

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 39 No.3

July
1994

日本不妊学会雑誌

第39卷 第3号

平成6年7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4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を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，一般講演を行う予定です。一般講演の抄録受付は締め切りました。多数のご応募をいただき有難うございました。

- I 特別講演 座長：永野俊雄(千葉大解剖教授) 講演者：柳町隆造(ハワイ大教授)
「Fertilizing ability of mammalian spermatozoa: Its development and relativity」
- II 会長講演 座長：吉田 修(京都大泌尿器教授) 講演者：片山 喬(富山医薬大泌尿器教授)
「不妊診療の課題と展望 —男性側の立場から—」
- III 教育講演 生殖医学の進歩シリーズ
 1. 演者：森 崇英(京都大産婦教授) 座長：泉 陸一(富山医薬大産婦教授)
「体外受精の現況と問題点」
 2. 演者：阿部和厚(北海道大解剖教授) 座長：毛利秀雄(放送大学副学長)
「精子成熟の場 —精巣上体・構造からみる機能分化—」
 3. 演者：熊本悦明(札幌医大泌尿器教授) 座長：白井将文(東邦大泌尿器教授)
「男子不妊症治療の現在の問題点」
 4. 演者：葛西孫三郎(高知大農学部生物資源科教授) 座長：入谷 明(近畿大生物理工学教授)
「哺乳動物胚の凍結・ガラス化保存」
 5. 演者：桑原惣隆(金沢医大産婦教授) 座長：広井正彦(山形大産婦教授)
「性機能と調節因子」
- IV シンポジウム
 1. 配偶子をめぐる最新の話題 —ニューテクノロジーによる研究—
司会：武谷雄二(東京大産婦教授)
奥山明彦(大阪大泌尿器教授)
 - 1) 精子形成機構解明のための分子生物学的アプローチ 並木幹夫(大阪大泌尿器)
 - 2) 卵母細胞の選択的発育に係わる卵巣内因子 佐藤英明(東京大医科学研)
 - 3) 哺乳動物精子の成熟と発生能 星 和彦(福島医大産婦)
 - 4) 卵の成熟・受精過程におけるカルシウムの意義について 藤原敏博(東京大産婦)
 - 5) 精巣における細胞間相互作用 —とくにSertoli cellとLeydig cellについて— 藤澤正人(神戸大泌尿器)
 - 6) 顆粒膜細胞の機能調節とエンドセリン —その細胞・分子レベルでの検討— 久保田俊郎(東京医歯大産婦)
 2. 着床をめぐって 司会：富永敏朗(福井医大産婦教授)
中村幸雄(杏林大産婦教授)

- | | |
|--------------------------------|---------------|
| 1) 子宮内膜におけるサイトカインの意義 | 神崎秀陽(京都大産婦) |
| 2) 着床期の子宮における成長因子の発現とその役割 | 玉田尋通(大阪府立大農学) |
| 3) 卵の発育分化と着床 | 堤 治(東京大産婦) |
| 4) 着床周辺部位の微小変化 —卵と子宮内膜のシグナル交換— | 根上 晃(福井医大産婦) |
| 5) 卵と着床 —インテグリンファミリーの生理学的意義— | 吉村泰典(杏林大産婦) |

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(千葉大泌尿器教授)
守殿貞夫(神戸大泌尿器教授)

- | | |
|---------------|----------------------------------|
| 1. 不妊症の成因について | 瀧原博史(山口大泌尿器)
伊藤晴夫(帝京大市原病院泌尿器) |
| 2. 精子機能 | 市川智彦(千葉大泌尿器)
布施秀樹(富山医薬大泌尿器) |
| 3. 精巣機能 | 徳永 葉(川崎医大泌尿器)
山本雅憲(名古屋大泌尿器) |
| 追加発言 | 藤澤正人(神戸大泌尿器) |
| 4. 治療 | 三浦一陽(東邦大泌尿器) |

VI 公開シンポジウム

「不妊の漢方治療」 司会：吉田英機(昭和大泌尿器教授)
青野敏博(徳島大産婦教授)

- | | |
|-------------------------------------------|-------------------|
| 1. 基礎的事項 | |
| 1) 精巣障害における漢方薬の作用 | 池本 庸(東京慈恵会医大泌尿器) |
| 2) ヒト精子に対する漢方薬の作用 | 田代眞一(昭和大薬科大) |
| 3) 顆粒膜細胞のステロイド生合成, 特にアロマトラーゼ活性に及ぼす各種生薬の影響 | 太田博孝(秋田組合総合病院産婦) |
| 2. 臨床的事項 | |
| 1) 男性不妊症における漢方療法の現状と将来 | 風間泰蔵(富山医薬大泌尿器) |
| 2) クロミフェンと温経湯または当帰芍薬散併用療法による排卵の誘発 | 安井敏之(徳島大産婦) |
| 3) 自己抗体陽性不育症患者に対する柴苓湯の効果 | 高桑好一(新潟大産婦) |
| 3. コメンテーター | 寺沢捷年(富山医薬大和漢診療教授) |

VII 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います。

1994年7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

※ 宿泊・昼食弁当*・エクスカージョンの御案内は39巻2号巻末を御覧下さい。(※学会当日, 昼食時の会場周辺の食堂は絶対数も少なく平日でもあるため, 混雑が予想されます。)

日本不妊学会誌

第39巻 第3号

平成6年7月1日

—目次—

原 著

微小穿刺法により測定したラット精巣上体内精子濃度

- および一日精子産生能について(英文)……………山本雅憲・他… 1
- マウス卵子の死滅と機械的刺激に見られる特異性……………小黒昌夫… 5
- Pentoxifylline-Percoll液を用いた運動精子回収法の有用性に関する検討……………福井敬介・他… 11
- 白血球細胞増殖抑制因子(LIF)のマウス子宮内膜上皮細胞
および胚盤胞に対する影響(英文)……………蔡 英美・他… 16
- 未婚または挙児希望の若年性子宮体癌8症例の検討—保存的治療の可能性—……………小原満雄・他… 22
- 不妊症への超音波造影剤応用のための基礎的検討……………石原 理・他… 29
- 多指標の統計的解析を用いた子宮腺筋症の診断の有効性……………太田博孝… 33
- 不妊治療による妊娠例の不妊原因と診療法に関する検討……………斉藤正博・他… 38
- 原因不明不妊症における不妊症検査としての腹腔鏡の意義……………生田克夫・他… 44
- 漢方薬のハムスター精巣上体培養細胞における蛋白合成促進作用について(英文)……………中山貴弘・他… 50
- Gossypolの精巣中DNA polymeraseに及ぼす影響……………砺波博一… 55
- Gn-RH agonist (buserelin) 経鼻噴霧による排卵誘発
—clomid-buserelin併用療法の試み—……………竹中 章・他… 64
- 停留精巣術後の妊孕性と精子機能
—Penetrak test, hypoosmotic swelling testによる評価—……………川田敏夫… 71
- 豚における抗プロゲステロン製剤, RU486の分娩誘発効果(英文)……………金山喜一・他… 77
- FK-506による同系精巣細胞に対する遅延型過敏反応の調節……………坂本泰樹・他… 80
- マウス脱落膜反応および着床に及ぼす
インドメタシンとプロスタグランジンの影響……………辻井弘忠・他… 86
- 男性不妊の精子DNAに関する基礎的研究
—Acridine Orange testおよびFlow cytometryによるヒト精子DNAヒストグラム— 岡本恭行・他… 94
- 体外受精・胚移植(IVF-ET)における排卵誘発法に関する検討
—GnRH agonist long protocol法とshort protocol法の比較—……………福元清吾… 103
- 加齢の妊孕能に及ぼす影響に関する臨床的・基礎的研究……………森 明人… 110
- 地方部会抄録…………… 117

