

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 38 No.4

October
1993

日本不妊学会雑誌

第38巻 第4号

平成5年10月1日

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

第39回日本不妊学会総会および学術講演会 (第1回予告)

下記により第39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6年10月26日(水) 役員会、学術講演会
平成6年10月27日(木) 学術講演会、評議員会、総会
平成6年10月28日(金) 学術講演会

会 場：富山県民会館 〒930 富山市新総曲輪^{しんそうがわ}4-18
TEL. (0764) 32-3111
富山第一ホテル 〒930 富山市桜木町10-10
TEL. (0764) 42-4411

今回は、10月26日(水)の役員会終了後から学術講演会を開始し、3日間の日程で、充分なご発表時間と充実したご討議をお願いする予定です。

演題募集要項、特別講演、教育講演、シンポジウム、その他詳細につきましては次号(39巻1号、平成6年1月発行)に予告致します。一般演題の締め切りは平成6年5月下旬の予定です。

第39回 日本不妊学会会長
片 山 喬

連絡先：〒930-01 富山市杉谷2630
富山医科薬科大学医学部泌尿器科教室内
第39回日本不妊学会総会事務局
(布施秀樹、風間泰蔵、木村寿子)
TEL. 0764-34-2281 内線2582 (医局)
FAX. 0764-34-5039

平成 5 年度第 2 回通常総会

平成 5 年度第 2 回通常総会は下記の如く京都市において開催され、入谷理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採決を行った。

日 時 平成 5 年 9 月 11 日 (土) 12 時 30 分～13 時
場 所 京都市 国立京都国際会館 (1 階メインホール)
開会当時の会員数 4,092 名
当日の出席会員数 2,078 名 (含委任状)

議 事

第 1 号議案：理事補充に関する件

理事会および評議員会より推薦の下記 2 名につき審議の結果、全員一致に新理事とすることを承認した。

武谷雄二 (関東支部) 平川舜 (関東支部)

第 2 号議案：平成 8 年度 (第 41 回) 学術講演会および総会に関する件

平成 8 年度 (第 41 回) 日本不妊学会学術講演会および総会は理事会、評議員会の提案通り、下記の如く開催することを全員一致で承認した。

担当支部 中国四国支部
会 長 青野敏博 (徳島大学医学部産婦人科教授)
開催地 徳島市

第 3 号議案：「学術」の担務設置に関する件

理事会および評議員会より提案のあった通り、常任理事、幹事の業務分担を現在の実情に合わせて「連絡」を「組織」および「渉外」と改め、新たに「学術」の担務を設置することを全員一致で承認した。

第 4 号議案：学会奨励賞設置に関する件

理事会および評議員会より提案のあった通り、定款の第 5 条に定める事業の一環として、学会雑誌に掲載された論文の中から優秀な論文を選び、学会奨励賞を授与出来る制度を新たに設置することを全員一致で承認した。

第 5 号議案：日本不妊学会定款施行細則の一部改定に関する件

第 3 号議案、第 4 号議案の承認にもとづき、定款施行細則第 14 条、第 41 条、第 48 条を下記の如く改定することを全員一致で承認した。

第3章 学会誌

施行細則第14条

- (旧) 本会は定款第5条の学会誌として年4回日本不妊学会雑誌を刊行する。
- (新) 本会は定款第5条の学会誌として年4回日本不妊学会雑誌を刊行する。
またすぐれた論文に対して学術奨励賞を授与することができる。

第6章 常任理事および常任理事会

施行細則第41条

- (旧) 常任理事は庶務・会計・編集その他の日常の会務を分担執行する。
- (新) 常任理事は庶務・会計・編集・組織・渉外・学術その他の日常の会務を分担執行する。

第7章 幹事・総会幹事および幹事会

施行細則第48条

- (旧) 幹事は庶務・会計・編集・連絡その他の会務を分担し、各会務分担の常任理事を補佐して日常の業務を行なう。
- (新) 幹事は庶務・会計・編集・組織・渉外・学術その他の会務を分担し、各会務分担の常任理事を補佐して日常の業務を行なう。

日本不妊学会誌

第38巻 第4号

平成5年10月1日

— 目 次 —

原 著

受精後のマウス、ラット、ハムスターおよびウサギの卵子における表層粒の変化

.....	細江実佐・他	1
ノコダゾールがマウス2細胞期胚の体外発生能に及ぼす影響	加藤容子・他	6
抗プロジェステロン製剤(RU486)が家兎子宮内膜の着床性変化に及ぼす影響	山海 直・他	11
透明帯開窓法のヒト胚発生、胚発育におよぼす影響	小田原靖・他	18
男性不妊症例の体外受精胚移植における精子調整法の比較検討	生田克夫・他	24
体外受精におけるPentoxifyllineの使用経験	児玉英也・他	30
IVF-ET時のluteal supportと黄体ホルモン測定の意義(英文)	石原 理・他	35
体外受精-胚移植の採卵術におけるケタミン麻酔-臨床的および基礎的検討-	重松 潤	41
Clomiphene/LH surge 法とClomiphene/HCG法によるAIH治療成績の比較	長谷川功・他	48
Percoll攪拌密度勾配法によるAIHの予後と培養精子運動率との相関	玉岡有告・他	53
補中益気湯の精子運動機能に対する作用-Penetrak test, hypoosmotic swelling test, computer-assisted semen analyzerによる検討-	柴原浩章・他	60
成熟ネコ卵管の神経支配——組織科学的並びに免疫組織化学的観察——	宮嶋 諭	67
当クリニックにおける不育症の原因と柴苓湯療法を中心にした治療成績の解析	假野隆司・他	77
不妊症における高アンドロゲン血症の頻度とその妊娠例の解析	太田博孝	86
プロラクチン分泌能からみた高LH血症性排卵障害の病態に関する検討	松口博之・他	90
高LH血症性視床下部障害の内分泌学的特徴とbromocriptineの効果	合阪幸三・他	94
子宮外妊娠に対する手術療法および薬物療法の比較検討	藤下 晃・他	100
AFSスコアリングに基づく術後癒着の		
術後早期腹腔鏡(Early Second Look Laparoscopy)による評価	森 俊介・他	106
抗クラミジア抗体診断キット、		
セロ イパライザ クラミジアIgA・IgGの臨床的検討	高橋敬一・他	110
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:		
平成3~4年の当院分娩統計より(第2報)	宮川善二郎・他	115
7例の未治療精索静脈瘤患者における		
進行性の精液所見の悪化と精巣容積の減少(英文)	山本雅憲・他	120
ヒト精子長期冷所保存におけるCaffeine, Pentoxifyllineの効果	菅野ひとみ・他	124
超音波カラードップラー法の精索静脈瘤への臨床応用		
—診断および静脈血逆流速度に基づいた分類の可能性—	白瀧 敬・他	129
精子運動に対する浸透圧の影響	齋藤和男・他	135
術後精液所見の改善が見られたFSH産生性下垂体腺腫の1例	風間泰蔵・他	140
機能性不妊におけるウレアプラスマ性器感染の意義(英文)	佐藤芳昭・他	145
総 説		
ヒト生殖機能に及ぼす喫煙の影響:女性および男性における妊孕性の変化	パナヨティス・ザボス・他	149
地方部会講演抄録		156

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 38, No. 4, 1993)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Changes of Cortical Granules in the Eggs of Mice, Rats, Hamsters and Rabbits
after Fertilization *M. Hosoe, S. Niimura & K. Ishida* 1
- Effects of Nocodazole on the Developmental Ability
of Mouse 2-cell Embryos In Vitro *Y. Kato & Y. Tsunoda* 6
- Effects of an Anti-progesterone Agent (RU486) on Endometrial Proliferation
at the Time of Embryo Implantation in Rabbits *T. Sankai, T. Endo,
K. Kanayama & Y. Sakuma* 11
- Fertilization and Embryo Development of Human Oocytes
after Zona Pellucida Opening *Y. Odawara, I. Tachibana, S. Chida,
M. Hiruta, Y. Watanabe, S. Iida,
S. Mori & M. Suzuki* 18
- Evaluation of Sperm Preparation Methods in In Vitro Fertilization
and Embryo Transfer for Male Infertility *K. Ikuta, N. Suzuki, M. Suzuki,
H. Okada, K. Kaida,
S. Hanada & Y. Yagami* 24
- Pharmacological Stimulation by Pentoxifylline to Improve Fertilizing Capacity
of Spermatozoa in IVF *H. Kodama, J. Fukuda, T. Matsui,
Y. Shimizu, M. Tasdemir, I. Tasdemir,
K. Sekine, M. Ogawa,
R. Namiki & T. Tanaka* 30
- The Significance of Luteal Support for In Vitro Fertilization
and Embryo Transfer Patients *O. Ishihara, J. Taya, Y. Iino,
M. Saitoh & K. Kinoshita* 35
- A Clinical and Embryological Study of the Ketamine Anesthesia
for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer *J. Shigematsu* 41
- A Comparison of Clomiphene/LH Surge and Clomiphene/HCG
for Timing of AIH *I. Hasegawa, H. Murakawa & R. Fujimori* 48
- Outcome of Intrauterine Insemination Using Percoll Centrifugation Method
and Sperm SurvivalRate *Y. Tamaoka, K. Kamei,
H. Nakamura & K. Tanabe* 53
- Evaluation of the Effects of Hotyû-ekki-tô on Human Sperm Motility as Assessed
by the Penetrak Test, Hypoosmotic Swelling Test
and Computer-assisted Semen Analyzer *H. Shibahara, T. Shinotani & K. Ikuma* 60
- Innervation of the Adult Cat Fallopian Tube
— Histochemical and Immunohistochemical Observations — *S. Miyajima* 67

Analysis of Etiology and Therapy with SAIREI-TO of Habitual Abortion in Our Clinic	T. Kano, M. Furudono, K. Okuyama & M. Ishii	77
Incidence and Outcome of Pregnancy in the Infertile Patients with Hyperandrogenemia	H. Ota	86
Studies on the Pathogenesis of the HyperLH Syndrome by the Estimation of the PRL Secretion	H. Matsuguchi, G. Nakamura, M. Nozaki, M. Sano & H. Nakano	90
Studies with Endocrinological Characteristic of Hyper-LH Hypothalamic Anovulation and Effect of Bromocriptine Administration	K. Aisaka, H. Tsuzuki, Y. Toriya, K. Kokuho, S. Tamechika, H. Saitoh, K. Yoshida & H. Mori	94
Comparison of Conservative Surgery and Drug Therapy for Ectopic Pregnancy	A. Fujishita, T. Ishimaru, H. Masuzaki, T. Samejima, K. Nakamura, T. Matsuwaki, R. Ortega, T. Yamabe, H. Yamashita, T. Nakano & Y. Kase	100
Evaluation of Postoperative Adhesions Based on the A. F. S. Classification by Early Second Look Laparoscopy	S. Mori, H. Matsuguchi, M. Nozaki, M. Sano, G. Nakamura & H. Nakano	106
Clinical Evaluation of Sero IPALISA Chlamydia IgA · IgG®: a Diagnostic Agent of Antibodies for Chlamydia Trachomatis	K. Takahashi, S. Nagai, K. Shiota, H. Tobai, S. Nakajima, Y. Yamada, T. Kojima, M. Izuta & K. Sato	110
The Influence of Induced Abortion on the Course of Pregnancy and Delivery of Primipara Women: 2nd Report from 1991-1992 Annual Obstetrical Statistics of Fujigaoka Hospital	Z. Miyakawa, T. Kimura, K. Tamura, T. Hondou, S. Moriyama, Y. Hada, A. Shimizu & Y. Notake	115
Progressive Decline in Semen Characteristics and Testis Volume Over Time in Seven Cases of Untreated Varicocele	M. Yamamoto, Y. Tsuji, H. Hibi & K. Miyake	120
Effects of Caffeine and Pentoxifylline under the Prolonged Storage of Human Spermatozoa in a Refrigerator	H. Kannno, Y. Kinoshita, Y. Sekiguchi, K. Tanaka, K. Saito, K. Sato, A. Iwasaki & M. Hosaka	124
Clinical Study of Varicocele by Color Doppler Ultrasonography	S. Shirataki, H. Tskihara, K. Imoto, K. Kamada, K. Ishizu, Y. Baba & K. Naito	129
Influence of Osmolarity on the Motility of Human Spermatozoa	K. Saito, Y. Kinoshita, K. Sato, A. Iwasaki & M. Hosaka	135

A Case of Follicle-Stimulating Hormone-Secreting Pituitary Tumor with Postoperative Elevation of Sperm Count	<i>T. Kazama, S. Oota, M. Iwasaki, A. Junichou, M. Sakamoto, H. Fuse, T. Katayama & T. Endo</i>	140
Relationship Between Genital Tract Ureaplasma Infection and Unexplained Infertility	<i>Y. Sato, T. Miyake & S. Oosawa</i>	145
Impact of Cigarette Smoking on Human Reproduction: Its Effects on Female and Male Fecundity	<i>P. M. Zavos, T. Toda, N. Sofikitis & I. Miyagawa</i>	149

受精後のマウス, ラット, ハムスター およびウサギの卵子における表層粒の変化

Changes of Cortical Granules in the Eggs of Mice, Rats, Hamsters and Rabbits after Fertilization

新潟大学農学部家畜生産学教室

細 江 実 佐

Misa HOSOE

新 村 末 雄

Sueo NIIMURA

石 田 一 夫

Kazuo ISHIDA

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

マウス, ラット, ハムスターおよびウサギの未受精卵子と受精卵子について, 表層粒の検出をFITCを標識した*Lens culinaris agglutinin* (LCA) を用いてレクチン組織化学的に行い, 表層粒の分布と密度が受精後どのように変化するかを観察した。

これらの動物の排卵直後の未受精卵子において, LCA陽性の表層粒は細胞質表層に単独で一様に多数分布していたが, 細胞質表層には表層粒を欠く部位が観察された。いずれの動物においても, 表層粒は, 排卵後3時間の精子侵入卵子では細胞質表層から消失したが, 細胞質深部には少数残存していた。細胞質深部の表層粒は, ウサギでは排卵後6時間の精子侵入卵子で完全に消失した。一方, マウス, ラットおよびハムスターの卵子では, 細胞質深部の表層粒は精子侵入後減少し, マウスとラットでは排卵後9時間あるいは15時間の前核卵子, ハムスターでは排卵後30時間の2細胞胚でそれぞれ完全に消失した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 595 - 599, 1993)

緒 言

一般に, 卵子に精子が侵入すると, 表層粒の内容物が開口分泌によって卵黄周囲腔に放出され, 透明帯反応や卵黄遮断を引き起こして他の精子の侵入を防ぐことが知られている¹⁾。一方, 透明帯反応と卵黄遮断の強さは動物種によって異なっており, その強さによって哺乳動物の卵子は次の3群に分類されている²⁻⁴⁾。すなわち, I群は透明帯反応は強いが卵黄遮断が弱いもので, この群にはハムスター, ヒツジ, イヌおよびハタネズミの卵子が含まれる。II群は透明帯反応と卵黄遮断の強さは共に中程度のもので, この群にはマウス, ラット, モルモット, ケナガイタチおよびネコの卵子が含まれる。III群は透明帯反応は弱いが卵黄遮断が強いもので, この群には

ウサギ, ナキウサギ, モグラおよびホリネズミの卵子が含まれる。なお, 補足精子はI群の卵子ではみられないが, II群の卵子ではまれに, III群の卵子では多数観察されるといわれている。さらに, 透明帯反応や卵黄遮断の開始する時期は, これらの反応が強い動物種の卵子ほど早いことも調べられている^{1,2,5-10)}。従って, 哺乳動物卵子における精子侵入後の表層粒の動態は, 上記の3群の間で異なることが考えられる。しかしこれまでに, 透明帯反応あるいは卵黄遮断の強さの異なる動物種の卵子について, 表層粒が受精後消失するまでの動態を比較観察した報告はみられない。

最近, 表層粒の複合糖質に結合するレクチンである*Lens culinaris agglutinin* (LCA) に蛍光色素を標識して, 哺乳動物卵子の表層粒の分布と数を調べるこ

が可能になった^{2,11-18}). この方法を用いた観察では、従来の電子顕微鏡を用いたものに比べ、表層粒の数を細胞質全域にわたって調べるのが容易であるので、表層粒の密度と分布を正確に調べるのが可能であると考えられている^{12,15}). そこで本研究では、透明帯反応と卵黄遮断の強さの異なる3種の動物群からマウスとラット、ハムスターおよびウサギを選び、これらの動物の未受精卵子と受精卵子について、表層粒の分布と密度が受精後どのように変化するかを、FITCを標識したLCAを用いてレクチン組織化学的に観察した。

材料および方法

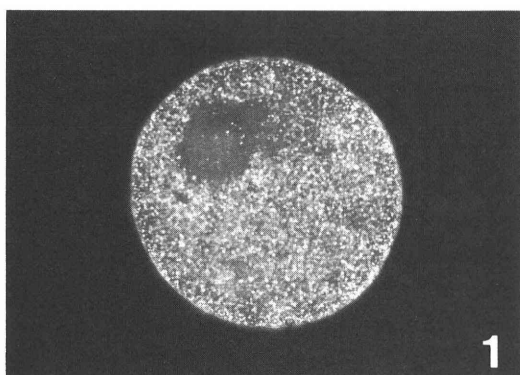


Fig. 1 An unfertilized hamster egg collected from the oviduct immediately after ovulation, and treated with LCA conjugated with FITC. A large number of fluorescent cortical granules are seen in the cortex of cytoplasm. $\times 300$.

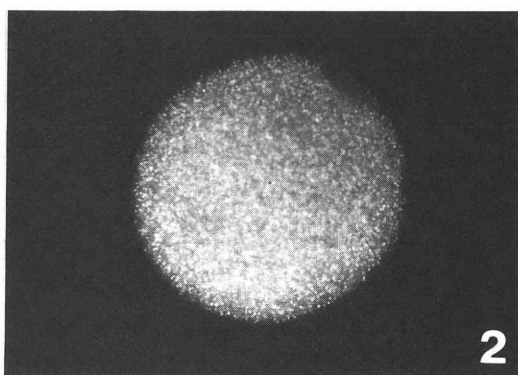


Fig. 2 An unfertilized rabbit egg collected from the oviduct immediately after ovulation, and treated with LCA conjugated with FITC. A large number of fluorescent cortical granules are seen in the cortex of cytoplasm. $\times 250$.

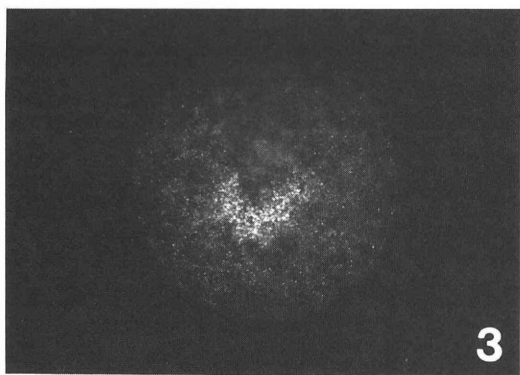


Fig. 3 A sperm-penetrated rat egg collected from the oviduct 3 hrs after ovulation, and treated with LCA conjugated with FITC. A very small number of fluorescent cortical granules are seen in the inner cytoplasm. $\times 300$.

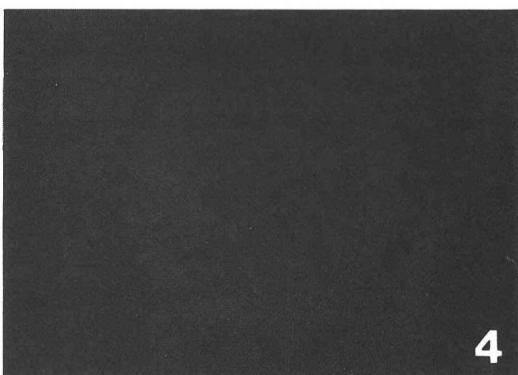


Fig. 4 An unfertilized mouse egg collected from the oviduct immediately after ovulation, and treated with LCA conjugated with FITC, and treated with α -methylmannoside, an inhibiting monosaccharide against LCA. No fluorescent cortical granules are seen in the cytoplasm. $\times 300$.

供試動物として、ICR系マウス42匹、Wistar系ラット45匹、ゴールデンハムスター48匹、日本白色種ウサギ16匹を使用した。飼育は24℃に調節した室内で行い、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。ラット、ハムスターおよびウサギの卵子は、自然排卵のものをを用い、発情期に成熟雄と交配させた雌から採取した。一方、マウスの卵子は過排卵のものをを用いた。すなわち、マウス卵子はPMSG (セロトロピン、帝国臓器) とhCG (ゴナトロピン、帝国臓器) それぞれ5 I. U. を48時間間隔で腹腔内に注射して過排卵誘起後、成熟雄と交配させた雌から採取した。

観察は、いずれの動物の卵子においても排卵直後

からLCAに陽性の表層粒が消失するまで3時間間隔で行った。すなわち、観察した卵子は、マウスでは排卵後9時間の前核期まで、ラットでは排卵後15時間の前核期まで、ハムスターでは排卵後30時間の2細胞期まで、ウサギでは排卵後6時間の精子侵入期までのものである。なお排卵は、マウスではhCG注射後13時間¹⁹⁾、ラットでは発情後期の日の午前3時²⁰⁾、ハムスターでは発情開始後8時間²¹⁾、ウサギでは交尾後13時間²²⁾に起こることが知られているので、排卵後の時間はこれらを基準にして算出した。

表層粒を観察するために、採取した卵子をDucibellaらの方法¹²⁾に従って処置した。すなわち、卵丘細胞の付着している卵子については0.1%ヒアルロニダーゼを含むリン酸緩衝塩類溶液²³⁾ (PBS, pH 7.4) で処置してこれを除去し、次いですべての卵子を0.2%プロナーゼ・PBSで処置して透明帯を取り除いた後、3.7%パラホルムアルデヒド・PBSに室温で30分間固定した。固定後、ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma, U. S. A.) を3%とグリシン (和光純薬) を100mM含むPBS (ブロッッキング液) に室温で浸漬して洗浄し、Triton X-100 (ナカライテスク) を0.1%含むPBSに5分間浸漬して透過処置を施した。次い

で、これらの卵子をブロッッキング液で洗浄した後、PBS 1 ml中にLCA (E-Y Laboratories, U. S. A.) を10 μ g, Triton X-100を0.1 μ lおよびBSAを3 mg含む液に20℃で30分間浸漬して染色した。対照として、LCAを含まない液に浸漬した卵子と、LCAの阻害糖である α -メチルマンノシド (Fluka Biochemika, Switzerland) を100 mM含むPBSに室温で10分間浸漬後、 α -メチルマンノシドを100 mM含むLCA溶液に20℃で30分間浸漬した卵子を用いた。なお観察した卵子の数は、いずれの動物においても各時間について45ないし60個であった。これらの処置を施した卵子は、落射蛍光顕微鏡装置 (ニコン) で観察した。

結 果

マウス、ラット、ハムスターおよびウサギの卵子を、FITCを標識したLCA溶液に浸漬すると、細胞質に顆粒状の蛍光が出現した (図1-3)。この蛍光顆粒は、LCAを含まないPBSに浸漬した卵子と、 α -メチルマンノシドで処置した卵子 (図4) には全くみられなかった。LCAに陽性の蛍光顆粒が表層粒を示していることが確認された。

各種哺乳動物卵子の表層粒の受精後消失するまで

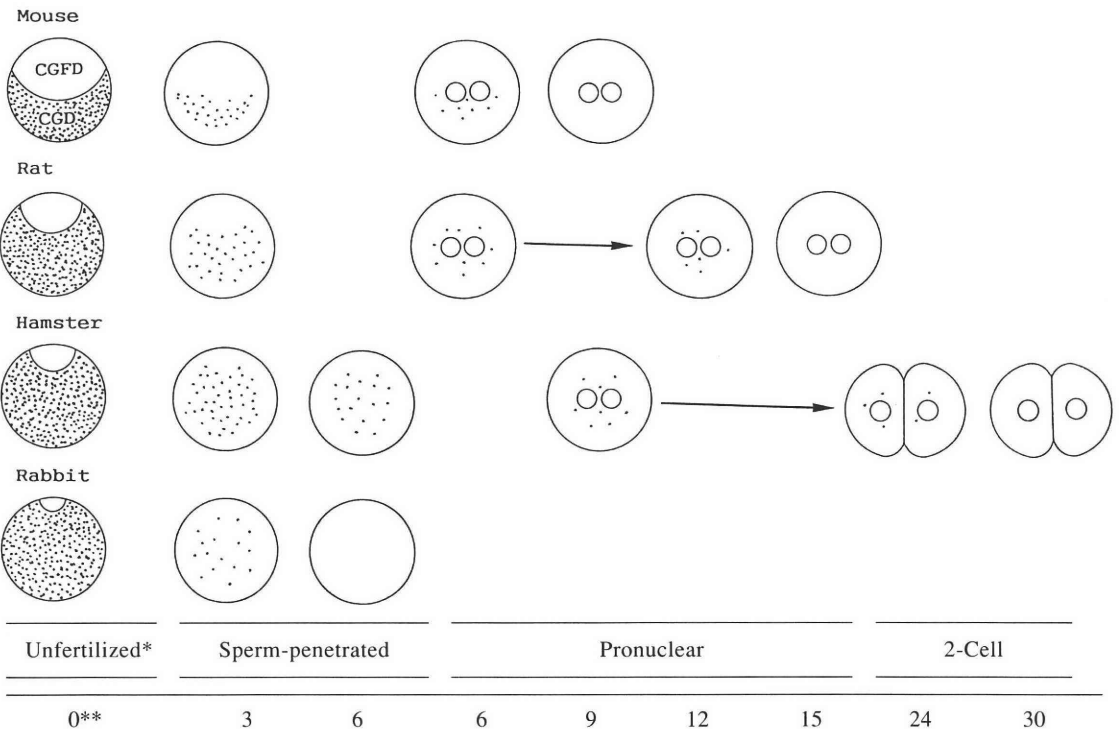


Fig. 5 Changes in the density and distribution of cortical granules in mammalian eggs after sperm penetration
CGD: Cortical granule domain, CGFD: Cortical granule-free domain.

*Stage of eggs. **Hours after ovulation.

の変化は図5に示した通りである。すなわち、マウス、ラット、ハムスター(図1)およびウサギ(図2)の排卵直後の未受精卵子では、LCA陽性の表層粒は細胞質表層に単独で一様に多数分布していたが、細胞質表層には表層粒を欠く部位(cortical granule-free domain: CGFD)が観察された。CGFDの大きさは、マウスで一番大きく、次いでラット、ハムスター、ウサギの順であった。いずれの動物においても、表層粒は排卵後3時間の精子侵入卵子の細胞質表層から消失したが、細胞質深部には少数残存していた(図3)。細胞質深部の表層粒は、ウサギでは排卵後6時間の精子侵入卵子で完全に消失した。一方、マウス、ラットおよびハムスターの卵子上では、細胞質深部の表層粒はその後時間の経過に伴って減少し、マウスでは排卵後9時間の前核卵子、ラットでは排卵後15時間の前核卵子、ハムスターでは排卵後30時間の2細胞胚でそれぞれ完全に消失した。

考 察

未受精卵子では、大部分の表層粒は細胞質表層に分布するが、細胞質深部にも少数ではあるが存在することが電顕観察によって確かめられている²⁴⁾。また受精すると、細胞質表層のものは放出されて消失するが、深部のものはそのまま残存することがマウス²⁵⁾とウサギ²⁶⁾の卵子上で調べられている。しかし、残存する表層粒がいつ完全に消失するかは調べられていない。

本実験において、透明帯反応と卵黄遮断の強さの異なるマウスとラット、ハムスターおよびウサギの卵子上について、表層粒の分布と密度が受精後どのように変化するかを観察した。その結果、表層粒はどの動物においても排卵後3時間の精子侵入卵子では細胞質表層から消失していたが、細胞質深部には少数存在していた。また、細胞質深部の表層粒は、その後時間の経過に伴って減少し、やがて消失したが、透明帯反応と卵黄遮断の強さが異なる動物の間では、表層粒が完全に消失するまでの時間は若干異なっていた。すなわち、ウサギが一番早く、次いでマウス、ラット、ハムスターの順であり、この順序は透明帯反応の弱い順、卵黄遮断の強い順と一致していた。

透明帯反応あるいは卵黄遮断が完成する時期は動物種によって異なっているが、ハムスター^{5,10)}、マウス^{6,8,9)}およびラット^{7,8)}の卵子上では媒精後およそ2時間であるといわれている。従って、本実験の結果は、細胞質表層にある表層粒が透明帯反応や卵黄遮

断の完成に役割を果たしていることを示唆している。一方、受精卵子の細胞質深部に存在する表層粒の役割については不明であるが、透明帯を除去したハムスターの前核卵子と2細胞胚に媒精すると、精子が侵入できることが報告されているので²⁷⁾、ハムスターでは受精卵子でもある時期までは透明帯での多精子侵入の防御機構の存在が必要であることが考えられ、受精後卵子の細胞質深部に存在する表層粒がこの機構の存続に役割を果たしている可能性もあるように思われる。しかし今回は、受精卵子の細胞質深部にある表層粒が細胞質表層に移動する像は観察できなかったもので、これらが放出されて消失するのか否かは明らかでない。今後、細胞質深部の表層粒の消失機序についても検討する必要があるものと思われる。

文 献

- 1) Schmell ED, Gulyas BJ and Hedrick JL, Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy. In: Hartmann JF ed, Mechanism and Control of Animal Fertilization. p365, Academic Press, 1983
- 2) Cherr GN and Drobnis EZ, Fertilization in the golden hamster. In: Dunbar BS, Orand MG eds, A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. p217, Plenum Press, 1991
- 3) Austin CR, Structure and function in mammalian eggs. In: The Mammalian Egg. p16, Blackwell Scientific Publications, 1961
- 4) Yanagimachi R, Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD, eds, The Physiology of Reproduction. p135, Raven Press, 1988
- 5) Barros C and Yanagimachi R, Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. Nature 233: 268, 1971
- 6) Inoue M and Wolf DP, Comparative solubility properties of rat and hamster zonae pellucidae. Biol Reprod 12: 535, 1975
- 7) Braden AWH, Austin CR and David HA, The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. Aust J Biol Sci 7: 391, 1954
- 8) Sato K, Polyspermy-preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro. J Exp Zool 210: 353, 1979
- 9) Wolf DP, The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs. Dev Biol 64: 1, 1978
- 10) Gwatkin RBL, Williams DT, Hartmann JF, et al., The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. J Reprod Fert 32: 259, 1973

- 11) Cherr GN, Drobnis EZ and Katz DF, Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J Exp Zool* 246: 81, 1988
- 12) Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, et al., Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol* 130: 184, 1988
- 13) Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, et al., Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol Reprod* 43: 870, 1990
- 14) Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, et al., Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 137: 46, 1990
- 15) Ducibella T, Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction. In: Wassrman PM ed, *Elements of Mammalian Fertilization*. Vol 1, p205, CRC Press, 1991
- 16) Stewart-Savage J and Bavister BD, Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. *Molec Reprod Dev* 30: 390, 1991
- 17) Niimura S, Yotsutani I and Ishida K, The incidence of polyspermy and the number of cortical granules in eggs from juvenile and adult mice. *J Reprod Dev* 38: 121, 1992
- 18) 細江実佐, 新村末雄, 石田一夫, ハムスター卵母細胞における表層粒の卵胞発育と成熟分裂に伴う変化. *日畜会報* 63: 1253, 1992
- 19) Gates AH, Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In: Daniel JC Jr ed, *Methods in Mammalian Embryology*. p64, Freeman, 1971
- 20) Pederson ES, Histogenesis of lutein tissue of the albino rat. *Am J Anat* 88: 397, 1951
- 21) Harvey EB, Yanagimachi R and Chang MC, Onset of estrus and ovulation in the golden hamster. *J Exp Zool* 146: 231, 1961
- 22) Pincus G and Enzmann EV, Fertilisation in the rabbit. *J Exp Biol* 9: 403, 1932
- 23) Dulbecco R and Vogt M, Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 99: 167, 1954
- 24) Gulyas BJ, Cortical granules of mammalian eggs. *Int Rev Cytol* 63: 357, 1980
- 25) Nicosia SV, Wolf DP and Inoue M, Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev Biol* 57: 56, 1977
- 26) Fléchon J-E, Huneau D, Solari A, et al., Réaction corticale et blocage de la polyspermie dans l'ocuf de lapine. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 15: 9, 1975
- 27) Usui N and Yanagimachi R, Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J Ultrastruct Res* 57: 276, 1976

**Changes of cortical granules
in the eggs of mice, rats, hamsters
and rabbits after fertilization**

Misa Hosoe, Sueo Niimura and Kazuo Ishida

Faculty of Agriculture,
Niigata University, Niigata-shi 950-21, Japan

Lens culinaris agglutinin (LCA) conjugated with FITC was used lectin-histochemically to demonstrate the presence of cortical granules in the eggs of mice, rats, hamsters and rabbits, and changes in the distribution and density of cortical granules in them were examined before and after sperm penetration. Regardless of species, LCA-reactive cortical granules were distributed densely as single particles in the cortex of unfertilized eggs immediately after ovulation, but there was always a cortical granule-free domain in their cortexes. In sperm-penetrated eggs 3 hrs after ovulation, the granules disappeared in their cortexes, while a few granules existed in their inner cytoplasm. As for rabbit eggs, the granules in the inner cytoplasm completely disappeared at the sperm-penetrated stage 6 hrs after ovulation. In mouse, rat and hamster eggs, on the other hand, the granules in their inner cytoplasm decreased after the sperm-penetration and then completely disappeared at the pronuclear stage 9 hrs after ovulation in mice, and 15 hrs in rats, and at the 2-cell stage 30 hrs after ovulation in hamsters.

(受付: 1993年 1 月 18 日)

(受理: 1993年 6 月 18 日)

ノコダゾールがマウス2細胞期胚の体外発生能に及ぼす影響

Effects of Nocodazole on the Developmental Ability of Mouse 2-cell Embryos In Vitro

近畿大学農学部畜産学教室

加藤 容子

Yoko KATO

角田 幸雄

Yukio TSUNODA

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture,
Kinki University, Nara 631, Japan

本実験では、マウス2細胞期胚の体外発生能に及ぼすノコダゾール処置の影響について、異なった2系統のマウスを用いて検討した。すなわち、F₁(C57BL×CBA)マウスあるいはCD-1系マウスより採取した2細胞期胚を、0.003~18.0 μ g/mlのノコダゾール添加液で12.5~14.5時間培養し、培養中2細胞期で発育を停止するか否か、薬剤除去後同調して4細胞期へ分裂するか否か、また体外培養を継続後胚盤胞へ発生するか否かをそれぞれ検討した。その結果、CD-1系由来胚では、F₁胚に比べて0.02 μ g/ml以下の濃度でも分裂を停止する胚の割合が高いことが判明した(17%対40%)。また、薬剤除去後の同調分裂率はCD-1系マウス胚で低く、特に0.3~15.0 μ g/ml処置区ではF₁マウス胚に比べて有意な差がみられた。さらに、同調分裂胚が胚盤胞へ発生する割合も、CD-1系マウス胚で有意に低かった。以上の結果より、ノコダゾールに対する感受性には系統差のみられることが明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 600 - 604, 1993)

緒 言

近年、哺乳動物の核移植の際にドナー細胞とレシピエント卵細胞質の細胞周期を同調させると、その後の発生能が向上することが報告されている¹⁾。しかしながら、哺乳動物において、個体への発生能力を損なうことなく初期胚の細胞周期を可逆的に同調させる方法は、確立されていない。細胞質中に存在するマイクロフィラメントの重合をサイトカラシンで阻害すると、細胞質分裂を阻止することはできるが、核分裂が進行するため多倍体を生じる結果となる^{2,4)}。また、核分裂を阻害する働きのあるコルセミドは同様の作用のあるコルヒチンやビンブラスチンよりも可逆性が高いことが指摘されている²⁾が、処理胚の胎子への発育能については明らかにされていない。最近我々は、F₁(C57BL×CBA)マウス由来の2細胞期胚をノコダゾール^{5,9)}で12~14時間体外で処理後、薬剤を除去して培養すると、4細胞期へ

の分裂を1時間以内に同調でき、またそれらを体外で胚盤胞まで発生させたのち受胎マウスへ移植すると、無処理胚と同様の割合で産子が得られることを明らかにした¹⁰⁾。

そこで、本実験では、ノコダゾールの処理濃度がマウス2細胞期胚の発生能に及ぼす影響について、2系統のマウスを用いて検討した。また、ノコダゾール処置時期が薬剤除去後の胚の発生能に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

実験1

供試胚には、PMSG(妊馬血清性性腺刺激ホルモン)とhCG(絨毛性性腺刺激ホルモン)で過剰排卵処理後、同系統の雄と交配させたF₁(C57BL×CBA)あるいはアルビノCD-1系雌より、hCG投与後43時間目に採取した2細胞期胚を用いた。胚は実験に供すまでパラフィンオイル下のM2液¹¹⁾ドロップ内に移

して7～8時間4℃の冷蔵庫内に静置した¹²⁾。

ノコダゾール (Aldrich Chem. Co.) は3 mg/mlとなるようにDMSO (ジメチルスルフォキシド) で溶解したものをstock液とし、供試直前にM16液¹³⁾で0.003～18.0 μ g/mlに希釈して用いた。なお、処理濃度は、1区: 0.003～0.02 μ g/ml, 2区: 0.03～0.20 μ g/ml, 3区: 0.3～2.0 μ g/ml, 4区: 3.0 μ g/ml, 5区: 6.0～9.0 μ g/ml, 6区: 12.0～15.0 μ g/ml, 7区: 18.0 μ g/mlである。

採取した2細胞期胚は、各濃度に調整したパラフィンオイル下のノコダゾール添加M16液ドロップ内にそれぞれ移し、37℃, 5%CO₂, 95%空気の炭酸ガス培養器内で12.5～14.5時間前培養後、4細胞への分裂が阻害されるか否かを検討した。分裂の阻害さ

れた胚の一部は、処理後M2液で洗浄して薬剤を除去したのち無添加M16液内に移して培養した。ついで、1時間後に観察して4細胞期へ分裂しているものを同調分裂胚と判定した。また、同調分裂胚の一部のものは、体外培養をさらに3日間継続して胚盤胞への発生能を検討した。

実験2

実験1と同様に過剰排卵処理を施したCD-1系マウスより、2細胞期胚をhCG投与後36, 43, 50時間目に採取し、それぞれ3.0 μ g/mlノコダゾール添加M16液で7時間処理後洗浄して体外培養を継続し、胚盤胞への発生率を検討した。

結 果

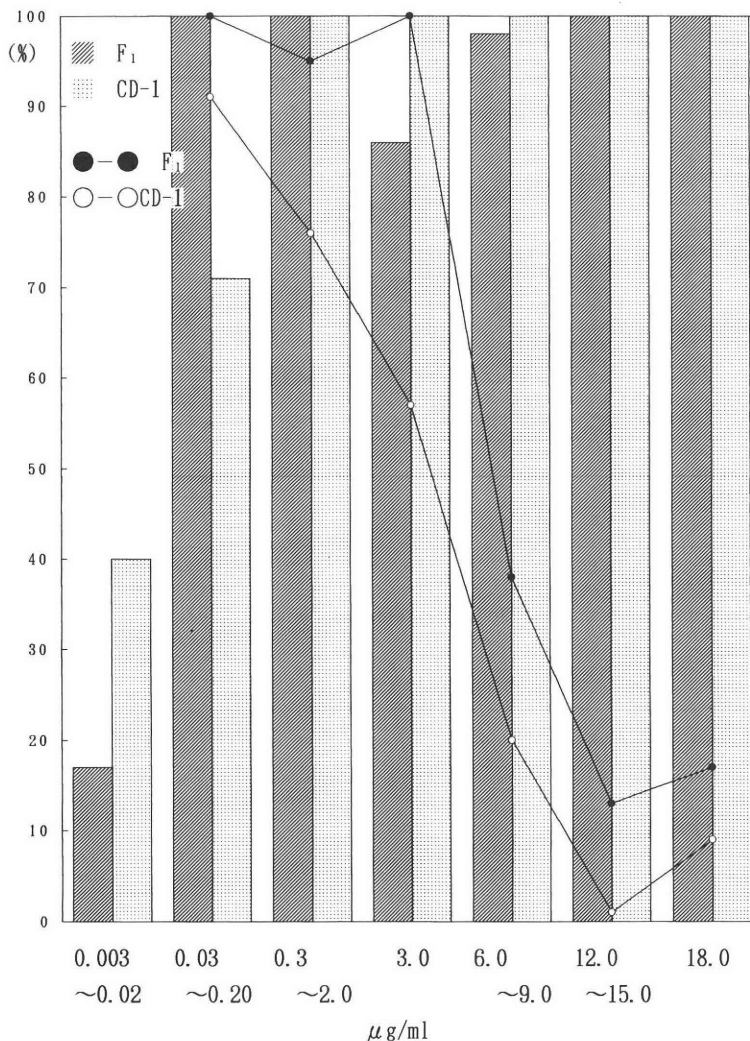


Fig. 1 Effects of the concentrations of nocodazole on the inhibition of division (bar graphs) of F₁ and CD-1 strain mouse 2-cell embryos, and the synchronous division to 4-cell stage (line graphs).

Fig. 1 に、各処理区ごとに、分裂停止胚の割合と薬剤除去後の同調分裂率を示した (実験 1)。各区は、それぞれ13~460個の胚を使用して検討した。棒グラフは分裂停止胚の割合を、折れ線グラフは同調分裂胚の割合を示した。CD- 1 系マウス胚を用いた場合、1 区で40 %、2 区で71 %、3 ~ 7 区ではすべての胚で分裂が阻害された。また、グラフには示していないが、0.003 μ g/mlでも31 %の阻害がみとめられた。一方、F₁マウス胚を用いた場合、1 区においては17 %で分裂阻害がみられたにすぎず、0.006 μ g/ml以下の濃度では全く阻害作用が観察されなかった。また、2 ~ 7 区における同調分裂率は、F₁ではそれぞれ100、95、100、38、13、17 %であった。これに対して、CD- 1 系胚では、91、76、57、20、1、9 %と、F₁胚と比較すると各区とも低い傾向にあり、特に3 ~ 6 区で有意な差がみられた。

Table 1 にノコダゾール除去後の胚の胚盤胞への発

生成績を示した。F₁マウスでは前報¹⁰⁾と同様に、無処理胚 (97 %) と大差なく高率 (89 %) に胚盤胞へ発育した。CD- 1 系マウス胚を用いた場合は、3 μ g/mlおよび0.2 μ g/mlのいずれの濃度でも胚盤胞への発生率 (43 %および52 %) は無処理胚の発生率 (90 %) と比べて有意に低かった。

Table 2 にノコダゾールの処理時期がCD- 1 系マウス 2 細胞期胚の体外発生能に及ぼす影響について示した。表から明らかなように、各処理区ともコントロール区と比べて4細胞ならびに胚盤胞への発生率がいずれも有意に低下する結果となった。また、hCG投与後36時間目に採取した胚を用いた場合の胚盤胞への発生率は、他区より特に低い傾向がみとめられた。

考 察

近年、哺乳動物の核移植時に、レシピエント卵細

Table 1 Effect of nocodazole on development of 2-cell embryos in vitro.

Strains of mice	Concentrations of nocodazole (μ g/ml)	No. of embryos			
		used	stopped at 2-cell stage (%)	divided synchronously* (%)	developed to blastocyst (%)
F ₁	3.0	45	44 (98)	44 (100)	39 (89)
	0	60	—	—	58 (97)
CD- 1	3.0	71	70 (99)	58 (83)	25 (43) ^a
	0.2	71	71 (100)	65 (92)	37 (52) ^b
	0	84	—	—	76 (90) ^c

a-b, a-c, b-c: p<0.01

* This means embryos which divided within 1 hour following elimination of nocodazole.

Table 2 Effect of the timing of the nocodazole treatment on the developmental ability of CD- 1 strain 2-cell embryos in vitro

Time of embryo collection (following hCG injection)	with (+) or without (-) nocodazole treatment	No. of embryos		
		used	4-cell	developed to blastocyst
36	+	48	32 (67) ^a	16 (33) ^{a'}
	—	66	62 (94) ^b	55 (83) ^{b'}
43	+	44	38 (86) ^c	29 (66) ^{c'}
	—	69	67 (97) ^d	62 (90) ^{d'}
50	+	42	28 (67) ^e	21 (50) ^{e'}
	—	43	39 (91) ^f	34 (79) ^{f'}

a-b, c-d, e-f, a'-b', c'-d', e'-f', a'-c': p<0.05

胞質とドナー細胞核間の細胞周期の同調あるいは制御が重要であることが示唆されている。Smith et al (1988)¹⁴⁾は、マウスの前核期卵あるいは2細胞期胚由来のドナー核を、除核した前核期卵へ核移植する際、細胞周期が一致した組み合わせの場合に胚盤胞への発生率が高いことを報告した。また、マウス胎子期生殖細胞を2細胞期胚へ核移植する場合も、ドナー細胞とレシピエント細胞質がともに分裂直前である場合に再構築胚が発育することを示唆した¹⁵⁾。しかしながら、いずれの場合も細胞周期の制御はhCG投与後の時間に依っており、ばらつきがみられる。そのため、より厳密な細胞周期の同期化が必要と考えられる。Collas et al (1992)¹⁾は、ウサギの8~16細胞期胚の細胞周期をコルセミドとDNAの合成阻害剤であるaphidicolinによってG1期に同調させたのちレシピエント卵細胞質に核移植したところ、S期のドナー核を用いた場合に比べて胚盤胞への発育が有意に向上することを報告した。

我々は、ノコダゾールでF₁マウス2細胞期胚を12~14時間培養後洗浄すると、1時間以内に4細胞期へ同調して分裂させることができ、その後の胚盤胞ならびに産子への発生能は無処理胚と比べて差のみられないことを報告した¹⁰⁾。そこで本研究では、ノコダゾール処置濃度の影響ならびにマウスの系統差を詳しく調べる目的で検討を行った。その結果、F₁由来胚の場合、0.03~3.0 μ g/mlの濃度では、分裂の停止ならびに同調分裂がともに高率にみとめられた。図には示していないが、6.0~9.0 μ g/mlでは薬剤を除去後、4細胞へ分裂する時間が2時間以上必要な胚が多くみられたが、これらの処置胚の胚盤胞への発生能は阻害されなかった。(35/42, 83%)。しかしながら12~18 μ g/mlの濃度で胚を処置すると、胚盤胞への発生能が有意に低下した(40/131, 31%)。

これに対して、CD-1系マウス由来2細胞期胚を用いた場合は、0.3 μ g/ml以上の濃度で全ての胚が分裂を停止していたが、同調分裂率はF₁の胚を用いた場合と比べて有意に低かった。また、3 μ g/ml以上の濃度では薬剤除去後4時間以上かかって分裂する胚が多くみられ、6 μ g/ml以上の濃度では胚盤胞への発生率は極めて低い結果となった(0~13%)。

この原因として、用いたマウスの系統によるノコダゾールに対する感受性の違いが考えられた。すなわち、Table 2に示すように、CD-1系の胚では処置濃度にかかわらずノコダゾール処理をした全区で、4細胞期への分裂ならびに胚盤胞への発育率が有意に低下したこと。また、早期の胚でより発生率が低

下する傾向のみられたことから、ノコダゾールがDNA合成に何らかの悪影響を及ぼしている可能性も考えられた。CD-1系マウス胚は、体外培養時に特有の「in vitro 2-cell block」現象を示す系統であることも要因のひとつと考えられる。すなわち、「in vitro 2-cell block」は細胞質に依存している現象¹⁶⁾であることから、ノコダゾールが分裂装置である紡錘体を構成する微小管以外の細胞質成分にも作用を及ぼしている可能性も考えられる。このことを明らかにするため、CD-1系の細胞核をF₁の細胞質に核移植するなどの検討が、今後必要と考えられる。

以上の結果より、微小管に結合して核分裂を阻害するノコダゾールの胚の生存性におよぼす影響は、用いたマウスの系統によって異なることが明らかとなった。

本研究の実施にあたりご協力頂いた龍門徳彦氏に感謝する。また本研究は、科学技術庁振興調整費「発生工芸技術の開発等に関する研究」、ヒューマンサイエンス財団基礎研究事業費、近畿大学環境科学研究助成金、文部省科研費(DC)ならびに財団法人日本科学協会笹川科学研究助成金により実施された。

文 献

- 1) Collas P, Balise JJ and Robl JM, Influence of cell cycle stage of the donor nuclear on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 46: 492, 1992
- 2) Siracusa G, Whittingham DG and De-Felici M, The effect of microtubule-and microfilament-disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. *J Embryol exp Morph* 60: 71, 1980
- 3) Snow MHL, Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature Lond* 244: 513, 1973
- 4) Trakowski AK, Witkowska A and Opas J, Development of cytochalasin B induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol exp Morph* 41: 47, 1977
- 5) Hoebeke JG, Van Nijien and De-Brabander M, Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 69: 319, 1976
- 6) Maro B and Bornens M, The centriolenucleus association: effects of cytochalasin B and nocodazole. *Biol Cell* 39: 287, 1980
- 7) Maro B, Johnson MH, Webb M, and Flach, G.

Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol exp Morph* 92: 11, 1986

- 8) Johnson MH, Pickering SJ, Dhiman A, Radcliffe, GS and Maro, B. Cyto cortical organization during natural and prolonged mitosis of mouse 8-cell blastomeres. *Development* 102: 143, 1988
- 9) Tacke L and Grunz H, Effect of cytochalasin B, nocodazole and procaine on binding and fate of concanavalin A in competent ectoderm of *Xenopus laevis*. *Zool Sci* 7: 657, 1990
- 10) Kato Y and Tsunoda Y, Synchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazole in vitro. *J Reprod Fertil* 95: 39, 1992
- 11) Fulton BP and Whittingham DG, Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273: 149, 1978
- 12) Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y, Nakamura, K, Uchida, T and Sugie, T., Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J exp Zool* 242: 147, 1987
- 13) Whittingham, DG, Culture of mouse ova. *J Reprod Fert, (suppl)* 14: 7, 1971
- 14) Smith LC, Wilmut I and Hunter RH, Influence of cell cycle stage of nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J Reprod Fert* 84: 619, 1988
- 15) Kato Y and Tsunoda Y, Nuclear transplantation of mouse fetal germ cells into enucleated two-cell embryos. *Theriogenology*, 37: 769, 1992
- 16) 中村公章, 角田幸雄, 前核置換技術を用いた「in vitro 2-cell block」の検討. *家畜繁殖誌* 33: 15, 1987

Effects of nocodazole on the developmental

ability of mouse 2-cell embryos in vitro

Yoko Kato and Yukio Tsunoda

Laboratory of Animal Reproduction,
College of Agriculture, Kinki University,
Nara 631, Japan

The present study was undertaken to examine the effects of nocodazole on the developmental ability of mouse 2-cell embryos in vitro. Two-cell embryos were collected from F₁ (C57BL×CBA) and CD-1 strain mice and they were cultured with M16 medium supplemented with 0.003~18.0 μ g/ml nocodazole in vitro. After 12.5~14.5 hours treatment, embryos whose development was stopped at the 2-cell stage were assessed whether they could divide synchronously into 4 cell stage within 1 hour and develop into blastocysts, following the elimination of the drug. The proportion of CD-1 strain embryos stopped at 2-cell stage during the treatment with the lowest concentrations of nocodazole (0.003 to 0.02 μ g/ml) was lower than that obtained with F₁ embryos (17 % vs 40 %). Significantly high proportions of F₁ embryos divided synchronously after elimination of 0.3 to 15.0 μ g/ml nocodazole compared with those of CD-1 strain embryos. The proportion of synchronously divided F₁ embryos developed into blastocysts after elimination of 3 μ g/ml nocodazole was not different from the control (89 % vs 97 %). But, the significantly lower proportion of embryos from CD-1 strain mice developed to blastocysts after elimination of 3 μ g and 0.2 μ g/ml nocodazole than control (43 and 52 % vs 90 %). The present study clearly demonstrated that the sensitivity of 2-cell embryos to the in vitro treatment of nocodazole was different between strain of mice.

(受付: 1992年12月24日)

(受理: 1993年 6月18日)

抗プロジェステロン製剤 (RU486) が家兎子宮内膜の 着床性変化に及ぼす影響

Effects of an Anti-progesterone Agent (RU486) on Endometrial Proliferation at the Time of Embryo Implantation in Rabbits

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

山 海 直*
Tadashi SANKAI

遠 藤 克
Tuyoshi ENDO
佐久間 勇 次
Yuzi SAKUMA

金 山 喜 一
Kiichi KANAYAMA

Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Kanagawa 252, Japan

東北大学農学部家畜繁殖学教室

梅 津 元 昭
Motoaki UMEZU

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Miyagi 981, Japan

RU486が、家兎の排卵、受精、胚の発育、着床に及ぼす影響について検討した。その結果、交配時にRU486 5 mg/rabbitを皮下投与した家兎において 10.9 ± 3.0 個の排卵を認めた。また、卵管と子宮から2～8 cellおよびblastocystの卵子を回収し、これらの卵子は、体外培養あるいは胚移植によって正常性が確認された。子宮の組織学的検索により、RU486を投与した家兎では、着床性の変化が約72時間遅延することが観察された。さらに、RU486を投与したRecipientの同期化処理をDonorの周期よりも経時的に早くして、正常胚の移植を試みたところ、24、48および72時間早い試験区でそれぞれ8.3、44.8および47.1%の着床が認められた。

以上のことから、家兎におけるRU486 5 mg/rabbitの交配時の投与は、排卵、受精および胚の発育には影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、着床阻止作用の要因は、子宮の着床性変化が48～72時間遅延するためであることが判明した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 605 - 611, 1993)

現所属；国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター*

Present address; Tsukuba Primate Center for Medical Science, the National Institute of Health, 1 Hachimandai Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

緒 言

抗プロジェステロン製剤 (RU486) は、プロジェス

テロンおよびグルココルチコイドに対して拮抗する合成ステロイドであり¹⁻³⁾、産科婦人科あるいは獣医畜産領域において広く応用できるものと考えられて

いる^{4,5)}。とくに、RU486のプロジェステロンに対する拮抗作用については、妊娠阻止、分娩誘発などへの応用を目的とした検討が試みられており⁶⁻¹¹⁾、さらに、作用の発現後においては生殖機能に影響をおよぼさないことが確認されている^{12,13)}。

家兎では、RU486 5 mg/rabbitを皮下投与することで完全に妊娠阻止が誘発できることが確認されている¹⁴⁾。本研究では、家兎において確実に妊娠阻止が誘起できるRU486の投与条件下で、排卵、受精、胚の発育、着床に及ぼす影響について検討を試み、その要因を解明することを目的とした。

材料および方法

供試動物は、日本白色種の家兎で体重2.8~3.2kgの成熟未經産雌を用いた。いずれも業者より購入し、実験に先立ち約1ヶ月の予備飼育を行い使用した。家兎は個別ケージに収容し、固形飼料および水を不断に給与した。また、交配に用いた雄家兎は、繁殖能力を有していることを確認したのを用いた。

RU486 (Roussel UCLF, France) は、ゴマ油で20 mg/mlになるように溶解して使用した。ゴマ油への溶解は、RU486をエタノールに溶解した後、最終濃度が20 mg/mlになるようにゴマ油を添加し、その後、湯煎によりエタノールを完全に気化して行った。

実験1：交配時におけるRU486 5mg/rabbit投与が排卵、受精および胚の発育に及ぼす影響

供試家兎は、成熟雄と交配しその直後にhCG(帝国臓器)とRU486を投与した。hCGは75IUを静脈内投与し、RU486は5 mg/rabbitを皮下投与した。その後、30および80時間目に安楽殺して卵巣所見および排卵卵子について検索した。検索は、卵管および子宮を摘出し、付着した脂肪を取り除いたのちに卵管は下向性(卵管采から卵管子宮接合部に向けて)に、子宮は上向性(子宮頸管側から卵管子宮接合部に向けて)に灌流し、卵子を回収して行った。灌流液には、30%非働化家兎血清を含むTCM-199を用いた。また、30時間目に灌流して得られた卵子を体外培養あるいは胚移植してその正常性について検索した。体外培養は、30%非働化家兎血清を添加したTCM-199で37℃、5%CO₂、95% airの条件下で行った。胚移植には、性周期の同期化処理を施した2例のRecipientを用いた。Recipientの同期化処理は、Donorの交配時に精管を結紮・切断した雄を用いて

交尾刺激を与え、直後にhCG 75 IUを静脈内投与して行った。なお、精管結紮雄は射出精液中に精子がないことを確認したのを用いた。移植は、Recipientの交尾刺激、すなわちDonorの交配から30時間目にRecipientをペントバルビタール酸誘導体による全身麻酔下で開腹し、内径0.5 mmのガラスキャピラリーを用いて卵管采から卵管内に卵子を注入して行った。その後、交尾刺激から11日目に開腹して、着床胎仔の有無について検索した。

実験2：交配時におけるRU486 5 mg/rabbit投与が着床に及ぼす影響

RU486を処理した家兎を用いて、経時的に子宮の組織標本を作製し、RU486が子宮の着床性変化に及ぼす影響について検索した。供試家兎を成熟雄と交配し、その直後にhCG 75 IU/rabbit/ivとRU486 5 mg/rabbit/scを投与した。また、無処置の対照区を設けた。交配後4日目(Day 4)、7日目(Day 7)および10日目(Day 10)に安楽殺したのちに子宮を摘出した。摘出した子宮は直ちにホルマリン固定し、組織標本を作製してH-E染色したのち子宮内膜像を鏡検した。

また、RU486投与家兎への正常胚の移植を試み、同期化処理を経時的に差を設けることによって着床が可能か否か、さらにその後妊娠を維持して分娩に至るか否かについて検討した。Recipientは、精管を結紮した雄を用いて交尾刺激を与え、その直後にhCG 75IUを静脈内投与して同期化、すなわち偽妊娠を誘起した。また、同時にRU486 5 mg/rabbitを皮下投与した。Recipientの同期化処理は、Donorの交配時および24、48、72、96時間前に行った。Donorは、成熟雄と交配し、その直後に確実に排卵を誘起するためにhCG 75IUを静脈内投与した。その後84時間目に家兎を安楽殺したのちに卵管と子宮を灌流して卵子を回収した。灌流は、30%非働化家兎血清を添加したTCM-199を用いて卵管は下向性に、子宮は上向性に行った。Donorから回収した卵子は、直ちに4~10個/rabbitを胚移植した。移植は、Recipientをペントバルビタール酸誘導体による全身麻酔下で正中線を開き、卵巣に排卵点を確認したのちに行った。まず、21Gの注射針で子宮上部を穿孔し、その孔より丁寧に内径0.5 mmのガラスキャピラリーを挿入し、0.05 mlの培養液と共に注入した。なお、Donorの交配時に同期化処理したRU486投与家兎への胚移植は、交配後30時間目に卵管から回収した卵子を卵管内へ移

植した試験区を設けた。検索は、Donorの交配日から数えて11日目に開腹手術して、着床胎仔および卵巣所見について行った。その後、分娩の有無、妊娠期間および産仔数について観察した。

実験成績

実験1：交配時におけるRU486 5 mg/rabbit投与が排卵、受精および胚の発育に及ぼす影響

交配時のRU486 5 mg/rabbit皮下投与が、排卵、受精、胚の発育に及ぼす影響について検討した結果はTable 1～3, Fig. 1, 2に示すとおりである。

交配後30時間目に検索した7例において、排卵点数は合計76個、平均 10.9 ± 3.0 個で、回収卵子数は59個、回収率は77.6%であり、いずれも卵管から回収された。回収卵子の発育ステージは2～8 cellであり、いずれも正常な分割像を示していた。交配後80時間目に検索した4例の排卵点数は、合計45個、平均 11.3 ± 2.4 個であった。また、卵管から26個、子宮

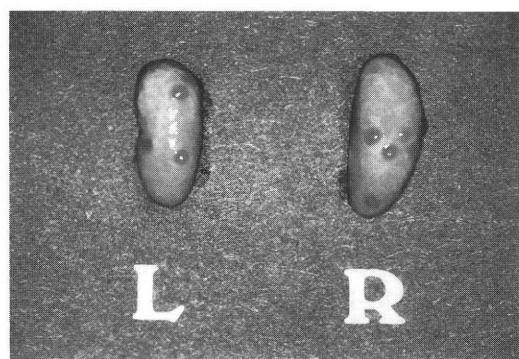


Fig. 1 The ovulation points on the ovaries in a rabbit given RU486 (5 mg/rabbit, s.c.) 30 hours after mating

から8個の卵子が回収された。回収率は75.6%であり、発育ステージはいずれもblastocystであった(Table 1)。Fig. 1に交配後30時間目に検索したときの排卵点を有する卵巣像を示した。また、Fig. 2に交配後30時間目に回収した4 cellと交配後80時間目に回収したblastocystの卵子を示した。

交配後30時間目に回収した2～8 cell stageの卵子を体外培養したところ、供試した35個の卵子はすべ

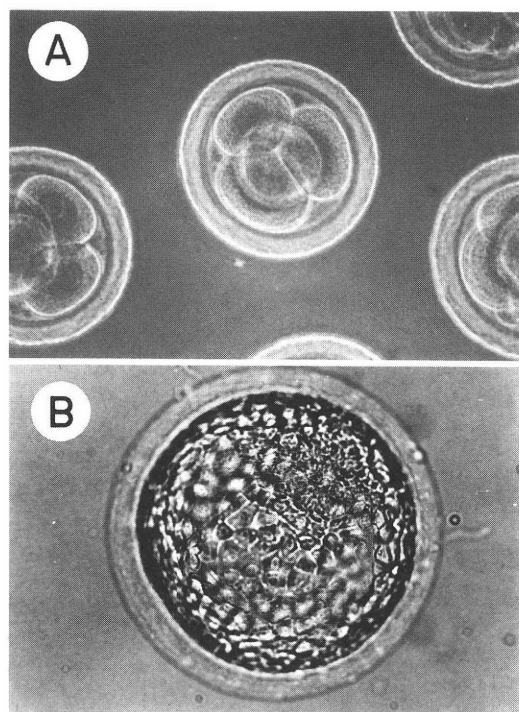


Fig. 2 Four cell stage (A) and blastocyst (B) eggs recovered from a rabbit given RU486 (5 mg/rabbit, s.c.) They were recovered 30 (A) and 80 (B) hours after mating respectively.

Table 1 Results of ovulation and developmental stages of eggs recovered from rabbits given RU486 (5 mg/rabbit, s.c.)

Time of examination (hours after mating)	No. of Anim. examined	No. of ovulation points	No. of ova recovered from		Stages of ova				
			oviduct	uterus	2	4	8	M	B
30	7	76 (Ave.10.9)	59	0 (77.6%)	2	55	2		
80	4	45 (Ave. 11.3)	26	8 (75.6%)					34

M: morula B: blastocyst

Table 2 Results of in vitro culture of ova recovered from rabbits given RU486 (5 mg/rabbit, s.c.)

No. of ova examined	Developmental stages of ova when the culture was started	No. of ova developed to blastocyst	% of ova developed to blastocyst
35	2 cell (2)	35	100
	4 cell (31)		
	8 cell (2)		

() No. of ova

Table 3 Results of transfer of ova recovered from rabbit given RU486 (5 mg/rabbit, s.c.)

Recipient Anim. No.	No. of ova transferred	Stage of ova transferred	No. of fetuses implanted ^{a)}	No. of newborn	Gestation period
295	Right 3	4 cell	1	0	-
	Left 5		0		
296	Right 7	4 cell	6	9	31
	Left 6		4		

a) confirmed under laparotomy on the 11th day after mating

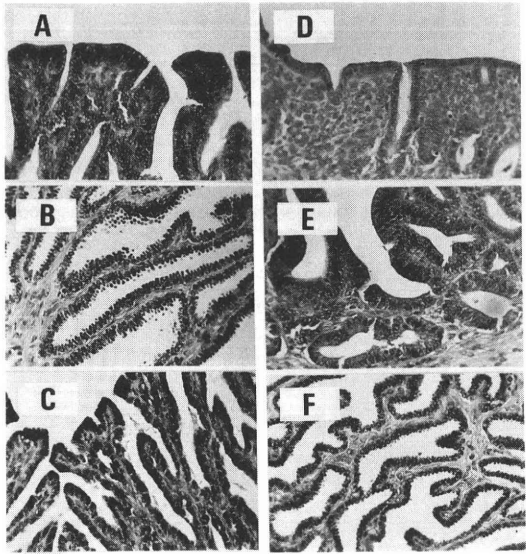


Fig. 3 Histological views of uterus in the rabbits
A, B, C: Intact control
D, E, F: Groups given RU486 of 5 mg/rabbit, S.C.
A, D: 4 day after mating B, E: 7 day after mating
C, F: 10 day after mating

てblastocystに發育した (Table 2). また, 2 例の Recipientにそれぞれ 8 および13個の卵子を移植したところ, Donorの交配後11日目の検索で 1 および10個の着床が認められた. その後, 後者から 9 例の産仔を得ることができた. 分娩は, Donorの交配日から数えて31日目に認められた (Table 3).

実験 2 : 交配時におけるRU486 5 mg/rabbit投与が着床に及ぼす影響

子宮内膜像について検索した結果をFig. 3 に示した. 家兎の着床時期である交配後 7 日目において, 対照区では上皮細胞の著しい腔内突出を認めたが, RU486投与家兎では辺縁が平坦であり, 対照区の 4 日目の像に類似していた. 交配後10日目では, RU486投与家兎で上皮細胞の突出を認め, 対照区の 7 日目の像に類似していた. すなわち, RU486投与家兎では, 子宮内膜像の着床性変化が遅延していることが認められた.

RU486投与家兎への胚移植において, Recipientの同期化処理を経時的に早く行った結果は, Table 4 に示したとおりである.

同期化処理の差が0 および96時間の試験区では着床は認められなかった. しかし, Recipientの同期化

Table 4 Results of embryo transfer to a recipient rabbit given RU486 (5mg/rabbit, s.c.)^{a)}

Time lag between donor and recipient (hours)	Stage and No. of ova transferred	No. of recipients	No. of recipients implanted	No. of fetuses implanted	No. of recipient delivered	Litter size
0 ^{b)}	4 cell (40)	4	0 (0) ^{d)}	—	—	—
0 ^{c)}	EB (8) B (18)	4	0 (0)	—	—	—
24 ^{c)}	EB (28) B (8)	5	2 (40)	3 (8.3) ^{e)}	1 (20) ^{d)}	1 (2.8) ^{e)}
48 ^{c)}	M (4) EB (2) B (23)	5	3 (60)	13 (44.8)	2 (40)	9 (31.0)
72 ^{c)}	EB (10) B (24)	5	4 (80)	16 (47.1)	1 (20)	2 (5.9)
96 ^{c)}	EB (11) B (17)	4	0 (0)	—	—	—

M: morula EB: early blastocyst B: blastocyst

() No. of ova

a) Coitus stimulation of recipients were synchronized at 0, 24, 48, 72 or 96 hours before donor's mating

b) transferred into the oviduct

c) transferred into the uterus

d) % to recipients

e) % to transferred eggs

を24時間前に行ったものでは5例中2例, 48時間で5例中3例, 72時間で5例中4例に着床を認めた。なお, 72時間の試験区では, 着床痕は存在していたが, 発育停止あるいはすでに吸収過程にあると思われるものを認めた。移植した卵子数に対する着床数は, 24時間で36個中3個(8.3%), 48時間で29個中13個(44.8%), 72時間で34個中16個(47.1%)であった。また, その後分娩にまで至った例数は, 24, 48および72時間区でそれぞれ1, 2および1例であった。産仔数は, それぞれ1, 9および2頭であり, 移植した卵子数に対する割合は, 2.8, 31.0および5.9%であった。

考 察

抗プロゲステロン(RU486)が排卵, 受精および胚の発育に及ぼす影響を明らかにするために, 交配と同時にRU486 5mg/rabbitを投与した家兎を用いて検討した。なお, 5 mg/rabbitという投与量は, 家兎の妊娠を阻止するには十分な量である¹⁴⁾。本実験において, 排卵, 受精, さらに少なくとも交配後80時間目までの胚の発育はすべて正常に遂行される結果が得られた。しかし, 山海ら¹⁵⁾は, RU486の投与により生殖道内の卵子の下降が遅延するが, 卵子の発育ステージは, 回収される部位とは関係なく時間に相関していることを報告している。本実験のRU486の投与スケジュールは著者らの方法と全く同じであることから, 今回の実験においても同様の現象が起

きていることが考えられる。

RU486の排卵抑制については, マウス¹⁶⁾, ラット¹⁷⁾で報告されているが, 排卵抑制の成否にはRU486投与の時期が強く関係している。今回の投与条件, すなわち交配時のRU486投与は家兎における排卵には影響を及ぼさなかったが, 今後, 投与時期の検討とあわせて内分泌学的, 組織学的な詳細な検討が必要と思われる。Psychoyos et al.¹⁸⁾は, ラットを用いて, 交配時のRU486投与が卵子の発育に及ぼす影響について検討しており, 妊娠4日目では正常なmorula stageの卵子が回収できるが, 5日目には子宮から回収された卵子は変性しており, blastocystは全く回収できなかったと報告している。今回, 子宮から多数のblastocystが回収されたが, このことは動物種による差か, あるいはRU486の投与量による差であるものと考えられる。なお, 本実験では, 回収卵子の体外培養と胚移植を試み, その正常性を実証している。よって, 家兎においては, 少なくとも5 mg/rabbitのRU486の投与では, 排卵, 受精および交配後80時間目までの卵子の発育には影響を及ぼさないことは明らかである。すなわち, 今回の投与条件下での家兎の妊娠阻止は, 交配後80時間目以降の生殖過程において生じるものと考えられた。

RU486が着床に及ぼす影響について

Psychoyos et al.¹⁸⁾は, 着床直前に卵子が変性することにより着床が阻害されると報告している。本実験では, RU486の着床阻止は, 主に母体側にその要因

があることが明らかとなった。すなわち、RU486非投与の家兎から回収した正常な分割卵子をRU486投与家兎に胚移植したところ、1例の着床も認められなかった。このことから、着床はRU486の子宮への影響により阻止されたものと考えられた。また、着床時期における組織像の検索において、子宮内膜の着床性変化が正常に遂行されていないことが明らかとなった。RU486に関する組織学的検索については、既にいくつかの報告がある¹⁹⁻²¹⁾。供試動物、投与時期、投与量などは報告者によって異なるが、RU486が子宮内膜におけるプロゲステロン作用を阻止して子宮内膜に影響を及ぼしていることは共通の知見である。本実験では、RU486を投与した家兎において子宮内膜の着床性変化が交配後10日目で認められ、これは対照区と比較して約3日間遅延していることが明らかとなった。そこで著者らは、このような組織学的観察により得られた知見を生殖生理学的に確認する目的で、RU486を投与したRecipientの性周期の同期化処理を経時的に早くして胚移植を試みた。その結果、同期化処理を48あるいは72時間早くした試験区で最も良好な着床、分娩成績を得ている。このように、RU486を投与した家兎の子宮内膜は、着床性変化が48から72時間程度遅延していることが形態的かつ機能的に明らかになった。

以上のように、RU486が着床時期における子宮内膜に及ぼす影響について家兎を用いて解明された。しかし、RU486は、動物種、投与時期、投与経路などによりその生理的影響を異にする可能性があるため、総合的な結論を出すには慎重な判断が必要であると考えている。

謝 辞

稿を終るに臨み、実験に御協力頂きました国立衛生試験場の内田雄幸先生に感謝致します。また、RU486を御提供頂いたRoussel-UCLAFに感謝致します。

文 献

- 1) Bertagna X, Bertagna C, Luton JP, et al., The new steroid analog RU486 inhibits glucocorticoid action in man. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 25, 1984
- 2) Philbert D, RU38486: an original multifaced antihormone. In: Agarwal MK ed, *Adrenal steroid antagonism*. p77, Walter de Gruyter & Co, 1984
- 3) Philbert D, Moguilewsky M, Mary I, et al., Pharmacological profile of RU486 in animals.

In: Baulieu EE and Segal SJ eds, *The antiprogesterone steroid RU486 and human fertility control*. P49, Plenum Press, 1985

- 4) Sankai T, Endo T, Kanayama K, et al., Anti-progesterone compound, RU486 administration to terminate pregnancy in dogs and cats. *J Vet Med Sci* 53: 1069, 1991
- 5) Cameron IT and Healy DL, Anti-progesterone: background and clinical physiology. *Bail Clin Obstet Gynaecol* 2: 597, 1988
- 6) Wolf JP, Sinosich M, Anderson TL, et al., Progesterone antagonist (RU486) for cervical dilation, labor induction, and delivery in monkeys: Effectiveness in combination with oxytocin. *Am J Obstet Gynecol* 160: 45, 1989
- 7) Asch RH and Rojas FJ, The effects of RU486 on the luteal phase of the rhesus monkey. *J Steroid Biochem* 22: 227, 1985
- 8) Shortle B, Dyrenfurth I and Ferin M, Effect of an antiprogesterone agent, RU486, on the menstrual cycle of the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 60: 731, 1985
- 9) Healey DL, Chrousos GP, Sculte HM, et al., Pituitary and adrenal responses to the antiprogesterone and antigluco-corticoid steroid RU486 in primates. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 867, 1983
- 10) Sakiz E, Euvrard C and Baulieu EE, The antiprogesterone activity of RU486, a contraceptive agent in the human. *Int Congr Ser Excerpta Med* 655: 239, 1984
- 11) Shaison G, George M, Lestrat N, et al., Effect of the antiprogesterone steroid RU486 during midluteal phase in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 484, 1985
- 12) Umezu M, Tadano M, Furusawa T, et al., Interruption of pregnancy by RU486 an anti-progesterone compound and subsequent reproductivity in rats. *Jap J Fertil Steril* 33: 431, 1988
- 13) 山海 直, 遠藤 克, 金山喜一 他, 抗プロゲステロン製剤 (RU486) による家兎の妊娠阻止とその後の妊孕性について, 日不妊会誌 36: 211, 1991
- 14) 山海 直, 遠藤 克, 金山喜一 他, 抗プロゲステロン (RU486) の投与経路, 投与量および投与時期が家兎の妊娠阻止に及ぼす影響. 日不妊会誌 37: 111, 1992
- 15) 山海 直, 金山喜一, 遠藤 克 他, 抗プロゲステロン, RU486が家兎卵子の下降速度および発育ステージに及ぼす影響. 日本受精着床学会雑誌 6: 176, 1989
- 16) Loutradis D, Bletsis A, Aravantinos L, et al., Pre-ovulatory effects of the progesterone antagonist

mifepristone(RU486) in mice. Hum Reprod 6:1238, 1991

- 17) Uilenbroek JT, Hormone concentrations and ovulatory response in rats treated with antiprogesteragens. J Endocrinol 129: 423, 1991
- 18) Psychoyos A and Prapas I, Inhibition of egg development and implantation in rats after post-coital administration of the progesterone antagonist RU486. J Reprod Fert 80: 487, 1987
- 19) Gravanis A, Schaison G, George M, et al., Endometrial and pituitary responses to the steroidal antiprogesterone RU486 in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 60: 156, 1985
- 20) Koering MJ, Healy DL. and Hodgen GD, Morphologic response of endometrium to a progesterone receptor antagonist, RU486, in monkeys. Fertil Steril 45: 280, 1986
- 21) Chillik CF, Hsiu JG, Acosta AA, et al., RU486-induced menses in cynomolgus monkeys: uniformity of endometrial sloughing. Fertil Steril 45: 708, 1986

**Effects of an anti-progesterone agent (RU486)
on endometrial proliferation at the time of
embryo implantation in rabbits**

Tadashi Sankai* Tuyushi Endo,
Kiichi Kanayama and Yuzi Sakuma

Department of Veterinary Physiology,

* Present address; Tsukuba Primate Center for Medical Science, the National Institute of Health, 1 Hachimandai Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

College of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Kanagawa 252, Japan

Motoaki Umezu

Laboratory of Animal Reproduction,
Faculty of Agriculture, Tohoku University,
Miyagi 981, Japan

The effects of 5 mg RU486 (s.c.) were examined on ovulation, fertilization, egg development and implantation in rabbits. Ovulation points in the ovaries were 10.9 ± 3.0 in rabbits given RU486 at the same time of mating. Two- to 8-cell and blastocyst eggs were obtained from the subjects given RU486, and the eggs were confirmed normal functionally by in vitro culture or embryo transfer. Inhibition of implantation was observed in the RU486-treated subjects; histological examination of the uterus before and after implantation indicated a delay of about 72 hours of endometrial proliferation necessary for implantation. Normal embryos transferred to RU486-treated recipient rabbits. When coitus stimulation of recipients were synchronized at 24, 48 and 72 hours before donor's mating 8.3, 44.8 and 47.1% of implanted fetuses to transferred eggs were obtained.

It was thus demonstrated that RU486, when administered 5 mg/rabbit (s.c.) at the time of mating, did not affect ovulation, fertilization and egg development but that it did prevent subsequent implantation as a result of two to three days delay of endometrial proliferation for implantation.

(受付: 1993年 3月22日)

(受理: 1993年 6月18日)

透明帯開窓法のヒト胚発生、胚発育におよぼす影響

Fertilization and Embryo Development of Human Oocytes after Zona Pellucida Opening

医療法人社団スズキ病院産婦人科

小 田 原 靖	千 田 智	蛭 田 益 紀
Yasushi ODAWARA	Satoru CHIDA	Masunori HIRUTA
渡 辺 洋 子	飯 田 修 一	森 滋
Yoko WATANABE	Shuichi IIDA	Shigeru MORI
立 花 郁 雄	鈴 木 雅 洲	
Ikuo TACHIBANA	Masakuni SUZUKI	

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

ヒト体外受精症例における透明帯開窓法(Zona opening)の胚発生、胚発育におよぼす影響について検討した。精液性状不良例20例(A群)および前回IVFでの受精非成立例18例(B群)に対して採取卵子の一部に透明帯を開孔し受精、胚発育を検討した。さらにIVF余剰胚の透明帯を2細胞期に開孔し胚発育を観察し、以下の結果を得た。

(1)開窓法による受精率、多精子受精率はA群で各々20.0%、12.0%、B群で25.8%、3.5%であり、55.2%(21/38)の症例に胚移植を施行し2例に妊娠が成立した。(2)両群36例のうち受精例26例の運動精子数、開窓、媒精後の透明帯付着精子数、卵卵腔内精子数は非受精例12例に比べいずれも高値であった。(3)開孔サイズの拡大は胚発育を抑制し、シヨ糖添加の有無、前培養時間、媒精時間で受精率、胚発育に変化を認めなかった。(4)余剰胚の開窓後の胞胚への移行率は非開窓例に比べ低値の傾向を認めた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38(4), 612-617, 1993)

緒 言

乏精子症、精子無力症に対して体外受精・胚移植法(IVF-ET)が広く適用されているが精液性状不良のため受精に至らない症例も多い¹⁾。このような受精障害を伴う乏精子症例に対してマイクロマニピュレーターを用いた顕微操作法が臨床応用されつつある。現在透明帯切開法、精子卵卵腔注入法および精子細胞質内注入法の臨床応用が報告されているが男性因子症例に対する有効性についてはいまだ不明な点が多い。我々はガラス製マイクロフックを用いた透明帯開窓法(Zona opening法)を独自に開発しその効果について検討を加えてきた²⁾。透明帯開窓法は

精子が入り得る大きさの裂孔を作成することにより精子が卵卵腔に到達する確率を増大させる一方、透明帯に生じた欠損が初期胚にいかなる影響をあたえるかについては不明な点が多い。また精子性状と本法による受精の可否についてもその詳細は明らかでない。今回透明帯開窓のヒト胚発育におよぼす影響について検討しさらにヒト体外受精における受精非成立症例および高度乏精子症例に対して次回IVF周期に本法を併用しその臨床成績について検討した。

対象および方法

(対象)

男性因子症例で精液性状不良のため通常のIVFで

は受精困難と考えられた症例20例(A群)および前回のIVFで受精に至らなかった精液性状不良症例18例(B群)の計38例に対してIVF透明帯開窓法を併用し、受精、胚発育、および臨床成績について検討した。(卵胞刺激法および採卵)

IVFのための卵胞刺激は月経第4日よりHMG150単位を投与した。高FSH症例、過短卵胞期を有する症例に対しては症例に応じてHMG投与量を増量、あるいはGnRHaを併用した。月経第8日より超音波卵胞計測、EIAによる血中エストラジオール測定を開始しその結果によりHMG投与量を適時増減した。主席卵胞群の卵胞径が14~15 mmに達した時点でHMGを中止し約56時間後にHCGを投与、32時間後に経腔超音波ガイド下に卵胞液を吸引し卵子を採取した。採取卵子は成熟度により前培養を施した後0.1%ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去し、極体を有する成熟卵子のみを顕微操作に供した。

(精子の調整)

精子はマスターベーションにより採取し十分に液化した後Percoll 撪拌密度勾配法を用い調整した。

(透明帯開窓法)

顕微操作に要するガラス製フック、ホールディングピペットはピペットプラー、マイクロフォージを用いて毛細ガラス管を加工し作製した。卵丘細胞を除去した卵子はパラフィンオイルに覆われたHTF/Bufferに移され、37℃に設定されたホットプレートを設置した位相差顕微鏡下で顕微操作を施行した。まず術者手前方向よりホールディングピペットを導入し卵子を把持する。続いて左右からガラス製マイクロフックを透明帯に刺入した後フックを左右に約5度引くことにより小裂孔を作製した。1ヶの卵子の顕微操作に要する時間は1分程度であり操作による卵細胞膜の損傷は全く認めなかった。

(媒精、受精の確認および胚移植)

操作終了後卵子はすみやかに血清添加HTFへ移され前培養の後調整精子により媒精を施行した。翌朝受精の有無を確認、胚の一部は前核期に卵管へ移植した。分割胚は採卵第2日に経経管的に子宮あるいは腹腔鏡下に卵管内へ移植した。胚移植を施行した症例には黄体ホルモン、黄体ホルモンデポー、および副腎皮質ステロイドの補充をおこなった。

(透明帯開窓の受精および胚発育におよぼす影響についての検討)

透明帯開窓の受精、胚発育におよぼす影響を検討する目的でAB両群と異なる16例のIVF症例より得られた形態的に胚移植に適さないと考えられた余剰胚

(Surplus Embryo)を患者の同意を得て実験に供した。2細胞期胚で著しい変性を認めない余剰胚を血清添加HTFに移し、一部胚に透明帯開窓術を施行しその後の胚発育について検討した。またAB両群の透明帯開窓術施行時に同一症例で(1)囲卵腔容積を増加するための0.2 mol ショ糖添加の有無(2)開孔サイズを通常の約5度の切開から約20度に拡大した場合との比較(3)開窓から媒精までの時間を1時間以内と1時間以上の比較(4)媒精時間を4時間に短縮した場合と通常IVFと同様約16時間とした場合の比較の4点について受精率、多精子受精率、分割率、良好分割胚(胚細胞の50%以上が形態的に正常でありfragmentを多く含まないもの)への移行率について検討した。成績の有意差検定は χ^2 testを用いた。

成 績

(透明帯開窓法による臨床成績)

表1にAB両群の臨床成績を示した。A群

(IVF初回施行例)での受精率、多精子受精率は通常媒精で各々11.4%、0.0%に対して透明帯開窓で20.0%、12.0%と透明帯開窓で高率であった。B群(前回IVF非受精例)の受精率、多精子受精率は通常媒精でともに0.0%に対して透明帯開窓で25.8%、3.5%と高率であった。38例中21例に胚移植を行い2例に妊娠が成立、1例は健全女児を出生し認め1例は子宮外妊娠であった。

(精液所見と受精の有無)

表2に両群38例のうち受精が成立した26例と非受精12例の精液所見を示した。採卵時の総運動精子数、直進運動精子数、精液調整後の運動精子数、媒精24時間後の精子運動率を比較すると調整後の運動精子数は受精群で 8.0×10^6 /ml、非受精群で 1.8×10^6 /mlと受精群において高値であった。さらに媒精24時間後の透明帯付着精子数および囲卵腔到達精子数も受精群で各々26.8、4.6に対して非受精群で6.6、2.3と受精群で高値であった。

(透明帯開窓操作が受精、胚発育におよぼす影響について)(表3, 4)

余剰2細胞期胚を開窓した後の胚発育は8細胞期への移行率は73.9%(17/23)と良好であったが以後次第に低下し胞胚への移行率は8.6%と非開窓例に比べ低値の傾向を示した。ショ糖添加の有無で受精率、多精子受精率、分割率、良好分割胚への移行率に差は認められなかった。開孔サイズを大きくした場合の受精率は12.5%と通常サイズの開孔と比較して低率である一方多精子受精率は15.6%と上昇した。良

表 1 AB両群の体外受精・胚移植成績

		正常受精率 (%)	多精子受精率 (%)	分割率 ／正常受精胚 (%)	胚移植率 ／患者 (%)	妊娠率 ／胚移植 (%)
A群 (n=20)	開窓卵	20.0 ^a (15/75)	12.0 ^c (9/75)	76.9 (10/13)	40.0 (8/20)	0.0 (0/8)
	非開窓卵	11.4 ^b (4/35)	0.0 ^d (0/35)	100.0 (4/4)		
B群 (n=18)	開窓卵	25.8 ^e (39/116)	3.5 (4/116)	86.7 (13/15)	72.2 (13/18)	15.3 (2/13)
	非開窓卵	0.0 ^f (0/31)	0.0 (0/31)			

a*b 0.1<p<0.5
c*d 0.02<p<0.05
e*f 0.001<p<0.01

表 2 開窓法による受精の有無と精液所見

		受精成立例 (26例)		受精不成立例 (12例)	
		mean	SD	mean	SD
運動精子総数	(x10 ⁶ total)	11.5	16.0	4.8	9.0
調整後運動精子総数	(x10 ⁶ total)	8.0 ^a	5.7	1.8 ^b	3.2
媒精24時間後精子運動率	(%)				
透明帯付着精子数		26.8 ^c	19.7	6.6 ^d	6.5
困卵腔到達精子数		4.6 ^e	7.3	2.3 ^f	4.1

a*b 0.001<p<0.01
c*d p<0.001
e*f p<0.001

表 3 余剰 2 細胞期胚透明帯開窓後の胚発育

	4 細胞	8 細胞	16細胞	桑実胚	胞胚	Hatching胞胚
開窓施行卵 (n=23)	86.9 % (20/23)	73.9 % (17/23)	34.7 % (8/23)	21.7 % (5/23)	8.7 % (2/23)	0.0 % (0/23)
開窓非施行卵 (n=15)	100.0 % (15/15)	93.3 % (14/15)	46.7 % (7/15)	46.7 % (7/15)	33.3 % (5/15)	6.7 % (1/15)

数字は各stageへの移行率を示す
all N. S.

