

2-29 ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 39 No.1

January
1994

日本不妊学会雑誌

第39巻 第1号

平成6年1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2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の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)午後から役員会，学術講演会

27日(木)学術講演会，評議員会，総会，総懇親会

28日(金)学術講演会

会 場：富山県民会館 〒930富山市新総曲輪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

学術講演会

本講演会では，特別講演，会長講演，教育講演，シンポジウム，ワークショップ，一般講演を行なう予定です。これらの詳細については追ってお知らせいたします。

一般講演は，口演発表とポスターに分かれ，一応ご希望を伺いますが，その選択は事務局にお任せ願います。多数のお申し込みをお待ちしています。ご応募の方は演題申し込み要領に従い，倫理面を十分に考慮して頂きたく存じます。演題の採否は会長にご一任願います。

I 特別講演「Fertilizing ability of mammalian spermatozoa: Its development and relativity」

柳町隆造(ハワイ大学教授)

II 会長講演

片山 喬(富山医科薬科大学泌尿器科教授)

III 教育講演 生殖医学の進歩シリーズ

1. 体外受精の現況と問題点

森 崇英(京都大学産婦人科教授)

2. 男子不妊症治療の現在の問題点

熊本悦明(札幌医科大学泌尿器科教授)

3. 性機能と調節因子

桑原惣隆(金沢医科大学産婦人科教授)

4. 哺乳動物胚の凍結・ガラス化保存

葛西孫三郎(高知大学農学部生物資源科学教授)

5. 精子成熟の場—精巣上体・構造からみる機能分化—

阿部和厚(北海道大学解剖学教授)

IV シンポジウム

1. 配偶子をめぐる最新の話—ニューテクノロジーによる研究—

司会：武谷雄二(東京大学産婦人科教授)

奥山明彦(大阪大学泌尿器科教授)

2. 着床をめぐる

司会：富永敏朗(福井医科大学産婦人科教授)

中村幸雄(杏林大学産婦人科教授)

V ワークショップ

精索静脈瘤—その妊孕性への影響—

司会：島崎 淳(千葉大学泌尿器科教授)

守殿貞夫(神戸大学泌尿器科教授)

VI 公開シンポジウム

不妊の漢方療法

司会：吉田英機(昭和大学泌尿器科教授)

青野敏博(徳島大学産婦人科教授)

VII 一般演題

演題申込み資格

講演者(共同発表者も含む)は本会会員に限ります。会員以外の方は演題申込みと同時に、1994年度会費(8,000円)を納入の上会員になって下さい。

演題申込み要領

1. 抄録の所定の抄録用紙にタイプまたはワープロでうち、書留郵便にて下記へお送り下さい。
〒930-01 富山県富山市杉谷2630
富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室内
第39回日本不妊学会総会事務局
2. 抄録は800字以内、図、表はつけないでください。
3. 別紙演題申込み書、受取書、採用通知書に所定の事項を記入して切手を貼り、抄録用紙(原本)および抄録用紙のコピー3部とともにお送りください。
4. 申込み締切日 1994年6月25日(土) (必着)

演題発表方法

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

参加申込み方法

学会当日会場にて受け付けます。

学会参加費 8,000円

懇親会費 8,000円

懇親会は、学術講演会第2日終了後に、富山第一ホテルにて行ないます。

1994年1月

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学教室内

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

公 告

平成5年度第2回通常総会において学会奨励賞の設置が可決承認された。
以下にその内容をお知らせする。

本会は「(社)日本不妊学会学術奨励賞」賞状と副賞を、授与することになった。

選考対象は、日本不妊学会雑誌各巻1～4号に掲載された原著論文で、その筆頭著者が掲載時満40歳以下のものに限る。

本学会の理事、評議員、大学教授、学会誌レフリーから、所定の書式による推薦を受けて、予備選考委員会および選考委員会でこの候補論文の中から3編の授賞論文を決定し、各々の筆頭著者に授与する。

副賞として各々に「日本不妊学会オルガノン学術奨励賞」賞状および記念品、学術奨励金50万円を授与する。

平成6年度日本不妊学会学術奨励賞について

日本不妊学会雑誌第38巻1～4号に掲載された原著論文で、その筆頭著者が掲載時に満40歳以下である論文を対象に、平成6年度日本不妊学会学術奨励賞の推薦を受け付けます。

推薦にあたり、所定の書式を(社)日本不妊学会事務局へご請求下さい。

(記載内容) 論文名 掲載された巻号頁
推薦理由 推薦者の署名捺印
筆頭著者の略歴

推薦は、平成6年4月30日(土)までに(社)日本不妊学会事務局へお送り下さい。

(お問い合わせ・書式請求・推薦書送付先)

〒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)日本不妊学会事務局

TEL. 03-3288-7266 (ファクシミリ兼用)

倫理委員会報告

代理母に関するアンケート調査報告

平成4年度倫理委員会

理事長：飯塚理八

委員長：高木繁夫

副委員長：入谷 明，島崎 淳

委員：久保春海，佐久間勇次，白井将文，広井正彦，穂坂正彦，
毛利秀雄，百瀬和夫，森 崇英，矢内原巧，津端捷夫

近年，代理母出産を海外において受ける不妊夫婦の話題が，マスコミ等に報道され，またこれを斡旋する業者が出現したとも言われる．このような情勢のもとで，その専門学会である日本不妊学会においても何らかの見解をもつための検討資料として，本学会の理事および評議員に対しアンケート調査を行った．また不妊症患者の意見を知るために，不妊治療中の夫婦に対しアンケート調査を行った．

1. 理事および評議員による回答の結果

平成4年8月，理事および評議員482名に対し表1のごときアンケートを発送し，215名より回答をえた(回答率44.6%)．

ホストマザーに関しては，これを肯定している者が40%，否定する者が59%に達し，否定する者の方が多い．さらにサロゲイトマザーに関しては肯定する者はわずか11.6%にとどまる(図1)．ホストマザーを肯定する主な理由は，夫婦にとって真の子どもである，唯一の方法である等である．一方これらの方法に反対する理由の主なものは，やはり倫理上の問題，法律上の問題，代理母の人権の問題などである(表2，表3)．

2. 不妊症夫婦による回答

平成4年7～8月，山形大学，慶應義塾大学，昭和大学，東邦大学，日本大学のそれぞれの附属病院に通院中の不妊症婦人およびその夫に対し表4，表5のアンケートへの回答を依頼し，総数921名の回答を得た．この内訳は夫は329名，妻が377名であった．ホストマザーに関しては，夫は43.3%で賛成，妻は49%で賛成．否定は夫が44.6%，妻が35%であり，したがってほぼ半数近くが賛成していることになる．しかしサロゲイトマザーに関しては，夫の70.5%，妻の67.8%で否定しているため，夫婦共に否定している者が多いと思われる．しかしこれに賛成するものも，夫で16.7%，妻で16.1%存在することにより，不妊の悩みの深刻さが窺われる(図2)．賛成・反対の理由については表6，7，8に示した．

表1 理事および評議員へのアンケート

平成4年8月1日		IV. 代理母出産には以下の2種類があります。これについてどの様に思われますか。ご意見とその理由をお書き下さい 方法1；夫と妻の受精卵を代理母の子宮へ移植する。	
日本不妊学会 理事長 倫理委員会委員長 飯塚理八 高木繁夫		賛成 理由1. 2. 3. 4. 5. 反対 理由1. 2. 3. 4. 5.	
最近是不妊領域に於ける治療法の進歩に目をみはるものがあり、不妊の夫婦に大きな福音をもたらしております。しかし一方では社会的、倫理的問題あるいは法的にみて、若干問題を残している領域があることも確かです。ことに、代理母出産に関しては、新聞その他のマスコミで報道され、この治療を受けるべく、すでに数組の不妊夫婦が渡米、渡韓したとさえ報道され、また昨年9月には国内にその斡旋業者がオープンしたともいわれれております。この様な情勢のもとでその専門学会である日本不妊学会でも何らかの見解をもつための検討をする必要があらうかと存じます。そこで理事および評議員各位のご見解を聴取し、検討の資料と致したく、下記のアンケートを実施することと致しました。無記名ですのでどうぞ忌憚のないご意見をお寄せ賜りますようお願い申し上げます。		方法2；夫の精子を代理母の子宮へ入れて受精させる。	
なお、勝手ながら8月末日までにご返送賜れば幸甚に存じます。		賛成 理由1. 2. 3. 4. 5. 反対 理由1. 2. 3. 4. 5.	
I. 先生の専門領域について 産婦人科・泌尿器科・獣医畜産・家畜繁殖・基礎医学・その他		V. その他、最近の不妊症治療に関してご意見がありましたらお書き添えください	
II. 先生の主な勤務先について 病院(開業・一般病院・大学病院) 大学医育機関 大学医学部以外の学部 その他			
III. 先生の年齢 歳			

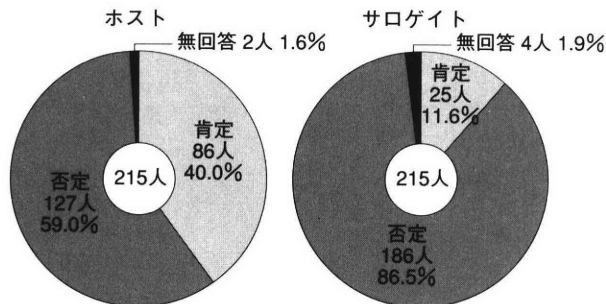


図1 不妊学会理事，評議員 (215人) の代理母出産に対する賛否

表2 ホストマザーに対する不妊学会理事および評議員にみる賛否の理由

賛成理由

1. 真の子供だから.	29 (人)
2. 嚴重な規律・法律を整えるなら.	25
3. 唯一の方法だから.	21
4. 当事者同士の同意の上で.	16
5. 代理母は機械的な役割. (臓器移植と同じ)	5
6. AIDの逆.	5
7. 代理母の人権が守られるなら.	5
8. 世界的にみて問題なし.	3
9. サロゲイトより良い	1
10. 倫理的にみて問題なし.	1
11. ボランティアとしてなら.	1
215人中 (重複回答含む)	

反対

1. 倫理上問題.	51 (人)
2. 法律上問題 (戸籍問題も含む).	21
3. 代理母とのトラブル.	20
4. 代理母の人権.	18
5. 営利目的になる恐れがある.	13
6. 真の子供ではない.	11
7. 代理母に反対.	9
8. 金で子供を作るべきではない.	8
9. 子供の将来を考えて.	7
10. 人は動物ではない.	4
11. 代理母より感染の可能性がある.	4
12. 母と子の関係に疑義.	3
13. 養子縁組みをすれば良い.	3
14. 代理母の妊娠時の環境に疑問.	3
15. 不妊症治療でない.	3
16. そこまでする必要があるのか?	3
17. 遺伝子学に問題がおこる.	3
18. AIDより問題.	2
19. AIDにも反対.	2
20. 近親婚.	1
21. 母が2人となるから.	1
22. 不妊の原因究明が先決.	1
23. 時期尚早.	1
215人中 (重複回答含む)	

表3 サロゲート・マザーに対する不妊学会理事および評議員にみる賛否の理由

賛成理由	(人)
1. 厳重な規律・法律を整えるなら.	9
2. 当事者同士の同意の上で.	9
3. AIDの逆.	8
4. 唯一の方法だから.	4
5. 世界的にみて問題なし.	3
6. 代理母の人権が守られるなら.	2
7. 代理母は機械的な役割. (臓器移植と同じ)	1
<hr/> 215人中(重複回答含む)	
反対理由	(人)
1. 真の子供ではない.	50
2. 倫理上問題.	48
3. 法律上問題(戸籍問題も含む).	18
4. 代理母とのトラブル	16
5. AIDより問題.	13
6. 代理母の人権.	13
7. 代理母に反対.	12
8. 不妊症治療でない.	9
9. AIDにも反対.	9
10. 母と子の関係に疑義.	8
11. 養子縁組みをすれば良い.	7
12. 子供の将来を考えて.	7
13. 営利目的になる恐れがある.	6
14. そこまでする必要があるのか?	6
15. 金で子供を作るべきではない.	5
16. 方法1(ホストマザー)より悪い.	5
17. 妾腹の子を実子と欺瞞する.	5
18. 妻の立場を考えて.	5
19. 遺伝子学に問題がおこる.	5
20. 近親婚.	3
21. 代理母の妊娠時の環境に疑問.	3
22. 代理母より感染の可能性がある.	2
23. 奇形児が産まれた場合の責任問題.	2
24. 母が2人となるから.	1
25. 人は動物ではない.	1
26. 未婚の母に悪用される.	1
27. 不妊の原因究明が先決.	1
28. 時期尚早.	1
<hr/> 215人中(重複回答含む)	

表4 不妊治療中の夫婦へのアンケート

【子供の欲しい方へのアンケートのお願い】

夫の立場からみたお答え

「結婚後何年経っても子供ができない」ということは、夫婦の寂しい気持ちは勿論のこと、両親や周囲から「まだか」等と云われ、その悩みは大変なことと思います。そこで不妊に悩む皆様の気持ちを以下のアンケートで調査したいと存じます。無記名ですのでどうぞ忌憚のないご意見をお聞かせ下さい。

(尚、該当する項目には○印を、 には数字や意見をご記入下さい)

I. 現在の年齢 歳 妻の年齢 歳 結婚後 年経過

II. あなた方夫婦は今までに妊娠したことがありますか

ある 回 自然流産 回 人工流産 回
 早産 回 出産 回
 なし

III. 子供が出来ない理由は何と云われましたか

私に原因がある。

妻に原因がある (無排卵あるいは卵巣機能に異常がある・卵管がつまっている・子宮
 筋腫がある・頸管粘液の分泌が悪い)

原因がわからない

IV. 体外受精によるしか子供が出来ないといわれた時どうしますか

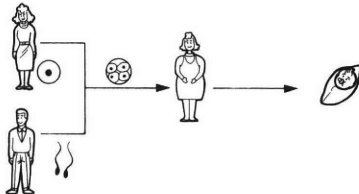
行う・行いたくない(その理由)

V. 体外受精により多くの受精卵が得られた場合には「凍結保存」して2～3ヵ月後に子宮の中にもどすことを行っていますが、あなたならどうしますか

行いたい・行いたくない(その理由)

VI. 最近、代理母出産が話題になることがあります。代理母出産には以下の2種類があります。これについてどう思いますか

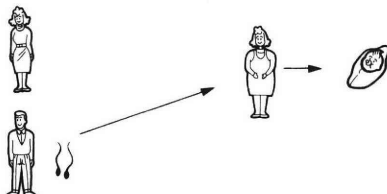
方法1；夫と妻の受精卵を代理母の子宮へ移植する。



よいと思う(理由)

わるいと思う(理由)

方法2；夫の精子を代理母の子宮へ入れて受精させる。



よいと思う(理由)

わるいと思う(理由)

表5 不妊治療中の夫婦へのアンケート

【子供の欲しい方へのアンケートのお願い】

妻の立場からみたお答え

「結婚後何年経っても子供ができない」ということは、夫婦の寂しい気持ちは勿論のこと、両親や周囲から「まだか」等と云われ、その悩みは大変なことと思います。そこで不妊に悩む皆様の気持ちを以下のアンケートで調査したいと存じます。無記名ですのでどうぞ忌憚のないご意見をお聞かせ下さい。

(尚、該当する項目には○印を、 には数字や意見をご記入下さい)

I. 現在の年齢 歳 夫の年齢 歳 結婚後 年経過

II. 今まで妊娠したことがありますか

ある 回 自然流産 回 人工流産 回
早産 回 出産 回

なし

III. 子供が出来ない理由は何と云われましたか

夫に原因がある。

私に原因がある (無排卵あるいは卵巣機能に異常がある・卵管がつまっている・子宮筋腫がある・頸管粘液の分泌が悪い)

原因がわからない

IV. 体外受精によるしか子供が出来ないといわれた時どうしますか

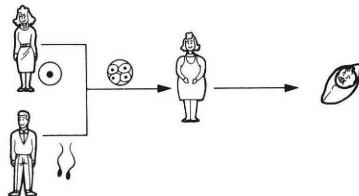
行う・行いたくない(その理由)

V. 体外受精により多くの受精卵が得られた場合には「凍結保存」して2～3ヵ月後に子宮の中にもどすことを行っていますが、あなたならどうしますか

行いたい・行いたくない(その理由)

VI. 最近、代理母出産が話題になることがあります。代理母出産には以下の2種類があります。これについてどう思いますか

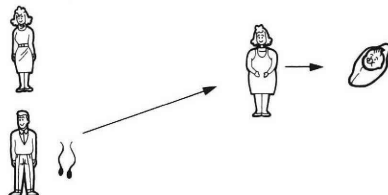
方法1；夫と妻の受精卵を代理母の子宮へ移植する。



よいと思う(理由)

わるいと思う(理由)

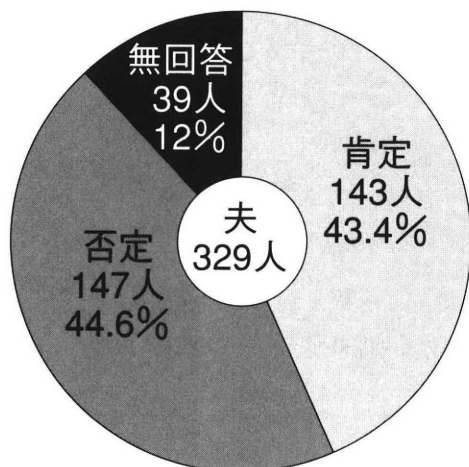
方法2；夫の精子を代理母の子宮へ入れて受精させる。



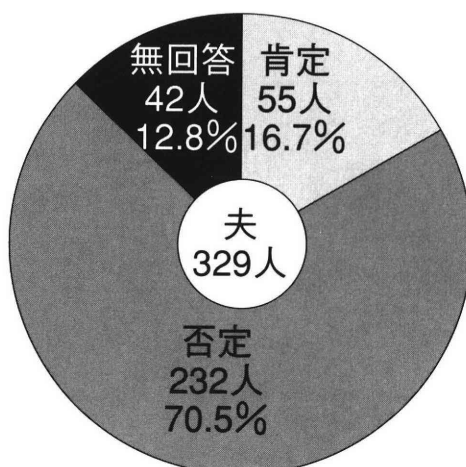
よいと思う(理由)

わるいと思う(理由)

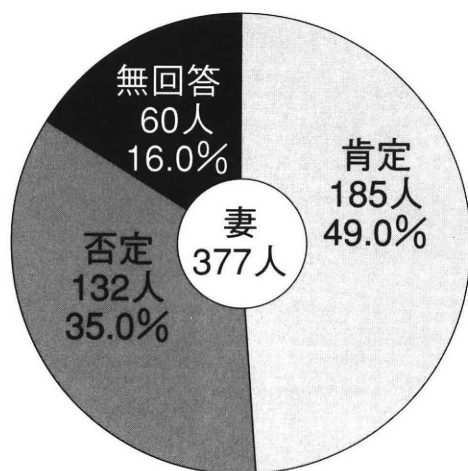
ホスト



サロゲイト



ホスト



サロゲイト

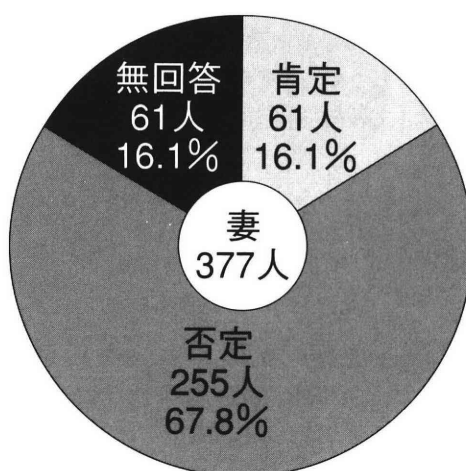


図2 不妊症患者夫婦の代理母出産に対する賛否

表6 夫からの代理母に対する賛成理由と反対理由

ホスト・マザー

賛成理由

1. 真の子供だから.	40(人)
2. 唯一の方法だから.	24
3. 子供が欲しいから.	12
4. 当事者同志の同意の上.	10
5. 営利的でなければ.	4
6. 妻が子供を産めないから.	1
<hr/>	
329人中	
(重複回答含む)	

反対理由

1. 真の子供でない.	9
2. 代理母とのトラブル.	8
3. 母が2人となるから.	3
4. 倫理上問題.	28
5. 他人の体を借りてまで行いたくない.	27
6. 法律上問題.	1
7. 養子縁組みをすればよい.	1
8. 営利目的になる恐れがある.	3
9. とにかく代理母に反対.	6
10. 母と子の関係に疑義.	3
11. 代理母の人権問題.	1
<hr/>	
329人中	
(重複回答含む)	

サロゲート・マザー

賛成理由

1. 唯一の方法だから.	16
2. 当事者同志の同意の上.	9
3. 子供が欲しいから.	6
4. 真の子供だから.	1
5. 妻が子供を産めないから.	1
6. 営利的でなければ.	1
<hr/>	
329人中	
(重複回答含む)	

反対理由

1. 真の子供でない.	70
2. 倫理上問題.	27
3. 他人の体を借りてまで行いたくない.	19
4. 夫婦愛がないから.	8
5. 代理母とのトラブル.	7
6. とにかく代理母に反対.	4
7. 母と子の関係に疑義.	4
8. 法律上問題.	2
9. 養子縁組みをすればよい.	2
10. 営利目的になる恐れがある.	?
<hr/>	
329人中	
(重複回答含む)	

表7 妻からの代理母に対する賛成理由と反対理由

ホスト・マザー

賛成理由

1. 真の子供だから.	60(人)
2. 唯一の方法だから.	48
3. 当事者同志の同意の上.	24
4. 自分が子供を産めないから.	11
5. 子供が欲しいから.	10
6. 営利的でなければ.	1
<hr/>	
377人中	
(重複回答含む)	

反対理由

1. 他人の体を借りてまで行いたくない.	49(人)
2. 代理母とのトラブル.	15
3. 倫理上問題.	14
4. とにかく代理母に反対.	9
5. 母と子の関係に疑義.	6
6. 代理母の人権問題.	6
7. 真の子供でない.	5
8. 養子縁組みをすればよい.	2
9. 母が2人となるから.	1
10. 営利目的になる恐れがある.	1
<hr/>	
377人中	
(重複回答含む)	

サロゲート・マザー

賛成理由

1. 当事者同時の同意の上.	18(人)
2. 唯一の方法だから.	17
3. 自分が子供を産めないから.	5
4. 子供が欲しいから.	5
5. AIDと同じ.	3
6. 真の子供だから.	2
7. 営利的でなければ.	1
<hr/>	
377人中	
(重複回答含む)	

反対理由

1. 真の子供でない.	114(人)
2. 母と子の関係に疑義.	34
3. 他人の体を借りてまで行いたくない.	28
4. 倫理上問題.	21
5. 代理母とのトラブル.	16
6. 養子縁組みをすればよい.	10
7. とにかく代理母に反対.	8
8. 夫婦愛がないから.	4
9. 代理母の人権問題.	4
10. 営利目的になる恐れがある.	2
11. 法律上問題.	1
<hr/>	
377人中	
(重複回答含む)	

表8 代理母出産に対する夫婦愛の無回答例におけるコメント

1. 不妊症でない人に賛否を簡単に言ってほしくない.
2. 真の子供と思えるかわからない.
3. ホストの気持ちを考えるとわからない.
4. その立場になったら考える.
5. 現状把握が不十分.
6. 悪いと思わないが, 自分は希望しない.
7. 真剣に考えたことがない.

日本不妊学会誌

第39巻 第1号

平成6年1月1日

—目 次—

原 著

微小穿刺法によるラット精細管および精巢上体管における

- ^3H -アンドロゲン経上皮性移行の特異性に関する検討 (英文) 山本雅憲・他 1
- 鼠経部子宮内膜症の一例 (英文) 塩谷雅英・他 6
- 日本人を対象とした精巢容積と精巢機能との関係 白瀧 敬・他 10
- 40歳以上の婦人に対する IVF-ET の成績 山下正紀・他 17
- 機能性不妊症の不育症因子の検討 假野隆司・他 23
- 内分泌不妊外来受診患者に対するホルモンスクリーニング検査の
有用性に関する検討 石原 理・他 32
- Klinefelter 症候群の臨床的検討 天野俊康・他 37
- マウス子宮平滑筋スキンドファイバー標本による細胞内 Ca ストアーの証明 (英文) .. 金山喜一・他 42
- 高濃度 Ficoll 溶液を用いたウシ精子運動性検査 (英文) 末次恭子・他 46
- 不妊夫婦の血中抗クラミジア抗体 大橋一友・他 49
- 不妊症患者における血清抗 *Chlamydia trachomatis* 抗体の陽性率
——新しい測定法であるヒタザイム法 (ELISA) を用いて—— 山本 弘・他 53
- ウサギ培養卵管上皮細胞のマウス初期胚に対する発育効果 川島夕美 59
- ブタ卵母細胞の体外成熟に及ぼす卵丘細胞の影響 (英文) 亀山祐一・他 66
- 各種 Gonadotrophin および合成 LH-RH の排卵誘起力を指標にした
マウス, ラット, アフリカツメガエル間の鋭敏度の比較 (英文) 信永利馬・他 70
- 子宮内膜症患者における腹水量および性状の検討 西村 弘・他 78
- 抗カドヘリン抗体処置マウス胚の割球接合に関する形態学的研究 (英文) 四谷伊公子・他 84
- 囊胞腎に精管末端部および精囊の囊状拡張を合併した2例 中角尚誉・他 90
- Ca イオノフォアによる先体反応誘起率の減少と体外受精における
受精障害との関係 (英文) ムラト・タシユデミル・他 96
- 男性および女性不妊患者の保有する抗精子抗体と反応する
精子抗原の検出 (英文) イシュク・タシユデミル・他 101
- 地方部会抄録 106

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 39, No. 1, 1994)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Specificity of Transepithelial Movement of ^3H -Androgen in Rat Seminiferous
and Caput Epididymal Tubules Examined by in Vivo Microperfusion
and in Vivo Micropuncture M. Yamamoto, Y. Tsuji,
H. Hibi & K. Miyake 1
- Endometriosis of the Groin: A Case Report M. Shiotani, Y. Noda, K. Narimoto,
M. Kinoshita, Y. Nanbu,
S. Kanaya & T. Mori 6
- Correlation of Testicular Size with Testicular Function in Japanese Males S. Shirataki,
H. Takihara, K. Kamada, T. Ueno,
K. Ishizu, Y. Baba & K. Naito 10
- Results of In vitro Fertilization in Women Over 40 Years of Age M. Yamashita,
P. Kyong-Rim, K. Morita, M. Nonogaki,
T. Hoshino, N. Okamoto, H. Shimada,
Y. Ono, M. Ikeuchi, E. Takashima
& K. Tatsumi 17
- A Study of Factors Associated with Habitual Abortion in Patients with Unexplained Infertility
..... T. Kano, M. Furudono,
K. Okuyama & M. Ishii 23
- Efficacy of Hormonal Screening Tests for the Patients with Menstrual Disorder or Infertility
..... O. Ishihara, Y. Ihno, M. Saitoh,
S. Takeda & K. Kinoshita 32
- A Clinical Study on Klinefelter's Syndrome T. Amano, S. Tokunaga,
T. Uchibayashi & M. Ohkawa 37
- Detecting the Intracellular Ca Store in Chemically Skinned Uterine Smooth Muscle Fibers in Mice
..... K. Kanayama, K. Nariai, T. Endo,
Y. Sakuma & K. Yabe 42
- Evaluation of Bovine Sperm Motility Using Ficoll Solution in High Concentration K. Suetsugu,
K. Miyazawa, K. Ohsaki, K. Sato,
T. Matsuzawa, S. Matsuzaki & C. Nakano 46
- Serological Diagnosis of Chlamydia Trachomatis Infection in Infertile Couples K. Ohashi,
F. Saji, T. Tomiyama, T. Tsutsui,
O. Tanizawa, M. Horikawa & N. Amino 49

Prevalence of Serum Anti-Chlamydia Antibodies in Infertile Patients	H. Yamamoto, H. Fukue, S. Mori, Y. Inoue, T. Kiya, M. Kanaya, M. Fujii, T. Endo, S. Tanaka & R. Kudo.....	53
Effects of Cultured Rabbit Oviduct Cells on the Development of Early Mouse embryos	Y. Kawashima.....	59
Effect of Cumulus Cells on <i>In Vitro</i> Maturation of Pig Oocytes	Y. Kameyama & Y. Ishijima.....	66
Comparison of Sensitivity of Mice, Rats and <i>Xenopus Laevis</i> to Ovulation-Inducing Gonadotrophins and Synthetic LH-RH	T. Nobunaga, X. Guo & S. Inoue.....	70
Analysis of Peritoneal Fluid in Women with Endometriosis	H. Nishimura, K. Matsuura, R. Honda, N. Tanaka, T. Kawano, K. Yo & H. Okamura.....	78
Morphological Studies on Blastomere Binding in Anti-Cadherin Antibody-Treated Mouse Embryos	I. Yotsutani, S. Niimura & K. Ishida.....	84
Two Cases of Cystic Dilatation of Terminal Vasa and Seminal Vesicles Associated with Polycystic Kidney	H. Nakazumi, I. Maehara, S. Orikasa, A. Hasuda, M. Takahashi & M. Hiramatsu.....	90
Lack of Calcium Ionophore (A23187) Induced and Inducible Acrosome Reactions Correlates with Fertilization Failure In Vitro	M. Tasdemir, I. Tasdemir, H. Kodama, J. Fukuda, K. Sekine & T. Tanaka.....	96
Identification of Sperm Antigens Reacting with Antisperm Antibodies in Sera from Infertile male and Female Patients	I. Tasdemir, M. Tasdemir, J. Fukuda, H. Kodama, K. Sekine & T. Tanaka.....	101

SPECIFICITY OF TRANSEPITHELIAL MOVEMENT OF ^3H -ANDROGEN IN RAT SEMINIFEROUS AND CAPUT EPIDIDYMAL TUBULES EXAMINED BY IN VIVO MICROPERIFUSION AND IN VIVO MICROPUNCTURE

Masanori YAMAMOTO, Yoshikazu TSUJI, Hatsuki HIBI
and Koji MIYAKE

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

Abstract: Proluminal movement of ^3H -testosterone from peritubular space to intratubular fluids of the adult rat testis and epididymis was studied by using in vivo microperifusion and subsequent micropuncture of seminiferous tubules and caput epididymal tubules. Tubules were perfused with Minimum Essential Medium containing ^3H -testosterone. To determine if androgen movement is saturable, 40, 80, 160, and 320 μCi ^3H -testosterone were included in the perfusion fluid. Radioactivity of ^3H -androgens in the intraluminal fluids was determined at 1 hour after perfusion. Transepithelial ^3H -androgen movement in the testis was linear ($r=0.64$, $p<0.001$, $y=0.27x-4.7$). The movement of ^3H -androgen across the epididymal epithelium was saturable (V_{\max} of 326.7 nM and K_m of 396 nM). To determine the effect of estradiol on proluminal androgen movement, estradiol at 10 times the concentration of ^3H -testosterone was incorporated in the perfusion fluid. Androgen uptake in the epididymal tubules was not affected by addition of estradiol to the perfusion fluid. These findings support our previous observations that proluminal transepithelial movement of ^3H -androgens in the epididymis could be mediated by its binding to specific intraluminal androgen binding protein (ABP).

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 1 - 5 , 1994)

Introduction

The mammalian testis and epididymis provide an important environment for spermatogenesis and maturation of spermatozoa¹⁾. The principal components of this environment are androgens which play an essential role in the regulation of spermatogenesis and controlling the epididymal metabolism and epididymal epithelial secretion^{1,2,3)}. However, there is little resolution about local mechanisms that regulate androgen movement across the seminiferous epithelium. It has been recently demonstrated that by using in vivo microperifusion followed by micropuncture transepithelial movement of ^3H -androgen in the epididymal tubules occurs against a concentration gradient⁴⁾ and is subject to competitive inhibition⁵⁾. It has also been revealed that ^3H -androgen movement

across the caput epididymal epithelium is completely returned to normal in the hypophysectomized rat supplemented with FSH or LH⁶⁾. It was therefore hypothesized that intraluminal ABP is an important factor in maintaining transepithelial androgen movement in the epididymis⁶⁾. The objective of this study is to determine whether or not proluminal androgen movement across the seminiferous tubules and epididymal tubules is altered by various concentrations of ^3H -testosterone in the intertubular compartments and to determine if proluminal antigrade movement of ^3H -androgen into the caput epididymal lumen is affected by addition of estradiol to the perfusion fluid.

Materials and Methods

Rats

Adult male Sprague-Dawley rats (440-670g;

Dominion, Dublin, VA) were maintained in a constant temperature (22°C), constant humidity (50%) vivarium on a 12 hr:12hr light:dark cycle. Food and water were available ad libitum. They were allowed to acclimate after shipment for at least one week before experimental use.

Isotopes

The following isotopes were purchased from New England Nuclear (Boston, Massachusetts): ^3H -testosterone (specific activity: 55.2 Ci/mmol, M.W. 288.4) and ^{14}C -polyethyleneglycol (^{14}C -PEG; specific activity: 15.0 mCi/g, M.W. 4000).

In vivo microperfusion and micropuncture

The animals were anesthetized with Inactin (sodium 5-ethyl-5-(1-methylproryl)-2-thiobarbiturate, Byk Guilden Konstanze, Hamburg, Germany; 100mg/kg body weight) and prepared for *in vivo* microperfusion and micropuncture of reproductive tract tubules as previously described⁴⁾. Briefly, a testis and epididymis were exteriorized in a 35°C testicle holder and stabilized in 2% agar. A small area of the immobilized testis or epididymis was exposed and covered with mineral oil. The tubules were perfused *in vivo* through a 100 μm tip micropipette inserted through the tunica albuginea. The perfusion fluids were lissamine-green dyed Minimum Essential Medium (MEM; pH 7.0-7.4; Gibco Laboratories, Grand Island, NY) containing 13.3, 26.7, 53.3, and 106.7 μCi ^3H -testosterone/ml (240, 480, 960, and 1920 nM testosterone, respectively) and 1.3 μCi ^{14}C -PEG/ml.

To determine the effect of estradiol on proluminal androgen movement into the caput epididymal tubules, perfusion fluid containing MEM, 26.7 μCi ^3H -testosterone/ml and 1.3 μCi ^{14}C -PEG/ml was supplemented with 4800 nM estradiol (10 times the concentration of ^3H -testosterone) or with 1% ethanol. Estradiol was dissolved in 1% ethanol. Priming and sustaining perfusion rates for the seminiferous and caput epididymal tubules were as previously described⁴⁾.

Intraluminal fluids and adjacent interstitial fluids (perfusion fluid remaining in the peritubular space) were collected by micropuncture at 1 hour after initiation of the sustaining perfusion in the experiment using perfusion fluid containing radiolabelled com-

pounds alone. The perfusion continued for 1 or 2 hours and fluids were collected from the epididymal interstitial space and lumen at 1 and 2 hours after perfusion in the experiment using perfusion fluid containing radiolabelled compounds with ethanol or estradiol plus ethanol. Cell free fluids were obtained by centrifugation and aliquanted as previously described⁷⁾. Each fluid sample was analyzed in triplicate for ^3H and ^{14}C radioactivity.

Analysis of data

Net proluminal movement of isotope into the caput epididymal tubules in the experiment using perfusion fluid supplemented with ethanol or ethanol plus estradiol was calculated described below. Since ^{14}C -PEG is essentially excluded by the blood-testis and blood-epididymal barrier⁴⁾ it was included in the perfusion fluid as a marker for contamination of seminiferous or epididymal tubule fluid by blood or interstitial fluid. The proportion of interstitial ^{14}C -PEG found in intraluminal fluid was considered as contamination from the extratubular compartment and was subtracted from the proportion of ^3H -androgen entering the intraluminal fluid. After correction for background, the counts per minute (CPM) of ^{14}C - and ^3H -50 nl of each intraluminal fluid was divided by the CPM/same volume of interstitial perfusion fluid collected at the same time period. The quotient was multiplied by 100 so that the final data reflect the percentage of peritubular isotope concentration appearing in intraluminal fluid.

Chauvenet's criterion⁸⁾ was applied to all the data. Where appropriate, the data were analyzed by an one-way analysis of variance, followed by Duncan's multiple range test. Statistical analysis between the control and treated groups was done by Wilcoxon Rank-Sum test. A p value of 0.05 or less was considered significant.

Results

While ^3H -testosterone was the steroid perfused around the intertubular space, it is known that ^3H -testosterone can be partially converted to ^3H -dihydrotestosterone or other ^3H -non polar molecule over the time course of the experiment^{4,7)}; thus we subsequently refer to ^3H -androgen (s) in the various fluids rather than ^3H -testosterone, per se.

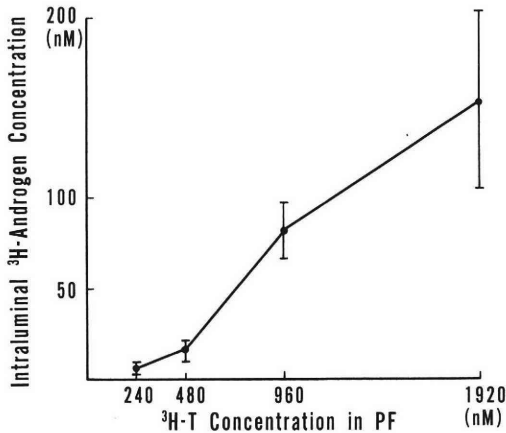


Fig. 1 Intraluminal ^3H -androgen concentrations in the seminiferous tubule lumen in the presence of various concentrations of ^3H -testosterone (^3H -T) in the perfusion fluid (PF). Each value is the mean \pm SEM of $n=9$ animals. These values were increased in linear fashion ($r=0.64$, $y=0.27x-4.7$, $p<0.001$).

Intraluminal ^3H -androgen concentrations in the seminiferous tubules were linear ($r=0.64$, $p<0.001$, $y=0.27x-4.7$) (Figure 1). Intraluminal ^3H -androgen concentrations reached approximately 156 nM at highest concentration of ^3H -testosterone in the perfusion fluid (Figure 1). Intraluminal ^3H -androgen concentrations in the caput epididymal tubules were shown to be via a saturable movement system (Figure 2). They were significantly higher than those in the seminiferous tubules at each ^3H -testosterone concentration in the perfusion fluid ($p<0.05$). The apparent K_m and V_{max} values were approximately 396 nM and 326.7 nM (Figure 2).

Intraluminal ^3H -androgen concentrations reached approximately 300% of interstitial androgen concentrations in the caput epididymal tubules (Figure 3). Proluminal movement of ^3H -androgen into the caput epididymal tubules was not inhibited by addition of 1% ethanol or 4800 nM estradiol dissolved in 1% ethanol to the perfusion fluid (Figure 3). In control and treated groups, movements of ^3H -androgen across the epididymal epithelium were not significantly different between 1 and 2 hrs (Figure 3).

Discussion

The present study has demonstrated that movement of ^3H -androgen across the seminiferous tubules is ele-

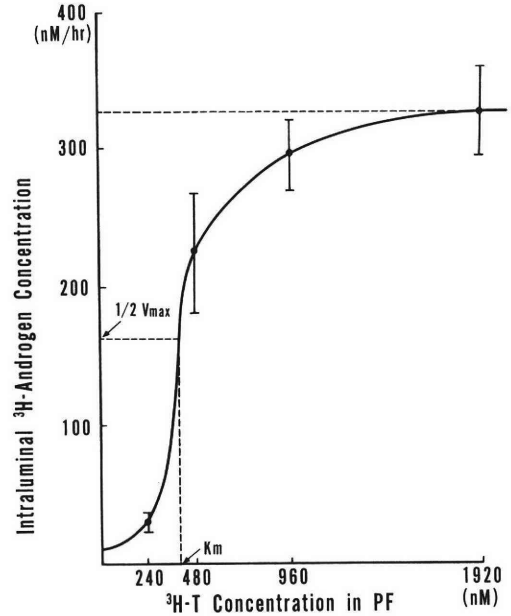


Fig. 2 Saturation curves of intraluminal ^3H -androgen concentrations in the caput epididymal lumen in the presence of various concentrations of ^3H -testosterone (^3H -T) in the perfusion fluid (PF). Each value is the mean \pm SEM of $n=9$ animals. The apparent K_m and V_{max} values were calculated from graph.

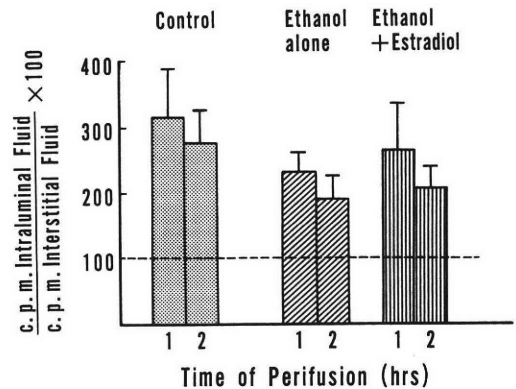


Fig. 3 Net proluminal movement of H-androgens into the caput epididymal tubules at 1 and 2 hrs after exposure of perfusion fluid or perfusion fluid with 1% ethanol or 4800 nM estradiol dissolved in 1% ethanol. The dotted line indicates the value for equilibrium between interstitial and intraluminal isotope concentrations. Results are compared to control and are expressed as percentage of peritubular ^3H -androgen appearing in intraluminal fluid. Each value is the mean \pm SEM of $n=8$ animals.

vated in linear fashion when ^3H -testosterone concentration in the perfusion fluid is increased, but intraluminal androgen concentration at highest perfusion ^3H -testosterone concentration was 156 nM which was significantly lower than that in the caput epididymis. Turner et al. demonstrated that there was relatively minor proluminal movement of the ^3H -androgen into the seminiferous tubule lumen⁴⁾. Intraluminal ^3H -androgen concentrations in the seminiferous tubule reach approximately 10-20% of peritubular ^3H -androgen concentrations⁴⁾. More recently they have reported that this movement was not inhibited by competition with unlabelled testosterone⁵⁾. These results and our present data are consistent with simple diffusion of free androgen across the seminiferous epithelium as previously reported⁹⁾. The restriction of ^3H -androgen movement into the seminiferous tubule is due to binding of androgen in the seminiferous epithelial cells, thus trapping some portion of total androgen available for diffusion into the lumen⁴⁾. Intraluminal ^3H -androgen concentrations in the seminiferous tubule was variable (Figure 1). The possible explanation of this result is that degrees of binding of ^3H -androgen to ABP in the seminiferous tubule lumen is considerably heterogeneous and this variability is related to the different stages of the cycle of the spermatogenesis¹⁰⁾.

The findings from the present study on transepithelial movement of ^3H -androgens in the caput epididymis indicate the intraluminal ^3H -androgen concentrations are saturable when 240, 480, 960, and 1920 nM ^3H -testosterone are introduced into the intertubular space. At 1 hour after initiation of the sustaining perfusion of 480 nM ^3H -testosterone, intraluminal ^3H -androgen concentrations were approximately 225 nM which was 15 times concentration of seminiferous tubule lumen fluid (Figure 1 and 2).

Cooper and Waites¹¹⁾ and Cooper¹²⁾ have investigated factors affecting transepithelial movement of androgens in the cauda epididymis of rats and has shown that the presence and nature of proteins in the cauda lumen may influence the partition of infused steroids between blood, epithelium, and lumen. Turner et al. reported that androgen movement across the epididymal epithelium, but not the seminiferous

epithelium, was against a concentration gradient and was subject to competitive inhibition.⁵⁾ More recently, we have demonstrated that proluminal ^3H -androgen movement into the caput epididymis is completely restored by replacement of FSH in the hypophysectomized rats.⁶⁾ Additionally, present study has shown that proluminal androgen movement into the epididymal lumen is via a saturable process when perfused ^3H -testosterone concentrations are increased. Thus, our previous work and our present data suggest that a mechanism underlying epididymal androgen uptake may be due to simple diffusion of androgen across the epithelium and its binding to intraluminal ABP which is known to be secreted by Sertoli cells after stimulation by FSH¹³⁾.

In the present study, proluminal movement of ^3H -androgens in the caput epididymis was not inhibited by addition of estradiol at 10 times concentration of ^3H -testosterone to the perfusion fluid. This result suggests that estradiol has no competitive effect on proluminal androgen movement in the epididymis and possible binding of estradiol to the interstitial protein can not enhance availability of interstitial ^3H -androgens to the intraluminal compartment in the epididymis. Estrogen receptors are present in the rat epididymis and they may primarily influence the synthesis of proteins by the epididymis which are secreted into the lumen where they may, in turn, interact with spermatozoa¹⁴⁾. Antigrade proluminal androgen movement in the epididymis is not dependent on the presence of spermatozoa in the epididymal lumen⁵⁾. Therefore, present results confirmed that transepithelial movement of ^3H -androgens in the epididymis is not mediated by estrogen receptors.

At this time there are several important questions that remain to be answered concerning transepithelial movement of androgens in the testis or epididymis: (1) Is proluminal androgen movement into the epididymal lumen energy-dependent, (2) Is intraluminal differential androgen compartmentalization in the testis and epididymis due to different degrees of androgen binding in the testicular and epididymal interstitial space, (3) Is androgen binding events in the caput epididymal epithelium involved in the movement of androgens across the epithelium?

Experiments to elucidate above issues are currently

underway.

References

- 1) Orgebin-Crist MC, Danzo BJ and Davies J, Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology Vol V, Male Reproductive System. P319, American Physiological Society, 1975
- 2) Brooks DE, Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol Rev* 61: 515, 1981
- 3) Robaire B and Hermo L, Efferent ducts, epididymis and vas deferens: Structure, functions and their regulation. In: The Physiology of Reproduction. Vol 1, P999, Raven Press, 1988
- 4) Turner TT, Transepithelial movement of ^3H -androgen in seminiferous and epididymal tubules: a study using in vivo micropuncture and in vivo microperfusion. *Biol Reprod* 39: 399, 1988
- 5) Turner TT, Jones CE and Roddy MS, On the proluminal movement of ^3H -androgens across the rat epididymal epithelium. *Biol Reprod* 40: 143, 1989
- 6) Yamamoto M and Turner TT, Proluminal movement of ^3H -androgen across the epididymal epithelium in the rat after hypophysectomy and gonadotropin supplementation. *Biol Reprod* 41: 474, 1989
- 7) Turner TT, Cochran RC and Howards SS, Transfer of steroids across the hamster blood-testis barrier and blood-epididymal barriers. *Biol Reprod* 25: 342, 1981
- 8) Worthing AG and Geffner J, Treatment of Experimental Data. P76, Wiley & Sons Inc, 1943
- 9) Turner TT, Jones CE, Howards SS, et al., On the androgen microenvironment of developing spermatozoa. *Endocrinol* 115: 1925, 1984
- 10) Ritzen EM, Boitani C, Pavinen M, et al., Stage dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. *Mol Cell Endocr* 25: 25, 1982
- 11) Cooper TG and Waites GMH, Factors affecting the entry of testosterone into the lumen of the cauda epididymidis of the anaesthetized rat. *J Reprod Fert* 56:165, 1979
- 12) Cooper TG, The general importance of proteins and other factors in the transfer of steroids into the rat epididymis. *Int J Androl* 3: 333, 1980
- 13) Hansson V, Weddington SC, French FS et al., Secretion and role of androgen binding proteins in the testis and epididymis. *J Reprod Fert* 24(suppl): 17, 1976
- 14) van Beurden-Lamers WMO, Brinkmann AL, Mulder E et al., High affinity binding of estradiol-17 beta by cytosols from testis interstitial tissue, pituitary, adrenal, liver and accessory sex glands of the male rat. *Biochem J*, 140: 495, 1974

微小穿刺法によるラット精細管 および精巢上体管における ^3H -アンドロゲン 経上皮性移行の特異性に関する検討

名古屋大学医学部泌尿器科学教室

山本雅憲 辻 克和 日比初紀
三宅弘治

微小かん流法と微小穿刺法を用いて、ラット精巢および精巢上体における、 ^3H -テストステロンの管外から管内への移行を検討した。精細管および精巢上体管周囲を ^3H -テストステロンを含むMEMでかん流した。アンドロゲン移行が飽和性か否かを検討する目的で、40, 80, 160, 320 μCi の ^3H -テストステロンをかん流液中に加えた。管内液中の ^3H -アンドロゲンの放射活性をかん流開始1時間後に測定した。精巢における、経上皮性の ^3H -アンドロゲン移行は直線性であった($Y=0.27X-4.7$)。一方精巢上体における経上皮性アンドロゲン移行は、飽和性であった($V_{\max}=326.7\text{ nM}$, $K_m=396\text{ nM}$)。エストラジオールの経上皮性アンドロゲン移行に対する効果を調べる目的で、 ^3H -テストステロンの10倍の濃度のエストラジオールをかん流液に加えた。精巢上体管におけるアンドロゲン摂取は、エストラジオールでは阻害されなかった。以上の結果より、精巢上体における経上皮性の ^3H -アンドロゲン移行は、アンドロゲンと管内のアンドロゲン結合蛋白との特異的な結合により制御されていることが示唆された。

(受付: 1993年2月4日)

(受理: 1993年5月26日)

ENDOMETRIOSIS OF THE GROIN: A CASE REPORT

Masahide SHIOTANI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tsukaguchi Prefectural Hospital, Hyogo 661, Japan

Yoichi NODA

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

Katsuhiko NARIMOTO

Ishida Hospital, Osaka 573, Japan

Mikihisa KINOSHITA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka Red Cross Hospital, Osaka 543, Japan

Yoshihiko NANBU

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Katsura Hospital, Kyoto 615, Japan

Seiichiro KANAYA

Department of Surgery, Kyoto NTT Hospital, Kyoto 601, Japan

Takahide MORI

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

Abstract: A rare case of endometriosis in the extraperitoneal part of the round ligament (EERL) is reported. This case is believed to be the 40th case on record. The patient had complained of cyclic pain and swelling in her right groin. The pain and the swelling began a few days before the onset of menstruation, and lasted for about 10 days. Physical examination revealed a tender and firm mass in her right groin. She had no symptoms of pelvic endometriosis. The serum CA-125 level was slightly elevated. The pain was diminished by preoperative therapy with Danazol, which shrank the mass. At the time of surgery, the patient was found to have a firm mass in the extraperitoneal part of the round ligament. The mass was excised, and endometriosis was confirmed pathologically. The etiology and management of this disorder are discussed.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 6 - 9 , 1994)

Introduction

Endometriosis may occur virtually in any organ

system. Endometriosis of the groin is a rare condition, and is usually located in the extraperitoneal part of the round ligament (EERL)^{1~4)}. Since the

first description of EERL by Cullen in 1896⁵⁾, only 39 cases have been reported^{1,2,4,6,7,8,9,10,11,12)}. In this report, we described the 40th case of EERL. This condition may initially be confused with an incarcerated inguinal hernia. Gynecologists and surgeons should bear in mind that endometriosis may be the cause of a suspected incarcerated inguinal hernia.

Case report

A 32-year-old single woman, para 0, complained of cyclic pain and swelling in her right groin for 6 months. She had a regular menstrual cycle. The pain and swelling began a few days before the onset of menstruation, and lasted for about 10 days during each menstrual cycle. Physical examination revealed a tender, firm, and poorly defined mass (2cm by 1.5 cm in size) in her right groin, just above the inguinal ligament and 1cm lateral to the right pubic tubercle. She had noticed no change in the size of the mass upon movement. There was no palpable inguinal lymphnode, and there were no abnormal findings in her left groin. Vaginal and rectal examinations were negative. Ultrasonography and magnetic resonance imaging (MRI) produced negative findings for endometriosis. All of the laboratory data were within normal limits, except her serum CA-125 level (41 U/ml), which was abnormally elevated (>35 U/ml). The presumptive diagnosis of endometriosis of the right groin was made, based on both characteristic symptoms: pain and swelling during menstruation and an elevated serum CA-125 level. Danazol (200mg two times daily) was administered preoperatively for 2 months. The pain in her right groin diminished by Danazol treatment, and she was admitted for surgery. At surgery, the inguinal canal was entered by incising the aponeurosis of the external oblique muscle. The entire mass of the extraperitoneal part of the round ligament (Fig.1) was then completely excised. No inguinal hernia was present. This mass had no apparent spatial communication with the pelvis. Endometriosis was confirmed pathologically by the presence of endometrial glands, with the endometrial stroma surrounded by fibroconnective tissues (Fig. 2). She had an uneventful postop-

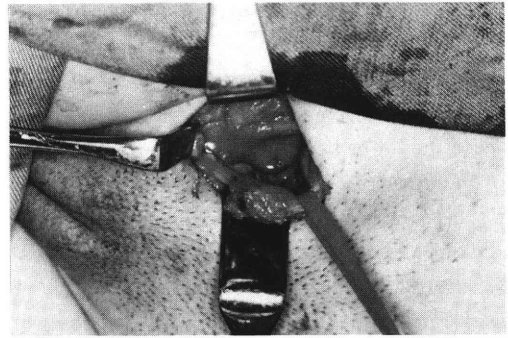


Fig. 1 Note the mass of the extraperitoneal part of the round ligament. No inguinal hernia was present.

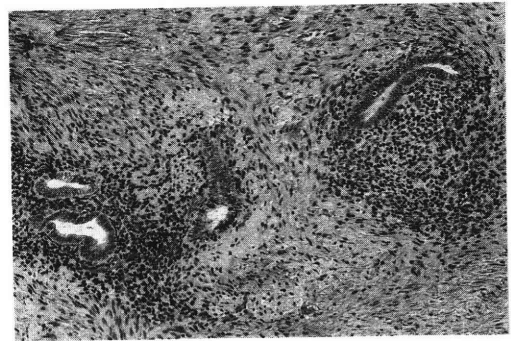


Fig. 2 Note the presence of endometrial glands with stroma surrounded with fibrosis and chronic inflammation in the mass. Magnification: X 100

erative recovery. Since the patient had neither fertility problems nor abdominal pain, she was not subjected to laparoscopy or further investigation. Two months later, she had no complaints at menstruation and her serum level of CA-125 was normal (25IU/ml).

Discussion

It is generally accepted that EERL is difficult to diagnose preoperatively^{2,4)} mainly because this disease is very uncommon and the physical findings are similar to those of inguinal hernia. Actually, a correct diagnosis was made only in 37.5% of the reported cases¹¹⁾; many cases were treated as inguinal hernia or lymphadenitis³⁾. Common symptoms are pain that aggravates with the onset of menstruation (62.5% of cases) and an enlargement of the mass during menstruation (29.2% of cases)¹¹⁾. EERL generally has a preference for the

right side (37 out of 40 cases), as was observed in the present case.

Incidence of EERL is reported to be 0.3%-0.5% in the patients suffering from endometriosis^{1,8,10)}. This disease should be kept in mind whenever a woman of the reproductive age complains of inguinal symptoms, especially on her right side, which are aggravated during menstruation. In addition, the present case suggested that elevated serum CA125 would be a useful indicator for a preoperative diagnosis of inguinal endometriosis.

Many discussions have focused on the pathogenesis of EERL^{4,11,13)} and the following hypothesis have been developed: (a) development from ectopic Müllerian or Wolffian remnants, (b) direct extension along the round ligament, (c) metaplasia of mesothelial cells, and (d) metastatic spread of an intra-abdominal endometriosis. However, none of these suggestions could explain why over 90% of the inguinal endometriotic lesions occur on the right side. Therefore, the origin of endometriosis in the extraperitoneal round ligament remains to be elucidated.

The present treatment for EERL is primarily surgical excision. The entire lesion must be removed intact from the operative field in order to avoid cellular dissemination and subsequent recurrence⁴⁾. Candiani et. al. reported that pelvic lesions were observed in 11 out of 12 patients in whom laparoscopy or laparotomy was preformed, for an association frequency of 91% (11 of 12)⁴⁾. Therefore laparoscopy may be indicated for all cases^{2,4)}.