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 39, No. 3, 1994)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Epididymal Sperm Concentration Determined by Micropuncture Technique
and Daily Testicular Sperm Production in the Rat M. Yamamoto, Y. Tsuji,
H. Hibi & K. Miyake 1
- Specific Changes Due to Destructive Death
and Mechanical Stimulation (Microinjection) in Mouse Ova M. Oguro 5
- The Selection and the Stimulation of Motile Sperm Using Pentoxifylline-percoll Gradients
..... K. Fukui, Y. Takeda, T. Fujioka,
H. Kitagawa, R. Kaura,
J. Yano & S. Matsuura 11
- Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Mouse Uterine Epithelial Cells and Blastocysts
..... E. Tsai, Y. Goto, M. Shiotani,
T. Nakayama, T. Mori & Y. Noda 16
- Treatment of Endometrial Carcinoma in Eight Unmarried or Infertile Women
40 Years of Age or Younger M. Obara, T. Kamizyou, K. Andoh,
T. Utsugi, H. Mizunuma & Y. Ibuki 22
- Safety of a New Echo-contrast Agent on Early Embryo Development
..... O. Ishihara, J. Taya, Y. Ihno,
M. Saitoh & K. Kinoshita 29
- Evaluation of Multiparametric Analysis in the Diagnosis of Adenomyosis H. Ota 33
- Statistical Analysis of Pregnant Cases after Treatment Infertility M. Saitoh, O. Ishihara,
Y. Ihno, T. Suno, H. Seki,
S. Takeda & K. Kinoshita 38
- Laparoscopy as an Infertility Examination in Cases of Unexplained Infertility
..... K. Ikuta, N. Suzuki, M. Suzuki,
H. Okada, T. Iida, Y. Ozaki,
S. Hanada, Y. Yagami,
M. Manzai & K. Kaida 44
- Accelerating Effects of Kampo Medicines on Protein Synthesis
in Cultured Hamster Epididymal Cells T. Nakayama, Y. Goto, S. Natsuyama
T. Mori & Y. Noda 50
- Effects of the Male Oral Contraceptive Gossypol on Testicular DNA Polymerases in Rat
..... H. Tonami 55

An Ovulation Induction in Women with Clomiphen-Citrare-Resistant Amenorrhea by Intranasal Spray of Diluted Gn-RH Agonist (Buserelin) Combined with and without Clomiphen Citrate	A. Takenaka, T. Sudoh, I. Yamade, Y. Takahashi, Y. Noda & H. Soga.....	64
Fertility and Sperm Function in Cryptorchidism after Orchiopexy —Evaluation with Penetrak Test and Hypoosmotic Swelling Test—.....	T. Kawada.....	71
Effects of Antiprogestosterone Compound RU 486 on Parturition Induction in Pigs	K. Kanayama, K. Nariai, H. Koie, T. Endo, Y. Sakuma & T. Sankai.....	77
Regulation of Delayed Type Hypersensitivity to Syngeneic Testicular Cells by FK-506	Y. Sakamoto, T. Matsumoto, Y. Mizunoe, M. Sakumoto & J. Kumazawa.....	80
Effect of Indomethacin and Prostaglandins on Decidual Cell Reaction and Embryo Implantation in Mouse	H. Tsujii & M. Moro.....	86
A Basic Research for Male Infertility — Acridine Orange Test and Flowcytometric DNA Analysis of Human Sperm —	Y. Okamoto, H. Okada, O. Matsumoto & S. Kamidono.....	94
Ovarian Stimulation with Long Protocol or Short Protocol of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist for In Vitro Fertilization	S. Fukumoto.....	103
Clinical and Experimental Study on the Aging Effects on Fertility	A. Mori.....	110

EPIDIDYMAL SPERM CONCENTRATION DETERMINED BY MICROPUNCTURE TECHNIQUE AND DAILY TESTICULAR SPERM PRODUCTION IN THE RAT

Masanori YAMAMOTO, Yoshikazu TSUJI, Hatsuki HIBI
and Koji MIYAKE

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

Abstract: Micropuncture samples taken from the rete testis, caput, corpus and cauda epididymidis of adult rats were assayed for intraluminal sperm concentrations. Epididymal sperm concentrations increased from the rete fluid to the cauda fluid through the caput fluid. Daily spermatozoal production averaged $17 \pm 2.3 \times 10^6$ sperm per gram of testicular parenchyma. The caput, corpus and cauda epididymidis contained 0.25 ± 0.2 , 0.31 ± 0.05 and $0.38 \pm 0.2 \times 10^9$ sperm. The calculated mean transit times of sperm through the epididymal segments on the basis of daily sperm production were estimated as 3.4, 4.3 and 5.3 days for the caput, corpus and cauda, respectively. Thus, the time required for maturation of sperm within the epididymis is considered to be approximately 12 days.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 229 - 232, 1994)

Introduction

The epididymis serves as a conduit and storage depot for spermatozoa, but beyond that the organ maintains a sperm maturation processes that result in the sperm cell's obtaining progressive motility and fertility. Many of the details for the mechanisms underlying these biologically significant functions remain to be elucidated; however, it is now clear that the physiological functions of the epididymis are very complex.

Although the mechanisms by which the epididymis performs this function of sperm maturation are not fully understood, the general consensus is that these processes are affected by the fluid milieu within the epididymal lumen and the epithelial cells that produce it. The intraluminal content in the epididymal duct can be collected using *in vivo* or *in vitro* micropuncture techniques¹⁾. These techniques made it possible to study the intraluminal fluid and spermatozoa. The objective of this study was to determine intraluminal sperm concentrations

in the rat epididymis by micropuncture technique.

Daily spermatozoal production by the testes, the distribution of spermatozoa within the epididymis and the time required for passage of spermatozoa through the epididymis have not been well established in the rat. We also wished to determine these characteristics.

Materials and Methods

Adult, male, Sprague-Dawley rats (320~610 g) were obtained from a breeder and reared in laboratory at 25°C with a 12 hour: 12 hour light-dark cycle. They were anesthetized with intraperitoneal injections of Inactin (sodium 5-ethyl-5- (1-methylpropyl) -2-thiobarbiturate, Byk Guilden Konstanz, Hamburg, Germany; 100 mg/kg body weight) and subjected to *in vivo* micropuncture. The micropuncture pipettes were attached to a micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan) for well controlled movement and connected to a 10 ml syringe with PE-50 tubing to press out from or suck in the pipette. Sudan-black stained mineral oil was

drawn into the micropipette prior to micropuncture. The micropipette was guided into a selected tubule and the intraluminal position of a pipette tip was confirmed by pushing out a small drop of stained mineral oil. Microsamples were obtained by sucking in the micropipette. The sample with stained mineral oil was always sealed at both ends to prevent exposure to air. The micropipette containing epididymal lumen content (sperm and fluid) was attached to a vertical transfer apparatus (Bunton Instruments, Rockville, MD) and the lumen content was mixed in water-equilibrated mineral oil in a glass mini-beaker (Fig. 1). A precalibrated 100 nl

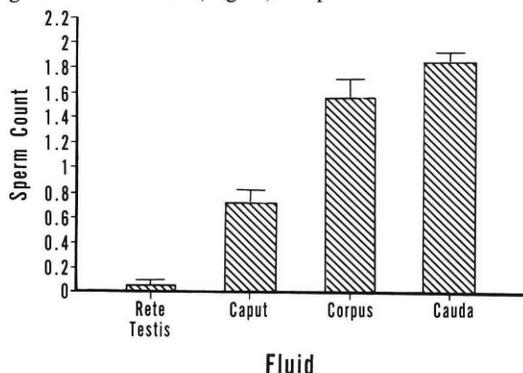


Fig. 1 Sperm concentrations ($\times 10^9/\text{ml}$) in the intratubular fluids of the rat epididymis (There is a significant increase in sperm concentration from caput to cauda epididymidis)

microvolumetric pipette (constriction pipette) was used to aspirate duplicate 100 nl aliquots of each micropuncture sample collected (Fig. 1). The 100 nl aliquot was transferred to an adjacent minibeeper and inserted into a mineral oil-covered, 25 μl droplet of 1% hyaluronidase in saline. The diluted hyaluronidase solution prevented sperm aggregation and facilitated evenly mixed spermatozoa in the small diluent drops. Twenty five μl of diluted epididymal fluid was then aspirated into a precalibrated 300 μl pipette. The remainder of the 300 μl pipette was filled with 1% hyaluronidase solution again. Each pipette was vigorously vibrated for 90 seconds on an automatic pipette shaker (Clay-Adams, NY) to completely mix the sample. Drops of the pipette contents were applied onto a hemocytometer to determine the sperm density of the fluid in the 300 μl pipette. Each counting was

performed in quadruplicate, and sperm density in the original micropuncture samples were calculated by the appropriate dilution figures.