表 4 透明帯開窓法における受精・胚発育に影響する諸因子の検討

		正常受精率 (%)	多精子受精率 (%)	分割率 ／正常受精胚 (%)	良好分割胚 ／正常受精胚 (%)
シヨ糖添加	有	24.0	4.0	91.7	33.3
		(12/50)	(2/50)	(11/12)	(4/12)
	無	28.0	0.0	64.2	42.8
		(14/50)	(0/50)	(9/14)	(6/14)
開窓サイズ	通常	25.8	6.4	75.0	25.0
		(8/31)	(2/31)	(6/8)	(2/8)
	大穴	12.5	15.6	50.0	0.0
		(4/32)	(5/32)	(2/4)	(0/4)
前培養時間	1 時間以下	20.0	0.0	50.0	50.0
		(4/20)	(0/20)	(2/4)	(2/4)
	1 時間以上	17.6	0.0	100.0	66.7
		(3/17)	(0/17)	(3/3)	(2/3)
媒精時間	4 時間	16.0	8.0	75.0	25.0
		(4/25)	(2/25)	(3/4)	(1/4)
	16 時間	19.0	5.4	71.4	42.9
		(7/37)	(2/37)	(5/7)	(3/7)
受精胚の 囲卵腔精子数	20 以下			79.3 ^a	27.6 ^c
				(23/29)	(8/29)
	20 以上			28.6 ^b	0.0 ^d
				(4/14)	(0/14)

a*b 0.001<p<0.01

c*d 0.02<p<0.05

好胚への移行率も0.0%と低率であった。さらに媒精までの前培養時間および媒精時間の長短により受精率、胚発育に差を認めなかった。また受精胚のうち囲卵腔に20以上の精子侵入を認めた胚と侵入精子数が20以下であった胚の分割率および良好胚への移行率は前者で有意に低値であった。

考 察

男性因子症例のIVF-ETによる治療成績は卵管因子症例に比べて不良であり受精に至らない症例も少なくない。通常のIVFにおいても男性因子症例での受精率を向上させるためにミニバコール法などによる精子調整法や微少小滴内媒精により相対的に卵子あたりの媒精数を増加させるなどの方法³⁴⁾が試みられ

ているがその効果は満足すべきものではない。一方、1970年代からマイクロマニピュレーターを用いて精子を卵子に到達せしめる種々の顕微操作法が開発された。現在臨床応用が報告されている顕微操作手技は透明帯切除、精子囲卵腔内注入、精子細胞質内注入の3法である。透明帯切除法には酸を用いて化学的に透明帯の一部分を融解切除する方法 (Zona Drilling⁵⁾) および機械的に切除する方法 (Partial Zona Dissection⁶⁾, Zona Cutting⁷⁾, Zona Opening) の2法が報告されているが、前者はヒトに応用した場合、酸による細胞質の障害に起因すると考えられる多精子受精が高率に発生することが報告され、現在主に胚のbiopsyを目的とした透明帯切除に用いられている。Cohenらはガラス針を用いて透明帯の一部を開

窓するPartial Zona Dissection (PZD)を開発し1988年に顕微操作による初の妊娠、分娩例を報告している⁸⁾。Ng.らは1988年に精子囲卵腔内注入法 (Micro insemination by sperm transfer, (MIST)),あるいはSubzonal Insemination (SUZI)⁹⁾, Subzonal Insertion (SZI))で初の妊娠、分娩を報告している¹⁰⁾。現在PZD, SZIによる妊娠、分娩例は100例前後と考えられる。昨年Palermoらは通常のIVFおよび精子囲卵腔内注入法で受精に至らなかった症例に対して細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, (ICSI))を試み4例の妊娠を報告した¹¹⁾。精子処理法については1250 v/cmの電圧処理の後ペントキシフィリン添加T6で調整し用いたと述べているが精子先体反応や卵子のactivationの誘起方法については明らかでなくこの点については更に詳細な報告が待たれる。今回我々は透明帯開窓法による受精、胚発育の詳細について検討したが余剰2細胞期胚で透明帯を開窓した場合の胞胚への発育は非開窓例に比べて抑制される傾向を認めた。以前我々が報告したマウス胚を用いた結果では同法での胚発育は良好であった。今回用いた胚が移植に適さない余剰胚であることも少なからず胚発育に影響を与えている可能性もあり今後新鮮卵子を用いた検討も必要と考えられる。さらに乏精子症例における透明帯開窓後の受精、胚発育において囲卵腔容積を拡大するためのショ糖添加の有無、前培養時間、媒精時間の影響について検討した。ショ糖の添加の影響についてはマウスを用いた結果と同様に添加の有無により差を認めなかった。次いで顕微操作による卵子に対する温度変化、浸透圧変化、機械的操作による影響、ホールディングピペットによる圧負荷などの影響から卵子を回復させるために媒精前に培養時間を長く設ける必要があるか否かを、さらに媒精時間の長短により開窓卵子に対する受精、胚発育の低下や侵入精子数の増加による多精子受精率の上昇といった影響があるか否かを検討したがこの2点により受精率、胚発育に変化は認められなかった。我々は午前中採卵、採精、午後に顕微操作、媒精というスケジュールで行っているため4時間で培養液を交換する場合夜に施行することになることも考慮し今回の結果から現在は通常のIVFと同じ媒精時間に設定している。開窓サイズを大きくした場合は受精率の低下および多精子受精率の上昇が認められ、胚のqualityの低下も著明であった。その原因として操作による卵細胞質への

物理的影響、開窓サイズの拡大による多数精子の囲卵腔への侵入が考えられる。精子不良例に対しても開窓サイズを大きくせず、媒精濃度を増加して対応することが望ましいと考えられる。透明帯の開窓部位について極体付近は卵細胞膜の精子レセプターが乏しいため極体の対側から切開するべきとの報告もあるが我々の結果では極体付近を開窓しても成績に差を認めず、また侵入精子は多くが囲卵腔内で活発に運動性を保持していることから囲卵腔が広くアプローチの容易な部分から切開すれば良いと考えられる。各法の受精率を対外受精での受精障害例における報告で比較すると透明帯開窓法では今回の我々の結果から25.8%, Cohenらの報告ではPZDで24.2% (33/136), SUZIで30.7% (8/26), PZD/SUZIを併用した症例ではPZD 18.6% (14/75), SUZI 38.8% (40/103)とSUZIでPZDよりも良好な受精率を報告している¹²⁾。一方多精子受精率は今回の結果から透明帯開窓法で3.5% (4/116), CohenらはPZDで24.2% (8/33), SUZIで17%であったと報告している。PalermoらはIVF/SUZI非受精例に対してICSIを施行した結果受精率21.0% (30/143)であったと報告している。ICSIによる妊娠報告例は未だ少数であり現時点でIVF受精非成立症例に対しては透明帯開窓法あるいはSUZIが適応と考えられるが運動精子がある程度回収できる症例では開窓法を施行し、運動精子がきわめて乏しい症例ではSUZIを第一選択すべきと考えられる。開窓法による受精例、非受精例の精液所見を比較すると受精例、非受精例の運動精子総数は 11.5×10^6 , 4.8×10^6 と受精群で高値であり、また媒精後の透明帯付着精子数は受精群26.8, 非受精群6.6と非受精群で付着は少数であった。これらの結果からIVF非受精症例で媒精後の透明帯に精子が20以上付着し、総運動精子濃度が 10×10^6 程度の症例が本法の適応であり、それ以下の症例に対してはSUZIが適応と考えられる。透明帯開窓法とSUZIを精子あたりの受精効率で比較すると後者が上回る一方通常IVFとの精子のCapacitation, 先体反応, 精子-卵子融合のメカニズムの差異などについていまだ不明な点も多い。我々の施設で開窓法で受精に至らなかった症例に対してSUZIを施行した受精率は現在のところ13.6%と低率である。今後両法の有効性、治療限界についてさらに精子の形態異常、運動障害あるいは先体反応や精子融合などの機能的異常など精子側の原因因子別に検討する必要があるとともに両法に適した精子処理方法の開発や顕

微操作手技の改善により臨床成績を通常の体外受精による受精率, 着床率に近づけることが望まれる。

文 献

- 1) Yovich JL and Stangger JD, The limitations of in vitro fertilization from males with severe oligozoospermia and abnormal sperm morphology. J in Vitro Fert Embryo Transfer 1: 42, 1984
- 2) Odawara Y and Lopata AA, zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentration: A mouse model. Fertil steril 51: 139, 1989
- 3) The Royal Women's Hospital Reproductive Biology Unit. Laboratory procedures and techniques, Not commercially sold
- 4) Dumoulin JCM, Bras M, Land JA, et al., Effect of the number of inseminated spermatozoa on subsequent human and mouse embryonic development in vitro. Human Reprod 7: 1010, 1992
- 5) Gordon JW, Grunfeld L, Talansky BE' et al., Fertilization of human/oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. Fertil Steril 50: 68, 1988
- 6) Cohen J, Malter HE, Wright G, et al., Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. Hum Reprod 4: 435, 1989
- 7) Depypere HT, McLaughlin KJ, Seamark RF, et al., Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. J Reprod Fert 84: 205, 1988
- 8) Cohen J, Malter H, Fehilly C, et al., Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet 2: 162, 1988
- 9) Fishel S, Antinori S, Jackson P, et al., Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). Human Reprod 6: 124, 1991
- 10) Ng SC, Bongso TA, Ratanam SS, et al., Pregnancy after transfer of multiple sperm under zona. Lancet 2: 790, 1988
- 11) Palermo G, Joris H, Devroey P, et al., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340: 17, 1992
- 12) Cohen J, Alikani M, Malter HE, et al., Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: Microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology. Fertil Steril 56: 696, 1991

Fertilization and embryo development of human oocytes after zona pellucida opening

Yasushi Odawara, Ikuo Tachibana, Satoru Chida, Masunori Hiruta, Yoko Watanabe, Shuichi Iida, Shigeru Mori and Masakuni Suzuki

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

20 couples with severe sperm deficiency (Group A) and 18 couples with previous IVF failure (Group B) were treated by IVF using zona opening procedure aiming to improve fertilization rate. The effects of sucrose exposure, size of the hole created on zona pellucida, pre-incubation time and duration of insemination on fertilization and embryo development were studied. We also investigated the in vitro embryo growth of 23 two cell stage surplus embryos after zona pellucida opening. The results obtained were as follows.

1) Rate of monospermic fertilization after zona opening were higher than usual insemination both in Group A (20.0 % vs. 11.4 %) and Group B (25.8 % vs. 0.0 %). 54 embryos fertilized by zona opening procedure were replaced to 21 patients and two pregnancies were established.

2) Fertilization and cleavage rate of the oocytes with large hole on zona pellucida were lower than oocytes with small hole.

3) There were no influences of sucrose exposure, pre-incubation time and insemination time on fertilization and cleavage by zona opening procedure.

4) Number of sperm observed in perivitelline space after zona opening were higher in fertilized oocytes (4.6 ± 7.3) than non fertilized oocytes (2.3 ± 4.1).

5) Blastocyst formation of two cell surplus embryos manipulated by zona opening method were fewer than zona intact controls (8.7 % vs. 33.3 %).

(受付: 1993年2月9日)

(受理: 1993年6月18日)

男性不妊症例の体外受精胚移植における精子調整法の比較検討

Evaluation of Sperm Preparation Methods in in vitro Fertilization and Embryo Transfer for Male Infertility

名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室

生 田 克 夫

Katsuo IKUTA

岡 田 英 幹

Hideki OKADA

鈴 木 規 敬

Noritaka SUZUKI

貝 田 清 隆

Kiyotaka KAIDA

八 神 喜 昭

Yoshiaki YAGAMI

鈴 木 真 史

Masashi SUZUKI

花 田 征 治

Seiji HANADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School,
Nagoya 467, Japan

男性不妊症例の体外受精胚移植法における精子調整方法を(1)精子洗浄後swim up(洗浄法), (2)80% percollを用い攪拌連続密度勾配法により精子分離後swim up(percoll法), (3)80% percollによる精子分離後pentoxifylline含有(1 mg/ml)培養液中へswim up(percoll-pentoxifylline法)の3方法で行い比較検討した。総回収卵子数に対する総受精卵子数の比較では洗浄法 9/69 (13%), percoll法 23/119 (19%), percoll-pentoxifylline法 54/131 (41%) で percoll-pentoxifylline法は他の2法に比べて高率であった。採卵周期数に対する移植可能周期数についても pentoxifylline法は他の2方法に比べて高率で4症例に妊娠が成立したことより、男性不妊症例の精子処理に percoll-pentoxifylline法が有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 618 - 623, 1993)

緒 言

体外受精胚移植法は不妊治療の一つとして臨床に登場して以来、短期間に不妊治療の重要な位置を占めるにいたった。そしてbuserelineの登場を得て、臨床における実施programの柔軟性が増し、安定した卵子回収成績が得られることとなり、さらに一層普及するにいたった。体外受精胚移植法の治療成績も安定化してきてはいるものの、まだ研究改良が必要な部分も多く存在する。現在の実際の治療において改良の余地のあることの一つに男性因子を有する症例の治療があげられる。男性因子を有する症例の体外受精胚移植治療の実施にあたって、受精率の低さとこれに伴う妊娠率の低さが問題となる。とくに男性因子を有する症例の精液に対して精液所見正常者と同じ精子調整を行うと、回収運動精子数が著

しく減少したり、たとえ十分な運動精子数が得られても受精率は低率にとどまる。この点に関してこれまでに様々な精子調整法、回収法が報告されているが未だ満足できる結果を得るにいたってはいない。そこで今回このような精子調整方法の一つとしてpentoxifyllineを使用した精子調整法を対象coupleの同意を得たうえでその有用性について他の精子調整方法とのあいだで比較検討を行った。

対象と方法

対象は当院において不妊原因として男性因子を有し体外受精胚移植を行った症例で、体外受精胚移植の精液採取時に精子濃度が 20×10^6 /ml未満または精子運動率が50%未満の条件を満たした27症例52周期を検討の対象とした。全例buserelineを使用した後、hMGにて卵巣を刺激し、hCG注射後経腔的に採卵し

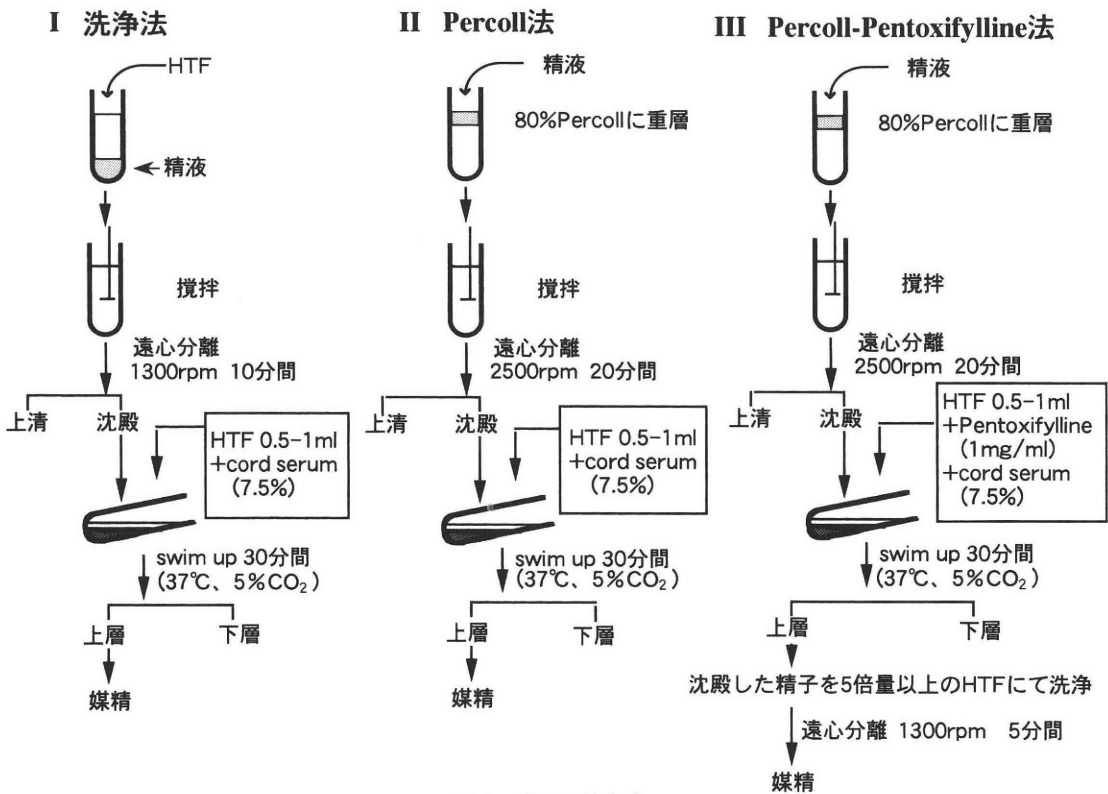


図 1 精子調整方法

表 1 対象の精液性状と治療周期数

	周期 (症例)	Oigozoo- spermia ($<20 \times 10^6$ /ml)	Asthenozoo- spermia ($<50 \%$)	Oligoasthenozoo- spermia ($<20 \times 10^6$ /ml and $<50 \%$)
洗浄法	18 (16)	2 (2)	12 (10)	4 (4)
Percoll法	16 (12)	4 (3)	9 (7)	3 (2)
Percoll- pentoxifylline法	18 (13)	4 (3)	9 (8)	5 (4)

た。精子調整法は図 1 に示すように¹⁾HTF medium による 1 回精子洗浄の後swim upを行ったもの (洗浄法)²⁾, 80 % percollを用いた撈拌連続密度勾配法により精子を分離した後swim upを行ったもの (percoll 法), 3) 80 % percollを用いた撈拌連続密度勾配法により精子を分離し, pentoxifyllineを 1 mg/mlの濃度で含有する上層のHTF mediumへswim upを行ったもの (percoll-pentoxifylline法), の 3 種類の方法で行い, 精子濃度30万 /mlで媒精に供した。18時間後に

受精の有無を確認し, 媒精後約48時間で胚移植を行った。このときの移植胚数は3個までとした。採卵後のluteal supportはprogesterone20-40 mg/日で行った。それぞれの精子調整方法の検討対象は表 1 に示すように¹⁾の洗浄法では16症例18周期²⁾, percoll法では12症例16周期³⁾, percoll-pentoxifylline 法では13症例18周期であり, いずれの調整方法においても精子の運動率が50 %未満を示すものが多くを占めていた。

表2 回収卵子数と精液所見

	洗浄法	Percoll 法	Percoll-Pentoxifylline法
回収卵子数	3.8±2.8	7.4±6.5	7.3±6.1
回収成熟卵子数	2.0±2.2	4.1±4.7	4.1±3.9
精液量 (ml)	4.2±2.1	4.5±2.5	3.5±1.5
精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	56.0±50.9	53.9±47.0	32.9±32.7
精子運動率 (%)	36.6±16.2	41.9±17.4	37.1±20.0
総運動精子数 (×10 ⁶)	75.6±83.5	68.8±43.4	31.6×35.8

表3 精子調整法別の受精率の比較

	洗浄法	Percoll法	Percoll-Pentoxifylline法
受精率 (%)	13.2±27.5	25.2±38.9	38.8±36.8
	p<0.05		
総受精卵子数 ／総回収卵子数	9/69 (13%)	23/119 (19%)	54/131 (41%)
	p<0.01		
受精周期 ／治療周期	4/18 (22%)	5/16 (31%)	13/18 (72%)
	p<0.05		
	p<0.01		
妊娠	0	0	4

成 績

3種類の精子調整法別の回収卵子数と精液所見とを比較したのが表2で、無作為な症例選択にもかかわらず、洗浄法の回収卵子数が他の2法に比べてやや少なく、また精液所見ではpercoll-pentoxifylline法の総運動精子数が他の2法に比べてやや少ない結果となった。

回収卵子の受精についてpercoll-pentoxifylline法を他の2法と比較したのが表3である。各周期毎に受精卵子数を回収卵子数で除し、これを受精率とし各精子調整法別の受精率の平均について比較するとpercoll-pentoxifylline法では38.8±36.8%であり洗浄法の13.2±27.5%に比べて有意に高率であった。しかしながら洗浄法では回収卵子数が少なかったことから、次に精子調整方法別に総回収卵子に対する総受精卵子数の割合でみるとpercoll-pentoxifylline法は131個中54個(41%)で洗浄法の69個中9個(13%)、

percoll法の119個中23個(19%)に比べて有意に高い結果となった。さらに媒精後受精卵が得られ胚移植が可能であった周期の割合についてみるとpercoll-pentoxifylline法では18周期中13周期(72%)であり洗浄法の18周期中4周期(22%)、percoll法の16周期中5周期(31%)に比べ有意に高い結果となった。妊娠はpercoll-pentoxifylline法において4症例の成立が見られた。さらに精子調整法別に受精周期と非受精周期を精液所見により検討したのが図2である。洗浄法やpercoll法では精子運動率は低くても精子濃度の高い周期での受精が比較的多く確認される。これに比べpercoll-pentoxifylline法では精子運動率のみ低い8周期中7周期、精子濃度のみ低い4周期中3周期、精子濃度も低くかつ精子運動率の低い周期でも6周期中3周期に受精が認められており、全般に他の2法に比べて受精卵を得る確率が上昇している様子が窺える。また、さらに精液量も加味した総運動精子数について受精の成立を検討すると図3のように総

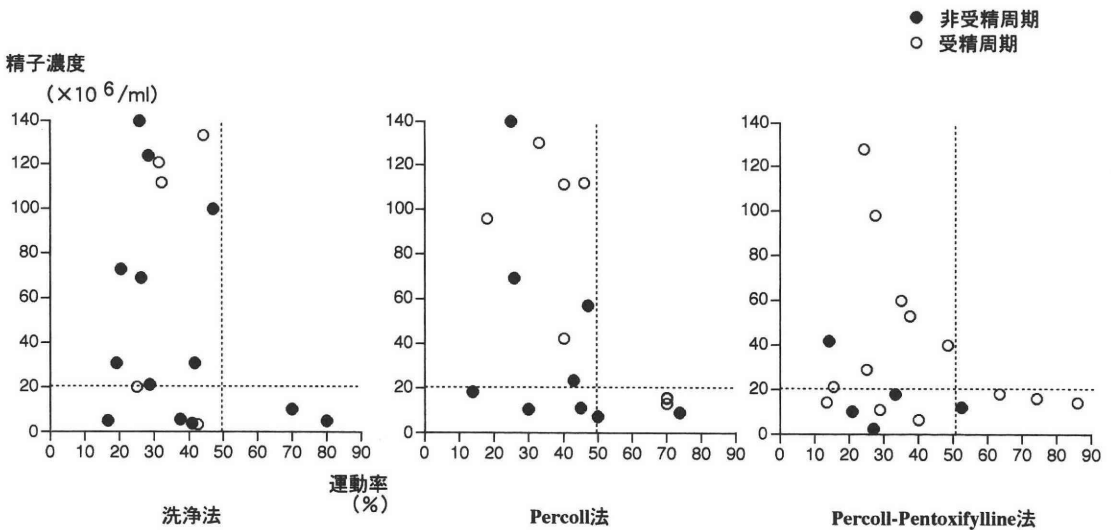


図 2 精子濃度，運動率と受精

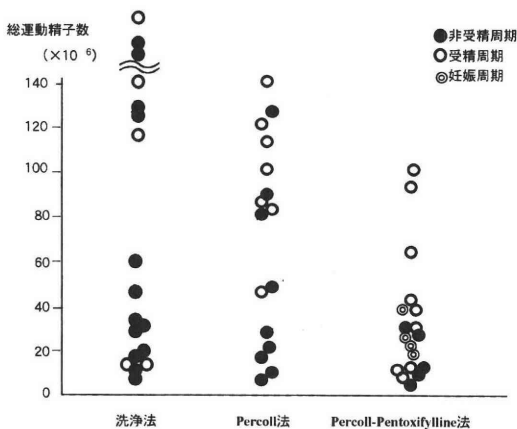


図 3 総運動精子数と受精

運動精子数が4000万未満では洗浄法で9周期中2周期(22%)，percoll法で5周期中0周期であるのに比べpercoll-pentoxifylline法では14周期中9周期(64%)で受精が確認され総運動精子数の少ない周期での受精率の改善が明かとなった。また妊娠に至ったpercoll-pentoxifylline法の4症例はこの総運動精子数4000万未満の周期で得られた。またpentoxifyllineの受精卵に対する影響を検討する目的で精子調整法別に移植時の胚の形態を表4に示した。全体の症例数は多くはないが，pentoxifylline使用群においても細胞の大きさが均一でfragmentationの無い良質な胚が分割胚27個中9個(30%)発生しており洗浄法の分割胚7個中1個(14.3%)，percoll法の9個中3個(30%)

と比較してpentoxifylline使用による特別な形態異常の発生頻度の上昇は認められなかった。

考 察

体外受精胚移植治療における精子調整に様々な方法が用いられているが，今回の精子濃度，精子運動率が不良である症例の体外受精胚移植法における精子調整法の検討では精子洗浄法とpercoll法との間に統計的に有為な差を得るまでには至らなかった。実際に精子調整を行うにあたっては洗浄法はpercoll法に比べて簡便であるが，percoll法はswim upをする際にpercoll層とmedium層との分離が明確であり上層の運動精子の回収が洗浄法に比べて極めて容易であるという利点を有する。受精率においてはpercoll法とpercoll-pentoxifylline法との間に有意差はないものの総回収卵子数に対する受精卵子数や受精卵の得られる周期の頻度で比較を行うとpercoll-pentoxifylline法は他の2法に比べて受精成績が良好であるとの結果が得られた。percoll-pentoxifylline法で受精卵が得られる割合は精子濃度のみ不良，精子運動率のみ不良，両因子とも不良のいずれの精液所見においても受精卵の得られる可能性が上昇していた。また妊娠に至った症例は4症例のうち1例は妊娠9週で流産に終わったが，のこり3症例は正期産で健常な生児を得ている。これら4症例の妊娠成立周期の総運動精子数は4000万未満であったことより，このような総運動精子数が少ない症例においてpentoxifyllineが有用と考えられる。精液所見の不良な妊娠症例に対

表 4 移植胚の形態

洗浄法 (n= 8)	2PN		
	4s	2a,f(+)	
	4a,f(+)	4a,f(+)	
	4s,f(+)	2a,f(+)	2a,f(++)
Percoll法 (n=12)	6a	8s	2a(+)
	4a,f(+)	4a,f(+)	
	2s	2a	
	4s	4a,f(+)	
	2PN	2PN	2PN
Percoll- pentoxifylline法 (n=28)	2PN		
	4a	5a	4s,f(+)
	4s	4s,f(+)	4s,f(+)
	4s		
	4a	2s,f(+)	3a,f(++)
	2s		
	○ 4s	4a,f(++)	4a,f(+++)
		2a,f(+++)	
	○ 4s	4s	8s
	4s		
	2s	3s	4s,f(+)
	○ 4a, f(+)	3a,f(++)	
	○ 4s, f(+)	2s,f(++)	

2PN : 2 pronuclear stage
s : 細胞の大きさが均一,
a : 細胞の大きさが不均一
f : fragmentationの程度 (+~+++)
○ : 胚移植後妊娠

するpentoxifyllineの経口投与の試みは比較的以前より行われ、その有効性が報告されている^{1,2)}。一方in vitroでpentoxifyllineを使用した精子処理を行った場合の精子に与える影響についての報告もみられ、精子のmotility³⁾や運動速度⁴⁾が改善するとされている。さらにはpentoxifyllineを臨床応用した精子調整法により体外受精胚移植⁵⁾やGIFT⁶⁾の成績の向上が報告されている。今回の我々の精液所見の不良な症例に対する体外受精胚移植法の治療成績からも精液所見不良例に対するpentoxifylline処理の受精に対する有効性が確認された。しかし受精成績の向上が精子の運動性の向上のみによるものか、acrosome reactionなどのレベルで作用するのかなどに関しては現在のところ

全く不明と言って良い。pentoxifyllineの精子に及ぼす生化学的な作用に関してはpentoxifyllineがXanthine誘導体でcAMPをAMPに変換するphosphodiesteraseのinhibitorであることから精子の細胞内のcAMPの上昇効果を介して精子の活動性に作用を及ぼしている可能性や、superoxideのような細胞膜の障害を起こす物質の産生を抑制する作用⁷⁾を介して働くことなどが推測されている。

極端に精液所見の不良である症例の治療に関しては日本においても顕微受精法が行われるようになりつつあるが、顕微受精法の精子処理過程にpentoxifyllineを応用した報告⁸⁾も見られ今後の詳細な検討とその有効性が期待される。

今回のpercoll-pentoxifylline法で得られた移植胚の形態観察では他の精子調整方法による移植胚の形態との間に差は認められず、分娩に至った児も現在順調に発育をとげており特に異常は認めていない。

以上より体外受精胚移植法を行うにあたって受精率の低さが問題となっている精液所見の不良症例に対して、精子調整過程にpentoxifyllineを使用することにより受精卵獲得の可能性が増し、治療成績が向上するものと考えられる。

文 献

1) Heite HJ, The effect of Trental on spermiographic parameters, a clinical study in patients with reduced fertility. Singapore Med J 20: 38, 1979
2) Aparicio NJ, Schwarzstein L, de-Turner EA, Pentoxifylline (B191) by oral administration in the treatment of asthenozoospermia. Andrologia 12: 228, 1980
3) de-Turner EA, Aparicio NJ, Turner D, et al., Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate, and a β -blocking agent on human sperm motility. Fertil Steril 29: 328, 1978
4) Rees JM, Ford WCL and Hull MGR, Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. J Reprod Fert 90: 147, 1990
5) Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, et al., Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage transfer (PROST) program for severe male factor infertility. Fertil Steril 50: 149, 1988
6) Sikka SC, and Hellstrom WJG, The Application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. J Androl 12: 165, 1991

- 7) Gavella M and Lipoac V, Pentoxifylline-mediated reduction of superoxide anion production by human spermatozoa. *Andrologia* 24: 37, 1992
- 8) Palermo G, Joris H, Devroey P, et al., Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. *Hum Repro* 7: 248, 1992

**Evaluation of sperm preparation
methods in in vitro fertilization
and embryo transfer for male infertility**

Katsuo Ikuta, Noritaka Suzuki, Masashi Suzuki,
Hideki Okada, Kiyotaka Kaida, Seiji Hanada
and Yoshiaki Yagami

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagoya City University Medical School,
Nagoya 467, Japan

Three sperm preparation methods in in vitro fertiliza-

tion and embryo transfer in male infertility were examined. In the first method, seminal fluid was centrifuged with human tubal fluid and motile sperm was collected by swim up technique. In the second, seminal fluid was centrifuged with 80 % percoll and motile sperm was collected by swim up technique. And in the third approach, sperm was collected in human tubal fluid layer containing pentoxifylline (1 mg/ml) after centrifugation with 80 % percoll. The ratios of total fertilized oocytes to total retrieved oocytes using simple swim up method, percoll method, and percoll-pentoxifylline method, were 9 out of 36 (13 %), 23 of 119 (19 %), and 54 of 131 (41 %), respectively. As for embryo obtained cycles compared with oocyte pick up cycles, the ratio with the percoll-pentoxifylline method was higher than with the other two methods. Four pregnancies were obtained from the percoll-pentoxifylline method. The percoll-pentoxifylline method was suggested to be useful for sperm preparation in in vitro fertilization and embryo transfer with male infertility.

(受付：1993年 1月21日)

(受理：1993年 6月18日)

体外受精におけるPentoxifyllineの使用経験

Pharmacological Stimulation by Pentoxifylline to Improve Fertilizing Capacity of Spermatozoa in IVF

秋田大学医学部産科婦人科学教室

児玉 英也

Hideya KODAMA

清水 靖

Yasuisi SHIMIZU

関根 和子

Kazuko SEKINE

福田 淳

Jun FUKUDA

ムラト タシュデミル

Murat TASDEMIR

小川 正樹

Masaki OGAWA

田中 俊誠

Toshinobu TANAKA

松井 俊彦

Toshihiko MATSUI

イシユク タシュデミル

Isik TASDEMIR

並木 龍一

Ryuuichi NAMIKI

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

Pentoxifyllineを用いて体外受精を行った男性不妊47症例64周期の体外受精の治療成績を検討した。精子は1 mg/mlのPentoxifylline溶液中に約45分incubateした後、直接媒精に使用した。治療周期の受精率は、周期当たり57.8% (37/64周期)、卵子当たり25.8% (132/511個)で、患者の過去のPentoxifyllineを使用しなかった体外受精周期の受精率と比較すると、有意な ($p<0.01$ および $p<0.001$) 改善が認められた。また、移植当たり43.2% (16/37) と良好な妊娠率が得られ、薬剤の受精環境への混入による受精卵の発育や着床に対する悪影響は認められなかった。Pentoxifyllineの有効例と無効例との間に、精子濃度、精子運動率、精子奇形率の差は認められなかった。以上より、Pentoxifyllineは、体外受精に使用する価値のある薬剤と考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 624 - 628, 1993)

緒言

体外受精の治療において、精子の受精能力低下を伴った男性不妊例は、治療に難渋する病態の一つである¹⁾。これまで精子の受精能力の改善の目的で様々な技術的試みがなされてきたが、その中で近年その有効性が確認されつつある技術に、精子の薬剤刺激²⁾と顕微授精³⁾がある。精子の薬剤刺激は、顕微授精が特殊な設備と技術的な習熟が必要な点に比較すると簡単に行えることから実用的な技術である。しかしこの技術は、まだ薬剤の安全性や使用法が確立されていないこと、薬剤の精子に対する本質的な

作用機序が解明されていないこと、薬剤刺激の有効な症例の選択等の問題を残している。また、実際にその体外受精における薬剤刺激の有効性を検討した報告^{4,5)}も少ない。当科ではこれまで、Pentoxifyllineによる薬剤刺激を導入してその有効性について検討を行ってきた。今回、これまでの臨床成績の分析を行ったので、報告する。

研究方法

1) 対象患者

1991年5月から1992年7月までの15カ月の期間に、Pentoxifyllineを用いて体外受精を行った男性不

妊47症例を対象とした。男性不妊の内訳は、乏精子症(精子濃度 20×10^6 /ml以下)12例, 精子無力症(精子運動率50%以下)16例, 両者の合併13例, 精液検査は正常だが過去の体外受精の治療で受精障害が認められ, その原因が精子にあると考えられる症例6例であった。女性の平均年齢は, 33.1 ± 4.0 歳(範囲28-44歳), 平均不妊期間は 6.5 ± 3.7 年(範囲1-15年)であった。

Pentoxifyllineは, 以前の体外受精の治療で, 受精が成立しなかったかまたは受精率(受精卵数/成熟卵数)が極めて低かった(20%未満)かのどちらかで, その原因が精子の受精能力低下に起因すると考えられる場合に使用した。

従って, 対象患者の多くは, 過去にPentoxifyllineを使用しないで体外受精の治療を受けたことのある患者であるが, 一部症例については, 精液性状が極めて不良で通常の体外受精では受精が困難と予測されたことから, 最初の体外受精の治療周期から使用した。

2) 体外受精の方法

当科で行っている体外受精のProtocolの詳細については以前に報告したが, ここで簡単に述べる。卵巣の刺激法としては, gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa, busarelin, Sprecur, Hoechst Japan) と human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, TeikokuzoukiまたはhMG, Nikken kagaku) の併用による long protocol を用い, 一部hMGに対する反応の不良な患者に対しては, Short protocol を用いた。GnRHa薬剤は, 経鼻的に一日900 μ gの投与量で, long protocolでは刺激前周期の黄体期中期から, short

protocolでは月経開始日から使用した。hMGは, 月経周期の2日目より一日150~300IUを患者の反応に合わせて連日投与し, 最大卵胞径が17-18mmに達した段階でhCG10,000 IUに切り替えた。採卵は, 経腔的に超音波断層法を用いて行い, 精液はswim-up法により回収して媒精した。配偶子の洗浄及び培養に用いる培養液には, 10%非働化患者血清を加えた human tubal fluid (HTF) 溶液を用い, 37 $^{\circ}$ C, 3種混合ガス(90%N₂, 5%CO₂, 5%O₂)の気相で培養した。媒精後約48時間後に子宮腔内に胚を最高4個まで移植した。移植当日(0), 3日目, 6日目にhCG 2,000IUによる黄体刺激を行い, 移植後17-19日目に尿のhCG検査(Testpak, Dinabot)で妊娠の有無を確認した。

3) Pentoxifyllineによる精子の薬剤刺激は, 図1に示す2つの方法を用いており, 比較的精子の回収が容易な症例ではMethod 1を, 精液性状が不良で運動精子の回収の比較的困難な症例にはMethod 2を用いた。Method 1では, 精液を10%非働化ヒト血清を加えたHTF溶液で2回遠心洗浄後, 我々の通常の体外受精のプログラムと同様に数百 μ lの溶液中にswim-up法にて運動精子を回収し, その溶液と等量の2mg/mlのPentoxifyllineを含む溶液を加えて約45分incubateした。その後, 10-50万個の精子を含む10-50 μ lの溶液で, 最終精子濃度を 2×10^5 /mlとなるように2mlのinsemination medium中に媒精した。Method 2では, 2回目の精液の洗浄遠心が終了後, 沈渣上の約50 μ lの上清を残して上清を除去し, 次いで残した上清とほぼ等量の2mg/mlのPentoxifylline溶液を静かに加えて僅かに攪拌した後約45分incubateし, この上清中の精子を回収して媒精した。この方法では, 非運

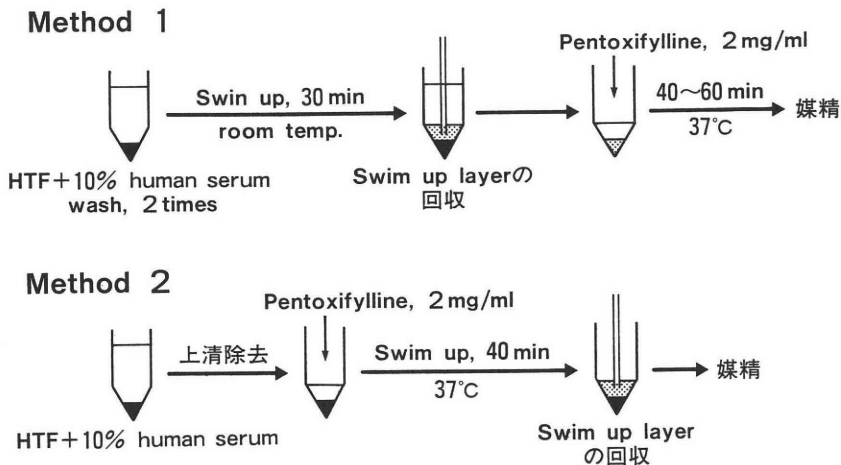


図1 Pentoxifyllineの使用方法

動精子の混入率が高くなるが、運動精子の量的な回収率ではMethod 1より優れている。

PentoxifyllineはSigma社のものを使用し、薬剤刺激時にHTF溶液中に溶解して作製した。

結 果

1) Pentoxifylline使用周期の治療成績47症例に対し、Pentoxifyllineを使用した体外受精が64周期行われた。その治療周期の平均採卵数は 8.0 ± 4.4 個であった。治療周期の平均精子濃度は $25.5 \pm 17.7 \times 10^6$ / ml, 平均精子運動率は 45.3 ± 20.4 %であった。受精成立例の最低精子濃度は 3.6×10^6 個 / ml, 最低精子運動率は10 %, 最低運動精子濃度は 1.5×10^6 個 / mlであった。受精は、37周期、合計132個の卵子に成立し、周期当たりの受精率は57.8 % (37/64), 卵子当たりの受精率は25.8 % (132/511)であった。37周期に平均 2.0 ± 2.5 個の胚が移植され、16例の妊娠が得られた。妊娠率は採卵当たり25.0 % (16/64), 移植当たり43.2 % (16/37)であった。妊娠の内訳は、単胎妊娠9例、双胎妊娠4例、稽留流産1例、子宮外妊娠2例であった。

2) Pentoxifylline使用による受精率改善の検討。

過去にPentoxifyllineを使用しないで体外受精の治療を受けた経験のある患者33例の、Pentoxifyllineを使用しなかった体外受精周期52周期と使用した体外

受精周期47周期との受精率の比較を表1に示す。

Pentoxifylline使用周期の受精率は使用しない周期と比較して、周期当たりの受精率で26.9 % (15/52周期) から59.6 % (28/47周期)へ、卵子当たりの受精率で8.5 % (35/412個) から28.4 % (107/377)へ、それぞれ1.0 %以下または0.1 %以下の危険率で有意な改善が認められた。個々の症例に注目してみると、Pentoxifyllineの使用により初めて受精の成立が認められたか著しく受精率が改善した有効例が18例、Pentoxifyllineを使用しても受精の成立が認められなかった無効症例が14例存在した。

3) Pentoxifylline有効性と精液検査所見。

Pentoxifylline有効群18例と、無効群14例について、精液検査所見を比較して表2に示す。精子濃度、運動率はMaklarの精子算定盤で算定し、精子奇形率は塗抹標本によりPapanicolaou染色で観察し算定し、精子奇形率は塗抹標本によりPapanicolaou染色で観察し算定した。精子濃度、精子運動率、精子奇形率について、両群間に有意な差は認められなかった。

考 察

体外受精の治療において精子の薬剤刺激が受精率を改善する可能性は以前より考えられていた²⁾が、実際にその有効性が臨床的に認識されだしたのは比較的最近のことである。Pentoxifyllineの体外受精に

表1 体外受精患者(33例)の、通常の媒精周期とPentoxifylline刺激精子での媒精周期の受精率の比較

	通常の媒精	Pentoxifylline刺激
周期数	52	47
周期当たりの受精率*	14/52周期 (26.9%)	28/47周期 (59.6%)
卵子当たりの受精率**	35/412個 (8.5%)	107/377個 (28.4%)

*p<0.01, ** P<0.001

表2 Pentoxifyllineの有効例および無効例の精液検査成績の比較

	Pentoxifylline有効例	Pentoxifylline無効例
症例数	18	14
精子濃度 ($\times 10^6$ /ml)*	23.8 ± 18.4	29.4 ± 22.5
精子運動率 (%)*	40.2 ± 19.0	41.3 ± 20.1
精子奇形率 (%)*	51.5 ± 10.6	51.0 ± 20.1

*n. s.

に対する臨床応用は、Yovich, J. M. et al. が1989年に Preliminaryな成績を報告⁴⁾し、さらに1991年に彼女らのcontrol studyの成績が報告⁵⁾され、その有効性が広く知られるようになった。我々も最初は半信半疑でこの治療法を導入したのであるが、現在では受精障害が予測される例についてはroutineに試みるようになってきている。今回我々が集計した成績でも、完全なcontrol studyでは無いものの、Pentoxifyllineの使用によって従来の受精率が改善していることが示されている。

これまでPentoxifyllineを使用する場合の技術的な問題点が、いくつか指摘されている。Yovich, J. M. et al. ⁴⁾は、当初Pentoxifyllineで処理した精子から薬剤を取り除いた後にswim-up法で回収して媒精していたが効果が認められず、Pentoxifyllineを取り除いてから時間をかけずに精子を回収して媒精するようにprotocolを変更したところ、臨床的效果が認められたと報告している。

また彼女らはPentoxifyllineの薬剤効果が期待できる時間に限度があり、薬剤で刺激してから媒精するまでの時間を1時間以下とすることが重要であると述べている。我々は、簡便にPentoxifyllineで処理した精子をそのまま薬剤を取り除かずに媒精に使用している。その場合薬剤は、精子の刺激に用いた濃度から数十倍から数百倍に希釈されるもののinsemination mediumに混入することになる。実は、当初我々も薬剤を取り除いてから媒精していたのであるが、その方法で明確な効果が認められなかった。たまたま、今回述べたような方法にしたところ効果が認められたので、その方法が定着して今日に至ったという経緯がある。薬剤がinsemination mediumに混入することで、薬剤が卵子の成熟⁷⁾や受精卵の発育を障害したりして体外受精の成績を低下させないか、また薬剤処置が染色体異常等の先天異常の頻度を増加することはないかといった問題がある。しかし、今回の成績では良好な胚の発育と着床率が得られており、今回我々が用いた濃度では、薬剤が胚の着床や初期発生に対して悪影響を及ぼす可能性は低いものと考えられる。また、少なくともこれまでの我々の経験や報告⁹⁾からは、精子の薬剤刺激が胎児の奇形の頻度を増加する可能性は認められていない。ハムスター試験においてcaffeineを添加する場合、精子に単独に用いるより受精環境に直接加えた方が成績が改善するとの報告⁸⁾もあり、insemination mediumに直接薬剤を投与すれば最も有効な薬剤効果が得られる可能性がある。しかしその

場合、卵子はさらに高濃度の薬剤に暴露されることになり、今後の慎重な検討が必要である。

さて、臨床的に重要な問題の一つに、薬剤刺激が有効と考えられる症例をいかにして選択するかという問題がある。今回の検討では、運動精子濃度が百万個/ml以下の極端に重症な男性不妊症例にPentoxifylline有効例は無く、それ以上の運動精子が得られた男性不妊例の約半数に効果が認められている。しかし、効果の認められた症例と認められなかった症例とでは、精液検査成績に有意な差を認めず、一般的な精液検査成績からPentoxifyllineが有効な患者を選択することは困難と考えられる。Pentoxifyllineは、phosphodiesteraseのinhibitorでcyclic AMPの分解の抑制により細胞内にcyclic AMPを蓄積する作用を有している。

細胞内cyclic AMPの上昇により精子の運動能力促進⁹⁾することが報告されており、当初Pentoxifyllineは、精子の運動性を改善することによって受精率の改善を促すと考えられていた^{4,5,10)}。しかし、最近の報告ではPentoxifyllineが精子の運動性を改善とする報告¹¹⁾と、必ずしも改善しないとする報告¹²⁾があり、実際に精子の運動促進作用がPentoxifyllineの受精率改善作用に関与しているかどうかは明らかでない。近年、男性不妊の受精障害の原因の一つに、先体反応の誘起障害がある可能性が示唆され^{13,14)}注目されている。先体反応の誘起にcyclic AMP-protein kinase Aを介する系が存在することが指摘されており¹⁵⁾、Pentoxifyllineにより先体反応の誘起過程が修飾される可能性が考えられる。我々は、PentoxifyllineがCa inophoreによる精子の先体反応の誘起作用を増強すること、この作用がPentoxifyllineの有効例に特異的に観察されることを報告¹⁶⁾している。従って、先体反応誘起試験を用いることによって、男性不妊症例から薬剤刺激の有効例を選択することが可能ではないかと考えている。

精子の薬剤刺激にはPentoxifyllineと類似の生物作用を有する2'-deoxyadenosinも報告されており、Pentoxifyllineとの併用療法¹⁷⁾も行われている。今回の検討では、Pentoxifyllineには過去の報告を裏づける臨床効果が認められており、今後も使用する価値のある薬剤であると考えられる。

文 献

- 1) Yovich JL and Stanger JD, The limitation of in vitro fertilization from males with severe oligospermia and abnormal sperm morphology. J

- In Vitro Fert Embryo Transfer 1 : 172, 1984
- 2) Burkman LJ, Experimental approaches to evaluation and enhancement of sperm function, In: Jones HD, Jones GS, Hodgen GD, and Rosenwaks Z, eds, In vitro fertilization. P201, Williams & Wilkins, 1986
 - 3) Palermo G, Joris H, and Van Steirteghem AC, Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. Hum Reprod 7: 248, 1992
 - 4) Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, et al., Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. Fertil Steril 50: 179, 1988
 - 5) Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, et al., Influence of pentoxifylline in severe male infertility, Fertil Steril 53: 715, 1990
 - 6) Kodama H, Kato M, Sekine K, et al., Efficacy of a gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for in vitro fertilization. Jpn J Fertil Steril 36: 389, 1991
 - 7) Downs SM, Daniel SAJ, Bornslaeger EA, et al., Maintenance of meiotic arrest mouse oocytes by purins: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. Gamete Res 23: 323, 1989
 - 8) Cai X and Marik JJ, Improving penetrating capacity of spermatozoa with poor motility by addition of caffeine at incubation with zona-free hamster ova. Fertil Steril 51: 719, 1989
 - 9) Tash JS, and Means AR, Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. Biol Reprod 28: 75, 1983
 - 10) Aparicio NJ, Turner EA, Schwarzstein L, et al., Effect of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline on human sperm motility. Andrologia 12: 49, 1979
 - 11) Tesarik J, Thebault and Testart J, Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. Hum Reprod 7: 1257, 1992
 - 12) Pang SG, Williams DB, Huang T, et al., Objective assessment of the in vitro effects of pentoxifylline on sperm motility, velocity, linearity and hyperactivation. Abstract of 47th Annual Meeting of American Fertility Society S99, 1991
 - 13) Plachot M, Mandelbaum J and AM, Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. Fertil Steril 42: 418, 1984
 - 14) Fenichel P, Basteris B, Donzeau M, et al., Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. Fertil Steril 55: 994, 1991
 - 15) De Jonge CJ, Han H-L, Mack SR, et al., Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate/cyclic AMP second messenger pathway. J Exp Zool 258: 113, 1991
 - 16) Tasdemir M, 児玉英也, 福田淳 他, Acrosome reaction induced testによるcapacitation促進効果の分析 (演題IV-9). 日不妊会誌 37: 786, 1992
 - 17) Yates CA, Trounson AO, and de Kretser DM, The stimulation of sperm motility by pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine. (abstr) Presented at the 5th Scientific Meeting of the Fertility Society of Australia Adelaide, 39: 1986

Pharmacological stimulation by pentoxifylline to improve fertilizing capacity of spermatozoa in IVF

Hideya Kodama, Jun Fukuda, Toshihiko Matsui,
Yasusi Shimizu, Murat Tasdemir, Isik Tasdemir,
Kazuko Sekine, Masaki Ogawa, Ryuichi Namiki
and Toshinobu Tanaka

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

We evaluated outcome of in vitro fertilization (IVF) treatment with pharmacological stimulation of spermatozoa by pentoxifylline in 64 cycles of 47 male infertile patients. Spermatozoa were incubated with medium containing 1 mg/ml of pentoxifylline for 45 minutes, and directly inseminated. Fertilization was achieved in 57.8 % (37/64) of treated cycles and 25.8 % (132/511) of total recovered oocytes, and these number were significantly higher ($p < 0.01$ and 0.001) than those in the previous IVF cycles of same patients treated without pentoxifylline. Pregnancy rate was 43.2 % (16/37) per transfer, and contamination of small amounts of pentoxifylline showed no detrimental effect on the development of embryos and implantation. There were no significant differences in semen parameters between the patient in which pentoxifylline had been effective, and ineffective. Pentoxifylline seems to be a useful drug to improve the result of IVF in male infertility.

(受付: 1993年 3月11日)

(受理: 1993年 6月18日)

THE SIGNIFICANCE OF LUTEAL SUPPORT FOR IN VITRO FERTILIZATION AND EMBRYO TRANSFER PATIENTS.

Osamu ISHIHARA, Junko TAYA, Yoshiaki IINO
Masahiro SAITOH and Katsuyuki KINOSHITA

Department of Obstetrics and Gynaecology, Saitama Medical Centre,
Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

Abstract: To investigate the efficacy of luteal support in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) patients using gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a), serum progesterone (P), estradiol (E₂), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) were measured at several points in all cycles of IVF-ET cases of forty patients during 1991 in our department. Sixteen out of 29 cases who received P and human chorionic gonadotropin (hCG) supplement as luteal support became pregnant and 9 cases had on-going pregnancy, whereas, 11 patients who received only hCG resulted in unsuccessful. Low LH level <1.3 mIU/mL at the time of hCG injection was necessary to achieve pregnancy, in contrast, P level was not a good indicator for predicting IVF outcome. Both P and E₂ levels climbed up at day 10 after IVF in successful cases, whereas unsuccessful cases showed low P and E₂ not only in cases without P supplement but in P supplemented cycles as well. The addition of P to hCG administration may have a role for successful IVF-ET despite no significant increase of serum P levels.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 629 - 634, 1993)

Introduction

The efficacy of luteal support in cases of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) is still controversial¹⁻⁴⁾, since serum progesterone (P) levels could be affected by many parameters during the cycles such as methods of ovulation induction, numbers of oocytes retrieved or methods of luteal support. Many authors have agreed on the fact that luteal support is necessary in cases using a gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a)^{5,6)}, however, the optimal luteal phase support is still under discussion despite wide usage of this kind of drugs⁷⁾. Recent papers showed human chorionic gonadotropin (hCG) supplement provided clearly better profiles of serum P levels during luteal phase, though in failed IVF-ET cycles, than P supplement⁸⁾. In this paper, we compared gonadotropins and steroids levels in IVF-ET patients in order to establish an efficient method of

luteal support in our department with using practical luteal monitoring.

Materials and Methods

Selection and Treatment of Patients

Forty patients out of fortythree who had undergone IVF-ET in our department during 1991 were recruited for this study. We could not obtain fertilized eggs in three cases excluded. The average of patients was 32.5 ± 4.3 years at the time of IVF-ET and mean infertile period was 4.6 ± 2.5 years. All these cases had at least one of these problems, i.e. tubal obstruction, endometriosis, oligospermia or unexplained infertility refractory to treatments over two years. After pituitary suppression using GnRH-a buserelin (Suprecur, Hechst Japan, Tokyo) for two weeks, follicular stimulation was carried out by 225 to 300 IU of FSH (Fertinom-P, Serono Japan, Tokyo) on day 1 to 3 followed by 150 to 300 IU of

human menopausal gonadotropin (hMG) (Humegon, Sankyo-Organon, Tokyo) after day 4. The dose and duration of hMG injection was determined by individual response of follicular growth, however, 10,000 IU human chorionic gonadotropin (HCG, Mochida, Tokyo) was given to induce follicular maturation when there were at least two follicles >18 mm in diameter.

Oocytes were recovered by transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles between 34 and 36 hours after hCG administration and incubated 6 hours prior to insemination. One to five embryos were transferred 46 to 50 hours after insemination. As luteal support, eleven successive cases between February to May received 3000 IU of hCG on day 3, 7 and 10 after ET and others received intramuscular P (50 mg) every day with additional injection of 1000 IU of hCG on day 3, 7 and 10. These two groups were not matched control group but there was no significant difference in parameters, i.e. ages, causes of infertility, numbers of transferred embryos.

Hormones Measurement

All patients were investigated by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) test and thyrotropin-

releasing hormone (TRH) test at early follicular phase of nonstimulated cycles prior to IVF-ET. During the IVF cycle, hormones such as luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), estradiol (E₂) and P were checked on day 1 and 7 of follicular phase, at the times of hCG injection and oocyte recovery, and day 3 and 10 after IVF as well. The hormone assays were done by using commercially available specific radioimmunoassay kits, i.e. Spac-S LH kit (Dai-ichi radioisotope Lab, Tokyo), Spac-S FSH kit (Dai-ichi radioisotope Lab, Tokyo), E₂ RIA kit (Dai-ichi radioisotope Lab, Tokyo) and Pregesterone RIA kit (Japan DPC Co., Tokyo). Pregnancy was diagnosed by ultrasonographic detection of gestational sac and urinary hCG titration by Higonavis (Mochida, Tokyo). So-called chemical pregnancy indicating slight elevation of urinary hCG titer was not regarded as pregnancy in this study. Data were statistically analysed by t-test.

Results

Sixteen out of 40 patients who received embryonal transfer succeeded in pregnancy diagnosed by detection of gestational sac and elevated urinary hCG. All these successful cases received P as luteal support,

Table 1 Basal hormonal backgrounds of four groups of patients at early follicular phase without treatment*

	A † (n=9)	B ‡ (n=5)	C §§ (n=13)	D (n=11)	Probability
early follicular					
LH (mIU/mL)	4.1 ± 5.2	2.0 ± 1.1 ¶	4.5 ± 2.2	5.2 ± 2.1 ¶	p<0.01
FSH (mIU/mL)	5.3 ± 1.4	8.5 ± 1.4	9.2 ± 8.8	10.9 ± 9.8	NS
LH/FSH	0.66 ± 0.77	0.21 ± 0.17 ¶	0.51 ± 0.36	0.55 ± 0.19 ¶	p<0.01
age (years old)	31.1 ± 2.8	29.7 ± 2.5	34.3 ± 3.7	34.4 ± 4.4	NS
eggs retrieved	5.2 ± 2.0	7.4 ± 2.3	5.9 ± 3.7	5.2 ± 2.4	NS
eggs transfered	3.5 ± 1.6	3.5 ± 1.5	2.9 ± 1.6	3.3 ± 1.6	NS

* Values are mean ± SD.

† A, on-going pregnancy.

‡ B, spontaneous abortion.

§§ C, unsuccessful cases administered with P as luteal support.

|| D, unsuccessful cases without P supplement.

¶ LH and LH/FSH of group B were significantly lower than group D.

NS, not statistically significant, t-test P>0.05.

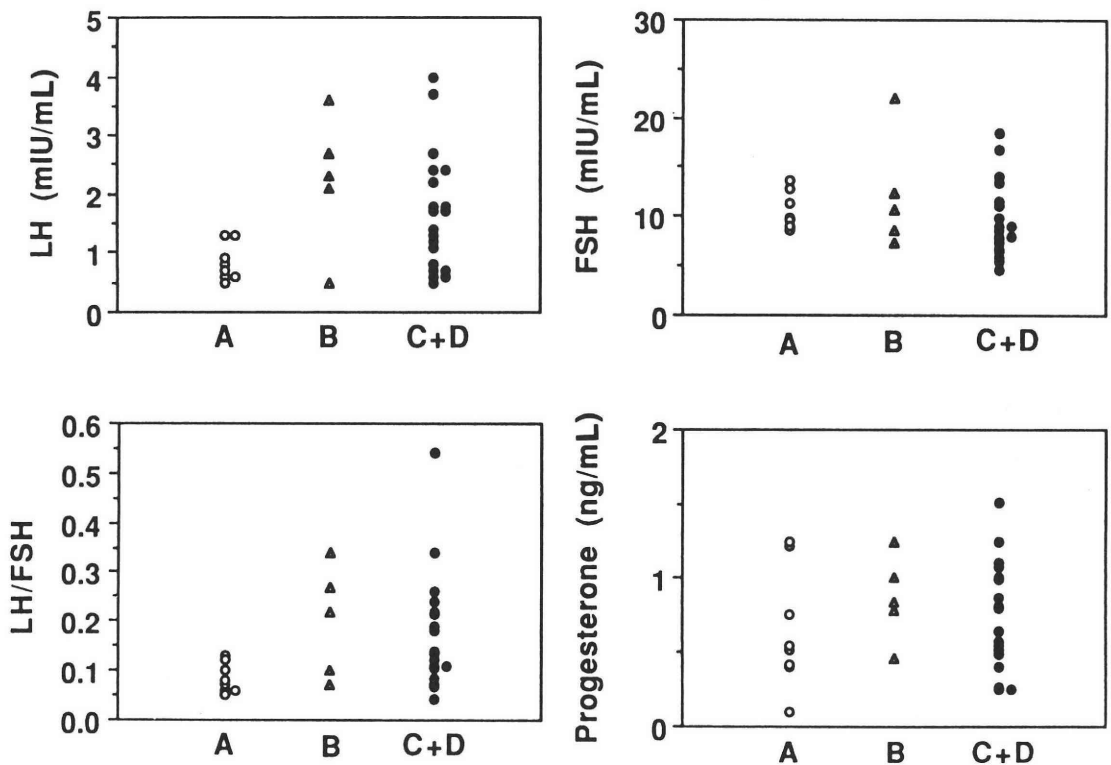


Fig. 1 The serum levels of LH, FSH, P concentration and LH/FSH ratio at the time of hCG injection.
A: on-going pregnancy, B: spontaneous abortion, C+D: unsuccessful cases.

whereas, none of eleven patients who received only hCG as luteal support became pregnant. Although five patients resulted in missed abortion without detected fetal heart beat and two cases of ectopic pregnancy, nine cases succeeded in on-going pregnancy including two cases of twin pregnancy.

In order to compare the efficacy of luteal support, the forty cases were divided into four groups, i.e. group A: on-going pregnancy (9 cases), B: spontaneous abortion (5 cases), C: unsuccessful cases who received P and hCG as luteal support (13 cases), D: unsuccessful cases who received only hCG as luteal support (11 cases). Two cases of ectopic pregnancy are not included in this comparative study. The backgrounds and the results of IVF-ET of these four groups of patients are shown in Table 1, which indicates that successful cases shared relatively lower FSH levels and younger ages but not significant to group C and D. Between these four groups, in addition, there was no significant difference of the number of retrieved oocytes nor that of transferred embryo as well.

At the point of hCG injection, FSH and P levels showed no significant difference between group A, B and C+D (Fig. 1). While E_2 levels were very variable between patients due to the difference of the number of follicles (data not shown), the patients who have LH levels higher than 1.3 mIU/mL failed in pregnancy (the average LH in successful cases was 0.89 ± 0.41 mIU/mL). The extent of P rise between hCG injection and follicle puncture, however, was larger in pregnant cycles (group A) (13.6 ± 6.8) compared with that of group B, C and D (10.1 ± 5.4 , 7.7 ± 3.0 , 7.5 ± 2.7 respectively), although there was no significance because of large standard deviation.

Steroids measurements just prior to oocyte recovery presented no differences in four groups as shown in Figure 2, though a few cases presented high E_2 and P due to hyperstimulation. In contrast, hormonal assessment during luteal phase revealed that both E_2 and P levels came up in parallel throughout luteal phase in successful cases (group A) (Fig. 3), while unsuccessful cases without P supplement (group D)

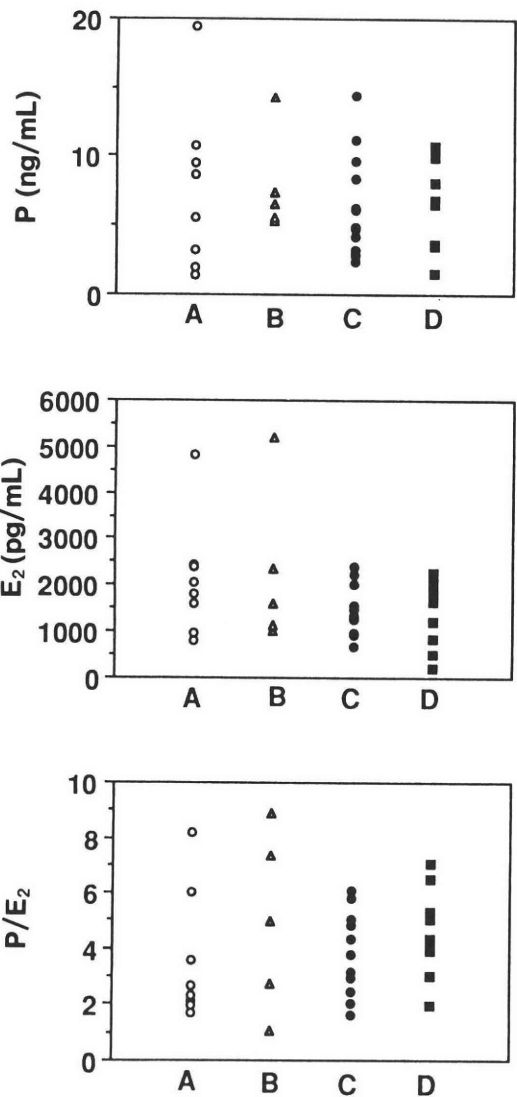


Fig. 2 The serum levels of P and E₂ concentration and P/E₂ ratio at the time of oocyte retrieval. A: on going pregnancy, B: spontaneous abortion, C: unsuccessful cases administered with P and hCG as luteal support, D: unsuccessful cases without P supplement (hCG only).

indicated significantly low P values which coincided with low E₂ levels. Group C also showed low P and E₂ at day 10 of luteal phase despite the supplement of P.

Discussion

It is widely accepted that the introduction of GnRH-a in controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET

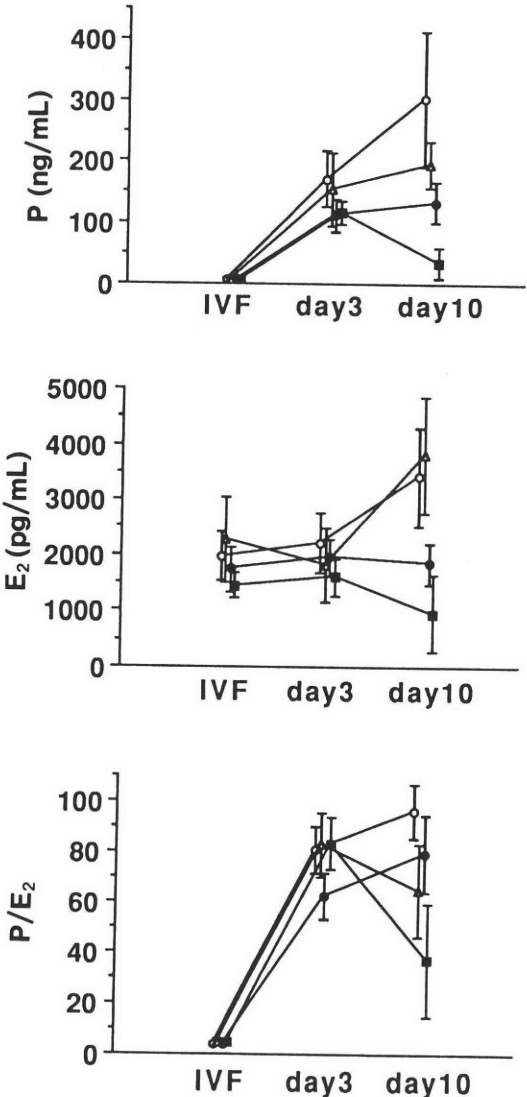


Fig. 3 Profiles of P and E₂ concentration and P/E₂ during the luteal phase of IVF-ET cycles (mean $\pm$ SEM). A (o): on-going pregnancy, B (Δ): spontaneous abortion, C ($\bullet$): unsuccessful cases administered with P and hCG as luteal support, D ($\blacksquare$): unsuccessful cases without P supplement (hCG only). On day 10, Plevel of group D is significantly lower than A and B as well as E₂ level of group D compared with A and B ($p > 0.01$), but no significant differences between four groups by day 3 ($p < 0.05$).

was the innovative approach to obtain higher pregnancy rate⁴⁾. In this connection, the luteal support

has been considered to be essential in IVF cycles¹⁰⁾. Though many groups have extensively investigated luteal phase with regard to luteal support and luteal monitoring to achieve better results of ET, average "take a baby home rate" has been still unsatisfactory.

Therefore, in an attempt to establish an applicable method of luteal support and luteal monitoring, this study was undertaken.

The fact that the patients who showed high LH levels at the time of hCG injection would rarely have satisfactory results, is partly because of premature luteinization occurring prior to hCG in cases using GnRH-a. Contrary to several recent studies¹¹⁾, P concentrations prior to hCG administration was not critical for successful IVF-ET. However, the successful cases showed better luteal function in response to hCG administration before oocyte collection. These two parameters must be evaluated to foresee the outcome of IVF-ET.

Only hCG for luteal support in eleven cases resulted in unsuccessful. It might be partly due to excessive E₂ concentrations stimulated by hCG to induce luteal phase defect. The high P value is important in that endogenous P secretion increased affects the fates of fertilized eggs. On the contrary, exogenous P administration seems unlikely to increase P levels in circulating blood, since the steroids level up to day 3 were not different in all four groups regardless of P supplement. In this sense, the effect of luteal support with P implicated a possible direct effect of P on local microenvironment before implantation¹²⁾. It might be argued that hCG is unnecessary in the cases supplemented with progesterone, however, we used relatively small amount of hCG injection with P, considering possible persistent suppressive effect of GnRH-a on endogenous LH during luteal phase, in order to prevent fetal wastages caused by luteal insufficiency.

P/E₂ ratio is more informative at midluteal phase in IVF-ET cycles, considering the number of follicles in comparison with only P value^{13,14)}. The decrease of P/E₂ in luteal phase, for instance, implies the hopeless outcome of IVF-ET. The early abortion often occurred with a sign of luteal phase defect as reported before¹⁵⁾. In the decades of conventional

treatment of infertility (before introducing IVF-ET), a part of luteal phase defect patient could be explained by the quality of ovulated oocytes which evolved the ovulation induction in patients with luteal phase defect as a effective treatment of luteal phase defect. Contrary to this, the optimized conditions to obtain good embryos in IVF-ET cycle means, in that sense, that luteal phase defect might be treated during luteal phase more effectively in these cases.

This study suggested that frequent P measurement after ET is unnecessary to know luteal function and to predict consequence of ET, but P assay between hCG administration and oocyte retrieval in conjunction with LH measurement is useful for predicting result of IVF-ET with reasonable costs and practical sampling schedule.

In summary, P supplement during luteal phase was necessary for IVF-ET patients which could not be compensated hCG administration. The circulating P level suggested that P supplement does not affect the level of circulating concentration but local environment of implantation.

References

- 1) Huang KE, Muechler EK, Schwarz KR, et al., Serum progesterone levels in women treated with human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46: 903, 1986
- 2) Hutchinson-Williams KA, Diamond MP, DeCherney AH, et al., Luteal rescue in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 53: 495, 1990
- 3) Shamma FN, DeCherney AH, Penzias AS, et al., Corpus luteum function in successful in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 57: 1107, 1992
- 4) Li TC, Cooke ID, Evaluation of luteal phase. *Hum Reprod* 6: 484, 1991
- 5) Urbancsek J, Rabe T, Grunwald K, et al., Analysis of hormonal changes during combined buserelin/HMG treatment. *Hum Reprod* 5: 675, 1990
- 6) Buvat J, Herbaut JC, Marcolin G, et al., Luteal support after luteinizing hormone-releasing hormone agonist for in vitro fertilization: superiority of human chorionic gonadotropin over oral progesterone. *Fertil Steril* 53: 490, 1990
- 7) Hassiakos D, Toner JP, Muasher SJ, et al., Implantation and pregnancy rates in relation to oestradiol and progesterone profiles in cycles with and without the use of gonadotrophin-releasing hormone agonists sup-

- pression. Hum Reprod 5: 1004, 1990
- 8) Nikkanen V, Kresanov I, Makinen J, et al., The effect of luteal support with human chorionic gonadotrophin or progesterone on the daily progesterone profile after different types of ovarian stimulation. Hum Reprod 7: 333, 1992
- 9) Loumaye E, The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 5: 357, 1990
- 10) Ben-Nun I, Jaffe R, Fejgin MD, et al., Therapeutic maturation of endometrium in in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 57:953, 1992
- 11) Check JH, Chase JS, Nowroozi K, et al., Premature luteinization: treatment and incidence in natural cycles. Hum Reprod 6: 190, 1991
- 12) Ben-Nun I, Siegal A, Ghetler Y, et al., Effect of preovulatory progesterone administration on the endometrial maturation and implantation rate after in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 53: 276, 1990
- 13) Gidley-Baird AA, O'Neill C, Sinosich MJ, et al., Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: the effects of altered progesterone/estrogen ratios in humans and mice. Fertil Steril 45: 69, 1986
- 14) Smitz J, Devroey P, Faguer B, et al., A prospective randomized comparison of intramuscular or intravaginal natural progesterone as a luteal phase and early pregnancy supplement. Hum Reprod 7: 168, 1992
- 15) Daya S, Ward S, Burrows E, Progesterone profiles in luteal defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol 158: 225, 1988

IVF-ET時のluteal supportと 黄体ホルモン測定の意義

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

石原 理 田谷順子 飯野好明
齊藤正博 木下勝之

当科における1991年のIVF-ET症例40例において、GnRHアゴニスト-hMG-hCGによる排卵誘発後、luteal supportとして、hCGを11例に、またhCGおよびプロゲステロン (P) を29例に投与した。併用群では16例が妊娠し 9 例が分娩に至ったのに対し、hCG単独では 1 例も妊娠が見られなかった。hCG投与時のP値は予後と関連せず、妊娠例では、IVF後10日のPおよびエストラジオールが高値を示した。さらに血中Pの値は、P投与の有無とは無関係であり、IVF-ETの成功例に於いて、P投与は血中Pの上昇を示さなくとも、着床局所の微小環境に影響を与えている可能性が示唆された。

(受付：1993年 3月15日)

(受理：1993年 6月18日)

体外受精—胚移植の採卵術におけるケタミン麻酔 —臨床的および基礎的検討—

A Clinical and Embryological Study of the Ketamine Anesthesia for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer

長崎大学医学部産科婦人科学教室

(主任：山邊 徹教授)

重 松 潤

Jun SHIGEMATSU

Department of Obstetrics and Gynecology,

Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852, Japan

体外受精—胚移植の採卵術に際してケタミン麻酔を行い、臨床的有用性を検討した。またケタミンがマウス受精卵に及ぼす影響についても検討した。そして以下の所見を得た。

- 1) 呼吸および循環系は安定していた。
- 2) ケタミンにジアゼパムおよびドロペリドールを加えたバランス麻酔は、ケタミン単独麻酔よりも副作用の頻度は低く、また程度も軽かった。
- 3) ケタミンは静脈内投与6分後に卵胞液中に移行していた。
- 4) ケタミンの最高卵胞液中濃度は $0.182 \mu\text{g/ml}$ であった。
- 5) マウス受精卵への影響は、ケタミン濃度が $2 \mu\text{g/ml}$ の培養液中でも認められなかった。

以上の結果から、ケタミン麻酔は、原則として気管内挿管を行わない採卵術の際に有用であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 635 - 641, 1993)

緒 言

体外受精—胚移植の採卵術は、当初、腹腔鏡下で行う経腹的採卵術であった。その後、超音波断層法の発達に伴って経腔的採卵術が主流となった。そのため、気腹の必要がなくなり、さらに手術時間が短縮し手術侵襲も大幅に減少した。すなわち、経腔的採卵術では、ダグラス窩および卵巣の穿刺のみが主な侵襲となった。そして入院を必要とせず、外来レベルで施行されることが多くなった。採卵術における麻酔も、術式に合わせて気管内挿管を伴う全身麻酔から静脈麻酔や局所麻酔へと変化した。そして安全でしかも覚醒の速やかな麻酔が求められるようになった。一方、卵へ及ぼす麻酔薬の影響については

報告が少なく、不明な点が多い。

そこで、経腔的採卵術の麻酔法として、呼吸や循環系に与える影響の少ないケタミン麻酔を選択し、その有用性を臨床的に検討した。さらに、ケタミンの卵へ及ぼす影響について、マウス受精卵を用いた基礎的検討も行った。

対 象

体外受精—胚移植を目的として、1989年から1992年に長崎大学産婦人科でケタミン麻酔下に経腔的採卵術を受けた111例を対象とした。ASA (American Society of Anesthesia) 分類によるphysical statusは全例がIであった。年齢は 33.5 ± 3.8 (27~40) 歳、体重は 53.2 ± 7.1 (41~70) Kg、身長は 156.1 ± 3.7 (149~166)

cmであった。そのうちの5例に対して、卵胞液中のケタミン濃度を、またそのうちの3例について、血中のケタミン濃度を測定した。

方 法

1. 麻酔法

95例については、ケタミンにディアゼパムおよびドロペリドールを加えたバランス麻酔を行い(バランス麻酔群)、16例に対しては、ケタミン単独で麻酔を行った(ケタミン単独群)。採卵術は午前中に行い、患者は前日の夕食以後は絶食とし、深夜0時以後は絶飲とした。そして採卵術室へ入室後、5%ブドウ糖液で静脈ルートを確保し、アトロピンを0.005 mg/Kg静注した。バランス麻酔群では採卵術開始10分前に、ディアゼパムを意識が消失するまで5 mg単位で静注し、その後、ドロペリドールを0.15 mg/Kg静注した。そして採卵術開始3分前にケタミンを0.6 mg/Kg静注した。ケタミンの追加は1回につき0.2~0.4 mg/Kgとし、採卵術が始まる前には腔腔洗浄時に体動を認めたり、疼痛を訴えたりした場合、また採卵術中では疼痛を訴えたり、体動や苦悶状顔貌を呈した場合に追加静注した。ケタミン単独群では初回投与量、追加投与量および追加投与の基準はバランス麻酔群と同様に行った。ケタミン単独群のうち7例は覚醒直前にディアゼパムを併用した。麻酔中は心電図、血圧、脈拍、呼吸、顔貌の変化および体動の有無を観察した。気管内挿管は行わなかった。翌日、全例について麻酔中の夢の有無および、再び採卵術を受けるとしたら同じ麻酔を希望するかどうかを聞き取り調査した。

2. 採卵術

採卵術は超音波断層装置(横河RT3000)を用いて経腔的に行った。採卵針は18 G針(ユニシス社)を、採卵セットはMonash型システムに準じて自作したものを、そして吸引装置は中央配管にMonash型 Suction Regulator (W.Cook社)を接続し、120 mmHgで吸引した。

3. ケタミンの卵胞液中への移行

①検体採取

バランス麻酔群の5例に対して、卵胞穿刺によって得た卵胞液を血液および緩衝液の混入を避けて回収した。混入したものについては除外した。またそのうちの3例に対して、静脈採血を麻酔開始前およびケタミン投与後10分毎に、採卵術が終了するまで行った。そして血清を卵胞液とともに凍結保存した。

②ケタミン濃度測定法

卵胞液中および血清中のケタミン濃度を高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて測定した。その際、内標準物質としてp-アミノアセトフェノン(1.0 μ g/ml MeOH) 100 μ lを試験管内へ添加後、一旦、蒸発乾固させたのち、室温で溶解した検体1 mlならびに2N-NaOH 100 μ lおよび抽出溶媒としてジクロロエタン6 mlを加え、5分間振盪混和し、3000 r.p.m.で5分間遠心分離した。そして下層のジクロロエタン層を別の試験管へ移し、蒸発乾固させた。

測定に際しては、アセトニトリル、蒸留水およびPIC-B7をそれぞれ25対74.5対0.5の割合で混和した溶液100 μ lを加えて再構成した。そしてその再構成溶液から20 μ lをHPLC(SHIMADZU LC6A System)に注入し、流速1.0 ml/min、波長269 nmで検出した。カラムは逆相のCOSMOSIL 5C18(ϕ 4.6 mm $\times$ 150 mm、

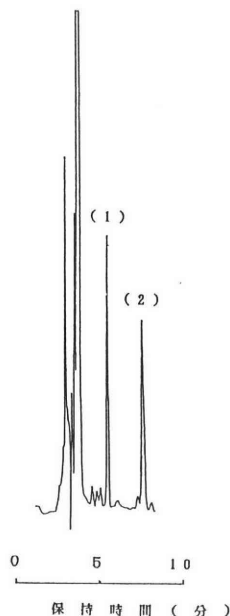


図1 ケタミンと内標準物質の液体クロマトグラム
(1)内標準物質 (2)ケタミン

ナカライテスク社)を用いた(図1)。

4. マウス受精卵に対するケタミンの影響

生後4ないし7週の雌マウス(C57BL/6)5匹にpregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 5 iuを皮下投与してprimingし、48時間後にhuman chorionic gonadotropin (hCG) 5 iuを皮下投与した。そして雄マウス(CBA)と交尾させた。その48時間後に開腹し、卵管を摘出して膨大部より卵を80個回収した。そのうち、2細胞期から4細胞期の受精卵(写真1)52個

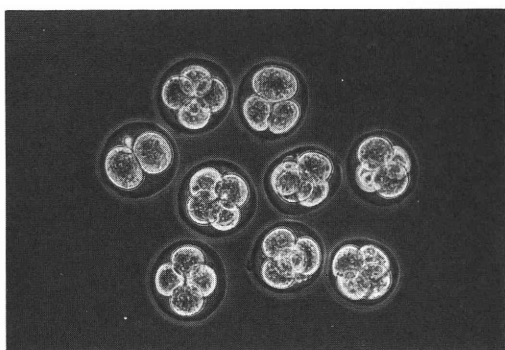


写真1 2ないし4細胞期のマウス受精卵

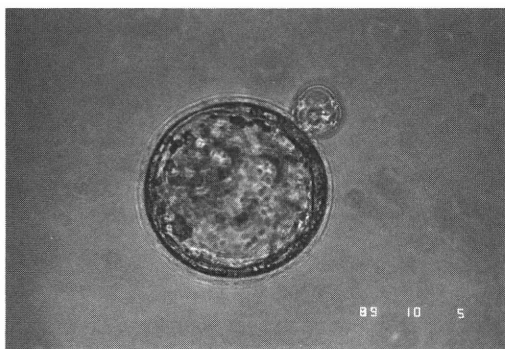


写真2 マウス胚盤胞

を6種類の異なった濃度のケタミンを含む培地中で培養した。その濃度は0 $\mu\text{g/ml}$ (対照), 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ および 200 $\mu\text{g/ml}$ とした。そして37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 in airの条件下で培養した。培養液はFetal Bovine Serumが20%になるように調整したTC-Medium199を用いた。そして72時間後に胚盤胞にまで分割した受精卵(写真2)を計数し、その比率を各群間で比較した。

結 果

1. 麻酔結果

採卵術は全例とも、とくに問題なく施行できた。バランス麻酔群では、採卵時間は 46 ± 21 (14-103) 分、ディアゼパム投与から呼名に十分に反応するまでの麻酔時間は 66 ± 22 (30-120) 分であった。ケタミン、ディアゼパムおよびドロペリドールの投与量はそれぞれ 60.7 ± 28.8 (20-135) mg, 10.5 ± 3.2 (5-20) mg, 8.4 ± 1.3 (6.3-10) mgであった。またケタミン使用量は1.1 mg/Kgであった。麻酔中の循環動態は安定していた。すなわち、収縮期血圧および拡張期血圧(mmHg)ともに経時的にやや下降傾向にあったが、

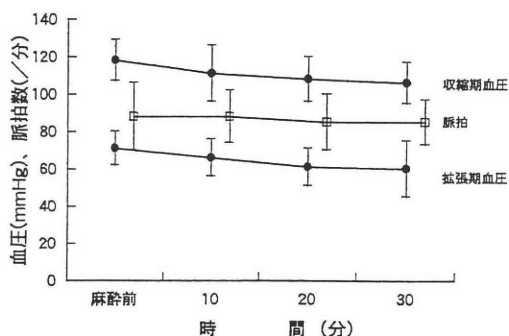


図2 バランス麻酔群の血圧、脈拍数の変動

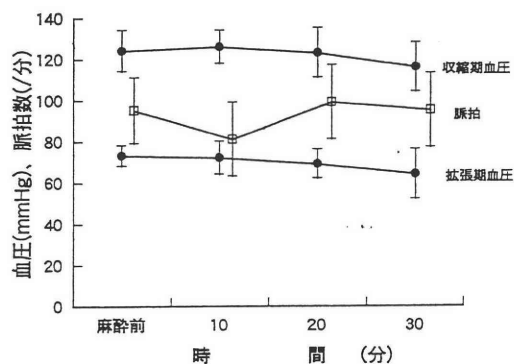


図3 ケタミン単独群の血圧、脈拍数の変動

麻酔前 $118 \pm 11/71 \pm 9$, 麻酔10分後 $111 \pm 15/66 \pm 10$, 20分後 $108 \pm 12/61 \pm 10$ および30分後 $106 \pm 11/60 \pm 15$ と変動は少なく、脈拍数(/分)も麻酔前 88 ± 18 , 10分後 88 ± 14 , 20分後 85 ± 15 および30分後 85 ± 12 とほぼ一定であった(図2)。呼吸状態も安定していて、呼吸抑制をきたすものはなかった。ケタミン単独群では、採卵時間は 27.6 ± 9.3 (12-43) 分、麻酔時間は 46.9 ± 10.4 (29-71) 分でバランス麻酔群よりも採卵時間および麻酔時間ともに短かった。ケタミン使用量は 87.8 ± 20.6 (40-120) mg, 体重当たり使用量は1.6 mg/Kgであり、使用量および体重当たり使用量ともにバランス麻酔群よりも有意に高値であった。血圧は麻酔前 $124 \pm 10/73 \pm 5$, 麻酔開始10分後 $126 \pm 8/72 \pm 8$, 20分後 $123 \pm 12/69 \pm 7$ および30分後 $116 \pm 12/64 \pm 12$ で、ほぼ一定であり、脈拍数は麻酔前 95 ± 16 , 麻酔開始10分後 81 ± 18 , 20分後 99 ± 18 および30分後 95 ± 18 であった(図3)。

麻酔中に唾液が口腔から流出した例がバランス麻酔群およびケタミン単独群にそれぞれ2例認められたが、いずれも気管内への誤嚥は臨床的に認めなかった。

麻酔中に夢を見たものがバランス麻酔群に30例 (32 %), ケタミン単独群に14例 (88 %) に認められた。夢の内容は色彩に富む抽象的なものが多かった。バランス麻酔群では、宇宙遊泳をしたとか、ジェットコースターに乗ったとか、楽しい内容のこともあったが、多くは気持ちの悪いものであった。ケタミン単独群では恐怖を感じる内容がほとんどであった。

次回に同じ麻酔を希望する割合はバランス麻酔群95例中75例 (80 %), ケタミン単独群16例中0 (0 %) であった。

2. ケタミンの移行

①卵胞液中ケタミン濃度

卵胞液中にケタミンを最も早く検出できたのはケタミン投与後6分で、その濃度は $0.036 \mu\text{g/ml}$ であった。他の4例では、第1回目の卵胞穿刺はケタミン投与から7分ないし9分後であったが、そのすべてからケタミンが検出され、その濃度は $0.044 \mu\text{g/ml}$ ～ $0.109 \mu\text{g/ml}$ であった。第2回目以降の卵胞液中ケタミン濃度は5例中3例においては経時的に上昇し、13分～18分で最高に達した後、漸減した。それらの最高値は $0.111 \mu\text{g/ml}$ ～ $0.182 \mu\text{g/ml}$ であった。残り2

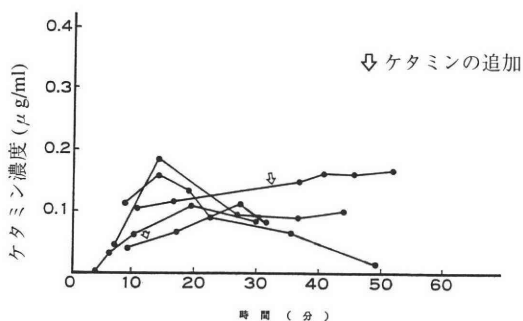


図4 卵胞液中ケタミン濃度

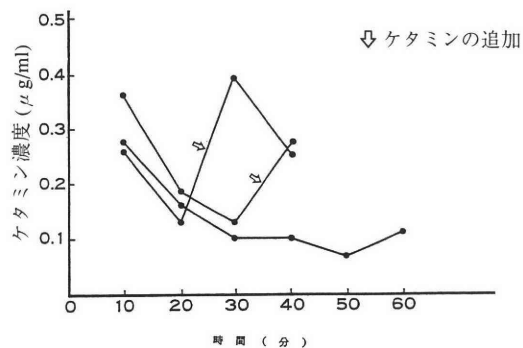


図5 血清中ケタミン濃度

例のうち1例はケタミンの追加投与から15分後に最高値の $0.109 \mu\text{g/ml}$ を示し、以後、減少した。他の1例はケタミンの追加投与16分後も上昇を続け、最高濃度は $0.16 \mu\text{g/ml}$ に達した。全体の最高濃度は $0.182 \mu\text{g/ml}$ であり、これはケタミン30mg投与の13分後であった(図4)。

②血清中濃度

ケタミンの血清中濃度はケタミン投与10分後にはすでに最高値を示し、以後、漸減した。その濃度は $0.261 \sim 0.363 \mu\text{g/ml}$ であった。追加投与により濃度は上昇し、最高値は $0.397 \mu\text{g/ml}$ であった(図5)。

3. マウス受精卵への影響

胚盤胞まで分割した受精卵は、対照群15個中15個 (100 %), ケタミン $0.2 \mu\text{g/ml}$ 群7個中7個 (100 %), ケタミン $1 \mu\text{g/ml}$ 群7個中7個 (100 %), ケタミン $2 \mu\text{g/ml}$ 群7個中7個 (100 %), $20 \mu\text{g/ml}$ 群12個中0個 (0 %), $200 \mu\text{g/ml}$ 群16個中0個 (0 %) であった(表1)。すなわち、ケタミン $20 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では、それ以下の濃度に比して有意に低値であった ($P<0.01$)。

