaries in 6 women with virilization, even though the androgen levels returned to normal. Dunaif et al.<sup>13)</sup> reported that in PCOS patients, suppression of hyperandrogenism with a gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) analog did not improve insulin resistance. We have also reported 2 patients with PCOS in whom the 75g GTT was performed after laparoscopic ovarian multifollicular puncture and resection (MPR)<sup>14)</sup>. Although the patients' serum testosterone concentrations decreased after MPR, they delayed a borderline response to glucose administration. Thus, the high blood level of testosterone might be secondary to insulin resistance.

We conclude that insulin resistance exists in nonobese patients with PCOS. The increased testosterone level observed in these patients may be the result of this resistance to insulin. The strong association between states of insulin resistance and ovarian hyperandrogenism suggests that insulin directly influences the function of the ovary.

## References

- 1) Kinoshita, T and Kato J, Impaired glucose tolerance in patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res* 33 (suppl2) : 18, 1990
- 2) Otani T, Maruo T, Yukimura N and Mochizuki M, Effect of insulin on porcine granulosa cells: Implications of a possible receptor mediated action. *Acta Endocrinol* 108: 104, 1985
- 3) Shoupe D, Kumar DD and Lobo AL, Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 147: 588, 1983
- 4) Utsunomiya T, Iwasato K, Mizoguchi Y, Sadanaga A, Terawaki S and Taniguchi I, Polycystic ovary syndrome and diabetes mellitus. *Med J Oita Pref Hosp* 19: 70, 1990
- 5) Burghen GA, Givens JR and Kitabchi AE, Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 113, 1980
- 6) Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL and Kaplan SA, Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 356, 1983
- 7) Givens JR, Kerber II, Wisner WL, Anderson RN, Coleman SA and Fish SA, Remission of acanthosis nigricans associated with polycystic ovarian disease and stromal luteoma. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 347, 1974
- 8) Kahn CR, Flier JS, Bas RS, Archer JA, Gordon P, Martin MM and Roth J, The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. *N Engl J Med* 294: 739, 1976
- 9) Barbieri RI, Makris A and Ryan KJ, Effect of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. *Fertil Steril* 40: 237, 1983
- 10) May JV and Schomberg DW, Granulosa cell differentiation in vitro: Effect of insulin on growth and functional integrity. *Biol Reprod* 25: 421, 1981
- 11) Poretsky L, Smith D, Seibel M, Puzianus A, Moses AC and Flier JS, Specific insulin binding sites in human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 809, 1984
- 12) Naganami M, Dinh TV and Kelder ME, Hyperinsulinemia in hyperthecosis of the ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 154: 384, 1986
- 13) Dunaif A, Green G, Futterweit W and Dobrjansky A, Suppression of hyperandrogenism does not improve peripheral or hepatic insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 699, 1990
- 14) Utsunomiya T, Sumioki H and Taniguchi I, Hormonal and clinical effects of multifollicular punc-

ture and resection on the ovaries of polycystic ovary syndrome. Horm Res 33 (suppl 2) : 35, 1990

### 多嚢胞性卵巣症候群の非肥満例における インスリン抵抗性について

大分県立病院産婦人科

宇津宮隆史 谷口一郎 貞永明美  
岩里桂太郎 溝口洋一 寺脇信二  
肥田木 孜

多嚢胞性卵巣 (PCOS) と糖代謝異常, インスリン分泌異常の関係を肥満例を除いて検討した。対象は内分泌学的PCOS20例, PCOSでない無排卵症14例および内分泌学的に異常のない不妊症9例 (C例) で, PCOS群は

1) 無排卵症 2) LH高値, FSH正常値 3) LH/FSH比 1以上 4) テストステロン (T) 値60ng/ml以上とし, 無排卵症群は 1) 無排卵症 2) T値は正常域とした。その結果平均年齢, FSH値はPCOS群とC群に差はなかったが, LH値, T値は他の2群に比べPCOS群が高かった。75g GTTの結果, 無排卵症群は糖尿病型はなく境界型1例, 正常13例に対し, PCOS群では糖尿病型はなく, 境界型14例, 正常6例と異常例が多かった。またインスリン値は, 前値は3群に差はなく, 反応値では無排卵症群に比べ, PCO群では明らかに反応が遅延し, 過剰に反応した, このように肥満のないPCOS例でもインスリン抵抗性が考えられ, 高アンドロゲン血症と関係があることが推察された。

(受付: 1992年11月4日特掲)

(受付: 1992年12月2日特掲)

## GIFTおよびZIFT成績と培養法の工夫

### Results of GIFT and ZIFT and the Improvement of Culture Condition

醍醐渡辺病院

渡辺 栄三  
Eizo WATANABE

江見 信之  
Nobuyuki EMI

石河 二郎  
Jiro ISHIKO

Daigo-Watanabe Hospital, Kyoto 601-13, Japan

京都大学医学部婦人科学産科学教室

野田 洋一  
Yoichi NODA

森 崇英  
Takahide MORI

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

難治性不妊患者に対し、1986年11月から配偶子卵管内移植 (GIFT) を、1990年10月から接合子卵管内移植 (ZIFT) を開始し、これまでに各々102症例124周期、30症例30周期に治療を行った。GIFTでは28例、ZIFTでは11例が妊娠し、対患者妊娠率は各々27.5%、36.7%であった。GIFT成績に及ぼす因子としては、卵巣刺激法、患者年齢、移植卵子数が重要であった。ZIFTは、免疫性不妊、原因不明不妊例で高い妊娠率が得られ、GIFTや卵管疎通性のある体外受精胚移植 (IVF・ET) 不成功例にも有効であった。また我々が動物実験などより明らかにした酸化的ストレスによる胚傷害の観点から、低酸素 (5%) および低照度下での操作や、培養液を遷移金属や光増感物質を含むHam's F-10から、これらを含まない  $\alpha$ -MEMへ変更することによって培養成績および臨床成績の向上がもたらされた。卵管疎通性の保たれた難治性不妊例に対して、GIFT、ZIFTはともに有効な治療法と考えられ、培養条件のさらなる改善により、今後もIVF・ETを凌ぐ成績が得られるものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 82 - 90, 1993)

#### 緒 言

1978年にヒト体外受精胚移植法 (IVF・ET) による出産例が初めて報告されて以来、配偶子操作を伴う治療は、不妊治療の中で次第に大きな位置を占めるに至り、それまでの一般不妊治療に抵抗する難治性不妊患者にも多大な恩恵を与えてきた。また、IVF・ETから派生した配偶子卵管内移植 (GIFT)<sup>2)</sup>、接合子卵管内移植 (ZIFT)<sup>3)</sup>なども同様に広く普及してきたが、何れの方法でもその挙児率は依然低率に留まっている<sup>4)</sup>。

この種の治療成績向上のためには、①適応基準の設定、②排卵誘発法、③胚培養法、④胚移植法、⑤

雄性配偶子の取り扱い方法、などが検討課題として考えられ、我々もこれまでにこれらに関連した数々の試みや改善を行ってきた。一方、野田らは最近、胚培養環境の改良の観点からいくつかの画期的な知見を見いだした。即ち、胚を取り巻く環境、特にin vivoとin vitroの胚培養環境の酸素濃度の異なる点に注目し、酸化的ストレスからの胚の保護の重要性を明らかにし<sup>5,6,7)</sup>、さらに、遷移金属、光増感物質、光照射の胚培養に及ぼす悪影響を解明し、培養液の改良、低照度下操作の必要性も指摘した<sup>8)</sup>。

今回我々は、当院で行ったGIFT、ZIFTの成績を解析することにより、成績に及ぼす因子や導き出された問題点の検討を行い、また、低酸素下培養、低照

度下操作, 培養液の変更などの新しい培養条件の有用性についても考察してみた。

## 方 法

### 1) 対象患者

挙児希望にて当院の不妊外来を受診し, 系統的かつ的確な検査および一般治療を一定期間行ったにもかかわらず妊娠に至らない難治症例に対して, 日本産婦人科学会の会告に基づき, 1986年11月より1992年6月までに, GIFTを施行した102症例124周期, ZIFTを施行した30症例30周期を対象とした。GIFTの適応は, 原因不明不妊, 男性因子, 子宮内膜症, 軽度卵管性不妊であり, ZIFTの適応は, 原因不明不妊, 男性因子, 子宮内膜症, 免疫性不妊であった。平均年齢はGIFTが $34.0 \pm 4.0$ 歳 (25~42歳), ZIFTが $36.8 \pm 2.9$ 歳 (31~42歳), 平均不妊期間はGIFTが $8.4 \pm 3.9$ 年 (2~20年), ZIFTが $11.3 \pm 3.7$ 年 (4~20年)であった。ZIFTの30症例中27例は既往にGIFTあるいはIVF・ETによる治療歴があった。

### 2) 卵胞期, 黄体期管理ならびに採卵, 媒精法

GIFTの排卵誘発は, clomid-hMG-hCG法<sup>9)</sup>, hMG-hCG法, buserelin-hMG-hCG法 (short protocol) の何れかによって行った (図1)。

ZIFTはすべてbuserelin hMG-hCG法 (short protocol) を用いた。各プロトコルとも月経周期 8日目より, 経腔的超音波断層法にて卵胞径の計測と血中ステロイドの測定を行い, 卵胞発育をモニターした。主席卵胞の直径が18mmを越えた時点でhMGを中止し, 最終hMG投与40~48時間後にhCG (5,000ないし

10,000単位) を投与し, さらにその36時間後に採卵を行った。採卵はGIFT例は腹腔鏡下に, ZIFT例は経腔超音波下に何れも吸引ポンプ (100mmHg) を用いて行った。精子は原則的に, 洗浄・swim-up法にて得られた運動良好精子 ( $10 \sim 20 \times 10^4/\text{ml}$ ) を媒精に用いた。媒精16~18時間後に受精の判定を行ない, 媒精40~72時間後に形態が良好な4~16細胞期に達した胚を選んでZIFTを行った。移植卵子, 胚数はGIFTは5個, ZIFTは4個を最多とした。採卵後2週間は, プロゲホルモン (50mg) を連日投与し, 子宮内に胎囊の確認できたものを妊娠例とした。

### 3) 培養条件

従来, 5%CO<sub>2</sub> in airに設定した培養器内での培養以外の操作は全てクリーンベンチ内, 即ち大気中で行っていたが, 1989年9月より, 卵子および胚がin vitroにある全過程で5%酸素濃度下に行えるよう改良した。採卵時の高酸素 (20%) 暴露を避けるため, Falcon2001チューブ内を予め混合ガスで飽和し, これに卵胞液, 卵胞洗浄液を回収した。卵子の有無の判定や, 媒精, 受精判定, 胚移植の準備などの全操作は, 改装したアトム社製新生児保育器<sup>10)</sup>内で行った。改装保育器内に, 100%窒素ガスを急速注入, 同時に100%二酸化炭素ガスも微量注入し, 酸素濃度計 (OX-30, アトム社) および炭酸ガス濃度計 (cosmotecter XP-314B, 新コスモス電気) でモニターし, 保育器内の気相が5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>に安定した後に各々の操作を行った。精液の取り扱いについては, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> in airの条件下にswim-upを行う以外は, 媒精の直前までは大気中で操作し

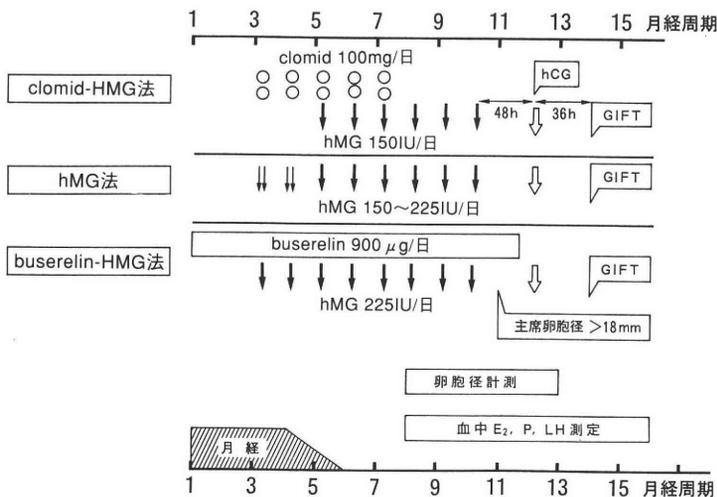


図1 GIFT法の卵巣刺激法別プロトコル

た。

GIFTの際用いる培養液は、従来よりHam's F-10を用いてきたが、低酸素下培養の応用と同時に $\alpha$ -MEMへと変更した。Ham's F-10には遷移金属Cu(CuSO<sub>4</sub>)、Zn(ZnSO<sub>4</sub>)、Fe(FeSO<sub>4</sub>)や光増感物質であるhypoxanthineが含まれており、 $\alpha$ -MEMにはこれらが含まれていないことが両培養液の違いであるが、遷移金属およびhypoxanthineは、胚に対してより酸素毒性の高いHOラジカルの産生に関与する<sup>8)</sup>。採卵室、培養室の室内照明、実体顕微鏡の光源を100Lux前後の低照度にした。ZIFTはすべて、 $\alpha$ -MEM、低酸素低照度培養条件下に行った。また、GIFT、ZIFTの際に生じた余剰胚を継続培養し、従来の20%酸素下、Ham's F-10を用いた培養条件下(高酸素・Ham's F-10群)での胚盤胞率と、低酸素、低照度下、 $\alpha$ -MEMに変更した培養条件下(低酸素・ $\alpha$ -MEM群)での胚盤胞率を比較した。統計学的処理は、 $\chi^2$ testを用いた。なお培養法の違い以外は、背景もほぼ一致し、同じ卵巣刺激法、採卵方法を用いた患者群を対象とした。

結 果

1) 卵巣刺激法別、培養法別GIFT成績比較

clomid-hMG群(40例)、hMG単独群(30例)、buserelin-hMG群(29例)における採卵成績は、発育卵胞数2個以下のpoor responder例が各々10.0%、13.3%、3.4%で、buserelin-hMG群で減少した。また、premature LH surgeの出現頻度(基礎値の2倍以上のLH上昇)は各々20.0%、16.7%、0%で、buserelin-hMG群で有意に抑制された。その結果、採卵を中止したキャンセル周期の頻度は各々、30.0%、30.0%、3.4%で、buserelin-hMG群で有意に低率となった。平均採取卵子数(何れの群も腹腔鏡下採卵)は各々、3.1個、3.1個、5.9個で、buserelin-hMG群で増加した<sup>12)</sup>。

移植を行った102症例124周期中28例が妊娠に至ったが(対周期妊娠率22.6%、对患者妊娠率27.5%)、これを卵巣刺激法別に比較してみると、clomid-hMG群(33周期)、hMG単独群(22周期)、buserelin-hMG群(69周期)における妊娠率は各々、9.1%、9.1%、33.3%で、流産率は各々、0%、0%、39.1%であった。さらにbuserelin-hMG群を、従来の高酸素・Ham's F-10群と低酸素・ $\alpha$ -MEM群に分けて比較してみると、高酸素・Ham's F-10群(28周期)、低酸素・ $\alpha$ -MEM群(41周期)における妊娠率は各々、28.6%、36.6%、流産率は各々、62.5%、26.7%であった(表1)。なお各

表1 卵巣刺激法別GIFT成績

卵巣刺激法	治療周期	妊娠 (%)	流産 (%)
Clomid+hMG	33	3 (9.1)	0
hMG	22	2 (9.1)	0
GnRHa+hMG	69	23 (33.3)	9 (39.1)
GnRHa+hMG	69		
高酸素・Ham's F-10群	28	8(28.6)	5 (62.5)
低酸素・ $\alpha$ -MEM群	41	15(36.6)	4 (26.7)

表2 患者背景因子別GIFT成績

		周期	妊娠 (%)
不妊原因	原因不明	63	20 (31.7)
	男性因子	33	3 (9.1)
	子宮内膜症	17	3 (17.6)
	卵管性	11	2 (18.7)
妻側年齢	<30	17	0 (0)
	30~34	53	16 (30.2)
	35~39	41	7 (17.1)
	>40	13	4 (30.8)
移植卵子数	1	7	1 (14.3)
	2	23	2 (8.7)
	3	21	4 (19.0)
	4	50	15 (30.0)
	5	19	6 (31.6)

群間で年齢、不妊期間、不妊原因などに差はみられなかった。

2) 患者背景因子別GIFT成績(表2)

不妊原因別に妊娠率を比較してみると、原因不明不妊が31.7%と最も良好で、男性不妊9.1%、子宮内膜症17.6%、卵管性不妊18.7%であった。妻側年齢を5歳毎に区切った年齢別妊娠率を比較してみると、30歳未満は0%、30~34歳30.2%、35~39歳17.1%、40歳以上30.8%であった。移植卵子数別の妊娠率は、1個14.3%、2個8.7%、3個19.0%、4個30.0%、5個31.6%であった。多胎妊娠は、品胎1例、双胎1例の計2例であり、子宮外妊娠例はなかった。

3) ZIFT成績

ZIFTを行った30例中27例にはIVT・ETまたはGIFTの何れか、あるいは両者の治療を受けた既往があり、最高は6回、平均は2.9回であった。図2は、例えば症例1はGIFTを5回受け、6回目にIVT・ET

を受けたが不成功で、7回目の治療としてZIFTを行った、症例30では初回IVT・ET、2回目GIFTを受けたが不成功で3回目の治療としてZIFTを行ったところ妊娠に至ったことを示している。このように今回の症例は、主に他施設にて頻回の治療を受けている高齢(平均年齢36.8歳)の難治症例が多かったが、30症例中11例が妊娠に至った(妊娠率36.7%)。既往治療別妊娠率は、IVF・ETのみが20.0%、GIFTのみが50.0%、IVF・ETおよびGIFTが36.4%、初回治療例(配偶子操作を伴う不妊治療としてZIFTが初回)が66.7%であった(表3)。

表3 既往治療別ZIFT成績

既往治療	周期	妊娠 (%)
IVF・ET	10	2 (20.0)
GIFT	6	3 (50.0)
IVF・ET+GIFT	11	4 (36.4)
none	3	2 (66.7)

表4 不妊原因別ZIFT成績

不妊原因	周期	妊娠 (%)
原因不明	12	5 (41.6)
免疫性	9	4 (44.4)
男性	3	1 (33.3)
子宮内膜症	6	1 (16.7)

不妊原因別の妊娠率は原因不明不妊41.6%、免疫性不妊44.4%、男性不妊33.3%、子宮内膜症16.7%であった(表4)。なお、症例1~26(図2)はDAY2(4~6細胞期)に移植を行い、最近の4例(症例27~30)はDAY3(8~16細胞期)に移植を行った。DAY3に移植を行った4例は全て妊娠に至った。4) GIFT不成功後、他治療により妊娠に至った症例(表5)

GIFT不成功に終わった74例のうち、現在までに把握できているだけで13例(17.6%)がその後GIFT以外の方法で妊娠に至った。3例は当院でのpercoll AIHによって、1例は他院でのIVF・ETによって妊娠したが、残りの9例は特別な治療なく、あるいは治療休止周期に妊娠に至った。GIFT不成功後、妊娠までの期間は最短でGIFT翌周期、最長で32カ月後であっ

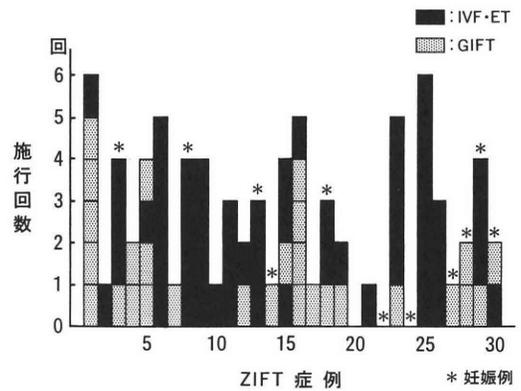


図2 ZIFT症例の既往治療歴

表5 GIFT不成功後、他治療により妊娠に至った症例

症例	年齢	GIFTまでの不妊期間(月)	不妊原因	妊娠に至った治療法	GIFT不成功後妊娠までの期間(月)
1.	25	39	男性+内膜症	自然	12
2.	29	36	男性	自然	32
3.	31	121	原因不明	自然	23
4.	33	112	原因不明	自然	18
5.	31	66	内膜症	自然	11
6.	33	83	原因不明	自然	5
7.	32	76	内膜症	自然	1
8.	31	36	原因不明	自然	3
9.	36	184	原因不明	自然	12
10.	27	23	卵管	パーコールAIH	32
11.	43	199	原因不明	パーコールAIH	8
12.	36	152	男性	パーコールAIH	25
13.	42	208	原因不明	他医でIVF・ET	12

表6 培養法別の胚盤胞率

培養法	4細胞	8細胞	桑実胚	胚盤胞 (%)
高酸素・Ham's F-10群	25	16	10	2*
		(64.5)	(40.0)	(8.0)
低酸素・ $\alpha$ -MEM群	62	53	43	30*
		(85.5)	(69.4)	(48.4)

\* p&lt;0.01

た。

5) 余剰胚継続培養による胚盤胞率の培養法別比較(表6)

高酸素・Ham's F-10群では、形態良好な4細胞期余剰胚は25個であったが、そのうち胚盤胞にまで発生したのは2個(8.0%)であった。これに対し、低酸素・ $\alpha$ -MEM群では、62個の余剰胚のうち胚盤胞にまで発生したのは30個(48.4%)と、高酸素・Ham's F-10群に比し有意に高率であった。

### 考 察

当院で、GIFTを行った102症例124周期のうち28例が妊娠に至り、対症例当り27.5%、対周期当り22.6%の妊娠率を得た。この成績を解析することにより、成績に及ぼすいくつかの因子や問題点が明らかになった。また、これまでに我々は酸化的ストレスが胚に与える傷害とそれからの保護の重要性を諸種の動物実験で明らかにしてきたが、培養条件を従来の20%酸素下やHam's F-10から、低酸素(5%)、低照度、 $\alpha$ -MEMに変更してみたところ、GIFT成績、胚培養成績ともに向上し、臨床的にも配偶子の酸化的ストレスからの保護の必要性が明らかとなった。

まず、成績に及ぼす因子として妻側年齢が考えられた。これまでの多くの報告を示すまでもなく、加齢に従って卵巣刺激に対する低反応例やキャンセル例の増加が著明で、今回の結果でも同様の傾向であった。妊娠率に関しては、30歳未満(17例)の妊娠例がなく、逆に40歳以上(13例)では4例が妊娠しているが、これは若年者に高度の男性不妊例が多かったこと、逆に高齢者は過去の不妊治療歴の比較的少ない症例が多かったことに起因すると思われる。しかし、40歳以上の妊娠4例中3例は流産に終わり、子宮内環境の不良のみならず、染色体をはじめとする胚の異常の増加も推察された。

不妊原因別成績では原因不明不妊が最も良好で、

子宮内膜症、卵管性不妊がこれにつき、男性不妊は不良であった。原因不明不妊症例の多くは、腹腔鏡所見として、軽度から中等度の卵管采の萎縮硬化所見がみられ、GIFTにより妊娠に至った症例が多かったことは、黄体化非破裂卵胞症候群や卵子停留も含めた広い意味での卵子pick-up障害の存在を示唆するものと考えられた。

卵巣刺激法の選択はGIFTにおいても重要なポイントである。本邦ではpremature LH surge予防の目的で、buserelin-hMG法が広く用いられているが、多施設、多数症例の検討でみると、際だって良好な刺激法といえるものはないのが現状である<sup>4)</sup>。しかし、これまでに報告されている様に<sup>13)</sup>、我々の成績でもbuserelin-hMG法は、clomid-hMG法やhMG単独法に比較して、キャンセル率の低下や採取卵子数の増加が認められた。卵胞期管理の容易さなども含め、しばらくはbuserelin-hMG法が卵巣刺激法の中心となるであろう。

移植卵子数もGIFT成績に大きな影響を及ぼすと考えられた。移植卵子2個以下での妊娠率10.0%に対し、3個以上では27.7%と有意に高率であった。

GIFTの適応条件は卵管膨大部での受精以降の生殖過程が正常に行いうることであるから、GIFT法の適応を考える上で、予め次の2つの点を明らかにしておく必要がある。すなわち、一つは卵管機能、形態についての評価であり、あと一つは精子受精能についての評価である。

卵管については、GIFT施行前にその形態および機能の評価が正確にできれば理想であるが、実際にはHSGなどによってのみ判断しているのが現状である。予め診断的に腹腔鏡検査を行ない、同時に大量通水療法などを行い卵管評価としている施設もあるが<sup>14)</sup>、何回も腹腔鏡を行うことには種々の制約がある。受精および初期発育環境として、in vitroより卵管内のほうが良好であることは間違いなからうが、原因不明不妊の一部や卵管性不妊例には、正常卵管機能が著しく障害を受けた症例があることは否定できない。しかし、卵管の生理さえ十分解明されていない現状で、正確で侵襲の少ない検査法の確立は困難であると考えられる。また、たとえ移植は可能であっても卵管周囲癒着が広範囲であったり、卵管炎、骨盤腹膜炎の既往が想定される症例では、卵管内移植の適応外としてIVF・ETに変更する必要もあるであろう。我々はこれまでに2例、これらの理由によりGIFTを行わず、IVF・ETに切り替えた。GIFTでは幸いにも子宮外妊娠例を経験していない

が、これは普段から診断的腹腔鏡により多数例の卵管を観察していることが、少しでも寄与したのかもしれない。術前の予想に反して、卵管内移植困難例に遭遇する可能性もあることから、GIFTを行うにしてもIVF・ETの設備、技術が求められることは言うまでもない。

GIFTにおいても男性不妊例の妊娠率は低い。GIFT開始当初は、機能性不妊のみならず男性不妊に対してもその成果が期待されたが、IVF・ETと比較しても決して有効と言える成績は得られていない<sup>12)</sup>。我々の成績でも、33例中妊娠例は3例で妊娠率は9.1%にすぎなかった。このような男性不妊治療に関して、現在、精子受精能の判定に関する検査法の確立と、より良い運動良好精子選別法の開発という2つの課題が立ちだかっている。精液性状と臨床成績が必ずしも一致しないことは、日常診療でもよく経験される事である。今回のGIFT症例においても、精子濃度180万/ml、運動率70%で妊娠、分娩した例もあるが、2000~3000万/ml、40%前後で不成功に終わった症例も数多い。GIFTにおいては、それが不成功に終わった場合、受精、初期発育、着床のどの段階で問題があったのかの確認ができない欠点がある。精子受精能に著しい障害を持つ症例では、IVF・ET、GIFTとも適応とはならないが、特にGIFTの場合、腹腔鏡操作による患者への侵襲、リスクを考えると、予め精子受精能の有無について評価すべき必要性は高いと考えられる。しかし精子受精能検査の実状は、幾つかの検査法を組み合わせて総合的に判断せねばならず、煩雑な手順、高価な設備を要する検査法も多い。今後の顕微授精の広がりなどを考えると、より簡便で信頼性の高い検査法の開発が望まれるところである。

媒精に供する運動良好精子の選別方法に関しては、洗浄-swim-up法、percoll法などを中心に行われているが、男性不妊例、特に運動性不良例では、媒精に必要な最低限の精子数さえ回収しづらい時がある。回収率を上げようとすればするほど、細菌をはじめとする汚染頻度が増し、特に卵管内に移植を行うGIFTでは卵管炎などの危険性が高まることになる。swim-down法や卵胞液の併用なども考案されているが、さらなる精子調整法の改善が急務と考えられる。我々は以上のような観点から、男性不妊例、特に重度の精子無力症々例には、まずIVFを行い、受精しなければ次に顕微授精を試み、何れかの方法により一定数以上の受精卵が得られれば、ZIFT法を選択することが現状では最も合理的ではないかと考

えている。

GIFT, ZIFTにおいても、培養条件の設定はIVF・ETと同じく重要である。我々はここ数年来、哺乳類の胚培養において観察される胚発生停止あるいは胚発育遅延の現象が酸化的ストレスに起因し、この酸化的ストレスから胚を保護した場合は胚発生効率が回復することを明らかにしてきた<sup>5,6,7)</sup>。マウス、ラット、およびハムスターの前核期胚を5%および20%の酸素下で培養すると、何れの種においても5%酸素下での胚発生効率が有意に高いこと、また、ハムスター胚を用いて採卵操作時の照度を1,600 Luxと70Luxで比較してみると、70Luxでは低率ながらも胚盤胞が得られたのに対し1,600Luxでは得られなかったこと、さらにCuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>の金属および光増感物質であるhypoxanthineについて、これらを含むHam's F-10と含まない $\alpha$ -MEMで比較してみると、これらの物質が胚発生を有意に阻害すること<sup>11)</sup>などから、胚細胞内の活性酸素分子種の濃度増加に関与する因子が、高酸素濃度、光の照射およびより反応性の高いHOラジカル産生をもたらすFe、Zn、Cuなどの遷移金属の存在であることを解明した。ところでGIFTでは、採取された卵子はすぐに卵管内に移植されるため、IVF-ETに比して遭遇する影響は軽微であると思われる。しかし、小さなディッシュ中の培養液中酸素濃度は、予め5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>で平衡させていても、大気中で短時間の操作を行っただけで瞬時に急上昇してしまうこと、また一過性に高酸素に被曝すると、以後の培養を低酸素濃度下で行っても胚の発育は有意に低下することが明かとなった<sup>15)</sup>。そこで、培養器内の気相を5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>に設定する以外は全て大気中で行っていた従来のGIFT操作を、採卵から移植にいたる全過程で低酸素、低照度で扱ひ、培養液もHam's F-10から $\alpha$ -MEMに変更した培養条件でGIFTを行って見たところ、表1のように妊娠率は上昇、流産率は減少した。さらに、余剰胚を継続培養してその胚盤胞率を高酸素・Ham's F-10群と比較してみると、低酸素・ $\alpha$ -MEM群のほうが有意に高かった。ヒトIVF・ETでも同様に、培養成績、臨床成績が向上しており<sup>11)</sup>、これらの結果から、配偶子操作治療を行う際には、卵子の酸化的ストレスからの保護が必要であり、低酸素、低照度下操作、 $\alpha$ -MEMといった培養条件が有用であることが示唆された。

腹腔鏡下に行われるGIFTは患者に相応の侵襲とリスクを強いるものであるが利点も多い。まず、治療

と同時に診断的腹腔鏡も兼ねており、それまで原因不明不妊として取り扱っていた症例の中に、子宮内膜症の初期病変や卵管周囲癒着などが新たに発見されることがある。軽症例では、GIFTの際に癒着剥離術や電気凝固などの処置も可能である。また、不妊検査の一つとして診断的腹腔鏡を行っている、所見の観察以外は生理食塩水による骨盤内洗浄ぐらいしか行わなかった長期不妊症例が、その後自然妊娠に至るのをしばしば経験するが、GIFTにおいても同様の現象が明らかとなった。表5に示すように、GIFT不成功後自然妊娠に至った9症例は、3年から15年余にわたる長期不妊症例で一般不妊治療には抵抗性であったが、GIFT後平均13カ月、最短はGIFT翌周期、最長は32カ月後に自然妊娠に至っている。これは、移植直前に行っている生理食塩水による骨盤腔内洗浄および腹腔鏡下の採卵や移植操作が、明確な機序は不明であるものの、妊孕性の改善に少なからず貢献したものと考えられた。

ZIFTはIVF・ETと比較すれば卵管に移植する点ではるかに生理的であり、GIFTと比較すれば受精を確認でき、受精卵を移植できるという利点を持っている。IVF・ETあるいはGIFTなどの頻回の治療失敗歴のある難治性症例に対しても高い妊娠率(33.3%)が得られたこと、とりわけ免疫性不妊例に高い妊娠率(44.4%)が得られたことはその証明と考えられる。ZIFTは従来、採卵2日後(DAY 2)に行っていたが、最近の4例(症例27~30)はDAY 3(8~16細胞期)に移植を行って見たところ全例が妊娠に至った。当院のIVF・ETにおいても、DAY 2の移植成績よりDAY 3の方が更に良好となっており、これは前記の培養条件の改良が大いに寄与したものと考えられるが、ZIFTにおいても同様の傾向が認められた。これらの成績は、体外培養による胚発生能へ及ぼすマイナス面が、培養条件の改良によって著明に減少し、長期培養により、embryo lossに終わる胚の除外がより確実となり、その結果、正常発生能を維持した胚を一定数移植できる確率を増加させたことを示している。しかし、受精卵の数が少なければ移植胚選別の利点は無いので、移植日は早くしたほうがよいであろうし、また移植胚1個あたりの妊娠率が高くなることによってもたらされる多胎妊娠増加の予防のためには、移植胚数の制限も考慮せねばならないであろう。現在の我々のZIFT成績ではGIFTより10%前後高い妊娠率が得られているが、卵管疎通性が保たれておりさえすれば、不妊原因の如何にかかわらずGIFTよりZIFTを第一選択としていいのではないかと

考えている。

以上、当院における最近のGIFTおよびZIFT成績を解析した。外来治療としても可能となったIVF・ETに比較して、これらの療法は腹腔鏡操作をとまない、患者、医療側何れもその負担は大きいものの、IVF・ETを凌ぐ良好な成績が得られた。胚培養法、胚移植の時期や方法など更に合理的に改善せねばならない問題点の多いIVF・ETの現状では、卵管疎通性のある難治性不妊症例に対して、GIFT、ZIFTはまず試みてみるべき有効な治療であり、低酸素下培養をはじめとする培養条件のさらなる改善により、一層の成績向上が期待できるものと思われた。

## 文 献

- 1) Steptoe PC and Edwards RG, Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 11: 366, 1978
- 2) Asch RH, Balmaceda JP, Ellsworth LR, Wong PC, Gamete intra-fallopian transfer (GIFT): a new treatment for infertility. *Int J Fertil* 30: 41, 1985
- 3) Devroey P, Braeckmans P, Smits J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Van Steirteghem A, Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* 1: 1329, 1986
- 4) Medical Research International Society for Assisted Reproductive Technology (SART), The American Fertility Society, In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States, 1990 results from the IVF-ET Registry. *Fertil Steril* 57: 15, 1992
- 5) Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T, Involvement of superoxide radicals in mouse 2-cell block phenomenon. *Molec Reprod Devel* 28: 356, 1991
- 6) Umaoka Y, Noda Y, Matsumoto H, Mori T, The effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryo. *Molec Reprod Devel* 31: 28, 1992
- 7) Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T, Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radical Biol Med* 13: 47, 1992
- 8) Noda Y, Embryo Development In Vitro. *Assisted Reproduction Reviews* 2: 9, 1992
- 9) 江見信之, 龍見信哉, 渡辺栄三, 松本 央, 馬岡陽, 辰巳賢一, 矢野樹理, 野田洋一, 森 崇英, 醍醐渡辺病院における配偶子卵管内移植 (GIFT) の実際とその成績. *日本受精着床学会雑誌* 5: 17,

1988

- 10) 馬岡 陽, 野田洋一, 松本 央, 森 崇英, マウス前核期胚培養における酸素毒性の影響. 日本不妊会誌35: 285, 1990
- 11) 野田洋一, 哺乳類初期発生に及ぼす環境因子の解析. 日産婦誌44: 960, 1992
- 12) 江見信之, 渡辺栄三, 野田洋一, 森 崇英, 配偶子卵管内移植の管理. 産と婦58: 2025, 1991
- 13) Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humeau C, Cristol P, Viala JL, Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 47: 639, 1987
- 14) 関 守利, 土屋清志, 伊藤理廣, 竹内 巧, 伊藤郁郎, 篠崎博光, 伊吹令人, 五十嵐正雄, 配偶子卵管内移植 (GIFT). 産と婦57: 2052, 1990
- 15) Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T, Developmental potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 8 :245, 1991

**Results of GIFT and ZIFT  
and the improvement of Culture condition**

Eizo Watanabe, Nobuyuki Emi and Jiro Ishiko

Daigo-Watanabe Hospital, Kyoto 601-13, Japan

Yoichi Noda and Takahide Mori

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

From November 1986, 102 patients with longstanding infertility were treated in our clinic in 124 cycles by gamete intrafallopian transfer (GIFT) and from October 1990, 30 patients were treated in 30 cycles by zygote intrafallopian transfer (ZIFT). Twenty-eight pregnancies were obtained by GIFT and 11 pregnancies by ZIFT, and pregnancy rate per patient was 27.5% and 36.7%, respectively. The protocol of ovarian hyperstimulation, age of female, and the number of eggs transferred were significant factors influencing pregnancy rates. ZIFT was effective for immunological infertility, unexplained infertility, and patients who had previous failed IVF · ET or GIFT treatment. Manipulation under low oxygen tension (5%) and low illumination using  $\alpha$ -MEM throughout the procedures for the purpose of protecting gametes or embryos from oxidative stress improved culture efficacy and clinical results. It can be concluded that GIFT and ZIFT may be successful for infertile patients with tubal patency, and superior to uterine replacement.