Daily sperm production (sperm/g, testis/d) for each testis was determined as follows. Testes were decapsulated, weighed and homogenized for 2 minutes at a setting of 3.5 on a Polytron tissue homogenizer (Brinkman Instruments, Rexdale, Ontario, Canada) in 50 mL 0.154 M NaCl containing 0.5% (vol/vol) Triton X-100, and 0.02% sodium azide. Condensed sperm nuclei in the resultant solution were counted on a hemocytometer, and sperm/g testis were determined for each testis. These values were divided by 6.1 days to convert them to sperm/g/d². The epididymis was divided into caput, corpus and cauda, although demarcation between the caput and corpus was arbitrary. Each segment of epididymis was weighed, minced, homogenized for 2 min in 50 ml 0.154 M NaCl containing 0.5% (vol/vol) Triton X-100, and 0.02% sodium azide. Spermatozoa in the resultant solution were counted on a hemocytometer.

The transit time of sperm through the epididymis was calculated by dividing the number of sperm in each segment by the daily spermatozoal production for the testis attached to the epididymis. The relationship "epididymal transit time = epididymal spermatozoal reserves/daily spermatozoal production²⁾" is valid if resorption of sperm in the epididymis is negligible and this latter assumption appears to be valid.

Results

The rat sperm concentrations in the fluid ($\times 10^9/\text{ml}$) of rete testis, caput, corpus and cauda epididymidis were 0.06 ± 0.01 , 0.72 ± 0.07 , 1.56 ± 0.11 , and 1.85 ± 0.045 , respectively showing sequentially increased concentrations from rete to cauda fluid (Fig. 1).

Testis contained $17 \pm 2.3 \times 10^6$ spermatids per gram parenchyma per day. The mean weight of paired testes was 4.2 g. Thus, daily spermatozoal production by both testes was $0.0712 \pm 0.1 \times 10^9$ spermatids (Table 1).

Mean weights (\pm SEM) for the caput, corpus and cauda epididymidis were 0.31 ± 0.1 , 0.07 ± 0.1

Table 1 Daily testicular sperm production and epididymal sperm reserves of the rat

Characteristic	Mean	± SEM
Weight		
Body (g)	428	± 0.4
Paired Testes Wt (g)	4.2	± 0.5
Daily Sperm Production		
Per Gram Parenchyma (10 ⁶ /g/day)	17	± 2.3
By both testes (10 ⁹ /day)	0.071	± 0.1
Extragenadal Sperm Reserves (10 ⁹)		
Caput Epididymidis	0.25	± 0.2
Corpus Epididymidis	0.31	± 0.05
Cauda Epididymidis	0.38	± 0.2
Epididymal Transit Time (days)		
Caput Epididymidis	3.4	± 0.8
Corpus Epididymidis	4.3	± 0.7
Cauda Epididymidis	5.3	± 0.4

and 0.31 ± 0.1 g. The caput, corpus and cauda epididymidis contained 0.25 ± 0.2 , 0.31 ± 0.05 and $0.38 \pm 0.2 \times 10^9$ sperm, respectively (Table 1). The mean transit times of sperm through the epididymal segments were estimated as 3.4, 4.3 and 5.3 days for the caput, corpus and cauda, respectively (Table 1).

Discussion

Sperm concentrations in the luminal fluids of the seminiferous tubule and rete testis are low. Several investigators have shown that sperm concentrations increase in the epididymidis of a wide range of experimental animals^{1,3,4}. It has been calculated that, in the ram, only 1 per cent of the fluid leaving the rete testis ever leaves the epididymis via the vas deferens⁵. The remainder is reabsorbed by the epithelium of the excurrent ducts, thus concentrating the spermatozoa and allowing more room for the continued transport of cells in more proximal regions.

Crabo⁶ calculated that 90 per cent of excurrent fluid reabsorption occurred in the ductuli efferentes of bulls and boars. A similar situation must exist in the hamster inasmuch as intratubular sperm

concentrations do not increase inside the epididymis proper⁷. Figure 1 illustrates a different situation in the rat in which intratubular sperm concentrations increase from caput to cauda epididymidis. Fluid is apparently removed from the epididymal lumen along the entire length of the duct. Turner reported that large amount of protein and sodium and smaller amounts of potassium are resorbed from the rat epididymal lumen between the caput and corpus epididymidis⁸.

Transport through the proximal epididymis is due to spontaneous, peristaltic contractions of the smooth muscles surrounding the epididymal duct but is assisted by hydrostatic pressure, as the mean pressure in the caput is significantly greater than the mean pressure in the proximal cauda epididymidis⁹. Movement through the distal regions of the epididymis is against a pressure gradient and is clearly the result of intermittent peristalsis of the epididymal duct, particularly at the time of ejaculation. Therefore, the mechanisms responsible for driving the spermatozoa through the lumen of the epididymis include hydrostatic pressure gradients, fluid currents established by action of cilia along the walls of the efferent ducts, and spontaneous rhythmic contractions of the contractile cells surrounding the epididymal duct. At the time of ejaculation, some of the sperm residing in the cauda are carried into the vas deferens by rhythmic contractions of the caudal ducts.

The present study has shown that the time required for transport of spermatozoa through the caput and the corpus in the rat is 3 ~ 5 days. It is not dependent simply on the number of sperm stored in the cauda, but rather is a function of storage capacity and daily spermatozoal production. Thus, variation in total epididymal transit time is probably due to differences in the rate of passage through the cauda epididymis, which in turn are due to changes in ejaculatory frequency. Frequency of ejaculation only increases the rate of transit through the cauda epididymis and probably has no effect on transport from the caput to the proximal cauda.

Extrapolating from daily sperm production rates, Amann observed that sperm transport time through the epididymis varies with age and sexual activity¹⁰.

Sperm transit time from the caput to the cauda epididymis is shortest in 19- to 20-year-old men, being about 2.7 days. The longest epididymal transit time is found in 16- to 18-year-old men and is approximately 11.9 days. The variation in sperm transit time with age depends on differences in the daily testicular sperm production rate rather than on a direct influence of age on the epididymis.

In conclusion, epididymal sperm concentrations increased from the rete fluid to the cauda fluid through the caput fluid. Large amount of the fluid leaving the rete testis is absorbed in the distal cauda epididymis. The mean transit times of sperm through the epididymal segments were estimated as 3.4, 4.3 and 5.3 days for the caput, corpus and cauda, respectively. Thus, the time required for maturation of sperm within the epididymis seems to be nearly 12 days.

References

- 1) Howards SS, Johnson A and Jessee S, Micropuncture and microanalytic studies of the rat testis and epididymis. *Fertil Steril* 26: 13, 1975
- 2) Amann RP and Lambiase JT, The male rabbit. III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J Anim Sci* 28: 369, 1969
- 3) Jessee SJ and Howards SS, A survey of sperm, potassium, and sodium concentrations in the tubular fluid of the hamster epididymis. *Biol Reprod* 15: 626, 1976
- 4) Turner TT, Hartmann PK and Howards SS, In vivo sodium, potassium, and sperm concentrations in the rat epididymis. *Fertil Steril* 28: 191, 1977
- 5) Waites GMH and Setchell BP, Physiology of the testis, epididymis, and scrotum. *Adv Repro Physiol* 4: 1, 1969

- 6) Crabo B, Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. *Acta Vet Scand* 6: (Suppl. 5) 1, 1965
- 7) Heller CG, Teshima F and Runley NJ, Duration of transport of spermatozoa through the ductular system. *Adv Biosci* 4: 121, 1969
- 8) Turner TT, Resorption versus secretion in the rat epididymis. *J Reprod* 72: 509, 1984
- 9) Hoskins DD and Casillas ER, Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. In *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol 5, Male Reproductive System*. p 453, American Physiological Society, 1975
- 10) Amann R, A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 2: 37, 1981

微小穿刺法により測定したラット精巢上体内精子濃度および一日精子産生能について

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

微小穿刺法によりラット精巢網、精巢上体頭部、体部、尾部の各部から管内液を採取し、精子濃度の測定を試みた。精巢上体における精子濃度は、精巢網から精巢上体尾部にかけて上昇した。ラット精巢においては、一日あたり、精巢実質 1 グラムにつき約 17×10^6 個の精子が産生されていた。精巢上体頭部、体部、尾部の各部では、それぞれ 0.25×10^6 、 0.31×10^6 、 0.38×10^6 個の精子を含んでいた。一日あたり精子産生能より割り出した精巢上体精子通過日数は、頭部、体部、尾部の各部において、それぞれ 3.4、4.3、5.3 日であった。従って、精巢上体内での精子成熟に要する期間は、おおよそ 12 日と考えられる。

(受付：1993年2月16日)

(受理：1993年12月8日)

マウス卵子の死滅と機械的刺激に見られる特異性

Specific Changes Due to Destructive Death and Mechanical Stimulation (Microinjection) in Mouse Ova