考 察

麻酔を行う場合は設備が整っている手術室で行うのが理想であり原則である。しかし、採卵術の場合、採卵術日の決定は卵胞の発育が正確に予測できないため、採卵術日の2ないし3日前になることが多い。そのため、中央手術室システムでは対応が難しくなる可能性がある。また体外受精-胚移植に必要なクリーンベンチやインキュベーターを手術室に常設することは難しい。そこで今回は体外受精-胚移植に必要な設備が設置され、また酸素、笑気および吸引の配管もあり、しかも麻酔器が設置されている分娩室で採卵術を行った。また麻酔に際しては気管内挿管は行わないことを原則とした。そのため、

表1 受精卵培養結果

ケタミン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	受精卵数	胚盤胞 数	%	有意差
0	15	15	100	無し
0.2	7	7	100	無し
1	7	7	100	無し
2	7	7	100	無し
20	12	0	0	$p<0.01$
200	16	0	0	$p<0.01$

使用する麻酔薬としては、呼吸および循環系、とくに呼吸に与える影響の軽微な麻酔としてケタミンを選択した。そしてバランス麻酔群では、ケタミンによって起こる不愉快な夢を予防すること¹⁾、ケタミンの鎮痛作用の増強²⁾および鎮静を目的としてディアゼパムを、また嘔吐を予防すること³⁾およびディアゼパムとの併用による深い鎮静を得る⁴⁾ことを目的として、ドロペリドールを併用した。また嘔吐が起こった場合に誤嚥を予防するために、咳嗽反射を保つことを目的として、必要最少限度の浅い麻酔を心掛けた。今回、唾液の口腔からの流出を各群にそれぞれ2例認めたが、これは前投薬として静注したアトロピンの効果が消失したためかもしれない。患者に疼痛を与える行為をより少なくする目的で、アトロピンの筋肉注射を避けたわけであったが、今後は、アトロピンの追加投与も考慮しなければならないかもしれない。

一般に全身麻酔の導入薬としてケタミンを使用する場合の投与量は1ないし3mg/kgであるが⁵⁾、今回の採卵術の麻酔では、初回量はそれ以下であった。これは採卵術での疼痛が比較的軽度であるためと考えられた。またケタミンによる呼吸抑制は2mg/kg以上の投与で生じるといわれているので⁶⁾、呼吸抑制をきたさないためにも、ケタミンは少量であることが望ましい。バランス麻酔群では、採卵時間はケタミン単独群よりも長いにもかかわらず、ケタミンの使用は少量であった。これはディアゼパムによるケタミンの鎮痛作用の増強作用によると考えられる。また、ドロペリドールによる鎮静作用も関与しているであろう。

一般にケタミンは血圧を上昇させるといわれているが、今回の使用では認められなかった。その理由として、ケタミンが少量であったこと、および採卵術に対する疼痛が比較的軽度であったことが考えられる。

消化器系への影響では、術中に唾液が口腔から流出した例が認められたが、これらの例で気管内への誤嚥がみとめられなかったのは、筋緊張が保たれていたこと、および比較的浅い麻酔であったため、喉頭反射が保たれていたことによるのであろう。しかし麻酔中は嘔吐や唾液の流出の前兆として現われる体動や嚥下運動を見逃さない細心の注意が必要であり、また起こった時のために、吸引および気管内挿管の準備が必須であると考えられた。今後、嘔吐が起こった時に備えて、H₂ blockerの使用を考慮する必要があるかも知れない。

夢はバランス麻酔群では、ケタミン単独群に比して出現頻度は低く、夢の内容も穏やかであった。このことはケタミンが少量であったために、その副作用も軽かったことに加えて、ディアゼパムおよびドロペリドールの抑制作用によると考えられる。一方、バランス麻酔群において、夢および嘔吐を完全に予防することはできなかったのは、ディアゼパムおよびドロペリドールの投与が少量であった可能性がある。しかし夢を完全に予防するために、ディアゼパムおよびドロペリドールを今回よりも多量に投与した場合は、喉頭反射が抑制されたり、覚醒が遅延する可能性があるもので、投与量に関しては今後の検討が必要であろう。

以上、採卵術におけるケタミン麻酔では、呼吸および循環系に与える影響は軽度であるが、唾液分泌の増加に対して、注意が必要であると考えられる。しかしケタミンにディアゼパムおよびドロペリドールを併用するバランス麻酔は、ケタミン単独の麻酔に比べて、麻酔後の患者の感想も良好であり、ケタミンの投与が少量であること、唾液の流出および夢の発生頻度が低いことなどより、採卵術に適した麻酔であるといえよう。

ケタミンにディアゼパムを併用する麻酔法は多く発表されているが^{2,7-13)}、さらにドロペリドールを加えた方法については報告は少ない。とくに採卵術に本麻酔法を用いたという報告は見当たらない。今回、ドロペリドールを使用しないケタミンおよびディアゼパムのみの方法については検討しなかった。ドロペリドールの効果については、他者の報告によれば、ドロペリドールを加えることによって、ケタミンの投与量を減少することができ、また血圧や脈拍の上昇を軽減することができたといわれている^{7,9)}。したがって、今回の場合もドロペリドールの投与はケタミンおよびディアゼパムの投与量を少なくする意味で有用であったと考えている。

近年、麻酔が受精や着床に及ぼす影響についての報告がなされるようになった。その中で、全身麻酔は悪影響を与えるという報告が少なくない¹⁴⁻¹⁷⁾。とくにイソフルレンは有害とするものが多く¹⁷⁻¹⁹⁾、ハロセンはエンフルレンよりも有害だという報告^{20,21)}がある。一方、静脈麻酔薬では、サイオペンタールにフェンタニールおよび笑気を併用した場合、受精率が低下するという報告がある¹⁷⁾。しかしケタミンについての報告は見当たらない。またケタミンの卵胞液中への移行についての報告も見当たらない。

そこで、今回、ケタミンの卵子への影響を検討す

る目的で、まずケタミンの卵胞液中への移行について検討した。その結果、経静脈的に投与したケタミンは速やかに卵胞液中に移行することが判明した。このことにより、ケタミン麻酔中は卵子がケタミンにさらされていることから、移行したケタミンによって卵子が何らかの影響を受けている可能性を考慮する必要を認めた。今回の検討では、卵胞液中の最高濃度は $0.18 \mu\text{g/ml}$ であったため、マウス受精卵を用いた培養実験では、ケタミンの濃度は $0.2 \mu\text{g/ml}$ を基準とした。そしてケタミンの濃度が $2 \mu\text{g/ml}$ 以下の群では、分割率に差が認められなかった。すなわち、卵胞液中濃度の10倍の濃度でも、分割率に影響は認められなかった。また培養実験では、卵子をケタミン中に72時間浸していたわけであるが、実際の採卵術はほとんどが1時間以内で終了するために、卵子がケタミンにさらされるのは、培養実験に比べると、きわめて短時間である。この点からもケタミンの卵子への影響は軽微であると考えられる。

また卵子に及ぼすディアゼパムおよびドロペリドールの影響については、採卵術にディアゼパム麻酔を行って妊娠した例の報告から²²⁾、ディアゼパムは通常の臨床使用量では影響はないと考えられる。ドロペリドールに関しては報告が見当たらず、今後、検討が必要であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御校閱を賜りました長崎大学産科婦人科学教室山邊 徹教授に深謝致します。

本論文の要旨の一部は第39回日本麻酔学会総会、および第39回日本産科婦人科学会九州連合地方部会にて発表した。

文 献

- 1) Coppel DL, Bovill JG, Dundee JW, The taming of Ketamine. *Anaesthesia* 28: 293, 1973
- 2) Hatano S, Nishiwada M, Matsumura M, Ketamine-Diazepam Anaesthesia for Abdominal Surgery, A Review of 1000 Cases with Continuous "Micro-Mini" Drip Administration Technique. *Anaesthesist* 27: 172, 1978
- 3) Sadove MS, Hatano S, Redlin T, et al., Clinical Study of Droperidol in the Prevention of the Side-Effects of Ketamine Anesthesia: A Progress Report. *Anesth Analg* 50: 526, 1971
- 4) Here GP, Conner JT, Katz RL, et al., Diazepam And Droperidol As I. V. Premedicants. *Br J Anaesth* 51: 537, 1979
- 5) Gilman AG, Rall TW, Nies AS, et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of

Therapeutics. Eighth Edition, 307, Pergamon Press, 1990

- 6) Zsigmond EK, Matsuki A, Kothary SP, et al., Arterial hypoxemia caused by intravenous ketamine. *Anesth Analg* 55: 311, 1976
- 7) 古賀義久, 嶋 武, 高橋光太郎, 小児における droperidol併用ketamine麻酔の検討. *麻酔* 21: 619, 1972
- 8) Hatano S, Sadove MS, Keane DM, Diazepam-Ketamine Anaesthesia for Open Heart Surgery "Micro-Mini" Drip Administration Technique. *Anaesthesist* 25: 457, 1976
- 9) 古賀義久, 嶋 武, 松川 周 Ketamine-diazepam混合微量点滴麻酔法, 筋弛緩薬および droperidol併用の有無と調節性について. *麻酔* 27: 278, 1978
- 10) Mattila MA, Hynynen KH, Eronen R, et al., Diazepam dosage and timing in ketamine combination anaesthesia. A Double-blind study. *Anaesthesist* 30: 500, 1981
- 11) Mogensen F, Muller D, Valentin N, Glycopyrrolate during ketamine/diazepam anaesthesia. A double-blind comparison with atropine. *Acta Anaesthesiol Scand* 30: 332, 1986
- 12) Tuman KJ, McCarthy RJ, Spiess BD, et al., Comparison of anesthetic techniques in patients undergoing heart valve replacement. *J Cardiothorac Anesth* 4: 159, 1990
- 13) Schönrath B, Borgwardt D, Langanke D, et al., Narkose zur Laparoskopie bei Sterilitäts-patienten. *Zent bl Gynäkol* 112: 267, 1990
- 14) Hayes MF, Magyar DM, Sacco AG, et al., Effect of general anesthesia on fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 48: 975, 1987
- 15) Boyers SP, Stronk JN, Fino L, et al., The time interval between laparoscopic aspiration of mature human oocytes affects fertilization rate (Abstr). Presented at the forty-second annual meeting of The American Fertility Society and the Eighteenth Annual Meeting of the Canadian Fertility and Andrology Society, Toronto, Ontario, Canada, September 27 to October 2, 1986. p83 Birmingham, The American Fertility Society, 1986
- 16) Hood A, Brown J, Serafini P, et al., The Effect of Anesthesia on GIFT Outcome. Program, 44th Annual Meeting, American Fertility Society, 1988, Abstr 121
- 17) Jensen JT, Boyers SP, Grunfeld LH, et al., Anesthesia exposure may affect fertilization rates of human oocytes collected by ultrasound aspiration (Abstr pp55). Presented at the Fifth World Con-

gress on In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, April 5 to 10, 1987, Norfolk, Virginia. p48
Birmingham, American Fertility Society, 1987

- 18) Matt DW, Steingold KA, Dastvan CM, et al., Effects of Sera from Patients Given Various Anesthetics on Preimplantation Mouse Embryo Development in Vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 8: 191, 1991
- 19) Chetkowski RJ, Nass TE, Isoflurane inhibits early mouse embryo development in vitro. *Fertil Steril* 49: 171, 1988
- 20) Hinkley RE, Wright BD, Comparative Effects of Halothane, Enflurane, and Methoxyflurane on the Incidence of Abnormal Development Using Sea Urchin Gametes as an In Vitro Model System. *Anesth Analg* 64: 1005, 1985
- 21) Fishel S, Webster J, Faratian B, et al., General Anesthesia for Intrauterine Placement of Human Conceptuses After in Vitro Fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 4: 260, 1987
- 22) Belaisch-Allart JC, Guillet-Rosso F, Baton C, et al., Coelioscopie sous anesthésie locale pour recueil d'ovocyte en vue d'une fécondation in vitro. *La Presse Medicale* 24: 2053, 1983

**A clinical and embryological study
of the ketamine anesthesia for
in vitro fertilization and embryo transfer**

Jun Shigematsu

Department of Obstetrics and Gynecology,
Nagasaki University School of Medicine,
Nagasaki 852, Japan
(Director: Prof. Tooru Yamabe)

A clinical study to evaluate the ketamine anesthesia for ultrasonically guided transvaginal oocyte retrieval was performed. The influence of ketamine on the mouse embryo cleavage was also examined. The summary of this study as follows. 1) The cardio-pulmonary system was stable in ketamine anesthesia at ultrasonically guided transvaginal oocyte retrieval. 2) The incidence and the degree of the side effects of anesthesia were lower in patients taken of ketamine combined with diazepam and droperidol than patients taken ketamine alone. 3) Six minutes after of intra venous ketamine administration, ketamine was detected in the follicular fluid. 4) The maximum level of the ketamine concentration on the follicular fluid was $0.182 \mu\text{g/ml}$. 5) The cleavage rate of mouse embryo was not affected in the medium added of ketamine in concentration of $2 \mu\text{g/ml}$. In conclusion: Those results suggest that ketamine anesthesia combined with diazepam and droperidol is useful for ultrasonically guided transvaginal oocyte retrieval. (Key words: ketamine, follicular fluid, oocyte, cleavage, IVF-ET)

(受付: 1993年 4 月 12 日)

(受理: 1993年 6 月 18 日)

Clomiphene/LH surge 法と Clomiphene/HCG法による AIH 治療成績の比較

A Comparison of Clomiphene/LH Surge and Clomiphene/HCG for Timing of AIH

秋田赤十字病院産婦人科

長谷川 功

村 上 晴 生

藤 盛 亮 寿

Isao HASEGAWA

Haruo MURAKAWA

Ryoju FUJIMORI

Division of Obstetrics and Gynecology, Akita Red Cross Hospital, Akita 010, Japan

不妊治療の重要な手段であるClomiphene-AIH療法のAIH実施時期の決定法として、自然のLH surge後 (LH>40 IU/Lの24時間後) に行なう方法 (A法) と、従来のHCG投与後 (40時間後) に行なう方法 (B法) とを比較検討した。男性因子9例、頸管因子5例、原因不明の16例の計30例の不妊症例 (平均不妊期間3.4年) を対象とし、うち15例は第1周期にA法・第2周期にB法を行ない、他の15例は第1周期B法・第2周期A法というcrossover studyを実施した。その結果、2周期合わせての妊娠率は、A法28周期中8周期 (28.6%)、B法25周期中4周期 (16.0%) とA法すなわちclomiphene/LH surge法で高い傾向が観察された。LH surge陽性日またはHCG投与日の卵胞径は、A法 25.5 ± 2.5 mm、B法 21.2 ± 0.9 mm、また子宮内膜厚はA法 11.5 ± 2.4 mm、B法 9.9 ± 2.5 mmといずれもA法で有意に高値であり、排卵周辺での内分泌環境が良好なことが、その原因として考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 642 - 646, 1993)

緒 言

AIHの妊娠成績を向上させるために、効果的な精液処理法の開発^{1,2)}、併用する排卵誘発法の工夫³⁾などが試みられているが、排卵と同期したAIH実施のタイミングもまた妊娠率に影響する重大な要因であることは論を待たない。

AIHは正常排卵周期を有する症例に対しても、自然周期で行なうよりも、排卵誘発周期に行なった方が妊娠率が高いことが、多くの報告で指摘されている^{1,4)}。その場合、HMGで排卵誘発を行なう場合はもとより、clomipheneを用いる場合にも、成熟卵胞はHCGが投与されると34~40時間後に排卵することから⁵⁾、HCG投与の一定時間後にAIHがおこなわれるのが一般的である。

近年、尿中LH半定量キットの普及により、LH surgeが短時間で容易に把握できるようになった⁶⁾。これを利用して、clomiphene投与後に観察された自然の

LH surgeを指標として実施時期を決定するAIHを行ない、従来のHCG誘発排卵によるAIHと比較検討を行ったので報告する。

対象および方法

表1 対象症例と背景

	第1群 (15例)	第2群 (15例)	計 (30例)
平均年齢	31.3±2.0	31.2±4.6	31.2±3.4
不妊期間 (年)	3.3±1.0	3.4±1.5	3.4±1.2
原因			
男性因子	4例	5例	9例
頸管因子	3例	2例	5例
原因不明	8例	8例	16例

1. 対象 (表 1)

秋田赤十字病院産婦人科不妊外来通院中の患者で、以下のような AIH の適応があると考えられ、患者の同意が得られ、今回初めて AIH を実施する 30 例を対象とした。症例の平均年齢・不妊期間・不妊原因を表 1 に示す。

不妊原因のうち、男性因子は、精子濃度または運動率において WHO の正常値⁷⁾を下回るものとし、頸管因子は、2 回以上の post coital test において強拡大で 5 個以上の運動精子を認めないもの、さらに原因不明例は、上記 2 検査のほか、黄体中期 P₄ 値・prolactin 値・抗精子抗体・腹腔鏡 (12 例は HSG のみ) に異常を認めないものとした。

これら 30 例を 15 例ずつ背景を同じくする 2 群に randomize し、AIH を行なった。第 1 群は、第 1 周期に次項に示す A 法にて行ない、妊娠非成立例は第 2 周期に B 法にて行なった。第 2 群は、第 1 周期 B 法、第 2 周期 A 法にて AIH を行なった。

2. AIH の実施方法

1) A 法 (clomiphene/LH surge 法)

月経周期 5 日目より、clomiphene citrate (CC) 100 mg を 5 日間内服し、12 日目より連日経陰超音波断層

装置 (アロカ社 SSD-550, 5MHz プローブ) にて卵胞径を計測し、さらに尿中 LH 測定を L-チェック (ニプロ) にて行なった。診察前日の 19 時の尿と当日の 9 時の尿について連日測定し、初めて 40 IU/L を越えた時点の 24 時間後に AIH を行なった。

2) B 法 (clomiphene/HCG 法)

A 法と同様に CC を内服し、月経周期 12 日目より連日計測した主席卵胞径が 20mm を越えた時点で (尿中 LH が 20 IU/L 以下であることを確認し)、HCG 5000 単位を投与しその 40 時間後に AIH を行なった。

AIH は、80 % パーコール攪拌密度勾配遠心法¹⁾にて行なった。全例黄体支持療法は施行しなかった。

3. 排卵周辺のモニターリング

全治療周期において、経陰超音波断層法にて、主席卵胞径・成熟卵胞数・子宮内膜の厚さとパターン⁸⁾を計測した。また AIH 施行後も、超音波検査にて排卵の終了を確認した。排卵の終了は、卵胞の消失もしくは径 5 mm 以上の減少とした⁹⁾。

成 績

1. 妊娠成績

表 2 に示した如く、第 1 群は第 1 周期に A 法にて

表 2 Clomiphene/LH surge 法と Clomiphene/HCG 法の妊娠率

	A 法 (clomiphene/LHs)	B 法 (clomiphene/HCG)
第 1 周期	5 /15 (33.3 %)	2 /15 (13.3 %)
第 2 周期	3 /13 (23.1 %)	2 /10 (20.0 %)
合 計	8 /28 (28.6 %)	4 /25 (16.0 %)

表 3 A 法と B 法の排卵周辺における各パラメーターの比較

	A 法	B 法	
パラメーター	clpmiphene/LHs	clomiphene/HCG	P-value
主席卵胞径 (mm)	5.5 ± 2.5	21.2 ± 0.9	p < 0.001
径 18mm 以上の卵胞数	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.6	N.S.
子宮内膜厚 (mm)	11.5 ± 2.4	9.9 ± 2.5	p < 0.05
AIH 実施日 (日)	16.3 ± 1.3	15.1 ± 1.2	p < 0.01
AIH 時排卵終了率	21/28 (75.0 %)	22/25 (88.0 %)	N.S.
精子濃度 (x10 ⁶ /ml)*	41.0 ± 31.4	43.7 ± 34.3	N.S.
精子運動率 (%)*	72.4 ± 14.2	71.0 ± 20.7	N.S.

*Percoll 処理後の精液所見

表4 妊娠成立周期と非妊娠周期における各パラメーターの比較

パラメーター	A法 (clomiphene/LHs)		B法 (clomiphene/HCG)	
	妊娠周期 (N=8)	非妊娠周期 (N=20)	妊娠周期 (N=4)	非妊娠周期 (N=21)
主席卵胞径 (mm)	24.9±2.4	25.7±2.6	20.8±1.0	21.6±1.1
径18mm以上の卵胞数	1.3±0.5	1.6±0.6	1.7±1.0	1.6±0.5
子宮内膜厚 (mm)	11.6±3.5	11.5±2.0	10.7±3.7	9.7±2.2
AIH 実施日 (D)	15.5±0.5*	16.6±1.4	14.2±1.5	15.4±1.1
AIH 時排卵終了率	75.0 %	75.0 %	75.0 %	90.5 %
精子濃度 (x10 ⁶ /ml)	45.0±7.1	39.6±36.3	43.0±34.3	43.9±35.5
精子運動率 (%)	77.0±10.4	70.8±15.3	68.8±25.3	73.1±13.1

*p<0.05

15例中5例が妊娠し、非妊娠例10例のうち2例が第2周期にB法で妊娠した。一方第2群は第1周期にB法にて15例中2例が妊娠し、非妊娠例13例のうち3例が第2周期にA法で妊娠した。すなわち、A法は2周期合わせて28例中8例、28.6%の妊娠率であり、B法の25例中4例、16.0%に比して高い傾向を認めた (p=0.12, 有意差なし)。

2. 排卵周辺のパラメーターの比較 (表3)

尿中LH surge陽性日 (A法) またはHCG投与日 (B法) の主席卵胞径を比較すると、A法において有意に高値であった。直径18mm以上の成熟卵胞数には差を認めなかった。子宮内膜の状態では、A法で有意に内膜が厚く、また典型的triple line pattern⁸⁾を示す例が多い傾向が観察された。AIHが実施された月経周期期日を比較すると、A法が有意に遅く実施された。AIH実施時点での排卵終了率はA法75.0%、B法88.0%で有意差はなく、この時点で排卵未了だったA法・B法の各症例とも、AIH実施の24時間後には排卵が終了していた。また、妊娠非成立周期における黄体期の日数はA法・B法それぞれ13.8±0.9日、13.6±0.6日と差を認めなかった。

A法・B法毎に、妊娠成立周期と非妊娠周期における各パラメーターを比較すると (表4)、A法において、妊娠成立周期でAIHが早い月経周期日に行なわれていた。精液性状 (パーコール処理後) には、両者間で有意差を認めなかった。

考 察

AIHは自然周期よりも排卵誘発周期に行なった方が妊娠率が高いとされている¹⁴⁾。特に原因不明不妊

症に対して、HMG-HCG療法にAIHを併用することにより、HMG-HCGのみの場合に比べて妊娠率の向上がみられたとする報告¹⁰⁾や、HMG-HCG-AIHでGIFT, IVF-ETに匹敵する妊娠率が得られたとする報告¹¹⁾がある。しかし、コストや、多胎妊娠・卵巣過剰刺激のリスクを考慮するとき、clomiphene-AIH療法のもつ意義は大きく、また、clomiphene療法時の頸管粘液減少の打開策としてAIHが併用されることもあり、本法は一般不妊治療における重要な手段といえる。

本研究では、原因不明不妊を中心とする症例に対する、clomiphene-AIHの実施時期を決定する方法として、HCG投与後に実施する方法と、内因性LH surgeを待ってその出現後に実施する方法の2法を比較検討した。症例が少ないこともあり、各症例について2法を順次行ない互いに対照とするCross over studyを採用した。HCG投与またはLH surgeの出現からAIH実施までの時間は、病院の勤務体制等の諸事情も考慮して決定したため、一般的な実施のタイミングに比べやや遅くなっている。しかし、両法間においてAIH実施時の排卵終了率には差がなく、AIHは両法とも排卵をめぐり同じ時相に行なわれたと考えられるので、この時間設定は今回の結果には影響を与えていないと考えられる。また、尿中LHの判定量において、一般には20 IU/Lがcut off値にされる。今回のclomiphene投与周期では、40 IU/Lを越える場合を陽性としたが、A法の全周期で1日2回の尿検査でこの基準が達成され、しかもその24時間以内に75%の例で排卵が終了し、残る全例とも48時間以内にはすべて排卵していた。すなわち、clomiphene投

与周期のLH surge判定法として, surgeを逃すことなく排卵時期をかなり限定できるという点で, 妥当な基準であったと思われる。

両法の妊娠率を比較すると, 有意差はないもののLH surge法で高い傾向が観察された。Martinezら¹²⁾も同様の検討を行っており, やはりLH surge法の妊娠率が優っていたと報告している。

両法の排卵周辺のパラメーターを比較してみると, A法において有意に主席卵胞径が大きく, また子宮内膜が厚くかつ典型的triple line patternをとる症例が多かった。このpatternの出現は血中Estradiol濃度と相関するといわれ¹³⁾, A法において排卵周辺の内分泌環境がより良好であったと推察される。逆にHCG法を一定の卵胞径で一律に行なうと, 症例によってはそれが不適切なタイミングであることになる。A法におけるこうした良好な卵胞機能は, 引き続き黄体機能をも良好なものとし, 妊娠率の向上に関与している可能性がある。しかし, 今回のデータの黄体期の日数(非妊娠例のみ)のみからは実証することはできなかった。

B法に比べて成績の良かったA法でAIH実施日が有意に遅かったが, A法内では, 逆に妊娠成立周期でよりAIHが早期に実施されていたことは興味深い。すなわち, LH surgeが適切な時期に出現する以前にHCGを投与するB法で妊娠率が低いことの他に, 逆にHCG投与を控えて待機するA法において, 卵胞がかなり増大してもなかなかLH surgeが出現してこない症例もまた妊娠率が低いということである。その理由として, 遅発排卵にみられるような卵の質的機能的異常による受精能の低下¹⁴⁾などが推察される。この事実を臨床に応用するならば, clomiphene-AIHにおいては, 主席卵胞径20 mm前後より連日尿中LHをモニターし(今回のシリーズのA法で, LH surge(+)となった時点の卵胞径の最小値は22 mmであった), LH surge(+)の24時間後にAIHを行なうが, 卵胞径26mm(今回のA法でのLH surge(+)時点の平均値)にてLH surge(-)ならばHCG誘発排卵にてAIHを行なうのが合理的ということになる。実際, A法では症例・周期によっては, LH surgeを捉えるのに1週間以上を要することもあるなど煩雑な面もあり, 今後このA法・B法の併用プロトコルの有用性について検討したいと考えている。

なお本論文の要旨は, 第37回日本不妊学会総会(於東京, 1992年)において発表した。

文 献

- 1) 七里和良, 谷啓 光, 織田和哉 他, 卵巣刺激法を応用したPercoll撹拌密度勾配法によるAIHの成績。産婦治療 61:967, 1990
- 2) 小林俊文, 撹拌密度勾配法による精子洗浄濃縮。日不妊会誌 34:117, 1989
- 3) Meilis GB, Paoletti AM, Strigini F, et al., Pharmacologic induction of multiple follicular development improves the success rate of artificial insemination with husbands semen in couples with male related or unexplained infertility. Fertil Steril 47: 441, 1987
- 4) 児玉英也, 加藤充弘, 福田 淳 他, Clomiphene-hMG刺激周期を利用したPercoll 洗浄精子によるAIH, 日不妊会誌 34:246, 1989
- 5) O'Herlihy C, Pepperell RJ, Robinson HP, Ultrasound timing of human chorionic gonadotropin administration in clomiphene stimulated cycle. Obstet Gynecol 59: 40, 1982
- 6) 中村潔史, 北川武司, 那波明宏 他, ギナール20およびギナール30を用いた尿中LH surge検出の臨床的検討。日不妊会誌 37:272, 1992
- 7) WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction, 1987
- 8) Check JH, Nowrooz K, Choe J, et al., Influence of endometrial thickness and echo patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization. Fertil Steril 56: 1173, 1991
- 9) Check JH, Chase JS, Nowrooz K, et al., Premature luteinization: treatment and incidence in natural cycles. Human Reprod 6: 190, 1991
- 10) Chaffkin LM, Nulsen JC, Luciano AA, et al., A comparative analysis of the cycle fecundity rates associated with combined human menopausal gonadotropin and intrauterine insemination. Fertil Steril 55: 252, 1991
- 11) Melis GB, Paoletti AM, Strigini F, et al., Pharmacologic induction of multiple follicular development improves the success rate of artificial insemination with husband's semen in couples with male-related or unexplained infertility. Fertil Steril 47: 441, 1987
- 12) Martinez AR, Bernadus RE, Voorhorst FJ, et al., A controlled study of human chorionic gonadotropin induced ovulation versus urinary luteinizing hormone surge for timing of intrauterine insemination. Human Reprod 6: 1247, 1991
- 13) Dickey RP, Olar TT, Curole DN, et al., Endometrial pattern and thickness associated with pregnancy outcome after assisted reproduction tech-

nologies. Human Reprod 7: 418, 1992

- 14) 康文 豪, 遅延性排卵の病態に関する研究—特に不妊因子としての検討—. 日不妊会誌 37: 279, 1992

A comparison of Clomiphene/LH surge and Clomiphene/HCG for timing of AIH

Isao Hasegawa, Haruo Murakawa
and Ryoju Fujimori

Division of Obstetrics and Gynecology,
Akita Red Cross Hospital, Akita 010, Japan

To improve the pregnancy rate of clomiphene-intra-uterine insemination (IUI) therapy, clomiphene-IUI was performed either following natural LH surge (24h after the detection of urinary LH >40 IU/L, method A) or following HCG administration (40 h after HCG, method

B), and the pregnancy rates of each method were recorded. Thirty infertile cases (male factor: 9 cases; cervical factor: 5 cases; unexplained: 16 cases) were randomly divided into 2 groups. For the first 15 cases, IUI was performed by method A in the 1st cycle and by method B in the 2nd cycle and for the remaining 15 cases, IUI was performed vice-versa (cross-over study). The data demonstrated that the pregnancy rate produced by method A (8/28 cycle, PR=28.6 %) was better than that by method B (4/25 cycle, PR=16.0 %). Analysis of periovulatory events showed that follicle diameter and endometrial thickness of method A were significantly greater than those of method B (25.5 mm vs 21.2 mm, $p<0.001$ and 11.5 mm vs 9.9 mm, $p<0.05$, respectively). It is suggested that in clomiphene-IUI, IUI following natural LH surge produces better result due to adequate periovulatory hormonal environment.

(受付: 1993年 1 月18日)

(受理: 1993年 6 月18日)

Percoll攪拌密度勾配法によるAIHの予後と 培養精子運動率との相関

Outcome of Intrauterine Insemination Using Percoll Centrifugation Method and Sperm Survival Rate

東京都済生会中央病院産婦人科

玉 岡 有 告

亀 井 清

中 村 英 世

Yukoku TAMAOKA

Kiyoshi KAMEI

Hideyo NAKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Saiseikai Central Hospital,

Tokyo 108, Japan

慶応大学医学部産婦人科教室

田 辺 清 男

Kiyoo TANABE

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,

Keio University, Tokyo 160, Japan

Percoll攪拌密度勾配法を用いた人工授精(Percoll AIH)において、精子洗浄処理後24時間精子培養を行い、経時的な精子運動率の変化をみるとともに、培養開始時、および24時間経過後の精子運動率とPercoll AIHによる妊娠予後との相関について検討を加えた。

対象は当院不妊症外来通院中の男性不妊もしくは人工授精頻回施行症例28例で、1990年6月より1992年6月まで施行したPercoll AIH 168周期である。培養開始時の精子運動率は妊娠群 $77.6 \pm 5.6\%$ (以下 $M \pm SD$)、非妊娠群 $73.3 \pm 20.5\%$ 、24時間培養後では妊娠群 $70.0 \pm 5.8\%$ 、非妊娠群 $42.0 \pm 23.5\%$ であり、妊娠群が24時間培養後精子運動率において、非妊娠群よりも有意に高値をとった。また24時間培養後、精子運動率が60%以上の13症例中7例に妊娠が成立し、60%未満では成立しなかった。以上の結果より24時間培養後精子運動率がPercoll AIHの妊娠予後をみる上で有意義であることが示唆された。

(Jpn.J.Fertil.Steril., 38 (4), 647 - 683, 1993)

緒 言

不妊症の治療法として人工授精法があげられるが、男性不妊に対しては、Percollによる洗浄精子を用いて人工授精をおこない現在まで臨床において一定の成果をあげてきている。1979年、Pertoft et al.¹⁾により、Percollによる密度勾配遠心法が開発され、以後ヒト精子に臨床応用されてきた。本邦においても単層Percoll法²⁾、多層Percoll法³⁾、Percoll攪拌密度勾配法⁴⁾による人工授精が行われてきている。当院に

おいても、1988年以降、重症男性不妊を含む、精子数200万/ml以下、運動率40%以下の症例、もしくは過去に不妊症ルーチン検査で機能性不妊と診断され、人工授精を6回以上行っても妊娠にいたらなかった症例(以下AIH頻回施行例)に対し、Percoll攪拌密度勾配法による洗浄精子を用いた人工授精(以下Percoll AIH)をおこなってきた。1988年1月より1989年4月迄の間に50症例、146周期において不妊症ルーチン検査施行後Percoll AIHを施行し、8症例、8周期に妊娠が成立した。しかし、妊娠例と非妊娠例と

を比べて見ると、このような日常臨床治療例では、Percoll処理後の精子数 (妊娠例vs非妊娠, ($M \pm SD$) 3787 ± 1298 万/ml vs 3343 ± 446 万/ml) および運動率 ($62.4 \pm 5.1\%$ vs $53.1 \pm 2.9\%$) において有意差はなかった。そこで今回我々はPercoll AIHに際し、洗浄後の精子を80%Percoll液を用い24時間培養 (24時間 sperm survival test) し、精子運動率の時間的変化、および妊娠例、非妊娠例における24時間培養後の精子運動率に対し検討を加えた。

対象と方法

1) 基礎実験

正常精液所見を有する症例より無作為に5例から12例を選び洗浄精子をPercoll, HAM-F10, human tubal fluid (HTF) にて培養し、おのこの培養液中の精子運動率の時間的変化を比較検討した。(図1)

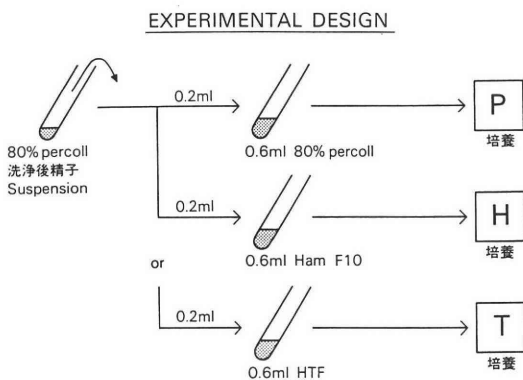


図1 実験プロトコル

図のように80%Percollによる精子洗浄後、その精子懸濁液0.8ml中、0.2mlを0.6mlの80%Percoll, HAM-F10, HTFに懸濁したものをそれぞれ、P,H,T,の3群とし、37.0度、5% CO₂, 95% Airの条件下でファルコンculture dish #3037にて培養した。培養開始時、および培養開始後6, 12, 24時間後の精子運動率を、精液量の関係から、P群単独、およびP, H群同時培養, P, T群同時培養と比較検討した。

2) Percoll AIHおよび80% Percollによる sperm survival test

対象は1990年6月より1992年6月まで当院不妊症外来においてPercoll AIHおよび24時間sperm survival test (以下SST) をおこなった患者28症例である。上記期間中168周期に不妊症ルーチン検査後、Percoll AIHを行い、全症例において、1回から4回までSSTをおこなった。SSTを1回のみ行った症例において

は、その結果を、複数回行った症例においては初回のSSTの結果を検討対象とした。

患者平均年齢 34.5 ± 4.3 歳 ($M \pm SD$)、平均不妊期間 6.4 ± 3.5 年 ($M \pm SD$)、であった。Percoll AIHの適応内訳は、精液因子18例、AIH頻回施行例10例であり原発性不妊27例、続発性不妊1例であった。基礎体温、頸管粘液、超音波検査による卵胞径測定、尿中ホルモン測定等により排卵日を推定しPercoll AIHを行った。28症例中、23症例は自然周期に、3症例はhMG、2症例はclomidにて排卵誘発後、AIHを行った。

SSTをおこなうにあたっては、Percoll AIHに際し、80%Percollによる精子洗浄後、精子懸濁液0.8ml中0.2mlを80%Percoll 0.6mlに再懸濁し24時間培養開始し、残りの0.6mlをAIHに供した。

80%Percollによる精子培養においては、培養開始時(0時間)、培養開始後6, 12, 24時間後の精子運動率を200倍顕鏡下にてMakler精子計算盤を用い算定した。

3) 統計学的処理

統計処理はstudent t testおよびpaired t testによりおこない、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

結 果

1) 基礎実験

a) P群 (80%Percoll培養群);

(P群における精子運動率の時間的変化)

図2のように、0時間 80.9 ± 10.3 、6時間 79.0 ± 17.2 、12時間 78.7 ± 10.3 、24時間 $64.9 \pm 16.1\%$ ($M \pm SD$)であった。24時間後には、培養開始(0時間)にくらべて有意に精子運動率の減少が認められた。 ($p < 0.01$)。 (図2)

b) P群とH群 (HAM-F10培養群) の比較;

(80%Percoll (P群)およびHAM-F10(H群)により同時に培養を行った実験において、精子運動率の時間的変化の比較)

図3に示すが如く、(P vs H, $M \pm SD$)、0時間 78.7 ± 7.7 vs 65.3 ± 14.1 、6時間 72.2 ± 19.3 vs 78.5 ± 8.6 、24時間 $58.3 \pm 29.6\%$ vs $51.5 \pm 9.2\%$ 、と両群間に精子運動率の時間的経過に有意な差は認められなかった。両群共培養24時間において有意に運動率の減少が認められた。 ($p < 0.05$) (図3)

c) P群とT群 (HTF培養群) の比較;

(80%Percoll (P群)およびHTF (T群)により同時に培養を行った実験において精子運動率の時間的変化の比較)

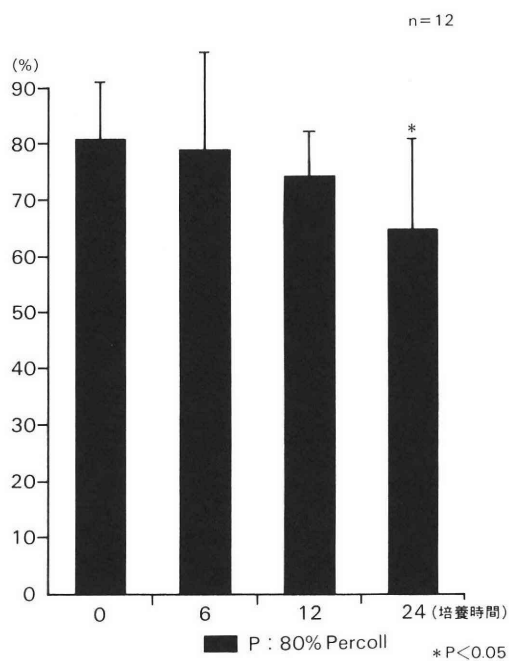


図 2 80%Percoll液培養における精子運動率の時間的変化

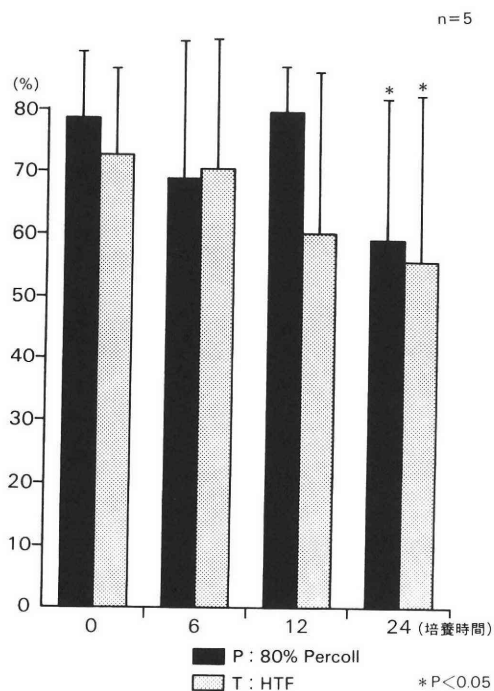


図 4 80%Percoll液 (P) およびHumanTubal Fluid培養 (T) における精子運動率の時間的変化

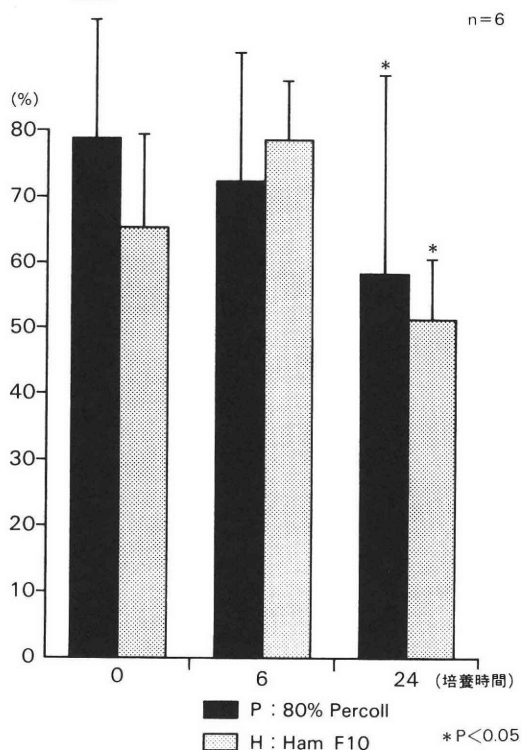


図 3 80%Percoll液 (P) およびHam F10培養 (H) における精子運動率の時間的変化

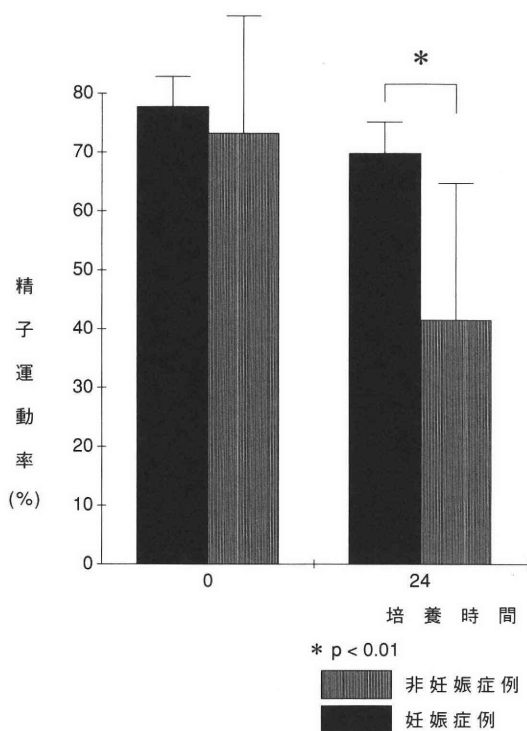


図 5 培養開始時 (0) および24時間培養後 (24) 精子運動率

図 4 に示すが如く、(P vs T,M±SD), 0 時間78.6 ±10.5 vs 72.6±13.9, 6 時間68.8±22.4 vs 70.4±21.0, 12時間79.6±7.2 vs 60.4±25.7, 24時間59.4±22.3 % vs 56.0±26.6 %, と両群間に精子運動率の時間的経過に有意な差は認められなかった. 両群共培養24時間において有意に運動の減少が認められた.(p<0.05) (図 4)

2) Percoll AIHおよび80%PercollによるSST

表 1 全症例, Percoll AIHおよびSST結果
P前m ; Percoll処理前精子運動率 (%)
P前c ; Percoll処理前精子数 (万/ml)
P後m ; Percoll処理後精子運動率 (%)
P後c ; Percoll処理後精子数 (万/ml)
P ; 妊娠例
AIH多 ; AIH頻回施行例
精子 ; 精液因子例

症例	年齢	不妊年数	原因	oh	24h	p前m	p前c	p後m	p後c	妊娠
SI	40	13	精子	46	42	50	6000	60	4000	
HG	33	4	精子	78	33	30	1600	70	1000	
KJ	40	13	精子	80	50	10	4000	70	3000	
UK	39	6	精子	83	9	65	3500	80	7000	
IU	35	6	AIH多	87	26	60	12000	80	7000	
TH	35	14	精子	10	7	20	20000	30	5000	
TY	28	6	精子	55	36	45	4500	80	10000	
HK	30	7	精子	87	29	21	3600	77	2200	
KY	41	8	AIH多	90	77	60	15000	80	20000	
HS	37	8	精子	78	56	35	1500	70	1500	
KS	28	4	精子	75	25	10	3000	80	400	
HI	25	2	精子	70	75	38	9500	70	8000	
KT	34	5	AIH多	89	25	60	1000	80	12000	
YG	30	5	精子	75	75	50	700	90	1000	
YK	37	10	精子	40	13	10	1000	60	2100	
ST	36	10	精子	73	20	19	1600	60	700	
NM	38	10	AIH多	88	26	80	5000	80	25000	
DM	33	2	精子	87	71	60	200	80	800	
HR	33	8	AIH多	94	68	50	6000	80	7000	
UY	45	10	精子	59	40	20	6000	50	1000	
WK	34	3	AIH多	95	79	50	7000	90	10000	
SM	32	4	AIH多	81	80	60	10000	80	20000	P
HD	31	6	AIH多	74	67	65	9700	80	13000	P
HA	32	4	AIH多	73	67	60	7000	80	8000	P
MN	36	2	精子	85	73	50	20000	90	12000	P
SB	34	3	AIH多	82	75	70	10000	80	8000	P
MD	36	2	精子	80	62	30	15000	80	12000	P
KD	34	5	精子	68	66	30	15000	60	15000	P
MEAN	34.5	6.4	74	49	43	6907	74	7096		
SD	4.3	3.5	18	24	20	5519	13	6123		

表 2 24時間培養後精子運動率60%を境界値とした場合の、妊娠例の比較

Sperm survival rate after 24 hrs	No. of patients	Pregnancy
≥60	13	7
<60 %	15	0

表 3 全SST結果 (%)

症例	初回	2回目	3回目	4回目	回数	妊娠	平均
SI	42	24			2		33
MD	62				1	p	62
HD	80				1	p	80
HG	33	68	38		3		46
KD	66	71			2	p	69
KJ	50				1		50
UK	9	9			2		9
KT	25				1		25
MN	73	55			2	p	64
IU	26				1		26
TH	7	12			2		10
SB	75	52			2	p	64
KS	25	75			2		50
TY	36	40	67	73	4		54
HK	29	18	50		3		32
KY	77	10	78		2		55
HS	56				1		56
HA	67	64			2	p	66
HI	75	50			2		63
YG	75				1		75
WK	79				1		79
HR	68				1		68
DM	71				1		71
YK	13				1		13
ST	20				1		20
UY	40				1		40
NM	26				1		26
SM	80				1	p	80
MEAN	49				1.6		50
SD	24				0.8		22

P; 妊娠例

Percoll AIHにより、28症例168周期中、7症例8周期に妊娠が成立した。妊娠率は症例あたり25%、周期あたり4.8%であった。妊娠症例7症例のうちAIH頻回施行例は4症例、精液因子例は3症例であり、妊娠症例全てが原発性不妊であった。また、妊娠症例7症例8周期のうち2症例3周期はhMGによる排卵誘発施行例であり5症例5周期は自然周期にPercoll AIHを行ったものである。全症例のPercoll処理前後の精子数、精子運動率、およびSSTの結果を表1に示した。(表1)

培養開始時(0時間)、および24時間培養後の精子運動率の全症例平均は各各74.0±18.0%、49.0±23.8%(M±SD)であった。

妊娠例、非妊娠例では、0時間。(妊娠例vs非妊娠例、M±SD)77.6±5.6 vs 73.3±20.5%、24時間。(妊娠例vs非妊娠例、M±SD)70.0±5.8 vs 42.0±23.5%であり、0時間では両者間に有意差は認められなかったが、24時間では、妊娠例が非妊娠例よりも有意に精子運動率が高値をとった。(p<0.01)(図5)。

また初回のSSTにおいて培養24時間後の精子運動率が60%を越える13症例のうち7症例に妊娠が成立し60%未満の症例では15症例全例、妊娠が成立しなかった。(表2)。さらに、初回のみならず、施行し得たSSTすべての結果を検討すると、全回、24時間後精子運動率50%以上の症例17例中7例に妊娠が成立し、1回でも50%未満の値をとる症例においては妊娠が成立しなかった。(妊娠例全例、施行し得たすべてのSSTにおいて24時間後精子運動率が50%以上であった)。(表3)

考 察

近年、不妊症治療において特に男性不妊に対する治療が色々な角度から、検討されてきているにもかかわらず適切な解決法が見つからないのが現状である。最近、GIFT、体外受精、顕微受精^{5,6)}等の治療法が試みられているとはいえ、それらの配偶子治療を始める前にどこまで従来の人工授精等の治療をころみたらよいのか明確な指針はない。従って、精子のqualityに対する臨床的アプローチが今迄以上に必要となってきた。

Percoll AIHが臨床に应用されてから精液性状不良症例に一定の成果をあげてきている。佐藤ら⁷⁾は一般臨床治療例の統計解析においてはPercoll洗浄後の精子運動率に関してPercoll AIHによる妊娠例、非妊娠例に有意差は認められないとし、我々も同様の見解を得た。そこで我々はPercoll AIHにより妊娠に至

り得る精子qualityのin vitroでの検索法を検討することを新たに臨床研究課題とした。布施ら⁸⁾はswim-up後の精子を用いSSTを行い、妊娠例、非妊娠例において36時間培養後の精子運動能に有意差を認めた。またMathur et al.⁹⁾は抗精子抗体を用いた実験において24時間精子培養後、抗精子抗体存在下では精子運動能の有意な低下を認めたとしている。さらにDenil et al.¹⁰⁾も人工授精後24時間培養した精子において、その運動性状に男性不妊と正常精液所見症例との間に有意差を認めている。このように精子運動性、その時間耐久性が精子qualityの評価としてひとつの有力な方法となりえることが示唆されてきた。本研究は臨床における精子qualityに対する検討を24時間精子培養法を用い培養後の運動率を比較検討することによりおこなったものである。基礎実験としてPercoll洗浄後の精子を、HAM-F10、HTF等の培養液、80%Percoll液にて培養した。これは1)精子運動率の時間的変化に3者の間にいかなる相違があるかを検討するとともに、2)Percollの成分であるsilica colloidに精子が長時間、暴露されることによる影響ならびに、3)もしPercoll洗浄後、精子を他の培養液に移すことなくひきつづき80%Percollにて培養出来れば、より簡便な操作法となり得る可能性を検討するためである。結果は80%Percoll液と他の培養液間に精子運動率の時間的変化に有意差はなく、3者共、6-12時間培養においておいては培養開始時と比較して運動率に有意な変化は認められず、24時間培養後に始めて運動率の有意な減少を認めた。そこで我々は80%Percoll液を精子培養液として用い得るとし、SSTを行った。結果はPercoll AIHによる妊娠例、非妊娠例では培養開始時における精子運動率に有意差は認められなかったが、24時間後には、妊娠例において有意に運動率が高値であった。このことは、精子洗浄直後の精子運動率よりも24時間経過後の精子運動率がPercoll AIHの妊娠予後と相関をもつものであり、sperm qualityを間接的にはあるが、より正確に示すものと考えられる。

Percoll AIHの予後をみるうえにおいて、24時間培養後の精子運動率が有力な判断材料となることが判明したとしても、運動率のcut off valueをどこにおくかが問題になる。24時間培養後の運動率が60%以上の症例では13症例中7症例に妊娠が成立しており、それ未満では15症例全例妊娠が成立していない。しかしながら今回のSSTは、testを1回のみ行った症例も、複数回行った症例も、条件統一の目的で全て、最初に行ったtestの結果(初回)を検討対象とした。

従って個人のSST(複数回行ったとして)のvariabilityをどのように考察しなければならないのかが今後の課題となる。事実、症例SBの場合、1回目のtestでは24時間培養後の精子運動率が75%であったが2回目は52%であり、其後のPercoll AIH 2回目(SST未施行)で妊娠が成立した。症例MNにおいても1回目73%、2回目55%でありこのとき同時に施行したPercoll AIHにより妊娠が成立している。ただ、妊娠例においては、全例、初回のみならず、施行し得た全てのsurvival testにおいて24時間後精子運動率が50%以上であり1回でも50%未満の値をとる症例には妊娠が成立しなかった。このことから臨床的には50%をcut off valueと考えるのがより妥当であろう。

以上、sperm qualityを、in vitroならびに臨床面より検討してきたが、今後、同一症例における反復したSSTのデータ集積が必要であろう。今回の研究により、不妊症の日常診療において、男性不妊および頻回AIH施行症例に対し、どこまで従来の、Percoll AIHを含む、治療を継続するか、どの時点で顕微受精までの配偶子操作を含む他の診療にきりかえるかの指針の一部にもなり得る可能性が示唆された。

本論文要旨は、第36回日本不妊学会総会(名古屋1991)において発表した。

文 献

- 1) Pertoft H, Laurent TC, Laas T, et al., Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by Polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal Biochem* 88: 271, 1978
- 2) 飯塚理八, 兼子 智, 小埜 清, 配偶者間人工授精へのPercoll精子洗浄濃縮法の応用, およびその分娩例の検討. *産婦人科の世界* 39: 33, 1987
- 3) 小埜 清, 人工授精, 体外受精に供する精子精製法に関する研究—とくにPercoll密度勾配遠心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 (3): 351, 1985
- 4) 真田利男, 攪拌密度勾配法による精子洗浄濃縮—とくに配偶者間人工授精への応用. *慶応医学* 66 (2): 343, 1989
- 5) Bongso TA, Sathanansanm AH, Wong PC, et al., Hman fertilization by micro-injection of immotile spermatozoa. *Human Reproduction* 4: 17, 1989
- 6) Sakkas D, Lacham O, Gainaroli L, et al., Sbjuzonal sperm microinjection in cases of severe male factor infertility and repeated in vitro fertilization failure. *Fertil Steril* 57: 1279, 1992
- 7) 佐藤博久, 木村裕幸, 斎藤 優 他, Percoll攪拌密度勾配法のAIH(配偶者間人工授精)への応

- 用とLife table法による妊娠率の検討. 日産婦会誌 4 (2): 149, 1990
- 8) 布施正樹, 長期培養後の精子運動能評価としてのsperm survival testに関する研究. 日産婦会誌 42 (12): 1678, 1990
- 9) Mathur S, Rosenlund C, Carlton M, et al., Studies on sperm survival and motility in the presence of cytotoxic sperm antibodies. Am J Reproductive Immunology and Microbiology 17: 41, 1988
- 10) Denil J, Ohl DA, Hurd WW, et al., Motility longevity of sperm samples processed for intrauterine insemination. Fertil Steril 58: 436, 1992

**Outcome of intrauterine insemination
using Percoll centrifugation method
and sperm Survival rate**

Yukoku Tamaoka, Kiyoshi Kamei
and Hideyo Nakamura

Department of Obstetrics and Gynecology,
Saiseikai Central Hospital, Tokyo 108, Japan

Kiyoo Tanabe

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University,

In the present study, the predictive value of sperm

motility rate in prognosis of intrauterine insemination was investigated. The sperm motility rate arisen from 24 hours culture after processing for intrauterine insemination using the method of continuous-step Percoll density gradient technique (Percoll AIH) was evaluated. Twenty eight subfertile couples underwent Percoll AIH in 168 cycles from June 1990 to June 1992. In all patients, the 24 hours culture of sperm after processing for Percoll AIH was performed during this study period at least one time and sperm survival rate was compared between the pregnant group (7 cases, 8 cycles) and the non-pregnant group (21 cases, 160 cycles).

Results were as follows. 1) There was no significant difference in the sperm motility rate immediately after processing for Percoll AIH between the two groups (pregnant vs non-pregnant, 77.6 ± 5.6 vs $73.3 \pm 20.5\%$). However, significant difference was found in the sperm motility rate between the two groups 24 hours after processing (pregnant vs non-pregnant, 70.0 ± 5.8 vs $42.0 \pm 23.5\%$).

2) Seven of 13 (54 %) patients whose sperm motility rate 24 hours after processing was more than 60 % conceived by Percoll AIH.

None of 16 patients whose sperm motility rate 24 hours after processing was less than 60 % conceived.

From the above results, the importance of prediction of prognosis from the sperm motility rate 24 after processing for Percoll AIH was postulated.

(受付: 1993年3月11日)

(受理: 1993年6月18日)

補中益気湯の精子運動機能に対する作用
—Penetrak test, hypoosmotic swelling test, computer-assisted
semen analyzerによる検討—

Evaluation of the Effects of Hotyû-ekki-tô on Human Sperm Motility
as Assessed by the Penetrak Test, Hypoosmotic Swelling Test
and Computer-assisted Semen Analyzer

柴原 浩章
Hiroaki SHIBAHARA

宝塚市立病院産婦人科
塩谷 朋弘
Tomohiro SHIOTANI

伊熊 健一郎
Kenichiro IKUMA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Takarazuka Municipal Hospital, Hyogo 665 Japan

男性不妊症に対する治療薬として広く用いられている補中益気湯の、臨床効果ならびにin vitroにおける精子運動能への直接作用につき検討を行い、以下の結果を得た。

(1) 23例の男性不妊症患者に補中益気湯の投与を行い、投与前後の精子濃度、精子運動率、Penetrak値およびhypoosmotic swelling test (HOS test) の総精子膨化率の改善度につき検討した結果、16例 (69.6 %) に有効性を認めた。特に精子運動率とPenetrak値では著明な改善が認められたことから、補中益気湯は精子の運動性の改善に有効であることが示唆された。

(2) 23例のうち、洗浄濃縮法によるAIH治療例も含めて6症例 (26.1 %) が妊娠した。

(3) 補中益気湯を精子培養液に溶解し、in vitroにおける精子運動機能への直接作用をcomputer-assisted semen analyzer (CASA) を用いて分析したところ、0.3~0.4 mg/mlの濃度で精子の運動速度と直進性ともに有意な改善効果が認められた。

以上より、補中益気湯は男性不妊症の中でも特に精子無力症に対する効果が期待される薬剤であり、さらにAIH治療などを併用することにより有用な男性不妊症治療法となりえることが示された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 654 - 660, 1993)

緒言

乏精子症や精子無力症等の男性不妊症は極めて難治性であるが、特発性の男性不妊症に対しては補中益気湯などの漢方製剤が有効である症例もみられる¹⁻⁸⁾。すでに我々は、男性不妊症患者に対して補中益気湯を投与し、精子の濃度や運動率のほか、精子機能検査法であるPenetrak testやhypoosmotic swelling test (HOS test) を用いて、精子の運動能力や受精能力に対する作用についても検討を行い、その有効性も報告してきた⁹⁾。今回は、さらに症例数を追加し

て、男性不妊症患者23例に対する補中益気湯の投与による作用の検討とともに、補中益気湯のin vitroにおけるヒト精子運動能に及ぼす直接作用についてもcomputer-assisted semen analyzer (CASA) を用いて分析したので報告する。

対象および方法

(1) 対象

対象は、1991年8月より1992年9月までの間に当科不妊外来を受信し、精液所見不良例については再検査を施行したうえで男性不妊症 (精子濃度 40×10^6

表1 補中益気湯の臨床効果判定基準-1 (精子濃度及び精子運動率)

判定*	精子濃度 ($\times 10^6$ /ml)		精子運動率 (%)	備 考
	20未満	20以上		
有効 (○)	+10 ↑	+20 ↑	+20 ↑	
不変 (△)	± 10	± 20	± 20	治療前後とも正常値
不変 (▽)	± 10	± 20	± 20	治療前後とも異常値
悪化 (×)	-10 ↓	-20 ↓	-20 ↓	

*寺田らの判定基準 (文献10) を参考とした。

/ml未満または精子運動率60%未満)と診断され、かつ婦人の不妊症検査も完了した23例 (原発性19例, 続発性4例) である

(2) 方法

1. 補中益気湯の臨床効果の検討法

一般精液検査 (精液量, 精子濃度, 精子運動率, 奇形率) と我々が以前に報告した手順⁹⁾によるPenetrak testとHOS testを施行後, ツムラ補中益気湯を1日投与量7.5 gで開始した。服用後約1ヵ月目に各検査を行い, 服用前と服用後の検査成績を比較した。効果判定は寺田ら¹⁰⁾の基準を参考にして設けた表1の判定基準と, 我々⁹⁾がすでに報告した表2の基準によった。すなわち精子濃度については, 表1に示すように補中益気湯投与前が 20×10^6 /ml未満の症例では, 投与後に 10×10^6 /ml以上の増加を有効 (○), 10×10^6 /ml以上の減少を悪化 (×) と判定し, 20×10^6 /ml以上の症例では, 20×10^6 /ml以上の増加を有効 (○), 20×10^6 /ml以上の減少を悪化 (×) として判定した。また精子運動率については, 補中益気湯投与前と比較して投与後に20%以上の増加を有効 (○), 20%以上の減少を悪化 (×) と判定した。ほかには治療前後ともに正常値 (精子濃度 40×10^6 /ml以上, 精子運動率60%以上) であった場合には (△), 治療前後ともに異常値であった場合には (▽) で表現した (表1)。さらにPenetrak testのcut-off値はinstructionに示された30 mm/90 min. を用いて, 補中益気湯の投与前に30 mm/90 min. 未満から投与後に30 mm/90 min. 以上に改善した場合は有効 (○), 投与前に30 mm/90 min. 以上でありながら投与後に30 mm/90 min. 未満に低下した場合は悪化 (×) と判定した。これに含まれない場合は不変と判定し, 治療前後とも30 mm/90 min. 以上の場合は (△), 30 mm/90 min. 未満の場合は (▽) で表現した (表2)。HOS testのcut-off値には著者ら¹¹⁾の報告した総精子膨化率 (T%) 50%とし, 表2のように補中益気湯の投与前に50%未満が投与後に50%

表2 補中益気湯の臨床効果判定基準-2 (Penetrak値及び総精子膨化率)

判定*	Penetrak test (mm/90分)	HOS test 総精子膨化率 (T %)
有効 (○)	30未満→30以上	50未満→50以上
不変 (△)	30以上→30以上	50以上→50以上
不変 (▽)	30未満→30未満	50未満→50未満
悪化 (×)	30以上→30未満	50以上→50未満

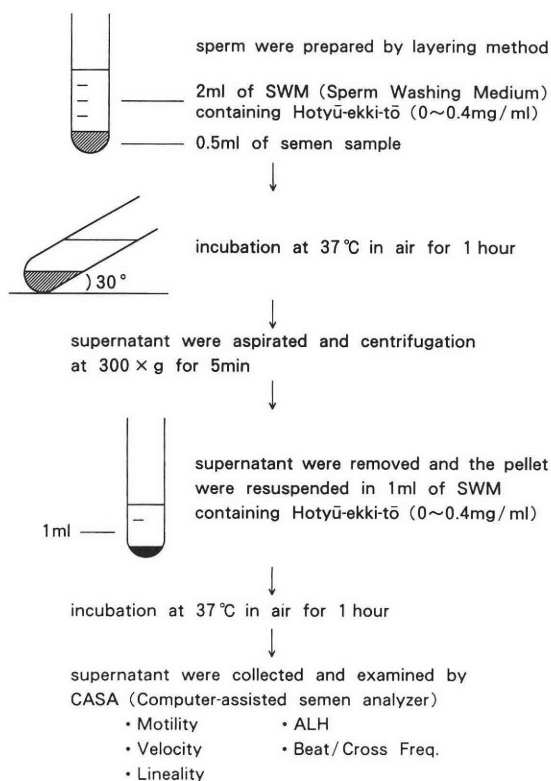


図1 CASAを用いた補中益気湯のin vitroにおける精子運動能に対する影響の検討方法

以上に改善した場合は有効(○), 投与前の50%以上が投与後に50%未満に低下した場合は悪化(×)と表現した. これに含まれない場合は不変と判定し, 治療前後とも50%以上と正常である場合は(△), 治療前後とも50%未満と異常である場合は(▽)で表現した.

2. 補中益気湯のin vitroにおける精子の運動機能に対する作用についての検討法

原精液の精子運動率が50%以上である4名の健康男性volunteerから精液の提供をうけた. sperm washing medium (SWM; Irvine scientific, USA) に粉末化させた補中益気湯を0.1 mg/ml毎に添加し, 0~0.4 mg/mlまで5段階の濃度の溶液を作製した. 図1の如くlayering method¹²⁾で精液0.5 mlに各濃度の補中益気湯添加培養液2 mlを上層し, 37℃ in airで1時間swim-upを行った. 培養液を回収し, 300 Xgで5分間遠心して得られた沈殿に, 再び同一濃度の補中益気湯添加培養液1 mlを各々上層して, 37℃ in airで1時間swim-upを行った. 上清を回収し, CASA (CellSoft 3000, ナック)を用いて精子の運動率(motility), 運動速度(velocity), 直進性(lineality), 精子頭部の平均振幅値(ALH; amplitude of lateral head displacement)と, 精子頭部の振り周波数(Beat/Cross frequency)についての測定を行った.

次に男性不妊症の治療薬として処方される八味地黄丸⁵⁾, 柴胡加竜骨牡蛎湯¹³⁾, 牛車腎気丸¹⁴⁾と, 対照として男性不妊症の治療薬としては処方されていない葛根湯と小柴胡湯の5種類の漢方製剤についても同様に粉末化させ, 0.4 mg/mlとなるようにSWMに添加し, 同様の方法で精子調整を行い, CASAで精子運動機能への作用について検討した. また補中益気湯は10種類の生薬より構成されるが, そのうち従来より精子の運動に影響することが報告されているサイコロ¹⁾の他, ニンジン, タイソウ, カンゾウと, 対照として補中益気湯には含まれていないブシ末を各々0.4 mg/mlずつSWMに添加し, 同様に検討した.

3. 有意差検定

統計学的解析にはFisher検定を用い, 危険率 $p<0.05$ を有意差ありと判定した.

結 果

1. 補中益気湯の臨床効果の検討結果

男性不妊症患者23例に対する補中益気湯投与前後の検査(精子濃度, 精子運動率, Penetrak値ならびにHOS testの総精子膨化率[T %])の結果を表3に示

す. 有意な改善を示す(○)が4項目中1項目もなかった症例と, 1項目でも悪化を示す(×)があった症例の合計7例(30.4%)を無効例(Code 17~23)とし, これらを除外した16例(69.6%)を有効例(Code 1~16)とした. 有効例のうちCode 1~4の4例が洗浄濃縮法による人工授精(AIH)の併用により, またCode 5, 6の2例は補中益気湯の投与のみで妊娠が成立した. なお無効例のうち3症例(Code 17, 18, 20)は精子奇形率が20%以上を示す奇形精子症であったが, 有効例には奇形精子症は存在しなかった.

有効例16例における補中益気湯投与前後の各検査成績を比較した結果を図2に示す. 精子濃度は投与前の $32.9 \pm 23.8 \times 10^6$ /mlが投与後には $46.0 \pm 36.0 \times 10^6$ /mlと有意($p<0.05$)に改善した. 精子運動率は投与前の $51.0 \pm 18.5\%$ が投与後に $78.4 \pm 11.8\%$ と極めて有意($p<0.0001$)に改善した. Penetrak値は投与前の 21.7 ± 10.5 mm/90 min. が投与後には 38.3 ± 8.5 mm/90 min. と有意($p<0.001$)に改善した. 同様にHOS testの総精子膨化率でも投与前の $36.2 \pm 17.1\%$ が投与後には $52.8 \pm 17.7\%$ と有意($p<0.01$)に改善した.

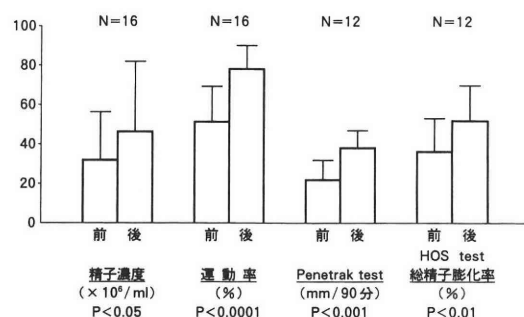


図2 補中益気湯が有効であった16症例の投与前後の各種検査値の比較

2. 補中益気湯のin vitroにおける精子運動機能に対する作用

補中益気湯のin vitroにおける精子運動機能への作用をCASAを用いて検討した結果を図3に示す. SWMに補中益気湯を添加せず精子を処理したcontrolにおけるCASAの平均値は各々, 精子の運動率が $70.0 \pm 12.8\%$, 運動速度が $47.5 \pm 11.7 \mu$ /sec., 直進性が 4.6 ± 0.8 , ALHが $3.0 \pm 0.3 \mu$, またBeat/Cross Freq. は 14.6 ± 1.5 Hzであった. 一方, 補中益気湯を0.1 mg/ml~0.4 mg/mlまで0.1 mg/ml毎にSWMに添加して精子を処理した場合には, 精子運動率, ALH, Beat/Cross Freq. では有意な変化を認めなかったが, SWMに補

表 3 男性不妊症患者23例に対する補中益気湯の治療効果判定と妊娠成立の有無

Code No.	精子濃度 (×10 ⁶ /ml)		精子運動率 (%)		Penetrak値 (mm/90分)		HOS test (T %)		各検査成績の 判定の合計 ○△▽×NT	効果 判定	妊娠 成立の 有無*	備考								
	投与前	投与後	判定	投与前	投与後	判定	投与前	投与後					判定	投与前	投与後	判定				
1	19	35	○	48	90	○	23	44	○	28	56	○	4	0	0	0	0	有効	有り ^a	V
2	30	22	▽	56	86	○	27	42	○	20	56	○	3	0	1	0	0	有効	有り ^a	
3	20	17	▽	48	92	○	26	52	○	60	60	△	2	1	1	0	0	有効	有り ^a	
4	23	35	▽	80	88	△	27	51	○	40	76	○	2	1	1	0	0	有効	有り ^a	
5	56	54	▽	20	80	○	6	29	▽	56	64	△	1	1	2	0	0	有効	有り ^b	
6	83	77	△	52	84	○	NT		NT		1	1	0	0	2	有効	有り ^b			
7	22	63	○	62	76	△	11	38	○	34	50	○	3	1	0	0	0	有効	無し	
8	21	38	▽	69	94	○	24	43	○	20	32	▽	2	0	2	0	0	有効	無し	
9	5	4	▽	48	74	○	7	31	○	34	20	▽	2	0	2	0	0	有効	無し	
10	33	45	▽	90	90	△	35	37	△	40	74	○	1	2	1	0	0	有効	無し	
11	75	149	○	57	66	▽	35	33	△	66	70	△	1	2	1	0	0	有効	無し	
12	9	12	▽	50	56	▽	10	36	○	24	36	▽	1	0	3	0	0	有効	無し	
13	9	12	▽	32	80	○	29	24	▽	12	40	▽	1	0	3	0	0	有効	無し	
14	60	80	○	30	60	○	NT		NT		2	0	0	0	2	有効	無し	T		
15	43	67	○	30	72	○	NT		NT		2	0	0	0	2	有効	無し			
16	18	33	○	44	66	○	NT		NT		2	0	0	0	2	有効	無し			
17	24	4	×	57	78	○	50	32	△	72	56	△	1	2	0	1	0	無効	無し	T
18	13	8	▽	68	58	▽	35	26	×	48	62	○	1	0	2	1	0	無効	無し	T
19	9	14	▽	75	76	△	30	39	△	42	44	▽	0	2	2	0	0	無効	無し	V
20	30	29	▽	73	72	△	47	21	×	64	72	△	0	2	1	1	0	無効	無し	
21	13	18	▽	28	18	▽	3	3	▽	36	28	▽	0	0	4	0	0	無効	無し	
22	20	16	▽	73	86	△	NT		NT		0	1	1	0	2	無効	無し			
23	147	115	×	17	4	▽	NT		NT		0	0	1	1	2	無効	無し			

NT : not tested. V : varicocele術後. T : teratozoospermia

*a : 補中益気湯投与+洗浄濃縮AIH併用による妊娠例, *b : 補中益気湯投与のみの治療による妊娠例

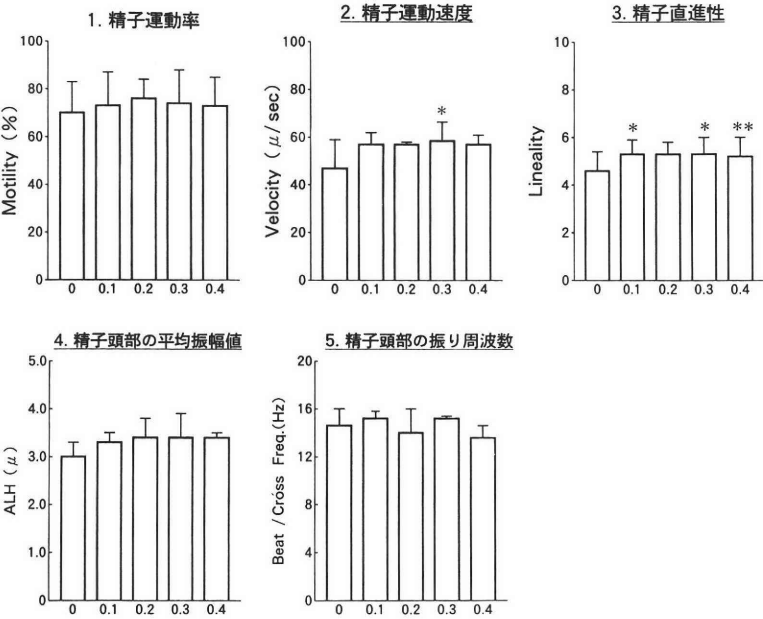


図 3 CASAを用いた補中益気湯のin vitroにおける精子運動能への影響の検討結果 [横軸は補中益気湯濃度 (mg/ml)]

*p<0.05, **p<0.01

中益気湯を0.3 mg/ml添加した場合に、精子運動速度が $58.5 \pm 8.1 \mu/\text{sec.}$ と有意 ($p < 0.05$) に改善した。精子直進性に対しても補中益気湯を0.1 mg/ml添加した場合 5.3 ± 0.6 ($p < 0.05$)、0.3 mg/ml添加した場合 5.3 ± 0.7 ($p < 0.05$)、また0.4 mg/ml添加した場合 5.2 ± 0.8 ($p < 0.01$)と有意な改善を認めた。

3. 補中益気湯以外の漢方製剤のin vitroにおける精子運動機能に対する作用

補中益気湯の培養液中への添加による精子の運動速度と直進性への改善効果が、他の漢方製剤を添加した場合にも認められるのかにつき、2名の健康男性精液を用いて検討した結果を表4に示す。SWMだけで精子を処理した場合の平均値は、運動速度が $60.0 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が4.35であった。一方、補中益気湯をSWMに添加した場合には、運動速度が $66.0 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が5.5と共に図3での結果と同様に改善した。その他の男性不妊症治療薬では、八味地黄丸添加で運動速度が $62.5 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が5.25と改善したが、柴胡加竜骨牡蛎湯や牛車腎気丸では運動速度、直進性共むしろ減弱する傾向を認めた。また男性不妊症治療薬以外の漢方製剤では、葛根湯は運動速度、直進性とも明らかに減弱させ、小柴胡湯添加では運動速度は $56.0 \mu/\text{sec.}$ と減弱したが、直進性は5.0と改善した。

表4 補中益気湯と他の漢方製剤との in vitro における精子運動速度・精子直進性に及ぼす効果の比較

精子培養液に 添加された漢方製剤	精子運動速度 ($\mu/\text{sec.}$)	精子直進性
なし	60.0	4.35
補中益気湯*	66.0	5.50
八味地黄丸*	62.5	5.25
牛車腎気丸*	57.0	4.15
柴胡加竜骨牡蛎湯*	58.5	4.30
葛根湯**	55.0	3.95
小柴胡湯**	56.0	5.0

*：男性不妊症治療薬として処方される製剤

**：男性不妊症治療薬として処方されない製剤

4. 補中益気湯構成生薬のin vitroにおける精子運動機能に対する作用

補中益気湯構成生薬のうち、サイコ、ニンジン、タイソウ、カンゾウの他、補中益気湯には含まれないブシ末を各々SWMに添加し、各生薬が精子の運動

表5 補中益気湯構成生薬のin vitroにおける精子運動速度・精子直進性に及ぼす効果の比較

精子培養液に 添加された生薬	精子運動速度 ($\mu/\text{sec.}$)	精子 直進性	漢方製剤*					
			A	B	C	D	E	F
なし	64.0	4.15						
サイコ	68.0	4.70	○		○	○		
ニンジン	66.0	4.90	○		○	○		
タイソウ	65.0	4.45	○		○○○			
カンゾウ	62.0	4.0	○			○○		
ブシ末	61.5	4.55		○○				

*：○は漢方製剤が、その生薬を含むことを示す

A：補中益気湯，B：八味地黄丸，C：牛車腎気丸，

D：柴胡加竜骨牡蛎湯，E：葛根湯，F：小柴胡湯

速度や直進性に及ぼす影響について、2名の健康男性精液を用いて検討した結果を表5に示す。SWMだけで精子を処理した場合の平均値は、運動速度が $64.0 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が4.15であった。SWMにサイコを添加した場合には、運動速度が $68.0 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が4.7、ニンジンを添加した場合には、運動速度が $66.0 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が4.9、タイソウを添加した場合にも、運動速度が $65.0 \mu/\text{sec.}$ 、直進性が4.45と各々精子運動機能を改善した。しかし、カンゾウを添加した場合には両者共に減弱し、ブシ末を添加した場合には、運動速度は $61.5 \mu/\text{sec.}$ と減弱し、直進性は4.55と改善した。

考 察

基礎疾患のない男性不妊症患者に対する治療法として、造精能力の賦活を目的とする薬物治療に加え、性状不良の射出精液を培養液で濃縮し、qualityの良い精子をできる限り多く受精の場に送り込むことが重要である¹⁵⁾。すでに我々は男性不妊症患者に補中益気湯を投与し、精子の濃度や運動率以外に、精子機能検査法であるPenetrak testとHOS testを用いてその有効性を検討し、補中益気湯が精子の造精機能を反映する総運動精子数を増加させ、また運動能や受精能も改善させることを報告してきた⁹⁾。今回は症例数を増やすとともに、補中益気湯のin vitroでの精子運動機能に対する作用につき、CASAを用いて検討を加えた。

男性不妊症患者23例に補中益気湯を投与した結果を表3に示したが、改善(○)と判定された率は、項目別にみると精子濃度では26.1% (6/23)、精子運動

率では52.2% (12/23), Penetrak値では47.1% (8/17), またHOS testでは35.3% (6/17)であった。この結果からみても、補中益気湯は臨床的には精子の運動性に有効な作用を与えることが示された。また総合的にみると、これらの4つの検査項目中1項目も改善(○)を示さなかった症例と、悪化を示す(×)が1項目でもあった症例とを除く16例(69.6%)に補中益気湯の有効性が認められた。うち6例が妊娠に至り、洗浄濃縮AIHを併用した4症例が含まれていた。この結果は、男性不妊症に対しては補中益気湯のような精子の運動性を増強する効果のある薬剤を投与した上に、精液を濃縮したAIHを組み合わせる治療法が有用であると報告した我々の方針¹⁵⁾を支持するものである。

一方、補中益気湯を培養液に添加してin vitroでの精子の運動性を検討した報告として、田代¹⁶⁾は独自の方法で精子の運動性が持続化されたことを、また広渡¹⁷⁾は我々と同様にCASAを用いて、男性不妊症患者精子11検体のうち6検体で精子運動率の向上を認めたと報告している。一方、光川¹⁸⁾は患者精液と補中益気湯構成生薬のうち、サイコ、ニンジン、タイソウ、カンゾウとを各々in vitroで直接反応させ、サイコだけが精子運動率を上昇させたと報告している。また、補中益気湯のin vitroでの精子の機能面に対する作用について、水谷¹⁸⁾や山野⁶⁾はtriple stain法を用いて検討し、補中益気湯がヒト精子のacrosome reactionを促進したと報告している。さらに山野⁶⁾は男性不妊症患者6例に補中益気湯を投与し、投与前後にハムスターテストを行い、いずれの症例においてもヒト精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入率が増加し、補中益気湯は精子の受精能力を促進すると報告している。

今回我々も補中益気湯を精子培養液SWMに添加し、in vitroにおける精子への直接効果につきCASAを用いて検討したところ、補中益気湯は精子の運動速度と直進性を有意に改善した。このように、精子の運動性をcomputerで自動解析した報告として、Holt¹⁹⁾は精子の運動速度と体外受精やハムスターテストの受精率とがよく相関すると述べ、Grunert²⁰⁾も精子の運動速度と体外受精率とが相関すると報告している。また田崎²¹⁾は速度と直進性の高い精子の存在が妊娠性に必要であり、精子の運動能力を定量的に解析することが重要であると報告している。今回の我々の検討結果から、補中益気湯は受精能力や妊娠性に相関するとされる精子の運動速度や直進性を改善する作用を示し、これは臨床成績とも

一致するものであった。

さらに補中益気湯の構成生薬の中から4種類を選びCASAで分析したところ、サイコ、ニンジン、とタイソウに精子運動能力を改善する効果が観察された。しかし、これらをすべて構成成分とする柴胡加竜骨牡蛎湯や小柴胡湯では精子運動能の改善を示さなかったことから、漢方製剤には複雑な成分間の相互作用が存在する可能性が示唆され、今後この点について検討する必要性があると考えている。

稿を終えるにあたり、本研究に御協力いただきました宝塚市立病院薬剤部薬剤師・吉岡睦展氏と、CellSoft 3000を貸与していただきました株式会社ナックに感謝致します。

本論文の要旨は第86回近畿産科婦人科学会(1992, 京都) および第37回日本不妊学会(1992, 東京)において発表した。

文 献

- 1) 光川史郎, 木村正一, 石川博夫 他, 男性不妊症患者に対する補中益気湯の使用経験. 日不妊会誌 29: 458, 1984
- 2) 吉田英機, 谷藤 匠, 桜井秀樹 他, 乏精子症に対する補中益気湯の臨床的効果について. 泌尿紀要 32: 297, 1986
- 3) 大橋一友, 上浦祥司, 鮫島義弘 他, 補中益気湯の乏精子症に対する治療効果. 産婦世界 39: 1189, 1987
- 4) 木村正一, 佐藤滋彰, 前原郁夫 他, 男性不妊症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
- 5) 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
- 6) 山野修司, 村山真治, 西田莊哉 他, 男性不妊症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
- 7) 野田洋一, 井田憲司, 神崎秀陽 他, 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
- 8) 夏山 知, 野田洋一, 野々垣多加史 他, 補中益気湯の乏精子症に対する効果. 日不妊会誌 36: 843, 1991
- 9) 柴原浩章, 伊熊健一郎, 塩谷朋弘 他, 男性不妊症に対する補中益気湯の有効性に関する検討ーPenetrak testならびにHypoosmotic swelling test (HOS test)を用いてー. 産婦の進歩 45: 76, 1993
- 10) 寺田為義, 里見定信, 風間泰蔵 他, 男性不妊症の治療成績. 日不妊会誌 30: 481, 1985
- 11) 柴原浩章, 辺見貴至, 赤井マリ子 他, ヒト精子

Hypoosmotic swelling testの精子機能検査法としての臨床的意義. 日不妊会誌 38: 241, 1993

- 12) Isojima S and Koyama K, Microtechnique of sperm immobilization test. In: Bratanov K, ed, Immunology of Reproduction. p215, Bulgarian Academy of Science, 1978
- 13) 金城貫亀, 喜久村徳進, 山川義憲 他, 男性不妊症に対する漢方製剤の使用経験. 沖縄医学会雑誌 24: 234, 1987
- 14) 高山秀則, 小西 平, 神波照夫 他, 男性不妊症に対する牛車腎気丸の効果. 泌尿紀要 30: 1685, 1984
- 15) 柴原浩章, 塩谷朋弘, 伊能健一郎, 当科における男性不妊症治療成績の検討. 産婦の進歩 45: 354, 1993
- 16) 田代眞一, 補中益気湯の精子運動持続化作用. 漢方医学 12: 13, 1988
- 17) 広渡恒治, 菅沼信彦, 浅田義正 他, 漢方製剤の精子運動能に対する直接作用の解析. 産婦人科漢方研究のあゆみ 9: 25, 1992
- 18) 水谷哲也, 小栗久典, 石原豊 他, 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
- 19) Holt WV, Moore HDM and Hillier SG, Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. Fertil Steril 44: 112, 1985
- 20) Grunert J-H, DeGeyter C, Bordt J, et al., Does computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results?. Int J Andrology 12: 329, 1989
- 21) 田崎 寛, 大橋正和, 石川博義 他, 精子機能検査法. 産婦治療 62: 909, 1991

Evaluation of the effects of Hotyû-ekki-tô on human sperm motility as assessed by the Penetrak test, hypoosmotic swelling test and computer-assisted semen analyzer

Hiroaki Shibahara, Tomonori Shinotani
and Kenichiro Ikuma

Department of Obstetrics and Gynecology,
Takarazuka Municipal Hospital, Hyogo 665, Japan

Hotyû-ekki-tô is one of the herbal medicines which are known to be effective for the treatment of patients with male factor infertility, but little is known about the mechanism of medications to improve human sperm function. We investigated its effect on human sperm motion parameters, using the Penetrak test, hypoosmotic swelling test (HOS test) and computer-assisted semen analyzer (CASA). Hotyû-ekki-tô was administered to 23 patients with male factor infertility, and 16 of them (69.6 %) showed improvement in routine semen analysis, Penetrak test and HOS test. Marked improvement was observed clinically in the results of the Penetrak test and sperm motility. Pregnancy occurred in 6 cases (26.1 %). Four had been treated with the medicine and AIH, and two with the medicine alone. Hotyû-ekki-tô also showed significant effects in vitro on sperm velocity and lineality as assessed by the CASA.

These findings suggest that Hotyû-ekki-tô is effective, especially for the treatment of infertile patients with asthenozoospermia. We conclude that combined therapy with Hotyû-ekki-tô and AIH is even more useful for male factor infertility.