References

- 1) Strasser EJ, Davis RM, Extraperitoneal inguinal endometriosis. *Am Surg* 43:421, 1977
- 2) Clausen I, Nielsen KT, Endometriosis in the Groin. *Int J Obstet* 25:469, 1987
- 3) Franklin RR, Navarro C, Extragenital Endometriosis. In: *Current Concepts in Endometriosis*. p289, Alan R Liss Inc, 1990
- 4) Candiani GB, Vercellini P, Fedele L, et al., Inguinal Endometriosis: Pathogenetic and Clinical Implications. *Obstet Gynecol* 78:191, 1991
- 5) Cullen TS, Adenomyoma of the round ligament. *Johns Hopkins Hosp Bull*, 112, 1886

- 6) Sampson JA, Inguinal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 19:462, 1925
- 7) Dickinson AM, Endometriosis of the round ligament simulating hernia. *Am J Obstet Gynecol* 38:720, 1939
- 8) Daro A, Capos N, Baserga R, Endometriosis of the round ligament. *J Int College Surgeons* 21:385, 1954
- 9) Dormandy TL, Inguinal endometriosis. *Lancet* I:832, 1956
- 10) Jimenez M, Miles RM, Inguinal Endometriosis. *Ann Surg* 151:903, 1960
- 11) Demetriades D, Levy NB, Posen JA, Endometriosis of the inguinal canal. *S Afr J Surg* 21:61, 1983
- 12) Sataloff DM, LaVorgna KA, McFarland MM, Extrapelvic endometriosis presenting as a hernia: Clinical reports and review of the literature. *Surgery* 105:109, 1989
- 13) Quagliarello J, Coppa G, Bigelow B, Isolated endometriosis in an inguinal hernia. *Am J Obstet Gynecol* 152:688, 1985

鼠経部子宮内膜症の一例

兵庫県立塚口病院産婦人科
塩谷雅英

滋賀医科大学産婦人科教室
野田洋一

石田病院産婦人科
成本勝彦

大阪赤十字病院産婦人科
木下幹久

京都桂病院産婦人科
南部吉彦

京都NTT病院外科
金谷誠一郎

京都大学婦人科学産科学教室
森 崇英

腹腔外の鼠経部円靱帯に発生した子宮内膜症 (EERL) の稀な一例を経験したので報告する。患者は周期的な痛みと腫脹を右鼠経部に訴えて来院した。この痛みと腫脹は月経開始の数日前に出現し約10日間持続するものであった。理学診上、圧痛を伴う、固く境界不明瞭な示指頭大の腫留を右鼠経部に認めた。内診および

MRIを含む画像診断上、骨盤内子宮内膜症を疑うような所見は認められなかったが、血中のCA-125は41U/mlとやや上昇していた。鼠経部子宮内膜症の診断のもとDanazolの投与を行ったところ、腫留は縮小し、同部の周期的な痛みと腫脹は軽減した。引続き外科的切除を目的として手術を行った。手術時、腹腔外の右鼠経部

円靭帯に固い腫留を認めこれを切除した。手術後、病理学的に子宮内膜症の診断が確定した。この症例について経過を報告するとともに、鼠経部子宮内膜症の病因とその治療法について考察を加えた。

(受付：1993年2月8日)

(受理：1993年8月23日)

日本人を対象とした精巣容積と精巣機能との関係

Correlation of Testicular Size with Testicular Function in Japanese Males

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
石 津 和 彦
Kazuhiko ISHIZU

瀧 原 博 史
Hiroshi TAKIHARA
馬 場 良 和
Yoshikazu BABA

鎌 田 清 治
Kiyoharu KAMADA
内 藤 克 輔
Katsusuke NAITO

Department of Urology, School of Medicine,
Yamaguchi University, Ube 755, Japan
(Director: Prof. K. Naito)

益田赤十字病院泌尿器科

植 野 卓 也
Takuya UENO

Department of Urology, Masuda Red Cross Hospital,
Masuda 698, Japan

日本人男子不妊患者346人を対象として、精巣容積と精子濃度、精子運動率、血清LH値、FSH値およびtestosterone値との関係につき検討を行った。精巣容積と精子濃度、精子運動率、血清LH値およびFSH値との間に有意の相関が認められた。しかし、重回帰分析による検討では、血清FSH値および精子濃度がそれぞれ独立して精巣容積へ有意に影響を及ぼすことが認められたものの、精子運動率および血清LH値については、精巣容積への有意な影響は認められず、精巣容積と精子運動率および血清LH値との有意の相関は、疑似相関である事が示唆された。

さらに、精巣容積を2ml毎8群に分類し、各群間における上記機能を表す各パラメーターの測定値の比較検討を行った結果、日本人男性において、精子濃度、精子運動率および内分泌学的所見が正常を示すと思われる最小精巣容積は12mlであり、精巣容積18ml以上で良好な精巣機能を持つ事が推定された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 10 - 16 , 1994)

緒 言

精巣容積は従来より、精液所見や妊孕性に関係すると言われている¹⁾。しかしながら、精巣機能を表す各パラメーターと、精巣容積との関係を定量的にみた報告は少ない。我々は既にアメリカ人を対象として、精巣容積と精巣機能との関係を報告した²⁾。民族間で精巣容積に差があるとの報告³⁾に基づき、今回

我々は日本人を対象として、精巣容積と精液所見、血清leuteinizing hormone (以下LH)、follicle stimulating hormone (以下FSH)、testosteroneの関係につき検討を行ったのでここに報告する。

対象および方法

対象は、1985年1月から1991年7月までの5年間で、不妊を主訴として山口大学附属病院泌尿器科男

子不妊外来を受診した患者のうち、閉塞性無精子症患者をのぞいた346人である。精巣容積は、山口大式punched-out orchimeter⁴⁾にて測定し、左右の精巣容積の平均を精巣容積として用いた。精巣容積の測定に際しては、特定の1人(H. T.)により行った。精液検査は原則として3日間以上禁欲とし、用手法にて採取した精液を37℃に保温したKitazato Microwarm Plate

表1 精巣容積による分類

群	精巣容積	例数 (%)
1 群:	8 ml未満	39 (11.6)
2 群:	8 ml以上10ml未満	13 (3.9)
3 群:	10ml以上12ml未満	26 (7.8)
4 群:	12ml以上14ml未満	49 (14.6)
5 群:	14ml以上16ml未満	58 (17.3)
6 群:	16ml以上18ml未満	58 (17.3)
7 群:	18ml以上20ml未満	29 (8.7)
8 群:	20ml以上	63 (18.8)
		計 335 (100)

MP-100上で30分以上放置して充分液化させたのち、精液量、精子濃度および精子運動率を、マクラー精子算定盤⁵⁾を用いて算定した。上記精液所見のデータは3回測定し、その最高値を用いた。LH, FSH, testosteroneは外来にて採血し、測定は、1989年7月1日までは尿中ゴナドトロピンを標準品とした第一ラジオアイソオトープ研究所製のLH (FSH) キット第一(旧キット)、それ以後は下垂体性ゴナドトロピンを標準品としたスパッカー-S LH (FSH) キットを使用した。旧キットによる測定値は一定の換算率を掛け、新キットの測定値と比較可能なものとした⁶⁾。TestosteroneはDPC社製のSPCトータルテストステロンキットにて測定した。正常値は、LH値:1.1~8.8mIU/ml, FSH値:1.8~13.6mIU/ml, testosterone値:320~1030ng/dlである。精巣容積および各パラメーター間の相互関係は単相関係数を求めて検討し、精巣容積への影響を重回帰分析を用いて検討した。さらに精巣容積を2ml毎に8群に分類し(表1)、各群間における各パラメーターの測定値の差の検定を行った。但し、精子運動率の検討においては、無精子症例は除外した。検定法はKruskal-Wallis検定およびMann-Whitney検定を用いた。

表2 精巣容積および各パラメーター間の単相関係数

	精液量	精子濃度	精子運動率	LH値	FSH値	testosterone値
精巣容積	0.0574*	0.3380**	0.2661**	0.3800**	0.5284**	0.1489*
精液量		0.0398*	0.0051*	-0.1056*	-0.0800*	0.0538*
精子濃度			0.4092**	0.2596**	-0.4069**	0.0188*
精子運動率				-0.1859*	-0.3494**	0.0766*
LH値					-0.7273**	0.0534*
FSH値						-0.1301*

*:p<0.1 **:p<0.01

表3 精巣容積に影響を与える各パラメーターの分析
- 重回帰分析による検討 -

	beta	standard beta	partial correlation	F ₀	p
FSH値	-0.2788	-0.4334	-0.3103	31.7159	p<0.01
精子濃度	0.0228	0.1353	0.1394	5.9058	p<0.05
testosterone値	0.0025	0.0847	0.0999	3.0023	NS
精子運動率	0.0104	0.0500	0.0531	0.8435	NS
精液量	0.0546	0.0110	0.0132	0.0516	NS
LH値	-0.0288	-0.0146	-0.0119	0.0420	NS
				R=0.5539	F ₀ =21.9835 p<0.01

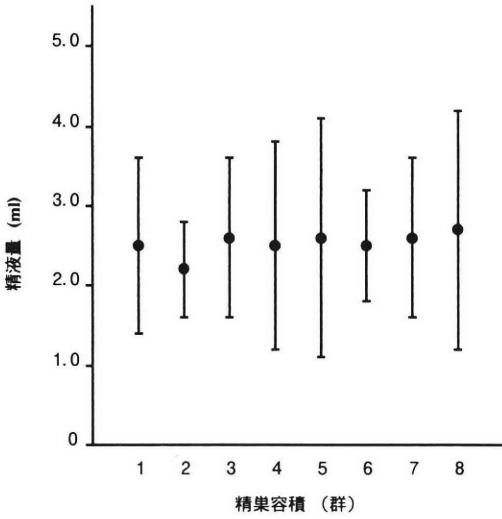


図1 精巣容積と精液量との関係
各群間に有意差は認めない

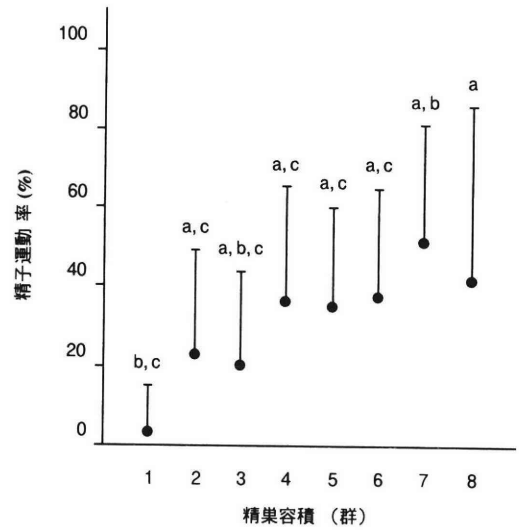


図3 精巣容積と精子運動率との関係
a, 精巣容積 8 ml未満 (1 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)
b, 精巣容積 12ml以上14ml未満 (4 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)
c, 精巣容積 18ml以上20ml未満 (7 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)

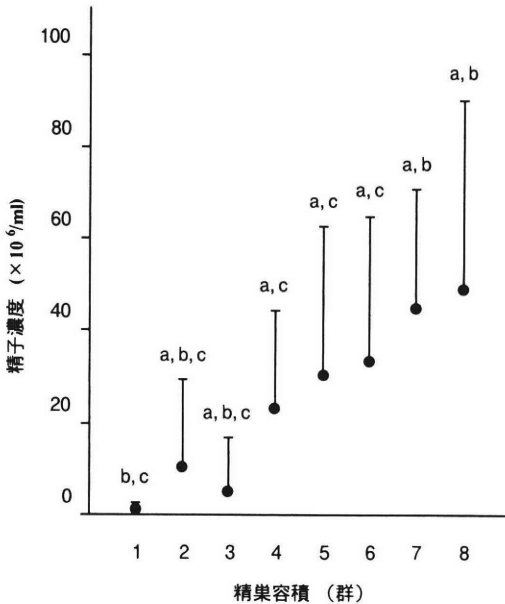


図2 精巣容積と精子濃度との関係
a, 精巣容積 8 ml未満 (1 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)
b, 精巣容積 12ml以上14ml未満 (4 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)
c, 精巣容積 18ml以上20ml未満 (7 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)

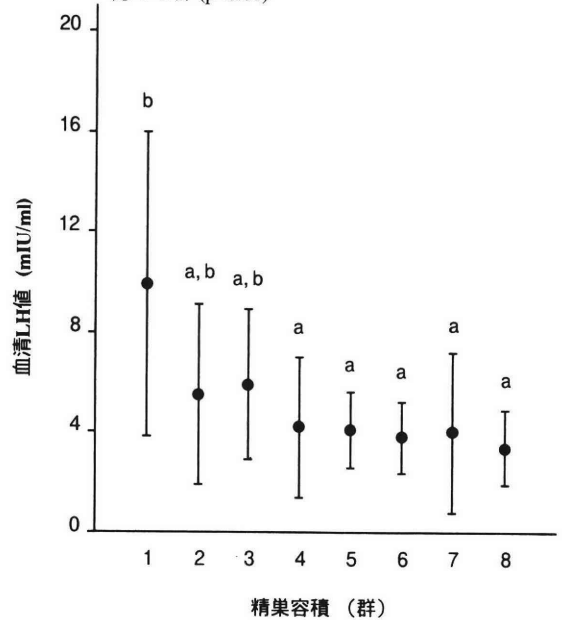


図4 精巣容積と血清LH値との関係
a, 精巣容積 8 ml未満 (1 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)
b, 精巣容積 12ml以上14ml未満 (4 群) と有意差を認める群 ($p<0.01$)

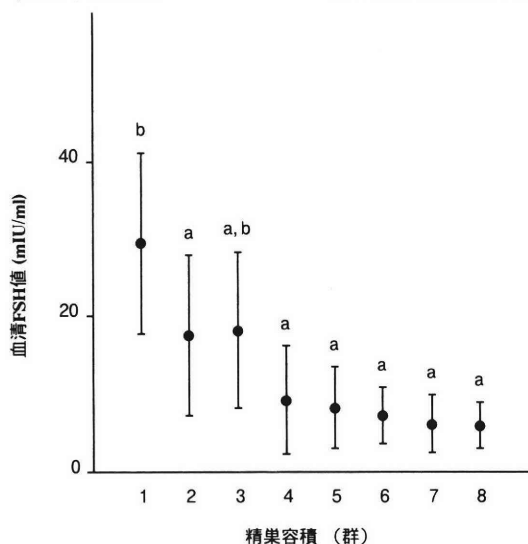


図5 精巣容積と血清FSH値との関係

- a, 精巣容積8ml未満(1群)と有意差を認める群($p < 0.01$)
 b, 精巣容積12ml以上14ml未満(4群)と有意差を認める群($p < 0.01$)

結 果

1. 精巣容積測定は335例に施行した。精巣容積の平均値は 14.9 ± 5.5 (mean \pm SD) mlで最大30ml, 最小0.75mlであり1群:39例(11.6%), 2群:13例(3.9%), 3群:26例(7.8%), 4群:49例(14.6%), 5群:58例(17.3%), 6群:58例(17.3%), 7群:29例(8.7%), 8群:63例(18.8%)であった(表1)。

2. 単相関係数および重回帰分析による各パラメーターの検討

精巣容積および各パラメーター間の相互関係の単相関係数による検討では、精巣容積と精子濃度、精子運動率、血清LH値およびFSH値との間、精子濃度と精子運動率、血清LH値およびFSH値との間、精子運動率と血清FSH値との間、さらに血清LH値と血清FSH値との間に有意水準1%以下で相関が認められた(表2)。

さらに重回帰分析による検討では、血清FSH値、精子濃度の順でこれらのパラメーターが有意に独立して精巣容積へ影響を与えることが認められた(表3)。

3. 精巣容積別に分類した1群～8群の各群間における各パラメーターの検討

1)精液量 各群の精液量の平均値および標準偏差は、1群: 2.5 ± 1.1 ml, 2群: 2.2 ± 0.6 ml, 3群: $2.6 \pm$

1.0ml, 4群: 2.5 ± 1.3 ml, 5群: 2.6 ± 1.5 ml, 6群: 2.5 ± 0.7 ml, 7群: 2.6 ± 1.0 ml, 8群: 2.7 ± 1.5 mlであり、各群間に有意差は認められなかった(図1)。

2)精子濃度 各群の平均値および標準偏差は、1群: $0.1 \pm 0.4 \times 10^6$ /ml, 2群: $11.0 \pm 18.4 \times 10^6$ /ml, 3群: $5.6 \pm 11.2 \times 10^6$ /ml, 4群: $23.5 \pm 21.0 \times 10^6$ /ml, 5群: $30.4 \pm 32.7 \times 10^6$ /ml, 6群: $33.8 \pm 30.9 \times 10^6$ /ml, 7群: $45.1 \pm 25.9 \times 10^6$ /ml, 8群: $49.1 \pm 41.0 \times 10^6$ /mlであった。平均精巣容積が12ml未満の各群(1～3群)は、精巣容積12ml以上14ml未満の群(4群)より有意に低値を示し($p < 0.01$)、さらに、精巣容積8ml未満の群(1群)では、他群に比して有意に低値を示した($p < 0.01$)。また、精巣容積18ml以上20ml未満の群(7群)は、精巣容積18ml未満の各群(1～6群)より有意に高値を示した(図2)。

3)精子運動率 各群の平均値および標準偏差は、1群: $3.5 \pm 11.7\%$, 2群: $23.3 \pm 25.9\%$, 3群: $20.5 \pm 23.4\%$, 4群: $36.8 \pm 29.0\%$, 5群: $35.7 \pm 24.3\%$, 6群: $38.1 \pm 27.1\%$, 7群: $51.8 \pm 29.1\%$, 8群: $42.0 \pm 44.1\%$ であった。精巣容積8ml未満の群(1群)、および10ml以上12ml未満の群(3群)は、精巣容積12ml以上14ml未満の群(4群)に比し有意に低値を示し($p < 0.01$)、さらに精巣容積8ml未満の群(1群)は他群より、有意に低値を示した。また、精巣容積18ml以上の各群(7～8群)は高値を示す傾向にあった(図3)。

4)血清LH値 各群の平均値および標準偏差は、1群: 9.9 ± 6.1 mIU/ml, 2群: 5.5 ± 3.6 mIU/ml, 3群: 5.9 ± 3.0 mIU/ml, 4群: 4.2 ± 2.8 mIU/ml, 5群: 4.1 ± 1.5 mIU/ml, 6群: 3.8 ± 1.4 mIU/ml, 7群: 4.0 ± 3.2 mIU/ml, 8群: 3.4 ± 1.5 mIU/mlであった。精巣容積12ml未満の各群(1～3群)は、精巣容積12ml以上14ml未満の群(4群)より有意に高値を示し、さらに精巣容積8ml未満の群(1群)では、他群に比し有意に高値を示した($p < 0.01$) (図4)。

5)血清FSH値 各群の平均値および標準偏差は、1群: 29.4 ± 11.7 mIU/ml, 2群: 17.6 ± 10.3 mIU/ml, 3群: 18.2 ± 10.0 mIU/ml, 4群: 9.2 ± 7.0 mIU/ml, 5群: 8.3 ± 5.2 mIU/ml, 6群: 7.2 ± 3.6 mIU/ml, 7群: 6.2 ± 3.7 mIU/ml, 8群: 6.0 ± 3.0 mIU/mlであった。精巣容積8ml未満の群(1群)、および10ml以上12ml未満の群(3群)は、精巣容積12ml以上14ml未満の群(4群)より有意に高値を示し($p < 0.01$)、さらに精巣容積8ml未満の群(1群)では、他群に比し有意に高値を示した($p < 0.01$) (図5)。

6)血清testosterone値 各群の平均値および標準偏差

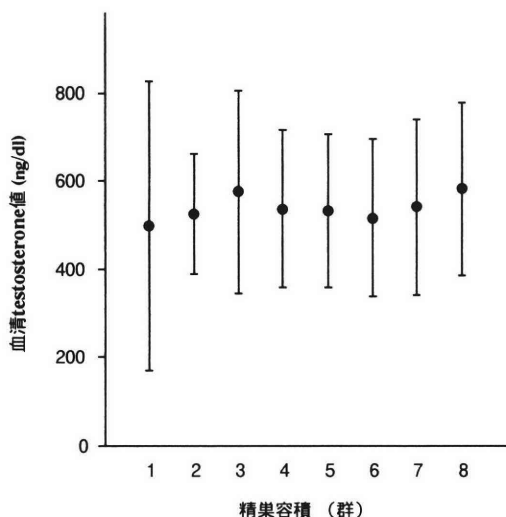


図6 精巣容積と血清testosterone値との関係
各群間に有意差は認めない

は、1群：498.7±327.8ng/dl, 2群：525.1±136.8ng/dl, 3群：576.5±230.0ng/dl, 4群：536.2±179.2ng/dl, 5群：532.7±172.8ng/dl, 6群：516.2±179.3ng/dl, 7群：541.5±200.3ng/dl, 8群：583.1±196.4ng/dlであり、各群間に有意差は認められなかった(図6)。

考 察

精巣はそのほとんどが精細管とgerminal elementsからなっており、一般的に精巣容積は男子不妊外来受診時における患者の精巣機能を推定するのに最も良い指標であると言われている。しかしながら、日常診療において精巣容積は曖昧な表現をされていることが多く、精巣容積の正確な、そして迅速簡便な検査法の確立、普及が望まれる現状である。精巣容積測定法には、長さ、幅、厚さの3方向を直接測定する方法^{8,9,10)}や、精巣と類似の種々の大きさのモデルと精巣を比較する方法^{11,12,13)}があり、また、最近では超音波による計測¹⁴⁾も行われている。しかしこれらの方法では、煩雑で手技の熟練が必要であり、再現性が低いと思われる。以前より我々は山口大式punched-out orchimeterの有用性を報告してきた⁴⁾が、この測定器による精巣容積測定は必ずしも熟練を必要とせず、正確かつ簡便に施行でき、十分に臨床応用可能であると考えられる。

精巣容積と精巣機能を表す各パラメーターとの関係を検討した報告は少なく、日本人を対象とした検討は我々の調べた限り中村¹³⁾、藤井¹⁵⁾、田島¹⁶⁾らの報告があるのみである。中村によると、成年日本

人男性の精巣容積は平均15ml前後とのべている¹³⁾。しかし中村の報告から約30年経過し、日本人の体格も向上した現在、再設定が必要であると考えられる。今回我々はこの山口大式punched-out orchimeterを用いて、精巣容積と精巣機能を表す各パラメーターとの関係を臨床的に比較検討した。

精巣容積および精巣機能を表す各パラメーター間での相互関係を単相関係数を求めて検討した結果では、精巣容積と精子運動率、精子濃度、血清LH値およびFSH値との間に有意の相関が認められ(表2)、これは他の報告²⁾と一致していた。しかし、重回帰分析による検討では、血清FSH値、および精子濃度については、有意にそれぞれ独立して精巣容積へ影響を及ぼすことが認められたが、精子運動率と血清LH値は精巣容積への有意な影響は認められなかった(表3)。すなわち単相関係数の検討において認められた精巣容積と精子運動率および血清LH値との間の有意の相関については、表2に示すように精子運動率および血清LH値ともに、精子濃度および血清FSH値との相関が強いため、間接的に有意の相関が認められたものと考えられ、擬似相関であったと考えられる。今回の検討において明らかなように、各パラメーターは相互に影響を及ぼしあっており、精巣容積と精巣機能を表す各パラメーターとの相関を検討する時は、特に血清LH値については、血清FSH値の影響を強く受けるとの報告もあり、各パラメーター相互間の影響を考慮し、擬似相関に注意しなければならないと考える。

精巣容積別に分類した8群の各群間における各パラメーターの検討において、精液量については、精巣容積による差異は認められず(図1)、このことは、精液量の80~90%が副性器からの分泌物によって占められており¹⁷⁾精巣容積の関与が少ないことによるものと考えられる。精子濃度および精子運動率は図2、図3に示す様に、精巣容積8ml、12mlおよび18mlを境にして有意差が認められ、精巣容積12ml以上にて精子濃度は $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の値を示しており、さらに精巣容積18ml以上にて、精子濃度および精子運動率ともに良好な値をとることが認められた。また、精巣容積8ml未満では精子濃度および精子運動率ともに著明な低値を示していたこと等から、精巣容積が18ml未満では、精子の量、質に幾分かの障害が加わっているが、精巣容積が12ml以上あれば、精液所見は正常となる可能性が高いと考えられた。

内分泌学的検査においても血清LH値およびFSH値は、図4、図5に示すように、精巣容積8mlおよび

12mlを境にして有意差が認められ、精巣容積8ml未満で著明な高値を示し、精巣容積12ml以上で正常範囲内の値を示していることが認められた。一方血清testosterone値については、精巣容積による差異は認められず(図6)、このことはLeydig cell functionは精巣が小さくなるまで比較的保たれることを示唆するものと考えられる。

以上より、日本人男性において、精子濃度、精子運動率、内分泌学的所見が正常、または正常に近い値を示すと思われる最小精巣容積は12mlであり、さらに精巣容積18ml以上で良好な精巣機能を持つと推定される。

最近人種による精巣容積の差が報告されている³⁾。タイ人を対象としたAribargの報告では、妊孕性を持つ最小精巣容積は12mlであると述べており¹⁸⁾、今回の我々の結果と一致した。しかし瀧原らのアメリカ人を対象とした報告では、正常精巣機能を示す最小精巣容積は14mlであり、また20ml以上にて良好な精巣機能を示すと述べており²⁾、我々の結果が2ml小さい値となった。今回の我々の検診結果も、人種間で精巣容積の正常値に差があるとの報告と矛盾しないものであり、正常値の設定に際しては、人種間で精巣容積に差がある事を念頭に置くべきであると考ええる。

本稿の要旨は、第11回日本アンドロロジー学会総会において発表した。

稿を終わるにあたり、統計処理に御指導いただきました段原解析センター所長池内淳先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Sherins RJ and Howards SS, Male infertility. In: Urology Campbell MF. 4th ed, p715, Saunders Co, 1978
- 2) Takihara H, Cosentino MJ, Sakatoku J, et al., Significance of testicular size measurement in andrology II. Correlation of testicular size with testicular function. J Urol 137: 416, 1987
- 3) Diamond JM, Variation in human testis size. Nature 320: 488, 1986
- 4) Takihara H, Sakatoku J, Fujii M, et al., Significance of testicular size measurement in andrology I. A new orchimeter and its clinical application. Fertil Steril 39: 836 1983
- 5) Makler A, A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. Fertil Steril 30: 313, 1978
- 6) 青野敏博, 松本脩三, 熊本悦明 他, 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-¹²⁵I-LH, スパック-¹²⁵I-FSH)の多施設における臨床的検討. ホと臨床 36: 1087, 1988

- 7) Sigman M and Howards SS, Male infertility. In: Urology Campbell MF. 6th ed, p663, Saunders Co, 1992
- 8) Stearns EL, MacDonnell JA, Kaufman BJ, et al., Declining testicular function with age. Hormonal and Clinical correlates. Am J Med 57: 761, 1974
- 9) Lambert B, The frequency of mumps and of mumps orchitis and the consequences for sexuality and fertility. Acta genet (Basel) 2 (Suppl 1): 68, 1951
- 10) Rundle AT and Sylvester PE, Measurement of testicular volume. Its application to assessment of maturation and its use in diagnosis of hypogonadism. Arch Dis Childh 37: 514, 1962
- 11) Schonfeld WA and Beebe GW, Normal growth and variation in the male genitalia from birth to maturity. J Urol 48: 759, 1942
- 12) Prader A, Testicular size: Assessment and clinical importance. Triangle 7: 240, 1966
- 13) 中村亮, 日本人男子の性器系の発育と成熟. 日泌尿会誌 52: 172, 1961
- 14) Fuse H, Takahara M, Ishii H, et al., Measurement of testicular volume by ultrasonography. Int J Androl 13: 267, 1990
- 15) 藤井光正, 川井修一, 清水芳幸 他, 男子不妊症診断の最近の話題. 西日泌尿 44増刊号: 532, 1982
- 16) 田島政晴, Test Sizeによる睾丸計測. 泌尿紀要 34:2013, 1988
- 17) Eliasson R, Biochemical analysis of human semen. Int J Androl (Suppl) 5:109, 1981
- 18) Aribarg A, kenkeerati W, Vorapaiboonsak V, et al., Testicular volume, semen profile and serum hormone levels in fertile Thai males. Int J Androl 9: 170, 1988

Correlation of testicular size with testicular function in Japanese males

Satoshi Shirataki, Hiroshi Takihara,
Kiyoharu Kamada, Takuya Ueno,
Kazuhiko Ishizu, Yoshikazu Baba
and Katsusuke Naito

Department of Urology, School of Medicine,
Yamaguchi University, Ube 755, Japan
(Director: Prof. K Naito)

The relationship of testicular size to the results of semen analysis and levels of serum luteinizing hormone (LH), serum follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone was investigated in 346 infertile Japanese males. Testicular size was significantly correlated with sperm concentration, sperm motility and serum levels of LH and FSH. However, multiple regression analysis revealed that sperm concentration and serum levels of FSH were factors significantly related to testicular size; sperm motility and serum LH level were not identified as a significant factor. These results suggest that the signif-

icant correlation of testicular size with sperm motility and serum LH level is an illusory correlation.

Analysis of values for each parameter measured in groups of subjects classified according to testicular size suggested that the lowest testicular size threshold for normal testicular function in the Japanese male is 12ml. No parameter reflecting testicular function showed any further increase in value in the group with testicular size above 18ml.

(受付: 1993年 3 月 2 日)

(受理: 1993年 9 月 27 日)

40歳以上の婦人に対するIVF-ETの成績

Results of In vitro Fertilization in Women Over 40 Years of Age

神戸市立神戸中央市民病院

山下 正 紀
Masanori YAMASHITA
野々垣 真佐史
Masafumi NONOGAKI
島 田 逸 人
Hayato SHIMADA

朴 京 林
Park KYONG RIM
星 野 達 二
Tatsuji HOSHINO
小 野 吉 行
Yoshiyuki ONO
高 島 英 世
Eisei TAKASHIMA

森 田 賢 二
Kenji MORITA
岡 本 紀 彦
Norihiro OKAMOTO
池 内 正 憲
Masanori IKEUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe City General Hospital, Kobe 650, Japan

梅ヶ丘産婦人科

辰 巳 賢 一
Kenichi TATSUMI

Umegaoka Women's Hospital

当院で行なった40歳以上の婦人33周期のIVF-ETにおける臨床的妊娠率、分娩率はそれぞれ22.2%、18.5%であった。妊娠周期および非妊娠周期で比較すると、hMGの投与量はそれぞれ 9.3 ± 1.9 アンプル、 13.6 ± 6.8 アンプル(150U/アンプル)であり、子宮内膜の厚さは 11.5 ± 1.5 mm、 7.8 ± 2.7 mmであった。両者とも妊娠周期および非妊娠周期間で統計的有意義差が認められた。また妊娠例のFSHの基礎値はすべて15mIU/ml以下であった。FSH基礎値が15mIU/mlを越える症例および子宮内膜の厚さが7mm以下の症例には妊娠例は認められず、hMGの投与量を増やしても妊娠の成立には結びつかなかった。FSH基礎値、hMGの必要量、子宮内膜の厚さはそれぞれIVF-ETの結果を予測する上で有用なデータであり症例選択の参考にすべきであると考えられた。40歳以上の不妊婦人では、FSH基礎値が15mIU/ml以下で、通常の範囲のhMG投与量で複数個の卵が採取でき、子宮内膜が厚くなるような症例に対しては、時を移すことなくIVF-ETを試みるべきであると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 17 - 22 , 1994)

緒 言

女性の年齢が上がるに従ってその妊孕性が低下することは広く知られている。不妊症治療においても女性が高齢化するにつれて治療が困難となり成績も不良である。IVF-ETについても同様の結果が多く報

告され適応条件に年齢による制限を設けている施設も少なくない。我々の施設ではIVF-ETによる不妊治療に年齢制限を一切行っていない。そのため全治療周期の1/3以上が40歳以上の婦人の治療周期で占められる結果となっている。その経験から高齢婦人の治療成績をretrospectiveに検討した。今後結婚年齢

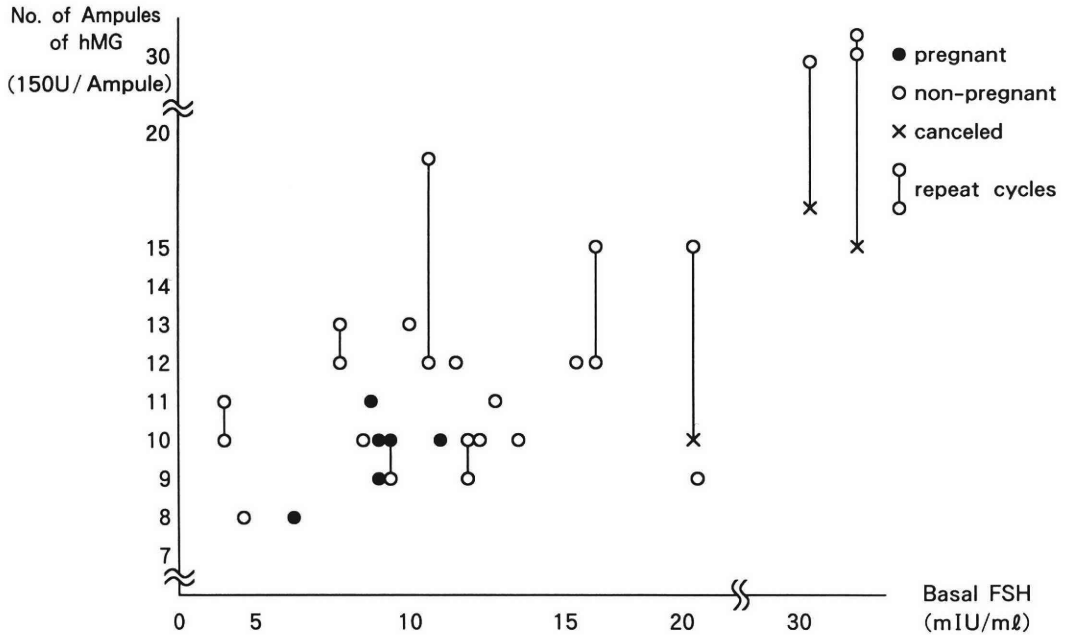


図1 Relationship between Basal FSH and No. of Ampules of hMG

の高齢化とともにますます高年齢の不妊症患者を取り扱う機会が増えることが予想される。高年齢婦人に対しIVF-ETによる治療を検討する際に、より合理的な基準が必要であると思われる。我々の治療成績および文献の考察をもとに高年齢婦人に対するIVF-ETの適応と限界について検討した。

研究方法

1991年6月より1992年8月までの15カ月間に神戸市立中央市民病院で行なったIVF-ETのうち妻が40歳以上の症例につきretrospectiveに検討した。その成績とhCG投与日に計測した子宮内膜の厚さ、非治療周期の月経3～6日目に測定したFSH基礎値、hMGの使用アンプル数および採取卵数との関係から高年齢婦人に対するIVF-ETのより合理的な適応の設定を試みた。この期間にIVFによる治療をした40歳以上の症例は23症例33周期であった。適応別では、卵管性不妊3周期(9.1%)、男性不妊6周期(18.2%)、子宮内膜症5周期(15.1%)、原因不明不妊19周期(57.6%)であった。妻の平均年齢は 41.4 ± 1.5 歳、夫の平均年齢は 41.2 ± 9.1 歳で平均不妊期間は 6.9 ± 2.4 年であった(mean \pm SD)。またIVFによる治療の経験では初回周期は17周期、2回目8周期、3回目以後は8周期であった。Stimulationは全例GnRH α 併用によるhMG-hCG法により行なった。月経周期1日目よりBuserelin

(Suprecur:Hoechst)を 900μ g/day経鼻噴霧し、月経周期3日目より連日hMG(Humegon, Organon:150IU/アンプル)を筋注投与した。hMGの投与量は月経周期3日目および4日目を2アンプル(300IU/day)5日目以後1アンプル(150IU/day)を基本としたが、症例ごとの卵巣の反応性を考慮して適宜増減した。卵胞発育のmonitoringおよびhCG投与時期の決定は経腔超音波断層法による卵胞径計測にて行なった。主席卵胞径が18mmに到達した日を最終hMGの投与日とし翌日hCG5000IUを筋注投与、その36時間後に経腔採卵を行なった。ET後はprogesterone 50mg/day(progehormon, 持田)を2週間筋注投与しtestpack陽性例は児心拍が確認できるまで継続した。ここではGSの認められた臨床的妊娠のみを妊娠成功例とし、chemical abortionは妊娠例から除外した。統計学的有意差検定はT検定を用いた。

結 果

Cancellation

刺激周期中3周期(9.1%)がcancelとなり、採卵周期は30周期であった。cancel周期は全て卵巣の低反応による卵胞発育不良であった。これらの症例に対しては別の周期に改めてhMGの投与を増量して全例採卵に至ったが、妊娠例は無かった。

hMG投与量

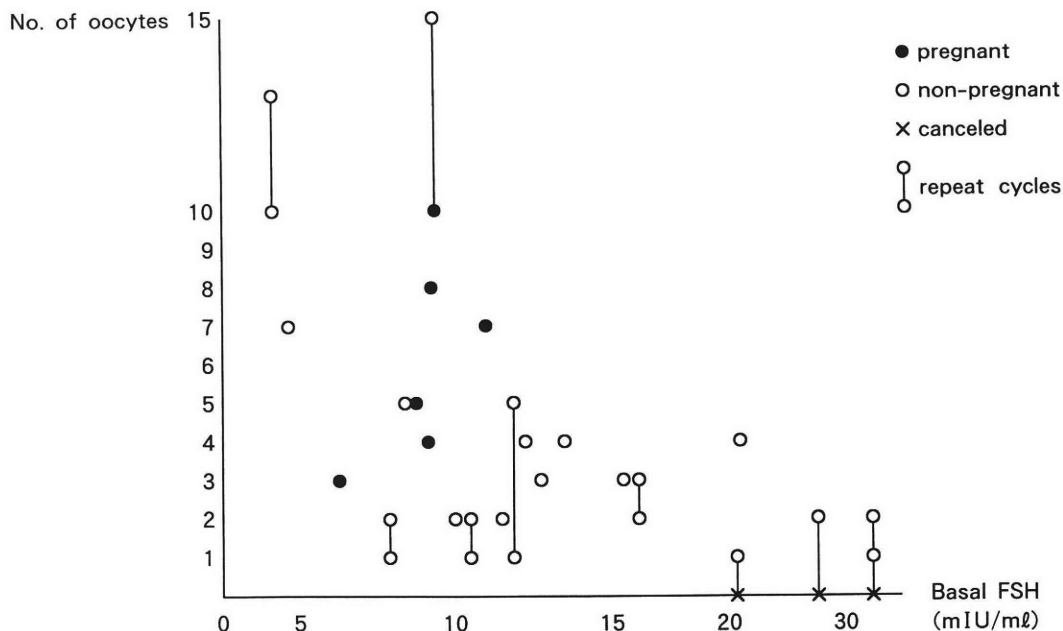


図2 Relationship between Basal FSH and No. of oocytes

平均投与量は 12.3 ± 1.0 アンブルと同時期の35歳未満の投与量 10.5 ± 0.4 アンブル (mean \pm SD) と比較して有意差はないもののやや多い傾向を認めた。

FSH基礎値

FSH基礎値とhMG投与量との関係を図1に、FSH基礎値と採取卵数との関係を図2に示す。low responseのためにcancelとなった周期はいずれもFSH基礎値が20mIU/ml以上の例であった。FSHの基礎値が15mIU/ml以上の症例や、採取卵数2個以下のlow responderの症例に妊娠の成立は認められなかった。

採取卵数

採卵は熟練した術者が行ない、卵胞当りの採卵率は80%以上であった。採取卵数は1個～15個にわたり、 5.2 ± 4.3 (mean \pm SD) であった。hMG投与量と採取卵数との関係を図3に示す。low responderの症例ではhMGの投与量を増やしても採取卵数は増加せず、また妊娠成立にもつながらなかった。妊娠例はhMGが11アンブル以下の投与量で採卵に至り、3個以上採取できた周期にのみ認められた。

子宮内膜の厚さ

hCG投与日に経腔超音波断層法にて子宮を矢状断面に描出し、内膜部分が最も大きくなる断面での内膜の最大幅を計測した。計測値は3mm～17mmにわたり 8.4 ± 3.2 mm (mean \pm SD) であった。図4は採取卵数と子宮内膜の厚さとの関係を示している。6mm以

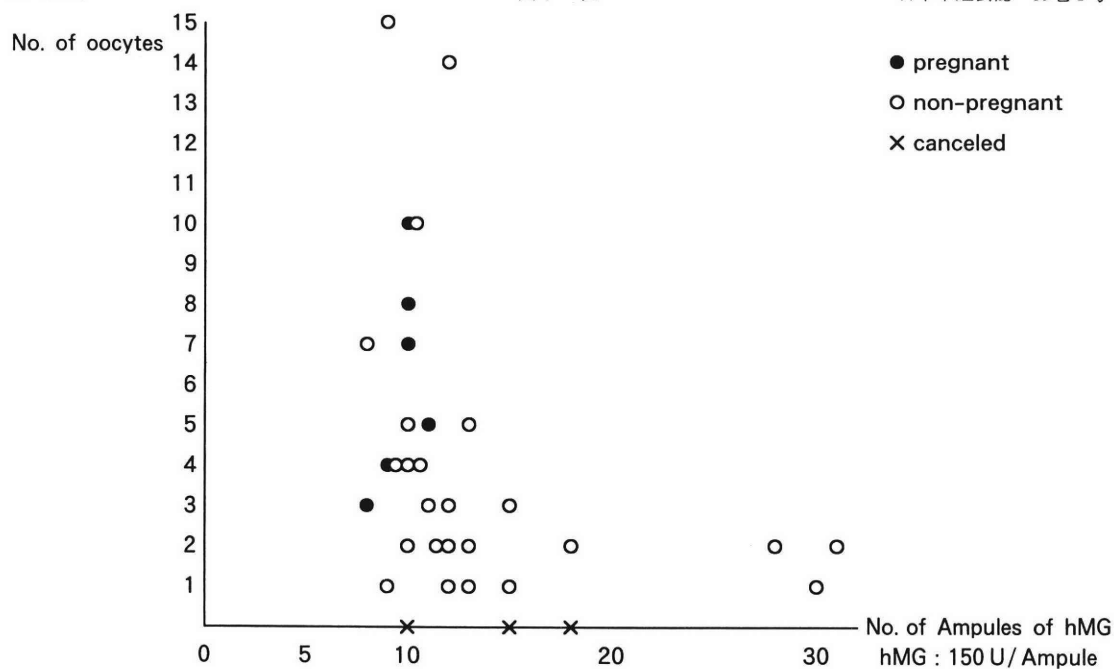
下の周期の大半はlow responderであり、7mm以下の周期に妊娠例は認められなかった。

治療成績

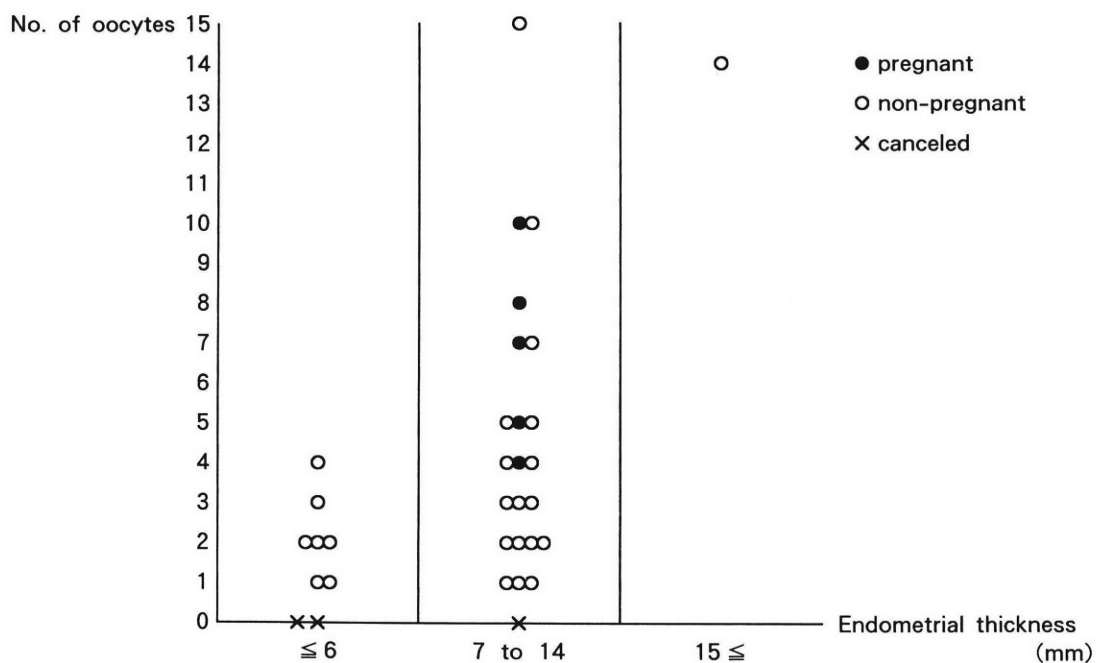
表1に治療成績を示す。採卵に至った30周期中1個以上の移植可能な胚が得られた27周期に胚移植を行なった。6例に臨床的妊娠が成立し、このうち5例が分娩終了し、1例が妊娠10周での流産であった。臨床的妊娠率、分娩率は胚移植当たりそれぞれ22.2%、18.5%であった。入院治療が必要となるような卵巣過剰刺激症やその他の合併症の発生は認められず、また出生児の外表面奇形や染色体異常等はいずれも認められなかった。表2は妊娠周期と非妊娠周期のデータの比較を示している。平均使用hMGアンブル数および平均子宮内膜径はそれぞれ妊娠周期 9.3 ± 1.9 アンブル、 11.5 ± 1.5 mm非妊娠周期 13.6 ± 6.8 アンブル、 7.8 ± 2.7 mmでありそれぞれ両者間に統計的な有意差を認めた。

考 察

女性の結婚年齢が高くなる傾向や、患者側の求める水準が高くなるなどのため今後高齢婦人の挙児希望患者を取り扱う機会がますます増えることが予想される。婦人の年齢が上がるに従って妊孕力が低下し、また流産率は上昇することは広く知られ、そのことは報告にも数多く見られる^{1,2)}。高齢婦人に対



☒ 3 Relationship between No. of oocytes and No. of Ampules of hMG



☒ 4 Relationship between Endometrial thickness and No. of oocytes

する不妊症治療はそのカップルの持つもとの不妊原因の他に、加齢による妊孕力の低下という克服し難い要素が加わるために非常に困難な場合が多

い。IVF-ETによる治療においても同様の報告が多く^{3,4)}、年齢による制限をもうけている施設も少なくない。世界のレベルでみると現在すでに多数の施設に

においてoocyte donationが行なわれている^{5,6)}。実際にDanielらは⁷⁾自身の卵では妊娠に至らなかった高年齢婦人に若年者の卵をdonateすることにより若年婦人と同等の成績をあげることが出来たと報告している。さらに加齢に伴う妊孕力の低下は卵の老化による質の低下に由来するとも推測している。その他にも同様の報告が認められ^{8,9)}、oocyte donationこそが今後高齢婦人やlow responder婦人に対する有効な治療になるとの観測もある。しかしながら日本ではoocyte donationは現時点では認められておらず、仮に許可されたとしても日本人には受け入れにくく、広く普及する方法とは思われない。そのことを踏まえて今回高齢婦人の中でも特に40歳以上のIVF-ETの治療周期につき検討した。33周期と少ない症例ではあったが、FSH基礎値、hMG投与量、採取卵数、子宮内膜の厚さおよびその治療成績の解析から、どのような症例が治療対象として適当かを検討した。FSH基礎値は卵巣のゴナドトロピンに対する反応性を良くあらわすと言われている。またRichardらは¹⁰⁾ IVF-ETの成績は月経周期3日目のFSH値により大きく左右されることを明らかにしている。彼らの成績ではFSH値が

15mIU/ml以下の群では17.0%の妊娠率が15～24.9mIU/mlでは9.3%、25mIU/mlでは3.6%とFSH基礎値が上昇するにつれ妊娠率は有意に低下している。このことからFSH基礎値はIVFの結果を予測するうえで有効な指標になると結論づけている。今回の我々の成績でもFSH値が15mIU/mlを越える症例はhMGに対する反応が悪く、採卵に至るまでに多くのhMGを必要とした。また20mIU/ml以上の症例ではcancel周期が増加した。FSH基礎値、hMG必要量、採取卵数の間にはそれぞれ密接な関係が示された。すなわちFSH基礎値が高い症例ではhMGの必要量は増加するけれども、採取卵数の増加や妊娠の成立は認められず、彼らの報告を裏付ける結果であった。hMG投与量の平均値は妊娠周期 9.3 ± 1.9 、非妊娠周期 13.6 ± 6.8 と両者には統計的有意差が認められた。また今回12アンプル以上を必要とした症例に妊娠例は認められず、hMG量が通常の範囲で採卵できるような卵巣の存在が妊娠成立の一つの条件と考えられた。着床に関してはまだ未知の部分が多く改善のための対策も充分でない。今回着床に関与する因子として子宮内膜の厚さについて着目し検討を加えた。6mm以下、7～14mm、15mm以上の3群に分けると、6mm以下の周期は9周期で全体の27%を占めている。6mm以下の周期の中では1周期のみが通常のhMG投与量で採卵ができたが他はいずれもlow responderの症例であった。妊娠例は7～14mmの周期だけに認められ、最も薄い内膜の妊娠周期は8mmであった。子宮内膜の超音波所見と妊娠成績の報告は¹¹⁾数多くみられる。Jeromeらは¹²⁾子宮内膜の厚さごとの妊娠成績を検討し、8mm以下では妊娠例がなく妊娠例の94%が10mmを越える周期であったと報告している。さらに内膜像がtriple line様かそれに近いパターンの妊娠率が高いことを示している。今回は内膜の厚さのデータしか示せなかったが内膜のエコーパターンも有意な所見であると実感された。

表1 Outcome of IVF treatment over 40 years of age

No. of Patient	23
No. of cycles	33
No. of retrievals	30
No. of transfers (transfer/retrieval)	27
No. of retrieved oocytes	4.0 ± 3.4
No. of cleaved oocytes	3.0 ± 2.3
No. of transferred embryos	2.6 ± 1.7 a
No. of pregnancies	6
Pregnancy rate (/ET)	22.2%
Ongoing pregnancy rate (/ET)	18.5%

a: Mean \pm SD

表2 Comparison between pregnant and non pregnant cycles

	pregnant cycle n=6	non pregnant cycle n=24	
Mean No. of retrieved oocytes	6.2 ± 2.6	4.0 ± 3.8	NS
Mean No. of hMG ampules	9.3 ± 1.9	13.6 ± 6.8	*
Mean thickness of endometrium (mm)	11.5 ± 1.5	7.8 ± 2.7	**

NS: not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

まとめ

40歳を越える高年齢婦人のIVFの成績向上には限界がある。しかしながら今回の検討から1. FSH基礎値が15mIU/ml以下である。2. 通常のhMG投与量で3個以上の卵が採取できる反応良好な卵巣を有する。3. 子宮内膜の厚さが8mm以上となる。以上の条件を満たす症例は妊娠成立が十分期待できる。このような症例に対しては積極的にIVF-ETを試みるべきであると考えられた。

文 献

- 1) Jane M, James T, Ulla L, Age and Infertility. Science 233: 1389, 1986
- 2) Schwartz D, Mayaux MJ, Female fecundity as a function of age. New Eng J Med 306: 404, 1982
- 3) Santiago L, Jairo E, Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. Fertil Steril 52: 270, 1993
- 4) Alberto R, Suheil J, Anibal A, et al., Result of in vitro fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. Fertil Steril 47: 130, 1987
- 5) Medical Research International and SART, In vitro fertilization-embryo transfer in the United States: 1990 result from the IVF-ET Registry. Fertil Steril 57: 15, 1992
- 6) Milton S, Maria CR, Anna V, et al., Establishing of oocyte donation in Brazil. Fertil Steril 57: 439, 1992
- 7) Daniel N, Paul A, Mary A, et al., Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. Lancet 337: 1375, 1991
- 8) Mark V, Richard J, Rogerio A, A preliminary report on oocyte donation extending reproductive potential to women over 40. New Eng J Med 323: 1157, 1990
- 9) David R, Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. Fertil Steril 59: 1, 1993
- 10) Richad T, Sergio O, James P, et al., Follicle-stimulating hormone level on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 51: 651, 1989
- 11) Khalifa E, Bryyski RG, Oehninger S, Sonographic

appearance of endometrium: the predictive value for the outcome of in-vitro fertilization in stimulated cycles. Hum Reprod 7: 677, 1992

- 12) Jerome H, Kosrow N, Jung C, et al., Influence of endometrial thickness and echo patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization. Fertil Steril 56: 1173, 1991

Results of in vitro fertilization in women over 40 years of age

Masanori Yamashita, Park Kyong-Rim,
Kenji Morita, Masafumi Nonogaki,
Tatsuji Hoshino, Norihiko Okamoto,
Hayato Shimada, Yoshiyuki Ono,
Masanori Ikeuchi and Eisei Takashima

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe City General Hospital, Kobe 650, Japan

Kenichi Tatsumi
Umegaoka Women's Hospital

The results of thirty-three IVF-ET cycles from twenty-three patients over 40 years of age were analysed retrospectively. Six clinical pregnancies were achieved at the pregnancy rate of 22.2% and the take home baby rate of 18.5% per ET. In the pregnant and non pregnant group, the number of hMG ampules were 9.3 ± 1.9 and 13.6 ± 6.8 respectively, and the thickness of the endometrium were 11.5 ± 1.5 mm and 7.8 ± 2.7 mm respectively (mean \pm SD). In the number of ampules of hMG and the thickness of the endometrium, there were statistically significant differences between pregnant and non pregnant group ($p < 0.05$, and $p < 0.01$, respectively). In all pregnant cases, basal FSH levels were below 15mIU/ml. The basal FSH level, required number of hMG and the thickness of the endometrium were considered to be good predictors for the success in IVF. As far as the patients show the basal FSH lower than 15mIU/ml, respond well to hMG and have thick preovulatory endometrium, we can expect a good pregnancy rate in the IVF-ET over 40 years of age.

(受付: 1993年7月9日)

(受理: 1993年9月27日)

機能性不妊症の不妊症因子の検討

A Study of Factors Associated with Habitual Abortion in Patients with Unexplained Infertility

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

Kano Clinic,
Osaka 542, Japan

奥 山 恵 子
Keiko OKUYAMA

機能性不妊症の原因と治療法を解明する目的で最低3周期の不妊因子に異常が認められない不妊期間5年以上の37例の不妊症因子(染色体・HLA抗原・抗核抗体・抗cardiolipin IgM抗体)を調べ、不妊症に準じた治療を行った。この結果、因子別頻度は染色体異常・HLA class II抗原の共有・DR 4抗原保有・抗核抗体陽性例は不妊症と概ね同率であったが、抗cardiolipin IgM抗体陽性例は2倍以上高率であった。また自己免疫異常と同種免疫異常を合併する症例が高率であった。治療は不妊症と同じく柴苓湯が有効であったが自己免疫異常単独例より同種免疫異常合併例で生児獲得率が高かった。以上の結果より、厳密に診断された機能性不妊症の主因は不妊症と同じく着床に関わる生殖免疫学異常と考えられたが、不妊症より自己免疫異常と同種免疫異常が合併した複雑な病態を呈することが明らかになった。自己免疫異常と同種免疫異常が合併している場合はリンパ球移植や副腎皮質ホルモン療法の適応にならない。したがって機能性不妊症の治療は柴苓湯療法がメインと考えられた。さらに、同種免疫異常を診断する時、夫婦におけるHLA Class II抗原の共有数を問題とするより夫のみが保有する同抗原数を重視すべきと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 23 - 31, 1994)

緒 言

不妊症診療は体外受精-胚移植、顕微授精に代表されるように受精、卵割に関わる点は長足の進歩を遂げたが、着床に関してはluteal supportの改良に留まって遅々として進んでいない現状である。また、機能性不妊症と診断される原因不明不妊症の病因や治療法についても解明されているとはいえない。我々は機能性不妊症は着床に関わる生殖免疫学的異常が主因、すなわち、その病因¹⁻¹⁴⁾や治療法^{8-10,13,14,15-18)}が解明されつつある不妊症(習慣流産)と同根の疾患と推測してきた。しかし、機能性不妊症は臨床的に妊娠の成立には至らないので着床不全のメカニズムは

不妊症と同一ではなく、より複雑と推測してきた。

以上の認識のもとに、厳密に診断された機能性不妊症の不妊症因子を調べ、不妊症に準じた治療の成績を検討して同症の病因ならびに治療法を考察した。

対象と方法

1991年から1993年にかけて当クリニックを受診した患者のなかで5年以上(最長17年)の不妊期間を有し、当クリニックで連続した1年以上の治療既往があり、この期間中最低3周期(卵管通気検査、子宮卵管造影、内膜日付診は1週期)は不妊因子に異常(卵管通気検査:100mmHg未満正常型^{9,10)}、子宮卵管造

影：異常なし，卵管通水圧：60mmH₂O以下^{9,10}，BBT-3～0 Dayのestradiol値：100pg/ml以上^{9,10,19}，最大首席卵胞径1.6cm以上ないし首席卵胞面積2.0cm²以上^{9,10}，Huhner-test：運動精子5個以上<400倍検鏡>^{9,10}，BBT+5～8 Dayのprogesterone値：15ng/ml以上^{9,10,19}，内膜日付診：遅延なし）がないことを確認している29歳から45歳の37例を対象とした(図1)。

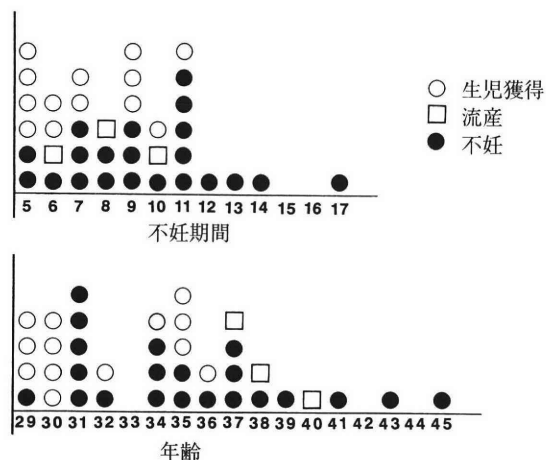


図1 対象機能性不妊症患者の不妊期間，年齢ならびに予後

このなかの22例の上記の不妊因子に異常が認められなかった39周期について着床の確認を目的としてBBT+12Day (luteal supportにHCG製剤を注射している場合は1週間以上の間隔を設けて^{20,21)} TR-FIA法にて血中HCGを測定した。

以上の対象に対して患者の合意のうえに染色体(夫婦)・HLA(夫婦，class I抗原，class II抗原；DR1，DR2，DR3，DR4，DRW6，DR7，DRW8，DR9，DRW10，DRW11 (5)，DRW12 (5)，DRW52，DRW53，DQW1，DQW2，DQW3，DQW4)・抗核抗体・抗DNA抗体・抗cardiolipin IgM抗体を調べた。治療は我々の不育症の基準に従ってHLA class II抗原を夫婦で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20ml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)，また，リンパ球移植を5クール行ったものの妊娠が成立しなかったか流産に終わった症例にはリンパ球移植・柴苓湯併用療法を行なった。HLA-DR4抗原保有例・抗核抗体・抗cardiolipin IgM抗体陽性例には柴苓湯(ツムラ，7.5g/day，不妊治療と並行，妊娠成立後12週まで)療法¹⁴⁾を行った。HLA class II抗原を夫婦で2個以上共有と抗核抗体，抗cardiolipin IgM抗体陽性を合併例

(DR4保有例の一部を含む)にはGVH反応を回避するために柴苓湯単独療法を行なった。

結 果

今回の37例の患者が通院した同時期で妊娠が成立しなかった不妊患者数は827例であり，単純に算出した機能性不妊症の頻度は4.5%になる。しかし，全ての原因不明不妊症患者に今回の検査が行われた訳ではなく，また全ての不妊患者の同一周期の不妊因子が検討されたわけではないので，実際の機能性不妊症の頻度はより高率になると推測される。22例39週期のBBT-12DayのHCG値は着床の診断値10mIU/ml以上²⁰⁾を示した症例が34周期(87.2%)に及んだ(図2)。

まず不育症因子を検討した結果を述べる。染色体異常では転座が2例(5.4%，いずれも妻)に，正常異型と考えられるサテライトとヘテロクロマチンがそれぞれ1例(2.7%)に認められた。HLA class II抗原の

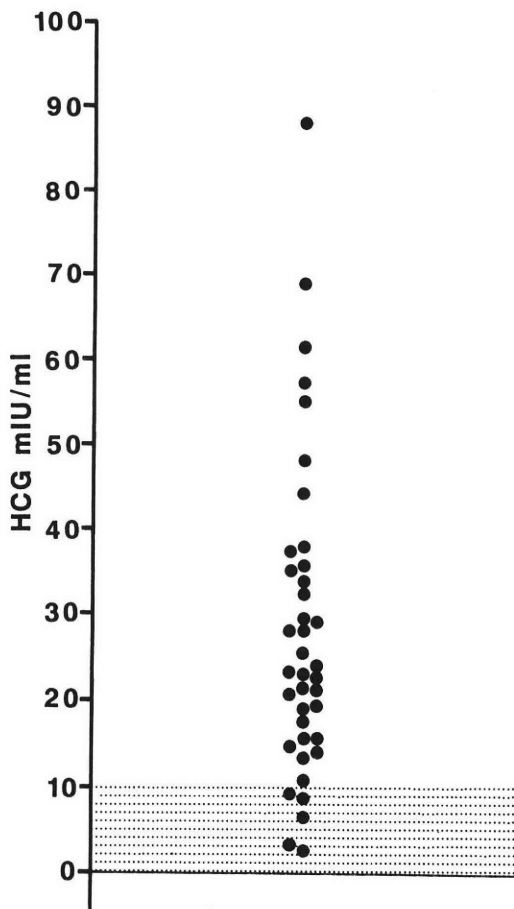


図2 当該周期の不妊因子に異常を認めなかった症例のBBT+12Dayの血中HCG値

共有数は3個以上(最高5個)が37.8%, 2個が39.7%に認められ, 不妊症(同種免疫異常¹³⁾)の一応の診断基準である2個以上は67.5%になり今回検討した因子のなかでは最も高率であった。HLA-DR4抗原保有率は29.7%であった。さらに, 自己抗体の抗核抗体陽性率は16.2%, 抗Cardiolipin IgM抗体陽性率は18.9%であった。(図3)。

各因子の重複を調べると, 複数の因子を有する重複例は51.3%と過半数を占めた。最高重複例はHLA class II抗原共有4個+DR4抗原保有+抗核抗体陽性ならびにHLA class II抗原共有3個+抗核抗体陽性+転座の3因子保有の各1例であった。重複型はHLA class II抗原共有2個以上共有+DR4抗原保有が最も多く, 次いでHLA class II抗原共有2個以上共有+抗Cardiolipin IgM抗体陽性の組み合わせであった。不妊症因子を有しない症例はわずか16.2%であった(図4)。

我々は考察で述べるように同種免疫異常の診断にはHLA class II抗原の夫婦での共有数より夫のみが保有する同抗原数の方が重要と考えている。この観点から, 夫のみが保有する同抗原数と夫婦の共有数との関係を調べた。この結果, 夫が4個異なる抗原を有する場合は夫婦の共有数は1個以下が87.5%と多数を占め, 2個は12.5%で3個以上は存在しなかった。

3個の場合は2個共有が66.7%, 1個以下が33.3%で, 3個以上は存在しなかった。ところが, 2個以下ではすべて3個以上共有していた(図5)。

次に治療成績を検討した。まず重複の有無を問わず因子別に検討した。染色体異常については卵胞機能賦活や黄体機能賦活などの通常の不妊治療に留まらざるを得ないが現在までのところ妊娠は成立していない。HLA class II抗原の共有例については単独例では夫リンパ球移植, DR4抗原保有と重複している症例には原則として柴苓湯単独療法, 時に夫リンパ球移植・柴苓湯併用療法, 抗核抗体ないし抗Cardiolipin IgM抗体陽性と重複している症例には柴苓湯単独療法を行ったが, 2個共有例では, 夫リンパ球移植, 夫リンパ球移植・柴苓湯併用療法で各1例(9.1%), 柴苓湯単独療法で3例(27.3%)で妊娠が成立, いずれも生児を獲得した。流産は柴苓湯療法の1例(9.1%, 抗核抗体陽性重複例)であった。3個以上共有では夫リンパ球移植, 柴苓湯療法はそれぞれ1例(7.1%), 夫リンパ球移植・柴苓湯併用療法で2例(14.2%)で生児を獲得, 流産は夫リンパ球移植(DR4抗原保有重複例), 柴苓湯療法(抗Cardiolipin IgM抗体陽性重複例)で各1例(7.1%)であった。全ての生児獲得率は36.0%であった(図6)。

夫のみが保有している抗原個数別では, 3個以上

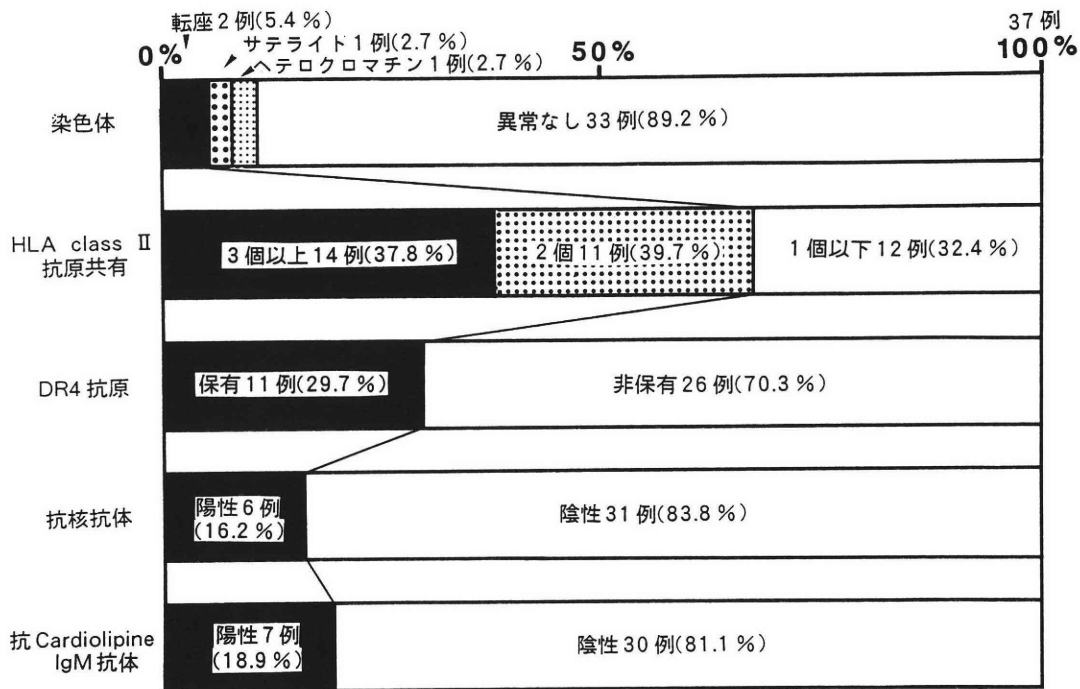


図3 対象機能性不妊症患者の不妊因子発現頻度

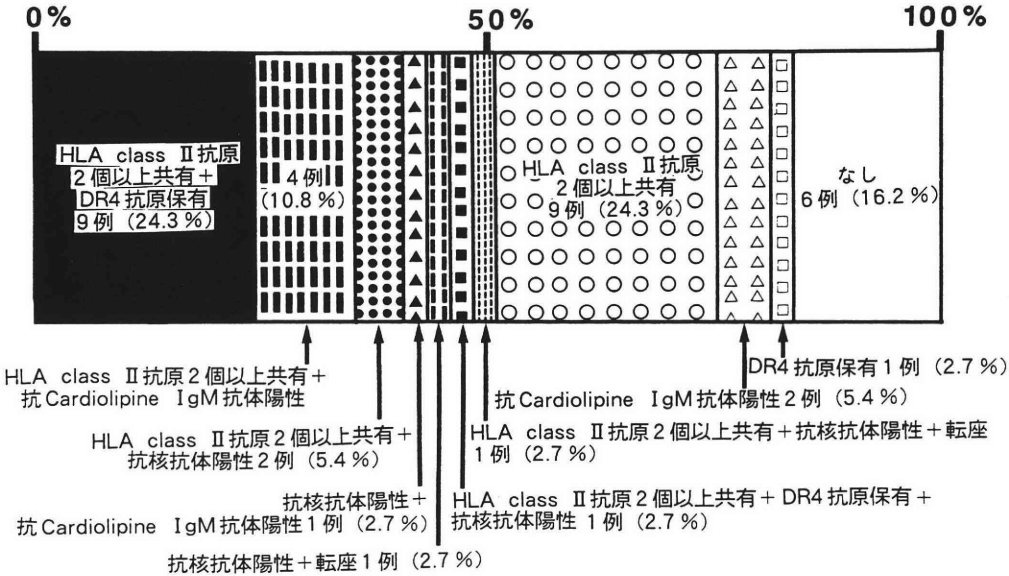


図 4 対象機能性不妊症患者の不育症因子重複度

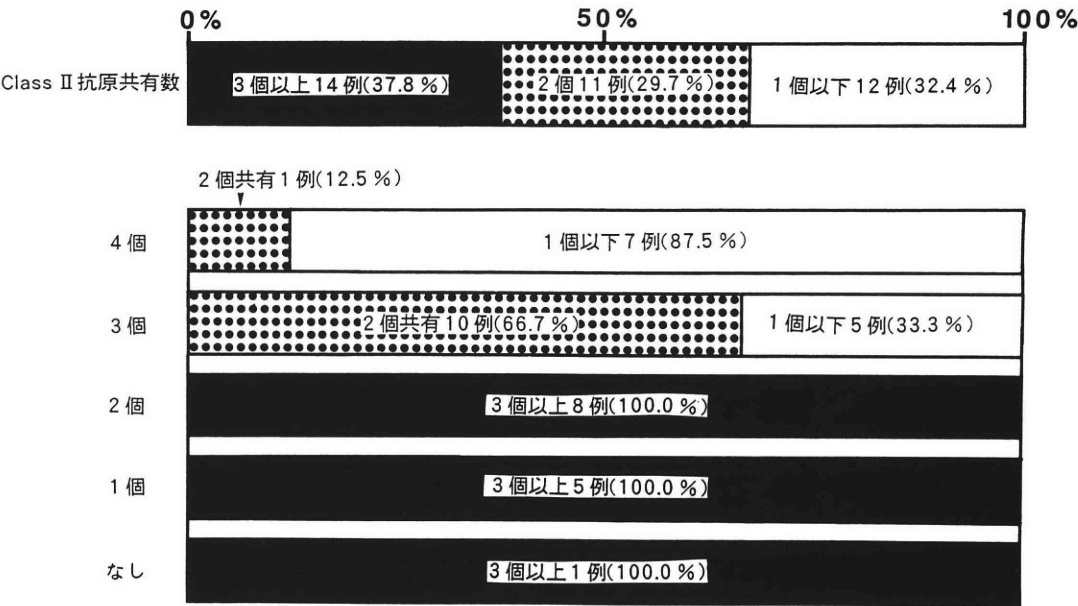


図 5 夫婦における HLA class II 抗原の共有数と夫のみ保有する同抗原数の関係

では 42.9% の高率な生児獲得率であったが、抗原数が減少するにしがたって生児獲得率が低下し、0 個の症例では妊娠が成立していない (図 7)。1 個の生児獲得例では妊娠前に 5 クールのリンパ球移植を必要とした。すなわち、生児獲得例では抗原数の減少に