千葉県がんセンター血液化学療法科

小 黒 昌 夫

Masao OGURO

Division of Hematology and Chemotherapy

Chiba Cancer Center Hospital, Chiba 260, Japan

マウス卵子を用い、卵子の死滅および機械的刺激による変化を各種細胞のそれと比較した。卵子以外の細胞へのシリコンオイルの注射は細胞の種類により多彩な反応を示したが、可逆的な変化が多い。しかし瞬間的の死滅も見られた。卵子ではそのような変化は見られなかったが、2回目の注射には卵形質は硬く、強い抵抗を示した。注射後、卵形質が不規則な形態を示す場合には卵子は死滅する。穿刺針を抜去すると、針には多量の卵形質の付着が見られた。卵形質はDAPI陽性物質で満たされていることより、注射によりDNAの損失を伴うことが考えられる。卵子の自然崩壊の長期培養観察の結果では、受精卵では7年後でも透明帯を保持し、卵形質は萎縮するが、崩壊消滅しない受精卵の存在することが確認された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 233 - 238, 1994)

緒 言

人工授精の中で顕微授精は内外で広く試みられているが、卵子が機械的刺激(穿刺・注射)に対してどのように反応するか、また卵子の自然死滅の過程はどのようになっているかなどについての詳細な報告は少ない。

我々は1983年、浮遊細胞に高粘稠度の液体を注射する技法を開発し^{1,2)}、各種細胞における機械的刺激による細胞反応を比較観察したが、その際にマウス卵子(未受精卵と受精卵)についても比較した。最近、新しい手法を開発したので³⁾、過去7年間の長期観察の結果も含めてここに報告する。

材料と方法

材料としてはICRマウスの試験管内受精卵と未受精卵をHoppeら⁴⁾の培養液で培養した。比較に供した各種細胞は、マウス白血病細胞(L1210)、Lewis肺癌細胞、HeLa細胞、NIH-3T3細胞などの培養細胞を用いた。

受精卵に対する注射は受精後2分割期になる以前に行い、注射した細胞は2日間以上の観察を続け、細胞反応を追跡した。

卵子の自然死滅崩壊の観察には未受精卵6個、受精卵8個を培養液をかえることなく、特種の観察板(ZOG-5, エレコン科学)で37°C, 5%CO₂の培養器の中で培養した。長期観察は前記条件下で最長7年間保存し、定時的に観察を続けた。

細胞注射に使用した装置は既報^{1,2)}と同様であるが、その要点を述べると顕微操作器は成茂製MPI型2台(左右1台)を使用し、倒立顕微鏡はニコン製TMD型で対物レンズは20倍か100倍のレンズを使用。対象細胞はエレコン科学製微細操作観察板(ZOG-1あるいは2)に培養液と共に入れ注射する。細胞内微量注射法は独自に開発した注射装置(Zell mek社)を使用し^{1,2)}、5500倍の倍率下で細胞注射を実施し、必要に応じて細胞の映像をU-matic(ソニーVo5800型)で記録した。注射に使用した注射針は外径1mm毛細管(芯の入ったエレコン科学製)を母管とし、十分に脱脂洗浄し乾燥後、微毛細管作製器(Zell mek社)によ

り尖端の内径 $0.16\mu\text{m}$ 以下の注射針ならびに細胞捕捉管を作製する。細胞の捕捉は捕捉管に $-18\text{cm H}_2\text{O}$ の吸引力が出るような細胞捕捉固定装置で操作して行い、注射後は陽圧をかけ細胞を自由に浮遊させた。細胞用微細注射装置(Zell mek社)は注射針により液体試料を細胞内に注入するため加圧する装置であり、テフロン管により注射針に連絡され、これには圧力計も連結されているため、注入時の圧力が計測でき、注射針の先端までの閉塞の有無や適正な注入量の圧力が計測される。注射針はシリコナイズしたもので、しないものでも針の作製過程で焼かれるため注射の結果には関係なく、作製された針はガス滅菌され、針管保管容器で保存した(1週間以内に使用すれば滅菌は保持されている)。

一方、細胞内DNAの存在を知るために4', 6-diamidino-2-phenylindole \cdot 2HCl (DAPI)⁵⁾の $1\mu\text{g/ml}$ を培養液に添加し、落射型蛍光装置(ニコン)、倒立顕微鏡($\times 1500$)で観察した。

前記の注射物質としては注射後に細胞内での局在を確認するため、高粘稠度の $140\sim 300\text{SC}$ (水の粘稠度は 1CS である)のシリコンオイルを用いた。

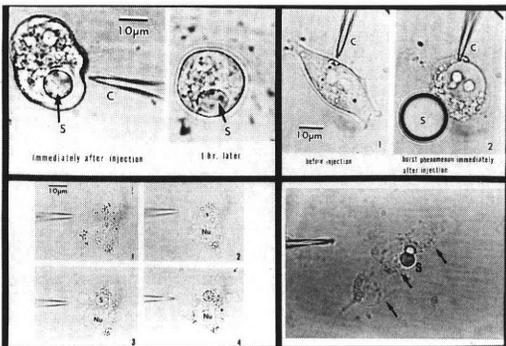


図1 各種細胞への注射による多彩な反応($\times 1500$)

左上: Lewis 肺癌細胞にシリコンオイル(S)を注射すると、注射部位が膨化突出したが、1時間後(右)には原形に復し、増殖を続けた。

右上: 同種細胞培養2日後の細胞で、注射前(1)に比し、注射2~3秒後で核を残し、細胞は萎縮した。

左下: 1. は注射前、2は核(NU)以外に注射(S)し、針を抜去すると2~3秒(3)で抜去部に膨化突出が出現し、4.15秒後にそれは消失したが、細胞の右側に同様の現象が出現した(HeLa細胞)。

右下: NIH-3T3(線維芽細胞)にシリコンオイル(S)を注射し、針を抜去すると、40秒後には矢印のように細胞が3分割された(以上の詳細は文献1. 2を参照されたい)。

結 果

1) 卵子以外の細胞に見られた細胞反応

図1に示したようにシリコンオイルの注射による細胞反応は、一般的には可逆的のことが多いが、穿刺・注射の直後に細胞の萎縮あるいは分割などの致死的变化も認められ、それらは細胞によっても異なっていたり。

2) 卵子にみられた注射による所見

図2, 3のように注射後、針を抜去すると注射針に卵形質が付着してくるが、針の抜去後に卵形質の形態に変化が出現する卵子はやがて死滅し、分割は認められなくなる。図4のように2回目の注射を試みると卵形質の表層は1回目の注射時より硬く、強い抵抗が認められるようになる。また注射針は1回目の注射でつまることが多く、2回目の注射には同一の注射針を使用することが不可能なことが多い。ただし $0.5\mu\text{m}$ 以上の内径の針ではつまることは少ない。

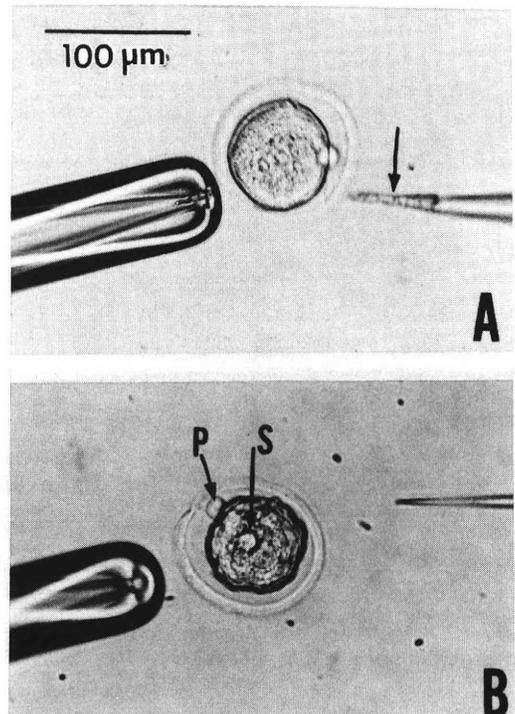


図2 マウス受精卵への注射による変形($\times 200$)

A: 矢印のように1回の穿刺により針の先端に卵形質が付着してくる。

B: シリコンオイル注射(S)により、卵形質の表層に波状の変形が生じ、この受精卵は3日後には萎縮し、死滅する。

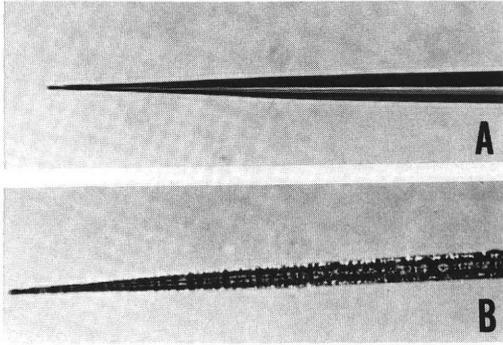


図3 注射針の穿刺前後(×400)