(受付: 1993年 3月12日)

(受理: 1993年 6月18日)

成熟ネコ卵管の神経支配 ——組織科学的並びに免疫組織化学的観察——

Innervation of the Adult Cat Fallopian Tube — Histochemical and Immunohistochemical Observations —

久留米大学医学部産婦人科学教室

(主任：薬師寺道明教授)

久留米大学医学部第二解剖学教室

(主任：猪口哲夫教授)

宮 嶋 諭

Satoshi MIYAJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Anatomy,
Kurume University School of Medicine, Kurume 830 Japan

成熟ネコの卵管の各部分 (卵管峡部, 卵管膨大部, 卵管采) における Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) -, Substance P (SP) -, Neuropeptide Y (NPY) -, Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) - 陽性神経線維の分布, ならびに古典的なアドレナリン作動性神経線維としての Tyrosine Hydroxylase (TH) - 陽性神経線維およびコリン作動性神経線維としての Acetylcholinesterase (AChE) - 反応陽性神経線維を組織化学的, 免疫組織化学的に観察した。

卵管峡部では CGRP-, SP-, VIP-, TH- 陽性神経線維および AChE-反応陽性神経線維が平滑筋層内に認められた。卵管膨大部では平滑筋層内に認められる神経線維は卵管峡部のものに比しその分布は著しく疎で, むしろ粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って TH-, NPY-, CGRP-, SP- 陽性神経線維が認められた。卵管采では粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って卵管膨大部と同様の神経線維が認められた。

なお, SP- 陽性神経線維は殆ど全て CGRP と同一神経内に共存している特徴があることが二重染色においてすべての部位に認められた。

以上の結果から, 卵管峡部で平滑筋層内に認められるアドレナリン作動性神経線維, コリン作動性神経線維および, CGRP-, SP-, VIP- 陽性神経線維が同卵管部位において平滑筋層の弛緩あるいは収縮の調節を行っていることが示唆された。また, 卵管膨大部, 卵管采の粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められる神経線維は, この部位において血流調整を行っていることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 661 - 670, 1993)

緒 言

卵管は自律神経の豊富な器官とされ, v. Herff (1892)¹⁾以来, 鍍銀法を用いた報告がみられる。

1960年代になると蛍光顕微鏡法 (Falck et al.)²⁾を用いて卵管におけるアドレナリン作動性神経線維の分布が観察されるようになり, ヒト³⁻⁵⁾, ネコ⁶⁾, ラット^{7,8)}, ウサギ⁹⁻¹²⁾などヒトを含む数多くの動物につ

いて報告がある。また同時に AChE 反応を用いてコリン作動性神経線維の分布に関し報告^{5,11,13,14)}がなされている。

近年, 免疫組織化学の発達に伴い上記以外の数多くのペプチドニューロンが卵管においても分布していることが証明されるようになってきた。すなわち, VIP¹⁵⁻²⁹⁾, Substance P^{25-27,29,30)}, NPY^{25-29,31-34)}, CGRP^{29,35-37)}, Neurotensin^{29,38)},

enkephalin^{39,40)}, Bombesin/GRP^{37,41)}, PHI^{25,27)}ニューロンの分布の報告である。

一方、卵管を採卵、卵の輸送といった機能面から考えた場合、卵管に分布する神経線維は如何なる働きを及ぼしているであろうか。さらに卵管の各部位(卵管峡部、卵管膨大部、卵管采)における神経支配の特徴は何であるかについての詳細な報告は少ない。そこで今回の研究では、卵管を卵管峡部、卵管膨大、卵管采に分け、それぞれの形態および各種ペプチドニューロンの分布を比較検討して卵管に対する神経支配の特徴を明らかにしようとした。

使用した抗体は卵管に血管が豊富なことから主に血管作動性ペプチドと言われているものの中よりVIP, NPY, SP, CGRPに対する抗体を用い、これに加えて古典的なアドレナリン作動性神経線維およびコリン作動性神経線維の分布をそれぞれTH-陽性神経線維, AChE-反応陽性神経線維にて観察した。また、SP, CGRPの共存関係についても観察を行った。

材料と方法

実験材料としては成熟ネコ(体重3.0~3.5 kg, 10匹)を使用した。ネコを選んだ理由は①血管灌流固定が可能である、②比較的卵管を卵管峡部、卵管膨大部、卵管采に分けて試料としやすい、③市販されている抗体が使いやすいことなどによる。これらの卵管における形態をHE染色にて観察し、CGRP-, SP-, NPY-, VIP-陽性神経線維の分布及び古典的なアドレナリン作動性神経線維を示すTH-陽性神経線維の分布を免疫組織化学(蛍光抗体法、酵素抗体法)を用いて観察した。また、古典的なコリン作動性神経線維の分布をAChE反応を用いて観察した。

1) HE染色

成熟ネコの筋肉内にセラクター(バイエル社, 0.15 ml/kg)を注射し麻酔を行った。開胸後、大動脈にカニューレを挿入し一方、右心耳を切開し生食水

(ヘパリン含む)にて脱血、Bouin液にて血管灌流固定を行った。次いで卵管を摘出し卵管峡部、卵管膨大部、卵管采に分け上記固定液中にさらに12時間(4℃)浸漬した。その後アルコール系列により脱水しパラフィンに包埋した。切片はHEによる染色を行った後、光学顕微鏡にて観察した。

2) 免疫組織化学

麻酔下にZamboni液(Zamboni and de Martino, 1967)⁴²⁾あるいは4%パラフォルムアルデヒド液にて1)と同様に血管灌流固定を行った。次いで卵管各部を摘出し上記固定液中にさらに12時間(4℃)浸漬した。それぞれ凍結しCryostatにて凍結切片(15μm)を作成した。切片は風乾後、0.3%TritonX-100を含む0.01 Mリン酸食塩緩衝液(以下PBSと記す)中にて24時間(4℃)浸漬した。

i) 蛍光抗体法: 切片は一次抗体(表1)にて48時間(4℃)反応、続いてTexas Red-ラベルあるいはFITC-ラベルの二次抗体(抗ウサギIg, 抗ラットIg, Amersham), 希釈率1:200にて2時間(室温)反応、PBSにて洗浄後グリセリンにて封入し蛍光顕微鏡により観察した。

ii) 酵素抗体法: 切片は非特異的反応を避けるために1% H₂O₂を含むPBSにて30分~1時間(室温)処理し一次抗体(表1)にて48時間(4℃)反応、PBSにて洗浄後ビオチン標識二次抗体(抗ウサギIg, 抗ラットIg, Amersham), 希釈率1:200にて2時間(室温)反応。HPR標識アビジン-ビオチン複合体(ABC, Amersham), 希釈率1:200にて2時間(室温)反応、PBSにて洗浄後3, 3'-ジアミノベンチジン(DAB)にて5分~10分間発色させ光学顕微鏡にて観察した。

iii) 二重染色法: 切片はウサギ抗CGRP抗体(Amersham), 希釈率1:500とラット抗SP抗体(Chemicon), 希釈率1:50の混合液にて48時間(4℃)反応、PBSにて洗浄後FITC-ラベル抗ウサギIg(Amersham)とTexas Red-ラベル抗ラットIg(Amersham)のそれぞれ希釈率1:200の混合液にて

表1 使用抗体と希釈率

抗 体	免疫動物	希 釈 率	
		蛍光抗体法	酵素抗体法
抗VIP (polyclonal, Milab)	ウサギ	1:2500	1:5000
抗SP (monoclonal, Chemicon)	ラット	1:50	1:200
抗CGRP (polyclonal, Amersham)	ウサギ	1:500	1:6000
抗NPY (polyclonal, Cambridge Research Biochemicals)	ウサギ	1:400	1:2000
抗TH (polyclonal, Eugene Tech International)	ウサギ	1:200	1:1000

2時間(室温)反応, PBSにて洗浄後グリセリンにて封入し蛍光顕微鏡により観察した。

iv) 対照実験: おのおのの抗体の特異性を調べるために①一次抗体を除いて反応を進めたもの②二次抗体を除いて反応を進めたもの③ABCを除いて反応を進めたもの④一次抗体を反応前に過剰な抗原にて24時間(4℃)吸収したもの, これらをコントロールとして行った。

3) 組織化学 (AChE反応)

1%パラフォルムアルデヒドと1.25%グルタルアルデヒド混合固定液(0.1Mリン酸緩衝液, pH7.3)による動物の血管灌流固定後に試料を採取し上記固定液に4~5時間(4℃)浸漬した。Cryostatにて凍結切片(15μm)を作成しKarnovsky-RootsのTagoの変法(Tago et al., 1986)⁴³⁾を用いてAChE反応を行った。尚, 非特異的ChE反応をブロックするために1μM iso-OMPA (Sigma) をAChE反応前に使用した。

結 果

1. HE染色

卵管峡部では, 管腔に突出した粘膜ヒダを認めその粘膜固有層内には血管あるいはリンパ管が数多く認められた。筋層はよく発達しており, 比較的厚い輪走平滑筋層と更にその外側に薄い縦走平滑筋層を認めた(写真1a)。

卵管膨大部では, 管腔に突出した粘膜ヒダは著明に発達しておりその粘膜固有層内には卵管峡部におけると同様に豊富な血管, リンパ管を認めた。輪走平滑筋層は卵管峡部と比べて薄くなり, その外側の縦走平滑筋層は更に薄くかつ部分的になっており, しばしば全く観察されない部分が存在した(写真1b)。

卵管采では, 発達した粘膜ヒダを認めその粘膜固有層内には血管, リンパ管が極めて豊富に認められた。明らかな筋層と思われるものは認められなかった(写真1c)。

2. 組織化学及び免疫組織化学的観察

成熟ネコの卵管(卵管峡部, 卵管膨大部, 卵管采)におけるCGRP-, SP-, NPY-, TH-, VIP- 陽性神経線維及びAChE- 反応陽性神経線維を観察した。これら線維個々の分布状態について下記するが, CGRP-, SP-, NPY-, TH- 陽性神経線維は分布密度の差はあるが比較的共通した分布様式を示し一方, これとは異なる分布域をもつものとしてVIP- 陽性神経線維, AChE- 反応陽性神経線維があり, この両者は非常に似た分布を示した。コントロールには反応



写真1 H. E. 染色像 a: 卵管峡部(×100), b: 卵管膨大部(×100), c: 卵管采(×150)

は認められなかった。

i) CGRP- 陽性神経線維

卵管峡部においてCGRP- 陽性神経線維は, 主に平滑筋層内に密な分布を認めた(写真2a)。卵管峡部の粘膜ヒダの粘膜固有層内においては, CGRP-陽性神経線維は乏しく希に血管に沿って認められるのみであった。

卵管膨大部において平滑筋層内におけるCGRP- 陽

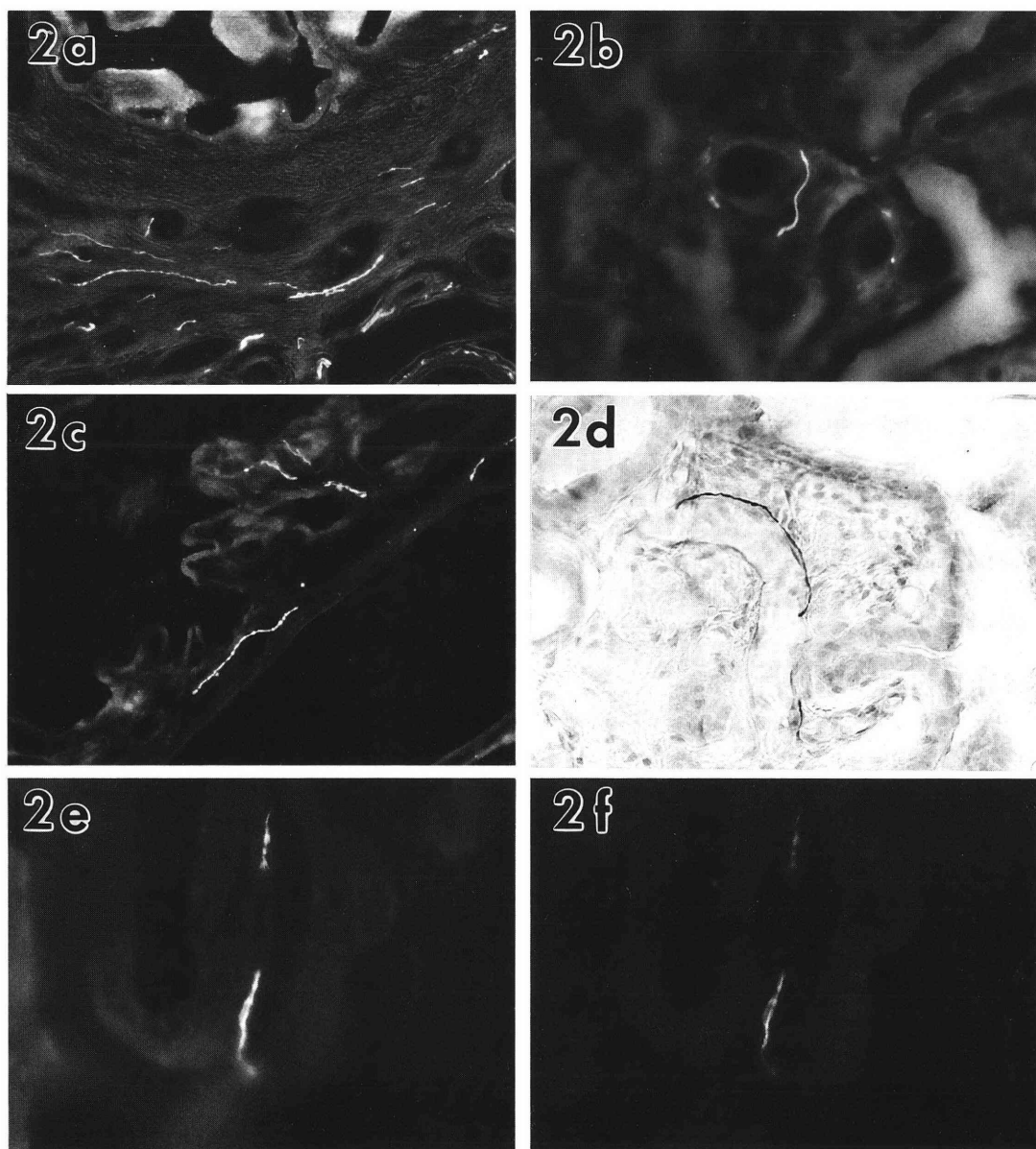


写真2 a: 卵管峡部. CGRP-陽性神経線維が輪走平滑筋層内に認められる. (×100)

b: 卵管膨大部 (×200), c: 卵管采 (×100), d: 卵管采 (ABC法×200), CGRP-陽性神経線維が粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められる.

e, f: 卵管采. CGRP, SPの二重染色像

e: CGRP-陽性神経線維, f: SP-陽性神経線維, 両ペプチドの同一神経内共存が認められる. (×200)



写真3 卵管采, NPY-陽性神経線維(矢印)が粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められる。(×250)

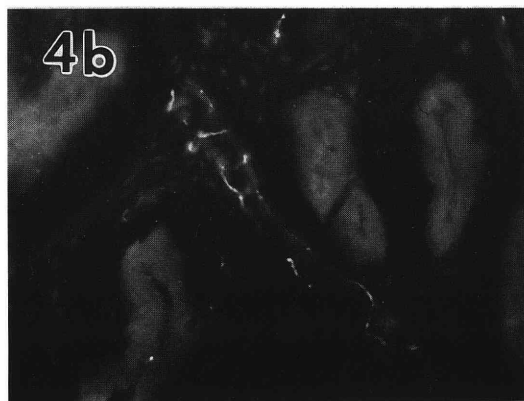


写真4 a: 卵管峡部, TH-陽性神経線維が輪走平滑筋層内に多数認められる。(×200)
b: 卵管膨大部, TH-陽性神経線維が粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認める。(×250)

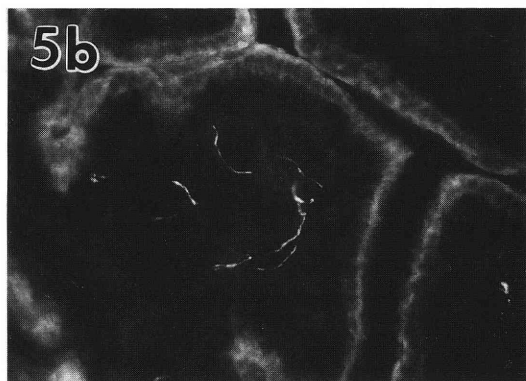
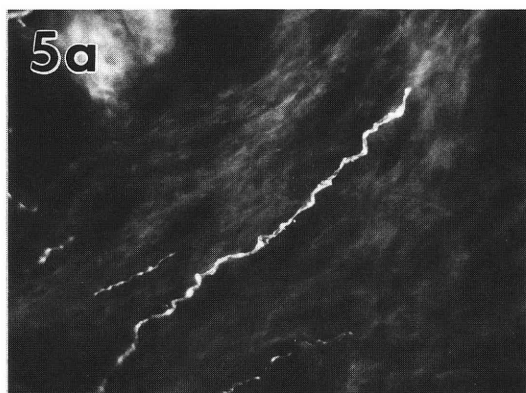


写真5 卵管峡部,

a: VIP-陽性神経線維が輪走平滑筋層内に認められる。(×200)

b: VIP-陽性神経線維が粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められる。(×200)

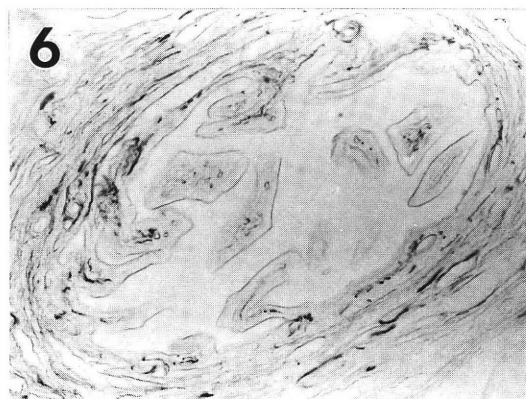


写真6 卵管峡部, AChE-反応陽性神経線維が平滑筋層内及び粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められる。(×100)

性神経線維は、卵管峡部と比べると少なく、主に粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められた(写真2b)。

卵管采においてCGRP-陽性神経線維は、粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められた(写真2c d e)。

ii) SP-陽性神経線維

卵管峡部においてSP-陽性神経線維は、平滑筋層内に希に認められるのみであった。

卵管膨大部、卵管采においては、主に粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められた(写真2f)。しかし、その分布密度はCGRP-陽性神経線維に比べて低かった。

また、卵管峡部、卵管膨大部、卵管采において同一切片に抗SP抗体・抗CGRP抗体を作用させて行った二重染色の観察では、SP陽性を示す神経線維の殆どは抗CGRP抗体に対して反応陽性で両ペプチドの同一神経内共存が認められた(写真2e f)。上述のようにSP-陽性神経線維はCGRP-陽性神経線維より少なく二重染色によりSP-陰性・CGRP-陽性神経線維が多いことが認められた。

iii) NPY-陽性神経線維

卵管峡部においてNPY-陽性神経線維は、ほとんど認められなかった。

卵管膨大部では、主に平滑筋層内に分布する比較的大きな血管をとり巻くようにしてNPY-陽性神経線維を認めた。

卵管采においては、主に粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められた(写真3)。

iv) TH-陽性神経線維

卵管峡部においてTH-陽性神経線維は、平滑筋層内に豊富に認められたが、粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管にはほとんど認められなかった(写真4a)。

卵管膨大部においてその平滑筋層内におけるTH-陽性神経線維は急速に乏しくなり、主に粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められた(写真4b)。

卵管采においては、粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って豊富に認められた。

v) VIP-陽性神経線維

卵管峡部においてVIP-陽性神経線維は、平滑筋層内及び粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って非常に豊富に認められた(写真5a b)。

しかし、卵管膨大部、卵管采においてはVIP-陽性神経線維はほとんど認められないか、認められてもその数は非常に少なかった。

vi) AChE-反応陽性神経線維

卵管峡部においてAChE-反応陽性神経線維は、VIP-陽性神経線維の場合と同様に平滑筋層内に分布すると共に又粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って認められた(写真6)。

卵管膨大部、卵管采においては、ほとんど認められなかった。

考 察

卵管の形態においてその機能を考える時、平滑筋の分布が重要と考えられる。成熟ネコ卵管の卵管峡部では、良く発達した輪走平滑筋層とその外側に縦層平滑筋層が観察された。卵管膨大部では、輪走平滑筋層は比較的薄くなり、その外側には発達の悪い縦走平滑筋層を認めた。また、一般にヒトやウサギの卵管では、輪走平滑筋層の内側に縦走平滑筋層が存在するがネコ卵管においては認められなかった。卵管采においては、明らかな平滑筋層は認められず、その粘膜ヒダの粘膜固有層においても平滑筋は認められなかった。卵管膨大部、卵管采を通じてよく発達した粘膜ヒダの粘膜固有層内には、非常に良く血管が発達しており、この部分における血流の豊富さが示唆された。

卵管は、古くより自律神経が豊富な器官の一つとして記載⁴⁾され、交感神経系、副交感神経系の両神経系による支配があるとされてきた。組織化学的研究技術の発達に伴い、1960年～1970年にかけてアドレナリン作動性神経線維、コリン作動性神経線維それぞれの卵管における分布が各種動物について研究報告³⁻¹⁴⁾され、卵管の部位別による分布は比較的共同していることが知られるようになった。すなわち、ウサギの卵管 (Brundin et al., Sjöberg et al., Owman et al.)⁹⁻¹²⁾におけるアドレナリン作動性神経線維の分布の観察では、子宮卵管接合部、卵管峡部の輪走平滑筋層への豊富な分布および卵管膨大部、漏斗部における卵管壁内血管周囲への分布が報告された。ヒト卵管 (Brundin et al., Owman et al., Kubo et al.)³⁻⁵⁾、ネコ卵管 (Rosengren et al.)⁶⁾、ラット卵管 (Norberg and Fredricsson, Brundin et al.)^{7,8)}による観察においても、アドレナリン作動性神経線維がウサギの場合と同様の分布を示すことが報告されている。今回の研究では、ネコ卵管についてノルアドレナリン合成経路の重要酵素であるtyrosine hydroxylase (TH) - 陽性神経線維を免疫組織化学的方法にて観察したが、これが従来のアドレナリン作動性神経線維に関する報告とほぼ同様な分布を示す結果を得た。コリン作動性神経線維の分布については、

Jacobowitz et al.¹⁴⁾がネコ卵管においてAChE-反応陽性神経線維が輪走平滑筋層及び粘膜固有層に分布すると記載している。しかし、卵管のどの部位についての所見なのかについては明らかに示していない。ウサギ卵管 (Owman et al.)¹¹⁾、ヒト卵管 (Kubo et al.)⁵⁾ による観察においては、卵管峡部においてのみAChE- 反応陽性神経線維が認められ、それらは主に輪走平滑筋層内に分布しており、粘膜固有層内にはまばらにのみ分布していたと報告されている。今回のネコによる観察でも卵管峡部の平滑筋層と粘膜ヒダの粘膜固有層内にAChE- 反応陽性神経線維を認め、卵管膨大部、卵管采においては同線維は認めなかった。著者の観察所見はこの点でJacobowitz et al.¹⁴⁾と同様な結果であったが、更に著者は粘膜ヒダの粘膜固有層内において認められたAChE- 反応陽性神経線維は殆どすべて血管に沿っていることを示した。

これらの結果より、まず古典的な分類におけるアドレナリン作動性神経、コリン作動性神経による神経支配様式についてまとめて考察すると、1) ネコの卵管峡部では平滑筋層に豊富な両神経線維の分布を認め、両神経線維による平滑筋層の調節がなされていることが示唆されるとともに、卵管膨大部、卵管采には、コリン作動性神経線維が殆ど分布しておらず専らアドレナリン作動性神経線維が優位であり、この神経線維が主に平滑筋の調節に深く関わっていること、2) 卵管粘膜固有層に豊富に存在している血管は、卵管峡部においてはコリン作動性神経支配を受けているが、卵管膨大部並びに卵管采においては専らアドレナリン作動性神経線維のみが分布していることが示唆された。

近年、免疫組織化学の発達に伴い、いわゆる自律神経を単純にアドレナリン作動性神経、コリン作動性神経に分類する考え方は古典的なものとなり、各種のペプチドニューロンの存在が卵管においても報告¹⁵⁻⁴¹⁾されるようになってきた。今回の研究では、卵管に血管が良く発達しているという組織学的特徴に注目し、上述のTH- 陽性神経線維、AChE- 反応陽性神経線維とともに血管作動性ペプチドとされているCGRP、SP、NPY、VIPについてこれを伝達物質とするニューロンの観察を行った。

CGRP-陽性神経線維の卵管における分布の報告はいろいろな哺乳動物を用いてなされている^{29,35-37)}しかし、ネコに関する報告はなく、かつ卵管において部位別特徴に言及して報告したものもない。Ghatei et al.³⁵⁾はラット卵管においてCGRP- 陽性神

経線維は主に上皮に接していると報告した。また、Häppölä et al.³⁷⁾はラット、モルモット、ブタを用いてCGRP- 陽性神経線維が卵管壁に分布する血管と輪走平滑筋層へ分布していると報告した。ヒト卵管による報告はSamuelson et al., Reinecke et al.^{29,36)}によってなされており、卵管の全長にわたる筋層及び血管にCGRP- 陽性神経線維が分布していると記載した。今回の研究によりCGRP- 陽性神経線維が、ネコの卵管峡部においては主に平滑筋層に分布していること、卵管膨大部、卵管采においては、急速に平滑筋層への支配が乏しくなり、粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管周囲に分布していることが判明した。

SP- 陽性神経線維の卵管における存在についての報告^{25-27,29,30)}では、動物の種類によって分布密度の差を認めている。ネコ卵管における報告は、Alm et al.³⁰⁾によってなされているが卵管のどの部位にどのように分布しているかについては記載していない。今回の著者の観察においては、卵管峡部、卵管膨大部の輪走平滑筋層へ分布密度は少ないがSP- 陽性神経線維が来ていることおよび卵管膨大部、卵管采では主に粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に分布していることが特徴であった。

また、CGRP、SPの両ペプチドは他の器官の支配神経においてしばしば同一ニューロンに共存する可能性があることが知られているが、卵管支配神経に関して報告されたものは著者の知る限りにおいて未だない。今回の二重染色による観察結果では、すべての部位においてSP- 陽性神経線維はそのほとんどがCGRP陽性で、両ペプチドの同一神経内共存が証明された。これはこの部位における感覚神経として機能していることが示唆される。しかし、CGRP陽性を示す神経線維の大部分はSP陰性の神経線維であり、SP- 陽性神経線維のなかにもごくわずかであるがCGRP陰性の神経線維が存在し、これらは遠心性に作用を及ぼす神経線維としての働き、即ち特にここでは平滑筋層並びに血管平滑筋作動性神経線維としての働きが十分に考えられた。

NPY- 陽性神経線維は各種動物においてその卵管に豊富に分布しているという報告が多い^{25-29,31-34)}。しかし、ネコ卵管における報告は無い。Samuelson et al.³²⁾は、ヒト卵管を卵管峡部、卵管膨大部、卵管采に分けそれぞれのNPY- 陽性神経線維の分布を観察し、これらの部分における血管とすべての筋層への分布及び卵管峡部での密な分布について報告した。今回のネコ卵管を用いた研究ではNPY- 陽性神経線維は卵管峡部には疎にしか分布しておらず、ヒト卵管

峡部における報告と明らかな分布の違いが認められた。また、ネコ卵管膨大部、卵管采においては血管壁に豊富な分布が観察され、この部位における血流の調節に関与していることが示唆された。

VIP-陽性神経線維の卵管における報告はペプタイドニューロンに関するものの中では最も多く、部位的特徴について記載しているものも少なくない。Alm et al.¹⁹⁾, Lynch et al.²⁰⁾, Helm et al.²²⁾はヒト卵管峡部の平滑筋層と上皮下の粘膜固有層内に豊富なVIP-陽性神経線維を認めることを報告し、Ström et al.²¹⁾はヒト子宮卵管接合部の平滑筋層においてVIP-陽性神経線維の分布密度が高くなることを報告した。ネコを含む各種動物についての報告でも分布密度に差はあるもののヒトと同様の結果が得られている^{15~17,23,25~27)}。今回のネコを用いた観察でも同様に卵管峡部の平滑筋層及び粘膜ヒダの粘膜固有層内に豊富なVIP-陽性神経線維を認め、さらに、粘膜固有層内においてそれは専ら血管に沿って走行していた。この結果から過去の報告においてヒト及び各種動物卵管の上皮下の粘膜固有層内に分布するとのみ記載されていたものも、血管に沿うものを示していた可能性があると思われる。卵管峡部における平滑筋層の調節にVIP-陽性神経線維が深く関与していることも示唆された。

以上のように、ネコ卵管においては部位によってその神経支配が大きく異なる特徴があることが分かる。すなわち、卵管峡部では平滑筋層にTH-陽性神経線維及びAChE-反応陽性神経線維が密であること、他にCGRP-, VIP-陽性神経線維も豊富である。卵管膨大部、卵管采では平滑筋層に対する神経支配が次第に失われ、神経線維は主に粘膜ヒダの粘膜固有層内の血管に沿って観察されることである。また、ここではCGRP-, TH-, NPY-陽性神経線維の分布が認められる。卵管壁に著明に発達している血管の神経支配という観点から見ると、卵管峡部とこれより末梢端とではやや相違があることが注目される。卵管峡部の血管は主にAChE-反応陽性神経線維、VIP-陽性神経線維により支配されており、卵管膨大部、卵管采のものではTH-, NPY-, CGRP-陽性神経線維が主である。これはおそらく卵管の部位に到達する神経線維が異なる幹神経から由来していることを示唆するものである。これらの神経支配の特徴から、卵管峡部およびこれに連なる卵管膨大部においてはこの部分の平滑筋層の収縮、弛緩をTH-, CGRP-, VIP-陽性神経線維およびAChE-反応陽性神経線維が調節し、これによって卵管内の卵の輸送に大きな役割を

はたしていること、および卵管采においては神経線維の機能は粘膜固有層内の血流の調節が主であろうと考えられる。卵管采の部分に平滑筋層がほとんど認められず血管が非常に豊富であるというネコ卵管采の形態的特徴から考えて、排卵された卵子を採卵する時期に一致してこの部分の血流が神経性の調節を受けて豊富になり、卵管采の粘膜ヒダの各々が膨れ卵管采が卵巣を包み込み、卵管采と卵巣との接する部分が広くなることで採卵をしやすくしているということが推察される。この変化はヒトやウサギなどの他の哺乳動物の卵管采においても血管が非常に発達しているという共通の形態的特徴から考えて同様の現象が起こっていることが十分に示唆される。しかし、ヒトやウサギの卵管采の粘膜固有層には平滑筋層が認められており、ネコの場合とは違ったメカニズムも働いている可能性は今後検討される必要がある。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師 久留米大学医学部産婦人科学教室 薬師寺道明主任教授、同第二解剖学教室 猪口哲夫教授ならびに御指導、御助言いただいた九州産業大学教養部生物 安藤光一教授、本学産婦人科学教室 岩永成見講師、同第二解剖学教室の諸先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) vHerff O, Über den feineren Verlauf der Nerven im Eierstocke des Menschen. Z Geburtsh Gynäkol 24: 289, 1892
- 2) Falck B, Hillarp N-Å, Thieme G, et al., Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J Histochem Cytochem 10: 348, 1962
- 3) Brundin J, Wirsén C, Adrenergic nerve terminals in the human fallopian tube examined by fluorescence microscopy. Acta Physiol Scand 61: 505, 1964
- 4) Owman CH, Rosengren E, Sjöberg N-O, Adrenergic innervation of the human female reproductive organs: A histochemical and chemical investigation. Obstet Gynecol 30: 763, 1967
- 5) Kubo K, Kawano J, Ishii S, Some observations on the autonomic innervation of the human oviduct. Int J Fertil 15: 30, 1970
- 6) Rosengren E, Sjöberg N-O, The adrenergic nerve supply to the female reproductive tract of the cat. Am J Anat 121: 271, 1967
- 7) Norberg K-A, Fredricsson B, Cellular distribu-

- tion of monoamines in the uterine and tubal walls of the rat. *Acta Physiol Scand* 68 suppl 277: 149, 1966
- 8) Brundin J, Fredricsson B, Norberg K-A, et al., The sympathetic innervation of the oviduct in the rat. *Acta Physiol Scand* 75: 69, 1969
 - 9) Brundin J, Wirsén C, The distribution of adrenergic nerve terminals in the rabbit oviduct. *Acta Physiol Scand* 61: 203, 1964
 - 10) Brundin J, Histochemical observations on the distribution of adrenergic nerve terminals in rabbit oviducts. *Acta Physiol Scand* 66 Suppl 259: 14, 1965
 - 11) Owman CH, Sjöberg N-O, Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Z Zellforsch* 74: 182, 1966
 - 12) Sjöberg N-O, Increase in transmitter content of adrenergic nerves in the reproductive tract of female rabbits after oestrogen treatment. *Acta Endocrinol* 57: 405, 1968
 - 13) Gerebtzoff MA, Cholinesterases. In: *A Histochemical Contribution to the Solution of Some Functional Problems*. p154, Pergamon, 1959
 - 14) Jacobowitz D, Koelle GB, Histochemical correlations of acetylcholinesterase and catecholamines in postganglionic autonomic nerves of the cat, rabbit, and guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 148: 225, 1965
 - 15) Larsson L-I, Fahrenkrug J, Schaffalitzkyde Muckadell OB, Vasoactive intestinal polypeptide occurs in nerves of the female genito-urinary tract. *Science* 197: 1374, 1977
 - 16) Alm P, Alumets J, Håkanson R, et al., Origin and distribution of VIP(Vasoactive Intestinal Polypeptide)-nerves in the genito-urinary tract. *Cell Tissue Res* 205: 337, 1980
 - 17) Alm P, Alumets J, Håkanson R, et al., Peptidergic (vasoactive intestinal peptide) nerves in the genito-urinary tract. *Neuroscience* 2: 751, 1977
 - 18) Bishop AE, Polak JM, Bloom SR, Vasoactive intestinal polypeptide innervation of the genital tract of women. *J Endocrinol* 81: 141, 1979
 - 19) Alm P, Alumets J, Håkanson R, et al., Vasoactive intestinal polypeptide nerves in the human female genital tract. *Am J Obstet Gynecol* 136: 349, 1980
 - 20) Lynch EM, Wharton J, Bryant MG, et al., The differential distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the normal human female genital tract. *Histochemistry* 67: 169, 1980
 - 21) Ström C, Lundberg JM, Ahlman H, et al., On the VIP-ergic innervation of the uterotubal junction. *Acta Physiol Scand* 111: 213, 1981
 - 22) Helm G, Ottesen B, Fahrenkrug J, et al., Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the human female reproductive tract. Distribution and motor effects. *Biol Reprod* 25: 227, 1981
 - 23) Ottesen B, Larsen J-J, Fahrenkrug J, et al., Distribution and motor effect of VIP in female genital tract. *Am J Physiol* 240: E32, 1981
 - 24) Owman CH, Helm G, Sjöberg N-O, Non-adrenergic, non-cholinergic neurogenic relaxation mediated by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the isthmus of the human fallopian tube. *Int J Fertil* 28: 12, 1983
 - 25) Huang WH, Gu J, Blank MA, et al., Peptide-immunoreactive nerves in the mammalian female genital tract. *Histochem J* 16: 1297, 1984
 - 26) Papka RE, Cotton JP, Taurig HH, Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res* 242: 475, 1985
 - 27) Kannisto P, Ekblad E, Helm G, et al., Existence and coexistence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry* 86: 25, 1986
 - 28) Blank MA, Gu J, Allen JM, et al., The regional distribution of NPY-, PHM-, and VIP-containing nerves in the human female genital tract. *Int J Fertil* 31 (3) : 218, 1986
 - 29) Reinecke M, Gauwerky JFH, Schneider K, Peptiderge (NPY, NT, VIP, SP, CGRP) Innervation der funktionellen Systeme des Uterus und der Tube des Menschen. *Arch Gynecol Obstet* 245 (1-4): 399, 1989
 - 30) Alm P, Alumets J, Brodin E, et al., Peptidergic (substance P) nerves in the genito-urinary tract. *Neuroscience* 3: 419, 1978
 - 31) Allen JM, Yeats JC, Blank MA, et al., Female urogenital tract contains high concentrations of neuropeptide Y. *Regul Pept* 7: 272, 1983
 - 32) Samuelson UE, Dalsgaard C-J, Action and localization of Neuropeptide Y in the human fallopian tube. *Neurosci Lett* 58: 49, 1985
 - 33) Owman CH, Stjernquist M, Helm G, et al., Comparative histochemical distribution of nerve fibers storing noradrenaline and neuropeptide Y (NPY) in human ovary, fallopian

tube and uterus. *Med Biol* 64: 57, 1986

- 34) Heinrich D, Reinecke M, Gauwerky JFH, et al., Immunohistochemical and biological evidence for a neuromodulator function of neuropeptide Y in the human oviduct. *Arch Gynecol Obstet* 241: 127, 1987
- 35) Ghatei MA, Gu J, Mulderry PK, et al., Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in the female rat urogenital tract. *Peptides* 6: 809, 1985
- 36) Samuelson UE, Dalsgaard C-J, Lundberg JM, et al., Calcitonin Gene-Related Peptide inhibits spontaneous contractions in human uterus and fallopian tube. *Neurosci Lett* 62: 225, 1985
- 37) Häppölä O, Lakomy M, Immunohistochemical localization of calcitonin gene-related peptide and bombesin/gastrin-releasing peptide in nerve fibers of the rat, guinea-pig, and pig female genital organs. *Histochemistry* 92: 211, 1989
- 38) Reinecke M, Neurotensin in the human fallopian tube: immunohistochemical localization and effects of synthetic neurotensin on motor activity in vitro. *Neurosci Lett* 73: 220, 1987
- 39) Alm P, Alumets J, Håkanson R, et al., Enkephalin-immunoreactive nerve fibers in the feline genito-urinary tract. *Histochemistry* 72: 351, 1981
- 40) Häppölä O, Lakomy M, Yanaihara N, Met⁵-enkephalin-and Met⁵-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-immunoreactive nerve fibers in the pig female reproductive system. *Neurosci Lett* 101: 156, 1989
- 41) Ghatei MA, Gu J, Allen JM, et al., Bombesin-like immunoreactivity in female rat genito-urinary tract. *Neurosci Lett* 54: 13, 1985
- 42) Zamboni L, De Martino C, Buffered picric acid-formaldehyde. A new, rapid fixative for electron microscopy. *J Cell Biol* 35: 148A, 1967
- 43) Tago H, Kimura H, Maeda T, Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J Histochem Cytochem* 34: 1431, 1986
- 44) Woodruff JD, Pauerstein CJ, The fallopian tube. p37, The Williams & Wilkins Co, 1969

Innervation of the adult cat fallopian tube — Histochemical and immunohistochemical observations —

Satoshi Miyajima

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kurume University School of Medicine,
Kurume 830, Japan
(Director: Prof. Michiaki Yakushiji)
Department of Anatomy,
Kurume University School of Medicine,
Kurume 830, Japan
(Director: Prof. Tetsuo Inokuchi)

The distribution of nerve fibers in the Fallopian tube of cats was investigated by histochemical and immunohistochemical methods. The nerve fibers, immunoreactive to calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and tyrosine hydroxylase (TH), and also acetylcholinesterase (AChE) -positive nerve fibers were observed in the isthmus, ampulla and fimbria of the Fallopian tube.

CGRP-, SP-, VIP-, TH-immunoreactive and AChE-positive nerve fibers were found in the smooth muscle layer of the isthmus. In the ampulla, TH-, NPY-, CGRP- and SP-immunoreactive nerve fibers were rarely seen in the muscular layer, and they were preferably associated with the blood vessels in the muscosal lamina propria. In the fimbria, TH-, CGRP- and SP-immunoreactive nerve fibers were found around blood vessels in the mucosal folds. The coexistence of the SP and CGRP in a single nerve fiber were demonstrated in all parts of the Fallopian tube by using double staining method.

These results suggest that AChE-positive and TH-, CGRP-, SP- and VIP-immunoreactive nerve fibers may induce the contraction or relaxation of smooth muscles in the isthmus, while TH-, NPY-, CGRP- and SP-immunoreactive nerve fibers may regulate the blood flow in the ampulla and fimbria.

(受付: 1993年 5月 7日特掲)

(受理: 1993年 6月18日特掲)

当クリニックにおける不育症の原因と 柴苓湯療法を中心にした治療成績の解析

Analysis of Etiology and Therapy with SAIREI-TO of Habitual Abortion in Our Clinic

医療法人 假野クリニック

假野 隆 司
Takashi KANO

古 殿 正 子
Masako FURUDONO
石 井 みさ子
Misako ISHII

奥 山 恵 子
Keiko OKUYAMA

Kano Clinic, Osaka 542, Japan

妊娠周期の不妊因子に異常を認めない60例の反復流産の原因ならびに最終妊娠経過を解析、それ等の治療成績を検討した。原因のなかではHLAクラスII抗原2個以上共有が最も高率で、ついで妻のDR4抗原保有、抗核抗体陽性、抗cardiolipine IgM抗体陽性、染色体異常(転座)の順であった。因子別の妊娠経過は染色体異常とDR4抗原保有不育症ではGS確認以上の症例が高率であり、抗cardiolipine IgM抗体陽性不育症はHCG確認だけに終わった症例(超早期流産)が高率であった。

治療による流産阻止率は夫リンパ球移植(HLAクラスI・II抗原2個以上共有)が77.3%と最も高率で、次いで柴苓湯(DR4抗原保有、抗核抗体陽性、抗cardiolipine IgM抗体陽性)療法の順であった。さらに夫リンパ球移植を行なったにもかかわらず流産を繰り返す症例に対して柴苓湯併用療法を行なったところ66.7%の流産阻止率が得られた。

以上の結果より不育症のなかには超早期流産を反復する症例がかなり存在するため、機能性不妊症ないし原因不明不妊症と診断されている症例のなかには習慣性超早期流産がかなり含まれていると推測された。したがって、そのような症例では速やかに不育症因子を検討する必要があると考えられた。また、不育症治療において柴苓湯は重要な地位を占めると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 671 - 679, 1993)

緒 言

近年、流産の原因解明が進むなかで治療法が明らかになってきた^{1,2)}ことで不育症(習慣性流産)の概念が定まってきた。しかし、不妊症診療においては体外受精-胚移植・顕微授精に代表されるように受精・卵割にかかわる治療は飛躍的に進歩してきた反面、着床不全の診断、治療は遅々として進んでいないのが現状である。

厳密な意味での不育症の原因は染色体異常を除けば、着床以降に発症する免疫障害に基づく胎児拒絶が主因と推測される。さらに、機能性不妊症と診断

されている原因不明不妊症の主因も着床障害と推測され、不育症と同根の疾患の可能性が高い。したがって、不育症の原因ならびに治療法の解明は現在最も難治な不妊症である機能性不妊症の克服に大きな貢献を果す期待が大きい。

今回は我々のクリニックの不育症の原因を分析するとともに、抗核抗体・抗リン脂質抗体陽性不育症に有効であることが明らかになっている柴苓湯療法³⁾を中心にした治療成績を解析することで、同症の病因が母児間の免疫応答の異常による胎児の免疫的拒絶にあるとの仮定のもとに診断治療学的に推論をすすめる、不育症の診断、治療を機能性不妊症に展開

することを試みた。

対象と方法

1991年1月から12月に当クリニックに通院した患者のなかで過去に分娩の既往がない流産は185例あり、このなかで妊娠周期の不妊症因子²⁾に異常が認められない流産の既往を少なくとも1回有し、子宮筋腫・子宮形態異常・頸管不全症・甲状腺機能障害を合併していない結婚後5年以上を経過した患者は60例であった(図1)。年齢は25歳から44歳で平均34.2歳である。

以上の60例を対象にして患者の合意のもとに染色体、HLA抗原(class I抗原, class II抗原: DR-locus; DR 1, DR 2, DR 3, DR 4, DRW 6, DR 7, DRW 8, DR 9, DRW10, DRW11 (5), DRW12 (5), DRW 52, DRW53, DQ-locus; DQW 1, DQW 2, DQW 3), 抗核抗体, 抗DNA抗体, 抗cardiolipine IgM抗体を調べ、夫婦でHLAクラスII抗原を2個以上共有している症例には夫リンパ球移植(フィコールコンレイ法で20 mlの血液からリンパ球を分離, 2週間おき4回を1クール, 妊娠成立後3回), HLA-DR 4 抗原保有例, 抗核抗体, 抗cardiolipine IgM抗体陽性例には柴苓湯(ツムラ, 9.0 g/day, 不妊治療と並行, 妊娠成立後12週まで) 療法を行ないその後適宜抗核抗体, 抗cardiolipine IgM抗体価を調べた。夫リンパ球移植後にもかかわらず流産に終わった症例と不妊であった症例の一部には柴苓湯・夫リンパ球移植併用療法を行なった。

また, 抗核抗体, 抗cardiolipine IgM抗体陽性者に対する柴苓湯の治療効果を検討するために上記の期

間以後に発生した症例を追加した。結果は $M \pm SD$ で示し, 平均値の有意検定はStudent's t-testで, 百分率の有意検定は χ^2 -testで行なった。

結 果

185例の流産の原因をretrospectiveに考察すると, 黄体機能不全などの不妊因子に問題があったのは125例で残り60例(32.4%)が原因不明であった。

60例の最終妊娠経過は一般的な不育症の妊娠診断基準とされる胎囊(GS)を確認した既往を3回以上有しているのは12例(20.0%; heart beat確認例も含む), GS確認1回ないし2回は26例, HCG確認(RIA法による血中HCG, HCG β ダイナパック迅速EIA法による血中HCG β およびHCGテストバックによる尿中HCG⁴⁾)のみが22例(36.6%)であった(図1)。なお, GS確認例の相当数もHCG確認だけに終わった流産の既往を有している。最高流産回数は12回(GS確認1回, HCG確認11回)であり, GS確認の最高は4回, HCG確認の最高は9回であった。

60例の不妊症因子を分析すると, 染色体異常は転座が4例(6.7%, 夫1例・妻3例)に, ヘテロクロマチン(二次狭窄部, 当該染色体が太くあるいは長い)4例, サテライト(仁形成部位, 重複した不随体の保有)が4例に認められた。最終妊娠経過は転座がGS確認3回以上群で他の2群より高率であった(図2)。

HLAクラスII抗原は2個共有が22例(36.7%), 3個以上(最高4個; 3例)は19例(31.7%)で, 2個以上は68.4%を占め, 不育症因子では最も高率であった。最終妊娠経過は各群に大差なかった(図3)。

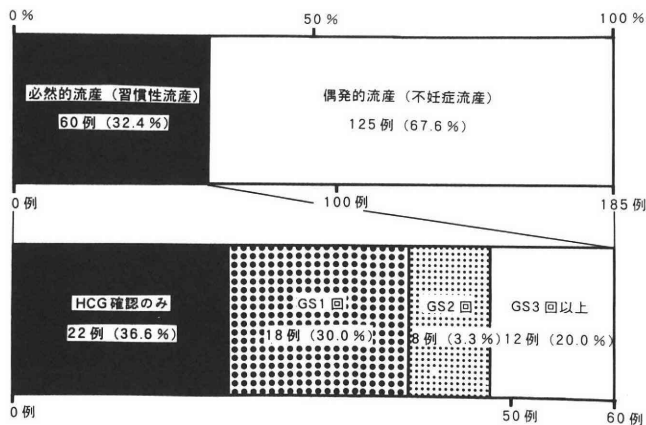


図1 流産の分類と診断基準

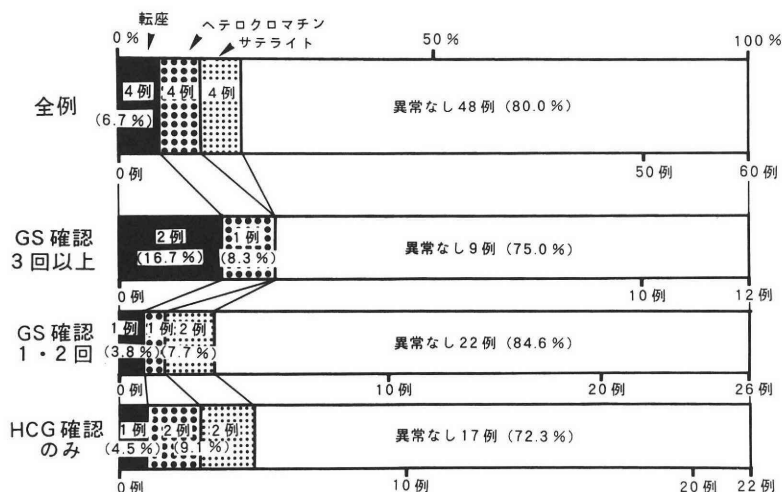


図2 非偶発流産症例の染色体所見

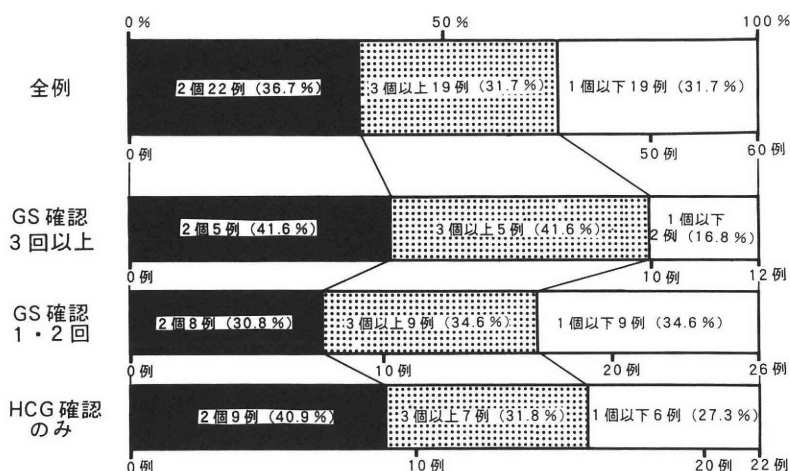


図3 非偶発流産症例の夫婦におけるHLAクラスII抗原の共有数

HLA-DR 4 抗原保有者 (妻) は22例 (36.7%) で、不育症因子では2番目に高率であった。最終妊娠経過はGS確認3回以上群が他の2群より高率であったが有意ではなかった (図4)。

抗核抗体は13例 (21.7%) で陽性で、不育症因子で3番目の頻度であった。最終妊娠経過は各群に有意な差は認められなかった (図5)。

抗リン脂質抗体としての抗cardiolipine IgM抗体陽性者は10例 (16.7%) で、染色体異常に次いで低率であった。最終妊娠経過はHCG確認群がGS確認3回以上群より3.3倍、GS確認1・2回群より2.4倍高率であったが有意ではなかった (図6)。

各因子の重複はHLAクラスII抗原2個以上共有と

DR 4 抗原保有者が最も多く7例で、ついでDR 4 抗原保有者と抗核抗体陽性が2例、DR 4 抗原保有者と抗cardiolipine IgM抗体陽性が1例、抗核抗体と抗cardiolipine IgM抗体陽性は2例で、最も多い重複症例はHLAクラスII抗原3個共有、DR 4 抗原保有、抗核抗体、抗cardiolipine IgM抗体陽性であり、本症例は流産7回の既往 (すべてHCGの確認のみ) があり、本論文執筆中柴苓湯・prednisolone・低用量aspirin併用療法を行なっているが経過良好な妊娠が成立していない。この症例で代表されるように不育症因子が重複する症例の妊娠の予後が悪い。

次ぎに治療成績を検討する。

HLAクラスII抗原2個以上共有不育症に対する夫

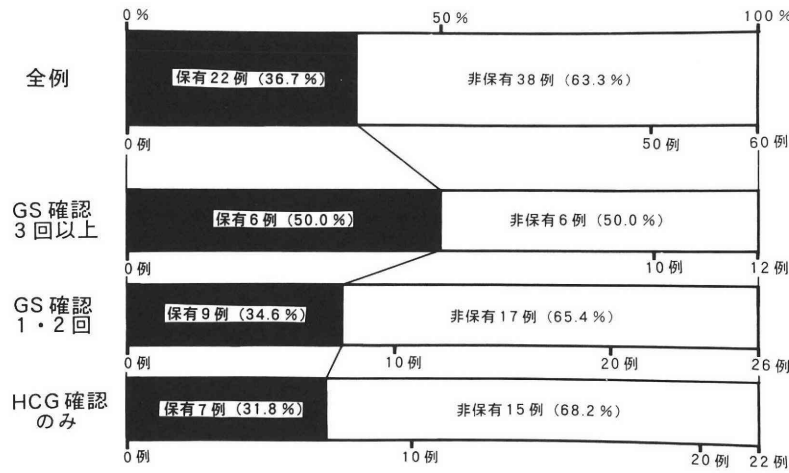


図 4 非偶発流産症例(妻)のDR 4 抗原保有

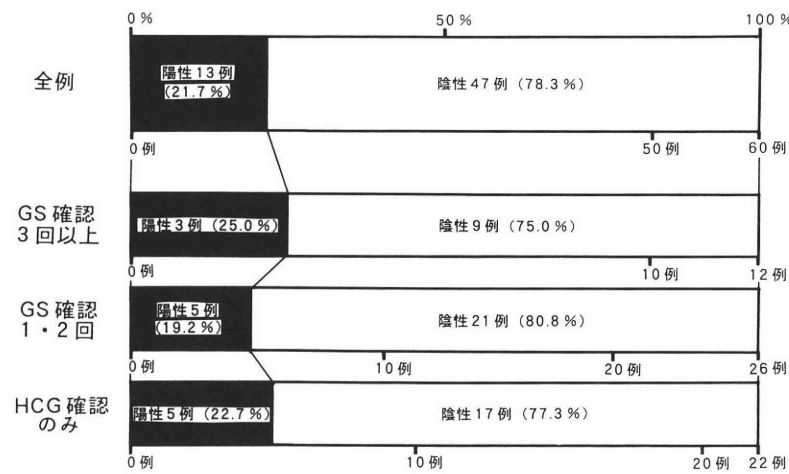


図 5 非偶発流産症例の抗核抗体陽性率

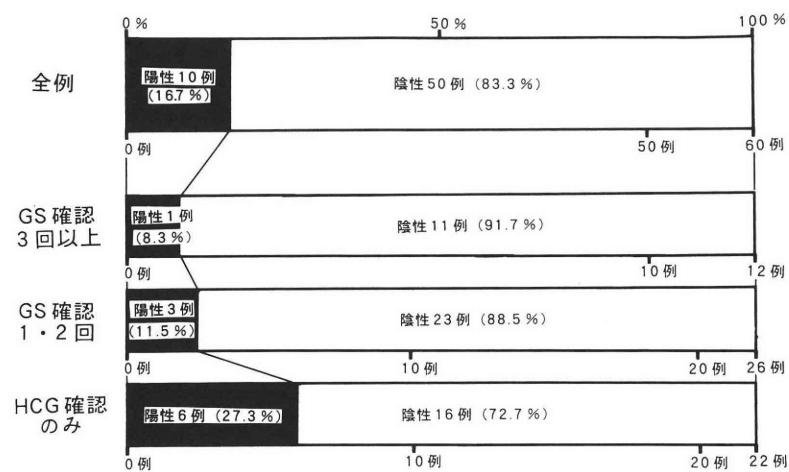


図 6 非偶発流産症例の抗cardiolipine IgM抗体陽性率

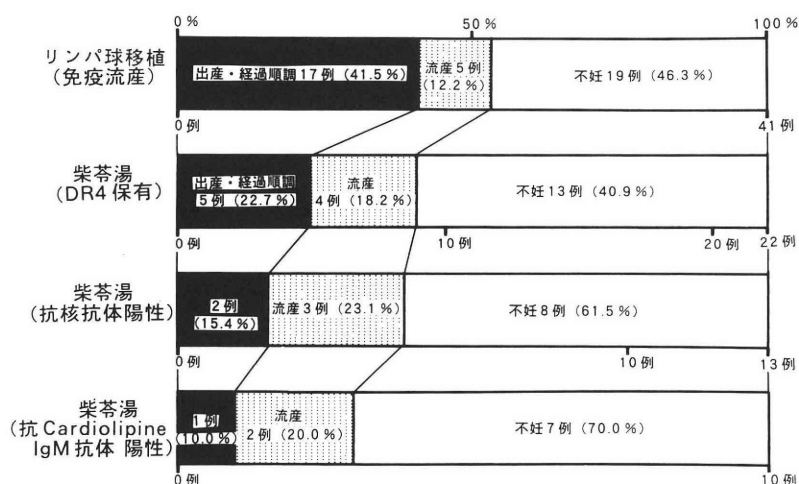


図 7 不育症の治療成績

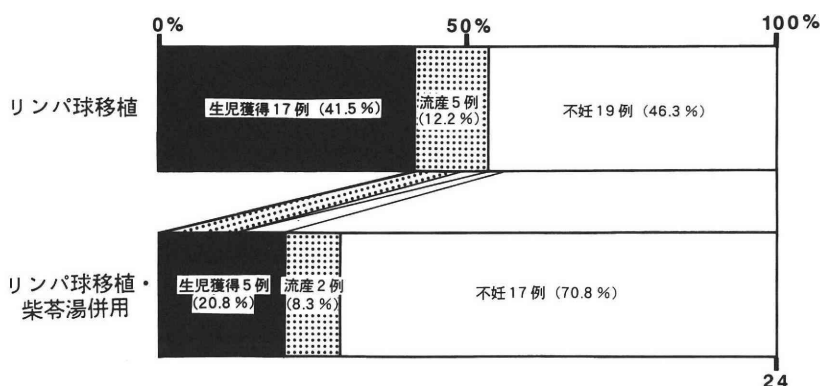


図 8 HLAクラスII抗原 2 個以上共有流産のリンパ球移植無効例に対する柴苓湯併用療法の治療成績

リンパ球移植は、生児を獲得した治療成功例は17例 (41.5%) であり、今回の治療のなかでは最も成功率が高かった。しかし、5例 (12.2%, HCG確認; 2例, GS確認; 3例) は流産に終わった。妊娠例の流産阻止率は77.3%であった。19例 (46.3%) は治療後妊娠が成立していない (図 7)。以上の流産例や不妊例にリンパ球移植と並行して柴苓湯を投与したところ 5例 (12.5%, 流産 3例, 不妊 2例) で妊娠が成立、その後順調に経過している (図 8)。

HLA-DR 4 抗原保有者には免疫応答の調整を目的として柴苓湯療法を行なったが、5例 (22.7%) で生児を獲得したが、4例 (18.2%) が流産に終わった。流産阻止率は55.5%であり、治療成功率および流産阻止率はリンパ球移植に次いで 2 番目に好成績であった。13例 (40.9%) に妊娠が成立していない (図 7)。

抗核抗体陽性例に対する柴苓湯療方は分娩例 2例 (15.4%), 流産 3例 (23.1%) で流産阻止率は40%であった (図 7)。また、8例 (61.5%) で妊娠が成立していない。柴苓湯投与後追跡調査が可能であった症例で抗体価が低下したのは 3例 (30.0%) であったが 20倍未満に陰性化した症例はなかった。分娩例は抗体価が低下ないし現状維持の症例で、上昇した症例には生児獲得例は存在しなかった (図 9)。

なお柴苓湯療法にもかかわらず流産に終わった一部の症例にprednisolone療法を行なったが、本論文執筆時点で生児を獲得ないし経過順調な妊娠が成立した症例は 1例もなかった。

抗cardiolipine IgM抗体陽性例に対する柴苓湯療方は分娩例 1例 (10.0%), 流産 2例 (20.0%) で流産阻止率は33.3%であった (図 7)。また、7例 (70.0%) で妊娠が成立していない。柴苓湯投与後追跡調査が

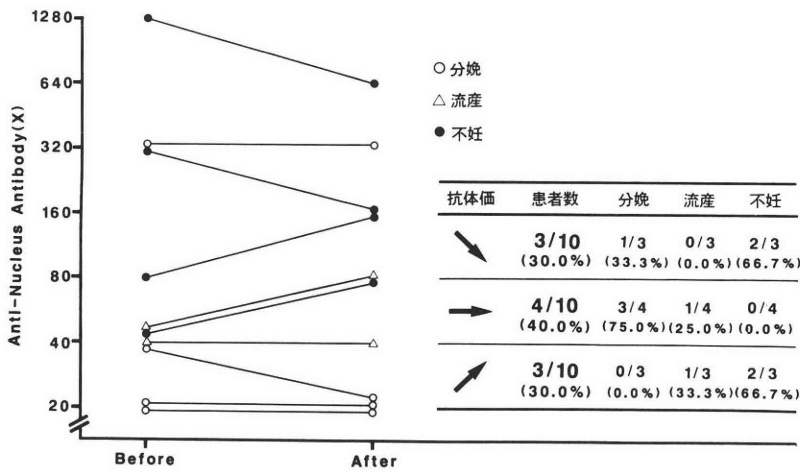


図9 抗核抗体陽性不育症に対する柴苓湯療法の治療成績

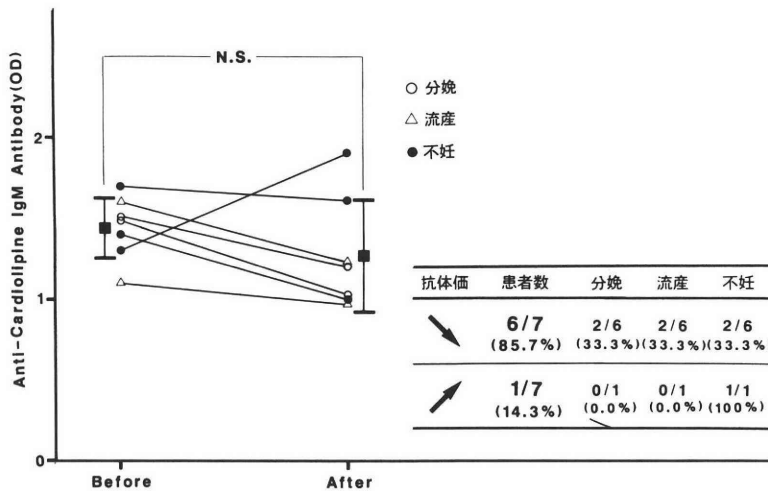


図10 抗cardiolipine IgM抗体陽性不育症に対する柴苓湯療法の治療成績

N. S.: no significant different

可能であった7症例中1例を除いて抗体価は低下したが、その低下は有意ではなかった。また1.0 OD以下の陰性になった症例はなかった。生児獲得例2例はともに抗体価が低下していた(図10)。

柴苓湯療法で流産に終わった症例には低用量aspirone持続療法を行なっているが本論文執筆時までに生児を獲得ないし経過順調な妊娠が成立した症例はない。

考 察

我々は現在行なわれている不育症(習慣性流産)診断の二点について疑問を持っている。超早期流産を軽視している点と既往流産回数を重視している点⁵⁾

である。

妊娠の早期診断技術進歩に伴ってBio-chemical abortion⁶⁾なる言葉が産み出されたように血中ないし尿中HCGを確認したあと超音波診断法で胎嚢(GS)の確認に至らず月経と鑑別できない出血に終わる超早期流産は臨床現場では少なくない。

Biochemical abortionという表現には多分に妊娠を否定するニュアンスがこめられているが⁶⁻⁹⁾、luteal support目的で注射したHCG製剤を検出する以外は妊娠(着床)に起因した内因性HCGと診断してよい。Biochemical abortion(非着床)と超早期流産はHCG筋注から1週間以上の間隔を設ければ容易に鑑別できる⁹⁾。

先に述べたように不育症の診断には3回以上の流産の既往が重視されるが⁵⁾、次回の妊娠も流産に終わる可能性を予想しつつ回数にこだわって黙過することは母性保護の観点から大問題である。したがって、例えば初めての流産でも、妊娠の早期診断で予後良好⁴⁾であったケースでは積極的な検査、治療が必要である。習慣性流産という言葉自体に流産回数を重視するニュアンスが強いために、我々は不育症と呼ぶべきと考える。

不育症は流産の原因が独自に存在する不妊症とは基本的に異なる疾患である。すなわち、卵胞機能・黄体機能・卵管機能・男性機能などの不妊症因子に起因しない流産と定義すべきと考える。さらに我々は子宮筋腫・子宮形態異常・頸管不全・甲状腺機能障害に起因する習慣性流産も不育症ではなく不妊症流産と考えている。

いずれにしても、妊娠周期の不妊因子に異常を認めない流産は仮にそれが初めての流産であっても不育症を疑うべきである^{1,2,4)}。

流産の妊娠基準は胎嚢(GS)の確認で診断されることが多いが、現実にはHCGの確認のみで出血に至る超早期流産の方が多くことは先に述べた。

超早期流産は着床直後に胎児が生存できなくなる状況が発生すると推測され、GSないしheart beatを確認し得た例とは成因が異なる可能性が高い。我々は臨床的に機能性不妊症と診断されている原因不明不妊症のなかになんかの免疫機構がかかわる習慣性超早期流産が含まれていると推測している。したがって、不育症、特に超早期不育症の診断、治療の進歩は機能性不妊症治療に寄与するところが大い。

以上の推論から我々は不育症の因子毎に最終妊娠経過がHCGの確認だけであった症例とGSないしheart betを確認できた症例を解析することで超早期流産の病因を推測することを試みた。

この結果、染色体異常については頻度は諸家の報告¹⁰⁾と差はなかったが、GS3回以上群で高率であったので、流産の原因が染色体異常など胎児側にある可能性が高いと考えられた。

ヘテロクロマチンならびにサテライトと流産との関係については報告がなくさらに研究が進められなければならないが、GS群とHCG群に差がなかったので胎児側に主体的な原因があったとは考えにくい。

一般的に免疫流産と称されるHLAクラスII抗原2個以上共有不育症は全例の70%近くを占め、不育症の最大の原因との諸家の報告^{2,4,5,10)}を裏付けた。その流産にいたる機序は夫のクラスII抗原の抗体であ

るblocking factorが産生されないために免疫的には移植片である胎児が拒絶されると理解されているが^{5,11-15)}、この機構が作動するのは妊娠6週以降と考えられている¹⁵⁾。したがって、少なくとも超音波でGSは確認されるはずであるが、今回の成績ではGS群とHCG群との間に有意差が認められなかった。これらの症例には他の不育症因子(染色体異常・自己抗体陽性・DR4保有)も含まれているのでこれらを減じて検討したが、それでも有意差は認められなかった。したがって、HLAクラスII抗原2個以上共有不育症の原因は単一でなく、blocking factorを含めて着床直後に胎児の生存が不可能となる免疫的状況が発生する可能性が高い。

妻がDR4抗原を保有していると流産が多いことはHLA抗原と流産の関係を検討しているなかで明らかになった^{1,2)}。今回の研究では有意差は認められなかったが、GS3回以上群が高率であったので、流産の原因は着床後時間が経過してから(6週以降)発生する可能性が高い。流産(胎児死亡)に至るメカニズムはDR4抗原を保有していると自己抗体を産生しやすいためと考えられてきた。事実、膠原病患者の90%近くが同抗原を保有していることや膠原病患者に流産が多いことはよく知られている¹¹⁾。しかし、今回の研究で同抗原の保有患者で自己抗体が陽性を示すのは10%にも満たなかった。したがって、次ぎに述べる抗核抗体陽性者と同じメカニズムで流産が起こっているとは考えにくく、母児間の免疫応答の異常が胎児死亡の原因と推測された。

抗核抗体陽性不育症はGS群とHCG群との間に有意差が認められなかったので、その原因は着床直後に発生する可能性が高いと考えられる。胎児が生存できなくなるメカニズムは抗核抗体陽性状態が膠原病前症と認識すれば自己と非自己の免疫的認識が円滑に行なわれない結果、胎児が着床直後に細胞免疫的に拒絶³⁾されると理解される。

抗リン脂質抗体はcardiolipineなどの陰性荷電物質に対する自己抗体の総称である。同抗体が存在すると絨毛や胎盤の血管で血栓が形成されて梗塞が起こり胎児が死亡すると考えられている¹⁶⁾。今回は抗リン脂質抗体として抗cardiolipine IgM抗体を検討した。同抗体の陽性率は染色体異常に次いで低率であったが、本因子に特異的な事実はHCG群がGS3回以上群の3倍以上高頻度であることである。この事実は同抗体に起因する流産が着床直後に起きる可能性が高いことを強く示唆し、機能性不妊症の重要な一因にもなると推測できた。

次に、治療成績から考察する。

染色体異常の治療は現状では残念ながら存在しない。しかし、ロバートソン型相合転座以外では妊娠を繰り返すうちに生児獲得が可能であるから、不妊症因子が原因の流産を阻止するために状況を整えておくことが必要である。

クラスII抗原 2 個以上共有不育症には夫リンパ球移植¹⁶⁻¹⁸⁾が広く行なわれており、その流産阻止率は 80 % 以上¹⁾と報告されているが、当クリニックの成績も 77.3 % と大差なく、不育症の治療のなかでは最も成績が良かった。しかし、リンパ球移植にもかかわらず流産を繰り返す症例が 12.2 % 存在した。そこで我々は流産例や不妊例に柴苓湯を併用してリンパ球移植を試みたところ 5 例 (流産 3 例、不妊 2 例) の分娩例が得られた。

柴苓湯の果たした役割の詳細は不明だが、同方剤に含まれる小柴胡湯には免疫応答を修飾する biological response modifier (BRM) と呼ばれる免疫調整作用¹⁹⁾が知られている。この作用が着床にかかわる母児間の免疫応答を妊娠の維持に都合の良いように調整してリンパ球移植の流産阻止作用を増強したためと推測された。

DR 4 保有不育症に対する有効な治療法は未だに報告されていない。前述したように同抗原保有者は自己抗体を産生しやすいと考えられてきたが²⁾、抗核抗体、抗リン脂質抗体陽性の症例は 10 % 未満と事前の予想よりはるかに低率であった。このため、我々は同抗体が存在すると母児間の免疫応答に異常が生じることが原因と考え、柴苓湯療法を行なった。この結果、リンパ球移植術に次ぐ流産阻止率を得た。この事実は直ちに我々の推論を正当化するものではないが、柴苓湯 (小柴胡湯) のすでに明らかになっている作用機序から考えて大誤はないと推測される。

抗核抗体陽性不育症には低用量 aspirin 持続療法や副腎皮質ホルモン療法^{3,16,20)}が知られているが、最近になって柴苓湯が有効なことが報告された³⁾。今回の研究でも 4 例の分娩例が得られた。しかし、分娩例のなかには抗体価が低下しなかった症例も含まれているので、柴苓湯の有効機序は必ずしも抗核抗体価を低下させる直接作用ではなく、同抗体が陽性になる免疫異常を妊娠維持が可能になるように改善させた結果と考えられるが、その詳細は今後の解明に期待される。

抗リン脂質抗体としての抗 cardiolipine IgM 抗体陽性不育症の治療法としては抗核抗体陽性不育症と同

じ低用量 aspirin 持続療法や副腎皮質ホルモン療法^{10,15)}が行なわれるが、柴苓湯の有効性もすでに報告されている³⁾。我々は柴苓湯療法を優先して行なっている。この結果、抗体価が陰性化した症例はなかったが、大半の症例で抗体価は低下して分娩例も得られた。

なお、我々は柴苓湯が無効な抗核抗体陽性不育症・抗リン脂質抗体陽性不育症に対して低用量 aspirin 持続療法や副腎皮質ホルモン療法を行なっている症例を少しく有しているが、論文執筆時に分娩例や on going 例を経験していない。以上の事実と安全性、妊婦への使用などから柴苓湯を first choice の薬物と考えるべきである。

最近、HLA クラス II 抗原 2 個以上共有不育症にリンパ球移植を行なったにもかかわらず流産に終わった症例の大半に染色体異常が認められたとの報告²¹⁾がなされた。胎児の染色体異常は偶発的なことだから、リンパ球移植自体はその効能を果たすと理解され、GS 確認に至った流産の原因は胎児側に存在する可能性が高いことを示唆している。

したがって、生殖免疫学的異常に起因する流産は超早期流産に高率な可能性すらある。

さらに、基礎体温の高温が 14 日以内で臨床的には月経と診断されている症例の中にも HCG を証明する症例が多数存在²²⁾するため、着床不全が本態と推測される機能性不妊症のなかにも多くの超々早期流産とも称すべき不育症症例が含まれていることは想像に堅くない。したがって、機能性不妊症に対しては積極的に上記の検査を実施し、不育症因子が確認された場合には早急にしかるべき治療を行なうべき必要があると考えられる。さらに、その治療のなかで柴苓湯 (小柴胡湯) は安全面ならず効能でも低用量 aspirin 持続療法や副腎皮質ホルモン療法に優っており、今後、不育症ならびに機能性不妊症の治療のなかで重要な地位を占めるであろうことはまちがいない。

文 献

- 1) 假野隆司, 新よくわかる不妊症の検査と治療—漢方薬から体外受精まで—。P143, ライフサイエンス, 1991
- 2) 假野隆司, 婦人科と漢方。P113, ライフサイエンス, 1992
- 3) 高桑好一, 楊 丙辰, 後藤重則 他, 自己抗体陽性不育症患者に対するツムラ柴苓湯投与に関する検討。産婦人科漢方研究の歩み。No. 8, P73, 診断と治療社, 1991

- 4) 假野隆司, 妊娠早期予後診断を応用した習慣性流産の早期診断の試み. 日不妊誌 37:152, 1992
- 5) 鮫島義弘, 亀田 隆, 木村 正 他, 当科における習慣流産の検査成績と夫リンパ球を用いた免疫療法による治療成績. 日不妊誌 35:112, 1990
- 6) Lopata A, In vitro fertilization and embryo transfer in the treatment of infertility. *Orgnorama* 18: 3, 1981
- 7) Whittaker AT, Taylor A and Lind T, Unsuspected pregnancy loss in healthy women. *Lancet* 1: 1126, 1983
- 8) Hertig AT, Rock J, Adams EC, et al., Thirty-four fertilized human ova good bad and indifferent recovered from 210 women of known fertility. *Pediatrics* 23: 202, 1959
- 9) Chartier M, Roger M, Barrat J, et al., Measurement of plasma human chorionic gonadotropine (hMG) and β -hCG activities in the late luteal phase, Evidence of occurrence of spontaneous menstrual abortions in infertile women. *Fertil Steril* 31: 134, 1979
- 10) 假野隆司, 筋注HCG製剤の血中HCG 値およびHCGテストパックに及ぼす影響. 日不妊誌 35: 345, 1990
- 11) 坂元正一監修, 習慣流産の診断と治療. 社団法人日本母性保護医協会編, P30, 1990
- 12) Komlos L, Zamir R, Joshua H, et al., Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin Immunol Immunopathol* 7: 330, 1977
- 13) Garencer M, Drazancic A, Kuvacic I, et al., A antigen studies in women with recurrent gestational disorders. *Fertil Steril* 31: 401, 1979
- 14) Scott JR, Rote NS, and Branch DW, Immunologic aspect of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 70: 645, 1987
- 15) Aoki K, HLA-DR compatibility in couples with recurrent spontaneous abortions. *Acta Obst Gynaec Jpn* 34: 1773, 1982
- 16) 秋月正史, 岡野哲朗, 抗リン脂質抗体. 日本臨床増刊号48: 624, 1990
- 17) Taylor C, and Faulk WP, Prevention of recurrent abortion with leucocyte trans fusions. *Lancet* 2: 68, 1981
- 18) Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JWT, et al., Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 141: 987, 1981
- 19) 陳 瑞東, 鈴木宋司, 荷見勝彦 他, 小柴胡湯の経口投与によるヒト腹腔内滲出マクロファージの活性化. *Biotherapy* 4: 1085, 1990
- 20) 片山隆章, 浅桐和男, 長谷川淳 他, 抗核抗体と不妊症. 日不妊誌 37:814, 1992
- 21) 岡田節男, 種村光代, 飯田忠史 他, 流産胎児の染色体異常—原因不明習慣性流産患者における免疫療法後流産例の検討—. 日不妊誌 37:843, 1992
- 22) 假野隆司, 出馬淳名, 伊藤正尚, BBT高温16日のHCG値による妊娠およびその予後の判定. 日不妊誌 33:332, 1988

**Analysis of etiology and therapy
with SAIREI-TO of habitual abortion
in our clinic**

Takashi Kano, Masako Furudono, Keiko Okuyama
and Misako Ishii

Kano Clinic, Osaka 542, Japan

We analyzed the etiology of habitual abortion and the final courses of pregnancy and studied the results of therapy in 60 patients in whom no abnormalities in sterile factor of pregnant cycle was found. The most common etiology of habitual abortion was co-presence of 2 or more HLA class II antigens, followed by presence of DR4 antigen in wife, positively for anti-nucleus antibody, positively for anti-cardiolipine IgM antibody, and chromosome aberration (trans-location). In different factors, habitual abortion due to chromosome aberration and presence of DR4 antigen was seen at a high rate in patients who showed pregnant course with GS or higher and habitual abortion due to possibility for anti-cardiolipine IgM antibody occurred at a high rate in patients in whom HCG was confirmed (ultra early abortion). The rate of prevention of abortion with treatment was 77.3 %, the highest being in cases of transplantation of the husband's lymphocytes (co-presence of 2 or more HLA class II antigens), followed by cases of SAIREI-TO therapy (presence of DR4 antigen, positivity for anti-nucleus antibody, and anti-cardiolipine IgM antibody). Moreover, when the therapy combined with SAIREI-TO was given to patients who had had repeated abortions even after transplantation of husband's lymphocytes, the rate of prevention of abortion was 66.7 %. These results indicated that there were a considerable number of cases habitual abortion (habitual ultra early abortion) among the functional intertilities or unknown infertilities. It was considered that factor of habitual abortion should be studied in such cases. SAIREI-TO was considered to be important in the treatment of habitual abortion.

(受付: 1993年2月1日)

(受理: 1993年6月18日)

不妊症における高アンドロゲン血症の頻度とその妊娠例の解析

Incidence and Outcome of Pregnancy in the Infertile Patients with Hyperandrogenemia

秋田組合総合病院産婦人科

太田博孝

Hiroataka OTA

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

不妊症における高アンドロゲン血症の頻度と妊娠・流産に及ぼす影響について検討した。各症例は不妊一般検査と共に血中テストステロン (T), DHEA-Sを同時に測定した。対象144例中高アンドロゲン血症の頻度は52例 (36.1 %) で、そのうち89 ng/dl以上の高T血症は26例、1527 ng/ml以上の高DHEA-S血症は6例、両者合併例は20例であった。妊娠例は全体で61例 (42.4 %), うち正アンドロゲン血症31例、高アンドロゲン血症30例で、妊娠例の50.8 %を高アンドロゲン血症群が占めた。これは同群中23例が高アンドロゲン血症に対する薬物療法としてデキサメタゾン (18例), 芍薬甘草湯 (5例) 投与を受けていたためと考えられた。流産例は全体で20例 (32.8 %), うち正アンドロゲン血症7例 (22.6 %), 高アンドロゲン血症13例 (43.3 %) で、高アンドロゲン血症群で約1.9倍の流産率となった。高アンドロゲン血症に対する短期ステロイド療法では流産率が明らかに高く、投与法の改善が必要と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 680 - 683, 1993)

緒言

性成熟期女性に高アンドロゲン血症を合併するとその性機能が障害される。すなわち、卵胞の発育が遅延し、基礎体温表上低温期が延長する。さらに排卵や黄体機能を抑制し、無排卵・無月経ともなる。また、血中アンドロゲンの増加は多毛、肥満などを引き起こす。

不妊症における高アンドロゲン血症の頻度は10 %前後とみられている¹⁾。高アンドロゲン血症例には副腎皮質ホルモン²⁻⁸⁾や芍薬甘草湯⁹⁾などが有効とされる。しかし、その妊娠例の予後についての報告はほとんどない。今回、我々は不妊症における高アンドロゲン血症の頻度、およびその妊娠例の予後について検討したので報告する。

対象と方法

対象は1988年4月より1991年12月までに秋田組合総

合病院産婦人科不妊外来を受診した144例である。症例の年齢は22歳から40歳までで、平均年齢は31.2歳であった。各症例は不妊一般検査と共に全例末梢血中のテストステロン (T), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S)を測定した。テストステロンは2抗体法 (栄研), DHEA-SはDCC法によるRIAで測定した。対照群の平均年齢は30.7歳で、いずれも基礎体温表上正常の2相性を示し、妊娠性の確認された27例とした。正常範囲は平均値±標準偏差 (mean ± SD) とし、それを越えた時異常高値とした。

多嚢胞卵巣症候群 (PCOS) の診断は基礎体温表上無排卵で、多毛などを認め、かつ内分泌学的にアンドロゲン値が高く、LH値が高値、FSH値が正常範囲であり、LH-RH負荷でLHが過剰反応を示す例を本症候群疑いとした。そして、経膈超音波断層法で卵巣が腫大し、長径10 mm以下の多数の小嚢胞を認めた例を多嚢胞卵巣症候群とした。また、本症候群以外の無排卵周期症10例、続発性無月経 (第1度7例、

表1 高アンドロゲン血症とその妊娠例の頻度

	排卵周期	無排卵	多嚢胞卵巣	合計
全症例数 (A)	109	19	16	144
正アントロゲン血症 (B)	78	12	2	92
(B/A)	(71.6)	(63.2)	(12.5)	(63.9)
高アントロゲン血症 (C)	31	7	14	52
(C/A)	(28.4)	(36.8)	(87.5)	(36.1)
妊娠例 (D)	42	13	6	61
(D/A)	(38.5)	(68.4)	(37.5)	(42.4)
正アントロゲン血症 (E)	24	6	1	31
(E/B)	(30.8)	(50.0)	(50.0)	(35.2)
(E/D)	(57.1)	(46.2)	(16.7)	(50.8)
高アントロゲン血症 (F)	18	7	5	30
(F/C)	(58.1)	(100.0)	(35.7)	(57.7)
(F/D)	(42.9)	(53.8)	(83.3)	(49.2)

() 内は対応群に対する頻度を示す

第2度2例)の計19例は無排卵群として一括した。

高アンドロゲン血症例にはデキサメタゾン (DEX) 0.5 mg/日を月経第1日目より原則2週間、あるいは芍薬甘草湯1日量7.5 gを月経第1日目より妊娠するまで、最大3カ月間投与した。

結 果

144例中正アントロゲン血症は92例 (63.9 %), 高アンドロゲン血症は52例 (36.1 %)であった (表1)。高アンドロゲン血症例のうち血中テストステロンの対照範囲 (66 ± 22 ng/dl) を越えた高テストステロン血症は26例 (50.0 %), DHEA-Sの対照範囲 (1195 ± 331 ng/ml) を越えた高DHEA-S血症は6例 (11.5 %), 両者合併例は20例 (38.5 %)であった。144例中排卵周期は109例 (75.7 %), 無排卵周期, 続発性無月経の排卵障害例は19例 (13.2 %), 多嚢胞卵巣症候群は16例 (11.1 %)であった。高アンドロゲン血症のうち, 排卵周期例は31例, 無排卵7例, 多嚢胞卵巣症候群14例であり, 多嚢胞卵巣症候群は16例中14例 (87.5 %)が高アンドロゲン血症例であった。

妊娠例は全体で61例 (42.4 %)あった。うち正アントロゲン血症が31例, 高アンドロゲン血症が30例あった (表2)。高アンドロゲン血症妊娠例の内訳は排卵周期18例, 無排卵7例, 多嚢胞卵巣症候群5例であった。高アンドロゲン血症例のうち23例 (76.7 %)が薬物投与を受けており, 薬物非投与での妊娠例

表2 高アンドロゲン血症各群の妊娠例数

群	排卵周期	無排卵	多嚢胞卵巣	合計
DEX群	8	6	4	18
芍薬甘草湯群	5	0	0	5
非投与群	5	1	1	7
合 計	18	7	5	30

表3 各群における流産例数

群	排卵周期	無排卵	多嚢胞卵巣	合計
正アントロゲン血症	7	0	0	7
高アントロゲン血症				
DEX群	4	0	4	8
芍薬甘草湯群	3	0	0	3
非投与群	0	2	0	2
合 計	14	2	4	20

は7例のみであった。薬物投与妊娠例のうちデキサメタゾン投与が18例, 芍薬甘草湯投与が5例あった。

初期流産例は全体で20例 (32.8 %)あった (表3)。うち正アントロゲン血症7例, 高アンドロゲン血症13例で, 高アンドロゲン血症群では正アントロゲン血症群の約1.9倍の流産率となった。また正アンドロ

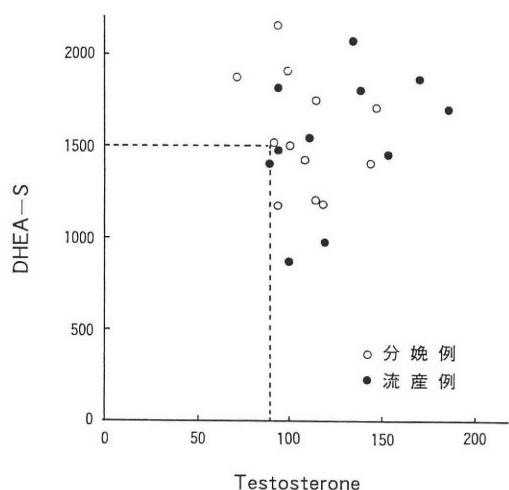


図1 高アンドロゲン血症の分娩・流産例における血中テストステロン、DHEA-S値。

ゲン血症の流産例は全例排卵周期群であった。一方、高アンドロゲン血症群では排卵周期7例、多嚢胞卵巣症候群4例であり、多嚢胞卵巣症候群の80.0%が流産に終わった。

図1に高アンドロゲン血症妊娠例23例の治療前テストステロン値とDHEA-S値を示した。分娩例でテストステロン値は1例を除き高値であり、DHEA-S値は正常ないし高値の範囲に分布していた。一方、流産例についてはテストステロン値は全例高かったが、DHEA-Sは高値、正常値のいずれもあった。

考 察

不妊症にみられる高アンドロゲン血症の頻度は一般に10%前後と報告される¹⁾が、より高頻度であるとする報告もある¹⁰⁾。今回の成績から不妊症全体のなかで高アンドロゲン血症例の占める頻度は我々の予想より高かった。

末梢血中に分泌されるアンドロゲンにはテストステロン、アンドロステンディオン、DHEA、DHEA-Sなどがある。このうち、テストステロン、アンドロステンディオンは主に卵巣由来、DHEA、DHEA-Sはその9割が副腎由来と考えられている¹¹⁾。高アンドロゲン血症には副腎皮質ホルモン療法が有効である。使用される副腎皮質ホルモンにはコーチゾル²⁾、プレドニゾロン³⁻⁵⁾、デキサメタゾン^{6,7)}などがある。これらホルモンの投与法は月経期から排卵期までの2週間程度投与する短期投与法⁴⁻⁷⁾と、1カ月以上にわたる長期投与法^{3,12)}がある。今回の成績から高アンドロゲン血症群全体での流産率は43.3%と正

アンドロゲン血症群の約1.9倍の流産率となった。また、DEX投与群でも8例(44.4%)と高い流産率となった。

副腎皮質ホルモンを長期で投与し、高い妊娠率が得られたとする報告はある¹²⁾。そしてその流産率は高くない。また、東山⁴⁾は副腎機能正常でクロミフェン無効の第1度無月経の72例にクロミフェンとプレドニゾロンの短期併用療法を行い、32例で妊娠成立し、うち6例(18.8%)が流産したと述べている。それによると流産率は低い。この理由として、上記症例の多くは正アンドロゲン血症例であったためと推定される。

現在まで、高アンドロゲン血症例における妊娠例の予後に関する報告はあまり見られない。今回、高アンドロゲン血症の流産例のうち、胎児心拍を確認後胎児死亡に至った例は1例のみで、他の全例は胎児の成長を認めていない。したがって、高流産率の原因としては子宮内膜の不十分な発育が胎児・胎盤系の発育に悪影響を及ぼした可能性が考えられた。さらに興味ある成績は高アンドロゲン血症の流産例である。それらのDHEA-S値は正常、高値と広く分布していたが、テストステロン値は全例高値であった。これらの成績は副腎皮質ホルモンの短期投与法ではテストステロンによる子宮内膜への悪影響が十分に改善されないこと、かつ子宮内膜への影響度はDHEA-Sよりもテストステロンのほうがより強いことを示唆した。

卵胞の発育は月経開始前よりすでに始まっている。この時期はFSHが多めに分泌され、卵胞の発育を刺激し始める。アンドロゲンの分泌にはあまり月経周期の変動はない。したがって、高レベルのアンドロゲンは持続的に卵胞の発育を抑制している可能性が十分考えられた。以上のことから月経第5日目より副腎皮質ホルモンの投与を開始するより、第1日目から開始することは理論的妥当性がある。

一方、副腎皮質ホルモンをいつ終了させるかは大きな問題である。短期投与法で不十分な例ではすでに述べたように1カ月以上の長期間投与する方法がある^{3,12)}。しかし、副腎皮質ホルモンの服用が1カ月以上に及ぶと、肥満、浮腫、肝機能障害、糖尿などの副作用が問題で、その長期投与には慎重にならざるを得ない。

文 献

- 1) Maroulis GB, Evaluation of hirsutism and hyperandrogenemia. In: Wallach EE and Kempers

- RD, eds, Modern trends in infertility and conception control. Vol 2, p32, Harper & Row Co, 1982
- 2) Janata J and Stärka L, Effect of cortisol on the production of ovarian androgens. *J Endocrinol* 29: 93, 1964
 - 3) Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, Tcholakian RK, et al., Effect of prednisone on plasma testosterone levels and on duration of phases of the menstrual cycle in hyperandrogenic women. *Fertil Steril* 32: 408, 1979
 - 4) 東山秀聲, クロミフェンとコルチコイドの併用療法. 産婦人科MOOK 13: 138, 1980
 - 5) 武谷雄二, 石川弘子, 木下俊彦 他, 多嚢胞卵巣の分類とbromocriptineの有用性の検討. 日産婦誌 38: 1697, 1986
 - 6) Lisse VK, Kombinierte clomiphen-dexamethasontherapie bei clomiphenresistenz. *Zbl Gynäkol* 102: 645, 1980
 - 7) 望月真人, 片山和明, 排卵誘発の実際. 産婦の実際 32: 1155, 1983
 - 8) Steinberger E, Rodriguez-Rigau LJ, Petak SM, et al., Glucocorticoid therapy in hyperandrogenemia. *Baillière's Clin Obstet Gynecol* 4: 457, 1990
 - 9) 柳沼 恣, 小林拓朗, 藤森亮寿, 「ツムラ芍薬甘草湯」の血中testosterone濃度低下作用とその臨床応用. 産婦人科漢方研究のあゆみ 1: 36, 1984
 - 10) Steinberger E, Smith KD, Tcholakian RK, et al., Testosterone levels in female partners of infertile couples. *Am J Obstet Gynecol* 133: 133, 1979
 - 11) Kirschner MA and Jacobs JB, Combined ovarian and adrenal vein catheterization to determine the site(s) of androgen overproduction in hirsute women. *J Clin Endocrinol* 33: 199, 1971
 - 12) Diamant YZ and Evron S, Induction of ovula-

tion by combined clomiphene citrate and dexamethazone treatment in clomiphene citrate nonresponders. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol* 11: 335, 1981

Incidence and outcome of pregnancy in the infertile patients with hyperandrogenemia

Hirotsuka Ota

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

Incidence and outcome of pregnancy in the infertile patients with hyperandrogenemia were investigated. Serum androgens evaluated were testosterone and androstenedione. In 144 infertile subjects, number with hyperandrogenemia was 52 cases (36.1 %), in which 26 cases consisted of high levels of testosterone (≥ 89 ng/dl) alone, 6 cases of high levels of androstenedione (≥ 1527 ng/ml) alone or 20 cases combined together.