(受付：1992年10月23日特掲)

(受理：1992年12月2日特掲)

## マウスの体外受精および初期胚発育におよぼす インターロイキンの作用

### Effect of Human Recombinant Interleukins on *in vitro* Fertilization and Early Embryonic Development of Mouse

熊本大学医学部産科婦人科学教室

楊 桂 雲	松 浦 講 平	本 田 律 生
Gui-Yun YANG	Kohei MATSUURA	Ritsuo HONDA
福 松 之 敦	河 野 哲 郎	岡 村 均
Yukitoshi FUKUMATSU	Tetsuro KAWANO	Hitoshi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,

Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860, Japan

マウスの体外受精率とその受精卵 (*in vitro*受精卵) からの発育率ならびに交配雌卵管から回収した2細胞期胚 (*in vivo*受精卵) の発育に及ぼすhuman recombinant interleukin (IL) - 1 $\beta$ , 5, 6 の影響を検討した。

体外受精率は, IL-1 $\beta$ では50ng/ml, IL-5では5 ng/ml以上, IL-6では0.5ng/ml以上で有意に抑制された ( $p<0.05$ ). *In vitro*受精卵の発育抑制は, IL-6添加群のみにみられ, 0.5ng/ml以上で4細胞期胚までの抑制が, 50ng/mlでは8細胞期胚から胚盤胞に至るまでの発育が抑制された。 *In vivo*受精卵の発育は, IL-1 $\beta$ とIL-6では対照群と差はみられなかったが, IL-5では胚盤胞胚への発育が促進された。

以上の結果から, ヒト腹水中に存在するIL-1 $\beta$ , 5, 6は初期胚発育ではなく, 受精障害作用により不妊をもたらすことが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 91 - 95, 1993)

#### 緒 言

子宮内膜症, 特に軽症・中等症患者における本症と不妊との関連については未だ結論は得られていないが, 不妊婦人では本症と診断される例が多く, その因果関係を明らかにすることは重要な研究課題と考えられる。

われわれは, これまで子宮内膜症患者について, 腹水量とその性状, あるいは腹腔内マクロファージ (M $\phi$ ) 総数とその活性の面から検討を行ってきたが<sup>5,6</sup>, その腹腔内環境は正常から逸脱しており, この現象が初期生殖現象の場である腹腔内における不妊因子を形成しているものと考えられる。しかし, マウスの初期胚発育に対する子宮内膜症患者腹水の影

響一つをみても, 一致した結論は得られていないのが現状である<sup>3,7,9</sup>。

子宮内膜症患者腹水中には, M $\phi$ やリンパ球などの細胞成分が含まれ<sup>4,5,8,10,13</sup>, インターロイキン1 (以下IL-1)を初めとする各種サイトカインを産生しており, これらが不妊となんらかの因果関係をもっているものと推測されている<sup>2,11</sup>。この中でM $\phi$ が産生するIL-1については, 受精および初期胚発育に対する障害性を示す報告<sup>8</sup>)もあるが, その評価は必ずしも一致していない<sup>3</sup>。

今回, この腹水中の存在するインターロイキンに着目し, 妊孕性にかなる影響を与えているのかを解明する目的で, マウスの体外受精および初期胚発育におよぼす影響をrecombinant human IL-1 $\beta$ , IL-

5, IL-6 を用いて検討したので報告する.

### 研究方法

実験動物は、4週齢の(C57 B1 xDBA) F1 未成熟雌マウスを用い、PMSG(セロトロピン, 帝国臓器)を5単位腹腔内に投与し、その48時間後にhCG(HCGモチダ, 持田製薬) 5単位を投与して過排卵処置を行った。hCG投与14ないし16時間後に頸椎脱臼により屠殺して開腹し卵管膨大部より未受精卵を採取した。これに同系成熟雄マウスの精巣上体尾部から採取した精子を1時間の前培養後、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ /mlに濃度調整を行い媒精した。培養液は、0.3%BSAを添加したhuman tubal fluid (HTF) 液を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% airの条件下で120時間まで培養し、受精ならびに胚発育を位相差顕微鏡下に経時的に観察した。媒精24時間後の2細胞以上へ分割したもの(in vitro受精卵)を受精と判定し、その後は24時間毎に観察を行って、4細胞, 8細胞, 桑実胚, 胚盤胞への発育率を求め、これを対照群とした。培養液に、recombinant human IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6 (Genzyme社, UK) を、0.05ng/ml, 0.5ng/ml, 5 ng/ml, 50ng/mlの4種の濃度で添加して、同様の培養条件で体外受精を行い、以下同様に受精および胚発育の観察を行った。

マウス初期胚は、7~8週齢の(C57 B1 xDBA) F1 成熟雌マウスにPMSG 5単位とhCG 5単位で同様の過排卵処置を行い、同系成熟雄マウスと自然交配させ、翌朝腔栓の確認ができたものをhCG投与45~48時間に開腹して卵管より採取した2細胞期胚(in vivo受精卵)を用いた。基本培養液および添加したIL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6濃度ならびに培養条件は体外受精系の実験と同様に行い、採取した2細胞期胚を96時間培養し、24時間毎に胚の発育状態を観察し、8細胞胚形成数, 胞胚形成数, 胚盤胞胚数, hatching数を測定した。

統計学的有意差検定は、Mann-Whitneyならびに $\chi^2$ 検定を用いた。

### 結果

1. IL-1 $\beta$ の受精率および胚発生への影響(図1, 図2, 表1)

体外受精率は、IL-1 $\beta$  50ng/ml添加群では42.5%であり、対照群(64%)に比べて有意に(P<0.01)抑制されており、これは0.5ng/ml添加群(61.4%), 5 ng/ml添加群(56.5%)と比べても有意(P<0.05)に低下していた(図1)。

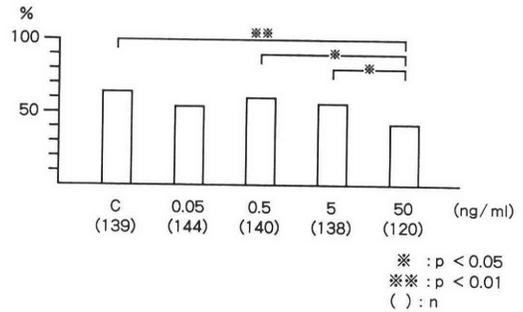


図1 体外受精率-IL-1 $\beta$ 添加-

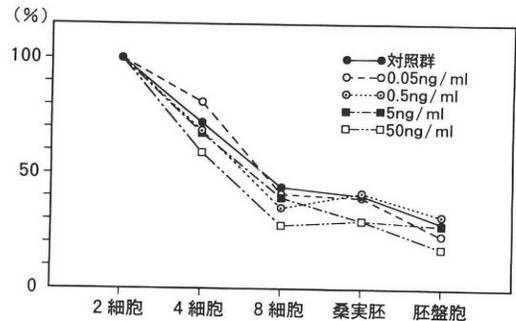


図2 IL-1 $\beta$ 添加によるin vitro受精卵発育

表1 IL-1 $\beta$ 添加によるin vivo受精卵発育

胚発育	対照	IL-1 $\beta$ 濃度 (ng/ml)	
		0.5	50
8細胞 (%)	100.0	96.7	93.3
胚盤胞 (%)	83.3	83.3	83.3
hatching (%)	79.2	73.3	73.3

in vitro受精卵から4細胞, 8細胞, 桑実胚, 胚盤胞への発育率を、in vitro受精卵を100%として比較したものを図2に示したが、IL-1 $\beta$ を添加しても対照群および各濃度群間の比較で有意差はみられなかった(図2)。

IL-1 $\beta$ を添加した時のin vivo受精卵からの胚発育率を、表1に示した。各群間で発育率に差はなく、IL-1 $\beta$ 添加によってもin vivo受精卵の胚発育抑制はみられなかった(表1)。

2. IL-6受精率および胚発生への影響(図3, 図4, 表2)

体外受精率は、0.5ng/ml以上では添加濃度に従って有意に抑制された(P<0.05, 図3)。

in vitro受精卵から4細胞, 8細胞, 桑実胚, 胚盤胞への発育率を、in vitro受精卵を100%として比較

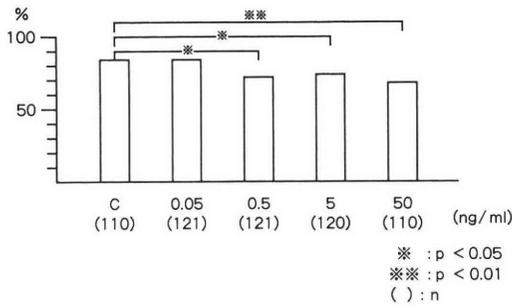


図 3 体外受精率—IL-6 添加—

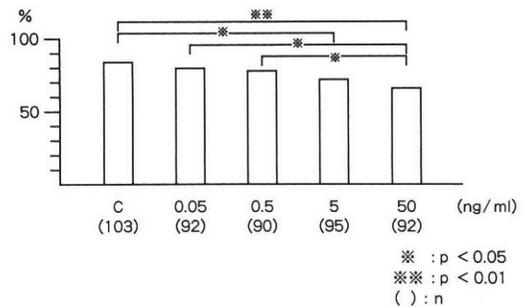


図 5 体外受精率—IL-5 添加—

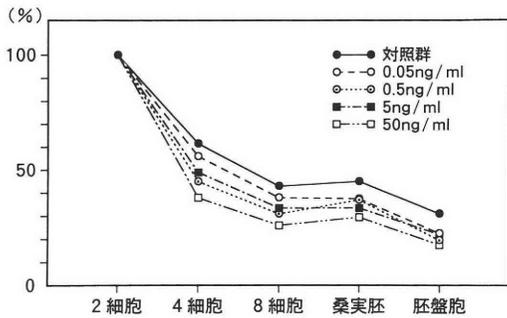


図 4 IL-6 添加によるin vitro受精卵発育

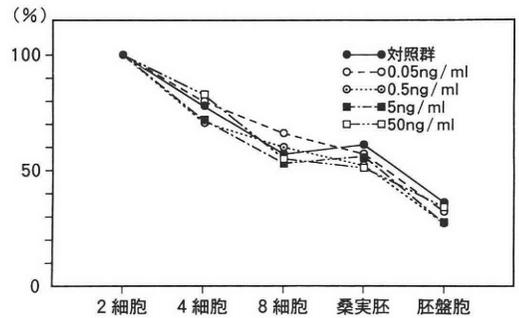


図 6 IL-5 添加によるin vitro受精卵発育

表 2 IL-6 添加によるin vivo受精卵発育

発育	対照	IL-6 濃度 (ng/ml)			
		0.05	0.5	5.0	50
8細胞 (%)	90.0	93.3	93.3	95.0	91.7
胚盤胞 (%)	56.7	56.7	55.0	61.7	53.3
hatching (%)	61.7	71.7	61.7	55.0	58.3

表 3 IL-5 添加によるin vivo受精卵発育

発育	対照	IL-5 濃度 (ng/ml)			
		0.05	0.5	5.0	50
8細胞 (%)	97.5	100.0	100.0	92.9	90.0
胚盤胞 (%)	65.0 <sup>a</sup>	81.0	95.0 <sup>a,b,c</sup>	69.0 <sup>b</sup>	67.5 <sup>c</sup>
hatching (%)	72.5	78.6	82.5	62.9	65.9

a, b, c: P<0.01

したものを図 4 に示したが、IL-6 0.5ng/ml以上の添加群では、4細胞期胚発育が有意に抑制された(P<0.05)。さらに50ng/ml添加群では、8細胞期胚以上の発育も対照群に比べ有意に抑制された(P<0.05, 図 4)。

in vivo受精卵の培養系にIL-6 を添加した時の胚発育率を、表 2 に示しているが、対照群ならびに各濃度添加群で有意差はみられなかった(表 2)。

3. IL-5 の受精率および胚発生への影響 (図 5, 図 6, 表 3)

体外受精率は、IL-5 添加濃度に従って有意に抑制された(P<0.05)(図 5)。

in vitro受精卵から4細胞, 8細胞, 桑実胚, 胚盤胞への発育率を、in vitro受精卵を100%として比較したものを図 6 に示したが、IL-5 を添加しても対

照群と各濃度群間の比較で有意差はみられなかった(図 6)。

IL-5 を添加した時のin vivo受精卵からの胚発育率を、表 3 に示した。8細胞およびhatching率には、対照群ならびに各濃度群で有意差はみられなかった。しかし、胚盤胞胚への発育率は、0.5ng/ml添加群は対照群ならびに5.0ng/ml, 50ng/ml添加群と比べると有意に促進された(P<0.01, 表 3)。

考 察

われわれは、子宮内膜症患者では腹水量が増加し、血性腹水頻度も高いこと、さらに、腹水中のMφ総数が有意に多く、かつ活性化状態と考えられる浸出型Mφの割合も増加していることを明らかにしてきた<sup>5,6)</sup>。このことから、子宮内膜症患者では腹

水産生機構が破綻し、腹腔内が被刺激状態にあると考えられる。

子宮内膜症、特に軽症例と不妊症との因果関係については、賛否両論あり現在までに種々の検討が行われてきた。子宮内膜症患者に限らず不妊婦人では腹腔鏡検査後の待機療法期間中に妊娠する例を経験することから推論するに、腹水の除去あるいは骨盤腔の洗滌といった一連の操作が妊娠成立に適した環境をもたらしているものと考えられる。このことから軽症、中等症の子宮内膜症患者における不妊との関連を腹水因子に求めようとするのは当然のことと思われる<sup>1)</sup>。

腹水の生殖初期現象に及ぼす影響を検討したものは、初期胚発育をみたものが多く<sup>1,2,3,7)</sup>、受精率を検討したものは少ない<sup>2,12)</sup>。武谷<sup>2)</sup>は、子宮内膜症患者腹水をマウス体外受精系に添加すると0.5%の濃度で受精率が低下し、さらにこの受精率は精子に腹水を作用させたときのみ低下すると述べている。Sueldo et al<sup>12)</sup>は、子宮内膜症患者の腹水上清にはマウス(ICR/Ha)受精を抑制する成分があり、56°C、30分間の処理により抑制が回復されることを報告しているが、一方では非働下腹水上清には、マウス(B<sub>2</sub>D<sub>6</sub>Fi)2細胞期胚の発育率を抑制する因子が存在することも報告されている<sup>7)</sup>。しかし、その因子を同定するには至っていない。

われわれが、今回recombinant human IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6を用いて検討を行ったのは、腹水中にはこれらを産生する細胞成分が存在し、子宮内膜症でその増加が報告されているからであり<sup>5,8,10,13)</sup>、特に、IL-1については、抗IL-1抗体を用いた電顕免疫組織学的なわれわれの検討でも子宮内膜症個体の腹腔内M $\phi$ に豊富なIL-1陽性像が確認されている<sup>5)</sup>、これら3種のILのマウス体外受精系における受精率と初期胚発育に対する影響を検討した結果、3種とも濃度によって異なるものの有意に受精率を抑制したが、体外受精が成功した受精卵の胚発育は3種間で異なる結果が生じた。すなわち、IL-1 $\beta$ とIL-5では対照群と差のない胚発育率がみられたが、IL-6では0.5ng/ml以上の濃度すべてにおいて4細胞期胚の発育が有意に抑制され、50ng/mlでは8細胞期胚以後の発育率が有意に抑制された。一方、in vivoで得られた2細胞期胚のin vitroでの発育に対する影響を検討してみると、3種とも対照群に比較して有意な抑制はみられず、IL-5 0.5ng/ml添加群では胚盤胞率が、むしろ促進していた。

以上の成績から、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6は受精段

階で障害的に作用しているものと考えられる。さらに、IL-1 $\beta$ とIL-5はin vitro受精卵の胚発育に影響を及ぼさなかったが、IL-6では0.5ng/ml以上の濃度でin vitro受精卵の胚発育が抑制されている。IL-6存在下で受精した卵では、その後の胚発育に障害が出るような因子がこの時点で組み込まれており、その結果として胚発育抑制が起こったものと考えられる。このことは、in vivo受精卵の胚発育に対してはIL-6は全く抑制作用を示さないことから推察されよう。すなわち3種のILには胚発育に対する障害作用はないものと考えられる。IL-1が、初期胚発育に対して障害作用を示さない結果は、郭等の報告<sup>3)</sup>と一致しているが、彼らはIL-1を卵管組織と共培養すると4細胞期胚までの発育が抑制されたことも報告している。

今回は、三つのインターロイキンを各々単独で作用させたが、ヒト腹腔内では実際にはこれら3種以上のサイトカインの他に、種々の液性成分や細胞成分が混在していることは容易に推測されるので、子宮内膜症患者の不妊原因を明らかにしていくためには、このようなin vivoにより近い条件を設定したさらに詳しい検討が必要であろう。

## 文 献

- 1) 澤田富夫, 吉村俊和, 青木豊和, 吉田麻里子, 服部公博, 谷内和子, 河上征治, 福島 穰, 内膜症腹水のマウス初期胚発育に及ぼす影響. エンドメトリオーシス研究会誌12: 247, 1991
- 2) 武谷雄二, 子宮内膜症の生化学的特性に関する基礎ならびに臨床的研究—正常子宮内膜との対比—. 日産婦誌41: 971, 1989
- 3) 郭 宗明, 武谷雄二, 綾部琢哉, 五味淵秀人, 矢野 哲, 堤 治, 水野正彦, 子宮内膜症腹腔内貯留液のマウス胚発生に及ぼす影響. 日産婦誌42: 1284, 1990
- 4) 宇田 聡, 梅咲直彦, 川端政實, 須川 信, 子宮内膜症における腹水中M $\phi$ およびinterleukin-1の不妊因子としての意義 (prednisoloneおよびDanazolによるM $\phi$ の機能抑制実験). エンドメトリオーシス研究会誌11: 185, 1990
- 5) 福松之敦, 片瀨秀隆, 宮村伸一, 松浦講平, 岡村均, 内藤 眞, 高橋 潔, 子宮内膜症患者における腹腔内活性化マクロファージの検討—内因性peroxidaseおよびinterleukin-1の細胞内局在を指標として—. 日産婦誌44: 529, 1992
- 6) 西村 弘, 松浦講平, 本田律生, 田中信幸, 河野哲郎, 楊 桂雲, 岡村 均, 子宮内膜症患者における腹水量および性状の検討. 日不妊会誌(投稿中)

- 7) Morcos RN, Gibbons WE, Findley WE, Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 44: 678, 1985
- 8) Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ, Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 50: 216, 1988
- 9) Fakin H, Baggett B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO, Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 47: 213, 1987
- 10) Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB, Macrophages and infertility: oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil Steril* 39: 310, 1983
- 11) Eisermann J, Odem RR, Gast MJ, Collins JL, Pineda J, Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 50: 573, 1988
- 12) Sueldo CE, Rathwick G, Lambert H, Swanson J, Steinleitner A, The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on murine spermocyte interaction. *Fertil Steril* 48: 697, 1987
- 13) Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj M, Raj S, Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 145: 333, 1983
- 14) Sherif GA, Chad IF, Amin UH, Sung IR, NeeOo WC, and Moon H K, Local peritoneal factors: Their role in infertility associated with

endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1207, 1987

**Effect of human recombinant interleukins  
on in vitro fertilization  
and early embryonic developem of mouse**

Gui-Yun Yang, Kohei Matsuura,  
Ritsuo Honda, Yukitoshi Fukumatsu,  
Tetsuro Kawano and Hitoshi Okamura

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

In order to clarify the relationship between the endometriosis and infertility, we evaluated the effects of human recombinant interleukin (IL-) 1  $\beta$ , 5 and 6 on in-vitro fertilization (IVF) rate and early embryogenesis by using mouse. IVF rate was significantly ( $P < 0.05$ ) suppressed by adding IL-1  $\beta$ , 5 and 6 to the medium in the concentrations more than 50ng/ml, 5 ng/ml and 0.5ng/ml, respectively. No influence of IL-1  $\beta$  and IL-5 on the growth of the IVF 2 cell embryos was observed, but IL-6 revealed suppressive effect on it. By the treatment of IL-1  $\beta$ , 5 and 6, the growth of in vivo 2 cell embryos obtained from the tube was similar to the control group. These results suggested that IL-1  $\beta$ , 5 and 6 present in peritoneal fluid in the cases of endometriosis may play a role in causing infertility through their antifertilization effect.

(受付: 1992年 7 月 17日)

(受理: 1992年 12 月 2 日)

## 腹腔鏡で確認したFitz-Hugh-Curtis症候群の1例

### Fitz-Hugh-Curtis Syndrome Verified with Laparoscopy: A Case Report

博愛病院産婦人科

竹内 薫 岩部 富夫  
Kaoru TAKEUCHI Tomio IWABE

Department of Obstetrics & Gynecology,  
Hakuai Hospital, Yonago 683, Japan

Chlamydia trachomatis (C. trachomatis) 感染による肝周囲炎 (Fitz-Hugh-Curtis症候群) の1例を経験したので報告する。症例は34歳の主婦。主訴は右季肋部痛で、下腹部痛と不正性器出血の症状も合併していた。白血球増多、CRP高値と炎症所見が陽性であったが、肝胆道系の機能検査や画像診断は正常であった。C. trachomatis抗原(酵素免疫法)は子宮頸管部と腹水細胞で陽性、血清抗Chlamydia抗体(間接酵素抗体法)もIgG $\geq$ 1:128, IgA $\geq$ 1:16と陽性であった。確定診断の目的で施行した腹腔鏡検査では、骨盤腹膜炎、卵管溜膿腫とともに、肝被膜と壁側腹膜に白斑、充血、点状出血を認め肝周囲炎と診断したが、典型的なviolin string adhesionの所見は見られなかった。ミノサイクリン投与により症状は速やかに軽快した。

本邦における本症候群の報告例を、自験例を含めて14例集計し、臨床的特徴を検討した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 96 - 100, 1993)

#### 緒 言

性感染症Sexually transmitted disease (STD)としてのC. trachomatis感染症が、近年我が国でも増加しており、産婦人科領域における子宮頸管炎や骨盤内感染症pelvic inflammatory disease (PID)の主要な原因の一つとして、その臨床的意義が注目されている。Fitz-Hugh-Curtis症候群(FHC症候群)は、C. trachomatisあるいは淋菌感染による肝周囲炎として欧米では以前から知られた疾患であるが<sup>1-6)</sup>、本邦での文献上の報告例はおよそ19例を数えるに過ぎない<sup>7-13)</sup>。

今回、当科において腹腔鏡検査で確定診断し得た本症候群の1例を経験したので、本邦報告例を中心とした文献的考察を加えて報告する。

#### 症 例

患者: 34歳, 主婦  
主訴: 右季肋部痛

既往歴: 24歳 虫垂切除術

妊娠分娩歴: 2妊2産

月経歴: 初経13歳, 周期27日型, 整順, 月経痛軽度  
現病歴: 1~2年前から帯下の増加を自覚し、近医で膣炎として頻回に治療を受けていた。最終月経は12月11日から7日間。12月末より下腹部膨満感、頻尿、残尿感が出現し、尿道炎と診断された。1月3日、不正性器出血があり、近医にてホルモン剤の内服投与を受けたが止血しなかった。1月23日から下腹部痛が出現し、近医にて抗生物質の点滴静注を受けたが疼痛は持続した。1月30日から右季肋部痛も出現し、翌日には激痛のため歩行、体位変換も困難となった。右季肋部痛は吸気時に増強し、右肩への放散痛も認められた。2月1日に近医より当科を紹介され入院となった。

入院時理学的所見: 身長155cm, 体重48kg, 体温37.2°C, 血圧112/76mmHg, 脈拍68/分。顔貌は苦悶状で貧血・黄疸を認めず。胸部打聴診異常なし。腹部の視診、聴診は異常なく、触診で右季肋部に著明

な圧痛を認めた。肝、胆、脾の腫大は認めなかった。下腹部に腫瘤は触知しなかったが、中等度の圧痛を認めた。鼠径リンパ節の腫大なし。内診所見では外陰部は正常、膣分泌物は血性で中等量。子宮腔部に軽度のびらんを認めたが、頸管炎の所見は見られなかった。子宮体部は前傾前屈、鶏卵大で移動痛を認めた。子宮内膜症を思わせるような可動性の制限は認めなかった。左右付属器に腫瘤は触知しない

が抵抗を触れ、中等度の圧痛を認めた。Douglas窩に膨隆や硬結はなく、中等度の圧痛を認めた。

検査所見(表1)：白血球増多、CRP高値と炎症所見が陽性であったが、肝機能検査値は正常範囲内であった。子宮頸管部でのC. trachomatis抗原(キット：Chlamydiazyme)、血清特異的抗Chlamydia IgG、IgA抗体(キット：IPAzyme Chlamydia AG)は共に陽性で、C. trachomatisの活動性感染と考えられた。腹腔鏡施行時に採取した腹水細胞を用いたC. trachomatis抗原も陽性であった。子宮頸部および内膜細胞診で悪性細胞を認めず、C. trachomatis感染に特徴的とされる細胞質内封入体の所見は典型的ではなかった。

腹腔鏡所見：以上の臨床経過、検査所見からFHC症候群を疑い、確定診断を目的として、2月4日に全身麻酔下に腹腔鏡を施行した。骨盤腹膜は全般的に充血しており、膀胱子宮窩とDouglas窩に黄褐色の混濁した腹水を中等量認めた(写真1)。子宮体部表面に不整形の炎症性白斑を認めた。左右卵巣は正常であったが、両側卵管は結節状に軽度腫大し、圧迫により内腔に貯留した膿様分泌物の排出が観察された(写真2)。内性器と骨盤腹膜に子宮内膜症の所見は見られなかった。肝臓・胆嚢の腫大はなく、肝右

表1 検査所見

血液一般	WBC	10,500	/mm <sup>3</sup>	
	RBC	374×10 <sup>4</sup>		
	Hb	11.5	g/dl	
	Ht	33.4	%	
	plt	323×10 <sup>3</sup>		
生化学	GOT	14	IU/l	
	GPT	16	IU/l	
	ALP	43	IU/l	
	γ-GTP	23	IU/l	
	ZTT	5.3	U	
	TTT	3.0	U	
	LDH	107	U/l	
	T.Bil	0.2	mg/dl	
	D.Bil	0.1	mg/dl	
	Amylase	121	U/l	
	elastase 1	228	ng/dl	
	BUN	6	mg/dl	
	Cr	0.9	mg/dl	
	Na	137	mEq/l	
	K	3.7	mEq/l	
	Cl	102	mEq/l	
	Ca	8.0	mEq/l	
	CRP	7.2	mg/dl	
	C.trachomatis	抗原	子宮頸管部	(+)
		腹水	(+)	
抗体		IgG	1: 64	(+)
			1: 128	(+)
		IgA 1: 16	(+)	
細菌培養	膣分泌物			
		一般菌 (-)、真菌 (-)、淋菌 (-)		
	腹水	好気性培養	(-)	
		嫌気性培養	(-)	
淋菌性培養		(-)		
画像診断(超音波, CT-scan)	肝・胆・脾		異常なし	
	骨盤内臓器		腹水貯留以外 異常なし	
尿検査			正常	



写真1 Douglas窩に貯留した腹水



写真2 子宮体部表面の炎症性白斑と右卵管溜膿腫



写真3 肝右葉表面と壁側腹膜の白斑および発赤



写真4 肝左葉と横隔膜の間の索状の癒着

葉表面の肝被膜と壁側腹膜に複数の白斑, 充血, 点状出血が認められ, 肝周囲炎の所見と考えられた(写真3). 典型的なviolin string adhesionは見られなかった. 肝左葉表面には白斑や充血は見られなかったが, 横隔膜との間に索状の癒着がわずかに認められた(写真4). 以上の所見から骨盤腹膜炎, 両側卵管溜膿種および肝周囲炎と診断した.

臨床経過: 2月4日からミノサイクリン200mg/日を点滴静注にて投与したところ, 投与4日目頃までに右季肋部痛は軽快し, 術後8日目に退院した. ミノサイクリンは内服に変更して総計4週間投与した. 4週間後の自覚症状では, 右季肋部痛および下腹部痛は消失していたが, 横隔膜に相当する部位の軽度の背部痛を訴えた. 子宮頸管部のC. trachomatis抗原は陰性となったが, 血清抗Chlamydia IgG, IgA抗体は, 治療前と同一であった. なお患者の配偶者には尿道炎などの症状はなく, 血清抗Chlamydia抗体は, IgG, IgAともに陰性であった. 尿道でのC. trachomatis抗原の検査は施行しなかった.

考 察

FHC症候群は, Stajano<sup>1)</sup>, Curtis<sup>2)</sup>, Fitz-Hugh<sup>3)</sup>らに

よって, 淋菌性卵管炎患者で肝臓周囲に癒着のある症例が報告されたことに始まる. はじめは淋病に特有の病態と考えられたが, Müller-Schoop<sup>4)</sup>が, C. trachomatis感染によっても起こり得ることを示唆し, Wölner-Hanssen<sup>5)</sup>が実際に肝周囲炎の肝被膜よりC. trachomatisを分離することに成功して以来, C. trachomatisの関与が決定的となった. 現在では, C. trachomatis感染症と淋菌感染症との発生頻度から考えて, 前者によるものが後者によるものよりも多いと考えられている. Corson<sup>6)</sup>は, 1930年から1983年までの文献上の報告例を405例集計し, PIDの症例に占めるFHC症候群の頻度を15~30%と推定している.

本邦におけるC. trachomatis感染を原因としたFHC症候群の報告は, 山下<sup>7)</sup>の3例が最初と思われる. 以後, 菅生<sup>8)</sup>の4例, 菅生<sup>9)</sup>の2例, 高嶽<sup>10)</sup>の4例, Toki<sup>11)</sup>の3例, 木田<sup>12)</sup>の1例, 舟越<sup>13)</sup>の2例の計19例が文献上の主な報告例と考えられる. このうち高嶽, 舟越らの6例を除く詳細の明らかな13例に自験例を加えた計14例を対象にして, 臨床的特徴を検討した(表2). 自覚症状では,

表2 本邦報告例の検討

( ): %

年齢 [平均]	19~48 [31.1]	
結婚	未婚	4/14 (29)
	既婚	10/14 (71)
症状	右上腹部(季肋部)痛	14/14(100)
	下腹部痛	12/14 (86)
	帯下増加	7/14 (50)
	不正性器出血	7/14 (50)
	発熱	6/14 (43)
検査所見	白血球増多	6/14 (43)
	CRP陽性	14/14(100)
	C. trachomatis	
	抗原	子宮頸管部 13/13(100)
		腹腔内 1/2 (50)
	抗体	IgG ≥ 1: 64 11/11(100)
		IgA ≥ 1: 16 2/2(100)
		IgM ≥ 1: 10 3/10 (30)
	淋菌培養陽性	0/12 (0)
腹腔鏡	施行率	7/14 (50)
	violin string adhesion	5/7 (71)
治療	オフロキサシン	8/14 (57)
	ミノサイクリン	2/14 (14)
	エリスロマイシン	1/14 (7)
	ドキシサイクリン	1/14 (7)
転帰	軽快あるいは治癒	14/14(100)
	軽快に要する治療日数	1~11

PIDの症状が合併あるいは前駆するものが50%以上を占めた。検査所見で白血球増多は43%に認めるのみであり、むしろ正常値例の多いことは、急性胆嚢炎などの鑑別上重要と思われる。C. trachomatis抗原は、子宮頸管部では検査した全例で陽性であるが、腹腔内から採取した検体から直接証明した報告は、今回の自験例のみである。血清抗Chlamydia IgA抗体は、C. trachomatisの活動性感染の指標といわれているが、諸家の報告では記載がないものが多く、陽性の2例は自験例と菅生ら<sup>9)</sup>の1例である。腹腔鏡は7例に施行されており、その内5例で典型的なviolin string adhesionが認められている。右季肋部痛発症から腹腔鏡施行までの日数は自験例の5日間が最短であり、次いでTokiら<sup>11)</sup>の症例1の6日間が短い。この2例では、典型的なviolin string adhesionは観察されず、7日間以上経過後の5例で観察されていることから、FHC症候群に特徴的とされる本所見の形成には発症後約1週間を要することが示唆される。FHC症候群は、ミノサイクリンやオフロキサシンなどのC. trachomatisに有効な抗生物質が投与された場合には劇的な症状の改善がみられ、軽快までに要する治療日数は数日間という報告が多い<sup>7-13)</sup>。

C. trachomatis感染症が20代を中心とした性的活動期の女性に蔓延している現在、FHC症候群の症例は実際にはかなり多く存在しているものと推測される。今後、若い女性で右上腹部痛を訴える症例においては、本症候群も念頭においてC. trachomatisの検索を行う必要がある。また不妊症領域では卵管因子とC. trachomatis感染との関連が注目されている。女性性器へのC. trachomatis感染が子宮頸部に留まっている間に発見し治療することが、PIDや卵管性不妊などの続発症予防の点で重要と思われる。

## 文 献

- 1) Stajano C, La reaccion frenica en ginecologia. *Semana Med Buenos Aires* 27: 243, 1920
- 2) Curtis AH, A case of adhesions in the right upper quadrant. *JAMA* 94: 1221, 1930
- 3) Fitz-Hugh T Jr, Acute gonococcal peritonitis of the right upper quadrant in women. *JAMA* 102: 2094, 1934
- 4) Müller-Schoop JW, Wang SP and Munzinger J, Chlamydia trachomatis as possible cause of peritonitis and perihepatitis in young women. *Br Med J* 1: 1022, 1978
- 5) Wölner-Hanssen P, Svensson L, Weström, L and Mårdh PA, Isolation of Chlamydia tra-

chomatis from the liver capsule in Fitz-Hugh Curtis syndrome. *N Engl J Med* 306: 113, 1982

- 6) Corson SL, The Fitz-Hugh-Curtis Syndrome Revisited. *J Repro Med* 30: 567, 1985
- 7) 山下幸孝, 梶村幸三, 梶山 徹, 玉田 尚, 西尾章功, 山本富一, 洲崎 剛, 兼松雄象, Chlamydia trachomatis感染による肝周囲炎(Fitz-Hugh-Curtis症候群)と考えられた3例. *日消誌*83: 2612, 1986
- 8) 菅生元康, 南澤 豊, 郭 宗明, 藤原敏博, 小泉佳男, 右上腹部痛をともなったChlamydia trachomatis頸管炎. *日産婦誌*39: 1675, 1987
- 9) 菅生元康, 中村和幸, Chlamydia頸管炎と右上腹部痛. *産婦実録*37: 631, 1988
- 10) 高嶽 博, 兼松雄象, Fitz-Hugh-Curtis症候群の腹腔鏡像. *Gastroenterol Endosc* 31: 1705, 1989
- 11) Toki T, Hoshiai H, Chan W-I and Yajima A, Fitz-Hugh-Curtis syndrome: Three cases confirmed by laparoscopy. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol* 16: 105, 1990
- 12) 木田隆雄, 米田誠一, 梶田芳弘, 大嶋一也, 藤田洋一, 中川雅夫, Fitz-Hugh-Curtis syndromeの1例. *内科* 65: 391, 1990
- 13) 舟越光彦, 山近貴輔, 平田 済, 鮫島博人, 小西恭司, 池田和宏, 篠沢和英, 犬塚日出男, 特徴的な腹部症状と腹腔鏡所見を呈したFitz-Hugh-Curtis症候群 (FHCS) の2例. *Gastroenterol endosc* 32: 974, 1990

## Fitz-Hugh-Curtis syndrome verified with laparoscopy: A case report

Kaoru Takeuchi and Tomio Iwabe

Department of obstetrics and Gynecology, Hakuai Hospital, Yonago 683, Japan

A case of Fitz-Hugh-Curtis syndrome caused by Chlamydia trachomatis (C. trachomatis) infection was presented. The patient was 34-year-old housewife and her chief complaint was severe hypochondralgia combined with lower abdominal pain and atypical genital bleeding. Leukocytosis and positive CRP test highly suggested intraperitoneal inflammatory disease. C. trachomatis antigen (enzymeimmunoassay) was positive in the specimen obtained from uterine cervix. Serum anti-Chlamydial antibodies (indirect immunoperoxidase assay) were also positive (IgG  $\geq$  1: 128, IgA  $\geq$  1: 16). Diagnostic laparoscopy showed inflammatory changes (white plaques, congestion and petechial hemorrhage) of the liver capsule and

prehepatic parietal peritoneum without typical violin string adhesion. Findings of pelvic peritonitis with pyosalpinx were also observed laparoscopically. The pa-

tient was effectively treated with minocycline for 4 weeks.