A: 注射前の表面。
 B: 注射後の針の表面に卵形質が付着していることがわかる。

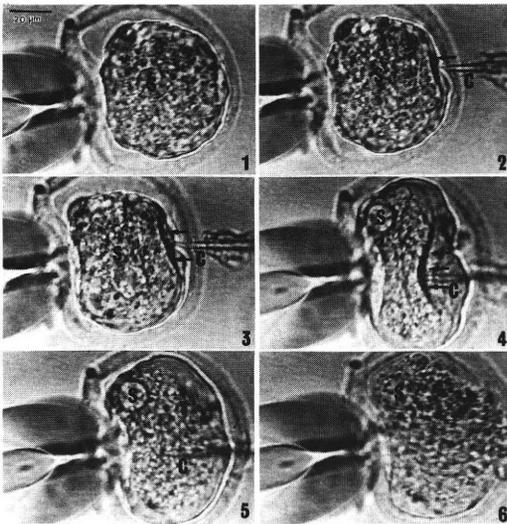


図4 受精卵への2回目の穿刺による変化(×200)

1: すでにシリコンオイルが注射されている(S).
 2~5: 針(C)が2回目の穿刺をすると、矢印のように卵形質の表層は硬く、抵抗を示した(2~4).
 5: 注射針はようやく卵形質内に入った。
 6: 針を抜去した。

3) 長期観察中に見られる卵子の自然死滅

卵子は受精と未受精にかかわらず、死に至ると卵形質は萎縮し、未受精卵は囲卵腔が拡大し、透明帯は不明瞭となり、遂には透明帯は消失し、卵子は融解するが受精卵よりも未受精卵が早期に自己融解した(図5,6)。しかし図6のように受精卵の8個の中の4個は、培養7年後でも自己融解が見られず残存していた。特に1個は全体としていくらかの萎縮は

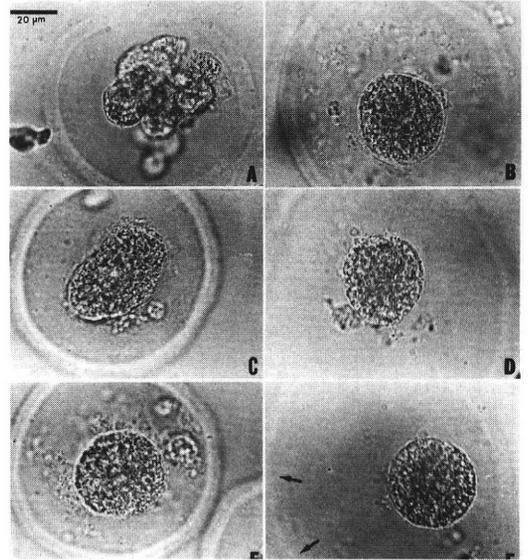


図5 培養7日目の卵子の形態(×1500)

A, C, Eは受精卵であるが、いずれも胚盤胞期には至らずに死滅し、卵形質は萎縮している。B, D, Fは未受精卵で、卵形質は萎縮しているが、受精卵と比較して囲卵腔は拡大(矢印)し、透明帯も淡く明瞭でない。

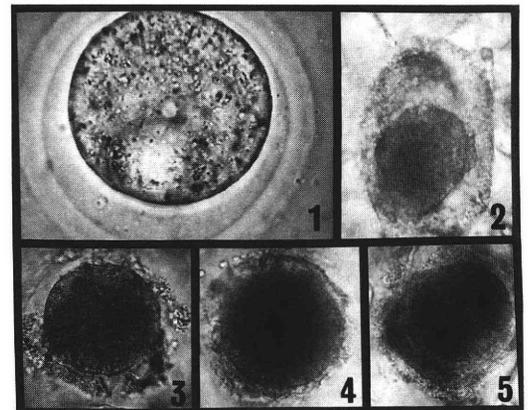


図6 受精後短時間と7年後の受精卵(×1500)

1: 2分割前の受精卵。
 2~5: 受精後も分割しなかった受精卵で、7年間追跡観察された4個の卵子。
 2: 7年間追跡した8個の中の1個で、卵形質は萎縮しているが、透明帯は保持されている。
 3~5: 早い卵子は136日頃より卵形質は萎縮が著明となり、3年後より透明帯の部分的欠損や消失が認められるが、卵形質の崩壊消滅は7年後にも認められなかった。しかしDAPI染色では陰性であった。

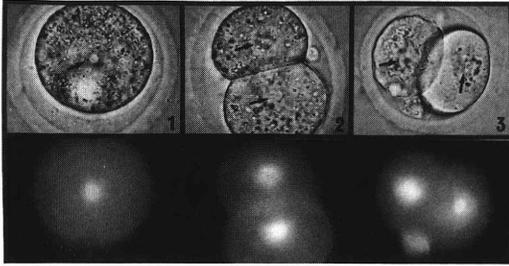


図7 受精卵のDAPIによる染色性(×1500)

1:受精後卵子で矢印のように核が認められる。
2,3:受精2日後で、2分割で分割は停止している。
各下段はDAPI染色陽性を示した蛍光写真で、卵形質は明らかに陽性であり、核はより強く陽性を示した。3.では極体もDAPI陽性であることを示している。

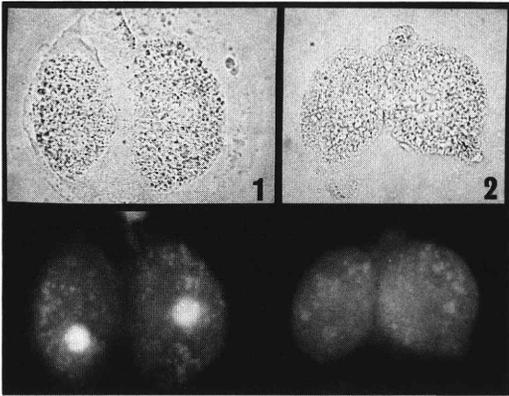


図8 受精卵2分割後のDAPI染色(×1500)

受精21日後であるが、1と2は共に2分割で分割が停止し、卵形質も粗構造を示している。
下段写真はそれらのDAPI染色で卵形質、核は陽性を示している。しかし染色性は粗となり、図7.のように均等に染色していない。
2の卵子では核の局在が不明瞭である。

認められたが、透明帯も保持された状態で観察され、他の3個の受精卵も部分的な透明帯の欠損は見られたが卵形質が萎縮し残存していることが確認された。これは未受精卵と著しく異なる所見である。

4) 卵子のDAPI染色所見

図7に示したように、受精後2分割期では卵形質は均等にDAPIに染色され、核は卵形質より強く陽性を示した。しかし図8のように受精卵が2分割期で分割を停止すると、21日後では卵形質のDAPI染色所見は不均等となり、核も不明瞭となる場合もある。未受精卵の場合には図9のように核は不明であるが、卵形質は受精卵より均等に染色されている。しかし

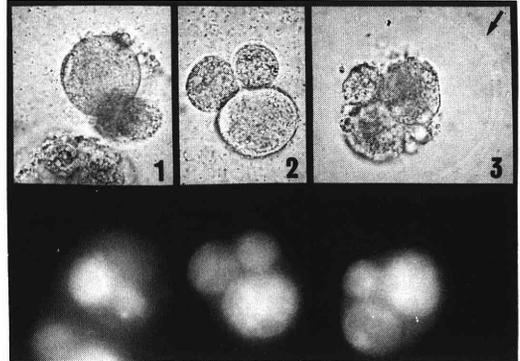


図9 未受精卵のDAPI染色像(×1500)

これらの3個は未受精卵の21日目(培養)であるが、3の卵子だけに透明帯の存在(矢印)が認められたが、他の1や2の卵子は透明帯は消失し、卵形質は裸であり、これらは1年以内で崩壊消滅する。

下段のDAPI染色では核の局在は不明であり卵形質のみが陽性を示している。

7年後では未受精卵は消滅しており、受精卵は残存していたが、培養液全体がDAPIで強く陽性であったため、卵子自体の染色性は不明となり、実験は中止された。

考 察

機械的刺激(穿刺・注射)に対する細胞の反応は細胞の種類によって多彩で、異なった反応を示したが、それは各々の細胞における防御機構の違い、細胞周期の違い、また核や原形質という穿刺部位の違いなどによるものと考えられる。