Number of pregnancy was 31 cases in normoandrogenemia and 30 cases in hyperandrogenemia. Number of pregnancy succeeded by the administration of dexamethazone (0.5 mg/day approx. for 2 weeks) or Shakuyaku-kanzo-to (7.5 g/day) in hyperandrogenemia was 18 or 5 cases, respectively. Number of early abortion in normoandrogenemic or hyperandrogenemic group was 7 or 13 cases, respectively. In conclusion, androgen affecting the outcome of pregnancy in patients with hyperandrogenemia appeared mainly to be testosterone. Treatment of the disease with dexamethazone for 2 weeks appeared to be insufficient, indicating the necessity of the improved protocol.

(受付: 1993年3月2日)

(受理: 1993年6月18日)

プロラクチン分泌能からみた 高LH血症性排卵障害の病態に関する検討

Studies on the Pathogenesis of the HyperLH Syndrome by the Estimation of the PRL Secretion

九州大学医学部婦人科学産科学教室

松口 博之 中村 元一 野崎 雅裕
Hiroshi MATSUGUCHI Gen-ichi NAKAMURA Masahiro NOZAKI
佐野 正敏 中野 仁雄
Masatoshi SANO Hitoo NAKANO

Department of Gynecology and obstetrics,
Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

高LH血症性排卵障害患者30例をprolactin (PRL) 分泌能により分類し, bromocriptine (Brm) 投与によるゴナドトロピン分泌の変化を検討した。30例中, 高PRL血症群 (HP群) が3例 (10.0%), 潜在性高PRL血症群 (OHP群) が8例 (26.7%), 正PRL血症群 (NP群) が19例 (63.3%) であった。Brm投与によりPRL値は, 基礎値およびTRHに対する反応値ともに有意に抑制された。LH値はBrm投与前では3群間に有意差はなかった。OHP群ではBrm投与により, LH基礎値, LH-RHに対する反応値ともBrm投与前に比し有意に低下した。一方HP群, NP群では, Brm投与前後でLH値に変化は認められなかった。FSHに関しては投与前で3群間で差はなく, Brm投与による変化も3群共に認められなかった。以上の結果より, 高LH血症に潜在性高PRL血症を伴うものでは, 他の高LH血症とその成因を異にすると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 684 - 687, 1993)

緒 言

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) に代表される高LH血症性排卵障害の高LH血症の成因については, いくつかの機序が考えられているが, いまだに明解な解答は得られていない。PCOSは, 非常に多様な病像を示すことより単一な疾患というよりもむしろいくつかの病態の集合と考えられ, PCOSをその病態により分類していくことが, 本疾患の発生機序の解明及び治療にとって必要であると思われる。

ところで, 以前よりゴナドトロピン (Gn) とプロラクチン (PRL) 分泌には密接な関係があることが知られており, 高LH血症性排卵障害に高PRL血症の合併が認められることも多い。

我々は, 高LH血症性排卵障害患者をPRL分泌能により分類しその病態の違いについて, bromocriptine

(Brm) に対する反応をもとに検討を加えた。

対象と方法

九州大学医学部附属病院産科婦人科不妊内分泌外来を通院中の無月経患者で, dydrogesteron 10 mg 5日間内服にて消退出血の認められる第一度無月経を示す症例に対し, 消退出血後4～6日目にLH-RH, TRHテストとして, LH-RH 100 μ gとTRH 500 μ gを同時に静注しLH, FSH, PRHの前値および30分値を, LHキット「第一」(標準品: 2nd IRP HMG), FSHキット「第一」(標準品: 2nd IRP HMG), PRLキット「第一」II (標準品: NIV VLS #2) を用いて測定した。

その結果, LH前値20 mIU/ml以上, 前値のLH/FSH比2以上, LH30分値100 mIU/ml以上の3条件を満たしたものを高LH血症とした。このような症例を,

LH-RH, TRHテストに対するPRLの反応により, PRL前値が ≥ 30 ng/ml以上の高PRL血症群 (HP群), 前値が ≥ 30 ng/ml未満にもかかわらず30分値が ≥ 150 ng/ml以上の潜在性高PRL血症群 (OHP群), それ以外のPRL分泌異常を示さない正PRL血症群 (NP群) の 3 群に分類した.

Brm投与のGn分泌能に対する影響についてBrm 5.0 mg/day投与開始 4 週間目以降の月経もしくは消退出血開始 4 ~ 6 日目に, LH-RH, TRHテストを行った. また, Brm投与前と投与中のLH-RH, TRHテスト時に, estrone (E_1), estradiol (E_2) testosterone (T), dehydroepiandrosteronesulfate (DHA-S) の基礎値についてもRIAにて測定した. なお, 標準体重の20 %以上の肥満や痩瘦を示す症例は除外した.

結 果

高LH血症を示したものは30例で, 表1に示すようにPRL分泌能による分類では, HP群 3 例 (10.0 %),

OHP群 8 例 (26.7 %), NP群19例 (63.3 %) であった. 平均年齢は 3 群間で有意差なく, 乳汁分泌を認めたものは, HP群の 1 例, OHP群の 1 例, NP群の 3 例の計 5 例であった. また, 多毛を認めたものはNP群の 2 例のみであった.

表2にLH-RH, TRHテストの結果についてBrm投与前と投与中を比較したものを示す.

Brm投与前のPRL前値はOHP群とNP群では, それぞれ 19.8 ± 4.9 ng/ml, 14.6 ± 5.5 ng/mlと有意差はなかった. Brm投与によりPRL値は 3 群ともに前値, 30分値ともに有意に抑制された.

Brm投与前のLH値は 3 群間で有意差はなかった. Brm投与によりOHP群ではLH前値, 30分値はBrm投与前に比し有意に低下した. 一方HP群, NP群では, Brm投与前とLH前値, 30分値に変化は認められなかった.

FSHに関しては投与前で前値, 30分値とも 3 群間に差はなく, Brm投与による変化も 3 群共に認めら

表1 高LH血症40例のPRL分泌能による分類

	HP 群	OHP 群	NP 群
症例数	3 例 (10.0 %)	8 例 (26.7 %)	19 例 (63.3 %)
年齢	29.2 ± 3.3 歳	29.6 ± 2.4 歳	28.3 ± 4.8 歳
乳汁分泌	1 例	1 例	3 例
多毛	0 例	0 例	2 例

表2 LH-RH, TRH testのBrm投与前, 投与中の比較

			HP 群	OHP 群	NP 群
PRL (ng/ml)	前値	Brm投与前	43.5 ± 7.1	19.8 ± 4.9	14.6 ± 5.5
		Brm投与中	5.9 ± 6.0	5.2 ± 3.2	4.5 ± 2.1
	30分値	Brm投与前	117.1 ± 14.0	162.1 ± 24.0	71.4 ± 34.7
		Brm投与中	25.7 ± 6.0	35.5 ± 13.7	4.5 ± 2.1
LH (mIU/ml)	前値	Brm投与前	25.9 ± 10.2	27.1 ± 7.4	32.3 ± 10.1
		Brm投与中	27.0 ± 14.9	18.2 ± 6.2	33.8 ± 13.6
	30分値	Brm投与前	183.7 ± 51.4	254.1 ± 98.9	177.7 ± 70.4
		Brm投与中	111.4 ± 26.2	100.8 ± 82.7	165.4 ± 75.0
FSH (mIU/ml)	前値	Brm投与前	8.2 ± 1.8	9.8 ± 1.1	12.1 ± 2.8
		Brm投与中	8.7 ± 2.1	11.3 ± 3.5	15.2 ± 3.5
	30分値	Brm投与前	20.3 ± 7.4	23.9 ± 5.7	24.7 ± 10.0
		Brm投与中	24.3 ± 6.3	21.5 ± 7.1	23.5 ± 12.5

* $P < 0.005$, ** $P < 0.05$

表3 T, DHA-SのBrm投与前, 投与中の比較

		HP 群	OHP 群	NP 群
T値 (ng/ml)	Brm投与前	4.7 ± 3.1	3.2 ± 1.9	5.9 ± 2.4
	Brm投与中	5.1 ± 2.0	3.1 ± 2.2	6.2 ± 3.5
DHA-S値 (ng/ml)	Brm投与前	1465 ± 371	1126 ± 562	1423 ± 459
	Brm投与中	1473 ± 642	1052 ± 457	1530 ± 621

れなかった。

表3にT, DHA-S値のBrm投与前, 投与後の比較を示す。Brm投与前ではT値DHA-S値ともNP群, HP群で高い傾向にあった。Brm投与によるT, DHA-S値の有意な変化は3群とも認められなかった。

考 察

PCOSにはPRL分泌異常を合併することが多い¹⁻⁴⁾。高LH血症は、いわば内分泌学的PCOSといえる病態であるが、本研究ではこのような症例中の33.6%にPRL分泌能の異常が認められ、その多くは潜在性高PRL血症の症例であった。

PCOSにおけるLH分泌亢進の機序のひとつとして、視床下部におけるdopamine活性の低下^{5,6)}が考えられている。このような点により、最近麦角アルカロイドの誘導体で、dopamineの作動薬としての作用を持つBrmが、PCOSに対して用いられるようになってきた。

BrmはPCOSにおいてLH分泌を抑制するという報告^{7,8)}と、変化を与えないとする報告⁹⁾がある。本研究で、Brm投与により、高LH血症に潜在性高PRL血症を伴うものでは、PRL分泌予備能と共にLH分泌予備能も抑制され、このようなものでは中枢におけるdopamine活性の低下が、高LH血症及び潜在性高PRLの成因である可能性が高いと考えられる。

潜在性高PRL血症における高PRL状態が副腎よりのDHA-S分泌を亢進させ¹⁰⁾ることより、高LH血症を引き起こすとの考えもあるがOHP群でDHA-Sの分泌が亢進していたものは少なく、またBrm投与によりPRL分泌を抑制してもDHA-S値の低下が認められなかったことより、高LH血症が高PRL状態により続発性に起こったものではないと考えられる。

高LH血症でPRL分泌異常を伴わないものでは、Brmは下垂体におけるLH,FSHの基盤分泌や、LH-RHに対する反応性には影響を与えなかった。つまり、このような症例のLH分泌予備能の亢進の原因とし

て、視床下部のdopamine活性の低下ではない他の機序が考えられる。このような症例では、T値, DHA-S値が高値を示したものが多く、副腎や卵巣におけるアンドロゲン産生の亢進が高LH血症の成因である可能性が示唆された。

まとめ

高LH血症に潜在性高PRL血症を伴うものではBrm投与によりPRLの分泌抑制と共にLH-RHに対するLH分泌の抑制, LH基礎値の低下が認められた。しかし高LH血症の他群ではそのような傾向は見られず、高LH血症に潜在性高PRL血症を伴うものは他の高LH血症とは成因を異にすると考えられた。

文 献

- 1) Falschi P, Pozo ED, Rocco A, et al., Prolactin Release in Polycystic Ovary. *Obstet Gynecol* 55: 579, 1980
- 2) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他, 排卵障害の原因別分類とその治療. *日本不妊会誌* 35: 650, 1990
- 3) Alger M, Vazquez-Matute L, Mason M, et al., Polycystic ovarian-disease associated with hyper prolactinemia and defective metoclopramide response. *Fertil Steril* 34: 70, 1980
- 4) Luciano AA, Chapler FK, Sherman BM, Hyper prolactinemia in Poly cystic ovary Syndrome. *Fertil Steril* 41: 719, 1984
- 5) Farrari C, Rampini P, Malinverni A, et al., Inhibition of luteinizing hormone release by dopamine infusion in healthy woman and in various patho physiological conditions. *Acta Endocrinol* 97: 436, 1981
- 6) Quigley ME, Rakoff JS, Yen SCC, Increased luteinizing hormone sensitivity to dopamine inhibition in poly cystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 231, 1981
- 7) Falaschi P, Rocco A, Pozo E, Inhibitory effect

of bromocriptine treatment on luteinizing hormone secretion in poly cystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol 62: 348, 1986

- 8) Spruce BA, Kendall-Taylor P, Dunlop W, et al., The effect of bromocriptine in the poly cystic ovary syndrome. Clin Endocrinol 20: 481, 1984
- 9) Burat J, Buvat-Herbaut M, Marcolin G, et al., A double blind controlled study of the hormonal and clinical effects of bromo-cryptine in the poly cystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 63: 119, 1986
- 10) Yen SCC, et al., Reproductive endocrinology. Saunders Philadelphia, 1986

**Studies on the pathogenesis
of the hyper LH syndrome
by the estimation of the PRL secretion**

Hiroshi Matsuguchi, Gen-ichi Nakamura,
Masahiro Nozaki, Masatoshi Sano
and Hitoo Nakano

Department of Gynecology and obstetrics,

Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka 812, Japan

30 anovulatory patients with increased luteinizing hormone (LH) secretion were classified into 3 groups according to their capacity of prolactin (PRL) secretion; hyperprolactinemia (group 1; n=3), occult-hyperprolactinemia (group 2; n=8) and normoprolactinemia (group 3; n=19). Moreover, effects of bromocriptine (Brm) (5 mg p.o./day) on gonadotropin secretion were investigated.

There were no significant difference either in basal serum LH levels or in serum LH levels 30 minutes after luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) injection (100 μ g i.v.) between 3 groups before exposure of Brm. In group 2 basal serum LH levels and LH levels after LH-RH injection were significantly suppressed after exposure of Brm. On the other hand, LH levels were not changed by Brm. administration in group 1 and 3.

These findings suggested that the increased secretion of LH in group 2 is etiologically different from that of group 1 and 3.

(受付: 1993年3月25日)

(受理: 1993年6月18日)

高LH血症性視床下部障害の内分泌学的特徴とbromocriptineの効果

Studies with Endocrinological Characteristic of Hyper-LH Hypothalamic Anovulation and Effect of Bromocriptine Administration

合 阪 幸 三

Kohzo AISAKA

國 保 健太郎

Kentaro KOKUHO

賛育会病院産婦人科

都 築 浩 雄

Hiroo TSUZUKI

為 近 慎 司

Shinji TAMECHIKA

吉 田 浩 介

Kohsuke YOSHIDA

鳥 谷 葉 子

Yohko TORIYA

斉 藤 英 樹

Hideki SAITOH

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

帝京大学医学部産婦人科

森 宏 之

Hiroyuki MORI

Teikyo University, School of Medicine, Tokyo 173, Japan

過去3年間の視床下部障害型排卵障害患者109例を対象として、LH/FSH比により、高LH血症性排卵障害(内分泌学的PCO, LH/FSH $\geq$ 1, 36例, A群)および非PCO (LH/FSH $<$ 1, 73例, B群)に分類し、血中各種ステロイドホルモン値、プロテクチン関連疾患 (PRD) の合併頻度、およびbromocriptine (Br) の臨床効果について比較し、以下の成績を得た。①血中androstenedione (ASD) 値は、A群で有意に高値を示したが ($P<0.02$)、他のホルモン値には有意差はなかった。②PRDは109例中52例 (47.7%) に認められ、このうち17例 (32.7%) はPCOも合併していた。③Brの投与によりA群のLH/FSHは $1.43\pm0.58\rightarrow1.12\pm0.60$ ($P<0.05$) と有意に改善され、24例 (66.7%) に排卵が認められ、8例に妊娠が成立した。B群の73例中PRDを合併しない38例に対してはBrは著効を示さなかった。以上より内分泌学的PCOでは、高ASD血症が特徴で、PRDを合併する症例が多く、Brの投与が有効であることが明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 688 - 693, 1993)

緒 言

高LH血症性視床下部障害は、いわゆるPCOS (Polycystic ovary syndrome) の初期の病態と考えられており、排卵障害の少なからぬ頻度を占めている重要な疾患のひとつとして近年注目されている¹⁻⁷⁾。狭義のStein-Leventhal症候群では、無月経、両側卵巣の多嚢胞性腫大、男性化、肥満などの症状を伴う

とされているが、本邦婦人では男性化徴候を伴うことはむしろまれで、血中のゴナドトロピン値を中心に診断する、いわゆる内分泌学的PCOに関する報告が多い¹⁻⁷⁾。診断基準に関しては現在のところ統一されたものはないが、高LH、正常FSH血症性排卵障害を主徴とするという点では一致している。今回我々は、ゴナドトロピンの測定法および標準品が1988年より大幅に変更されたのを機に、最近3年間

の不妊・内分泌外来を受診した高LH血症性視床下部障害(以下内分泌学的PCOとする)症例について、それらの内分泌学的特徴およびbromocriptineの有効性を検討したので報告する。

研究対象および研究方法

1989年1月より1991年12月末までの3年間に、新たに当科不妊・内分泌外来を受診した385例のうち、LH-RH (100 μ g), TRH (500 μ g) 負荷テスト(前, 30分後, 60分後の3回採血)により視床下部障害型排卵障害と診断された109例を対象とした。これらを、負荷前値のLH/FSH比により、内分泌学的PCO (LH/FSH ≥ 1 , 36例, A群) および非PCO (LH/FSH < 1 , 73例, B群) の2群に分類し、血中各種ステロイドホルモン値, prolactin (PRL) 関連疾患の合併状況およびbromocriptine (5 mg/day) の2か月以上連続投与による臨床効果について比較検討した。

各種ホルモン測定のための採血は、基礎体温(BBT)が2相性を示す症例については黄体期に、1相性のものに関しては随時施行した。測定に関しては、FSH, LHおよびPRLはWHOの新しい標準品を用いた第一RI社製のIRMA法により、estrone (E₁), estradiol (E₂), progesterone (P₄) および androstenedione (ASD) についてはRIA法により、いずれもSRL社に依頼して行われた。その際のintraおよびinterassay varianceは、FSH, LH, PRLに関しては10%未満、E₁, E₂, P₄, ASDに関しては15%未満といずれも満足すべき値であった。

なお、今回の研究では、PRL関連疾患 (Prolactin related diseases, PRD) として、高PRL血症(血中PRL基礎値 ≥ 15 ng/ml) および潜在性高PRL血症(基礎値 < 15 ng/ml, TRH負荷30分値 ≥ 70 ng/ml) の2疾患をまとめて取り扱った。また、bromocriptine投与による効果判定は、排卵の有無、妊娠成立の有無により行った。排卵の有無は超音波断層法にて最大経20 mm以上の成熟卵胞が認められた場合を排卵ありと判定することとした。

推計学的処理は、Student's paired t-testおよび χ^2 検定によった。

研究成績

1. 血中各種ホルモン値からみた本疾患の内分泌学的特徴

血中各種ステロイドホルモン値は、A, B群でそれぞれ、E₁: 105.3 $\pm$ 56.2 vs. 89.4 $\pm$ 48.0 pg/ml, E₂: 178.9 $\pm$ 87.7 vs. 185.2 $\pm$ 76.4 pg/ml (図1), P₄ (BBTが

2相性を示したもののみ, A群: 31例, B群: 60例): 8.2 $\pm$ 5.1 vs. 9.4 $\pm$ 5.8 ng/ml, ASD: 2.31 $\pm$ 1.40 vs. 1.62 $\pm$ 1.35 ng/ml, (P<0.02, 図2) と、A群でASD値が有意に高値を示した。

血中ゴナドトロピン値に関しては、図3、表1に

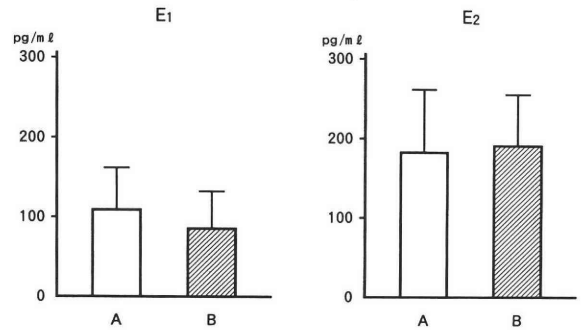


図1 血中E₁, E₂値の比較 (M $\pm$ S.D.)

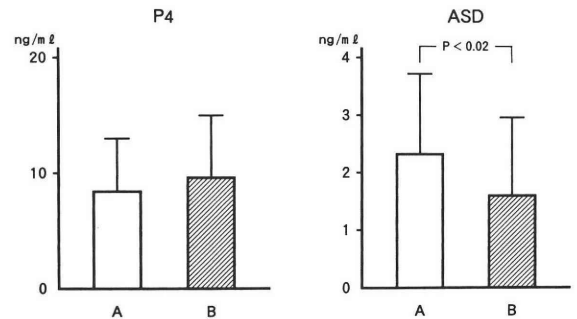


図2 血中P₄, ASD値の比較 (M $\pm$ S.D.)

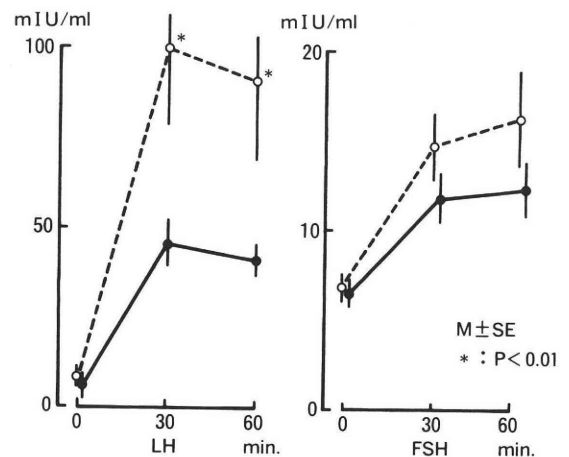


図3 血中ゴナドトロピン値の比較 (bromocriptine投与前)

○---○ A
●---● B

表1 血中ゴナドトロピン値の比較 (M±S.D.)
(bromocriptine投与前)

*: P<0.01

		LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)
前値	A:	9.4 ± 6.8	6.6 ± 3.4
	B:	5.4 ± 3.0	6.2 ± 2.9
30分値	A:	100.7 ± 61.2*	14.6 ± 9.6
	B:	47.0 ± 26.3	11.2 ± 8.3
60分値	A:	91.0 ± 58.2*	16.2 ± 10.6
	B:	41.6 ± 23.4	12.5 ± 8.1

示すように、LHの30分値、60分値でA群が有意に高値を示した (P<0.01)。Bromocriptineの投与により、図4、表2に示すように、A群にみられたLH-RH負

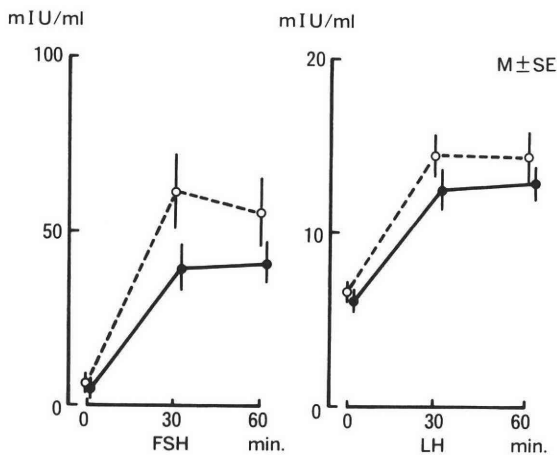


図4 血中ゴナドトロピン値の比較
(bromocriptine投与後)
○---○A
●---●B

表2 血中ゴナドトロピン値の比較 (M±S.D.)
(bromocriptine投与後)

		LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)
前値	A:	6.7 ± 3.0	6.4 ± 2.5
	B:	5.6 ± 3.4	6.1 ± 3.0
30分値	A:	62.0 ± 37.3	14.6 ± 6.5
	B:	47.2 ± 30.1	12.2 ± 7.6
60分値	A:	53.6 ± 36.9	14.5 ± 6.3
	B:	48.0 ± 29.3	12.6 ± 7.4

荷に対するLHの過剰な反応は著明に抑制された。Bromocriptine投与前後での比較では、A群のLH 30分値、60分値で、いずれも有意に抑制されていた (P<0.02)。一方、LH-RH負荷前値では、A群でLHが高値をとる傾向が得られたが、A、B群間に有意の差は認められなかった。しかし、LH/FSH比をとると、A群:1.43±0.58、B群:0.90±0.46とA群で有意に高値であった。Bromocriptine投与により、それぞれ、1.12±0.60、0.88±0.51とA群で有意に抑制されていることが明らかとなった (P<0.05、図5)。同様に、A群で高値を示していた血中ASD値もbromocriptineの投与により、A、B群でそれぞれ1.70±1.06、1.75±1.27 ng/mlとA群で有意に低下していた (P<0.05、図6)。

以上より、内分泌学的PCOでは、高ASD血症が特徴的所見であり、bromocriptineの投与により、LH/FSH比は低下し、高ASD血症も改善することが明らかとなった。

2. PRL関連疾患 (PRD) との関係

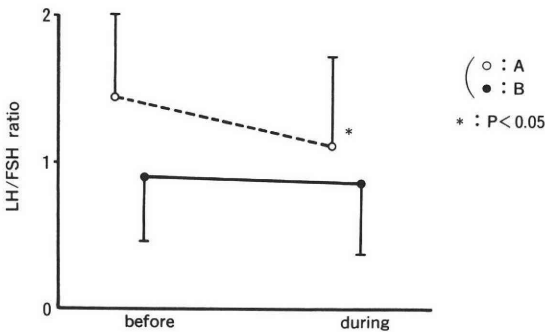


図5 Bromocriptine投与によるLH/FSH比の変化
(M±S.D.)

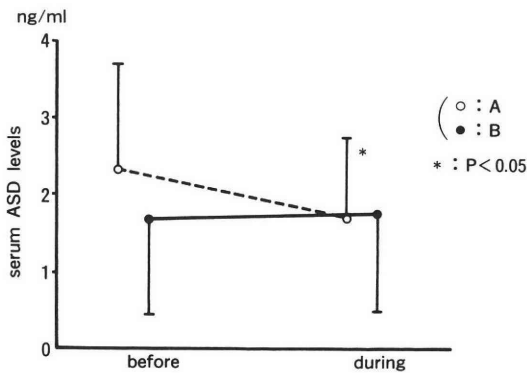
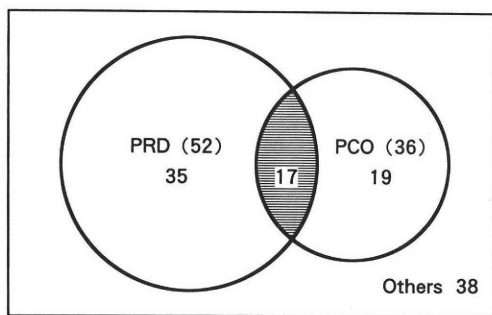


図6 Bromocriptine投与による血中ASD値の変化
(M±S.D.)



Total 109 cases

図 7 本研究対象におけるPRDとPCOとの相関

全症例109例のうち、PRDは52例 (47.7 %) に認められ、これらのうち17例 (32.7 %) はPCOを合併していた。逆に内分泌学的PCOの側からみると、36例中17例 (47.2 %) にPRDが合併していた (図 7)。すなわち、内分泌学的PCOとPRDはしばしば合併してみられ、この両者を合わせると視床下部障害に基づく排卵障害の65.1 % (109例中71例) と、原因の多数を占めていることが明らかとなった。

3. Bromocriptineの臨床効果

Bromocriptine 5 mg/dayの 2 か月以上の投与により、前述したように血中LH/FSH比、ASD値は改善され、A群36例中24例 (66.7 %) に排卵が認められ 8 例 (22.2 %) に妊娠が成立した。B群では73例中35例にPRDが認められたが、それ以外の38例についてbromocriptineの効果を検討したところ、5例 (13.2 %) に排卵が認められたのみで、妊娠例はなかった。またA群においてもPRDが17例合併していたので、これらを除外して検討したところ、19例中 9 例 (47.4 %) に排卵が認められ 3 例 (15.8 %) に妊娠が成立した ($\chi^2=8.00$, $P<0.005$, 表3)。

以上のことから、内分泌学的PCOに対するbromocriptine療法の有効性が示された。また、

表 3 PCOと非PCO症例におけるbromocriptineの有効性の比較

pure-PCO: PRDの合併を除外したPCO症例

pure-non-PCO: PRD, PCO以外の視床下部障害症例

	Br. Effectiveness		Total
	(+)	(-)	
pure-PCO	9	10	19
pure-non-PCO	5	33	38
Total	14	43	57

$\chi^2=8.00$, $P<0.005$

bromocriptineが有効とされるPRDやPCOを除外した視床下部障害に基づく排卵障害には、bromocriptineは有効でないと考えられた。

考 察

近年、各種ホルモンの測定が容易になって以来、PCOSに対する概念は大きく変化しつつある。殊に個々の症例により症状の出現がまちまちであること、卵巢の多嚢胞化といった一元的な病態のみならず、他の内分泌学的病変と複雑なネットワークを形成していること、人種差が著明であること等が、ますます本疾患の概念を混乱させているものと考えられる¹⁻³⁾。冒頭にも述べていたように、本邦婦人のPCOSでは欧米に比べて男性化徴候や、男性ホルモン高値が著明でないことから、血中のゴナドトロピン値を中心に診断する、いわゆる内分泌学的PCOに関する報告が数多くみられる¹⁻⁷⁾。明確な診断基準は現在のところ定められていないが、いずれも高LH、正常FSH血症性排卵障害を主症状とするという点では一致している。著者らは以前より、このような疾患は排卵障害を訴える患者の少なからぬ頻度を占めること、多くの場合PRDを伴っていること、bromocriptineの投与が有効であること、その作用機序としては、PCOにみられる視床下部におけるdopamine turnoverの亢進を強力なdopamine agonistとしての作用により改善すること等につき報告を重ねて来た^{4,6,7,10)}。今回はゴナドトロピンの測定系が1988年より標準品も含めて大幅に変更されたことを機に、新しい測定系において内分泌学的PCOがどのような血中ゴナドトロピン値の変動を示すか、それにより卵巢からの性ステロイドホルモン分泌はどのように変化するか等につき、bromocriptine療法の有効性も含めて再検討することを目的として研究を行った。

まず、内分泌学的PCOの診断規準として、以前の報告で旧キットによる測定値で、 $LH \geq 30$ mIU/ml, $FSH \leq 15$ mIU という値を用いたが⁶⁾、これらの基準から青野らの報告に基づく新旧キット間の変換式により⁸⁾、排卵期周辺を除外して $LH > FSH$ を示すものという基準⁷⁾を採用した。この基準により、最近の109例の視床下部性排卵障害を 2 群に分けて比較検討したところ、A群 ($LH > FSH$ を示した群) において、LH-RH負荷後のLHのみが過剰反応を示し、しかも、本邦婦人のPCOに特徴的にみられるとされる高ASD血症を伴っていたことから、この基準は内分泌学的PCOの診断として妥当なものであると考えられた。

また、以前にも報告したように、本疾患の多数(約半数)にPRDを合併していることが明らかとなった⁷⁾。

下垂体からのPRL分泌は、視床下部からのdopamineにより抑制的にコントロールされているが、PCOでは視床下部におけるdopamine turnoverの亢進によりdopamine活性が低下する結果、抑制がとれて2次的に下垂体からのPRL分泌が亢進する可能性が考えられる。潜在性高PRL血症ではエストロゲンによるfeedback機構が障害されていることが多いが、bromocriptineによりnegative, positiveともfeedbackが改善することから、やはり視床下部におけるdopamine失調がその病因であると考えられている¹⁰⁾。本研究で数多くみられたPCOとPRDの合併も以上のような機序に因っているものと思われた。

最後にbromocriptine療法の効果を検討したが、やはり以前の報告と同様に、bromocriptineの投与はLHを低下させ、LH-RHに対する反応も抑制し、結果的にLH/FSH比を改善し、血中ASD値も正常域に低下させることが明らかとなった。作用機序としては前述のようにdopamine agonistとしての作用により、視床下部のdopamine失調を改善することによるものと推察された。

PCOの治療薬としては、bromocriptine以外にclomipheneがあるが、排卵誘発率では高率で良好な成績を示しているが、妊娠率が必ずしも良くない点が問題である。当科の成績でも⁷⁾、bromocriptineは排卵率ではclomipheneに及ばないものの、妊娠率ではclomipheneを上まわっており、良好な結果が得られている。なお、内分泌学的PCOの子宮内膜組織は、低estrogen, progesterone血症を反映してatypicalな系を示すことが多いが、このような状態は子宮内膜にとって好ましいものではなく、将来的に子宮内膜癌が発生しやすいとされているので、挙児を希望しない場合でも周期的にE-P剤(pillなど)を投与し、子宮内膜を正常化しておく必要がある⁶⁾。またそれにより、中枢に対するfeedback効果から、高値をとっているLHも低下するという作用も期待できる。

おわりに

本研究の結果、高LH血症性視床下部障害患者(内分泌学的PCO)の診断基準としては、排卵期周辺を除いて血中LH/FSH > 1とするのが妥当であることが明らかとなり、その内分泌学的特徴は高ASD血症であることが示された。本疾患はPRDと同様に排卵障害の原因として多数を占め、放置すると子宮内膜

にも好ましくない影響を与えることから、早期からの適確な診断、治療が必要であると考えられた。また、bromocriptine療法は内分泌学的に高LH、高ASD血症を改善し、臨床的にも良好な成績を示すことから、本疾患のfirst choiceとして試みられるべき治療法であると思われた。

本論文の要旨は、第37回日本不妊学会総会(1992年11月、東京)において発表した。各種ホルモンの測定に御協力を頂いたSRL社に深謝する。

文 献

- 1) 森 崇英, 多嚢胞性卵巣症候群—概念の整理と最近の治療. 日内分泌会誌 63: 1449, 1987
- 2) 水口弘司, 植村次雄, 白須和裕 他, 正常プロラクチン血性排卵障害のbromocriptine療法—潜在性高プロラクチン血症と多嚢胞性卵巣症候群. 産婦実録 36: 187, 1987
- 3) 合阪幸三, 吉田浩介, 多嚢胞性卵巣に対する排卵誘発法. 産婦治療 56: 537 1988
- 4) 森 宏之, 合阪幸三, 松岡 良 他, 高LH, 正常プロラクチン血性排卵障害に対するbromocriptineの効果. 日内分泌会誌 61: 48, 1985
- 5) 武谷雄二, 石川弘子, 木下俊彦 他, 多嚢胞性卵巣の分類とbromocriptineの有用性の検討. 日産婦会誌 38: 1697, 1986
- 6) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他, 内分泌学的PCO症例の臨床的背景およびbromocriptineの効果に関する研究. 日内分泌会誌 66: 101, 1990
- 7) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他, 排卵障害の原因別分類とその治療. 日本不妊会誌 35: 650, 1990
- 8) LH・FSH研究会(代表: 青野敏博), 下垂体性ゴナドトロピン標準品を用いたLHおよびFSHのImmunoradiometric測定法(スパック-S LH, スパック-S FSH)の多施設における臨床的検討. ホと臨床 36: 1087, 1988
- 9) PRL研究会(代表: 青野敏博), WHO標準品を用いた血中プロラクチンのImmunoradiometric測定法(スパック-S, プロラクチンキット)の多施設における基礎的および臨床的検討. ホと臨床 37: 441, 1989
- 10) 合阪幸三, 安藤三郎, 國保健太郎 他, いわゆる潜在性高prolactin血症患者におけるprolactin分泌予備能の検討. 日内分泌会誌 62: 662, 1986

Studies with endocrinological characteristic of hyper-LH hypothalamic anovulation and effect of bromocriptine administration

Department of Obstetrics and Gynecology,

San-ikukai Hospital, Tokyo 130, Japan

Kohzo Aisaka, Hiroo Tsuzuki
Yohko Toriya, Kentaro Kokuho
Shinji Tamechika, Hideki Saitoh
and Kohsuke Yoshida

Teikyo University,
School of Medicine, Tokyo 173, Japan

Hiroyuki Mori

Present study was performed to elucidate the endocrinological background of the hyper-LH hypothalamic ovulatory disturbances (so-called the endocrinological PCOD). 109 cases of the hypothalamic anovulations were selected by the LH-RH and TRH loading test during past three years. Then, the subjects were divided into two groups; group A: $\text{LH/FSH} \geq 1$, the endocrinological PCOD, 36 cases, and group B: $\text{LH/FSH} < 1$, non-PCOD type, 73 cases. And serum levels of the various types of sex steroid hormones, the rate of the complication of prolactin related diseases (PRD) and the efficacies of the administration of bromocriptine were compared between

these two groups. There were significant increases in serum androstenedione (ASD) levels in the group A compared to those of the group B (2.31 ± 1.40 vs. 1.62 ± 1.35 ng/ml, $p < 0.02$). However, no significant change could be seen in the other sex steroid levels. 52 cases of the PRD were found in all of 109 subjects (47.7 %), and 17 cases of the PRD were complicated with the endocrinological PCOD (32.7 %). By the administration of bromocriptine, the LH/FSH ratio in the group A was improved significantly ($1.43 \pm 0.58 \rightarrow 1.12 \pm 0.60$, $p < 0.05$), while there was no significant change in the group B. And also, serum levels of ASD in the group A decreased significantly (1.70 ± 1.06 ng/ml, $p < 0.05$). The ovulations were induced 24 cases of the group A (66.7 %), and 8 cases (22.2 %) were conceived. On the contrary, only 5 cases (13.2 %) out of 38 cases in the group B which were not complicated with PRD ovulated, and no case was conceived. From these results, it was concluded that the characteristic of the endocrinological PCOD was the elevated serum ASD level, and many cases of the PCOD complicated with PRD. The administration of bromocriptine was effective not only for the treatment of the PRD, but also for the PCOD.

(受付：1993年5月21日特掲)

(受理：1993年6月18日特掲)

子宮外妊娠に対する手術療法および薬物療法の比較検討

Comparison of Conservative Surgery and Drug Therapy for Ectopic Pregnancy

長崎大学医学部産婦人科

藤 下 晃

Akira FUJISHITA

鮫 島 哲 郎

Tetsuro SAMEJIMA

オルテガ ラウル

Raul ORTEGA

石 丸 忠 之

Tadayuki ISHIMARU

中 村 恒 一

Kouichi NAKAMURA

山 辺 徹

Tooru YAMABE

増 崎 英 明

Hideaki MASUZAKI

松 脇 隆 博

Takahiro MATSUWAKI

Department of Obstetrics and Gynecology,

Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852, Japan

健康保険諫早総合病院産婦人科

山 下 洋

Hiroshi YAMASHITA

中 野 龍 夫

Tatuo NAKANO

加 瀬 泰 昭

Yasuaki KASE

Health Insurance Society Isahaya Hospital, Isahaya 854, Japan

子宮外妊娠に対する保存的治療としての手術療法および薬物療法の成績について比較検討した。対象は保存手術を行った22例(手術群)、腹腔鏡下に病巣内にMTXを注入した12例(局注群)およびMTXの筋肉内投与を行った16例(全身投与群)である。手術群の術式はsalpingotomy16例、salpingostomy 5例およびmilking 1例であった。局注群ではMTX 15~50 mgを使用し、全身投与群では20 mg/日を4~5日間全身投与した。治療後尿中hCG値が検出感度以下になるまでの期間は手術群で短く(16.5日)、局注群(42.3日)と全身投与群(43.8日)は同程度であった。術後の患側における卵管疎通率は、手術群79%、局注群86%および全身投与群85%であり、治療後の妊娠率は、手術群59%、局注群50%および全身投与群69%であった。局注群12例中7例ではMTXの追加投与が必要であり、2例ではその後、卵管破裂をきたした。以上より、MTX療法は有用であるが、適応例を選択し、限界を熟知した上で施行すべきと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 694 - 699, 1993)

緒 言

子宮外妊娠(以下、外妊と略す)に対する保存療法として、手術および薬物療法が挙げられる。手術療法は従来より行われてきた一般的な保存的術式の他、microsurgeryや腹腔鏡下手術などの方法が試みられている^{1~3)}。

一方、薬物療法としては、methotrexate (MTX) の全身あるいは局所投与が試みられている。その他、

prostaglandin 剤(PGF 2 α)、Etoposide、高張ブドウ糖液およびエタノールなどを用いた局所投与も試みられている^{4~7)}、その投与量や投与方法に関しては、いまだ一定の基準は定められていない。

今回、私どもは従来から行ってきた開腹術による保存手術、腹腔鏡下に、MTXを病巣内に注入する方法および関連施設で行ったMTX全身投与法の3つの治療法による成績を比較することにより、その有用性についての検討を行った。

表1 症例の背景

	手術群	局注群	全身投与群
部位	膨大部 14例 峡部 7例 采部 2例	膨大部 7例 峡部 3例 間質部 2例	膨大部 14例 峡部 2例
年齢	27.7歳 (21~40)	28.0歳 (17~33)	27.1歳 (22~34)
妊娠週数	8週5日 (4週6日~13週4日)	7週6日 (5週1日~10週3日)	7週2日 (4週0日~11週0日)
尿中hCG値	6,575 iu/l (512~38,400)	4,659 iu/l (512~19,200)	1,883 iu/l (50~4,800)
MTX投与量		103 mg (15~265)	109 mg (80~200)

対象および方法

1984年5月から1992年9月までに長崎大学附属病院で保存手術を行った23例(手術群), 腹腔鏡下に非破裂を確認したのち, 病巣内にMTXを注入した12例(局注群) および1986年10月から1991年6月までに, 健康保険諫早総合病院で腹腔鏡下に外妊と診断したのち, MTXの全身投与を行った16例(全身投与群)を対象とした。

子宮外妊娠の部位は, 手術群は膨大部14例, 峡部7例および采部2例, 局注群は膨大部7例, 峡部3例および間質部2例および全身投与群では膨大部14例, 峡部2例であった。手術群, 局注群および全身投与群の患者年齢は, それぞれ平均27.7歳(21~40歳), 28.0歳(17~33歳) および27.1歳(22~34歳)であった。妊娠週数は同様に, 平均8週5日(4週6日~13週4日), 7週6日(5週1日~10週3日) および7週2日(4週0日~11週0日)であった。また術前の尿中hCG値の平均は, 手術群 6,575 iu/l(512~38,400), 局注群 4,659 iu/l(512~19,200) および全身投与群 1,883 iu/l(50~4,800)であり, 全身投与群では手術群および局注群に比べ低値であった(表1)。なお, 尿中hCG値の測定はUCGタイトレーションセット(杏林製薬)およびハインツインクロンhCG(栄研化学)によった。

手術群23例の術式はsalpingotomy 17例, salpingostomy 5例およびmilking 1例であった。なお, 卵管切開後の内容除去にはマイクロサージェリー用の電気メスを用いた(図1)。

Salpingotomy 卵管切開術



(峡部~膨大部)

Salpingostomy 卵管開口術



(采近傍膨大部)

Milking



(采部)

Segmental resection 部分切除術



(峡部~膨大部)

図1 保存手術の術式

局注群は腹腔鏡下に外妊が非破裂であることを確認したのち, MTX 15~50 mgを生理食塩液2~3 mlに溶解し, 病巣内に注入した。全身投与群は同様に腹腔鏡で外妊が非破裂であることを診断したのち, MTX 20 mg/dayを4~5日間筋肉内に投与した。局注および全身投与群では, 尿中hCG値の下降が遅延するか, あるいは再上昇を認める場合には, MTX 20 mg/dayの筋注を適宜追加投与した(表2)。MTXの総投与量は局注群で平均103 mg(15~265), 全身投与群で109mg(80~200mg)であり, 2群間に有意差はなかった。

表 2 対象および治療内容

	手術群	局注群	全身投与群
症例数	23例	12例	16例
治療内容	salpingotomy 17例 salpingostomy 5例 milking 1例	MTX 15～50 mgを生理食塩液 2～3 mlに溶解し、病巣内に注入する。	MTX 20mg/日4～5日間の筋注を1ないし2クール施行する。

表 3 治療成績

	手術群 (n=23)	局注群 (n=12)	全身投与群 (n=16)
hCG消失までの日数	16.5 (n=11) (9～27)	42.3 (n=12) (20～75)	43.8 (n=16) (20～77)
卵管疎通率			
患側	15/19 (79 %)	6/7 (86 %)	11/13 (85 %)
対側	16/17 (94 %)	5/6 (83 %)	10/11 (91 %)
予後	17例中10例に12回の妊娠が成立。 分娩 8例 流産 2例 妊娠中 2例	8例中4例に5回の妊娠が成立。 分娩 1例 流産 1例 妊娠中 3例	13例中9例に11回の妊娠が成立。 分娩 9例 流産 1例 外妊 1例
副作用		肝機能障害 1例 全身倦怠感 2例	白血球減少 1例

治療成績

尿中hCG値が検出感度以下 (2 iu/l) になるまでに要した日数は、手術群では平均16.5日 (9～27日) であったのに対し、局注群では平均42.3日 (20～75日) および全身投与群では43.8日 (20～77日) であった (表 3) 。治療終了3周期後の子宮卵管造影検査で、手術群における患側の卵管疎通率は79 % (15/19例) であり、対側では既往摘出卵管を除いて算出すると94 % (16/17例) であった。局注群では患側および対側の疎通率は、それぞれ86 % (6/7例) および83 % (5/6例) であり、全身投与群では同様に85 % (11/13例) および91 % (10/11例) であった。治療終了後6ヵ月以上follow upできた症例で、初回治療後2年以内に妊娠した例を検討すると、手術群で17例中10例 (59 %) に12回の妊娠が成立し、その内訳は正常分娩8例、流産2例および現在妊娠継続中が2例である。局注群では8例中4例 (50 %) に5回の妊娠が成立し、流産後の正常分娩1例および妊娠継続中が3例である。全身投与群では13例中9例 (69 %) に11回

の妊娠が成立し、その内訳は正常分娩9例、流産1例および対側に外妊を反復したもの1例であった。

なお、MTX投与群での副作用は局注群で3例、全身投与群で1例にみられた。軽度の肝機能障害1例、白血球減少症1例および軽度の全身倦怠感を訴えた2例であった。これらの例に対しては特別の治療は行わなかったが、その後軽快した。局注群3例はすべて全身投与を追加した例であり、MTX総投与量が100 mgを超えており、全身投与群1例での総投与量は200 mgであった。またMTX局注群で2例がその後破裂したが、1例は卵管膨大部の大きさが6×3 cmであり、術前の尿中および血中hCG値はそれぞれ9,600および4,700 iu/lであった。初回MTX 30 mgを局注したが、その後腹腔内出血が出現し、初回治療2週間後に開腹した。残り1例の卵管峡部の大きさは4×3 cmであり、術前の尿中および血中hCG値はそれぞれ19,200および4,400 iu/lであった。初回50 mgを局注したが、その後尿中hCG値の下降が遷延し、3週後もhCG値は1,200 iu/l程度と下降せず、開腹手術を考慮しながら、3クール目を投与中に突然

破裂した。

考 察

外妊に対する保存手術は1953年、Stromme⁸⁾らによって最初に行われ報告された。以後、保存手術の報告は散発的に認められるにすぎなかったが、1970年の後半になってmicrosurgeryが普及しはじめ、これに伴って、手術器具や縫合糸の改良がなされた結果、保存手術の成績が著しく向上し、根治手術(卵管摘出術)にかわる方法として注目されるようになってきた¹⁰⁾。その後、microsurgeryの手法が保存手術に取り入れられるようになり、さらに腹腔鏡下の保存手術も試みられている¹¹⁻¹⁵⁾。Oelsner¹¹⁾によれば、根治手術後の子宮内妊娠率は36.5%であり、外妊反復率は15.4%であったという。同様に、Lavy¹²⁾の5文献(患者数1,025例)の集計による卵管摘出後の子宮内妊娠率は平均42%(34~49%)および外妊反復率は11%(7~17%)であったとしている。これに対し、保存手術後の治療成績については、Vermesh¹³⁾の8文献(527例)の集計によると、開腹保存手術後の子宮内妊娠率は54%および外妊反復率は13%とされている。また腹腔鏡下に保存手術が施行された269例の挙児希望患者における子宮内妊娠率は58%、外妊反復率は16%であったという¹⁴⁾。同様に、350例における子宮内妊娠率は56%および外妊反復率は17%であったとの報告がみられる¹⁵⁾。

また対側卵管の既摘出例や閉塞例などの単一卵管における治療成績についてみると、子宮内妊娠率は55~57%および外妊反復率は20~24%^{13,14)}などの報告がみられる。このように、根治手術と保存手術後の子宮内妊娠率は変わらないか、むしろ保存手術の方がやや高いとする報告がみられ、また外妊反復率に関しても、両者間に有意の差はみられないとする報告が多いことなどから、保存手術の有用性が示唆されている。自験では、保存手術後の子宮内妊娠率は59%であり、外妊の反復はみられなかった。

ところで、従来より膨大部妊娠では流産が多く、峡部および間質部では破裂が多いとされてきたが、これは卵管粘膜と皺襞の発達の違いによるものと考えられている¹⁶⁻¹⁸⁾。すなわち、膨大部では受精卵の多くは粘膜固有層に着床し、その後のトロフォブラストの破壊侵入に対しても、脱落膜がその防御となりうるので、漿膜の破壊、すなわち破裂は起こりにくいと考えられる。一方、粘膜の発達の不良な峡部では、直接筋層内に着床することが多く、またたとえ粘膜内に着床しても脱落膜形成が不良なため、漿

膜面を破壊し、破裂をきたすと考えられている¹⁶⁾。

Pauerstein¹⁷⁾は、摘出卵管での着床部位を組織学的に検討し、25例中 intraluminal type (管腔内発育) は16例(64%)にみられ、このうち3例(19%)に破裂が認められ、一方、extraluminal type (管腔外発育) の6例(24%)のうち5例(83%)に破裂がみられ、さらにmixed type (混合型) についても3例(12%)のうち2例(67%)が破裂したと述べている。また Senterman¹⁸⁾は膨大部妊娠84例と峡部妊娠7例での組織学的検討を行い、膨大部のなかで47例(56%)はintraluminal typeであり、このうち粘膜が温存されていたのは15例(32%)、筋層が温存されていたのが40例(85%)であったが、峡部では大部分の例がextraluminal typeあるいはmixed typeであったという。したがって、峡部ではトロフォブラストの侵入が比較的容易に起こりやすく、そのため卵管の破裂をきたしやすいが、膨大部に対しては、本来の姿をそこなうことなく保存手術が可能ではないかと述べている。

一方、薬物療法は手術療法に比べて侵襲が軽度であり、手技も容易しかも入院も短期間で済むことから、最近ではMTXをはじめとする薬物療法が注目されている^{4-7,19)}。MTX療法には全身投与と腹腔鏡下あるいは経腔超音波ガイド下に局所投与する方法がある。経腔超音波下に注入する方法は、外来レベルで行えるという利点があるが、経腔超音波断層法のみでは外妊部位を検出できない例も存在し、また薬物が確実に病巣内に注入されているかどうかは疑問であるため、私どもは腹腔鏡下で確定し薬物投与を行っている。

Maymon¹⁹⁾によれば、MTX療法を行った174例のうち、成功例は160例(92%)、副作用出現は26例(15%)、外科的な処置が必要であったのは15例(8.6%)であり、子宮卵管造影法で87例中66例(75%)に卵管疎通を認め、その後17例(9.7%)に子宮内妊娠が認められたという。自験では、局所投与および全身投与法におけるhCG消失日数においては両者間に差はなく、卵管通過性も同程度であった。妊娠率に関しては、手術群59%、局注群50%、および全身投与群69%であり、全身投与群で高い傾向を示したが、全身投与群では他の2群に比べ、術前hCG値が低値のものを対象としたためと考えられる。しかし3群間で統計上の有意差は認められなかった(χ^2 検定)。また副作用に関しては、重篤な副作用はみられなかったが、局注群に比べ全身投与群に出現頻度が少なかった理由として、術前のhCG値が前者に比べ後者

が低値を示した例が多かったためと思われる。MTX総投与量が多くなれば、副作用の出現頻度も高くなることが想定され、投与量も少なく有効で、かつ副作用の少ない治療法が望まれる。

MTX局所投与の際の薬剤は全身投与に比べ、異所性絨毛に直接作用し、組織内により高濃度で停滞し、しかも直接的に作用するであろうことを想定して始められたが、私どもの検討では、局注と筋注の場合の血中MTX濃度および血中消失パターンに差を認めていない²⁰⁾。Schiffら²¹⁾も同様の結果を報告している。したがって、局所投与を行った場合に、はたして高濃度の薬剤が維持され、長時間にわたって作用するか否かは疑問である。自験では、局注群12例中MTX投与が1回のみであったものは5例であり、残り7例には全身投与の追加投与が必要であった。そのため最初に局注を行った群のMTX総投与量は103 mg (15~265 mg)、全身投与群は109 mg (80~200 mg)であり、2群間に有意差はなかった。またMTX投与量に関しても、一般には12.5~50 mg程度が多く用いられているが、5 mgの投与量で成功した例や、なかには局注後に450 mgの大量点滴静注法を行った例なども報告されており、いまだ至適量を決めるまでには至っていない。またhCG値が下降したにもかかわらず、破裂した例の報告もある^{19,22)}。このように、MTX療法には今後解明されるべき多くの問題点があり、その適応と限界を熟知したうえでの治療法が望まれる。また今後、MTX局所投与においては、薬剤がより長時間組織内に停滞するような工夫が必要と思われる²³⁾。

文 献

- 1) Ishimaru T, Fujishita A, Mahmud N, et al., Conservative surgery for unruptured tubal pregnancy. *Jpn J Fertil Steril* 38: 105, 1993
- 2) 佐藤孝道, 児島孝久, 倉橋敬一, 子宮外妊娠の保存的手術療法. *産婦実録* 41: 471, 1992
- 3) Pouly JL, Mahnes H, Mage G, et al., Conservative laparoscopic treatment of 321 ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 46: 1093, 1986.
- 4) 田中俊誠, 藤本征一郎, 各種薬剤による子宮外妊娠の保存療法について. *臨婦産* 45: 855, 1991
- 5) 日下真純, 経腔超音波下Etoposide局所投与により保存的治療を行った卵管妊娠の1例. *産と婦* 58: 1401, 1991
- 6) Lang PF, Tamussino K, Hnigl W, et al., Treatment of unruptured tubal pregnancy by laparoscopic instillation of hyperosmolar glucose solution. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1378,

1992

- 7) 江川正弥, 小西公磨, 木下叫一 他, 頸管妊娠の早期診断と保存的薬物療法における超音波断層法の有用性—胎嚢内エタノール注入法の有効例—. *日超医論文集* 61, 319, 1992
- 8) Stromme WB, Salpingotomy for tubal pregnancy. *Obstet Gynecol* 1: 472, 1953
- 10) 澤崎千秋, 柳澤洋二, 子宮外妊娠. p157, 金芳堂, 1972
- 11) Oelsner G and Tarlatzis BC, Radicalsurgery for extrauterine pregnancy. In: DeCherney AH ed, *Ectopic pregnancy*. p127, Aspen Publishers, 1986
- 12) Lavy G, Diamond MP and DeCherney AH, Ectopic pregnancy: its relationship to tubal reconstructive surgery. *Fertil Steril* 47: 543, 1987
- 13) Vermesh M, Conservative management of ectopic gestation. *Fertil Steril* 51: 559, 1989
- 14) Thornton KL, Diamond MP and DeCherney AH, Linear salpingostomy for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North America* 18: 95, 1991
- 15) Nager CW and Murphy AA, Ectopic pregnancy. *Clinic Obstet Gynecol* 34: 403, 1991
- 16) 山邊 徹, 石丸忠之, 子宮外妊娠の病理解剖学. *産婦人科 Mook* No6, p22, 金原出版, 1979
- 17) Pauerstein CJ, Croxatto HB, Eddy CA, et al., Anatomy and pathology of tubal pregnancy. *Obstet Gynecol* 67: 301, 1986
- 18) Sentermann M, Jibodh R and Tulandi T, Histopathologic study of ampullary and isthmic tubal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 159: 939, 1988
- 19) Maymon R, Shulman A, Maymon BB, et al., Ectopic pregnancy, the new gynecological epidemic disease: review of the modern work-up and the nonsurgical treatment option. *Int J Fertil* 37: 146, 1992
- 20) 松脇隆博, 藤下 晃, 石丸忠之 他, 子宮外妊娠に対するMTX療法後の血中MTX濃度に関する検討. *日本内視鏡学会誌* 8: 32, 1992
- 21) Schiff ET, Tsabari A, Shalev E, et al., Pharmacokinetics of methotrexate after local tubal injection for conservative treatment of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 57: 688, 1992
- 22) Tulandi T, Falcone T, Atri M, et al., Transvaginal intratubal methotrexate treatment of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 58: 98, 1992
- 23) 藤下 晃, 石丸忠之, 松脇隆博 他, メソトレキセート・リビオドール懸濁液の子宮腔内注入後における組織内濃度に関する検討. *日本内視鏡学会誌* 8: 28, 1992

Conservative surgery and MTX therapy for ectopic pregnancy

Akira Fujishita, Tadayuki Ishimaru,
Hideaki Masuzaki, Tetsuro Samejima,
Kouichi Nakamura, Takahiro Matsuwaki,
Raul Ortega and Tooru Yamabe

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

Hiroshi Yamashita, Tatu Nakano
and Yasuaki Kase

Department of Obstetrics and Gynecology,
Health Insurance Society Isahaya Hospital,
Isahaya 854, Japan

Conservative surgery is considered a useful method for ectopic pregnancy (EP). Recently, MTX therapy for unruptured EP has been tried, and its efficacy and usefulness are reported. The MTX injection method is divided into a systemic and a local approach depending on whether it is performed with ultrasonographic guidance or by a laparoscopic technique.

We have tried three kinds of therapies (conservative surgery, MTX local injection and MTX systemic injection), and the clinical data was analyzed.

Conservative surgery by laparotomy was conducted in 22 cases: 16 by salpingotomy, 5 cases by salpingostomy, and one was treated by the milking method. These were done with a macrosurgical technique. MTX local injection (15-50 mg) was used in 12 cases, injected by laparoscopy in the ectopic sac. The systemic injection (20 mg, IM/day, 4-5 days) was used in 16 cases. The levels of urine hCG declined more rapidly in the conservative surgery (mean 16.5 days), than in the local (42.3 days) or systemic method (43.8 days). The tubal patency rate did not differ significantly between the three methods (conservative surgery: 79 %, local: 86 % and systemic: 85 %).

The pregnancy rate after treatment was relatively higher with the systemic method (69 %), than with conservative surgery (59 %) or the local method (50 %), but there were no statistical difference among three groups (χ^2 test). The total MTX dose was roughly equivalent in the systemic (109 mg) and local methods (103 mg). No serious toxicity was seen with either the systemic or the local MTX method. Seven of 12 cases treated locally, received MTX systemic injection afterwards because the levels of hCG did not decline quickly. Two cases ruptured after local injection.

Thus, MTX therapy is an effective method in some cases when we selected this indication and it is necessary to know fully the limitation of drug therapy.

(受付: 1993年3月15日)

(受理: 1993年6月18日)

AFSスコアリングに基づく術後癒着の 術後早期腹腔鏡 (Early Second Look Laparoscopy) による評価

Evaluation of Postoperative Adhesions Based on the A. F. S. Classification by Early Second Look Laparoscopy

九州大学医学部婦人科学産科学教室

森 俊 介

Shunsuke MORI

佐 野 正 敏

Masatoshi SANO

松 口 博 之

Hiroshi MATSUGUCHI

中 村 元 一

Gen-ichi NAKAMURA

野 崎 雅 裕

Masahiro NOZAKI

中 野 仁 雄

Hitoo NAKANO

Department of Gynecology and Obstetrics Faculty of Medicine,

Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

九州大学医学部附属病院産科婦人科において保存的開腹術後12日以内に術後癒着の評価及び剥離目的で早期腹腔鏡 (Early Second Look Laparo-Scopy; ESSL) を施行した42例を対象とし、術後癒着の程度、ならびに腹腔鏡下に癒着剥離が可能か否かを検討した。術後癒着はAmerican Fertility Society (AFS) のスコアを用い、初回手術終了時とESSL時のスコアの変化で評価した。42例中37例 (88.1%) に術後癒着が認められた。AFSスコアの変化が1～5点の癒着は27例、6～10点の癒着は4例、11～20点の癒着は1例、21点以上の癒着は5例であった。術後癒着が認められた37例中31例 (83.8%) で腹腔鏡下に癒着剥離が可能であった。AFSスコアの変化が10点以下の癒着は全て剥離可能であったが、11点以上の癒着では完全に剥離できた症例はなかった。AFSスコアは術後癒着の評価として適当であると考えられ、また術後癒着の評価、剥離に関しESSLは有用であると考えられた。

(Jpn, J. Fertil. Steril., 38 (4), 700 - 703, 1993)

緒 言

妊娠性を温存もしくは高める目的での婦人骨盤内手術において、術後の癒着は卵巣や卵管の機能を障害する可能性があるため大きな問題である。従来、種々の術後癒着を防止させる方法が試みられてきたが、防止効果は完全ではない^{1,2)}。最近、術後早期に腹腔鏡 (Early Second Look Laparoscopy; ESL) を施行し、術後癒着の評価並びに癒着剥離を行なう報告が見られるようになってきた¹⁻¹¹⁾。

しかし、従来の報告では癒着の程度の評価基準は統一されておらず、また客観性に欠けるものが多い。我々は当科におけるESSL時に術後癒着の程度をAmerican Fertility Society (AFS) の癒着スコアリングに基づき評価し、またESSLにより癒着剥離が可能

であったか否につき検討を加えた。

研究対象および方法

対象は九州大学医学部附属病院産科婦人科において、昭和63年4月から平成2年5月までの間に骨盤内保存手術を行い、患者の同意を得て術後12日以内に術後癒着の評価ならびに剥離目的でESSLを行った42例である。症例の平均年齢は29.2歳で、未婚婦人2例、不妊婦人40例、不妊婦人の平均不妊期間は3.9年であった。

初回手術時の診断名は表1の通りである。子宮内膜症の合併が16例に見られ、卵巣嚢腫9例中7例はチョコレート嚢胞であった。

初回手術の術式は表2に示す通りである。癒着剥離術をおこなった8例のうち4例は腹腔鏡下に癒着

表1 初回手術時診断名

診断名	例数
卵管周囲癒着	18例
子宮内膜症	16例
卵管閉塞	13例
卵管溜水症	11例
子宮筋腫	10例
卵巢囊腫	9例
中隔子宮	2例

(重複あり)

表2 初回手術術式

術 式	例数
癒着剥離術 (腹腔鏡下)	7例 4例)
顕微鏡下卵管形成術	20例
卵巢囊腫摘出術 (Webster-Baldy法)	9例 6例)
筋腫核出術	4例
子宮形成術 (卵管形成術併用)	2例 1例)
計	42例

剥離を行った症例である。全例に、初回手術終了時に癒着防止の目的で腹腔内にデキストラン70 200ml およびハイドロコーチゾン 500mgを注入した。

ESLLは術後7～12日目に全身麻酔下にopen laparoscopyにて行い、この時、術後癒着を認めた場合には、腹腔鏡下の癒着剥離を試みた。なお、初回手術終了時に存在していた癒着に関しては、癒着剥離は試みなかった。

AFSの癒着スコアリング¹²⁾に基づき、初回手術終了時、ESLL施行時に、癒着の状態を左右付属器の合計スコアで評価し、ESLL施行時の癒着のAFSスコアより初回手術終了時のAFSスコアを引いた値で術後癒着の程度を示した。

ESLL時の癒着剥離が可能であったか否かについては、腹腔鏡下に術後癒着がすべて剥離できた場合を剥離可能とし、一部剥離できた場合を一部可能、癒着剥離が全くできなかった場合を不可能とした。

表3 術後癒着と癒着剥離の可否

[術後癒着=ESLL時のAFSスコア
-初回手術終了時のAFSスコア]

術後癒着 (AFSスコア差)	症例数	E. S. L. L. 時癒着剥離		
		可能	一部可	不可能
0	5	—	—	—
1～5	27	27	0	0
6～10	4	4	0	0
11～20	1	0	0	1
21～	5	0	3	2
術後癒着の認められた症例	37	31	3	3

(例)

結 果

表3にESLL時に判定した初回手術に基づく術後癒着の程度と腹腔鏡下癒着剥離の可否について示した。AFSスコアの差が0点であったもの、つまり付属器領域に術後癒着の全く見られなかった症例は42例中5例のみで、残りの37例(88.1%)になんらかの術後癒着が認められた。術後癒着の見られた37例中27例はAFSスコアの変化が1～5点の極軽度の術後癒着、4例は6～10点の軽度の癒着、1例は11～20点の中等度の癒着、5例は21点以上の高度の癒着であった。

なお初回手術時、腹腔鏡下に癒着を剥離した4例中にも3例に極軽度の癒着が認められた。

癒着剥離が可能であった症例は、術後癒着のあった37例中31例(83.8%)で、全て術後のAFSスコアの変化が10点以下の症例であった。術後のAFSスコアの変化が11点以上の術後癒着であった6例中、剥離可能であった症例は1例もなく、3例では全く癒着剥離ができなかった。

なお今回ESLLを行った43例で、術中術後に合併症を起こした症例はなかった。

考 察

骨盤手術後の腹腔鏡(Second Look Laparoscopy)は、1967年にSworenら^{3,4)}によって卵管形成術の術後評価のためとして初めて施行され、その後、術後評価並びに術後癒着の評価として多数施行されるようになった。また術後早期に癒着の評価及び剥離を目的として1975年にSworen⁵⁾は術後6週に腹腔鏡を施行、その後初回手術後6から12週に施行したESLLが多数報告されるようになった^{1,2,6,7,11)}。

術後の腹腔内癒着について、Jansen⁶⁾らは256例の不妊症の手術後の患者において、初回手術時に全く癒着のなかった73例中に術後癒着を認めたものは42例(57.5%)で、初回手術時に癒着剥離を施行した183例中では168例(91.8%)であったと報告している。その他の報告でも^{7-9,13)}術後癒着の発生は48%から100%と高率である。

我々の検討でも42例中37例(88.1%)と殆どの症例でなんらかの術後付属器領域の癒着を認め、この中には卵巣・卵管に直接手術操作を加えていない症例も含まれていた。今回全例に術後癒着防止の目的でデキストラン70およびハイドロコーチゾンを使用したにもかかわらず、これほど高率に術後癒着を認めたことは、これらの方法では充分に術後癒着を防ぐことができないと考えられた。

術後癒着の程度に関しては従来の報告は主観的な評価しかされていなかった。我々は、AFSの癒着スコアリングに基づき術後癒着を客観的に評価したが、その内の多くは、AFSのスコア変化が10点以下の軽度もしくは極軽度の癒着であり、このようなものでは腹腔鏡下に癒着剥離が可能であった。しかし、術後癒着がAFSスコアリングで11点以上であったものではESLL時に癒着剥離が可能であった症例はなかった。つまり、術後癒着のAFSスコアは癒着剥離の可否とよく相関しており、術後癒着の評価としてAFSスコアリングは適当であると考えられた。

術後の癒着は術後約3日頃より線維化が始まり、完全に線維化が完成するのは術後約21日目といわれている¹⁴⁻¹⁶⁾。よって、線維性癒着の完成前である術後早期に癒着剥離を行えば、比較的容易に癒着剥離が可能と考えられる。McLaughlinら¹⁰⁾は、ESLL時腹腔鏡下に術後癒着の剥離が100%可能であったと報告し、またJansen⁶⁾らもESLL時殆どの癒着剥離は出血もなく容易に剥離可能であったと報告している。我々の検討でも、術後癒着のあった、37例中31例(83.8%)で癒着剥離が可能であった。癒着は腹腔鏡下に鈍的に容易に剥離可能のものが殆どであり、剥離面よりの出血も殆ど認めなかった。

術後癒着が高頻度に認められることより、ESLL時の癒着剥離の後に再癒着を起こす可能性が考えられる。この点に関しては、ESLL施行後に更にThird Look Laparoscopy (TLL) を行い評価する必要がある。今回の我々の検討ではTLLを施行した症例はないが、McLaughlin¹⁰⁾やJansen⁶⁾らはESLL後施行したTLL時に再癒着を認めなかったと報告している。これに対しTrimbos-Kemperら⁹⁾はESLL後1~2年後

にTLLを施行し、再癒着を37.5%に認めた。しかしESLL時に癒着剥離を施行した際に出血をおこさなかったものでは、27%にしか再癒着を認めなかったとした。これらのことよりESLL後に再癒着は起こらないとは断定しきれないが、出血のおこらない容易に剥離可能な癒着を剥離する場合には、再癒着の可能性は少ないと考えられる。

術後癒着の妊娠に及ぼす影響について、今回の検討では、癒着の認められた場合は全例に癒着剥離を行ったため、術後癒着の剥離が妊娠成立に必要であったか否かについては言及できない。Pittawayら⁸⁾は不妊患者23例に卵巣手術及びESLL(癒着剥離は施行せず)を施行し、その結果両側及び残存付属器に術後癒着が残存していた症例には1例も術後妊娠成立を認めなかったが、少なくとも一方の付属器に術後癒着のないものでは、67%に妊娠を認めたと報告し、術後癒着が不妊の原因となる可能性を示唆している。術後癒着、特に卵管の癒着は術後の妊娠成立の妨げとなる可能性があるため、やはり積極的に剥離すべきと考えられる。

まとめ

術後癒着をAFSスコアにより評価した結果、AFSスコアリングは術後癒着の評価として適当であると考えられた。術後癒着は高頻度に認められるものの、術後早期では癒着の程度は比較的軽度なものが多く、腹腔鏡下に容易に剥離できるものが多かった。術後癒着の評価ならびに剥離に関しESLLは有用であると考えられた。

文 献

- 1) Diamond MP, Daniell JF, Martin DC, et al., Tubal patency and pelvic adhesions at early second-look laparoscopy following intraabdominal use of the carbon dioxide laser; initial report of the intraabdominal laser study group. *Fertil Steril* 42: 717, 1984
- 2) Daniell JF, Feste J, Diamond MP, et al., Clinical results of terminal salpingostomy with the use of the CO₂ laser; report of the intraabdominal laser study group. *Fertil Steril* 45: 175, 1986
- 3) Swolin K, Spontanheilung nach Querresektion der Tuba Fallopii. *Acta Obstet Gynecol Scand* 46: 219, 1967
- 4) Swolin K, 50 Fertilitatsoperationem: Teil Material und resultat. *Acta Obstet Gynecol Scand* 46: 251, 1967

- 5) Swolin K, Electromicrosurgery and salpingostomy; long-term results. *Am J Obstet Gynecol* 121: 418, 1975
- 6) Jansen RPS, Early laparoscopy after pelvic operation to prevent adhesions; safety and efficacy. *Fertil Steril* 49: 26, 1988
- 7) Trimbo-Kemper TCM, Trimbo JB, van-Hall EV, Adhesion formati on after tubal surgery; results of the eighthday laparoscopy in 188 patients. *Fertil Steril* 43: 395, 1985
- 8) Pittaway DE, Daniell JF, Maxson WS, Ovarian surgery in an infertily patient as an indication for a shortinterval second-look laparoscopy; a preliminary study. *Fertil Steril* 44: 611, 1985
- 9) Trimbo-Kemper TCM, Trimbo JB, Van Hall EV, Treatment of Post Surgical Adhesions. Wiley-Liss Inc, 1990
- 10) McLaughlin DS, Evaluation of adhesion reformation by early second-look laparoscopy following microlaser ovarian wedge resection. *Fertil Steril* 42: 531, 1984
- 11) Luber K, Beeson CC, Kenedy JF, et al., Result of micro Surgical treatment of tubal infertility andearly second-look laparoscopy in the post-pelvic inflammatory disease patient; Implications for in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 154: 1264, 1986
- 12) The American Fertility Society, The American Fertility Society Classification of adnexal adhesions distal tubal occlson, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, Mullerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril*, 49: 944, 1988
- 13) Serour GI, Badraoui MH, El-Agizi HM, et al., Laparoscopic adhesiolysis for infertile patients with pelvic adhesive disease. *Int J Gynecol Obstet* 30: 249, 1989
- 14) Ellis H, Harrison W, Hugh TB, The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br J Surg* 52: 471, 1965
- 15) Milligan DW, Raftery AT, Observations on the pathogenesis of peritoneal adhesions, a light and electron microscopical study. *Br J Surg* 61: 274, 1974
- 16) Johnson FR, Whitting HW, Repair of parietal peritoneum. *Br J Surg* 49: 653 1962
- 17) Tulandi T, Faicone T, Kafta I, Second-look operative laparoscopy 1 year following reproductive surgery. *Fertil Steril* 52: 421, 1989

**Evaluation of postoperative adhesion based
on the A. F. S. classification
by early second look laparoscopy**

Shunsuke Mori, Hiroshi Matsuguchi
Masahiro Nozaki, Masatoshi Sano
Gen-ichi Nakamura and Hitoo Nakano

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

We evaluated the extent of postoperative adhesion by the score of American Fertility Society classification of adnexal adhesions (AFS score) in 42 patients who underwent early second look laparoscopy (ESLL) 7-12 days after the first conservative operation.

Adhesions made by surgery between the first operation and the ESLL were divided into four grades based on changes in the AFS score. Post operative adhesions existed in 37 patients (89.1 %). The changes of AFS score were as follows; from 1 to 5 points in 27 patients, from 6 to 10 points in 4 patients, from 11 to 20 points in 1 patient and over 21 points in 5 patients. Post operative adhesions could be completely dissected at the time of ESLL in all of the patients with AFS score changes less than 10 points. On the other hand, the adhesions were not completely dissected in the patients with score of more than 11 points.

These findings suggest that the changes in AFS score evaluated by ESLL are reliable in the grading for post-operative adhesions.

(受付: 1993年 3月25日)

(受理: 1993年 6月18日)

抗クラミジア抗体診断キット， セロ イパライザ クラミジアIgA・IgG®の臨床的検討

Clinical Evaluation of Sero IPALISA Chlamydia IgA・IgG®: a Diagnostic Agent of Antibodies for Chlamydia Trachomatis

高橋 敬一
Keiichi TAKAHASHI
東 梅 久 子
Hisako TOBAI
児 島 孝 久
Takahisa KOJIMA

虎の門病院 産婦人科
永 井 聖一郎
Seiitiro NAGAI
中 島 俊 一
Syuniti NAKAJIMA
伊豆田 誠 人
Makoto IZUTA

塩 田 恭 子
Kyoko SHIOTA
山 田 義 治
Yoshiharu YAMADA
佐 藤 孝 道
Kodo SATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Toranomon Hospital, Tokyo 105, Japan

クラミジアトラコマチス (CT) の抗体測定試薬であるセロ イパライザ クラミジア® (SERO) をヒタザイムクラミジア® (HITA) や抗原検査と比較し、その有用性について検討した。

① SEROではCT抗原陽性25例中、IgG抗体陽性率は80 % (20例)、IgA抗体陽性率は72 % (18例) であった。IgA抗体の単独陽性は3例、IgG抗体とIgA抗体がともに陰性が1例に認められた。② CT抗原陽性の同一血清17検体を用いたSEROとHITAの比較では、IgG抗体陽性率に有意差はなかったが、IgA抗体陽性率は、SEROでは82 % (14例)、HITAでは47 % (8例) で、SEROで高率に陽性であった。③ 性交渉未経験者の血清で、IgA抗体IndexがIgG抗体Indexより高いものは、HITAでは17検体中16検体、SEROでは15検体中10検体だった。

以上より、① SEROはHITAよりCTの感染状態をより反映すると考えられたが、② その相違点は特にIgA抗体にあることが示唆された。また、③ CT抗原検査のスクリーニングとしてSEROを使用するには、IgG抗体またはIgA抗体が陽性の場合に、抗原検査を行うのが適当と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 704 - 708, 1993)

緒 言

クラミジア・トラコマチス (CT) は近年、性感染症の重要な病原体であることが明らかになり、産婦人科においては卵管性不妊や子宮外妊娠¹⁾との関係も報告されている。CTの検査法には抗原検査と抗体検査法があり、それぞれ数種類の方法がある。血清中の抗体検査で最近開発された酵素免疫測定法 (ELISA法) のひとつに、セロ イパライザ クラミジアIgA・IgG® (SERO) があり、大量検体処理に適している、

クラミジア・ニューモニエとの交差反応が少ない、などの特徴²⁾があるとされる。今回、このSEROについて臨床的有用性を検討し、また他のELISA法 (ヒタザイムクラミジア®: HITA) とも比較し、若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

1992年9月から12月までの4ヶ月間に、虎の門病院受診患者のうち、CTの検査が必要であると判断した症例に対し、子宮頸管部からCTの抗原検査と、

血清によるCT抗体検査をおこなった。抗体検査は531症例、612検体についておこなった。検査対象患者は不妊症、子宮頸管炎、妊婦などで、比較的若年の年齢層だった。またこれとは別に、性交渉未経験者14例の血清をもちいて抗体検査を行った。

抗体検査は、明治乳業(株)に依頼し、SEROを用いてIgG抗体とIgA抗体を測定し、IgG抗体、IgA抗体それぞれのインデックスが1.1をこえるとき陽性で(+)とした。またインデックスが0.9以上1.1以下は判定保留で(±)、0.9未満を陰性で(-)とした。HITAの測定は帝人バイオラボラトリーズに依頼して測定し、判定も同様とした。

抗原検査は、イデアイクラミジア®をもちいて、子宮頸管部から検体を採取して行った。

有意差検定は χ^2 検定により行った。

結 果

1) SEROによるIgG抗体とIgA抗体の相関(表1)

531症例の血清をもちいて、SEROによりIgG抗体とIgA抗体を測定した。抗体検査を複数回おこなった症例は、初回の検査についてのみ検討の対象とした。

IgG抗体の陽性例は139例、26%で、IgA抗体陽性例は115例、22%であった。IgA抗体が陽性の115例中、IgG抗体が陽性であるのは89例、77%にとどまり、IgA抗体が陽性でも必ずしもIgG抗体が陽性ではなかった。

またIgG抗体の単独陽性症例は33例、6.2%、IgA抗体の単独陽性症例は19例、3.6%であった。

表1 SEROによるIgG抗体とIgA抗体の相関

		IgG抗体			計
		+	±	-	
IgA抗体	+	89	7	19	115
	±	17	1	15	33
	-	33	17	333	383
計		139	25	367	531

注) 1症例につき、最初に採血した1検体の結果を対象とした

2) SEROとHITAの抗体陽性率の比較(表2)

1症例あたり最初に採血した同一血清を使用し、SEROとHITAによる抗体陽性率を261例について比較した。

IgG抗体陽性率はSEROでは36%(95/261)、HITA

表2 同一血清によるSEROとHITAのIgG抗体とIgA抗体の相関

SERO					
		IgG抗体			計
		+	±	—	
IgA抗体	+	64	2	13	79
	±	9	0	6	15
	—	22	8	137	167
計		95	10	156	261

IgG抗体陽性率: 36%(95/261)

IgA抗体陽性率: 30%(79/261)

HITA					
		IgG抗体			計
		+	±	—	
IgA抗体	+	52	0	17	69
	±	12	1	11	24
	—	28	4	136	168
計		92	5	164	261

IgG抗体陽性率: 35%(92/261)

IgA抗体陽性率: 26%(69/261)

注) 1症例につき、最初に採血した1検体の結果を対象とした

では35%(92/261)と同一症例群でのIgG抗体陽性率はほぼ同じであった。また、IgA抗体陽性率はSEROでは30%(79/261)、HITAでは26%(69/261)であり、若干SEROでのIgA抗体陽性率が高いものの有意差はなかった。

3) SEROとHITAの同一血清による比較(表3)

血清308検体について、SEROとHITAによる測定結果を、IgG抗体とIgA抗体別に比較した。

SEROからみたHITAとのIgG抗体の陽性一致率は86%(107/124)で、陰性一致率は95%(163/172)だった。

一方、IgA抗体の陽性一致率は、64%(67/104)で、陰性一致率は84%(153/182)であり、IgG抗体に比較してIgA抗体の一致率は低かった。IgA抗体では(±)がIgG抗体よりも多いため、陽性一致率、陰性一致率ともIgG抗体より低くなるが、これを考慮しても、SEROとHITAではIgG抗体に比較してIgA抗体の一致率が低く、両者の相違点として、IgA抗体の相

表3 同一血清を用いたSEROとHITAの結果の比較

IgG抗体					
		HITA			計
		+	±	—	
SERO	+	107	4	13	124
	±	3	2	7	12
	—	7	2	163	172
計		117	8	183	308

SEROからみた陽性一致率：86 % (107/124)

SEROからみた陰性一致率：95 % (163/172)

IgA抗体					
		HITA			計
		+	±	—	
SERO	+	67	15	22	104
	±	6	3	13	22
	—	15	14	153	182
計		88	32	188	308

SEROからみた陽性一致率：64 % (67/104)

SEROからみた陰性一致率：84 % (153/182)

違が示唆された。

4) クラミジア抗原陽性症例のSEROによる抗体検査結果 (表4)

抗原と抗体検査を同時に行った症例で、抗原が陽性であった25症例の血清を用いてSEROにより抗体を測定した。

IgG抗体の陽性率は80 % (20/25)、IgA抗体の陽性率は72 % (18/25) だった。IgG抗体、IgA抗体がとも

表4 クラミジア抗原陽性症例の血清によるSEROの抗体検査結果

		IgG抗体			計
		+	±	—	
IgA抗体	+	14	1	3	18
	±	3	0	0	3
	—	3	0	1	4
計		20	1	4	25

IgG抗体陽性率：80 % (20/25)

IgA抗体陽性率：72 % (18/25)

に陽性の症例は14例 (56 %) だったが、IgA抗体が単独で陽性である症例は3例 (12 %) 認められた。

一方、IgG抗体、IgA抗体ともに陰性症例はわずかに1例のみだった。

5) 抗原陽性症例の血清によるSEROとHITAの比較 (表5)

抗原陽性17症例の同一血清を用いて、SEROとHITAをIgG、IgA抗体別に比較した。

IgG抗体の陽性率はSEROでは82 % (14/17)、HITAでは65 % (11/17) で、SEROでの陽性率がやや高いものの有意差を認めなかった。

一方、IgA抗体での陽性率はSEROでは82 % (14/17)、HITAでは47 % (8/17) であり、SEROが有意に良好な結果 ($P<0.05$) を示し、抗原陽性症例での抗体の比較でもIgA抗体の相違が示唆された。

表5 SEROとHITAの抗体検査結果の比較 (抗原陽性症例の同一血清を使用)

		IgG抗体			
		HITA			
		+	±	—	計
SERO	+	11	0	3	14
	±	0	0	0	0
	—	0	0	3	3
計		11	0	6	17

IgG抗体陽性率 SERO：82 % (14/17)

HITA：65 % (11/17)

IgA抗体					
		HITA			計
		+	±	—	
SERO	+	8	1	5	14
	±	0	0	1	1
	—	0	0	2	2
計		8	1	8	17

IgA抗体陽性率 SERO：82 % (14/17)

HITA：47 % (8/17)

6) 性交渉未経験者の血清によるSEROとHITAの比較 (表6)

つぎに同年代の陰性コントロール群として、性交渉未経験者14例、17検体の血清を用いてSEROとHITAを比較した。対象の年齢は20歳から36歳にわた

表6 性交渉未経験者の血清によるSEROとHITAの検査結果の比較

case	age	HITA		SERO	
		IgG	IgA	IgG	IgA
I S	21	+1.3	+1.4	-0.7	-0.3
ON	25	-0.3	±1.1	-0.3	-0.6
K S	31	-0.4	+2.8	-0.6	-0.7
		-0.2	-0.5	-0.5	±1.1
		-0.2	-0.3		
K Y	21	-0.3	-0.5	-0.1	-0.2
K T	32	-0.5	±1.0		
		-0.1	-0.3	-0.2	-0.3
S N	22	-0.2	-0.4	-0.3	-0.3
N E	20	-0.6	+1.6	-0.6	-0.2
N A	36	-0.4	-0.6	+1.3	+1.6
N I	27	-0.3	-0.6	-0.8	-0.4
N N	25	-0.4	-0.5	-0.3	-0.4
F N	24	-0.5	-0.8	-0.3	-0.5
M Y	35	-0.3	-0.4	-0.3	-0.4
M A	28	-0.8	+1.6	-0.3	-0.3
Y Y	29	-0.2	-0.2	-0.2	-0.3

り、平均26.8歳で、これらの症例は診察により性交渉未経験であることが確認されている。

IgG抗体とIgA抗体のインデックスを比較すると、HITAでは1例のみ(症例YY)同じであったが、そのほかの16検体ではすべてIgA抗体インデックスがIgG抗体インデックスより高かった。またIgA抗体が4検体で陽性を示した。したがって、HITAではIgA抗体のインデックスがIgG抗体に比較して高く設定されている可能性が示唆された。

一方、SEROでは、15検体中、IgG抗体インデックスがIgA抗体インデックスより高い検体が3検体、同じものが2検体、IgA抗体インデックスが高いのが10検体あり、HITAのような特徴は認めなかった。ただしIgG抗体、IgA抗体ともに陽性を示す症例(症例NA)が1例あり、HITAでは陰性を示したが、他の抗体検査での確認はできていない。

考 察

SEROは、CTのL2株の精製EB(基本小体)の抗原を固相化したマイクロプレートを使用しており、大量検体処理に適している、クラミジア・ニューモニエとの交差反応が少ない、吸光度を測定するので結果に検査者の主観が入らないなどの特徴²⁾がある。

今回、SEROを使用する機会を得たので臨床的に検討し、他のELISA法とも比較した。

SEROでの、IgG抗体とIgA抗体の相関を比較すると、IgAの単独陽性例が19例、3.6%に認め(表1)られた。HITAでのIgA単独陽性例は8%(61/724)であった³⁾ことに比較すると少ないものの、EIA法のイバザイム・クラミジア⁴⁾やデタミナー・クラミジア^{5,6)}ではIgAの単独陽性例は非常にまれであり、この点については今後も検討が必要である。サルの実験⁵⁾からはIgA抗体が単独で陽性になる可能性は想定しにくく、ELISA法では抗原を精製することで、クラミジアニューモニエとの交差反応が減少するもののCT固有の血清型の一部を失っている可能性⁵⁾もあり、IgA抗体の単独陽性例(特に抗原陽性例の血清)の少なからぬ存在は、IgG抗体の検出が抗原の種類によっては逆に不完全になっていることも考えられる。堀内らの報告⁵⁾では、IgG抗体がMIFで陽性の18例中、HITAでは4例のみが陽性で、14例(78.6%)は陰性であったし、また中田らの報告²⁾では、妊婦78例の血清によるSEROとMIFとの比較で、IgG抗体がMIFで陽性であった50例中、11例(22%)がSEROでは陰性を示していたことも先の可能性を示唆する。

クラミジア抗原が陽性であった症例の検討では、SEROでIgG抗体とIgA抗体がともに陰性である例は1例のみ(表4)であり、良好な結果を得たが、IgA単独陽性例が3例、IgG単独陽性例が3例認められた。したがってSEROを抗原検査のスクリーニングとして使用するには、IgG抗体とIgA抗体の少なくともどちらか一方が陽性である場合には抗原検査を施行することが適当であると考えられた。この点はIgA抗体単独陽性例が少なく、IgG抗体のみでのスクリーニングが可能であるイバザイム⁴⁾やデタミナー⁶⁾とは異なり注意を要する。

抗原陽性例でHITAとSEROを比較すると、HITAでは、22%(10/46)が抗原が陽性にも関わらず、抗体では陽性と判断できなかった報告³⁾もあり、また本研究でもSEROの抗体陽性率(表4、表5)がHITAより良好であると考えられた。そしてこの差は、IgG抗体よりも、IgA抗体で大きい(表5)ことが示された。ただし、SEROでのIgA抗体の陽性率がHITAに比較して高いと、IgA抗体のfalse positiveが増えて、抗原陽性者の検討のみでSEROが有用とは必ずしも言えない可能性がある。この点、同一血清でのIgA抗体陽性率(表2)はSEROが30%(79/261)、HITAが26%(69/261)と有意差はなく、SEROでは全

体のIgA抗体陽性率が有意に高いとは言えない。また再検査が必要であると判断される(±)を含めるとIgA抗体では94例、HITAでは93例が(±)か(+)であり、ほぼ同数であった。

IgA抗体のSEROとHITAの差は、性交渉未経験者の血清による検査結果(表6)においても認められた。HITAではIgG抗体に比較してIgA抗体インデックスが高く設定されている可能性が示唆された。一方、SEROでもこの傾向はあるもののHITAほど明らかではなかった。したがってSEROではIgA抗体の疑陽性がHITAよりも少ない可能性が示唆され、かつ抗原陽性例での抗体陽性率も高く、感度・特異性ともに優れていることが示唆された。

まとめ

以上より、

- 1) SEROは同じELISA法のHITAより良好な結果を得た。
- 2) SEROとHITAの相違点は、おもにIgA抗体にあることが示唆された。
- 3) 抗原検査のスクリーニングとしてSEROを使用するには、IgG抗体またはIgA抗体の少なくともどちらか一方が陽性の場合に抗原検査を行うのが適当であると考えられた。

文 献

- 1) 高橋敬一, 塩田恭子, 為近慎司 他, 子宮外妊娠患者におけるクラミジア抗体の陽性率, 日産婦誌 44: 376, 1992
- 2) 中田博一, 本多昭仁, 押尾好浩 他, クラミジア抗体測定試薬「セロ イパライザ クラミジア」(ELISA法)の有用性について, 医学と薬学 28: 148, 1992
- 3) 高橋敬一, 佐藤孝道, 抗クラミジアトラコマチスIgA, IgG抗体測定試薬であるヒタザイムクラミジア®の有用性と限界に関する臨床的検討, 日本性感染症会誌 4: 1993 印刷中
- 4) 高橋敬一, 塩田恭子, 為近慎司 他, クラミジア抗原陽性例からみた非妊婦におけるクラミジア抗体検査の限界, 日産婦誌 11: 1993, 印刷中
- 5) 堀内 清, 齊加志津子, 山崎 勉 他, 産婦人科領域におけるクラミジア感染症の抗体測定に関する研究, 日本性感染症会誌 4: 1993 印刷中

- 6) 高橋敬一, 佐藤孝道, 齊加志津子 他, デタミナー®・クラミジア抗体検査試薬の有用性に関する臨床的検討, 日本性感染症会誌 4: 1993 印刷中

Clinical evaluation of sero IPALISA chlamydia IgA · IgG®: a diagnostic agent of antibodies for chlamydia trachomatis

Keiichi Takahashi, Seiti Nagai
Kyoko Shiota, Hisako Tobai
Syuniti Nakajima, Yoshihara Yamada
Takahisa Kojima, Makoto Izuta
and Kodo Sato

Department of Obstetrics and Gynecology,
Toranomon Hospital, Tokyo 105, Japan

The purpose of this study is to evaluate the characteristic of Sero IPALISA Chlamydia IgA · IgG® (SERO), Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-chlamydial antibodies (IgG, IgA), comparing with another assay HITAZyme® (HITA) and CT antigen examinations from clinical point of view.