反比例した多くのリンパ球移植を必要とした。DR4 抗原保有者の柴苓湯療法では 3 例 (27.3%) で生児を獲得したが、1 例 (9.1%, HLA class II 抗原 3 個共有重複例) が流産に終わった。抗核抗体陽性者に対する柴苓湯療法は 3 例 (50.0%) で生児を獲得、今回の因子別

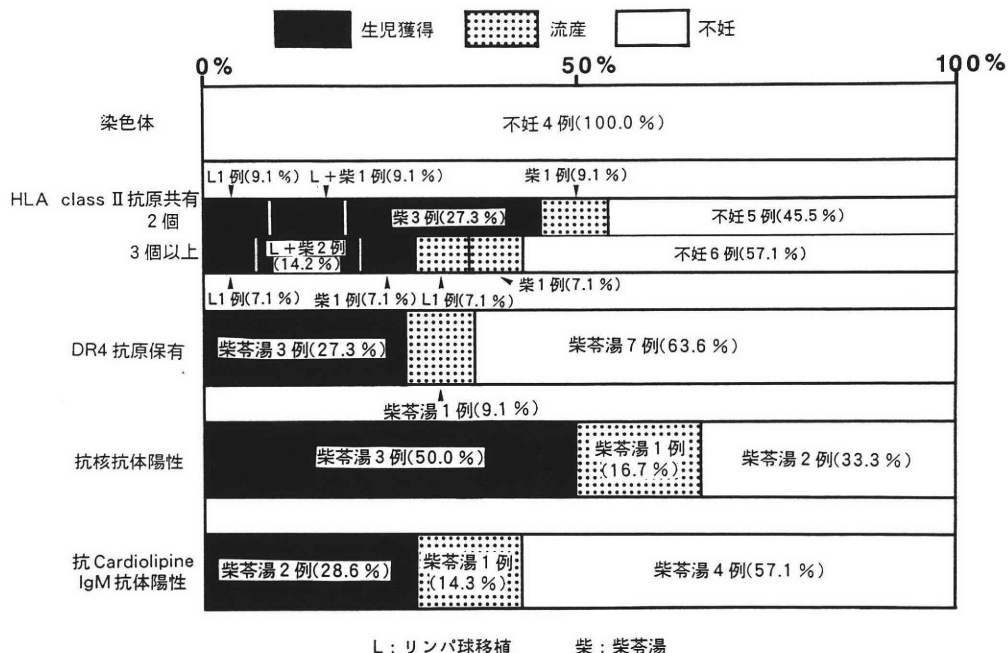


図6 不妊症因子別治療成績

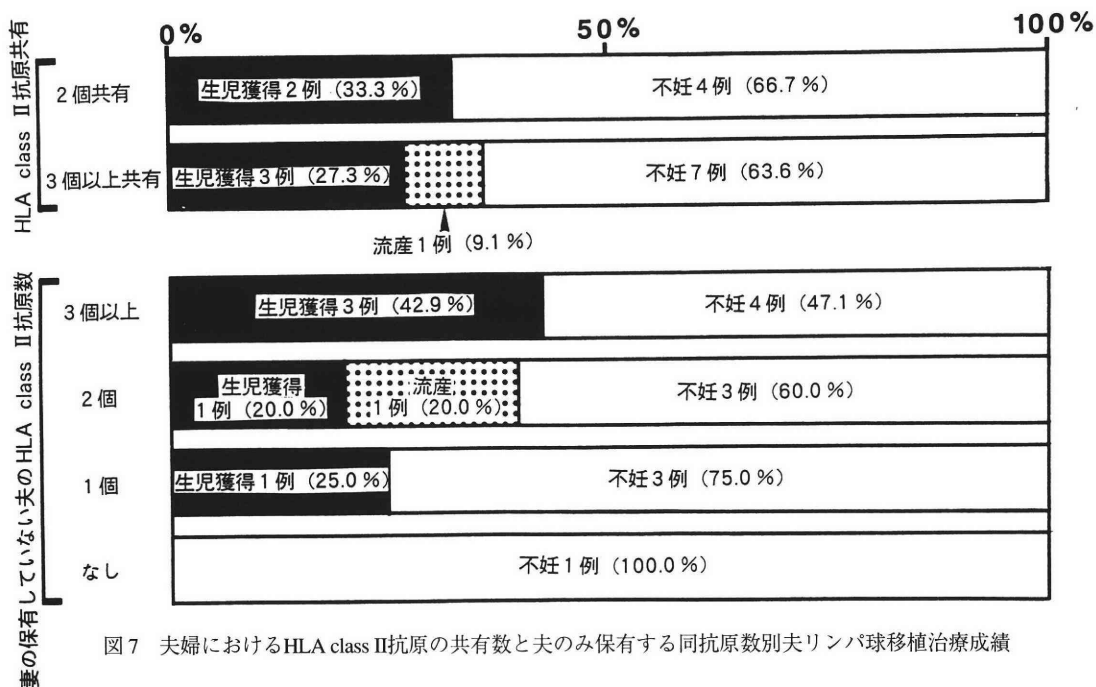


図7 夫婦におけるHLA class II抗原の共有数と夫のみ保有する同抗原数別夫リンパ球移植治療成績

治療成績では最も好成績であった。しかし、流産も1例(16.7%, HLA class II抗原2個共有重複例)で認められた。抗Cardiolipin IgM抗体陽性者に対する柴苓湯

療法では2例(28.6%)で生児を獲得した。流産例は1例(14.3%, HLA class II抗原3個共有重複例)であった。

DR4抗原保有、抗核抗体陽性、抗Cardiolipin IgM抗

体陽性などの自己免疫異常例における柴苓湯療法で極めて特徴的なことは各因子単独例では生児獲得者は存在せず、抗核抗体陽性、抗Cardiolipin IgM抗体陽性合併の1例を除いてすべて同種免疫異常と重複している症例ばかりであったことである。

自己免疫異常因子単独例の柴苓湯療法無効例にはアスピリン、prednisolone療法を行なっているが現在までに生児獲得例ないし妊娠継続例は存在しない。

考 察

機能性不妊症は現状で確立された不妊症検査で異常を認めない原因不明不妊症と定義され、具体的には基礎体温 (BBT)、卵管通気検査、子宮卵管造影 (HSG)、頸管粘液検査、Huhnerテスト、精液検査、子宮内膜日付診、各種ホルモン測定もしくは負荷テスト、超音波断層法 (卵胞径・子宮内膜厚等)、および抗精子抗体などに異常を認めない不妊症²²⁾と考えられている。その頻度は全不妊症の3.7%²³⁾から7.8%²⁴⁾程度と考えられているが、各施設の検索法や診断基準が一律でないためその概念がいまだに曖昧であることは否めない。

特に卵巢機能はいまだに基礎体温だけで診断する施設が多いため、機能性不妊症と診断された症例のなかには、排卵期の卵胞径・面積・estradiol値や黄体期のprogesterone値からretrospectiveに改めて卵巢機能不全不妊症と診断される症例が非常に多い²⁵⁾。加えて、これが最も重要なことであるが、卵巢機能は周期毎に変動するので、例え以上のデータが仮に1周期で正常であっても恒常的に卵巢機能正常とは診断し得ない。不妊症の原因は周期毎に異なるのである。したがって、過排卵刺激で妊娠が成立する症例は機能性不妊症ではなく卵巢機能不全不妊症に分類されるべきである。さらに、我々は機能性不妊症には詳細に検査すれば原因が判明し得る偶発因子である黄体機能不全症²⁶⁾、潜在的高プロラクチン血症、マイコプラズマならびにクラジミア感染症などは含めるべきではないと考える。以上の認識から現状で厳密な意味の機能性不妊症の原因と考えられるのは受精能障害、黄体化未破裂卵胞、卵管機能障害、子宮内膜receptor機能異常、免疫性着床不全等と思慮される。

一般的には機能性不妊症にはAIHやIVF-ETが適応と考えられているが、先に述べた因子のなかで適応になるのはAIHは受精能障害 (精子の処理を必要とする)、IVF-ETは受精能障害 (顕微授精)、卵管機能障害であり、いずれも着床障害の治療になり得ない。また、子宮内膜receptor機能異常は内膜日付診で診断

可能である。

以上の認識から我々は機能性不妊症の主因を着床不全と考え、原因不明不妊症の月経の多くはsubclinical abortionと推測してきた。この推測の正しさは今回の研究で22例39周期の実に87.2%でBBT+12Dayに10mIU/ml以上の血中HCGを検出したことで証明されたと考える。多くの機能性不妊症は習慣性超早期流産 (不育症) の可能性が高い。

近年、不妊症のなかに抗核抗体陽性症例が存在することが報告¹²⁾され、不妊症と免疫異常が注目されるようになった。

以上の事実から、我々は多くの機能性不妊症の主因は不育症と同じく着床に関わる生殖免疫異常と結論するに至った。

しかし、臨床的には妊娠と診断し得ない機能性不妊症と時にはheart beatが確認されるまで妊娠が進行する不育症は病態が全く同じとは考えにくい。そこで厳密に診断した機能性不妊症の不育症因子と不育症に準じた治療の成績を我々が既に報告した不育症の結果¹⁴⁾と比較検討するなかでその差異を見出す手法を用いて機能性不妊症の病因解明を試みた。この結果、今回検討した機能性不妊症の実に83.7%の高率に免疫性不育症因子が認められた。

しかし、その内容は予想通り微妙に異なった。機能性不妊症は不育症と比較して因子の合併が多く抗Cardiolipin IgM抗体陽性者が高率であった。不妊症の抗核抗体陽性者は不育症より複数の抗核抗体を有する事実¹²⁾から不妊症の免疫異常は不育症より複雑なことは予想されていたが、現実はいずれも複雑である。すなわち、HLA class II抗原の共有と抗核抗体ないし抗Cardiolipin IgM抗体陽性といった治療原則が異なる同種免疫異常と自己免疫異常の合併が多かったのである。

さらに、今回の研究で最も重複が多かったのはHLA class II抗原の共有とDR4抗原保有であったが、DR4抗原は自己抗体の産生と関係が深いので基本的には自己免疫異常 (素因) に分類されるから、機能性不妊症の特徴は同種免疫異常と自己免疫異常の合併といえるであろう。

我々の不育症の研究では抗Cardiolipin IgM抗体陽性者はHCG認識に終わった症例がGS確認まで妊娠が進行した例より3倍以上高率¹⁴⁾で、同抗体は超早期流産 (着床不全) と関係していると考えられ、機能性不妊症の病因の一つと推測されたが、推測通り同抗体陽性率は不育症全体より高かった。この事実は同抗体が原因となる流産は他の原因より早期に起こるこ

とを意味し機能的な不妊症の一原因であることを示唆している。

治療成績から考察すると、不育症と異なる点は同種免疫異常に対するリンパ球移植術の成績が悪いのに対して抗核抗体陽性例で柴苓湯療法の成績が良いことであった。リンパ球移植の成績が不育症より悪かった理由は先にも述べたように機能的な不妊症では免疫異常が複雑でHLA class II抗原の共有以外の未知な免疫異常を合併している可能性が高いためと推測される。

しかし、同種免疫異常の診断を夫婦のHLA class II抗原の共有数で下すことへの疑問も残る。最近になって、リンパ球移植の適応をHLA class II抗原の共有数に求めることに対して懐疑論が優勢になってきた¹³⁾。

この点に関して考察したい。妻に産生された夫HLA class II抗原の抗体がblocking agentであるとの仮定⁸⁾が正しいとすれば、我々は同抗原を夫婦で何個共有しているかという事実より夫が妻と異なる抗原を何個保有しているかの方が問題と考える。報告はないものの一般的には近親結婚では流産や不妊が多いと想像されているが、我々はその原因は一般に考えられているように染色体異常などの胎児異常ではなく、同種免疫異常に起因している可能性が高いと推測する。高等な哺乳類では種の繁栄のために近親の胎児の着床を拒絶すると考えるからである。すなわち、我々は着床に関わる同種免疫異常は近親の子供を拒絶する免疫作用と推論する。

以上の推論から我々は夫の保有する妻と異なるHLA class II抗原は夫の妻に対する容量依存性がある近親性の免疫的否定因子と考える。この推論が正しかったことは今回の夫のみが保有する抗原数が2個以下のグループでは夫リンパ球移植の成績が低下し、生児を獲得した例では抗原数が多い症例より多くのリンパ球移植を必要とした事実と夫婦のHLA class II抗原が全く同じ症例が度重なるリンパ球移植にもかかわらず妊娠が成立していない事実が支持すると考える。

夫のみが保有するHLA class II抗原数が減少するとblocking factorの産生が少なくなるため着床不全を招来するので必然的に治療として移植リンパ球数を増やす必要に迫られるわけである。

このように推論を進めてくると、従来から考えられてきた共有数の増加に比例して(夫のみが保有する抗原数の減少に反比例して)不育症の頻度が高まり、リンパ球移植(同量で)の有効率が上がるとの論

理は治療面では誤りとなる。なぜなら共有数が多くなると臨床的には流産と診断し得ない機能的な不妊症に吸収されるので不育症の頻度が低くなるし、リンパ球数当たりの治療効果も低下するからである。したがって、我々は従来から考えられてきた夫婦におけるHLA class II抗原の共有数と不育症の因果関係は基本的には正しいと結論するに至った。

しかしながら、今後は夫婦におけるHLA class II抗原の共有数より夫のみが保有する抗原数を重視すべきである。また、少ない時にはその数に反比例して移植リンパ球数を増やさなければ着床不全を阻止し得ないと認識する必要がある。

今回の研究で明らかになったいま一つの重要な点は同種免疫異常(HLA class II抗原2個以上共有例、夫の保有抗原数不足)に柴苓湯が単独で有効であった事実である。柴苓湯単独療法を行なった症例はすべて抗核抗体ないし抗Cardiolipin IgM抗体陽性またはDR4抗原を保有しているためGVH反応を危惧してやむなく同療法を行なったのであるが、リンパ球移植に優るとも劣らない生児獲得率を得た。その有効機序はすでに報告^{14,18)}されているように自己免疫異常改善のためとも理解されるが、生児獲得例のなかには夫のみが保有するHLA class II抗原数が2個以下の重症同種免疫異常症例が2例含まれるため、柴苓湯が同種免疫異常にも効果があったと考えざるを得ない。我々はリンパ球移植無効HLA class II抗原2個以上共有不育症例にリンパ球移植との併用での有効性を報告¹⁴⁾した。したがって、柴苓湯の同種免疫異常に対する有効性はもはや疑問の余地がないと考えられた。

生殖免疫学的異常に起因する着床不全は再々述べてきたように同種免疫異常と自己免疫異常に大別される。前者に対する代表的治療法はリンパ球の移植(免疫療法)であり、後者は副腎皮質ホルモン療法ないしアスピリン療法である。しかし、今回のように両者を合併している場合は原則的にはいずれの治療法も行なえない。なぜならリンパ球移植はGVH反応が危惧されるし、副腎皮質ホルモン療法はその免疫抑制がblocking factorの産生抑制を引起す可能性があるし、アスピリンが同種免疫異常に有効とは考えられないからである。

この点、柴苓湯の免疫応答調整作用²⁷⁾はいずれの免疫異常にもマイナス作用はないことは今回臨床的に実証し得たと考えるし、一般的な副作用も少ない。したがって、現時点で柴苓湯は機能的な不妊症治療薬としてはfirst choiceの薬物と考えられた。今後、基礎

研究での同方剤の薬理作用の詳細な解明が切望される。

以上の考察より以下の結論が得られた。すなわち、厳密な意味での機能性不妊症の主因は不育症と同じく着床に関わる生殖免疫学的異常である。しかし、その病態は自己免疫異常のウエイトが高いものの同種免疫異常と自己免疫異常を合併することが多く不育症より複雑である。したがって、従来から行なわれてきた免疫治療(リンパ球移植)や副腎皮質ホルモン療法は合併症の発症や同種免疫異常を悪化させる可能性があるため適応に制限がある。この点、漢方薬の柴苓湯は安全性の問題で一長があると考えられた。また、同種免疫異常の診断は従来から行なわれてきた夫婦におけるHLA class II抗原の共有数ではなくて、夫のみが保有する同抗原数を問題にすべきと考えられた。

ただ、本研究の治療成績で生児獲得例が年齢が若く不妊期間が短かった症例に多かったことから、仮に着床不全の原因となる生殖免疫学的状況が改善されたとしても女性の加齢によって卵の老化などの不妊症因子が治療不能になって妊娠の成立が期待できなくなる状況もあり得るので、不妊症治療を行うなかで不妊因子に異常がないにもかかわらず妊娠が成立しない症例や基礎体温の高温が14日以上(16日から18日程度)継続する症例は早い段階で不育症因子が関与する着床不全を疑い、AIHやIVF-ETを実施する前に以上述べてきた各因子の検査を行ない速やかにしかるべき治療に着手する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 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
- 2) Komlos L, Zamir R, Joshua H, et al., Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin Immunol Immunopathol* 7: 330, 1977
- 3) Garencier M, Drazancic A, Kuvacic I, et al., HLA antigen studies in women with recurrent gestational disorders. *Fertil Steril* 31: 401, 1979
- 4) Aoki K, HLA-DR compatibility in couples with recurrent spontaneous abortions. *Acta Obst Gynaec Jpn* 34: 1773, 1982
- 5) Whittaker AT, Taylor A, and Lind T, Unsuspected pregnancy loss in healthy women. *Lancet* 1: 1126, 1983
- 6) De La Torre G, Vazquez LH, Vazquez JA, et al.,

Prevalence of antinuclear antibodies in patients with habitual abortion and toxemic pregnancies. *Rheumatol Int* 4: 87, 1984

- 7) Scott JR, Rote NS, and Branch DW, Immunologic aspect of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 70: 645, 1987
- 8) 坂元正一監修, 習慣流産の診断と治療. P30, 社団法人日本母性保護医協会編, 1990
- 9) 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
- 10) 假野隆司, 婦人科と漢方. P113, ライフサイエンス, 1992
- 11) 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
- 12) 中塚幹也, 吉田信隆, 長谷川淳 他, 不妊・不育症例における抗核抗体スクリーニングの検討. *日産婦誌* 45: 431, 1993
- 13) 八神喜昭, 不育症の病態—その免疫学的考察—. *日産婦誌* 45臨時増刊: S119, 1993
- 14) 假野隆司, 古殿正子, 奥山恵子 他, 当クリニックにおける不育症の原因と柴苓湯を中心とした治療の解析. *日不妊誌* 38: 671, 1993
- 15) 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
- 16) Taylor C, and Faulk WP, Prevention of recurrent abortion with leucocyte trans fusions. *Lancet* 2: 68, 1981
- 17) 鯨島義弘, 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
- 18) 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. N08 P73, 診断と治療社, 1991
- 19) Kano T, and Kishikawa K, Etiological study on hyposecretion of progesterone in the aspect of echographically measured follicle diameter and estradiol and progesterone in the patient categorized by BBT patterns. *Jap J Fertil Steril* 30: 5, 1985
- 20) 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
- 21) 假野隆司, Two-step sandwich 法応用ディスク式HCG EIA test (HCGテストパック) の半定量判定による妊娠の早期予後診断. *日不妊誌* 33: 719, 1988
- 22) 合阪幸三, 森 宏之, 水口弘司 他, いわゆる機能不妊症の病態並びに治療に関する研究. *産婦世界* 34: 1213, 1982
- 23) 合阪幸三, 友成康平, 多和田哲雄 他, いわゆる

機能性不妊婦人に対するHMGを用いた過排卵療法の試み. 日産婦誌 1:196, 1989

- 24) 山本和重, 松波数寿, 早崎源基, 当科における不妊症の臨床統計. 岐阜市民病院年報 11:95, 1991
- 25) 都竹 理, 機能性不妊への過排卵刺激-AIH療法. 臨産婦 46:474, 1992
- 26) 久具宏司, 石原智子, 武谷雄二 他, 機能性不妊におけるclomiphene投与によるprogesterone値の変化. 産と婦 6:1343, 1989
- 27) 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

A study of factors associated with habitual abortion in patients with unexplained infertility

Takashi Kano, Masako Furudono,
Keiko Okuyama and Misako Ishii

Kano Clinic
Osaka 542, Japan

In order to elucidate causes and treatment in functional sterility, we studied factors of habitual abortion (chromosomes, HLA antigen, antinuclear antibody, anticardiolipin IgM antibody) in 37 patients who had a history of an infertility period of 5 years or more but had no evident abnormality of infertility-related factors for at least 3 cycles. When an abnormality was found, the patient was treated according to

treatment used for habitual abortion. The results pertaining to different factors showed almost the same incidence as that of habitual abortion seen in chromosomal abnormality, common possession of HLA class II antigen, possession of DR4 antigen and positive for antinuclear antibody, and a 2-fold or more higher incidence in positive case of anticardiolipin IgM antibody. Compared with habitual abortion, many overlapping cases of autoimmune abnormality and homologous immune abnormality were characteristically seen. For the purpose of treatment, SAIREITO was just as effective as was shown in cases of habitual abortion. However, more viable babies could be obtained in cases complicated with autoimmune abnormality and homologous immune abnormality than in those of a single autoimmune abnormality. These results indicate that unexplained infertility in its strict meaning is mainly due to a reproductive immunological associated with implantation, and presents with a complex immune abnormality complicated with both autoimmune and homologous immune abnormalities, as opposed to habitual abortion. Since implantation of lymphocytes and adrenal cortico hormone therapy are not indicated in complicated cases having autoimmune and homologous abnormalities, SAIREI-TO therapy was considered to be the main treatment of choice for unexplained infertility. When a homologous immune abnormality is diagnosed, it was considered that the number of HLA class II antigens which are possessed by only husband should be of greater importance rather than the number of their common possession of HLA class II antigens.

(受付: 1993年7月15日)

(受理: 1993年9月27日)

内分泌不妊外来受診患者に対する ホルモンスクリーニング検査の有用性に関する検討

Efficacy of Hormonal Screening Tests for the Patients with Menstrual Disorder or Infertility

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

石 原 理	飯 野 好 明	斉 藤 正 博
Osamu ISHIHARA	Yoshiaki IHNO	Masahiro SAITOH
竹 田 省	木 下 勝 之	
Satoru TAKEDA	Katsuyuki KINOSHITA	

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

1991年の1年間に、月経異常あるいは不妊症を主訴として当科を受診した症例364例(平均 28.1 ± 6.3 歳(mean \pm SD))全例に、ホルモンスクリーニング検査として、LHRHテスト、TRHテストおよびエストラジオール、プロゲステロン、フリーテストステロン、アンドロステンジオンの同時測定を行った。その結果、早発閉経あるいは卵巣性無月経を呈するもの18例(4.9%)、内分泌学的多嚢胞性卵巣症候群と思われる症例32例(8.8%)、高アンドロゲン血症16例(4.4%)、高プロラクチン血症37例(10.2%)、潜在性高プロラクチン血症15例(4.1%)が発見された。多項目の内分泌学的スクリーニング検査により、特異的治療の可能性のある内分泌病態の発見される頻度が明らかとなり、同時多項目検査の有用であることが示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 32 - 36, 1994)

緒 言

月経異常あるいは不妊症を主訴として来院する患者に対しては、通常各種ホルモンの測定またLHRH負荷試験(LHRHテスト)、TRH負荷試験(TRHテスト)などが行われる。しかし、各施設で各種ホルモン測定方法や測定キットに相違があることから、排卵障害や内分泌異常を診断するためには、排卵を有する婦人の月経周期のなかで、卵胞期初期における各種ホルモンの正常値を決定しておくことが不可欠と思われる。そこで、月経異常あるいは不妊症を主訴として当科を受診した症例全例に、ホルモンスクリーニング検査として、LHRHテスト、TRHテストおよびエストラジオール(E_2)、プロゲステロン(P_4)、フリーテストステロン(FT)、アンドロステンジオン($\Delta 4$)の同時測定を行い、排卵を有する婦人における各

種ホルモンの正常値を決定し、また、内分泌不妊外来受診患者に対する同時多項目内分泌学的スクリーニング検査の意義につき検討した。

対象と方法

1991年の1年間に、月経異常あるいは不妊症を主訴として当科を受診した症例は364例であった。これらの症例全例について、原則として、月経周期を有するものについては月経開始後3から5日目の卵胞期初期に、また無月経の症例については初診時に、LHRHテスト、TRHテストおよび E_2 、 P_4 、FT、 $\Delta 4$ の同時測定を行った。LHRHテストはLHRH $100 \mu g$ を、TRHテストはTRH $500 \mu g$ を静注し、15分後と30分後に採血しLH、FSH、PRLを測定した。無月経症例の結果については、 E_2 および P_4 の値より、明らかに排卵直前や黄体期に検査が行われたと思われる症

例を除外して、評価した。なお、各ホルモンの測定にはそれぞれ、LHはSpac-S LHキット(第一ラジオアイソトープ)、FSHはSpac-S FSHキット(第一ラジオアイソトープ)、プロラクチン(PRL)はSpac-S PRLキット(第一ラジオアイソトープ)、E₂はE₂ RIAキット(第一ラジオアイソトープ)、P₄はDPCプロゲステロンキット(日本DPC)、FTはDPCフリーテストステロンキット、Δ4はAndrostenedione Test Set (Wien Lab)などRIAキットを用いた。

結 果

(1) 対象症例の年齢は13から45歳に分布した(平均

28.1±6.3歳(mean±SD:以下同様))。FSH20mIU/mL以上の早発閉経あるいは卵巣性無月経症例(POF)は、18例であった。このPOF群の平均FSH値は48.5±33.4mIU/mLであった。また、LHの基礎値は17.0±13.0mIU/mLであった。一方、POFおよび無月経例以外の排卵周期を有すると思われる婦人のデータ(n=230)をlog変換し、平均値と正常範囲(mean±3/2SD)を求めると、卵胞初期平均FSH値は7.0mIU/mLであった。また、FSHの基礎値の正常範囲は、5.0から9.9mIU/mLと考えられた。同様に排卵周期婦人の卵胞期初期LHの平均値と正常範囲は、それぞれ、3.2mIU/mlおよび0.9から11.6mIU/mLであった(表1)。

表1 卵胞初期ホルモン基礎値の正常としてよいと思われる値(本文参照)
排卵周期の卵胞初期の測定値をlog変換後平均して得た値である(n=230) Δ4: androstenedione

	mean (M)	M±SD	M±3/2SD	M±2SD
LH (mIU/mL)	3.2	1.3-7.5	0.9-11.6	0.6-17.8
FSH (mIU/mL)	7.0	5.0-9.9	4.3-11.6	3.6-13.8
PRL (ng/mL)	4.3	2.8-6.5	2.3-8.1	1.8-10.0
Δ4 (ng/mL)	0.89	0.58-1.36	0.47-1.68	0.38-2.08

表2 多項目内分泌スクリーニング検査により発見された異常。各群の定義については本文の方法の項を参照(mean±SD)

	年齢	LHRHテスト						TRHテスト			FT (pg/mL)	androstenedione (ng/mL)
		LH (mIU/mL)			FSH (mIU/mL)			PRL (ng/mL)				
		前	15分	30分	前	15分	30分	前	15分	30分		
POF (n=18)	33.1 ±7.4	17.0 ±13.0	61.5 ±62.5	91.4 ±106.2	48.6 ±33.4	67.4 ±51.6	79.7 ±64.1	4.3 ±1.7	43.8 ±27.0	37.0 ±21.1	0.77 ±0.35	0.81 ±0.56
PCO (n=32)	24.0 ±4.5	17.3 ±7.4	103.8 ±65.0	133.1 ±83.6	8.1 ±2.0	13.6 ±4.9	16.4 ±6.0	5.8 ±3.6	39.8 ±17.2	32.1 ±13.9	1.97 ±0.95	1.90 ±0.59
高PRL 血症 (n=37)	27.9 ±4.9	5.0 ±3.0	18.2 ±12.9	20.7 ±14.9	6.9 ±2.6	10.2 ±4.7	11.7 ±5.9	18.2 ±11.3	68.6 ±29.5	59.6 ±25.3	1.18 ±0.70	1.03 ±0.50
OHP (n=15)	30.0 ±6.7	3.9 ±2.9	16.6 ±14.3	19.6 ±15.9	5.7 ±2.8	7.8 ±3.7	9.4 ±4.7	5.7 ±2.2	110.3 ±16.1	90.7 ±19.2	0.75 ±0.20	0.93 ±0.47
高アン ドロゲ ン血症 (n=16)	27.5 ±6.5	5.4 ±3.1	28.2 ±20.1	33.2 ±22.7	6.3 ±2.5	9.9 ±4.0	11.5 ±4.7	4.6 ±1.7	31.1 ±16.7	24.6 ±14.3	4.38 ±1.75	1.59 ±0.37

POF: 早発閉経および卵巣性無月経症例 PCO: 内分泌学的多嚢胞性卵巣症候群症例

高PRL血症: 高プロラクチン血症 OHP: 潜在性高プロラクチン血症

FT: フリーテストステロン

PRLおよび $\Delta 4$ の正常範囲については、表1に示す通りである(以下に詳述)。

(2) FSH正常, LH高値(12mIU/mL以上), LH/FSH>2の三条件を満たす症例は32例あり, 内分泌学的多嚢胞性卵巣症候群と思われる症例(PCO)として抽出した。PCO群の平均FSH値は 8.1 ± 2.0 mIU/mL, 平均LH値は 17.3 ± 7.4 mIU/mLであった。この32例中31例はLHRHテストで過剰反応を示した(図1)。

PCO群のうち, 高アンドロゲン血症($\Delta 4 > 1.7$ ng/mL)を伴ったものは21例, 伴わない症例は11例であった。しかし, 年齢, LHを含むその他の検査値に関しては, 高アンドロゲン血症の存在とは関係なく, 全く相違を認めなかった。したがって, PCO群全体の検査値は表2のごとくであった。

(3) PRL10ng/mL以上の高PRL血症は, 37例であった。なお, POFおよびPCO群にPRL10ng/mL以上の症例は存在しなかった。高PRL群を除外後の症例のみでTRHテストの結果をlog変換して評価するとTRH負荷前のPRL平均値は4.3, 15分後42.9ng/mL, 30分後37.1ng/mLで, 正常範囲として $\text{mean} \pm 3/2\text{SD}$ をとると, 15分後100ng/mL以上, 30分後85ng/mL以上は潜在性高

PRL血症(OHP)と判断してよいと考えられた(表3)。この評価基準では, 残る症例のうち, 15例がOHPと判定された。また, POF群に1例のOHPが含まれていた。高PRL血症およびOHP群のその他の検査値は表2の通りであった。

(4) 排卵周期症例について, $\Delta 4$ を評価すると, $\Delta 4$ の正常範囲は0.47から1.68ng/mLとなった。FTは, 測定感度(0.5pg/mL)以下の症例が19例存在するため, 便宜的に, これらの症例を0.5pg/mLとして $\text{mean} \pm 3/2\text{SD}$ をとると, 2.7pg/mL以上は明らかな高アンドロゲン血症としてよいと考えられた。この基準では16例が高アンドロゲン血症に適合した。また, この基準で見るとPOF18例中1例(5.6%), PCO 32例中21例(65.6%), 高PRL症例37例中4例(10.9%)に高アンドロゲン血症を伴っていた。図2のように, FTと $\Delta 4$ にはほぼ正の相関があるが, 高アンドロゲン血症症例中には, 明らかにFT優位の症例と, 明らかに $\Delta 4$ 優位の症例が存在する。また, 内分泌学的PCOにおける高アンドロゲン血症症例には, FTのみの上昇を示

表3 TRH500 μ g負荷によるPRL値の正常としてよいと思われる値(本文参照)
排卵周期の卵胞初期の測定値をlog変換後平均して得た値である

	mean (M)	M \pm SD	M \pm 3/2SD	M \pm 2SD
PRL前 (ng/mL)	4.3	2.8-6.5	2.3-8.1	1.8-10.0
15分	42.9	24.4-75.5	18.4-100	13.9-133
30分	37.1	21.4-64.5	16.2-85.0	12.3-112

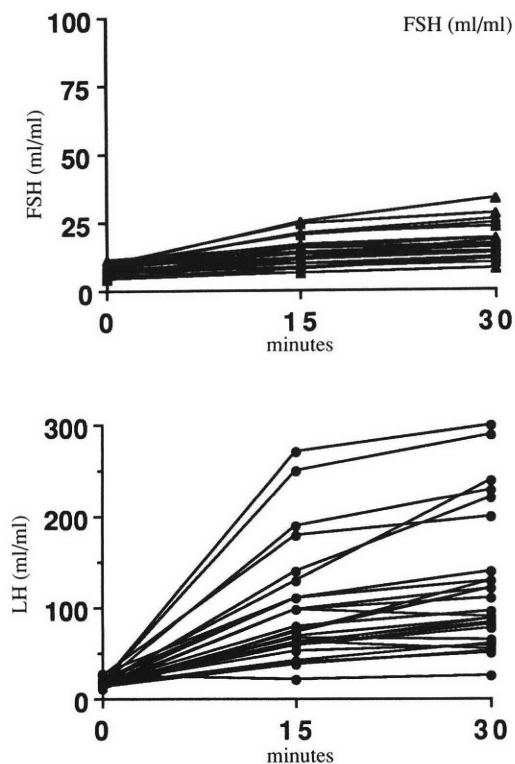


図1 PCO症例のLHRH(100 μ g)負荷に対するLHとFSHの反応(n=32)

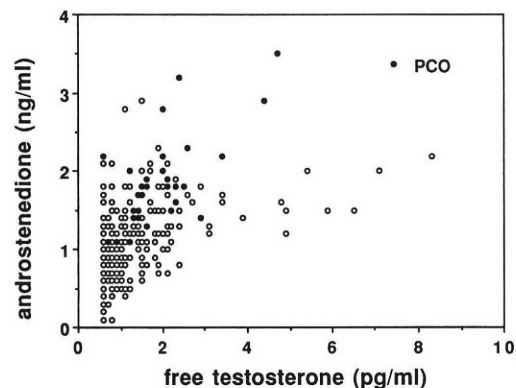


図2 全症例のフリーテストステロンとアンドロステンジオンの相関
PCO症例は●で示した(n=358 PCO症例はn=32)

す症例は無かった。PCOを除いた高アンドロゲン血症群の他の検査値を表1に示す。

考 察

月経異常あるいは不妊は、産婦人科外来を受診する患者の主訴として、最もしばしば遭遇するものであり、これらの症例に対しては、内分泌学的背景について精査を行うことが望ましい。しかし、実際は、現病歴、既往歴および家族歴を考慮し、また、内診所見や全身所見、さらに超音波断層法などreal timeで得られた情報と、基礎体温や頸管粘液量などから、適切な内分泌学的臨床検査を選択しているのが現状である。そこで今回我々は、月経異常および不妊の症例全例に対して、スクリーニング検査としてLHRH test, TRH testおよびE₂, P₂, FT, Δ4の同時測定を行い、内分泌学的検査における異常の出現頻度につき検討した。

これらの検査を行う場合、まず考慮すべきことは、月経周期におけるLHRHテストの施行時期である。今回、月経のある症例は卵胞期初期に、また無月経症例では、性ステロイド負荷によるゴナドトロピンなどへの影響を避けるため、来院時直ちに施行したが、排卵直前であったり黄体期であった場合には、同時測定したE₂およびP₂の値により評価の対象になるデータかどうか判定した。

不妊症症例のうち排卵周期を持つ症例のホルモン値を正常値としてlog変換後、平均値を算出し、平均から3/2SD以内を正常範囲とした(表1および表3)。これら正常値を基準として、表2に示すような内分泌病態を示す症例の各種ホルモン値を明らかにした。

その結果、全症例の32%になんらかの異常が発見された。特にLH異常を伴わない高アンドロゲン血症が4.4%に存在し、また、OHPは4.1%であったことから、スクリーニングとしてこれらの検査を行うことの重要性が示唆された。今回検討した正常値算出の母集団は不妊症症例であるが、LH, FSH, PRLについては正常婦人について報告されている値と同様であった^{3,4)}。

このスクリーニング検査で、TRH負荷によるOHPは比較的頻度が高いが、高アンドロゲン血症と共にその臨床的意義は確立されていない。しかし、黄体機能不全をきたすOHPのあることは知られており、プロモクリプチンが有効であるとする報告もあることからスクリーニング検査で明らかにしておくことは有用である。また、高LHのPCOを呈する症例には

hMG-hCGあるいはGnRHa-hMG-hCG療法を要することが多く、治療計画上不可欠の検査と思われる。

一方、LHの上昇を伴わない高アンドロゲン血症、とくにΔ4上昇を伴わないFT上昇症例の病態については、不明である。FTは卵巣における産生量ばかりでなく、副腎におけるアンドロゲン産生と、血中ステロイドホルモン結合グロブリン(SHBG)の量と関係があると思われる。排卵や受精との関係は不明であるが、今回の検討により、LH上昇を伴わない高アンドロゲン血症症例が、婦人科外来受診患者に少なからず存在することが明らかとなり、PCOを疑う症例ばかりでなく、スクリーニング検査としてアンドロゲンを測定することは有用であると思われる。

以上、内分泌不妊外来受診患者におけるホルモンスクリーニング検査の結果について述べた。

本稿をまとめるにあたりデータ処理にご協力頂いた松岡菊美および新藤明子の両氏に深謝致します。

文 献

- 1) 中山徹也, 高崎克哲, 矢内原巧, LHRHテストの適応と解釈. 産と婦 56:867, 1989
- 2) Speroff L, Glass RH and Kase NG, Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Williams & Wilkins, 1989
- 3) 多賀理吉, 町田稔文, プロラクチンの測定とデータの読み方. 産婦治療 64:601, 1992
- 4) 河上征治, 樋口泰彦, FSH, LHの測定とデータの読み方. 産婦治療 64:597, 1992

Efficacy of hormonal screening tests for the patients with menstrual disorder or infertility

Osamu Ishihara, Yoshiaki Ihno,
Masahiro Saitoh, Satoru Takeda
and Katsuyuki Kinoshita

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

Three-hundred sixty-four cases of patients with infertility or menstrual disorder were investigated with one-point multiple hormone screening test including LHRH challenge test (100 μg), TRH challenge test (500 μg), assays for estradiol, progesterone, free testosterone and androstenedione. The screening revealed the relative

incidence of specific endocrinological disorders as follows: premature ovarian failure as 4.9% (18 cases), endocrinological polycystic ovary syndrome as 8.8% (32 cases), hyperandrogenemia as 4.4% (16 cases), hyperprolactinemia as 10.2% (37 cases) and occult hyperprolactinemia as 4.1% (15 cases). This study sug-

gets that the one-point multiple hormone screening test is recommendable for the patients at out-patient clinics for infertility or other menstrual disorders in terms of the unexpected high incidence of these specific disorders.

(受付:1993年3月22日)

(受理:1993年9月28日)

Klinefelter症候群の臨床的検討

A Clinical Study on Klinefelter's Syndrome

金沢大学医学部泌尿器科学教室

天 野 俊 康

Toshiyasu AMANO

徳 永 周 二

Shuji TOKUNAGA

打 林 忠 雄

Tadao UCHIBAYASHI

大 川 光 央

Mitsuo OHKAWA

Department of Urology, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan

1985年1月より1993年4月までの間に、染色体検査にてKlinefelter症候群と診断された15例につき検討を加えた。その結果、染色体は、47,XXYが14例、46,XY/47,XXYが1例であった。初診時年齢は2歳から51歳であり、小児例では停留精巣、20歳代前半では外性器などの身体的異常、20代後半から30歳代では不妊症を主訴とし、それ以上では他疾患の精査中に本症候群と診断された。内分泌学的には、成人例でテストステロンは77%が低値、LHは58%が高値、FSHはモザイクの1例以外はすべて高値を示した。精巣容量は全例小さく、8例の精液検査では精子を認めず、5例の精巣組織像では、精細管はSertoli細胞のみで、萎縮、繊維化、硝子化および間質でのLeydig細胞の増殖が認められた。合併疾患は、停留精巣、痴呆、脊髓空洞症などが認められた。治療は、成人例のうち7例にテストステロンの補充療法が行われた。挙子希望者3例にはAIDを依頼し、1例の配偶者に妊娠が確認された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 37 - 41, 1994)

緒 言

1942年、Klinefelterらにより報告¹⁾され、1954年、Jacobsら²⁾により性染色体の異常が指摘されたKlinefelter症候群は、一般男子人口の約0.2%に認めるとされている³⁾。今回われわれは、当科外来受診者のうち染色体検査にてKlinefelter症候群と診断された15例について臨床的検討を加えたので報告する。

対象および方法

1985年1月より1993年4月までの8年4カ月間に当科外来を受診した患者のうち、染色体検査 (leucocyte karyotype) にてKlinefelter症候群と診断された15例を対象とし、臨床所見、内分泌所見および治療法につき検討を加えた。

結 果

15症例の染色体の核型は表1に示すごとくで、15例中14例が47,XXYであり、1例のみが46,XY/47,XXYt (21q, 11q) のモザイクを示した。

初診時年齢は、2歳から51歳であった。2歳および4歳の2例は、いずれも停留精巣のため当科を受診し、末梢血染色体検査にてKlinefelter症候群と診断されたものである。20歳から29歳の3例は、陰茎發育不全、女性化乳房などの身体的異常を主訴としており、29歳から36歳までの7例は、不妊症を主訴としていた。さらに、39歳から51歳までの3例は、血尿あるいは他科からの紹介で当科を受診し、Klinefelter症候群と診断された。初診時の年齢により、主訴が異なるという特徴が認められた (図1)。

内分泌所見上、小児の2例を除く13例中、テストステロン (T) は3例が正常、他の10例 (77%) が低値を示した。黄体化ホルモン (LH) は、成人例12例中5例

表1 初診時年齢, 主訴, 検査成績および合併疾患

	年齢	主訴	染色体型	精巣容量 ml	T ng/dl	LH mIU/ml	FSH mIU/ml	PRL ng/ml	合併疾患
1	31	infertility	47XXY	3.0	67.0	41.1	46.8	3.6	-
2	29	infertility	47XXY	2.0	205.0	48.1	63.7	3.1	-
3	30	infertility	47XXY	2.5	167.0	9.3	28.6	12.0	-
4	33	infertility	47XXY	0.6	237.7	13.7	74.3	7.0	-
5	36	infertility	47XXY	1.9	150.8	109.4	61.1	8.7	-
6	20	genital anomaly	47XXY	1.8	441.0	73.8	75.1	12.0	-
7	41	others	47XXY	1.0	165.6	44.5	63.7	8.8	-
8	20	genital anomaly	47XXY	1.6	39.1	.	.	.	-
9	35	infertility	47XXY	1.6	66.0	55.1	67.2	5.5	-
10	29	genital anomaly	47XXY	1.6	286.0	125.6	97.3	10.6	痙性対麻痺, 痴呆
11	4	migratory testis	47XXY	1.5	50.8	6.4	5.6	5.7	停留精巣, 夜尿症
12	2	migratory testis	47XXY	0.9	50.8	2.2	2.4	11.3	停留精巣, 多指症, 動脈管開存症
13	39	others	46XY/47XXY	7.9	631.6	25.5	19.0	.	脊髄空洞症, 痴呆
14	51	others	47XXY	0.8	28.3	7.1	27.9	13.1	非ホジキン病
15	36	others	47XXY	1.5	123.8	4.3	33.4	23.6	慢性関節リウマチ

が正常値, 7例(58%)が高値を示したが, 卵胞刺激ホルモン(FSH)はモザイクの1例のみ正常値で他の11例はいずれも高値を示した. プロラクチン(PRL)に関しては, 成人例11例の測定ではいずれも正常値を示した(図2). なお, Tが正常であった3例中1例はモザイク症例, 他の2例は陰茎發育不全, 勃起不全を訴えた20歳代の症例であった.

性機能に関しては, 痴呆症を合併した2例を除く成人の11例中, 2例が勃起力の低下を訴えたが, 11例すべて性交は可能であった.

精巣容量の測定では, 全例正常精巣より小さく, 最も大きかったモザイク症例でも7.9mlのみであった(表1).

成人症例の8例に精液検査が施行されたが, いずれも精子が認められなかった. モザイク症例では, 用手法による精液採取が不能であったが, 前立腺マッサージによる前立腺液検査にて精子が確認され, 多少の造精機能はあるものと考えられたが, 脊髄空洞症, 痴呆などを合併した症例であり精巣生検は施行されていない.

精巣生検は, 小児1例を含む5例に施行されていた. 成人4症例の精巣の病理像は, いずれも精細管にはSertoli細胞のみで, 萎縮, 繊維化および硝子化を認めた. 間質では, Leydig細胞の増殖が認められ

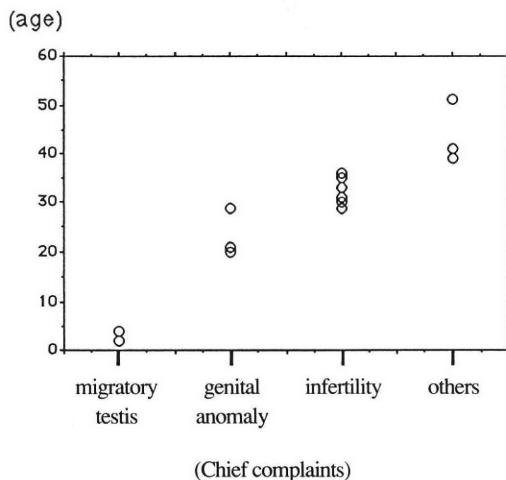


図1 Chief complaints and age

た. また小児の精巣組織像でも, 精細管内にgerm cellは認められなかった. なお現在では, 精巣生検は染色体検査にてKlinefelter症候群と診断された場合, 原則として施行していない.

合併疾患は表1に示すごとく, 小児では停留精巣, 多指症, 成人では痴呆, 痙性対麻痺, 脊髄空洞症, 非ホジキン病などが認められた.

治療に関しては, 小児例では経過観察のみであり,

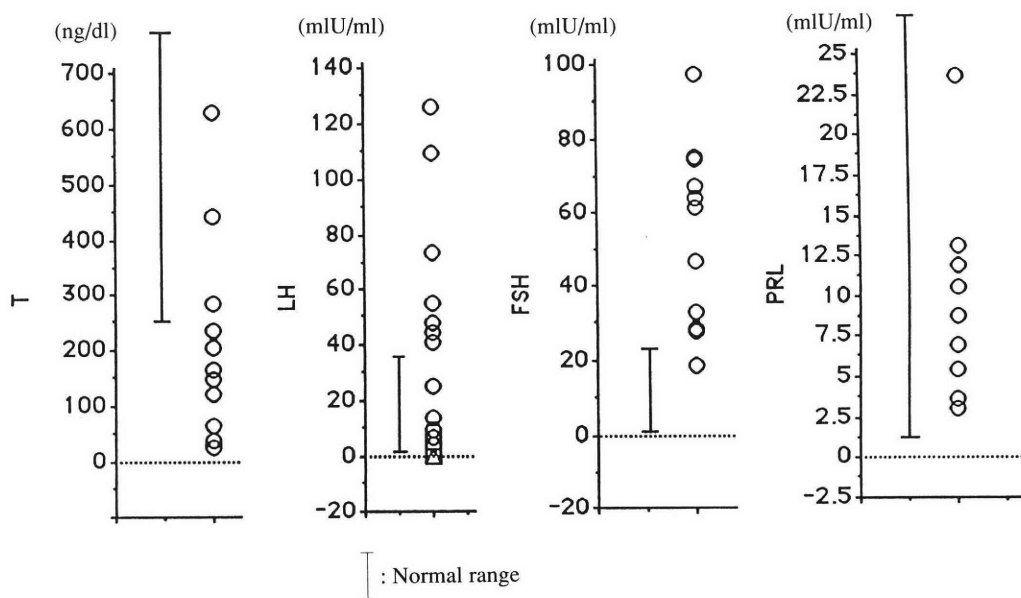


図2 Serum hormonal levels in patients with Klinefelter's syndrome

将来的にTの血中濃度などを参考とし、T補充療法を検討する予定である。現在までのところ、初診時2歳の症例では、4歳までの観察で精巣の大きさはほぼ不変であり、ホルモン値は再検しておらず、4歳例では12歳までの観察で、精巣容量は1.5mlが2.6ml、Tは50.8ng/dlが108.0ng/dlとなっているが、思春期の発来はまだ認めていない。成人例では、原則としてTの血中濃度をみながらT補充療法を行うことにしているが、現在のところ男性ホルモン不全徴候の改善を望む8例に対して、外因性Tの補充療法を継続している。T補充療法後の血中T値は、Tが定期的に投与されている間は、正常下限値までの上昇は認められるが、投与間隔が延びるにつれ低値を示した。観察期間の短い2例を除く6例のうち、長期間定期的にTを継続しているものは、3例にすぎず、長期T補充療法の困難さを示すものと考えられた。また、T補充療法後の血清内LH、FSHに関しては、上記6例中Tの補充が十分であったと考えられる時期において、正常化したものは4例、高値のままであったものが2例であった。

さらに、挙子希望に対しては、AIDとし紹介しているが、現在のところ3例の配偶者が試み1例に妊娠が確認されている。

考 察

現在ではKlinefelter症候群は、2個以上のX染色体と

1個以上のY染色体を有する細胞が認められるものとされる⁴⁾。今回の15例中14例の染色体は47,XXYで、1例が46,XY/47,XXYt(21q, 11q)とモザイクを示した。46,XY/47,XXYのモザイクはKlinefelter症候群の約9%に認められる³⁾。われわれの経験した症例は、幼少期より痴呆、歩行障害を認め、脊髄空洞症のため神経内科入院中に、性機能の評価のため当科を紹介された39歳の男性である。精巣の大きさは正常と47,XXY患者のはほぼ中間で、内分泌学的にもT、LH、FSHおよびPRLいずれも正常値を示した。精巣生検は未施行であるが、前立腺液検査にて精子の存在を確認しており、性腺機能的にみて正常者と47,XXYのKlinefelter症候群患者との中間に位置するとも考えられ、興味深い。

年齢により主訴に差が認められたが、小児例は停留精巣の際偶然に発見され、20歳前半では性への関心の高まりから二次性徴の異常など身体的異常を主訴に診断される。さらに20代後半から30代にかけては、結婚数年後不妊を訴え受診し、それ以上の年齢では性機能異常とは無関係に他疾患の精査中に本疾患と診断される。このようなKlinefelter症候群患者の初診時年齢と主訴との関係は、男性の性成熟の過程と関連して説明できるものと思われた。

一方、不妊症の見地からみると、無精子症および乏精子症の染色体検査の結果、無精子症の17.7%に染色体異常が認められその半数以上がKlinefelter症候

群であり、乏精子症では6.7%の染色体異常のうち3分の1が本症候群であったとの報告がある⁵⁾。今回の観察期間中、不妊を訴え無精子症と診断された症例が47例、乏精子症と診断された症例が106例あった。これらの症例に対し、必ずしも染色体検査を施行しておらず、Klinefelter症候群を見逃していた可能性も否定できない。今後無精子あるいは乏精子症症例には、本症候群を念頭に置き染色体検査を積極的に施行すべきであると考ええる。

内分泌的には、46,XY/47,XXYのモザイク症例を含む3例が、血中Tが正常値を示したが、その1例は正常下限であり、他の成人例10例はいずれも低値を示した。従来の報告でもKlinefelter症候群患者でもTが正常値を示すものが少数ながら認められる⁶⁻⁹⁾。Klinefelter症候群では、精巣のLeydig細胞の増生はあるものの、絶対数の増加はなくLeydig細胞の機能において症例間で相違があり⁷⁾、T産生能および産生予備能は中等度から高度に低下している¹⁰⁾と考えられる。したがって、T産生能障害が軽度な症例において正常T値を示すものと推察された。LHに関しては、測定された成人例12例中7例が高値を示したが、FSHは12例中モザイクの1例を除き、11例が高値を示した。これらの所見は従来の報告と同様であった⁶⁾。

さらに、精巣の大きさ、精液所見に関しても、46,XY/47,XXY症例が他の症例より若干精巣容量が大きく、わずかに精子を認める以外、精巣は非常に小さく、精液中に精子は認められなかった。精巣生検でも、施行された成人4症例とも精細管の硝子化およびSertoli細胞のみを認め、間質でのLeydig細胞の増殖がみられた。これらの所見も従来の報告³⁾と同様であり、最近では、T分泌にさらに悪影響を及ぼしかねない点を考慮して、47,XXYのKlinefelter症候群と診断された症例には、精巣生検は施行しない方針としている。

今回の検討における本症候群の合併症に関しては、小児の停留精巣、成人での痴呆および脊髄神経系の疾患があげられた。布施ら⁷⁾の56例の検討では2例が停留精巣を主訴としており、今回の検討より低頻度であったが、停留精巣患者で、精巣の発達が著しく悪いものは本症候群の可能性も考え、染色体検査を施行してもよいと考えられた。また精神病患者の0.59%に本症例がみられ一般の発生率より有意に高いとの報告³⁾もあり、今回みられた痴呆、脊髄神経系疾患患者にも本疾患患者である可能性も考慮すべきであろう。さらに、分子生物学の進歩に伴い、

各種疾患の遺伝子学的研究が進むにつれ、今後本疾患の発見率も増加すると予想され、合併症も多様化してくるものと思われる。

Klinefelter症候群の治療について、造精機能に関しては一般に全く無効であるが、46,XY/47,XXY症例で妊娠性が認められた症例も報告されており³⁾、47,XXY症例でも乏精子症を呈する症例もあり^{5,7,8)}、精液所見の確認は重要と考えられた。Tの補充療法に関しては、T投与により二次性徴発現、体重増加などの身体的効果だけでなく、より活発で積極的な性格が形成されるという精神的な効果⁷⁾も重要と思われる。しかしながらT補充に対する反応は、症例間に差があり、内分泌学的にもLH、FSHが正常化するものや高値のままのもの様々であり^{7,9)}、今回のわれわれの結果もほぼ同様であった。これらは画一的なT補充療法では不十分であることを示すものと考えられ、T投与の量、間隔および副作用に関して、各症例ごとに血中ホルモンレベルを測定しながら治療することが重要と考えられた。

結 語

1985年1月より1993年4月までの8年4カ月間に当科にてKlinefelter症候群と診断された15例につき検討を加え、以下の結果がえられた。

- 1)染色体検査では、1例が46,XY/47,XXYとモザイクであり、他の14例は47,XXYであった。
- 2)小児例では停留精巣の精査中に、20歳代前半では外性器などの身体的異常を、20代後半から30歳代では不妊症を、それ以上では他疾患の精査中に本症候群と診断された。
- 3)内分泌学的には、Tは成人例では77%が低値を示し、LHは58%が高値を示したが、FSHはモザイクの1例以外はすべて高値を示した。
- 4)精巣容量の測定では、モザイク症例では他のものよりやや大きいものの、全例正常精巣より明らかに小さかった。
- 5)成人例のうち7例にT補充療法が行われた。挙子希望者3例にはAIDを依頼し、1例の配偶者に妊娠が確認された。

文 献

- 1) Klinefelter HF, Reifenstein EC and Albright F, Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. J Clin Endocrinol 2: 615, 1942

- 2) Jacobs PA, and Strong A, A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183: 302, 1959
- 3) Nielsen J, Klinefelter's syndrome and the XYY syndrome. A genetical, endocrinological and psychiatric-psychological study of thirty-three severely hypogonadal male patients and two patients with karyotype 47, XYY. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 209: 1, 1969
- 4) Castro-Magana M, Bronsther B and Angulo MA, Genetic forms of male hypogonadism. *Urology* 35: 195, 1990
- 5) 近藤宜幸, 目黒則男, 清原久和 他, 男性不妊症における染色体異常の研究. *日泌尿会誌* 83: 1442, 1992
- 6) 福谷恵子, Klinefelter症候群における間脳-下垂体-睾丸系の内分泌学的研究. *日泌尿会誌* 67: 954, 1976
- 7) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴夫 他, Klinefelter症候群の臨床的観察. *日泌尿会誌* 74: 226, 1983
- 8) 空本慎慈, 吉田裕之, 安元章浩 他, Klinefelter症候群の臨床的検討. *西日泌尿* 54: 1674, 1992
- 9) 笹川五十次, 風間泰蔵, 梅田慶一 他, Klinefelter症候群の臨床的・内分泌学的検討. *西日泌尿* 47: 687, 1985
- 10) 伊藤直樹, ゴナドトロピンと精巣機能. *日不妊会誌* 38: 498, 1993

A clinical study on Klinefelter's syndrome

Toshiyasu Amano, Shuji Tokunaga,
Tadao Uchibayashi and Mitsuo Ohkawa

Department of Urology, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan

Fifteen cases of Klinefelter's syndrome, examined at the Department of Urology, Kanazawa University Hospital between 1985 to 1993 were reviewed.

Karyotype analysis revealed 47, XXY in 14 cases and 46, XY/47, XXY mosaicism in 1. Age ranged from 2 to 51 years. The chief complaints were undescended testis in 2 infant cases, genital anomaly in 3 early twenties and infertility in 7 late twenties to thirties. Three cases over 39 years-old were unexpectedly diagnosed as Klinefelter's syndrome during urological examinations.

Serum testosterone levels were low in 77% of adult patients. Serum levels of luteinizing hormone (LH) in 58% and follicle stimulating hormone (FSH) in all the patients except mosaicism were elevated.

The volume of testis was very small in all 47, XXY cases, while the testis in a patient with mosaicism was of median size between 47, XXY and normal testis. Semen analysis performed in 8 patients revealed azoospermia. Testicular biopsies were performed in 5 patients including 1 infant case, with no spermatogenesis observed. These results were the same as previously reported. Therefore we do not perform testicular biopsies as a rule at present.

Undescended testis, dementia and syringomyelia were associated with Klinefelter's syndrome. Seven adult patients were treated with extrinsic testosterone. One of these wives became pregnant after artificial insemination with donor semen.

(受付: 1993年6月2日)

(受理: 1993年9月29日)

DETECTING THE INTRACELLULAR Ca STORE IN CHEMICALLY SKINNED UTERINE SMOOTH MUSCLE FIBERS IN MICE

Kiichi KANAYAMA, Koichi NARIAI, Tuyoshi ENDO
and Yuzi SAKUMA

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

Katsuhiro YABE

Department of Legal Medicine, Saitama Medical School,
Saitama 350-04, Japan

Abstract: Skinned fibers were prepared in the uterine smooth muscle of mice for use in determining the presence of intracellular Ca store. For taking in Ca^{2+} into the intracellular Ca store, Ca loading was applied to specimens of skinned fibers obtained by chemical treatment with saponin. After complete relaxation of the specimens, they were allowed to react with caffeine in the external solution free from Ca. As a result, tension was generated in the chemically skinned fibers of the uterine smooth muscle. The generation of contractions clarified the presence of intracellular Ca store that released Ca^{2+} in reaction with caffeine.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 42 - 45 , 1994)

Introduction

Natori¹¹⁾ developed skinned fibers for use as a muscle model that permits free control of the intracellular environment of the muscle according to the condition of the external solution. After several subsequent improvements⁵⁾, skinned fibers of the skeletal muscle have been frequently used as an experimental model of contractile proteins and sarcoplasmic reticulum (SR). In the smooth muscle, however, investigation of contractility by the use of skinned fibers was initiated fairly later, in the latter half of the 1970s⁶⁾.