マウス卵子では1回目の注射では他の細胞のような細胞反応は認められず、また2回目の同一卵子に対する注射には、卵形質の表層は1回目の注射より硬く、強い抵抗を示した。これらの所見は他の細胞注射には認められなかった所見である。

機械的刺激によらない卵子の自然死滅の過程を追跡すると、未受精卵は受精卵よりも早期に崩壊消滅することが明らかとなった。受精卵の中には7年後の追跡観察でも透明帯を明らかに保持しているものもあり、透明帯が消失しても卵形質はいくらかの萎縮はあるが崩壊消失しないことが確認された。これは受精によって透明帯に特殊な変化が誘導され受精卵は外界からの変化を受けずに受精した透明帯によって保護されているものと考えられる。一般的には培養細胞は死後、早期薬物による場合は10日以内に崩壊消滅することからしても、このように長期間、原型を保持できることは受精卵の特徴といえる。す

なわち未受精卵は崩壊消滅するが受精卵にだけこのように長期間原型が保持されることは受精後の透明帯に不明な物質が誘導されるためと考えざるを得ず、ここにも受精現象の未知な課題が示唆される。

予期しなかった次の点は卵形質がDAPI陽性であり、またその経時的变化である。蛍光色素であるDAPIはDNAのアデニンとチミンの塩基結合に親和性があり、他とは結合しないことより、本色素はDNAの存在を証明する染色剤として利用されている。しかし本色素自体は細胞毒性を有することから、生きている細胞のDNAの推移を観察するには不相当と思われていた。我々は細胞毒性を示さない本剤の適正濃度を見出したので³⁾、その方法を用いて卵子中のDNAの局在を観察した。その結果、各種細胞では核のみがDAPIで染色され、他は染色されなかったが、卵子では核のみならず卵形質も染色された。しかし培養21日後には卵形質のDAPI陽性状態は不均一となり、核以外は遂にDAPI陰性となり、7年後には培養液がDAPI陽性となった。以上の所見は卵形質にも多量のDNAが存在することを示唆する。また卵子以外の細胞の死滅崩壊の経過をDAPI染色で追跡すると当然のことながら細胞核のみが染色され、死後はそれは大小不同に細断片化し、ほとんどは2週間以内に消滅(自己融解)することが一般的である。それは未受精卵の卵形質に見られたことと類似していたが、受精卵の核にはそのような所見は21日までは認められなかった。一般に高等生物の細胞内にDNAの存在する所は核とミトコンドリアといわれているが、DAPI染色では核のみ染色され、ミトコンドリアは染色されない(高倍率蛍光顕微鏡でも認識されない)。また一般細胞の死滅過程では核(染色体)のfragmentationが先行し、細胞は崩壊→融解する。その観点より勘案すると卵子にも核以外の卵形質中に、一般細胞の原形質内にあるミトコンドリアよりも高濃度のDNAが存在し、そのために卵形質までもDAPIで可視的に染色され、それが死の退行変化に伴い、DNAの不規則凝縮がおこされ、培養21日までみられるような卵形質のDAPI染色性が不規則な所見としてみられ、それも遂には崩壊し、染色性の消失へと進展するのかもしれない。培養液中に溶出されたDNAは、蛍光観察により一様なDAPI陽性液として7年後の観察に示された所見となったものと思われる。

このように死滅の過程でも受精卵は未受精卵や他の細胞のそれと異なっていることが認められた。

重要な点は卵子を穿刺し、穿刺針を抜去すると穿刺針には卵形質が付着することで、それは卵子穿刺

は卵形質のDNAの一部を針と共に取り出ししていることを強く示唆していることである。1回の穿刺でどの位のDNAが失われているかは測定出来なかったが、卵形質内への顕微授精法はなお解明すべき重要な問題が残されていることを示唆している。卵形質内への精子注入による妊娠成功率には、それらのことが関与しているのかもしれない。DNA欠損を伴うことが疑われる受精法は、たとえ妊娠が成功するにしても、将来のためには慎重であるべきであり、DNA学の立場よりなお重要な倫理的課題が残されているものと思われる。

本論文の要旨は第37回日本不妊学会で報告した。なおマウス卵子(受精卵, 未受精卵)は東邦大学医学部生物学・山田武教授より恵与されたことを深謝いたします。

文 献

- 1) 小黒昌夫, 相馬悌介, 細胞内微量注射法 I. 細胞工学 3:453, 1984
- 2) 小黒昌夫, 相馬悌介, 細胞内微量注射法 II. 細胞工学 3:543, 1984
- 3) 小黒昌夫, 抗癌剤による細胞核の動的変貌—初期より細胞融解まで—. 第49回日本癌学会総会記事, P390, 1990
- 4) Hoppe PC and Pitts S, Fertilization in vitro and development of mouse ova. Biol Reprod 8: 420, 1973
- 5) Richards GM, Modifications of the Diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. Anal Biochem 57: 369, 1974
- 6) Lee GM Thorntwait and Rash EM, Picogram per cell determination of DNA by cytofluorometry. Anal Biochem 137: 221, 1984
- 7) 小黒昌夫, 関 保雄, 細胞の形態変化からみたトポイソメラーゼ阻害剤耐性と感受性. Mebio 10: 66, 1993

Specific changes due to destructive death and mechanical stimulation (Microinjection) in mouse ova

Masao Oguro

Division of Hematology and Chemotherapy
Chiba Cancer Center Hospital, Chiba 260, Japan

Changes due to natural death and mechanical stimulation in the ova were compared with those in

various other cells using mouse ova. Most of the responses of cells other than the ova to microinjection consisted of reversible changes, but the nature of these responses widely differed among the various types of cells. However, "burst death" which occurs instantaneously is observed on rare occasions in these cells. Although "burst deaths" were not noted in the ova, the vitelline membrane of the ovum plasma became sclerotic. As a result, resistance was encountered on the second microinjection. The needles tended to become clogged even after a single injection. When the morphology of the ovum plasma showed irregular features, the ovum usually exhibited a course which

lead to its destructive death. When the injection needle was withdrawn, large amounts of ovum plasma adhered to it. Since the ovum plasma was filled with DAPI-positive substances, it is speculated that injection results in a loss of DNA.

Long-term observations of the natural death of ova have revealed that the unfertilized ovum is destroyed at an earlier stage than the fertilized ovum. Our investigation has confirmed that some fertilized ova still maintain their zona pellucida up to 7 years after their formation without being destroyed.

(受付：1993年10月18日)

(受理：1994年1月24日)

Pentoxifylline-Percoll液を用いた運動精子回収法の 有用性に関する検討

The Selection and the Stimulation of Motile Sperm Using Pentoxifylline-percoll Gradients

愛媛大学医学部産婦人科学教室

福井 敬介 Keisuke FUKUI	武田 康成 Yasunari TAKEDA	藤岡 徹 Touru FUJIOKA
北川 博之 Hiroyuki KITAGAWA	香浦 留美子 Rumiko KAURA	矢野 樹理 Juri YANO
	松浦 俊平 Shunpei MATSUURA	

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine
Ehime University, Ehime 791-02, Japan

精子無力症患者からの、運動精子回収および精子運動能賦活を目的としてpentoxifylline-percoll法 (PP法) を考案し、その有用性について検討した。精子無力症にて人工授精を5回以上施行しても妊娠しない37症例(61周期)に対し、患者の同意を得た上で、Pentoxifylline (1 mg/ml) 添加percoll液を用いて運動精子を回収し、Hamilton-Thorn Motility Analyzer (HTM) を用いて精子運動のパラメーターを測定した後、子宮内人工授精 (IUI) あるいは腹腔内人工授精 (IPI) を施行した。HTMによる測定値のうちmotility, path velocity, straight line velocity (VSL), lateral head displacement (ALH), curvilinear velocity (VCL) においてPP法はcontrolに比して有意な上昇を認めた。また、PP法による人工授精の妊娠率は8.2% (5/61) であった。以上からPP法は精子無力症における運動精子の濃縮、回収ならびに精子運動能賦活法として有効な方法であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 239 - 243, 1994)

緒言

Methylxanthine phosphodiesterase inhibitorは精子細胞内のcyclicadenosine 3' 5' monophosphate (cAMP) を増加させ、精子運動率を増加させる作用を有することが知られている¹⁾。Methylxanthin groupの中でpentoxifyllineはcaffeineやtheophyllinに比して長時間作用する特徴を持つことが報告されており²⁾、臨床的な有用性が注目されている。今回我々は精子無力症患者の精液からの運動精子濃縮回収および精子運動能賦活を目的としてPentoxifyllineを添加したPercoll液を作成し、これを用いて運動精子を回収し、その運