The results were as follows; 1) IgG positive rate was 80 % (20/25) and IgA positive rate was 72 % (18/25) by SERO in the 25 sera of the patients with positive CT antigen. Out of the 25 sera, 3 showed positive IgA with negative IgG. Only one showed negative both IgG and IgA. 2) There was no significance between IgG positive rate of SERO and that of HITA in 17 same sera of CT antigen positive patients. But IgA positive rate of SERO was 82 % (14/17), and it was better than that of HITA which was 47 % (8 /17). 3) IgA antibody index was higher than that of IgG by HITA in the 16 out of 17 sera of virgin women.

It was suggested that SERO was more useful than HITA, especially IgA antibody of SERO was representative of infectious status of chlamydia. It was also suggested to be valuable to perform CT antigen examination when IgG and/or IgA showed positive by SERO.

(受付: 1993年 6 年15日特掲)

(受理: 1993年 6 年18日特掲)

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： 平成3～4年の当院分娩統計より（第2報）

The Influence of Induced Abortion on the Course of Pregnancy and Delivery of Primipara Women: 2nd Report from 1991-1992 Annual Obstetrical Statistics of Fujigaoka Hospital

昭和大学藤が丘病院産婦人科

宮 川 善二郎
Zenjiro MIYAKAWA

木 村 武 彦
Takehiko KIMURA

田 村 和 司
Kazushi TAMURA

本 道 隆 明
Takaaki HONDOU

森 山 修 一
Shuuichi MORIYAMA

羽 田 義 信
Yoshinobu HADA

清 水

篤

野 嶽 幸 正

Atushi SHIMIZU

Yukimasa NOTAKE

Department of Obstetrics and Gynecology,

Fujigaoka Hospital, Showa University, School of medicine, Yokohama 227, Japan

〔目的〕人工妊娠中絶回数別に初産の妊娠・分娩経過に及ぼす影響について検討した。

〔方法〕平成3～4年の当院分娩統計より検討し、検定にはunpaired Student's t-test及び χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

〔結果〕初産婦901例中、中絶経験なし群（なし群）は85.6%，中絶1回群（1回群）は11.8%，中絶2回以上群（2回以上群）は2.6%だった。切迫早産はなし群3.5%に対し、2回以上群12.5%と有意に増加し（ $p < 0.05$ ），最終的な早産もなし群4.9%，2回以上群20.8%と有意に増加した（ $p < 0.01$ ）。分娩時出血量はなし群 283 ± 211 ml（mean $\pm$ SD），1回群 282 ± 231 mlで変わらず，2回以上群 320 ± 213 mlで増加したが今回は有意差を認めず。

〔結論〕人工妊娠中絶の回数別に初産の妊娠・分娩に及ぼす影響を検討した結果，初回分娩前の頻回（2回以上）中絶は避ける事が望ましいと考えられる。

（Jpn. J. Fertil. Steril., 38（4），709 - 713, 1993）

緒 言

初産の人工妊娠中絶は，次回妊娠時の切迫早産の頻度を高め，分娩時出血量を増加させることを報告した。今回は，中絶回数別に初産の人工妊娠中絶が次回妊娠・分娩経過に及ぼす影響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日より平成4年12月31

日までの2年間に当院で分娩した単胎の初産婦（ $n = 901$ ）を解析した。検定は，unpaired Student's t-test及び χ^2 検定を用いてYatesの補正を加え， $p < 0.05$ 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（表1）：2年間の中絶回数別の初産婦の内訳を示す。2回以上の中絶経験のある初産婦は平成3年から平成4年にかけて半減した。2年間の合計で中絶なし771例（85.6%），

中絶1回106例(11.8%), 中絶2回19例(2.1%), 中絶3回5例(0.5%)で、4回以上の中絶経験例はなかった。中絶なし群(n=771), 中絶1回群(n=106), 中絶2回以上群(n=24)の対象妊婦の背景を表2に示した。母体年齢・身長・妊娠前体重に有意差は認めなかった。

2) 妊娠経過に及ぼす影響(表3): 胎児の性別に大きな偏りはなかった。切迫早産で入院した症例は中絶なし群3.5%, 中絶1回群5.7%, 中絶2回以上群12.5% (p<0.05 VS中絶なし群) 中絶回数が増加す

るにつれて有意に増加した。最終的な早産率は中絶なし群4.9%, 中絶1回群2.8%, 中絶2回以上群20.8%で、特に中絶2回以上群で有意に頻発した(p<0.01 VS中絶なし群, 中絶1回群)。

重症妊娠中毒症の発症や骨盤位分娩は、中絶2回以上群で統計的に有意に増加した。帝王切開率は、中絶回数が増加するにつれ増加したが有意差とならず。吸引分娩率や死産率には有意差を認めなかった。

次に、正期産で経陰分娩した妊婦を同様に3群に

表1 中絶回数から見た初産婦の内訳(%)

n	平成3年(1991年) 461	平成4年(1992年) 440	2年間合計 901
中絶なし	392 (85.0)	379 (86.2)	771 (85.6)
中絶1回	53 (11.5)	53 (12.0)	106 (11.8)
中絶2回	11 (2.4)	8 (1.8)	19 (2.1)
中絶3回	5 (1.1)	0 (0)	5 (0.5)

※中絶4回以上の初産婦は、平成3～4年の2年間に認めなかった。

表2 対象となった妊婦の背景

n	中絶なし群 771	中絶1回群 106	中絶2回以上群 24
分娩回数(回)	0	0	0
年齢(歳)	28.4 ± 3.9	28.9 ± 4.6	28.8 ± 5.1
身長(cm)	158.1 ± 5.0	158.7 ± 5.8	155.9 ± 4.2
妊娠前体重(kg)	50.3 ± 6.5	51.0 ± 7.1	48.8 ± 6.1

(mean ± SD)

表3 中絶回数が妊娠経過・分娩結果に及ぼす影響(%)

n	中絶なし群 771	中絶1回群 106	中絶2回以上群 24
男児の比率(%)	386 (50.1)	60 (56.7)	13 (54.2)
切迫早産入院(%)	27 (3.5)	6 (5.7)	3 (12.5)*
早産(%)	38 (4.9)	3 (2.8)	5 (20.8)**
骨盤位分娩(%)	30 (3.9)	2 (1.9)	2 (8.3)*
重症妊娠中毒症(%)	15 (1.9)	2 (1.9)	2 (8.3)*
帝王切開率(%)	65 (8.4)	11 (10.4)	3 (12.5)
吸引分娩率	35 (4.5)	3 (2.8)	1 (4.2)
死産率	5 (0.6)	0 (0)	0 (0)

*: p<0.05 vs 中絶なし群

** : p<0.01 vs 中絶なし群, 中絶1回群

表4 対象となった正期産で経膈分娩した妊婦の背景

n	中絶なし群 706	中絶1回群 95	中絶2回以上群 21
分娩回数(回)	0	0	0
年齢(歳)	28.2 ± 3.7	28.7 ± 4.5	28.8 ± 5.4
身長(cm)	158.2 ± 5.0	159.2 ± 5.7	156.0 ± 4.2
妊娠前体重(kg)	50.3 ± 6.5	51.0 ± 7.3	48.3 ± 5.9
分娩時体重(Kg)	60.0 ± 7.2	61.7 ± 7.5	58.1 ± 6.4

(mean ± SD)

表5 中絶回数が正期産の分娩経過に及ぼす影響

n	中絶なし群 706	中絶1回群 95	中絶2回以上群 21
男児の比率(%)	353 (50.0)	55 (57.9)	13 (61.9)
前期破水(%)	169 (23.9)	21 (22.1)	4 (19.0)
陣痛誘発(%)	78 (11.0)	13 (13.7)	2 (9.5)
陣痛促進(%)	201 (28.5)	34 (35.8)	6 (28.6)
分娩時間(分)	790 ± 474	857 ± 477	822 ± 593
新生児体重(g)	3,026 ± 409	3,129 ± 380	2,971 ± 382
分娩時出血量(ml)	283 ± 211	282 ± 231	320 ± 213
分娩時異常出血の頻度(%)	79 (11.2)	15 (15.8)	5 (23.8)

※数字は症例数, () 内は%を示す.

分娩時間・新生児体重・分娩時出血量は, mean ± SDで表示した.

分け対象妊婦の背景を表4に示した. 母体年齢・身長・妊娠前体重・分娩時体重に有意差は認めなかった.

3) 分娩経過に及ぼす影響(表5): 胎児の性別に大きな偏りはなかった. 前期破水は前期破水は, 中絶なし群 23.9%, 中絶1回群 22.1%, 中絶2回以上群 19.0%で有意差を認めず. 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 790 ± 474 分(13時間10分 ± 7時間54分, mean ± SD), 中絶1回群 857 ± 477 分(14時間17分 ± 7時間57分), 中絶2回以上群 822 ± 593 分(13時間42分 ± 9時53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 11.0%, 中絶1回群 13.7%, 中絶2回群 9.5%で有意差を認めず. 陣痛促進は, 中絶なし群 28.5%, 中絶1回 35.8%, 中絶2回 28.6%で有意差を認めなかった. 新生児の出生時体重は, 中絶なし群 3,026 ± 409 g,

中絶1回群 3,129 ± 380 g, 中絶2回以上群 2,971 ± 382 gで有意差を認めなかった. 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 283 ± 211 ml, 中絶1回群 282 ± 231 ml, 中絶2回群 320 ± 213 mlで, 中絶2回以上群で増加したが今回は有意差とはならなかった. 500 ml以上の分娩時異常出血では, 中絶なし群 11.2%, 中絶1回群 15.8%, 中絶2回以上群 23.8%で中絶回数が増加するにつれ増加したが有意差とはならなかった.

考 察

平成3年よりの2年間の統計であり, 骨盤位や重症妊娠中毒症の発生頻度が中絶2回以上群に統計的に有意に増加したことを, 中絶を2回以上経験しているためと直ちに因果関係に結び付けることには慎重でなければならない. 平成3年に較べ平成4年で特に中絶3回以上の初産婦がなくなり, 中絶2回以上の初産婦が半減したことは喜ばしいことであり, 今後も経年的に推移を見守りたい.

日本では人工妊娠中絶は昭和23年(1948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が¹⁾、最近では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²⁾。今回は平成3年の当院分娩統計より³⁾、初産の人工妊娠中絶は次回妊娠時の切迫早産の頻度を高め、分娩時出血量を有意に増加させることを報告した⁴⁾。今回は平成4年の当院分娩統計と合わせ⁵⁾、人工妊娠中絶回数に着目してretrospectiveに妊娠・分娩経過に及ぼす影響を検討した。妊娠経過では、中絶回数の増加とともに切迫早産の頻度が増加した。すでに人工妊娠中絶の既往が早産の危険因子として報告されている⁶⁾。しかし、最終的な早産率は、中絶1回群では中絶なし群よりもむしろ低率で入院・加療による効果が十分発揮されているのに対し、中絶2回以上群では早産した症例のうち入院・加療したのは1例のみで、他の4例は入院治療を受けることなく早産してしまっていた。従って、今後中絶経験が2回以上の初産婦は、常に切迫早産を念頭に置き妊娠検診中より細心の注意を払う必要がある。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⁷⁾、最も影響を及ぼすのは産道因子(初産・経産の別)と考えられる。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。分娩時出血量は特に中絶2回以上群で増加したが、今回は有意差でなく、500 ml以上の分娩時異常出血の頻度も中絶回数により増加傾向を示したが今回は有意差は認めなかった。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⁸⁾、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、特に2回以上反復した人工妊娠中絶の既往と分娩時出血量の増加との間になんらかの因果関係が推察されるが、詳細については現在も不明である。吸引分娩の頻度は有意差なく、帝王切開率も中絶回数により増加傾向を示したが有意差は認めなかった。

今回の結果から中絶経験のある初産婦でも、中絶1回例の妊娠・分娩経過は中絶経験のないものと較べてもそれほど大差なく、一方中絶2回以上のもので妊娠・分娩経過は著しく悪化傾向を示し、中絶経験者全体の成績を引き下げる役割を果たしていた。これは、人工妊娠中絶のプロセスを反復することに切迫早産や分娩時出血量を増加させる原因があるこ

とを示唆する結果と考えられる。すでに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⁹⁾。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^{10,11)}、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初産の人工妊娠中絶は、医学的には出来得る限り1回に止どめることが望ましいと考えられる。

文 献

- 1) 石原 力, 優生保護法の歴史. 産婦人科治療 53: 391, 1986
- 2) 厚生省児童家庭局母子衛生課監修, 母子衛生の主なる統計. P80, 財団法人母子衛生研究会, 1992
- 3) 宮川善二郎, 田口 敦, 田村和司 他, 平成3年(1991年)の当院分娩統計の紹介. 日産婦神奈川会誌 28: 180, 1993
- 4) 宮川善二郎, 清水 篤, 田口 敦 他, 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. 不妊学会誌 38: 123, 1993
- 5) 宮川善二郎, 井奥研爾, 本道隆明 他, 平成4年(1992年)の当院分娩統計の紹介: 平成3年と比較して第6報. 日産婦神奈川会誌投稿中 1993
- 6) de Haas I, Harlow BL, Cramer DW, et al., 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 他, 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 28: 41, 1993
- 8) 宮川善二郎, 田口 敦, 田村和司 他, 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 28: 37, 1993
- 9) Cunningham GF, MacDonald PC and Gant NF, Consequences of elective abortion, in Williams Obstetrics. 18th ed, P506, Appleton & Lange Co, 1989
- 10) Grmis DA, Mishell DR Jr, Shoupe D, et al., Early abortion with a single dose of the antiprogesterone RU-486. Am J Obstet Gynecol 158: 1307, 1988
- 11) Norman JE, Thong KJ, Rodger MW, et al., Medical abortion in women of ≤ 56 days amenorrhoea: a comparison between gemeprost (a PGE_1 analogue) alone and mifepristone and gemeprost. Brt J Obstet Gynecol 99: 601, 1992

**The influence of induced abortion
on the course of pregnancy and delivery
of primipara women:
2nd report from 1991-1992 annual
obstetrical statistics of Fujigaoka hospital**

Zenjirou Miyakawa, Takehiko Kimura
Kazushi Tamura, Takaaki Hondou
Shuuichi Moriyama, Yoshinobu Hada
Atushi Shimizu and Yukimasa Notake

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fujigaoka Hospital,
Showa University, School of medicine,
Yokohama 227, Japan

Objective: Induced Abortion was reported to increase the incidence of threatened preterm delivery and parturitional blood loss in our prior study. The purpose of this study is to evaluate the influence of induced abortion frequency on the course of pregnancy and delivery of primipara women.

Methods: 901 Primipara women who delivered in our hospital for two years, 1991 to 1992, were classified to 3 groups, none (0), once (1), twice or more ($2\geq$), according to the frequency of induced abortions.

Student's *t*-test and χ^2 test with Yates correction were used for discrete data. $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results: 0 group; 771 (85.6 %) primipara women had not underwent induced abortion. This group was compared with other groups, i. e.

1 group; 106 (11.8 %) women who underwent induced abortion once and $2\geq$ group; 24 (2.6 %) women who underwent twice or more.

In the course of pregnancy, compared with 0 group incidence (3.5 %) of threatened preterm delivery, $2\geq$ group incidence (12.5 %) was increased significantly ($p<0.05$). Contrasted with 0 group incidence (4.9 %) of preterm delivery, $2\geq$ group incidence (20.8 %) was increased remarkably ($p<0.01$). In the course of delivery, compared with 0 group blood loss (283 ± 211 ml, mean $\pm$ SD), $2\geq$ group blood loss (320 ± 213 ml) was increased but not significantly this time. There were no statistical differences between 0 group and 1 group in this study.

Conclusion: These data suggested that repeated induced abortions could give serious influences on the course of pregnancy and delivery of primipara women. In the medical perspective, nullipara women should avoid frequent induced abortions.

(受付: 1993年 3月11日)

(受理: 1993年 6月18日)

PROGRESSIVE DECLINE IN SEMEN CHARACTERISTICS AND TESTIS VOLUME OVER TIME IN SEVEN CASES OF UNTREATED VARICOCELE

Masanori YAMAMOTO

Yoshikazu TSUJI

Hatsuki HIBI

Koji MIYAKE

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

Abstract: To answer the question of whether varicocele has a deleterious effect upon testicular function, we observed semen parameters in men with untreated varicocele over time. Seven men, 27 to 43 years of age, sought fertility evaluation and were found to have varicocele and normal semen parameters. When they returned (mean follow-up, 60 months) because of ongoing fertility problems, semen analysis showed highly significant drops in sperm density ($\times 10^6/\text{mL}$), from 85.7 to 19.1, and in motility, from 65 % to 31.6 %. Left testicular volume also significantly decreased from 19mL to 17.4mL. No significant change was seen in semen volume. Observation of these changes reinforces suspicions that testicular damage that leads to subfertility is progressive in men who have varicocele.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 714 - 717, 1993)

Introduction

The concept that the varicocele can cause male infertility has been enshrined in the urologic firmament for many years. Many men with varicoceles have abnormal semen analyses, some with over toligozoospermia, necrozoospermia, asthenozoospermia, or other disorders of sperm motility¹⁾.

The role of the varicocele in male infertility has been controversial and the question of whether varicocele has deteriorative effect on testicular function over time has been addressed by numerous animal experiments. Fussell et al. reported that progressive change of testicular histology as evidenced by ultrastructural study over 18 months of follow-up²⁾. Shafik et al. demonstrated that dogs with experimental varicocele had a decline in sperm concentration and motility, an increase in percentage of abnormal morphology of sperm, and increased testicular temperature when compared with the control group³⁾.

Similar investigation in humans has been accom-

plished by several authors. Lipshultz and Carrier⁴⁾ documented sperm concentrations decreased by >50 % in older men with varicocele when compared with younger men. Nagao et al. determined hormonal and semen parameters in fertile and infertile men with varicocele. Both groups were revealed to have abnormalities that were more proclaimed in the infertile group⁵⁾. Recently, Chehval and purcell observed semen parameters in the same men with untreated varicocele over time⁶⁾. Statistically significant deterioration of semen parameters was found from normal to abnormal⁶⁾. Clinical studies which describe the effect of varicocele upon testicular function over time in the same patients are few. We have encountered seven cases of untreated varicocele who returned to our clinic because of persistent infertility. We report on alterations in semen analyses and testis volumes over time in men with untreated varicocele.

Materials and methods

Seven men with varicocele who visited our male in-

fertility clinic were included in this study. The diagnosis of varicocele was based on physical examination in the erect and supine position using Valsalva's maneuver. Varicoceles were graded according to Dubin and Amelar⁷⁾ into: small (grade I), only detected during Valsalva's maneuver; moderate (grade II), easily palpated without Valsalva maneuver; large (grade III), causing visible bulging of the scrotal skin. All men had unilateral left varicocele. Six patients had grade II varicocele and one patient (case 2 in Table 1) had grade I varicocele. Semen analyses were normal at the initial presentation. They returned to our clinic for re-evaluation after 25 to 96 months because of persistent infertility. Semen samples were collected after a period of sexual abstinence of 3 to 5 days. Semen was obtained at the hospital by masturbation and examined within 1 hour after ejaculation. At least two samples from each man were obtained. Values demonstrated are the means of two or more samples. Testicular volumes were measured using an orchimeter. The orchimeter was fitted over the stretched anterior scro-

tal skin excluding the head and the body of the epididymis while the volume was measured.

All the values were expressed as Mean $\pm$ SE. Comparison of changes in semen parameters were made by paired t-test analysis. Correlation and regression statistics were used to determine whether length of follow-up interval was associated with changes in semen quality. Statistical significance was considered to be present when the P value was <0.05 . Statistical analysis was performed using a commercially available software package (Systat Inc., Chicago, IL).

Results

The changes in seminal parameters and testis volume are shown in Table 1. Ages of the 7 men ranged from 27 to 43 years. Mean follow-up was 60.1 ± 10.8 (mean $\pm$ SE).

Deterioration in grade of varicocele was not recognized in 6 patients, but one patient with grade I varicocele had grade II varicocele at second visit. Deterioration in sperm concentration and motility, and

Table 1 Semen characteristics of patients with untreated varicocele during 8 years' follow-up

Pt.	Baseline					Follow-up					
	Density	Motility	Vol.	Testis Volume rt	Testis Volume lt	Interval	Density	Motility	Vol.	Testis Volume rt	Testis Volume lt
	$\times 10^6/\text{mL}$	%	mL	mL	mL	mo	$\times 10^6/\text{mL}$	%	mL	mL	mL
1	110	62	2.0	18	16	28	20	34	2.2	18	16
2	85	65	2.0	22	20	84	9	20	2.2	20	19
3	92	65	3.5	20	19	25	15	15	3.0	20	16
4	62	50	4.2	20	22	36	19	40	4.0	20	20
5	54	75	3.8	22	21	92	32	31	3.3	20	18
6	125	68	3.6	20	19	96	35	59	3.3	19	18
7	72	70	3.2	18	16	60	4	22	4.0	18	15

Table 2 Values and paired t test analysis of baseline and follow-up semen parameters and testis volume

	Baseline values	Follow-up values	Probability
Density ($\times 10^6/\text{ml}$)	85.7 ± 9.7	19.1 ± 4.3	0.0001
Motility (%)	65.0 ± 3.0	31.6 ± 5.6	0.003
Volume (ml)	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.3	0.818
Testis Volume (ml)			
Right	20.0 ± 0.62	19.3 ± 0.36	0.094
Left	19.0 ± 0.87	17.4 ± 0.68	0.01

left testis volume. were statistically significant (Table 2). However, no significant change was found in seminal volume and right testis volume. Regression relationships were not detected between the length of follow-up and semen quality.

Sperm density, which was normal in 7 patients, became abnormal at the second visit in 5 (71.4 %). Also, sperm motility was initially normal in 6 patients, 5 of which (83 %) became abnormal. Right testis volume was normal in 7 patients, 3 of which (43 %) decreased. Left testis volume was initially normal in 7 patients, 6 of which (86 %) decreased. Dependent worsening of total sperm count was found. There was no correlation of grade of varicocele with decrease in semen quality.

Discussion

In the present study, it is suggested that deterioration of semen quality in the patients with varicocele can develop in progressive fashion. This finding is supported by Castro-Magna's study showing normal testicular histology of adolescents but of Leydig cell dysfunction as evidenced by abnormal response to gonadotropin-releasing hormone⁸⁾. According to their study, it is obvious that testicular deterioration can occur not only early in adolescent but also in some cases before detectable abnormality in spermatogenic epithelium. Cheval and Purcell reported that semen parameters, especially sperm density, sperm motility and total sperm count worsened significantly in men with untreated varicocele over time⁶⁾. Their mean follow-up period was 44.3 months. They asserted that in males with varicocele, normal semen parameters should not routinely be expected to stay normal over time⁶⁾.

A regression relationship between worsening of semen quality and interval of follow-up was not detected from the present data and neither was from Cheval and Purcell's study⁶⁾. They speculated that deterioration of semen parameters from normal to abnormal after long term follow-up reflects some dependent process that is not explained by normal variations in semen analyses⁶⁾. It is plausible that proposed varicocele effects of scrotal temperature⁹⁾, hormonal abnormalities¹⁰⁾, biochemical¹¹⁾, and immunological factors¹²⁾, combine to induce a bilateral disease.

Okuyama et al. compared testicular volumes and semen parameters in a group of adolescents with a surgi-

cally treated varicocele and a group of adolescents treated by means of a conservative regimen¹³⁾. A reversal of testicular growth failure and an increase in semen quality in the corrected group was reported. Hoesli¹⁴⁾ reported similar findings in 27 adult men between 20 and 29 years of age, treated for their varicocele because of fertility problems. Testis volume and semen quality were compared with a group of age-matched controls with a varicocele encountered during a routine medical examinations for other reasons than infertility. Laven et al. performed a prospective controlled study in 88 randomly selected adolescents to study the effects of varicocele treatment on testicular function¹⁵⁾. They concluded that although not apparent in all adolescents, varicocele correction resulted in an increase in left testis volume and sperm concentration¹⁵⁾.

From the study of Cheval and Purcell⁶⁾, and from the results reported in this communication, we conclude that testicular damage that leads to subfertility is progressive in men who have varicocele. Men whose semen parameters are normal despite the presence of varicocele, and who are concerned about fertility, require regular check of semen quality because those parameters are likely to decline.

References

- 1) Dublin L and Amelar RD, Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 22: 469, 1971
- 2) Fussell E, Lewis R, Roberts J, et al., Early ultrastructural findings in experimentally induced varicocele in the monkey testis. *J Androl* 2: 111, 1981
- 3) Shafik A, Wali M, Abdel-Azis Y, et al., Experimental model of varicocele. *Eur Urol* 16: 298, 1989
- 4) Lipshultz L and Corriere J, Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 117: 175, 1977
- 5) Nagao RR, plymate SR, Berger RE, et al., Comparison of gonadal function between fertile and infertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 46: 930, 1986
- 6) Cheval MJ and Purcell MH, Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril* 57: 174, 1992

- 7) Castro-Magana M, Angulo M and Canas J, Improvement of Leydig cell function in male adolescents after varicocelectomy. *J Pediatr* 115: 809, 1989
- 8) Dubin L and Amelar RD, Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with a varicocele. *Fertil Steril* 21: 606, 1970
- 9) Yamaguchi M, Sakatoku J and Takihara H, The application of intrascrotal deep body temperature measurement for the noninvasive diagnosis of varicoceles. *Fertil Steril* 52: 295, 1989
- 10) Bickel A and Dickstein G, Factors predicting the outcome of varicocele repair for subfertility: the value of the luteinizing hormone-releasing hormone test. *J Urol* 142: 1230, 1989
- 11) Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, et al., Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* 22: 149, 1989
- 12) Gilbert BR, Witkin SS and Goldstein M, Correlation of sperm-bound immunoglobulins with impaired semen analysis in infertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 52: 469, 1989
- 13) Okuyama A, Nakamura M, Namiki M, et al., Surgical repair of varicocele at puberty: preventive treatment for fertility improvement. *J Urol* 139: 562, 1988
- 14) Hoesli PO, Zur fruhbehandlung de Varikozele bei Kindern und Jugendlichen. *Helv Chir Acta* 56: 229, 1989
- 15) Laven JS, Velde ER, Haans LCF, et al., Effects of varicocele treatment in adolescents: a randomized study. *Fertil Steril* 58: 756, 1992

7例の未治療精索静脈瘤患者における 進行性の精液所見の悪化と精巣容積の減少

山本雅憲 辻 克和 日比初紀
三宅弘治

名古屋大学医学部泌尿器科学教室

精索静脈瘤が精巣機能に悪影響を及ぼすか否かを検証する目的で、未治療精索静脈瘤患者の精液所見の長期に亘る観察を試みた。年齢が23歳から43歳の7名の患者が不妊を主訴に来院し、精索静脈瘤が発見されたが、精液所見は正常であった。彼らは不妊が持続するため、長期間経過した後に(平均60カ月)、再び来院し、精液検査を受けた。初診時の精子濃度の平均値は、 $86 \times 10^6/\text{mL}$ であったが、再診時のそれは $19 \times 10^6/\text{mL}$ と有意に減少していた。運動率は65%から32%に有意に減少していた。左精巣容積も19mLから17.4mLに有意に減少していた。精液量には変化は認められなかった。以上の結果より、精索静脈瘤患者においては、精巣機能の悪化は、進行性であることが示唆された。

(受付: 1993年1月22日)

(受理: 1993年6月18日)

ヒト精子長期冷所保存におけるCaffeine, Pentoxifyllineの効果

Effects of Caffeine and Pentoxifylline under the Prolonged Storage of Human Spermatozoa in a Refrigerator

横浜市立大学医学部泌尿器科学教室

菅野 ひとみ

Hitomi KANNNO

田中 克幸

Katsuyuki TANAKA

岩崎

Akira IWASAKI

木下 裕三

Yuzo KINOSHITA

斉藤 和男

Kazuo SAITO

皓

穂坂 正彦

Masahiko HOSAKA

関口 由紀

Yuki SEKIGUCHI

佐藤 和彦

Kazuhiko SATO

Department of Urology,

Yokohama City University School of Medicine, Yokohama 236, Japan

Caffeine, pentoxifylline などのmethyl xanthine誘導体は精子運動賦活作用を有することが知られる。両者のヒト精子運動性への作用の比較と、長期冷所保存 (3℃, 一週間) における効果について検討した。希釈精子にcaffeine, pentoxifylline (各々 1 mM) 添加後 1 時間の測定で, caffeineでは精子頭部振幅を増加させ、直進性を低下させたが, pentoxifyllineでは、運動率、速度、直進性、精子頭部振幅のすべてのパラメーターを増加させた。またcaffeineは、速度は早い直進性の低い精子を増加させたのに対し、pentoxifyllineは速度も早く直進性も高い精子数を増加させた。Methyl xanthine存在下で希釈精子を一週間まで冷所保存し、37℃ 15分のincubation後測定すると常に、caffeine, pentoxifylline添加群が、controlに比し有意に高い精子運動率と速度を示した。Methyl xanthine誘導体は、ヒト冷所保存精子に対して運動性を向上させることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 718 - 722, 1993)

緒言

Caffeine, theophylline, pentoxifyllineなどのmethyl xanthine誘導体は、phosphodiesteraseを阻害する作用により、細胞内cAMP濃度を高めることで、精子運動賦活作用を有するとされている^{1,2)}。なかでもPentoxifyllineは、1970年代から注目され始めた比較的新しい微小循環改善剤で、赤血球の変形能を改善し、血液の粘張度を下げ、血小板の凝集と血栓形成を抑制することが知られている³⁾。経口投与で、末梢血管病変、脳血管病変、など多くの疾患の治療に応用されているが (300~1200 mg/day)、乏精子症の治療にも効果があることが近年報告されている^{4,5)}。他のmethyl xanthine誘導体より、溶解度が

高いことも一つの特徴である。一方、数時間にわたってのmethyl xanthine誘導体の精子に対する効果については詳細な検討がされているが^{6,7,8)}、その長期的効果はあまり検討されていない。我々は、caffeineとpentoxifylline添加直後の精子運動特性の比較、及び3℃、1週間にわたる精子長期冷所保存における、caffeine, pentoxifyllineの効果について、コンピューター精子解析装置CellSoft 3000 (CRYO RESOURCE社) を用い検討したので報告する。

対象と方法

対象は横浜市立大学医学部泌尿器科不妊外来を訪れた患者、10症例より採取した精液である。年齢は 35 ± 4.5 (M $\pm$ SD) 歳、精子濃度は $46.4 \pm 22.6 \times$

10⁶/ml, 精子運動速度は $41.5 \pm 8.0 \mu\text{m/s}$, 精子運動率は $51.1 \pm 17.4\%$, 精子直進性は 5.5 ± 1.0 , 精子頭部振幅は $2.1 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ であった。

精液をIrving Scientific社のRifrigeratingMedium (TEST Yolk Buffer) で1:1に希釈し, 希釈した精液をControl群, 1 mMのCaffeine (Sigma社) 添加群, 1 mMのPentoxifylline (Sigma社) 添加群の3群に分け, 37℃下で約1時間のincubation後, 精子運動率, 運動速度, 直進性, 頭部振幅を解析した。次にこの3群の希釈精子を, 1週間まで3℃で冷所保存を行い, 37℃15分のincubation後に, 経時的な精子運動特性の変化を解析した。解析はCellSoft 3000を用いて行った。

Test Yolk Buffer 組成は, TES 211 mM, Tris 96 mM, Dextrose 11 mM, Penicilline-G 100 units/ml, Streptomycin Sulfate 100 $\mu\text{g/ml}$, Egg yolk 20% (v/v) である。

結 果

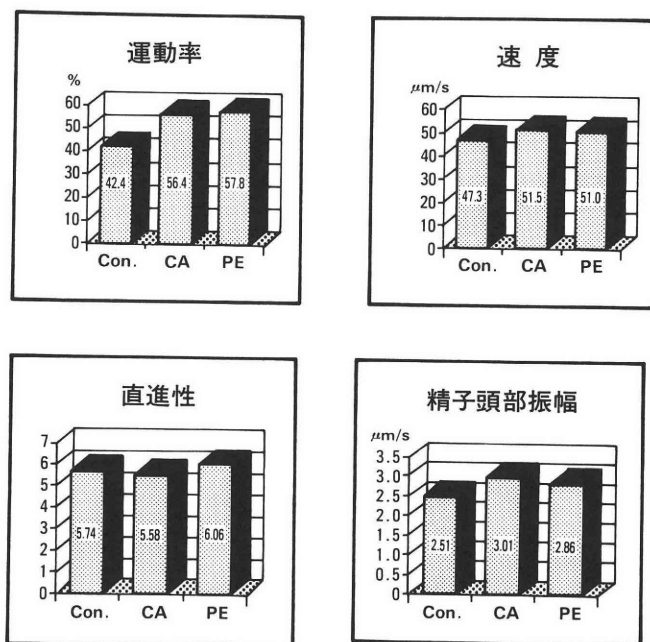
Caffeine, pentoxifylline添加直後の精子運動特性

を図1に示す。測定は添加後37℃下で約一時間, incubationした後に行った。

Pentoxifylline群は, control群に比し, 運動率, 速度, 直進性, 精子頭部振幅, のすべてが高い値を示した。一方, caffeine添加群は, 運動率と速度に関しては, 同様に高い値を示したが, 直進性は低下し, 精子頭部振幅は, 顕著な上昇を示した。

さらに, 速度と直進性の2つのパラメーターを同時に解析した結果を表1に示す。

Control群は846の細胞を, caffeine添加群は768の細胞を, pentoxifylline添加群は810の細胞を解析した。速度が $40 \mu\text{m/s}$ 以上の精子の割合は, control群の21.6%に比べ, caffeine添加群は33.0%, pentoxifylline添加群は36.5%, と共に増加しており, 添加群の方が運動速度の高い精子数が多いことがわかった。さらに速度が $40 \mu\text{m/s}$ 以上の精子について, 直進性が6.5未満と, 6.5以上について分析した結果, caffeine群では速度が $40 \mu\text{m/s}$ 以上で, しかも直進性が6.5以上と高い精子の割合は12.5%と少なく, 直進性が6.5未満の精子の割合は20.5%と多かった。



Con. : Control

CA : Caffeine 添加群

PE : Pentoxifylline 添加群

図1 Caffeine/Pentoxifylline添加直後の効果

表 1 caffeine, Pentoxifylline添加直後の精子運動速度と直進性

		Velocity (μ m/s)			
		0 ~10	10~40	40 ~	
				Linearity <6.5	$\geq$ 6.5
Control	(846 cells)	63.4 %	15.0 %	9.8 %	11.8 %
Caffeine	(768 cells)	52.2 %	14.8 %	20.5 %	12.5 %
Pentoxifylline	(810 cells)	47.7 %	15.8 %	15.8 %	20.7 %

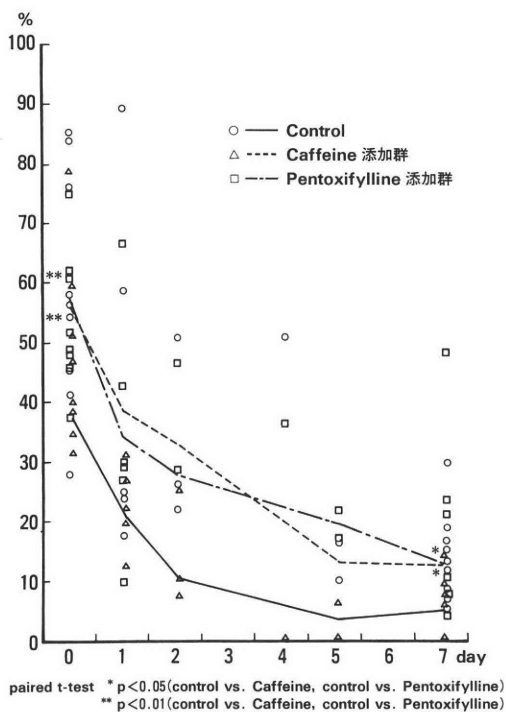


図 2 運動率

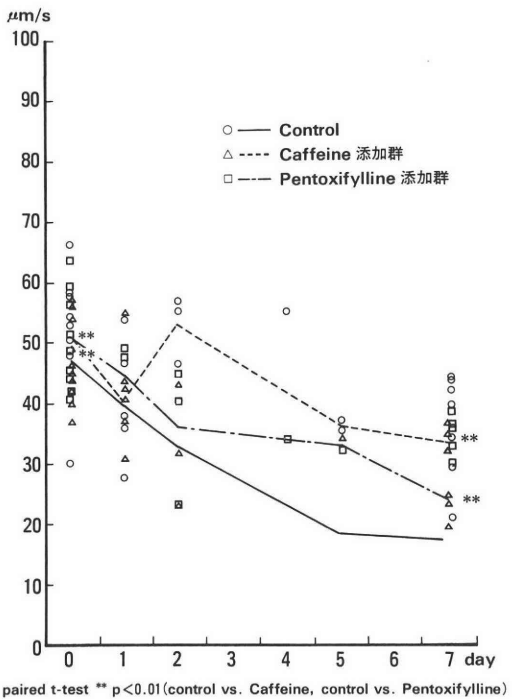


図 3 速度

表 2 精子長期冷所保存下でのCaffeine, Pentoxifyllineの効果

Day	速度 μ m/s		運動率%	
	0	7	0	7
Control	47.3 $\pm$ 6.9	17.2 $\pm$ 15.7	42.4 $\pm$ 10.4	0 $\pm$ 4.7
Caffeine	50.4 $\pm$ 9.4	33.6 $\pm$ 13.8	56.4 $\pm$ 19.4	12.6 $\pm$ 8.3
Pentoxifylline	51.0 $\pm$ 7.4	24.1 $\pm$ 16.8	57.8 $\pm$ 14.7	12.7 $\pm$ 15.0

一方pentoxifylline群では、速度も直進性も高い精子数の割合が20.7 %と多く、速度は高いが直進性が6.5未満の割合は15.8 %と少なかった。運動速度40 μ m/s 以上の精子においてpentoxiflline群はcaffeine群に比し有意に (χ^2 , p<0.01) 直進性6.5以上の精子が多く認められ、同じmethyl xanthine誘導体でありなが

ら、pentoxifyllineは、直進性が高く、しかも速度の早い精子数を増加させる点で、caffeine群との効果の違いがあることが示唆された。

一週間 3℃下での精子冷所保存における精子運動率と運動速度の経時的変化を図 2, 図 3, 表 2 に示す。測定は37℃復温後 (37℃, 15分のincubation後)

に行った。caffeine群, pentoxifylline群のいずれも、一週間にわたって、control群に比べ有意に高い値を示した。

考 察

Caffeine, pentoxifylline などのmethyl xanthine誘導体が、phosphodiesterase阻害作用により細胞内cAMP濃度を高め、精子運動賦活作用を有することはよく知られている。しかしながら、caffeineとpentoxifyllineでは異なった作用を有し、単純にphosphodiesterase阻害作用のみでは、説明しにくいとの報告もある⁶⁾。牛では細胞のアルカリ化などの影響も考えられ⁹⁾、また牛では精子運動賦活は、ATP濃度の低下と、ADP、AMP濃度の上昇を伴うと報告されているが^{10,11)}、人間では、ATP、ADP濃度は殆ど変化しないとの報告もある^{6,12)}。Hongらは、caffeineの濃度により、作用機序が異なる可能性を示唆し、高濃度のcaffeine下では細胞内への、Caイオン取り込みを抑制することで、精子の運動を賦活するのではないかと報告している¹³⁾。しかし、正確な作用機序については不明な点が多く、今後の検討課題であろう。

今回の検討でも、caffeineとpentoxifyllineの両者では、精子運動能に及ぼす影響に差があることが示唆された。caffeine添加により、精子直進性が低下し、精子頭部振幅が増加することは、杉元らにより報告されている⁷⁾。今回の1 mM, 37℃下1時間の条件において、pentoxifylline添加群では、速度も直進性も高い精子数の割合が増加するという点で、速度は早い直進性の低い精子数の多いcaffeine群とは若干異なる結果が得られた。Caffeine, pentoxifyllineの添加濃度に関しては、1991年Sikkaらが0.1 mM, 1.0 mM, 3.0 mMの各濃度での比較を行い、caffeineもpentoxifyllineも精子運動率と精子運動速度に関して、ほぼdose dependentな反応を示したと報告している¹⁴⁾。我々の検討でも1 mMの濃度で十分な効果が得られ、この濃度における精子長期冷所保存を試みた。

精子長期冷所保存におけるmethyl xanthine誘導体の効果に関しては、1992年Diazらの報告がある¹⁵⁾。彼らは5日までの4℃下での精子冷所保存を行い、保存後にcaffeineを3.5 mMまたは7 mM添加し、精子運動率の増加したことを報告している。今回の検討のように冷所保存液中にpentoxifyllineやcaffeineが添加された状態では、むしろ活性化された精子は寿命が短いことも予想されたが、一週間の保存中常に添加

群のほうが高い運動能を示すことがわかった。ただし、3℃の冷所保存中、精子が運動し続けているとは考え難く、冷所保存後37℃に復温した15分間に、caffeineやpentoxifyllineが作用したことも考えられる。今後の検討が必要と考えられた。

結 語

Caffeineとpentoxifyllineの添加後(1 mM)の効果は、caffeineが、精子頭部振幅を特に増加させ、直進性を低下させたのに対し、pentoxifyllineはすべてのパラメーターを増加させた。またcaffeine群は速度は早い直進性の低い精子数を増加させたのに対し、pentoxifyllineは速度も直進性も高い精子数を増加させた。

一週間の冷所保存下(3℃)においては、caffeine, pentoxifylline添加群は37℃15分のincubation後の測定において常に、control群に比し有意に高い精子運動率と速度を示した。

本論文の要旨は、第37回日本不妊学会学術講演会(東京)において発表した。

文 献

- 1) Garbers DL and Kopf GS, The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv cyclic Nucleotide Res* 13: 251, 1980
- 2) de-Turner EA, Aparicio NJ, Turner D, et al., Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate, and a β -blocking agent on human sperm motility, *Fertil Steril* 29: 328, 1978
- 3) Ward A and Clissold SP, Pentoxifylline: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 34: 50, 1987
- 4) Micic S, Hadzi-Djokic J, Dotlic R, et al., Pentoxifylline treatment of oligoasthenospermic men. *Acta Europ Fert* 19: 135, 1988
- 5) Shen MR, Chiang PH, Yang RC, et al., Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br J Pharmac* 31: 711, 1991
- 6) Rees JM, Ford WCL and Hull MGR, Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 90: 147, 1990
- 7) 杉元幹史, 野村伊作, 松岡則良 他, 精子運動能とCaffeine-cell soft systemによる解析. *日不妊会誌* 35: 589, 1990
- 8) Schoenfeld C, Amelar RD and Dubin L, Stimu-

lation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. Fertil Steril 26: 158, 1975

- 9) Vijayaraghavan S, Crichtlow LM and Hoskins DD, Evidence for a role for cellular alkalisation in the cAMP mediated initiation of motility in bovine caput spermatozoa. Biol Reprod 32: 489, 1985
- 10) Garbers DL, First NL, Gorman SK, et al., The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. Biol Reprod, 8: 589, 1973
- 11) Garbers DL, First NL, Gorman SK, et al., The effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism. Biol Reprod 8: 599, 1973b
- 12) Calamera JC, Nicholson R, Brugo S, et al., Effects of methyl xanthines upon the spermatozoa adenosinetriphosphate (ATP) concentration in normal semen. Andrologia 16: 358, 1984
- 13) Hong CY, Chiang BN, Wu P, et al., Involvement of calcium in the caffeine stimulation of human sperm motility. Br J clin Pharmac 19: 739, 1985
- 14) Sikka SC and Hellstorm WJG, The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. J Androl 12: 165, 1991
- 15) Diaz JW, Gonzalez MA, Avedo F, et al., Use of an ATP-supplemented medium for the conservation of human semen and the effect of caffeine on the motility of preserved sperm. Results in artificial insemination. Andrologia 24: 131, 1992

Effects of caffeine and pentoxifylline under the prolonged storage of human spermatozoa in a refrigerator

Hitomi Kannno, Yuzo Kinoshita, Yuki Sekiguchi
Katsuyuki Tanaka, Kazuo Saito, Kazuhiko Sato
Akira Iwasaki and Masahiko Hosaka

Department of Urology,
Yokohama City University School of Medicine,
Yokohama 236, Japan

It has been reported that methyl xanthine derivatives increase the activity of human spermatozoa. In this study we investigated the effect of caffeine and pentoxifylline on the sperm motility in 1-week storage of human spermatozoa in a refrigerator (3°C). In 1-hour incubation at 37°C, caffeine especially increased lateral head displacement (ALH), but decreased linearity. 1 mM Pentoxifylline, however, increased both ALH, linearity, velocity and motility. Caffeine increased sperms of high-velocity and low-linearity fraction, whereas Pentoxifylline increased that of high-velocity and high-linearity.

In 1-week storage of sperm with these compounds at 3°C, sperm motility and velocity was always higher than control, suggesting that methyl xanthine derivatives have a positive effect on the motility of refrigerated sperms.

(受付: 1993年1月27日)

(受理: 1993年6月18日)

超音波カラードップラー法の精索静脈瘤への臨床応用 —診断および静脈血逆流速度に基づいた分類の可能性—

Clinical Study of Varicocele by Color Doppler Ultrasonography

山口大学医学部泌尿器科学教室

(主任：内藤克輔教授)

白 瀧 敬

Satoshi SHIRATAKI

鎌 田 清 治

Kiyoharu KAMADA

瀧 原 博 史

Hiroshi TAKIHARA

石 津 和 彦

Kazuhiko ISHIZU

内 藤 克 輔

Katsusuke NAITO

Department of Urology,

Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi 755, Japan

(Director: Prof. Katsusuke Naito)

井 本 勝 彦

Katsuhiko IMOTO

馬 場 良 和

Yoshikazu BABA,

超音波カラードップラーの精索静脈瘤診断および精索静脈瘤の血流動態解析への可能性について検討した。理学的所見にて精索静脈瘤を認める28例と、精索静脈瘤を認めない17例を対象として理学的所見との比較にて超音波カラードップラー法は精索静脈瘤のscreeningとして有用であると考えられた。また超音波カラードップラー法上のsubclinical varicocele症例 6 例中 3 例に精索静脈瘤根治術を施行し 3 例中 2 例に精液所見の改善傾向が認められた。理学的所見による精索静脈瘤のgrade 別の最大静脈血逆流速度の検討では、grade III群がsubclinical varicocele群より静脈血逆流速度が有意に速く、またgradeが高くなるに従い静脈血逆流速度が速くなる傾向が認められ、超音波カラードップラー法にて精索静脈瘤を静脈血逆流速度という数値にて客観的に分類できる可能性が示唆され、精索静脈瘤の病態解明への可能性を新たに開くものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 723 - 728, 1993)

緒 言

1952年にTulloch が無精子症の1例に両側精索静脈瘤根治術を施行し妊娠の成立をみたという報告¹⁾以来、男子不妊症において精索静脈瘤に対する手術療法の有効性はよく知られている。一方subclinical varicocele の手術適応に対しては議論が多い。しかしsubclinical varicocele に手術療法を行い精液所見の改善または妊娠の成立を認めた報告も認められ^{2,3)}、clinical varicoceleだけでなくsubclinical varicoceleをも確実に診断し、手術適応を検討することは重要である。内精静脈造影は精索静脈瘤の診断において

golden standard ではあるが侵襲的である。このため補助診断法として超音波ドップラー法^{4,5)}、サーモグラフィ⁶⁾、陰囊シンチグラフィ^{7,8)}、精巣深部温測定法⁹⁾が用いられている。しかしこれらの補助診断法では測定結果が判読者により異なり主観的であり、また定量的な評価が難しい欠点がある。最近開発された超音波カラードップラー法は非侵襲的な検査法であり、血流をリアルタイムにカラー表示し、さらに血流速度を数値にて表現することができ、従来の方法に比べ血流動態を客観的に評価できる。精索静脈瘤の成因は内精静脈への静脈血逆流であると考えられており、超音波カラードップラー法ではこ

の内精静脈への静脈血逆流の有無を評価するのみでなく、静脈血逆流速度を定量的に解析することが可能と思われる。超音波カラー Doppler 法を精索静脈瘤の血流動態解析に臨床応用した報告はいまだなされていない。今回われわれは超音波カラー Doppler 法を精索静脈瘤の診断に臨床応用し、理学的所見および手術所見と比較し、本法の診断への有用性、さらに精索静脈瘤の血流動態についても検討を加えた。

対象および方法

1991年3月から1992年9月までの19カ月間に、山口大学医学部泌尿器科を受診した患者のうち、理学的所見にて左精索静脈瘤が認められた28例と、精索静脈瘤を認めなかった17例を対象とした。精索静脈瘤の理学的所見による clinical grading は、grade I : small, grade II : moderate, grade III : large に分類¹⁰⁾した。年齢分布は14歳から45歳で、平均29.7歳であり、男子不妊を主訴としたもの43例、陰嚢部鈍痛を主訴としたもの2例であった。

超音波カラー Doppler 法の装置はアロカ社製 SSD-680を用い、探触子は7.5 MHzのリニア探触子を使用した。SSD-680は従来のBMode断層法に加えて、探触子に近づいてくる血流を赤色で、遠ざかる

血流を青色で血流をリアルタイムにカラー表示できる Flow Mode と、カラー表示された血流の部にサンプルマークを合わせ Doppler 波形を検出できる Doppler Mode からなっている。測定は患者を立位とし Valsalva の手技をとらせ、陰嚢上部にて蔓状静脈叢での静脈血逆流を観察し、静脈血逆流が描出された症例を精索静脈瘤とした。描出された血流の角度補正を行った後、最大静脈血逆流速度を測定した(図1)。測定は数回行い、最大値を最大静脈血逆流速度とした。

まず超音波カラー Doppler 法にて観察された蔓状静脈叢での静脈血逆流が、精索静脈瘤の原因と考えられている腎静脈から内精静脈への逆流を表しているか、精索静脈瘤根治術前後に超音波カラー Doppler 法を施行し得た5症例において術中所見と比較検討した。

精索静脈瘤の有無につき理学的所見と超音波カラー Doppler 所見を比較検討し、理学的所見上精索静脈瘤が明らかでなく、超音波カラー Doppler 法にて静脈血逆流が認められた症例を超音波カラー Doppler 法上の subclinical varicocele と判断し、同症例中精索静脈瘤根治術を施行した3例で術中所見と比較した。またこの3例の術前後の精液所見の検討を行った。

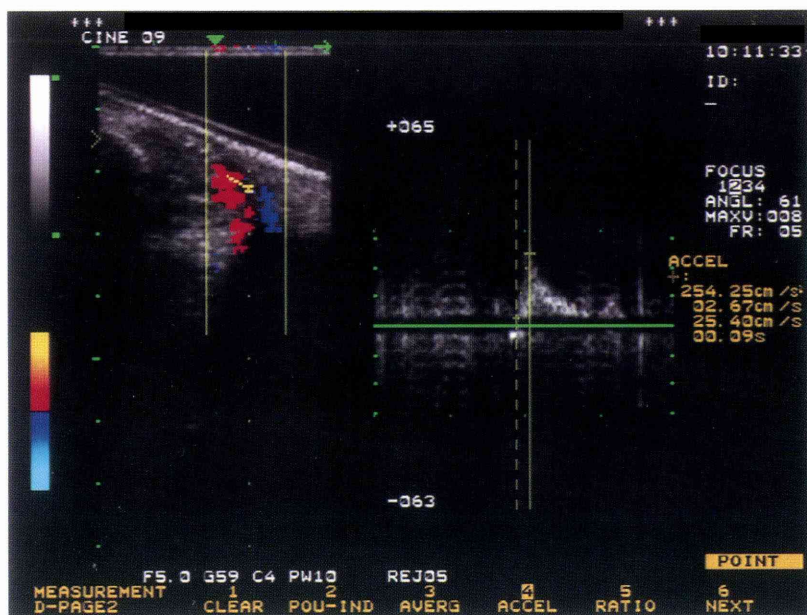


図1 超音波カラー Doppler 写真 探触子に近づく血流は赤色、遠ざかる血流は青色で表される。赤色部にサンプルマークを合わせ Doppler 波形を描出し角度補正を行ったのち最大静脈血逆流速度 (Doppler 波形のピーク値) を測定した。

表 1 精索静脈瘤根治術前後の超音波カラー Doppler 法所見と術中所見との関係

No.	年齢	超音波カラー Doppler 所見 静脈血流の有無		術中所見 内精静脈の拡張の有無
		術前	術後	
1	28	有	無	有
2	26	有	無	有
3	36	有	無	有
4	24	有	無	有
5	33	有	無	有

さらに45症例中超音波カラー Doppler 法にて静脈血逆流が認められた34症例において、理学的所見による grade I から grade III の精索静脈瘤および超音波カラー Doppler 法上の subclinical varicocele の 4 群にわけ、各群間の最大静脈血逆流速度の検討を行った。検定法は Kruskal-Wallis 検定および Mann-Whitney 検定を用いた。

結 果

精索静脈瘤根治術前後に超音波カラー Doppler 法を施行した 5 症例は、全例に手術中に内精静脈の拡張が確認され、手術前に認められた蔓状静脈叢での静脈血逆流は、手術後には全例とも消失していた

表 2 精索静脈瘤の診断における超音波カラー Doppler 法所見と理学的所見との関係

		超音波カラー Doppler 法所見		
		逆流あり	逆流なし	合計
理学的所見	静脈瘤あり	28	0	28
	静脈瘤なし	6	11	17
	合計	34	11	45

(表 1)。

理学的所見にて精索静脈瘤が認められた28例全例に超音波カラー Doppler 法にて静脈血逆流が認められ、理学的所見と超音波カラー Doppler 法での所見との一致率は100 %であった。また理学的所見にて精索静脈瘤が認められなかった17例については、超音波カラー Doppler 法にて 6 例 (35.2 %) に静脈血逆流がみとめられた (表 2)。

理学的所見にて精索静脈瘤が認められず、超音波カラー Doppler 法にて静脈血逆流が認められた 6 例を超音波カラー Doppler 法上の subclinical varicocele と判断した。このうち精索静脈瘤根治術が 3 例に施行され、この 3 例全例に術中所見として内精静脈の拡張が認められ、この 3 例は subclinical varicocele であることが確認された (表 3)。subclinical varicocele の手術症例の術前後の精液所見は、症例 1, 2 で精子濃度および精子運動率が改善しており、特に症例 1 では術前精子濃度 $7.5 \times 10^6/\text{ml}$ から術後精子濃度 $45.0 \times 10^6/\text{ml}$ と著明に改善した。

理学的所見による各 grade ごとの最大静脈血逆流速度は、grade I 群は $35.0 \pm 13.2 \text{ cm/sec.}$ (mean $\pm$ SD, $n=6$)、grade II 群は $46.5 \pm 22.4 \text{ cm/sec.}$ (mean $\pm$ SD, $n=16$)、grade III 群は $53.5 \pm 20.2 \text{ cm/sec.}$ (mean $\pm$ SD,

表 3 超音波カラー Doppler 法上の subclinical varicocele の術中所見および手術前後の精液所見

No.	年齢	術中所見	精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)		精子運動率 (%)	
		内精静脈拡張	術前	術後	術前	術後
1	28	あり	7.5	45.0	47	60
2	26	あり	30.2	36.7	74	76
3	36	あり	4.0	13.1	26	49
4	33	N.E.	3.9	—	40	—
5	33	N.E.	65.6	—	36	—
6	27	N.E.	23.6	—	48	—

N.E.: not evaluated

表4 理学的所見による各grade別の静脈血逆流速度

静脈瘤 (Grade)	症例数	静脈逆流速度 (mean±SD) (cm/sec.)
Sub.	6	29.8±13.5
I	6	35.0±13.2
II	16	46.5±22.4
III	6	53.5±20.2

Sub.: subclinical varicocele *: $p<0.05$

n=6), subclinical varicocele群は 29.8 ± 13.5 cm/sec. (mean±SD, n=6)であった. clinical gradeが高くなるに従い, 最大静脈血逆流速度も高値となる傾向が認められ, grade III群はsubclinical varicocele群より有意に最大静脈血逆流速度は高値であった($p<0.05$) (表4).

考 察

超音波カラードップラー法は簡便かつ非侵襲的な検査法であり, 泌尿器科領域では急性陰囊症¹¹⁾および最近では血管性インポテンスのpenile blood flowの測定^{12,13)}に用いられている. 超音波カラードップラー法の精索静脈瘤の診断への初めての応用を試みたのはPetrosら¹⁴⁾である. 彼らは内精静脈造影と超音波カラードップラー法および理学的所見とを比較検討し, 超音波カラードップラー法にて精索静脈瘤が認められた17例中16例に内精静脈造影にて精索静脈瘤が認められたことを報告している. しかし彼らは, 血流動態の定量的解析としての静脈血逆流速度は測定しておらず, 単に精索静脈瘤のscreeningの補助手段として位置づけているにとどまった. われわれは, 精索静脈瘤根治術前後の超音波カラードップラー所見と術中所見とを比較検討した. 検討できた5例全例において術中に静脈瘤が確認され, 超音波カラードップラー法にて手術前に認めた静脈血逆流は手術後には消失した. すなわち, 超音波カラードップラー法にて蔓状静脈叢で認められる静脈血逆流は腎静脈から内精静脈への逆流を表現していることが確認できた.

精索静脈瘤の補助診断法としては先に述べたように種々報告されているが, それぞれ長所, 短所を有している. 精索静脈瘤の最も確実な診断法とされている内精静脈造影を基準にして, それぞれの補助診断法の有用性を検討したW. H. O. の報告¹⁵⁾では, 理学的所見, サーモグラフィー, 超音波ドップラー法および陰嚢シンチグラフィーのうち, 超音波ドッ

プラー法はfalse positive率が高く, 陰嚢シンチグラフィーはfalse negative率が高いとされている. 今回の検討では内精静脈造影を施行しておらず, 超音波カラードップラー法の精索静脈瘤診断に対するsensitivity, specificityの検討は行わなかったが, 理学的所見にて精索静脈瘤が認められた症例全例にて超音波カラードップラー法でも精索静脈瘤と診断され, またfalse negativeが認められなかった点から, 超音波カラードップラー法は精索静脈瘤のscreening法の一つとして充分有用であると考えられた.

次に, 臨床上診断が極めて困難なsubclinical varicoceleの診断における超音波カラードップラー法の有用性を検討した. 文献上subclinical varicoceleは男子不妊症の24%から77%であり^{2,5,13-18)}, 報告者によりかなり差が認められる. これは対象患者の背景が異なること, 補助診断法の違い, および診断技術によるものと思われる. われわれの検討における超音波カラードップラー法によるsubclinical varicoceleは17例中6例(35.2%)に認められた. この6例中精索静脈瘤根治術を施行した3例全例で術中所見にて内精静脈の拡張が認められたことにより, subclinical varicoceleの診断に際し, 超音波カラードップラー法は充分信頼できるものと思われた.

現在subclinical varicoceleの手術療法に関しては先に述べたように議論の多いところである. Dubinら¹⁹⁾はsmall varicoceleもlarge varicoceleと同じように妊孕性に影響を与えると報告しており, またYarboroughら²⁾は内精静脈造影により決定したsubclinical varicoceleに対し内精静脈塞栓術を施行し精子濃度の有意な改善を認めている. 今回超音波カラードップラー法上のsubclinical varicoceleに対し精索静脈瘤根治術を施行し, 術前および術後6カ月以上経過した後に精液検査を施行し得た3症例の検討で, 2例に精子濃度および精子運動率の改善を認め, そのうち症例1では術後精子濃度が著明に改善していた. subclinical varicoceleの中には, 今回われわれが経験したように手術療法により著明な精子濃度の改善を認める症例もあることより, subclinical varicoceleに対し手術療法を試みることは妥当ではないかと考えられる.

精索静脈瘤の病態をみる上で, 精索静脈瘤のgradingまたはtype別分類を行うことは重要なことと考えられる. 精索静脈瘤のgrading¹⁰⁾は主に理学的所見により行われている. しかし理学的所見によるsmall varicoceleの診断は, 触診時の挙辜筋反射等に

より常に正確なものとは断定し難い。このため各種補助診断法による精索静脈瘤のgradingやtype別分類が行われている。

Hirshら²⁰⁾は超音波ドップラー法により精索静脈瘤のgradingを行い、静脈の拡張が認められるものをgrade I、間欠的な静脈血逆流が認められるものをgrade II、持続的な静脈血逆流が認められるものをgrade IIIとしている。またComhaireら²¹⁾は陰囊部RIアンギオのtime activity curveから精索静脈瘤を5つのtypeに分類している。しかし従来のいずれの方法も必ずしも静脈を画像上同定した上で、静脈血逆流の血流動態を定量的に解析したものとは言い難い。われわれの理学的所見による各gradeごとの最大静脈血逆流速度の比較検討結果では、grade IIIはsubclinical varicoceleに比し最大静脈血逆流速度が有意に速く、clinical gradeが高くなるに従い最大静脈血逆流速度も速くなる傾向を認めた。この結果は精索静脈瘤を最大静脈血逆流速度という数値にて分類することを可能とするものであり、客観的な血流動態に立脚した診断、治療と病態解明への可能性を新たに開くものであると考えられた。

超音波カラードップラー法施行時に、蔓状静脈叢の拡張が著明で静脈の蛇行が著しいlarge varicoceleでは、静脈血逆流を認める血管の走行の決定が難しい症例があり、血流速度算出時の角度補正に困難を生ずる場合がある。また拡張した血管内で乱流がおり正確な静脈血逆流速度の計測が行えない場合もある。これらの問題点は超音波カラードップラー法による精索静脈瘤の血流動態解析の欠点である。われわれは乱流により静脈血逆流速度の測定が行えなかった症例は認めなかったが、large varicoceleの静脈の拡張蛇行が著しい症例で、静脈血逆流速度の角度補正が困難な例を認めており、この点は今後解決されるべき問題である。

文 献

- 1) Tulloch WS, A consideration of sterility factors in the light of subsequent pregnancies II, Subfertility in the male. *Edinburgh Med J* 59: 29, 1952
- 2) Yarborough MA, Burns JR and Keller FS, Incidence and clinical significance of subclinical scrotal varicocele. *J Urol* 141: 1372, 1989
- 3) Gonda RL Jr, Karo JJ, Forte RA, et al., Diagnosis of subclinical varicocele in infertility. *AJR* 148: 71, 1987
- 4) Greenberg SH, Lipshultz LI, Morganroth J, et

al., The use of the Doppler Stethoscope in the evaluation of varicoceles. *J Urol* 117: 296, 1977

- 5) Hirsh AV, Cameron KM, Tyler JP, et al., The Doppler assesment of varicoceles and internal spermatic vein reflux in infertile men. *Brit J Urol*, 52: 50, 1980
- 6) Lewis RW and Harrison RM, Contact scrotal thermography II, use in the infertile male. *Fertil Steril* 34: 259, 1980
- 7) Vandeweghe M and Comhaire F, Investigation of testicular blood circulation with Technetium. *Annals of the Association for the Study of Fertility* 5: 13, 1978
- 8) Suga K, Nakanishi T, Sakatoku Y, et al., Clinical study of varicocele by sequential scrotal scintigraphy. *Andrologia* 22: 525, 1990
- 9) Takihara H, Yamaguchi M, Baba Y, et al., Deep body intrascrotal thermometer: Theory and methodology. *Adv Exp Med Biol* 286: 115, 1991
- 10) Takihara H, Sakatoku J and Cockett ATK, The pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril* 55: 861, 1991
- 11) Middleton WD, and Melson GL, Testicular ischemia: color Doppler sonographic findings in five patients. *AJR* 152: 1237, 1989
- 12) Quam JP, King BF, James EM, et al., Duplex and color Doppler sonographic evaluation of vasculogenic impotence. *AJR* 153: 1141, 1989
- 13) 鎌田清治, 瀧原博史, 植野卓也 他, 超音波カラードップラー法により測定した勃起能正常者の陰茎血流動態, 日不妊会誌 36: 876, 1991
- 14) Petros JA, Andriole GA, Middleton WD, et al., Correlation of testicular color Doppler ultrasonography, physical examination and venography in the detection of left varicoceles in men with infertility. *J Urol* 145: 785, 1991
- 15) World Health Organization, Comparison among different methods for the diagnosis of varicocele. *Fertil Steril* 43: 575, 1985
- 16) Kursh ED, What is the incidence of varicocele in a fertile population?. *Fertil Steril* 48: 510, 1987
- 17) McClure RD and Hricak H, Scrotal ultrasound in the infertile man: Detection of subclinical unilateral and bilateral varicoceles. *J Urol* 135: 711, 1986
- 18) Perrin P, Rollet J and Durand L, The Doppler Stethoscope in the Diagnosis of Subclinical Varicocele. *Brit J Urol*, 52: 390, 1980
- 19) Dubin L and Amelar RD, Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile

men with varicocele. Fertil Steril 21: 606, 1970

- 20) Hirsh AV, Kellett MJ, Robertson G, et al., Doppler Flow Study, Venography and Thermography in the Evaluation of Varicoceles of Fertile and Subfertile Men. Brit J Urol 52: 560, 1980
- 21) Comhaire F, Simons M, Kunnen M, et al., Testicular arterial perfusion in varicocele: The role of rapid sequence scintigraphy with Technetium in varicocele evaluation. J Urol 130: 923, 1983

Clinical study of varicocele by color Doppler ultrasonography

Satoshi Shirataki, Hiroshi Tskihara
Katsuhiko Imoto, Kiyoharu Kamada
Kazuhiko Ishizu, Yoshikazu Baba
and Katsusuke Naito

Department of Urology,
Yamaguchi University School of Medicine,
Yamaguchi 755, Japan
(Director: Prof. Katsusuke Naito)

Whether color doppler ultrasound can be used to detect varicoceles and to determine their hemodynamic characteristics was tested for a group of 28 patients with

and 17 patients without clinically detectable varicocele. Findings of color doppler ultrasound related to the diagnosis of varicocele were compared with those of physical examination. Color doppler ultrasound was found to be reliable means for screening for varicocele in infertile men.

In 6 patients use of color doppler ultrasound resulted in detection of subclinical varicoceles. Of these patients, 3 underwent varicocelectomy and 2 patients of the 3 patients who underwent varicocelectomy were found to have postoperative improvement in the results of semen analysis.

Analysis of retrograde venous peak flow velocity measured for groups of subjects classified according to grade as assigned based on results of physical examination demonstrated that retrograde venous peak flow velocity in grade III patients was significantly higher than that in patients of other grades, and that the higher the grade assigned, the higher the retrograde venous peak flow velocity. These findings suggested that varicoceles can be classified by retrograde venous peak flow velocity, an objectively measurable value, and that color doppler ultrasound can be used to determine the hemodynamic characteristics of varicoceles.

(受付: 1993年2月2日)

(受理: 1993年6月18日)

精子運動に対する浸透圧の影響

Influence of Osmolarity on the Motility of Human Spermatozoa

横浜市立大学医学部泌尿器科教室

齋藤 和 男

Kazuo SAITO

木 下 裕 三

Yuzo KINOSHITA

佐藤 和 彦

Kazuhiko SATO

岩 崎

Akira IWASAKI

皓

穂 坂 正 彦

Masahiko HOSAKA

Department of Urology,

Yokohama City University, Yokohama 236, Japan

精子運動に対する浸透圧の影響について検討した。精子運動率と運動速度は340 mOsm.内で最も高く、この90 %以上を維持する安全域は280 mOsm.より400 mOsm.であった。また高浸透圧暴露により運動を停止した精子を再び等張内に戻すと一部の精子は運動を再開したのに対し、低浸透圧暴露を受けた大部分の精子は運動を再開することがなかった。高浸透圧による精子傷害は低浸透圧と比べ小さく、精子運動性の維持の点からは低張や等張内よりも340 mOsm.前後の高浸透圧培養液の方が優れていると考えられた。

一方、低浸透圧内では高Linearity, 低lateral head amplitude (ALH), 高beat cross frequency (BCF) を示し、精子尾部運動も振幅が低下し振動数が増加した。対照的に高浸透圧内では低Linearity, 高ALH, 低BCFを示し、精子尾部運動は振幅が増大し振動数が低下した。このように運動特性も浸透圧によって強く影響を受けることが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 729 - 733, 1993)

緒 言

逆行性射精患者では、精液が膀胱内に逆流し尿との接触が起こるため、運動率の良い精子を回収することは難しい。以前は尿に含まれる尿素が精子に傷害を与えると考えられていたが、Hardy¹⁾やMakler²⁾らの検討により、尿の浸透圧、pHが重要な因子であることがわかってきた。とくに尿の浸透圧は約50 mOsm./Kgより1200 mOsm.まで変化するため精子に対する影響は大きい。このため逆行性射精患者では膀胱内に等張液を注入する方法³⁾や、尿の浸透圧を等張化させるためあらかじめ飲水させる方法^{4~6)}が行われてきたが、満足な結果は得られていない。

しかし、精子と浸透圧に関する検討は最近では少なく²⁾、運動特性に関する検討は行われていない。

対象と方法

対象：当科不妊外来患者と健康男子のうち、精液所見で、精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、運動率50 %以上の44精液を対象とした。44精液の平均精液量は3.1 ml、精子数 $50.6 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率72.7 %であった。

精子浮遊液の作成：手動的に採取された精液を充分液化させた後、30 %単層percoll液 (浸透圧 305 mOsm.) 3 ml上に、精液 2 mlを重層し、300 g×15分間遠心分離して精子を回収した。得た精子に10 % FCS-F12 (浸透圧 311 mOsm. pH 7.6) を加え 1 mlの精子浮遊液を作成した。

1) 精子運動と浸透圧との関係について

10 % FCS-F12 5 mlに20 %マニトールと蒸留水を計 5 ml加え、160 mOsm.より700 mOsm.までの10段階の培養液を作成した。浸透圧の測定は

OSMOSTAT OM-6020 (京都第一科学) を使った。pH はすべて、7 から7.5の範囲であった。

10段階の浸透圧の異なる培養液それぞれ0.5 ml に、精子浮遊液0.05 mlを加え、37℃恒温槽に1時間放置したのち、37℃下で精液自動解析装置 (Cell soft™ 3000) を使い100精子の運動特性を測定した。さらにNac社製Microscopic High Speed Video MHS-200を使い精子尾部運動を検討した。

2) 浸透圧による運動傷害の可逆性について

高浸透圧培養液 (640 mOsm.) 0.5 mlに精子浮遊液 0.05 mlを加え、30分間高浸透圧環境に暴露した後に 10 % FCS-F12 2.5 mlを加え等浸透圧 (360 mOsm.) とした時の精子運動の変化について検討した。

同じように低浸透圧内 (160 mOsm.) に30分間暴露した後に、10 % FCS-F12を加え、等浸透圧 (290 mOsm.) とした時の精子運動の変化についても検討した。

有意差の検定はpaired tを用いた。

結 果

1) 精子運動と浸透圧との関係について

精子運動率は340 mOsm.の75.0 %が最も高く、280 mOsm.での70.2 %から400 mOsm.での71.9 %までは

340 mOsm.時の運動率の90 %以上を示した。一方 160 mOsm.と640 mOsm.以上では運動率が50 %以下になった (Fig. 1)。平均運動速度も運動率と同じように340 mOsm.が58.6 μ m/sec.で最も高かったが、220 mOsm.での55.5 μ m/sec.より400 mOsm.での57.0 μ m/sec.までは340 mOsm.の90 %以上を示した (Fig. 2)。Linearityは340 mOsm.が6.8で、高浸透圧内では低下し、低浸透圧内では上昇し、3.8から7.2まで変化した (Fig. 3)。beat cross frequency (BCF) は340 mOsm.が17.1 Hzで、Linearityと同様に高浸透圧内では低下し、低浸透圧内では上昇し、13.6 Hzから18.3 Hzまで変化した (Fig. 4)。

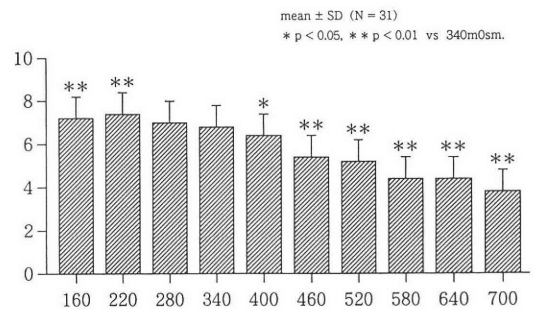


Fig. 3 浸透圧とLinearity

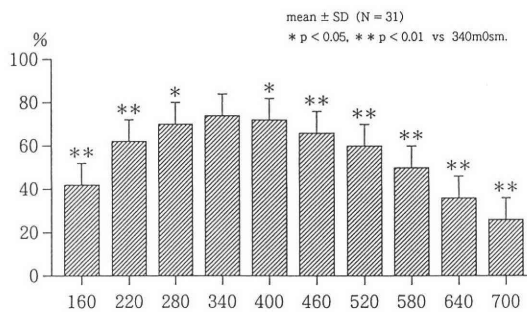


Fig. 1 浸透圧と運動率

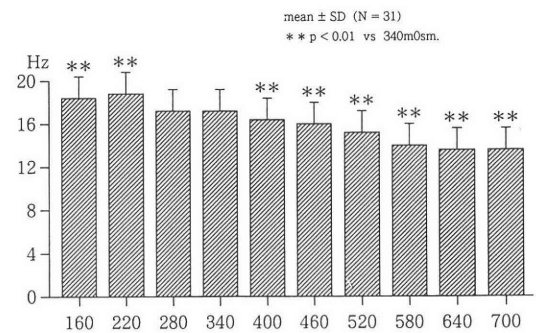


Fig. 4 浸透圧とBCF

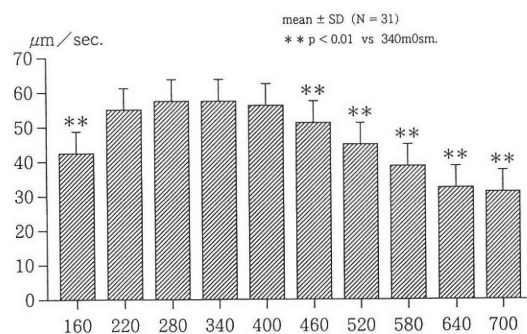


Fig. 2 浸透圧と運動速度

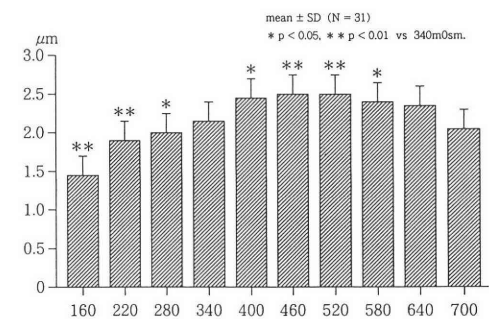


Fig. 5 浸透圧とALH

平均 lateral head amplitude (ALH) は 340 mOsm. が $2.2\text{ }\mu\text{m}$ で, linearity や BCF とは反対に低浸透圧内では低下し, 高浸透圧内では上昇した. しかし 520 mOsm. の $2.5\text{ }\mu\text{m}$ を最大に, 580 mOsm. 以上では低下した (Fig. 5).

高浸透圧 (640 mOsm.) と低浸透圧 (160 mOsm.) 暴

露を受けてから 60 分間までの経時的な精子運動率の変化をみると, ともに運動率は浸透圧暴露直後に低下し 60 分の範囲では変化が見られなかった (Fig. 6).

High Speed Video で記録した高浸透圧内の精子尾部運動は, 高振幅で低振動を示した. 一方低浸透圧内では低振幅で高振動を示し, 一部の精子は尾部の膨化が見られた (Fig. 7).

2) 浸透圧による運動傷害の可逆性について

高浸透圧暴露により運動率 76.8 % から 38.4 % に低下した精子を, 再び等張内に戻したところ 60.6 % まで回復した. これは高浸透圧のため運動停止した精子のうち, 58 % が運動を再開したことになる. また運動速度, linearity, BCF, ALH も高浸透圧暴露前の値に近づいた. 一方低浸透圧暴露により運動率 76.8 % から 42.9 % に低下した精子を等張内に戻しても 46.1 % に回復したにすぎず, 運動停止した精子の 9 % が運動を再開しただけであった. しかし運動速度, linearity, BCF, ALH は低浸透圧暴露前の値に近づいた (Table).

考 察

精子自動分析装置の出現により, 運動率だけではなく運動速度や Linearity などのパラメーターの解析により運動特性も評価できるようになった. 一方精子は浸透圧の影響を受け運動率が変化することが知られている²⁾が, 運動特性についての検討は現在まで行われていない.