The contractile characteristics of the smooth muscle considerably differ according to the organ. Unlike the skeletal muscle, the smooth muscle has two routes for the supply of Ca^{2+} which is needed for contractions, i.e., release from the intracellular Ca store¹²⁾ and inflow from the outside of the muscle cell^{2,14)}. The presence of more than one route for Ca^{2+} mobilization is thought to have created differences in the mode of contraction of the smooth muscle and in the

degree of involvement of intracellular Ca store in muscular contractions among the smooth muscles. The presence of intracellular Ca store in the smooth muscle has been demonstrated using skinned fibers, a physiological model of intracellular Ca store, in taenia caecum only^{6,12)}. There has been no such report on the uterine smooth muscle.

The presence of intracellular Ca store in the uterine smooth muscle has been suggested, because treatment of the muscle with carbachol after K-contracture resulted in generating contractions¹⁰⁾. The purpose of this study is to demonstrate the presence of intracellular Ca store in mouse uterine smooth muscle using skinned fibers.

Materials and Methods

Muscle preparation

Bundles of longitudinal muscle of the uterus from mature diestrus mice weighing between 30 to 32g were used. They were kept in Locke's solution of the following composition¹³⁾: 154mM NaCl, 5.6mM KCl,

1.8mM NaHCO₃, 2.2mM CaCl₂, and 5.6mM Glucose. The solution was neutralized with NaOH and brought to pH 7.4. The bundle of muscle fibers, 0.5mm in width and 3mm in length, was mounted horizontally with one end fixed and with the other connected to a force transducer (TB-612T, Nihon Kohden Co., Tokyo, Japan), and isometric tension was recorded.

Preparation of skinned fibers and experimental procedures

Before muscle fibers were chemically skinned, the response of intact (unskinned) muscle fibers to a high-K solution, in which all NaCl was replaced by KCl in the Locke's solution, was examined. After high-K contraction was recorded, the solution was changed to a relaxing solution (G2) containing 105mM K-methanesulfonate (K-Ms), 20mM piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulphonic acid)(PIPES), 4mM MgSO₄, 2mM ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) and 4mM adenosine-5'-triphosphate, disodium salt (ATP). Ca²⁺ in the storage site of the intact muscle fiber was then released by 50mM caffeine in G2 solution. Saponin treatment was carried out by keeping the specimen for 25 minutes in G2 solution containing 150 μg/ml saponin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). After the saponin treatment the muscle fiber was washed with G2 solution. The muscle fiber thus chemically skinned was then loaded with 10⁻⁴ M Ca²⁺ in a Ca solution weakly buffered with 0.1mM EGTA for 4 minutes. This Ca solution contains 20mM PIPES, 4mM MgSO₄, 0.1mM EGTA, 4mM ATP, 10⁻⁴ M free Ca²⁺ and K-Ms which is in a volume necessary for bringing the ionic strength of the solution to 0.2M. The apparent binding constant of the Ca-EGTA complex was considered to be $2.10 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ⁹⁾.

Tension of the muscle fibers developed by Ca loading was relaxed in the relaxing solution containing 0.1mM EGTA (G0.1). 50mM caffeine dissolved in G0.1 was then applied to the skinned smooth muscle fibers. The tension was measured and displayed on a recorder (RTA-1200, Nihon Kohden) through amplifier (AP-100, Nihon Kohden).

G2, G0.1 and Ca solution were neutralize with KOH and brought to pH6.8. The solutions used in this

experiment were not saturated with O₂. This experiment was carried out in the air-conditioned room the temperature of which was regulated at 20°C.

Results and Discussion

Figure 1 shows a contraction curve of the smooth muscle specimen before and after saponin treatment. All of the three muscle specimens used in this study showed similar findings. In the presence of 0.1mM EGTA, 10⁻⁴ M of free Ca penetrated the chemically skinned uterine muscle to be bound to the contractile proteins and to generate tension. Therefore, the treatment of the smooth muscle with 150 μg of saponin for 25 minutes resulted in satisfactory skinning.

Since the Ca loading solution contained 4mM ATP, it was predicted that Ca²⁺ entering the cytoplasm in the muscle fibers was incorporated into the intracellular Ca store of the muscle specimens. When after complete relaxation using a relaxing solution (G0.1), the muscle was allowed to react with caffeine, tension was again generated. As the solution (G0.1) containing caffeine was Ca-free, there was no possibility that extracellular Ca²⁺ was involved in the generation of tension. Therefore, the generation of tension was due to the release of Ca²⁺ stored in the intracellular Ca store as a result of Ca loading. Thus, this experiment revealed the presence of intracellular Ca store in the uterine smooth muscle of mice using skinned fibers as an experimental system.

Kyozuka¹⁰⁾ treated non-skinned intact rat uterine smooth muscle fibers with caffeine following incorporation of Ca²⁺ into the intracellular Ca store. As a result, no tension was generated. However, the findings in our study clearly demonstrated that caffeine released Ca²⁺ in an amount sufficient for the generation of tension from the intracellular Ca store of both the intact and skinned fibers. Therefore, the intracellular Ca store of the uterine smooth muscle of mice has physiological characteristics similar to those of taenia caecum^{6,12)} and of the sarcoplasmic reticulum of the skeletal⁴⁾ and cardiac¹⁾ muscles.

In the smooth muscle, rather than Ca²⁺ release from intracellular Ca store, that of inflow from the outside of the muscle cell seems to play the leading role for the amount of Ca²⁺ needed for contractions^{2,14)}. Therefore, tensions generated by caffeine are not

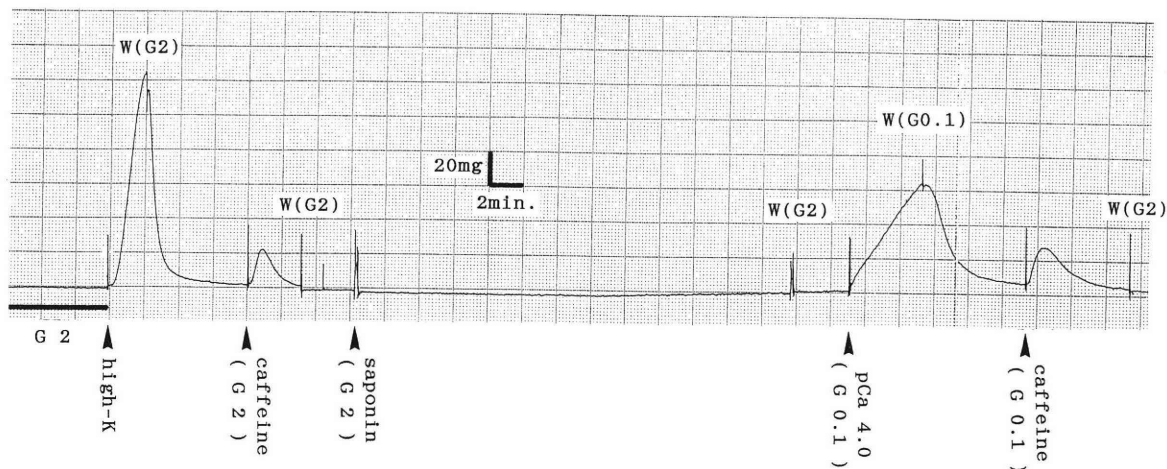


Fig.1 Time-course of tension development in the same preparation before and after skinning. The experimental solutions were applied as indicated at each arrow. Caffeine represents the application of 50mM caffeine and saponin represents 150 μ g/ml saponin application. W represents washing with the relaxing solution (G2 or G0.1).

thought to exceed K-contracture of intact fibers. Although the findings in this study do not identify the site of the intracellular Ca store in the uterine smooth muscle, those of other studies^{7,8)} indicate that it is most probably the sarcoplasmic reticulum.

The duration of Ca loading to the skinned fibers in this study was 4 minutes. When the duration of Ca loading is longer, it would be possible that the tension subsequently generated by caffeine is increased. On the other hand, long-hour Ca loading may result in the manifestation of Ca induced Ca release (CICR), which would interfere with assessment of experimental results. This is an issue to be investigated in future.

Our study has indicated that intracellular Ca store in the mouse uterine smooth muscle could be detected using skinned fibers as an experimental system. The system seems to be useful for analysis of the mechanism of Ca^{2+} mobilization during contractions of the uterine smooth muscle and characteristics of intracellular Ca store. Since the caffeine-induced Ca^{2+} release from the intracellular Ca store was reported to be the result of CICR³⁾, the findings in this study indicate the presence of CICR in the uterine smooth muscle, as well as the skeletal muscle⁴⁾, the cardiac muscle¹⁾ and taenia caecum¹²⁾. The findings in this study would be applicable for analysis of the involvement of CICR in contractions of the uterine smooth muscle.

References

- 1) Beuckelmann DJ, Wier WG, Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol* 405: 233, 1988
- 2) Edman KAP, Schild HO, The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. *J Physiol* 161: 424, 1962
- 3) Endo M, Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Proc Japan Acad* 51: 479, 1975
- 4) Endo M, Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Current Topics in Membranes and Transport* 25: 181, 1985
- 5) Nakajima Y, Endo M, Release of calcium induced by 'depolarisation' of the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature New Biol* 246: 216, 1973
- 6) Endo M, Kitazawa T, Yagi S, et al., Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers. In: *Excitation-contraction coupling in smooth muscle*. Casteels R, Godfraind T, Ruegg JC, eds, p 199, Elsevier/North-Holland, 1977
- 7) Endo M, Kitazawa T, Yagi S, Muscle contraction: Its regulatory Mechanism. Ebashi S, Maruyama K, Endo M, eds, Japan Sci Soc Press, p 447, Springer-Verlag, 1980
- 8) Endo M, Yagi S, Iino M, Tension-pCa relation and sarcoplasmic reticulum responses in chemically skinned smooth muscle fibers. *Federation Proc* 41: 2245, 1982
- 9) Harafuji H, Ogawa Y, Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid with calcium around neutral pH. *J Biochem* 87: 1305, 1980
- 10) Kyojuka M, Contraction of rat uterine smooth muscle in Ca-free high K solution. *Biomed Res* 4: 523, 1983

- 11) Natori R, The property and contraction process of isolated myofibrils. Jikei Med J 1: 119, 1954
- 12) Saida K, Intracellular Ca release in skinned smooth muscle. J Gen Physiol 80: 191, 1982
- 13) Shimizu Y, Ochiai K, Hachiya S, Etiological study of ectopic pregnancy from the view point of contractile properties in isthmus smooth muscle of human oviduct. Jap J Fert Ster 31: 64, 1986
- 14) Shimodan M, Sunano S, The initiation of phasic and tonic contraction by potassium and the effect of calcium, multi-valent cations and Ca-antagonist on potassium contracture in guinea-pig vas deferens. Jpn J Physiol 31: 15, 1981

マウス子宮平滑筋スキンドファイバー標本による 細胞内Caストアの証明

日本大学農獣医学部獣医学科生理学教室

金山喜一 成相孝一 遠藤 克
佐久間勇次

埼玉医科大学法医学教室

矢部勝弘

マウス子宮平滑筋においてスキンドファイバー標本を作成して細胞内Caストアの証明を試みた。先ず、サポニン処理によってスキンドファイバーにした子宮縦走筋標本にCa負荷を行い、細胞内にCaを取り込ませた。次いで、この標本を弛緩液中で十分に弛緩させた後、外液にCaがfreeの状態のカフェインを作用させたところ張力の発生をみた。この収縮の発現は、カフェインによってCa²⁺を放出する細胞内Caストアの存在を明確に示すものである。

本研究で用いた子宮平滑筋のスキンドファイバー実験系は、子宮収縮に係わるCa動員機構の解析に有効な手法になるものと思われる。

(受付：1993年6月16日)

(受理：1993年9月29日)

EVALUATION OF BOVINE SPERM MOTILITY USING FICOLL SOLUTION IN HIGH CONCENTRATION

Kyohko SUETSUGU, Kiyoshi MIYAZAWA, Kazue OHSAKI,
Kunitada SATO

Department of Theriogenology,
Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Obihiro 080, Japan

Tokihiro MATSUZAWA

Department of Biology,
Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Obihiro 080, Japan

Shigenori MATSUZAKI, Chiyo NAKANO

Tokachi AI Center,
Hokkaido Livestock Improvement Association Inc, Shimizu 089-01, Japan

Abstract: A method for evaluation of bull sperm motility using 22% ficoll solution was developed. A 0.1 ml semen was added to 1 ml of 22% ficoll in the culture medium and the number of motile and immotile spermatozoa were counted with a hemocytometer. Percentage of sperm motility was obtained by the number of motile sperm over the total number of spermatozoa. Under this condition, the sperm motility in fresh and frozen semen was evaluated. Significant correlations were found between this method and direct microscopic examination. The results suggest that using ficoll solution is a useful method for objective analysis of bull sperm motility.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 46 - 48, 1994)

Introduction

Sperm motility in the bull can be evaluated by sperm penetration test with cervical mucus⁸⁾ and spectrophotometry^{4,5,7,10)}. Sperm autoanalyzer has also been used for objective and speedy analysis^{2,3,8)} but this method is expensive and complicated. Clinically, sperm motility is determined directly with the use of a microscope. However, data are not reliable and repeatability of examination is inevitable as the motion of sperm is very fast. Therefore, in the current study, suppression of the sperm motility by high viscous ficoll solution was attempted to calculate the number of sperm with high motility.

Materials and Methods

Separation of active progressive (+++ to ++) and

progressive to stillness (+ to -) sperm: Fresh and frozen semen collected from 40 bulls by artificial vaginal method at Hokkaido Livestock Improvement Association Inc. (HLIA) were used in this experiment. High and low motile spermatozoa were Separated using the Swim-up method⁶⁾. Into a tube containing 1 ml of Dulbecco's Eagle medium (DEM), 0.1 ml of semen was added and allowed to settle for one hour in a waterbath at 37 °C. A 0.5 ml of the sample which contained (+++)-(++) motile sperms, and (+)-(-) sperm were collected from the upper and lower phases of the supernatant, respectively. Sperm motility was classified as active progressive (+++, ++), progressive (+), swing (±) and stillness (-).

Observation of sperm motility in various concentration of ficoll solution: Figure 1 summarizes the method of evaluation of sperm motility using fresh

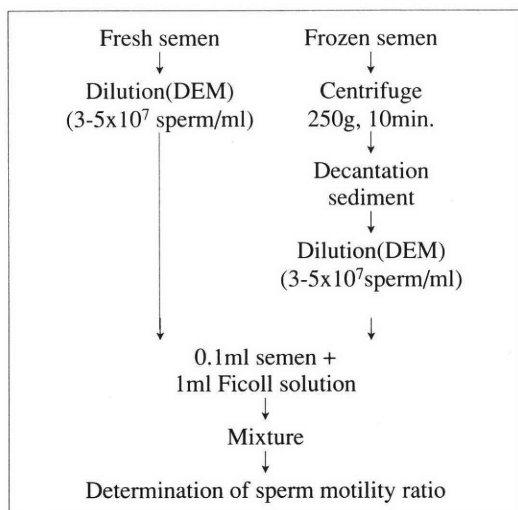


Fig. 1 Method of evaluation of sperm motility using different concentrations of ficoll solution

and frozen semen. Fresh semen was diluted in DEM. Frozen semen(0.5 ml) was diluted in 1.5 ml DEM and centrifuged to remove the egg yolk material used as a medium in freezing semen. The supernatant was decanted and the sediment was diluted in DEM. Into each tube containing one ml of 13.5%, 14.5%, 19.25%, 22.0% and 24.75% ficoll solution in DEM, 0.1 ml of frozen semen was added. A similar preparation was carried out using fresh semen. Sperm and ficoll solution were mixed and the sperm motility ratio (SMR) was observed with the use of a hemocytometer at 37 °C. SMR was determined using the formula:

$$\frac{\text{Number of sperm in swing motion} \times 100}{\text{Total number of sperm}}$$

Sperm viability was observed before and 5 minutes after the addition of ficoll solution. Spermatozoa were stained with eosin and nigrosin.

Precision of SMR in 22% ficoll solution was observed four times in 4 samples of frozen semen and 5 samples of fresh semen.

Results

Percentage of (+++) - (++) motile sperm in the upperphase was greater than 95%; while that of the (+) - (-) motile sperm was negligible.

With 22% ficoll solution, in fresh semen 95% sperm changed their motility from (+++) - (++) to (+)

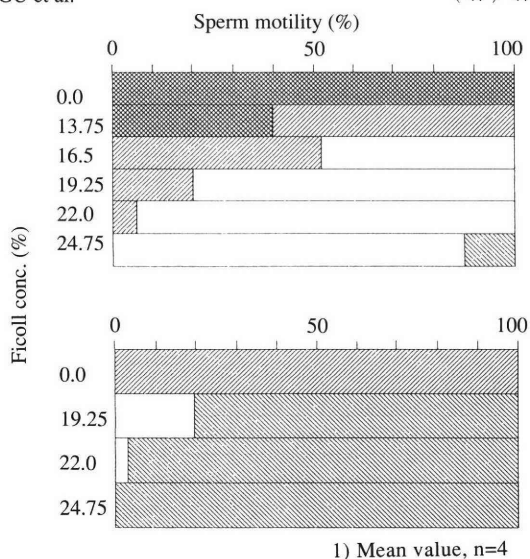


Fig. 2 Change of sperm motility (progressive-upper, weak-lower) in fresh semen under condition of different concentration of ficoll solution

■ #~# ▨ + □ ± ▩ -

motile sperm, and about 97% of the sperm changed motility from (+) - (-) to (-) motile sperm (Fig. 2). The same results were obtained in frozen semen.

No significant difference in sperm viability was observed before and after addition of ficoll solution with $58.2\% \pm 19.9$ and $59.6\% \pm 15.9$, respectively.

Coefficient of variation for fresh and frozen using 22% ficoll solution ranged from 1.9 - 11.1% and 1.2 - 5.4%, respectively (Table 1).

Discussion

The present study describes the possibility of evaluating sperm motility with precision, as evidenced by the change from (+++) - (++) motility to (+) motility, specifically after the addition of 22% Ficoll solution. However, a drawback must be considered that ficoll solution may cause damage to sperm. While, in humans, 5% to 7% ficoll solution is used to collect active sperm for artificial insemination¹⁾ and the use of additives has been shown to decrease sperm activity¹¹⁾. In the present study, the addition of ficoll solution with high viscosity had no apparent adverse effects on sperm motility and viability.

As shown in this experiment, a slight change in the concentration of ficoll solution influences sperm

Table 1 Precision of sperm motility in 22% ficoll solution

Semen sample		Intra-assay variation	
		Sperm motility (%) Mean \pm SD	C. V. ¹⁾ (%)
Fresh semen	1	61.6 \pm 0.9	1.9
	2	73.3 \pm 1.1	2.3
	3	80.2 \pm 5.6	11.1
	4	81.2 \pm 3.5	7.1
	5	71.0 \pm 1.8	3.7
Frozen semen	1	54.4 \pm 1.8	1.9
	2	54.2 \pm 2.7	5.4
	3	44.2 \pm 0.6	1.2
	4	52.2 \pm 1.4	2.8

1) Coefficient variation

motility. Thus, the best concentration of ficoll solution must be decided before using for laboratory evaluation of sperm motility by practitioners.

We conclude that ficoll solution is a useful, economical, and lesstime consuming reagent in determing sperm motility.

References

- 1) Ariff BHoL, Soon-Chye N, Wong PC, et al., Improved sperm concentration, motility, and fertilization rates following Ficoll treatment of sperm in a human in vitro fertilization program. Fertil Steril 51: 850, 1989
- 2) Budworth PR, Amann RP and Hammerstedt RH, A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. J Dairy Sci 70: 1927, 1987
- 3) Jasko DJ, Little TV, Smith K, et al., Objective analysis of stallion sperm motility. Theriogenology 30: 1159, 1988
- 4) Jasko DJ, Smith K, Little TV, et al., A spectrophotometric procedure for the determination of objective measurements of equine spermatozoan motility. Theriogenology 31: 945, 1989
- 5) Joseph ES, Luis B, Bayard TS, et al., Turbidimetric analysis of human sperm motility. Fertil Steril 28: 1337, 1977
- 6) Kagawa T, Murayama S, Deguchi K, et al., Sperm characteristics selected by Swim up method. J Fertil Implant (Tokyo) 6: 83, 1989
- 7) Levin RM, Hypolite JA and Wein AJ, Clinical use of the turbidimetric analysis of sperm motility. Andrologia 16: 434, 1984
- 8) Mahony MC, Alexander NJ and Swanson RJ,

Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers. Fertil Steril 49: 876, 1988

- 9) Murase T and Brown JW, Impact of methodological factors on sperm penetration into cervical mucus in cattle. Theriogenology 34: 73, 1990
- 10) Robert WA, An objective method for evaluating Angus and Hereford sperm motility. Int J Fertil 20: 109, 1975
- 11) Robert ML, Jane S and Stanley HG, A quantitative method for determining the effect of drugs on spermatozoal motility. Fertil Steril 33: 631, 1980

高濃度 Ficoll 溶液を用いたウシ精子運動性検査

帯広畜産大学家畜臨床繁殖学教室

末次恭子 宮澤清志 大崎和栄
佐藤邦忠

同 生物学教室

松沢時弘

家畜改良事業団十勝事業所

松崎重範 中野千代

Ficoll の粘性を利用したウシ精子の運動性検査法について検討した。精子の活発な前進運動 [運動性 (+++)] が、振子運動 [運動性 (±)] に変化する様な Ficoll 溶液の濃度を求めた。その結果、22.0% Ficoll 溶液 (精液添加後の最終濃度 20.0%) が最適であることがわかった。以上の結果から、本検査法は簡便で、客観的な精子運動性検査法として応用できる。

(受付: 1993 年 7 月 5 日)

(受理: 1993 年 9 月 29 日)

不妊夫婦の血中抗クラミジア抗体

Serological Diagnosis of Chlamydia Trachomatis Infection in Infertile Couples

大阪大学医学部産科婦人科学教室

大 橋 一 友

Kazutomo OHASHI

佐 治 文 隆

Fumitaka SAJI

富 山 達 大

Tatsuhiro TOMIYAMA

筒 井 建 紀

Tateki TSUTSUI

谷 澤 修

Osamu TANIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka University Medical School, Suita 565, Japan

大阪大学医学部中央臨床検査部

堀 川 晶 行

Masayuki HORIKAWA

網 野 信 行

Nobuyuki AMINO

The Central Laboratory for Clinical
Investigation, Osaka University Medical School, Suita 565, Japan

クラミジア抗原が固相化されたマイクロプレートを用いた酵素抗体法を用いて、不妊症夫婦95組に血中抗クラミジア抗体検査を行った。IgA, IgG抗体を別々に測定し、その結果をHSGの所見ならびに子宮頸管のクラミジア抗原検査の結果と比較検討した。IgA, IgG抗体ともに陽性の19症例では11例(58%)に卵管異常が認められ、うち7例は両側卵管閉塞であった。一方、IgA, IgG抗体ともに陰性の60例では卵管異常9例(15%)しか認められなかった。また従来の測定法ではあまり報告されていないIgA抗体のみ陽性の症例が8例(8%)にみられた。子宮頸管にクラミジア抗原を認めた症例は2例にすぎず、この2例はIgA, IgG抗体ともに陽性であった。夫の血中抗クラミジア抗体がIgA, IgG抗体ともに陽性の9症例では7例(78%)の妻にIgA, IgG抗体をとともに認めた。今回用いた酵素抗体法による血中抗クラミジア抗体測定法は夫婦そろっての検査を行うことによってクラミジア感染の感染予防ならびに感染治療に役立つものと考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 49 - 52, 1994)

緒 言

性行為感染症(STD)のなかでクラミジア感染症は最も頻度の高い疾患の一つである。婦人科領域では子宮頸管炎、子宮付属器炎、骨盤腹膜炎を起こすことが多く、最近ではクラミジア性子宮付属器炎による卵管性不妊が注目されている。従来、クラミジア感染症の診断は病原体であるChlamydia trachomatisの抗原検査によって行われていた^{1,2)}。最近ではクラミジア性子宮付属器炎や骨盤腹膜炎の診断には血中の

抗クラミジア抗体の測定も併用されており、その有用性が報告されている³⁻⁷⁾。

今回、不妊夫婦そろっての血中抗クラミジア抗体検査を新しく開発された酵素抗体法を用いて行い、クラミジア感染症のSTDとしての性格を明らかにするとともに、不妊症検査としてのこの検査の意義を検討した。

対象と方法

1. 対象

大阪大学医学部産婦人科不妊外来を受診した不妊夫婦95組で、平均不妊期間は5年3ヶ月であった。

2. 血中抗クラミジア抗体の測定

血中抗クラミジア抗体を酵素抗体法を用いたセバイパライザクラミジアIgAキットおよび同IgGキット(明治乳業)により測定した。

血清をIgAキットでは32倍、IgGキットでは256倍に希釈した後にマイクロプレートのウエルに50 μ lずつ添加し、37℃で30分反応させる。洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgAまたはIgG抗体を50 μ lずつ添加し、37℃で30分間反応させる。洗浄の後に発色基質(TMB: 3, 5, 3', 5'-テトラメチルベンチジン)を添加し、IgA抗体測定の際は室温で30分反応させ、IgG抗体測定の際は室温で15分反応させ、H₂SO₄で反応を停止させる。マイクロプレートリーダーを用いて、ブランクを対照として450nmの吸光度を測定する。測定結果の判定には陽性、陰性コントロールを用いて、次の計算式にてカットオフ値を求める。

$$\text{カットオフ値} = 0.154 \times (\text{Pc} - \text{Nc}) + \text{Nc}$$

Pc: 陽性コントロールの450nmにおける吸光度

Nc: 陰性コントロールの450nmにおける吸光度

カットオフ値 - 0.03以上の吸光度を示す場合を抗クラミジア抗体陽性とした。

またコントロールの測定値が満たす条件として陽性コントロールの吸光度が0.8以上、陰性コントロールの吸光度が0.15以下になることとした。

3. 子宮頸管クラミジア抗原の検査

子宮頸管上皮をswabにより擦過採取し、蛍光抗体法であるMicroTrak法(Syva社)および酵素抗体法であるIDEIA (Infectious Disease Enzyme Immuno Assay: 協和メデックス)を用いて検討した⁸⁾。

4. 子宮卵管造影(hysterosalpingography: HSG)の造影剤にはLipiodolを用い、透視モニター下で2回、さらに翌日に1回撮影を行なった。読影では卵管の描出や造影剤の腹腔内への拡散の状態から、両側卵管の通過性や卵管周囲癒着の有無を判定した。

結 果

1. 血中抗クラミジア抗体と卵管異常

表1に女性の血中抗クラミジア抗体と卵管異常の有無を示した。卵管所見はHSG所見に従って、卵管閉塞、卵管狭窄、卵管周囲癒着に分類した。IgA, IgG抗体ともに陽性を示した19例のうち11例(58%)に卵管の異常を認めた。一方、両抗体陰性の60名では9名(15%)にのみ卵管異常が認められた。これら

表1 血中抗クラミジア抗体と卵管異常

抗クラミジア抗体		卵管異常
IgA	IgG	
+	+	11/19 (58%)
+	-	2/8 (25%)
-	+	2/8 (25%)
-	-	9/60 (15%)

表2 卵管異常の詳細

抗クラミジア抗体		卵管閉塞		卵管 卵管周囲		計
IgA	IgG	両側	片側	狭窄	癒着	
+	+	7	3	1	0	11
+	-	1	1	0	0	2
-	+	0	1	0	1	2
-	-	1	5	0	3	9

卵管異常の詳細を検討すると、IgA, IgG両抗体陽性の症例では両側卵管閉塞の症例が11例中7例と非常に多く、抗クラミジア抗体陰性症例では逆に両側卵管閉塞の症例はわずか1例のみで、片側卵管閉塞(5例)や卵管周囲癒着(3例)が多く見られた(表2)。

450nmの吸光度で示される抗体価はIgA, IgG抗体とも陽性の19名ではIgA抗体価が 2.11 ± 0.96 、IgG抗体価 3.72 ± 2.29 であり、IgA抗体のみ陽性の8名のIgA抗体価 1.37 ± 0.54 、IgG抗体のみ陽性の8名のIgG抗体価 1.56 ± 0.47 に比して有意に高値を示した。

2. クラミジア子宮頸管炎と抗クラミジア抗体(表3)

今回検討した95例のうち2例の子宮頸管上皮細胞にのみクラミジア抗原を認めた。またこの2例は血中の抗クラミジア抗体はIgA, IgGともに陽性であり、特にIgG抗体価はOD450nmで8.03, 3.43と高い値を示した。

3. 夫婦間の血中クラミジア抗体

表4に各夫婦間の血中クラミジア抗体を示した。夫の血中抗クラミジア抗体がIgA, IgGともに陽性の9例のうち7例(78%)の妻が両抗体ともに陽性であ

表3 クラミジア子宮頸管炎と抗クラミジア抗体

		クラミジア子宮頸管炎	
		+	-
抗クラミジア抗体	+	2	33
	-	0	60

表4 夫婦間の抗クラミジア抗体

		IgA		妻	
		IgG		+	
				+	
				-	
				+	
				-	
夫	IgA	IgG			
	+	+	7	0	0
	+	-	0	2	1
	-	+	3	0	1
	-	-	9	6	6
					50

り、一方夫の抗体陰性の71例のうち9例(13%)の妻のみが両抗体陽性であった。さらに夫のIgA抗体のみが陽性の7例では妻にIgA, IgG抗体ともに陽性の症例はなかったのに対して、夫のIgG抗体のみが陽性の8例のうち3例(38%)の妻がIgA, IgG抗体ともに陽性であった。

考 察

従来、血中抗クラミジア抗体の測定に用いられてきたイバザイムクラミジア法⁸⁾は、クラミジアの細胞内封入体を抗原として、倍々希釈した血清を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識をした第2抗体で染色する半定量法であった。その判定ではIgG抗体で64倍以上、IgA抗体で16倍以上の希釈血清で青い染色を認めたものを各抗クラミジア抗体陽性と規定している。そのためこの方法では細胞を染色し顕微鏡で判定するという検査の性格上、微妙な判定の差がとらえにくく、かつ大量の検体の処理には適していないという欠点があった。今回用いたセロイパライザクラミジア法は精製したクラミジア抗原を固着させたマイクロプレートを用いて酵素抗体法で血中抗クラミジア抗体を測定する方法であり、血清の倍々希釈の必要がなく、マイクロプレートリーダーを使う事で短時間に大量の検体の処理が可能である。また、各抗クラミジア抗体の陽性、陰性標準抗血清を毎回の測定に用いるため、異なる血清の抗体価の微妙な差や変動の測定が可能である。

イバザイムクラミジア法で不妊女性の血中抗クラミジア抗体を検出した結果では、IgA抗体が17-31%に、IgG抗体が38-63%の症例に検出されている³⁻⁷⁾。またこれらの陽性率は妊婦などの対照群の陽性率と比較して有意に高率であると報告されている。今回のセロイパライザクラミジア法を用いた検討ではIgA抗体陽性率が28%、IgG抗体陽性率も28%であった。IgA抗体についてはその抗体価の上昇が活動性感染を示し、治癒の判定に有効であると言われている。このIgA抗体について従来のイバザイム法によ

る検討ではIgA抗体を保有する患者ではほとんどIgG抗体が検出されている。しかし今回の検討ではIgA抗体のみを保有する症例が8例(8%)にみられた。これらの症例では450nmの吸光度で示される抗体価はIgA, IgG抗体ともに陽性の症例の抗体価に比して低値を示している。以上の結果はセロイパライザクラミジア法がイバザイム法では検出不能であった非常に低値のIgA抗体を検出できる可能性を示唆するものであり、初期の活動性感染の診断に役立つものと考えられる。

今回、我々は不妊夫婦そろっての血中抗クラミジア抗体測定を行った。その結果、夫が抗クラミジア抗体を有する夫婦では妻も非常に高率に抗クラミジア抗体を保有していることから、あらためてクラミジア感染症のSTDとしての性格が示された。一般に血中抗クラミジアIgA抗体は活動性のクラミジア感染の存在を示し、IgG抗体は感染の既往を示すと言われている。表4に示すように夫のIgA抗体のみが陽性の症例で妻にはIgA, IgG抗体が両方ともに陽性の症例が見られず、夫のIgG抗体のみが陽性の症例には妻の両抗体陽性の症例が認められた。このことは夫のIgG抗体がまだ上がっていない感染初期においては妻へのクラミジアの十分な感染は成立しておらず、この時期に夫のクラミジア感染症を治療することによって、妻への感染を防ぐことができるのではないかと考えられる。以上のように不妊夫婦そろっての血中抗クラミジア抗体の測定は不妊治療に有意な情報になるものと考えられる。

クラミジア感染症が女性不妊を発症させる主因は卵管障害であり、抗クラミジア抗体を保有する不妊女性に高率に卵管障害が認められることが報告されている³⁻⁷⁾。今回の検討でも両側卵管閉塞などの高度の卵管障害が抗クラミジア抗体陽性、特にIgA, IgG抗体陽性の症例に多く見られる。基質的な障害を受けた卵管の機能を改善させることは難しく、このような卵管障害を防ぐためには男性からの感染の予防、もしくは感染初期での治療が必要である。クラミジア感染症に対してはteracyclineやmacrolideによる経口治療が使用されている。我々も以前にOfloxacinの有効性を報告している¹⁰⁾。このようなクラミジア感染症に対する化学療法の効果の評価は従来、子宮頸管上皮の抗原検査によって評価されてきた。一方、笠松らはイバザイムクラミジア法を用いて血中抗クラミジアIgA抗体の変動が治療効果の判定に有意義であることを報告している¹¹⁾。今回用いたセロイパライザクラミジア法は従来法に比べて抗

体価の微妙な変動も客観的に明らかにすることができ、クラミジア感染症の診断ばかりでなく、治療効果の判定にも有用であると思われる。マイクロプレートによる酵素抗体法を用いた抗クラミジア検査法であるセロイパライザクラミジア法はその操作の簡便性からも、今後、血中の抗クラミジア抗体検査の主要な方法になっていくものと思われる。

文 献

- 1) Maedh P, Ripa KT, Svensson L, et al., Chlamydia trachomatis in patients with acute salpingitis. N Engl J Med 296: 1377, 1977
- 2) Paavonen J, Chlamydia trachomatis in acute salpingitis. Am J Obstet Gynecol 138: 957, 1980
- 3) 間接免疫ペルオキシダーゼ法によるクラミジア感染症の血清学的診断法の意義 - 特に不妊、不育患者について - . 日不妊誌 34 : 858, 1989
- 4) 武内裕之, 岩佐 剛, 宇津野栄 他, 不妊症と Chlamydia trachomatis 感染. 日不妊誌 35 : 415, 1990
- 5) 野口昌良, 岡本俊充, 稗田茂雄 他, 卵管性不妊症と Chlamydia trachomatis 感染に関する検討. 日不妊誌 35 : 547, 1990
- 6) 平野正志, 平野浩紀, 前田信彦 他, 不妊症におけるクラミジア感染の意義. 産婦人科の実際 41 : 203, 1992
- 7) 生田克夫, 鈴木規敬, 鈴木真史 他, 不妊症におけるクラミジア抗体価と腹腔鏡. 産科と婦人科 60 : 298, 1993
- 8) 堀川晶行, 浅利誠志, 佐治文隆 他, 産婦人科領域の C. trachomatis 感染症における IDEIA クラミジア™法の有用性の検討. 臨床検査機器試薬 16 : 135, 1993
- 9) Piura B, Sarov I, Sarov B, et al., Serum IgG and IgA antibodies specific for Chlamydia trachomatis in salpingitis patients as determine by the immunoperoxidase assay. Eur J Epidemiol 1: 110, 1985
- 10) 佐治文隆, 亀田 隆, 浅利誠志 他, 不妊婦人における Chlamydia trachomatis 感染率と Ofloxacin による治療成績. 産婦人科の世界 41 : 921, 1989
- 11) 笠松高弘, 菅生元康, 吉川裕之 他, Chlamydia trachomatis 女性性器感染症の診断および治療における血清特異的 IgA 抗体の意義. 日産婦誌 41 : 479, 1989

Serological Diagnosis of Chlamydia Trachomatis Infection in Infertile Couples

Kazutomo Ohashi, Fumitaka Saji,
Tatsuhiko Tomiyama, Tateki Tsutsui
and Osamu Tanizawa

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka University Medical School, Suita 565, Japan

Masayuki Horikawa and Nobuyuki Amino

The Central Laboratory for Clinical Investigation,
Osaka University Medical School, Suita 565, Japan

Genital chlamydia infection is increasing in Japan. Chlamydia infection in women causes endometritis, salpingitis and pelvic peritonitis, and disorders fertility by tubal obstruction. Sera collected from 95 infertile couples in Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Medical School were studied for antibodies against chlamydia trachomatis. Serological Diagnosis of chlamydia antibodies were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Sero IPALIZA Chlamydia (Meiji Milk Products Co. LTD.). These results were compared with the findings of hysterosalpingography (HSG) and the results of direct antigen detection in the uterine cervix. Both IgA and IgG antibodies were found in 19 (20%) of 95 patients, while 60 patients showed serologically negative. The tubal damages, including obstruction, stenosis, and peritubal adhesion, were found four times more in the former than in the latter (11/19 (58%) vs 9/60 (15%)). The chlamydia antigen in the uterine cervix was detected in only two patients, who had both IgA and IgG antibodies. Of 9 partners of the husbands with both IgA and IgG antibodies, 7 were serologically positive in both IgA and IgG antibodies, suggesting that their infections would be sexually transmitted. In conclusion, the serological detection of chlamydia antibodies was important for infertile couples to prevent its infection from the partners and to treat them with the genital chlamydia infection in an early stage.

(受付: 1993年7月5日)

(受理: 1993年9月30日)

不妊症患者における血清抗Chlamydia trachomatis抗体の陽性率 ——新しい測定法であるヒタザイム法(ELISA)を用いて——

Prevalence of Serum Anti-Chlamydia Antibodies in Infertile Patients

札幌医科大学医学部産婦人科学教室(主任:工藤隆一教授)

山 本 弘

Hiroshi YAMAMOTO

井 上 雄 子

Yuko INOUE

藤 井 美 穂

Miho FUJII

福 江 ひろみ

Hiromi FUKUE

木 谷 保

Tamotsu KIYA

遠 藤 俊 明

Toshiaki ENDO

工 藤 隆 一

Ryuichi KUDO

森 悟 子

Satoko MORI

金 谷 美 加

Mika KANAYA

田 中 昭 一

Shoichi TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology,

School of Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo 060, Japan

ELISA法による血清クラミジア抗体測定法であるヒタザイム法を用いて不妊症患者の血清クラミジア抗体IgG, IgAを測定し, 抗体陽性率や抗体価と卵管性不妊との関連性を検討し, さらに従来の測定法であるイパザイム法での報告と比較検討した。イパザイム法で測定した不妊症患者の抗体陽性率は一般妊婦に比べ高いとする報告があるが, ヒタザイム法で測定した成績では両者の抗体陽性率に差はなかった。今回の不妊症患者および妊婦の抗体陽性率はイパザイム法による諸家の報告する陽性率より低かったが, イパザイム法での成績と同様ヒタザイム法で測定した抗体陽性例は子宮卵管造影や腹腔鏡所見の異常を示す症例が有意に多く, 抗体陽性例はクラミジア感染による卵管性不妊が推測された。特にIgGとIgA両者陽性の症例は腹腔鏡異常所見を示す症例が多く91.7%(イパザイム法では75%と報告されている)に腹腔鏡で異常所見が認められた。クラミジア抗体の測定は卵管性不妊の有無のスクリーニングに非常に有用であるが, その正診率は従来のイパザイム法よりヒタザイム法が高かった。しかし, IgA陽性性例で治療を行い, 治療後の抗体価の推移を検討したが, 抗体が陰性化した症例は少なく, 治療後の経時的なIgA抗体の測定のみでの治癒の判定が困難である症例が多かった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 53 - 58, 1994)

緒 言

性行為感染症の一つであるChlamydia trachomatis(以下クラミジアと略す)感染症は, 女性においては無症候性に経過することが多いが, 附属器炎やpelvic inflammatory diseaseをきたし卵管性不妊^{1,2)}や子宮外妊娠^{3,4)}の原因となることが注目されている。しかし, クラミジア感染を診断するにはクラミジア抗原を検出することが必要であるが, 外来診療では卵管から

クラミジア抗原を検出することは不可能である。そこで, 血清クラミジア抗体の測定によりクラミジア感染の補助的診断が行なわれ, IgA抗体は活動性感染の指標となると報告されている⁵⁻⁷⁾。しかし, 従来の血清抗体の測定法であるイパザイム法は間接酵素抗体法により組織学的に抗体を測定する方法であるため, 半定量法であり, また非特異的反応や測定者の違いにより結果に差が出る可能性がある。そこで今回我々は, このようなイパザイム法のもつ欠点が

少なく、また *Chlamydia pneumoniae* (以下 *C. pneumoniae* と略す) との交叉性が少なく、しかも抗体価を定量できる血清クラミジア抗体の測定法であるヒタザイム法 (日立化成工業) を用いて当科不妊症外来を受診した患者の血清クラミジア抗体IgGおよびIgA抗体を測定し、抗体陽性率や抗体価と卵管性不妊や子宮外妊娠の既往との関連性を検討し、さらにイパザイム法で測定した成績とを比較検討した。

方 法

1. 対象

1991年7月から1992年3月までの期間に当科不妊外来に通院した390例を対象とした。また、同時期に当科産科外来に通院した117例の妊婦を対照とした。

2. 抗体検査

被験者血清を検体としてヒタザイム法で血清クラミジアIgG, IgA抗体の測定を行なった。この測定法は *Chlamydia trachomatis* L₂株基本小体から精製したクラミジア外膜抗原を固相抗原として用いるELISA法である。抗体価を抗体Index表現し、Indexが1.1以上を陽性とした。

IgG, IgA Index = 検体補正吸光度 / カットオフ値

3. 抗原検査

血清クラミジア抗体陽性例では、直接蛍光抗体法やEnzyme immunoassay法であるクラミジアザイムで頸管のクラミジア抗原の検索を行なった。

4. 統計処理

有意差検定にはt検定および χ^2 検定を用い、危険率5%以下を有意水準とした。

結 果

1. 不妊症患者および対照妊婦のクラミジア抗体陽性率 (表1)

不妊症患者および妊婦の平均年齢はそれぞれ31.7 ± 4.4歳 (20 ~ 46歳), 29.3 ± 4.5歳 (19 ~ 41歳) で

表1 不妊症患者および妊婦のクラミジア抗体陽性率

	不妊症患者 (390例)	妊婦 (117例)
IgG	17.7% (69例)	14.5% (17例)
IgA	14.9% (58例)	12.8% (15例)
IgG+IgA	9.7% (38例)	9.4% (11例)
IgG and/or IgA	22.8% (89例)	17.9% (21例)

IgG+IgA : IgGとIgA両者陽性

IgG and/or IgA : IgGとIgA両者あるいは一方陽性

あり両群で差はなかった。不妊症患者および妊婦の抗体陽性率はIgGはそれぞれ17.7%および14.5%, IgAは14.9%および12.8%, IgGとIgA両者陽性 (IgG+IgA陽性) は9.7%および9.4%であり両群で差はなかった。IgGとIgAの両者あるいは一方陽性は22.8%および17.9%であり、不妊症患者で有意な差はないが高い傾向があった。データは示していないが、不妊症患者の抗体陽性の65例で頸管のクラミジア抗原検査を行い3例 (4.6%) が陽性であった。また、子宮外妊娠の既往のある10例中8例 (80%) がIgGとIgAの両者あるいは一方陽性であった。

2. 不妊症患者および対照妊婦のクラミジア抗体陽性例の抗体価 (表2)

IgG陽性例の抗体価の平均は不妊症患者および妊婦でそれぞれ2.90 ± 2.23および3.34 ± 2.02であり、IgA陽性例の抗体価は2.71 ± 1.26および2.39 ± 1.44で、両群にIgGおよびIgA抗体価に差はなかった。しかし、両群ともIgG+IgA陽性例はIgGまたはIgA単独陽性例にくらべIgGやIgA抗体価は有意に高かった。

表2 クラミジア抗体陽性例の抗体価

	不妊症患者	妊婦
IgG (+)	2.90 ± 2.23	3.34 ± 2.02
IgA (+)	3.77 ± 2.61	4.04 ± 2.13
IgA (-)	1.83 ± 0.78	2.04 ± 0.81
IgA (+)	2.71 ± 1.62	2.39 ± 1.44
IgG (+)	3.11 ± 1.78	2.70 ± 1.56
IgG (-)	1.86 ± 0.74	1.55 ± 0.37

*p<0.05

3. 原発性と続発性不妊でのクラミジア抗体陽性率およびその抗体価 (表3)

原発性と続発性不妊の抗体陽性率はIgG, IgAとも

表3 原発性不妊と続発性不妊別のクラミジア抗体陽性率およびその抗体価

	原発性不妊 (289例)	続発性不妊 (101例)
IgG	14.5% (42例)	26.7%* (27例)
抗体価	3.33 ± 2.57	2.23 ± 1.27
IgA	13.1% (38例)	19.8%* (20例)
抗体価	2.92 ± 1.74	2.33 ± 1.28
IgG+IgA	8.3% (24例)	13.9%* (14例)
IgG and/or IgA	19.7% (57例)	31.7%* (32例)

*p<0.05

表4 腹腔鏡所見とクラミジア抗体

	IgG (23例)	IgA (18例)	IgG+IgA (12例)	IgG and/or IgA (29例)	陰性 (25例)
腹腔鏡異常	82.6%* (19例)	77.8%* (14例)	91.7%* (11例)	75.9%* (22例)	28.0% (7例)
抗体価	3.09 ± 4.88	2.22 ± 0.30			
腹腔鏡正常	17.4% (4例)	22.2% (4例)	8.3% (1例)	24.1% (7例)	72.0% (18例)
抗体価	2.04 ± 0.27	2.20 ± 0.35			

*p<0.05

表5 HSG所見とクラミジア抗体

	IgG (53例)	IgA (45例)	IgG+IgA (28例)	IgG and/or IgA (70例)	陰性 (178例)
HSG異常	66.0%* (35例)	57.8%* (26例)	71.4%* (20例)	58.6%* (41例)	32.0% (57例)
抗体価	3.01 ± 6.19	2.65 ± 2.36			
HSG正常	34.0% (18例)	42.2% (19例)	28.6% (8例)	41.4% (29例)	68.0% (121例)
抗体価	2.67 ± 4.66	2.31 ± 1.61			

*p<0.05

に続発性不妊で有意に高かった。IgGとIgAの両者あるいは一方陽性例は原発性は約20%，続発性は約30%であった。しかし、抗体陽性例でのIgG、IgA抗体価は原発性と続発性不妊で差はなかった。

4. クラミジア抗体と腹腔鏡所見 (表4)

54例に腹腔鏡 (開腹術を含む) を施行し、既往手術や内膜症以外による癒着、卵管水腫や卵管閉塞を認めた症例を異常とし抗体陽性率とその抗体価を検討した。抗体陽性例は陰性例にくらべ有意に腹腔鏡異常例が多く、IgGとIgAの両者あるいは一方陽性例の75.9%が腹腔鏡異常を示した。特にIgG+IgA陽性例でより腹腔鏡異常例が多く、IgG+IgA陽性例の91.7%に腹腔鏡異常所見が認められた。次に、抗体陽性例での腹腔鏡異常所見の有無と抗体価を比較検討した。IgG抗体価は腹腔鏡異常例で高い傾向があるものの有意な差はなく、IgA抗体価は腹腔鏡異常と正常で差はなかった。卵管水腫13例の12例 (92.3%)がIgGとIgAの両者あるいは一方陽性であった。

5. クラミジア抗体と子宮卵管造影 (HSG) 所見 (表5)

HSGを248例に行いクラミジア抗体とHSGの異常所見の有無とを比較検討した。卵管閉塞、卵管水腫、残像や拡散障害をHSG異常所見とした。抗体陽性例は陰性例にくらべ有意にHSG異常所見を示す症例が多く、特にIgG+IgA陽性例の71.4%にHSGの異常が認められた。しかし、抗体陽性例の中でHSG異常例のIgG、IgA抗体価は正常例にくらべ高値の傾向はある

が有意な差はなかった。データは示していないがクラミジア抗体とRubin test所見との関連性はなかった。

6. クラミジア感染治療後のIgA抗体価の推移 (図1)

当科ではIgA陽性例の夫婦にマクロライド系抗生剤を2週間投与している。治療終了後6カ月以上その抗体価を測定できた16例の抗体価の推移を検討した。IgAが陰性化した症例は6例 (37.5%)であり、陰

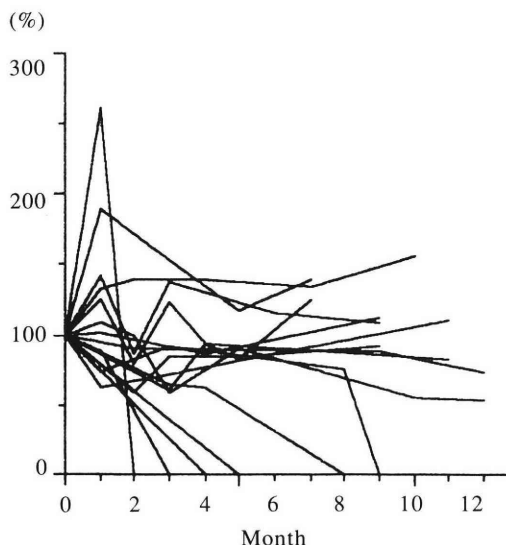


図1 血清クラミジア抗体IgA陽性例における治療後のIgA抗体価の推移

性化する症例は少なかった。また、治療後の抗体価が低下した症例は4例(25.0%)あったが、治療後の抗体価は治療前の抗体価の55~92%までの低下であり50%以下となった症例はなかった。逆に治療後抗体価が上昇した症例は6例(37.5%)存在した。また、IgAが陰性化下した症例としなかった症例の治療前の抗体価には差はなかった。

考 察

イパザイム法で測定した妊婦の血清クラミジア抗体陽性率は、IgGの22.2%~36.8%、IgAの10.1%~16.9%、IgGとIgA両者あるいは一方陽性の24.8%~46.6%と報告されている^{8~12)}。抗体陽性率は地域差があることが考えられるが、林ら⁹⁾は北海道の妊婦のクラミジア抗体陽性率をIgGは27.0%、IgAは11.0%、IgGとIgA両者あるいは一方陽性は30.7%と報告している。今回我々の妊婦の抗体陽性率はIgAの12.8%は諸家の報告と同頻度であるが、IgGの14.5%およびIgGとIgA両者あるいは一方陽性の17.9%の陽性率は低かった。その理由として対象の違いより測定法の違いによるものと考えられる。すなわちヒタザイム法は*C.pneumoniae*との交叉性が低く、偽陽性が少なく、より*C.trachomatis*に特異性の高い検査法である¹⁷⁾ことに起因すると考えられる。また、高橋ら⁴⁾は子宮外妊娠患者の79%(30/38例)がクラミジア抗体(IgGあるいはIgA)を保有していたと報告し、我々の成績の80%と一致しており、子宮外妊娠の原因にクラミジア感染が強く関与することを示唆する。

不妊症患者の血清クラミジア抗体陽性率は、一般の妊婦の陽性率より高いとする報告と差はないとする報告があるが、卵管性不妊症患者の抗体陽性率は妊婦や卵管性以外の不妊症患者の陽性率より高いとする報告がほとんどである^{11~16)}。我々の成績は不妊症患者と妊婦の抗体陽性率に差はないが、HSGや腹腔所見の異常を示す卵管性不妊症患者は妊婦や卵管性以外の不妊症患者より有意に抗体陽性率は高かった。クラミジア感染が卵管性不妊の大きな原因であることが改めて認識された。続発性不妊の抗体陽性率が原発性不妊より有意に高かったが、山崎ら¹²⁾も同様なことを指摘しているが、その理由として我々も報告¹⁸⁾しているが続発性不妊においてクラミジア抗体陽性率の高い卵管性不妊の占める割合がより高率であるため続発性不妊のクラミジア抗体陽性率が高くなったと考えられる。また、流産の原因にクラミジア感染が関与することが報告²³⁾されており、このために続発性不妊の抗体陽性率が高くなった可

能性がある。しかし、クラミジア感染と流産との原因の因果関係はないとする報告²⁴⁾もあり、データは示していないが今回の我々の調査でも流産の既往の有無と抗体陽性率とは相関性はなく、流産の原因に占めるクラミジア感染の頻度はそれほど高くはないと考えられる。抗体陽性例の頸管のクラミジア抗原の検出率は4.6%であったが、不妊症患者の頸管のクラミジア抗原検出率は5.1%~7.5%と報告^{11,14)}され、また本邦の妊婦における抗原の検出率は3.4~6.3%と報告されており、不妊症患者の頸管のクラミジア抗原検出率は一般妊婦と同程度であった。

イパザイム法による抗体陽性例のHSG異常率はIgG陽性の37.5%~78.9%、IgA陽性の34.7%~85.0%と報告^{11~14)}されており、報告者による差が大きい。これはHSGの異常所見の判定が報告者で異なることや、HSG所見と実際の腹腔所見とが一致しないことが多いためと考えられる。我々は腹腔鏡で癒着が認められた症例でのHSGの正診率は42.2%と低いことを報告している²⁰⁾。林らのイパザイム法による北海道での調査によると、抗体陽性例の卵管性不妊症患者の率はIgG陽性例の37.5%、IgA陽性例の50.0%と報告している⁹⁾。これは、我々の成績のIgG陽性の66.0%、IgA陽性の57.8%と比較し低率であった。この違いはヒタザイム法はより*C.trachomatis*に特異性が高い検査法であるためと考えられる。熊本ら¹⁷⁾はヒタザイム法およびイパザイム法とWestern blot法との一致率はヒタザイム法で有意に高く、ヒタザイム法の方がイパザイム法より*C.trachomatis*抗原特異性が高いと報告している。

抗体陽性例は陰性例に比し腹腔鏡所見で癒着や卵管閉塞を示す症例が有意に多いと報告されている^{14,15,21)}。生田ら²¹⁾は51例に腹腔鏡を行いIgG陽性(イパザイム法)の62%、IgA陽性の75%、IgG+IgA陽性の75%に癒着を認めたと報告している。さらにIgG+IgA陽性例はIgG単独陽性例より癒着や卵管閉塞を認める症例が多かったと述べている。我々のヒタザイム法での成績はIgG陽性の83%、IgA陽性の78%、IgG+IgA陽性の92%に癒着や卵管閉塞などの腹腔鏡異常を認めた。従来のイパザイム法での報告に比べヒタザイム法で測定した抗体陽性例での腹腔鏡異常を示す症例が有意に多かった。腹腔鏡を施行した症例は術前のHSGで卵管性不妊が推測された症例が多いために抗体陽性率がIgGは42.6%、IgAは33.3%と不妊症全体の陽性率の約2倍高かった。しかし、癒着や卵管閉塞を認める症例は認めない症例に比べ有意に抗体陽性率は高く、クラミジア感染が癒着や卵管

閉塞の大きな原因と考えられた。また、クラミジア感染に特徴的な腹腔所見は膜状癒着と卵管水腫であった。

治療後、頸管内のクラミジア抗原はすみやかに陰性化した。IgA抗体が陰性化したり抗体価が治療前の50%以下となった症例はおおよそ40%であった。宇津野²²⁾はIgA抗体価は初感染例、抗体価低値例、頻回治療例、急性期において治療後に低下および陰性化するが、卵管性不妊症ではIgA抗体価は不変であったと報告している。我々の成績では治療後に抗体が陰性化する症例と陰性化しない症例での治療前の抗体価には差はなかった。笠松⁷⁾は治療後78.6%の症例でIgA抗体が低下したと報告しているが、彼らの症例は子宮頸部よりクラミジアが分離培養された症例であり、初感染例や急性期が多いと考えられ、このためにIgA抗体が低下した症例が多かったと思われる。また、治療後IgA抗体が低下しない症例が21.4%存在し、これは子宮内膜や卵管に持続感染があるためと推定している。我々は原則として治療は夫婦に2週間投薬の一回だけ行なっている。IgAが治療後も長期にわたり陽性である症例は頻回に治療を行えばIgA抗体が低下および陰性化する可能性はあると思われる。

まとめ

ヒタザイム法で測定した妊婦および不妊症患者の血清クラミジア抗体陽性率は従来のイバザイム法で測定した成績より低かった。これはヒタザイム法がよりC.trachomatisに特異性が高いためによるものと考えられる。不妊症患者の血清クラミジア抗体を測定することである程度卵管性不妊の有無のスクリーニングが可能である。特にIgG+IgA陽性例で卵管性不妊である可能性が高かった。しかし、不妊症患者においては活動性感染の指標と考えられているIgA抗体の測定だけでは治療後の治癒の判定は困難な症例が多かった。

本論文要旨は、第37回日本不妊学会総会(東京1992)において発表した。

文 献

- 1) Sweet RL, Chlamydial salpingitis and infertility. Fertil Steril 38: 530, 1982
- 2) McGregor JA, Chlamydia infection in Women. Obstet Gynecol Clin North Am 16: 565, 1989
- 3) Chaim W, Sarov B, Sarov I, et. al., Serum IgG and IgA antibodies to Chlamydia in ectopic pregnancies. Contraception 40: 59, 1989

- 4) 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
- 5) Piura B, Sarov I, Svarov B, et. al., Serum IgG and IgA antibodies specific for Chlamydia trachomatis in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur J Epidemiol 1: 110, 1985
- 6) 吉沢花子, 原尻真理, 橋爪 壮, C.trachomatis 感染症の血清学的診断におけるIgA 抗体の意義. 感染症学雑誌 61: 893, 1987
- 7) 笠松高弘, 菅生元康, 吉川裕之 他, Chlamydia trachomatis 女性性器感染症の診断および治療における血清特異的IgA 抗体の意義. 日産婦誌 41: 479, 1989
- 8) 松田静治, クラミジア・トラコマチス. 産婦の実際 40: 951, 1991
- 9) 林 謙治, 熊本悦明, 酒井 茂 他, Chlamydia trachomatis 感染症の診断および疫学調査における特異的血清IgA, IgG抗体測定に関する検討. 感染症学雑誌 62: 355, 1988
- 10) 野口昌良, 岡本俊充, 保条説彦 他, Chlamydia trachomatis 感染と抗IgA, IgG, IgM抗体. 産と婦 58: 235, 1991
- 11) 武内裕之, 岩佐 剛, 宇津野栄 他, 不妊症とChlamydia trachomatis 感染. 日不妊会誌 35: 415, 1990
- 12) 山崎ともみ, 吉沢花子, 橋爪 壮 他, 不妊症外来受診者のChlamydia trachomatis 抗体保有状況. 日本性感染症学会誌 1: 15, 1990
- 13) 楊 柄辰, 荒川 修, 谷 啓光 他, 間接免疫ペルオキシダーゼ法によるクラミジア感染症の血清学的診断法の意義—特に不妊・不育患者について—. 日不妊会誌 34: 858, 1989
- 14) 大須賀穰, 三橋直樹, 水野正彦, 不妊外来における抗クラミジア抗体測定の意義. 日本性感染症学会誌 1: 98, 1990
- 15) 野口昌良, 岡本俊充, 稗田茂雄 他, 卵管性不妊症とChlamydia trachomatis 感染に関する検討. 日不妊会誌 35: 547, 1990
- 16) 岡田弘二, 保田仁介, 不妊症とクラミジア感染の既往. 産婦の実際 36: 59, 1987
- 17) 熊本悦明, 佐藤隆志, 広井正彦 他, 尿路性器Chlamydia trachomatis 感染症における特異的血清IgA, IgG抗体についての検討—HITAZYMEとIPAzymeの比較—. 感染症学雑誌 67: 315, 1993
- 18) 山本 弘, 遠藤俊昭, 幡 洋 他, 当科における最近5年間の不妊症の臨床統計. 日不妊会誌 29: 394, 1984
- 19) 熊本悦明, 妊婦におけるChlamydia trachomatis 感染症. 産と婦 57: 257, 1990
- 20) 東口篤司, 下谷保治, 山本 弘 他, Rubin test,

HSG, laparoscopyの卵管通化性に関する診断的意義. 日不妊会誌 33 : 559, 1988

- 21) 生田克夫, 鈴木則敬, 鈴木真史 他, 不妊症におけるクラミジア抗体価と腹腔鏡所見. 産と婦 60 : 298, 1993
- 22) 宇津野栄, 婦人のChlamydia trachomatis感染の疫学的調査および診断, 治療における特異的血清IgA, IgG抗体測定の意義. 日産婦誌 43 : 763, 1991
- 23) 原尻真理, 吉沢花子, 橋爪 壮 他, Chlamydia trachomatis感染が妊娠・分娩ならびに出生児に及ぼす影響. 感染症学雑誌 62 : 147, 1988
- 24) 山崎 勉, 中田博一, 喜田善和 他, Chlamydia trachomatis母児感染について 第2編 流早産との関連. 日本新生児学会雑誌 25 : 389, 1989

Prevalence of serum anti-chlamydia antibodies in infertile patients

Hiroshi Yamamoto, Hiromi Fukue, Satoko Mori,
Yuko Inoue, Tamotsu Kiya, Mika Kanaya,
Miho Fujii, Toshiaki Endo, Shoichi Tanaka
and Ryuichi Kudo

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Sapporo Medical University,
Sapporo 060, Japan

Three hundred and ninety infertile patients and 117 pregnant women were investigated for the presence of

serum anti-chlamydia antibodies, IgG and IgA, by ELISA(HITAZYME). The relation between serum anti-chlamydia antibodies and tubal infertility was examined.

The positive rates for IgG and IgA were 17.7% and 14.5% in infertile patients, 14.9% and 12.8% in pregnant women. There were no significant differences between infertile patients and pregnant women; however, these values were lower than those previously obtained with indirect immunoperoxidase assay (IPAzyme).

Abnormal findings of hysterosalpingography and laparoscopy were more frequently found in positive than in negative antibody infertility. 91.7% of infertile patients seropositive for IgG and IgA had tubal abnormalities on laparoscopy. 72.0% of patients seronegative for IgG and IgA had no tubal abnormalities. These values were higher than those reported when anti-chlamydia IgG and IgA were measured by IPAzyme. The patients seropositive for IgA were administered antibiotics. After treatment, IgA was not detected or had been reduced to less than half of pretreatment titers in about 40% of the patients. IgA titers remained high in about 40% of the patients, and the other 20% showed IgA titers less than half of pretreatment values.