動性の変化をcomputer-assisted analyzerにて解析すると共に、回収した精子を用いて人工授精を行い、その妊娠率を検討したので報告する。

対象および方法

当科不妊外来において精子無力症(夫)のため人工授精を施行している症例のうち、clomidによる過排卵誘発および80% percoll法による運動精子選別を5回以上施行しても妊娠しない症例で同意の得られた37症例(61周期)を対象とした。4日間の禁欲後、手法にて精液を回収し、30分間室温にて液化させた後、Hamilton Thorn Research Motility Analyzer (HTM,

model 2030, version 7.0) を用いて精子運動の評価を行った。HTMの測定条件はtemperature 37°C, acquisition rate 30 frames/sec, acquisition time 0.67secにて 5 fields測定し, Motility, VAP (five-point running average path velocity, μ /sec), VSL (straight line average velocity, μ /sec), VCL (curvilinear velocity μ /sec), ALH (average of lateral head displacement, μ m), BCF (Beat cycle frequency, Hz), Linearity (VSL/VCL, %) の7つのパラメーターを計測した(図1)。次に80% percoll液 (Sigma Chemical Co) または 1 mg/mlのpentoxifylline (Sigma Chemical Co) 添加80% percoll液を 1 ml入れた15ml滅菌遠沈管(コーニング)に精液を 1 mlずつ重層して250×g, 20分間遠心した。それぞれの上清を除去した後, ペレットをHAM's F-10 medium (GIBCO) 2 mlを加えて洗浄し, 最終精子濃度が $1 \sim 2 \times 10^7$ /mlの精子浮遊液を作成し,

再びHTMにて各パラメーターを計測した。さらにpentoxifylline-percoll法 (PP法) を用いて回収した精子を用いて子宮内人工授精 (30症例, 54周期) あるいは腹腔内人工授精 (7 症例, 7周期) を施行し, その妊娠率について検討した。全周期ともclomidによる過排卵誘発を施行し, 経陰超音波断層法にて主席卵胞径が20mmとなった時点で人工授精を行った。結果はmean±SDで記載し, 有意差検定はStudent paired t-testを用いて行った。

結 果

未処理精子 (control群), 80% percoll法 (P群) およびpentoxifylline-percoll法 (PP群) により回収された精子の運動率はそれぞれ23.5±7.9, 51.9±24.6, 61.5±24.5 (%)であり, control群に比してP群およびPP群は有意

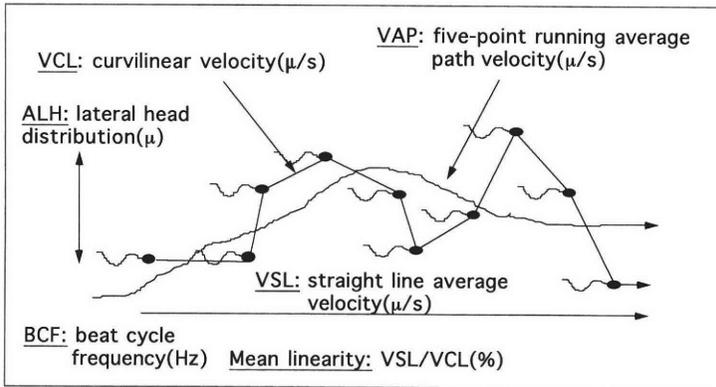


図1 Motility Analyzer HTM 2030, ver 7.0により測定した各精子運動パラメーター

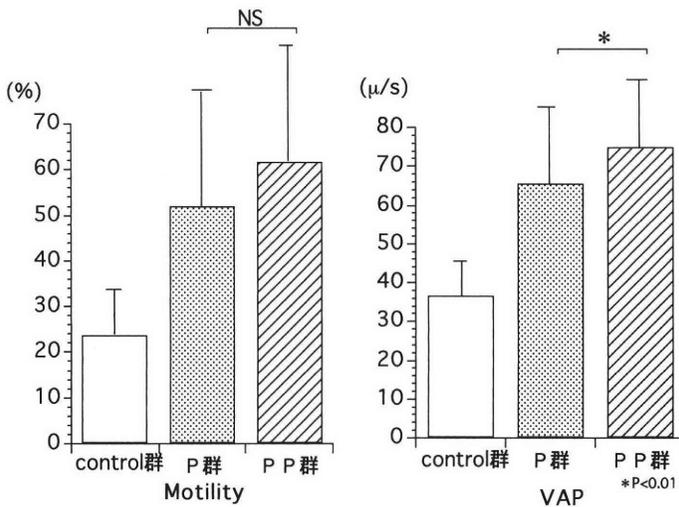


図2 control群, P群およびPP群における motility, five-point running average path velocity (VAP) の比較

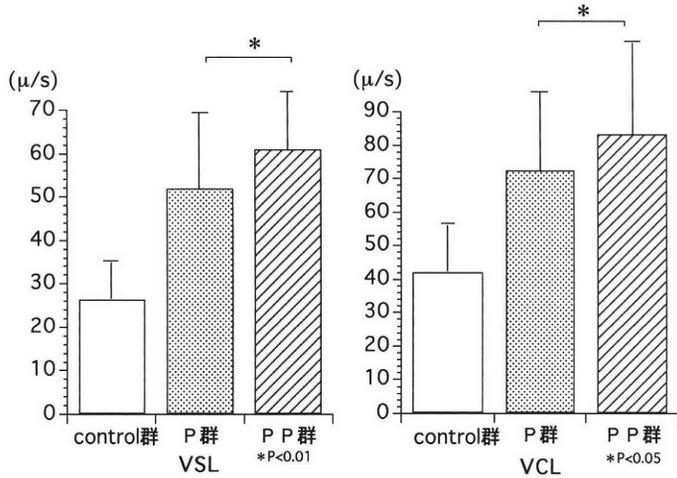


図3 control群, P群およびPP群におけるstraight line average velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) の比較

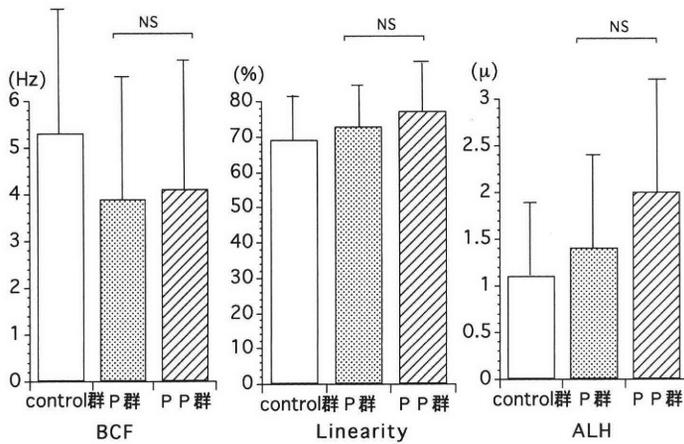


図4 control群, P群およびPP群におけるbeat cycle frequency (BCF), Linearity, average of lateral head displacement (ALH) の比較

な高値を示したが ($P<0.01$, $P<0.005$), P群, PP群間に有意差を認めなかった. VAPは 36.5 ± 8.8 , 65.5 ± 20.8 , 74.6 ± 15.4 (μ/sec) でcontrol群に比してP群およびPP群は有意な高値を示し ($P<0.005$, $P<0.0001$), さらにP群, PP群間にも有意差を認めた ($P<0.01$) (図2). VSLは 26.4 ± 6.1 , 51.8 ± 16.9 , 61.0 ± 10.3 (μ/sec) でcontrol群に比してP群およびPP群は有意な高値を示し ($P<0.001$, $P<0.0001$), P群, PP群間にも有意差を認め ($P<0.01$), VCLも 41.9 ± 12.6 , 72.3 ± 23.1 , 83.0 ± 20.9 (μ/sec) でありcontrol群に比してP群およびPP群は有意な高値を示し ($P<0.0005$, $P<0.0001$), 同様にP群, PP群間に有意差を認めた ($P<0.05$) (図3). しかし, 3群におけるBCFは 5.3 ± 3.9 , 3.9 ± 2.5 , 4.1 ± 2.8

表1 PP法を用いた子宮内人工授精および腹腔内人工授精の成績

AIH	cycle (case)	Pregnancy No.	Pregnancy rate
IUI	54	4	7.4%
	(29)	(4)	(13.3%)
IPI	7	1	14.2%
	(7)	(1)	(14.2%)
	61	5	8.2%
	(37)	(5)	(13.5%)

(Hz), Linearityは 69.1 ± 11.2 , 72.7 ± 11.5 , 77.1 ± 10.7 (%), ALHは 1.1 ± 0.8 , 1.4 ± 1.0 , 2.0 ± 1.2 (μ) とALHにおいてPP群がP群に比して高値を示す傾向が認められたが($p=0.055$), その他に関しては3群間における統計学的有意差はなかった(図4).