(受付：1992年9月17日)

(受理：1992年12月2日)

## 血液透析患者に対するGnRH agonistによる 子宮筋腫保存療法の1症例

### Conservative Treatment of Uterine Leiomyoma Using GnRH Agonist for a Woman with Hemodialysis: A Case Report

新潟大学医学部産科婦人科学教室

(主任：田中憲一教授)

倉林 工  
Takumi KURABAYASHI  
山本 泰明  
Yasuaki YAMAMOTO

安田 雅弘  
Masahiro YASUDA  
織田 和哉  
Kazuya ODA  
田中 憲一  
Kenichi TANAKA

藤巻 尚  
Takashi FUJIMAKI  
吉沢 浩志  
Hiroshi YOSHIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,

Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahimachi-dori, Niigata 951, Japan

(Director: Prof. K. Tanaka)

血液透析患者に対するGnRH agonistによる子宮筋腫保存療法の本邦における初回例を経験したので、ここに報告する。

症例は、慢性腎不全のため血液透析中の46歳の婦人である。過多月経と貧血(Hb7.6g/dl)を主訴に当科受診し、超手拳大の子宮を認めた。年齢や、過去に20数回のシャントトラブルの既往があること等から、手術を施行せず経過観察していたが、時々多量の性器出血が出現するため、GnRH agonistにて子宮筋腫保存療法を試みることにした。Buserelin 450  $\mu$ g/日にて開始し、下腹痛が強度のため900  $\mu$ g/日に増量して軽快したため、その後300  $\mu$ g/日に減量し、合計6カ月間点鼻投与した。投与期間中、月経や不正出血は出現せず、貧血は軽快し、超音波断層法では子宮の体積は若干の減少を示した。副作用として、肩こり、一時的な下痢、6カ月で4%の骨密度減少を認めた。

GnRH agonistによる子宮筋腫保存療法は、副作用に注意して投与量を調節しつつ使用すれば、血液透析患者にも有用である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 101 - 104, 1993)

#### 緒 言

最近、Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonistによる子宮筋腫の保存療法が臨床応用され始めた。GnRH agonistには、骨密度低下など低エストロゲン血症による副作用があるため、保存療法の適応には十分な検討が必要である。しかし、手術に対するハイリスクのため手術不可能な症例では、

GnRH agonistによる保存療法が有用である。

今回我々は、血液透析中で過去に頻回のシャントトラブルのある46歳の子宮筋腫患者に対し、Buserelinによる保存療法が著効であった一症例を経験した。血液透析患者に対するGnRH agonistによる子宮筋腫保存療法の本邦における初回例と考えられるので、ここに報告する。

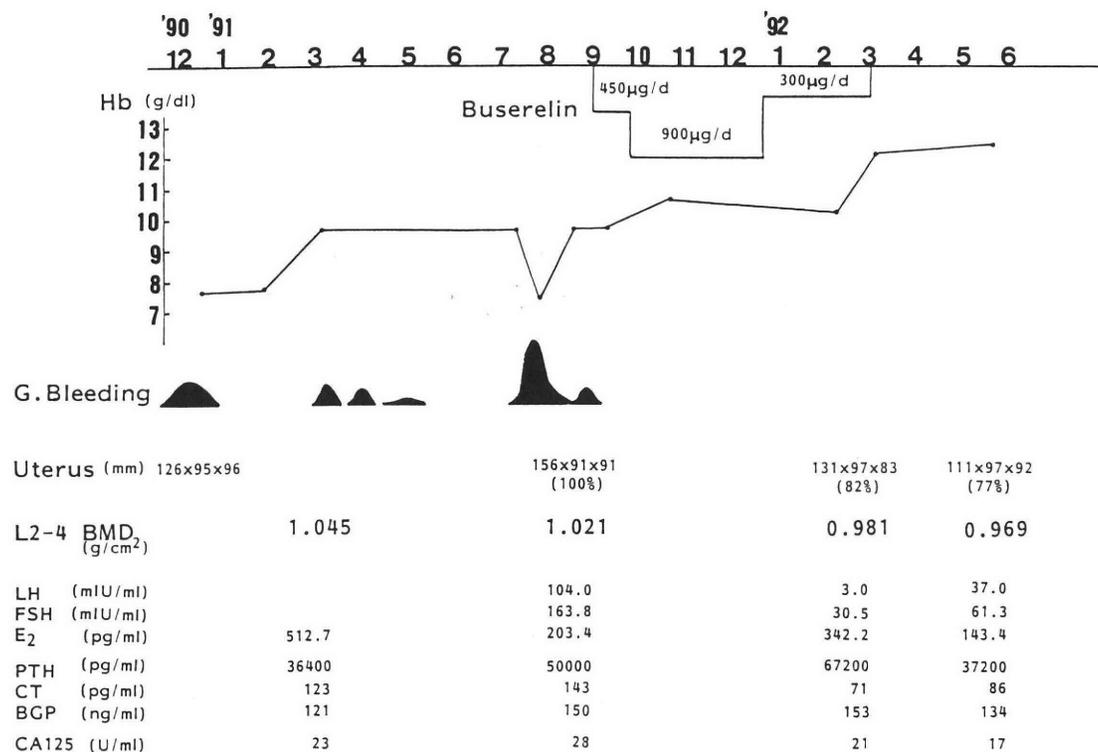


図1 経過表

Hb: hemoglobin

BMD: bone mineral density

(QDR-1000WによるDXA法)

PTH: 高感度parathyroid hormone

CT: calcitonin

BGP: bone gla protein=osteocalcin

## 症 例

症例 AM 46歳 主婦

主訴: 過多月経

月経歴: 初経12歳, 周期1~4カ月不順

妊娠分娩歴: 1妊0産 (1967年人工妊娠中絶)

既往歴: 1969年から慢性腎不全のため血液透析中。1971年・1973年に乳癌にて両側乳房切除術, 1974年に副甲状腺機能亢進症にて副甲状腺摘出術施行。過去に20数回の透析用シャントトラブルあり。

現病歴: 1990年10月から過多月経と貧血 (Hb7.6g/dl) が出現し当科初診したところ, 超手拳大の子宮を認めた。超音波断層法やCTにて126×95×96mmの子宮筋腫と考えられた。

1991年3月に当科に検査入院するも, ①46歳, ②過去に20数回のシャントトラブルの既往があること, ③糖尿病の合併が判明したことから, 手術を施行せず, 貧血に対する保存療法 (エリスロポイエチン・鉄剤) にて経過観察していた。しかし, その後も時々多量の性器出血が出現し, 貧血状態も悪化するため, Buserelinによる保存療法を試みることにした。

本邦における血液透析中の子宮筋腫患者に対するGnRH agonist使用の報告が皆無のため, まず常用量の半量から開始することにした。1991年9月よりBuserelin acetate 450µg/day投与にて開始し, 下腹痛が持続するため900µg/day投与に増量したところ軽快し, その後300µg/dayに減量し, 合計6カ月間投与した (図1)。Buserelin投与中に月経や不正出血は起こらず, 貧血も軽快し, 超音波断層法にて子宮体積は81%に縮小した。投与中の副作用として, 肩こり・一時的な下痢 (月・水・金曜日の午後が透析日であったが, 毎週月曜日の朝に出現し, 透析後軽快した)・DXA法 (Dual energy X-ray absorptiometry) にて6カ月間で4%の腰椎骨密度の減少を認めた。

投与終了後8カ月まで, 月経・不正出血は出現せず, Buserelin投与終了後, 下痢は消失した。しかし肩こりは投与終了後かえって増強し, 腰椎骨密度は投与前に比べ投与終了3カ月後で5%低下した。

## 考 察

Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) は、下垂体からのゴナドトロピン放出促進作用を有する、10個のアミノ酸からなるペプチドである。このアミノ酸組成の一部をかえたGnRH agonistは、反復投与により下垂体の感受性を低下させ、ゴナドトロピンの産生・放出を抑制する。このため、卵巣でのエストロゲン産生が抑制され、低エストロゲン状態を生じさせる。現在まで、GnRH agonistは、子宮内膜症、思春期早発症、乳癌、前立腺癌の治療に利用され、さらに最近、GnRH agonistによる子宮筋腫の保存療法の臨床応用が開始した。GnRH agonistによる子宮筋腫治療の適応として<sup>1)</sup>、

①種々の事情にて子宮筋腫手術の延期を必要とする場合：この治療にて、貧血の改善・悪化の防止を期待できる。

②閉経期に近い比較的高齢婦人：閉経期近くの婦人では、GnRH agonistにより約3分の1が閉経期に移行し、月経再開婦人でもこの治療を数回繰り返すことにより、やがて閉経期に移行する。

③手術に対するハイリスク・合併症のため、手術不可能な場合：GnRH agonistの反復にて、手術を回避する。今回の症例は、血液透析中のため、手術によるシャントトラブルの再発などを憂慮して、GnRH agonistによる保存療法を選択した。

慢性腎不全婦人のホルモン状態は、LHの軽度上昇、FSH・E<sub>2</sub>正常～低下し、E<sub>2</sub>によるLHに対するnegative feedbackは存在するが、E<sub>2</sub>上昇に伴うLHのpositive feedback、すなわちLHサージが欠如している。このため血液透析婦人は無排卵性無月経となりやすい<sup>2)</sup>。血液透析患者のGnRH agonist代謝に関する文献はないため、LHRHに関する検討を参考にすると、Matsubara M. et alによると、慢性腎不全患者の血中内因性LHRHは11.4±1.4pg/mlと高値を示し、血液透析後4.8±0.5pg/mlと正常化した。この高値は卵巣機能低下によるE<sub>2</sub>低下のfeedbackによりLHRHの増加をきたす。また本症では外因性LHRHの分解遅延が知られており、これもLHRH高値の一部に関与していると考えられる。これらの結果、本症でのLH上昇を引き起こすと考えられる<sup>3,4)</sup>。さらに血中LHRH高値は血液透析により正常化し透析可能であったことから、血中LHRHは大部分血清蛋白と結合していないものと考えられる<sup>3)</sup>。さらに、透析患者は外因性LHRH投与に対してLH、FSHは異常高値およびピーク時期の遅延を示したが、これは、腎臓

におけるLH、FSH排泄能の低下および、不活化の低下が原因と考えられる<sup>5)</sup>。

本症例で最も憂慮したことは、透析患者にGnRH agonistを使用することにより、健常人に比べ副作用が強く出現しないかということであった。今回我々は、常用量の1/2量の450μg/dayより開始し、症状や副作用出現にあわせて投与量の増減を行い、最終的には300μg/dayにて効果は持続していた。使用中月経や不正出血がおこらず、貧血の改善に役だったことは、非常に有用であったといえよう。Buserelin使用開始直後のLH、FSHを測定していないが、治療中にflare upによる副作用は認められなかった。低エストロゲン血症による副作用の一つである肩こりは、投与中止後かえって増強し、GnRH agonistによる低エストロゲン状態が投与中止後も持続しているものと考えられた。腰椎骨密度は使用前に比べ投与6カ月後に約4%の減少を示したが、投与中止後3カ月後もまだ減少傾向が続いている。GnRH agonist投与中止後の骨密度の回復過程について、ラットの実験では加齢や投与期間による差が指摘されている<sup>6)</sup>。日本人の場合では、20～30歳代婦人に比べ閉経前婦人へのGnRH agonist投与によるいわゆる“逃げ込み療法”では骨密度の回復不良の可能性も否定できない<sup>7)</sup>。もしも長期的にみても、閉経前婦人に対するGnRH agonist投与中止後は骨密度回復不良であるというコンセンサスが得られれば、GnRH agonist投与前の十分なインフォームドコンセントや、投与開始時からの骨密度減少予防治療の併用も必要であろう。本症例では、Buserelin投与前に比べ投与後5%の骨密度減少であったが0.969g/cm<sup>2</sup>と正常範囲内のため、無治療にて外来で嚴重に経過観察している。本症例ではBuserelin 6カ月投与にて閉経に移行したと考えられるが、投与中止後再び過多月経を繰り返す場合には、Buserelinの反復投与も必要となる。血液透析患者へのGnRH agonistの長期反復投与についての報告はなく、副作用に十分注意しての慎重な投与が望まれる。

Hampton et al.は、21歳の透析婦人で過多月経による貧血の治療のため、GnRH agonistの一つである、leuprolide acetate (3.75mg depot) による治療を開始したところ、15日後に卵巣過剰刺激症候群をおこした1症例を報告した<sup>8)</sup>。血液透析婦人は①下垂体GnRHレセプターの機能不全があること、②透析による薬剤の除去により下垂体からの内因性ゴナドトロピン分泌を増加させること、③内因性ゴナドトロピンに対する卵巣の反応性が亢進状態にあると考えられ

る。特に血液透析患者ではdepotよりもBuserelinのような連日3回点鼻薬の方が、調節性にすぐれ副作用防止の点からも望ましいと考える。

GnRH agonistは、副作用に注意し投与量を調節しつつ使用すれば、血液透析患者の子宮筋腫保存療法にも非常に有用である。

### 文 献

- 1) 中村幸雄, 子宮筋腫の薬物療法. 日本医事新報 3450: 23, 1990
- 2) Lim VS, Henriques C, Sievertsen G and Frohman LA, Ovarian function in chronic renal failure: Evidence suggesting hypothalamic anovulation. *Ann Int Med*, 93: 21, 1980
- 3) Matsubara M, Nakagawa K, Nonomura K and Hirota N, Plasma LRH levels in chronic failure before and during haemodialysis. *Acta Endocr* 103: 145, 1983
- 4) Gryczynska M, Kosowicz J and Czekalski S, Plasma half disappearance time and metabolic clearance rate of exogenous LH-RH in patients with chronic renal failure. *Materia Medica Polona* 42: 124, 1980
- 5) Hasegawa K, Matsushita Y, Hirai K, Otomo S and Okamoto T, Abnormal response of LH, FSH and testosterone to LH-RH hormone in chronic renal failure. *Acta Endocr* 87: 467, 1978
- 6) 倉林 工, 藤巻 尚, 安田雅弘, 山本泰明, 織田和哉, 田中憲一, GnRH agonistのラット骨密度におよぼす影響に関する検討. エンドメトリオーシス研究会会報13: 182, 1992
- 7) 古謝将一郎, 野口慎一, 児島信子, 永田行博, 子宮内膜症治療薬の骨塩量に及ぼす影響. エンドメトリオーシス研究会会報13: 174, 1992
- 8) Hampton HL, Whitworth NS and Cowan BD, Gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate) induced ovarian hyperstimulation syndrome in a woman undergoing intermittent hemodialysis. *Fertil Steril* 55: 429, 1991

### Conservative treatment of uterine leiomyoma using GnRH agonist for a woman with hemodialysis: A case report

Takumi Kurabayashi, Masahiro Yasuda,  
Takashi Fujimaki, Yasuaki Yamamoto,  
Kazuya Oda, Hiroshi Yoshizawa  
and Kenichi Tanaka

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Niigata University School of Medicine, 1-757  
Asahimachi-dori, Niigata 951, Japan  
(Director: Prof. K. Tanaka)

This is the first case report in Japan of conservative treatment of uterine leiomyoma using GnRH agonist for woman with hemodialysis. A 46 year old woman with chronic hemodialysis, consulted at our department complaining of hypermenorrhea and severe anemia (hemoglobin 7.6g/dl). She was diagnosed as overfistsized uterine leiomyoma. We first, considering her age and her twenty-several experiences of shunt trouble, observed her condition without surgical treatments. However, as she sometimes had massive genital bleeding, we decided to perform conservative treatment of uterine leiomyoma with GnRH agonist. The initial dosage, 450  $\mu$ g/day of Buserelin, increased to 900  $\mu$ g/day for her severe abdominal pain, but finally decreased to 300  $\mu$ g/day as the pain was lightened. The administration lasted for 6 months, and during the period, she did not have menses nor atypical genital bleeding. Anemia was alleviated and a slight decrease of uterine volume was observed with ultrasonography. She showed a few side effects such as stiff shoulder, temporary diarrhea and 4% loss of lumbar bone mineral density for the 6 months.

Conservative treatment of uterine leiomyoma with GnRH agonist is very useful for women with hemodialysis, if we control the dosage to prevent the side effects.

(受付: 1992年 8月31日)

(受理: 1992年12月 2日)

## CONSERVATIVE SURGERY FOR UNRUPTURED TUBAL PREGNANCY

Tadayuki ISHIMARU

Akira FUJISHITA

Naseem MAHMUD

Tooru YAMABE

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

---

**Abstract:** Seventeen women with unruptured tubal pregnancies who desired to preserve their reproductive potential were treated by milking in one subject, salpingotomy in 12 and salpingostomy in four. The length of time required for hCG level to reach  $< 2 \text{iu/L}$  ranged from six to 23 days (mean 15.6 days). All of the conservative surgeries were made successfully and none of the subjects underwent re-laparotomy. In ten subjects followed up for more than 12 months, eight subjects had 11 conceptions. Seven subjects have not yet conceived because of shortness in follow-up period. Intrauterine pregnancy rate per subject was 80% and live birth rate 70%. The conservative surgery is more useful in terms of therapeutic efficacy compared to Methotrexate (MTX) treatment.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 ( 2 ), 105 - 110, 1993)

---

### Introduction

The conservative management is divided into both surgical treatment and drug therapy. The laparoscopic surgery and operation by laparotomy are done as the surgical treatment<sup>1,2)</sup>. Methotrexate (MTX) is mainly used as the drug therapy<sup>3,4)</sup>. Salpingectomy which has been the traditional treatment resulted in the reduction of intrauterine pregnancy without the decrease in the rate of recurrent ectopic pregnancy. The intrauterine pregnancy and ectopic pregnancy rate after salpingectomy are about 42% (range 34 to 49%) and about 11% (range 7 to 17%) respectively<sup>5)</sup>. While the intrauterine pregnancy and ectopic pregnancy rate after conservative surgery are about 56 to 58% and about 16 to 17% respectively<sup>2,6)</sup>. Thus, the intrauterine pregnancy rate is higher after conservative surgery, but recurrent ectopic pregnancy rate seems to be similar. Therefore, a conservative surgery should be attempted in a woman who desires future pregnancy. In this study the efficacy and significance of the conservative surgery are discussed.

### Materials and Methods

Seventeen women with unruptured tubal pregnancies who desired to preserve their reproductive potential were treated by milking, salpingotomy and salpingostomy. The choice of operative method was determined by the location of the pregnancy. When pregnancy was located at the fimbrial site, the conceptus was evacuated by expression through the distal ostium. Salpingostomy was performed when gestation was located in the distal ampulla close to the distal ostium. An antimesenteric incision was made with the electrocautery from the proximal ampulla to the distal fimbriated end and was left open. If bleeding from incision site was found, it was controlled by 5-0 or 6-0 Vicryl suture or electro-cauterization. Salpingotomy was conducted in the pregnancy of ampullary or isthmic segment. An incision was made electrosurgically on the antimesenteric surface of the oviduct containing the pregnancy and was closed in one or two layer with 5-0 or 6-0 Vicryl or was left open without suturing (Fig. 1). The hysterosalpingo-

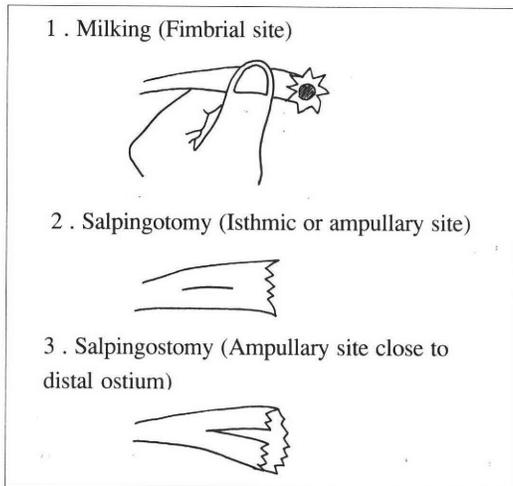


Fig. 1 Method of Conservative Surgery

graphy was performed when pregnancy did not occur four-five months after the operation.

### Result

The age of 17 patients ranged from 21 to 35 and 15 patients were married except case 12 and case 13. The conservative surgery was made because all patients desired future fertility. The conservative surgery

was made successfully and none of the seventeen subjects underwent re-laparotomy. The highest values of hCG before operation ranged from 512 to 32,000iu/L. The nine tubal pregnancies were located in ampullary site, six cases in isthmic and two cases in fimbrial site. A salpingotomy was performed in 12 cases, a salpingostomy in four cases and milking in one case.

The length of time required for hCG levels to reach < 2iu/L ranged from six to 23 days (mean 15.6 days). Of ten subjects (case one to ten) followed up for more than 12 months eight subjects had 11 conceptions. The length of time required from post operation to first pregnancy ranged from one to 24 months (mean 13.3 months). Five subjects except case 12 and case 13 out of the residual seven subjects have not yet conceived because of short period of follow up of less than six months after operation. Subject three and five with spontaneous abortion in the first pregnancy had one term gestation in the second pregnancy, respectively. Subject ten had a recurrent ectopic pregnancy in the ipsilateral oviduct. All of the remaining five subjects had term gestation in the first conception (Table 1). Intrauterine pregnancy rate (per subject) in ten subjects of follow-up of more than 12 months was

Table 1 Clinical data from patients with tubal pregnancy treated by conservative surgery

Case No	Age	Gestation (WK)	Gravidity (G) Parity (P)	HCG (IU/L)	site of tubal pregnancy	Method	Time from post-operation to first conception (months)	pregnancy after operation
1	25		G2P1		isthmic	salpingotomy	12	2 live birth
2	21	8	G0P0	9,600	isthmic	salopigotomy	12	1 live birth
3	24	6	G4P0	1,200	ampullary	salpingostomy	9	abortion→1 live birth
4	23	8	G0P0	2,000	ampullary	salpingotomy	18	1 live birth
5	24		G0P0	19,200	isthmic	salpingotomy	15	abortion→1 live birth
6	28	9	G3P0	32,000	isthmic	salpingotomy		
7	29	12	G0P0	1,024	ampullary	salpingostomy	15	1 live birth
8	23		G0P0	1,200	isthmic	salpingotomy	1	1 live birth
9	28		G0P0	80	ampullary	salpingotomy		
10	26	8	G1P0	9,600	fimbria	salpingostomy	24	repeated ectopic pregnancy
11	26	7	G0P0	2,400	fimbria	milking		
12	26	8	G0P0		ampullary	salpingostomy		
13	31	8	G1P0	9,600	ampullary	salpingotomy		
14	35	5	G1P1	19,200	isthmic	salpingotomy		unable to conceive (follow-up period < 6 months)
15	28	9	G0P0	512	ampullary	salpingotomy without suturing		
16	31	10	G1P1	512	ampullary	salpingotomy		
17	32	8	G2P1		ampullary	salpingotomy		

Table 2 Reproductive Performance of 10 Subjects in a Follow up of more than 12 months

	No. of Subjects		%
	Salpingotomy (n=7)	Salpingostomy (n=3)	
No conception	2	0	20
Conception	5	3	80
≥1 live birth	5	2	70
Abortion	1	1	20
Repeat ectopy	0	1	10

80% and seven subjects (70%) had at least one live birth (Table 2).

As a result of evaluation of tubal patency by HSG, good patency of the involved oviducts was recognized in 12 out of 16 examined cases and poor patency in one subject. Patency rate of the involved oviducts was 81.3% (13/16). While that in the contralateral oviducts was 92.9% (13/14) (Table 3).

### Discussion

Table 3 Results of evaluation of tubal patency by HSG after conservative surgery

Case No.	Tubal patency		Findings
	Involved tube	Contra-lateral tube	
1	Good	Good	
2	Good	Good	
3	Good	Good	
4	Good	Good	
5	Good	Good	
6	Good	Previous salpingectomy	
7	Good	Good	
8	not examined	not examined	
9	Obstruction	Good	Involved tube; Hydrosalpinx
10	Poor	Obstruction	Involved tube; perifimbrial adhesion
11	Good	Good	
12	Good	Good	
13	Obstruction	Previous salpingectomy	
14	Obstruction	Good	
15	Good	Good	
16	Good	Good	
17	Good	Good	

Patency rate of involved tube; 81.3% (13/16)

Patency rate of contra-lateral tube; 92.9% (13/14)

Traditionally, salpingectomy for tubal pregnancy has been the treatment of the first choice regardless of unruptured or ruptured tubal pregnancy. But salpingectomy resulted in a significant reduction in fertility, without a decrease in the rate of recurrent ectopic pregnancy<sup>5)</sup>.

Recently, improvement of diagnostic modalities and operative instruments has enabled a preservation of reproductive potential. The intrauterine pregnancy rate became higher after conservative surgery compared to salpingectomy<sup>2,5,7)</sup> (Table 4). But it is difficult to evaluate the ultimate utility of conservative surgery in the presence of a potentially normal contra-lateral fallopian tube. Regarding this, De Cherney et al reported the reproductive outcome of salpingostomy for ectopic pregnancy in the sole patent oviduct<sup>8)</sup>. Its term viable pregnancy rate was 53% and the recurrent ectopic pregnancy rate was 20%. Review of the other literature on conservative surgery of ectopic pregnancy rate reveals an intrauterine pregnancy rate of 55 to 57% and a recurrent ectopic pregnancy rate of 20 to 24% (Table 5). These results imply

Table 4 Pregnancy after Conservative Surgery

Author	Year	Patients desiring conception	No. Pregnancies (%)		
			Intrauterine	Ectopic	
Thornton (2)	Data collected from 22 literatures	1980~1990	269	157 (58%)	42 (16%)
Nager (6)	Data collected from 7 literatures	1986~1990	350	196 (56%)	58 (17%)
Vermesh (7)	Data collected from 8 literatures	1960~1986	527	(54%)	(13%)

Table 5 Results of Conservative Surgery for Tubal Pregnancy in Patients with Absent or Occluded Contralateral Fallopian Tubes

Author	Year	Patients desiring conception	No. Pregnancies (%)		
			Intrauterine	Ectopic	
Thornton (2)	Data collected from 22 literatures	1956~1987	167	91 (55%)	34 (20%)
Vermesh (7)	Data collected from 6 literatures	1972~1986	90	51 (57%)	22 (24%)

that a conservative surgery is an acceptable surgical technique for the treatment of tubal pregnancy.

The choice of surgical procedure depends on the location of the pregnancy. "Milking" or fimbrial evacuation is conducted when the pregnancy is located in a distal ampulla close to fimbrial site. This procedure is technically simple and Sherman et al reported intrauterine pregnancy rate of 92% by this procedure<sup>9</sup>. While Vermesh stated that the attempts at forcible expression will result in tubal damage and incomplete removal<sup>7</sup>. Thus, the effect on postoperative fertility is still controversial. Salpingotomy or salpingostomy is the recommended treatment for an unruptured ectopic pregnancy, and it is used in the isthmic or ampullary gestation, especially most suitable for ampullary pregnancy. But this procedure is controversial for isthmic pregnancy.

De Cherney et al reported that three out of four patients who underwent a linear salpingostomy for isthmic pregnancy had tubal occlusion and none of the four conceived<sup>10</sup>. The other six patients with isthmic gestation were managed by segmental resection and delayed microsurgical anastomosis and four of these

patients conceived. They concluded that segmental resection with either immediate or delayed anastomosis was preferable to linear salpingostomy in isthmic pregnancy. But, in our cases with isthmic ectopic pregnancy followed more than one year three out of five subjects conceived after salpingotomy. Therefore, we think a salpingotomy for the conservative management of unruptured isthmic ectopic pregnancy is worthy of attempt.

The procedure by which the removal of conceptus is made through an incision made on the antimesenteric surface of the oviduct containing the pregnancy is called "salpingotomy" or "salpingostomy". But, according to IFFS (International Federation of Fertility and Sterility) a salpingostomy means the surgical creation of a new tubal ostium. Therefore, in this study we call salpingostomy the procedure of making an incision to the fimbriated ostium and salpingotomy the procedure of making an incision only on the tubal surface over the pregnancy site.

Recently, Tulandi et al reported about outcome of tubal pregnancy by salpingotomy with or without tubal suturing<sup>11</sup>. According to the literature, intrauterine

pregnancy occurs earlier after salpingotomy without tubal suturing than those after salpingotomy with tubal suturing. It is possible that leaving the tubal incision open to heal by secondary intention allows better healing and facilitates return of tubal function. But further studies in relation to this problem are needed in the future.

In recent years local methotrexate (MTX) injection is performed for unruptured tubal pregnancy. We injected MTX (20 to 30 mg) into the tubal pregnancy site through the tubal wall by means of a 15 cm long spinal needle (18 to 20 gauge) introduced under laparoscopic guidance. As a result of MTX injection for seven tubal pregnancies, resolution was obtained in six subjects (85.7%), but in one subject salpingectomy by laparotomy was performed because of a further rise of hCG and appearance of symptom.

In our cases of MTX injection hCG value was 3,300iu/L (range 512 to 9,600iu/L) and length of time required for hCG levels to reach < 2iu/L ranged from 20 to 59 days (mean 35.8 days). Reviewing the literature in relation to MTX treatment, unsuccessful rate was 11.1%<sup>12)</sup>, 16.7%<sup>13,14)</sup> and 33%<sup>15)</sup>. Moreover, in 22 tubal pregnancies administered MTX intramuscularly, the resolution was obtained in 22/23 subjects (95.7%) but complete patency rate of tube was 52.6%.

Thus, there are still some problems to be solved in relation to the complete resolution of ectopic pregnancy.

### Summary

A conservative surgery was performed in 17 patients with unruptured tubal pregnancy. None of the patients underwent re-laparotomy, and an intra-uterine pregnancy rate and the patency was 80% and 81.3%, respectively. Conservative surgery is therefore an acceptable fertility-preserving treatment for tubal pregnancy.

### References

- 1) Vermesh M, Conservative management of ectopic gestation. *Fertil Steril* 51: 551, 1989
- 2) Thornton KL, Diamond MP, De Cherney AH, Linear Salpingostomy for Ectopic Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 18: 95, 1991
- 3) Ichinoe K, Wake N, Shinkai Y, Miyazaki Y, Tanaka T, Nonsurgical therapy to preserve oviduct function in patients with tubal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 156: 484, 1987
- 4) Pansky M, Bukovsky I, Golan A, Langer R, Schneider D, Arieli S, Caspi E, Local Methotrexate injection, A non surgical treatment of ectopic Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 161: 393, 1989
- 5) Lavy G, Diamond M, De Cherney AH, Ectopic pregnancy: its relationship to tubal reconstructive surgery. *Fertil Steril* 47: 543, 1987
- 6) Nager CW, Murphy AA, Ectopic Pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 34: 403, 1991
- 7) Vermesh M, Conservative management of ectopic gestation, *Fertil Steril* 51: 559, 1989
- 8) De Cherney AH, Maheaux R, Nattolin F, Salpingostomy for ectopic pregnancy in the sole patent oviduct: reproductive outcome. *Fertil Steril* 37: 619, 1982
- 9) Sherman D, Langer R, Herman A, Bukovsky I, Caspi E, Reproductive outcome after fimbrial evacuation of tubal pregnancy. *Fertil Steril* 47: 420, 1987
- 10) De Cherney AH, Boyers SP, Isthmic ectopic pregnancy: segmental resection as the treatment of choice. *Fertil Steril* 44: 307, 1985
- 11) Tulandi T, Guralnick M, Treatment of tubal ectopic pregnancy by salpingotomy with or without tubal suturing and salpingectomy. *Fertil Steril* 55: 53, 1991
- 12) Pansky M, Bukovsky I, Golan A, Langer R, Schneider D, Arieli S, Caspi E, Local methotrexate injection: A nonsurgical treatment of ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 161: 393, 1989
- 13) Ory SJ, Villanueva AL, Sand PK, Tamura RK, Conservative treatment of ectopic pregnancy with methotrexate. *Am J Obstet Gynecol* 154: 1299, 1986
- 14) Tulandi T, Bret PM, Atri M, Treatment of ectopic pregnancy by transvaginal intratubal methotrexate administration. *Obstet Gynecol* 77: 627, 1991
- 15) Fernandes H, Baton C, Lelaidier C, Frydman R, Conservative management of ectopic pregnancy: prospective randomized clinical trial of methotrexate versus prostaglandin sulprostone by combined transvaginal and systemic administration. *Fertil Steril* 55: 746, 1991

**未破裂卵管妊娠に対する保存手術**

長崎大学医学部産婦人科教室

石丸忠之 藤下 晃 Naseem Mahmud

山辺 徹

挙児希望の未破裂卵管妊娠17例に対し、保存手術を施行した。方法はmilking (1例)、salpingotomy (12例) およびsalpingostomy (4例) などであり、妊娠部位により、上述の手術方法が選択された。術前のhCG値は512～32,000 IU/Lであり、術後hCG値が測定不能になるま

での期間は平均15.6日(6～23日)であった。17例すべて、初回の手術操作で治癒し、再開腹を必要としたものは1例も認められなかった。術後に、17例すべてに、HSGを施行した結果、患側および対側卵管の開通率はそれぞれ81.3% (13/16) および92.9% (13/14)であった。術後1年以上を経過した10例のうち、7例に8回のlive birthが認められ、2例に流産および1例に同側の卵管妊娠の再発がみられた。

卵管妊娠に対する保存手術は安全かつ確実な方法であり、挙児希望例に対する有用な治療手段であること示唆された。

(受付：1992年7月23日)

(受理：1992年12月2日)

## 妊娠初期絨毛における補体および 補体制御因子の分布に関する検討

### Distribution of Complements and Complement Regulatory Factors in Chorion of Early Pregnancy

岡山大学産婦人科学教室

錦 織 恭 子

Kyoko NISHIKORI

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

近年、膜性補体制御因子の研究解析が進み、その生体内での役割、分布は次第に明らかとなってきたが、その妊娠初期絨毛での分布や役割は不明な点が多い。今回、我々は超音波検査にて胎児心拍を確認した5例の正常妊娠初期絨毛に対し補体(C1q, C3, MAC)と膜性補体制御因子(DAF, MCP, CD59)の分布を蛍光抗体法と酵素抗体法を併用し検討した。その結果、絨毛表面にC1q, C3, MACの存在は認められたが特異的な補体の活性化を示す様な分布は認めず、DAFは、syncytiotrophoblast(以下STと略)の細胞表面と、症例によりvillous cytotrophoblast(以下VCTと略)の細胞表面に存在を認め、MCPはST, VCTの両方の細胞表面に存在しCD59はSTの母体側のみに存在することが認められた。extra-villous trophoblastではDAF, MCP, CD59の存在が確認された。以上の事より、正常妊娠初期絨毛には、DAF, MCP, CD59等の複数の補体制御因子が存在し補体系の制御を行っている事が確認された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38(2), 111 - 117, 1993)

#### 緒 言

近年、補体の分解産物の作用やそのレセプター、補体の制御因子等が確認され補体系の生体における様々な機能が解明されつつある。補体活性化反応にはalternative pathwayとclassical pathwayが存在し、alternative pathwayは抗原抗体反応を必要とせず、細胞表面で反応を開始し細胞膜を障害、異物の排除を行う生体防御機構である<sup>1,2)</sup>。その反応は異物侵入後、抗体を介する反応を必要とせず速やかに発動する。さらにC3のレベルで生体内では常時活性化が起こっているために、この補体活性化から自己の細胞が如何にして防御を行っていたかが長い間注目されていた。近年この補体系に異物識別能力、すなわち自己細胞に沈着した補体の反応にのみ防御機構が働くという機構が発見され、解析されてきた。それが細胞表面に存在する膜性補体制御因子である。これ

らにはC3 convertaseの解離をおこしC3の活性化を抑制するDAF(decay accelerating factor)<sup>3,4)</sup>、Factor IとともにC3bを限定分解し、その活性化を遮断しC3の沈着を非可逆的に阻害するMCP(membrane cofactor protein)<sup>5,6,7)</sup>、MCPと同様にC3bの不活性化を起こすが、自己細胞に限定されないCR1<sup>8,9)</sup>と、MAC(membrane attack complex)の形成を阻害するCD59<sup>10,11,12)</sup>などが属するが、細胞の種類によって分布に差があることが確認されている。またclassical pathwayは抗原抗体反応に引き続く反応であるが、前述の補体制御因子は、この抗体の関与する免疫応答においても当然ながら補体系を制御している。母体にとって胎児成分はsemiallogenicであり、そこに働く免疫応答は常に興味深い問題であった。今回我々は妊娠現象に伴う免疫応答、特に補体系に関して母体成分と直接接触している絨毛組織を対象とし補体成分であるC1q, C3, MACおよび膜性補体制御因子

であるDAF, MCP, CD59の検討を加えた。方法としては操作が簡便でありかつ鋭敏である蛍光抗体法染色および組織構築の検討が容易な酵素抗体法染色を併用し、妊娠初期の絨毛組織を対象として補体制御因子(DAF, MCP, CD59)の分布に関して検討した。

### 対象および方法

#### 対象

超音波検査により異常が認められず、かつ週数相当の胎嚢または胎児および胎児心拍動が確認され、臨床症状にも異常を認めない妊娠7週の優生保護法に基づいて行った妊娠人工中絶症例5例から得られた正常絨毛組織を対象とした。これらの症例には自己免疫疾患、腎疾患、高血圧、糖尿病等の補体系および血管系に影響を与える合併症や習慣性流産等の既往は認められなかった。また、症例はいずれも正常分娩の既往をもっており平均年齢は32.0歳であった。なお、絨毛組織は患者の同意を得て研究に供した(表1)。

表1 対象症例

	年齢	妊娠回数	生児数	妊娠週数	胎児心拍
症例1	32	1	1	7	(+)
症例2	24	1	1	7	(+)
症例3	29	2	2	7	(+)
症例4	42	2	2	7	(+)
症例5	33	3	2	7	(+)

#### 方法：

##### 1. 検体処理

検体採取後直ちに生理的食塩水で余分な血液を洗浄し5~8mm程度に細切し、ドライアイス-エタノールで冷却したヘキサンによって急速に冷却固定を行った。そののち検体をヘキサンより取り出し、染色まで-80℃で保存した。

##### 2. 染色法

###### ① 蛍光抗体染色法

###### 1) 固定法

目的とする抗原によって単純凍結未固定標本とアセトン固定標本の二種類を作成した。C1q, C3など血清成分の除去を必要とする場合は単純凍結未固定標本とし、MAC, DAF, MCP, CD59など主に細胞膜表面に認められるであろうと考えられるものを対象とする場合はアセトン固定標本とした。

###### 2) 使用抗体

抗ヒトC1q山羊IgG抗体、抗ヒトC3山羊IgG抗体はMBL社製FITC bound polyclonal抗体を使用した。抗ヒトMACマウスIgG抗体は米国Quidel社製monoclonal抗体を使用し、抗DAF抗体は大阪大学微生物病研究所 木下タロウ教授より、抗MCP抗体は大阪成人病センター 瀬谷 司先生より、抗CD59抗体は、山之内製薬研究所 杉田雄二先生より、それぞれ提供をうけ使用した。また、第二抗体である抗マウス羊IgG抗体は米国Tago社製のヒト血清吸着済みfluorescein isothiocyanate (FITC) bound affinity polyclonal抗体を用いた。これらの抗体はいずれも使用時phosphate buffered saline (PBS) で40倍に希釈し用いた。

###### 3) 染色手技

###### a) 単純凍結未固定標本

前述のごとく処理、保存した標本をクリオスタットで6~10μmにスライスしたのち室温にて風乾を60分行い、PBSの中で5分間3回の洗浄を行った。ついで検体に各々のFITC標識抗体を添加し、モイストチェンバーにのせ30分静置した。その後、PBSの中で5分間3回の洗浄を行い余分な抗体を除去し、最後にグリセリンバッファーを使用し蛍光顕微鏡で検鏡を行った。コントロールとしてFITC抗体の代わりにPBSを使用し同様の操作を行った。

###### b) アセトン固定標本

標本をクリオスタットで6~10μmにスライスしたのち室温にて風乾を60分行い、アセトン固定を15分行った後でPBSで5分間3回の洗浄を行った。ついで検体に第一抗体を添加しモイストチェンバーにのせ30分静置しPBSのなかで5分間3回洗浄を行い余剰な抗体を除去した。つぎに第二抗体(Tagó社製)を加えモイストチェンバーにのせ30分静置しPBSで5分間3回の余剰な抗体の洗浄を行ったあと、グリセリンバッファーを添加し蛍光顕微鏡で検鏡した。第一抗体の代わりにPBSを使用したものと、第一抗体のかわりに正常マウス血清を使用したものに対し同様の染色操作を行いコントロールとした。

###### ② 酵素抗体染色法

MAC, DAF, MCP, CD59に関しては、蛍光抗体法で抗原の存在を確認した検体に対し酵素抗体染色を併用し組織分布をより詳細に検討した。

###### 1) 固定法

検体はすべて蛍光抗体法で用いたのと同様にアセトンにて固定を行った。

###### 2) 使用抗体および染色手技

第一抗体としては蛍光抗体染色で用いたものと同じ抗DAF抗体、抗CD59抗体、抗MCP抗体、抗MAC

抗体を使用した。酵素抗体法は米国Vector社製 Vectastain ABCキットおよびニチレイ(株)社製ヒストファインDAB基質キットを使用した。検体は低温下で6~10 $\mu$ mにスライスしたのち、風乾を60分行い、ついでアセトン固定を15分行った後PBSで5分間3回の洗浄を行った。そのうち、希釈正常血清を滴下し20分間反応後、余剰な血清を除去し第一抗体を滴下しモイストチェンバーの上で30分間室温で反応させた。そのうちPBSで10分間2回洗浄後、希釈ビオチン化第二抗体を滴下しモイストチェンバー上で30分間反応させた。PBSで10分間2回洗浄したあとABC試薬(アビジン+ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ)を反応させ約60分間静置し、PBSで10分間2回洗浄し、ヒストファインDAB基質キット(ペルオキシダーゼ基質)を滴下し検鏡しながら反応停止を行った。次いで水溶性ヘマトキシリンで核染色を行ったのち脱水封入を行った。また、endogenousなperoxidase活性は0.03% $H_2O$ -methanolによってblockしたが、0.03% $H_2O$ -methanolによる操作の影響を考慮して、同一検体にてこの操作を省略したものを同様

に染色し比較した。

## 結 果

### 1) C1q

C1qの分布は、絨毛表面やtrophoblastic cell column内部に局所的に認められたが全体としては殆ど沈着は認めなかった(図1)。

syncytiotrophoblast, cytotrophoblastにおける細胞特異的な沈着は特に認めなかった。

### 2) C3

C3の初期絨毛における分布も、絨毛表面やtrophoblastic cell column内部に局所的に認められたが(図2)、細胞特異的な分布は確認されなかった。

### 3) MAC

蛍光抗体法、酵素抗体法のいずれにおいてもMACは絨毛表面やtrophoblastic cell column内部に局所的に認められたが、C1q, C3と同様に補体系の特異的な活性化を示す沈着は確認されなかった。MACにおいて酵素抗体法の0.03% $H_2O$ -methanolによる操作の影響は認めなかった(図3, 4)。

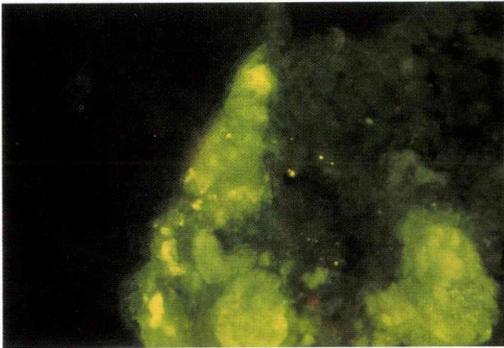


図1 C1qの沈着。

C1qの蛍光抗体による染色。局所的にこのような見られた。

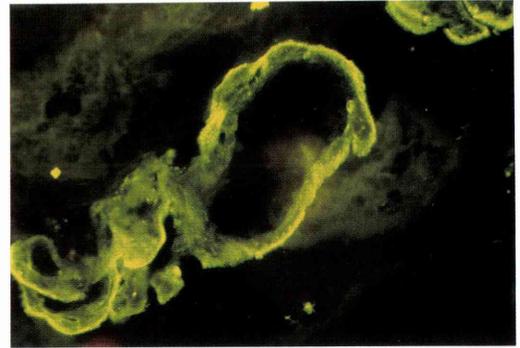


図3 MACの沈着。

MACの蛍光抗体による染色。局所的にこのような見られた。

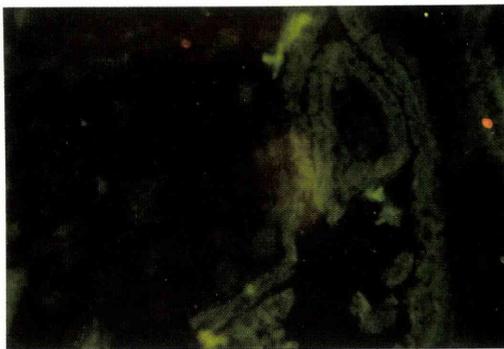


図2 C3の沈着。

C3の蛍光抗体による染色。局所的にこのような見られた。



図4 MACの沈着。

MACの酵素抗体による染色。局所的に沈着がみられるのみである。

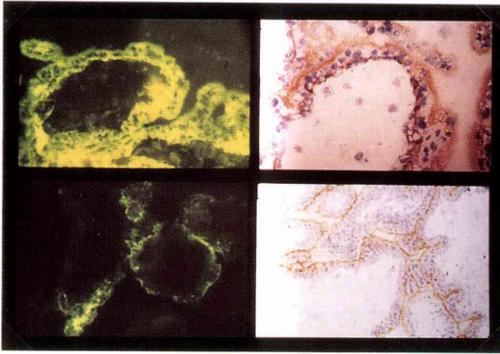


図5 DAFのvilliにおける分布.