今回の検討では, 340 mOsm. 内での運動率や運動速度が最も高く, 280 mOsm. より 400 mOsm. までは運動率や運動速度が 340 mOsm. 時の 90 % 以上を維持した. Makler²⁾ らも 350 mOsm. 培養液内での運動率が最も高く, 高浸透圧内での運動率は低浸透圧内と比

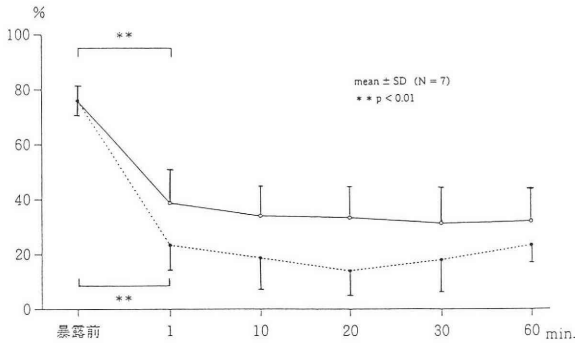
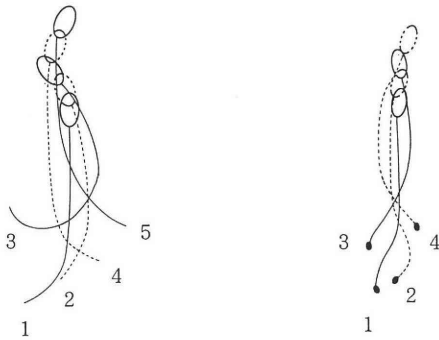


Fig. 6 640 mOsm. (···) と 160 mOsm. (—) 内での経時的な運動率の変化



高浸透圧内 (460 mOsm.) 低浸透圧内 (160 mOsm.)
Fig. 7 high speed video を使い 0.02 秒間隔で撮影した精子尾部運動

Table 30 分間の高 (640 mOsm.) ・ 低 (160 mOsm.) 浸透圧暴露後に等張に復帰させた時の精子運動の変化

	運動率 (%)	運動速度 ($\mu\text{m/s}$)	Linearity	BCF (Hz)	ALH (μm)
暴露前	76.8 $\pm$ 5.3	55.4 $\pm$ 6.8	6.8 $\pm$ 0.5	17.6 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.2
高浸透圧暴露時	38.4 $\pm$ 10.1**	35.1 $\pm$ 9.4**	4.2 $\pm$ 0.9**	13.6 $\pm$ 2.1**	2.4 $\pm$ 0.2**
等張復帰時	60.6 $\pm$ 8.5*	44.3 $\pm$ 11.3*	6.2 $\pm$ 0.8*	17.2 $\pm$ 1.8*	2.3 $\pm$ 0.3
暴露前	76.8 $\pm$ 5.3	55.4 $\pm$ 6.8	6.8 $\pm$ 0.5	17.6 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.2
低浸透圧暴露時	42.9 $\pm$ 9.4*	38.4 $\pm$ 8.4*	7.1 $\pm$ 0.8*	18.7 $\pm$ 2.0*	1.6 $\pm$ 0.3**
等張復帰時	46.1 $\pm$ 8.3	43.1 $\pm$ 9.4	6.3 $\pm$ 1.2*	18.3 $\pm$ 2.1	1.8 $\pm$ 0.2

(mean $\pm$ SD, N=6 *P<0.05, **P<0.01)

べ高いと報告している。さらに低浸透圧内の精子は細胞外液が流入し精子尾部が膨化し細胞膜の破裂などの不可逆的な傷害が起こるため⁷⁾、低浸透圧暴露をにより運動を停止した精子を再び等張内に戻しても大部分の精子は運動を再開することがなかった。しかし高浸透圧による精子運動性の低下には可逆性があり、高浸透圧による精子傷害は低浸透圧と比べ小さいと考えられた。このように精子運動性の維持の点からは低張や等張内よりも340 mOsm.前後の高浸透圧培養液の方が優れていると考えられる。

一方ヒト精液もMakler²⁾らによると平均337 mOsm., Polak⁸⁾らによると平均369 mOsm.と高浸透圧に維持されている。さらにPolak⁸⁾らは360 mOsm.より380 mOsm.の精液内の運動率が高かったと述べている。今回の検討でも、やや高浸透圧内での運動率が高かったことから、精子運動性の維持の点からは精液が高浸透圧であることは合目的であると考えられる。

さらに運動率や運動速度だけではなく、運動性パラメーターも浸透圧によって強く影響を受けた。低浸透圧内の精子頭部運動は高Linearity, 低ALH, 高BCFを示し、ハイスピードビデオにより得られた精子尾部運動も低振幅かつ高振動を示した。高浸透圧内の精子運動は低Linearity, 高ALH, 低BCFで尾部運動も高振幅で低振動を示し、hyperactivation^{9~11)}と類似していた。さらに高浸透圧暴露や低浸透圧暴露を受けた精子を再び等張内に戻したところ、運動性パラメーターも浸透圧暴露前の値に回復したことから、この変化は浸透圧勾配による細胞内外液の移動が関与していると推測された。

つぎに高浸透圧内の精子が正常の授精能を保持しているかに関しては、Brackett¹²⁾は20分間380 mOsm.の高浸透圧暴露をうけたウサギ精子でIVFを行うと高浸透圧暴露を受けなかった精子と比較して授精率が良くなると報告している。Bondioli¹³⁾は10分間380 mOsm.の高浸透圧暴露を受けた牛精子でIVFを行ったところ授精率が良くなったと報告している。Aitken¹⁴⁾は410 mOsm.の高浸透圧培養液内で6時間培養したヒト精子は305 mOsm.培養液内で行った精子と比較して運動率には変化がなく、アクロゾーム反応や透明帯除去ハムスター卵進入試験が促進したことを報告している。またPilikian¹⁵⁾らも420 mOsm.の高浸透圧培養液内で15時間培養したヒト精子は296 mOsm.培養液内の精子と比較して運動率には差がなく直進運動性がやや劣ったが、透明帯除去ハムスター卵進入試験は促進することを報告し

ている。このように高浸透圧は授精能を高めるとの報告があるが、この理由として高浸透圧は精子被覆抗原を除去するためだと推測されている¹²⁾。しかしDumoulin¹⁶⁾らはヒト精子を285 mOsm. 315 mOsm. 345 mOsm.の培養液で2時間前培養しIVFを行ったところ、それぞれの精子運動率には差がなく、345 mOsm.ではむしろ授精率が低下したことを報告している。このように、精子授精能と浸透圧に関しては、明かな結論には至っていないが、少なくとも精液の浸透圧である350 mOsm.程度では授精能への影響は小さいと考えられる。

以上のことから、精子培養液は低浸透圧や等張内よりも340 mOsm.程度の高浸透圧の方が優れていると考えられた。また逆行性射精患者より精子を回収する場合、尿の浸透圧を340 mOsm.から400 mOsm.を目標に調整することにより、運動率の高い精子を回収することが可能になると考えられた。

文 献

- 1) Hardy NR, Biol LI, On the spermicidal properties of urea solutions. *Contraception* 10: 645, 1974
- 2) Makler A, David R, Blumenfeld Z, et al., Factors affecting sperm motility. VII. sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil Steril* 36: 507, 1981
- 3) Hotchkiss RS, Pinto AB, Kleegman S, Artificial insemination with semen recovered from the bladder. *Fertil Steril* 6: 37, 1955
- 4) Mahadevan M, Leeton JF, Trounson AO, Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertil Steril* 36: 243, 1981
- 5) Braude PR, Ross LD, Bolton VN, et al., Retrograde ejaculation: a systematic approach to noninvasive recovery of spermatozoa from post-ejaculatory urine for artificial insemination. *Br J Obstet Gynecol* 94: 76, 1987
- 6) Brassesco M, Viscasillas P, Burrell L, et al., Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. *Fertil Steril* 49: 923, 1988
- 7) Drevius LO, Eriksson H, Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experim Cell Research* 42: 136, 1966
- 8) Polak B, Daunter B, Osmolarity of human seminal plasma. *Andrologia* 16: 224, 1984
- 9) Yanagimachi R, The movement of golden ham-

ster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 23: 193, 1970

- 10) Ginsburg KA, Sacco AG, Moghissi KS, et al., Variation of movement characteristics with washing and capacitation of spermatozoa. 1. Univariate statistical analysis and detection of sperm hyperactivation. *Fertil Steril* 51: 869, 1989
- 11) Mortimer ST, Mortimer D, Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl* 11: 195, 1990
- 12) Brackett BG, Oliphant G, Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 12: 260, 1975
- 13) Bondioli KR, Wright Jr RW, In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. *J Anim Sci* 57: 1001, 1983
- 14) Aitken RJ, Wang YF, Liu J, et al., The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: Development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl* 6: 180, 1983
- 15) Pilikian S, Moncharmont P, Pinatel MC, et al., In vitro behavior of human nonfertile semen in isoosmotic and hyperosmotic media. *Arch Androl* 18: 199, 1987
- 16) Dumoulin JCM, Evers JHL, Offermans JPM, et al., Human in vitro Fertilization using spermatozoa capacitated in hyperosmotic media. *Gynecol Obstet Invest* 30: 165, 1990

Influence of osmolarity on the motility of human spermatozoa

Kazuo Saito, Yuzo Kinoshita
Kazuhiko Sato, Akira Iwasaki
and Masahiko Hosaka

Department of Urology,
Yokohama City University, Yokohama 236, Japan

The influence of osmolarity on the movement characteristics of human spermatozoa was studied with the computerized semen analyser (Cell Soft™ 3000) and high speed video. The motility rate and linear velocity of spermatozoa were the highest at 340 mOsm./Kg. In the range of 280-400 mOsm., these parameters maintained more than 90 % that at 340 mOsm. Some of the immotile spermatozoa caused by hyperosmotic condition regained motility when osmolarity was restored to isotonic condition. Few immotile spermatozoa in hypoosmotic condition, however, regained their motility even when osmolarity was restored to isotonic. It seems that the damage to spermatozoa from hyperosmotic medium is less than hypoosmotic. Thus a slightly hyperosmotic condition (about 340 mOsm.) is better suitable with respect to preservation of motility.

Under hypoosmotic condition (160-220 mOsm.) the movement of sperm head was characterized by high linearity, high Beat cross frequency (BCF), and low lateral head amplitude (ALH). In addition the tail movement was also low amplitude and rapid beats. In contrast, under hyperosmotic condition (400-700 mOsm.), the movement was characterized by low linearity, low BCF and high ALH. The tail movement exhibited high amplitude and low beats. It appears that osmolarity strongly affects not only motility rate but also movement characteristics of motile spermatozoa.

(受付: 1993年3月8日)

(受理: 1993年6月18日)

術後精液所見の改善が見られたFSH産生性下垂体腺腫の1例

A Case of Follicle-Stimulating Hormone-Secreting Pituitary Tumor with Postoperative Elevation of Sperm Count

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

風 間 泰 蔵

Taizo KAZAMA

十 二 町 明

Akira JUNICHO

太 田 昌一郎

Shouichirou OOTA

酒 本 護

Mamoru SAKAMOTO

片 山 喬

Takashi KATAYAMA

岩 崎 雅 志

Masashi IWASAKI

布 施 秀 樹

Hideki FUSE

Department of Urology, Faculty of Medicine,

Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

富山医科薬科大学医学部脳神経外科学教室

遠 藤 俊 郎

Toshirou ENDO

Department of Brain Surgery, Faculty of Medicine,

Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

32歳, 男性. 視野異常を契機としての脳外科的検索の結果, 下垂体腫瘍を発見された. ホルモン学的には, 血中FSHが78.0 mIU/mlと高値を示していたが, その他のホルモンには異常を認めなかった. また, 精液検査において, 精子数 $12 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ と軽度乏精子症を呈していた. 経蝶形骨洞的に摘出された腺腫は, 組織学的に嫌色素性であり, 免疫組織化学的にもFSH産生腺腫と確認された. 術後血中FSH値は低下し, また術後3か月目の精液検査で, 精子数 $92 \times 10^6/\text{ml}$ と著明な改善が認められた. 術前術後を通して, 血中LHは正常値にて変化はなく, また血中テストステロン値もやや低値を持続した. 本症例での, 術後精子数の改善の機序に関しては, いくつかのものが考えられるが, 詳細は不明である.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 734 - 738, 1993)

緒 言

下垂体腺腫は, 造精機能障害を介して男性不妊を引き起こす病態のひとつとされているが, ホルモン非産生性あるいはプロラクチン産生性の腺腫によるものがよく知られているのに対して, FSH産生性腺腫と不妊の関連についての報告は少ない.

今回, われわれはFSH産生性下垂体腺腫の術後に, 精液所見の改善が見られた1例を経験したので, 若干の文献的考察を加えて報告する.

症 例

患者: 32歳, 男性, 会社員.

主訴: 両耳側半盲, 視力低下.

既往歴: 1986年に結婚, 以後4年を経過するも挙児に恵まれず, 1990年3月近くの産婦人科開業医を受診, 精液検査の結果, 乏精子症を指摘され, 以後漢方薬などによる内服治療を受けていた.

家族歴: 特記すべきことなし.

現病歴: 1991年4月頃より視野および視力障害が

出現した。富山医科薬科大学付属病院眼科を受診，視野異常のパターンより下垂体腫瘍を疑われ，同院脳神経外科を紹介された。

現症：身長171.5 cm，体重76 kg，脈拍72/分，整。血圧122/82 mmHg，多毛，顔色の変化，乳汁漏出あるいは性欲の減退などは認めない。両耳側半盲を認めるが，その他神経学的に異常なし。胸腹部理学的に正常。

検査成績：一般血液検査 WBC 7, 260/mm³, RBC 467×10⁴/mm³, Hb. 14.3 g/dl, Ht. 43.8 %, Plt. 25.0 ×10⁴/mm³. 血液生化学検査：T.P. 6.9 g/dl, alb. 4.4 g/dl, A/G 1.76, LDH 177 mIU/ml, GOT 15 KAU, GPT 15 KAU, γ -GTP 19 IU/l, Al-p 6.6 KU, Ch-E 0.97 Δ PH, T-chol. 226 mg/dl, TG 283 mg/dl, Na 142 mEq/l, K 3.9 mEq/l, Cl 106 mEq/l, BUN 19 mg/dl,

Creat. 1.0 mg/dl, FBS 81 mg/dl, CRP 0.6 mg/dlといずれも正常。

内分泌検査成績：TSH 2.0 μ U/ml (0.6-5.1), GH 1 ng/ml (<5), ACTH 20 pg/ml (15-85), LH 3.0 mIU/ml (1.8-5.2), FSH 78.0 mIU/ml (2.9-8.2), PRL 6.2 ng/ml (1.5-9.7), α -MSH 1.0 pg/ml (<10), cortisol 14.3 μ g/dl, LH-RH 負荷試験：LH基礎値は正常であったが，LH-RHに対する反応性の低下が認められた。また，FSHは，基礎値が高値であり，やはり反応性の低下が認められた(図1)。

X線学的所見：頭部X-Pにて，ballooning, double floorなどの所見があり，また頭部CT像にて，トルコ鞍～鞍上部に広がる3×3×2.3cmの充実性腫瘍陰影が認められた(図2)。さらにMRIにおいても同様の腫瘍陰影が認められた。

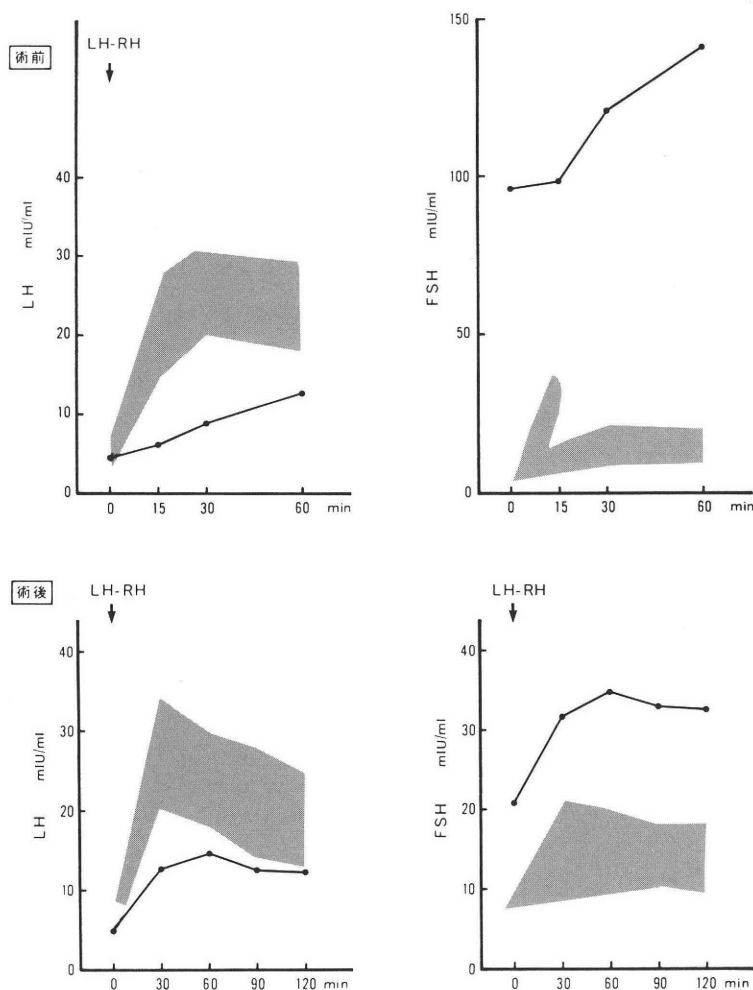


図1 LH-RH負荷試験 (LH-RH 100 μ g 静注)

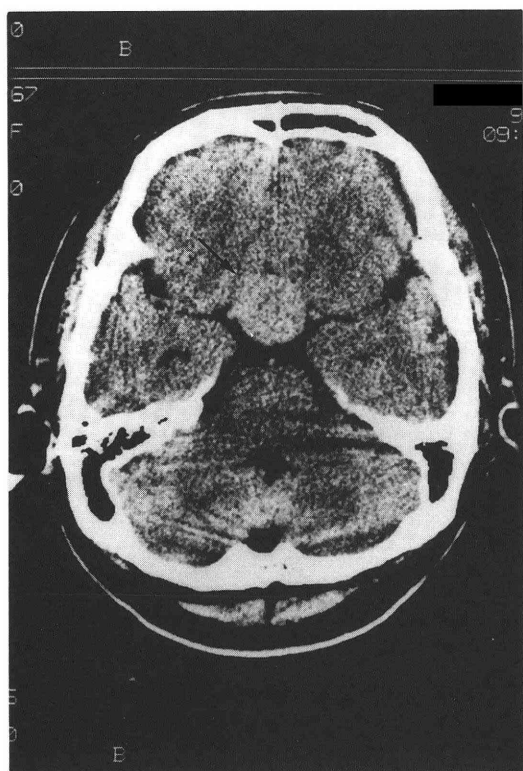


図2 頭部CT像

以上の所見より、本症例はFSH産生性の下垂体腺腫と診断され、1991年7月9日経蝶形骨洞的アプローチにて腺腫摘出術が施行された。病理組織学的には、摘出された腫瘍は、立方形の嫌色素細胞よりな



図3 腫瘍組織抗FSH染色所見 (X100)

り、シート状、trabecularあるいは腺管様構造を示して発育していた。また、同腫瘍は酵素抗体法により、FSHの集族性の染色が認められ、FSH産生腫瘍であることを裏付ける結果であった(図3)。

経過：図4に自験例の入院後経過を示した。脳神経外科より当科へ紹介のあったのは、手術終了後約1か月のことであり、その際の泌尿器科的診察においては、精巣容積両側とも22 mlと正常、また髭剃りの回数あるいは経直腸的前立腺超音波断層法による所見などにおいて性腺不全を示唆するようなものは認められなかった。また、精液検査では、精液量3.5 ml、精子濃度4,500 万/ml、運動率55 %、奇形率47 %の結果であった。本経過表において、血中FSH値は、術後低下しており、それに伴って精液検査における精子濃度の増加が認められた。しかし運動率は、変化を示さず50~60 %で推移した。血中LH値

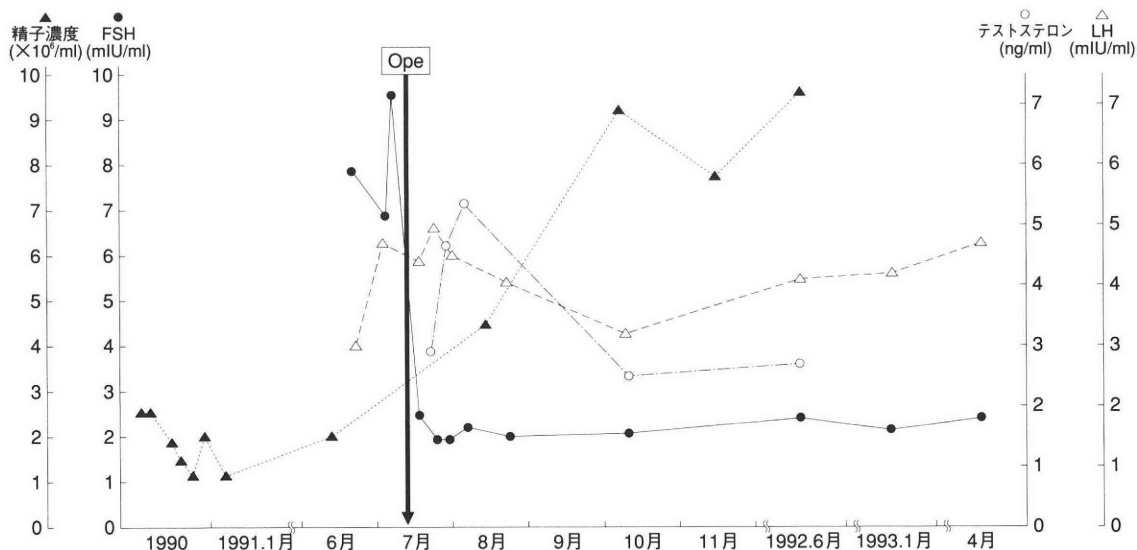


図4 経過表

は術前術後を通して3～5 mIU/mlと正常値で推移し、特に術後の変化は認められなかった。また、血中テストステロン値は残念ながら術前の採血がなされていないが、術直後において2.7 ng/mlと低く、その後当科初診前後にいったん正常域内に入っている。しかし、10月の、精子濃度が9200 万/mlに達した時点ではまた2.5 ng/mlと低値をとっていた。術後4 か月目のLH-RH負荷試験では、若干FSHの高値が見られた。また、LHの反応性は、術前に比し大きな変化は認めなかった(図1)。

考 案

下垂体前葉のゴナドトロピン分泌細胞は、FSH、LHの両方を分泌するとされている。また、この2つのホルモンは、ともにサブユニット α 、 β よりなり、それぞれに特徴的なのは β サブユニットのみで、 α サブユニットは、共通であることなどが知られている。よってこの細胞から腺腫が発生した場合、その分泌するホルモンとしては、LH、FSHはもちろん、 α および β サブユニットも有りうるということになる^{1,2,3}。実際に一番高い頻度で見られるのが、FSHを産生するもの、つづいて α サブユニット、FSHの β サブユニット、LHの β サブユニットの順と報告されている¹。

下垂体のゴナドトロピン産生腺腫は、従来比較的に稀とされている。Snyderは、男性139人に見られた未治療下垂体腺腫を、その産生するホルモンによって分類し、FSH産生腺腫は、ホルモン非分泌性腺腫、プロラクチン産生腺腫に次いで多く、17%を占めていたとしている¹。この臨床的な特徴としては、圧倒的に男性に多いこと、また、ホルモン過剰による症状がほとんど無いため、腫瘍の増大による視交叉の圧迫による視野異常、視力障害などが出現するまで発見されにくいなど、ほぼ自験例にあてはまる。さらに、腺腫の圧迫により、正常のゴナドトロピン分泌細胞のLH分泌も障害され、それによる2次性の性腺機能低下も起こりうるとされている。血中テストステロンの低下に関して、自験例と同じ経蝶形骨洞の手術により、術後の回復が見られた症例も報告されている⁴。

精子形成にFSHおよびテストステロンが不可欠であるという事実から考えれば、自験例で見られた術後の精液所見の改善も、このテストステロンの回復に伴うものと考えられることができるなら合理的である。しかし自験例では、術前術後の血中LH値には変化がなく、いずれも正常であったこと、術前のテ

ストロン採血が残念ながらなされていなかったが、手術2週後のテストステロンが2.5 ng/mlと正常値より低く、その後も一過性の上昇を見ただけで、精液所見の改善が見られた時点においても有意な上昇が見られていないなどこの考え方ではうまく説明がつかないものと考えた。もちろん、術後のテストステロンの一過性の上昇が、障害されていたLH分泌の回復に伴うものであり、血中LHおよびテストステロン値の日内リズムに、術後改善が起きていたというような可能性はあるであろう。その意味でHCGテストの施行も考えるべきであったかと反省している。

このほかに考えられることとして、まず、FSHとして測定されたものが、生理的に非活性なものであり、実際には精巣の精子形成に対する刺激とはなっていなかった可能性が挙げられる。正常の下垂体では、グリコシレーションの程度によって様々な種類のFSHが分泌されるとされており、このグリコシレーションが、生理活性に不可欠とされている⁵。このグリコシル基を化学的に除去すると、リセプターに対する結合能は保たれるものの、それ以下の反応を惹起する能力が消失することが判明しており、自験例の腺腫で分泌されていたのはこのようなものであった可能性がある。また、FSH高値が持続したため、Sertoli細胞におけるFSHレセプターがdownregulationにより減少し、結果、造精機能の障害を来した可能性なども考えられる。残念ながら自験例では、これ以上の検索が行なえず詳細を明らかにすることはできなかったが、今後同様の症例を経験した際にはぜひ検討してみたいと考えている。

性腺不全が長期にわたって持続し、これが視床下部に対する刺激となって、下垂体のFSH産生腫瘍が発生したと思われる症例の報告もある⁶。一般に男子不妊症外来において、造精機能の低下からのフィードバックにより、血中FSHの上昇を来している例はそれほど稀ではなく、興味の持たれる点であるが、術後の経過からみて、自験例でこのような可能性はないものとする。しかし、外来診断において、単にホルモン学的な値だけを見ると、これらの症例と、自験例の鑑別は難しいので、注意が必要である。

本論文の要旨は、第11回日本アンドロロジー学会にて発表した。

文 献

- 1) Snyder PJ, Pituitary Tumors: Diagnosis

and Treatment-Gonadotroph Cell Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin* 16: 755, 1987

- 2) Borges JLC, Ridgway EC, Kovacs K, et al., Follicle-Stimulating Hormone-Secreting Pituitary Tumor with Concomitant Elevation of Serum α -Subunit Levels. *J Endocrinol Metab* 58: 937, 1984
- 3) Demura R, Jibiki K, Kubo O, et al., The Significance of α -Subunit as a Tumor Marker for Gonadotropin-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 564, 1986
- 4) Harris RI, Schatz NJ, Genarelli T, et al., Follicle-Stimulating Hormone-Secreting Pituitary Adenomas: Correlation of Reduction of Adenoma Size with Reduction of Hormonal Hypersecretion after Transsphenoidal Surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 1288, 1983
- 5) Galway AB, Hsueh AJW, Daneshdoost L, et al., Gonadotroph Adenomas in Men Produce Biologically Active Follicle-Stimulating Hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 907, 1990
- 6) Woolf PD and Schenk EA, An FSH-Producing Pituitary Tumor in a Patient with Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 561, 1974

**A case of follicle-stimulating hormone-secreting
pituitary tumor
with postoperative elevation of sperm count**

Taizo Kazama, Shouichirou Oota
Masashi Iwasaki, Akira Junichou
Mamoru Sakamoto, Hideki Fuse
and Takashi Katayama

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

Toshirou Endo

Department of Brain Surgery, Faculty of Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University,
Toyama 930-01, Japan

A follicle-stimulating hormone-secreting pituitary tumor was demonstrated in a 32 year-old man who presented with bilateral hemianopsia. He had no endocrine symptoms. Plasma level of FSH was elevated, and concentrations of other pituitary hormones were all normal. Semen analysis revealed mild oligozoospermia ($12 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$). Transsphenoidal tumor resection was performed. The tumor was a chromophobe adenoma, and immunohistochemical examination showed that the tumor was FSH-secreting. Postoperative semen analysis showed marked improvement of sperm concentration with reduction in serum FSH levels.

(受付: 1993年2月15日)

(受理: 1993年6月18日)

RELATIONSHIP BETWEEN GENITAL TRACT UREAPLASMA INFECTION AND UNEXPLAINED INFERTILITY

Yoshiaki SATO

Takao MIYAKE

Shogo OOSAWA

Department of Obstetrics & Gynecology,
JA Sagamihara Kyodo Hospital, Kanagawa 229, Japan

Abstract: Thirty couples in which the male partner had ureaplasma urealyticum infection of the seminal fluid were treated for 2 - 4 weeks with ofloxacin (Tarivid®, 100 mg three times a day). Successful treatment of ureaplasma infection resulted in considerable improvement of sperm motility and decrease of white blood cells in the seminal fluid. After treatment, the conception rate for these 30 couples with unexplained infertility was 66 % within 1 year. Although the role of ureaplasma urealyticum in human infertility still remains unclear, we believe that ureaplasma infection may be an important cause of unexplained infertility. In addition, treatment with ofloxacin improves the conception rate in infertile patients with ureaplasma infections.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 739 - 742, 1993)

Introduction

Symptomatic infection of the male genital tract has long been regarded as a cause of infertility. In particular, the significance of genital ureaplasma infection in infertile couples has been investigated during the last few years. However, the relationship of such infection to unexplained infertility remains a highly controversial subject. This study was done to clarify the role of asymptomatic ureaplasma infection in the semen of couples with unexplained infertility.

Materials and Methods

Patients: Semen was collected from 137 infertile men, who first urinated and then carefully washed their hands and the glans penis with sterile physiological saline. In addition, great care was taken to prevent contamination of the sperm vials used and semen was collected by masturbation following 4 days of sexual abstinence. Within 2 hours of collection, the specimens were routinely examined for sperm motility, ejaculate volume, the number of spermatozoa per milliliter, white blood cells, and agglutination using a

Makler counting chamber¹⁾. Agglutination is characterized by a tendency of spermatozoa to stick together head to head, tail to tail and the presence of clumped aggregates of live spermatozoa stuck to debris, leucocytes, fibers and other inclusion of the seminal fluid. Sperm motility grade was classified by Kopf's method²⁾. Part of each semen specimen was placed in a culture flask for the isolation of microorganisms. For the identification of ureaplasma urealyticum (U. urealyticum), a Mycotrim- GU kit³⁾ was used. In the wives of these men, endocervical mucus was obtained under sterile conditions by gentle removal with sterile swabs.

Culture of U. urealyticum: Each flask contained agar and broth to support the growth of the organism. When the flask was inoculated and incubated with the agar side up, the agar and broth were separated by a pocket of humid air, creating the optimal conditions for the growth of U. urealyticum. Antimicrobial discs were added before incubation to prevent the growth of other microorganisms. After 24 hr cultivation, cultures positive for U. urealyticum show an increase in pH and a color change in the medium. Flasks showing

no colour change after 24 hr were reinoculated with enrichment broth in order to check for low titers of the organisms and incubation was continued for 6 days. Finally, microscopic examination of the colonies on the agar surface was done.

Detection of chlamydia and Neisseria gonorrhea: The direct immunofluorescence test⁴⁾ (MicroTrak®) was used for the detection of chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhea in semen. Infertility was defined as unexplained when no apparent cause was recognized as follows. All female patients were programmed for hormone determinations, endometrial biopsy, postcoital test, serum sperm antibodies, hysterosalpingography (HSG), and laparoscopy. On the other hand, male sperm was regarded as normal if the following criteria were satisfied: volume > 1 ml, sperm density 20 million/ml, 50 % of sperm with good forward motility, 50 % normal forms of sperm.

Statistical significance were calculated using Student's t-test.

Results

Results of microbial screening

Semen samples from 137 men attending our infertility clinic were studied to determine the bacteria present in addition to U. urealyticum. The most common species were. α streptococcus, Gram-positive bacilli, and Staphylococcus epidermides.

A total of 90 % of the samples contained some bacterial species (Table 1).

U. urealyticum infection in semen

U. urealyticum was found in 74 (54 %) of the positive cultures of seminal fluid from the 137 infertile men. In the fertile control group, only 5 % (2/40) had positive cultures. There was a significantly increased

prevalence of U. urealyticum in patients with infertility.

U. urealyticum infection in couples with unexplained infertility

Thirty patients were selected who were positive for U. urealyticum in semen cultures and were diagnosed as having so-called unexplained infertility. Among these 30 couples, cervical infections were more frequent than normal in the partners and 80 % of the wives were positive when the husbands were positive. The sexual transmission of this infection is demonstrated by the significantly higher rate among partners. Among the semen specimens which showed U. urealyticum, 3 chlamydial infections and 5 Group β -staphylococcus (GBS) infections were also found simultaneously. However, N. gonorrhea was not detected in any of the patients in this group. After treatment with OFLX for 14-28 days for these unexplained

Table 1 Microbial Prevalence in Semens

S. epidermidis	30	cases
α -streptococcus	36	〃
β -streptococcus	11	〃
γ -streptococcus	19	〃
G (+) bacillus	35	〃
Staphylococcus	23	〃
Neisseria	3	〃
S. aureus	3	〃
G (-) bacillus	1	〃
H. parainfluenzae	1	〃
H. parahemolytics	1	〃
Enterococcus	2	〃
A. maltophilia	1	〃
yeast-like organism	1	〃

Table 2 Incidence of Microorganisms in Semen and Cervix Samples before and after OFLX Therapy

Pathogens	Semen		Cervix		Simultaneous infection	
	before Tx.	after Tx.	before Tx.	after Tx.	before Tx.	after Tx.
Ureaplasma	30	4	24	4	24	2
Chlamydia	3	0	2	1	1	0
Gonococcus	0	-	0	-	0	-
GBS	5	0	10	3	5	0

Tx. therapy for ureaplasma with OFLX

Table 3 Effects on Semen Analysis

before	therapy	after therapy
volume	4.8±1.2 ml	3.5±2.1 ml
PH	7.5±0.6	7.9±2.6
count	47×10 ⁶ (average)	39×10 ⁶ (average)
motility	63±1.5 %	78±4.2 %
agglutination ¹⁾	66.9 % (20 cases)	13.3 % (4 cases)
WBC ²⁾	33.3 % (10 cases)	10.0 % (3 cases)
grade ³⁾	42±3.8 %	72±6.6 %

1), 2). 10≤/ml 3) G III+G IV ※significant (P<0.01)

Table 4 Pregnant Cases during 1 year Follow-up

Spontaneous pregnancy	10	(50.0 %)
AIH	4	(20.0 %)
Ovarian stimulation	3	(15.0 %)
IVF-ET	2	(10.0 %)
Other	1	(5.0 %)
Over-all pregnancy rate	20/30	66.6 %

infertile couples, the number of *U. urealyticum* organisms isolated was reduced from 30 to 6 %. A similar reduction was seen in the wives with cervical infection (Table 2).

Effect on semen parameters

The relationship between treatment of *U. urealyticum* infection and the improvement of semen quality is shown in Table 3. Statistical analysis revealed that OFLX treatment influenced semen quality by causing a significant increase in motility and a decrease in the presence of white blood cells and of agglutination. No significant changes of semen volume, pH and sperm count were found (Table 3).

Pregnancies during 1 year of follow-up

Twenty of the 30 wives conceived during treatment or within 1 year after treatment either with or without some medical assistance. The overall rate of successful pregnancy was 66.6 % (Table 4).

Discussion

Infection of the male genital tract has frequently been suggested as a cause of infertility, but the relationship of mycoplasma infection to male infertility still needs further clarification. The lack of a simple method has discouraged most laboratories from cultur-

ing for mycoplasma in the past. Mycotrim-GU broth³⁾, which we used in this study, proved to be more sensitive than the conventional urea broth and can be recommended as an effective and convenient culture system for genital mycoplasma.

Ureaplasma and other organisms were frequently isolated together from the same specimen and these agents may be considered pathogenic even in the absence of signs or symptoms of genital tract infection⁵⁾. In our study, most of the specimens were not completely sterile and 70 % of the samples contained two or more different bacterial species. These findings suggest that the genital flora of the male is just as varied and complex as that of the female. Ulstein⁶⁾ has suggested that the recovery of Gram-positive organisms from the semen at concentrations below 10⁴ colonies/ml is of no clinical significance. Mycoplasma are a unique group of microorganisms that appear to be intermediate between bacteria and viruses.

The relationship of ureaplasma infection in semen to infertility remains controversial. Taylor-Robinson et al.⁷⁾ suggested that ureaplasma may cause infertility in men because they recovered them from 47 % of infertile men and from 57 % of those with low fertility. The recent isolation of ureaplasma from testicular biopsy specimens of infertile men suggests that these organisms may sometimes interfere with spermatogenesis⁸⁾. However, de-Louvois et al.⁹⁾ found no significant difference in the isolation of ureaplasma from fertile (52.6 %) and infertile (57.2 %) couples.

The findings of our study support those of Taylor-Robinson and other authors, since semen with ureaplasma infection had poor motility, fewer sperma-

tozoa, and more aberrant spermatozoa than did semen without ureaplasma infection¹⁰⁾. Furthermore, successful treatment of ureaplasma infection was associated with a considerable improvement of spermatozoal motility and a decrease in certain abnormalities of seminal cytology.

In sexually active women, colonization with genital mycoplasmas increases in proportion to the number of sexual partners. Thus, it may be possible that the penetration of mycoplasma into the upper female genital tract is dependent on or enhanced by their presence in the semen and perhaps by adherence to spermatozoa. It should be clear by now that when treating gynecologic infections, treatment of the partner must also be taken in consideration. In summary, the present study indicates that ureaplasma infection of the genital tract is frequent in infertile couples and that treatment improves the semen quality and pregnancy rate. Routine culture of *U. urealyticum* may be useful in the management of unexplained infertility.

References

- 1) Makler A, A new multiple exposure photography technique for objective human sperm motility determination. *Fertil Steril* 30: 192, 1978
- 2) Kopf GS, Preparation and analysis of semen samples. In: Behrman SJ, Kistner RW, and Paton GW, eds, p 89, Little-Brown and Company, 1988
- 3) Wood JC, Lu RM, Peterson EM, et al., Evaluation of Mycotrim-GU for Isolation of Mycoplasma Species and Ureaplasma urealyticum. *J Clin Microbiol*, 22: 789, 1985
- 4) Tam MR, Stamm WE, Handsfield HH, et al., Culture-independent diagnosis of Chlamydia trachomatis using monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 310: 1146, 1984
- 5) Fowler VS, MacLeod J and O'Leary WN, T-Mycoplasmas and human infertility: Correlation of infection with alterations in seminal parameters. *Fertil Steril* 26: 1212, 1975
- 6) Ulstein M, Capell P, Holmes KK, et al., Nonsymptomatic genital tract infection and male infertility. In: Hafez FSE ed, Human semen and fertility regulation in men. p355, Mosby, 1976
- 7) Taylor-Robinson D and McComach WR, The genital mycoplasmas. *N Engl J Med* 302: 1003, 1980
- 8) Engel VS and Baumann B, Das Vorkommen von Mykoplasmen in Hodengewebe. *Dermatol Monatsschr* 165: 593, 1979
- 9) de-Louvois J, Blades M, Harrison RF, Frequency of mycoplasma in fertile and infertile couples. *Lancet* 1: 1073, 1974
- 10) O'Leary WN and Frick J, The correlation of human male infertility with the presence of mycoplasma F strains. *Andrologia* 7: 309, 1975

機能性不妊における ウレアプラスマ性器感染の意義

JA相模原協同病院産婦人科

佐藤芳昭 三宅崇雄 大沢章吾

30組の夫がウレアプラスマ精液感染を有する機能性不妊症のカップルをofloxacin 300 mg/日にて2～4週の治療を行った。

治療の前後において精液中の精子運動能は明らかに上昇し、白血球数は有意の低下をみた。治療後に、この30組のうち20組(66%)が一年以内に妊娠の成立をみた。

不妊症におけるウレアプラスマ性器感染症の真の意義は不明であると言って良いが、この結果よりみると、ウレアプラスマ感染と機能性不妊症との間には密接な関係があると考えられ、又感染発見時には、ofloxacinによって治療することは、その妊娠率を高めることは明らかであった。以上より機能性不妊患者のルーテン検査としてウレアプラスマを検出を行って、陽性時には治療を行うことにより、精液性状の改善と、妊娠率の向上に寄与するものと考えられる。

(受付: 1993年3月22日)

(受理: 1993年6月18日)

ヒト生殖機能に及ぼす喫煙の影響： 女性および男性における妊孕性の変化

Impact of Cigarette Smoking on Human Reproduction: Its Effects on Female and Male Fecundity

Department of Animal Sciences, University of Kentucky and Andrology Institute of Lexington,
Central Baptist Hospital
パナヨティス・ザボス
Panayiotis M. ZAVOS
Department of Animal Science,
University of Kentucky and Andrology Institute of Lexington,
Central Baptist Hospital, Lexington, Kentucky 40546-0215, USA

鳥取大学医学部産科婦人科学教室
戸田 稔子
Toshiko TODA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

鳥取大学医学部泌尿器科学教室
ニコラオス・ソフィキティス 宮川 征男
Nikolaos SOFIKITIS Ikuo MIYAGAWA
Department of Urology,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

喫煙は健康上・社会上の重大な問題となっているが、生殖医学の領域においても、喫煙と生殖機能の関係についてさまざまな研究がなされている。今日、喫煙は喫煙習慣を有する人にとっても医師にとっても深刻な問題である。医師は喫煙の有害作用を認識し、これを患者に啓蒙する重要な立場にある。本稿では、女性と男性の妊孕性に与える喫煙の影響を文献的に概説し、生物学的妥当性、生殖過程における喫煙の作用発現の機序を考察した。女性・男性の生殖に関わる広範な過程で喫煙が影響を与えている可能性が示され、不妊症患者だけでなく、挙児希望のある人の喫煙が好ましくないこと、喫煙習慣のある人は禁煙すべきであることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 38 (4), 743 - 749, 1993)

緒 言

合衆国では、生殖年齢の人口の30～35%が喫煙を介してnicotineを摂取している。いうまでもなく、非喫煙者もタバコの煙を受動的に吸入することで影響

を受ける¹⁾。今や喫煙は死亡原因や予防医学に最も重要な因子とみなされ、肺癌や肺気腫、虚血性心疾患との関連が知られている。最近の研究では喫煙と悪性腫瘍の関連は肺癌だけでなく、膀胱、子宮、食道、膵臓の癌においてもみだされている。1987年

には合衆国女性の悪性腫瘍による死亡原因の第一位は、乳癌から肺癌に移行した。喫煙者の大多数は単なるタバコの常用者というより耽溺性を有する。最近のLancetの論文では、現在の喫煙率が持続すれば、最終的に先進国に住む5人にひとりには喫煙に関係する疾患で死亡するだろうと予測している。喫煙による死亡者は2000年までに合衆国の人口に匹敵する2億5千万人にのぼると推定される²⁾。

タバコの煙には、数多くの物質が含まれている。nicotine, carbon monoxideの他、放射性polonium, benzo(a)pyrene, dimethylbenz(a)anthracene, dimethylnitrosamine, naphthalene, methylnaphthalene等の発癌物質や変異原性物質が報告されている³⁾が、成分の多くはその毒性について十分検討されていない。能動的・受動的にかかわらず、タバコの煙を吸入すると肺の脈管を介してこれらの物質が吸収される。

今日、喫煙が健康上・社会上の重大な問題となっていることは疑いがなく、本稿では最近注目を浴びている喫煙と生殖医学との関連、特に女性・男性の生殖機能に与える影響について文献的に考察した。

I. 女性の生殖機能における喫煙の影響

妊娠中の喫煙が母体と胎児に悪影響を与えることは周知の事実であるが、喫煙と女性の妊孕性に関しても多くの研究がある。疫学的研究・動物実験共に、タバコの煙とその成分が生殖機能に悪影響を与えるという仮説を強く支持している。疫学的研究では方法論、つまり研究対象や対照の設定が重要である。これらが適切とすると、文献の上では喫煙する女性の妊孕性が低下することが明瞭に示されている。この影響は特に、月経周期、卵管機能と胚移送、卵子の発育、閉経年齢、骨代謝などにおいて報告されている。妊娠成立の機序は精巧かつ複雑で、女性の生殖器官がすべて正常に機能する場合に、排卵、卵管における受精、受精卵の移送、子宮内の着床の一連の経過が可能となる。喫煙はこのすべての過程に影響を与える可能性を有する。生殖や受精過程のさまざまな段階で喫煙がどのように影響を与えるか完全には解明されていないが、近年この方面への関心が高まり、多くことがわかってきた。

1) 妊孕能力に与える影響

ある疫学的研究によると、不妊症の発症率は喫煙の習慣のある女性(21%)では非喫煙女性(14%)に比較して有意に高いとされている⁴⁾。また、常用す

るタバコの本数により示される喫煙量が増加するにつれて妊孕性の低下がみられ、特に一日量16本以上になると両者に高い相関が認められている⁵⁾。妊孕性と喫煙の関係を検討した研究は、概してほとんどの研究が喫煙する女性において妊娠率や妊孕性が低下することを示している。しかし喫煙するという事実は必ずしも因果関係を意味するものではない。因果関係を論ずる際は、喫煙の程度、量依存性の有無、特異性、一貫性、生物学的妥当性が問題となる。これらの論文の中には上記の点で不備なものもあり、慎重に検討するべきである。

2) 卵管機能に与える影響

喫煙と卵管機能および卵管性不妊との関係は、ヒトと実験動物の両方で研究されている。疫学的研究のなかには、喫煙と卵管性不妊症の関係を証明しているものもある。この原因には、喫煙者では性的パートナーの数が多く、骨盤内炎症性疾患のリスクが増加する⁶⁾という生活習慣の違いと、喫煙の直接作用で骨盤内炎症性疾患が発症しやすいという可能性が考えられるが結論はでない。喫煙開始後、血中・尿中でepinephrineとvasopressinの増加が認められ、喫煙とnicotineの作用はepinephrineまたはvasopressinの放出を媒介にしていると思われる^{7,8)}。これらの内分泌学的変化により子宮卵管機能が変化し、配偶子の移送と妊孕性に悪影響を及ぼす可能性がある⁹⁾。受精後の卵管内の胚移送が遅延すると、胚の正常発育が障害されたり残存した胚から異所性妊娠発生の頻度が増加するであろうし、逆に胚の子宮内への移送が促進されても着床を阻害することが推測される。

子宮外妊娠の成因は不明であるが、なんらかの卵管機能異常が存在すると考えられる。喫煙と子宮外妊娠の関係の証明として、卵管妊娠症例を出産症例および非妊娠症例と比較した研究がある。この研究によると、対照群に比較し卵管妊娠群では有意に喫煙者が多かった¹⁰⁾。また喫煙は体液性および細胞性免疫を抑制することが示されている¹¹⁾。この結果、炎症に対する卵管上皮の反応性が変化し、卵管炎とその後の不妊症が増加することが考えられる。このように卵管の生理学的特徴の変化から胚の子宮内への移送機能に変化をきたすこと、卵管の免疫機能が障害されることが示されており、疫学的にみられる喫煙と卵管性不妊症の関係の根拠になると考えられる。

3) 卵子と着床前の胚に与える影響

動物実験では、喫煙により卵細胞が破壊される可

能性が示されている^{12,13)}。この影響は原始卵胞のみならず、发育卵胞や卵子の減数分裂においても起こりうるという。これらの実験では卵巣組織切片において量依存性に卵子/卵胞の破壊および減数分裂の異常が認められた。卵細胞とその受精過程も影響を受ける。nicotineは表層顆粒の形成を阻害し、多精子受精の防御機構を抑制する¹⁴⁾。多精子受精では正常の胚发育が障害され、妊孕性が低下すると考えられる。ヒトにおいては卵子に対する喫煙の作用はそれほど明確ではないが、喫煙する女性では閉経年齢が低い¹⁵⁾という報告は多い。動物実験結果および喫煙女性の閉経年齢の低下を考慮すると、喫煙により卵細胞の質的および量的消耗が誘起されるという仮説が成り立つ。喫煙の結果、卵子の減数分裂、卵胞发育、卵子の正常性に悪影響を与え、最終的に生殖機能の停止を意味する閉経が早まると考えられる。

4) 性周期・内分泌機能に与える影響

喫煙者では非喫煙者に比較して、続発性無月経、月経不順、性器出血の頻度が高いことが報告されている。30歳以上の女性における大規模な調査によると、40~50代の喫煙者、特にヘビースモーカーでは非喫煙者より月経不順の頻度が高かった。30代では喫煙者は非喫煙者より子宮摘出術をうけた者が多く、妊娠経験は喫煙者のほうがより少なかった¹⁶⁾。MacMahonら¹⁷⁾は、喫煙継続者と過去に喫煙経験のある女性の排卵周期における尿中estrogenを調査し、黄体期の尿中estriol, estradiol, estroneが有意に低いことを報告している。喫煙者では卵胞期のestrogenも低下していたが有意差はなかった。これは喫煙者にestrogen依存性と考えられる病態、すなわち子宮内膜癌や子宮内膜症が少なく、骨粗鬆症が多い¹⁸⁾という現象を支持している。

nicotineに暴露されるとラットの排卵率が低下する¹⁹⁾との報告があるほか、最近では体外受精においても、喫煙者と非喫煙者でestrogen値、採卵数、受精率、妊娠率を比較した研究がみられる。喫煙患者群ではestrogen値・採卵数が低く、最終的な妊娠率も喫煙患者群33%、非喫煙患者群57%と差があった²⁰⁾。著者はnicotineを生殖機能に対する毒物のひとつとみなし、estrogen値、採卵数の低下が誘起されたと述べている。

動物実験では雌ラットの視床下部・下垂体機能の検討で、nicotineまたはタバコの煙により、量依存性にgonadotropinの放出と周期性のコントロール機構が変化することが示されている²¹⁾。これらの影響はタバコの煙の成分中でも、主にnicotineによる作用と考

えられている。nicotineは直接作用またはvasopressinの増加を介してLH分泌を低下させることが示唆されている。またnicotineは発情期前の雌ラットで、量依存性にLH surgeの遅延、鈍化、完全消失などのLH分泌異常を誘起する^{19,22)}。これほど著明ではないが、同様の傾向はprolactin分泌能においても認められている。Gn-RHに対する下垂体の反応性は正常であることから、nicotineの作用部位は下垂体レベルではないと考えられる。

以上の動物実験と臨床研究の成績より、nicotineまたはタバコの煙は女性の中枢性の内分泌のホメオスターシスに作用し、排卵周期や妊孕性に悪影響を与えることが示された。

5) 骨粗鬆症に与える影響

閉経後の喫煙女性は骨粗鬆症のリスクが高いことが知られている。これまでに述べたとうり喫煙はestrogen低下等の内分泌学的変化を誘起し、二次的な代謝の変化から骨粗鬆症のリスクが高くなるのであろう²³⁾。近年、喫煙による副腎由来のホルモンの変化が検討され、副腎内で一部の酵素が阻害されることが報告された。この結果は、nicotineが副腎皮質ホルモン分泌を刺激してcortisolを増加させる^{8,24)}との報告と関連する可能性がある。cortisolの増加は骨粗鬆症や骨塩減少と関連がある²⁵⁾。

このように喫煙と女性の生殖能力、妊孕性の低下には強い関連があることが示された。しかし疫学的調査によると、喫煙の既往のみではこの影響はかなり減少する。このことより禁煙はリスクを減少させ、正常妊娠の成立に寄与すると思われる。挙児希望を有する女性、特に不妊症の患者では禁煙することが賢明であろう。

II. 男性の生殖機能における喫煙の影響

喫煙が男性の生殖機能、特に性的活動性や精液所見に有害作用を与えるか否かは非常に興味深い問題であるが、明確な結論は出ていなかった。しかし不妊症の研究や治療への関心が深まり、男性生殖機能を考える上で喫煙の有害作用は非常に重要なポイントとなってきた。生殖機能に有害作用を有するものとしては、その他に環境的・職業的因子があるが、これらも増加傾向にある。化学物質類は精巣機能に作用して、生殖機能を障害すると考えられている。これには精子形成をコントロールする内分泌機能への作用と精細管上皮の精祖細胞・Sertoli細胞への直接作用がある。喫煙者ではインポテンスが増加したり、精液所見では精子形態異常率が高く、運動率や

精子濃度は低下するという報告がみられる。これらの変化は男性不妊症と直接関係するほか、受精後も正常な胚発生が起らないような異常精子が産生される可能性がある。特に形態異常の精子では、spermatogenesisや精子DNAの異常を考慮する必要がある。これまで流産等の問題は伝統的に女性側の問題と考えられてきたし、喫煙の影響というような生殖に関する研究も女性を主体に行われてきた。生殖現象における父方由来の異常も次第に解明されてきており、男性における研究は今後ますます重要性を持つであろう。

1) 精液所見に与える影響

喫煙男性と非喫煙男性を比較すると、平均精子濃度が喫煙男性で低下するとの報告は数多くみられる。その減少率は平均約22%で、最大では57%というものもある。精子運動率の比較でも喫煙男性に運動率の低下を認めており、平均で20%の運動率低下が報告されている。精子濃度、運動率の喫煙の量に比例して低下するとしているものが多い²⁶⁻³³⁾。その他、形態正常精子の割合を検討したものでは喫煙男性で形態正常精子率の低下を認め、低下率は平均17%であった^{26,27,30)}。精子形態と喫煙強度の検討では、喫煙量に依存して精子形態異常の増加を認めたものと、認めなかったものがそれぞれ同数であった。最近の研究では、喫煙男性で精子軸糸の中心子の数と配列に明らかな変化を認めたものがある³⁴⁾。この研究では喫煙は精子の鞭毛の微細構造に作用した結果、精子運動率や直進運動能に影響を与えたと述べている。また精索静脈瘤を有する男性では、喫煙により副腎髄質からのcatecholamineの放出が増加し、腎静脈を介して精索静脈にcatecholamine逆流が起こり、精細管の障害が起こるという仮説もある³⁵⁾。精索静脈瘤を有する喫煙男性では、精索静脈瘤を有する非喫煙男性の10倍、精索静脈瘤のない喫煙男性の5倍の高頻度で乏精子症がみられる。

以上のように喫煙により、精子濃度、精子運動率、形態正常精子率が低下する傾向が示されているが、研究によって結論にばらつきがあることもたしかである。これらの中には対象数が少ない研究もあり、今後も症例数を重ねて検討する必要がある。

2) DNAの安定性に与える影響

精巣における精子形成のように、急速な分化・増殖を示す組織では、タバコの煙に含まれるような発癌物質や突然変異誘発物質に対して感受性が高いといわれている³⁶⁾。喫煙者では非喫煙者と比較して、末梢血中のリンパ球の姉妹染色分体交換の頻度が高

い³⁷⁾。また末梢血中のリンパ球の染色体異常率と精子形態異常率に相関をみだしている報告もある³⁸⁾。タバコの煙には直接作用または代謝物によりDNAの突然変異をおこす成分を含むことが示されているが、実験動物におけるnicotine、タバコの煙、またはpolycyclic aromatic hydrocarbonへの暴露実験では、精巣萎縮¹²⁾、精子形成阻害³⁹⁾、精子の形態変化⁴⁰⁾が認められている。

3) 内分泌機能に与える影響

喫煙、特にnicotineが視床下部/下垂体/精巣系に急性および慢性的に作用することを証明した実験は多く、testosterone, LH, ACTH, GH, TSH, prolactinの値が変化することが報告されている^{24,32,41-43)}。testosteroneやゴナドトロピンの変化には、さまざまな報告がみられる。喫煙者や動物実験で血中・精巣静脈中のtestosterone値が低下する^{32,44-46)}ことが示されているが、中枢性の内分泌変化やLeydig cell機能障害によるものか、testosterone代謝の変化によるものかは明らかにされていない。

これらの結果は、疫学的研究でみられた喫煙男性における精液所見の変化を裏づけており、タバコの煙が精子形成に対する直接的または間接的な毒性を有するという仮説を裏付けている。

4) 喫煙とインポテンス

近年の研究では、喫煙、糖尿病、高コレステロール血症などの動脈硬化のリスクファクターが、同時にインポテンスのリスクファクターとなることが報告されている⁴⁷⁾。われわれの調査でも、喫煙する男性にインポテンス傾向が増加、または性交回数が増加することが示された(Zavos, 未発表)。夫と妻の平均年齢が等しい、非喫煙者(132人)群と喫煙者(158人)群において、性交頻度(回数/月)は非喫煙者が 11.6 ± 2.7 に対し、喫煙者では 5.7 ± 1.8 にすぎなかった。喫煙者群は一日最低30本で平均11.6年の喫煙歴があった。パートナーの女性に性交時の性的満足度を1から10の10段階で評価させた結果、非喫煙者が 8.7 ± 1.1 、喫煙者が 5.2 ± 1.1 であった。これは予備的調査の結果であるが、このような生物学的傾向がみられたことは意義がある。性的活動性低下における喫煙の作用機序は不明であるが、血管性インポテンスとの関連が示唆されている⁴⁸⁾。また喫煙により一般健康状態に影響を与え、性的活動性が変化すること、性行動に関与する内分泌機能、または生殖器官の機能に直接作用することも考えられる。

現在までの研究により、喫煙が男性の生殖機能や精液所見に影響を与える経路には3つの機序が考え

られる。第一はLeydig細胞機能の障害による精巣組織内のtestosterone濃度の減少である^{46,49,50}。この場合、精子形成ならびに精子成熟に關与する精巣上体等のtestosterone標的臓器の機能に影響を与える。第二にnicotineが精巣組織に直接作用して精子形成に影響する経路である。喫煙またはタバコの煙りを吸入するとcarbon monoxideやnicotineのような揮発性成分が急速に吸収される。吸入したnicotineの約90%以上が吸収されるといわれている。第三に喫煙やnicotine摂取の際に副腎髓質からのcatecholamine分泌が亢進し、血管収縮作用による疎血の影響を介して、ステロイド合成能および精子形成に影響を与える可能性が考えられている^{50~52}。

結 論

今日、喫煙は喫煙習慣を有する人にとっても医師にとっても深刻な問題である。喫煙の医学的有害性は明らかに証明されているが、これまでもまして新たな研究成績が蓄積されつつある。喫煙が医学的に有害であるとする研究の数は5万以上にのぼる。本稿では近年注目されている喫煙の生殖機能に与える有害作用について概説し、生物学的妥当性、生殖過程における喫煙の作用発現の機序を考察した。挙児希望のある人はこの議論を真摯にうけとめる必要がある。とくに女性であれ男性であれ不妊症患者、および流産経験者では避けられぬ問題と思われる。幸いにも妊娠した人はもちろん禁煙すべきである。さもないければ胎児が喫煙の影響をうけることは明らかである。喫煙が全身的な健康状態、とくに生殖過程に悪影響を及ぼすことが明らかとなり、医師の側でも無関心ではいられなくなってきた。禁煙を本人の意思にまかせず、医師が積極的に注意するほうが禁煙の成功率が高いという研究もある。また喫煙者の立場からも、医師から禁煙を勧められたほうが、生活習慣の変化を受入れやすいことは明らかである。

文 献

- 1) US Department of Health and Human Service, The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General. Government Printing Office, 1984
- 2) Peto R, Lopez AD, Boreham J, et al., Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 339: 1268, 1992
- 3) Stedman RL, The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 68: 153, 1968
- 4) Tokuhata GM, Smoking in relation to infertility and fetal loss. *Arch Environ Health* 17: 353, 1968
- 5) Howe G, Westhoff C, Vessey M, et al., Effects of age, cigarette smoking, and other factors on fertility: findings in a large prospective study. *Br Med J* 290: 1697, 1985
- 6) Malcolm S and Shephard RJ, Personality and sexual behavior of the adolescent smoker. *Am J Drug Alcohol Abuse* 5: 87, 1978
- 7) Huain MK, Frantz AG and Ciarochi F, Nicotine-stimulated release of neurophysin and vasopressin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 1113, 1975
- 8) Cryer PE, Haymond MW, Santiago JV, et al., Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamics and metabolic events. *New Engl J Med* 295: 573, 1976
- 9) Neri A and Eckerling B, Influence of smoking and adrenaline (epinephrine) on the uterotubal insufflation test (Rubin test). *Fertil Steril* 20: 818, 1969
- 10) Campbell OM and Gray RH, Smoking and ectopic pregnancy: a multinational case-control study. In: *Smoking and reproductive health*. p70, P S G Publishers, 1987
- 11) Burton RC, Smoking, immunity and cancer. *Med J Aust* 5: 411, 1983
- 12) Essenberg JM, Fagan L and Mallerstein AJ, Chronic poisoning of the ovaries and testes of albino rats and mice by nicotine and cigarette smoke. *West J Surg Obstet Gynecol* 59: 27, 1951
- 13) Mattison DR and Thorgeirsson SS, Ovarian aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primordial oocyte toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in mice. *Cancer Res* 39: 3471, 1979
- 14) Longo FJ and Anderson E, The effects of nicotine on fertilization in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *J Cell Biol* 46: 308, 1970
- 15) Jick H, Porter J and Morrison AS, Relation between smoking and age of natural menopause. *Lancet* 1: 1354, 1977
- 16) Hammond EC, Smoking in relation to physical complaints. *Arch Environ Health* 3: 28, 1961
- 17) MacMahon B, Trichopoulos D, Cole P, et al., Cigarette smoking and urinary estrogens. *N Engl J Med* 307: 1062, 1982
- 18) Baron JA, Smoking and estrogen-related dis-

- ease. *Am J Epidemiol* 119: 9, 1984
- 19) McLean BK, Rubel A and Nikitovitch-Winer MB, The differential effects of exposure to tobacco smoke on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the proestrous rat. *Endocrinol* 100: 1566, 1977
 - 20) Peterson CM, Jones KP, Carrell DT, et al., Pregnancy rates in smokers versus nonsmokers undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril Program Suppl*: s147, 1991
 - 21) Weathersbee PS, Nicotine and its influence on the female reproductive system. *J Reprod Med* 25: 243, 1980
 - 22) Blake CA, Norman RL, Scaramuzzi RJ, et al., Inhibition of the proestrous surge of prolactin in the rat by nicotine. *Endocrinol* 92: 1334, 1973
 - 23) Daniell HW, Osteoporosis of the slender smoker. *Arch Intern Med* 136: 298, 1976
 - 24) Suzuki T, Ikeda H, Narita S, et al., Adrenal cortical secretion in response to nicotine in conscious and anesthetized dogs. *Q J Exp Physiol* 58: 139, 1973
 - 25) Hahn TJ, Boisseau VC and Avioli IV, Effect of chronic corticosteroid administration on diaphyseal and metaphyseal bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 274, 1974
 - 26) Evans HJ, Fletcher J, Torrance M, et al., Sperm abnormalities and cigarette smoking. *Lancet* 1: 627, 1981
 - 27) Karagounis CS, Papanikolaou NA, Zavos PM, Semen parameters compared between smoking and non smoking men: smoking intensity and semen parameters. *Infertility* 8: 373, 1985
 - 28) Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, et al., Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl* 7: 369, 1984
 - 29) Vogt HJ, Heller WD and Borelli S, Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Fertil Steril* 45: 106, 1986
 - 30) Godfrey B, Sperm morphology in smokers. *Lancet* 1: 948, 1981
 - 31) Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD and Steinberger E, Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril* 38: 115, 1982
 - 32) Shaarawy M and Mahmoud KZ, Endocrine profile and semen characteristics in male smokers. *Fertil Steril* 38: 255, 1982
 - 33) Spira A, Consummation de tabac et caractéristique du sperme. In: *Human Fertility Factors, with Emphasis on the Male*. p 363, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, 1981
 - 34) Zavos PM, Karagounis CS, Ahparaki A, et al., Effects of cigarette smoking on the ultrastructure of the axoneme of human spermatozoa. *Fertil Steril Program Suppl*: s100, 1988
 - 35) Klaiber EL, Broverman DM, Pokoly TB, et al., Interrelationships of cigarette smoking, testicular varicoceles, and seminal fluid indexes. *Fertil Steril* 47: 481, 1987
 - 36) Ravenholt RT, Circulating mutagens from smoking. *N Engl J Med* 307: 312, 1982
 - 37) Lambert B, Lindblad A, Nordenskjold M, et al., Increased frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers. *Hereditas* 88: 147, 1988
 - 38) Nordenson I, Abramsson L and Ducheck M, Somatic chromosomal aberrations and male infertility. *Hum Hered* 34: 240, 1984
 - 39) Viczian M, The effect of cigarette smoke inhalation on spermatogenesis in rats, *Experientia* 24: 511, 1968
 - 40) Wyrobeck AJ and Bruce WR, Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 4425, 1975
 - 41) Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, et al., Nicotine from cigarette smoking increasing circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology* 78: 305, 1982
 - 42) Seyler LE, Pomerleau OF, Fertig JR, et al., Pituitary hormone response to cigarette smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 159, 1986
 - 43) Winternitz WW and Quillen D, Acute hormonal response to cigarette smoking. *J Clin Pharmacol* 17: 389, 1977
 - 44) Briggs WJ, Cigarette smoking and infertility in men. *Med J Aust* 1: 616, 1973
 - 45) Mittler JC, Pogach L and Ertel NH, Effects of chronic smoking on testosterone metabolism in dogs. *J Steroid Biochem* 18: 759, 1983
 - 46) Antypas S, Sofikitis N, Miyagawa I, et al., Effects of smoking on sperm quality and function. *Biol Reprod* 48 (suppl 1): 68, 1993
 - 47) Virag R, Bouilly P and Frydman D, Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. *Lancet* 1: 181, 1985
 - 48) Jeremy JY, Mikhailidis DP, Thompson CS, et al., The effect of cigarette smoke and diabetes mellitus on muscarinic stimulation of prostacyclin synthesis by the rat penis. *Diabetes Res* 3: 467, 1986

- 49) Patterson TR, Stringham JD and Meikle AW, Nicotine and cotinine inhibit steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Life Sci* 46: 265, 1990
- 50) Kasson BG and Hsueh AJW, Nicotinic cholinergic agonists inhibit androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 117: 1874, 1985
- 51) Biswas NM, Ptra PB, Sanyal S, et al., Adrenogonadal interaction in nicotine-induced alteration of steroidogenesis in male rats. *Andrologia* 11: 227, 1979
- 52) Perry C, Antagonistic action of adrenalin on the reproductive cycle of the English sparrow. *Anat Rec* 79: 57, 1941

**Impact of cigarette smoking
on human reproduction:
Its effects on female and male fecundity**

Department of Animal Sciences,
University of Kentucky and Andrology Institute of
Lexington, Central Baptist Hospital, Lexington,
Kentucky 40546-0215, USA

Panayiotis M. Zavos

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

Toshiko Toda

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

Nikolaos Sofikitis, Ikuo Miyagawa

Cigarette smoking has become a serious health and social problem in society today and also presents a rather challenging dilemma for the physician or the health care provider. No doubt, the physician has a very difficult and yet very necessary and important role to play in convincing patients of the adverse health effects smoking has on the body's ability to properly function and reproduce. The smoking behavior can be defined only as physically self-destructive and anyone who smokes should be advised to stop. The data shown in this review depicts a great deal of epidemiological evidence that smoking adversely affects female and male fertility. It also shows the biological plausibility and mechanisms of action of cigarette smoke and its components on the various reproductive processes. The argument against smoking holds true for anyone wishing to reproduce, however, it is particularly imperative for individuals having difficulty in conceiving or experiencing infertility problems.

(受付：1992年12月15日)

(受理：1993年6月18日)

地方部会講演抄録

第107回日本不妊学会関東地方部会

日時：1993年2月13日(土)

場所：グランドヒル市ヶ谷3階「瑠璃」

1. 各段階精子における先体反応比率の比較

○増田あさ子・玉岡有告・亀井 清
中村英世

(東京都済生会中央病院産婦)

(目的) 配偶子治療における精子処理法として培養液、Percoll液を用いた精子洗浄、swim-up、および前培養があるが、それぞれの精子処理後、もしくはその一定時間培養後における先体反応精子率についての報告は少ない。そこで我々は各種精子処理段階における先体反応精子率を比較検討した。

(方法) 当院不妊症外来通院中の正常精液所見を有する患者、夫を対象とし、上記各段階精子について先体反応精子率をTalbotらのtriple stain法を用い検討した。

(結果) 先体反応率は、採取液化後原精液 $5.8 \pm 1.9\%$ 、swim-up処理直後 $14.7 \pm 3.8\%$ 、3時間培養後 $21.8 \pm 0.4\%$ 、24時間培養後 $42.2 \pm 12.3\%$ 、Percoll処理直後 $18.6 \pm 0.9\%$ 、腹腔鏡時、原精液子宮腔内注入後ダグラス回収精子 $26.6 \pm 1.2\%$ であった。

(結論) swim-up、Percoll精子洗浄直後の先体反応精子率は原精液に比べ増加し、swim-up後培養時間経過と共に先体反応率も増加することが認められた。

2. ヒト精漿中のプロテイナーゼインヒビターの各種ヒト体液性プロテイナーゼ阻害

○原 唯純 (立川共済病院産婦)
黒田優佳子・小林俊文・野澤志郎
(慶応大学産婦)

兼子 智

(東京歯科大市川総合病院産婦)

松田兆史・秋浜澄行 (明治薬科大学)

ヒト精漿中より単一ステップでトリプシン様プロテイナーゼインヒビターの分離を行ない、得られたインヒビターとヒト体液中より得られるアルギニンアミダーゼ類に対する阻害効果の検討を行なった。

その結果、ヒト精漿塩基性アルギニンアミダーゼ

2種、同酸性アルギニンアミダーゼおよびヒトスロニンビンに対して阻害効果を示すことが明らかになった。一方、カリクレイン活性を示さないヒト尿中酸性アルギニンアミダーゼ、ヒト精漿中に存在する組織カリクレインおよびヒト高分子量ウロキナーゼは本インヒビターにより弱くあるいは全く阻害を受けないことが明らかになった。

ヒト精漿塩基性アルギニンアミダーゼに対するLBTIおよび本インヒビターのKi値の測定を行なった結果、同酵素は本インヒビターに対してよりもLBTIに対して強い親和性を示すことが明らかになった。

3. 体外受精における精子調整法の比較検討

○中野眞佐男・吉村慎一・村田美穂
保坂元枝・小西康博・小林淳一

(済生会神奈川県病院産婦)

体外受精における精子調整法としてパーコールSWIM DOWN法を用い、乏精子症および精子無力症の症例において、SWIM UP法との比較検討を行った。

症例は精子濃度2000万未満かつ精子運動率50%未満が11例、2000万未満50%以上が3例、2000万以上50%未満が6例、2000万以上50%以上が2例の計22例で、その成績は採取卵につき受精率51.9%、分割率41.5%であり、対症例では受精率72.7%、分割率68.2%、妊娠率18.2%であった。FERTILITY INDEX別にみると、FI5未満で1例が妊娠したものの受精率および分割率は20%と低かった。FI5以上10未満では受精率75%、分割率64%でSWIM UP法の60%、52%に比べて良かった。FI20以上では受精率、分割率ともにSWIM UP法と差はなかった。

したがって、FI10未満のものには精子調整法としてSWIM DOWN法を用いるのが良いと考えられた。

4. クラミジア陽性不妊患者の夫精液所見の検討

○佐藤佐由里・林 直樹・梁 善光
塩津英美・藤原敏博・大須賀穰
細谷岩生・島内昌仁・鈴木尚子
秋守恵子・岡田文美子・堤 治
三橋直樹・武谷雄二

(東京大学産婦)

Chlamydia trachomatis (C.) は女性側の不妊症の原

因として知られているが男性側の不妊に及ぼす影響についての検討は少ない。今回我々は、C.感染陽性の不妊症患者と非感染患者の夫の精液所見を比較し、女性側のC.感染の有無で間接的にC.が夫の精液に及ぼす影響を推定可能かなにかにつき検討した。

対象は過去3年間の当科不妊外来受診患者のうち、EIA法と抗体検査、夫の精液検査を施行した177例で、非感染群(89例)・活動感染群(52例)・既往感染群(36例)に分類された。精液所見は濃度・運動率及び両者の総合的指標としてのFertility Index (F.I.)につきそれぞれ解析を行った。

感染群と非感染群の間で夫精液の運動率や濃度に有意差はなかったが、F.I.で有意差が認められた。F.I.の低下は活動感染群のみでなく、既往感染群でも認められた。

女性側のC.感染の有無で夫の精液所見に差異が認められたことから今後夫側の直接的な試料の採取による検討も必要ではないかと考えられた。

5. 洗浄濃縮時・運動回収不良例における血清添加の効果

○石塚文平・近藤俊彦・栗林 靖
堀越 裕 (聖マリアンナ医大産婦)
斉藤寿一郎・房間茂由・石田徳人
大野祐子・浜田 宏・岩本晃明
(聖マリアンナ医大泌尿器)

血清添加の精子運動能におよぼす影響を検討する目的で80%percoll攪拌密度勾配法にて洗浄濃縮後の精子液に各種ヒト血清を1:1に付加し、その前後に精子自動分析装置(CASA)による一般精液検査を行った。対象は当科不妊外来受診中の不妊カップルのうち主に男性不妊の適応でAIHを施行した45例で、その平均(±SD)精子濃度は $47.5 \pm 45 \times 10^6/\text{ml}$ 、平均(±SD)運動率は $19 \pm 16\%$ であった。血清としてはAIH時妻血清(N=45)、卵胞期女子血清(N=15)、男子血清(N=15)を用いた。その結果、①洗浄濃縮後の血清添加により精子運動率は約30%の症例で50%以上上昇した。②上昇率と原精液一般所見の間に相関はなかった。③妻排卵期血清、卵胞期初期女子血清、男子血清の間に精子運動能賦活効果について有意差はなかった。④血清添加は精子velocityに影響を与えなかった。

6. 精子特性分析機(SQA)の使用経験について

○岩佐 剛・佐藤隆之・豊成由佳
福田 勝・竹内久彌・桑原慶紀
(順天堂大学産婦)

7. 中隔子宮の内視鏡的治療法

○吉岐潤子・蛭原照男・林 保良
久布白兼行・宮本尚彦・坂倉啓一
関 賢一・岩田嘉行
(川崎市立川崎病院産婦)

習慣流産や不育症の原因となりうる中隔子宮に対し当院ではレゼクトスコープを用いた経頸管的切除術(以後TCRと略す)を施行している。1985年から1992年までの当院における中隔子宮27例にTCRを施行し、術後妊娠経過について検討したので報告する。

27例のうち完全中隔子宮は3例、不完全中隔子宮は24例であった。妊娠歴は原発不妊が8例、習慣流産9例を含む流産が16例、早産、満期産、人工妊娠中絶がそれぞれ1例であった。TCR施行時に行った腹腔鏡検査では正常骨盤例が10例に認められ、他の17例は子宮筋腫、子宮内膜症、及び腹腔内癒着の合併が認められた。術後流産率は81%から20%に減少し生児獲得率は4%から74%に改善された。TCRのみを施行した例の術後妊娠率は72%であったが腹腔鏡下手術を併用した例では39%であった。TCRは患者への侵襲が少なく、分娩時の創部破裂の危険性が低く、中隔子宮に対し有用な治療法であると考えられた。

8. 中隔子宮の術前・術後のHSG像の検討

○藤木 豊・岡根夏美・岡本 一
西田正人・久保武士 (筑波大学産婦)

今回我々は形成術を施行した不妊症・不育症の既往をもつ中隔子宮25例の、術前後の子宮卵管造影像と予後の関係について調べ、若干の知見を得たので報告する。なお奇形の程度はAP/RLを用いて数量化した。

術前のAP/RLは不妊例と不育例の間に有意差はなかった。術式は軽度不全中隔子宮に対してはStassmann法を、高度の不全中隔・完全中隔子宮にはJones変法(筑波大式)を、筋腫か中隔か迷う例にはTompkins法を選択した。術後AP/RLは有意に減少した。不妊症8例の術後生児獲得率は75%だった。不育症の生児獲得率は2.6%から77.8%に改善した。不妊例での術後妊娠の有無、不育例での術後生児の有無と術後AP/RLに相関はなかった。生児獲得症例の術前AP/RLは大きい傾向があった。以上の結果から形態以外に何らかの因子が予後に関与していると考えられた。

9. Tubal catheterizationを目的とした新しい子宮鏡の開発

○高田淳子・小杉好紀・興石 真
井坂恵一・高山雅臣

(東京医科大学産婦)

近年、卵管閉塞治療TBTやHIT, H-GIFT, TV-TEST等, 経頸管的に卵管にアプローチする不妊治療が脚光を浴び、短時間で確実に卵管にチュービングすることにポイントが置かれる。

我々は微細径子宮鏡を開発し経験したので報告する。本子宮鏡は、メディカルサイエンス社FS-MS-551で、外径2.3~2.7 mm, 内径0.85 mmのワーキングチャンネルとライトガイド, 4200~8000画素のイメージガイドを含む。視野角は70度, 焦点深度も調節可能。スコープの先は45度に曲げられる。オリンパスType-Pに比し、頸管や子宮拡張の必要なく自から卵管口付近まで近ずけ、画像上でチュービングできる。また操作上はJansenカテーテルと同じ簡便さを持ちながら、卵管口を直視できる。

以上より、チュービングを目的とした本子宮鏡はType-PとJansenの両者の長所を兼ねた優れた子宮鏡である。今後改良を重ね、卵管へのチュービングの普及に勤めたい。

10. 子宮筋腫合併不妊婦人の妊娠予後

○中山摂子・安達知子・小林万里子

(東京女子医大産婦)

岩下光利・武田佳彦

(同母子総合医療センター)

子宮筋腫合併婦人に対する筋腫核出術と薬物治療を特に妊娠例の予後を中心に比較検討した。

(対象) 1991年1月から1992年12月までに当科で流早産または満期産に至った直径4 cm以上の子宮筋腫合併不妊婦人14例中、薬物治療後妊娠群5例、妊娠前筋腫核出後妊娠例9例

(結論) 1. 筋腫核出群においては帝王切開は約半数に認めたものの、妊娠、分娩時の異常を合併することが少なかった。2. 薬物治療群では妊娠前、筋腫の縮小効果はあったものの、全例に妊娠中、筋腫の増大、変性を起こした。5例中、正常分娩1例、巨大頸部筋腫のため帝切になったもの1例、筋腫の変性に伴う破水流産例1例、変性から来る疼痛のため人工妊娠中絶に至ったもの1例、22週進行流産1例であった。

(考察) 筋腫が不妊原因と考えられる筋腫合併不妊患者に対し、妊娠時の異常を考慮し、直径4 cm以上の筋腫は積極的に筋腫核出することが望ましく薬物療法は好ましくないと考えられた。

11. 不妊症患者の腹腔内所見とクラミジア感染

○永井聖一郎・佐倉まり・東梅久子

高橋敬一・児島孝久・佐藤孝道

(虎の門病院産婦)

当科で1991年から1992年の2年間に不妊症で腹腔鏡や開腹を行った77例を対象に、この腹腔内所見によって、卵管に異常のなかったコントロール群(C群)36例、卵管に異常のあったA群41例に分け、腹腔内所見とクラミジア抗体価(イパザイム®)の関係を検討した。さらに、A群はA1卵管周囲癒着(内膜症なし)19例、A2卵管周囲癒着(内膜症)13例、A3卵管閉塞16例、A4卵管水腫6例に分類した。クラミジア抗体IgG128倍かつIgA 16倍以上陽性がA群の19例46%、A1の11例58%、A3の12例75%、A4の5例83%に認められ、C群の2例6%より高値であった。一方、IgG64倍IgA16倍ともに陰性はC群の25例69%、A2の9例69%に認められ、A1、A3、A4より高値であった。

以上より、クラミジア感染は卵管の障害を引き起こすことが示唆された。特に内膜症以外の卵管周囲癒着、卵管閉塞、卵管水腫の原因として重要であると考えられた。

12. 卵巣過剰刺激症候群に対する低用量ドーパミン療法について

○松本和紀・楠原浩二・清水良明

中野 真・恩田威一・寺島芳輝

(東京慈恵会医科大学産婦)

卵巣過剰刺激症候群(OHSS)は今もって重要な医原性疾患であり、その確実な予防法はない。最近、従来の高浸透圧利尿を目的とした補液療法に加え、低用量ドーパミン療法が注目されて来ている。そこで平成4年に当院で経験したOHSS6例のうち2例にこれを試み従来の治療を行なった4例とその成績を比較検討した。

全例腹部膨満感、腹痛を訴え、著明な乏尿、体重増加、腹囲の増大、血液濃縮、軽度の低蛋白血症と高K血症を認めた。低用量ドーパミン療法では投与後ただちに利尿がつき、血液濃縮の改善が認められた。入院期間もドーパミン非投与群が平均12.5日であったのに比し、ドーパミン投与群では8.5日であ

り、血漿製剤の投与も必要としなかった。

OHSSに対する低用量ドーパミン療法は腎血流量を増加させることにより利尿が得られ、今後充分その効果が期待できる治療方法であると考えられた。

13. ヒト胎盤LH/hCGレセプターの精製

○田口正男・石原楷輔・菊池三郎

(日本医科大学産婦)

(目的) 1990年、ヒト胎盤にLH/hCGレセプターの存在が免疫組織学的に証明されたが、これまでトロホプラストからLH/hCGレセプターを精製したのと報告例はみられない。そこでヒト胎盤を用いLH/hCGレセプターの精製を試み、生化学的性質を検討した。

(方法) ヒト胎盤をcold acetone中でhomogenationし、アセトンパウダーを作製し、この可溶化上清をhCG-Sepharoseとincubationした。洗浄後、acetate buffer (pH 4.0) にてレセプターを溶出した。

(結果) ①170 gの胎盤から約40 gのアセトンパウダーが作製され、これより約0.6 mgのレセプターが精製された。②HPLCで分析すると、約140-KDaの単一ピークを認め、この部分のSDS-PAGEを行うと非還元状態で135-KDa、70-KDa、56-KDaが、還元状態で70-KDa、56-KDaが、主バンドとして認められた。

(結論) LH/hCGレセプターの分子量は約135-KDaであり70-KDa、56-KDaの構成成分よりなり、しかもdisulfide bondを持つdimerと推定された。

14. Enzyme-immunoassay (EIA: MS-18)による血中Estradiol (E₂) 簡易迅速測定法の基礎的・臨床的検討

○原田竜也・久保田俊郎・大庭美和子
黒沢美穂子・鎌田周作・大原基弘
清水康史・坂本秀一・麻生武志

(東京医科歯科大学医学部産婦)

血中E₂の簡易迅速EIAの基礎的検討と、そのIVF-ET療法における臨床応用の可能性について検討した。EIAキット：MS-18は免疫阻止反応を原理とし、酵素標識抗原 (E₂-HRPO) との免疫反応を介した呈色反応によってE₂を測定するものである。IVF-ET療法を実施した10例のGnRHアナログ・hMG刺激を行った期間に連日採血し、EIAおよびradioimmunoassay (RIA)で血中E₂を測定、両測定値の相関と超音波断層法による卵胞発育について分析した。EIAによる血中E₂の測定感度は0.3 ng/ml、

10.0 ng/mlまで測定可能で、測定値の変動計数のcoefficient of variation: C.V. は7.8～14.7 %、前者の測定値がやや高い傾向がみられた。又、その測定値は卵胞発育を十分反映するものであった。

以上より、本EIAは迅速かつ簡易に血中E₂を測定でき、その測定値はIVF-ET治療時の卵胞成熟度のモニタリングにおいて有用なパラメーターにより得ると考えられる。

15. 多嚢胞性卵巣症候群における全身脂肪量と耐糖能についての検討

○菊地律子・植村次雄・水口弘司

(横浜市立大学医学部産婦)

(目的) 多嚢胞性卵巣症候群婦人 (PCOS) 及び肥満婦人にDEXAを用いて全身脂肪量の測定を行ない、PCOSの全身脂肪量と耐糖能、インスリン代謝につき検討した。

(対象及び方法) 21～38歳の女性25症例 (単純性肥満 6名、肥満PCOS 6名、正常体重PCOS 13名) に対してDEXAによる全身脂肪量測定、75 gOGTT、各種ホルモン検査を施行した。

(結果) ①Body Mass IndexとDEXAによる全身脂肪量は高い相関を示した。②全身脂肪量と基礎インスリン値は正の相関を、LH (定常状態) は負の相関を示した。③インスリン抵抗性、基礎インスリン値は単純性肥満で量も高かった。④基礎インスリン値とアンドロステジオン、DHEA-Sは有意な正の相関が認められた。

(結論) PCOSにみられるインスリン抵抗性、高アンドロゲン血症への全身脂肪量の関与が示唆された。

16. 精索静脈瘤手術前後におけるLHRHテストの試み

○大橋正和・石川博通・中川 健
昌 亮

(東京歯科大学市川総合病院泌尿器)
大塚基嗣・田崎寛

(慶応義塾大学泌尿器)
織田孝英 (国立埼玉病院泌尿器)

精索静脈瘤 (以下本症) の手術前後の造精機能と視床下部下垂体精巣系の関連を知るために、本症手術前後にLHRHテストを試みた。

対象は本症にて高位結紮術を施行した50例で、精液所見は全例1000万/mlを越えていた。精液所見は精子濃度、運動率を、ホルモン基礎値としてLH、

FSH, T値を測定した。LHRHテストは100 μ gを負荷し、前、30、60分後のLH、FSH値を追跡した。以上の検査を術前と術後3ヵ月に行った。50例を術後精液所見改善群、非改善群に分けた。ホルモン基礎値は両群においても、それぞれの術前後でも差はなかった。負荷後のFSHピークは両群とも術前後で差はなかった。LHピークは改善群で術後低下する傾向をみたが差はなかったが、LHピークの術前後の差を改善群、非改善群で比較すると有意に改善群が大きかった。

以上より改善群ではLHRH負荷後のLHピークが術後沈静化したことはなんらかのLH分泌の“negative feedback”が術後増強したと考えられた。

17. プセレリン-HMG-HCG療法によって排卵に成功した化学療法後卵巣性無月経の2例

○岡田文美子・林 直樹・国府田きよ子
矢野 哲・堤 治・三橋直樹
武谷雄二 (東京大学産婦)

化学療法剤の進歩により、生命予後が改善するにつれて、若年者の卵巣機能障害、及び妊孕性が問題となってきた。化学療法後の卵巣性無月経は、各種の排卵誘発法に抵抗性で、回復困難であると言われている。今回我々は、ホジキン病の化学療法後に卵巣性無月経となり、治療抵抗性であったが、プセレリン-HMG-HCG療法の施行により、排卵に成功した2例を経験した。

1例はプセレリンを約4ヵ月持続投与し、血中FSH値を121 mIU/mlから6.8 mIU/mlまで低下させ、E₂ 52.4 pg/mlと上昇した時点でHMGを投与し排卵を認めた。もう1例は、治療前のFSH値39 mIU/mlを10.9 mIU/mlまで低下させたところでHMGを投与したところ排卵し、同周期で妊娠に至った。

この2症例において、排卵周期と卵胞発育を認めない周期とを比較検討したところ、プセレリンの長期投与により、十分に血中FSH値を低下させ、卵巣の反応性の回復を待ってからHMG投与を行う事が重要であると考えられた。

18. 当院における不妊症からの妊娠例の検討

○佐久間洋・張 玲・梶原 健
吉松春彦・田辺博子・小倉一仁
渡辺芳明・平野正子・堀切 浩
相馬廣明・畑俊夫(埼玉医科大学産婦)

(対象) 1988年10月から1992年10月までに当院不妊外来を受診した患者282例中不育症を除き、1ヵ月

以上の通院加療を行った症例206例を対象とした。

(方法) 主たる不妊原因の因子別妊娠率、初診から妊娠までの期間、予後、分娩様式に関して検討した。

(結果) 1) 妊娠64例、全体の妊娠率は31.6%。各因子別の妊娠率は卵管33.3%、子宮31.6%、内分泌33.3%、頸管14.3%、男性21.4%、腹膜26.6%、性交障害100%、原因不明40%であった。2) 初診から妊娠までの期間は3~4ヵ月以内がピークで、50%以上が6ヵ月以内、2年以上は自然妊娠のみであった。3) 流産率9.4%、切迫流産率27.6%、切迫早産率58.1%であり、不妊因子別の差はなかった。4) 分娩様式は経膈53.7%、帝切46.3%であった。

(考察) 初診から2年以内に妊娠しない者は治療は難しいと思われた。妊娠例は切迫流早産が多く、注意を要した。帝切率は高く適応としては、胎児仮死、貴重児、高齢初産が多かった。

19. 当院における高齢者体外受精成績

○生方良延・神野正雄・羽生一朗
安藤 索・塩川滋達・吉村泰典
中村幸雄 (杏林大学産婦)

(目的) 40歳以上の体外受精症例(42.2 $\pm$ 0.4歳)18例31周期と37歳未満の症例(31.8 $\pm$ 0.5歳)30例31周期の成績を比較した。

(方法) hMG単独あるいはGnRH agonist併用にて卵巣刺激を行い、最大卵胞径16 mm、血清LH値が至適レベルに達した時、hCG 1万単位を投与した。hCG投与後36時間で採卵を行い、媒精後36-48時間後に胚移植を行った。採卵後10、14日に血清hCG値を測定し、その上昇をもって妊娠を判定した。

(結果) hCG投与日の卵胞数及び血清E₂値は、40歳以上で有意に低値であったが、hMG総投与量、卵胞あたりの血清E₂値には差を認めなかった。採卵数、受精卵数、正常分割胚数は40歳以上で有意に低値であったが、受精率および正常分割率には差を認めなかった。40歳以上での妊娠率は、37歳未満に比し有意の差を認めなかったが、on going 妊娠率は有意に低値だった。

(結論) 採卵数の減少に伴う移植胚数の減少がon going 妊娠率の低下の一因と思われた。

20. 市販配偶子操作用培養液を用いた体外受精一前核期卵移植成績の検討

○太田昭彦
(帝京大学医学部附属市原病院臨床研究)

五味淵秀人・金子義晴・貝原 学
(同産婦)

体外受精-胚移植 (IVF-ET) の手技の簡素化を目的としてHTF (IRVINE SCIENTIFIC), GPM (SERONO) の2種類の市販培養液を用いて体外受精-前核期卵移植を施行しその成績を検討した。卵巣刺激はGnRH-HMG-hCG Short protocol 法, 精子はSwim-up法によって回収し, $1 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で媒精, 5% CO_2 -5% O_2 -90% N_2 37℃で培養した。

その結果, 受精率はHTFで総採卵数および周期あたりそれぞれ66.1% (82/124), 94.1% (16/17), GPMでそれぞれ54.7% (35/64), 80.0% (12/15) であった。妊娠率は, HTFでET周期あたり50.0% (8/16) GPMでの妊娠率は25.0% (3/12) であった。

当科での4-8細胞期胚移植法の妊娠率は27.0% (10/37) であり, 患者血清を添加しないGPMでもほぼこれと同等の妊娠率を示し, HTF前核期移植法の妊娠率は4-8細胞期胚移植法に較べむしろ高い傾向を示し, これらの培養液は特に前核期卵移植法においてのIVF-ETの手技の簡素化に有用であると考えられた。

21. One step in situ dilution法を用いた凍結受精卵移植による妊娠の一例

○三宅崇雄・望月愛郎・松信 晶
佐藤芳昭・大沢章吾
(JA相模原協同病院産婦)

ヒトの体外受精において移植されなかった余剰卵の凍結保存が臨床に応用されるようになっている。卵の凍結方法は種々の改善が試みられているが, 簡便に行える一方法としてOne step in situ dilution法をヒト受精卵凍結保存に応用してみた。その前の予備実験として, ウサギ前核期受精卵121個を用いて同方法による凍結融解を試み, 67個 (56%) のblastocyst形成をみた。