The examination of anti-chlamydia antibodies was very useful in screening tubal infertility. However, it was difficult to determine the cure of the chlamydial infection based only on the changes of serum anti-chlamydia IgA antibody.

(受付: 1993年6月22日)

(受理: 1993年10月1日)

ウサギ培養卵管上皮細胞のマウス初期胚に対する発育効果

Effects of Cultured Rabbit Oviduct Cells on the Development of Early Mouse embryos

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室(主任:平川 舜教授)

川 島 夕 美

Yuumi KAWASHIMA

First Department of Obstetrics and Gynecology,

Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan (Director: Prof. S. Hirakawa)

卵管機能の一端を解明する目的で、ウサギ培養卵管上皮細胞のマウス初期胚に対する発育効果を検討し、次の成績を得た。

- 1) ウサギ卵管上皮細胞とマウス前核期胚との共培養によって、マウス前核期胚の発育が促進された。
- 2) ウサギ卵管上皮細胞のマウス前核期胚に対する共培養効果は24時間で十分であった。
- 3) ウサギ卵管上皮細胞培養液のマウス前核期胚に対する発育促進効果が濃度依存的に認められた。

以上の成績から、培養卵管上皮細胞は初期胚発育促進因子を産生・分泌することが示唆された。マウス初期胚の発育には卵管上皮細胞の存在が必ずしも不可欠ではないが、初期胚が一定期間卵管上皮細胞と共存していれば、初期胚の発育は順調に進行することが明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 59 - 65, 1994)

緒 言

マウスにおいては *in vitro* の培養で、2細胞期胚からは高率に胚盤胞まで発生することが知られている。しかし1細胞期の受精卵からの培養では、ある種の近交系以外 *in vitro* 2-cell blockが生じるため、2細胞期で発生が停止する系統¹⁻³⁾が多い。1957年にWhitten⁴⁾がマウスの2-cell block現象を報告して以来、数多く報告され、その原因として胚細胞質因子をMuggleton-Harrisら²⁾は指摘し、卵子母由来の遺伝子がマウス胚の発生を左右するとGoddardら³⁾は報告しているが、この現象の詳細はいまだ明らかにされていない。着床前の哺乳類の受精卵は生殖器官を通過する過程で、絶え間なく様々な環境の変化にさらされるが、2-cell block現象は、*in vivo* では起こらないことから、卵管は胚発育のための微小環境を提供し、*in vitro* では得られない胚の発育に必要なして十分な生理活性物質を産生・放出していることに異論はないと思われる。

器官培養中のマウス卵管の中へのマウス前核期胚の移植⁵⁾は2-cell blockを解除し、ヒツジ胚とヒツジ卵

管上皮細胞⁶⁾との共培養によって胚の発育は促進され、ウシ胚を異種のウサギ卵管⁷⁾に移植しても胚の発育は順調に進行することが報告されている。

本実験では卵管機能の一端を解明する目的で、ウサギ培養卵管上皮細胞を用いて、上皮細胞のマウス初期胚に対する発育効果について検討した。

材料および方法

1. 卵の採取

6週齢のICR系雌マウスにpregnant mare serum gonadotropin (PMSG: 帝国臓器) 5単位を腹腔内投与し、さらに48時間後にhuman chorionic gonadotropin (hCG: 帝国臓器) 5単位を投与し、過排卵処理を行った。hCG投与後、同系成熟雄マウスと交配させ、翌朝腔栓の認められた雌マウスを実験に使用した。hCG投与18時間後に頸椎脱臼法でマウスを屠殺し、卵管を摘出して環流し、卵を採取した。受精卵は通常前核期胚のみを選択したが、一部の実験ではhCG投与40、42および43時間後に各々2細胞期胚を採取した。前核期胚は0.1% hyaluronidase (Sigma) /phosphate buffered saline (PBS) (-) /0.2% bovine serum albumin

(BSA:Sigma)で卵丘細胞を除去し、PBS (-)で十分に洗浄を行なって実験に供した。

2. ウサギ卵管上皮細胞の分離・培養

ペントバルビタールナトリウム (ネプタール: 大日本製薬) 麻酔下に、体重3.0~3.3kg, 非発情期の日本白色雌ウサギの卵管を無菌的に摘出した。卵管内腔を開き、内腔をHank's balanced salt solution (HBSS) (-)で十分に洗浄後、実体顕微鏡下にて膨大部粘膜ヒダを小鋏で切除した。Penicillin G (200単位/ml) およびstreptomycin (200 μ g/ml) 含有HBSS (-)で十分に洗浄した粘膜ヒダ細切片を、0.56% dispase (三光純薬)/HBSS (-)の中で37℃, 75分間酵素処理した。金属性メッシュを通過した細胞を遠心、洗浄して浮遊細胞を得た。この細胞を10% fetal calf serum (FCS: 三菱化成)/penicillin G (200単位/ml)・streptomycin (200 μ g/ml)/Ham's F-12 (Gibco): Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) の1:1の培地に細胞を浮遊させた後、48-well multiplate (住友ベークライト)に移し、90分後に培養液を回収して細胞浮遊液を再度作製し、細胞数 5×10^5 /mlの濃度で48-well multiplateに播種し、実験に供した。37℃, 5% CO₂-95% airの基本培養条件下にインキュベータ内にて培養した。

3. ウサギ培養卵管上皮細胞とマウス前核期胚との共培養

上皮細胞がconfluentに達した後に培養液を0.3%BSA/mBWW液⁸⁾ (800 μ l/well)の胚培養基本培地と交換し、6時間の前培養の後、hCG投与18時間後に採取したマウス前核期胚を20個導入し、基本培養条件下にて共培養を開始した。対照としては単独の胚培養基本培地でhCG投与18時間後に採取したマウス前核期胚を基本培養条件下で培養した。

4. ウサギ培養卵管上皮細胞とマウス前核期胚との共培養後の胚単独培養

上皮細胞とマウス前核期胚との共培養22 (hCG投与40時間後)、24 (hCG投与42時間後) および25 (hCG投与43時間後) 時間後に、培養2細胞期胚を別の0.3%BSA/mBWW液 (800 μ l/well)のみを含む48-well multiplateに移し変えて基本培養条件下で培養した。対照としては単独の胚培養基本培地でhCG投与40、42および43時間後に採取したマウス2細胞期胚を基本培養条件下で培養した。

5. ウサギ培養卵管上皮細胞培養液中でのマウス前核期胚の培養

上皮細胞がconfluentに達した後に培養液を0.3%BSA/mBWW液 (800 μ l/well)と交換して培養を続け、培養液交換の24時間後に培養液を回収した。各

plateより等量ずつ回収した10%培養液/0.3%BSA/mBWW液および50%培養液/0.3%BSA/mBWW液を各々含む48-well multiplate (800 μ l/well)にhCG投与18時間後に採取したマウス前核期胚を、それぞれ20個導入し、基本培養条件下で培養した。対照としては単独の胚培養基本培地でhCG投与18時間後に採取したマウス前核期胚を基本培養条件下で培養した。

6. 酵素抗体染色によるウサギ培養卵管細胞の同定

培養細胞をchamber slide (Nunc)に播種し、適当な密度に増殖した時点で95%冷アルコール固定し、酵素抗体法(PAP法)(DAKO)にてkeratin, vimentinおよびepithelial membrane antigenの染色をした。

7. 観察方法

培養細胞は位相差顕微鏡にて細胞増殖の程度を観察した。胚分割の程度は24時間毎に位相差顕微鏡にて観察した。

8. 統計処理

胚分割の割合の比較は χ^2 検定を用いて統計処理を行なった。

成 績

1. 培養細胞の形態および酵素抗体染色

位相差顕微鏡にての観察による培養細胞は、写真1に示すごとく上皮系細胞に特徴的な敷石状に並んでいた。また培養細胞はkeratinもepithelial membrane antigenも陽性の細胞で、vimentinは陰性の細胞であり、培養細胞は上皮細胞であることが確認された。

なお本培養法によるconfluentな状態での線維芽細胞の混入率は、位相差顕微鏡にての観察によって、5%以下であった。

2. ウサギ培養卵管上皮細胞のマウス前核期胚に対する発育効果

実際に初期胚の発生が進行する環境は卵管内なので、培養卵管上皮細胞とマウス前核期胚とを共培養

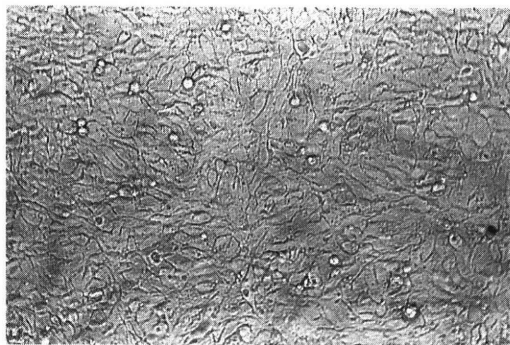


写真1 ウサギ培養卵管上皮細胞の光顕写真(×100)

表1 ウサギ培養卵管上皮細胞とマウス前核期胚との共培養

	前核期胚 ^a	2細胞期胚(%) ^b	4細胞期胚(%) ^c	桑実胚(%) ^d	胚盤胞(%) ^e
対照 ^h	198	172 (86.7)	78 (39.4) ^f	17 (8.6) ^f	5 (2.5) ^f
共培養 ⁱ	208	181 (87.0)	132 (63.5) ^g	91 (43.8) ^g	67 (32.2) ^g

f・g : $p < 0.01$

a : hCG投与18時間後

d : hCG投与 96時間後

b : hCG投与48時間後

e : hCG投与120時間後

c : hCG投与72時間後

h : 前核期胚を0.3%BSA/mBWW液で培養

i : 上皮細胞と前核期胚との共培養

し、上皮細胞の胚に対する発育効果を検討した。共培養群での胚発生の頻度は表1に示すごとく、前核期胚は63.5%以上が2-cell blockを越えて発育しており、4細胞期胚率は63.5%、桑実胚率は43.8%、胚盤胞率は32.2%と著しく高く、対照群における4細胞期胚率39.4%、桑実胚率8.6%、胚盤胞率2.5%と比較してそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に高率で、上皮細胞の胚発育効果が認められた(写真2)。共培養群での2細胞期胚率は87.0%で対照群とほぼ同水準であった。



写真2 共培養開始102時間後の胚盤胞の顕微鏡写真
($\times 100$)

3. ウサギ培養卵管上皮細胞とマウス前核期胚との共培養後の胚単独培養

共培養の効果が胚のどの発育段階の過程まで必要なかを判定するため、共培養後に胚のみを別の培養液に移して培養し検討した。まずin vitroで2-cell blockが解除される時期を判定するため、hCG投与18、40、42および43時間後に採取した胚を用いて培養した。hCG投与18時間後に採取した胚の4細胞期胚率は39.4%、同様に40時間後は42.4%なのに対して、42時間後は89.5%、43時間後は99.3%であり、42および43時間後に採取した胚の4細胞期胚率が18および40時間後に比べてそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に高かったの

で(表2)、hCG投与40から42時間後に卵管から胚が採取されると2-cell blockは解除されることが判明した。この結果に基づいて、共培養後の胚単独培養の対照はhCG投与40、42および43時間後の胚とした。共培養22時間後(hCG投与40時間後)に回収した2細胞期胚を単独培養した場合の4細胞期胚率は37.8%、桑実胚率は9.7%および胚盤胞率は5.6%で、対照群とほぼ同水準であった(表2)。共培養24時間後(hCG投与42時間後)に回収した2細胞期胚を単独培養した場合の4細胞期胚率は53.3%、桑実胚率は29.1%および胚盤胞率は19.8%で、対照群の4細胞期胚率89.5%、桑実胚率84.2%および胚盤胞率73.7%に比べて胚発生率はそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に低いが(表2)、共培養22時間後の胚単独培養と比較すると、共培養24時間後の胚単独培養の4細胞期胚率、桑実胚率および胚盤胞率はそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に高率であった(表2)。共培養25時間後(hCG投与43時間後)に回収した2細胞期胚を単独培養した場合の4細胞期胚率は62.6%、桑実胚率は41.4%および胚盤胞率は30.5%で、対照群の4細胞期胚率99.3%、桑実胚率98.6%および胚盤胞率95.9%に比べて胚発生率はそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に低いが(表2)、共培養22時間後の胚単独培養と比較すると、共培養25時間後の胚単独培養群の4細胞期胚率、桑実胚率および胚盤胞率はそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に高率であった(表2)。また共培養25時間後の胚単独培養の桑実胚率および胚盤胞率は、共培養24時間後の胚単独培養の桑実胚率および胚盤胞率と比べて共培養25時間後の胚発生率の方が有意 ($p < 0.01$) に高率であった(表2)。これらの結果から、卵管上皮細胞の前核期胚に対する共培養効果は、共培養時間の経過に伴って増強され、少なくとも24時間の共培養で十分であることが判明した。

4. ウサギ培養卵管上皮細胞培養液のマウス前核期胚に対する発育効果

における4細胞期胚率39.9%, 桑実胚率9.1%および胚盤胞率2.1%に比べてそれぞれ有意 ($p<0.01$) に高い胚発生率であり (表3), 卵管上皮培養液中には何らかの胚発生促進因子の存在が示唆された。培養液中での2細胞期胚率は87.3%で, 対照群の86.0%に比べて有意の変化は認められなかった (表3)。これに対して10%培養液中での2細胞期胚率は84.6%, 4細胞期胚率は34.9%, 桑実胚率は8.7%および胚盤胞率は0.7%で, 対照群とほぼ同水準であり, 10%培養液濃度では胚発育促進効果は認められなかった (表3)。

考 察

哺乳類の *in vitro* 培養ではハムスター⁹⁾, ブタ¹⁰⁾, ウシ¹¹⁾ およびヒツジ⁶⁾ 等で stage specific な胚発育の停止が知られており, 特定のマウス系統¹⁻³⁾ では *in vitro* 2-cell block 現象として長い間知られている。1957年に Whitten⁴⁾ が2-cell block 現象を提唱して以来, 2-cell block を制御する因子を多くの研究者達が探し求めた。Muggleton-Harris²⁾ は, block の出現しない系統の胚細胞質を, block の出現する胚への直接導入によって, 胚発育の停止が起こらないことを突き止め, 2-cell block の原因として胚細胞質の因子を示唆している。一方 Goddard³⁾ は, block の出現しない雌マウスとの交配は block が生じず, 卵子母由来の遺伝子が2-cell block 誘導因子の一つであることを確認した。EDTA¹²⁾, glutamine¹³⁾, superoxide dismutase¹⁴⁾ および低酸素濃度下培養¹⁵⁾ も, 2-cell block 解除効果を発揮するが, この現象の詳細な機序はいまだ解明されていない。

そこで著者は, 実際に胚が発育する卵管内では, 2-cell block 現象は起きない事実より, 卵管上皮細胞から産生・放出されて胚の発育に不可欠な生理活性物質あるいは胚発育の場としての微小環境の欠如が, 2-cell block を引き起こす可能性があるものと考え, 卵管上皮細胞を feeder layer として胚を培養し, 上皮細胞の胚発育に対する発育効果を検討した。

ウサギ卵管上皮細胞を feeder layer として, マウス前核期胚を培養した。その結果前核期胚は2-cell block が解除され, 胚盤胞への発育率も顕著に向上する現象が認められた。したがって卵管上皮細胞は胚の発育を促進する因子を産生・放出するか, あるいは胚の発育にとって最適な微小環境を提供することが判明し, 胚発育促進因子は種に特異性を持たないことも明らかとなった。ヒツジ卵管上皮細胞とヒツジ胚⁶⁾ や, ヒト卵管上皮細胞とヒト胚¹⁶⁾ との共培養でも胚の発育は促進され, ウサギ卵管へウシ胚⁷⁾ を

移植する異種間の共培養においても胚発育促進効果が確かめられており, 卵管上皮細胞に存在する胚発育促進因子は種に特異性を持たないものと思われる。共培養に用いる feeder layer の種類によって胚発育促進効果には差異があり, 卵管内で発育する段階の胚には卵管由来の体細胞^{6,17,18)} との共培養で, 子宮へ移行後の胚には子宮由来の体細胞^{19,20)} との共培養で一段と強い発育促進効果が得られる。また大部分の哺乳類胚²¹⁻²³⁾ は, 排卵後約40~70時間, 卵管膨大部峡部接合部周辺に停留し, この間に胚は2細胞期以上に発育するので, 分泌細胞の占める比率²⁴⁾ が最も大きい膨大部上皮細胞²⁵⁾ との共培養で, 胚は効率よく発育が促進される。後期2細胞期胚からの *in vitro* 培養では, 胚盤胞への発育の進行は良好であり, また卵管上皮細胞とマウス前核期胚との共培養で, 胚は難関な2-cell block を越えて発育し, 胚盤胞の発生率の向上が認められたので, どの発生過程まで共培養効果が維持されれば, 胚の2-cell block が解除されるかを調べた。hCG 投与18時間後の前核期胚を24時間以上共培養を行なった2細胞期胚は, その後は共培養を行なわなくても胚単独培養で, 発育が順調に進行するのが分かった。極く初期の2細胞期胚の発育段階において *in vitro* 2-cell block が出現するので, 少なくとも共培養効果24時間の微小環境が維持できれば, block は出現しないことが明らかとなった。hCG 投与36時間以後の2細胞期胚からの *in vitro* 培養では, 2-cell block は生じないと報告³⁾ されており, この時期は本実験の条件ではhCG 投与42時間後に相当し, 諸家の報告とほぼ一致する成績であった。

培養卵管上皮細胞の培養液 (conditioned medium) 中で, 濃度依存的に胚は2-cell block を越えて, 胚盤胞まで発育が良好に進行することが確認された。したがって胚の発育には体細胞の存在が必ずしも不可欠ではないことが判明した。ウシ trophoblastic vesicle²⁶⁾ の培養上清液はウシ胚の発育を促進し, ヒト卵管培養上清液²⁷⁾ もマウス胚の発育を促進するが, マウス卵管上皮細胞²⁸⁾ には, 発育促進物質としての特異的な糖蛋白の存在が示唆されてはいるものの, いまだ発育促進物質を特定するまでには至っていない。ウサギ卵管内へマウスの1細胞期胚²⁹⁾ を移植しても, 胚は発育せず, 2細胞期胚を移植すると, 胚は順調に発育するので, 異種間の卵管に存在する胚発育促進因子は, 胚の特定の発生段階の過程のみに有効であるという興味ある報告もみられる。

マウス前核期胚は, 卵管上皮細胞から産生・放出される生理活性物質, すなわち胚発育促進因子によ

って発育が促されるものであり、発育の場としての卵管環境の存在は必ずしも必要としないことが示唆された。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました東邦大学第1産科婦人科学教室平川 舜教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導を賜りました同齊藤眞一講師に感謝致します。

なお本論文の要旨は第43回、第44回日本産科婦人科学会学術講演会にて発表した。

文 献

- Whitten WK and Biggers JD, Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fert* 17: 399, 1968
- Muggleton-Harris AL, Whittengham DG and Wilson L, Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. *Nature* 299: 460, 1982
- Goddard MJ and Pratt HPM, Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. *J Embryol Exp Morph* 73: 111, 1983
- Whitten WK, Culture of tubal ova. *Nature* 179: 1081, 1957
- Biggers PJD, Gwatkin RBL and Brinster RL, Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature* 194: 747, 1962
- Gandolfi F and Moor RM, Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 81: 23, 1987
- Lawson RAS, Adams CE and Rowson LEA, The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J Reprod Fert* 28: 313, 1972
- Spindle AI and Pedersen RA, Hatching, attachment and outgrowth of mouse blastocysts in vitro: Fixed nitrogen requirements. *J Exp Zool* 186: 305, 1973
- Yanagimachi R and Chang MC, In vitro fertilization of golden hamster ova. *J Exp Zool* 156: 361, 1964
- Davis DL and Day BN, Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J Anim Sci* 46: 1043, 1978
- Wright RJr and Bondioli KB, Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 53: 702, 1981
- Abramczuk J, Solter D and Koprowski H, The beneficial effects of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 61: 378, 1977
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, et al., An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* 86: 679, 1989
- 松本 央, 野田洋一, 馬岡 陽 他, Superoxide Dismutaseによるマウス 2-cell blockの解除. *日不妊会誌* 35: 293, 1990
- Quinn P and Harlow GM, The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool* 206: 73, 1978
- Bongo A, Soon-Chye N, Sathananthan H, et al., Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 4: 706, 1989
- Rexroad CE Jr and Powell AM, Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 29: 387, 1988
- Sakkas D, Trounson AO and Kola I, In vitro cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells. *Reprod Fertil* 1: 127, 1989
- Allen RL and Wright RW Jr, In vitro development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. *J Anim Sci* 59: 1657, 1984
- Rexroad CE Jr and Powell AM, Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J Anim Sci* 66: 947, 1988
- Greenwald GS, A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. *Fertil Steril* 12: 80, 1961
- Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz Hess R, et al., Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Gynecol* 132: 629, 1978
- 齊藤眞一, 家兎卵管 adrenergic transmitterと卵輸送との関連性の検討. *日不妊会誌* 38: 392, 1993
- Verhage HG, Bareither ML, Jaffe RC, et al., Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat* 156: 505, 1979
- 齊藤眞一, 勝見千明, 松島弘充 他, 家兎卵管組織のマウス初期胚発生に対する発育効果. *日受精着床学会誌* 8: 91, 1991
- Heyman Y, Ménéz Y, Chesné P, et al., In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos :

Improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27: 59, 1987

- 27) 大柴葉子, 初期胚発生に影響する卵管因子の実験的研究. 慶應医学 68: 465, 1991
- 28) Kapur RP and Johnson LV, Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J Exp Zool* 238: 249, 1986
- 29) Brinster RL and Tenbroeck JT, Blastocyst development of mouse pre-implantation embryos in the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fert* 19: 417, 1969

Effects of cultured rabbit oviduct cells on the development of early mouse embryos

Yuumi Kawashima

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

We examined the effect of cultured rabbit oviductal epithelium on mouse early embryo development, for the purpose of analyzing the function of oviduct. Development of pronucleus stage mouse embryos to blastocyst stage was promoted by co-culture with rabbit oviductal epithelium. This promoting effect of co-culture with rabbit oviductal epithelium appeared within 24 hours. Development of pronucleus stage mouse embryos to blastocyst stage was promoted by conditioned medium, and was dose-dependent. These results suggested that cultured oviductal epithelium produce some factors which promote early embryo development. Although the presence of oviductal epithelium may not be required for the development of mouse early embryos, co-existence with oviductal epithelium for a certain period of time clearly promotes development of early embryos.

(受付: 1993年8月17日特掲)

(受理: 1993年10月4日特掲)

EFFECT OF CUMULUS CELLS ON *IN VITRO* MATURATION OF PIG OOCYTES

Yuichi KAMEYAMA and Yoshiro ISHIJIMA

Department of Bioproduction, Faculty of Bioindustry,
Tokyo University of Agriculture, Abashiri 099-24, Japan

Abstract: An experiment on the effect of cumulus cells on *in vitro* maturation of pig oocytes was carried out. The pig oocytes with thick and tight cumulus cells recovered from follicles, each of the follicles had a diameter of 2-5mm, were used. The experiments were classified into following 3 groups, the group of oocytes cultured with the intact cumulus cells (I, II and IV), the group of oocytes cultured after the removal of the cumulus cells (III), and the group of oocytes cultured with the intact cumulus cells which were removed 24 hours after the commencement of culture (V and VI). The oocytes cultured with intact cumulus cells were divided into the group in which the oocytes were immersed in PBS for 15 minutes before the culture (II) and 24 hours after the culture (IV). At the group of oocytes in which cumulus cells were removed 24 hours after the culture, the ones were transferred to other dish after the removal (VI). The *in vitro* maturation rates of the oocytes with cumulus cells were 63-66%. A marked decrease in the maturation rate (40%) was observed when the cumulus cells were removed before the commencement of culture. However, it was indicated that there was not much effect on *in vitro* maturation of the oocytes when the cumulus cells were removed 24 hours after the culture. No difference in the maturation rates was observed even when the oocytes were transferred to other dish upon the removal 24 hours after the culture. These results were suggested that cumulus cells had the effect on maturation of pig oocytes if they were present during the first 24 hours of culture.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 66 - 69, 1994)

Introduction

The presence of cumulus cells in the *in vitro* maturation of mammalian oocytes is known to affect substance transfer⁹⁾ and energy supply¹⁾ to the oocytes. The maturation rates of oocytes without cumulus cells recovered from follicles is known to be markedly low in cows^{3,5)} and pigs¹⁰⁾. On the other hand, it was reported that the maturation rates of oocytes cultured after the removal of cumulus cells were not changed in mice²⁾ and rats⁶⁾, but decreased in pigs⁸⁾.

In recent reports, it has become known that somatic cells and cumulus cells originated from follicles have the effect on fertilization and developmental capability after maturation of the oocytes in sheep¹¹⁾, pigs⁷⁾ and rats¹²⁾.

However, the role of cumulus cells in maturation of oocytes is still not fully known.

In this paper, the effect that removal of cumulus cells and time of the removal would have on *in vitro* maturation of pig oocytes was examined in order to learn the role of cumulus cells in maturation of oocytes.

Materials and Methods

The pig oocytes with thick and tight cumulus cells recovered from ovarian follicles, each of the follicles had a diameter of 2-5mm, were used. The recovery of oocytes was carried out in accordance with the recovering method described in a previous report⁴⁾. Culture is carried out for 48 hours using 10%FCS, PMSG (10IU/ml), hCG (10IU/ml) and estradiol-17 β (1 μ g/ml) added mKRB. Culture condition was 39 °C in temperature and 5% CO in air. Removal of cumulus cells was carried out by pipetting in 0.1% hyaluronidase added PBS. The maturation stages of

oocytes were identified by staining them with 1% aceto orcein after fixating in ethanol and acetic acid (3: 1, V / V). The experiments were classified into the following seven groups, I : the oocytes with intact cumulus cells cultured without any treatment, II : the oocytes with intact cumulus cells cultured after immersion in PBS for 15 minutes, III : the oocytes were cultured after removal of cumulus cells with hyaluronidase, IV : the oocytes with cumulus cells were kept in PBS for 15 minutes at 24 hours after culture and then cultured further in the same dish that was used before the immersion, V : the oocytes with cumulus cells were cultured for 24 hours, cumulus cells were removed from oocytes with hyaluronidase and cultured in the same dish that was used before the removal, VI : the oocytes from which cumulus cells were removed in accordance with the procedure described in V and transferred to other dish after removal, and VII : the oocytes which had no cumulus cells at the time of recovery were cultured without any treatment.

Results

The results obtained were shown in Table 1. The maturation rates of oocytes cultured with intact cumu-

lus cells in groups I, II and IV were 66.0, 63.5 and 62.6%, respectively. The maturation rates of oocytes from which were removed before culture (III) was 40.2%. The maturation rates of oocytes in group III was significantly low ($P<0.05$). Also, the maturation rate of oocytes without cumulus cells at the time of recovery (VII), the maturation rate was markedly low (33.1%). Moreover, the maturation rates of oocytes from which cumulus cells were removed after 24 hours of culture were 55.8% in group V and 59.0% in group VI. As compared to the maturation rate of oocytes from which cumulus cells were removed before culture, these were high. And the significant difference in maturation rates between V and VI was not observed.

Discussion

The maturation rate of oocytes with thick and tight cumulus cells obtained in this experiment was 66.0% (group I). This was about the same as the one in a previous report⁴⁾. The oocytes with intact cumulus cells were immersed in PBS in groups II and IV, because the removal of cumulus cells in this experiment took place in PBS. There was no significant difference in maturation rate between with or without

Table 1 Effect of Cumulus Cells on Maturation of Pig Oocytes

Treatment of oocytes ¹⁾	No. of oocytes	Stage of maturation ²⁾				Maturation rate (%)
		GV	MI ~ TI	MII	Deg.	
I	485	45	115	320	5	66.0
II	178	14	49	113	2	63.5
III	229	54	71	92	12	40.2*
IV	179	17	50	112	0	62.6
V	240	24	80	134	2	55.8
VI	239	17	79	141	2	59.0
VII	136	40	23	45	28	33.1*

1) I : Cumulus cells intact

II : Immersion in PBS for 15 minutes before culture, cumulus cells intact

III : Removal of cumulus cells in PBS before culture

IV : Immersion in PBS for 15 minutes after 24 hours of culture, cumulus cells intact

V : Removal of cumulus cells in PBS after 24 hours of culture

VI : Removal of cumulus cells in PBS after 24 hours of culture, transfer to other dish

VII : Oocytes without cumulus cells at the time of recovery

2) GV: Germinal vesicle, MI ~ TI : Metaphase I ~ Telophase I, MII : Metaphase II, Deg.: Degeneration

* Significantly lower than groups I, II, IV, V and VI at $P<0.05$

immersion in PBS. This indicated that the exposure to PBS did not have any adverse effect on maturation of pig oocytes.

The maturation rate of oocytes from which cumulus cells were removed before commencement of culture was low (40.2%). As compared to the maturation rate of oocytes with intact cumulus cells, this was significantly low. This result supported the report of McGaughey⁸⁾ which showed the effectiveness of cumulus cells on *in vitro* maturation of pig oocytes. The maturation rate of oocytes without cumulus cells was low as reported by Sato et al.¹⁰⁾ and it was lower than the maturation rate of oocytes from which cumulus cells were removed.

The maturation rate of oocytes from which cumulus cells were removed after 24 hours of culture and cultured in same dish (group V) or a different dish (group VI) that was used before removal of cumulus cells was not significantly different from the maturation rate of oocytes in group from which cumulus cells were not removed (groups I and II). This suggested that cumulus cells had the effect on maturation of oocytes if they were present during the first 24 hours of culture. Also, the results of group VI was suggested that factor released by cumulus cells did not have to be present in medium after 24 hours of culture.

Acknowledgments

We wish to thank the staff of the Kitami Meat Packer Inc. and Higashimokoto Meat Inspection Office, Hokkaido for the supply of pig ovaries.

References

- 1) Bigger JD, Whittingham DG, Donahue RP, The pattern of energy metabolism in the mouse oocytes and zygote. *Proc Nat Acad Sci USA* 58: 560, 1967
- 2) Binor Z, Wolf DP, *In vitro* maturation and penetration of mouse primary oocytes after removal of zona pellucida. *J Reprod Fert* 56: 309, 1979
- 3) Fukui Y, Sakuma Y, Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol Reprod* 22: 669, 1980
- 4) Kameyama Y, Ishijima Y, *In vitro* maturation of follicular oocytes obtained pig ovaries at a slaughterhouse. *Jap J Fertil Steril* 34: 751, 1989

- 5) Leibfried L, First NL, Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48: 76, 1979
- 6) Magnusson C, Role of cumulus cells for rat oocyte maturation and metabolism. *Gamete Res* 3:133, 1980
- 7) Mattioli M, Galeati G, Seren E, Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res* 20: 177, 1988
- 8) McGaughey RW, The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17 β on meiotic maturation. *Endocrinology* 100: 39, 1977
- 9) Moor RM, Smith MW, Dawson RMC, Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp Cell Res* 126: 15, 1980
- 10) Sato E, Iritani A, Nishikawa Y, Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap J Zootech Sci* 49: 400, 1978
- 11) Staigmiller RB, Moor RM, Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* 9: 221, 1984
- 12) Vanderhyden BC, Armstrong DT, Role of cumulus cell and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 40: 720, 1989

ブタ卵母細胞の体外成熟に及ぼす卵丘細胞の影響

東京農業大学生物産業学部生物生産学科

亀山祐一 石島芳郎

ブタの卵母細胞の体外成熟に及ぼす卵丘細胞の影響を検討した。直径2～5mmの卵胞から回収した卵丘細胞が厚く緊密に付着したブタ卵母細胞を、卵丘細胞を付けたまま(I, IIおよびIV), 培養開始前に卵丘細胞を除去(III), 培養24時間後に卵丘細胞を除去(VとVI)の3通りで培養した。この場合、この実験の卵丘細胞の除去がPBS中で行なわれるため、IIおよびIV区は卵丘細胞を付けたまま15分PBSに浸漬した。また、卵丘細胞からの放出因子の影響をみるため、培養24時間に卵丘細胞を除去した場合、除去後は別のディッシュに移す区(VI)を設けた。体外成熟率は、卵丘細胞が付着した卵母細胞の場合には、PBSに浸漬の有無に関係なく63～66%を示したのに対し、培養前に卵丘細胞を除去した場合には40%と低率であった。しかしながら培養24時間後に卵丘細胞を取り除いた場合

には、成熟率はさほど低下しなかった (56%)。培養24時間後に卵丘細胞を除去し、除去後別のディッシュに移しても成熟率 (59%) は変わらなかった。これらの結果、ブタの卵母細胞の体外成熟に卵丘細胞は必要であ

るが、長く存在しなくても役割を果たすことが示唆された。

(受付：1993年5月12日)

(受理：1993年9月29日)

COMPARISON OF SENSITIVITY OF MICE, RATS, AND XENOPUS LAEVIS TO OVULATION-INDUCING GONADOTROPHINS AND SYNTHETIC LH-RH

Toshima NOBUNAGA and Xiu-Li GUO

Institute for Experimental Animals
Tohoku University School of Medicine, Miyagi 980, Japan

Sakae INOUE

Institute of Endocrinology
Gunma University, Gunma 371, Japan

Abstract: The ovulation-inducing activity of gonadotrophins and synthetic porcine LH releasing hormone (LH-RH) was compared based on correlations observed between mice, rats, and *Xenopus laevis* injected subcutaneously with the amount of hormone necessary to induce ovulation in 50% of the treated animals.

In comparing dose of hormone necessary to induce ovulation in 50% of the animals treated, mice injected with porcine FSH, ovine LH, ovine pituitary GTH, rat anterior pituitary, *Xenopus* anterior pituitary, hCG, PMSG and LH-RH were, respectively, 7.0, 12.0, 7.3, 8.1, 6.7, 13.4, 16.0, and 16.0 times more sensitive than rats. Mice injected with FSH, LH, ovine pituitary GTH, *xenopus* pituitary hCG and PMSG were, respectively, 224.3, 96.0, 106.8, 2.7, 101.3 and 70.7 times more sensitive than *Xenopus*.

Rats injected with FSH, LH, ovine pituitary GTH, *xenopus* anterior pituitary hCG and PMSG were, respectively, 32.0, 8.0, 14.7, 0.4, 7.6, and 4.4 times more sensitive than *Xenopus*. With LH-RH, the dose required to induce ovulation in rats was 16 times larger than the dose required for mice, but a dose 5333 times larger than the dose administered the mice did not induce ovulation in *xenopus*. The ovipositing tests for *Xenopus* injected with 16 whole rat anterior pituitaries were voided because of the death of the frogs.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 70 - 77, 1994)

Introduction

Detailed species specific studies on the biological and chemical properties of pituitary hormones and the sensitivity of animals to hormones has mainly concentrated on the posterior pituitary hormones. The anterior pituitary gonadotrophins have also attracted the attention of researchers^{1,2,3}.

The dosages of the various gonadotrophins and LH-RH needed to induce ovulation have not been established for different types of animals. The ovulation activity of mice, rats, hamsters, rabbits, and cats has been compared by injection of hCG and PMSG^{4,5,6}.

In this study, mice, rats, and *Xenopus* were compared in regard to their sensitivity to ovulation induction by subcutaneous injection with porcine FSH, equine pituitary LH, ovine pituitary GTH, acetone dried rat anterior pituitary, acetone dried *xenopus* anterior pituitary, hCG, PMSG, and synthetic LH-RH.

Materials and Methods

1. Mice

IVCS strain mice from sibling matings were used. The mice were 70-100 days old, weighed 23-31g, and had established 4-day estrus cycles⁷.

a. Environment

Room temperature was kept at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and room humidity between 50-60% throughout the study. Fluorescent lighting was provided from 5 a.m. to 7 p.m. The CA-1 diet (CLEA Japan, Inc. Tokyo) was provided and water was given ad libitum. Weaned mice were maintained in aluminum cages with drop pans and metal mesh floors and wood wool was used for nesting.

b. Vaginal smear

Vaginal smears were taken daily in the afternoon. Comparisons were made with the rats in the various stages of estrus⁸⁾.

c. Administration of hormones

Gonadotrophins and synthetic LH-RH dissolved in 0.4ml of physiological saline solution were administered subcutaneously in separate doses between 4 and 5 p.m. during the diestrus stage of the estrus cycle. This day was determined for each mouse after observation of more than 2 regular 4-day estrus cycles.

d. Detection of eggs

Animals were autopsied 20 hours after injection. The fallopian tube containing ova was removed and placed with a drop of physiological saline between 2 glass slides. It was then observed under a binocular phase microscope at 100x magnification.

2. Rats

Selectively bred Wistar-Imamichi rats of the CSK closed colony were used. The rats were 90-120 days old and weighed 190-300 grams. The rats were used after the appearance of more than two regular estrus cycles of 4 days each.

The rats were housed in metal net cages and given the CE-2 diet (CLEA Japan, Inc., Tokyo) and water ad libitum. They were kept under much the same conditions as the mice.

3. *Xenopus laevis*

Xenopus laevis were obtained at one year old as parental stock from the Institute of Endocrinology of Gunma University, Maebashi. They had been maintained as a closed colony for many years. The *Xenopus laevis* used in this study were 1.5-2 years old and weighed 15-46g.

a. Environment

According to the method of Nobunaga (1986)⁹⁾ adult female *Xenopus* were kept in groups of 20-30 per plastic aquarium measuring $90 \times 70 \times 40$. The

aquariums were filled with well water and were located in a room kept at $20-26^\circ\text{C}$. They were given pellet chow for trout (Trout-fry No.1: Oreintalkobo, Inc., Tokyo). No males were present in the aquariums. Lighting was provided from 5 a.m. to 7 p.m.

b. Administration of hormones

The adult female *Xenopus* were put in individual aquarium and injected with 0.4 ml of hormone in physiological saline in the dorsal lymph sac.

c. 20 hours after injection the *Xenopus* were checked for oviposition in the single aquarium.

4. Gonadotrophins and LH-RH

a. 1.6AU/mg of Porcine FSH (Antrin, Toshiba Pharmaceutical Co. LTD, 5 armour unit ampule) was dissolved in sterilized physiological saline and kept in a bottle in the refrigerator.

The frozen FSH was thawed to room temperature 30 minutes before injection and adjusted to a volume of 0.4ml in physiological saline.

b. Equine LH (PLH, Armour-Baldwin Laboratories, Lots No. J14106 and J14211 equivalent to 2.1-2.6 mg armour standard per/mg) was weighed and dissolved in a sterilized physiological saline. The remaining treatment was the same as that for FSH.

c. Unfractionated ovine pituitary GTH (Ovine p-GTH; Vetrophin, Abbott Laboratories Argentina S.R.L. Combines FSH, LH, LTH in a natural balance. Lot No. 8691). 5 rat units were preserved per vial and diluted in the same way as for FSH.

d. Acetone dried rat pituitary (rat-p); Male Donryu strain rats (50-60 days old, weighing 150-230g) were killed with ether anaesthesia, the pituitaries removed and dried immediately with acetone. The pituitaries were pulverized by agate mortar and suspended with saline for doses of 0.4 ml.

e. Acetone dried *Xenopus* anterior pituitaries (*Xenopus*-p) were obtained from male *Xenopus* 1.5 years old, weighing 12-40g, using a microscope. They were preserved and diluted in the same way as the rat pituitaries.

f. hCG (T-2 preparation, Sankyozoki Co., Ltd. 4000IU Per/mg) was dissolved in sterilized physiological saline. It was preserved and diluted in the same way as the FSH.

g. PMSG (Serarmon Production, Lot No. 10148, Toshiba Pharmaceutical Co., Ltd. 1000IU per

ampule) was preserved and diluted in the same way as the FSH.

h. Synthetic porcine LH releasing hormone (LH-RH) synthesized by Okada and Murakomi, (Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) was based on the structure proposed by Matsuo et al. (1971)¹⁰⁾ and Baba et al. (1971)¹¹⁾.

Volume of the synthetic LH-RH solution of 80% or more purity (200 mg/ampule) was adjusted in physiological saline so that each dose assayed was 0.4 ml. It was preserved and diluted in the same way as the

FSH. 0.6% sodium chloride was used as the physiological saline for *Xenopus*.

5. ED50

The dosage expected to cause an effect in 50% of the animals was calculated using the Behrens-Karber method or the Van der Waerden method¹²⁾.

Results

1. Ovulatory response to gonadotrophins and LH-RH

Ovulatory responses to injection of FSH, LH,

Table 1 Ovulation in Mice, Rats and *Xenopus* with different preparations of GTH

dose	Porcine FSH (AU)										50% ovulation amount/ani. amount/kg	
	0.0063	0.0125	0.025	0.05	0.01	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	(AU)	(AU)
Mice	0/7 *(0)	5/7 (71)									0.0107	0.41
Rats			0/2 (0)	0/5 (0)	6/6 (100)	4/4 (100)					0.0750	0.26
<i>Xenopus</i>							0/3 (0)	0/2 (0)	0/4 (0)	4/4 (100)	2.4000	80.00
dose	Ovine pituitary LH (μg)											
	12.5	25.0	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	(μg)	(μg/kg)
Mice	0/5 (0)	1/2 (50)	2/2 (100)								25	926
Rats		0/1 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)					300	1056
<i>Xenopus</i>							0/1 (0)	0/4 (0)	4/4 (100)		2400	80000
dose	Ovine pituitary GTH (RU)											
	0.0039	0.0078	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1		(RU)	(RU/kg)
Mice	0/4 (0)	4/4 (100)	4/4 (100)								0.0059	0.227
Rats				1/5 (20)	5/5 (100)						0.0430	0.151
<i>Xenopus</i>						0/5 (0)	2/6 (33)	5/5 (100)			0.6300	21.000
dose	Rat anterior pituitary (Number)											
	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	8	16	(No.)	(No.)/kg
Mice	1/4 (25)	3/5 (60)	1/1 (100)								0.0268	1.03
Rats				0/3 (0)	2/3 (66)						0.2180	0.77
<i>Xenopus</i>									0/4 (0)	0/2 (death)		

* : Ovulating animals/Treated animals (%)

ovine-p, GTH and rat-p are shown in Table 1. Ovulatory responses to injection of Xenopus-p, hCG, PMSG and LH-RH are shown in Table 2. None of the 7 mice injected with 0.00625 AU of FSH ovulated, but with a dose of 0.0125 AU of FSH 5 of the 7 mice injected ovulated.

In the case of the rats, results are shown as number of ovulating animals per number of animals injected, as with the mice. The ovipositing tests for Xenopus injected with 16 whole anterior rat pituitaries were voided because of the deaths of the frogs used in the

tests.

In the Xenopus injected with 8 anterior rat pituitaries, death or oviposition induction were not observed; however, hypertrophy and congestion of the cloaca were seen. If the gonadotrophins had been refined rat anterior pituitaries, ovulation might have occurred. Besides, in the Xenopus injected with 4 acetone dried rat pituitaries, oviposition was not induced.

In response to a single injection of 200 mg LH-RH, oviposition, hypertrophy, and congestion of the cloaca were not observed.

Table 2 Ovulation in Mice, Rats and Xenopus induced with different preparations of GTH and LH-RH

	Xenopus anterior pituitary (Number)										50% ovulation amount (No.)	50% ovulation amount (No.)
dose	1.25	2.5	5		10		20					
Mice	0/5 *(0)	5/5 (100)									1.88	72
Rats			0/1 (0)		1/3 (33)		3/3 (100)				12.54	44
Xenopus		1/6 (17)	3/6 (50)		3/3 (100)						5.00	167
hCG												
dose	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	258	(IU)	(IU/kg)
Mice	0/9 (0)	10/11 (91)	3/3 (100)								0.77	30
Rats					1/11 (19)	12/15 (80)					10.30	36
Xenopus							0/7 (0)	4/11 (36)	10/10 (100)	4/4 (100)	78.00	2600
PMSG (IU)												
dose	2	4	8	16	32	64	128	256	512		(IU)	(IU/kg)
Mice	2/10 (20)	9/9 (100)	4/4 (100)								2.80	108
Rats					1/5 (20)	5/5 (100)					44.80	158
Xenopus						0/7 (0)	4/15 (27)	9/13 (69)	2/2 (100)		198.00	6600
Porcine LH-RH (μ g)												
dose	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	50	100	200		(μ g)	(μ g/kg)
Mice	0/4 (0)	4/4 (100)	2/2 (100)								0.038	1.44
Rats					0/5 (0)	5/5 (100)					0.600	2.11
Xenopus							0/2 (0)	0/3 (0)	0/2 (0)			

* : Ovulating animals/Treated animals (%)

Table 3 Comparison of ratios (Rats/Mice*, Xenopus/Mice** and Xenopus/Rats***) based on doses of respective hormones to induce 50% ovulation

preparations	Values from dose/ani.			Values from dose/kg		
	R: M*	X: M**	X: R***	R: M	X: M	X: R
Porcine FSH	7.0	224.3	32.0	0.6	195.1	307.7
Ovine LH	12.0	96.0	8.0	1.1	83.2	75.8
Ovine pitu. GTH	7.3	106.8	14.7	0.7	92.5	139.1
Rat anterior pitu.	8.1	-	-	0.7	-	-
Xenopus ante. pitu.	6.7	2.7	0.4	0.6	2.3	3.8
hCG	13.4	101.3	7.6	1.2	86.7	72.2
PMSG	16.0	70.7	4.4	1.5	61.1	41.8
Porcine LH-RH	16.0	-	-	1.5	-	-

Oviposition was not induced in *Xenopus* with 2-4 times of 50mg LH-RH subcutaneous injection at 2-hour intervals. Also, oviposition was not induced with 2 subcutaneous injections of 50 mg each at 24-hour intervals.

2. The hormone dosage required for induction of ovulation in 50% of assayed animals.

The hormone dosage required for induction of ovulation in 50% of the assayed animals is shown on the right side of Tables 1 and 2 to compare the effectiveness in mice, rats, and *Xenopus*. The results show that the dose required to induce ovulation was relative to average body weight (mice: 26g, rats: 284g, *Xenopus*: 30g) and this was added to Tables 1 and 2.

3. Comparison of ovulatory response of mice, rats and *Xenopus* to gonadotrophins and LH-RH.

Table 3 compares the ratios of rats/mice, *Xenopus*/mice and *Xenopus*/rats for the hormone doses necessary to induce ovulation in 50% of the animals.

Discussion

It has been reported by Burdick and Whitney (1941)¹³, Burdick et al. (1943)¹⁴, and Burdick et al. (1953)¹⁵ that in mice ovulation can be induced with a single injection of gonadotrophin and that this reaction can be used for assay of pituitary gonadotrophin, PMSG and hCG.

Mice (IVCS strain) with regular 4-day estrus cycles have been established by selective breeding⁷. For this reason, 4-day cycle mice can be used along with 4-day cycle rats in an ovulation-induction assay of gonadotrophins¹⁶.

The method for an ovulation-induction assay, inspecting ova in the oviduct 20 hrs after subcutaneous injection of gonadotrophins at 4 to 7 p.m. on the day of diestrus in the adult 4-day cycle rat, was reported by Burdick et al. (1943)¹⁴ and Eto and Imamichi (1955)¹⁷. The ovulatory responses of rats to various gonadotrophins were compared using this method.

The discovery that pituitary extracts cause oviposition in *Xenopus* is attributed to Hogben et al. (1931)¹⁸. A test for the early diagnosis of human pregnancy using *Xenopus* was described and the conditions for quantitative gonadotrophin assays in *Xenopus* were established as a standard procedure for measurement of the hormone in human pregnancy diagnosis^{19,20}.

It is known that ovulation can be induced in animals with the injection of gonadotrophin, but that sensitivity is related to the type of gonadotrophin and the kind of animal injected^{4,5,6,21,22,23}. Comparison is difficult however, because of difficulties in determining the units for standardizing the gonadotrophin activities. For example, even if the gonadotrophins used are of a fixed structural formula and molecular weight, physiological sensitivity may differ according to sample lot and origin of the gonadotrophin. It is therefore difficult to know what type of response is the best indicator of sensitivity.

In this study, species and gonadotrophic hormones were compared to find differences in sensitivity. When injected with FSH, ovine LH, ovine p-GTH, rat pituitary, *Xenopus* pituitary, hCG, PMSG and LH-RH

mice were 7.0, 12.0, 7.3, 8.1, 6.7, 13.4, 16.0, and 16.0 times more sensitive than rats. However, the ratios of mice and rats by 50% ovulation induced with respective FSH, ovine p-GTH, rat pituitary and *Xenopus* pituitary showed smaller amount than the other hormones.

Mice injected with FSH, LH, ovine p-GTH, *xenopus* pituitary, hCG and PMSG were 224.3, 96.0, 106.8, 2.7, 101.3, and 70.7 times more sensitive than *Xenopus*. However, the ovulation response in mice for *Xenopus*-p was only 2.7 times greater than for *Xenopus* and required a far smaller amount for ovulation than was required for FSH, LH, ovine p-GTH, hCG, and PMSG. Rat pituitary and LH-RH was not observed to induce ovulation in *Xenopus*.

When rats and *Xenopus* were compared for their sensitivity, the rat ovulating response to LH, hCG, and PMSG was 8.0, 7.6, and 4.4 times greater than the *Xenopus* response and the rat response to FSH and ovine p-GTH was 32.0 times and 14.7 times greater than for *Xenopus*.

When the ovulation response ratio to FSH, LH, p-GTH, hCG, and PMSG of *Xenopus*/rats is compared with the ovulation response ratio of *Xenopus*/mice there is not a great difference. However, the rat ovulation response to *Xenopus*-p was 0.4 times less than the *Xenopus* response to injection of its own pituitary hormone.

Parker et al. (1947)²⁰⁾ reported that a stable commercial extract of sheep anterior pituitary is the most satisfactory source for inducing oviposition. However, they do not compare results obtained from gonadotrophins and those from other origins. In our study we found that sensitivity of *Xenopus* to ovine p-GTH was the same as the mice/rat sensitivity to hCG.

The rat response to synthetic porcine LH-RH was 16 times greater than that in mice. *Xenopus*, on the other hand, was not induced to ovulate with a doses of synthetic porcine LH-RH 5333 times larger than those administered to the mice and 333 times greater than those administered to the rats. With acetone dried hypothalamus of 8 adult male *Xenopus*, the two female *Xenopus* injected did not ovulate but when acetone dried hypothalamus of 16 male *Xenopus* was injected, one of two female *Xenopus* ovulated and when acetone dried hypothalamus of 32 male *Xeno-*

pus was injected, both females ovulated. Accordingly, if there is no contamination of gonadotrophic responding matter (this was not checked in this study) the difference in the releasing factor of *Xenopus* pituitary gonadotrophins to induce oviposition may be related to chemical structure^{1,24)}.

The above mentioned hormone dose per animal necessary to induce ovulation in 50% of treated animals was determined by rough estimate of dose per kg of mean body weight. When compared with dose per kg of hormone to induce ovulation in 50% of treated animals, the sensitivity of rats to PMSG and LH-RH was 1.5 times that of mice and for other gonadotrophins it was 0.6 to 1.2 times that of mice. *Xenopus* showed much less sensitivity, except with *Xenopus*-p, where *Xenopus* showed a sensitivity 2.3 times greater than mice, and 3.8 times greater than rats.

This study was carried out in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation of Tohoku University and Tohoku University School of Medicine.

Acknowledgments

We are pleased to acknowledge the considerable assistance of Dr. Michio, T. Okamoto (Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., LTD. Tokyo).

Reference

- 1) Ishii S, The specific characterization and molecular structure of Hormones. *The Heredity* 26 (8) : 69, 1972
- 2) Tanaka S and Takikawa H, Amphibian and reptilian gonadotrophin biological activity. *Gunma Symposia on Endocrinology* 21: 37, 1984
- 3) Wakabayashi K, Hattori MT, Sakamoto K, et al., Mammalian gonadotrophins polymorphism, Biosynthesis and release. *Gunma Symposia on Endocrinology* 21: 93, 1984
- 4) Nobunaga T and Imamichi T, Effect of route of administration (subcutaneous, intraperitoneal and intravenous.) on induced ovulation by gonadotrophins. II. Results of induced ovulation by hCG in adult Mice, rat and rabbits. *The Japanese of Journal Animal Reproduction* 9 (1) : 25, 1963
- 5) Nobunaga T and Takahashi KW, Effect of route of administration (subcutaneous, intraperitoneal and intravenous) on induced ovulation by gonado-

- trophins. V. Results of induced ovulation in the IV CS strain mice and Wistar-Imamichi strain rats by PMSG. The Japanese of Journal Animal Reproduction 13 (3) : 85, 1967
- 6) Nobunaga T and Sugiyama O, Comparison of the ovulatory response in mice, rats and rabbits induced by the gonadotrophins and synthetic LH-RH. Japanese Journal Fertil Steril 21 (2) : 35, 1976
 - 7) Nobunaga T, Takahashi KW and Okamoto MT, Establishment of the IV CS strain mouse; showing a regular four-day estrous cycle. Experimental Animals Supplement 22: 277, 1973
 - 8) Nobunaga T and Nakamura K, Fundamental study on the physiology of estrous cycle in the Wistar-Imamichi rat. I. Cyclic change of vaginal smear observed continuously at intervals of 3 hours. The Japanese of Journal Animal Reproduction 14 (1) : 1, 1968
 - 9) Nobunaga T, Changes of the rearing method in *Xenopus laevis*. The Journal of Experimental Animals Technology 15 (2) : 128, 1980
 - 10) Matsuo H, Arimura A, Nair RMG, et al., Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid-phase method. Biochemical and Biophysical Research Communications 45 (1) : 822, 1971
 - 11) Baba Y, Matsuo H and Schally AV, Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. Biochemical and Biophysical Research Communications 44 (1) : 459, 1971
 - 12) Yamaguchi T, Katsuyama M, Suzuki W. Comparison of the amounts of hCG and PMSG to induce ovulation in 50% of the animals: Mice, Syrian, Hamsters and rats. Experimental Animals 42 (2) : 153, 1992
 - 13) Burdick HO, Whitney R, Ovulation induced in mice by single injections of follutein or untreated Human pregnancy urine. American Journal of physiology 132: 405, 1941
 - 14) Burdick HO, Watson R, Ciampa V, et al., A rapid test for pregnancy gonadotropins on the basis of induced ovulation in mice. Endocrinology 33: 1, 1943
 - 15) Burdick HO, Rouse CA and Coats MJ, A basis for comparing the potency of gonadotrophins. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 82: 43, 1952
 - 16) Nobunaga T, Nakamura K and Hosoya T, Effect of route of administration (subcutaneous intraperitoneal and intravenous) on induced ovulation by gonadotrophins. IV. Results of induced ovulation by hCG in inbred adult mice having regular 4 days estrous cycle. The Japanese of Journal Animal Reproduction 11 (1): 16, 1965
 - 17) Eto T and Imamichi T, On the induction of ovulation in mice and rats by the single subcutaneous injection of Human chorionic gonadotrophin. Endocrinologia Japonica 2 (2) : 149, 1955
 - 18) Hogben L, Charles E and Slome D, Studies on the pituitary gland to calcium metabolism and ovarian function in *Xenopus*. Journal of Experimental Biology 8: 345, London, 1931
 - 19) Paul HF, Fried MD and Rakoff AE, Inadequacy of frog pregnancy test. Obstetrics and Gynecology 6: 12, 1955
 - 20) Elkan E, *Xenopus laevis* daudin. UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, Second edition p804, Published by UFAW (The Universities Federation for Animal Welfare) 1957
 - 21) Parker FJR, Robbins SL and Loveridge A, Breeding, rearing and care of the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). American Nature 81: 38, 1947
 - 22) Imamichi T and Miura T, Studies on the gonadotrophins activities of unfractionated sheep pituitary gonadotrophins (Vetrophin), II comparison of ovulation inducing activities of vetrophin and hCG. The Japanese of Journal Animal Reproduction 8 (4) : 127, 1963
 - 23) Nobunaga T, Takahashi KW and Imamichi T, Studies on the ovulatory response of Japanese Cats (*Felis catus*) with gonadotrophins. The Japanese of Journal Animal Reproduction 22 (3) : 89, 1976
 - 24) Yoshida T and Ishii S, Gonadotrophins II. physical and chemical properties. Zoological Magazine 82: 79, 1973

**各種Gonadotrophin および
合成LH-RHの排卵誘起力を指標にした
マウス、ラット、アフリカツメガエル間の
鋭敏度の比較**

東北大学医学部附属動物実験施設

信永利馬 郭 秀麗

群馬大学内分泌研究所

井上 栄

各種Gonadotrophin および合成ブタ LH-RH (synthetic porcine LH releasing hormone) の皮下投与 (dose/animal)

による排卵誘起反応を指標にして、マウス、ラット、およびアフリカツメガエルの反応の鋭敏度について比較検討した。50%のラットに排卵を誘起させるのに必要なホルモン量とマウスのそれを比較するとFSH, Ovine pituitary GTH, Rat pituitary, Xenopus pituitaryではそれぞれ7.0, 7.3, 8.1, 6.7倍ラットの方が多く必要であった。

これに対してLH, hCG, PMSG, LH-RHではマウスよりラットの方がさらにそれぞれ12.0, 13.4, 16.0,

16.0倍多く必要であった。アフリカツメガエルの排卵に必要なFSH, LH, Ovine pituitary GTH, Xenopus pituitary, hCG, PMSG量はそれぞれマウスの224.3, 96.0, 106.8, 2.7, 101.3, 70.7倍であり、ラットを基準にしてそれぞれ32.0, 8.0, 14.7, 0.4, 7.6, 4.4倍多く必要であった。合成ブタLH-RHではラットはマウスの16倍の量で排卵誘起を認めたが本実験での200 μ gの投与量ではアフリカツメガエルに排卵誘起を認めなかった。

(受付：1993年7月23日)

(受理：1993年10月7日)

子宮内膜症患者における腹水量および性状の検討

Analysis of Peritoneal Fluid in Women with Endometriosis

熊本大学医学部産科婦人科学教室

西村 弘
Hiroshi NISHIMURA
田中 信幸
Nobuyuki TANAKA

松浦 講平
Kohei MATSUURA
河野 哲郎
Tetsuro KAWANO
岡村 均
Hitoshi OKAMURA

本田 律生
Ritsuo HONDA
楊 桂雲
Keiun YO

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

子宮内膜症患者における腹水量およびその性状(血性・非血性)を明らかにする目的で、子宮内膜症(以下E群)171例の臨床進行期別ならびに各月経周期別の腹水につき検討した。子宮内膜症のない212例を少なくとも一側の卵管は疎通している176例(Non E群)と両側とも閉塞している36例(TO群)の2群に分けてこれをコントロール群とした。その結果、Non E群では18日目以降の腹水量が、1～7日目と8～14日目と比較して有意に多かった($P<0.05$)が、E群とTO群では月経周期による腹水量の変動はなかった。E群の腹水量(15.3 ± 16.6 ml)は、Non E群(9.2 ± 18.9 ml)とTO群(7.5 ± 9.2 ml)に比較して有意に多く($P<0.01$)、さらにE群の血性頻度(55.6%)は、Non E群(30.7%)とTO群(22.0%)に比べて有意に高かった($P<0.01$)。E群Ⅳ期の腹水量は、他の3期と比べて有意に少なく($P<0.05$)、血性腹水頻度もⅠ期とⅡ期と比べて有意に低かった($P<0.05$)。血性あるいは非血性別に腹水量を比較してみると、Non E群の15～17日目を除くすべての群のすべての時期において、血性の場合に腹水量が有意に多かった($P<0.05$)。すなわち、子宮内膜症Ⅰ期からⅢ期までの患者では腹水量が増加し、血性腹水の頻度も高いが、Ⅳ期患者では腹水量が減少し、かつ血性腹水の頻度も低いことが明らかとなった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 78 - 83, 1994)

緒 言

軽症子宮内膜症の不妊原因として腹水因子の解析が進められている^{1,2,3)}が、これは卵管采による排出卵のピックアップや卵管内環境に腹水が関与している可能性が十分考えられるからであり、また、临床上、子宮内膜症合併不妊患者や機能性不妊患者に対して腹腔鏡検査を行った際に、腹水吸引や卵管通水を行うと比較的早い時期に自然妊娠が成立する例があることも動機の一つであろう。女性の腹腔は性管を通して外界と交通し、月経血の逆流も含めて刺激を受け易い環境にある。さらに、機能的および形態的にも一連の劇的な周期的変化を起こす卵巣が存在

し、これが腹水の産生維持に積極的に関与しているものと考えられている。

子宮内膜症の組織発生を論じる上で、血性腹水の存在が、月経血の経卵管逆流に引き続く子宮内膜組織の着床説の有力な論拠とされてきた。日常不妊診療で腹腔鏡検査を行い、多数例の骨盤腔を観察してみると子宮内膜症の有無や周期に関係なく血性腹水の存在を経験することが多いことに気づくが、その機序についての明確な説明はなされていない。

正常周期婦人の腹水量は、月経期から排卵期にかけて増加し、黄体期でピークに達するパターンを報告しているものもある^{4,5,6)}が、この周期性を認めない報告もある^{7,8)}。子宮内膜症患者の腹水量に関する

報告でも同様の検討は行なわれているものの、同時に腹水の性状を検討した報告はない。

そこで、本邦における子宮内膜症患者における腹水量およびその性状を明らかにする目的で、当科において最近の6年半に経験した子宮内膜症症例171例をretrospectiveに検討したので報告する。

研究対象および方法

対象は、昭和60年1月より平成3年6月までの6年6カ月の間に当科において腹腔鏡検査あるいは開腹手術を施行し、月経周期が明確である子宮内膜症(以下E群)171例で、その臨床進行期(Revised-AFS分類)は、I期が83例、以下、II期が40例、III期が29例、IV期が19例である。同期間に腹腔鏡検査を行なった非子宮内膜症212例をコントロールとして、これらを少なくとも一例の卵管は疎通している176例(Non E群)と両側卵管が閉塞している36例(TO群)の2群に分けて検討した。なお悪性疾患や活動性炎症性疾患を合併した症例は本研究から除外した。

腹水の採取方法は、ほとんど腹腔鏡検査時に行ったが、気腹(CO₂)後に軽い骨盤高位と第2穿刺を行い、ただちに膀胱子宮窩とダグラス窩の貯留液をすべて吸引した。穿刺部からの血液混入例は対象から除外した。開腹術の場合は、腹膜切開までの止血を完全に行い、腹膜切開時の血液混入のない状態で、骨盤高位で腸管を頭側へ圧排した後に、骨盤内貯留液をサーフロ針の外套で吸引した。吸引液はただちにその量を測定し、性状は肉眼的に判断し淡血性から暗赤色、さらに純血性か、あるいは黄色から褐色のいずれかに分け他の骨盤内観察所見と共に当科で用いている専用チャートに記録して保存した。今回の検討はこの記録をもとに行なったが、性状は前者を血性、後者を非血性に分類した。

各群間の腹水量の有意差検定にはMann-Whitney検定を、各群間の血性腹水頻度の検定には χ^2 検定を用いた。

研究成績

1. 腹水の量と性状(表1, 2)

腹水採取法、すなわち腹腔鏡検査時と開腹手術時による採取した腹水の量・性状に差はみられなかった。

E群の腹水量(15.3±16.6ml, 平均値±標準偏差)は、Non E群とTO群の2群と比べて有意に多く(P<0.01)(表1)、さらに血性腹水の頻度(55.6%)も有意に高かった(P<0.01)(表2)。Non E群とTO群の間に

表1 腹水量(ml)

E群：子宮内膜症例
Non E群：卵管疎通性のある非子宮内膜症例
TO群：卵管が閉塞している非子宮内膜症例

mean ± S.D.		
E群	(n=171)	15.3 ± 16.6
Non E群	(n=176)	9.2 ± 18.9
TO群	(n=36)	7.5 ± 9.2

*: P<0.01

表2 腹水の性状

E群：子宮内膜症例

Non E群：卵管疎通性のある非子宮内膜症例

TO群：卵管が閉塞している非子宮内膜症例

	血性	非血性	血性腹水頻度 (%)
E群 (n=171)	95	76	55.6*
Non E群 (n=176)	54	122	30.7
TO群 (n=36)	8	28	22.0

*: P<0.01

は腹水量ならびに血性腹水の頻度に有意差はなかった。

2. 月経周期からみた腹水量およびその性状

月経周期を1から7日目、以下8から14日目、15から17日目、18日目以降の4期に分けてみた腹水量を図1、性状別の腹水量を図2、E群とNon E群の2群における各周期別の血性腹水頻度を表3、4に示した。

1) E群(図1, 表3)

月経周期からみた腹水量には有意の変化はみられず(図1)、各周期間における血性腹水の頻度にも有意差はなかった(表3)。しかし、血性と非血性に分けてその腹水量を月経周期別にみると、いずれの周期においても血性腹水の場合が有意に多く(P<0.05)、特に15～17日目でみると、血性の腹水量が29.0±28.0 ml、非血性の6.2±10.2 mlと著明な差がみられた

表3 月経周期別にみた腹水性状
(子宮内膜症群)

月経周期(日目)	血性	非血性	血性腹水頻度(%)
1～7	19	10	65.5
8～14	29	17	63.0
15～17	10	9	52.6
18～	37	40	48.1

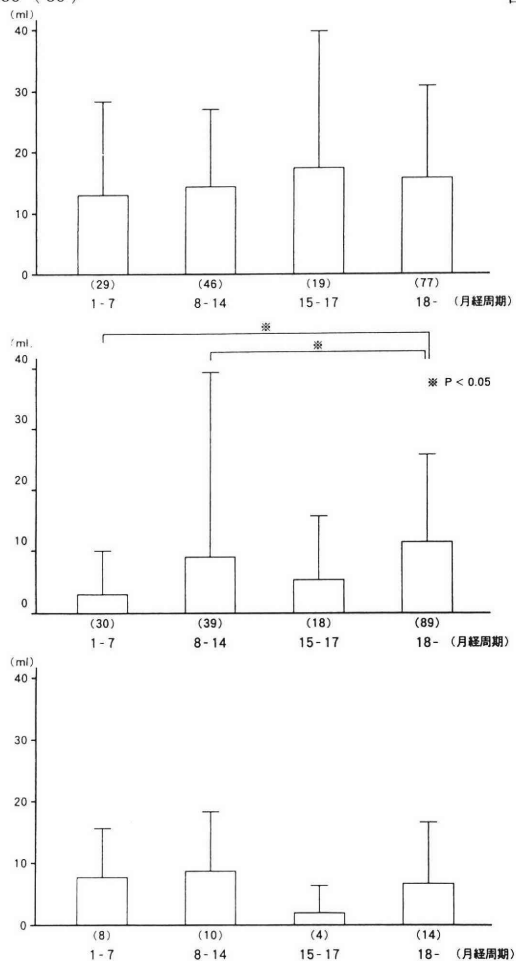


図1 月経周期別腹水量

上段は子宮内膜症群, 中段は非子宮内膜症群下段は卵管閉塞群の結果を示す。()内は症例数を示す

($P<0.05$) (図2).