上段はDAFの分布が相対的にcytotrophoblastに強い症例. syncytiotrophoblast, villous cytotrophoblastの両方の細胞表面への分布

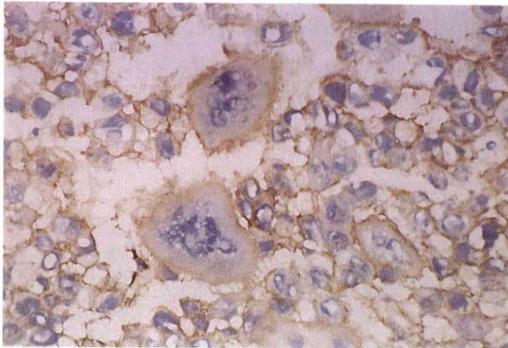


図6 DAFのextra-villous trophoblastでの分布.

extra-villous trophoblastではその細胞表面にDAFの分布が認められる. 酵素抗体法による染色.

#### 4) DAF (decay accelerating factor)

DAFの分布はsyncytiotrophoblast, villous cytotrophoblastの両方の細胞表面に認めた. その分布がvillous cytotrophoblastの側に強い症例が1例(図5上段) 相対的にsyncytiotrophoblastの側に強くみられ, villous cytotrophoblastには殆ど認められない症例が2例(図5下段), また同一検体中でsyncytiotrophoblastの側に強く認められる部位とvillous cytotrophoblastに強く認められる部位が混在する症例が2例あった. しかし, いずれの症例でもextra-villous trophoblastの細胞表面には比較的強い分布を認めた(図6). また, 全症例を通じてmesenchymal stromal cellには殆ど分布は認められなかった.

また, DAFの染色において0.03% $H_2O$ -methanolによる操作により, 染色パターンに変化は認められなかったが, 若干の染色性の低下が認められた. また, DAFの分布は蛍光抗体法と酵素抗体法にのいずれに

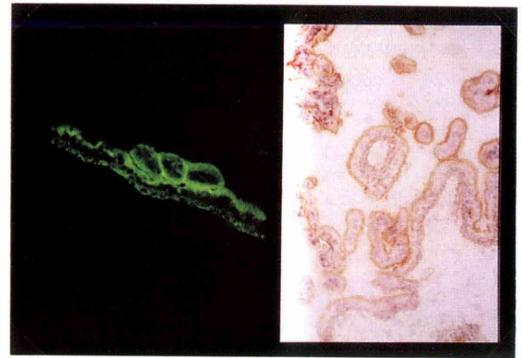


図7 MCPのvilliにおける分布.

VilliにMCPの分布を認める. syncytiotrophoblast, villous cytotrophoblastの両方の細胞表面への分布が認められる. 左が蛍光抗体法, 右は酵素抗体法.

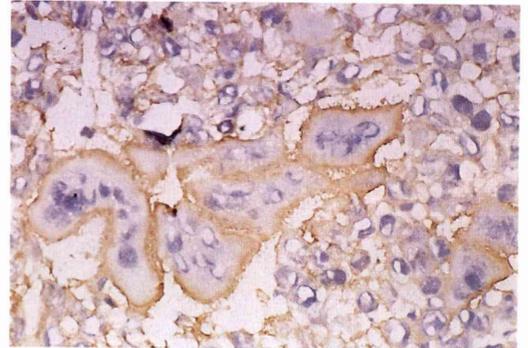


図8 MCPのextra-villous trophoblastでの分布.

extra-villous trophoblastではその細胞表面にMCPの分布が認められる. 酵素抗体法による染色.

おいても差は認められなかった.

#### 5) MCP (membrane cofactor protein)

MCPはsyncytiotrophoblast, cytotrophoblastの両方の細胞表面に均等な分布を示していた(図7). extra-villous trophoblastの細胞表面にも同様に分布を認めたが(図8) mesenchymal stromal cellには殆ど分布を認めなかった. なお, MCPの場合も0.03% $H_2O$ -methanolによる操作によって影響は認められなかった. またMCPの分布は蛍光抗体法と酵素抗体法のいずれの染色法においても差を認めなかった.

#### 6) CD59

syncytiotrophoblastの細胞表面に強い分布が認められたが, villous cytotrophoblastには殆ど分布が確認されなかった(図9).

extra-villous trophoblastの細胞表面には比較的強い分布を確認した(図10). mesenchymal stromal cellへの分布は殆ど確認されなかった. 尚, CD59の場合も



図9 CD59のVilliでの分布

VilliにCD59の分布を認める。おもにsyncytiotrophoblastの細胞表面、特に母体側への分布が認められる。左は蛍光抗体法、右は酵素抗体法による染色。

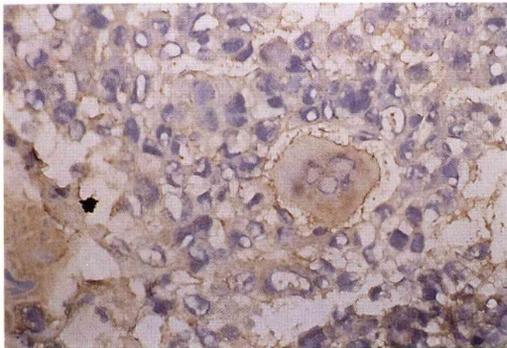


図10 CD59のextra-villous trophoblastでの分布。

extra-villous trophoblastではその細胞表面にMACIFの分布が認められる。酵素抗体法による染色。

表2 妊娠初期絨毛における補体制御因子の表出

	DAF	MCP	CD59
syncytiotrophoblast	±~++	+~+++	+++
villous cytotrophoblast	-~+++	+~++	-
extra-villous trophoblast	+~++	+~++	+~++
mesenchymal stromal cell	-	-	-

補体制御因子の各々の細胞に置ける染色性の強さを表現した。最も強いものを(+++)とし、全く染色されない場合を(-)で表現し四段階に評価した。

0.03% $H_2O$ -methanolによる操作により染色パターンに変化は認めなかったが、若干の染色性の低下を認めた。またCD59の分布は蛍光抗体法と酵素抗体法のいずれにおいても差を認めなかった(表2)。

考 察

補体の活性化経路、中でもalternative pathwayは抗体の関与なしに発動される生体内異物に対する最も初期の生体防御反応である。このalternative pathwayの活性化は一般にC3の活性化(C3b化)から始まるとされている。このC3の活性化は通常C3 convertaseによって増強される。しかし、そのほかにも液層で231時間の半減期で常時おきているC3と水の反応により生成されるC3b類似物質の活性化の経路も存在している<sup>13)</sup>。このC3の活性化に携わる反応は、classical pathwayおよびalternative pathwayのいずれの系においても補体系活性化の増幅回路であるだけでなく、その段階でアナフィラトキシンとなるC3a, C4aまたオプソニン作用をもつC3bなども産生する。

さらに、C5 convertaseの生成、それにとまう更に強力なアナフィラトキシンであるC5aの生成へと連鎖していく。従って、一連の補体およびその分解産物に関連する反応にとって、このC3 convertaseの制御は非常に重要なものである。それゆえに、この生体内でのC3bまたはC3 convertaseの不活化に対してはFactor I, CR1 やMCP, DAFなど複数の因子が関与し一連の補体活性化を制御している。その中でFactor Iのcofactorとして作用し、活性化された補体から細胞を保護しているMCPと、可逆的ではあるがC3 convertaseの分解を行い細胞を保護しているDAFは、CR1等と異なりこれらの因子の存在する細胞のみに働くと言う点で特徴的である。また、それにより自己に対する補体反応を制御し、結果として補体系の反応に一種の自己、非自己の認識を与えている。さらに、補体の活性経路alternative pathwayおよびclassical pathwayの共通産物で細胞障害最終産物であるMAC (C5-C9complex)の生成抑制も補体制御にとって重要である。MACは細胞膜を障害し細胞融解を引き起こす物質であるが、このMACの生成阻害を行う、いくつかの因子が近年確認されており<sup>10,11,12)</sup>、これらの生体における重要な役割が指摘されている。C3活性化を制御するDAF, MCP, CR1などとならんでこのMAC形成阻害因子が補体活性の二重の制御機構を形成し、補体からの生体の自己防御を行っていると考えられており、これらの因子は細胞の種類によって分布に差がみられることが報告されている。以上の事実より、本研究では正常妊娠初期絨毛において補体因子についてはC1q, C3, MACを、膜性補体制御因子についてはDAF, MCP, CD59に関し検討し局所の補体系の動態を総合的に把握する事を目的とした。その方法として今回我々は、手技として簡便で感度の高い蛍光抗体法および組織構

築の確認に適した酵素抗体法による染色を用いた。現在までに絨毛組織に関してはDAF, MCPおよびCR1の存在が検討されており<sup>14,15)</sup>、これらの報告はいずれも妊娠期間を初期と後期に分け比較している。しかし妊娠初期において胎児及びその附属物が正常であるとの完全な診断は困難である。そのため超音波検査による胎児心拍動が確認された妊娠の予後が良好である<sup>16)</sup>ことから、今回著者は経膈超音波にて胎児心拍の確認され、臨床経過にも特に問題を認めなかった妊娠7週の人工妊娠中絶例の絨毛を、患者の同意を得たのち採取し検討を行った。その結果、これらの症例では補体のC1q, C3, MACの絨毛への沈着は少なく、細胞の種類に関係なく局所的不規則な染色性が認められたにすぎなかった。このことから、人工中絶によって得られた正常妊娠初期絨毛では補体系はclassical pathway, alternative pathwayともに充分制御されていると考えられた。また、補体制御因子に関して、DAFはextra-villous trophoblast, syncytiotrophoblastの細胞表面には全例で確認されたが、villous cytotrophoblastには症例により確認されないものもみられ、MCPは全例においてextra-villous trophoblast, syncytiotrophoblast, villous cytotrophoblastの細胞表面に確認された。CD59は、extra-villous trophoblast, syncytiotrophoblastの表面には確認されたが、villous cytotrophoblastの細胞表面には確認されなかった。この結果より、興味深い事実をいくつかあげることができる。まずextra-villous trophoblast, syncytiotrophoblastの細胞表面にはDAF, MCP, CD59は全例に確認されていることである。これらの細胞は母体血または母体面に直接接していることから考慮すると、この補体制御因子の生体防御に置ける重要性、さらに妊娠の維持機構に関する重要性を示唆するものと考えられる。また、逆にこれらの補体制御因子の発現には母体、または母体血との接触が重要な因子である可能性も考えられた。もう一点は、DAFの分布に関して、MCPやCD59と異なりvillous cytotrophoblastで症例間に差が見られると言う点である。このDAFの分布に関しHsi<sup>14)</sup>らは妊娠初期のcytotrophoblast cellにおいても明かな分布を報告しており、それに対しHolmesら<sup>15)</sup>はDAFの分布はsyncytiotrophoblastの母体側にのみ認められ、妊娠初期ではその発現は弱いと報告している。この点では彼らの報告と著者の成績は若干異なっている。その理由としてまず、Hsiら<sup>14)</sup>が妊娠8~12週のを、Holmesら<sup>15)</sup>が6週から12週のをを用いてそれらを妊娠初期として一つにまとめて検討しているの

に対し、著者はすべて妊娠7週の検体に限定して検討している事が影響しているのではないと思われる。発生的にも、妊娠初期のvillous cytotrophoblastはsyncytiotrophoblast, extra-villous trophoblastへ分化、増殖し胎盤の完成とともに退化していくものと考えられ、同じ細胞でもその時期の細胞の状態によりDAFの発現に差がみられることは充分考えられる。このような妊娠初期絨毛でのDAFの発現のばらつきが固体差によるものであるのか、あるいはこの妊娠週数に特異的なものであるのかについては今後さらに検討を加える必要があろう。

## 結 語

妊婦血清の補体価の変化には様々な報告があり<sup>17,18)</sup>妊娠中の補体消費の亢進を報告しているものもある。また、子宮内での着床前の補体の活性化の報告<sup>19)</sup>もあり、その点でも局所における補体系の制御機構の解明は興味深い。今回、著者の検討の結果、正常妊娠初期の絨毛には膜性補体制御因子であるDAF, MCP, CD59の存在が確認された。補体はその分解産物やレセプターを介して抗体産生、アナフィラキシーの誘発、凝固系への影響など様々な生体反応に影響を及ぼしており、それ故、補体系の制御も単にMACの形成を阻害することのみが最終目的ではなく、検討がすすむに従い今後さらに多くの意味づけがなされるであろう。そして免疫学的な側面の注目されている妊娠の成立の機序、妊娠合併症等の病態においても、補体の反応あるいはその制御に関する問題は重要な課題となろう。

稿を終えるにあたり、本研究のご指導ならびに御校閲を賜った恩師工藤尚文教授に深く感謝の意を述べるとともに直接実験の指導を頂いた野間 純助手、清水健治博士、平川秀三助手、貴重なご助言を頂いた天野哲基講師に深謝致します。

## 文 献

- 1) 岡田秀親, 補体と生体防御. Annual Review免疫 1987 (菊池浩吉ほか編), 198, 中外医学社, 1987
- 2) 富田基郎, 杉田雄二, 補体第2経路因子群の構造と反応特異性. 蛋白質 核酸 酵素31: 847, 1986
- 3) Kinoshita T, Mefof ME, Nussenzweig V, Endogenous association of decay-acceleration factor with C4b and C3b on cell membranes. J Immunol 126: 3390, 1986
- 4) Nicholson-Weller A, Burge J, Fearou DT, Weller PF, Austen F, Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay

- accelerating activity for C3 convertase of complement system. *J Immunol* 192: 184, 1982
- 5) Seya T, Turner JR, Atkinson JP, Purification and characterization of a membrane protein (gp 45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J Exp Med* 163: 837, 1986
  - 6) Seya T, Ballard LB, Kuner VJ, Atkinson JP, Distribution membrane cofactor protein of complement human peripheral blood cells: An altered form is found on granulocytes. *Eur J Immunol* 18: 1289, 1988
  - 7) 瀬谷 司, 細胞性補体制御因子, membrane cofactor protein (MCP) の構造と機能. *北海道医学雑誌* 63: 259, 1988
  - 8) Fearon DT., Identification of membrane glycoprotein that is the C3b receptor of human erythrocyte, polymorphonuclear leucocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J Exp Med* 152: 20, 1980
  - 9) Weler JM, Daha MR, Austen KF, Featon DT, Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein  $\beta$  IH. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6596, 1976
  - 10) Okada N, Harada R, Fujita T, Okada H, Monoclonal antibodies capable of causing hemolysis of neuramotase-treated human erythrocytes by homologous complement. *J Immunol* 143: 2262, 1989
  - 11) Sugita Y, Nakano Y, Tomita M, Isolation from human erythrocytes of a new membrane of protein which inhibits the formation of complement channels. *J Biochem* 104: 633, 1988
  - 12) Zalman LS, Wood LM, Muller-Eberhard H, Isolation of a human erythrocyte membrane protein capable of inhibiting expression of homologous complement transmembrane channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6975, 1986
  - 13) Pangburn MK and Muller-Eberhard HJ, The alternative pathway of complement. *Springer Seminar Immunopathol* 7: 163, 1984
  - 14) Hsi B, Hunt JS, Atkinson JP, Differential expression of complement regulatory proteins on subpopulations of human trophoblast cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 19: 209, 1991
  - 15) Holmes CH, Simpson KL, Wainwright SD, Tate CG, Houlihan JM, Sawyr IH, Pogers IP, Spring FA, Anstee DJ, Tan-ner MJ, preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. *J Immunol* 144: 3099, 1990
  - 16) 福本 悟, 赤松信雄, 関場 香, B/M modeを用いた妊娠初期胎児心拍の検討. *産婦中四会誌* 1: 57, 1982
  - 17) Yasuhara M, Tamaki H, Converse change in serum level of immunoglobulins (IgG, A and M) and complement components (C 3, 4) during pregnancy. *臨床病理* 39: 1195, 1991
  - 18) Yamada K, pregnancy and complement. *clin Immunol* 15: 101, 1985
  - 19) Jin M, A functionally active complement system is present in uterine secretion of the mouse to implantation. *Am J Reprod Immunol* 26: 53, 1991

**Distribution of complements  
and complement regulatory factors  
in chorion of early pregnancy**

Kyoko NISHIKORI

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

The expression of complement regulatory factors (decay accelerating factor, membrane cofactor protein and membrane attack complex inhibition factor) and the deposit of complements (C1q, C3 and membrane attack complex) were investigated by immunofluorescence staining and enzyme antibody method in 5 human chorions at 7th week of pregnancy. The expression of decay accelerating factor (DAF) was always observed on syncytiotrophoblast and extra-villous trophoblast, but not always on villous cytotrophoblast. It was not observed on mesenchymal stromal cell. The expression of membrane cofactor protein (MCP) was always observed on syncytiotrophoblast, extra-villous trophoblast and villous cytotrophoblast. It was also negative on mesenchymal stromal cell. The membrane attack complex inhibition factor (CD59) was observed on syncytiotrophoblast and extra-villous trophoblast, but not on villous cytotrophoblast and mesenchymal stromal cell. The deposit of complements was observed on all components in all cases, but the expression was weak. The result suggested that complement system was clearly regulated by membrane complement regulatory factors at surface of chorion in early pregnancy. The existence of this regulation was considered to protect the chorion against the attack of maternal complements in the uterus.

(受付: 1992年10月6日)

(受理: 1992年12月2日)

## THE SECRETORY PATTERN OF GROWTH HORMONE AND RELAXIN IN HUMAN PREGNANCY

Katsuyoshi SEKI

Chieko MITSUI

Ichiro NAGATA

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

---

**Abstract:** Relaxin can stimulate growth hormone (GH) secretion in monkeys. While relaxin is rarely detectable sera in of nonpregnant women, it is readily detectable in sera of pregnant women. To evaluate the relationship between GH and relaxin secretion, we measured serum concentrations of GH and relaxin in women during three trimesters of pregnancy and at 6 weeks postpartum.

The GH concentrations were similar in the first trimester and postpartum, and significantly lower in the second and third trimesters than in the first trimester. Serum relaxin was undetectable postpartum. Serum relaxin levels were significantly lower in the second and third trimesters than in the first trimester. The parallel changes in serum GH and relaxin during pregnancy suggest but do not prove that relaxin may be one of the factors which stimulate GH secretion.

If this is the case, GH levels should be increased during pregnancy compared to the postpartum values, since serum relaxin was undetectable postpartum. However, serum GH levels were not increased in any of the three trimesters of pregnancy. Thus, relaxin is not likely to have a major role in the regulation of GH secretion during human pregnancy.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38( 2 ), 118 - 121, 1993)

---

### Introduction

Relaxin is an ovarian hormone known primarily for its action during pregnancy on the smooth muscle of the uterus and connective tissue of pubis symphysis and cervix.<sup>1)</sup>

There is also evidence that relaxin affects pituitary hormone secretion in animals. Cronin et al. reported that human relaxin increased cAMP levels in cultured anterior pituitary cells from rats.<sup>2)</sup> Sortino et al. found that relaxin stimulated prolactin (PRL) secretion from cultured rat anterior pituitary cells.<sup>3)</sup> Furthermore, relaxin infusion into cycling monkeys induced an increase in serum growth hormone (GH) and PRL.<sup>4)</sup>

It is not known whether endogenous relaxin is involved in the regulation of GH secretion in humans. While relaxin is rarely detectable in sera of nonpregnant women, it is readily detectable in sera of

pregnant women.<sup>5)</sup> And therefore, GH secretion should be increased in pregnant women compared to nonpregnant women, if endogenous relaxin stimulates GH secretion. During pregnancy, GH release after insulin induced hypoglycemia is decreased.<sup>6-8)</sup> GH response to arginine is also decreased in the third trimester of pregnancy.<sup>9-10)</sup> However, normal or increased GH response to arginine has been found in the first trimester of pregnancy.<sup>9,10)</sup> Furthermore, previous studies on basal GH levels during pregnancy yielded inconsistent results.<sup>6-11)</sup> Thus, a reliable pattern of GH secretion has yet to be established during pregnancy. To further evaluate the pattern of change in serum GH level during pregnancy and to determine whether any relationship exists between serum GH and relaxin levels, we measured serum GH and relaxin levels in 16 women longitudinally during three trimesters of pregnancy and at 6 weeks postpartum.

## Materials and Methods

The study population consisted of 16 non-obese women, ranging in age from 23 to 29 years. Twelve were nulliparous and four were multiparous. All patients experienced uncomplicated pregnancies of duration between 38 and 41 weeks from the onset of the last menstruation. They received no medication except for ferrous sulfate.

Blood samples were collected by antecubital venipuncture in the morning after an overnight fast and at least 30 min bed rest.

The samples were obtained during the three trimesters of pregnancy, and at 6 weeks postpartum. The mean gestational week for the first trimester was 11 (range 5-16 weeks), for the second trimester was 23 (range 17-28 weeks) and for the third trimester was 35 (range 29-39 weeks).

Serum GH was determined by a highly specific and sensitive immunoradiometric assay with kits obtained from Daiichi Radioisotope Laboratory (Tokyo, Japan). No cross-reaction was found with human placental lactogen (hPL) ( $10 \mu \text{g/ml}$ ), human chorionic gonadotropin ( $1,000 \text{ IU/ml}$ ), PRL ( $10 \mu \text{g/ml}$ ), thyrotropin ( $50 \mu \text{U/ml}$ ), follicle stimulating hormone ( $100 \text{ mIU/ml}$ ), luteinizing hormone ( $100 \text{ mIU/ml}$ ), and 20 K GH ( $10 \mu \text{g/ml}$ ). The sensitivity of the assay was  $0.1 \text{ ng/ml}$ . The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.5 and 6.3%, respectively.

Relaxin was measured by radioimmunoassay<sup>12,13</sup> with  $^{125}\text{I}$ -labeled polytyrosyl-relaxin and rabbit antiporcine relaxin serum R6, as previously described.<sup>14</sup> The sensitivity of the assay was  $200 \text{ pg/ml}$ . The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6.6 and 9.3%, respectively. Statistical analyses were performed using analysis of variance.

## Results

The GH concentrations in the first trimester were similar to the postpartum values (Table 1). The GH concentrations were lower in the second (not significant) and third trimesters ( $p < 0.01$ ) of pregnancy compared to the postpartum values. The GH concentrations were significantly lower in the second and third trimesters than in the first trimester ( $p < 0.01$ ).

Serum relaxin was detectable in three trimesters of

Table 1. Serum GH and relaxin levels in three trimesters of pregnancy and 6 weeks postpartum (n=16)

	GH (ng/ml)	relaxin (ng/ml)
Postpartum	$2.9 \pm 1.3$	undetectable
1st trimester	$3.9 \pm 2.7$	$0.70 \pm 0.09$
2nd trimester	$1.9 \pm 1.0^a$	$0.54 \pm 0.07^a$
3rd trimester	$1.2 \pm 0.6^{a,b}$	$0.55 \pm 0.09^a$

Values are mean  $\pm$  SD.

<sup>a</sup> $p < 0.01$  vs 1st trimester, <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs postpartum.

pregnancy, but not 6 weeks postpartum (Table 1). The concentrations of relaxin were significantly lower in the second and third trimesters than in the first trimester ( $p < 0.01$ ). The serum relaxin level did not correlate with the GH level in any of the three trimesters, though it correlated with the GH level when all data during pregnancy and postpartum were combined ( $r = 0.48$ ,  $n = 64$ ,  $p < 0.01$ ).

## Discussion

Previous studies on basal GH levels during human pregnancy yielded inconsistent results.<sup>6-11</sup> This may be ascribed, at least in part, to the limitations of traditional radioimmunoassays. hPL cross-reacted in most radioimmunoassays for GH. More recently, a GH-like antigen of probably placental origin was found in sera of pregnant women.<sup>15</sup> In the present study, we measured serum GH levels using a highly specific immunoradiometric assay. Serum GH levels were lower in the second and third trimesters than in the first trimester. This is in keeping with the results of Frankenne et al. who measured serum GH levels in pregnant women using two highly specific monoclonal antibody-based GH radioimmunoassays.<sup>15</sup> They reported that serum GH levels progressively decreased during the second half of pregnancy and that a pregnancy-associated GH-like antigen appeared in the circulation at midpregnancy and increased thereafter. Thus, pituitary GH secretion appears to decrease during the second and third trimesters of pregnancy.

Relaxin can stimulate GH secretion in monkeys.<sup>4</sup> In keeping with the results of other reported studies, relaxin levels were lower in the second and third trimesters compared to the first trimester.<sup>5,16,17</sup> Thus, the

pattern of serum GH level was similar to that of relaxin during pregnancy. The parallel changes in serum GH and relaxin suggest but do not prove that relaxin may be one of the factors which stimulate GH secretion in women. If this is the case, GH levels should be increased during pregnancy compared to the postpartum values, since serum relaxin was undetectable at 6 weeks postpartum.

There is indirect evidence that hPL inhibits GH secretion.<sup>9,18)</sup> hPL may inhibit pituitary GH secretion in late pregnancy when relaxin levels are relatively low. Thus, the stimulatory effect of relaxin on GH secretion may be overridden by the inhibitory effect of hPL in late pregnancy. However, it is difficult to explain the unincreased GH level in early pregnancy, since the relative concentration of hPL is low and that of relaxin is high at this time. Thus, it is unclear whether the parallel changes in GH and relaxin during pregnancy are causally related, and relaxin is not likely to have a major role in the regulation of GH secretion during human pregnancy.

### References

- 1) Sherwood OD, Relaxin. In the physiology of Reproduction, Edited by E. Knobil and J. D. Neill, P. 585, New York, Raven Press, 1988
- 2) Cronin MJ, Malaska T and Bahkit C, Human relaxin increases cyclic AMP levels in cultured anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 1246, 1987
- 3) Sortino MA, Cronin MJ and Wise PM, Relaxin stimulates PRL secretion from cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology* 124: 2013, 1989
- 4) Bethea CL, Cronin MJ, Haluska GJ and Novy MJ, The effect of relaxin infusion on prolactin and growth hormone secretion in monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 956, 1989
- 5) O'Byrne EM, Carriere BT, Sorensen I, Segaloff A, Schwabe C and Steinetz BG, Plasma immunoreactive relaxin levels in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 1106, 1978
- 6) Spellacy WN and Buhi WC, Pituitary growth hormone and placental lactogen levels measured in normal term pregnancy and at the early and late postpartum periods. *Am J Obstet Gynecol* 105: 889, 1969
- 7) Spellacy WN, Buhi WC and Birk SA, Human growth hormone and placental lactogen levels in midpregnancy and late postpartum. *Obstet Gynecol* 36: 238, 1970
- 8) Yen SSC, Vela P and Tsai CC, Impairment of growth hormone secretion in response to hypoglycemia during early and late pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 31: 29, 1970
- 9) Tyson JE, Rabinowitz D, Merimee TJ and Friesen H, Response of plasma insulin and human growth hormone to arginine in pregnant and postpartum females. *Am J Obstet Gynecol* 103: 313, 1969
- 10) Samaan NA, Goplerud CP and Bradbury JT, Effect of arginine on plasma levels of growth hormone, insulin, and glucose during pregnancy and the puerperium. *Am J Obstet Gynecol* 107: 1002, 1970
- 11) Kletzky OA, Rossman F, Bertolli SI, Platt LD and Mishell DR, Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin, and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 151: 878, 1985
- 12) Sherwood OD, Rosentreter KR and Birkhimer ML, Development of radioimmunoassay for porcine relaxin using <sup>125</sup>I-labeled polytyrosyl-relaxin. *Endocrinology* 96: 1106, 1975
- 13) O'Byrne EM and Steinetz BG, Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum for porcine relaxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 272, 1976
- 14) Seki K, Uesato T, Tabei T and Kato K, Serum relaxin in patients with hydatidiform mole. *Obstet Gynecol* 76: 381, 1986
- 15) Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J and Hennen G, The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 1171, 1988
- 16) Szlachter BN, Quagliarello J, Jewelewicz R, Ostamondh R, Spellacy WN and Weiss G, Relaxin in normal and pathogenic pregnancies. *Obstet Gynecol* 59: 167, 1982
- 17) Seki K, Uesato T, Tabei T and Kato K, The secretory pattern of relaxin and human chorionic gonadotropin in human pregnancy. *Endocrinol Japon* 32: 741, 1985
- 18) Grumbach MM, Kaplan SL, Sciarra JJ and Burr IM, Chorionic growth hormone-prolactin (CGP): Secretion, disposition, biologic activity in man, and postulated function as the "growth hormone" of the second half of pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 148: 501, 1968

## 妊娠時の成長ホルモンおよびリラキシンの 分泌パターン

防衛医科大学校産科婦人科

関 克義 三井千恵子 永田一郎

サルにおいて成長ホルモンの分泌がリラキシンによって刺激されることがある。リラキシンは非妊婦の血清中にほとんど検出されないが、妊婦の血清中に容易に検出される。成長ホルモンとリラキシンの分泌の関係について検討すべく、われわれは妊娠初期、中期、後期、および産褥期に成長ホルモンおよびリラキシンの血清濃度を測定した。妊娠中期および後期において成長ホルモン濃度は妊娠初期に比して有意に低

かった。血清リラキシンは産褥期に検出されなかった。妊娠中期および後期において血清リラキシンは妊娠初期に比して有意に低かった。妊娠中に血清成長ホルモンとリラキシンが平行して変化したことはリラキシンが成長ホルモン分泌を刺激する諸因子の一つであることを示唆するが、証明するものではない。もしそうであれば、産褥期に血清リラキシンが検出されないから、妊娠時の血清成長ホルモンは産褥期に比して増加していることが考えられる。しかし、血清成長ホルモンは妊娠中どの時期でも増加していなかった。したがって、妊娠時にリラキシンは成長ホルモン分泌の調節において重要な役割を果たしている可能性は少ない。

(受付：1992年8月4日)

(受理：1992年12月2日)

# 人工妊娠中絶が初産の妊娠・分娩経過に及ぼす影響について

## The Influence of Artificial Abortion on Pregnancy and Delivery of Primipara Women

昭和大学藤が丘病院産婦人科

宮川 善二郎 Zenjiro MIYAKAWA	清水 篤 Atushi SHIMIZU	田口 敦 Atushi TAGUCHI
田村 和司 Kazushi TAMURA	船津 雅幸 Masayuki FUNATU	羽田 義信 Yoshinobu HADA
木村 武彦 Takehiko KIMURA	野嶽 幸正 Yukimasa NOTAKE	

Department of Obstetrics and Gynecology,

Fujigaoka Hospital, Showa University School of medicine, Yokohama 227, Japan

[目的] 人工妊娠中絶が単胎・初産の妊娠・分娩に及ぼす影響について検討した。

[方法] 平成3年(1991年)の当院分娩計より検討し、検定にはunpaired Student's t-test及び $\chi^2$ 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

[結果] 初産婦461例中、中絶経験なし群は、85.0%、中絶経験あり群は15.0%だった。妊娠経過では、切迫早産が中絶経験なし群3.6%、中絶経験あり群10.1%で中絶経験あり群で有意に増加したが( $p < 0.05$ )、最終的な早産の頻度には有意差を認めなかった。分娩経過では、分娩時出血が中絶経験なし群 $256 \pm 199$ ml (mean  $\pm$  SD)、中絶経験あり群 $323 \pm 268$ mlで中絶経験あり群で有意に増加した( $p < 0.05$ )。

[結論] 人工妊娠中絶は、単胎・初産の妊娠経過においては切迫早産の頻度を増加させ、分娩経過においては分娩時出血量を増加させる可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 122 - 125, 1993)

### 緒 言

人工妊娠中絶手術は、安全で確実に施行できるよう多くの研究・報告があるが、中絶手術がその後の妊娠・分娩にどのような影響を及ぼすかについては必ずしも明らかではない。そこで、この点について統計的検討を加え考察した。

### 方 法

対象は、平成3年1月1日より12月31日までの1年間に当院で分娩した単胎の初産婦の461例を解析した。検定には、unpaired Student's t-test及び $\chi^2$ 検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

### 成 績

1) 中絶回数から見た初産婦の内訳：中絶経験なし392例(85.0%)、中絶1回53例(11.5%)、中絶2回11例(2.4%)、中絶3回5例(1.1%)で、中絶なし群( $n = 392$ )と中絶あり群( $n = 69$ )の対象妊婦の背景は表1に示したが、年齢・身長・非妊娠時体重に有意差は認めなかった。以下2)～5)の検討結果を表2に示す。

2) 胎児の性差・自然流産回数：胎児の性差は、男児が中絶なし群で、51.3%、中絶あり群で、59.4%で、中絶あり群で男児の増加傾向を認めたが有意差とはならなかった。自然流産回数は、中絶なし群は、