1991年6月より10名の患者より同意を得て余剰卵の凍結を行ったが, そのうち5名は採卵周期に妊娠に至った。現在までに3名の患者に融解卵の移植を行ったが, 1名が妊娠に至り, 現在妊娠24週で経過観察中である。その症例は, 34歳の9年不妊で抗精子抗体陽性のため体外受精が行なわれた。過排卵刺激により12個採卵し10個の卵に受精を確認し, 4個の2前核期卵を移植し6個を凍結保存した。この周期には妊娠しなかったため, 2か月後の自然周期20日目に2個の融解卵を移植し妊娠に至った。

22. 凍結ハムスター未受精卵を用いたハムスターテストの臨床応用について

○赤間晴雄・内藤正文・板橋光司郎
(川鉄千葉病院産婦)

ハムスターテストは精子受精能の評価法の一つとして有用であるとされており, 近年, 市販の凍結ハムスター未受精卵を用いた本テストが実施されている。

今回我々は当科不妊症外来において47症例に対し55回本テストを実施し以下の知見を得た。

(方法) 約5日間禁欲後手取的に採取した精液と市販凍結ハムスター未受精卵を用い, 日本農産工業k.kの「ハムスターテストマニュアル」に従ってテストを実施した。

(結果及び考察) 1. 精子濃度2000万/ml以上かつ精子運動率50%以上の群の精子侵入率は平均49.7%であり, その他の群の平均28.4%に比し有意 ($P < 0.01$) に高かったが, これらパラメーターと精子侵入率との相関は高くなかった。2. 反復テストした8例では2回の侵入率はほぼ同等であった。3. 精子侵入率と体外受精時の受精率との間には正の相関が認められた。4. 本テストは男性不妊の治療法の選択に有用であると考えられ, 一般病院でも実施可能と思われた。

23. 妊娠初期の胎嚢・胎芽の発育動態について

○町田正弘・武内裕之・福田 勝
桑原慶紀 (順天堂大学産婦)

経陰超音波断層法を用い, 正確な排卵日診断に基づいたAIH妊娠40例 (単胎妊娠・正期産・成熟児) の初期胎芽発育動態を検討した。また, AIH妊娠後の流産12例を対比し検討した。

(結果) ①GSは最も早期で, 妊娠30日で検出可能であった。妊娠5週6日 (妊娠41日) の時点で, その検出率は100%となった。②流産例を含めたGS検出時期の検討では, 正常経過妊娠群と比較し, 流産例は妊娠のごく初期: 妊娠30日 (妊娠4週2日) ~ 妊娠37日 (妊娠5週2日) の間でのGSの検出率が有意に低かった。③GS最大径の計測による発育曲線は $Y = 1.111 - 0.622X + 0.02X^2$ であり, 相関係数0.851と良好な相関を示した。④FHMは妊娠4週4日 (妊娠32日) より検出可能であった。妊娠7週0日 (妊娠49日) の時点で, その検出率は100%となった。⑤胎芽径 (CRL) 計測では4mmより可能であった。またその発育曲線は, $Y = 41.88 - 2.044X + 0.03X^2$ であり, 相関係数0.947と良好な相関を示した。

24. 新しいカテーテルを用いた子宮鏡下卵管内胚移植

○北村誠司・宮崎豊彦・赤星晃一
岩田壮吉・大澤淑子・小林俊文
野澤志朗 (慶應義塾大学産婦)

(目的) 従来の経頸管的卵管内胚移植および配偶子移植では、カテーテルを卵管内へ0.5~1.0 cmしか挿入出来ず、移植の確実性も低い。我々は径の小さい新しい胚移植用カテーテルを開発し、体外受精において子宮鏡を用いて胚を卵管膨大部に確実に戻し、妊娠率の向上を図った。

(方法) 1) 1991年10月より1992年11月まで、8症例に子宮鏡下卵管内胚移植を行った。対象は、卵管機能に異常無く、今まで2回以上IVFを施行しても妊娠しない症例である。移植胚は主に2~8細胞期のものを用い、培養液0.05 mlとともにカテーテル内に移した。カテーテルは、テフロン製、3 Fr、先端部分3 cmは2 Frで、卵管口より約3 cm挿入、胚移植を行った。

(結果) 2例の妊娠が確認され、現在、20週と17週で経過順調である。

(考察・結論) 新しいカテーテルは、受精卵をより確実に卵管膨大部に移植出来ることから有用であり、子宮鏡下卵管内胚移植法は、IVF妊娠困難例に有効であると考えられる。

25. 妊娠成立を見た新婚インポテンス症例

○野澤英雄・沈 明・金 正民
永尾光一・森岡 元・原 啓
松橋 求・高波真佐治・石井延久
三浦一陽・白井将文
(東邦大学医学部第1泌尿器)

1978年から1991年までの14年間に東邦大学大森病院リプロダクションセンターへ受診したインポテンス患者は3169例であった。

このうち新婚インポテンス症例は870例であり、その大部分は心因性で590例(67.8%)、器質性は167例(19.2%)、混合性は91例(10.5%)、その他の原因によるもの22例(2.5%)であった。なお1990年と1991年の2年間に新婚インポテンスと診断された466例のうち、70例が男性不妊を主訴として来院した。そのうち49例が心因性であり、その他、器質性や混合性などは21例であった。これらの中で経過観察できた症例は12例あり、このうち人工授精により妊娠したのは2例、性機能回復後に自然妊娠した症

例は4例であった。

男性不妊症は大部分が特発性の精巣機能障害であるが新婚インポテンスによる不妊原因も意外に多かった。また新婚インポテンス症例は、インポテンスが改善すると来院しなくなるので予後を調査するのは困難であった。

26. 性交出血にて発見された睾丸性女性化症の一例

○佐藤芳昭・三宅崇雄・望月愛郎
松信 晶・大沢章吾
(JA相模原協同病院産婦)

症例は19歳の女子大生、前夜性交後大量出血あるとのことで受診。視診ではPortioを認めず、血液浸油が腔壁に著明だが内診上子宮を認めない。本人は初経14歳と言うが、母親と接触の結果原発性無月経と判明。腔盲端部裂傷を縫後後諸検査開始。LH 35.4, FSH 21.7 mIU/ml, E₂ 10.1 pg/ml T361 ng/mlとhypergonadotropic hypogonadism, hypertestosteronismをみとめ、腔腔鏡で腹腔内に性腺をみとめた。hCG負荷ではTはやや上昇し、染色体検査では46XYと男性核型であり、以上より完全型精巢性女性化症と診断。年齢と腫瘍化予防のために両側性腺摘出術施行。病的には精巣組織であったが、spermatogenesisはみとめなかった。

通常精巢性女性化症での腔としての存在はurogenital sinusよりの発生で1~2 cmの浅いものが多いが、本例は腔長7 cmと正常女性と変りなく、正常に性交が可能であった割に珍らしい例と考えられる。

27. 男性不妊症の検査時に発見されたXX male症例

○西見大輔・中居敏明・栗田 稔
永尾光一・原 啓・桑原 孝
黒田加奈美・松橋 求・高波真佐治
石井延久・三浦一陽・白井将文
(東邦大学医学部第1泌尿器)

過去14年間に当院へ男性不妊を主訴として受診した2664例の内、不妊の原因が染色体異常と診断したのは47例(1.8%)であった。この内47 XXYが最も多く37例、次いでY染色体の欠損や異常症例が5例、46 XX maleが4例(0.15%)、46 XY/47 XYYが1例であった。

今回は46 XX maleの4例について検討した。4例とも体型、知能低下などは無く、結婚生活や社会的活動に支障無く、男性不妊症のみを主訴として来院し、無精子症及び染色体異常が発見された。血中ホ

ルモンではtestosterone 2.84 ± 0.58 ng/ml, FSH 70.12 ± 32.66 mIU/ml, LH 44.85 ± 26.50 mIU/ml, PRL 20.07 ± 7.06 ng/mlとhypergonadotropic hypogonadismを示した。精巣容積は右側は 4.00 ± 1.00 ml, 左側は 3.50 ± 0.87 mlで全例矮小精巣であった。精巣生検では精細管の硝子化, 精細管基底膜の肥厚, Sertoli cellの減少, Leydig cellの増生などの所見を示した。

28. hCG-hMG療法により児を得た,

hypogonadotropic hypogonadismの一例

○田中宏樹・岩本晃明・星野孝夫
矢島通孝・原口千春・馬場克幸
河野正二郎・皆川信彦・長田尚夫
(聖マリアンナ医大泌尿器)

患者は35歳, 主訴は2年間の原発性不妊。思春期は正常に発来。身長167 cm, 指極長164 cm, 体型正常, 恥毛Tanner分類4度, 嗅覚異常はなかった。精巣容量は左14 ml, 右16 mlで, 陰茎, 前立腺はやや小さかった。

検査所見: 精液検査は採取出来ないため行えなかった。内分泌検査; LH 0.5 mIU/ml, FSH 0.5 mIU/ml, Testosterone 0.8 ng/ml. LH-RH試験; 低反応。hCG試験; Testosterone前0.5後 2.9 ng/mlと軽度反応。染色体は46 XYで, CTで下垂体に異常なし。

以上より, hypogonadotropic hypogonadismと診断した。hCG-hMG治療は, hCG 3000 u週1回, hMG 150 u週2回で行った。2ヵ月目LH, FSH, Testosteroneは正常化し, 精液も少しずつ出るようになった。3ヵ月目に精子の出現を見, 6ヵ月目に精子濃度 5×10^6 /ml, 運動率23%で妊娠に至り, 3000 gの健康な女児が誕生した。本症例は, 思春期後に原因不明のhypogonadotropic hypogonadismを来したものだと思われる。

29. 習慣流産における染色体異常の検討

○細川知俊・牧野恒久・小沢伸晃
松林秀彦・染谷健一・野澤志朗
(慶応義塾大学医学部産婦)

我々は反復する流産に対する原因検索の一環として, 染色体分析を行っており, 今回その結果を報告する。対象は過去10年間に当科不育症外来を受診した者のうち総流産数2回以上のもので, 妻は1378名, 夫は1376名に染色体分析を行なった。染色体分析は, 末梢血リンパ球培養法を用いた。

1. 今回の調査では, 妻の5.08%, 夫の3.71%に染色体異常を認めた。これを新生児集団での染色体異

常頻度と比較すると, 妻では12.7倍, 夫では9.28倍となる。

2. 相互転座は習慣流産患者で発見される染色体異常として最も多いと言われており, 今回の調査では, 妻に70例中22例, 夫に51例中16例が認められた。

3. ロバートソン転座は妻に8名, 夫に3名が認められた。

4. モザイクは妻13名, 夫3名に認めたが, アーチファクトの可能性もあり, さらに検討が必要と思われる。

特 別 講 演

「男性不妊症に対する精路再建術」

○吉田英機 (昭和大学医学部泌尿器)

精路の通過障害によるいわゆる「閉塞性無精子症」に対する精路再建術は最近の顕微鏡下手術の普及により精子出現率の向上が見られる。

その現状として精管の部分的閉塞に対する精管-精管吻合術, 精巣上体尾部の閉塞に対する精管-精巣上体吻合術および先天性精管欠損症に対する人工精液瘤造設術の手術成績について最近の諸家の報告とともに纏めてみた。精管-精管吻合術の成績は一層縫合と二層縫合とであまり差はみとめられず, 粘膜面をきちんと合わせるにより, 一層縫合で十分であることが示唆された。精管-精巣上体吻合術はそれほど多くの症例ではないが, その成績は良好であった。

人工精液瘤造設術により精子の回収は比較的良好であるが, 妊娠成立は極めて少なく, 今後さらに検討を加える必要性を指摘した。

第111回日本不妊学会関西支部集談会

日 時: 1993年3月27日(土)

場 所: 日本シーリング株式会社 本社2F講堂

1. マウス胚を用いた培養胚発生停止現象の解析—酸化的ストレスによる細胞周期制御機構の障害—

○夏山知・森 崇英 (京都大産婦)
野田洋一 (滋賀医大産婦)
山下正兼・長浜嘉孝
(岡崎・基礎生物学研究所生殖研)

哺乳類初期胚を体外培養すると種特異的な段階で発生停止をきたすがその一因は胚への酸化的ストレ

スと考えられる。この現象を解析するためマウス 2-cell block をモデルとして細胞周期制御の面から検討を加えた。

(材料及び方法) ICR雌マウス(4週齢)を過排卵処理・交配後、in vivo群は経時的に採卵、in vitro群では前核期胚を採取し無添加またはSOD・Thioredoxin添加BWW培地で培養し経時的に胚を採取した。各群のcdc 2 kinase活性(MPF活性)は ^{32}P 標識ATPを用い、基質となる合成ペプチドへの ^{32}P 取り込みをチェレンコフ光で測定した。cdc 2の磷酸化・脱磷酸化状態はwestern blottingのバンドの変化にて判定した。

(結果及び結論) マウス体外培養胚では第2細胞周期のcdc 2 kinase活性が上昇せず、またcdc 2の脱磷酸化阻害が認められたが、SOD・Thioredoxin添加はこれを回復した。これらは培養胚での酸化的ストレスによる細胞周期制御の障害を示すと考えられる。

2. ラット初期胚の発生に及ぼす種々のアルブミンの影響

○山田雅保・柳田和子・内海恭三

(京都大農)

1991年にKishiらによってラット前核期胚が、リン酸およびグルコースを含まないHEC M-1培地中で胚盤胞期胚へ発生することが報告されたが、その率は約20%と低率であった。

最近、我々はマウス胚用M16培地からリン酸を除去し、さらにNaCl濃度を95 mMから85 mMに改変させた培地中でラット前核期胚が高率(80%)に胚盤胞期へ発生することを見出した。この実験の中で、さらに従来多くの動物種の体外受精や胚培養に用いられているBSAがラット前核期胚および2細胞期胚の発生を阻害することを観察した。本実験では、ラット2細胞期胚の発生におよぼす種々のアルブミン(BSA, α ラクトアルブミン, オボアルブミン)の影響について検討した。

その結果、いずれのアルブミンも50-100 μM 以上の濃度で胚の発生を阻害することが判明した。現在、この阻害機構については全く不明である。

3. リコンビナントZP4蛋白質の大量生産について

○長谷川昭子・井上みゆき・小森慎二

香山浩二・磯島晋三 (兵庫医大産婦)

ブタ透明帯構成蛋白質のひとつZP4は、ヒトを含め広い範囲の動物種の透明帯と抗原性を共有する。

またZP4に対する抗体は、ヒトのin vitro受精系を阻害するのみならず、ZP4を動物に免疫するとその動物は不妊になることが明らかになっている。即ち、ZP4は避妊ワクチンターゲットとして、最も注目される抗原である。しかしZP4を天然の材料から大量に且つ純粋に得ることは非常に困難である。そこで今回、分子生物学を応用したリコンビナントZP4の作成を試みた。

方法は、まず当教室でクローニングに成功してZP4遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。IPTGでZP4蛋白質の発現を誘導し、ZP4特異モノクローナル抗体を用いて、陽性コロニーを検出した。この転換細胞を大量培養し、溶菌させた後、アフィニティクロマトを用いて精製リコンビナントZP4を得た。

今後、動物実験により避妊ワクチン効果を検討する。

4. 各種漢方薬のハムスター精巣上体培養細胞に及ぼす影響について

○中山貴弘・後藤康夫・夏山 知

森 崇英

(京都大産婦)

野田洋一

(滋賀医大産婦)

田代眞一 (国立京都病院

内分泌代謝疾患センター)

男性不妊症の治療に使用される漢方薬の作用機序の解明のため、各種漢方薬をマウスに経口摂取させ、その血清中の成分がハムスター精巣上体培養細胞の蛋白合成に与える影響について検討した。

ハムスター精巣上体細胞の培養系を作成し、これに漢方薬2%含有飼料を摂取した雄マウスの10%血清入り培地と ^3H -Leucineを加えた。5%CO₂, in air, 温度32℃にて20時間の培養を行った後、精巣上体細胞の ^3H -Leucine取り込み量を測定した。飼料に配合した漢方薬はTJ-7, 12, 26, 32, 41, 48, 87, EK-7, 32, 41の10種である。

この結果、TJ-41, EK-41(補中益気湯), TJ-48(十全大補湯)含有飼料摂取マウスの血清添加培地において有意に培養細胞の ^3H -eucineの取り込み量の増加が認められた。

これらの結果より、これらの漢方薬の臨床効果の作用機序の1つとして、精巣上体細胞における精子の機能的成熟を促す蛋白の合成促進作用を推察することが可能となった。

5. 無精子症患者の精巣生検組織像と他のParameterについての検討

○松宮清美・高田晋吾・並木幹夫
奥山明彦 (大阪大泌尿器)
高田剛・近藤宣幸・清原久和
(健保連大阪中央病院泌尿器)

無精子症の治療は困難なことが多いが, assisted reproductive technologyの進歩により従来治療困難とされてきた症例にも挙児可能な場合も出現している. 基本的には精巣で精子形成を認めることが必要条件であり, 今回我々は無精子症症例の中から精巣での精子形成症例の特徴を明らかにするためにretrospectiveに検討した.

対象は最近2年間に不妊を主訴として受診した無精子症患者のうち精巣生検施行症例である. 検討項目は年齢, 既往歴, 不妊期間, 精巣容積, 精索静脈瘤の有無, 内分泌学的検査, 染色体検査とした. 生検組織像から精子形成群と精子無形成群にわけ, それぞれの検討項目における特徴を報告する.

6. 無精子症患者における染色体異常について

○佐久間孝雄・龍見 昇・神崎正徳
林 晃史・田中宏和・藤澤正人
岡田弘・松本修・守殿貞夫
(神戸大泌尿器)
今西 治・羽間 稔
(淀川キリスト教病院泌尿器)
浜口毅樹 (龍見泌尿器)
大家角義 (末光病院)

1984年5月~1992年2月の間に当科男性不妊外来を受診した男性不妊患者のうち, 無精子症患者419例に染色体検査を行い, うち94例(22.4%)に染色体異常を認めた.

その内訳は, Klinefelter症候群が, 68例(72.3%)と最も多く, 常染色体異常5例がこれに続いた. 常染色体異常はすべて転座で, 相互転座が4例, Robertson転座が1例であった. また正常異変が10例存在した.

無精子症患者における染色体異常の頻度は, これまでの報告では, 20%~27%で, 今回の我々の検討でもほぼ同様の結果であった. また, 染色体異常を認めた症例の内分泌学的検査では, LH, FSH, Testosteroneの平均値がそれぞれ, 15.6 mIU/ml, 38.9 mIU/ml, 3.5 ng/mlであり, hypergonadotropic hypogonadism (slightly) の所見を呈した. 精巣生検上, ほぼ全例が, Germ cell aplasiaの所見であった.

7. 当科におけるAIHの成績 —精子処理方法の比較—

○松岡逸子・藤野祐司・伊藤文俊
小嶋哲也・荻田幸雄
(大阪市立大産婦)
康 文豪
(大阪市立住吉市民病院産婦)

配偶子操作法の進歩により, 近年の不妊治療技術の発展には著しいものがある. しかしながら, これら操作法でも運動良好精子を選別回収することが妊娠率向上の重要な因子となっている. そこで, AIH施行時に行った各種精子処理法について, 精子数, 運動率, 妊孕係数(FI値: 精子運動率×精子数/10⁸)を比較検討した.

対象は当科不妊外来患者73症例, 総計289周期で, 不妊因子の内訳は, 男性因子46症例, 長期不妊18症例, ヒュナーテスト陰性例9症例である. 精子処理法施行周期数は, 洗浄濃縮法; 99周期, swim up法; 97周期, MS管法; 48周期, 80%パーコール法; 35周期, sperm prep法; 10周期である. これら操作法におけるFI値の変化を処理前のFI値15未満, 15以上25未満, 25以上に分けて検討した.

その結果, 15未満において80%パーコール法でFI値が有意に増加し, FI値の低値な不良精子例において優れた処理方法であった.

8. 精子計算盤および精子自動解析装置の正確性・再現性の検討

○石川元春・高瀬規久也・赤井正彦
三橋洋治・星合 昊・野田起一郎
(近畿大産婦)

血小板測定器補正用の標準粒子を用い二種類の精子計算盤の正確性・再現性を検討し, この計算盤が精子自動解析装置(CASA)の計測値も検討した.

標準液には, 6X10⁶/mlの血小板標準粒子を使用した. 精子計算盤には, 3個のマクラー精子カウントチャンバー(MKC)およびSPエースG(SPAG)を使用した. 使用法に従って粒子を顕微鏡下に算定し, その直後にCASAで粒子を算定した.

3個のMKCの正確性(%理論値)は平均; +18.8%, 範囲; +3.3~48.3%であり, 再現性(%CV)は平均; 11.2%であった. また, SPAGの正確性は平均; -16.1%, (範囲; -66.7%~+66.7%)で, 再現性は平均47.3%, (範囲; 9.1~52.0%)であった. CASAで計測した結果を直接計測したものと比較すると, MKCで+6.7%, SPAGでは+97.7%であった.

今回の検討では二種類の精子計算盤を比較すると正確性、再現性に関してはMKCの方がSPAGよりもすぐれていた。また、MKCはCASAに応用してもおおむね満足できる結果が得られるが、SPAGは誤差が大きくこの装置での使用に適さなかった。

9. 当科における不妊外来開設後の1年間の臨床統計

○六車光英・松田公志・杉 素彦
檀野祥三・小松洋輔

(関西医大泌尿器)

当科では平成4年1月に不妊外来を開設した。開設後1年間に不妊を主訴として初めて受診した患者は53人で、年齢は24~54歳、平均34歳で、不妊期間は6カ月~12年、平均3年1カ月であった。

初診時には問診、理学的検査、超音波ドップラー法による精索静脈瘤の検討、血中テストステロン・LH・FSH・プロラクチンの測定、2回以上の精液検査を行った。治療は、特発性の乏精子症および精子無力症の10例にクロミフェン・メコバラミン・カリクレインのいずれかによる薬物療法を、精索静脈瘤を認めた5例に腹腔鏡下精索静脈瘤手術を、閉塞性無精子症の6例には顕微鏡下精巣上体-精管吻合術または精管-精管吻合術を行った。

これらの患者の臨床像および治療成績について検討を加え、不妊外来を行う上での問題点について述べたい。

10. Klinefelter症候群患者に発生したLeydig cell tumorの一例

○岡田 弘・佐久間孝雄・龍見 昇
神崎正徳・林 晃史・田中宏和
藤澤正人・松本 修・守殿貞夫

(神戸大泌尿器)

大家角義

(末光病院)

(症例) 25歳の男性。

(主訴) 不妊。

(既往歴) 13歳時にOsgood-Schlatter Syndromeと診断された。

(現病歴) 14歳頃より左陰嚢内容が次第に大きくなってきた事に気付くも放置していた。

1985年9月、不妊歴4年で当科不妊外来を初診した。左陰嚢内容は26 ml、表面不整の硬い腫瘤として触知し、右陰嚢内容は3 mlであった。内分泌学的にはhypergonadotropic normogonadism。精液検査上無精子。染色体分析上47XXY。精巣腫瘍マーカーは全

て正常範囲内。精巣腫瘍の診断のもと、左高位除睾術をおこなった。腫瘤のほとんどはLeydig cell tumor (LCT) で占められ、圧排された左精巣部は、germ cell aplasiaであった。

LCTは約10%が悪性といわれるが、本症例は7年後の現在再発を認めていない。

11. LH-RH analogueを100回投与した前立腺癌症例の内分泌動態

○百瀬 均・三馬省二・藤本清秀

米田龍生・田中雅博・岡島英二郎

大園誠一郎・平尾佳彦・岡島英五郎

(奈良医大泌尿器)

LH-RHアナログ製剤の長期投与例についての報告は本邦では少ない。我々は1984年に9月に同薬剤の投与を開始し、1993年1月までの8年4ヵ月間に合計100回継続投与し得た症例を経験したので報告する。

患者は初診時年齢72歳、治療前診断は中等度分化型前立腺癌cT4NOMOであった。治療開始3週間目に血中テストステロン値はcastration levelに下降し、以後治療継続中はこの値が持続した。前立腺性酸性フォスファターゼ(PAP)は治療開始4週目に正常化し、以後正常範囲内で推移したが63カ月目から上昇し始め、同時に前立腺の増大を認めた。その後PAPの漸増とともに83カ月目には多発性骨転移及び傍大動脈リンパ節転移が出現した。この間LHは正常範囲内で推移したが、55カ月目以後は0.5 mIU/ml以下の低値が持続した。

治療開始101カ月目に患者の希望も有り、除睾術を施行した。摘出精巣の病理組織学的所見についても報告する予定である。

12. 前立腺温熱療法法の3年間の臨床経験

○西川慶一郎・伊藤周二

(大阪市立北市民病院泌尿器)

安本亮二・辻野 孝

(大阪市立十三市民病院泌尿器)

吉村力勇・浅井省和

(大道病院泌尿器)

前川正信 (大野記念病院泌尿器)

和田誠次・岸本武利

(大阪市立大学泌尿器)

西尾正一

(府中病院泌尿器)

1989年より1992年の3年間に68例の前立腺肥大症(BPH)の患者に対して、915MHz経直腸式ハイパー

サーミア (TRHT) あるいは2450MHz経尿道式ハイパーサーミア (TUHT) による治療を行った。

TRHTは30例に対し43.5℃, 60分間の加温を週2回, 計6回から10回施行した。一方, TUHTは38例に対し45.0℃, 60分間の加温を週3回, 計6回施行した。自覚的改善度は自覚症状スコアを, 他覚的改善度は残尿量及び平均尿流速などを用いて評価した。

TRHT群では30例中26例に自覚的改善が, 評価可能であった19例中13例に他覚的改善がみられた。

TUHT群では38例中30例に自覚的改善が, 評価可能であった22例中11例に他覚的改善がみられた。両群間の治療成績に有異な差は認めなかった。両群での自覚的改善率は83%で, 他覚的改善率は59%であった。

本治療法による重篤な副作用は無かった。このことによりハイパーサーミアはBPHに対する有効な治療法の1つであると考えられた。

13. 両側精索静脈瘤に対する術中内精静脈造影の経験

○山本員久・岩本勇作・瀬川直樹
平井 景・上野信之・清水 篤
砺波博一・高崎 登・岩動孝一郎
(大阪医大泌尿器)

(目的) 両側精索静脈瘤に対して内精静脈, 特に右内精静脈の流入する経路を知る目的で, 内精静脈影をおこなった。

(対象と方法) 1980年1月から1993年1月までに経験した両側精索静脈瘤20例に対して, 両側内精静脈高位結紮術を施行した。そのうち術中に両側の内精静脈を造影しえた15例を対象とした。

(結果) 左内精静脈に関しては, 15例中全例が左腎静脈に流入し, そのうち左腎静脈から下大静脈にスムーズに流入しているものは4例, 左腎静脈に停滞あるいは腎に逆流しているものは11例であった。右内精静脈に関しては, 15例中10例が下大静脈に直接流入し, 5例が右腎静脈に流入していた。右腎静脈に流入していた5例ではすべて右腎静脈に停滞あるいは腎に逆流していた。また, 右腎静脈に流入していた5例の精巣側への造影では, 左右が交通しているものはなかった。

14. 勃起不全患者に対する末梢循環改善剤並びに桂枝加竜骨牡蠣湯での治療経験

○辻野 孝・安本亮二・董 逸敏

林 真二・岩井謙仁・阪倉民浩
松田 淳・入谷純光・鶴崎清之
堀井明範・姜 宗憲・山本晋史
福井淳一・河野 学・大町哲史
甲野拓郎・夫 恩澤・笠井慎司
西阪誠泰・岸本武利・前川正信
(大阪市大泌尿器IMP研究グループ)

日本インポテンス学会の診断ガイドラインに従い, 現症, 内分泌環境, 陰茎動脈・陰茎背動脈の血流速度, PBPIを測定し, 末梢循環障害も関係していると思われる勃起機能障害症例15例に対し, 桂枝加竜骨牡蠣湯7.5 grと, シロスタゾールを150 mgを一日量として内服させ, その治療効果を評価した。

効果判定は3ヶ月後の勃起状態, 50%以上の陰茎血流速度の改善をもって行った。10例(67%)に臨床効果が観察され, このうち8例に陰茎血流速度の改善が見られた。一方, 効果のない5例のうち2例に陰茎血流速度の改善が見られた。

治療効果発現の機序としては, プラシーボ効果のほかに, 桂枝加竜骨牡蠣湯に含まれる桂枝・芍薬とシロスタゾールとの末梢血管拡張作用によると思われる。今後, 末梢血管障害によると考えられる勃起力の低下した症例にはこのような処方を試みてみたいのではと思われた。

15. マウス, ラット, ハムスター, モルモットおよびウシの黄体におけるinsulin-like growth factor-I (IGF-I) の免疫組織化学的検討

○玉田尋通・大野美佳・沢田 勉
森 純一 (大阪府大獣医臨床繁殖)

(目的) 各種動物の黄体におけるIGF-Iの発現については未だ明らかでない。本研究では黄体におけるIGF-Iの免疫組織化学的検討を行った。

(方法) マウス, ラット, ハムスター, モルモットおよびウシの発情周期ならびに妊娠各期に卵巣を採取し, プアン固定した。パラフィン包埋後, 切片を作製し, NIHより供与された抗IGF-Iポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(結果) マウスとラットの黄体における染色性は, 発情周期中および妊娠の初期から中期には軽度であったが, 妊娠の末期に強くなった。ハムスターの黄体では妊娠末期にのみ明らかな陽性反応を示した。モルモットでは, 発情周期中には軽度であったが, 妊娠の初期から中期に中等度となり, 妊娠の末期にかけて弱くなった。ウシの発情周期中では, 黄

体期の初期から後期にかけて染色性が著しく強くなった。妊娠中では妊娠推定1ヶ月で中等度の、5～6ヶ月で強度の、7～9ヶ月で軽度の染色性が認められた。

16. 不妊カップルにおける抗クラミジア抗体の測定

○富山達大・大橋一友・筒井建紀
上浦祥司・下屋浩一郎・金井利仁
橋本一昌・久保田康愛・佐治文隆
谷澤 修 (大阪大産婦)

骨盤腹膜炎や子宮付属器炎の原因としてクラミジア感染症が注目されており、これらの疾患は卵管の機能を障害し、不妊の原因になると考えられる。今回、不妊カップルの血中抗クラミジア抗体をセロイパライザクラミジアキット(明治乳業)で測定し、その意義について検討した。

当科不妊外来を受診した95組を対象とした。血中抗体クラミジア抗体(IgG, IgA)は酵素抗体法で測定し、子宮卵管造影所見、子宮頸管のクラミジア抗体の有無と比較、検討した。女性のIgG, IgA抗体ともに陽性例は19例でありうち11例(58%)に卵管の異常を認め、両者とも陰性の60例では9例(15%)にのみ卵管の異常を認めた。また、両抗体が陽性の女性の夫では7例(37%)が抗体陽性であり、一方、抗体陰性の女性の夫での抗体陽性率(3%:2/60)に比べ有意に高率であった。子宮頸管のクラミジア抗原陽性の女性は2名だけであり、この2名はIgG, IgA抗体がともに陽性であった。

血中クラミジア抗体の測定で得られた結果は不妊治療にとって有用な情報となると考えられる。

17. 新しい胚移植法TMETに関する検討

○森本義晴・牧野 滋・桑名博士
森本武晴
(河内総合病院不妊センター)
堀越順彦・榎木 晋・榎木 勇
(関西医大産婦)

近年、卵巣刺激法や、採卵法、培養法の改良進歩により体外受精胚移植法による妊娠成功率が顕著に向上し、着床率の改善が残された大きな課題となっている。

当センターでも、体外受精開始以来種々の胚移植チューブを用い胚移植法の改良を進めてきた。その結果、ファイコンチューブを用いた河内総合病院方式の胚移植法を考案し比較的安定した成績を得ていたが、時に極めて移植困難な症例に遭遇し苦慮する

ことがあった。そこで1992年9月よりKato O., Asch R.により開発された経筋層胚移植法(TMET)について検討した。

18-gauge Echo tip spinal needle(Cook社製, 25 cm, トラカールつき)にて、膀胱下部から最も子宮底に近い子宮内膜を出来るだけ直角に穿刺した。次に、トラカールを抜去し内径0.9 mmの硬膜外チューブに胚を装填し、針先より3 mmまでチューブを出し胚を注入した。これらの操作は全て陰式エコー下に行ない、超音波装置としてはALOKA SSD-620および横河U-SONIC Rifoを用いた。

今回この方法により着床率の向上を見たので報告する。

18. 子宮内膜症不妊に対するultra-long protocolによるIVF-ETの治療効果

○越田光伸・下野奈美・川口周利
岩井敏子・高畠桂子・栗栖美穂
飯藤豪一・山田裕久・井上欣也
(北野病院婦)

薬物療法や手術療法にても妊娠にいたらない子宮内膜症不妊に対してIVF-ET療法は有効な治療法である。本報告においては子宮内膜症不妊に対するshort-protocol(S)及びultra-long protocol(UL)によるIVF-ETの治療成績を比較検討した。

Sによる治療例は13症例15周期で4例に妊娠を認め(対周期妊娠率26.7%), ULによる治療例は13症例13周期で9例に妊娠を認め(対周期妊娠率69.2%)妊娠率はUL群で有意に高かった。受精率はS群では36/73(49.3%) UL群では61/84(72.6%), IVF後48時間における5 cell以上への分割率はS群では7/36(19.4%) UL群では22/61(36.1%)で受精率, 5 cell以上への分割率に有為差を認めた。卵巣刺激中の血中E₂, FSHレベルは両群に差は認めなかったが, LHレベルはUL群で低かった。また黄体期中期のP/E₂比はUL群で高かった。

子宮内膜症に対してultra-long protocolによるIVF療法は非常に有効な治療法と考えられた。

19. 当科不妊外来における現状と治療成績

○竹中 章・須戸龍男・山出一郎
野田洋一 (滋賀医大産婦)

1986年1月から1992年末日の期間の当科不妊外来の成績を報告する。1986～1988の期間は、年間新患者数は70～80人であるが、1989年以降100名強で推移している。この間の不妊患者総数は619名で、177

名 (28.6 %) に妊娠が成立した。

原因別に見ると、無排卵症などの純内分泌学的問題と思われるもの252名 (40.7 %), 子宮内膜症124名 (18.1 %), asthenospermiaを含む男性側因子93名 (14.8 %), 子宮内膜症以外の卵管因子33例 (5.3 %), chlamydia感染症38例 (6.1 %), 内分泌異常・chlamydia感染症のない頸管因子35名 (5.7 %), 子宮筋腫ないし子宮奇形16例 (2.6 %), 機能性不妊52名 (8.4 %), 検査未完了のもの43名 (6.9 %) である (複合原因を有するものは各々を一例とした)。原因別の妊娠率は、内分泌因子; 34.5 %, 子宮内膜症; 29.8 %, 卵管因子; 18.2 %, 男性側因子; 24.7 %, 頸管因子; 37.1 % である。

以上のごとく、当科では卵管因子の成績が比較的 low 今後改善が望まれる。

20. 当科不妊症患者に対する腹腔鏡施行例の現状と成績

○須戸龍男・竹中 章・山出一郎
野田洋一 (滋賀医大産婦)

平成元年4月より平成4年12月までに当教室で行った腹腔鏡検査は103例であった。その適応は全て不妊症であり、内訳はPOFが3例 (0.03 %), 臨床的子宮内膜症合併60例 (58.2 %), 卵管因子27例 (26.2 %), 機能性不妊26例 (25.2 %) であった。

原因不明例でも腹腔鏡により、子宮内膜症・卵管周囲癒着・卵管囊腫など8例 (30.7 %) に何らかの異常所見を得た。子宮内膜症の腹腔鏡による正診率は81.7 % であるが、正常所見が11例認められた。卵管因子に関しては、HSGと腹腔鏡所見の一致率は26例 (75 %) で諸家の報告の範囲にあったが、異常所見での一致率は低かった。

我々は腹腔鏡下に、PCOに対する楔状切除・子宮内膜症病変の電気焼灼・チョコレート囊腫に対するエタノール固定、卵管周囲の癒着剥離術などを行っており、腹腔鏡検査後の妊娠率は26.4 % であった。腹腔鏡検査は一般臨床不妊症検査では発見できない原因不明例の検査として、また子宮内膜症の確定診断と治療に特に有用である。

特 別 講 演

1 性ホルモンと癌増殖

松本圭史 (大阪府立母子保険総合医療センター)

幼い時から性腺の無い女性と男性における乳癌と前立腺癌の発生率は、正常者の1/100それよりずっと

以下である。まず、乳癌と前立腺癌の発生と増殖におよぼすエストロゲンとアンドロゲンの作用機構について述べる。

1980年以後になって、性ホルモンの癌細胞増殖促進作用は自己が性ホルモン誘導性に産生する増殖因子の作用によるのではないかと考えられるようになった。しかし、そのことは実証できなかった。その第1の理由は、無血清培地における性ホルモン依存性増殖系が確立できなかったからである。我々は、無血清培地でアンドロゲン依存性に増殖するマウス乳癌株(SC-3)を世界にさきがけて確立し、SC-3の増殖は自己がアンドロゲン誘導性に産生する増殖因子によることを実証した。その因子は、線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーに属する第8の新しい因子で、SC-3細胞膜上のFGF受容体に結合して増殖を促進する。

II X精子とY精子の分離とその検定

毛利秀雄 (放送大)

性の人為選択に関してはいろいろな方法が考えられるが、ヒトを含む哺乳類ではX精子とY精子を分離して人工授精を施すことができればもっとも実用的である。この種の研究では、従来キナクリン染色によってY精子の頭部にY染色体の繰返し配列に基づくFボディーが認められることから、ヒトの精子が好んで材料に用いられてきた。

Percollを用いた密度勾配遠心法では、条件を定めればほとんどX精子のみよりなる分画を沈殿として得ることができる。この方法は、日本産婦人科学会によって、X染色体上の遺伝子によって男児に発現する致死的な遺伝病の可能性のある家族等に限って施すことが認められている。

他の方法としては無担体電気泳動法がある。中性付近でヒト精子をこのための装置にかけると、陽極側に二つのピークが得られる。そのうちより陽極側、つまりより負に荷電しているピークはX精子、他のピークはY精子よりなることが分った。但し泳動後の精子は運動性を失うので、そのままでは人工授精はできない。

キナクリン染色の結果については異論もあるので、各分画の精子よりDNAを抽出し、Y染色体上のSRYやDYZ1などのシーケンスをPCR法で増幅して調べたところ、上記の結果を確かめることができた。またFボディーが検出されないマウスの精子を無担体電気泳動にかけたところ、やはり二つのピークが得られ、PCR法の結果はヒトの場合と同様であ

ることを示した。

なおDNAを染色してX精子とY精子のDNA量の差をフローサイトメトリーで検出し、セルソーターで分離する方法でも両者を分取でき、ごく最近この方法によるウシでの雌雄産み分けの成功が報じられている。

平成5年度日本不妊学会中部支部学術集会

日 時：1993年5月15日(土)

会 場：興和紡績本社ビル 11階ホール

1. 卵管閉塞症に対する子宮鏡下選択的卵管造影(通水)法の有用性について

○前田佳子・浅井光興・正橋鉄夫
内田 聡・野崎宗信・澤口啓造
藪下廣光・鈴木正利・野村昌良
中西正美 (愛知医大産婦)

近年、卵管閉塞と診断された症例に対する選択的卵管造影法が注目されている。

今回、私たちは卵管閉塞と診断された6例に対し、子宮鏡下選択的卵管造影法を行った。HSGによる閉塞部位は、大部分は間質部であった。既に切除されている2卵管を除き計10卵管に子宮鏡下選択的卵管造影法を試み、8卵管で再疎通させることができた。これら8卵管のうち7卵管で数ヶ月後再閉塞の有無を確認したが、1卵管以外全て通過性は保たれていた。6例中2例が自然妊娠し、現在妊娠継続中である。

私たちは、卵管近位端の閉塞の場合、子宮鏡下の選択的卵管造影法をまず行い、成功すれば6ヶ月は経過観察し、妊娠に至らなければ遠位端病変の有無を確認する。再疎通できなかった場合には、腹腔内所見を腹腔鏡で確認後、マイクロサージャリーまたは、IVF-ETを選択すべきではないかと考えている。

2. 当科における腹腔鏡施行不妊症患者75例の予後の解析

○朝比奈俊彦・川口欽也・中島 彰
藤城 卓・寺尾俊彦
(浜松医大産婦)

(目的) 当科における腹腔鏡(L/S)施行不妊症例の妊娠成功例を解析することにより、L/Sがいかにその妊娠に関与しえたかを不妊病因別に解析した。

(方法) 1990年4月～1992年9月(2年6ヶ月)の期間に、当科でL/Sを施行した不妊症例75例を対象

とした。

(結果) ①75例のうち6ヶ月以上followできた症例は39例、うち13例が妊娠に成功し、L/S後妊娠までに要した期間は平均6.2ヶ月であった。②妊娠例13例のうち、L/S後診断で「卵管癒着」3例と「所見なし」6例は、通常のL/S処置(色素通水と腹腔内温生食洗浄)後に、L/S前と同じ治療法で妊娠した。一方「子宮内膜症」3例と「両側卵管閉塞」1例は、体外受精によってのみ妊娠した。

(結論) L/Sにより「子宮内膜症」と診断された不妊症例においては、通常のL/S処置や内膜症組織電気焼灼を行っても、腹腔内環境改善効果はあまり期待できないと思われる。

3. Seager手持ち式直腸プローベによる電気射精の経験

○小谷俊一 (中部労災病院)

Seagerモデル12型electro ejaculator(手持ち式直腸プローベ使用)を用い、10名の射精障害男性(23～41歳、平均33歳)に電気射精を試みた。

射精障害の原因は9名が外傷性背髄損傷、1名が副精巣腫瘍で後腹膜リンパ節廓清術後、延べ27回施行、射精は26回(96%)発現した(順行性+逆行性13回、順行性のみ4回、逆行性のみ9回)。副作用は下肢の痙攣8回、下腹痛8回、発汗、頭痛、鳥肌3回(いずれも軽度で一過性)。順行性射精17回の内容は、射精発現までの刺激回数10～24回(平均19回)刺激電圧14～25V(平均19.6V)、精液量0.2～6ml(平均1.4ml)、精子数 $1.2 \sim 290 \times 10^6/\text{ml}$ (平均 $69 \times 10^6/\text{ml}$)運動率0～40%(平均12%)。AIHは順行性射精の1名と逆行性射精の1名で計6回施行し、逆行性射精の1名(L1背髄損傷38歳、受傷後13年)で3回目のAIHで妊娠に成功した(現在妊娠4ヶ月)。

4. DANAZOL 投与により改善を認めたanorexia nervosaの一症例

○澤入美穂・森下重雄・操 良
伊藤直樹・玉舎輝彦 (岐阜大産婦)

Danazol は、現在子宮内膜症の治療薬として汎用されているが、副作用として体重増加が問題となることが多い。danazolの生物学的特性についてはさまざまな視点より研究がなされてきているが、今回、danazolの蛋白同化作用による体重増加効果と摂食の制御における抗エストロゲン作用の影響に注目し、anorexia nervosaの患者への投与を試みた。

当科を受診した17歳のanorexia nervosaの女性患者

にdanazol 200 mg/day を約1年間経口投与したところ10 Kg (31 Kg→41 Kg) の体重増加と完全主義的な性格や食物に関する異常な強迫観念の改善が認められた。ホルモン検査上、danazol 投与前にはエストラジオール、LH、FSHは低値であったが、投与後改善を示した。LH-RH testは、投与前には下垂体の反応低下を認めたが、投与後反応は正常化した。

以上のことよりanorexia nervosaに対するdanazol 投与の有効性が示唆された。

5. OHSSに合併した中大脳動脈血栓症の一例

○楯信太郎・広岡 孝・北川武司
古井憲司・花井一夫・古橋 円
菅沼信彦・友田豊 (名古屋大産婦)

IVF-ET後にOHSS発症しその後、朝トイレにて突然意識なくし転倒、右片麻痺及び失語があり、脳外科にて左中大脳動脈起始部血栓症と診断した。直ちに血栓溶解をするためにウロキナーゼ療法施行し、OHSSが原因と思われる中大脳動脈血栓症を引き起こした症例を経験した。

その後妊娠経過及び脳神経学的にも順調であるが、OHSS合併症には十分注意しなければならないことが再確認された。

6. 治療に苦慮した重症OHSS症例

○隅山充樹・多田 伸・佐藤匡昭
塚田和彦・吉田真里子・吉村俊和
樋口康彦・廣田 穰・澤田富夫
河上征治 (藤田保健衛生大産婦)
近藤正利・上田真
(八千代病院産婦)

hMG-hCG療法、FSH-hCG療法などcontrolled ovarian hyperstimulation (COH) は不妊症患者に広く用いられるようになってきた。それに伴う合併症としてOHSSが増加している。

今回我々は大量の腹水貯留を伴う重症OHSS 4症例をほぼ同時期に経験し、血中及び腹水中のホルモン動態、Renin-Angiotensin系の変動について比較検討する機会を得、後に妊娠を確認した3症例で、血中及び腹水中のestradiol、progesterone値の上昇、加えてteststeroneの異常高値認め、さらにAngiotensin I、IIの血中と腹水中濃度において著名な解離を認めた。妊娠に至らなかった1症例においてはこの解離は認めなかった。

我々は早期に重症OHSSへの移行を防止することができればCOHの臨床的意義が増すと考え、その指

標としての可能性の有無をteststerone値とRenin-Angiotensin系の変動に注目し検討した。

7. 稀釈スプレキュアの排卵効果

○藤原義俱 (藤原産婦人科医院)

GnRHのアナログは初期の目的に反して、現在では性機能を抑制する薬として用いられている。

今回はGnRHのアナログを稀釈して本来の目的である排卵誘発に利用し若干の結果を得たので報告する。スプレキュアを10:1、20:1、30:1に各々稀釈し1日1回片方の鼻腔に噴霧した。投与方法は連日、隔日、また排卵日近くで連続使用し最高12回を限度とした。

対照は正常排卵群、PCD群、体重減少性無月経群、その他、で稀釈スプレキュアの効果を検討した。

また稀釈スプレキュアとHMGを用いての排卵効果、HMG量の調節、PCDに対するOHSSの対策、妊娠例等に検討を加えた。特に妊娠例では明らかにその原因が稀釈スプレキュアのためと思われる15例に対し妊娠月と非妊娠月のE₂とP₁子宮内膜の厚さ卵胞の大きさ等を比較したので併せて報告する。

8. Anorexia Nervosaに対する性ステロイド療法の長期予後

○戸谷良造・飯田佳世・平竹咲江
三輪一博・鈴置洋三
(国立名古屋病院産婦)

Anorexia Nervosaの多くは精神科、心療内科などで加療されている。産婦人科の治療は、無月経への対症療法がなされているに過ぎない。

我々はKaufmann療法、pill療法とは異なり、正常排卵婦人の卵巣産生ステロイド量に該当するホルモン補充療法を行えば、体重増加、精神症状の改善効果が得られることを期待して治療してきた。

昭和62年に集計した成績では、17例に平均32周期の本療法を施行。そのうち12例は結婚し、10例に16児を得ていた。2例の未妊娠例、5例の未婚例を追跡していたところ、最近2例が妊娠した。1例は性ステロイド療法36周期後にHMG-HCG療法12コース目に妊娠、現在品胎妊娠8週である。他の1例は性ホルモン療法96周期施行、以後bromocriptine療法を加え、自然排卵が発来、以後結婚し、自然妊娠にて現在20週である。

本疾患に対し、性ホルモン療法は有効であり、産婦人科医は、より積極的に本疾患の治療に取り組む

べきと考える。

9. 加齢と卵巣の反応性—ゴナドトロピン療法より

○成田知華子・上條浩子・浅井正子

成田 収

(成田病院)

近藤育代・菅沼信彦

(名古屋大学分院)

近年、女性の高学歴化、就労婦人の増加などの要因により結婚年齢が上昇するにつれ、不妊夫婦の増加が指摘されている。この加齢による妊孕力の低下が卵巣あるいは子宮のいずれによってもたらされるか、最近1年半に体外受精を行った508 cyclesをmoalに検討した。

400周期に胚移植を行い125周期でchemical pregnancyを認めた。妊娠率は年齢とともに低下した。FSHの基礎分泌値は年齢と共に次第に増加した。下垂体ホルモンを抑制し卵巣の反応性を検討した結果、年齢とともにGonadotropin投与量の有意な上昇とpeakE₂ Levelの有意な低下を認めた。加齢による子宮のreceptivityを検討する目的で良好な胚を移植した周期の着床率を比較したところ、年齢の上昇と共に着床率の低下を認めた。

形態的に良好な胚であると判断されても胚のqualityが必ずしもagingの影響をうけていないとはいえず、正確な意味でのreceptivityを判断するのは困難であると思われた。

10. マウス初期胚発育過程におけるEGFの作用転換に関する検討

○寺田 厚・箕浦博之・浜口元昭

伊東雅純・豊田長康 (三重大産婦)

(目的) マウス初期胚に及ぼすEGFの影響が、stageにより異なることを明らかにするとともに、EGF binding siteについても検討した。

(方法) ① 6～9 週齢ICR雌マウスを過排卵処理後、自然交配により妊娠させ、卵管灌流法により2細胞期または4細胞期に胚を回収し、基本培養液に1 p～10 ng/mlの濃度でEGFを加えて培養した。②各stageにて回収した胚を¹²⁵I-EGF単独、およびこれに非標識EGFを加えて反応させ、dipping法によるautoradiographyを行った。

(成績) ① 2細胞期胚培養18時間後には、50 pg/ml以下の低濃度EGF添加群で2 cell blockの改善がみられた。しかし4細胞期胚培養72時間後では、用量反応性にEGFによる発育抑制効果が観察された。② autoradiographyの結果、桑実胚以後で、EGFの特異

的結合が観察された。

(結論) EGFはマウス初期胚の発生過程において4細胞期前後で相反する影響を及ぼし、その作用転換にはEGF受容体の発現が関与している可能性が示唆された。

11. 当院における体外受精胚移植の5年間の成績

○菅沼信彦・安藤智子・塚原慎一郎

森脇崇之・大野泰正・福田洋行

稲垣資郎・近藤育代

(名古屋大学分院産婦)

花井一夫・古橋 円・友田 豊

(名古屋大学産婦)

当院において約5年間に358症例、669周期に対し体外受精胚移植(IVF-ET)を行った。

症例の適応は、卵管因子174例、子宮内膜症92例、男性因子125例、抗精子抗体陽性17例、自己抗体陽性22例、原因不明不妊42例であった。臨床的妊娠は134例、37.4%で、うち凍結胚融解移植によるものが20例であった。97例は既に出産し、23例は現在妊娠中(12週以降)である。多胎率は21.7%、流産率は16.7%、子宮外妊娠は4.0%で、いずれも自然妊娠より若干高率である。適応別妊娠率は、卵管因子51.1%、子宮内膜症44.6%、男性因子20.0%、抗精子抗体陽性29.4%、自己抗体陽性18.2%、原因不明不妊33.3%で、男性因子と免疫性不妊の妊娠率の改善が今後望まれる。

胚移植回数毎の累積生産率の期待値は、回数を終わる毎になだらかなカーブを示し、4回以上の胚移植で、約60%に生児が期待できる結果となった。

12. IVF-ETによる流産例のその後の治療成績

○鈴木規敬・鈴木真史・岡田英幹

貝田清隆・生田克夫・花田征治

八神喜昭

(名古屋市大産婦)

1988年9月～1993年3月に当科でIVF-ETを行った114症例310 ET周期のうち69周期に妊娠(尿中hCG陽性)が成立したが、この内22周期は流産に終わっている。これら流産症例のうち、その後にETを行った15症例37 ET周期について検討した。

妊娠は9周期(25%)、生児獲得(妊娠継続中を含む)は5周期(14%)であり、全IVF-ET(310 ET周期)の成績(22%, 15%)とほぼ同等であったが、さらに流産症例をGS確認の有無によるchemical abortion(C群)とGS確認後流産(G群)2群に分けて検討すると、特に流産後の2回までのETではC群8 ET周期

で妊娠 0 に対し G 群 14 ET 周期では妊娠 7 (50%) 生
児獲得 4 (29%) で、G 群の成績は全 IVF-ET の初めの
2 回の ET (163 ET) の妊娠 45 (27 %) 生児獲得 30 (18
%) と比べても良好な成績であった。

このことより IVF-ET の結果流産に終わった症例で
も流産時に GS の確認されている症例では、その後早
期の妊娠・生児獲得が期待できると考えられた。

関連学会のお知らせ

シンポジウム「“性”をめぐる諸問題」

- 主 催 日本学術会議，泌尿生殖医学研究連絡委員会
[責任者：吉田修(泌尿生殖医学研究連絡委員会委員長)]
- 共 催 神戸大学泌尿器科学教室
- 後 援 日本泌尿器科学会，日本産科婦人科学会，日本不妊学会，日本授精着床学会，日本性感染症学会，日本アンドロロジー学会，日本腎泌尿器疾患予防医学研究会，日本性科学学会，日本母性衛生学会，兵庫県，神戸市

I. 日 時：平成5年11月1日(日) 13:30～17:30

II. 会 場：神戸国際会議場(神戸市中央区港島中町 6-9-1 TEL. 078-302-5200)

III. 参加費：無料

IV. プログラム：

(1) 開会挨拶 吉田 修(京都大学 泌尿器科教授)

(2) 演題および演者

A. 性教育について

1. 保学的な視点より 平山宗宏(日本総合愛育研究所 所長)
2. 教育学的な視点より 武田 敏(千葉大学 教育学部教授)

B. 性感染症(STD)

1. AIDS 根岸昌功(駒込病院 感染症科医科)
2. 男性におけるSTD 守殿貞夫(神戸大学 泌尿器科教授)
3. 女性におけるSTD 松田静治(江東病院 副院長)

C. 性機能障害

1. 女性の立場より 本多 洋(三井記念病院 産婦人科部長)
2. 男性の立場より 斎藤宗吾(三聖病院 院長)
3. 老人の性 塚本泰司(札幌医大 泌尿器科助教授)

(3) 総合討論 座長：青野敏博(徳島大学 産婦人科教授)

座長：吉田 修(京都大学 泌尿器科教授)

(4) 開会挨拶 守殿貞夫(神戸大学 泌尿器科教授)

連絡先：橋村孝幸

(京都大学医学部泌尿器科学教室 (075) 751-3326, 3328)

第 8 回日本更年期医学会学術集会

テーマ「皆で考えましょう更年期」

I. 日 時：平成 5 年11月27日 (土) 9:00～17:00・28日 (日) 9:00～17:30

II. 会 場：シェーンバッハ砂防 (砂防会館)

〒102 東京都千代田区平河町 2 - 7 - 5

TEL 03 (3261) 8386 FAX 03 (3261) 5449

III. プログラム：

特別講演 (I) 演者 日野原 重明 (聖路加国際病院 院長)

「女性の中年からの生き方の選択」

座長 麻生 武志 (東京医科歯科大学 教授)

特別講演 (II) 演者 宮武 正 (東京医科歯科大学 教授)

「脳の老化と痴呆」

座長 熊坂 高弘 (獨協医科大学 教授)

シンポジウム (I) 更年期と生活習慣の改善

シンポジウム (II) 更年期のQOLからみたホルモン補充療法の可能性

シンポジウム (III) 看護からみた更年期

シンポジウム (IV) 更年期の基礎と臨床 (I) 子宮内膜の生理と病理

シンポジウム (IV) 更年期の基礎と臨床 (II) 骨代謝の基礎と臨床

サテライトミーティング・ラウンドテーブル・一般講演

IV. 参加費：8,000円

V. 懇親会：期日・11月27日 (土) 17:20～19:30

会費・8,000円

連絡先：第 8 回更年期医学会学術集会係

日本更年期医学会事務所

〒106 東京都港区麻布台 1 - 9 - 14 A・H-1ビル

株式会社コンベックス内

TEL03 (3589) 3355 FAX03 (3589) 3974

第 8 回更年期医学会学術集会

会長 麻生武志

東京医科歯科大学産婦人科

第35回 哺乳動物卵子学会

下記により第35回哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員の参加をお願い致します。

記

I. 期 日：1994年4月27日(水)・28日(木)

II. 会 場：日本大学会館，2階，大講堂

〒102 東京都千代田区九段南4-8-24

電話：03(3262)2271

III. 内 容：

会長講演：「卵の成熟と胚発生をめぐる話題」

ワークショップ：「卵子研究における新技術」

一般講演：前回の講演と同様に講演内容をオフセット印刷し，哺乳動物卵子学会誌11巻1号に講演要旨として掲載いたします。講演原稿は2ページにおまとめ頂きます。発表時間は1題7分，討論3分を予定しておりますが，演題数によって変わることがありますのでご了承願います。

IV. 演題申込：締切／1994年1月15日(土)必着

講演の申込は，葉書に演題名(和文および英文)，発表者名および共同研究者名(ローマ字)を記入のうえ，下記宛お送り下さい。折り返し，発表内容を記載する原稿用紙をお送り致します。

講演原稿の締切は，1994年2月26日(土)必着とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

哺乳動物卵子学会事務所 遠藤 克 宛

電話：0466(81)6241 内線2125

V. 総 会：4月28日(木)13:00～13:30

日本大学会館 大講堂

懇親会：4月27日(水)18:00～20:00

私学会館 5階「穂高」

〒102 東京都千代田区九段北4-2-25

電話：03(3261)9921

大会事務局：〒173 東京都板橋区大谷口上町30-1

日本大学医学部産科婦人科学教室内

第35回哺乳動物卵子学会事務局

大会幹事 栃木明人

電話：03(3972)8111 内線2522

FAX：03(3972)9612

当大会では日本産科婦人科学会の認定医シールが発行されます。

第35回 哺乳動物卵子学会
大会長 佐藤和雄

編集委員会からのお知らせ

38巻2号(4月)から38巻4号(10月)に掲載された論文は以下の先生方にご審査をお願いしました。

麻飯石伊太奥加川国香佐神須武田辻豊永西花福星松宮森安	生田丸吹田山藤越本山治保藤谷中井田井田島浦川水	武和忠令博明順慎恵浩文利寛雄啓弘正征峰和俊勇宏洸	志質之人孝彦三助吉二隆春人二幹忠裕宏人治子彦平生之彦	雨石岩植大長金神久小佐菅関竹田堤土永野林藤星松三森山	森井動村橋田川崎保林藤原中辺橋田口方本合本宅岡中	良延孝次輝尚弘秀春俊和七守生清治一昌征一昊修治明寿	彦久郎雄久夫司陽海文雄郎利昌男慶一郎良也一郎昊修治明寿	雨石伊碓大長守北熊米佐鈴高舘玉津中新野林布牧三村森吉	宮川藤井濱田殿尾本谷藤木崎野舎端西村澤施野浦上沢田	章通英亜三夫夫学明男道悦登也彦夫美雄朗夫樹久陽旭昭機	荒石伊内荻甲河木己相澤鈴高田田寺中西野平古松三森矢	木川藤海野斐上下斐良田森田中村川村島嶽尾橋浦橋嶋	勤男夫三弘生治之豊輔夫薫敬一蔵樹雄博正義晃平樹一聰
----------------------------	-------------------------	--------------------------	----------------------------	----------------------------	--------------------------	---------------------------	-----------------------------	----------------------------	---------------------------	----------------------------	---------------------------	--------------------------	---------------------------

ありがとうございました。

日本不妊学会誌

— 総合目次 —

第38巻 第1号

平成5年1月1日

原 著

ヒト卵胞液中に見いだされるアルギニンアミダーゼに関する研究

1-分子量の異なる3種アルギニンアミダーゼについて 小林俊文・他 1

ヒト顆粒膜細胞における甲状腺ホルモンレセプターmRNAの発現に関する研究

..... 岡村昌幸・他 7

ヒト卵胞に於けるatrial natriuretic peptide (ANP) binding site (英文) 臼杵 愼 11

体外受精における抗リン脂質抗体の意義 加藤充弘・他 16

GnRH agonist併用による過排卵刺激法:

Long protocolとShort protocolの有用性に関する比較検討 渡部秀哉 22

LH-RH agonist療法時の更年期症状に対する

代謝性ステロイド製剤 (Metharmon®-F錠) の予防効果の検討 植村次雄・他 28

体外受精・胚移植における過排卵刺激時のホルモン環境と着床率との関係 星合 明 38

配偶子卵管内移植 (GIFT) における妊娠成立に関与する諸因子の検討 北澤正文 45

体外受精に関する培養液と微小環境培養法の基礎的・臨床的研究 藤森 淑 53

GnRHα併用周期におけるpremature luteinizationの体外受精成績に及ぼす影響 (英文)

..... 児玉英也・他 61

習慣流産患者に対するTRHテストの意義 (英文) 河野雅洋・他 66

習慣流産の免疫療法前後における免疫学的変化について 中塚幹也・他 72

血清CA125及び各種マーカーを使用した切迫流産の予後判定 (英文) 高橋健太郎・他 80

経腔超音波断層法による妊娠初期の予後判定 中町悟子・他 87

子宮卵管造影法 (HSG) の不妊症に対する治療効果の検討 緒方りか・他 91

挙児希望婦人における診断的腹腔鏡検査の有用性 大野洋介・他 95

共通尿生殖洞例における腔入口形成術 (英文) 石丸忠之・他 100

不妊を主訴としたXYY症候群の1例 稲井 徹・他 105

男子不妊症の臨床統計的検討 石田 章・他 109

男性不妊の臨床的観察 大橋正和・他 116

当院における体外受精・胚移植の成績——特に精液性状の観点から—— 西村 満・他 123

ヒト精子表面におけるFibronectinの局在と受精への関与 佐々木宏子・他 129

機能性男性不妊症における新しい検査法:

Hypoosmotic Swelling Testと精子Acrosin活性測定の有用性に関する検討 戸田稔子・他 137

静脈性インポテンスに対する拡大鏡下venous ligation surgery (英文) 瀧原博史・他 142

AIHの成績から見た精子濃度の臨床的意義 石原 理・他 147

Transverse Vasovasostomyにより妊娠・出産に成功した無精子症の1例 小林信幸・他 152

hCG連続投与後、精漿中transferrin濃度の増加とともに妊孕性を獲得した

無精子症の一例 吉田謙一郎・他 156

不妊をきたした筋緊張性ジストロフィー (Myotonic dystrophy) の1例 岡田 弘・他 161

停留精巣における精巣上体異常の過去23年間の臨床的検討 鎌田清治・他 164

当科における精索静脈瘤の動物実験モデルの総合的検討 (英文)

.....ニコラオス・ソフィキティス・他 168

胚盤胞形成過程のマウス胚における

アクチンとサイトケラチンの組織化学的観察 (英文) 四谷伊公子・他 177

総 説

Hatching現象——形態変化と機序, 及びプロスタグランジンとの関係—— 千田 智・他 183

地方部会講演抄録 193

第38巻 第2号

平成5年4月1日

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 215

精液中フマラーゼ (Fumarase) 活性の研究 (英文) 内島 豊・他 220

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 225

メス非使用による精管切断術 (英文) 山本雅憲・他 231

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 234

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 241

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 250

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 254

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 262

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 269

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 274

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 278

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 285

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 291

GIFTおよびZIFT成績と培養法の工夫 渡辺栄三・他 297

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 305

腹腔鏡で確認したFitz-Hugh-Curtis症候群の1例 竹内 薫・他 310

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 315

未破裂卵管妊娠に対する保存手術 (英文) 石丸忠之・他 319

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 325

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 332

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 336

凍結・融解胚移植の臨床応用の有用性の検討 山辺晋吾・他 340

地方部会講演抄録 348

第38巻 第3号

平成5年7月1日

原 著

Electrofertization: 電氣的細胞融合操作の受精への応用の試み (英文)

- マラデニ・イマド・アブデル・アジズ・他 369
- 体外受精・胚移植におけるいわゆるPoor Responderに関する検討 東梅久子・他 373
- 高い妊娠率を得るためには、形態学的に不良な胚を良好な胚と一緒に移植すべきか? (英文)
- ムラト・タシュデミル・他 377
- 体外受精-胚移植法におけるLH-RHagonistと2種類のhMG製剤を用いた卵胞刺激法の比較検討
- 広井正彦・他 381
- IVF-ET周期の卵巣刺激におけるGnRHaとclomiphene citrateとの比較 (英文) 多賀茂樹・他 387
- 家兎卵管adrenergic transmitterと卵輸送との関連性の検討 斉藤眞一 392
- クラミジア頸管炎・骨盤腹膜炎に対するトスフロキサシン (OZEX®) の有用性の臨床的検討
- 高橋敬一・他 400
- 卵管性不妊診断におけるクラミジア・トラコマトイスの血清抗体価測定の意義 (英文)
- タシュデミル・イシュク・他 405
- 多嚢胞性卵巣症候群に対するLow Dose Pure FSH投与 沖 利通・他 408
- GnRHに無効の子宮内膜症に対するダナゾール療法の治療効果 玉舎輝彦・他 415
- 重症卵巣過剰刺激症候群に対する低用量ドーパミン療法の有用性 河野哲郎・他 423
- MTX局所投与による子宮外妊娠治療におけるMTX血中動態について 日下真純・他 428
- 黒毛和種雌牛におけるロバートソン型転座個体の繁殖成績 (英文) 森 英紀・他 433
- 精索静脈瘤患者の精子アクロシン活性 (英文) ニコラオス・ソフィキティス・他 437
- 過去6年6ヶ月間の男子不妊症の臨床統計的検討 白瀧 敬・他 441
- 第38回日本不妊学会学術講演会抄録 449

第38巻 第4号

平成5年10月1日

原 著

受精後のマウス, ラット, ハムスターおよびウサギの卵子における表層粒の変化

- 細江実佐・他 595
- ノコダゾールがマウス2細胞期胚の体外発生能に及ぼす影響 加藤容子・他 600
- 抗プロゲステロン製剤(RU486)が家兎子宮内膜の着床性変化に及ぼす影響 山海 直・他 605
- 透明帯開窓法のヒト胚発生, 胚発育におよぼす影響 小田原靖・他 612
- 男性不妊症例の体外受精胚移植における精子調整法の比較検討 生田克夫・他 618
- 体外受精におけるPentoxifyllineの使用経験 児玉英也・他 624
- IVF-ET時のIuteal supportと黄体ホルモン測定の意義 (英文) 石原 理・他 629
- 体外受精-胚移植の採卵術におけるケタミン麻酔-臨床的および基礎的検討- 重松 潤 635
- Clomiphene/LH surge 法とClomiphene/HCG法によるAIH治療成績の比較 長谷川功・他 642
- Percoll攪拌密度勾配法によるAIHの予後と培養精子運動率との相関 玉岡有告・他 647

補中益気湯の精子運動機能に対する作用—Penetrak test, hypoosmotic swelling test, computer-assisted semen analyzerによる検討—	柴原浩章・他	654
成熟ネコ卵管の神経支配——組織科学的並びに免疫組織化学的観察——	宮嶋 諭	661
当クリニックにおける不育症の原因と柴苓湯療法を中心にした治療成績の解析	假野隆司・他	671
不妊症における高アンドロゲン血症の頻度とその妊娠例の解析	太田博孝	680
プロラクチン分泌能からみた高LH血症性排卵障害の病態に関する検討	松口博之・他	684
高LH血症性視床下部障害の内分泌学的特徴とbromocriptineの効果	合阪幸三・他	688
子宮外妊娠に対する手術療法および薬物療法の比較検討	藤下 晃・他	694
AFSスコアリングに基づく術後癒着の		
術後早期腹腔鏡 (Early Second Look Laparoscopy) による評価	森 俊介・他	700
抗クラミジア抗体診断キット,		
セロ イパライザ クラミジアIgA・IgG-Iの臨床的検討	高橋敬一・他	704
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:		
平成3～4年の当院分娩統計より (第2報)	宮川善二郎・他	709
7例の未治療精索静脈瘤患者における		
進行性の精液所見の悪化と精巣容積の減少 (英文)	山本雅憲・他	714
ヒト精子長期冷所保存におけるCaffeine, Pentoxifyllineの効果	菅野ひとみ・他	718
超音波カラードップラー法の精索静脈瘤への臨床応用		
—診断および静脈血逆流速度に基づいた分類の可能性—	白瀧 敬・他	723
精子運動に対する浸透圧の影響	齋藤和男・他	729
術後精液所見の改善が見られたFSH産生性下垂体腺腫の1例	風間泰蔵・他	734
機能性不妊におけるウレアプラスマ性器感染の意義 (英文)	佐藤芳昭・他	739
総 説		
ヒト生殖機能に及ぼす喫煙の影響: 女性および男性における妊孕性の変化	パナヨティス・ザボス・他	743
地方部会講演抄録		750

Japanese Journal of Fertility and Sterility

CONTENTS

(Vol. 38, No. 1, 1993)

Originals

Studies on Arginine Amidases in Human Follicular Fluid

1-Evidence of Three kinds of Arginine Amidases Having Different Molecular Mass-

.....T. Kobayashi, S. Kaneko, S. Nozawa, T. Sugiyama,
E. Iida, Y. Matsuda & S. Akihama 1

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

.....M. Okamura, T. Otani, T. Sugawara & M. Mochisuki 7

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

Significance of Antiphospholipid Autoantibodies in In Vitro Fertilization M. Kato,

H. Kodama, T. Matsui, J. Fukuda,

S. Takeda, K. Sekine & M. Maki 16

Comparison of Long-term and Short-term Protocols in Controlled Ovarian

Hyperstimulation with GnRH agonist and hMG for IVF-ET H. Watanabe 22

The Effect of a Sex Steroid-thyroid Hormone Mixture (Metharmon-F Tablets)

in Preventing Climacteric Symptoms During LH-RH agonist Therapy

.....T. Uemura, H. Minaguchi, K. Shirasu, Y. Yosimura,
T. Negishi, N. Katagiri, T. Yanagihashi, N. Takahashi,
K. Nakase, J. Mouri, M. Nakayama, T. Koshimizu,
S. Tsutiya, T. Ooyama, K. Satou, A. Matsuyama,
O. Kosuge & N. Ootsuka 28

Relationship between Hormonal Environment and Implantation Rate during the Controlled

Ovarian Hyperstimulation with GnRH Agonist and hMG in IVF-ETcycles A. Hoshiai 38

Evaluation of the Factors Concerning the Achievement of Successful Pregnancy

by Gamete Intrafallopian Transfer M. Kitazawa 45

Basic Clinical Study of Medium and Microenvironmental Incubation

for in Vitro Fertilization-Embryo Transfer S. Fujimori 53

The Effect of Premature Luteinization During Pituitary Suppression

with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist on the Outcome of in Vitro Fertilization

.....H. Kodama, J. Fukuda, T. Matsui,
K. Sekine, M. Tasdemir & I. Tasdemir 61

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

Immunological Changes after Lymphocyte Injection Therapy for Habitual Aborter

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

Study on Prognostic Value of Serum CA 125, Hormones Associated with Pregnancy

and Ultrasonographic Examination in Threatened Abortion K. Takahashi,

	<i>S. Okada, K. Yoshino & M. Kitao</i>	80
Early Pregnancy Outcome Predicting with Transvaginal Ultrasonography	<i>S. Nakamachi, Y. Inoue, H. Fukue, H. Hata, H. Yamamoto, S. Tanaka & R. Kudo</i>	87
Therapeutic Efficacy of Hysterosalpingography (HSG) in Infertility, a Prospective, Randomized, Clinical Study	<i>R. Ogata, G. Nakamura, Y. Uchiumi, M. Yokoyama, Y. Watanabe, M. Nozaki, M. Sano & H. Nakano</i>	91
Usefulness of Diagnostic Laparoscopy for Infertile Women	<i>Y. Ohno, T. Tamura, J. Kitawaki, K. Tanaka, T. Yamamoto & H. Okada</i>	95
Vaginoplasty for Imperforate Vagina with Vaginourethral Communication	<i>T. Ishimaru, H. Masuzaki & T. Yamabe</i>	100
A Case of XYY Syndrome with Male Infertility	<i>T. Inai, T. Hamao, M. Kajimoto, N. Miyake, S. Naruo & S. Kagawa</i>	105
A Clinico-Statistical Study on Male Infertility	<i>A. Ishida & T. Tomoyoshi</i>	109
Clinical Observation on Male Infertility	<i>M. Ohashi, H. Ishikawa, M. Ohya, M. Tachibana, S. Baba, N. Deguchi, S. Jitsukawa, M. Hata & H. Tazaki</i>	116
Retrospective Studies on the Semen Characteristics and the Outcome of In Vitro Fertilization-Embryo Transfer in Our Hospital	<i>M. Nishimura, H. Okata, A. Nishigaki, Y. Ootani, Y. Torii, S. Aoki & K. Sato</i>	123
Localization of Fibronectin on the Surface of Human Spermatozoa and Relation to the Fertilization	<i>H. Sasaki & K. Hoshi</i>	129
Employment of New Assays in the Evaluation of Idiopathic Male Infertility: Hypoosmotic Swelling Test and Sperm Acrosin Activity	<i>T. Toda, Y. Mio, N. Terakawa, N. Sofikitis, I. Miyagawa & P. M. Zavos</i>	137
Microscopic Venous Dissection Surgery for the Treatment of Venous Impotence	<i>H. Takihara, T. Ueno, Y. Baba, K. Kamada, S. Shirataki, K. Ishizu & K. Naito</i>	142
Retrospective Analysis of Infertile Couples Treated by Artificial Insemination with Husband's Semen	<i>O. Ishihara, J. Taya, Y. Iino, M. Saitoh, T. Suno, K. Kinoshita & K. Yoshida</i>	147
A Case Report of Transverse Vasovasostomy with Successful Fertilization	<i>N. Kobayashi & K. Yoshida</i>	152
A Report of Successful Fertilization of Azoospermic Patient Accompanied with the Increase of Seminal Plasma Transferrin Concentration by hCG Treatment	<i>K. Yoshida, Y. Uchijima, N. Kobayashi & H. Saitoh</i>	156
A Case Report of Myotonic Dystrophy with a Complaint of Infertility	<i>H. Okada, A. Hayashi, O. Imanishi, O. Matsumoto & S. Kamidono</i>	161
A Clinical Study on Epididymal Abnormalities Associated with Undescended Testis	<i>K. Kamada, H. Takihara, S. Shirataki, T. Ueno, K. Ishizu, Y. Baba & K. Naito</i>	164

Experimental Models for the Study of Varicocele: A Selected Review	 N. Sofikitis & I. Miyagawa	168
Histochemical Observations on Actin and Cytokeratin in Mouse Embryos		
in the Course of Blastocyst Formation	 I. Yotsutani, S. Niimura & K. Ishida	177
Hatching of Blastocysts		
—Morphology, Mechanism and Prostaglandin Synthesis—	 S. Chida, M. Suzuki,	
	S. Uehara, A. Yajima, L. Mettler & K. Semm	183

(Vol. 38, No. 2, 1993)

Originals

Biological Activity of Seminal Plasma Motility Inhibitor in Infertile Patients	 T. Iwamoto H. Tanaka & T. Osada	215
Studies on Fumarase Activity in Human Semen	 Y. Uchijima & K. Yohida	220
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	225
Experience with No-scalpel Vasectomy	 M. Yamamoto,	
	Y. Tsuji, H. Hibi & K. Miyake	231
Involvement of Human Semen Properties and Fertilizing Capacity		
in the Acrosome Enzymes and Proteinic Tail Components of Spermatozoa	 T. Sugano & K. Hoshi	234
Clinical Evaluation of the Human Sperm Hypoosmotic Swelling Test	 H. Shibahara, T. Henmi, M. Akai,	
	M. Shigeta, K. Koyama and S. Isojima	241
Variation of Sperm Concentration in Multisemen Analysis	 T. Utsugi, Y. Nakajima & Y. Ibuki	250
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	254
Effect of Traditional Herbal Medicines on Cultured Hamster Epididymal Cells	 Y. Noda, S. Natsuyama & T. Mori	262
The Effects of Ethical Kanpos on the Culture of Hamster Epididymal Cells	 S. Natsuyama, T. Mori & Y. Noda	269
Endothelin-3 Stimulates Rat Ovarian Steroidogenesis	 S. Usuki	274
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	278

The Role of Growth Hormone in Ovarian Responsiveness to Gonadotropins	··· A. Takasaki, T. Kuramoto, K. Hiratuka & H. Morioka	285
Insulin Resistance in Nonobese Patients with Polycystic Ovary Syndrome	··· T. Utsunomiya, T. Taniguchi, A. Sadanaga, K. Iwasato, Y. Mizoguchi, S. Terawaki & T. Hidaki	291
Results of GIFT and ZIFT and the Improvement of Culture Condition	·········· E. Watanabe, N. Emi, J. Ishiko, Y. Noda & T. Mori	297
Effect of Human Recombinant Interleukins on in vitro Fertilization and Early Embryonic Development of Mouse	········ G. Yang, K. Matsuura, R. Honda, Y. Fukumatsu, T. Kawano & H. Okamura	305
Fitz-Hugh-Curtis Syndrome Verified with Laparoscopy: A Case Report	·········· K. Takeuchi & T. Iwabe	310
Conservative Treatment of Uterine Leiomyoma Using GnRH Agonist for a Woman with Hemodialysis: A Case Report	········ T. Kurabayashi, M. Yasuda, T. Fujimaki, Y. Yamamoto, K. Oda, H. Yoshizawa & K. Tanaka	315
Conservative Surgery for Unruptured Tubal Pregnancy	········ T. Ihimaru, A. Fujishita, N. Mahmud & T. Yamabe	319
Distribution of Complements and Complement Regulatory Factors in Chorion of Early Pregnancy	·········· K. Nishikiori	325
The Secretory Pattern of Growth Hormone and Relaxin in Human Pregnancy	·········· K. Seki, C. Miitsui & I. Nagata	332
The Influence of Artificial Abortion on Pregnancy and Delivery of Primipara Women	········ Z. Miyakawa, A. Shimizu, A. Taguchi, K. Tamura, M. Funatu, Y. Hada, T. Kimura & Y. Notake	336
The Benefits of Clinical Use of Transferring Cryopreserved-Thawed Early Embryos	········ S. Yamabe, S. Yamaguchi, K. Katayama, M. Mochizuki, K. Furukawa, M. Hayashi, S. Hayashi & K. Hayashi	340

(Vol. 38, No. 3, 1993)

Originals

Electrofertilization: A Trial to Use Electric Field in IVF	········ E. Maradny, T. Asahina, K. Kawaguchi & T. Terao	396
Poor Responder in ovarian stimulation for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer	········ H. Tobai, T. Okuno, K. Takahashi, T. Kojima & K. Sato	373
Should We Transfer Bad Quality Embryo Together with Good Ones to Increase the Number of Embryos Transferred and Pregnancy Rate in Turn ?	········ M. Tasdemir, I. Tasdemir, H. Kodama, J. Fukuda, T. Matsui, K. Sekine & M. Higuchi	377

The Study of Follicle Stimulation Methods with LH-RHa and hMG/FSH in In vitro Fertilization and Embryo Transfer	M. Hiroi, H. Saito, F. Sato, T. Shimizu, M. Ishikawa, K. Sengoku, Y. Yagami, S. Hanada, K. Ikuta, Y. Nagata, T. Dochi, A. Mori, M. Nakayama, T. Sakumoto & M. Sakugawa	381
Comparison of the Regimens with Gonadotropin Releasing Hormone Analog and Clomiphene Citrate for an In Vitro Fertilization and Embryo Transfer Program	S. Taga, N. Yoshida, K. Nishikori, Y. Hirano, T. Katayama, K. Nagoshi, K. Shintani, K. Shimizu & T. Kudo	387
Adrenergic Transmitter in the Oviduct of Rabbits during Egg Transport	S. Saito	392
Clinical Effects of Tosufloxacin to Chlamydia Trachomatis Cervicitis and PID	K. Takahashi, K. Shiota, H. Tobai, T. Okuno, T. Kojima, M. Izuta & K. Sato	400
Chlamydial Serology and Tubal Infertility	I. Tasdemir, M. Tasdemir, H. Kodama, J. Fukuda, T. Matsui, K. Sekine & M. Higuchi	405
Low dose Pure FSH Therapy for Polycystic Ovarian Syndrome	T. Oki, A. Mori, T. Douchi, & Y. Nagata	408
Treatment of GnRH Analogue-unresponsive Pelvic Endometriosis with Danazol	T. Tamaya, T. Ito, K. Wakita	415
Effectiveness of Low-dose Dopamine Treatment for Severe Ovarian Hyperstimulation Syndrome	T. Kawano, K. Matsuura, N. Tanaka, R. Honda & H. Okamura	423
Pharmacokinetics of Local Methotrexate Injection for the Treatment of Ectopic Pregnancy	M. Kusaka, I. Furuta, T. Fujino & S. Fujimoto	428
Reproductive Performances of Japanese Black Cows Carrying a 7/21 Robertsonian Translocation	H. Mori, M. Kosugiyama & Y. Shoda	433
Acrosin Profiles of Spermatozoa in Infertile Men with Varicocele	N. Sofikitis, I. Miyagawa & P. Zavos	437
A Clinical Survey of Male Infertility During the Recent 6.5 Years	S. Shirataki, H. Takihara, K. Kamada, T. Ueno, K. Ishizu, Y. Baba & K. Naito	441
Abarects [38th Annual meeting on Japan Society of Fertility and Sterility]		449

(Vol. 38, No. 4, 1993)

Originals

Changes of Cortical Granules in the Eggs of Mice, Rats, Hamsters and Rabbits after Fertilization	M. Hosoe, S. Niimura & K. Ishida	595
Effects of Nocodazole on the Developmental Ability of Mouse 2-cell Embryos In Vitro	Y. Kato & Y. Tsunoda	600

Effects of an Aniti-progesterone Agent (RU486) on Endometrial Proliferation at the Time of Embryo Implantation in Rabbits	T. Sankai, T. Endo, K. Kanayama & Y. Sakuma	605
Fertilization and Embryo Development of Human Oocytes after Zona Pellucida Opening	Y. Odawara, I. Tachibana, S. Chida, M. Hiruta, Y. Watanabe, S. Iida, S. Mori & M. Suzuki	612
Evaluation of Sperm Preparation Methods in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer for Male Infertility	K. Ikuta, N. Suzuki, M. Suzuki, H. Okada, K. Kaida, S. Hanada & Y. Yagami	618
Pharmacological Stimulation by Pentoxifylline to Improve Fertilizing Capacity of Spermatozoa in IVF	H. Kodama, J. Fukuda, T. Matsui, Y. Shimizu, M. Tasdemir, I. Tasdemir, K. Sekine, M. Ogawa, R. Namiki & T. Tanaka	624
The Significance of Luteal Support for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer Patients	O. Ishihara, J. Taya, Y. Iino, M. Saitoh & K. Kinoshita	629
A Clinical and Embryological Study of the Ketamine Anesthesia for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer	J. Shigematsu	635
A Comparison of Clomiphene/LH Surge and Clomiphene/HCG for Timing of AIH	I. Hasegawa, H. Murakawa & R. Fujimori	642
Outcome of Intrauterine Insemination Using Percoll Centrifugation Method and Sperm SurvivalRate	Y. Tamaoka, K. Kamei, H. Nakamura & K. Tanabe	647
Evaluation of the Effects of Hotyû-ekki-tô on Human Sperm Motility as Assessed by the Penetrak Test, Hypoosmotic Swelling Test and Computer-assisted Semen Analyzer	H. Shibahara, T. Shinotani & K. Ikuma	654
Innervation of the Adult Cat Fallopian Tube — Histochemical and Immunohistochemical Observations —	S. Miyajima	661
Analysis of Etiology and Therapy with SAIREI-TO of Habitual Abortion in Our Clinic	T. Kano, M. Furudono, K. Okuyama & M. Ishii	671
Incidence and Outcome of Pregnancy in the Infertile Patients with Hyperandrogenemia	H. Ota	680
Studies on the Pathogenesis of the HyperLH Syndrome by the Estimation of the PRL Secretion	H. Matsuguchi, G. Nakamura, M. Nozaki, M. Sano & H. Nakano	684
Studies with Endocrinological Characteristic of Hyper-LH Hypothalamic Anovulation and Effect of Bromocriptine Administration	K. Aisaka, H. Tsuzuki, Y. Toriya, K. Kokuho, S. Tamechika, H. Saitoh, K. Yoshida & H. Mori	688
Comparison of Concervative Surgery and Drug Therapy for Ectopic Pregnancy	A. Fujishita, T. Ishimaru, H. Masuzaki, T. Samejima, K. Nakamura, T. Matsuwaki, R. Ortega, T. Yamabe, H. Yamashita, T. Nakano & Y. Kase	694

Evaluation of Postoperative Adhesions Based on the A. F. S. Classification by Early Second Look Laparoscopy	S. Mori, H. Matsuguchi, M. Nozaki, M. Sano, G. Nakamura & H. Nakano	700
Clinical Evaluation of Sero IPALISA Chlamydia IgA · IgG®: a Diagnostic Agent of Antibodies for Chlamydia Trachomatis	K. Takahashi, S. Nagai, K. Shiota, H. Tobai, S. Nakajima, Y. Yamada, T. Kojima, M. Izuta & K. Sato	704
The Influence of Induced Abortion on the Course of Pregnancy and Delivery of Primipara Women: 2nd Report from 1991-1992 Annual Obstetrical Statistics of Fujigaoka Hospital	Z. Miyakawa, T. Kimura, K. Tamura, T. Hondou, S. Moriyama, Y. Hada, A. Shimizu & Y. Notake	709
Progressive Decline in Semen Characteristics and Testis Volume Over Time in Seven Cases of Untreated Varicocele	M. Yamamoto, Y. Tsuji, H. Hibi & K. Miyake	714
Effects of Caffeine and Pentoxifylline under the Prolonged Storage of Human Spermatozoa in a Refrigerator	H. Kannno, Y. Kinoshita, Y. Sekiguchi, K. Tanaka, K. Saito, K. Sato, A. Iwasaki & M. Hosaka	718
Clinical Study of Varicocele by Color Doppler Ultrasonography	S. Shirataki, H. Tskihara, K. Imoto, K. Kamada, K. Ishizu, Y. Baba & K. Naito	723
Influence of Osmolarity on the Motility of Human Spermatozoa	K. Saito, Y. Kinoshita, K. Sato, A. Iwasaki & M. Hosaka	729
A Case of Follicle-Stimulating Hormone-Secreting Pituitary Tumor with Postoperative Elevation of Sperm Count	T. Kazama, S. Oota, M. Iwasaki, A. Junichou, M. Sakamoto, H. Fuse, T. Katayama & T. Endo	734
Relationship Between Genital Tract Ureaplasma Infection and Unexplained Infertility	Y. Sato, T. Miyake & S. Oosawa	739
Impact of Cigarette Smoking on Human Reproduction: Its Effects on Female and Male Fecundity	P. M. Zavos, T. Toda, N. Sofikitis & I. Miyagawa	743

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理順とする。
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 3 名までとし、以下は他 (et al.) とする。誌名は規定または慣用の略名に従うこと。特に号数を必要とする場合は巻数とページ数との間に括弧で囲む、すなわち
著者名、題名、誌名 巻数 (号数)：ページ数、年次

- 例 1. Ovesen P, Christiansen JS, Moller J, et al., 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
2. 藤森 淑, 体外受精に関する培養液と微小環境培養法の基礎的・臨床的研究. 日不妊会誌 38: 53, 1993
- 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. McClure RD, Endocrine investigation and therapy. In: Tanago EA, Lue TF, McClure RD, eds, Contemporary Management of Impotence and Infertility. 1 ed, p222, Williams & Wilkins Co, 1988
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、受理順序によらず、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、〒102 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 4 号

1993年 9 月 24 日 印 刷

1993年 10 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