2) Non E群 (図1, 表4)

18日目以降の腹水量 (11.8 ± 15.0 ml) は, 1~7日目 (4.5 ± 7.4 ml) と 8~14日目 (9.3 ± 29.1 ml) と比べ有意に多かった ($P<0.05$, 図1). 血性腹水の頻度を月経周期別に比較した結果では有意の変化はみられなかった (表4). 血性・非血性に分けて, その腹水量を月経周期別にみると 15~17日目では差はなかったが, 他の三つの各月経周期においては血性腹水の場合の量は, 非血性の場合と比べると有意に多かった ($P<0.05$) (図2).

3) TO群

月経周期による腹水量には有意な変化はなかった.

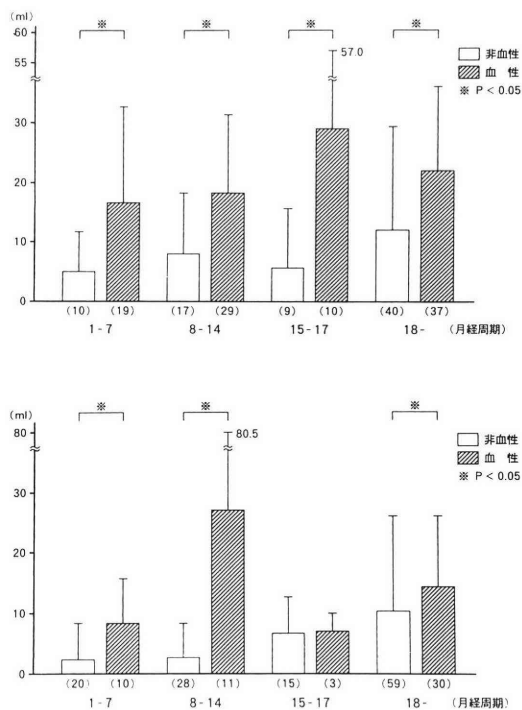


図2 月経周期別にみた腹水性状とその量
上段は子宮内膜症群, 下段は非子宮内膜症群

表4 月経周期別にみた腹水性状
(非子宮内膜症群)

月経周期(日目)	血性	非血性	血性腹水頻度(%)
1 ~ 7	10	20	33.3
8 ~ 14	11	28	28.2
15 ~ 17	3	15	16.7
18 ~	30	59	33.7

3. E群の臨床進行期別および性状別にみた腹水量 (図3)

子宮内膜症Ⅰ期からⅢ期までの症例の腹水量には有意差はなかったが, Ⅳ期症例の腹水量は 4.4 ± 7.5 ml と他の3期と比べると有意に少なかった ($P<0.05$). さらに血性・非血性に分けてその腹水量を臨床進行期別にみると, いずれの進行期においても血性の場合に腹水量が有意に多かったが ($P<0.05$), Ⅳ期症例の血性腹水頻度は19例中6例 (31.6%) と, Ⅰ期とⅡ期症例と比較して有意に低かった ($P<0.05$, 表5).

考 察

本邦でも, ここ数年不妊症を含む婦人科疾患に腹腔鏡検査が積極的に導入され, 骨盤内の観察あるい

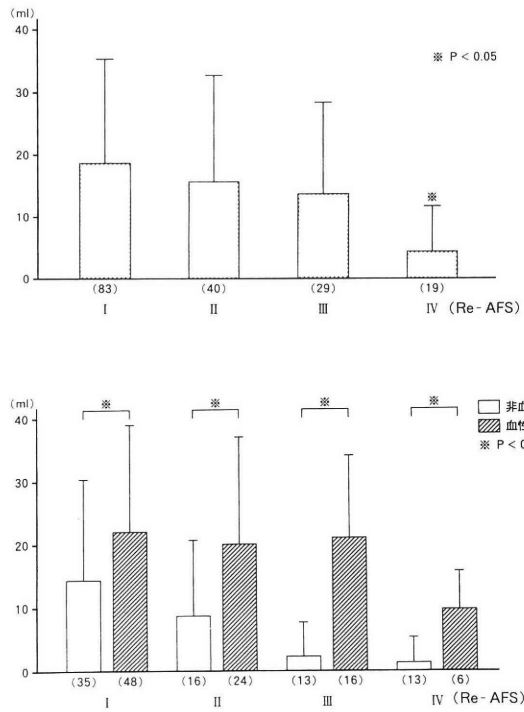


図3 子宮内膜症群における臨床進行期別にみた腹水量と性状別の腹水量

上段は腹水量，下段は腹水性状別にみた腹水量を示す

表5 子宮内膜症群の臨床進行期別腹水性状

Re-AFS	血性 (例数)	非血性 (例数)	血性腹水頻度 (%)
I	48	35	57.8%
II	24	16	60.0%
III	16	13	55.2%
IV	6	13	31.6%

* : P<0.05

は処置を行なう機会が多くなってきた。女性骨盤内における腹水の存在は、精子や卵の輸送、さらに、初期の受精卵の分割にも重要な役割をはたしていると考えられており^{2,3)}、骨盤腔内環境の一つとして腹水性状の異常を明らかにしていくことは意義深いものと考えられる。不妊婦人では高頻度に子宮内膜症を合併することから、腹水中の妊娠成立阻害因子を同定する方向で研究が進められている。われわれも腹水中のマクロファージに注目し、その総数と活性化の指標としてペルオキシダーゼ活性の局在を電顕的に観察して検討してきたが、子宮内膜症患者ではマクロファージ総数が有意に増加し、さらに活性型

である浸出型マクロファージの割合が多いことを報告している⁹⁾。

今回の検討では、子宮内膜症症例では非子宮内膜症症例と比べて腹水量が有意に多かった。Moen et al.¹⁰⁾は、子宮内膜症患者の腹水量は17.5 mlとわれわれの結果とはほぼ同じ値を示し、ダナゾール治療により10.5 mlへと有意の減少がみられたと報告している。このことは子宮内膜症でみられる腹水量の増加が、病変の存在と密接に関連するものか、あるいは単に薬物療法による卵巣機能の抑制による腹水産生量の減少ないしは無月経による経卵管逆流の消失のいずれかに起因するものと推察される。月経周期における腹水量の変動を分析してみると、非子宮内膜症婦人では卵胞期の初期から後期にかけて増加し、黄体期ではさらに増加していた。この結果は、Maathuis et al.⁸⁾、Koninckx et al.¹¹⁾の報告と一致している。この月経周期にともなう腹水量とその性状の変動には、主に月経血の逆流と卵胞破裂時に伴う出血が関与しているものと考えられる。しかし、子宮内膜症症例では月経周期にともなう変動がみられなかった。これには血色素を初めとする腹膜の吸収機構の破綻や卵巣周囲癒着などによる卵胞破裂障害が関連しているものと考えられる。

腹水の維持は、産生と吸収という動的な平衡関係により行なわれていると考えられている。経口避妊薬服用婦人や閉経後婦人、あるいは男性では腹水の量が有意に少ないことから⁸⁾、腹水産生に関しては機能的な卵巣の存在が重要な意義を有している⁸⁾ことには異論はなからう。腹水の動的な変動に関与しているもう一つの因子として、卵管からの分泌液も考えられる。しかし、非子宮内膜症例に限っていえば、卵管閉塞の有無による腹水量に差がなかったことから、卵管分泌液の関与は少ないものと考えられる^{8,11)}。腹膜の吸収能について検討した研究はなく、今後、子宮内膜症例において明らかにしていくべき重要な課題の一つと考えられるが、現時点では腹水の維持機構が破綻しているものとするのが妥当と思われる。

子宮内膜症発生において月経血の経卵管逆流に基づくSampsonの移植説を支持する根拠の一つとして、月経期における血性腹水の存在が挙げられてきたが、今回の検討では血性腹水の存在は、必ずしも月経周期の初期に限られたものではなく、また子宮内膜症例での血性腹水の頻度は55.6%と有意に高いものの、非子宮内膜症例においても30.7%の頻度で血性腹水がみられた。さらに卵管閉塞例でも22%の頻

度で血性腹水がみられたことから、血性腹水をすべて月経期の月経血逆流によって説明することはできないことが示唆される。

排卵時の卵胞破裂に伴う腹腔内への出血も腹水が血性になる原因とも考えられるが、子宮内膜症ならびに非子宮内膜症例の両者とも、排卵直後における血性腹水の頻度に差はみられなかった。

さらに、子宮内膜症病変部からの出血も考慮に入れる必要があるが、腹腔鏡検査時に漿膜表面からの出血が観察される例をわれわれは経験しておらず、特に卵巣病変を持たない軽症例では血性腹水の原因を病変部からの出血に求めるのは困難であろう。病理組織学的にみても卵巣を除けば病変の間質に出血をみることは稀であり、血管の破綻を証明できる例に至っては皆無といって良いであろう。腹水中のマクロファージの総数ならびにその活性化⁹⁾、さらに腹水のインターロイキン1, 5, 6のレベル(投稿中)は腹水が血性であることと相関がみられなかった。

子宮内膜症患者をその臨床進行期別に分けて腹水量ならびに性状を検討してみると、Ⅳ期の症例ではⅠ期からⅢ期の症例と比較して腹水量は有意に少なく、血性腹水の頻度も19例中6例と有意に低かった。子宮内膜症Ⅳ期症例においては広範な卵巣表面の癒着や卵巣チョコレート嚢胞によって卵巣表面からの浸出液量がかなり減少しており、この減少程度が漿膜病変による腹水産生・吸収機構の障害による腹水の増量効果を上回った結果、Ⅳ期症例では腹水量が減少しているものと考えられる。

未解決な問題の多い子宮内膜症において、今後、子宮内膜症と不妊との因果関係を明らかにしていく上で、この腹水の量と性状の異常も今後解明すべき点であると考えられる。

文 献

- 1) Drake TS, Metz SA, Grunert GM, et al., Peritoneal fluid volume in endometriosis. *Fertil Steril* 34: 280, 1980
- 2) Schenken RS, Endometriosis, Contemporary Concepts. In: *Clinical Management*. Lippencott, 1989
- 3) Syrop CH and Halme J, A comparison of peritoneal fluid parameters of infertile patients and the subsequent occurrence of pregnancy. *Fertil Steril* 46: 631, 1986
- 4) Badawy SZA, Marshall L and Cuenca V, Peritoneal fluid prostaglandins in various stage of the menstrual cycle: Role in infertile patients with endometriosis. *Int J Fertil* 30: 48, 1985

- 5) Chacho KJ, Stronkowski-Chacho M, Andressen PJ, et al., Peritoneal fluid in patients with and without endometriosis: Prostanoid and macrophages and their effect on the spermatozoa penetration assay. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1290, 1986
- 6) De Leon FD, Vijayankumar R, Brown M, et al., Peritoneal fluid volume, estrogen, progesterone, prostaglandin and epidermal growth factor concentrations in patients with and without endometriosis. *Obstet Gynecol* 68: 189, 1986
- 7) Crain JL and Luciano AA, Peritoneal fluid evaluation in infertility. *Obstet Gynecol* 61: 159, 1983
- 8) Maathuis JB, Van Look PFA and Michie EA, Changes in volume, total protein and steroid concentrations of peritoneal fluid throughout the human menstrual cycle. *J Endocri* 76: 123, 1978
- 9) 福松之敦, 片渕秀隆, 宮村伸一 他, 子宮内膜症患者における腹腔内活性化マクロファージの検討—内因性peroxidaseおよびinterleukin-1の細胞内局在を指標として—. *日産婦誌* 44: 529, 1992
- 10) Moen MH, Hagen B and Onsrud M, CA 125 in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Human Reproduction* 6: 1400, 1991
- 11) Koninckx PR, Renaer M and Brosens IA, Origin of peritoneal fluid in women: An ovarian exudation product. *Br J Obstet Gynecol* 87: 177, 1980

Analysis of peritoneal fluid in women with endometriosis

Hiroshi Nishimura, Kohei Matsuura
Ritsuo Honda, Nobuyuki Tanaka
Tetsuro Kawano, Keiun Yo
and Hitoshi Okamura

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

To elucidate the peritoneal environment of patients with endometriosis, peritoneal fluid (PF) aspirated during laparoscopy or laparotomy was evaluated in 171 patients with endometriosis (E group). One hundred seventy-six patients without endometriosis and tubal pathology (Non-E group) and 36 of bilateral tubal obstructions without endometriosis (TO group) were also analyzed as control. E group included 83 at stage I, 40 at stage II, 29 at stage III and 19 at stage IV. PF contaminated by peripheral blood or from patients with active inflammatory diseases and malignancies were excluded from this

study. The results were as follows.

1) In the Non-E group, the volume of PF in the luteal phase was significantly increased, compared to the follicular phase ($P<0.05$). In both of the E and TO group, however, there was no change in PF volume among their menstrual cycle.

2) The volume of PF in the E group (15.3 ± 16.6 ml, mean \pm SD) was significantly increased, compared to the Non-E group (9.2 ± 18.8 ml) and TO group (7.5 ± 9.2 ml) ($P<0.05$). The incidence of bloody PF in the E group (55.6%) was significantly higher than the Non-E group (30.7%) and TO group (22%) ($P<0.01$).

3) Patients with endometriosis at stage IV revealed a significantly smaller PF volume and lower incidence of bloody PF compared with patients at other stages ($P<0.05$) and stage I, II, respectively.

4) In all phases of all groups examined, the volume of bloody PF was significantly larger than the non-bloody fluid ($P<0.05$), except for the periovulatory phase.

Conclusion ; These results suggest a disturbed PF equilibrium of production and resorption in the patients with endometriosis.

(受付：1993年 1月11日)

(受理：1993年10月12日)

MORPHOLOGICAL STUDIES ON BLASTOMERE BINDING IN ANTI-CADHERIN ANTIBODY-TREATED MOUSE EMBRYOS

Ikuko YOTSUTANI

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

Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

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

Abstract: Cultured in Whittingham medium containing the anti-cadherin antibody, 2-cell mouse embryos stopped their development after reaching the 16- or 32-cell stage; that is, flattening of their outer blastomeres and compaction of the embryos did not occur at the 8- or 16-cell stage, and resulted in the failure of blastocyst formation. Ultrastructural observation of such embryos did not show the construction of junctional complexes of any type. Actin fluorescence in such embryos remained stronger in the peripheral cytoplasm of blastomeres even at these stages, and cytokeratin fluorescence, spread throughout the cytoplasm of the blastomeres, remained granular in shape. These findings showed a distinct difference in the intensity, shape and/or localization of the fluorescence from those found in the embryos developed in an antibody-free medium (control), suggesting that cytoskeletal filaments associated with the formation of zonula adherens and desmosomes were not mobilized for blastocyst formation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 84 - 89, 1994)

Introduction

In mouse embryos during blastocyst formation, outer blastomeres become flattened at the 8- or 16-cell stage, and then compaction occurs after all the blastomeres have adhered to each other¹⁻³⁾. It is evident that the following phenomena are indispensable in the onset of compaction of embryos; the appearance of Lewis X (Le^x) epitope^{4,5)} and the activation both of E-cadherin⁶⁾ on the cell surface of blastomeres and of cytoskeletal filaments in the cytoplasm⁷⁻¹⁰⁾. Richa and Solter¹¹⁾ and Yotsutani et al.¹²⁾ reported on the role of Le^x epitope in the compaction of mouse embryos, saying that in the embryos cultured in a medium containing anti-Le^x antibody, flattening of the outer blastomeres occurred^{11,12)}, while activation of actin filaments in the cytoplasm of blastomeres and the construction of junctional complexes between pairs of blastomeres did not¹²⁾. It is therefore under-

stood that the Le^x epitope has no relation to blastomere transformation, though it does the activation of cytoskeletal filaments and the construction of junctional complexes.

Cadherin, one of the cell-to-cell adhesion molecules on the cell surface, participates in cell-to-cell recognition which in turn leads to organ formation¹³⁻¹⁵⁾. In mice, E-cadherin (uvomorulin) is always present on the cell surface of their eggs and embryos, but its location changes when the embryos have induced compaction^{6,16)}. Cultured in a medium containing anti-cadherin antibody, then, uncompacted 8- or 16-cell mouse embryos continue to cleave up to 16- or 32-cell embryos, but compaction never occurs^{6,17)}, and when compacted 8- or 16-cell embryos are cultured in such a medium, decompaction occurs¹⁸⁻²⁰⁾. From these findings, it is evident that in mouse embryos cadherin plays an important role in the onset and propulsion of compaction. Since junctional com-

plexes such as zonula adherens and desmosomes appear in blastocysts, some changes in actin and cytokeratin participating in the construction of such junctional complexes should occur beforehand. In all of the former investigations, however, there has been no description on the role of cadherin in mouse embryos, with special reference to changes in the location of cytoskeletal filaments or to the construction of junctional complexes.

The present investigation used 8- to 32-cell mouse embryos cultured in a medium containing anti-cadherin antibody, and applied light microscopic observation to examine the transformation of outer blastomeres, electron microscopic observation to see the construction of junctional complexes, and histochemical observation to locate actin and cytokeratin filaments in these embryos.

Materials and Methods

Eighty female mice of the ICR strain were kept and fed normally in a room at 24 °C, lit 14 hrs a day from 4 a.m. till 6 p.m. Superovulated with 5 IU PMSG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan) and with 5 IU hCG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) 48 hrs later, they were mated with ICR males of proven fertility.

In order to examine the influence of anti-cadherin antibody on in vitro development of mouse embryos, 2-cell embryos were collected from the oviducts 48 hrs after hCG injection, and their zonae pellucidae were removed with pronase (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.). The embryos thus treated were cultured, at 37 °C for 40 hrs, in 40 μ l Whittingham medium²¹⁾ containing 1 ng anti-cadherin antibody (ECCD-1, Takara Biochemicals, Kyoto, Japan) placed in a CO₂ incubator (5 % CO₂, 95 % air). As for the controls, a few 2-cell embryos were cultured in Whittingham medium devoid of the antibody at 37 °C for 40 hrs. The embryos observed were at the 8- to 32-cell stages.

About a third of the embryos portioned mainly for electron microscopic observation were fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 4 % glutaraldehyde and 2 % paraformaldehyde at 4 °C for 3 hrs, rinsed 3 times in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) over night, post-fixed in a 0.1 M

cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 1 % osmium tetroxide at 4 °C for 1 hr, and then dehydrated through an acetone series to be embedded in Epon 812. A few samples thus embedded were sectioned and stained with toluidine blue (pH 7.0), and then observed under a light microscope. The other samples were cut using an ultramicrotome, stained with uranium acetate and lead nitrate, and then photographed under a JEM-100B electron microscope.

For the detection of actin, about half of the remaining embryos were treated at room temperature throughout: they were fixed in a phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)²²⁾ containing 3.7 % formaldehyde for 30 min, rinsed in a PBS, immersed in a PBS containing 0.25 % Tween-20 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.) for 5 min, rinsed again in a PBS, and immersed in 100 μ l PBS containing 16.5 ng NBD-phalloidin (Molecular Probes Inc., Junction City, U.S.A.) for 20 min. As for the controls, a few embryos were immersed in a PBS devoid of phalloidin.

For the detection of cytokeratin, the remaining embryos were also treated at room temperature: they were fixed in a PBS containing 2 % paraformaldehyde for 30 min, rinsed in a PBS containing 100 mM glycine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) and 0.3 % bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co.) (BSA-PBS), immersed in a BSA-PBS containing 0.25 % Tween-20 for 5 min, rinsed again in a BSA-PBS, immersed in rabbit anti-keratin serum (Transformation Research Inc., Framingham, U.S.A.) that reacts with cytokeratin polypeptides (molecular weights; 50,000, 54,000 and 57,000) for 60 min (the primary antibody treatment), this primary antibody being diluted 50 times with a PBS. The embryos treated with the antiserum were rinsed in a PBS, and immersed in a FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel, Durham, U.S.A.) for 60 min (the secondary antibody treatment), this secondary antibody being diluted 64 times with a PBS. As for the controls, a few embryos were treated with the secondary antibody previously treated with normal rabbit serum, or treated simply with the secondary antibody.

Each of the embryos thus prepared for the observation of actin and cytokeratin was placed in the center

of four vaseline spots on a slide. A cover slip was then carefully placed on the vaseline spots and pressed gently to anchor the embryo in between the cover slip and the slide. Observation was carried out under a reflected-light fluorescing microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Results

When 2-cell embryos were cultured in Whittingham medium, the embryos underwent compaction at the 8- or 16- cell stage, and outer blastomeres that had been round became flat, while inner ones stayed round; a subsequent culture, then, led them into blastocysts. When cultured in Whittingham medium containing anti-cadherin antibody, however, compaction did not occur, and the 16 to 32 blastomeres in the embryos all stayed round, since the antibody prevented the embryos from growing into blastocysts.

Junctional complexes

Cultured in Whittingham medium without the antibody, uncompacted 8- and 16-cell embryos had no junctional complexes between any of the pairs of blastomeres, while in compacted 8- and 16-cell embryos, there were junctional complexes found between each pair of outer flattened blastomeres, between each pair of inner round blastomeres, as well as between a flattened blastomere and a round blastomere (Fig. 1).

Cultured in a medium with anti-cadherin antibody, however, all the 16-cell and 32-cell embryos were composed only of round blastomeres, having no junctional complexes anywhere (Fig. 2).

Actin

Immersed in a phalloidin solution, all of the embryos cultured in a medium with or without anti-cadherin antibody showed fluorescence throughout the cytoplasm of all the blastomeres (Figs. 3-a and 4), but not when immersed in a PBS devoid of phalloidin (Fig. 3-b). These findings indicate that the fluorescence shows the presence of actin.

Developed in Whittingham medium without the anti-cadherin antibody, actin fluorescence was strong in all of the peripheral cytoplasm of the blastomeres in uncompacted 8- and 16-cell embryos, while in compacted 8- and 16-cell embryos, the fluorescence was especially strong in the peripheral cytoplasm

where two blastomeres adhered (Fig. 3-a). In 8-, 16- and 32-cell embryos developed in a medium containing anti-cadherin antibody, composed of round blastomeres only, actin fluorescence was strong in all of the peripheral cytoplasm of the blastomeres (Fig. 4).

Cytokeratin

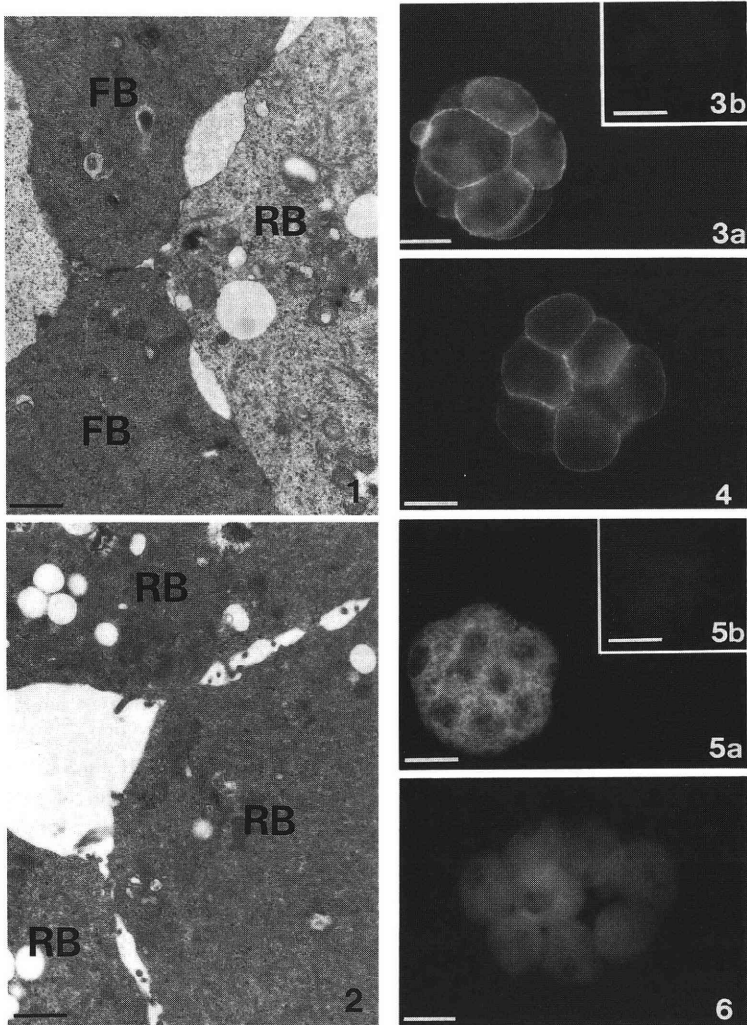
Immersed in a rabbit anti-keratin serum and a FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, the embryos cultured in a medium either with or without anti-cadherin antibody showed fluorescence throughout the cytoplasm of all the blastomeres (Figs. 5-a and 6), but not when treated with the secondary antibody after being immersed in normal rabbit serum or when treated with the secondary antibody only (Fig. 5-b). From these findings we have ascertained that the fluorescence shows the presence of cytokeratin.

Developed in a medium without the anti-cadherin antibody, weak cytokeratin fluorescence, granular in shape, was spread throughout the cytoplasm of blastomeres of uncompacted 8-cell and 16-cell embryos, while in flattened and round blastomeres of compacted 8- and 16-cell embryos, the fluorescence was strong and looked mesh-like in shape (Fig. 5-a). Developed in a medium with the antibody, however, the fluorescence in 8-, 16- and 32-cell embryos was always weak and granular in the blastomeres (Fig. 6).

Discussion

In mice, E-cadherin is recognized to exist on the cell surface of embryos at the 1-cell through blastocyst stages, but it becomes localized in compacted embryos in the regions where two blastomeres adhere^{18,23}. It is also understood that activated actin participates in the transfer of E-cadherin to cell adhering regions^{24,25}. In the present investigation, neither actin nor cytokeratin activation was found in mouse embryos which had been cultured in a medium containing the anti-cadherin antibody. This finding suggests that the transfer of cadherin to the region where two blastomeres adhere did not occur, and therefore compaction did not occur either, because of the failure of cell-to-cell adhesion.

From the present findings on cadherin and the former findings on Le^x epitope¹¹, the following suppositions can be proposed in the process of compaction in



Abbreviations. FB: flattened blastomere, RB: round blastomere.

- Fig. 1 A compacted 16-cell mouse embryo developed in Whittingham medium without antibody. A scale indicates $1.0\ \mu\text{m}$. Junctional complexes are seen between all pairs of blastomeres.
- Fig. 2 A 16-cell mouse embryo developed in Whittingham medium with anti-cadherin antibody. A scale indicates $1.0\ \mu\text{m}$. No junctional complexes are seen between any pair of blastomeres.
- Fig. 3 Compacted 8-cell mouse embryos developed in Whittingham medium without antibody, treated with phalloidin (a) and with a PBS devoid of phalloidin (b). Scales indicate $25.0\ \mu\text{m}$. a. Actin fluorescence is seen in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres, and is especially strong in the peripheral cytoplasm where two blastomeres adhering to each other. b. No fluorescence is seen in the cytoplasm of any blastomere.
- Fig. 4 An 8-cell mouse embryo developed in Whittingham medium with anti-cadherin antibody, treated with phalloidin. A scale indicates $25.0\ \mu\text{m}$. Actin fluorescence is seen in all of the peripheral cytoplasm of round blastomeres.
- Fig. 5 Compacted 8-cell mouse embryos developed in Whittingham medium without antibody, treated with rabbit anti-keratin serum and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (a) and only with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (b). Scales indicate $25.0\ \mu\text{m}$. a. Cytokeratin fluorescence, mesh-like in shape, is seen in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres. b. No fluorescence is seen in the cytoplasm of any blastomere.
- Fig. 6 An 8-cell mouse embryo developed in Whittingham medium with anti-cadherin antibody, treated with rabbit anti-keratin serum and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG. A scale indicates $25.0\ \mu\text{m}$. Cytokeratin fluorescence is granular and weak in the cytoplasm of all round blastomeres.

mouse embryos during blastocyst formation: firstly, the activation of E-cadherin on the cell surface of blastomeres and that of actin in their cytoplasm induce flattening of blastomeres; secondly, cell-to-cell recognition by the Le^x epitope starts between pairs of blastomeres; thirdly and lastly, junctional complexes are constructed between pairs of blastomeres, these, as a whole, inducing the compaction of embryos.

References

- 1) Lewis WA, Wright ES, On the early development of the mouse egg. *Contr Embryol Carnegie Inst* 25: 115, 1935
- 2) Ducibella T, Anderson E, Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol* 47: 45, 1975
- 3) Yotsutani I, Niimura S, Ishida K, The incidence and morphology of transformed embryos in the course of blastocyst formation in four mammalian species. *Jpn J Fertil Steril* 37: 74, 1992
- 4) Solter D, Knowles BB, Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5565, 1978
- 5) Gooi HC, Feizi T, Kapadia A, et al., Stage-specific embryonic antigen involved $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 292: 156, 1981
- 6) Vestweber D, Gossler A, Boller K, et al., Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 124: 451, 1987
- 7) Reima I, Lehtonen E, Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse embryos. *Differentiation* 30: 68, 1985
- 8) Emerson JA, Disruption of the cytokeratin filament network in the preimplantation mouse embryo. *Development* 104: 219, 1988
- 9) Lehtonen E, Ordóñez G, Reima I, Cytoskeleton in preimplantation mouse development. *Cell Differ* 24: 165, 1988
- 10) Yotsutani I, Niimura S, Ishida K, Histochemical observations on actin and cytokeratin in mouse embryos in the course of blastocyst formation. *Jpn J Fertil Steril* 38: 177, 1993
- 11) Richa J, Solter D, Role of cell surface molecules in early mammalian development. In: Rossant J, Pedersen R, eds, *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. p293, Cambridge University Press, 1986
- 12) Yotsutani I, Niimura S, Ishida K, Influence of anti-Le^x antibody on in vitro development of 8-cell mouse embryos. *J Mamm Ova Res* 10: 26, 1993
- 13) Vestweber D, Kemler R, Ekblom P, Cell-adhesion molecule uvomorulin during kidney development. *Dev Biol* 112: 213, 1985
- 14) Takeichi M, The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102: 639, 1988
- 15) Takeichi M, Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451, 1991
- 16) Reima I, Maintenance of compaction and adherent-type junctions in mouse morula-stage embryos. *Cell Differ Dev* 29: 143, 1990
- 17) Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M, The Ca⁺⁺ dependent cell-cell adhesion system regulated inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35: 631, 1983
- 18) Vestweber D, Kemler R, Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. *Exp Cell Res* 152: 169, 1984
- 19) Richa J, Damsky CH, Buck CA, et al., Cell surface glycoproteins mediate compaction, trophoblast attachment, and endoderm formation during early mouse development. *Dev Biol* 108: 513, 1985
- 20) Ogou S, Okada TS, Takeichi M, Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Dev Biol* 92: 521, 1982
- 21) Whittingham DG, Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Suppl* 14: 7, 1971
- 22) Dulbecco R, Vogt M, Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 99: 167, 1954
- 23) Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M, Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cell studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 101: 19, 1984
- 24) Hirano S, Nose A, Hatta K, et al., Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol* 105: 2501, 1987
- 25) Nagafuchi A, Takeichi M, Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7: 3679, 1988

抗カドヘリン抗体処置マウス胚の割球接合に
関する形態学的研究

新潟大学大学院自然科学研究科

四谷伊公子

新潟大学農学部家畜生産学教室

新村末雄 石田一夫

2細胞期のマウス胚を抗カドヘリン抗体を添加した
培地で培養すると、胚は16～32細胞期までは発生す

るが、胚盤胞を形成しなかった。また、8～16細胞期に外側割球の扁平化や胚の収縮は起こらず、16～32細胞期胚の割球間には接合装置の形成は全く認められなかった。この時期の胚のアクチンを示す蛍光は、割球の細胞質外帯で一様に強く、サイトケラチンを示す蛍光は、割球の細胞質全域に出現したが、顆粒状で弱かった。これらの所見は、抗体無添加の培地で発生した正常な胚と比較すると、蛍光の強さ、局在性、形状の点で異なっており、接着帯やデスモソームの形成に関与するこれらの細胞骨格系線維が、活性化されていないことを示唆している。

(受付：1993年 8月13日)

(受理：1993年10月15日)

嚢胞腎に精管末端部および精嚢の嚢状拡張を合併した2例

Two Cases of Cystic Dilatation of Terminal Vasa and Seminal Vesicles Associated with Polycystic Kidney

東北大学医学部泌尿器科学教室

(主任：折笠精一教授)

中 角 尚 誉
Hisayoshi NAKAZUMI
蓮 田 精 之
Akiyuki HASUDA

前 原 郁 夫
Ikuo MAEHARA
高 橋 勝
Masaru TAKAHASHI

折 笠 精 一
Seiichi ORIKASA
平 松 正 義
Masayoshi HIRAMATSU

Department of Urology,

Tohoku University, School of Medicine, Sendai 980, Japan

(Director: Prof. S. Orikasa)

嚢胞腎に精管末端部および精嚢の嚢状拡張を合併した2例を報告する。症例1は27歳男性。主訴は挙児希望。精液検査にて精子濃度、精子運動率、精液量の低下を認め、精管精嚢造影、MRIでは精管末端部および精嚢の嚢状拡張が認められた。腹部超音波検査では両側腎に多発性の嚢胞が存在していた。頻回射精を指導したが精液所見は改善せず、現在精嚢穿刺術を併用したAIHを計画中である。症例2は26歳男性。主訴は血精液。精液検査では精子濃度、精子運動率の低下と血精液を認めた。精管精嚢造影では両側精管末端部および精嚢の嚢状拡張を認め、さらに前立腺内に円形の嚢状構造を認めた。骨盤MRIでは右精嚢と円形病変の中の血液貯留が示唆された。腹部MRIにて両側腎に多発性の嚢胞を認めた。精路の通過障害が血精液の原因であると考え、経尿道的手術を予定したが、同意が得られず、現在抗生剤、消炎剤で経過観察中である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 90 - 95, 1994)

緒 言

嚢胞腎 (polycystic kidney : PCK) は、DNA異常によって起こる代表的な腎疾患であり、両側性かつ多発性に発生した嚢胞のため正常実質が圧排され次第に腎機能が低下することが問題となる¹⁾。

腎以外の病変としては肝嚢胞、脾嚢胞、脳動脈瘤の頻度が高いが、肺、脾、卵巣、甲状腺、子宮にも嚢胞が合併すると報告されている²⁾。また、精管末端部および精嚢の嚢状拡張が合併した症例は今までに18例報告されている。

今回我々は、不妊または血精液症を主訴として当科を受診し、嚢胞腎と精管末端部および精嚢の嚢状拡張を合併した2例を経験したので報告する。

症 例

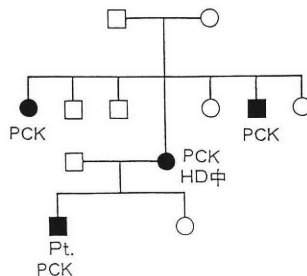
〔症例1〕

患者：27歳、男性。

主訴：挙児希望。

既往歴：24歳時に健康診断の超音波検査で嚢胞腎を指摘されている。

家族歴：



現病歴：3年5ヶ月間の不妊を主訴として当科外来を受診。

現症：体格中等度，栄養状態良好。血圧142/96。胸腹部の理学的所見に異常を認めなかった。精巣容量は両側とも20 ml大で精巣上体，精管は正常に触れる。前立腺は胡桃大で弾性硬に触れ，精嚢は触知しなかった。

生化学的検査：肝機能，腎機能，電解質に異常を認めなかった。BUN 17 mg/ml，Cr 0.8 mg/ml。

精液検査：精液量0.5ml (>2.0ml)，精子濃度 $22 \times 10^6/\text{ml}$ (> $20 \times 10^6/\text{ml}$)，運動率10.5% (>50%)，精子運動能指数0 (>70)，pH 7.07と精液量が少なく，総精子数の低下，精子運動率の低下を認めた。

内分泌学的検査：LH 3.3 mIU/ml，FSH 2.6 mIU/ml，PRL 2.7 ng/ml，Testosterone 781.0 ng/dlとすべて正常。

腎超音波検査：両側腎に多発性の嚢胞を認めた。(図1)

精管精嚢造影：両側の精管末端部は拡張し精嚢と広く交通していた。精嚢はくびれをもち嚢状に拡張していた。(図2)

骨盤MRI検査：拡張した両側精管膨大部と精嚢がT1強調像で低信号領域として描出され，T2強調像では高信号領域として描出された。(図3，4)

組織学的検査：精巣生検では精細管内に精子に至るまでの各成熟段階を示す精細胞を認めた。精細管壁の肥厚や精細胞の剥脱像は認めなかった。

経過：精子運動性の低下は拡張した精路での停滞のためであると考え，頻回射精を指導した。しかし，5日間連続射精では精液所見の改善が見られず，その後妊娠にも至っていない。射精後の超音波ガイド下経直腸的精嚢穿刺術により運動性良好な精子が得られたため，今後は経直腸的精嚢穿刺術を用いて人工授精を行なう予定である。

〔症例2〕

患者：26歳，男性，未婚。

主訴：血精液。

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：

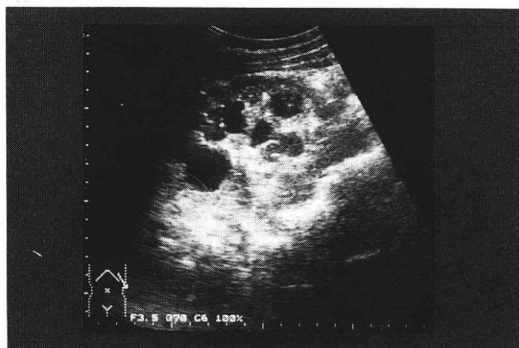
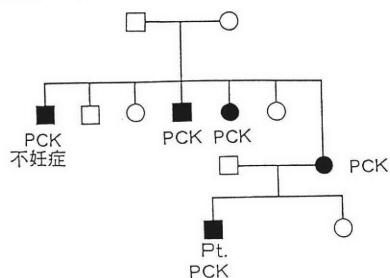


図1・2 症例1 腎超音波断層像



図3 症例1 精管精嚢造影像

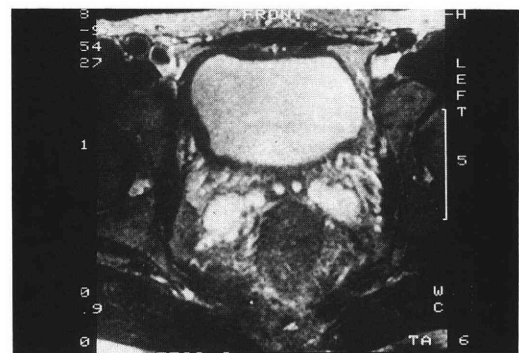


図4 症例1 骨盤MRI T2強調像

現病歴：1991年10月頃より精液に血液が混じるようになり近医を受診。CTにて嚢胞腎を指摘されている。1992年3月11日精査のため当科紹介となった。

現症：体格中等部、栄養状態良好。血圧196/108。腹部には両側性に腫大した腎を触れた。陰茎、陰囊には異常を認めなかった。精巣容量は両側とも12 ml。精巣上体の頭部は両側ともやや腫張していたが精管は正常に触知した。前立腺は胡桃大で弾性硬に触れた。

生化学的検査：GOT 87 IU/L, GPT 122 IU/L. BUN 18 mg/dl, Cr 1.0 mg/dl. 電解質に異常を認めなかった。

精液検査：精液量1.2 ml, 精子濃度 $6 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率4.2%, 精子運動能指数0, RBC無数WBC 0 - 1/5

HPF, pH 7.62と精液量, 精子濃度, 精子運動率の低下と血精液を認めた。

内分泌学的検査：LH 3.0 mIU/ml, FSH 2.5 mIU/ml, PRL 2.1 ng/ml, Testosterone 219.4 ng/dlとTestosteroneがやや低値であった。

腎超音波検査：両側腎に多発性の嚢胞を認めた。

尿道膀胱造影：特に異常を認めなかった。

精管精囊造影：右精管より造影剤を注入したところ拡張した右精管膨大部, 精囊が造影された。さらに造影剤を注入すると尿道は造影されず, 正中部の嚢状に拡張した部分, ついで拡張した左精囊が造影された。左精管より造影剤を注入すると左精囊, 左射精管, 尿道, 膀胱が造影された。(図5, 6)

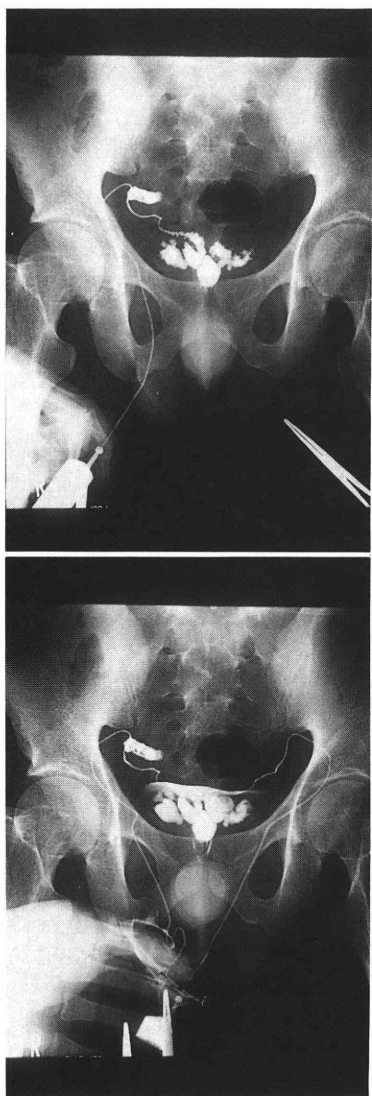


図5・6 症例2 精管精囊造影像

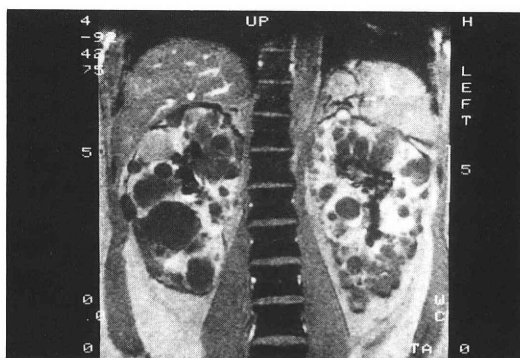


図7 症例2 腹部MRI T1強調像

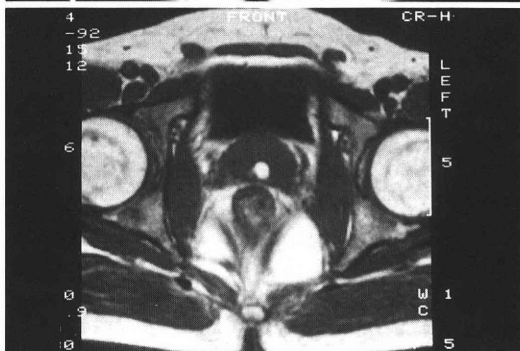
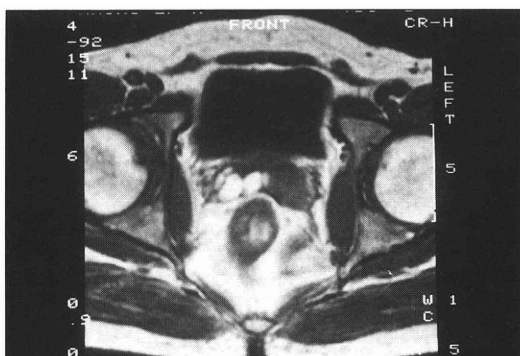


図8・9 症例2 骨盤MRI T1強調像

腹部MRI検査：両側腎に多発性の嚢胞を認めた。肝には嚢胞を認めなかった。(図7)

骨盤MRI検査：T1強調像，T2強調像にて両側精管膨大部，精囊の拡張が認められた。また前立腺中央部に嚢状に拡張した部分を認めた。T1強調像で，右側精管膨大部，精囊，前立腺の中央部の嚢状に拡張した部分は高信号領域として描出され，亜急性の出血があったことが示唆された。(図8，9)

組織学的検査：精巣生検では精細管内に精子に至るまでの各成熟段階を示す精細胞を認めた。精細管壁の肥厚や精細胞の剥脱像は認めなかった。

経過：精路の通過障害が血精液や精子運動性低下の原因であると考え，経尿道的切除術による通過障害の解除を勧めたが，本人の同意が得られず現在のところ抗生剤，消炎剤で経過観察中である。

考 察

嚢胞腎は，腎以外の病変の合併が多いことで知られている。東原らの316例の集計によると，肝嚢胞-54.6%，脾嚢胞-7.1%，脳動脈瘤-8.0%の合併率であった³⁾。一方，精囊の嚢状拡張については，谷川らの集計によると1987年まで本邦で47例が報告されており比較的稀な疾患であると言える⁴⁾。また，石神らは男性不妊症患者5979例中28例(0.47%)に精管精囊の異常拡張を認めたとしている⁵⁾。

嚢胞腎に精囊の拡張が合併した症例は今までに中島ら⁶⁾，森脇ら⁷⁾，酒徳ら⁸⁾，中嶋ら⁹⁾，伊藤ら¹⁰⁾，岩崎ら¹¹⁾，松橋ら¹²⁾，遠坂ら¹³⁾，瀬島ら¹⁴⁾，大橋ら¹⁵⁾，浜尾ら¹⁶⁾により計18例が報告されているにすぎない。しかし，酒徳らは，男子嚢胞腎疾患9人に精管精囊造影を行ない3例に精管末端部および精囊の嚢状拡張を認めたと報告している⁸⁾。このことより両者の合併は決して頻度の低いものではないと推測される。

精管末端部および精囊の形態異常を示す疾患については石神ら¹⁷⁾，森脇ら⁷⁾，松岡ら¹⁸⁾，岩崎ら¹¹⁾の分類が見られるものの未だ確立された分類法はない。石神らは，1)単一化した射精管の異常拡張，2)精囊自身の一部または全体の異常拡張，3)ミュー管遺残物の異常拡張の3群に分類している¹⁷⁾。また，岩崎らは，精囊および精囊周囲の嚢胞性疾患を5群に分類し，嚢胞腎に合併したものを独立した項目として設け，これを精囊嚢状拡張症と呼ぶことを提唱している。

その精管精囊上の特徴として，1)両側性であること，2)憩室様構造を失い，あたかも食道における

Achalasiaの様な形態をとること，3)射精管の完全な閉塞例以外では尿道との交通を有しており，その際には精管自体の拡張は著明でないこと，が挙げられている¹¹⁾。実際，中島の2例目，酒徳の1～5例目，岩崎の1～3例目，森脇の1例，遠坂の1例，大橋の1例，浜尾の1例，そして自験例の1例目において上記の特徴が当てはまる。これらを独立した項目として分類することは適切であると思われる。岩崎ら，大橋らは嚢胞腎に精囊の嚢状拡張が合併する原因としてウォルフ管の発生異常を挙げている。

自験例の2例目においては，正中部に嚢状に拡張した部分を認めたが，これが1)ミュー管嚢胞に2次的に射精管が交通したものか，2)射精管開口部の閉塞による拡張なのか，3)単一射精管の嚢状拡張なのか，4)あるいはこれらを組み合わせた病態なのか明らかでなかった。2例目の形態的特徴は，1例目の形態的特徴とはやや異なっており嚢胞腎との合併が偶然である可能性も否定出来ない。

精路の形態異常を伴う患者は，血精液または不妊を主訴として泌尿器科を受診することが多い。その中に嚢胞腎に合併した症例があることを念頭において問診を行なうことが重要であろう。精液検査では精液量の低下，精子運動率の低下，血精液を認めた場合には精路の通過障害，うっ滞などを疑い，腹部超音波検査による腎の検索と，経直腸の超音波検査による精路の拡張の有無の評価を行なうことが望ましい。経直腸の超音波断層は1)前立腺，膀胱との位置関係が立体的に把握できる，2)侵襲が少なく外来で繰り返し行なえる，という利点があり本疾患の診断と経過観察に不可欠である。また拡張した精路の内部の性状を知るにはMRIが有用である。自験例では症例1，2共に拡張した精囊が描出され，症例2においては右精囊の亜急性の出血が明瞭に描出された。さらに形態的特徴により分類を行なうためには精管精囊造影が有用である。

精囊の拡張が不妊症を起こす原因として精子が拡張した部位に長期間停滞することによる運動性の低下が考えられる。石神らは，精管精囊の異常拡張を示した5例に対し拡張部の部分摘出を行ない全例に精液所見の改善を認め，特に射精管拡張に結石を合併した男性不妊の症例では挙児を得たと報告している¹⁹⁾。また，精囊は，精子のエネルギー源とされる果糖や精子の子宮頸管への侵入を増強するとされるプロスタグランジンを分泌するとされている²⁰⁾。従ってこれら精囊分泌物の質的量的な異常が妊孕性の低下に関係している可能性も十分考えられる。

不妊を主訴とした患者に対する拡張部摘除以外の治療法として、経尿道的精丘切開術¹⁶⁾、尿管カテーテルによる経尿道的精路拡張術¹¹⁾、人工精液瘤造設術^{11,12)}、経直腸的精囊穿刺術を併用したAIH¹⁶⁾が行なわれ、妊娠例も報告されている¹¹⁾。血精液を主訴とした患者に対して精囊摘出術を行なったという報告も見られるが^{6,7)}、性機能障害の可能性もあり、適応は慎重に決定されるべきであると思われる。

結 語

1. 囊胞腎と精管末端部および精囊の囊状拡張を合併した2例を報告した。
2. 診断に経直腸の超音波検査とMRIが有用であることを強調した。

本論文の要旨は第11回日本アンドロロジー学会にて報告した。

文 献

- 1) 石川 勲, 多発性囊胞腎. 代謝 27: 57, 1990
- 2) Dalgaard OZ, Malformations related to bilateral polycystic kidneys in adults. Acta Med Scand 158 (supple328): 182, 1957
- 3) Higashihara E, Aso Y, Shimazaki J, et al., Clinical Aspects of polycystic kidney Disease. J Uro 147: 329, 1992
- 4) 谷川克己, 西澤和亮, 河村信夫, 同側の腎無形成を伴った精囊腺囊状拡張の1例. 泌尿紀要 33: 1474, 1987
- 5) 石神襄次, 男性不妊とその治療. 産婦人科治療 46: 143, 1983
- 6) 中島啓雄, 柳瀬功一, 精囊腺囊胞の2例. 日泌尿会誌 53: 43, 1962
- 7) 森脇 宏, 結縁繁夫, 精囊腺疾患について—とくにその分類について—. 日泌尿会誌 53: 43, 1962
- 8) 酒徳治三郎, 桐山齊夫, 佐長俊昭 他, 多発性囊胞腎を合併した精囊腺および精管末端部囊胞状拡張について. 西日泌尿 35: 12, 1973
- 9) 中嶋和喜, 内藤克輔, 勝見哲郎, 精囊の囊胞状拡張を伴った囊胞腎の1例. 日泌尿会誌 68: 508, 1977
- 10) 伊藤浩紀, 楠山弘之, 中目康彦 他, 精囊の囊胞を伴い不妊症を示す囊胞腎の2例. 日泌尿会誌 73: 1487, 1982
- 11) 岩崎 皓, 広川 信, 穂坂正彦 他, 精囊囊状拡張症およびその分類について. 日泌尿会誌 79: 1385, 1988
- 12) 松橋 求, 原 啓, 高波真佐治 他, 囊胞腎の合併した副睪丸管および精管膨大部拡張症の1例. 日泌尿会誌 79: 564, 1988
- 13) 遠坂 顕, 山崎 彰, 岩崎 皓 他, 囊胞腎と部分的逆行性射精を合併した精囊囊状拡張症の1例. 日不妊会誌 35: 273, 1990
- 14) 瀬島健裕, 東堀裕司, 精囊腺異常拡張症の1例. 日泌尿会誌 82: 1858, 1991
- 15) 大橋正和, 石川博義, 大家基嗣 他, 囊胞腎と部分的逆行性射精を合併した精囊囊状拡張症. 泌尿器外科 5: 151, 1992
- 16) 浜尾 功, 稲井 徹, 梶本昌昭 他, 囊胞腎を合併した精囊囊状拡張症の1例. 西日泌尿 54: 1994, 1992
- 17) 石神襄次, 加古 賢, 矢田文平 他, 精囊腺ならびに精管末端部の異常拡張症について. 泌尿紀要 6: 792, 1960
- 18) 松岡 啓, 中川克之, 野田進士, 精囊腺囊状拡張について. 西日泌尿 39: 713, 1977
- 19) 石神襄次, 森 昭, 林法信他, 精囊腺疾患の診断と治療. 泌尿紀要 9: 528, 1963年
- 20) Eskin BA, Azarbal SC, Slata WG, In vitro responses of the spermatozoa cervical mucus system treated with prostaglandin (F₂α). Obstet Gynecol 41:436, 1973

Two cases of cystic dilatation of terminal vasa and seminal vesicles associated with polycystic kidney

Hisayoshi Nakazumi, Ikuo Maehara,
Seiichi Orikasa, Akiyuki Hasuda,
Masaru Takahashi and Masayoshi Hiramatsu

Department of Urology,
Tohoku University, School of Medicine,
Sendai 980, Japan
(Director: Prof. S. Orikasa)

Two cases of cystic dilatation of terminal vasa and seminal vesicles associated with polycystic kidney are reported. Case 1 was a 27-years old male, who complained of infertility. Seminalysis revealed oligoasthenozoospermia and reduced semen volume. Vesiculogram and MRI showed bil. dilatation of terminal vasa and seminal vesicles. Abdominal echogram revealed multiple cysts in bil. kidneys. We advised him to ejaculate frequently, but his seminalysis didn't improved. Now, we are planning AIH using seminal vesicle puncture. Case 2 was 26-years old male, who complained of hematospermia. Seminalysis revealed oligoasthenozoospermia, reduced semen volume and hematospermia. Vesiculogram showed bil. dilatation of terminal vasa and seminal

vesicles and an additional round cystic structure in prostate. Abdominal MRI revealed multiple cysts in bil.kidneys. MRI suggested blood pooling in rt.seminal vesicle and in the round lesion. As the cause of

hematospermia seemed to be obstruction of seminaltract, we planned transurethral surgery. But the pt. didn't consent to it. So we follow up him with antibiotics and antiphlogistics.

(受付：1993年 5月 7日)

(受理：1993年10月18日)

LACK OF CALCIUM IONOPHORE (A23187) INDUCED AND INDUCIBLE ACROSOME REACTIONS CORRELATES WITH FERTILIZATION FAILURE IN VITRO

Murat TASDEMIR, Isik TASDEMIR, Hideya KODAMA,
Jun FUKUDA, Kazuko SEKINE and Toshinobu TANAKA

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

Abstract: To study the unexplained fertilization failure in vitro by acrosome reaction ionophore challenge test (ARICT), we examined 27 sperm samples, 9 of which (Group A) obtained from patients with history of fertilization failure at least at two consecutive in vitro fertilization trials due to unknown etiology. And 18 control patients (Group B) whose fertilizing potentials were proven by IVF were chosen by random sampling. Sperm acrosomes were examined by staining with pisum sativum agglutinin (PSA) labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC), as spontaneous and Ca-ionophore (A23187) induced acrosome reactions (AR). Although the incidence of spontaneous ARs were not statistically significant between group A and B (10.2 ± 1.7 and 10.0 ± 2.0 respectively), the incidence of A23187 induced and inducible (induced minus spontaneous) ARs in group A (23.0 ± 2.0 and 12.8 ± 3.0 respectively) were significantly ($p < 0.01$) lower than that in group B (28.7 ± 2.9 and 18.7 ± 3.6 respectively). In conclusion, the incidence of A23187 induced and inducible ARs were in correlation with the success in fertilization in vitro. And this approach has also helped us to understand the repeating failure of some cases in IVF due to unknown etiology which were later attributed to male factor.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 96 - 100, 1994)

Introduction

The explanation for failure of fertilization in vitro for some male infertility cases is beyond the limits of conventional infertility parameters. It is well known that the acrosome reaction (AR) that occurs as a consequence of sperm capacitation is an indispensable prerequisite for sperm to fuse with the oocyte and pass through the zona pellucida (ZP)¹⁻⁴. So in determining the fertility of male partner this essential physiologic modification of sperm head should be tested. Recently acrosome reaction ionophore challenge test (ARICT) has been introduced as a method to predict the fertilizing potential of sperm, and its results have been shown to have correlation with fertilization in vitro⁵.

We designed this research to study the unexplained failure of fertilization in vitro by ARICT.

Materials and methods

Patients

Twenty seven patients were included into this study. We selected 9 patients (Group A) who underwent in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) treatment due to unexplained etiology and failed to fertilize in vitro at least at two consecutive cycles between November 1990 and March 1992. And 18 control patients (Group B) whose fertilizing potentials were proven by IVF were chosen by random sampling.

In vitro fertilization

Ovarian stimulation was achieved by human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonol, Teikoku-zouki, Japan), started on the second day of menstruation with a dose of 225 IU daily, accompanied by a GnRH agonist (Buserelin, Sprecur, Hoechst Japan),

administered 900 μ g daily beginning from the mid-luteal phase of the previous cycle (long protocol) as described previously⁶). The consecutive IVF-ET cycles were carried out by the same clinical staff with the same methodology and under the same laboratory conditions. When the diameter of the leading follicle reached 17 mm or more, 10000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) was administered on the evening of that day. Oocytes were harvested by ultrasound-guided follicle aspiration through a transvaginal approach under local anesthesia 34 hours after hCG administration. The oocytes were immediately isolated and the morphological grade of maturity was estimated according to defined criteria⁷). The oocytes were cultured in 2 mL of HCO₃ buffered human tubal fluid containing 10% heat inactivated-patient's serum (HTF-PS), under an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ at 37°C and inseminated in HTF-PS under the same atmospheric conditions with 10×10^4 motile spermatozoa/mL of culture medium, prepared by a swim-up technique. In every cycle there were at least three mature oocytes inseminated. Sixteen hours after insemination, oocytes with two pronuclei were considered fertilized and were cultured further with fresh medium for cleavage and replacement. Up to 4 embryos were transferred to the uterus 32-34 hours following the recognition of fertilization. Luteal function was supported by injection of 2000 IU of hCG at 0, 3 and 6 days after the transfer.