表1 対象となった妊婦の背景

	中絶なし群 (n=392)	中絶あり群 (n=69)
分娩回数(回)	0	0
年齢(歳)	28.2±4.0	28.9±4.6
身長(cm)	158.2±4.8	157.7±6.0
非妊娠時体重(kg)	50.5±6.5	49.7±5.8
分娩週数(週)	39.1±1.4	39.3±1.4

(mean±SD)

表2 人工妊娠中絶が妊娠経過に及ぼす影響

	中絶なし群 (n=392)	中絶あり群 (n=69)
男児の比率(%)	51.3	59.4
自然流産回数(回)	0.14±0.38	0.13±0.41
前期破水(%)	22.4	17.4
切迫早産入院(%)	3.6	10.1*
早産(%)	4.3	4.4
重症妊娠中毒症(%)	2.3	4.3
骨盤位(%)	4.8	2.9
帝王切開(%)	9.4	10.1

(mean±SD)  
\*:p<0.05

0.14±0.38回(mean±SD), 中絶あり群0.13±0.41回で有意差を認めなかった。

3) 前期破水・切迫早産入院・早産の頻度：前期破水は、中絶なし群で、22.4%、中絶あり群で、17.4%で有意差を認めなかった。切迫早産入院は、中絶なし群で、3.6%、中絶あり群で、10.1%で、中絶あり群で有意に増加した(p<0.05)。しかし、早産は、中絶なし群で、4.3%、中絶あり群で、4.4%で有意差を認めなかった。

4) 妊娠中毒症(重症)の頻度：中絶なし群で、2.3%、中絶あり群で、4.3%で有意差を認めなかった。

5) 骨盤位・帝王切開の頻度：骨盤位は、中絶なし群で、4.8%、中絶あり群で、2.9%で有意差を認めず。帝王切開は、中絶なし群で、9.4%、中絶あり群で、10.1%で有意差を認めなかった。

次に、正産期・経陰分娩について、中絶なし群(n=341)と中絶あり群(n=60)について検討した。対象妊婦の背景は表3に示したが、年齢・身長・非妊娠時体重・分娩時体重に有意差は認めなかった。以下6)～9)の検討結果を表4に示す。

表3 対象となった正産期の妊婦の背景

	中絶なし群 (n=341)	中絶あり群 (n=60)
分娩回数(回)	0	0
年齢(歳)	28.0±4.0	28.8±4.6
身長(cm)	158.4±4.8	158.5±6.0
非妊娠時体重(kg)	50.5±6.5	50.1±5.7
分娩時体重(kg)	60.6±7.2	60.4±6.8

(mean±SD)

表4 人工妊娠中絶が正産期の分娩経過に及ぼす影響

	中絶なし群 (n=341)	中絶あり群 (n=60)
新生児体重(g)	3,082±358	3,125±358
分娩時間(分) (陣痛開始～胎盤娩出まで)	760±425	877±470
陣痛誘発(%)	12.3	18.3
陣痛促進(%)	25.5	36.7
吸引分娩(%)	1.8	5.0
分娩時出血量(ml) (陣痛開始～胎盤娩出後2時間の合計)	256±199	323±268*

(mean±SD)  
\*:p<0.05

6) 正産期での新生児の出生時体重：新生児の体重は、中絶なし群では、3,082±358g、中絶あり群では、3,125±362gで有意差を認めなかった。

7) 正産期での分娩時間、陣痛誘発・促進の頻度：分娩時間を陣痛開始から胎盤娩出までの時間とすると、中絶なし群は、760±425分、中絶あり群は、877±470分で、中絶あり群で分娩時間の延長傾向を認めたが有意差とはならなかった。当院では自然分娩を原則としており、産科的適応がないかぎり陣痛誘発は施行しないが、予定日超過に対しては妊娠42週以前に陣痛誘発を施行している。陣痛誘発は、中絶なし群で、12.3%、中絶あり群で、18.3%で有意差を認めず。陣痛促進は、中絶なし群で、25.5%、中絶あり群で、36.7%で有意差を認めなかった。

8) 正産期での吸引分娩の頻度：中絶なし群で、1.8%、中絶あり群で、5.0%で増加傾向を認めたが有意差を認めなかった。

9) 正産期での分娩時出血量：分娩時出血量を、陣痛開始から胎盤娩出後2時間までの出血量の合計とすると、中絶なし群で、256±199ml、中絶あり群で、

323±268mlで、中絶あり群で有意に増加した(p<0.05)。

## 考 察

不妊症の妊婦が妊娠した場合の妊娠・分娩経過についてはすでに報告があるが<sup>1)</sup>、不妊症の原因により様々な結果がでることが予想される。また、自然流産後は、子宮内容除去術など人為的影響が加わるために、妊娠・分娩経過に及ぼす影響はより複雑なものとなるのが考えられる。

最近では母体の高齢化・少産化が進む一方、特に若年妊娠の増加と若年妊娠における人工妊娠中絶の増加が指摘されている<sup>2)</sup>。日本では人工妊娠中絶は、1948年(昭和23年)優生保護法の成立により合法化され、その後2回改正され今日にいたっている<sup>3)</sup>。人工妊娠中絶手術の際の子宮穿孔や手術後の感染など短期的な合併症はよく知られているが、長期的な次回以降の妊娠・分娩に及ぼす影響については、必ずしも明らかでない。そこで、当院の分娩統計<sup>4)</sup>より、人工妊娠中絶の既往を持つ妊婦と、既往を持たない妊婦についてretrospectiveに検討したが、1病院の1年間の分娩統計からの結果であることを最初に明記したい。

統計解析値からは、妊娠経過では自然流産・骨盤位・前期破水・重症妊娠中毒症の発症、分娩経過では陣痛誘発・促進、新生児の性別・出生時体重・帝王切開の頻度などは、ほとんど影響を受けていないものと考えられる。

統計的に有意とは判定されなかったが、分娩経過については、中絶経験のある妊婦では分娩時間の延長傾向が見られた。分娩時間には様々な因子が影響を及ぼしていることを当院の分娩統計の解析から報告したが、最も影響を及ぼすのは分娩回数(初産・経産の別)に見られる産道因子だった<sup>5)</sup>。母体の年齢・体格や新生児の出生時体重にはほとんど差がないことから、分娩時間の延長は産道の開大遅延による可能性が疑われる。中絶経験のある妊婦では吸引分娩の頻度も有意差はないが増加傾向を示しており、今回の結果は最終的に遷延分娩や胎児仮死が増加し難産となりやすいことを暗示している。

人工妊娠中絶の有無が、統計的に有意な影響を及ぼしていると判定された因子としては、中絶経験のある妊婦では切迫早産で入院した妊婦が有意に増加していた。早産した妊婦に関する他の検討では、すでに人工妊娠中絶の既往が危険因子として報告されている<sup>6)</sup>。しかし、今回の結果では、最終的な早産

の頻度に差がないことから、妊婦検診等で早期に症状を把握し、適切な入院管理を行えば早産を予防することは十分可能と考えられる。また、中絶経験のある妊婦では分娩時出血量が有意に増加していた。分娩時出血量には様々な因子が影響を及ぼしていることを報告したが<sup>7)</sup>、母体の年齢・体格や新生児の出生時体重にはほとんど差がないことから、直接的には陣痛の変調が分娩時出血量の増加した主な原因ではないかと考えられる。

人工妊娠中絶手術の際に、子宮頸管を強引に拡張すると次回以降の妊娠・分娩経過に悪影響を及ぼすことが指摘されている<sup>8)</sup>。しかし、最近ではRU486等の薬剤による人工妊娠中絶も試みられており<sup>9)</sup>、中絶方法により異なった結果も考えられる。今回の当院における統計的検討から人工妊娠中絶の既往のある初産婦については、切迫早産や分娩時出血量の増加を念頭において対処する必要が示唆された。今後さらに大規模集団での多角的でprospectiveな検討が必要と考えられる。

## 文 献

- 1) Li TC, MacLeod I, Singhal V and Dunvan SLB, The obstetric and neonatal outcome of pregnancy in women with a previous history of infertility: a prospective study. *Br J Obstet Gynaecol* 98: 1087, 1991
- 2) 厚生省児童家庭局母子衛生課監修, 母子衛生の主要なる統計. P69, 財団法人母子衛生研究会, 1991
- 3) 石原 力, 優生保護法の歴史. *産婦人科治療* 53: 391, 1986
- 4) 宮川善二郎 田口 敦 田村和司 船津雅幸 羽田義信 清水 篤 木村武彦 野嶽幸正, 平成3年(1991年)の当院分娩統計の紹介. *日産婦神奈川会誌* 29: 180, 1993
- 5) 宮川善二郎 田口 敦 田村和司 船津雅幸 羽田義信 清水 篤 木村武彦 野嶽幸正, 分娩時間に影響を及ぼす諸因子の解析: 平成3年(1991年)の当院分娩統計より. 第3報, *日産婦神奈川会誌* 29: 193, 1993
- 6) de Haas I, Harlow BL, Cramer DW and Frigoletto FD, Spontaneous preterm birth: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1290, 1991
- 7) 宮川善二郎 田口 敦 田村和司 船津雅幸 羽田義信 清水 篤 木村武彦 野嶽幸正, 分娩時出血量に影響を及ぼす諸因子の解析: 平成3年(1991年)の当院分娩統計より. 第2報, *日産婦神奈川会誌* 29: 189, 1993
- 8) Cunningham GF, MacDonld PC and Gant NF,

Consequences of elective abortion, in Williams Obstetrics, 18th ed. 506, Appleton & Lange Co., 1989

- 9) Grimes DA, Mishell, Jr DR, Shoupe D and Lacarra M, Early abortion with a single dose of the antiprogesterin RU-486. Am J Obstet Gynecol 158: 1307, 1988

### **The influence of artificial abortion on pregnancy and delivery of primipara women**

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Fujigaoka Hospital,  
Showa University School of medicine,  
Yokohama, Japan

Zenjirou Miyakawa, Atushi Shimizu,  
Atushi Taguchi, Kazushi Tamura,  
Masayuki Funatu, Yoshinobu Hada,  
Takehiko Kimura and Yukimasa Notake

The influence of artificial abortion on pregnancy and delivery of primipara women was studied from 1991 an-

nual obstetrical statistics of Fujigaoka hospital. 85.0% of 461 primipara women had not experienced artificial abortion, but 15.0% of them had experienced artificial abortion once or more times.

The incidence of threatened preterm delivery was increased significantly ( $p < 0.05$ ). 10.1% of women with experience of artificial abortion needed the admission because of threatened preterm delivery, but the rate of admission of women with no experience was only 3.6%. The final incidence of preterm delivery was unchanged between the two groups.

Parturitional blood loss of women with experience of artificial abortion was  $323 \pm 268$ ml (mean  $\pm$  SD). This was significantly increased compared with the blood loss ( $256 \pm 199$ ml) of women with no experience ( $p < 0.05$ ). The other factors in this study presented no significant differences.

These data suggested that artificial abortion affected the incidence of threatened preterm delivery and parturitional blood loss.

(受付: 1992年7月22日)

(受理: 1992年12月2日)

## 凍結・融解胚移植の臨床応用の有用性の検討

### The Benefits of Clinical Use of Transferring Cryopreserved-Thawed Early Embryos

神戸大学医学部産科婦人科学教室

山 辺 晋 吾  
Shingo YAMABE

山 口 聡  
Satoshi YAMAGUCHI

片 山 和 明  
Kazuaki KATAYAMA

望 月 眞 人  
Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kobe University, School of Medicine, Kobe 650, Japan

恵生産婦人科病院

古 川 和 典  
Kazunori FURUKAWA

林 正 人  
Masato HAYASHI

林 茂 樹  
Shigeki HAYASHI

林 要  
Kaname HAYASHI

Keisei Obstetric and Gynecological Hospital,  
Takamatsu 760, Japan

---

凍結・融解胚移植につきその臨床的有用性をfreshなIVF-ETとの比較において検討した。

IVFあるいはGIFTを目的として採卵した107周期のうち、余剰胚があり、患者の同意が得られた18周期の胚を凍結保存した。胚の凍結は前核期に行ない、凍結保護剤としてはPROHとsucroseを用いた。

現在までに12周期分49個の胚を融解し、追加培養により32個の胚が分割した(65.3%)。凍結、融解胚の分割率はfreshなIVFでの胚の分割率(77.7%)と有意の差はなかった。10周期に融解胚の移植を行ない、5周期に妊娠が成立した。胚移植あたりの妊娠率は凍結、融解胚では50%であり、一方freshな胚移植では33.0%であった。

胚の凍結保存は採卵周期あたりの胚移植の機会、つまり妊娠の機会を増加させることができるばかりでなく、着床条件の良い自然排卵周期での胚移植を可能にするという面でも有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (2), 126 - 133, 1993)

---

#### 緒 言

体外受精胚移植の技術の進歩に伴い、不妊症治療、および治療方針は大きく変化しつつある。しかし、いまだ、受精や着床の詳細に関しては解明されていない部分も多く、体外受精の成功率は十分に満足できるものではない。また、この治療による患者の肉体的、精神的、経済的負担も大きい。

凍結胚移植を臨床に応用することにより、採卵周期あたりの胚移植の機会を増加させることができる。これは妊娠の機会の増加を意味し、結果的に体外受精を受ける患者の諸種負担の軽減につながるものであると考えられている<sup>1-5)</sup>。

今回、我々の施設における凍結胚移植による第1号の分娩例を得ることができた。これを機会に胚の凍結保存および融解胚移植の臨床応用の有用性につ

き検討してみた。

### 対象・方法

#### 1. 対象

1991年に恵生産婦人科病院において体外受精(IVF)を目的として64症例88周期に、配偶子卵管内移植(GIFT)を目的として17症例19周期に採卵を施行した。これらの採卵周期のうち、余剰胚が3個以上あり、患者が希望した17症例18周期に胚の凍結保存を行なった。凍結保存した胚のうち、11症例12周期の凍結胚の融解を行ない、9症例10周期に胚移植を行なった。

また、1990年、91年に恵生産婦人科病院で施行したIVF89症例136周期を凍結、融解胚移植周期との比較の対照とした。刺激に対する卵巣の反応性の指標としてhCG投与時のEstradiol (E<sub>2</sub>)と採卵数を用い、卵巣の反応性と胚移植あたりの妊娠率の検討もあわせて行なった。

#### 2. 体外受精

IVFあるいはGIFTのための卵巣刺激はすべてGnRH analogue (buserelin acetate: Sprecur, ヘキストジャパン) + HMGで行なった。卵巣機能にまったく異常のなかった症例についてはshort protocol法で卵巣刺激を行なった。その他の症例は黄体中期よりGnRH analogue 900 μg/dayを用い、月経周期第3日より、HMG (Humegon, 日本オルガノン)あるいはpure FSH (Fertinome P, セロノジャパン) 225IU/dayを連日筋注するlong protocolで行なった。なお、胚を凍結保存した周期はいずれもlong protocolの周期であった。

平均卵胞径が18mm以上の卵胞が2個以上になった時点でHMGを中止し、最後のHMGから約36時間後にhCG 10000IUを筋注した。その34時間後に経陰超音波(横河メディカルシステム, RT3600)下で採卵を行なった。

IVF周期では採取した卵のうち、成熟卵には6時間の前培養の後、卵あたり5万~20万の精子を媒精した。未成熟卵は前培養を続け、成熟したと判定した時点で媒精した。媒精後12時間で受精の確認を行ない、two pronuclei (2PN)の確認された卵を胚移植あるいは胚凍結に供した。GIFT周期では余剰卵に前記と同様の操作でIVFを行ない、得られた胚は凍結保存した。

なお、抗精子抗体がIVFの適応である患者以外には培養液としてhuman tubal fluid (HTF, Irvin Scientific)に患者血清を添加し、抗精子抗体が適応で

ある場合には臍帯血清を添加した7.5% serum-HTFと15% serum-HTFを用いた。15% serum-HTFは受精確認後の胚の培養に、その他の培養操作には7.5% serum-HTFを用いた。

培養はすべてCO<sub>2</sub> in airで行なった。

#### 3. 胚凍結

2PNの確認後約5時間、すなわち媒精後17時間より胚凍結を行なった。凍結手順はFig. 1に示したようにLaSalleらの方法<sup>6)</sup>に従った。20% serum添加phosphate buffer saline (PBS, Gibco) (PBS-S)で胚を2回リンスし、1.5M 1, 2-propanediol (PROH, Sigma)添加PBS-S中で室温下に15分間置き、さらに凍結mediumである1.5M PROHと0.1M sucrose (Sigma)添加PBS-S中に15分間放置した。その後250 μlのストロー(クリスタルストロー133, IMV社)にFig. 2に示したようにloadingした。凍結はプログラムフリーザー(cell freezer R204, プラナー社)を用い、室温から-7℃までは-2℃/分で冷却し、-7℃で5分間保持して、その間に植氷した。-7℃から-30℃までは-0.3℃/分で、-30℃からは-50℃/分で冷却した。-180

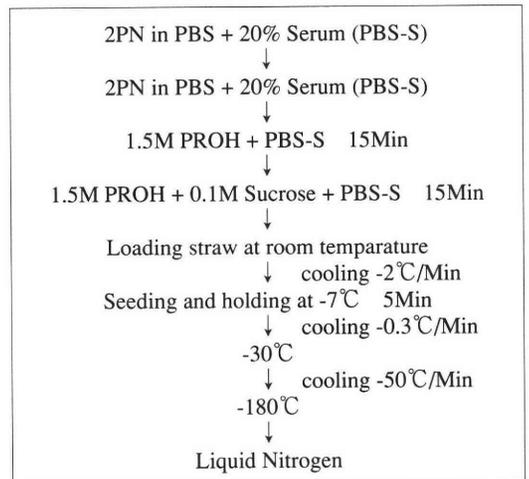


Fig.1 Freezing Method

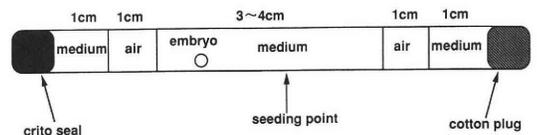


Fig.2 Loading embryos into the straw.

To the straw on the cotton plug side, a rubber sterile tube with 1 ml syringe connected is jointed. The medium, air, and an embryo are pumped up by the syringe into the straw. After filling up, the straw is sealed with crito seal.

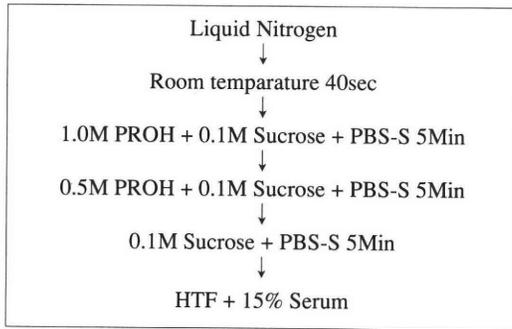


Fig.3 Thawing method

℃まで達した後、液体窒素に投入して凍結保存した。

#### 4. 胚融解

胚融解の手順をFig. 3 に示した。液体窒素からストローを取り出し、室温に40秒間放置し、融解した胚を1.0M PROH, 0.1M sucrose添加PBS-Sで5分間リンスし、その後はPROHの濃度を順次下げ、さらにsucroseを除いて、15% serum添加のHTFに移して約24時間の追加培養を行なった。

追加培養 3 時間後に15% serum添加HTFで再度medium changeを行なった。

融解後24時間の追加培養によって前核期胚が分割することをもって胚の生存とした。

#### 5. 融解胚移植周期

融解胚の移植は、7 症例 8 周期には自然排卵周期に、2 症例 2 周期にはclomiphene citrate (CC) とhCGを投与した周期に行なった。CCの投与は月経周期第5日より100mg/dayで5日間行ない、主席卵胞の平均卵胞径が22mmに達した時点でhCG 10000IUを投与した。

移植周期には月経第10日より経膈超音波による卵胞の観察と12時間ごとの尿中LHの測定(L Check, ニプロ)を行なった。凍結胚の融解はLH surge開始後、あるいはhCG投与後60~72時間に開始し、融解胚の移植は84~96時間後に行なった。

なお、移植胚はTestaraの報告<sup>7)</sup>に従い、50%以上が正常形態を示す胚のみを移植した。

#### 6. 統計学的処理

妊娠率、胚の分割率の検定には $\chi^2$ 検定を用い、その他の統計的処理にはStudent's t testを用いた。

### 成 績

#### 1. 移植胚数と妊娠率

freshなIVFでの胚移植周期における移植胚数と妊娠率の関係をFig. 4 に示した。1 個の移植胚数では妊

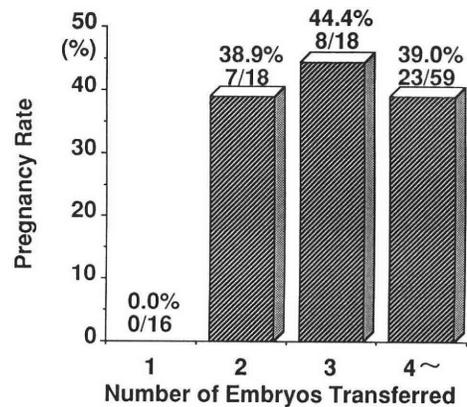


Fig.4 Comparison of pregnancy rates in the groups defined by number of fresh embryos transferred.

Any patients did not conceive in the group only one embryo was transferred. No difference was found among the pregnancy rates in the groups two or more embryos transferred.

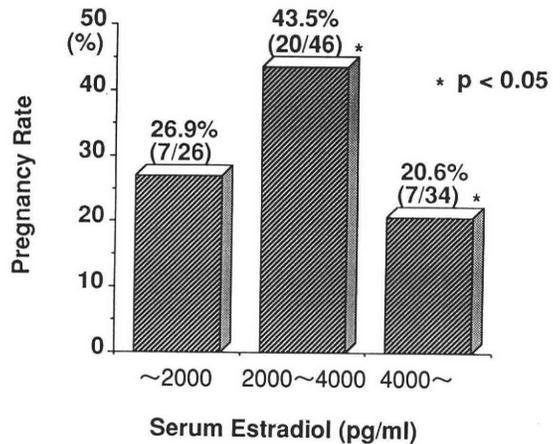


Fig.5 Pregnancy rates per ET in each group defined by the levels of serum estradiol measured before OPU.

Pregnancy rate in the group with low estradiol (~2000pg/ml) levels at hCG injection was lower than that in the group with medium estradiol (2000~4000pg/ml) levels but there was no significant difference between the two. On the other hand, the rate in the group with high estradiol levels was significantly lower than that in the group with medium estradiol levels.

娠率がなかったが、移植胚数が4 個以上になっても2 個あるいは3 個の胚移植周期との間に妊娠率には差がなかった。

#### 2. IVFにおける卵巣の反応性と妊娠率

IVFにおけるhCG投与時のE<sub>2</sub>値と胚移植あたりの

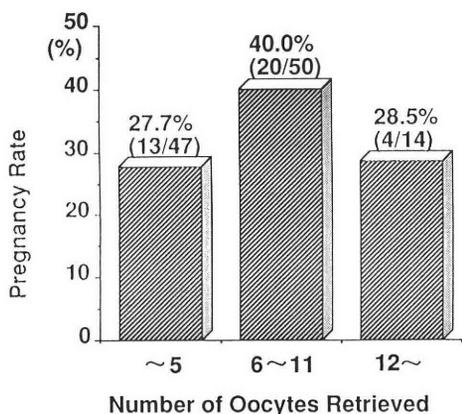


Fig. 6 Pregnancy rates per ET in three groups defined by the number of oocytes retrieved.

Although there was no significant difference among the pregnancy rates of these three groups, the pregnancy rate in the group with large number of oocytes retrieved as well as the rate in the group with small number was lower than that in the group with medium number of oocytes.

妊娠率の関係をFig. 5 に示した. hCG投与時のE<sub>2</sub>が2000 pg/ml未満の周期の妊娠率は26.9%で, 2000~4000 pg/mlの周期の妊娠率が43.5%と最も高く, 4000 pg/ml以上の周期では20.6%であり, 2000~4000 pg/mlの周期に比べて有意に妊娠率は低かった ( $p < 0.05$ ).

Fig. 6 は同様にIVFにおける採卵数と妊娠率の関係を示したものである. 有意の差はないものの, 採卵数が6個~11個の周期で妊娠率は最も高く, 5個以下, あるいは12個以上の採卵数の周期では低い傾向が認められた.

### 3. 凍結・融解胚移植

凍結前の2PNの胚をPhoto 1 に, 同一胚の凍結, 融解後をPhoto 2 に示した. 凍結, 融解後の胚は凍結前に比べて, 卵丘細胞がはがれたこと以外に形態的に変化はなかった. また, 追加培養24時間後の胚をPhoto 3 に示した. 分割速度はfreshな胚と比べほとんど差を認めず, 追加培養により分割した胚は24時間で2 cell, あるいは4 cellに至った.

Table 1 に凍結胚融解症例を示した. case 1 はfreshな体外受精胚移植において双胎妊娠し, 異常なく分娩に至った症例であり, 患者の同意を得て胚の融解を行なった. また, case 4 は融解胚移植予定であったが, 3個の胚のうち, 1個に分割が認められたのみで, しかもその1個の分割胚は50%以上のfragmentationを示したため, 胚移植を断念した. case 2 と5は同一症例である. case 6, 8はCC, hCGを投

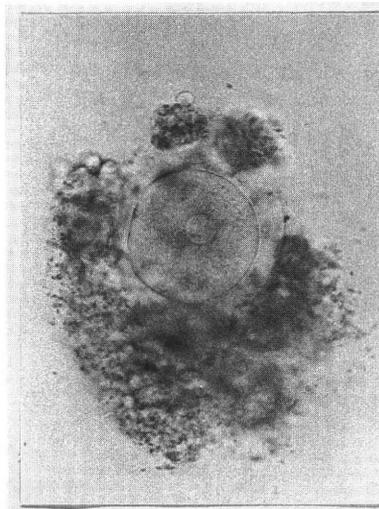


Photo 1 Two-pronuclei stage embryo before freezing.

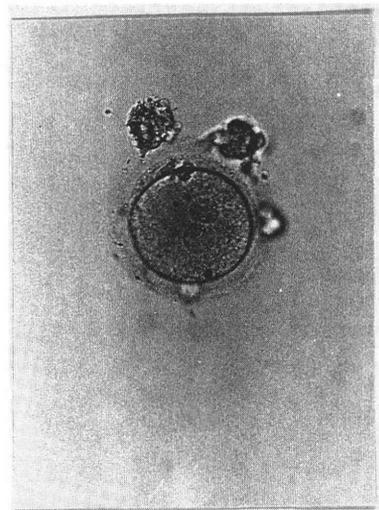


Photo 2 Two-pronuclei stage embryo after thawing. (the same embryo on photo 1)

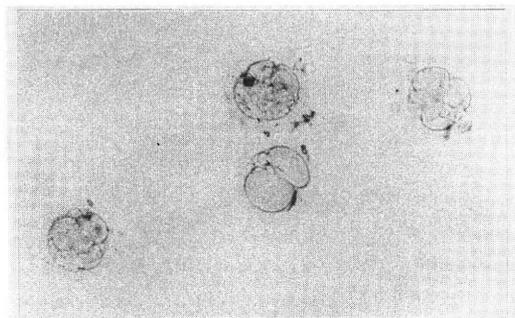


Photo 3 Cryopreserved-thawed embryos for transfer after additional culture.

Table 1 Thawed cases

Cases	Adaptation	Cryo Emb.	Emb. Deve.	Emb. Tr.	Preg.
1	endometriosis	4	3		
2	antibody	3	2	2	-
3	male factor/endometriosis	3	2	1	-
4	antibody	3	1	0	
5	antibody	3	2	2	-
6	male factor	6	5	4	+
7	tubal factor	7	5	4	+
8	antibody/endometriosis	2	2	2	+
9	tubal factor	3	2	2	+
10	tubal factor	7	2	2	+
11	male factor/endometriosis	4	3	3	-
12	tubal factor	4	3	2	-
Total		49	32 (65.3%)	24 (49.0%)	5/11(45.5%)

与した周期に融解胚移植を行なった症例であり、その他のcaseでは自然排卵周期に融解胚移植を行なった。これらの周期のうち、case 6, 7, 8, 9, 10が妊娠に至った。case 6は双胎妊娠で、現在順調に経過中である。case 7は1992年9月に、3024gの男児を自然分娩した。その妊娠、分娩経過には特に異常はなかった。case 8は妊娠6週で、case 10は妊娠8週で自然流産に終わった。

Table 2にfreshな体外受精での胚移植と凍結・融解胚移植の成績比較を示した。freshな胚の分割率は77.7%であり、凍結・融解胚の分割率は65.3%で、2群間に有意の差はなかった。平均胚移植数はそれぞれ3.1個、2.5個でこれにも有意の差を認めなかった。妊娠率は胚移植を行ない得なかった周期も含めるとfreshな胚移植周期で27.2%、凍結・融解胚移植周期で45.5%であった。胚移植あたりではそれぞれ33.0%、50.0%であった。

Table 2 Comparison of cryopreserved-thawed embryo transfer with fresh embryo transfer

	Fresh IVF-ET	Cryo ET
Cleavage Rate	77.7%(431/555)*	65.3%(32/49)*
Emb. Transferred	3.1±2.3**	2.5±1.3**
Preg. Rate (per cycle)	27.2%(37/136)*	45.5%(5/11)*
(per ET)	33.0%(37/112)*	50.0%(5/10)*

\* There were no significant differences between groups.  
\*\* mean ± SD

## 考 案

凍結、融解過程の胚への影響については種々の意見がある。Ashwood-Smithら<sup>8)</sup>は胚凍結、融解の過程で細胞損傷が起こることを報告しているし、KrzyminskaとO'Neill<sup>9)</sup>のように、マウス8細胞期胚を凍結、融解すると、5～8%の胚に障害が起こるが、着床、あるいは着床後の胚の発育にはfreshな胚と差がないという報告をしているものもある。われわれの成績では凍結、融解後の追加培養によりその65.3%が分割を示した。これはfreshな胚の分割率77.7%と比較してやや低い傾向があるものの、2群の間には有意の差は認められなかった。qualityの高い卵が受精した胚はfreshな移植周期に用いることが多かったことも考慮に入れる必要があると考えられる。文献的には凍結胚の生存率は、60～83%<sup>7,10-12)</sup>で、かつfreshな胚と凍結・融解胚の分割率に差がない<sup>11)</sup>と報告されており、われわれの結果もほぼこれらに一致するものであった。凍結・融解胚とfreshな胚の分割率に差がないことは、凍結、融解によっても、胚が生存しているばかりではなく、胚のqualityが大きく低下しないことを示唆するものである。Table 2に示したように、症例数が少ないため、十分な検討とはいえないものの凍結胚の移植周期での妊娠率はfreshな胚移植周期の妊娠率を下回るものではなかったことも考え合わせると、凍結・融解胚の移植はfreshな胚の移植と同等の妊娠率が期待できると考えられる。

Fig. 4 に示したように、移植胚数が2個以上である周期は妊娠率は35~45%と比較的安定した成績であった。凍結胚の65.3%つまり、約2/3が融解後生存して分割を示すという結果より、計算上では3個以上の余剰胚がある場合において胚凍結を行なえば、再度の移植を2個以上の胚で行なえることが期待できる。したがって、3個以上の余剰胚がある周期で胚の凍結保存を行なうことは、再度の妊娠機会を保存しておくことを意味し、患者に精神的ゆとりを与えることができる。

実際のIVFにおいては、余剰胚が3個以上あると考えてもよい、受精卵数が6個以上の周期は1991年には88周期中19周期であった。このうち4周期がfreshな胚移植により妊娠に至った。残り15周期すべてに胚の凍結保存と融解胚移植を行なっていたとすれば胚移植あたりの妊娠率を40%として、6周期に妊娠が期待できたはずである。つまり、周期あたりの実際の妊娠率25.0% (22/88)であったものが、31.8% (28/88)に上昇する計算となる。このように胚凍結により、再度の胚移植の機会を残すことは、われわれの施設を例にとると、約6%もの妊娠率を上昇させることになり、これらの患者の肉体的、精神的、経済的負担を軽減することにつながる。

卵巣刺激に対する卵巣の反応性の指標としてhCG投与時のE<sub>2</sub>値、採卵数を用いた。Fig. 5, 6に示したように卵巣刺激に対して過剰な反応を示した症例では妊娠率が低い傾向にあることがわかった。Formanらは採卵前のE<sub>2</sub>が高い症例では有意に妊娠率が低いことを示し、これらの症例では黄体期のE<sub>2</sub>/progesteroneが上昇するために着床条件が悪化することが妊娠率の低い原因のひとつである<sup>13)</sup>と述べている。しかし、こういう過剰反応を示す症例こそ採卵数が多く、多数の余剰胚がある可能性が高い。Fig. 4に示したように4個以上の胚を移植しても2個あるいは3個の移植胚数の場合と妊娠率に差がないのであるから、胚移植数を限定し、できるだけ多くの余剰胚を凍結保存して、着床条件がよい自然排卵周期に融解胚の移植を行なう方が妊娠の可能性をより高めることになると考えられる。

また、エストロゲンのレベルが高く、採卵数の多い症例は卵巣過剰刺激症候群(OHSS)を招きやすい<sup>14~18)</sup>。凍結胚の移植による妊娠率とfreshな胚移植による妊娠率に差がないのであれば、Amsoら<sup>19)</sup>が述べているようにすべての受精卵を凍結保存することによりその周期での妊娠を避け、重篤なOHSSを招かないようにすることも可能である。

分割胚の形態にのみ胚のqualityの判断を頼っている現在、分割前の前核期胚を凍結することに抵抗があった<sup>20)</sup>。しかし、PROHを凍結保護剤として用いた場合、凍結、融解後の生存率が最も高いのは1 cell embryoであること<sup>7)</sup>から、前核期での胚凍結を行なうことにした。媒精後20時間を過ぎると前核の消失あるいは早いものでは分割の起こり始める胚もあるため媒精後約17時間で胚凍結を開始した。採取卵が未成熟で前培養の時間が長くなっても前核期で凍結した場合の生存率は差がないとWrightら<sup>21)</sup>は述べている。

凍結胚移植周期に関しては我々はcase 6, 8を除いて自然排卵周期を用いた。case 6, 8の2症例ではいずれも黄体機能不全があったため、CCの投与を行なった。CCは子宮内膜に影響を及ぼすために、胚移植周期に不適切であるという報告<sup>22,23)</sup>もあるが、これら2症例ではCCの投与例にもかかわらず、胚移植の時期には十分な子宮内膜の厚さが観察された。今後、卵巣機能のさらに悪い症例ではGnRHを用いたhormone replacement therapyを行なった周期での胚移植<sup>24~27)</sup>を予定している。

## 結 論

胚の凍結保存、融解によっても胚の分割率はfreshな胚のそれと明らかな差はなかった。また、症例数が12症例と少ないものの、融解胚の移植による妊娠率はfreshな胚の移植によるそれと余り変わらなかった。したがって、胚の凍結保存、および融解胚移植を臨床に用いることは、胚移植の機会を増やすことにより採卵周期あたりの妊娠の可能性が上昇することを意味し、患者の肉体的、精神的苦痛、経済的負担を減少させることにつながるものと思われる。そればかりでなく、IVF目的の卵巣刺激に対して過剰に反応する症例には胚の凍結保存は着床環境のよい、卵巣刺激をしていない周期での胚移植を可能にし、結果的にIVFの妊娠率の向上につながるものと推察された。また、OHSSの発症が予想される場合、すべての胚を凍結保存し、胚移植を猶予し、将来に妊娠の可能性を十分に残しながら、その周期での妊娠を避けることで、結果的にOHSSの重症化を予防することも可能になるであろう。

しかし、世界的にも凍結・融解胚移植により検討に耐えるに十分な数の健常児出産の報告や時間の経過があるとはいえ、人間の生殖行為に人為的操作がより多く加わる操作であるだけに今後とも慎重に取り組んで行く必要はある。この慎重さと十分な考

慮をもって行なっていく限りにおいては、以上述べてきたように、胚凍結・融解の操作は臨床的に有用な手段であろうと思われる。

### 文 献

- 1) Trounson A and Mohr L, Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707, 1983
- 2) Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CPM and Drogendijika AC, Tow pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fert Steril* 42: 293, 1984
- 3) Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD and Frydman R, High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 46: 268, 1986
- 4) Fugger E, Clinical status of human embryo cryopreservation in the United State of America. *Fertil Steril* 52: 986, 1989
- 5) Katayama KP, Stehlik E, Roesler M, Pentimalli C, Gummarson C, Jagusch S and Meyer M, Cryopreservation of human embryos as a useful tool for infertile couples. *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol* 16: 97, 1990
- 6) Lassalle B, Testart J and Renard JP, Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil Steril* 44: 645, 1985
- 7) Testart J, Belaisch-Allart J, Lassalle B, Hazout A, Forman R, Rainhorn J-D, Gazengel A and Frydman R, Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an invitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 48: 107, 1987
- 8) Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC and Ashhorn R, Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 3: 795, 1988
- 9) Krzyminska U and O'Neill C, The effects of cryopreservation and thawing on the development in vitro and in vivo of biopsied 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 6: 832, 1991
- 10) Cohen J, Kort HI, De Vane GW, Massey JB, Elsner CW and Norbury SE, Cryopreserved zygotes and endocrinologic factors in the replacement cycle. *Fertil Steril* 50: 61, 1988
- 11) Fugger EF, Dorfmann AD, Bustillo M, Bender SD, Katz LP and Schulman JD, Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 50: 273, 1988
- 12) Demoulin A, Jouan C and Dubois M, Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols and frozen at either pronucleate or multicellular stages. *Hum Reprod* 6: 799, 1991
- 13) Forman RG, Testart J and Frydman R, Impantation, Biological and clinical aspects. 218, Springer-Verlag, 1988
- 14) Navot D, Relou A, Birkenfeld A, Rabinowitz R, Brzezinski A and Margalioth EJ, Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 159: 210, 1988
- 15) Forman RG, Ross C, Frydman R, Barlow D and Egan D, Severe ovarian hyperstimulation syndrome using agonists of gonadotropin-releasing hormone for in vitro fertilization: a European series and proposal for prevention. *Fertil Steril* 53: 502, 1990
- 16) Smitz J, Camus M, Devroey P, Erard P, Wisanto A and VanSteirteghem AC, Incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome after GnRH agonist/HMG superovulation for in vitro fertilization. *Hum Reprod* 5: 933, 1990
- 17) MacDougall N, Tan SL and Jacobs HS, In-vitro fertilization and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 7: 597, 1992
- 18) Rizk B and Smitz J, Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonists for IVF and related procedures. *Hum Reprod* 7: 320, 1992
- 19) Amso NN, Ahuja KK, Morris N and Shaw RW, The management of predicted ovarian hyperstimulation involving gonadotropin-releasing hormone analog with elective cryopreservation of all pre-embryos. *Fertil Steril* 53: 1087, 1990
- 20) Cohen J, Kort HI, De Vane JB, Massey JB, Elsner CW, Turner TG and Fehilly CB, Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 49: 283, 1988
- 21) Wright G, Wilker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A and Cohen J, Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 5: 109, 1990
- 22) Thatcher SS, Hillier SG, Donachie KM, Baird DT and Glasier A, The effect of clomiphene citrate on the histology of human endometrium in regularly cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49: 296, 1988
- 23) Sathanandan M, Macnamee MC, Rainsbury P,

Wick K, Brinsden P and Edwards RG, Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: A prospective semi-randomized study. *Hum Reprod* 6: 685, 1991

- 24) Asch RH, Cefalu E, Balmaceda JP, Gastaldi C, Ord T, Rojas F and Borrero C, Oocyte donation and gamete intrafallopian transfer in premature ovarian failure. *Fertil Steril* 49: 263, 1988
- 25) Salat-Baroux J, Tibi C, Cornet D, Mandelbaum J, Alvarez S, Plachot M and Antoine JM, Pregnancies after replacement of frozen-thawed embryos in a donation program. *Fertil Steril* 49: 817, 1988
- 26) Meldrum DR, Gutlay-Yeo AL, Wisot A, Marr B, Hamilton F and Huynh D, Artificial agonadism and hormone replacement for oocyte donation. *Fertil Steril* 52: 509, 1989
- 27) Schmit CL, Taney FH, deZiegler D, Kuhat MJ, Gagliardi CL, Colon JM, Mellon RW and Weiss G, Transfer of cryopreserved-thawed embryos: the natural cycle versus controlled preparation of the endometrium with gonadotropin-releasing hormone agonist and exogenous estradiol and progesterone (GEEP). *Fertil Steril* 52: 609, 1989

#### **The benefits of clinical use of transferring cryopreserved-thawed early embryos**

Shingo Yamabe, Satoshi Yamaguchi,  
Kazuaki Katayama and Matsuo Mochizuki

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kobe University, Kobe 650, Japan

Kazunori Furukawa, Masato Hayashi,  
Shigeki Hayashi and Kaname Hayashi

Keisei Obstetric and Gynecological Hospital,  
Takamatsu 760, Japan

Two-pronuclei stage embryos produced by 18 IVF or GIFT cycles were frozen with 1, 2-propandiol and sucrose as cryoprotectants. Forty-nine embryos of 12 cycles were thawed and 32 embryos (32/49, 65.3%) cleaved after 24hrs' additional culture. There was no significant difference between the cleavage rate of frozen-thawed embryos and that of fresh embryos (431/555, 77.7%). Twenty-four embryos of 10 cycles were transferred to the patients and 5 pregnancies occurred (5/10, 50%). One of the pregnant patients already delivered without any problem during her pregnancy and labor, two aborted at 6 th and 8 th week of gestation, and the other is now with pregnancy. Pregnancy rate after transfer of frozen-thawed embryos was higher than that after transfer of fresh embryos (37/112, 33.0%), but there was no statistical significance.

In our fresh IVF program, pregnancy rate in patients with high serum estrogen level just before oocytes pick up or with a large number of retrieved oocytes was lower than that in patients with medium level of serum estrogen level or with 6 to 11 retrieved oocytes. Patients who highly responded to ovarian stimulation seemed to be not good candidates for implantation but they have high probability of having many surplus embryos.

From these results, it can be concluded as follows; 1) clinical use of cryopreservation of early embryos enables the patient to have another chance for successful pregnancy, 2) for the highly responded patients, cryopreseved-thawed embryo transfer in the natural cycle might bring better results than fresh embryo transfer in the stimulated cycle, 3) if OHSS is highly expected, we can also withhold replacement of fresh embryos by cryopreservation.

(受付：1992年10月2日)

(受理：1992年10月2日)

## 地方部会講演抄録

### 1992年度日本不妊学会北陸支部学術総会

日時：1992年5月23日(土)

場所：金沢シティモンドホテル

#### 1. 妊娠診断薬“クリアビュー-HCG”の使用経験

○村上弘一・中川俊信・真野達夫

生水真紀夫・三輪正彦・赤祖父一知

(金沢大産婦)

(目的) Color Immuno Chromatographic Assay法を用いた妊娠診断薬“クリアビュー-HCG”の臨床的有用性について検討した。

(方法) 正常妊娠74例, 異常妊娠16例(自然流産13例, 子宮外妊娠3例), 非妊娠女性43例(正常月経周期23例, 無月経6例, 閉経後14例)において, 尿中hCGをクリアビュー-HCGおよびHCGテストパックプラスにて同時に測定した。

(成績) 正常妊娠における陽性率は, 妊娠4週以後100%であり, HCGテストパックプラスの結果と一致していた。異常妊娠では, 診断, 処置後の臨床経過に沿ってクリアビュー-HCG陽性尿希釈倍率は低下した。非妊娠女性においては, 陽性例は見られなかった。HCGテストパックプラスとの相関性については, 陽性例, 陰性例ともに良好であった。

(結論) 妊娠診断薬“クリアビュー-HCG”は, 正常妊娠および異常妊娠症例の診断, 経過観察に有用であった。また, 非妊娠女性における陽性例は認められず, 今後は簡便で正確な妊娠診断薬として日常の産婦人科診療に使用できるものと考えられた。

#### 2. 当科におけるSwim up法によるAIHの成績

○丹野治郎・福岡秀昭・羽根淳治

上田由生子・土用下麻美・吉田 勝

井浦俊彦・高林晴夫・桑原惣隆

(金沢医大産婦)

#### 3. 当院におけるMicrofertilizationの現況

○道倉康仁・辻 敏徳・藤波隆一

高塚亮三・加藤 修

(永遠幸マタニティクリニック)

(緒言) 男性不妊症例や, いわゆる原因不明不妊症例の中には体外受精を施行しても全く受精しないも

のがあり, これらに対して顕微受精法が試みられるようになった。当院でも一昨年11月よりCornell大学の指導下に, 余剰卵による顕微受精の臨床実験を重ね昨年末の日本産婦人科学会の承認を踏まえて, 本年1月より臨床応用を開始した。

(方法) PZDはOligo-asthenozoospermiaを含め過去3回以上のintact inseminationで受精の得られない症例のみを適応とし, SUZIはtesticular failureによるsevere oligozoospermiaの症例のみを適応として実施した。

(結果) (1) PZDは43例253個の卵に実施し, 71個(28.1%)の受精および54個(76.1%)の分割を得た。26例に胚移植を行い2例の妊娠が成立した。(2) SUZIは35例176個の卵に実施し, 23個(13.1%)の受精および20個(86.9%)の分割を得た。14例に胚移植を行うも, 妊娠には至っていない。

(考察) 現段階では, 顕微受精を併用した体外受精の結果は, 受精率, 着床率ともに思わしくない。顕微受精, 特にSUZIでは倫理面も考慮し, その適応を充分吟味する必要がある。通常体外受精がうまくいかないからといって, 安易に選択すべきではないと考える。受精率を高めるために, 顕微受精の手技を検討する一方で, CASA, LLLT, 精管洗浄, 精巣上体精子採取など, 受精能の高い精子を回収する工夫が更に必要であると思われる。

#### 4. Transmyometrial embryo transfer

##### "The Towako method" 1年間の成績

○道倉康仁・辻 敏徳・藤波隆一

高塚亮三・加藤 修

(永遠幸マタニティクリニック)

(目的) 胚移植における新しい手技として, 当院で経子宮筋層の内膜内胚埋込み法(the "Towako Method")を試行し1年を経過したが, 今回この1年間の臨床成績を検討した。

(方法) 1991年3月末より1992年3月末までに当院で本法を実施した患者195名を対象とし, 治療周期と妊娠率, さらに妊娠例ではその転帰を解析した。胚移植は, 経陰超音波監視下に陰門蓋部より経子宮筋層的に子宮内膜内へ八光針を刺入し, カテーテルにより胚を埋込んだ。

(結果) 患者総数195名, 治療周期総数402, 採卵総回数338, 移植総回数240で, 妊娠数は66, 移植当り

妊娠率27.5%,採卵当り妊娠率19.5%であった。妊娠例66例のうち、分娩に至ったものは9例で、妊娠経過中が38例、流産は19例であった。尚、胚の移植部位は施術時に超音波像により確認できるが、内膜内と子宮腔内とで、移植部位の違いによる妊娠の展開には、有意の差は認められないものの、妊娠当り流産率は内膜内の方が低い傾向がみられた。

(考察)我々の1年間の臨床成績は、『生殖医学の登録に関する委員会』報告による平成2年分の臨床実施成績と比較して、良好な結果と思われ、子宮頸管に損傷を全く与えない本法の利点が確認された。また、妊娠成立後の経過は通常の胚移植と何等変わらないと思われた。良好な胚と子宮内膜が得られれば、本法により体外受精の成績はさらに向上するものと考えられる。

### 5. CASA (Computer Aided Sperm Analysis)を用いた体外受精媒精精子濃度の決定法

○高塚亮三・加藤 修

(永遠幸マタニティクリニック)

(目的)演者らは最近、CASAの情報に基づいて体外受精媒精精子濃度を決定する新しい方法を開発した。本研究において、この方法による精子の評価と体外受精に対する有用性について検討を行った。

(方法)精子運動自動解析はCellsoft series 3000 (CRYO Resources, Ltd=ナック)を用いて行った。採精30分後minipercoll法にて精製した精子を直ちにcellsoftで解析した。直進性の度数分布に基づき、Nordic型(N型)精子とAlpine型(A型)精子に分類した。N型精子の場合は前進性精子( $v \geq 40 \mu\text{m/s}$ ,  $l \geq 3.5 \sim 4.5$ )を、またA型精子を含む場合は有効精子( $v \geq 40 \mu\text{m/s}$ ,  $l \geq 4.5$ ,  $ALH \geq 3.0$ )を10万/卵子の割合で含むように媒精精子濃度を決定した。

(結果)CASAに基づく精子の平均直進性( $\bar{v}$ )と前進性精子含有率(c)の間には、閾値( $l \geq 4.0 \sim 5.5$ ,  $v \geq 40 \sim 50 \mu\text{m/s}$ )に依存して相関係数0.9583~0.8027で相関係数が成立した。手動カウントで"c"を算出した場合、 $\bar{v}$ との間の相関係数は0.7509であった。高い直進性を示すが、速度が遅く低受精能のA型精子と呼ばれるsubpopulationの存在する症例では、amplitude of lateral head displacement (ALH)を考慮することにより高受精率(80.6%)を得た。この媒精精子濃度決定法に基づき行った47症例の体外受精の受精率は69.8%であった。Polyploidの産生率の高い症例に対しては閾値  $l \geq 3.5$  を適用することにより、受精率を低下させることなくPolyploidの産生率が

29.5%から19.4%に低下した。

(結語)CASAの情報に基づく精子の評価法は従来の評価法では検出不可能なA型精子の存在を示唆し、体外受精において高受精率を維持するために有用な方法であると思われる。

### 6. ウシの黄体嚢腫 (luteal cyst)内における卵母細胞の性状について

泉 徳和・榊田星史(石川県農短大)

黄体嚢腫 (luteal cyst)は牛の繁殖効率を大幅に低下させる卵巣嚢腫 (ovarian cyst)の一種である。しかし同じ卵巣嚢腫のなかにあっても、黄体嚢腫の形態的特徴や治療法は卵胞嚢腫 (follicular cyst)のそれとは全く異なる。黄体嚢腫の治療や形態的報告は見られるが、その中の卵母細胞の形態に関しては不明である。卵胞嚢腫内の卵母細胞は、回収された卵母細胞の34% (42/122)が正常な卵核胞期 (GV)であると報告されている(泉ら, 1987)。そこで本研究では黄体嚢腫内の卵母細胞を回収し、その形態を観察、検討したので報告する。

材料と方法:供試材料は黄体嚢腫を有するホルスタイン種乳牛11頭の卵巣である。本研究における黄体嚢腫とは、直径2.0cm以上の巨大卵胞(嚢腫cyst)の内壁が肉眼的にも、組織学的にも黄体化しているものを指す。屠殺後30分以内に卵巣を摘出し、37℃生食液に漬けて実験室に運んだ。直径2.0cm以上の黄体嚢腫等から実態顕微鏡下で卵母細胞を回収した。卵母細胞は4~5日間、カルノワ液で脱脂・固定し、酢酸オルセイン染色後、位相差顕微鏡あるいはノマルスー微分干渉顕微鏡で観察した。

結果と考察:黄体嚢腫11個から6個(55%)の卵母細胞を回収した。顆粒層細胞の被覆は完全1例、部分的1例、裸状2例、繭状や蜘蛛の巣状で糸を曳くもの各1例であった。

卵母細胞の状況は核崩壊を伴って細胞融解した4例(67%)と軽い変性を伴った卵核胞期の2例(33%)が認められた。卵母細胞を回収した黄体嚢腫6例のうち、内壁の部分的黄体化は5例、全体的は1例であった。以上のことから卵胞嚢腫に比べ卵母細胞の変性が強く、さらに内壁の黄体化が進むにつれ、細胞融解の割合が高くなる傾向が示された。

### 7. 男性不妊症への漢方療法

根上 晃

(福井医大産婦)

富永敏朗

(福井笠原病院産婦)

不妊症の治療法は配偶子操作法の発展により飛躍

的に進歩した。しかし、依然として男性因子による不妊症の妊娠率は低いままにとどまっているのが現状である。今回我々は男性不妊患者16名にツムラ補中益気湯エキス顆粒7.5g/dayを投与し、精子数、運動率、生存時間の検討をした。16例中6例に運動数の改善を認め、3例が投与4ヵ月以内に通常の性交指導で妊娠した(運動率改善:6/16=37.5%, 妊娠率:3/16=18.8%)。ツムラ補中益気湯エキス顆粒が投与された10例では運動率が改善しなかった例も含めて、精子の生存時間(一定時間当たりの運動精子数の改善)の延長が観察された。従来ツムラ補中益気湯エキス顆粒の精子に対する効果は運動率の改善のみが報告されていたが、我々の研究から生存時間の延長にも有効な効果があることが判明した。これらの事実やこれまでのサイコ剤が精子の生存時間を延長するという事実を考慮すれば、不妊症カップルの女性側にも証にみあったサイコ剤を投与すれば、女性生殖器内での生存時間の延長が得られることが推測される。したがって、不妊症カップルへの男性側へのサイコ剤の投与は射精時の精子の運動性の向上をもたらし、女性側への投与は女性生殖器内での精子の生存時間の延長をもたらし、一定時間後の運動精子数の相対的増加につながることを推測され、不妊症カップルの両者にサイコ剤を投与する方法は妊娠率の改善のための新しい治療方法になり得る可能性が示唆された。

## 8. 腹腔鏡下精索静脈瘤手術の経験

奥村昌央・酒本 譲・風間泰蔵  
布施秀樹 (富山医薬大泌尿器)  
片山 喬・新居 隆 (同大産婦)

腹腔鏡下に精索静脈瘤手術を行ったので報告する。症例は、不妊を主訴とする30歳の男性患者であり、左精索静脈瘤(1度)を認めた。術式は、全身麻酔下で仰臥位とし臍直下に気腹針を挿入しCO<sub>2</sub>ガスにて気腹をおこなった。ついで臍直下に10mm径のトラカールを挿入し、その中に腹腔鏡を挿入し、腹腔内を観察し、内精血管および精管の走行を確認した。第2穿刺は、恥骨上3横指、第3穿刺は、左外側腹壁に内視鏡下に挿入した。第2、第3穿刺部より、鉗子を挿入し、内精静脈を動脈より剥離し、静脈にのみクリッピングを行った。出血の有無を確認後、脱気しトラカールを抜去した。術前の陰嚢シンチで左側の精巣部に集積を認め、venous returnが不良であったが、術後2週間目では改善しており、精索静脈瘤の消失を認めた。

腹腔鏡下精索静脈瘤手術は開放手術に比べ内精静脈のみを確実にクリッピングでき、とくに両側性の場合に有用であると思われた。

## 特別講演

### 着床のメカニズム

富永敏朗 (福井医大産婦)

### 第30回日本不妊学会中国四国支部学術講演会

日時:1992年8月8日(土)

会場:高知新阪急ホテル

#### 1. 不妊治療妊娠例(治療期間別検討)

○伊原直美・林 信旨・西条仁子

金重恵美子 (岡山中央病院産婦)

(目的)不妊治療により妊娠した症例に対する治療法は興味深いですが、今回はその治療に要した期間別に検討した。

(方法)挙児希望で来院し、1990年1月~1991年12月に妊娠成立をみた308例を、その治療期間により、6ヵ月未満(A群:97例)、6ヵ月~1年未満(B群:104例)、1年~2年未満(C群:76例)、2年以上(D群:31例)に分類検討した。

(成績)非妊娠周期における腹腔鏡および開腹手術は、それぞれ、A群:2%・0%, B群:26%・7%, C群:37%・15%, D群:52%・29%を占めていた。妊娠周期に卵管検査をおこなっていた症例は、A群:44%, B群:16%, C群:17%, D群:13%で、子宮卵管造影検査は特にA群で高率であった。妊娠周期の卵巣刺激は、A群:71%, B群:84%, C群:76%, D群:87%におこなっていたが、hMG療法はA群:3%, B群:15%, C群:35%, D群54%であった。配偶者間人工授精による妊娠例は、A群:27%, B群:31%, C群:37%, D群42%を、体外授精による妊娠例は、A群:2%, B群:3%, C群:12%, D群:19%を、それぞれ占めていた。

(結論)治療期間2年以上のD群は、全体の10%を占めるに過ぎず、開腹手術既往者や体外授精による妊娠例が他群に比較し高率であった。2年間の積極的な治療で妊娠成立をみない症例には、体外授精が適応と考えられる。

#### 2. 経膈超音波ガイド下下チョコレート嚢腫内容液吸引術により妊娠が認められた1例

○佐藤真一・高橋健太郎

アントワンアブムサ・岡田さおり

北尾 学 (鳥根医大産婦)

子宮内膜症は不妊原因の1つに挙げられ、進行例に対しては外科的治療が行われている。しかし、嚢腫の切除と単なる内容液の吸引の有効性は明らかにされていない。今回、経腔超音波ガイド下にチョコレート嚢腫内容液吸引術のみを行い、妊娠が認められた症例を経験したので報告する。

症例は30歳、主婦。挙児希望を主訴に受診した。臨床的に子宮内膜症が疑われたため、腹腔鏡を施工しr-AFS IV期と診断し、同時に癒着剝離術と病変部の焼灼術を施行した。術後Danazol 400mg/dayを6カ月投与した。夫の精液検査にて乏精子症が認められたため、治療終了後の10カ月の間にAIHを6回施行したが妊娠には至らなかった。経過観察中に経腔超音波断層法にて4×4cmのcystic tumorが認められ、再発が疑われた。そこで静脈麻酔下に経腔超音波ガイド下嚢腫内容液吸引術を施行し、15mlのチョコレート様の内容液を吸引した。そしてこの周期に自然妊娠が成立した。

子宮内膜症の治療に開腹あるいは腹腔鏡による手術は有用であるが、再発例に対しては経腔超音波ガイド下での嚢腫内容液吸引術は有効であると思われる。これは吸引により正常卵胞の発育を抑制するmassが取り除かれたことや卵管と卵巣の位置関係が矯正されたことによると推察される。

### 3. 薬物療法で著明に縮小が認められた endometriomaの1例 —MRI像の検討—

○岡田さおり・高橋健太郎・迫田良一  
白井孝昭・吉野和男・北尾 学  
(鳥根医大産婦)

EndometriomaはMagnetic resonance imaging (MRI)によりその診断能力が向上したものの一つである。今回、子宮内膜症症例に、Danazol 400mg/day, Buserelin 900 μg/dayの併用療法を施行し治療前後でのMRI像を比較した。

症例は23歳、主婦。挙児希望を主訴に当科受診した。内診および超音波断層法にて左卵巣腫瘍が疑われた。MRIでは左卵巣にT<sub>1</sub>強調画像(T<sub>1</sub>WI)にて高輝度のcystが3つ認められた(直径約60mm, 40mm, 10mm)。T<sub>2</sub>強調画像(T<sub>2</sub>WI)では直径60mmのcystは高輝度に描出され、残り2つのcystは低輝度でshadingを認めた。腹腔鏡を施行し両側endometriomaと診断した。治療後のMRIでは前回撮影時直径60mmのcystは著明に縮小し15mm程度となった。他の2つはわ

ずかに縮小したのみであった。右卵巣のcystも直径8mmに縮小した。また、腹腔鏡にても卵巣の縮小が確認された。

T<sub>2</sub>WIでshadingを示すものは比較的古い血液と考えられ薬物療法には反応し難いが、T<sub>2</sub>WIで均一高輝度を示すものは反応良好であった。ゆえに、MRIの信号強度により薬物療法に対する反応の善し悪しが、ある程度予測可能であると思われる。

### 4. 体外受精・胚移植妊娠例における初期胎児頭殿長発育曲線の作成

○関島秋男・吉田壮一・池成孝昭  
片桐千恵子・高尾成久・岩部富夫  
戸田稔子・見尾保幸・寺川直樹  
(鳥取大産婦)

(目的)妊娠初期の胎児頭殿長(CRL)計測による妊娠週数推定は、その後の妊娠経過の適切な評価のために不可欠である。しかし現在のCRL標準発育曲線は、最終月経を基礎にしており排卵日までの卵胞期日数が一定でなく必ずしも正確とはいえない。そこで今回、体外受精・胚移植にて妊娠が成立した症例のCRLから標準発育曲線を作成し、妊娠7～10週の胎児発育を検討した。

(方法)当科の体外受精・胚移植により妊娠した症例のうち、多胎妊娠や糖尿病など胎児発育に影響を及ぼすと考えられるものを除外した20症例を対象とした。採卵日を妊娠満14日とし、CRL計測は経腔超音波断層法にて行い、20胎児より得られた48回のCRL計測値を用いて回帰分析を行った。

(結果)CRL計測値より得られた2次回帰式は、xを妊娠期間(日)、yをCRL計測値(mm)として、 $y = 0.018x^2 - 1.14x + 20.7$  ( $r = 0.972$ )であった。

(結論)今回の検討から、妊娠初期特に7～10週の胎児のCRLはほぼ2次曲線に沿って増加することが明らかとなり、妊娠7～10週の胎児発育の評価に有用と考えられた。

### 5. マウス乏精子モデルにおける機械的透明帯部 分開孔術の有用性の検討

○高尾成久・吉田壮一・片桐千恵子  
池成孝昭・関島秋男・岩部富夫  
大野原良昌・戸田稔子・原田 省  
見尾保幸・寺川直樹 (鳥取大産婦)

(目的)重症男性不妊症例に対して顕微授精法が臨床応用可能となり、その有効性が報告されている。我々は、本法の臨床実施に向けた基礎的検討とし

て、機械的透明帯部分開孔術のマウス体外受精系における有用性を検討した。

(方法) B6C3F1幼若雌マウスを過排卵処理後、卵を採取した。0.1% hyaluronidase添加培養液にて卵丘細胞を除去し、0.1M sucrose処理後、開孔術を行った。一方、B6C3F1成熟雄マウスの精巣上体精子を2時間前培養した後、3種類の精子濃度 ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ : A,  $5 \times 10^4/\text{ml}$ : B,  $1 \times 10^4/\text{ml}$ : C) を作成し授精に用いた。各精子濃度における授精後24時間での2細胞胚の割合(受精率)と96時間での拡大胚盤胞以上への胚発生率を、開孔術群と開孔術を施行しなかった対照群との間で比較検討した。

(結果) 精子濃度Aにおける受精率は、対照群で66%、開孔術群で64%であり、胚発生率もそれぞれ72%、80%と差を認めなかった。乏精子モデルのうち、精子濃度Bにおける受精率は、対照群38%、開孔術群33%と差を認めず、また精子濃度Cでも対照群15%、開孔術群19%と差はなく、開孔術群での受精率の改善は得られなかった。一方、開孔術群の胚発生率はBでは29%、Cでは32%であり、対照群の72%、57%に比して低かった。

(結論) 乏精子モデルでは、機械的透明帯部分開孔術はマウス体外受精の受精率を改善できず、手技的改良の必要があると考えられた。

## 6. ハムスター卵のトリプシン処理膨化透明帯におけるヒト精子Acrosome reaction誘起作用の検討

○熊谷正俊・上田克憲・竹中雅昭  
新甲 靖・大浜紘三 (広島大産婦)

(目的) ハムスター卵のトリプシン処理膨化透明帯に、ヒト卵子透明帯と同様に精子のAcrosome reaction (以下A.R.) 誘起作用があるか否かを検討した。

(方法) ハムスター卵の透明帯は0.01%トリプシンで直径を約1.5倍に膨化させた。精子は健康男性より採取しmBWW培養液で2回洗浄後、Swim up法で回収した。mBWWで1時間(5例)あるいは6時間(3例)前培養した精子をハムスター卵に授精(精子濃度  $3 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$ )し1時間培養した。その後、約半数の卵は精子を含まない培養液中に移しさらに3時間培養した。授精時、1時間培養後および3時間培養後の精子浮遊液におけるA.R.発現率(以下%AR)と1時間培養後、3時間培養後の透明帯付着精子の%ARをFITC-PSA染色により算定した。

(結果) 1時間前培養例の授精時、1時間培養後およ

び3時間培養後の精子浮遊液の%ARはそれぞれ  $2.2 \pm 1.1$ ,  $2.5 \pm 0.9$ ,  $3.1 \pm 1.3$ , 透明帯付着精子の%ARは1時間培養後  $3.4 \pm 2.4$ , 3時間培養後  $5.6 \pm 3.2$ であった。同様に、6時間前培養例では精子浮遊液の%ARは  $3.6 \pm 1.4$ ,  $6.2 \pm 2.2$ ,  $7.9 \pm 4.5$ , 透明帯付着精子の%ARは1時間培養後  $5.7 \pm 2.8$ , 3時間培養後  $7.9 \pm 5.0$ であった。透明帯付着精子での%ARの増加は精子浮遊液での増加に比べて高値であったが、統計学的には有意差はなかった。

(結論) ハムスター卵のトリプシン処理膨化透明帯に付着したヒト精子では、3時間の培養では明らかなA.R.誘起作用は認められなかった。

## 7. 凍結胚保存の導入後における多胎率および妊娠率の検討

○矢野浩史・矢野知恵子・竹内郁子  
(矢野産婦人科)

体外受精-胚移植(IVF)における多胎妊娠を予防する目的にて、平成3年11月より余剰胚の凍結保存を導入した。5例につき行い、凍結解凍後の胚の生存率につき検討した。また、導入後における多胎率および妊娠率につき検討した。移植胚数は4個以下とし、残った良好胚を凍結保存した。凍結に供する胚は前核期とした。凍結保護剤はPropandiolとSucroseを用いた。プログラムフリーザー(Planner社Kryo 10)により凍結保存した。5例のうち、3例は採卵周期における新鮮胚移植により妊娠した。残りの非妊娠2例の凍結胚6個を解凍し追加培養したところ、1個が4細胞期まで進展し、他の5個は変性した。生存率は16.7%(1/6)であった。この生存胚を自然排卵周期において胚移植を行ったところ、biochemical pregnancyではあったものの妊娠を得た。凍結保存を導入する以前の多胎率は27.8%(5/18)であったが、導入後は10.0%(1/10)と低下した。導入後の妊娠率(対移植)は40.0%(10/25)と良好であり、導入以前と有意差は無かった。凍結胚保存による妊娠、出産例はいまだ少ないが、IVFを補佐する重要な方法であると思われる。

## 8. GnRHa-HMG-HCG法を用いた体外受精-胚移植におけるE<sub>2</sub>初期上昇群の治療成績について

○小林津月・村山眞治・石川ひろ美  
山野修司・青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 血中estradiol (E<sub>2</sub>) 値の上昇開始日が月経周期3~5日目である症例に対して卵巣刺激法を変更して体外受精-胚移植を施行し、その臨床成績を通

常治療の成績と比較検討した。

(方法) E<sub>2</sub>初期上昇群に分類された10症例に対する卵巣刺激法を以下のように変更した。前週期の高温相7日目よりプセレリン600 $\mu$ g/日を連日投与し、月経周期3日目よりHMG日研を前回の投与量225IU/日から150IU/日に減量し、4日間筋注した。月経周期7日目からはヒュメゴン150IU/日を主席卵胞平均径が18mmを越えるまで連日投与した。

HMG中止45時間後にHCG5000IUを筋注し、翌日採卵した。今回の治療成績(減量治療群10周期)を同一症例の変更前刺激法における成績(通常治療群18周期)と比較検討した。

(成績) 1. 減量治療群におけるE<sub>2</sub>上昇日は初期上昇群が5例、6~8日の群が4例、不明1例であった。2. 通常治療群の妊娠率は周期当たり11.1%(2/18)、胚移植当たり11.1%(2/18)であり、妊娠2例のうち1例が流産、あと1例が外妊であったが、減量治療群では3例に妊娠が成立し、妊娠率はそれぞれ30.0%(3/10)、33.3%(3/9)であり、3例とも妊娠は継続している。しかし、両群間の妊娠率は有意差を認めなかった。

(まとめ) E<sub>2</sub>初期上昇を示す体外受精-胚移植症例に対し、HMG投与量を減量することにより比較的良好な妊娠率が得られた。

## 9. 当院における体外受精・胚移植およびGIFTの成績

○蔵本武史・高崎彰久・平塚圭祐  
森岡 均 (済生会下関総合病院産婦)

(目的) 当院では1989年12月よりGIFT、1990年8月より体外受精・胚移植(IVF-ET, PROST, TEST)を開始した。今回今年4月までの成績を報告する。

(方法) 体外受精は49例(卵管因子25例、男性因子11例、子宮内膜症6例、原因不明6例、抗精子抗体陽性1例)、92周期に、GIFTは27例(原因不明13例、子宮内膜症10例、LUF3例、男性因子1例)、31周期に施行した。卵巣刺激はGn-RH analogue+FSH+HMGによるlongまたはshort protocol法を用い、重症男性不妊症例にはペントキシフィリンによる精子処理を行った。

(結果) 患者平均年齢、平均不妊期間は体外受精で34歳、8年、GIFTで30.9歳、7.3年であった。平均採卵数は体外受精6.9個(受精率73.9%/周期)、GIFT6.4個であった。男性不妊の受精率は不良であった。平均移植胚(卵)数は体外受精3.8個、GIFT4.2個であった。妊娠は体外受精で、20例(IVF-ET 15例、PROST

5例)、GIFTで8例に成立し、妊娠率は胚移植当たり29.4% [IVF-ET 27.8% (15/54), PROST 38.5% (5/13), TEST 0% (0/1)], GIFT当たり26% (8/31)であり、症例当りの妊娠率は体外受精39% [IVF-ET 35% (14/40), PROST 45.5% (5/11), TEST 0% (0/1)], GIFTは30% (8/27)であった。分娩例は体外受精2例、GIFT4例で、現在10例が妊娠継続中である。

(考察) 今後妊娠率の向上には、男性不妊に対する治療法の改善を図る必要があると思われた。

## 10. 当科におけるPOST, DIFIの試み

○矢野樹理・武田康成・福井敬介  
北川博之・松浦俊平 (愛媛大産婦)

体外受精胚移植法による不妊症治療は、最近めざましい技術的進歩をとげてはいるものの、その妊娠率、費用、胚培養に伴う医療サイドのストレスなどの点で、まだ多くの問題点を抱えている。当科では、1992年3月より卵管通過障害の無い難治性不妊に対して、POST(腹腔内卵子精子移植法)やDIFI(直接卵胞内人工授精法)を試みているので、その現況について報告する。

対象患者は、当科通院中の3年以上の長期不妊患者で、POST3例、DIFI4例であり、それぞれの年齢、不妊期間、精子数、精子運動率、およびAIH回数は、POST 31.3 $\pm$ 2.1歳、7.7 $\pm$ 1.7年、6700万/ml、20%、9.3回、DIFI 34.0 $\pm$ 2.9歳、4.0 $\pm$ 1.0年、2339万/ml、17%、13回であった。卵胞発育促進法として、pureFSH、HMG150-300単位をD3より連日筋注し、GnRH agonistは使用しなかった。クリアプランにてLHサージの有無を確認後、HCG5000IU投与後38時間でPOST施行し、DIFIは24時間で行った。どちらも局所麻酔と静脈麻酔の併用で行い、経腔超音波断層法下に卵胞を穿刺して、採卵取、精子注入などの操作を行った。黄体期管理はHCG筋注およびプロゲステロン腔座薬を併用した。その結果POST3例中1例が妊娠し、現在妊娠継続中であるが、DIFIは残念ながら今の時点ではまだ妊娠例が無く、さらに改良が必要と考えられた。

## 11. 当院におけるAIHの成績

○武田康成・矢野樹理・北川博之  
福井敬介・松浦俊平 (愛媛大産婦)

当科で行ったAIH法の変遷と成績について検討した。昭和62年5月までは液化射精精液をそのまま注入し(nAIH)、それ以後は単層Percoll法で処理した精液を注入した(tAIH)。平成3年10月よりtAIH3回以

上施行し妊娠しない症例にHMG-HCG排卵誘発を併用した。nAIHの適応は精子異常10例、難治性不妊3例、Miller-Kurzrock陰性3例、tAIHでは精子異常20例、子宮内膜症22例、性交障害1例、難治性不妊13例であった。16例75周期にnAIHを、56例135周期にtAIHを施行した。tAIH群のうち12例27周期にHMG-HCG排卵誘発を行った。nAIH群で7例(41.2% per case, 9.3% per cycle)、tAIH群で10例(17.8% per case, 7.4% per cycle)で妊娠の成立をみた。tAIH群のうちHMG-HCG排卵誘発群では3例(25% per case, 11.1% per cycle)妊娠した。nAIH群と比較してtAIH群における妊娠率の低下は、後者ではいわゆるAIHの適応とならないような症例まで適応を拡大したためと考えられる。妊娠に至るまでのAIHの回数はnAIH群では3.8回、tAIH群では1.6回で、後者の方が少なかった。これはtAIH群では、精液洗浄濃縮により精子が受精しやすくなっていること、超音波や簡易LH測定キットの発達によりAIHのtimingをより正確に把握できるようになったことが考えられる。HMG-HCG併用により難治症例より妊娠例が出たが、複数卵の排卵により受精の機会が増加したためと思われる。

## 12. 黄体機能不全の診断における子宮内膜日付診と血中progesterone濃度との関連について

○森下 一・武本幹彦・樋口和彦  
青野敏博 (徳島大産婦)  
佐野寿昭 (同第一病理)

(目的) 黄体機能不全の診断にはBBT測定、子宮内膜日付診、血中progesterone (P) 濃度測定などの方法が行われている。しかし、黄体機能不全の定義や成因および診断については必ずしも意見が統一されていない。今回我々は黄体期中期における子宮内膜日付診と血中P濃度との間にどのような関連があるかを検討した。

(対象および方法) BBTにて高温相持続日数が10日間以上の29症例において、高温相6～8日目に子宮内膜組織検査および血清P濃度測定を行った。なおBBT曲線と3日以上の内膜所見のずれがある場合に日付診不一致とした。

(成績) 1) 15症例18周期に日付診の不一致が見られた。2周期連続して日付診が不一致であったのは3症例であった。2) 12症例13周期において血清P濃度は10ng/ml未満であった。2周期連続して血清P濃度が10ng/ml未満であったのは1症例のみであった。3) 日付診不一致例の血中P濃度は $13.4 \pm 1.3$  ng/ml (mean  $\pm$  SE) で一致例 ( $13.0 \pm 0.7$  ng/ml) と差はなかつ

た。4) 日付診不一致で血中濃度が10ng/ml未満は4症例4周期において見られたが、2周期連続して見られた症例は1例もなかった。

(結論) 以上の所見より、黄体機能不全の診断において、子宮内膜日付診と血中P濃度とはほとんど関連しないことが判明し、estrogen濃度の測定も必要であることが示唆された。

## 13. LUF症候群の病態および管理

○小林正幸・伊東武久・縄田修吾  
成松昭夫・秋田彰一  
(社会保険徳山中央病院産婦)

黄体化無排卵卵胞症候群(LUF)につき、その臨床的発症素因、誘因、ホルモン動態、Needle Puncture (NP) の効果等につき検討を加えた。すべての卵胞が無排卵の病態をComplete LUF (C-LUF)、一部排卵し一部無排卵の病態をPartial LUF (P-LUF) と定義した。

対象はC-LUFを認めた18症例の観察周期とし、HMG-HCG療法中のものは除外した。LUF発症の素因としては卵巣周囲癒着、子宮内膜症、PCOが考えられた。排卵誘発剤の影響についてはクロミッドはP-LUFの発症を誘発する傾向がみられたが、プロモクリプチンの服用は自然周期よりLUFの発症を低下させる傾向がみられた。C-LUF周期では88.9%が黄体機能不全となり、また、 $E_2/P$ 比はLUFを起こさなかった周期に比し有意に高値となった。LUFは約半数が次回卵胞期初期まで残存し、その卵胞液中の $E_2$ 、P値も低値ながら認められたが、LUFの次周期の排卵への影響については明らかな傾向は認められなかった。