Preparation of Sperm Samples and Evaluation of Acrosome Reaction

Sperm acrosomes were examined by staining with pisum sativum agglutinin (PSA) labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma Co. St. Louis, MO) as described by Cross et al.⁸) with slight modifications as follows: after 45 minutes of liquefaction at room temperature, the samples were divided into two parts. One part was used for preparation of sperm for IVF. The other part was diluted in four volumes of human tubal fluid containing 1% bovine serum albumin (HTFBSA-prepared at Reproductive Endocrinology Laboratory of Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University, Japan) and washed twice by centrifugation at 200xg for 6 minutes. After 45 minutes of swim-up, enriched motile fractions (>90% progressive motile spermatozoa) were collected and

divided into four parts for examination of spontaneous and A23187 (dissolved in ethanol 2×10^{-3} M and stored at -20°C; Sigma Co. St. Louis, MO) induced AR at 1 and 24 hour at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ and air. The sperm samples were smeared on fluorescence free glass microscope slides (Matsunami Glass Ind., LTD, Tokyo, Japan) and were fixed in 95% ethanol for 1 hour after air drying. Slides were washed in distilled water before and after two hours exposure to 30 μ g/mL PSA labeled with FITC in phosphate buffered saline. In each slide, at least 200 sperm were examined under a fluorescence microscope with 400x magnification.

Statistical Analysis

Comparison between two sets of data in the same group was made by using paired Student's t-test. Statistical analysis between different groups was performed by using Student's t-test.

Results

The results of spontaneous and A23187 induced acrosome loss at 1 and 24 hour incubations were compared at Figure 1. Spontaneous acrosome loss at 1 and 24 hour incubations (mean \pm SD; 10.2 ± 2.0 and 11.5 ± 1.8 respectively) were not statistically significant. As were the A23187 induced acrosome loss at 1 and 24 hour incubations (mean \pm SD; 26.7 ± 3.8 and 27.6 ± 3.6 respectively). Depending on this

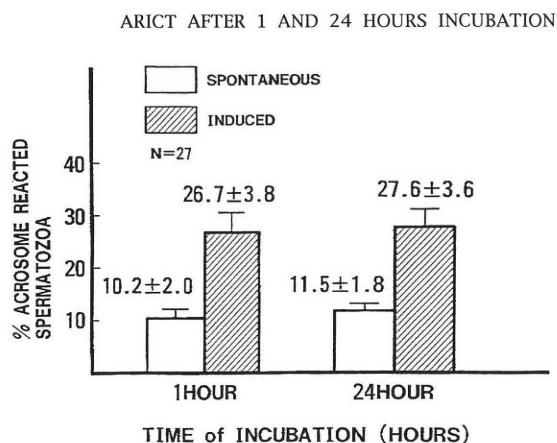


Fig. 1 The incidence of acrosome reactions at 1 and 24 hours of incubations (in HTF+1% BSA medium) are not statistically significant

ARICT: acrosome reaction ionophore challenge test

Table 1 Spontaneous and A23187 induced acrosome loss

	Spontaneous acrosome loss %	induced acrosome loss %	inducible* acrosome loss %
Group A (n= 9)	10.2 ± 1.7 ‡	23.0 ± 2.0 §	12.8 ± 3.0 §
Group B (n=18)	10.0 ± 2.0	28.7 ± 2.9	18.7 ± 3.6

* Inducible acrosome loss: Induced minus spontaneous acrosome loss.

‡ Not significant when compared with group B.

§ p<0.01 when compared with group B.

result, the comparison between group A and B as spontaneous, A23187 induced and induced minus spontaneous acrosome loss were made at 1 hour of incubation as shown in Table 1. Although the incidence of spontaneous ARs were not statistically significant at group A and B (10.2 ± 1.7 and 10.0 ± 2.0 respectively). The incidence of A23187 induced and inducible (induced minus spontaneous) ARs in group A (23.0 ± 2.0 and 12.8 ± 3.0 respectively) were significantly ($p<0.01$) lower than that in group B (28.7 ± 2.9 and 18.7 ± 3.6 respectively). The individual values of group A and mean \pm SD value for group B was illustrated in Figure 2. Although one patient in

group A has shown high incidence of A23187 induced acrosome loss, this patient failed to fertilize again in the current IVF cycle.

Discussion

The conventional sperm parameters such as; sperm count, concentration, percentage of motile and morphologically normal spermatozoa, has limited value in defining all cases of male infertility. By the common practice of IVF-ET, it has been apparent that there are unexplained male infertility cases with normal classical sperm parameters⁹⁾. Although there has been several possible explanations for unexplained IVF failure, a specific analysis of sperm functions, including capacitation, acrosome reaction (AR), sperm-zona binding, sperm-oocyte fusion and nucleus decondensation is probably inevitable to evaluate and understand unexplained male infertility⁹⁾. The acrosome reaction that occurs as a consequence of sperm capacitation is an indispensable prerequisite for sperm to succeed fertilization. Furthermore, since the fertilizing ability of sperm fades relatively soon after the occurrence of the AR¹⁰⁾, it is likely that the fertilizing sperm completes the AR in the immediate vicinity of the oocyte or on the ZP. So the incidence of A23187 inducible AR which indicates the difference between the incidence of A23187 induced and spontaneous AR possibly represents the part of sperm responsible for fertilization.

In testing the AR, physiologic activators are not suitable for comparative and repetitive tests. Acrosome reaction ionophore challenge test (ARICT) is suitable for these purposes. In our experience with 27 patients, there was no significant difference at 1 and 24 hours of incubation concerning spontaneous and A23187 induced AR. We achieved the optimum

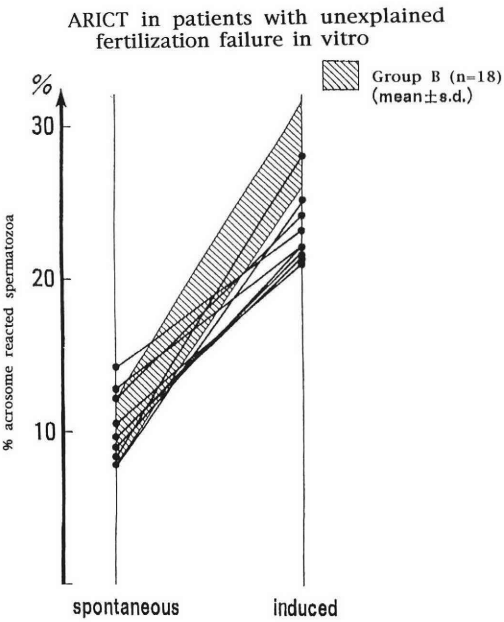


Fig. 2 The incidence of spontaneous and A23187 induced acrosome reactions for group A (n=9) are shown as individually
ARICT: Acrosome reaction ionophore challenge test

capacitation and AR consequently by incubating the sperm samples for 1 hour in HTFBSA and the comparison between group A and B was carried with the results of AR at 1 hour of incubation.

It is likely that spermatozoa with a spontaneous acrosome loss have an impaired fertilization ability and that the fertile spermatozoa are included in the unreacted population that are able to acrosome react in response to A23187. The incidence of inducible AR represent the group of sperm that is capable to acrosome react in response to A23187. Therefore, this index can be taken as a better marker to determine the fertility of male partner.

In the present study, the group with unexplained failure in IVF (group A) has shown significantly lower incidence of both A23187 induced and inducible (induced minus spontaneous) ARs when compared with control group (group B). And the incidence of spontaneous ARs were not significantly different. The lack of response to A23187 in group A can be caused by delayed capacitation¹¹⁾ or by a defect in the cascade of reactions from entry of calcium to exocytosis of intracellular enzymes. As is shown in Figure 2 one patient in group A has shown high incidence of A23187 induced and inducible AR but again failed to fertilize in vitro. Explanation of fertilization failure in this patient possibly involves several other factors rather than the defect in AR.

In conclusion, the incidence of A23187 induced and inducible ARs were in correlation with the success in fertilization in vitro. And this approach has not only helped us to understand the repeating failure of some cases in IVF due to unknown etiology, but also helped us to identify male infertility cases hidden beyond the limits of conventional sperm parameters.

This study was presented at the 4th Microfertilization seminar, Tokyo, Japan, April 18, 1992.

References

- 1) Yanagimachi R, Mechanisms of fertilization in mammals. In: Fertilization and Embryonic Development In Vitro, p81, New York Plenum Press, 1981
- 2) Moore HDM, Bedford M, The interaction of mammalian gametes in the female. In: Mechanism and Control of Animal Fertilization, p435, New York Academic Press, 1983

- 3) Overstreet JW, Hembree WC, Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro, Fertil Steril 27: 815, 1976
- 4) Talbot P, Sperm penetration through oocyte investments in mammals, Am J Anat 174: 331, 1985
- 5) Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, et al., Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization, Fertil Steril 55: 944, 1991
- 6) Hideya K, Mitsuhiro K, Kazuko S, et al., Efficacy of gonadotropin releasing hormone agonist treatment for in vitro fertilization. Jpn J Fertil Steril 36: 389, 1991
- 7) Ben-Rafael Z, Kopf GS, Blasco L, et al., Follicular maturation parameters associated with the failure of oocyte retrieval fertilization and cleavage in vitro, Fertil Steril 45: 51, 1986
- 8) Cross NL, Morales P, Overstreet JM, et al., Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res 15: 213, 1986
- 9) Jeulin C, Feneux D, Serres C, et al., Sperm factors related to human in vitro fertilization. J Reprod Fertil 76: 1, 1986
- 10) Fleming AD, Yanagimachi R, Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. J Exp Zool 220: 109, 1982
- 11) Perreault SD, Rogers BJ, Capacitation pattern of human spermatozoa, Fertil Steril 38: 258, 1982

Caイオノフォアによる先体反応誘起率の減少と体外受精における受精障害との関係

秋田大学医学部産科婦人科学教室

ムラト・タシユデミル イシュク・タシユデミル
児玉英也 福田 淳
関根和子 田中俊誠

Caイオノフォアによる先体反応誘起試験を、過去の体外受精の治療で少なくとも2回以上原因不明の受精障害を経験した9例の不妊患者(A群)を含む、27例の患者に施行した。18例(B群)のコントロール患者は、体外受精の治療で精子の正常な受精能力が示された患者から無作為に選択した。刺激前とCaイオノフォア刺激後の先体反応の誘起の有無は、FITC標識 *pisum sativum* agglutinineで検出した。刺激前の精子の先体反応の誘起率(A群: $10.2 \pm 1.7\%$ および B群: $10.0 \pm 2.0\%$)には両群間で有意差は認められなかったが、Caイオノフォア刺激後の先体反応誘起率($23.0 \pm 2.0\%$ vs $28.7 \pm 2.9\%$) および刺激により誘起された先体

反応の率 (刺激後－刺激前の先体反応誘起率, $12.8 \pm 3.0\%$ vs $18.7 \pm 3.6\%$) に有意差 ($p < 0.01$) を認めた.

Caイオノフォア刺激後の先体反応誘起率, および刺激により誘起された先体反応の率は, 体外受精の成

績との相関が認められた. Caイオノフォアによる先体反応誘起試験は, 原因不明の受精障害例の中から男性不妊例を特定する上で有意義と考えられる.

(受付: 1993年3月18日)

(受理: 1993年11月12日)

IDENTIFICATION OF SPERM ANTIGENS REACTING WITH ANTISPERM ANTIBODIES IN SERA FROM INFERTILE MALE AND FEMALE PATIENTS

Isik TASDEMIR, Murat TASDEMIR, Jun FUKUDA,
Hideya KODAMA, Kazuko SEKINE and Toshinobu TANAKA

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

Abstract: To identify the sperm antigens reacting with antisperm antibodies, 24 human sera with immobilizing antibodies (14 females and 10 males) and 5 normal sera were analyzed with reference to binding of IgG by Western immunoblotting. A total of 15 different polypeptides were capable of binding IgG. 87.5% of the sera reacted with 77 kDa spermatozoal polypeptide and 41.6% of the sera reacted with 68 kDa spermatozoal polypeptide which were the most commonly reacting polypeptides in our study. None of the male sera reacted with 28 kDa polypeptide whereas 42.8% of the female sera showed binding to this polypeptide. Also we could not detect any binding to 83, 42, 32 and 30 kDa spermatozoal polypeptides with male sera. On the other hand none of the female sera reacted with the 45 and 38 kDa spermatozoal polypeptides. The results showed that 77 kDa and 68 kDa spermatozoal polypeptides play important role in infertility and the major difference in binding patterns of male and female sera was seen in 28 kDa spermatozoal polypeptide.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (1), 101 - 105, 1994)

Introduction

Auto and iso antibodies directed against the human spermatozoa play a major role in infertility. These may cause infertility through immobilization by agglutination or complement fixation, or through inhibition of cervical mucus penetration or by blocking sperm egg interaction by inhibiting binding of human sperm to the human zona pellucida¹⁻³. In the present study, we have attempted to identify the antigens on human spermatozoa using human sera containing iso and auto antibodies by Western immunoblotting. This involved the demonstration of IgG antibody binding to spermatozoal antigens electrophoretically transferred to the nitrocellulose after Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis by means of peroxidase conjugated anti-antibodies. We tried to determine the pattern of antibody specificities in female and male sera.

Materials and Methods

Human sera

24 human sera with sperm immobilizing antibodies were obtained from infertile patients (14 females (F) and 10 males (M)) attending to Fertility Clinic at Akita University Hospital. All the samples were highly positive for serum IgG immunobead binding. Controls were sera from 5 fertile donors without sperm immobilizing antibodies, which were also negative for serum IgG immunobead binding.

Spermatozoa

Specimens were obtained from 4 fertile donors with normal semen quality. Spermatozoa from pooled semen of 4 donors washed two times with phosphate buffered saline (PBS) pH7.4 and the concentration of spermatozoa was adjusted to 3×10^8 cells/ml in PBS. The suspension was sonicated in ice bath and centrifuged at $300 \times g$ for 5 minutes. Same volume of 5% Trichloroacetic acid (TCA) was added to the super-

nant and kept in ice for 15 minutes. It was then centrifuged at $10000 \times g$ for 10 minutes. The pellet was suspended in $800 \mu l$ of Tris-HCl (0.0625 M) buffer (pH 6.8) containing 2% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol and 0.001% bromophenol blue as the marker dye and centrifuged at $15000 \times g$ for 15 minutes. The supernatant fluid was heated at $95^\circ C$ for 2 minutes.

Gel Electrophoresis and Immunoblotting

One dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to the method of Laemmli⁴⁾ using 10% polyacrylamide slab gels. Molecular weight standard mixture containing Phosphorylase b (94,000), Bovine Serum Albumin (67,000), Ovalbumin (43,000), Carbonic Anhydrase (30,000), soybean Trypsin Inhibitor (20,100) was run in parallel with sperm extracts. After electrophoresis, Western immunoblotting techniques as described by Towbin et al.⁵⁾ were performed. Sperm antigens were electrotransferred onto nitrocellulose strips ($0.45 \mu m$ diameter pore size) obtained from Millipore. The nitrocellulose strips were blocked by 5% skimmed milk in Tris-buffered saline pH7.5, for 1 hour and incubated overnight at room temperature with 24 sperm immobilizing antibody positive and 5 control sera (1/50 dilution) with constant agitation. Excess antibodies were removed by washing the strips five times for 5 minutes each wash, with washing buffer containing Tween 20. The strips were incubated with peroxidase conjugated affinity purified goat anti-human IgG (1/500 dilution), (Sigma) for 2 hours at room temperature. The strips were then washed five times and submitted to enzyme color reaction by using 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride.

Results

A total of 15 different polypeptides were capable of binding IgG. The polypeptides of 86, 83, 77, 68, 65, 61, 58, 48, 45, 41, 38, 32, 30, 28 and 25 kDa were recognized. None of the control sera showed binding to these polypeptides.

Table 1 shows the number and the percent of sera binding to each reacting polypeptide on spermatozoa with Western immunoblotting. 21 (87.5%) and 10 (41.6%) of 24 human sera with sperm immobilizing antibodies reacted with 77 kDa and 68 kDa polypep-

Table 1 Number, and percent of sera binding to each reacting polypeptide on spermatozoa with Western Immunoblotting

Antigens (Mw)	# of sera (n=24)	% of sera
86 kDa	2	8.3
83 kDa	3	12.5
77 kDa	21	87.5
68 kDa	10	41.6
65 kDa	5	20.8
61 kDa	2	8.3
58 kDa	6	25
48 kDa	4	16.6
45 kDa	1	4.2
41 kDa	4	16.6
38 kDa	1	4.2
32 kDa	5	20.8
30 kDa	4	16.6
28 kDa	6	25
25 kDa	6	25

tides respectively which were the most commonly reacting polypeptides in our study. 6 (25%) of the 24 human sera reacted with each of the 58 kDa, 28 kDa, 25 kDa polypeptides. 5 (20.8%) of the 24 human sera reacted with each of the spermatozoal polypeptides with the molecular weights of 65 and 32 kDa. 4 (16.6%) of the human sera reacted with each of the 48 kDa, 41 kDa and 38 kDa polypeptides. 3 (12.5%) and 2 (8.3%) of human sera reacted with 83 kDa and 86 kDa, 61 kDa polypeptides respectively. Only 1 sera reacted with each of the 45 kDa and 38 kDa molecular weight polypeptides. Detailed results obtained from the 7 most frequently observed IgG binding polypeptides are given in Table 2.

Figure 1 shows the percent of female and male sera binding to each polypeptide on spermatozoa. 85.7% of female sera and 90% of male sera reacted with 77 kDa polypeptide, whereas 42.8% of female sera and 40% of male sera reacted with 68 kDa polypeptide. On the other hand 35.7% of the female sera reacted with each of the 58 kDa and 25 kDa polypeptides, but only 10% of the male sera reacted with these polypeptides. Although 42.8% of the female sera reacted with the 28 kDa polypeptide, none of the male sera reacted with this polypeptide. We also could not detect any

Table 2 Binding pattern in Western Immunoblotting of IgG from 24 human sera 7 of the most frequently reacting polypeptides on human spermatozoa.

Antigens (Mw)								
Serum NO	Sex	77 kDa	68kDa	65kDa	58kDa	32kDa	28kDa	25kDa
610	F	+		+				
456	F		+					
670	F	+						
1098	F	+	+					
800	F		+					
506	F	+	+			+	+	
296	F	+	+					
267	F	+	+	+				
735	F	+			+	+	+	+
618	F	+			+	+	+	+
124	F	+			+	+	+	+
869	F	+	+		+			
737	F	+					+	+
807	F	+			+	+	+	+
1227	M	+	+					
887	M	+						
1116	M	+						
1103	M	+	+	+				
332	M	+	+					
874	M	+						
411	M	+	+					
384	M							+
1017	M	+		+	+			
443	M	+		+				

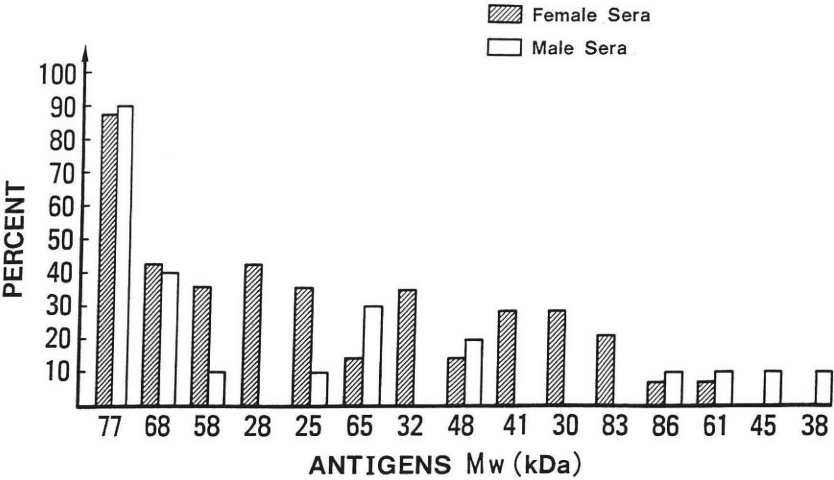


Figure 1 Percent of female and male sera binding to each reacting polypeptide on spermatozoa with Western Immunoblotting

binding to 83, 41, 32, 30 kDa polypeptides with male sera to which 21.4%, 28.5%, 35.7% and 28.5% of the female sera showed binding respectively. On the other hand none of the female sera reacted with the 45 and 38 kDa polypeptides to which 10% of the male sera showed binding.

Discussion

In the present study, we present data about the identification of the corresponding antigens of the human spermatozoa to the sperm immobilizing antibodies by Western immunoblotting.

Our analysis of 24 human sera (14 female and 10 male) showed that the antigens of high molecular weights (77 kDa and 68 kDa) play an important role in infertility since they are the most frequently recognized antigens both by male and female sera, which agrees with the other studies^{6, 7}. Poulsen reported that the presence of antibodies against 77 kDa polypeptide was correlated with infertility⁶ and Jaroslova et al. reported that the 68 kDa spermatozoal polypeptide was recognized specifically by antisperm antibodies⁷. Beside these 77 kDa and 68 kDa antigens, we demonstrated that the 65 kDa, 58 kDa, 32 kDa, 28 kDa and 25 kDa spermatozoal polypeptides were frequently recognized by antisperm antibodies which is in correlation with the previous studies^{8, 9, 4}.

The major difference in binding patterns of female and male sera was seen in 28 kDa polypeptide; none of the male sera reacted with the 28 kDa spermatozoal polypeptide whereas 42.8% of the female sera showed binding to this polypeptide which needs further investigation.

Beside clinical tests that can detect the presence of antisperm antibodies in serum, the identification of the antigens against which antibodies are directed should improve the diagnosis of immunologic infertility. Monoclonal antibodies of the same isotype but directed against different antigens present on the sperm have been shown to either block sperm-egg membrane fusion¹⁰ or sperm attachment to zona pellucida¹¹. Thus characterization of the specific sperm antigens against which antisperm antibodies are directed is very important in determining the role of antisperm antibodies in infertility.

References

- 1) Rumke P, van-Amstel N, Messer EN, et al., Prognosis of fertility of men with sperm agglutinins in the serum. *Fertil Steril* 25: 393, 1974
- 2) Kremer J, Jager S, Kuiken J, et al., Recent advances in diagnosis and treatment of infertility due to antisperm antibodies in Spermatozoa. In: *Antibodies and Infertility*. Cohen J and Hendry WF eds. p117, Blackwell, 1978
- 3) Menge AC, *Immunologic Aspects of Infertility and Fertility Regulation*. p 205, Elsevier, 1980
- 4) Laemmli UK, Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680, 1970
- 5) Towbin H, Staehelin T, Gordon J, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350, 1976
- 6) Poulsen F, The nature of an iso-antigen of the human sperm membrane. *J Reprod Immunol* 10: 15, 1985
- 7) Parslow JM, Poulton TA, Hay FC., Characterization of sperm antigens reacting with human sperm antibodies. *Clin Exp Immunol* 69: 179, 1987
- 8) Primakoff P, Lathrop W and Bronson H, Identification of human sperm surface glycoproteins recognized by autoantisera from immune infertile men, women and vasectomized men. *Biol Reprod* 42: 929, 1990
- 9) Naaby-Hansen S and Bjerrum OJ, Auto-and iso-antigens of human spermatozoa detected by immunoblotting with human sera after SDS-PAGE. *J Reprod Immunol* 7: 41, 1985
- 10) Sailing PM, Irons G, Waibel R, Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 33: 515, 1985
- 11) Primakoff P, Hyatt H, Myles DG, A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 101: 2239, 1985

男性および女性不妊患者の保有する抗精子抗体と反応する精子抗原の検出

秋田大学医学部産科婦人科学教室

イシユク・タシユデミル ムラト・タシユデミル

福田 淳 児玉英也

関根和子 田中俊誠

精子不働化抗体強陽性の不妊患者24例(女性14例, 男性10例)と5例のコントロール血清のIgGが反応する精子抗原を, Western blotting法により同定した. 15種類の異なった蛋白にIgGの結合が認められた. 87.5%の血清は77kdの精子蛋白に反応が認められ, 41.6%の血清は68kdの蛋白に反応が認められた. 男性患者では28kdの蛋白に反応を認めた患者は存在しなかったが, 女性患者の42.8%はこの蛋白に反応が認められた. また, 83, 42, 32, および30kdの精子蛋白は

男性血清との反応は認められなかった. 一方, 女性血清は, 45および38kdの蛋白に反応は認められなかった. 以上, 不働化抗体陽性血清のIgGが反応する主な精子抗原は, 77および68kdの蛋白で, これらは不妊症の病態形成に重要な意義を有している可能性が考えられる. 28kdの精子抗原に対しては, 男性血清と女性血清で反応の差が著明であった.

(受付: 1993年 3月18日)

(受理: 1993年11月12日)

地方部会講演抄録

第35回日本不妊学会北海道地方部会

日時：平成5年2月6日(土)15時00分～

場所：北海道大学学術交流会館

1. GnRHa-hMG療法の臨床的有用性に関する検討

○森下奈緒美, 加藤育民, 高岡康男

玉手健一, 千石一雄, 石川睦男

(旭川医科大産婦)

今回、我々は排卵障害を有する不妊患者に対し、hMG療法を行なう際にGnRHaを併用し、その有用性に関する検討を行なったので報告する。

対象は当科不妊外来においてhMG-hCG療法を行なった症例で、36例、46周期に対しhMG単独療法を、53例、71周期に対しGnRHa-hMG併用療法を施行した。投与方法は、GnRHaは月経周期1日目より1日900 μ gを連日点鼻し、hMGは月経周期3日目より連日150～300IUを投与し、主席卵胞径が16mmに達した時点でGnRHaを中止してhCGに切り替えた。

hMG投与開始日の血中LH値がGnRHa併用群で有意に高い結果が得られたが、その他、hMGの投与期間、投与量、hCG切り替え日における血中E₂値、卵胞数、および妊娠率には有意な差は認められなかった。

2. 最近2年間の当科不妊外来患者の統計的検討

○加藤育民, 片山英人, 森下奈緒美

高岡康男, 玉手健一, 千石一雄

石川睦男

(旭川医科大産婦)

1989年1月より1990年12月までの最近2年間に、当科不妊外来に新規182例が登録された。そのうち、原発性不妊症は117例(64.3%)、続発性不妊症は65例(35.7%)であった。また、各々について、初診時年齢、不妊期間、不妊因子、妊娠例および妊娠成立初期の治療法について検討した。

平均初診時年齢は、原発性不妊症32.3歳(22～44歳)続発性不妊症32.2歳(22～48歳)であった。平均不妊期間は、原発性不妊症4年8ヶ月、続発性不妊症5年3ヶ月であった。不妊因子は、計9因子に分類した。原発性不妊症では、卵巣・内分泌因子(29.9%)、男性因子(20.5%)が多く、続発性不妊症では、卵管因子(36.9%)、機能的因子(20.0%)が多かった。

た。

また妊娠症例数は、原発性では29例、続発性では20例が確認された。

3. 原因不明の習慣性流産における夫婦間HLA抗原系の類似性に関する検討

○岸田達朗, 玉置淳子, 山田秀人

奥山和彦, 佐川 正, 大久保仁

藤本征一郎

(北海道大産婦)

習慣性流産の一因として、患者夫婦間のHLA抗原系の類似性が推察され、多くの報告がなされているが、いまだ結論を得るに至っていない。今回我々はHLA-A, B, C, DR, DRW, DQの各抗原系について流産患者夫婦間の類似性の検討を行なった。

対象は1987年4月より1992年9月の間に北海道大学産婦人科・不育症外来を受診した患者および配偶者の中で、HLAタイピングを行なった94組中、原因不明と考えられる81組とした。対象とする流産患者を以下の5群に分けて検討した。

1群：連続3回以上の習慣性流産患者

2群：連続2回のみの反復流産患者

3群：分娩後に2回の流産患者

4群：分娩後に3回以上の流産患者

5群：連続2回流産した後の転帰が不明の患者

HLA-A, B, C, DR, DRW, DQいずれの抗原系においても各群間で有意な類似性は観察されなかった。

4. 不妊婦人の子宮内膜の検討

○南 邦弘, 金上宣夫, 山本哲三

渡辺広史, 幡 洋, 岡部泰樹

(札幌東豊病院産婦)

近年ホルモン療法の進歩が著しく、また体外受精、殊に顕微受精の開発により男性不妊を含め、全ての不妊治療が解決された観があります。しかし、子宮内膜異常を原因とする不妊に関しては未解明の点が多く、治療に困難を極めます。

今回私達はエコー、ヒステロスコープを用いて子宮内膜異常、主にポリープを不妊原因とする症例について検討しましたので報告いたします。

5. 子宮内膜におけるStromelysin 3の発現について

○藤井美穂, 森 悟子, 井上雄子
田中昭一, 工藤隆一

(札幌医科大産婦)

(目的) 子宮内膜におけるStromelysin 3 (ST3) の発現とホルモンの相関を分析する目的で, 各月経周期における内膜のST3の発現を調べ, さらに内膜腺細胞と間質細胞を分離しST3の発現を調べた。

(方法) 摘出子宮の内膜, および酵素処理後遠心法により分離した腺細胞, 間質細胞を用い, Northern blot法でST3の発現を観察した。RNAの抽出はChomezynski and Sacchiの方法によった。

(成績) 増殖期子宮内膜におけるST3の発現は強く, 分泌期中期以降の子宮内膜では発現を認めなかった。内膜腺細胞と比較し, 間質細胞におけるST3の発現は強かった。

6. ダナゾールと肝底護剤(ウルソデスオキシコール酸UDCA)との併用療法の有用性について

○桜田芳弘, 林 正路, 工藤正尊
藤本征一郎 (北海道大産婦)

今回われわれは, ダナゾール療法開始と同時にUDCAを併用し, GOT, GPTの推移を観察しダナゾールと肝底護剤との併用療法の有用性について検討した。

(研究方法) 対象は1992年1月より当科および関連病院を受診し子宮内膜症と診断され, ダナゾールと肝底護剤との併用療法を受けた17名の婦人である。ダナゾールおよびUDCAは1日400mg, 16週間投与された。投与前, 投与中および投与終了後に自覚症状, 体重, 肝機能, 血清脂質検査および副作用について検査もしくは観察を行ないダナゾール単独療法時の成績と比較検討した。

(成績1) GOT, GPTいずれか一方でも正常値を越えた症例は単独療法群34.0% (18/53), 併用療法群37.5% (6/16)であった。2) GOT, GPT上昇のため投与中止となった症例は単独療法群では投与4週時にGPTが392IU/ℓと150IU/ℓとなった2例であったが, 併用療法群ではGOT, GPTの上昇が軽度であったため中止例は認められなかった。

以上よりUDCAの併用により肝機能障害の程度が軽減され, 投与を中止することなく継続することが可能になると思われた。

7. 腹腔鏡施行中に低酸素脳症を合併した1例

○林 正路, 山本 律, 櫻田芳弘

牧野田知, 藤本征一郎

(北海道大産婦)

近年, 腹腔鏡は単に診断的なものに留まらず, 比較的安全で手術侵襲が少ないなどの利点より, 外科領域における腹腔鏡下胆膵術などの治療的腹腔鏡を含めます普及しつつある。

当科においても子宮内膜症の診断や治療, 不妊症領域における卵管・腹膜因子の精査や癒着剥離, 子宮体部癌のstagingなど, 年間約70~80例程度の腹腔鏡を施行している。

腹腔鏡の重篤な合併症としては, 心停止, 肺塞栓等が, 1万件に2例の頻度で報告されている。今回我々は, 腹腔鏡施行中に合併症として低酸素脳症をきたし不幸な転機を迎えた症例を経験したので報告する。

8. IVF-ETと子宮外妊娠

○東口篤司, 森若 治, 高階俊光
神谷博文 (斗南病院産婦)

'92年1月より'93年12月までの2年間で, IVF-ETのべ数290例のうち59例が妊娠(ETあたり20.3%)したが, 子宮外妊娠はそのうち6例(妊娠あたり10.2%)であった。6例のうち5例が卵管性不妊で3例は両側卵管水腫, 2例は前回片側卵管切除, 他側卵管水腫であった。これらの症例の中には, 採卵後14日目の妊娠反応で陰性を示した症例や同時期に月経様出血を伴ないBBT下降, 低温相の持続を示した症例も認められた。

IVF-ETで子宮外妊娠をひきおこしやすい要因としては, 移植卵数, 移植時のカテーテル内圧など様々なfactorが検討されているが, 上記症例においては卵管内圧の上昇に伴う卵管内-子宮内の交通異常が大きな要因であることが示唆された。また採卵後14日目の妊娠反応陰性やその後のBBT下降は必ずしも妊娠していないことを意味せず, その後の経過を厳密に観察することが必要であると考えられた。

9. 子宮外妊娠の経過の多様性について

○深沢けい子 (ふかざわ病院産婦)

当院開業以来, 約5年間の間に診断し得た外妊8例について, その臨床経過が, 変化に富んでいると思われたので, 比較しつつ報告させていただきます。

まずは, 診断に要した日数が0日~57日と, 非常にバラツキがあったという点であり, 次に尿中hCGレベルが, 最高32,000単位/ℓの症例から, 遂に, 一度も1,000単位/ℓを越えず, 50単位/ℓの頭打ちであっ

た低レベルの症例まで、その差の大きい点、また、出血量が、0 ml～780 mlと、差が開いた点の、3点です。

10. ウシ卵子の体外成熟および受精に及ぼすホルモン添加の影響

○額田紀雄, 菱沼 貢, 高橋芳幸

金川弘司

(北海道大獣医学部畜産臨床繁殖)

成熟培地へのホルモン添加 (FSH 製剤 0.02 AU/ml, E_2 1 μ g/ml) が体外成熟および受精に及ぼす影響を調べた。

卵丘-卵子複合体として媒精した場合、血清無添加成熟培地へのホルモン添加は成熟率および精子侵入率には影響を与えず、正常受精率を有意に高めた。ホルモン添加培地で培養した卵丘-卵子複合体から卵丘細胞を分離あるいは除去して媒精を行なった結果、裸化卵子区の精子侵入率および正常受精率は、卵丘-卵子複合体区および卵丘細胞+裸化卵子区に比べ、有意に低かった。ホルモン添加および無添加培地で培養後、卵子と卵丘細胞を分離し、4つの区を作り、受精率を調べた結果、精子侵入率および正常受精率はホルモン添加培地由来の卵丘細胞の存在により増加した。多精子受精率は無添加培地由来の卵子により低下した。

以上のことから、成熟培地へのホルモン添加により影響を受けた卵丘細胞が体外受精率を向上させることが示された。また、ホルモン無添加培地で成熟させた卵子には、多精子防御機能の低いことが示唆された。

11. マウスの4倍体4細胞期胚胚卵腔へ注入した8細胞期胚単一割球の発生能

○田上貴寛, 鄭 熙泰, 菱沼 貢

高橋芳幸, 金川弘司

(北海道大獣医学部畜産臨床繁殖)

谷口隆秀 (農林水産省先端技術研)

電気融合により作出した4倍体胚を用いて、2倍体8細胞期胚からマウスの一卵性多子の作出を試みた。2倍体8細胞期胚単一割球を顕微操作により4倍体4細胞期胚へ注入した胚(8分離注入胚)の*in vitro*における発生能を調べ、形態的に正常な胚盤胞を受容雌へ移植した。得られた産子については、GPI分析により系統検索を行なった。

8分離注入胚の93～98%が正常の桑実胚または、胚盤胞へ発育し、移植した胚盤胞の10～11%が産子

にまで発育した。1個の8細胞期胚からは、最高3例の産子を得ることができた。7例の成熟産子のうち、1例は軽度の毛色キメラであったが、他の6例は、2倍体胚由来の毛色を有していた。組織別GPI分析を実施した産子10例では、程度の差はあるが、全ての産子で4倍体胚由来細胞の混在を認めた。

12. 野生エゾシカの胎子および卵巣の形態学的観察

○谷口圭二, 菱沼 貢, 高橋芳幸

金川弘司

(北海道大獣医学)

梶 光一

(道環境科学研究センター)

山中正実

(斜里町知床自然センター)

鈴木正嗣

(北海道大歯学)

野生雌エゾシカ63例について、胎子および卵巣の形態学的観察を行なった。

胎子の観察では、2月と4月(それぞれ妊娠4カ月および6カ月に相当)における胎子の平均的な発育状態が明らかとなった。2月の胎子では体毛はなく、体重と全長の平均値はそれぞれ544.7gおよび33.4cmであった。4月の胎子では体毛が観察され、体重と全長の平均値はそれぞれ2123.7gおよび57.7cmであった。さらに、非常に幼若な胎子がいずれの時期でも観察されたことから、交尾可能な期間が長期にわたっていると考えられた。

卵巣では、妊娠の指標となり得る黄体および黄体退縮物に注目した。妊娠例の81.6%において、主黄体の他に1個から7個の副黄体が観察された。尚、非妊娠例では黄体は観察されなかった。黄体退縮物は、結合組織で囲まれた黄色または橙色を呈する構造物として、肉眼的に観察することができた。しかし、閉鎖卵胞および髄質内組織との鑑別は困難であった。

13. ウシ体外受精卵の発育に及ぼす気相およびグルコースの影響

○山本康了, 高橋芳幸, 菱沼 貢

金川弘司

(北海道大獣医学部畜産臨床繁殖)

ウシ体外受精卵をグルコースを含まない修正合成卵管液(SOF)と5.56 mMグルコースを添加した修正SOFを用いて、5%CO₂ in airと5%CO₂-5%O₂-90%N₂の気相下で4日間、39℃で培養した。

その結果、5.56 mMグルコースの添加と5%CO₂ in airの条件はともに桑実胚への発育を阻害した。

ついで、グルコースを含まない修正SOFを用い5

%CO₂-5%O₂-90%N₂, 39℃の気相下で4日間ウシ体外受精を培養し, 5日目からは0, 1.0および5.56 mMのグルコースを添加した修正SOFに胚を移して, さらに2日間培養した。

その結果, 胚盤胞への発育率に差異はなかったが, 1.0および5.56mMグルコースを添加した培地では胚盤胞の平均細胞数(128.3および127.2個)はグルコース無添加(92.4個)と比較して有意に増加し($p<0.05$), 桑実胚以降の発育には1.0~5.56mMのグルコース添加が有効であることが確認された。

14. 未受精卵の凍結保存は染色体異常を誘発するか——凍結ハムスター卵とヒト精子の異種間体外受精法による検討——

○立野裕幸, 上口勇次郎, 美甘和哉

(旭川医科大学生物)

我々の方法で作製した凍結ハムスター卵をヒト精子と異種間体外受精させて, 未受精卵の凍結融解処理が卵や受精精子の染色体および卵のDNA修復能にどのような影響を及ぼすかを調査した。

凍結卵を利用した場合のヒト精子の自然発生染色体異常および変異原(γ 線, ダウノマイシン, プレオマイシン)で誘発された染色体異常の頻度とタイプは新鮮卵利用の場合と同様であった。また, ハムスター卵の染色体異常頻度も凍結卵と新鮮卵で有意差はみられなかった。

以上の結果より, 未受精卵の凍結融解処理が受精後の卵や精子の染色体異常を誘発する可能性のないこと, 凍結融解処理によって卵のDNA修復能は変化しないことが示された。

15. 犬精液の凍結および融解が精子形態に及ぼす影響——特にアクロゾーム異常の走査型電子顕微鏡(SEM)による検討——

○柴田 智, 中尾 茂, 中尾敏彦

森好政晴, 河田啓一郎

(酪農学園大学獣医学)

健康なビーグル種雄犬6頭から採取した11例の精液を用い, 凍結精液作成過程および融解時の精子形態, 特にアクロゾーム形態に及ぼす影響について光学顕微鏡(LM)および走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行なった。

凍結過程における精子生存率およびLMによる精子形態の変化は, 採取直後からグリセリン平衡終了までの間においては著しい変化は認められなかったものの, 凍結融解後には精子生存率は有意に低下し

($p<0.01$), アクロゾーム異常も有意に増加していた($p<0.01$)。融解後の精子のSEMによる観察では, アクロゾームの破裂あるいは脱落を示す精子の他に, LMで正常と見られる精子にもアクロゾームに小胞を形成するものが多数認められた。

以上の成績より, 犬凍結精液では凍結および融解後に著しい生存率の低下と奇形率の増加が認められた, LMでは観察困難なアクロゾーム異常がSEMにより明瞭に観察された。

特別講演

「受精にともなう精子の変化」

星 和彦(福島県立医科大産婦)

受精を首尾よく成就させるため, 精子は周到な準備をする。受精に伴う精子の変化は, 雄性生殖管の中で進行する形態学的変化と射出後雌性生殖管内で起こる機能的な変化に分類される。

1. 精子の形成(形態的成熟)

一連の精子形成過程の中でもっともダイナミックな変化を見せるのはspermiogenesisの段階である。核は密に凝集して独特の形態になり, 核蛋白は体細胞型のヒストンから次第に精細胞型のヒストンに置換され, 最終的にはプロタミンに完全に置換される。プロタミン分子は二重鎖DNAの間隙に入り込み, 強固なS-S結合により独特のside-by-sideのクロマチン配列を形成し, 強固にpackingされる。体細胞に比べて著しく凝縮されたこのクロマチン構造は, 過酷な環境変化からDNAを保護するのに有利である。成熟した精子であれば, 90℃という高温, 凍結乾燥, pH3~10, 高浸透圧(飽和)塩溶液, 100%アルコール等の処理を受けても“発生能”は維持されていることが確認されている。

2. 精子の機能的成熟

雌の体内に射出された成熟精子は運動性は有するが受精できる状態にはない。受精能力を持つためには, 雌性生殖管内でさらにいくつかのプロセスを踏まなければならない。

(1) 受精能獲得

雌性生殖管内で, 精子は先ず“受精能獲得”とよばれる生理的变化を起こす。“受精能獲得”がどのような機序で起こるのかはよく解っていないが, 頸管粘液や卵胞液によって促進されることが最近の研究で明らかにされている。

(2) 先体反応

受精能を獲得した精子は卵に接近して“先体反応”

を起こし始める。“先体反応”の機序もまだよく解っていないが、細胞内外のCa-ionが重要な役割をはたしていること、またin vivoではzona induced acrosome reactionとよばれる透明帯に接着することで惹起される“先体反応”が主体であることなどが解明されてきている。

(3) 精子運動の活発化 “Hyperactivation”

“Hyperactivation”とは受精直前に起こる精子の運動変化で、ヒトでは妊孕力と強い関連性を持つことが臨床的に確認されている。

第4回日本不妊学会春季九州支部会

日時：平成5年4月25日(日) 8時40分～

会場：大分東洋ホテル 久住の間(2階)

1. Autoradiographyによる正常子宮筋および筋腫結節における gonadotropin releasing hormone receptorの局在に関する研究

○山下隆則, 石丸忠之, 山辺 徹

(長崎大産婦)

Gonadotropin releasing hormone agonist (Gn-RHa)は子宮内膜症や子宮筋腫の治療に広く使用されている。

この薬剤の作用機序は下垂体のreceptorのdown regulationによるdesensitizationをひきおこし、性腺からのsex steroid hormoneの分泌を抑制することにある。しかし、1988年Wiznitzerらが子宮筋腫結節のmembraneにGn-RH receptorが存在することを示唆しており、Gn-RHの子宮筋腫への直接作用による治療効果が期待される。

今回我々は、正常子宮筋および筋腫結節におけるGn-RHa receptorの存在の有無を検討するため、 ^{125}I -Buserelinを用いautoradiographyによるreceptor assayを試みた。

正常子宮筋および筋腫結節のいずれにおいても ^{125}I -Buserelinのbinding activityが認められGn-RHa receptorの存在が強く示唆された。また、正常子宮筋のbinding activityは筋腫結節のものより高く、receptor濃度は正常子宮筋の方が筋腫結節のものより高いことが示唆された。

2. 正常ヒト卵巣およびPCOにおける 17α -hydroxylase/C17-20 lyase (P-450 $_{17\alpha}$) と aromatase cytochrome P-450 (P-450 $_{arom}$) の発現についての免疫組織学的検討

○田村尚也, 和氣徳夫 (九大生医研産婦)

P-450 $_{17\alpha}$ およびP-450 $_{arom}$ に対する特異的抗体をそ

れぞれ用い、正常ヒト卵巣とPCOにおける両酵素の発現局在について比較検討した。

正常卵巣ではP-450 $_{17\alpha}$ は内卵胞膜細胞層に、またP-450 $_{arom}$ は顆粒膜細胞層に局在しており、P-450 $_{17\alpha}$ の発現はP-450 $_{arom}$ の発現に先行して認められた。卵巣間質においてP-450 $_{17\alpha}$ は、内卵胞膜細胞由来である卵巣間質腺細胞に認められた。PCOではそのほとんどは閉鎖卵胞であり内卵胞膜細胞層にP-450 $_{17\alpha}$ の強陽性所見を認めたが顆粒膜細胞層にはP-450 $_{arom}$ の染色性は認められなかった。また少数の卵胞で顆粒膜細胞層にP-450 $_{arom}$ の染色性を認めたがその発現様式は正常と異なり不均一な発現様式を示した。卵巣間質には両酵素に対する染色性は認められなかった。

以上PCOでの卵巣性アンドロゲンの供給は主として閉鎖卵胞内卵胞膜細胞と考えられ、また顆粒膜細胞でのP-450 $_{arom}$ の発現は正常と異なっていることが明らかとなった。

3. 体外受精におけるGnRHアナログの投与量の違いおよび投与時期の違いによる比較検討

○永吉 基, 田中 温, 塩見秀明

栗田松一郎, 田中威づみ, 竹本洋一

鷹野和哉, 高崎博幸, 井手紀子

(セントマザー産婦)

(目的) 体外受精・胚移植において、GnRHアナログの投与量の違いおよび投与時期の違いにより、HMGもしくはpure FSHの使用量、卵胞数、採卵数、受精率、分割率および妊娠率にどのように影響するか検討した。

(方法) 月経周期第1日よりGuRHアナログを600 $\mu\text{g/day}$ (Short 600) と、900 $\mu\text{g/day}$ (Short 900) 点鼻し、月経周期3日よりHMGもしくはpure FSHを使用した。また、月経周期第3日よりGnRHアナログを600 $\mu\text{g/day}$ (Short II 600) と、900 $\mu\text{g/day}$ (Short II 900) 点鼻し、同日よりHMG等を使用し、卵胞刺激を行なった。

(結論) 1. Short 600とShort 900では、卵胞数、採卵数、受精数において有意差を認めたものの、受精率、分割数、分割率では差を認めなかった。2. Short II 600とShort II 900では、受精率においてのみ有意差を認め、その他では差はなかった。3. 妊娠率においては、Short 900でやや高い傾向を示した。4. GnRHアナログの1日使用回数を3回より2回に減らすこと、HMG等と同時にスタートすることは、患者への負担を軽減するものと思われる。

4. 当院におけるIVF-ETの治療成績

○蔵本武志, 高崎彰久, 平塚圭裕
森岡 均 (済生会下関総合病院産婦)

当院では平成2年8月よりIVF-ETを開始した。今回平成4年12月までの治療成績について報告をする。IVF-ETは92症例に行ない、症例の平均年齢は34歳、平均不妊期間は8年であった。

主な不妊原因は卵管因子が最も多く、続いて男性因子、子宮内膜症例、原因不明等であった。

卵巣刺激法として主にlongプロトコル法を用い、163周期に採卵を行ない平均採卵数は7.8個、平均受精数は3.6個、採卵当りの受精率は70%であった。114回の胚移植(最大4個まで)を行ない、49例に妊娠を認めた。胚移植当りの妊娠率は43.0%(49/114)、臨床的妊娠率は36.0%(41/114)であった。現在まで16人が出産し、24人(男児11人、女児13人)の新生児が出生した。

(結論) 技術改良を加えることでIVFの妊娠率の向上を図ることができた。男性因子の受精率は不良であり、通常のIVFで受精しない症例に対しては顕微授精の導入が必要であると思われる。

5. 卵管水腫に対するIVF-ET後発生した子宮外妊娠3例について

○新堂昌文, 詠田由美, 森下富士夫
桜井景紀, 馬渡秀仁, 吉満陽孝
白川光一 (福岡大産婦)

IVF-ETにおける子宮外妊娠の発生率は、5～10%程度と報告されている。当教室の子宮外妊娠は、8.3%(3/36)であったが、3例全てが水腫卵管に対するIVF-ET施行例であった。

IVF-ETは福岡大学プロトコルに従い、GnRH併用hMG刺激後採卵し、3～4個の胚を2前核期または4細胞期に移植した。受精後14日目(4WOd)の尿妊娠反応は陰性、以後3例とも子宮内にGSを認めず、下腹痛を伴わない少量の性器出血が持続した。以後血中HCGの高値が持続するため腹腔鏡and/or、開腹術を行ない、外妊と確診し卵管切除術を施行し、血中HCGは全例陰性化した。術後病理検査で水腫部位への着床を確認した。

水腫卵管に発症した外妊例では、自覚症状に乏しく、診断が困難であり、より慎重なfollow upが必要となる。IVF-ETでは複数胚をETしているため、開腹手術時は発症部位はもちろん、対側卵管も含め腹腔内の検索を充分に行なう必要があると思われる。

6. 男性不妊症患者における精液所見と泌尿器科の所見の関連について

○安東桂三, 岩城恵理子, 広津倫江
宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)
緒方俊一 (大分県立病院泌尿器)

不妊外来においてフナー試験不良患者の精液検査をおこなっている。

今回、精液結果がWHO精液基準を一項目でも下回る男性不妊患者について、泌尿器科専門医にて超音波検査・触診・一部に対して造影を行なった。対象者は34名で、その結果、形態的には前立腺周囲の血管の怒張が22例(65%)・精囊腺の腫大20例(59%)・精囊腺の変形23例(68%)・前立腺内の石灰化様陰影8例(24%)・前立腺の圧痛20例(59%)・前立腺の腫脹16例(47%)であった。泌尿器科的診断では、前立腺炎22例(65%)・精囊腺炎13例(38%)・異常無し3例(9%)・その他(陰囊水腫・ヘルニア合併)1例(3%)であった。特に前立腺炎と精囊腺炎の合併については10例が存在した。

これらに関して処方・その他治療を行ないつつ不妊治療も併せて行ない4例の妊娠例が確認された。不妊治療について男性側からアプローチする事により治療成績の向上の可能性が伺われる事が判明した。

7. Sperm Quality Analyzerによる精子受精能の評価に関する検討

○森 明人, 中村佐知子, 沖 利通
竹内一浩, 堂地 勉, 永田行博
(鹿児島大学産婦)

不妊治療において、従来の精液分析だけで精子の受精能を評価することは困難である。

われわれは新しく開発されたSperm Quality Analyzer(SQA:United Medical Systems社)を導入し、精子受精能の新しい評価法として有用か否かを検討した。

対象は当科でIVF-ETを試みた18例で、SQAを用いSperm Motility Index値(SMI値)を測定し、精子濃度、運動率、Penetrak値およびIVF-ET時の受精率と比較検討した。SMI値は精子濃度、運動精子数、運動率と正の相関を示し、受精率との相関も $R=0.748$ であり、Penetrak値と受精率との相関($R=0.694$)よりも高い相関を示した。SMI-Poor群(SMI値80以下)、Fair群(80～160)、Good群(160以上)の受精率はそれぞれ20%(1/5)、85.7%(6/7)、100%(6/6)であった。また通常の精液分析で正常と判定したが、SMI値がPoorで受精しなかったものが2例あった。

SQAは極めて簡便な検査法であり、SMIは精子の受精能を評価する上で有用な指標となりうる。

8. 顕微授精における精子処理法の検討

○高崎博幸, 田中 温, 永吉 基
塩見秀明, 栗田松一郎, 田中威づみ
竹本洋一, 鷹野和哉, 井手紀子
(セントマザー産婦)

(目的) 重症男性不妊症に対して顕微授精が臨床応用されているがその臨床成績はいまだ低値である。その原因として、精子の先体反応、運動性、生存性を十分に検討せずに精子処理を行なっていることが考えられる。今回、我々は顕微授精における妊娠率上昇の鍵となる精子処理法について開発、検討を行ない、有用な知見を得たので報告する。

(方法) K-Ⅲ法で行なった。液化精液をパーコール(3-2-1)で処理後、代謝基準を含まないメEDIUM内の毛細管に充満し、毛細管の両端をワセリン+パラフィンで封入し、高温(40~42℃)、嫌気環境下で15~30分培養した。培養後10%ヒト血清添加HTF内の倍地に注入した。この倍地内の精子の一部にトリプル染色を施行した。

(結果) ①同法施行後の先体正常-生存、先体正常-死滅、先体剥離-生存、先体剥離-死滅の割合はそれぞれ43%-40%-26%-27%であった。②PZDの精子処理法(300万~500万/cc, 30%+~++)以下の場合: パーコール3-2-1で処理後ヒト卵胞液で培養した。プリンスター小球内の精子の運動性がよければ通常の媒精を行ない、運動性が悪ければPZDを積極的に行なった。③SZIの精子処理法(50~300万/cc, 30%(+)以下の場合: パーコール2-1で処理後K-Ⅲを行なった。その後異物を除去する目的でミニパーコール8-単層を追加した。④ICSIの精子処理法(50万/cc, 10%以下): 10%血清添加HTFで遠心後K-Ⅲを行なった。その後異物除去の為にミニパーコール8-単層を追加した。⑤PZD, SZI, ICSIの受精率、分割率、多精子受精率、妊娠率はそれぞれ27%(223/825)-14%(116/825)-14%(116/825)-10%(23/232)-15%(88/587)-12%(70/587)-7%(41/587)-10%(8/81)-11%(15/159)-6%(10/159)-0%-4%(2/51)であった。

(結論) ①K-Ⅲ法は顕微授精において現在のところ最も効果のある精子処理法と思われる。②顕微授精における究極の精子処理法は、生存性を失わずに先体反応を高率に発生し、しかも運動性を保つ方法で、その上それらの性状の変化の度合いをコントロールできる方法である。

9. 運動性を低下させず、高率に先体反応を誘起

する精子処理法の検討

○田中威づみ, 田中 温, 永吉 基
塩見秀明, 栗田松一郎, 竹本洋一
鷹野和哉, 高崎博幸, 井手紀子
(セントマザー産婦)

(目的) 従来精子前培養は37℃で行なわれてきたが、今回我々は先体反応を高率に誘起する目的で、精子前培養の温度を40~42℃に上昇させ、臨床上有用と思われる結果を得たので報告する。この高温精子培養法の好成績はK-Ⅲ法(高温、嫌気環境、代謝基質を含まないメEDIUM)の開発の出発点となった。

(対象) 精子濃度は正常範囲内(1000~3000万/cc)であるが精子運動率が中程度不良(20~40%, 最活発前進運動精子は認めない)な症例で、従来の精子処理法では分割を認めなかった体外受精450例を対象とした。この450症例中特に運動率の低い92症例に対し、透明帯開孔術を施行し、残りの358症例は通常の媒精を行なった。

(方法) 液化精液をパーコール3層にて分離後4~6%ヒト卵胞液で30~60分培養した。この精子浮遊液を40℃-10分, 15分, 25分, 42℃-10分, 15分, 25分の各条件下で培養後、媒精した。この際一部の精子をトリプルステインにて染色し先体反応の有無を観察した。

(成績) ①各種条件下における先体正常-正常、先体正常-死滅、先体剥離-生存、先体剥離-死滅精子の割合はそれぞれ82%-1%-1%-7%, 80%-1%-10%-9%, 70%-3%-14%-13%, 63%-2%-20%-15%, 47%-4%-27%-22%, 43%-2%-25%-30%であった。②通常の媒精における40℃-10分, 40℃-15分, 40℃-25分, 42℃-10分, 42℃-15分, 42℃-25分各条件下の分割率および妊娠率はそれぞれ15%(13/86)-14%(1/7), 18%(86/490)-14%(8/56), 21%(34/163), 9%(2/22), 26%(59/224)-20%(5/25), 24%(247/1022)-25%(32/128), 18%(162/881)-14%(17/120)であった。③透明帯開孔術を施行した症例の42℃-10分, 42℃-15分, 42℃-25分における分割率および妊娠率はそれぞれ17%(3/18)-0%(0/2), 17%(122/699)-11%(6/54), 18%(55/302)-8%(3/36)であった。

(結論) ①精子前培養を高温下にて行なうことにより分割率が上昇し、妊娠率も高くなった。②精子前培養を高温にすることにより、先体剥離、生存精子が増加することがわかった。③精子前培養の至適環境は42℃-15分であった。

10. 閉塞性無精子症に対する精路再建術

——精巣上体精管吻合術——

○瀧原博史, 馬場良和, 石津和彦
鎌田清治, 白瀧 敬, 井本勝彦
内藤克輔 (山口大泌尿器)

閉塞性無精子症のうち, 精巣上体に閉塞性病変が存在し, 精管の通過性が保たれている場合には精巣上体と精管との吻合術の適応になる。

当科では顕微鏡下に精巣上体を尾部から頭部方向に詳細に観察し, 拡張した精巣上体管を縦切開し, 精子流出の確認出来た部位で, 10-0ナイロン糸を用いて精管と精巣上体管とをend to side anastomosisして来た。

対象は, 精巣上体での閉塞と思われる14症例で, 内訳は精巣上体炎後の閉塞2例, Young症候群4例, 原因不明2例, 先天性の閉塞が疑われるもの3例, 過去の精管切断術時に精巣術時に精巣上体で切断された事が疑われる等の既往歴を有するもの3例となっていた。

術後成績は, 吻合術後の精子出現症例10例(71%), 運動精子出現症例8例(57%), 挙児を得たことが確認された症例4例(29%)であった。

11. 重症卵巣過剰刺激症候群に対するドーパミン療法の検討

○中里和正, 照屋陽子, 長井 裕
新川唯彦, 左久本哲郎, 東 政弘
金澤浩二 (琉球大産婦)

重症卵巣過剰刺激症候群(severe OHSS)に対する治療は従来, 十分な補益と蛋白補充が主治療法であった。'92年Ferrarettiらがドーパミンによる治療法を導入し良好な成績を得ている。

今回当科で4例のsevere OHSSに対しこのドーパミン療法を行ない, その治療効果について検討した。4例はいずれも卵管因子, 原因不明因子で体外受精を施行した。その後severe OHSSにて入院管理した。腹水貯留は著明であり, 3例には胸水も認めた。入院直後よりドーパミン $3 \mu\text{g/kg/min}$ で持続注入した。高蛋白食とし, 1日500mlの水分制限も行なった。

開始6時間後より症状の変化があり尿量の増加を認めた。2日以内に全例腹水の減少, 血液濃縮の改善を得た。投与中は重篤な副作用を認めなかった。妊娠成立を3例に認めドーパミン投与日数は平均13日であり, 一方非妊娠例では6日であった。ドーパミン終了後も腹水の再貯留など症状の悪化は認めなかった。

以上よりドーパミン低用量持続注入療法は安全で有用な治療法と思われた。

12. 卵巣過剰刺激症候群に対する低用量ドーパミン療法

○中村佐知子, 沖 利通, 森 明人
堂地 勉, 永田行博 (鹿児島大産婦)

卵巣過剰刺激症候群(OHSS)はhMG-hCG療法の重篤な副作用の一つである。今回, 我々はIVF-ET周期に発生したOHSSに低用量dopamine療法を施行し, 奏功した症例を経験した。

症例は, 30歳。子宮外妊娠で両側卵管切除している。8/6/92挙児希望で当科を初診し両側卵管閉塞の診断でIVF-ET予定となった。12/4/92を最終月経としday3日からhMG150単位を10日間投与し, hCG10000単位筋注後採卵。2日後4細胞期胚4個を子宮内移植した。Luteal supportはprogesterone製剤を用いたが, hCG投与5日後には, 腹部膨満感・卵巣腫大・腹水も認められ, OHSS管理目的で12/25入院した。入院後, Mannitolとdopamine($3 \mu\text{g/min/kg}$)6日間投与により腹水は著明に減少し, 1/4/93には妊娠反応陽性になり, 軽快退院した。

このように, OHSSに対する低用量dopamine療法は有用であるが, その作用機序や適応・安全性等について考察する。

13. OHSSに続発し, 男化徴候を呈した巨大卵巣嚢胞の一例

○河野哲郎, 大場 隆, 田代浩徳
中村正也, 片瀟秀隆, 松浦講平
岡村 均 (熊本大産婦)

今回我々は, OHSSに続発し, 左卵巣腫大が妊娠中も持続し, 妊娠中期からは男化徴候を呈した症例を経験した。

症例は27歳の初産婦でclomid-hMG-hCG-AIH療法によって妊娠が成立したが, OHSSの診断にて当科に入院した。安静, 電解質液輸液で腹水, 血液の濃縮は改善したが, 上腹部に $26 \times 18 \times 6 \text{cm}$ の緊満感を欠く嚢腫様の構造を認めた。その後の妊娠経過は順調であったが, 妊娠16週頃よりacne, 声の低音化を認め, 更に36週頃よりclitoromegalyが出現した。血中テストステロン値は妊娠経過に伴い上昇した。妊娠39週5日, 自然陣痛発来し, 2550gの男児を出生した。産褥5日目に開腹術を行ない, 360° 捻転した9240gの左卵巣嚢腫を摘出した。卵巣は全体に嚢腫状であったが, 壁は肥厚し, 間質の著名な浮腫を伴

っていた。

Massive edema of the ovaryは、卵巣間質の浮腫による著名な卵巣の腫大を特徴とし、男化徴候を伴う極めて希な疾患であり、その病因を考える上で貴重な疾患と考える。

14. 早発卵巣不全における卵の存在の非観血的確認の試み——GnRHa投与後の内分泌動態から——

○河野康志, 植原久司, 宮村研二

江藤靖子, 広田佳子, 宮川勇生

(大分医科大産婦)

これまで早発卵巣不全症例に対しGnRHaを投与し卵の非観血的確認の検討を報告してきた。今回、GnRHa投与中止後の内分泌動態から卵の存在の指標となる因子を検討した。