LUFに対するNPは次回C-LUFの発生を低下させる傾向がうかがわれた。HCG投与またはLH surge翌日のNPはその周期のLUF発生を予防する効果がある可能性が示唆された。

## 14. 卵巣刺激周期における卵胞期血中Progesterone値とembryo qualityとの関連性

○吉田壮一・高尾成久・片桐千恵子  
池成孝昭・関島秋男・岩部富夫  
戸田稔子・見尾保幸・寺川直樹  
(鳥取大産婦)

(目的) 卵巣過剰刺激周期においてLH上昇を伴わない卵胞期血中Progesterone (P) 値の軽度上昇 (P上昇) が、IVF-ET治療成績に悪影響を及ぼし、妊娠率低下を招くことを明らかにしてきた。そこで今回、妊娠

率低下に関与すると考えられる受精卵のqualityとP上昇の関連を、胚移植施行前のcell stageおよび胚のgradeを指標として検討した。

(方法) IVF-ETのためGnRH analog+hMG+hCGにより卵巣刺激を行った57症例65周期で、受精が確認された188個の胚を対象とした。P上昇周期から得られた胚68個(P上昇群)とP上昇のなかった周期で得られた胚120個(非P上昇群)についてcell stageおよび胚のgradeを比較検討した。

(結果) 4-cell以上に分割した胚は、P上昇群で50% (34/68)、非P上昇群で56.7% (68/120)と両群間に差を認めなかった。胚のgradeでは、不均等なblastomereやfragmentationを含むgrade 2から4の胚は両群間で差を認めなかったが、均等に分割したgrade 1の胚はP上昇群で17.6% (12/68)、非P上昇群で47.5% (57/120)であり、P上昇群で有意に少なかった。一方、intact blastomereが1個のみでfragmentationの著しいgrade 5の胚は、P上昇群で30.9% (21/68) 非P上昇群で5.0% (6/120)となり、P上昇群で有意に多かった。

(結論) 以上の成績より、P上昇周期で得られる受精卵のqualityは著明に低下しており、その結果、妊娠率低下を招くことが示唆された。

#### 15. IVF-ETにおけるluteal supportに対するプロゲステロン直腸座薬の有用性に関する検討

○福井敬介・矢野樹理・武田康成  
松浦俊平 (愛媛大産婦)

IVF-ETにおけるGnRH agonistの使用はpremature LH surgeを抑制し、採卵率を向上させる半面、黄体機能不全の原因となり、黄体ホルモンの補充が不可欠である。通常、プロゲステロンの筋注、腔内投与等が行われているが、今回我々はプロゲステロン座薬を自作し、直腸内および腔内に投与し、これらの有用性について比較検討したので報告する。

(対象と方法) 当科においてIVF-ETおよびPOSTを施行した患者を対象とした(n=11)。これらを直腸内投与群(n=5)、腔内投与群(n=4)およびコントロール群(n=2)の3群にわけ、採卵から12時間後にプロゲステロン座薬50mgを投与し、投与後0, 1, 2, 3, 6時間後に採血を行い、血中P4, E2, FSH, LHをEIA法にて測定した。

(結果) 投与後、1, 2, 3, 6時間におけるdelta P4 (ng/ml)は直腸内投与群において $4.0 \pm 2.4$ ,  $5.4 \pm 0.7$ ,  $6.8 \pm 2.2$ ,  $15.7 \pm 3.5$ と上昇し、また腔内投与群においても $4.5 \pm 2.4$ ,  $10.2 \pm 3.5$ ,  $10.5 \pm 1.9$ ,  $14.7 \pm 6.5$ と上昇し、直腸内投与群と腔内投与群において有意差

を認めなかった。また、血中E<sub>2</sub>, LH, FSHは何れの経路における投与後においても明らかな変化を示さなかった。

(結論、考察) プロゲステロン座薬の腔内投与群および直腸内投与群における血中のdelta P4の経時的変化について検討したが、両群ともコントロール群に比して有意な上昇を認めたものの、直腸および腔内投与群間における有意差は認めなかった。しかしプロゲステロン腔座薬のET前における使用は胚移植手技の妨げとなり、腔内からの漏出も考えられ、また自己投与の簡易性においても直腸内投与は優っており、IVF-ET等のluteal supportに有用な方法と考えられた。

#### 16. 経腔超音波断層法による子宮内膜日付診

○谷 政明・野間 純・長谷川 淳  
錦織恭子・多賀茂樹・白河一郎  
片山隆章・新谷恵司・工藤尚文

(岡山産婦)

(目的) 我々は分泌期子宮内膜の経腔超音波像と組織像とを比較検討し、“木の葉状”の定型的超音波子宮内膜像を呈する症例では子宮内膜高輝度領域率(HEA ratio)により日付診が可能であることを示唆してきた。そこで今回、超音波断層法にて排卵を確認し得た症例について組織学的日付診とHEA ratioとを比較検討した。

(対象) 1989年8月から1991年12月までの間に当科不妊外来を受診した自然排卵周期症例で分泌期に定型的超音波子宮内膜像を呈した32症例を対象とした。年齢は27~37歳、平均年齢は27.0歳であった。

(方法) 月経周期10日目前後より連日経腔超音波断層法を施行し子宮内膜と卵胞を観察し、主席卵胞の消失日を排卵日(LO)とした。L5からL10にHEA ratioを計測した後子宮内膜組織を一掻き搔爬にて採取し、組織学的日付診を行った。

(成績) HEA ratioは組織学的日付診POD4で73.7%を示し、POD6で78.0%となったのち直線的に増加し、POD10で100%となった。排卵後日数と組織学的日付診との間に2日以上ズレを生じた症例を8例(促進5例遅延3例)認めたが、これらの症例においてもHEA ratioの増加は子宮内膜のdatingの進行と一致していた。

(結論) 自然排卵周期症例において子宮内膜のHEA ratioによる超音波子宮内膜日付診は可能であり、非侵襲的に子宮内膜の組織状態を推察できる。

### 17. 不妊症・不育症患者のヒステロファイバースコープによるスクリーニング検査

○原 鐵晃・大島清久・児玉尚志  
竹中雅昭・上田克憲・岡本悦治  
大濱紘三 (広島大産婦)

(目的) 不妊症、不育症患者のスクリーニング検査におけるヒステロファイバースコープの有用性を検討した。

(方法) 不妊症例10例(原発性不妊7例, 続発性不妊3例), 不育症11例, 計21例を対象とし, 原則として治療開始前の着床期に検査を実施した。17例が高温相4日~7日であった。子宮鏡による観察項目は, 主として子宮内腔隆起性病変, 奇形や癒着の有無で, その他, 子宮内膜の血管像, 腺開口所見とホルモン環境との相関を検討し, 異常のある症例を内膜異常とした。また, 同じ月経周期の低温期に子宮卵管造影を行うとともに, 内視鏡実施当日に子宮内膜日付診, 超音波による子宮内膜厚測定, 血中P<sub>4</sub>値, E<sub>2</sub>値, PRL値測定も行った。

(結果) 不妊症例では内腔異常として, 完全双頸双角子宮1例が認められた。不育症例では6例に内腔異常を認め, その内訳は弓状子宮4例, 子宮内膜ポリープ3例, 子宮内腔癒着2例であった。子宮奇形以外の内腔異常の確定診断は, 子宮卵管造影では困難であった。また, 内視鏡的に内膜不良と判定した5例のうち2例は低P<sub>4</sub>値を示し, 1例は日付診にて低P<sub>4</sub>効果内膜と判定され, 1例は超音波計測による着床期子宮内膜厚5mmであった。

(結論) ヒステロファイバースコープにより, 子宮卵管造影では鑑別診断が困難な病変の確定診断が可能となるのみでなく, 子宮内膜の血管像, 腺開口所見に基づき子宮内膜のホルモン環境およびその反応性のある程度推測することが可能である。

### 18. 自然流産絨毛の染色体検査成績について

○朴 由美・中堀 隆・井上卓也  
山中研二・諏訪美鳥・布谷隆明  
高橋 晃・浮田昌彦  
(倉敷中央病院産婦)

当院において1989年5月より1992年4月までの3年間に施行した自然流産絨毛の染色体検査について検討した。核型分析の結果155症例中, 正常は59例(38%), 異常96例(61.9%)で, 異常の種類別頻度は, トリソミー52%, モノソミー17.7%, 三倍体7.3%, 四倍体2.1%, モザイク4.2%, その他16.7%であつ

た。20~24歳, 25~29歳, 30~34歳では42%~50%が正常核型であるが, 母体の高齢化に従い染色体異常が増加し35歳以上での異常核型は85%に達した。

年齢別における染色体異常の増加は, トリソミー型の増加によるものが主であり, このことはDown症候群についてもっとも著明にみられた。流産時妊娠週数との関連では, 12週までの流産症例では71%に異常核型がみられたのに対し, 13週以降の流産症例では44%であった。胎児心拍との関連では, 妊娠9週までに超音波断層法にて胎児心拍が認められた後, 流産した症例の核型異常は90%であり, 胎児心拍が認められなかった症例の異常核型は75%であった。トリソミー型染色体異常においては, 18番や21番のトリソミーでは胎児心拍が認められた後に流産することが多く, 13番, 15番や16番のトリソミーでは胎児心拍が認められないままに流産することが多かった。生産児ではみられない染色体異常の場合は, 胎児心拍が認められないままに流産することが多かった。また, 既往自然流産2回以下の症例における異常核型は72%に対し, 3回以上では67%であった。

### 19. 多嚢胞性卵巣症候群における間脳・下垂体卵巣機能について

○吉野和男・岡田さおり・高橋健太郎  
北尾 学 (島根医大産婦)

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)において間脳・下垂体・卵巣機能の関係を検討した。研究対象は超音波断層法により両側卵巣に10個以上のmicrocystを認めた13例とし血中LH-RH, LH, FSHを180分間, 15分間隔で測定し, その後LH-RH test (LH-RH 100 $\mu$ g 静注法)を施行した。そして, LH-RH, LH, LH/FSH比の13回の平均値, LH-RH testのpeak値(p-LH), またE<sub>1</sub>/E<sub>2</sub>比, T, ASD, DHEA-Sを測定した。

結果として, PCOS (13例)において, LHとLH/FSH比, p-LHとDHEA-SおよびE<sub>1</sub>/E<sub>2</sub>比との間には有意な正の相関関係が認められた。

以上のことよりPCOSにおいて下垂体機能にandrogen系, estrogen系が影響を及ぼしていることが示唆された。

### 20. 高プロラクチン血症における排卵障害の機序の解明

○桑原 章・松崎利也・米田直人  
横山裕司・斎藤誠一郎・漆川敬治  
安井敏之・東 敬次郎・苛原 稔

青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 高プロラクチン (PRL) 血症における排卵障害の機序につき検討した。

(対象・方法) 高PRL血症性排卵障害患者5例(血中PRL: 33~120ng/ml)の16周期, ならびに正PRL血症性排卵障害患者10周期に対し, LHの律動性分泌の検討, プレマリン負荷試験, GnRH負荷試験等を施行した後, GnRHの律動皮下投与(20 $\mu$ g/120分)を行った。hCG非投与周期では卵胞成熟後10日間以上排卵を待機した。hCG投与周期では卵胞成熟後hCG5000単位を投与し排卵を誘発した。

(結果) 高PRLでは非治療時の検査でLHの律動性分泌が平均1.3回/4時間と低頻度でありプレマリン負荷試験において48時間後のLH値が前値の91%(平均)と反跳性上昇を認めなかった。PRLの高低にかかわらずGnRHの律動性投与により全例全周期に卵胞が成熟したがhCG非投与周期での排卵率は, 正PRL症例の86%に対し, 高PRL症例は20%と有意( $p<0.05$ )に低率であった。hCG投与周期では高PRL症例, 低PRL症例ともに全例全周期に排卵した。

(結論) 高PRL血症では, GnRHの律動性分泌の障害とエストロゲンのLH放出に対するポジティブフィードバック機構の障害が主な病態であり, 臨床的にはPRLの卵巣レベルでの卵胞発育および排卵に対する抑制は少ない。

## 21. Nocturnal Hyperprolactinemiaの発症機序に関する検討

### 特にMelatonin分泌との関連について

○岡本啓一・岡谷裕二・相良祐輔  
(高知医大産婦)

(目的) 夜間のProlactin (PRL) 分泌の増量にはMelatonin (MLT) 量が強く関連していることを報告してきた。今回, 夜間にのみ30ng/ml以上のPRLの過剰分泌を示すNocturnal Hyperprolactinemia (NH) 症例に注目し, 夜間の分泌関連とMLT負荷時のPRL分泌動態を解析し, 正常婦人と比較検討した。

(方法) 21時に消灯し, 6時に点灯起床させる明暗条件下で20時より8時まで2時間毎に採血した。MLT負荷は13時に1mg, 5mgを内服投与した。

(成績) 対照群(C群)のMLT, PRLのピークは各々2時, 4時であった。NH群ではMLTはC群に比し早期に増量し, ピークも0時で $182.7\pm 69.1$ pg/mlと有意の高値を示した。PRLはMLTの急速な増量に伴って0時に $52.6\pm 26.7$ ng/mlと著増し, MLTを同調するが

如き変動を示した。MLT1mg負荷では, MTは両群ともに40-60分でピークに達し, PRLも約2時間遅れて同一レベルのピークを示した。C群のMLT5mg負荷では, PRLの増量は極めて早く, 内服後1時間でピークレベルに達した。

(結論) NH群の著明な夜間のPRL分泌の増量, Surge発現時期の変化にもMLT Surgeが強く関連していること, またMLT-PRL surgeの時間差の短縮は, 本症でのMLT分泌亢進がその原因と強く推察された。

## 22. 体重の増減に伴う無月経患者の内分泌学的検討

○林 和俊・岡谷裕二・相良祐介  
(高知医大産婦)

体重減少に伴う無月経患者[第I度(A群): 3例, 第II度(B群): 10例], 体重の増加に伴う無月経患者(C群): 8例]を対象とし, 消退出血後7~10日に内分泌学的検討を行った。

(成績) LH-RH testではLH, FSHの基礎値はA, C群は正常範囲を, B群は正常以下の低値を示した。30, 60分値は, A群は過剰反応を, B群は低反応を, C群は正常パターンを示した。Premarin testでは, 48, 72時間後のLH反応は, B群は著明な低反応を, A, C群は反応は認められるものの正常群に比し低値であった。さらにB群では72時間後のLHの変化率と体重減少率との間に有意の負の相関が認められた( $r=0.68$ ,  $p<0.05$ )。血中estradiol (E<sub>2</sub>) はA, B群では13例中11例が10pg/ml以下の低値を示したが, C群は正常群と同一レベルであった。血中testosterone (T) はA, B群は正常レベルを示したが, C群は $83.9\pm 19.5$ ng/dlで正常群に比し有意に高値を示した。E<sub>2</sub>/T ratioはいずれの群も正常群に比し低値であった。さらにC群では体重と血中T値間に有意の正の相関が認められた( $r=0.710$ ,  $p<0.05$ )。以上の成績から, これら3群間でLH-RHに対する下垂体の反応性が異なることが示された。また, 両群ともE<sub>2</sub>/T ratioが正常群に比し低値を示し, これらが視床下部-下垂体のLH分泌に対するestrogenのpositive feedback機構の乱れを生じさせている可能性が示唆された。

## 23. 先天性精管欠損症の5例

○大橋洋三・森岡政明・小松文都  
戦 泰和・藤田幸利  
(高知医大泌尿器)

男子不妊症の原因としての先天性精管欠損症は,

比較的稀な疾患とされたいが、最近その報告例が増加している。今回我々は、5例の精管欠損症を経験したのでその臨床成績を報告する。

対象 1984年から1992年までに不妊を主訴として受診した5例で、年齢は33~41歳平均36.4歳、内分泌学的検査成績は、T、LH、FSHはいずれも正常であった。精巣容積は、1例で両側15mlであったが、残り4例は20ml以上あった。患側は、両側欠損が4例あり、うち3例は両側とも精巣上体尾部より精管が全長にわたり欠損していた。1例は、1側の精管が精巣上体尾部より約10cmの所で盲端に終わっており、対側は全欠損であった。残り1例は、1側正常、対側は全欠損であった。超音波検査では、前立腺は正常であったが、精囊腺は精管両側欠損例は全例欠損、部分欠損例は低形成であった。精巣生検の所見は、ほぼ正常造精能を示していた。

これらの症例中の1例に対して、東邦大式人工精液瘤を造設した。術中の精巣切開時に得られた分泌液には運動精子を多数認めたと、術後1カ月目の穿刺洗浄液中には精子を認めず2カ月後10-15/HPF、activ sperm 0、3カ月後、精子数 $700 \times 10^4/\text{ml}$ 、active spermは1-2/HPFであった。

治療成績について文献的考察を加える。

#### 24. 腹腔鏡下精索静脈瘤手術の経験

○志田原浩二・市川孝治・小澤秀夫  
大枝忠史・那須保夫・公文裕巳  
大森弘之 (岡山大泌尿器)

男子不妊症の原因のひとつである精索静脈瘤に対して、腹腔鏡下に精巣静脈のクリッピングを行ったので、その経験を報告する。対象は、不妊を主訴に当科を受診し、精索静脈瘤を認めた15例で、年齢は25~43歳(平均33.1歳)、患側は全例左である。術前の精液所見は、精子濃度 $0 \sim 4950 \times 10^4/\text{ml}$ 、運動率 $0 \sim 65\%$ 、陰囊シンチグラムでは、逆流型が3例、うっ滞型が12例であった。手術は、全身麻酔下に、仰臥位Trendelenburg体位とし、CO<sub>2</sub>ガスにて気腹を行い、臍直下に外套管を挿入し、腹腔鏡を挿入した。第2穿刺は恥骨上3横指、第3穿刺はモンローの点で内視鏡下に刺入した。腹腔内を観察後、内鼠径輪の上方で精巣血管および精管の走行を確認した。第2および第3穿刺部より剥離鉗子と把持鉗子を挿入し、精巣血管の内側の腹膜を切開し、後腹膜腔に達した。精巣血管を周囲脂肪組織より剥離した後、動脈と静脈を分離し、静脈をクリッピングの後、切断した。内視鏡下で拡大されているため、精

巣動脈の同定は比較的容易であり、動脈のみの温存が可能であった。平均手術時間は111分、入院期間は8.2日で、術後、全例静脈瘤は消失した。合併症は特に問題となるものは経験していない。術後は創痛も軽く、早期社会復帰が可能であった。静脈塞栓術等と比較して必ずしも侵襲は小さいとは言えないが、手技の容易なこと、効果の確実なこと、安全性等を考慮すると、有効な治療法であると考えられた。

#### 25. 赤外線サーモグラフィによる精索静脈瘤の臨床的検討—第11報—

○河原弘之 (水島中央病院泌尿器)  
田中啓幹 (川崎医大泌尿器)

(目的) 精索静脈瘤の診断における赤外線サーモグラフィの有用性について我々はヒストグラムや、冷負荷で診断率が高まることを報告した。しかし、それにはプログラムの変換や、冷負荷の回復時間がかかるのが難点であった。そこで今回我々は、外来診断の際に、従来の正面測定に加え、両斜位より測定を行い、その有用性を検討した。

(対象および方法) 1988年8月より1992年4月までに当科外来を訪れ、視触診ならびに陰囊シンチグラフィや超音波ドップラーで精索静脈瘤と診断した48人と特発性不妊患者39人である。方法は恒温恒湿室(26℃, 60%)で患者を立位開脚にし、正面、両斜位をポイントモードで測定した。

(結果) 特発性不妊患者群では正面および両斜位で温度差は見られず、精索静脈瘤患者では、正面で精巣部温は右 $31.4 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、左 $32.3 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 、精索部温は右 $33.3 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、左 $34.8 \pm 0.9^\circ\text{C}$ であったものが斜位法において精巣部温は右 $31.1 \pm 1.1^\circ\text{C}$ 、左 $32.3 \pm 1.6^\circ\text{C}$ 、精索部温は右 $33.3 \pm 0.9^\circ\text{C}$ 、左 $35.4 \pm 0.9^\circ\text{C}$ と、その差はより顕著になり、診断も容易になった。

(考察) 我々は赤外線サーモグラフィでポイントモード、ヒストグラムモード、冷負荷を用い、精索静脈瘤の診断率の向上を図った。しかしこの方法では、プログラムの変換や、冷負荷の回復時間が難点であった。そこで、蔓状静脈叢が精索の後方に走ることより精索部を覗き込むように斜位での測定を考えた。その結果、左右の温度差はより顕著になったばかりか、正面では診断し得なかった3例においても診断は容易になった。

#### 26. 過去5年間の男子不妊症の臨床統計的検討

○白瀧 敬・鎌田清治・植野卓也

石津和彦・馬場良和・瀧原博史  
(山口大泌尿器)

1985年1月～1991年7月までの5年間に不妊を主訴として当科男子不妊外来を受診した患者381人について、精子濃度によりI群： $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、II群： $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満、III群： $10 \times 10^6/\text{ml}$ (無精子症を除く)、IV群：無精子症(primary azospermia)、V群：無精子症(obstructive azospermia)のI～V群に分類し、臨床統計的検討を行った。不妊患者は総外来患者の7.8%、男子外来患者の12.5%を占め、初診時年齢は30～34歳が最多で、不妊期間は2～3年が最も多かった。

精巣容積はIV群が他群に比して有意に小さく( $p < 0.01$ )、精液量はV群が他群に比し有意に少なかった( $p < 0.01$ )。また、精子運動率は精子濃度が低くなる程有意に低下した( $p < 0.01$ )。LH値、FSH値はIV群が他群に比して有意に高く( $p < 0.01$ )、さらにFSH値ではIII群もI、II、V群より有意に高値を示した( $P < 0.01$ )。

不妊の原因疾患としては精索静脈瘤が最多で106例(27.8%)を占めており、また閉塞性無精子症が44例(11.5%)と他の報告より多かった。また手術施行例は134例(35.2%)で、そのうちvaricocelectomyが96例(71.6%)と最も多く、人工精液造設術が13例(9.7%)に施行された。

## 27. 精子運動性に及ぼす凍結およびカフェインの影響について

○安元章浩・乾 政志・桑田善弘  
空本慎慈・杉元幹史・竹中生昌  
(香川医大泌尿器)

人工受精において精子凍結保存の技術の向上は重要な問題である。一般的には凍結にはプログラムフリーザーが理想的とされるが高価であり、より簡便な方法が模索されている。また凍結による影響では精子運動性は全般に低下するとされるが、運動の微細な変化に付いてまで調べた報告はない。今回私たちは健康成人20人から用手的に得た精液を用いて、TYB (Test Yolk Buffer, IRVINE Scientific) を用いた液体窒素による簡易凍結法を行い、凍結の運動性に与える影響、さらには凍結精液に対するカフェインの影響を自動解析装置を用いて検討した。その結果凍結により、速度、頭部振幅は増加し、運動率、直線性は低下した。また凍結精子に対するカフェインの影響としては運動率、頭部振幅が増加し、速度は

低下し、未凍結精子に対するカフェインの影響とはほぼ同様の傾向であった。今後凍結精子におけるこれらのパラメーターを人工授精に有利な状態に誘導する技術が必要と考えられる。

## 28. hCG-hMG療法にて造精機能の発現を認めた下垂体小人症の1例

○田村雅人・香川 征 (徳島大泌尿器)  
白川悦久 (徳島大小児科)  
稲井 徹・横関秀明 (徳島市民病院)  
小倉邦博 (小倉診療所)

hCG-hMG療法にて造精機能の発現を認めた下垂体小人症の1例を経験したので報告する。症例は22歳男性で下垂体小人症にて当院小児科にてGH療法を施行していたが、二次性徴の発現を認めないため1986年2月、当科紹介となった。

身長は157cm、67kg、恥毛のなどの二次性徴の発現を認めなかった。勃起は認めしたが、射精は認められなかった。精巣容積は右が5ml、左が4mlであった。血清ホルモン値はLH3.5mIU/ml、FSH2.6mIU/ml、testosterone 0.15ng/mlと低値を示した。LHRH負荷テストでは90分後にLH9.3mIU/ml、FSH5.2mIU/mlであった。hCGテストではtestosterone値は3.1ng/mlに上昇した。以上の結果から低ゴナドトロピン性類宦官症と診断し、hCG3000IUとhMG500IUの週1回の投与を開始した。3カ月後に恥毛の発育など二次性徴の発現を認め、精巣容積も8mlとなった。4カ月後に射精が可能となった。7カ月後に恥毛Tanner grade 3、精巣容積10mlとなった。10カ月後の精液検査では精液量0.8ml、精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ となった。

下垂体小人症にみられた低ゴナドトロピン性類宦官症に対するhCG-hMG療法は有効な方法であると考えられた。

## 29. 抗核抗体と不妊症

○浅桐和男・片山隆章・長谷川 淳  
錦織恭子・新谷恵司・野間 純  
清水健治・工藤尚文 (岡山産婦)

(目的) 膠原病を中心とする自己免疫疾患の患者に高率に検出される抗核抗体は、習慣性流産の患者にも高率に出現し、不育との関連が注目されてきている。ところが抗核抗体と不妊との関係は不明であるため、今回その関係につき検討した。

(方法) 対象は当科不妊外来を受診した不妊を主訴とする125人であり、患者血清を分離し、蛍光抗体法により抗核抗体の陽性、陰性の判定を行い、陽性

の場合は染色パターンの分析, 抗体価の測定を行った。

(結果) 125人の不妊患者のうち, 陽性は35人(陽性率28%)と高率に認めた。年齢, 不妊期間は, 陽性群 $32.1 \pm 4.4$ 歳,  $6.5 \pm 4.4$ 年, 陰性群 $32.9 \pm 4.6$ 歳,  $6.5 \pm 3.8$ 年と両者に差を認めなかった。陽性群の抗核抗体の染色パターンはspeckle型を22人(63%)と最も多く認めた。陽性群のうちfollow up可能であった28人につき検討すると, 17人が妊娠し(妊娠群), 11人は妊娠しなかった(不妊群)。両群の年齢, 不妊期間に差はなく, 抗核抗体の染色パターンにも差はなかった。しかし抗体価は妊娠群は17人すべて40倍以下であったが, 不妊群は11中4例が80倍以上であった。陽性群のうち23人にprednizolone (PSL) 5 mgを月経周期5日目より14日間使用したところ12人が妊娠した。しかし抗核抗体陰性群では43人中妊娠したのは8人のみであった。

(結論) 不妊患者には高率に抗核抗体陽性例が存在した。また不妊治療におけるPSLの効果は, 抗核抗体陽性例に対してより有効であった。

### 30. 習慣性流産に対する当科の夫リンパ球免疫療法の検討

○石松正也・中村康彦・手山知行  
田村晴代・加藤 紘 (山口大産婦)

(目的) 習慣性流産患者の背景, およびそれに対する夫リンパ球免疫療法の有用性について検討した。

(方法) 平成元年1月以降当科を受診した, 原則として連続3回以上の自然流産歴を有する13例を対象とした。夫婦の染色体検査およびHLAタイピングを含む, 習慣性流産に対する一般検査を施行し, このうち明らかな原因を指摘できない症例, またはHLAクラスII抗原2個以上一致する症例に対し, 夫リンパ球による免疫療法を行った。

(結果) 明らかな習慣性流産の因子としては, 夫の染色体転座1例, 妻のX染色体異常1例で, その他はいずれも原因不明であった。HLAタイピングを施行したところ, クラスII抗原が2個以上一致した夫婦が10例(77%), またHLA-DR抗原が1個以上一致した夫婦は12例(92%)であった。この13例のうち, 11例に夫リンパ球免疫療法を行い, 6例に妊娠が確認され, 分娩例4例, 現在妊娠継続例1例と, 妊娠維持に成功した症例は5例(83%)と良好な結果が得られた。

(結論) 習慣性流産の免疫学的発症因子として, HLA抗原の一致が報告されているが, 今回の検討で

も特にHLA-DR抗原の一致が高率にみられた。また, 反復する流産に対しての夫リンパ球免疫療法は有用な治療法であると考えられた。

### 31. ヒト精漿中Fcレセプターの生殖免疫学的研究

○前田信彦・平野浩紀・前川正彦  
大頭敏文・鎌田正晴・青野敏博

(徳島大産婦)

(目的) Fc $\gamma$ レセプター(Fc $\gamma$ R)はimmunomodulatorとして知られているが, 我々はこれまでに, 精漿中に既知のFc $\gamma$ Rとは異なる, 新しいCD16(Fc $\gamma$ R III)関連抗原の存在することを明らかにしてきた。そこで, 本研究では, 精漿中のFcRを純化し, 各種免疫反応に及ぼす影響につき検討した。

(方法) 凍結乾燥保存した精漿の75%硫酸の不溶画分から, 各種クロマトグラフィーを用いて抗原を精製した。抗原の検出はSDS-PAGE, 抗Fc $\gamma$ R III(CD16)抗体であるLeu1bを用いたWestern blotにより行った。免疫応答系として各種マイトジェン刺激リンパ球活性化反応(LB), エフェクター系としてNK活性およびADCC活性系に各種濃度の精製抗原を添加し, その影響を検討した。

(成績) 精製したCD16関連抗原は, クーマシーブルー染色にて16KDの1本のバンドとして検出された。同抗原の添加により, PWM刺激LBは用量依存的に抑制され,  $1 \mu\text{g/ml}$ で刺激指数増加率 $14.3 \pm 5.1\%$ とほぼ完全に抑制された。しかし, PHAおよびConAによるLBは $1 \mu\text{g/ml}$ の抗原添加で $107.5 \pm 21.4\%$ 及び $63.9 \pm 10.0\%$ であり, さらにNK活性, ADCC活性の抑制は-8.3%および5%とConA刺激LBに軽度抑制を示した他はほとんど抑制作用を示さなかった。

(結論) 今回純化した16KDの抗原は, モノクローナル抗体Leu1bと反応することからFc $\gamma$ R III(CD16)と考えられ, PWMによるリンパ球活性のみを強く抑制したことから, この抗原は精子抗原に対する抗体産生を抑制していると考えられる。

## シンポジウム

### 「精子と卵の成熟と局所環境因子」

#### 1. ヒト精巢上体精子の妊娠能

○三浦一陽 (東邦大泌尿器)  
岡田詔子 (東邦大第2解剖)

精路通過障害症例(先天性精管欠損, 鼠径ヘルニア手術時の精管結紮, 精巢上体炎後の閉塞, 原因不明の精管狭窄, 精囊奇形例等)は自験例全例の3.2%

と高率に発生している。我々は、そのような症例のうち精管、精管吻合や精巣上体・精管吻合の不可能な症例に、シリコン製人工精液瘤用プロステーシスを考案・作成し、精巣上体に造設して精巣上体精子の回収を行っており、回収精子の人工授精により妊娠と出産に成功した2症例を経験している。

一方、動物実験では、精巣上体から採取した精子の妊孕能は知られているが、ヒトの精巣上体の精子での妊孕能は、簡単に採取できないので少数例の報告に過ぎない。そこで我々は精路閉塞症例に対し、人工精液瘤を造設する時や、その後の回収精子を用いてヒト精巣上体精子の妊孕能について検討している。

(実験方法) 精巣上体からの回収精子は hypo-osmotic swelling test (HOST) の施行や、精巣上体からの人工精液瘤造設手術時の精子の採取、あるいは人工精液瘤からの回収精子がごく微量の場合は、兼子らの percoll クッション法を用いて洗浄し、培養後やMS管を用いて swim up sperm を回収した。これらの精子についてハムスターテストや、先体反応陽性率検査(先体反応については精子を受精能獲得条件で約4時間培養したのち室温でPIにて約10分染色すると、死滅精子のみが赤く染色される。その後洗浄しFITCPSAで先体部を約30分、4℃で染色すると先体反応完了精子はPSAで染色されないで識別できる。これらの蛍光ラベルを指標として検体を flow cytometry に流して自動解析により生存精子の先体反応陽性率を検討する) などの方法等を用いて得た結果を、精巣上体より採取した精子と男性不妊症の精子と正常男性の精子について分析し、それぞれの妊孕能を検討して報告する。

## 2. 精巣上体のアンドロゲン環境と精子成熟

○木下裕三 (横浜市大泌尿器)

精巣上体は、内部を通過する精子が成熟する場であると考えられており、この精子成熟のプロセスは、一般に、アンドロゲン依存性の機構として知られている。精巣上体のアンドロゲン代謝の中核をなす酵素である  $5\alpha$ -reductase の比活性は、前立腺とほぼ同等に、きわめて高く、また酵素学的諸性質の観点からも、基質親和性が高く、酸性領域に至適pHを持つという点で、前立腺と同様のアンドロゲン標的臓器としての性格を有している。しかしながら、精巣上体内部においては、 $5\alpha$ -reductase の分布は均一ではなく、部位による差が認められており、ヒト精巣上体頭部の先端から約5~10mmまでの部分を占

めている輸出管の領域では、 $5\alpha$ -reductase 活性がきわめて低く、transitional zoneで、精巣上体管に移行すると急激に $5\alpha$ -reductaseが高くなることが確認された。この様に、同一精巣上体内にあっても、輸出管と精巣上体管とでは、まったく異なる内分泌学的環境を呈していることは、精巣上体の部位別に見た精子の成熟度と内分泌学的環境の関連性を知る上で興味深い点であろうと思われる。

近年、授精技術の進歩に伴い、精子の成熟と言う概念を一義的に解釈することは困難となり、たとえば、IVFの成否にかかわる精子成熟と、正常プロセス、あるいはAIHに要求される成熟とを同一レベルで議論できるかは疑問であるが、最近、我々は、電氣的刺激法による精巣上体尾部精子の大量回収法を試み、その運動特性をCellsoftにより解析しているもので、その観点から精巣上体尾部精子の成熟度についても考察を加えてみたい。

## 3. Capacitation過程におけるヒト精子細胞内の free Ca濃度の変化

○山野修司 (徳島大産婦)

精子の先体反応はCa influxによって誘起されると考えられていたが、直接的な証明はなかった。最近、ウシにおいて、細胞内free Ca濃度(以下[Ca]i)の上昇した精子のみが先体反応を起こすことが明らかとなった。しかし、ヒト精子では[Ca]iに関する知見はほとんどみられない。我々は、Fura2を用いて個々のヒト精子の[Ca]iを測定した結果、resting stageにおいては $121 \pm 48 \text{ ng}$ であることを見出した。これらの精子を5~6時間程度培養しても、精子[Ca]iは $126.6 \pm 39.50 \text{ ng}$ と変動しないが、18時間培養した場合は、 $154 \pm 39 \text{ ng}$ に上昇することが判った。さらに、18時間培養したヒト精子に20%卵胞液を添加したところ、12検体中10検体に添加後10分以内に精子[Ca]iが有意に上昇し、その上昇幅は平均23ngであった。現在、精子[Ca]iと先体反応との関連を検討中である。また、培養時における精子の細胞膜脂質の変化についても述べたい。

## 4. 卵胞の発育・成熟とInterleukin-1

○中村康彦 (山口大産婦)

卵胞発育・成熟や排卵現象には、従来のEndocrineコントロールのみでは解明し難い問題が多々ある。我々は、卵巣内に存在するThird componentとしてのMast cellおよびMacrophageに注目し、これら細胞が卵胞発育・成熟および排卵に及ぼす影響について検

討してきた。

Krishnaらは既に雌ハムスターでは排卵期のLH surgeに一致してMast cellに脱顆粒が見られることを報告している。我々の検討ではラットやハムスターのような複数排卵の動物ではMast cellは卵巣そのものよりは卵巣門や卵巣嚢に多く見られ、牛や猿のような単一排卵動物では卵巣内に多くのMast cellを認めた。さらに牛での検討の結果、Dominant follicleではnon-dominant follicleより内茨膜細胞層で有意にMast cellの数が増加していた。またMast cellから分泌されるヒスタミン、セロトニンにつき雌ハムスター卵胞に対する効果をin vitroで検討した結果、ヒスタミンやセロトニンは卵胞のSteroidogenesisに対して促進的に作用している事が明らかとなった。すなわち、Mast cellは卵胞の発育・成熟に対して促進的に働いている可能性が示唆された。

一方、卵巣内のMacrophageとしては、黄体退縮期に出現するscavengerとしての役割がよく知られていたが、近年Macrophageより分泌される種々のCytokineの卵巣機能に対する影響が注目を集めている。我々はこのうちInterleukin-1 (IL-1)に注目し、ハムスター卵胞に対する影響をみた。その結果、IL-1はPreovulatory follicleのSteroidogenesisを閉鎖卵胞の状態に近づけると共に、形態学的にもhCGによる卵胞の黄体化を抑制する事が明らかとなった。すなわちMacrophageは、卵胞の発育・排卵に対しては、抑制的に作用している可能性が示唆された。

卵胞は、Preantral follicleより発育し始め何らかのメカニズムをクリアして成熟し排卵卵胞に至る。このDominant follicleの選別、言い換えればAtretic follicleの選別も未だ明確には解明されていない。Mast cellやMacrophageはこの卵胞の成熟・排卵卵胞の選別になんらかの関与を及ぼしていることが示唆された。

## 5. 排卵現象におけるPlasminogen Activator-Plasmin系の作用機序について

○森岡信之 (高知医大産婦)

(目的) 卵胞内Plasminogen activator (PA)-plasmin系の卵胞壁破裂機序における役割が注目されている。我々は、哺乳動物の排卵機序解明を目的として未成熟ラット卵巣灌流系を確立し、PA-Plasmin系の活性阻害剤であるtrans-4-(aminomethyl)-cyclohexane carboxylic acid (AMCHA), あるいはPlasminの特異的阻害剤であるD-valyl-L-Phenylalanyl-L-Lysyl chloromethyl ketone (Val-Phe-Lys-CMK)の排卵抑制効

果、排卵阻害の作用発現時期、作用発現時間および卵胞内tPA活性の変動について検討した。一方、ヒト卵胞内PA活性と卵胞液中ステロイド濃度との関連についても検討を加えた。

(方法) LH (0.1  $\mu$ g/ml) +IBMX (0.2mM) 添加灌流液へ、AMCHAあるいはVal-Phe-Lys CMKを投与し、容量、暴露時期、暴露時間の排卵に及ぼす影響について検討し、更に排卵過程における卵胞内tPA濃度を測定した。また、ヒト卵胞液中tPA活性とステロイド濃度を測定した。

(成績) AMCHA暴露は0.05~5 mMの間で有意の用量依存的排卵抑制効果を認め、5 mMで $4.2 \pm 1.9$  (n=7)と最大排卵抑制効果をみた。Val-Phe-Lys-CMKにおいても同様に用量依存的排卵抑制効果を認めた。AMCHA暴露後plasminogen 4.2  $\mu$ g/mlの添加により $21.3 \pm 4.5$ と正常排卵数に回復した。AMCHA, Val-Phe-Lys-CMKは、ともに卵巣内のSteroidogenesis, Prostaglandin synthesisに影響を与えなかった。AMCHA暴露開始時期の排卵に及ぼす影響は、LH+IBMX投与1~3時間後より暴露させた群にのみ有意の排卵抑制効果を認めた。暴露時間の排卵に及ぼす影響は、LH-IBMX投与1時間より3時間の暴露で、排卵数 $6.4 \pm 1.4$ と有意の抑制を認めた。卵胞内tPA活性は、HCG投与1時間後より活性上昇を認め、2時間後および9時間後にPeakを形成する2峰性の推移を示した。ヒト卵胞内tPA活性とステロイド濃度との検討では、Estradiol, Progesterone高値群に、tPA活性が高い傾向を認めた。

(結論) (1) AMCHA, Val-Phe-Lys-CMKの用量依存的排卵抑制効果がみられた。(2) AMCHAはLH投与後4時間以内という排卵過程の極初期段階に作用させた時のみ、排卵抑制効果を認めた。(3) これらの排卵抑制効果はPlasminogen投与により回復した。(4) 卵胞内tPA活性はHCG投与2時間後に初期活性Peakを認めた。すなわち、PA-Plasmin系は排卵過程の極初期段階にActivateされ、以後の卵胞壁破裂機序のTriggerとなることを明らかとした。一方、卵胞内Steroid濃度とtPA活性の検討から、PAは排卵機序のみならず卵成熟度に関与する可能性も示唆された。

平成4年度 日本不妊学会東北支部総会

日時: 1992年10月3日(土)

会場: ホテル辰巳屋

## 1. PZDとマクロファージ

○野原 理・小池数与・田中栄一  
平山寿雄・斉藤英和・川越慎之助  
広井正彦 (山形大産婦)

partial zona dissection (PZD) を受けた卵が、マクロファージ (M) より受ける影響について検討した。マウスを過排卵処理し、1細胞の受精卵を培養に供した。PZDは、26ゲージ針を用いて施行した。Mはマウス腹腔内にピシバニール (OK) 投与48時間後に腹腔内より回収した。PZDを施行せず、Mを加えない群 (C群)、PZDを施行せず、Mを加えた群 (M群)、PZDを施行し、かつMを加えた群 (P群) およびMを賦活化するためOKを培養液に加えた (C', M', P群) の6群について、24時間ごとに理想発育胚の率を観察した。Mを加えた群の発育は、加えない群に比べ良好であった。またPZDを加えた群と加えない群に差は見られなかった。

結果として、Mを培養系に加えても胚の発育は障害されず、むしろ胚の発育を促進していた。PZDにより透明帯の裂け目を形成しても、Mによる胚への発育障害は認めなかった。

## 2. マウス2細胞期胚と家兔卵管上皮細胞の共培養に関する研究

○千田定則・船山由有子・寺田幸弘  
渡辺 正・田村みどり・陳 偉業  
村上 節・萬代泰雄・戸澤秀夫  
深谷孝夫・矢嶋 聰 (東北大産婦)

(目的) 家兔卵管上皮細胞とマウス2細胞期胚との共培養を行い、初期胚発育に及ぼす影響を検討した。

(方法) 雌性成熟家兔の卵管をcollagenase-trypsin処理後、HTF+10%FCS培地に $1 \times 10^5$ /mlで播種し培養した。過排卵・交配した幼若雌マウスから2細胞期胚を採取・共培養し、①初期胚発育と120時間後の培地内酸素分圧をコントロールと比較した。

②cell culture insertsを入れ、共培養細胞との接触の有無による初期胚発育を比較した。

(結果) 胚盤胞率は、コントロール40.2%、共培養53.8%で ( $P < 0.01$ )、120時間後の酸素分圧は、各々142.3, 128.8mmHgであった ( $P < 0.01$ )。接触の有無による胚盤胞率は、接触あり52.5%、なし50.0%であった。

(結論) 家兔卵管上皮細胞とマウス2細胞期胚との共培養は初期胚発育を促進し、それは共培養細胞と

卵細胞との直接接触よりも、共培養細胞から放出される何らかの発育促進物質と低酸素状態が影響を及ぼしていると考えられる。

## 3. ヒト卵管上皮細胞の凍結保存による共培養への応用

○菅野良恵・片寄治男・小野木 哲  
渡辺美佳・市川文隆・菅野孝子  
月川 奏・柳田 薫・星 和彦  
佐藤 章 (福島県立医科大産婦)

IVFの成功率を上げる手段の一つとして、共培養 (CO-CULTURE) が行われるようになってきているが、臨床で応用するためには、卵管上皮細胞が常時供給されることが必要となる。そこでヒト卵管上皮細胞の凍結保存を試みたので報告する。

採取したヒト卵管より卵管上皮細胞浮遊液を取り出し、細胞凍結保存液セルバンカーに細胞を懸濁し、クライオチューブに入れ急速に $-80^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、凍結させる。融解は、 $37^{\circ}\text{C}$ 微温湯につけ急速に行い、RDG培養液を用いて培養する。我々の方法は従来のslow programed freezing法に比べ、所要時間が短かく手技も簡便であり、共培養の実現に大きく貢献していくものと思われる。今後、凍結融解された細胞を用いて実際に共培養を行い、機能的に検討する必要がある、研究を重ねていく予定である。

## 4. マウス精巣上体各部の精子受精能に関する検討

○平山寿雄・松田秀雄・斉藤英和  
川越慎之助・広井正彦 (山形大産婦)

マウスの精巣上体を、頭部、体部、尾部の3つの部分に分け、各々から取り出した精子を用いて、顕微操作による囲卵腔注入を施行した際の受精能および、受精した初期胚の発育状況を検討した。

受精能についてみると、通常の体外受精で頭部精子で0%、体部精子で3.6%、尾部精子で82.3%であったが、囲卵腔注入法により、頭部精子16.8%、体部精子48.9%であった。また受精した初期胚の発育状況を見ると、3群間に有意差なくblastocystに至ることがわかった。

つまり、運動性、透明帯結合能、貫通能において未熟な精巣上体頭部および体部の精子は、通常の体外受精における受精率は低いものの、囲卵腔内注入技術により受精が可能となることが確認された。また、これら頭部、体部精子による受精卵の発育も良好であることがわかった。

## 5. 精子受精能検査の検討—Hamster testと

### Ca ionophore A23187 challenge testの相関—

○藤井俊策・池田史朗・立崎達夫  
鍵谷昭文・齋藤良治 (弘前大産婦)

(目的) Ca ionophore A23187処理による精子先体反応の誘起をpisum sativum lectin (PSA) で調べ、hamster testの成績と比較・検討した。

(方法) 男性不妊患者15名と健常男性14名を対象とし、A23187 challenge testは以下のごとく行った。A23187処理精子と非処理精子とをFITC-PSAで先体を染色して、先体が消費された生存精子の割合を求め、A23187処理精子と非処理精子との差を先体反応誘起の指標とした。Hamster testは、同時に同じ検体を使用して行った。

(成績) A23187 challenge testの平均値は不妊群では22.1%健常男性群では35.6%で、両群に有意差は認めなかったが、hamster testの侵入率と有意な順相関が認められた ( $R=0.7$ )。

(結論) A23187 challenge testは精子の受精能力を知るスクリーニング検査として有用であることが示唆された。

## 6. Acridine orange染色法によるsperm

### —egg fusionの判定法

○片寄治男・阿部利明・佐々木恵子  
飯沢禎之・中木純子・木村康之  
柳田 薫・星 和彦・佐藤 章  
(福島県立医大産婦人科)

(目的) Sperm-egg fusion判定法としてのAcridine orange (A. O.) 蛍光染色法の有用性について検討した。

(方法) 透明帯除去ハムスター未受精卵 (metaphase II) に、m-TALP-3 培養液でacrosome reactionを惹起されたハムスター精巢上体尾部精子を授精させ、経時的に卵を酸処理し、染色を施した。

(結果・考察) 授精後10分から、Red型の蛍光を呈する膨化現象のみられない精子核が観察され始め、20分以後は膨化精子核へと変化した。S-S結合に乏しい精子核をRed型に染色する性質を有するA. O. により、fusion後に卵細胞質内でS-S結合の還元を受けた精子核も同様にRed型に染色され、膨化以前の早い段階でfusionを判定することが可能であるとともに、授精精子のacrosome reactionの迅速な評価法にも成り得ることが示唆された。

## 7. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた卵細胞骨格の

## 研究

○寺田幸弘・渡辺 正・松山由有子  
陳 偉業・千田定則・田村みどり  
村上 節・萬代泰男・戸澤秀夫  
深谷孝夫・矢嶋 聰 (東北大産婦)

(目的) microfilaments (MF) は細胞の運動、変形等に関与するほか、細胞膜裏打ち構造の土台としての役割が注目されてきている。今回卵のMFを蛍光染色し、共焦点走査型レーザー顕微鏡で観察した。

(方法) ゴールデンハムスター透明帯除去卵を固定・透過処理後FITC-phalloidinにて処理し、卵のMFを蛍光染色した。標本の観察はOLYMPUS-LSM-GB200を用いた。

(成績) 共焦点レーザー顕微鏡により従来の蛍光顕微鏡で悩まされた他焦点よりの散乱光が除かれ、明瞭な像が得られた。また画像解析によりサンプル内の蛍光強度の客観的な判断が可能であり三次元解析により卵のmicroscopic tomographyとも言える像が得られた。M II期卵ではMFは細胞膜直下に集積し、特に第1極体放出部に多重に存在が認められた。

(考察) 共焦点レーザー顕微鏡は特に卵のような大きな細胞の立体的解析に大きな力を発揮すると考えられる。

## 8. LH-RHアナログ投与による下垂体精巢ホルモンおよび精巢組織の変化

○笹川五十次・都丸政彦・安達裕一  
石郷岡学・中田瑛治 (山形大泌尿器)

前立腺癌患者12名(平均年齢70歳)を3群に分け、徐放型LH-RHアナログ(酢酸ゴセレリン)を0.9, 1.8, 3.6mgずつ皮下投与した。血中LH, FSHおよびテストステロンは、3群とも投与後28日目まで有意に低下したが、3群間における差は認めなかった。精巢組織は、LH-RHアナログ投与後8~16週で、Johnsen scoreの低下、精細管内腔の狭小化、精細管壁の肥厚を3群において認めた。しかしながら、3群間において差は認められなかった。本研究より酢酸ゴセレリン0.9mg投与が、血中ホルモンとともに精巢組織にも十分な抑制を示すことが明らかになった。LH-RHアナログの長期投与は、精巢組織に不可逆的变化をきたすことがあるため、本剤を男性避妊薬として用いる場合、少量投与で十分であると考えられた。

## 9. 妊娠成立周期における黄体中期の血中プロゲステロンとエストラジオールに関する検討

○池田史朗・立崎達夫・藤井俊策

鍵谷昭文・斎藤良治 (弘前大産婦)

妊娠周期と非妊娠周期での黄体中期の黄体機能の相違を検討する目的で、黄体中期の血中P<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>値、P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>を測定した。

(対象および方法) 妊娠周期群26名の内訳は、自然周期群11例、clomid周期群15例であった。基礎体温、超音波断層法、尿中LH、血中P<sub>4</sub>を基に排卵を確認し、黄体中期(高温相6から8日目)に採血し、P<sub>4</sub>(ng/ml)およびE<sub>2</sub>(pg/ml)をEIA法にて測定した。非妊娠周期は、これら26名の妊娠し得なかった周期の単数あるいは複数のデータを用いたが、その内訳は自然周期群17例、clomid周期群29例であった。

(結果) 自然周期群、clomid周期群ともに非妊娠周期ではP<sub>4</sub>値とE<sub>2</sub>値の間に有意な相関を認めなかったが、妊娠周期群ではP<0.05で有意な相関を認めた。黄体機能の指標として、黄体中期の血中P<sub>4</sub>値のみならず、血中E<sub>2</sub>値が、着床、妊娠に関する重要な要因であることが示唆された。

#### 10. 多嚢胞性卵巣に対する内視鏡下レーザー治療とその臨床的効果

○松山由有子・渡辺 正・寺田幸弘  
田村みどり・陳 偉業・千田定則  
村上 節・萬代泰男・戸沢秀夫  
深谷孝夫・矢嶋 聡 (東北大産婦)

PCO45例中クロミッドやHCG-HMG療法にて排卵誘発が困難であった25症例全員に対して、腹腔鏡下にレーザーを用いて両側卵巣に小孔を開け、その術前後の臨床所見および内分泌動態からその有効性を検討した。

追跡が可能であった22症例中21例(90.9%)に術後排卵を確認、そのうち13例(59.1%)が自然排卵であった。7例(31.8%)はpure-FSH療法にて、1例を除いて高度なOHSS症状を呈さずに排卵した。9例(40.9%)が術後妊娠成立した。術前にOHSSが17例中10例(58.8%)に認められたが、術後は8例中2例(25.0%)であった。16例について内分泌学的検討を行ったが14例でLHの基礎値の改善を、10例でLH/FSH比の改善を、12例でLH-RH負荷後のLH値の反応パターンの改善を認めた。

PCOに対する腹腔鏡レーザー焼灼術は、卵巣楔状切除術と同等に有効な治療法であり、しかも手術侵襲が少なく反復治療が可能で、今後広く応用されるべき治療法と思われる。

#### 11. 腹腔鏡施行例における妊孕性予後と不妊因子

#### の関連

○中谷一夫・遠藤英敬 (釜石市民病院)

若干の治療手技を加えた腹腔鏡を施行し、その後、当施設で管理した不妊症例238例について、腹腔鏡施行時を起点とした妊孕性の予後と諸不妊因子の関連を検討した。

①妊娠例は腹腔鏡後短期間(月)に集中し、その傾向は続発群に著しかった(原発:14.9±19.0, Median:9/続発:7.4±7.1, Median:6)。②原発群では続発群に比べて男性不妊因子の頻度が高かった(33/146 vs 5/92, P<0.01)。③腹腔鏡からの期間の2 MOM (Multiple of the median) 時点での妊娠例では不妊例に比べて、腹腔鏡までの不妊期間が短かった(原発:37.0±22.1 vs 49.9±32.1, P<0.05/続発:35.5±21.4 vs 49.6±25.6, P<0.01)。④子宮内膜症の存在は予後との関連を示さなかった。⑤原発群では非子宮内膜症性両側卵管閉塞が(0/41 vs 7/68, P<0.05)、続発群では非子宮内膜症性両側付属器異常が(3/28 vs 16/43, P<0.01) 予後と関連を示した。その原因としては既往の性的感染症の影響が示唆された。

#### 12. 長期不妊の問題点

(市中病院不妊外来の立場より)

○宮川コウ・武田正美 (松園病院産婦)

- 1) 当不妊外来における約1600例を対象にした妊娠率は約40%であった。
- 2) 不妊の原因は内分泌因子が半数以上を占め、ついで卵管因子、男性因子で、特に最近は男性因子が増加の傾向を示している。
- 3) 不妊の年齢分布、および不妊期間と妊娠率は加齢、不妊期間の長期化と共に低下し、特に36歳以上、7年以上になれば妊娠率は半減する。7年以上を長期不妊として扱った。
- 4) 不妊症410例中、長期不妊は88例でそのうちの妊娠例は19例(21.6%)でそのほとんどが治療後2年以内の妊娠であった。
- 5) 体外受精(高度医療施設に依頼)24例中4例の妊娠例をみたが、1例は流産した。24例中、長期不妊は14例で、妊娠例はない。
- 6) 長期不妊は高齢化と共に複数の不妊因子となる場合が多く妊娠成立には不利になるので、長期化の原因となる社会的要因や治療のあり方に検討を加える必要がある。

#### 13. 当科における凍結受精卵の臨床応用

児玉英也・福田 淳・松井俊彦

清水 靖・関根和子・タシュデミル・ムラト・タシュデミル・イシュク  
樋口誠一 (秋田大産婦)

(山形大産婦)

当科の凍結胚移植の臨床応用状況について報告する。胚凍結は原則として媒精後2日目に行い、凍結保護剤としてPROHとsucroseを用いた。プログラムフリーザーにて、 $-7^{\circ}\text{C}$ で植水、以下 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{ml}$ で緩徐に、 $-30^{\circ}\text{C}$ から急速に $-180^{\circ}\text{C}$ まで冷却して液体窒素に投入した。解凍は用手的に行い、凍結保護剤を取り除いた後、自然周期またはclomid周期で同期させた子宮に胚を移植した。1991年10月より1992年9月まで、34症例39周期で胚凍結を行い、22症例24周期に解凍、移植を行った。その結果、5例の妊娠(単胎妊娠2例、双胎妊娠1例、稽留流産1例、化学的流産1例)が認められ、妊娠率は移植当り20.8%であった。自然周期およびclomid周期、LH surgeおよびhCGによる同期のいずれからも妊娠例が得られた。また、多くの妊娠例の解凍時の胚の形態は、必ずしも良好ではなかった。比較的簡便な方法で妊娠例が得られたことから、今後臨床応用は拡大するものと考えられる。

#### 14. CA-125が高値であったchlamydia trachomatis (chT) による骨盤腹膜炎 (PID) の5例

○角田千恵子・永井 宏

(向仁会永井病院)

近年検査法の進歩により、chTによるPIDの実態が明らかにされつつある。一方、CA-125が卵巣癌のみならず、子宮内膜症等の良性疾患においても、高い陽性率を示す事は良く知られている。今回我々は、CA-125が異常高値を示した、chT PID 5症例を経験し、検討したので報告する。5症例とも頸部クラミジア抗原、IgA、IgG抗体は陽性であり、4症例は若年未婚であった。腹腔鏡あるいは開腹した3症例は、いずれも淡黄色透明な少量の腹水を認め、卵巣、卵管、卵管采の線維性癒着があり、炎症は、漿膜の発赤と水腫を主としたカタル性病変であった。化学療法施行後、いずれの症例もCA-125は正常化した。chT PIDでCA-125が高値を示したのは、腹膜炎に炎症等の刺激が加わり、CA-125産生が誘導されたためと推測されるが、chT感染とCA-125産生がより密な関係にあるのではないかと示唆される。

#### 15. IVF治療における子宮外妊娠の発生

○小池数与・野原 理・平山寿雄

斉藤英和・川越慎之助・広井正彦

IVF-ETによる妊娠のうちで、子宮外妊娠の占める割合は自然妊娠によるものに比べて高いことが報告されている。当科において1987年1月から1992年8月までに施行した1878の採卵周期における子宮外妊娠の発生について検討した。1878の採卵周期のうち1311周期(69.8%)に胚移植を施行し、そのうち226周期(17.2%)に妊娠が確認された。そのうちの子宮外妊娠は8周期であり、全妊娠周期にあたり3.5%を占めていた。8周期のうち、1症例で2回の子宮外妊娠例があり、また1例は子宮内外同時妊娠であった。不妊原因は、7症例中4例が卵管因子であった。8周期のうち4周期は、MTXによる保存的治療が成功した。妊娠継続例と子宮外妊娠例で、各パラメータを検討したところ、総胚移植数が平均2.71個と3.71個と、有意に子宮外妊娠で高かった。IVF-ETでは、常に子宮外妊娠の発生に留意することが必要であり、またその場合には早期のMTX保存療法が可能である。

#### 16. OHSSに合併した脳血栓症

○福田 淳・児玉英也・松井俊彦

清水 靖・関根和子・タシュデミル・ムラト・タシュデミル・イシュク

樋口誠一 (秋田大産婦)

今回、OHSSに脳血栓症を併発した症例を経験したので、報告する。症例は31歳、6年間の不妊を主訴に来院。両側精管閉塞による無精子症と診断され、精巢上体精子による体外受精の方針となる。GnRHa、HMG、HCGにて排卵誘発、27個採卵、5個受精、4個移植施行。移植後11日目腹部膨満し、入院管理となる。安静輸液管理するも、その翌々日深夜、突然の不穏状態および左半身麻痺を認め、直ちに脳血管撮影施行。左右内頸動脈閉塞と診断される。諸治療にて現在全身状態は回復し、リハビリ中である。本症例は双胎妊娠が成立していた。入院を要した11例の重症OHSS症例について、入院時の凝固学的な検討を行い、今回の症例と比較した、その結果、OHSSでは、ほぼ全例、Htの上昇、aPTTの短縮、TATの上昇を認め、過凝固の状態にあった。血栓症を併発した本症例では、他に比べFDP-DDの上昇、PICの上昇、 $\alpha 2-P1$ の低下、プレカリクレインの低下が著しく、血栓症の一つの指標となると思われた。

#### 17. IUD装着内膜にみられる化生について

○利部輝雄・鈴木浩基・西谷 巖  
(岩手医大産婦)

Müller管は、卵管、子宮、膈の上1/3を形成するが、その上皮も夫々に対応して分化する。Müller管上皮は多分化能を有しており、この上皮で覆われる部位には種々の化生がみられる。子宮内膜では、内因性あるいは外因性のエストロゲン、慢性炎症、機械的刺激により種々の化生が生ずる。

IUDは、子宮内膜に対する持続する機械的刺激の代表であるが、そのさいの子宮内膜化生についての報告は少ない。そこで、IUDを2年間装着したのち、交換あるいは除去を希望して来院した月経周期25~35日の婦人282例を対象に、装着者の同意のもとに子宮内膜を採取し、病理組織学的に検討した。その結果、282例中185例65.6%に何らかの化生が認められた。化生の分類では、Papillary metaplasia 143例(50.7%)、Hobnail metaplasia 60例(21.3%)、Ciliated cell metaplasia 48例(17.0%)、mucinous metaplasia 6例(2.1%) Squamous metaplasia 5例(1.8%)、Clear cell metaplasia 1例(0.4%)であった。

## 特別講演

### I 卵管内精子移動に及ぼす排卵の影響

伊藤雅夫 (日本大学衛生学)

### II 顕微受精の現状と将来

後藤和文 (鹿児島大学畜繁殖学)

### III POFの臨床

平野睦男 (仙台JR病院産婦)

POF (premature ovarian failure) は40歳以下の成熟婦人に発症する無月経であり、内分泌学的には高gonadotropin血症と低estrogen血症が特徴である。先天性の原始卵胞の欠乏状態や卵巣におけるFSHレセプターの不足のほか、感染症などによる卵胞組織の破壊、卵巣におけるFSH抗体の形成など、自己免疫性卵巣不全も成因として考えられている。POFに対しては卵巣ステロイドホルモン療法やGnRH agonistとHMG-HCG療法の併用の有効性が期待されて来たが、排卵、妊娠に至る例は少なく、このため最近では欧米諸国からoocyte donationによる他人の卵子と夫精子を用いたIVF-ETやGIFTによる妊娠報告例がふえつつあるのが現状である。

今回はPOFの臨床像、病態、とくに自己免疫疾患との関連性について考察し、さらに自験例を含めて、その治療方法と限界についても述べる。

# 関連学会のお知らせ

## 第8回世界体外受精会議

かねてからご高承の通り、本年9月に第8回世界体外受精会議が本邦で開催されるに当り、共催団体である日本不妊学会並びに日本受精着床学会の年次学術集会も合流して開催する運びとなっております。

このような方針の下に、それぞれの学術集会が自主性を保ちながらも、合流することによって参加して頂くことの意義と成果がさらに相乗されますよう、関係者が緊密な連絡をとりながら企画を進めて参りました。

世界会議、国内会議ともに、学術プログラムをはじめ参加者にご満足頂けるよう腐心したつもりであります。これらの学会の成否は皆様のご参加にかかっております。登録料につきましても日本不妊学会と世界体外受精会議(日本受精着床学会を含む)一括登録の場合は、特別料金を設定させて頂いております。

会を盛り立てて頂きますよう皆様のご参加を心からお待ち申し上げます。

第8回世界体外受精会議  
会長 森 崇 英  
第38回日本不妊学会  
会長 杉 本 修  
第11回日本受精着床学会  
会長 人 谷 明

### 参加登録のご案内

学会に参加ご希望の方は、下記の要領により、登録手続きをお願い致します。登録費には、学術プログラムへの参加費、コンgress・キット、及び社交行事(但し一部有料)などへの参加費、会議資料の費用が含まれています。

また、同伴者の方々の登録費には、学術プログラムへの参加費は含まれていませんが社交行事(但し一部有料)や同伴者プログラムへの参加費が含まれています。

### 1. 日程

1993年

	9/11(土)	9/12(日)	9/13(月)	9/14(火)	9/15(水)
午前	第38回日本不妊学会	登録受付			
午後		開会式	第8回世界体外受精会議		閉会式
夕	懇親会	ウェルカムカクテル		バンケット	

## 2. 登録費

- 1) 第8回世界体外受精会議・第38回日本不妊学会・第11回日本受精着床学会3学会に参加される場合

	1993年5月31日まで	1993年6月1日以降
参加者	¥53,000	¥58,000
同伴者	¥10,000	¥10,000

- 2) 第8回世界体外受精会議・第11回日本受精着床学会2学会に参加される場合

	1993年5月31日まで	1993年6月1日以降
参加者	¥50,000	¥55,000
同伴者	¥10,000	¥10,000

- 3) 第38回日本不妊学会のみにご参加の方は、当日下午記金額を受付にてお支払下さい。尚、不妊学会のみの事前登録は行いません。

	当日
参加者	¥8,000

- 4) 第11回日本受精着床学会のみの参加登録は行えません。

## 3. 登録の申し込みおよび送金方法

すでに送付致しております第8回世界体外受精会議のセカンドサーキュラーのREGISTRATION FORMを後記の事務局までお送り下さい。また銀行振込で送金される場合は、本誌巻末にとじ込みの振込用紙をご利用下さい。

振り込まれる際には、振込用紙の本人控えのコピーをREGISTRATION FORMと一緒に事務局までお送り下さい。

尚、前記のごとく不妊学会のみの事前登録は行えませんのでご注意ください。

### ■ ご参加及び演題提出に関するお願い ■

- 1) 日本不妊学会への演題申込は、1993年1月発行の日本不妊学会雑誌第38巻第1号の演題申込要領をご参照下さい。申し込みの締切は1993年4月20日です。
  - 2) 日本不妊学会は世界体外受精会議と連続して行われるため、体外受精に関連のある演題はできるだけ世界体外受精会議へご出題下さい。
  - 3) 世界体外受精会議では、Free communicationとPoster sessionを設けています。国際学会で発表されるチャンスですので、奮って演題をご提出下さい。
  - 4) 三学会はすべて国立京都国際会館(宝ヶ池)で開催され、5日間の出席でカバーできます。
  - 5) 三学会に通してご出席の場合は登録料が割引されます。
  - 6) 日本産科婦人科学会研修出席証明シール(Aシール)は、各学会より配布されますので、三学会に出席された場合は3枚配布されます。
- 尚、詳細につき不明な点がございましたら、ご遠慮なく事務局までお問い合わせ下さい。

第8回世界体外受精会議事務局

〒106 東京都港区麻布台1丁目9番14号 A・H-1ビル  
株式会社コンベックス内

Tel: 03-3589-3355 Fax: 03-3589-3974

International Symposium of New Reproductive Technology  
— Endoscopic, Transcervical Approaches —  
国際生殖技術シンポジウム  
(第8回世界体外受精会議サテライトシンポジウム)

国際生殖技術シンポジウムを東京に於いて下記の通り開催いたします。奮って御参加下さい。

会 長 野 澤 志 朗

- I. 会 期：平成5年9月16日(木)・17日(金)  
II. 会 場：慶應義塾大学病院 新棟11階大会議室・中会議室  
東京都新宿区信濃町35  
JR総武線・信濃町駅前  
III. 日 程：16日(木)参加登録・歓迎パーティ  
17日(金)シンポジウム  
IV. 参加費：5000円(歓迎パーティ, 17日昼食を含む)  
V. 主な講演内容：  
Transvaginal balloon tuboplastyシンポジウム  
生殖医療における内視鏡技術の現在と将来  
子宮鏡下卵管内胚移植法 など  
VI. 主な国外からの演者(予定)：  
J. Kerin (Australia)  
J. Gleicher (U.S.A.)  
J. Cohen (France)  
K. Semm (Germany)

問い合わせ先：

〒160 東京都新宿区信濃町35  
慶應義塾大学医学部産婦人科学教室内  
国際生殖技術シンポジウム事務局  
担当 小林俊文 末岡 浩  
TEL (03)-3353-1211 内線2393  
FAX (03)-3226-1667

## 第4回日本インポテンス学会学術総会

第4回日本インポテンス学会学術総会を開催いたしますので、御案内申し上げます。また、下記の特別講演、シンポジウム、サテライトシンポジウムを予定しておりますので多数御参加下さいますようお願い申し上げます。

第4回日本インポテンス学会学術総会  
会長 熊本悦明(札幌医科大学泌尿器科教授)

### 1. 学術総会

会期：1993年10月1日(金)、2日(土)

会場：札幌共済ホール(札幌市中央区北4条西1丁目)

### 2. 学術総会特別プログラム

特別講演1「生と性」

- 1) 男はいつまで父たり得るか? 丹田 均(三樹会病院院長)
- 2) 男はいつまで男たり得るか? 熊本悦明(札幌医科大学泌尿器科教授)
- 3) 女はいつまで母たり得るか? 藤本征一郎(北海道大学産婦人科教授)
- 4) 女はいつまで女たり得るか? 本多 洋(三井記念病院産婦人科部長)

特別講演2「性行動調節の脳内メカニズム」

- 1) ラットにおけるオス型の性行動調節機構 佐藤嘉一(札幌医科大学泌尿器科)
- 2) ラットにおけるメス型の性行動調節機構

佐久間康夫(弘前大学生理学教室教授)

特別講演3「糖尿病における性機能障害」

- 1) 男性を中心に 山口康宏(旭川泌尿器科クリニック院長)
- 2) 女性を中心に 高橋良当(東京女子医科大学糖尿病センター)

シンポジウム「薬物起因性性機能障害とその対策」

司会 筒井末春(東邦大学心療内科教授)

宮地幸隆(東邦大学第1内科教授)

### 3. サテライトシンポジウム

日時：1993年9月30日(木)午後5時より(予定)

会場：札幌共済サロン(札幌市中央区北4条西1丁目)、

「性機能障害の診断」——今何がわかって、何がわからないのか——

司会 石井延久(東邦大学泌尿器科助教授)

荒木 徹(倉敷成人病センター泌尿器科部長)

4. 演題応募要項は会員の皆様にお送りさせていただきます。会員でない先生方にも事務局まで御連絡戴ければ演題応募要項等につき御案内させていただきます。

申し込み締切 1993年5月31日(月)(必着)

演題送付先 〒060 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学泌尿器科教室内

第4回日本インポテンス学会学術総会事務局

塚本泰司 佐藤嘉一

TEL: 011-611-2111(内線3472) FAX: 011-612-2709

## 第2回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会

第2回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会を第4回日本インポテンス学会学術総会に引き続く10月3日に開催いたしますので御案内申し上げます。また、下記の特別講演、教育講演、シンポジウムを予定しておりますので多数御参加下さいますようお願い申し上げます。

第2回 日本腎泌尿器疾患予防医学研究会  
会長 熊本悦明(札幌医科大学泌尿器科教授)

### 1. 研究会

会 期：1993年10月3日(日)

会 場：札幌共済ホール(札幌市中央区北4条西1丁目)

### 2. 研究会特別プログラム

#### 特別講演

- 1) 膀胱癌、前立腺癌と食餌 垣添忠生(国立がんセンター病院長)
- 2) 膀胱癌、前立腺癌とライフスタイル 平山 雄(予防がん学研究所所長)
- 3) 新生児における先天性副腎皮質過形成症例のスクリーニング  
菊地由生子(札幌市衛生研究所長)

#### 教育講演「骨盤内手術における性機能障害予防対策」

座長 吉田 修(京都大学泌尿器科教授)

- 1) 骨盤内尿路系手術における性機能温存術  
岡田清己(日本大学泌尿器科教授)
- 2) 直腸癌に対する自律神経温存術後の男性性機能  
大木繁男(横浜市立大学第2外科講師)

#### シンポジウム「成人検診における血尿スクリーニングの臨床的意義」

司会 小磯謙吉(筑波大学泌尿器科教授)

長瀬光昌(帝京大学第1内科教授)

3. 演題応募要項は会員の皆様にお送りさせていただきます。会員でない先生方にも事務局まで御連絡戴ければ演題応募要項等につき御案内させていただきます。

申し込み締切 1993年5月31日(月)(必着)

演題送付先 〒060 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学泌尿器科教室内

第2回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会事務局

塚本泰司

TEL: 011-611-2111(内線3472) FAX: 011-612-2709

# 第38回日本不妊学会総会および学術講演会 ——宿泊のご案内——

この度、標記学会が来る平成5年9月11日(土)・12日(日)の2日間、国立京都国際会館において開催されることになり、ご出席されます皆様方の宿泊等のお世話をJTB国際旅行西日本営業部にてお引受させていただきますことになりました。

皆様のお申込をお待ちいたしますと共に、本学会のご成功をお祈り申し上げます。

## 1. 宿泊のご案内

宿泊取扱期間：平成5年9月10日(金)～12日(日)

宿 泊 地：京都市内ホテル

宿 泊 料 金：ホテル別宿泊料金

1泊朝食付，サービス料，税金込みの一人様料金

ホテル名	シングル	ツイン	地下鉄・駅からの所要時間
宝ヶ池プリンスホテル	23,900円*	20,200円	北山駅よりタクシー5分
都ホテル	19,100円*	17,000円	御池駅よりタクシー7分
京都国際ホテル	14,000円	12,400円	御池駅より徒歩8分
京都新阪急ホテル	12,400円	10,300円	京都駅より徒歩3分
からすま京都ホテル	12,400円	—	四条駅より徒歩1分
ホテルアルファ京都	9,500円	8,800円	御池駅より徒歩10分
セントラルイン	8,100円	6,500円	四条駅より徒歩8分

\*ツインルームの一人使用

◎お申込の順にお受けいたしますので、やむをえずホテルランクの変更をお願い申し上げる場合がございますのであらかじめご了承下さい。

## 2. お申込方法

申込書にご記入の上、総宿泊金額と通信費1件につき500円添えて現金書留もしくはクレジットカードにて申し込み下さい。折り返し宿泊予約確認書をお送り致します。なお、ご希望のホテルが満員の場合は、第2希望のホテルをご予約させていただきますのでご了承下さい。

申込書送付先：〒541 大阪市中央区本町2-1-6 堺筋本町センタービル7F  
JTB国際旅行西日本営業部 第38回日本不妊学会総会  
担当：山口・梁・大江 TEL：06-271-6195 FAX：06-271-6131

## 3. 申込み〆切日：平成5年8月27日(金)

## 4. 取消料について

取消及び変更される場合はお早めにご連絡下さい。下記の取消料及び通信費を差し引いた残額を後日返金します。

取 消 日	10日～3日まで	3日～前日まで	当日・無連絡(不泊)
宿泊取消料	2,000円	50%	100%

# 第38回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊申込み書

代表者氏名			
勤務先		(TEL)	(FAX)
郵便物送付先	(〒 )		
ご返金時口座	銀行	支店 普・当 No.	口座名

\*○印をお付けください

(ふりがな) 氏名	希望ホテル名	部屋タイプ*			宿泊日*			宿泊希望日		泊 数	
		SB	TB	T/S	10	11	12	チェックイン	チェックアウト		
		SB	TB	T/S				月 日	月 日		
		SB	TB	T/S				月 日	月 日		
		SB	TB	T/S				月 日	月 日		
連絡事項  (第2希望ホテル)		A 宿泊額合計			¥	× 泊数 × 部屋数		= ¥			
		B 通信連絡費			¥500						
		合計 (A+B)			¥						

※SB：シングル TB：ツイン T/S：ツインシングルユース

お支払い方法 (該当するものに○記しを記入して下さい)    1. 現金書留    2. クレジットカード

《クレジットカードにてお支払いの方は、下記にご記入下さい。》

利用カード会社		
<input type="checkbox"/> YES JTB カード	<input type="checkbox"/> JCB	<input type="checkbox"/> DCカード
<input type="checkbox"/> ダイナースカード	<input type="checkbox"/> VISA	<input type="checkbox"/> ミリオンカード
<input type="checkbox"/> 日本信販	<input type="checkbox"/> ユニオンクレジット	
有効期間	19    年    月まで	
引落カード番号		
ご署名		

## 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、平かなを用い、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 intrantrine 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 J J, Guttmacher A F, Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy. 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、東京都千代田区麹町5-4 クロスサイド麹町ビル8階、  
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	

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	

日本不妊学会雑誌 38 卷 2 号

1993年 3月26日 印 刷

1993年 4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  
東京都千代田区麹町 5-4  
クロスサイド麹町ビル 8階  
Tel (03) 3288-7266  
振替口座番号 東京 7-93207