対象はhypergonadotropic hypogonadismを呈した8症例で消退出血開始後3日目より4週間GnRHaを投与した。その投与中止後4～6週間、毎週LH, FSH, E₂を測定し、この経過中、E₂が50pg/ml以上の値をとった上昇群(I群)4症例と、非上昇群(II群)4症例との間で、各群のLH, FSH, E₂の動態を検討した。LH, FSHはII群がI群に比べ高値傾向を示し、特に、投与終了後、FSHは14日後、LHは28日後に有意差(P<0.05)を認めた。E₂はI群がII群に比べて高値であり7日後、14日後に有意差(P<0.05)を認めた。

GnRHa投与後のLH, FSH, E₂動態は卵の非観血的確認の指標として有用であり、特に、E₂値は卵の存在および排卵の可能性、そして確認の鋭敏な指標となり得ることが示唆された。

15. 夫リンパ球を用いた免疫療法により抗核抗体陽が陽性化した症例に関する検討

○河野雅洋, 石丸忠之, 山辺 徹

(長崎大産婦)

田川博之 (長崎市民病院産婦)

当科では1987年7月より原因不明の原発性習慣流産患者を対象とし、夫リンパ球を用いた免疫療法を行なっている。

現在までに26例に施行し、21例が免疫療法後に妊娠した。妊娠例の内訳は、挙児成功14例、流産4例、子宮外妊娠1例および妊娠継続中2例である。免疫療法を施行した26例の抗核抗体は、治療前にはすべて陰性であったが、治療後には3例(11.5%)が陽性となった。抗核抗体は、免疫療法終了後2週間目には陽性化し、その後半年以上経た時点においても

陰性化せず、一過性のものではないと推察された。陽性化した抗核抗体は、FANAまたは抗ssDNA抗体のみであり、抗体価も小さいことから、臨床的に問題となることは少ないと思われるが、長期的な影響は不明であり、今後定期的な経過観察が必要であると考えている。

免疫療法の治療成績は良好であるが、抗核抗体陽性化の誘因となりうる可能性もあり、その適応は限定しなければならないと思われる。

16. 当院における不育症患者へのリンパ球移植および低用量アスピリン療法の効果についての検討

○栗田松一郎, 永吉 基, 塩見秀明

田中威づみ, 竹本洋一, 鷹野和哉

高崎博幸, 井手紀子, 田中 温

(セントマザー産婦)

平成2～4年までに当院で夫リンパ球移植治療を行なった原因不明の原発性反復流産患者について、次回妊娠の経過を調査した。

(1) 2回連続流産(A群)の場合、36例中31例が妊娠後期あるいは分娩まで至った。3回以上連続流産(B群)では21例中18例(85.7%)の妊娠維持率が得られた。(2) リンパ球治療後に体外受精で妊娠した症例はA群で3例、B群で4例あり(体外受精による流産の症例も含む)、今回の調査では7症例ともに分娩あるいは妊娠後期に至っている。(3) 抗リンパ球抗体の陽性化と次回妊娠の成否との間には正の相関関係を認めなかった。(4) 自己免疫異常による不育症症例として、4回連続流産のSLE患者に対し、プレドニゾロンと小児用パフファリンを投与、ループスアンチコアグランドの陰性化等、異常検査値および症状の改善後に妊娠を許可したが、次回妊娠も枯死卵となった。

17. 子宮外妊娠に対するPGF_{2a}局所投与による臨床効果の検討

○小池弘幸, 渡辺裕之, 戸枝通保

野田俊一, 松浦千治郎, 川口日出樹

植田一英, 池ノ上克

(宮崎医科大産婦)

近年、子宮外妊娠の診断技術の向上に伴い、腹腔鏡下の保存的療法が報告されるようになった。腹腔鏡下の保存的療法には、Methotrexate(MTX)が主に使用されており、その他にProstaglandin(PG)、高張グルコース液、生理的食塩水などが使用されている。

MTXは低用量でもショックや骨髄抑制といった副作用があり、また卵や染色体に与える影響については、不明な点が多い。そこで今回、我々は子宮筋収縮剤である Prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) を子宮外妊娠の保存的療法として12症例に使用して、その臨床効果を検討したので報告する。

腹腔鏡は、全例硬膜外麻酔下に行なった。18ゲージの穿刺針を使用して、卵管または卵巣の胎嚢部に PGF_{2a} 0.7～5.0mg を分割注入し、妊娠黄体には、estrogen 10mg を注入した。12例中10例は、保存的療法のみで軽快退院したが、hCGが高値を示した2例はさらに開腹術を要した。

今回の結果から、本来の適応として、1) 未破裂の子宮外妊娠であること。2) 胎児心拍動を認めないこと。3) conceptusの最大径が3cm未満であること。4) 血中hCGおよび尿中hCG値が、それぞれ5000mIU/mL、4000IU/L以下であること、などが適応と思われる。

18. 子宮筋腫摘出術時における癒着防止法の検討

○新納直久，緒方りか，井村睦規
野崎雅裕，佐野正敏，中野仁雄

(九州大産婦)

子宮筋腫摘出術や子宮形成術の際には、術後の腹腔内癒着が問題となる。文献的な癒着防止法としては腹腔内薬剤投与方法、大網移植法、再成セルロース膜を用いた癒着防止法等があるが、当科では子宮表層の縫合に吸収性のmono-filament糸による連続縫合とフィブリン接着剤の使用を行ない顕著な癒着防止法効果を認めている。

今回は、その代表的な1症例を提示する。症例は31歳の既婚婦人で不妊と過多月経を主訴に来院した。血中Hb=8.7g/dlの貧血と子宮卵管造影法により子宮腔内に突出した径3.5cmの腫瘍を認め原発性不妊症および粘膜下筋腫と診断された。子宮筋腫核出術の適応となり子宮底部の縦切開による筋出摘出術が行なわれた後、粘膜層は一層の連続縫合筋層は三層の連続縫合を行ない、表層はmono-filament糸による広間膜の連続縫合に加え、フィブリン接着剤を塗布した。

術後7日目に腹腔鏡検査を行なったが腹腔内や子宮創面には癒着は認められなかった。

19. 不妊症における腹腔鏡検査

——卵管采について——

○宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)

不妊症診療において卵管の機能については不明な

点が多い。今回、当院で開院以来5ヶ月間に行なった腹腔鏡検査の結果、興味ある成績が得られたので報告する。

対象は71例で平均年齢31.5歳、平均不妊期間5年5ヶ月であった。それらに対し、腹腔鏡検査を行ない、その後、妊娠に成功した16例、いまだ妊娠していない55例について、子宮内膜症(EM)の有無、卵管采の形態について比較した。

その結果、平均年齢、平均不妊期間には差はなかった。EMは妊娠群、非妊娠群ともに75%の症例に見られた。またr-AFSスコアは妊娠群では5.3点、非妊娠群9.7点と妊娠群がやや低値を示した。また卵管采の形態を正常婦人の卵管采の大きさに比較してみると、妊娠群では正常の大きさの30%程度以下の例が16.7%であったのに比べ、非妊娠群では32.7%で、非妊娠群の卵管采は小さい例が多く、卵のPick-up能力の問題が考えられた。

20. 不妊症患者に対する意識調査に関する検討

○曾根崎とし子，足達明子，麻生佳枝
宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)

当院において、不妊外来の患者に対して、不妊治療を如何に行なっていくかの指標とするために、外来患者に対してアンケートを通じて意識調査をおこなった。

対象者は当院不妊外来に来院した患者とし、無作為に165夫婦を抽出し、選択方式(一部意見記入)にて、家族構成・職業別・治療歴・人工授精/体外受精に関する意識・その他で行なった。

ほとんどが核家族化された家庭(夫婦2名)構成であるにもかかわらず、専業主婦の占める割合が38%(パート・無回答を加えると72%)と高く、また当院以外での不妊症治療歴については71%あった。人工授精/体外受精の容認については、それぞれ妻が97%，87%，夫が76%，68%であり、夫婦間に意識の違いが存在した。これらの点を中心に最近の不妊症患者の不妊治療に対する意識について考察する。

特 別 講 演

「私の精子免疫研究の軌跡」

磯島晋三(前兵庫医科大学産婦人科教授)

私の抗精子抗体の研究は、モルモット精巣組織で雌モルモットを強力に免疫すると血中に抗精子抗体が産生されると同時に不妊になるという結果を、1959年Scienceに発表した時に始まる。

その後、原因不明不妊婦人血中に、補体依存性精

精子不動化抗体(SI-Ab)を発見したが、この事実を国際的に認めて貰う迄に約10年かかっている。既婚婦人は、精子抗原に対していろいろな抗体を産生しているが、その中で不妊に関係するのは、精子不動化抗体のように受精障害を起こすものだけで、原因不明不妊婦人の約13%に見出すことができる。

単クローン抗体を用いて対応精子抗原を解析した結果、精子不動化抗体は殆どが糖鎖エビトープに対するもので、最近3-0ガラクトース基を持つ糖脂質に対応することが判明した。従って、自己免疫抗体の一種である可能性が高く、生まれつきすでに精子抗原糖脂質に反応するT細胞クローンを持っている婦人が精子との接触によって、そのT細胞クローンが増殖した結果、精子不動化抗体を産生するようである。

1993年日本不妊学会北陸支部学術総会

日 時：平成5年5月29日(土)13時45分～

場 所：金沢シティモントホテル

1. Decapitated spermatozoa の1例

○風間泰蔵，高峰利充，酒本 護
布施秀樹，片山 喬

(富山医科薬科大泌尿器)

佐竹紳一郎，舟本 寛，館野政也

(富山県立中央病院産婦)

(症例) 30歳，男性。主訴：不妊。既往歴・家族歴：特記すべきことなし。現病歴：昭和63年10月，28歳で結婚。以後2年間妻の妊娠が見られないため，平成2年12月1日当科を受診した。妻には婦人科的な異常は認められなかった。現症：体格栄養中等度。恥毛は男性型であり精巣は左右とも26mlと正常大であった。前立腺にも触診上異常は認められなかった。

(検査所見) 血中各種ホルモン検査では，LH 2.9mIU/ml，FSH 4.4mIU/ml，テストステロン 4.4ng/ml，プロラクチン 4.3ng/ml と正常。精液検査は，4回施行し，精子数は $117 \sim 280 \times 10^6/m$ ，運動率 63～92% と正常であり精子直進性も良好であったが，その形態はいわゆる pin head を有するものが90%以上を占めていた。また，頭部のみの精子も少数認められた。hypoosmotic swelling testでは，膨化率(g型)は14%，膨化率(b～g型)は74%であり，尾部細胞膜機能には異常はないものと考えられた。精液の透過電顕所見では，中間部近位部の pin head 様膨大は細胞質であった。この細胞質の膨大を除いては80%以上の頭部離断精子は正常の尾部構造を示していた。分離した頭

部にも，種々の異常が見られたが，最も正常に近い場合でも基底小板は発達していなかった。本例はその後富山県立中央病院産婦人科に紹介の上，体外受精の方向で治療を検討していたが，その検査中に妻に自然妊娠を見た。

文献上，ヒトで頭部と尾部の離断した精子が大多数をしめる症例は9例報告されているが，妊娠に至った症例は自験例が初めてである。また本奇形の発生機序に関しては，本症例の頭部離断精子に近位中心体が含まれていることから，Baccettiら(1984)の症例と同じであると思われるが，確定には精巢生検が必要である。

2. 当科における Klinefelter 症候群の臨床的検討

○天野俊康，徳永周二，打林忠雄

大川光史

(金沢大泌尿器)

1985年1月より1993年4月までの8年4カ月間に，染色体検査にて Klinefelter 症候群と診断された15例につき検討を加えた。

その結果，染色体の核型は，14例が47,XXYであり，1例のみが46,xy/47,XXYt(21q,11q)とモザイクを示した。初診時年齢は，2歳から51歳であり，小児例では停留精巣の精査中に，20歳代前半では外性器などの身体的異常を，20代後半から30歳代では不妊症を，それ以上では他疾患の精査中に本症候群と診断された。

不妊症を訴える無精子あるいは乏精子症症例には，必ずしも染色体検査を施行しておらず，本症候群を見逃していた可能性も否定できず，今後本症候群を念頭に置き染色体検査を積極的に施行すべきであるとする。内分泌学的には，テストステロンは成人例では77%が低値，LHは58%が高値を示したが，FSHはモザイクの1例以外はすべて高値を示した。精巣容量は，全例小さかった。成人症例の8例に精液検査が施行されたが，いずれも精子は認められなかった。精巣の病理像は，いずれも精細管には Sertoli 細胞のみで，萎縮，繊維化および硝子化を認め，間質では Leydig 細胞の増殖が認められた。

これらの所見は従来の報告と同様であり，最近ではテストステロン分泌にさらに悪影響を及ぼしかねない点を考慮して，Klinefelter 症候群と診断された症例には，原則として精巢生検は施行してない。合併疾患は，停留精巣，多指症，痴呆，痙性対麻痺，脊髓空洞症，非ホジキン病などが認められた。治療に関しては，成人例のうち7例にテストステロンの補充療法が行なわれた。挙子希望者3例にはAIDを依

頼し、1例の配偶者に妊娠が確認された。

3. マウス会陰皮膚メラノサイトの分化発生に及ぼすアンドロゲンの影響について

○生水真紀夫, 村上弘一, 打出喜義

橋本 茂, 荒木克己, 赤祖父一知

(金沢大産婦)

雄マウスでは、会陰の真皮中層に多数の色素細胞が存在するが、雌では殆ど見られない。今回、この色素細胞群が胎性期にアンドロゲンに依存して発生・分化してくることを確認したので報告した。

妊娠13-18日の母ラット(CH3/He)にtestosterone propionate (0.5mg), flutamide (150mg/kg), またはfinasteride (320mg/kg)を連日投与した。妊娠19日目に胎仔の会陰真皮を採取してDOPA・メラニン染色を施した後、whole mount標本または5mの切片標本を作成した。雄では、真皮中層に多数の色素細胞が観察された。これらの色素細胞は、肛門前方を中心とする同心円状の配列(concentric arrangement, CA)を示し、その中心部で最も細胞密度が高くなっていた(prenatal accumulation, PA)。雌では、色素細胞数が少なくCA・PAは見られなかった。Testosterone propionate投与を受けた雌胎仔では、色素細胞が増加しCA・PAが出現した。Flutamideまたはfinasteride投与を受けた雄胎仔では色素細胞が減少してCA・PAが消失した。アンドロゲンレセプターの欠損した雄(Tfm)では、色素細胞数は雌より少なく、CA・PAも観察されなかった。妊娠14日の胎仔会陰皮膚を10%FBS加Ham'sF12中で90時間培養して、誘導される色素細胞数を検討したところ、雄・雌・Tfm雄ではそれぞれ胎仔1匹あたり $85 \pm 16 \cdot 75 \pm 11 \cdot 13 \pm 4$ 個であったのに対し、25nMのtestosterone存在下ではそれぞれ $170 \pm 38 \cdot 171 \pm 33 \cdot 15 \pm 5$ 個であった。

以上より、マウス会陰真皮中層の色素細胞は胎性期後半に内因性のアンドロゲンに依存して発生・分化してくるものと考えられた。

4. ペネトラック精子貫通能テストの検討

○羽根淳治, 鄒 麗, 福岡秀昭

丹野治郎, 吉田勝彦, 井浦俊彦

高林晴夫, 桑原惣隆

(金沢医科大産婦)

不妊因子の中で精子と頸管粘液の不適合は重要な問題であり、従来より精子頸管粘液適合試験としてHühner test, Miller-Kurrock testやKremer testなどが行なわれているが、最近臨床応用が可能となったペネ

トラックテスト(セロノ社)を検討したので報告する。

(研究方法)最近、当科不妊外来を訪れた不妊症配偶者である34±8歳の男性27名を対象として精液分析を約1週間の禁欲後に行なった。ウシ頸管粘液を用いた精子貫通試験(ペネトラック)を用いて精子貫通能の評価を行なった。精液分析の結果、27名中9名に正常精子、7名に奇形精子症、11名に精子過少症が種々の程度で見られた。精液分析の最も重要なパラメータすなわち、精子濃度、精子形態、精子運動能を精子貫通能と比較した。

(研究結果) ペネトラックテストの結果は直進運動性と最も高い相関があり($r=0.68$)、続いて全運動率($r=0.62$)、精子数($r=0.61$)、正常精子率($r=0.51$)、と相関があった($P>0.01$)。正常精子のグループ中2例に粘液中での精子貫通判定保留が見られた。精子数と精子運動性が正常であった8精液標本をswim up法にて処理し、ペネトラックテストの改善率を高めて、IVFに使用した。正常な精子貫通能(>30mm/90分)を持つ患者6名が受精したが、精子貫通能が30mm/90分以下であった2名の患者では受精しなかった。

(結論) ペネトラックテストは従来の方法では不明な精子の運動性障害が検出可能であり、精子運動能を短時間で簡単かつ客観的に判断できるものと思われる。

5. 前媒精Gift (P.I.Gift) 法における成績と semen analysis (CASA) による妊娠成功の予測

○加藤 修, 道倉康仁, 高塚亮三

(永遠幸マタニティクリニック)

1984年R.H.AschがGift法の成功を報告以来、本法は原因不明不妊、乏精子症の有用な治療法として使われてきた。

しかしながら全麻下腹腔鏡手術の煩雑に加え、体外受精胚移植法の成功率の上昇により、本法を行なう施設が減少してきたのも事実である。

我々は、恥骨上縁横切開による(1.5cm) minilaparotomic Gift法を考案、従来のサンドイッチ法でなく前媒精法にて高率(55.8%)の成功を得たので報告する。

同時にCASAによる精子受精能の解析、ならびに採取卵のgrade等を考慮した良好条件下で行なった本法では14症例中11症例(78.6%)の成功を得た。

今後更に適応条件の検討を行なえば、その成功率を限りなく100%に近づける事が可能と思われ、長期の原因不明不妊夫婦には、朗報になり得ると信ずる。

6. 細胞質内精子注入法 (ICSI) の臨床実施報告

○高塚亮三, 道倉康仁, 加藤 修

(永遠幸マタニティクリニック)

10個以下の注入精子数による卵卵腔内精子注入法 (SZI) では受精の得られない7症例について, 細胞質内精子注入法 (ICSI) で受精を試みたので報告する。

対象は1993年5月までに当院でICSIが実施された男性不妊因子を有する7症例でいずれも重篤な精子無力症であり, そのうち5症例は乏精子症でもあった。6症例の女性患者に対してはGn-RHa+hMGで, 残り1症例に対してはクロミフェンで過排卵処理を行なった。注入精子には三層パーコール法で洗浄した精子を用いた。1症例については, パーコール法で洗浄した精子を1000V/cmの電場で2.5ミリ秒間暴露した後, 1mg/mlのペントキシフィリン処理を施したものをICSIに供した。ICSIは透過型ノマルスキー微分干渉装置を備えたオリンパスIM-IIにナリシゲの三次元ジョイスティック油圧四方向マイクロマニピュレーターを装着したものをを用いて行なった。胚移植は採卵50時間ないし55時間後, トワコウ法で行なった。

7症例中2例については, 20~30精子を注入することにより, SZIでも受精が認められたが, 精子不足のためICSIも試みた。ICSIでの総受精率は41.2% (21/51)であった。電気パルス照射後, ペントキシフィリン処理した精子を用いた1症例の受精率は46.2% (6/13)と向上したが, 無処理の6例の総受精率39.5% (15/38)との間には統計学的な有意差はなかった。

7症例中1例で妊娠し, 6週5日で心拍動確認もその後拍動停止, 流産と終わった。SZIで10個以下の注入精子数で受精が認められない症例についてはICSIが奨励される。この際, 精子および卵子の賦活化も妊娠成功率を向上させる重要な因子となると考えられる。

7. 妊娠を契機に改善されたPCOの3症例

○久保 真, 小辻文和, 富永敏朗

(福井医科大産婦)

我々は妊娠を契機として臨床的に改善したと思われるPCOを3例経験したので臨床経過と妊娠前後の卵巣形態, 内分泌動態の変化を紹介する。

3症例ともにLH基礎値, LH/FSH比, アンドロゲン値は上昇しており卵巣形態も典型的なPCOパターンを呈した。症例1はクロミフェン療法や卵巣楔状切除に対しては無反応であり, GnRH-pFSH/hCG療法

により妊娠, 生児を得た。妊娠後には卵巣形態の改善とアンドロゲンの低下を認め, クロミフェン単独にて排卵, 妊娠した。症例2もクロミフェン療法や卵巣楔状切除が無効であり, GnRH-hMG/hCG刺激下にIVF-ETにて妊娠した。この妊娠は23週で早産に終わったが, 以後卵巣形態の正常化が観察され自然排卵が回復して妊娠した。症例3はクロミフェン療法等により2回の妊娠を経験している。初回は8週で流産し, 2回目は正常産であった。正常産後に初めて卵巣形態の正常化が観察され, クロミフェン療法にて妊娠した。

以上, 妊娠がPCOに好影響をもたらすことが示唆された。このメカニズムについては妊娠中上昇したエストロゲンとプロゲステロンがゴナドトロピン分泌低下をもたらす結果, 莖膜細胞機能が抑制されることが主因と推察される。また, 妊娠中上昇するIGFBPやSHBGも好影響を与えるものと思われる。

8. 当院における腹腔鏡症例の検討

○舟本 寛, 大口昭英, 佐竹紳一郎

小嶋康夫, 中野 隆, 館野政也

(富山県立中央病院産婦)

近年, 腹腔鏡は婦人科領域において検査および治療の手段として不可欠なものとなってきている。当科では昭和61年より腹腔鏡を実施しており, 平成4年5月までに203例に達している。当初は子宮外妊娠の確定診断が主であったが, 最近では不妊症症例が増加し, 平成2年10月からはGIFTにも使用している。203例の適応は不妊症が108例と最も多く, 次いで外妊の確定診断33例, GIFT29例, その他33例であった。

不妊症108例のうち機能性不妊が45例 (42%)と最も多く, 次いで卵管不妊44例 (41%), 子宮内膜症の疑い15例 (13%), 月経異常が4例 (4%)であった。機能性不妊45例のうち19例 (42%)に子宮内膜症, 14例 (31%)に卵管・卵巣周囲癒着が発見された。骨盤内に異常が認められなかったのは12例 (27%)であった。HSG, 付属器手術の既往などにより卵管不妊を疑った44例のうち, 卵管閉塞, 卵管水腫, 卵管・卵巣周囲癒着をみとめたものは31例 (70%), 子宮内膜症9例 (21%), 異常なし3例 (7%), 観察不能1例 (2%)であった。臨床的に子宮内膜症が疑われた15例のうち13例に内膜症が確認された。不妊症108例のうち41例に子宮内膜症を認めたが, R-AFS分類による期別はI期17例 (41%), II期4例 (10%), III期9例 (22%), IV期11例 (27%)であった。腹腔鏡施行後の予後では

不妊症例108例中28例(26%)に妊娠が成立した。妊娠成功例中腹腔鏡下に癒着剥離術を施行した症例は8例、自然に妊娠した症例9例、チョコレート嚢腫の吸引やblue berry spotの凝固を行なった症例が5例、IVF-ET、GIFTを施行したものは6例であった。

またGIFTは29例に施行したが8例(28%)に妊娠が成立した。

9. HSGとLaparoscopyとの対比

○仙田 享, 小辻文和, 富永敏朗

(福井医科大産婦)

(目的) 腹腔鏡検査は、有用な不妊症検査法の一つであるが、全例に行なうことは難しい。そこで、HSGをスクリーニングとしてまず行ない、腹腔鏡検査が必要か否かを判断できないかと考え、当教室の過去10年間にその両方を施行した患者について検討した。今回はPreliminary Reportとして両者の所見の不一致について報告する。

(方法) 原発性不妊症32名、続発性不妊症13名、子宮内膜症3名の計48名を対象に、卵管通過性、卵管溜水腫、卵管周囲癒着、卵管采癒着についてHSGと腹腔鏡の所見を比較検討した。

(結果) ①HSGにて卵管通過性を認めた53例中、11例(21%)は腹腔鏡で通過性を認めず、HSGで通過性を認めなかった29例中、7例(24%)には腹腔鏡で通過性を認めた。②HSGにて卵管溜水腫を認めた7例は全て腹腔鏡でもこれを認め、HSGで卵管溜水腫を認めなかった66例中3例(4.5%)に腹腔鏡で卵管溜水腫を認めた。③HSGにて卵管周囲癒着の疑いと診断した3例は全て腹腔鏡でこれを確認できたが、疑い無しと診断した65例中9例(14%)には腹腔鏡で癒着を認めた。④HSGにて卵管采癒着の疑いと診断した10例中4例(40%)は腹腔鏡では癒着を認めず、HSGで疑い無しと診断した45例中5例(11%)に腹腔鏡で癒着を認めた。

(結論) 今回の結果では、両検査法の不一致例が卵管通過性、卵管周囲および卵管采癒着の項目で多く認められた。今後、症例を重ね、腹腔鏡検査施行前にスクリーニングとしてHSGを活用するために、その施行法や判定法、更には他の検査法との総合的評価について検討したい。

10. 不妊症患者における腹腔鏡下手術の検討

○結城浩良, 副田善勝, 脇 博樹

新居 隆, 泉 陸一

(富山医科薬科大産婦)

(はじめに) 不妊症患者に対して施行した腹腔鏡下手術の経験から、その治療的意義について考察したので報告する。

(対象) 平成4年8月より平成5年3月の間に診断的あるいは治療的腹腔鏡を施行した不妊症患者19例である。子宮内膜症が存在した6例に対して、チョコレート嚢胞核出、病巣の凝固、蒸散を施行した。卵管性不妊に対し、卵管形成術(開窓術)、卵巣や卵管の周囲癒着剥離、卵管大量通水を試みた。POFが疑われる卵巣性不妊に対し、生検を施行した。男性因子および原因不明の症例に対しては、観察のみにとどまった。

(結果) 子宮内膜症に対するチョコレート嚢胞核出、病巣凝固・蒸散、癒着剥離を施行した例では、全例治療効果が期待できるものと考えられ、うち1例が妊娠しているが、術後経過観察期間は1~5ヶ月と短いため、不妊症に対する治療効果についての評価はまだできない。卵管疎通性が悪かった4例に対して大量卵管通水を行なったところ、2例は卵管の疎通性は良くなった。子宮内膜症以外に腹腔内癒着があった4例に対し、癒着剥離を施行し、2例は卵管の疎通性は良くなったが、2例は疎通性は不良のままであった。

(考察) 我々の少数例の経験から考察すると、子宮内膜症が不妊の原因と考えられる症例に対しての腹腔鏡下処置は、ホルモン療法に比べ、確実性に富み、治療に要する期間がはるかに短いため、臨床的価値は高いものと考えられる。卵管性不妊に対する腹腔鏡下手術は、限られた症例にのみ適応があると思われる。他の治療法も含めた多角的なアプローチが必要であろうと考えている。また癒着剥離術は、術後の再癒着を検討していないので、考察は困難だが、一般に腹腔鏡下手術における新しい癒着の発生は少ないと言われている点で、ある程度の効果は期待してよいと考えている。

特 別 講 演

「ウシの射精反射機構に影響する要因」

泉 徳和(石川県農短大家畜繁殖)

ウシの射精反射機構に影響する要因として、高位の中樞である大脳皮質と関係する刺激、あるいは陰莖の局所からの求心性刺激が考えられる。

大脳皮質と関係する刺激のうち、聴覚的刺激では、発情雌ウシの鳴き声は雄ウシの乗駕や射精までの性的反応時間を短くし、促進的に働き、トラクタの騷

音は概ね抑制的に働く。しかし、雄ウシに対して激励的、催促的な怒声を浴びせると、抑制的に働く場合と、促進的に働く場合がある。怒声が促進的な場合は、自己抑制されていた乗駕、あるいは射精反射が突発的に解除されたものと考えられる。嗅覚的刺激として、発情期の頸管粘液は、乗駕までの性反応時間に対し概ね影響を及ぼさないが、一部短縮し、一部、フレーメン反応で延長する。人為的な乗駕抑制は約7割の雄ウシ群に有効であり、2割弱の群では無効である。しかし、残り1割強の群では精液量が少なく、精液性状は劣っている。最後の群は採取場に到着するまでの一連の視覚的現象が条件反射的に性的刺激に組み込まれたと考えられる。従って、採取場に到着後の乗駕抑制は、過剰な刺激となり、中枢神経系を過剰に興奮させ、保護的抑制作用を働かせ、生殖器機能を減退させたと推察される。

マッサージ法や表面麻酔、あるいは部分的表面麻酔により、ウシの射精反射をもたらし神経終末が亀頭の粘膜上皮に存在することを明らかにした。鍍銀染色で、太い神経繊維を源に、粘膜固有層から乳頭層に進入後、各先端に銀好性の終末板を備えた約10本の細い神経繊維に分歧させた特殊な終末を発見した。この終末は他の動物やウシ陰茎の他の部分には発見されていないので、ウシの特異な射精反射をもたらし神経終末であると考えられる。

第108回 日本不妊学会関東地方会

日時：平成5年7月3日(土)午後2時～

場所：高崎ワシントンホテル11階ワシントンホール

1. 停留精巣術後の血清FSHとインヒビン値

○川田敏夫, 小野芳啓, 山中英寿

(群馬大泌尿器)

長谷川喜久

(群馬大学産婦)

停留精巣術後のSertoli細胞機能を調べる目的で血清インヒビン値をRIA法にて測定した。対象はインヒビン値が測定できた片側停留精巣術後17例である。手術年齢は 9.5 ± 6.9 歳(平均 \pm SD)検査時年齢は 27.1 ± 7.0 歳であった。またコントロールとして検査時年齢 27.3 ± 4.8 歳の正常健康男子26例のインヒビン値を測定した。停留精巣術後の血清インヒビン値は無精子症(4例)のみ低下を認め、乏精子症(4例)、正常精子濃度(9例)ではコントロール群と有意差は無く、Sertoli細胞のインヒビン分泌能は乏精子症でも保たれていた。またFSHとインヒビンは相関係数

$r=0.549$ で負の相関を示し、FSHのnegative feed back機構にインヒビンが関与している事が示唆された。

2. メタロチオネインのヒト精子 nuclear chromatin decondensation (NCD) に対する抑制効果について

○鈴木孝憲, 山本昭子, 今井強一

山中英寿

(群馬大泌尿器)

中嶋克之

(日本抗体研)

木村正己

(産医研)

正常4例、不妊10症例の精子をKvistらの方法により1% SDSまたは1% SDS+1.5mM 亜鉛溶液にメタロチオネイン(MT) 0.75, 7.5, 75, 750 μ g/mlを加え、37℃, 1時間反応させ、NCD頻度を位相差顕微鏡で観察した。正常精子および不妊精子は1% SDSにより有意に膨潤し、亜鉛添加でNCDは抑制された。不妊精子NCD頻度は正常精子NCD頻度より有意に低値であった。正常精子NCD頻度は1% SDS+MT7.5, 75, 1% SDS+1.5mM+MT750で有意に低値であった。不妊精子NCD頻度は1% SDS+1.5mM Zn+MT7.5, 75, 750で有意に低値であった。前立腺液中のMTは精子NCD抑制因子の1つと考えられた。

3. 凍結精子の蘇生率の向上——ペントキシフィリン添加と希釈融解法について——

○兼子 智, 郡山 智, 吉田丈児

斉藤 優, 原 利夫, 泉 康史

小田高久

(東京歯科大市川総合病院産婦)

黒田優佳子, 小林俊文, 野澤志明

(慶応義塾大産婦)

精子凍結保存液中のグリセリンは、その高浸透圧により細胞に浸透し、凍害を防止する。しかし非凍結時にはむしろ障害的に作用する。すなわち保存液と混合した精子を凍結前、融解後に放置すると運動率が経時的に低下する。精子凍結保存における融解後蘇生率の向上を目的として基礎検討を行なった。攪拌密度勾配法により洗浄濃縮した精子(運動率: $32.4 \pm 4.8\%$)にペントキシフィリン(1.0 mM)を添加して10分間培養後、KSII精子保存液と等量混合して凍結した結果、対照群の融解後運動率が $15.8 \pm 1.9\%$ であったのに対し、添加群では $23.4 \pm 2.3\%$ と有意に高かった。

凍結精子(凍結前運動率: $76.4 \pm 6.9\%$)の融解は単に微温湯に浸漬する(融解後運動率: $46.7 \pm 6.9\%$)よりも、3倍量のHanksを添加して希釈融解($58.0 \pm$

4.6%)したほうが良好な結果が得られた。以上の結果は、ペントキシフィンリン添加して凍結し、希釈融解を行なうことが蘇生向上に有用であることを示唆している。

4. AIHにより妊娠の成立をみた逆行性射精の1例

○石井尊雄, 篠原洋介, 上片平昭二

角田新平, 望月愛郎, 内野直樹

林 輝雄 (衣笠病院産婦)

逆行性射精の妊娠例は本邦でもすでに20例以上が報告されている。

今回われわれは、夫が逆行性射精、妻第1度無月経である夫婦に凍結精子を用いたAIHを行ない妊娠に成功したので報告する。

症例は、夫25歳、妻25歳で精査の結果女性側は、第1度無月経による排卵障害を認めた。男性側では、2回の精液検査で精子を認めなかったため泌尿器科依頼により、逆行性射精の診断を得た。精子の採取は、Hotchikiss法によらず、自然排尿からの回収法を行ないPercoIlによる洗浄濃縮を施行した。凍結精子3回分を準備した上でClomiphen-HMG-HCGによる排卵誘発を行ない、卵胞成熟確認後精子を解凍しAIHを行なった。初回のAIHにより妊娠が成立し、現在妊娠36週で順調に経過中である。

逆行性射精に凍結精子を用いたAIHによる妊娠症例としては、本症例が本邦初であると考え報告した。

5. AIH妊娠例の臨床統計、AIDとの比較

○宇津木利雄, 安藤一道, 水沼英樹

伊吹令人 (群馬大産婦)

横田佳昌 (横田産婦)

AIH(配偶者間人工授精)による妊娠例77症例とAID(非配偶者間人工授精)による妊娠例101症例を比較した。

累積妊娠率によるとAIH妊娠は6回目までの施行回数で88%が妊娠し、AID妊娠では約10回目と同率に達し、以後どちらも妊娠の可能性は少ないと判明し、AIHは6回以降、治療法の変更が必要と考えられた。無精子症や強度な乏精子症にAIDを適応しており、AIHよりも少ない回数で妊娠に至ると予想されたが、反対にAIDの方がより多くの施行回数が求められているのは、予想に反していた。AIH妊娠例で、洗浄前の原液精子濃度と洗浄後のAIH使用精子濃度の比較では上昇して妊娠したのは約6割で、4割の妊娠症例は減少した精子で妊娠に至っていた。AIH妊娠した精子濃度は平均が6800万/mlであり、

AIHは乏精子濃度群以外で適応が拡大され、70%以上の妊娠例は正常精子濃度群(2000万/ml以上)において認められた。

6. DIPI(腹腔内人工授精)による妊娠例の検討

○石田徳人, 栗林 靖, 近藤俊彦

大野祐子, 堀越祐史, 斎藤寿一郎

合屋英俊, 房間茂由, 石塚文平

雨宮 章 (聖マリアンナ医科大学産婦)

AIH, IVF-ETにより妊娠に至らなかった症例のうち男性因子および、原因不明不妊にDIPIを施行し、妊娠例を検討した。

対象は、男性因子31組と原因不明不妊9組で、93周期にDIPIを施行した。また、HSGあるいは腹腔鏡で少なくとも片側の卵管の疎通性を認め、ダグラス窩の閉鎖のないものとした。natural 36周期, clomid 16周期, HMG 42周期に施行した。HCG筋注後、約40時間でDIPIを施行した。排卵の推定は超音波を用い、精子の調整はswim up法にて行ない、精子浮遊液を22Gカテラン針にて後腔円蓋よりダグラス窩へ注入した。結果として対患者妊娠率は、男性因子55.6%, 原因不明不妊12.9%, 対周期妊娠率は同様に、7.6%, 14.8%であった。また、妊娠例はHMG周期のみに認めた。精子濃度800万/ml, 運動率13%の症例でも妊娠した。

以上、DIPIは男性不妊、原因不明不妊でAIH不成功例、IVF-ET待機例、およびIVF-ETを施行しても妊娠に至らなかった場合、施行する意義は大いにあると考えられた。

7. PG.Eを利用したDIPIの検討

○小嶋 清, 常盤佳代子, 高田たか子

(玉里メディカル・ウィーメンズクリニック小嶋医院)

眞田利男, 山口禎章 (総合太田病院)

村木 章 (国立水戸病院)

兼子 智 (東京歯科大市川病院)

飯塚理八 (飯塚クリニック)

器質的な完全閉塞を認めない部分的卵管狭窄、あるいは子宮内膜症が原因と考えられる卵管内・外癒着による血行障害例、あるいは機能的卵管通過障害に対してプロスタグランディンE投与により、PG.Eの持つ作用である末梢血行循環障害改善、平滑筋弛緩運動を利用し、AIH, DIPI, DIFIに施行した。

方法は排卵前後、排卵日にPG.E1-120 μ g ~ 360 μ gを点滴静注した。基礎検討は、投与前後の通気、通水検査、また作用持続時間等を見た。

臨床応用による比較検討は、PG.E1投与有無によるAIH, DIPI, DIFIの施行周期における妊娠成立で行なった。

PG.E1は軽度器質卵管障害、機能的卵管通過障害に対して有効であった。しかし、作用時間は平均3～4日と短いため、繰り返し反復治療が必要と考えられた。また特記すべき副作用は認めなかった。

8. 卵管通過性のある卵管性不妊患者の体外受精胚移植治療の適応

○中村秀夫, 伊藤理廣, 竹内 巧
土屋清志, 重城利國

(済生会前橋病院産婦)

(目的) 卵管の通過はあるが、通過障害を示す症例では、いかなる基準でIVF-ET治療を行なうか、腹腔鏡下に測定した卵管の通水圧を基準に、卵管通過障害のIVF-ET適応の判断基準を検討した。

(方法) 当院での腹腔鏡施行31例中、通水圧300mmHgを超えるものはIVF-ETを、300mmHgを超えないものは、外来管理を6カ月行ない、妊娠に至らなければIVF-ET適応とした。

(結果) 通水圧300mmHg以上を示した症例10例中、8例にIVF-ETを行ない、4名に妊娠例を認めた。残りの2例のうち1例は自然排卵周期で妊娠した。通水圧150-300mmHgの通水圧を示した6例中、5例は卵巣刺激+人工授精または自然排卵周期の外来管理したが妊娠に至らず、1例はIVF-ETで妊娠した。通水圧が150mmHg未満を示した症例14例中13例は外来管理して、8例に6カ月以内に妊娠を認めた。

(考察) 卵管の通過性を示す卵管性不妊患者の管理方法として通水圧別管理を用いた。さらに通水圧が正常で6カ月の治療によっても妊娠しない症例では、配偶子の受精能の確認をするためにもIVF-ETが必要があると考ええる。

9. 片側または両側卵管閉塞不妊症例の臨床的検討

○石巻静代, 安達知子, 松尾明美
網野幸子, 中山摂子, 工藤美樹
岩下光利, 武田佳彦

(東京女子医科大学産婦)

(目的) 不妊症の原因として卵管因子は高い頻度を占めている。子宮卵管造影にて片側、または両側卵管閉塞を認めた不妊症例の臨床的検討をした。

(対象) 平成2年1月から平成4年12月までの3年間に施行した子宮卵管造影721例、片側または両側

卵管閉塞を認め、当科にて精査、加療を行ない得た不妊症例33例を対象とした。

(結果) 全33例中、両側閉塞は7例、片側閉塞は7例であった。閉塞部位は、両側閉塞では両側間質部が7例中4例、片側閉塞でも間質部が26例中19例と間質部閉塞が多かった。閉塞の原因は、開腹手術後の癒着による閉塞と考えられるものが両側例で2例、片側例で10例見られ、主要な要因と考えられた。妊娠に至った治療法として通気、通水、子宮鏡下選択的通水など非観血的卵管疎通術にて45.4%が妊娠に至った。子宮卵管造影にて卵管閉塞と診断された症例の中には可逆的な閉塞例も多く含まれていることが示唆された。

10. Tuboplastyにて卵管の再疎通を見た症例の検討

○高田淳子, 井坂恵一, 興石 真
小杉好紀, 高山雅臣 (東京医科大産婦)

子宮卵管造影法(Hysterosalpingography HSG)で卵管疎通性がない場合、体外受精やマイクロサージェリーが必要となり患者に負担がかかる。我々はHSGで近位端閉塞症例を選び再疎通を試みたので報告する。

初回HSG施行後、Jansen-Anderson Catheterを用い選択的子宮卵管造影法(Selective HSG S-HSG)、または子宮鏡にてCatheterizationを施行し卵管拡張を試みた。子宮鏡にて施行した症例が11例、S-HSGが3例。その後HSGにて再疎通の有無を確認した。両側閉塞群のうち両側再疎通を見た症例4例、片側再疎通を見た症例2例、再疎通を見ない症例1例。片側閉塞群のうち再疎通を見た症例5例(このうち2例が妊娠)、再疎通を見ない症例1例。約84パーセントの卵管が再疎通を見たといえる。

症例数が少ないため今後症例を重ねる必要があるが、HSGにて卵管閉塞を見た場合、子宮鏡やS-HSGの比較的簡便な方法で再疎通を見る可能性があると考ええる。

11. 不育症におけるMCP testの意義——特にE2/P4 ratioの変化について——

○板垣智昭 (佐野厚生総合病院産婦)

(目的) 不育症例の内分泌異常ではPRL分泌異常の占める割合は大きい。Bromocriptine (Br) 投与で健児を得た7例の黄体機能に及ぼすPRLの影響を検討した。

(方法) 3回自然流産の既往を有する婦人7例に卵

胞期初期LH-RHおよびMCP testを施行し、OHPと診断され、Br療法の前後で黄体期中期のE₂、P、PRL、E₂/p ratioを測定し比較した。

(結果) E₂、Pは投与後に有意の高値を示し、PRL、E₂/pは有意の低値を示した。

(結論) 不育症例では、黄体期中期にPRLは正常でもP低値を示す例がある。その例にはOHPの検査が必要であり、MCP testは有用である。黄体機能の指標としてのE₂/P ratioにはPRLが関与し、Br療法はその至適な環境をつくっていることが示唆された。

12. 胚移植時の受精卵の形態学的検討とIVF-ETの予後

○飯野好明、石原 理、田谷順子
齊藤正博、関 博之、竹田 省
木下勝之

(埼玉医大総合医療センター産婦)

(目的) 卵管因子以外の症例に対しIVF-ET法は有効な治療法といえるのか、原因不明長期不妊症例と男性因子のみの症例について考察した。

(対象・方法) 卵管因子のみの症例群、原因不明長期不妊症例群と男性因子のみの症例群の3群で検討した。

(結果) 妊娠率は、卵管因子群32.3%、原因不明長期不妊群26.3%、男性因子群22.7%であった。卵管因子群では良好卵の割合は30%、不良卵40%であった。卵管因子群に対し原因不明長期不妊群は、成功例、失敗例とも平均採卵数、平均移植胚数、移植胚の不良卵の割合に有意差はない。男性因子群は平均採卵数は卵管因子群と変わらないが移植胚数では男性因子群の失敗例では少なく移植胚も良好卵が極めて少なかった。

(考察) 原因不明長期不妊症例は、移植胚の質は卵管因子群と差がないと考えられる。男性因子群の失敗症例は良好卵が極めて少なく、移植胚数が有意に少ないため妊娠に結びつかないと考えられた。

13. 酸化再生セルロース膜(インターシード[®])の使用経験

○桃原祥人、坂本秀一、多田雅人
田口 誠、久保田俊郎、麻生武志
(東京医科歯科大産婦)

骨盤内手術の術後癒着による不妊症は少なくない。Interceed (TC7)は手術操作部位を被覆することにより癒着を防止する目的で開発された再生酸化セルロース膜で、その有用性は各方面で報告されてい

る。我々は、挙児希望を主訴とする骨盤内手術症例3例にTC7を用い、術後早期腹腔鏡にて術後癒着予防の効果を確認した。

症例1は右卵管妊娠手術後、腹腔鏡にて左卵管周囲の癒着が認められ、癒着剥離術施行し、左卵管、卵巣周囲をTC7で被覆した。症例2は子宮筋腫を合併した不妊例で筋腫核出術施行、核出創部にTC7を用いた。症例3は両側卵巣囊腫核出後に左卵巣囊腫再発、卵巣囊腫核出と癒着剥離術施行、剥離後の腹膜欠損部を中心にTC7を用いた。

いずれの症例も術後癒着は認められないか、認めても容易に剥離可能であり、TC7による癒着防止が有効であると判断された。また、術後早期腹腔鏡は術後癒着の有無の確認だけでなく、再癒着の修復にも有効であった。

14. 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併用投与の効果

○大山俊樹、白須和裕、植村次雄
水口弘司 (横浜市立大産婦)

子宮内膜症でLH-RH agonist療法をうけている症例では、長期にわたる低エストロゲン状態により、のぼせ・ほてりなどの更年期様症状と骨塩量の減少が問題となる。そこでこれらの問題に対し従来より更年期障害、卵巣欠落症状に使用されている代謝性ホルモン剤(メサルモンF)の予防効果の検討を行なった。

(方法) 子宮内膜症の患者でLH-RH agonist 900 μ g/日単独投与(19例)とメサルモンF2錠/日併用投与(24例)を行なった。

(結果) ①子宮内膜症に対しては単独・併用両群とも同等の効果が得られた。②単独群では高率に出現するのぼせ・ほてりなどの随伴症状は、併用群では抑制された。③骨所見では併用群でMD法のΣGS/Dが開始時に比して有意差をもって増加した。

(結論) LH-RH agonist療法時のメサルモンF併用は、LH-RH agonistの治療効果を減じることなく、副作用の軽減に有用な治療法と考えられた。

シンポジウム

「排卵誘発法—その適応と限界」

1. PCOに対する排卵誘発法とその限界

○安藤一道、水沼英樹、伊吹令人
(群馬大産婦)

PCOに対する排卵誘発の際、いかにOHSSを予防

しかつ治療効率を上げるかが最も重要な点である。これらにつき検討し以下の結論を得た。

(1) PCOの排卵誘発法としてpure FSHによるstep-down法は従来の投与法(fixed-dose法)に比べOHSSの発症率を有意に低下させることから有用な誘発法の1つと思われる。

(2) PCOに対するpure FSH療法の際、premature LH分泌を認める場合OHSS発症率は83.3%で、これを認めない場合わずか24.1%であった。更にpremature LH分泌を認めたときpure FSH投与を中断・休薬すると45.5%に有意に減少することから、血中LHをモニターし個別にpure FSH投与を決定することがOHSS発生の予知・予防に有用である。

(3) PCOに対するpure FSHによる排卵誘発の累積妊娠率をみると、3周期目までに76.9%が妊娠成立し7周期までに100%に達することから、妊娠成立に至らない場合はむやみに長期間排卵誘発をつづけるべきではなく新たな治療法を選択すべきである。

2. 機能性不妊に対するhMG療法——その適応と限界——

○石原 理, 飯野好明, 斉藤正博

須野敏章, 田谷順子, 木下勝之

(埼玉医科大総合医療センター産婦)

機能性不妊あるいは原因不明長期不妊症例の一部において、hMGによる排卵誘発は妊娠成功に結び付くことが知られている。しかし、多胎妊娠やOHSSなどの危険を考慮した場合、その有用性が上回るか一致した見解がない。そこで、無排卵例のみならず、排卵を有する不妊婦人に積極的にhMG療法を適用し、その効果と問題点を検討した。

その結果、排卵を有する不妊婦人においても、hMGによる過排卵誘発により2年間に68例の妊娠が得られ、これらの症例では、しばしばAIHの併用や、GnRHαによる卵胞発育の管理また黄体ホルモン投与による黄体期管理が有効であった。OHSSは妊娠周期の22.4%に認められ、多胎妊娠は双胎を10.7%に認めたのみであった。妊娠成立までの期間は、90%の症例で2年以内であり、同一治療法の繰り返しは90%の症例で3回以内で妊娠が成立した。

したがって、機能性不妊の治療においては、積極的なhMG療法とAIHを試み、この後さらに不妊である場合はIVF-ETを試みるべきと思われる。

3. hMG律動的皮下投与法による排卵誘発

○吉村泰典

(杏林大産婦)

視床下部からのGnRHは約90分間隔で分泌されており、その分泌に伴い血中のLH、FSH値は変動する。当教室ではゴナドトロピンによる排卵誘発にhMG律動的皮下投与法を用い、高い排卵率・妊娠率を得ている。

第I度・第II度無月経およびPCO症例における排卵率・妊娠率は、対症例で100%・66.7%であり、対周期別でも86.1%・13.1%であった。OHSSは律動的皮下投与によってもその発生を予防することはできなかったが、いずれの症例もmild, moderateのtypeであった。現在までの多胎発生率は、35例の妊娠中2例のみであり、従来の一日一回の筋注法により有意な低値を示していた。

以上のことより、hMG律動的皮下投与法は、clomiphene無効な各種無排卵症に対し、多胎発生の可能性の少ない有効な排卵誘発法であると考えられた。

4. LHRH pulse療法

○林 直樹, 久具宏司, 堤 治

三橋直樹, 武谷雄二 (東京大産婦)

(目的) 各種排卵障害患者に対しGnRHパルス投与を試みその適応と内分泌動態を検討した。

(対象) 第1・2度視床下部性無月経(各1・2群)・高PRL血症(高P群)・下垂体腫瘍術後第2度無月経(術後群)・PCOS計29患者50周期。(方法) GnRHを90分間隔1パルス10 μ g(症例により20)皮下投与した。排卵後中止し、HCG5000IUを3日毎3回筋注した。

(成績) 1) 2群・高P群は約60%の排卵率を示した。2) 1群は多発卵胞発育を示す傾向があった。3) 術後群のうち下垂体機能障害軽症例に排卵を誘発した。4) PCOSは多発卵胞発育・脱感作の傾向にあった。5) 排卵周期では平均22.1日目に卵胞径19.7mmで排卵し、血中E₂ピークおよび黄体機能も良好であったが、LHサージが自然周期に比較し有意に小さかった。

(考察) 1) 2群および高P群が好適応であった。一部の術後群に適応があるものと思われた。2) 自然周期と同様の内分泌動態を示すも、LHサージが小さいことが特異的と考えられた。

5. LHRHa療法

○楠原浩二(東京慈恵会医科大産婦)

Clomid resistantなPCOSの排卵誘発にはhMG、FSHが有効であるがOHSSも発症しやすい。これはPCOSでは内因性のLH分泌が亢進していることが原因の1

つと考えられる。そこでGn-RH analogにてLHを抑制しhMGにて排卵誘発を試みた。

21例・96周期にhMG単独投与し(単独群)これをコントロールとした。11例・17周期にGn-RH analogを併用した(併用群)。併用法はGn-RHa (Buserelin) 900 μ g/dayを2週間投与した後、hMG(日研hMG) 150 iuをGn-RHaと併用投与した。

その結果、排卵率は単独群89.6%、併用群88.2%(/cycle)と両群良好であった。妊娠率は単独群42.9%、併用群9.1%(/case)で単独群が良好であった。一方OHSSは単独群18.8%、併用群29.4%と併用群が高率であった。しかし後者は全て軽症、中等症にとどまった。単独群ではOHSS18周期のうち4周期が重症例であったが、これはいずれも妊娠周期に発生したものである。

以上の結果から、Gn-RHaの併用にてOHSSが予防し得なかったものの軽症ですむようにみえるが今回の併用例では妊娠例が1例と少なかったため重症にならなかったとも考えられ、併用法がOHSS発症の予防、あるいは重症化の予防に有用であるか否かは今後の検討が必要と考えられた。

6. Bromocriptine療法

○合坂幸三

(賛育会病院産婦)

高PRL血症の治療薬として幅広く用いられているbromocriptine (br)の有効性を検討した。

110例の視床下部障害による排卵障害患者にbrを5 ng/day、2カ月以上連続投与しその効果を検討した。その結果、TRH 500 μ g負荷30分後の血中PRL値(PRL₃₀)が70ng/ml以上で88.5%に、50～70ng/ml以上でも77.4%に排卵が認められ、いわゆる潜在性高PRL血症に対するbrの有効性が再確認された。また、PRL₃₀<50ng/mlの症例においても、血中LH、FSHを示す内分泌学的PCO症例で47.4%に排卵が認められた。潜在性高PRL血症、高PRL血症は、排卵障害の約50%、内分泌学的PCOは約20%を占める重要な疾患であるが、これらに対するbrの有効性が明らかとなった。また、これらを厳密に除外すると、brはほとんど無効であった。

以上より、排卵障害の治療に際しては、LH-RH、TRH負荷テストにより各症例の内分泌学的背景を十分に検索する必要があると考えられた。

関連学会のお知らせ

第12回日本受精着床学会

会期：平成6年7月14日(木)～15日(金)

会場：城山観光ホテル

鹿児島市新照院町41-1 TEL. 0992-24-2211

会長：永田行博(鹿児島大学医学部産科婦人科)

招請講演(7月14日)

村松 喬教授(名古屋大学医学部第一生化学教室)

『着床と細胞膜の接着レセプター』

特別講演1(7月14日)

Lucinda Veeck, Director Embryology Laboratory

(The Jones Institute, Eastern Virginia Medical School, USA)

『The Morphological Evaluation of Oocytes and Preembryos』

特別講演2(7月14日)

菅原七郎教授(東北大学農学部・生物生産科学科・動物生殖科学講座)

『哺乳類の胚盤胞形成と生化学的特性』

シンポジウム(7月15日)

『受精卵へのアプローチ——受精卵から得られる情報とその応用——』

連絡先：〒890 鹿児島市桜ヶ丘8丁目35番1号

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室内

第12回日本受精着床学会事務局

総会幹事：堂地 勉

TEL. 0992-75-5423(直通)

FAX. 0992-65-0507

第39回日本不妊学会 (宿泊・交通・観光のご案内)

第39回日本不妊学会が、平成6年10月26日(水)～28日(金)の3日間富山市にて開催されるにあたり、全国各地より多くの皆様方が来富されますことを心より歓迎申し上げます。

さて、本学会にご参加されます皆様方の宿泊・交通・観光のお世話を、JTB富山支店にてお引受けさせていただくことになりました。皆様のお申込みをお待ちいたしますと共に、本学会のご成功をお祈り申し上げます。

JTB 富山支店
支店長 諏訪 求

- 宿泊ホテルは富山市内の都市ホテル、ビジネスホテル、日本旅館等をランク別、料金別毎に分けて、ご案内申し上げます。
- 交通機関は、富山発着の航空便を特別割引運賃にてご案内申し上げます。
- 観光旅行は学会終了後、富山県内の有名観光地を日帰りコース、1泊2日コースに分けてご準備いたしております。

尚、詳細につきましては本誌次号にてご案内いたしますので、是非共皆様方のお申込をお待ち申し上げます。

日本医学会だより

1993年10月 No.10

第1回日本医学会特別シンポジウム

ここ数年、日本医学会では、単に医学の世界からの観点のみでなく、人文科学系をも含めた広い、他領域の学問との対比によって、あらためて医学・医療を見直すことが出来ればと検討していた。

時間を重ねて検討した結果、従来4年に1回開催している日本医学会総会の中間年に、医学の本質について考えるという趣旨の特別シンポジウムを開催してはとの結論を得て、このたび実現の運びとなった。

第1回特別シンポジウムは「医と法」をテーマに、1993年8月28日～29日の両日、仙台国際センター(仙台市)で開催された。

シンポジウム開催前日の仙台は、台風を迎えた生憎の天候であったが、こうした悪条件をものともせぬ約350名の方々が、様々な交通機関を使って参加された。シンポジウム主催者側にとっては、誠に嬉しいことであった。

この特別シンポジウムは、「インフォームドコンセントと医事法学」と題した特別講演と、「医学的因果関係と法的因果関係」、「予防医学における法」、「医師の責任と法」と題した3つのシンポジウムから構成された。この企画構成にあたっては、石田名香雄組織委員長(日本医学会副会長)をはじめ7名の医学と法学の第一人者からなる組織委員の努力があった。

討論では、医師の裁量権と医療への法的介入のあり方などについての対話が活発におこなわれた。こうして日本医学会が、「医と法」という重いテーマのもとに、意義深いシンポジウムを開催したことは、今後の医学・医療に対しなんらかの指標を与えるものと考えられ、十分に所期の目的が果たされたと言えるべきであろう。

また、特別シンポジウムの当日の記録が、1994年3月頃には刊行される予定で、希望者には、無料で頒布される。刊行時期に葉書で日本医学会まで申し込みたい。

日本医学会シンポジウム

「高血圧をめぐる最近の話題」が、1993年12月9日

(木、10:00～17:00)に日本医師会館大講堂で開催される。

本シンポジウムの組織委員は、黒川清、猿田享男、村上和雄の3氏からなる。参加希望者は日本医学会に葉書で申し込まれたい。参加費は無料。

プログラムの概要は、下記のとおりである。

I. 血圧調整と高血圧の病態

1. 腎と高血圧／黒川清(東大・内科)。
2. 腎の血行動態と高血圧／伊藤貞嘉(Henry Ford Hospital)。
3. 高血圧の病態の多様性－食塩感受性－／藤田敏郎(東大・内科)。

II. 高血圧治療の現況

4. 高血圧治療の動向／猿田享男(慶應大・内科)
5. 血圧の日内変動を考慮した治療／小澤利男(都老人医療センター)。
6. 各種降圧薬の使用上のポイント／阿部圭志(東北大・内科)。
7. 降圧薬の副作用－高血圧治療とQOL／藤井潤(朝日成人病研)。

III. 高血圧研究の新展開

8. 高血圧と遺伝子－レニン・アンギオテンシン系を中心に－／村上和雄(筑波大・応用分子生物)。
9. 高血圧とNO／戸田昇(滋賀医大・薬理)。

医学賞・医学研究助成費受賞の決定

第5回(1993年度)医学賞・医学研究助成費選考委員会が、1993年9月7日に開催された。

日本医師会医学賞は推薦20件の中から下記の3名に決定した(敬称略)。

基礎部門：永津俊治(藤田保衛大総医研・生化学)

「カテコールアミンの分子生物学的研究」

臨床部門：河合忠一(京都大・内科学)

「心筋症に関する基礎的・臨床的研究

－ウイルス感染免疫学説の提唱とその実証－」

森武貞(大阪大・外科学)

「腫瘍マーカーの研究」

また日本医師会医学研究助成費は、推薦74件中、次の15件が選定された。

基礎部門：「ジアシルグリセロールキナーゼの分子多様性と神経・免疫系での機能的意義」近藤尚武(東北大・解剖学),「細胞死に伴い活性化される遺伝子の同定—mRNA display法を用いて—」佐藤真(大阪大・生理学),「癌原遺伝子発現法による循環中枢神経回路の研究」三浦光彦(群馬大・生理学),「哺乳類一次知覚ニューロンにおける情報処理機構の遺伝子工学的手法による解析」緒方宣邦(九州大・薬理学)

社会部門：「本態性高血圧症におけるアンギオテンシノーゲン (AGT) 遺伝子の役割と地域医療への応用；北海道鷹栖町住民検診での検討」羽田明(北海道大・公衆衛生学)

臨床部門：「ヒト消化管腫瘍におけるガストリン受容体遺伝子の発言とその突然変異に関する研究」木下芳一(神戸大・消化器病学),「じん肺症における肺内病変と沈着粉じんの鉱物学的成分の関連」斎藤芳晃(珪肺労災病院・内科学),「稀な血液凝固異常症の発見,ならびにその分子異常と病態生理に関する研究」重清俊雄(徳島大・内科学),「糖尿病の発症におけるインスリン分泌機構異常に関する研究」清野裕(京都大・内科学),「糖尿病の成因としてのインスリン受容体異常,グルコキナーゼ異常,ミトコンドリア異常に関する研究」門脇孝(東京大・内科学),

「先天性脂質代謝異常症の遺伝子治療に向けての基礎的研究」衛藤義勝(慈恵医大・小児科学),「大腸癌の転移性決定因子としての糖鎖分子発現機構の解析と転移制御への臨床応用」中森正二(大阪府立成人病センター・外科学),「弓部大動脈手術における低体温逆行性脳循環法による脳保護効果の研究」高本真一(国立循環器病センター・外科学),「血管内皮細胞と合成繊維によって構築するハイブリッド型人工血管の研究」高木淳彦(東京大・外科学),「網膜複合糖質の分子細胞生物学的研究—視細胞変性機構の解明に向けて—」上原文行(鹿児島大・眼科学)

授賞は,日本医師会設立記念医学大会(11月1日)の場で行われる。また同日,医学賞の授賞講演が行われる予定である。

医学用語辞典(和英)の刊行

日本医学会は,医学用語管理委員会委員による医学用語辞典英和が完成した(1991年4月)後,引き続き和英版の出版作業を行ってきたが,このたび来春早々に刊行される運びとなった。我国の本格的な医学用語和英辞典が誕生する。医学用語統一の指針となるであろう。

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、受付順序によらず、速やかに掲載される。この場合は掲載に要する実費は全額著者負担とし、かつ特別掲載料を納付する。
14. 掲載原稿に対しては、別冊30部を贈呈する。これ以上を必要とする場合は、原稿に別刷総部数を朱記する。なお、30部を越す分についての実費は著者負担とする。
15. 投稿のさいは、原稿とともにコピー2部を添付する。ただし写真は原稿を含めてオリジナルを3部とする。
16. 投稿先および諸費用の送付先は、〒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、ご注意ください。(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
遠 藤 克
平 川 舜
水 口 弘 司

伊 藤 晴 夫
楠 原 浩 二
穂 坂 正 彦
毛 利 秀 雄

石 島 芳 郎
小 林 俊 文
三 橋 直 樹

EDITORIAL BOARD

Masafumi SHIRAI (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA
Tsuayoshi ENDO
Shun HIRAKAWA
Koji MINAGUCHI

Haruo ITO
Koji KUSUHARA
Masahiko HOSAKA
Hideo MORI

Yoshiro ISHIJIMA
Toshihumi KOBAYASHI
Naoki MITSUHASHI

日本不妊学会雑誌 39 卷 1 号

1993年12月24日 印 刷
1994年 1 月 1 日 発 行

編集兼発行者 白 井 将 文

印 刷 者 武 田 昭 彦

印 刷 所 株式会社 デンプロ
東京都台東区元浅草 4 - 9 - 13

発 行 所 社団法人 日本不妊学会
東京都千代田区麹町 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