次にPP法を用いた子宮内人工授精および腹腔内人工授精の一周期あたり(または症例あたり)の妊娠率はそれぞれ7.4% (4/54cycles), 13.3% (4/30cases) および14.2% (1/7cycles), 14.2% (1/7cases)であり, 両者を総合した妊娠率は8.2% (5/61cycles) および13.5% (5/37cases)であった(表1).

考 察

Pentoxifyllineは精液中における精子の運動能力を延長し, その作用時間はCaffeineやTheophyllinなど他のMethylxanthine誘導体に比してlong lastingであることがTurner et al.²⁾によって報告されて以来, male factor infertility (asthenozoospermia, oligozoospermia) に対する有用性が報告されており³⁾, assisted reproductive technologyを補佐する薬剤として注目されている. PentoxifyllineはcAMP phosphodiesteraseを阻害し, 精子細胞内のcAMPを上昇⁴⁾, glycolysisの亢進, mitochondrial oxidative phosphorylationを亢進させる⁵⁾ ことによりその作用を発現すると考えられている. Yanagimachi⁶⁾は精子受精能獲得は精子細胞内のcalciumの上昇と共に細胞内のcAMPの上昇に依存していると報告しており, 最近, Samuel et al.⁷⁾はasthenozoospermiaのspermとpentoxifylline (1 mg/ml; 3.6mM) を1時間作用させたところ, hyperactivation rateが上昇したと報告していることからcAMPの上昇と精子capacitationとの関連性が示唆される. また, Sheena et al.⁹⁾は正常精液よりswim-up法によって回収したmotile spermを1mg/mlのpentoxifyllineにて処理後, 精子運動の各パラメーターの検討を行っているが, 培養開始15分後においてVSL, VAPの有意な上昇, Liniarityの有意な低下がみられ, 培養開始30分以後はVSL, VAPの有意な上昇, Liniarityの有意な低下に加え, BCF, ALHの上昇が認められ始めたことと報告している. これはpentoxifyllineとの共培養の15~30分間以後に有意に精子運動性の変化が現れることを示唆している成績と考えられる. 今回我々の成績ではVCL, VSL, VAPにおいて有意な上昇を認めたと, ALH, BCF, Liniarityにおいては著明な変化を認めず, Burkman et al.⁸⁾によって提唱されているhyperactivationのcriteria (VCL>100mic/sec, BCF>7.5Hz, Linearity<65%)を満たす傾向は得られなかった. こ

れはpentoxifylline-percoll処理あるいはpercoll処理の後, 培養を行っていないのが原因ではないかと考えられる. 今後pentoxifylline-percoll処理を行った後に培養を加え, 精子運動性の経時的変化およびhyperactivation rateの変化を検討する必要がある. また, male infertility症例に対するpentoxifyllineの臨床的応用については, Yovich et al.¹⁰⁾がmale infertilityの57症例 (61周期) に対しpentoxifylline処理を用いPROST (pronuclear stage tubal transfer) あるいはTEST (tubal embryo stage transfer) を施行し, 有意に受精率, 胚移植症例数が増加し, これまでに17人の生児を得ているが奇形等はなく, すべて正常児であったこと, early pregnancy lossの比率はpentoxifylline処理しない場合と同様であることよりhuman embryoに対するtoxicityは低いのではないかと報告している. さらにasthenozoospermiaあるいはoligo-asthenozoospermiaに対しpentoxifylline (経口投与) のin vivoにおける検討も行われている^{11,12)}. Shen et al.¹³⁾はasthenozoospermiaの8症例に対し, pentoxifylline (1200mg/day) を3カ月間投与し, 投与前に比べ精子濃度は変化しなかったが, 精子運動率は有意に増加したと報告しており, 今後, in vivo投与前後における精子運動の各パラメーターの変化や人工授精の妊娠率に対する効果などについてさらに検討が必要であると考えられる. また, 当科のpercoll法による人工授精 (AIH) 妊娠症例における妊娠までの平均AIH施行回数は 1.9 ± 1.1 回であった¹⁴⁾. これは反復AIHにおいて3~4回目以降の妊娠率は低いことを示唆する成績であり, これらの症例に対して何らかの補助的治療を加える必要がある. 今回, percoll-AIHを5回以上施行しても妊娠に至らない37症例に対しPP法を用い5例 (13.5% per cases) に妊娠が成立した. これは反復AIHの不成功例に対してのPP法の有用性を示唆する成績であり, これらの症例に体外受精や顕微授精を施行する前段階に行う治療法の一つとして簡便かつ有用であると考えられる.

文 献

- 1) Aparicio NJ, Turner EA, Schwarzstein L, et al., Effect of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline on human sperm motility. *Andrologia* 12: 49, 1980
- 2) Turner EA, Aparicio NJ, Turner D, et al., Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphatase and a β -blocking agent on human sperm motility. *Fertil Steril* 29: 328, 1978
- 3) Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, et al.,

Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertil Steril* 50: 179, 1988

- 4) Tash JS, Means AR, Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cAMP and calcium. *Biol Reprod* 26: 745, 1982
- 5) Rees JM, Ford WCL, Hull MGR, Effect of caffeine and pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 90: 147, 1990
- 6) Yanagimachi R, Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, et al., eds, *The physiology of reproduction*. 1 ed, p135, Raven Press, 1988
- 7) Pang SC, Williams DB, Huang T, et al., Effect of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivated motility in vitro: a preliminary report. *Fertil Steril* 59: 465, 1993
- 8) Burkman LJ, Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch Androl* 13: 153, 1984
- 9) Lewis SEM, Moohan JM, Thompson W, Effect of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* 59: 418, 1993
- 10) Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, et al., Influence of pentoxifylline in severe male infertility. *Fertil Steril* 53:15, 1990
- 11) Marsiglia EAP, Eid JS, Pentoxifylline treatment of asthenozoospermia. *Andrologia* 15 (T) :571, 1982
- 12) Marrama P, Baraghini GF, Carani C, et al., Further studies on the effects of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligo-asthenozoospermia. *Andrologia* 17: 612, 1985
- 13) Shen MR, Chiang PH, Yang RC, et al., Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br J Clin Pharmacol* 31: 711, 1991
- 14) 武田康成, 矢野樹理, 福井敬介 他, 当科におけるAIH法の変遷と成績. *産婦中四会誌* 41: 320, 1993

The selection and the stimulation of motile sperm using pentoxifylline-percoll gradients

Keisuke Fukui, Yasunari Takeda, Touru Fujioka, Hiroyuki Kitagawa, Rumiko Kaura, Juri Yano, and Shunpei Matsuura

Department of Obstetrics and Gynecology
School of Medicine, Ehime University
Ehime791-02, Japan

Pentoxifylline, one of methylxanthine derivatives, have been shown to increase the sperm motility. It acts by inhibiting cAMP phosphodiesterase, leading to an increase in intracellular cAMP levels. We evaluated the effect of pentoxifylline-percoll centrifugation method on the characteristics of the sperm motility using computer assisted sperm motility analyzer, and the influence on outcome of artificial insemination with husband's semen (AIH) in asthenozoospermia. The semen samples were collected from patients of asthenozoospermia (n=61) undergoing AIH. The liquefied semen was layered onto 80% percoll gradients containing 1mg/ml of pentoxifylline, and centrifuged at 250×g for 25 minutes. The sperm pellet was suspended with HAM's F-10 medium and MOT (motility), VAP (five-point running average path velocity), VSL (straight line average velocity), VCL (curvilinear velocity), ALH (average of lateral head displacement), BCF (beat cross frequency), and Linearity (VSL/VCL) were measured by Hamilton-Thorn Research Motility Analyzer (HTM, model 2030, version 7.0). Intrauterine insemination (IUI) or intraperitoneal insemination (IPI) was performed after HTM analysis. The results were as follows. Pentoxifylline-percoll treatment significantly increase the level of VCL, VAP, and VSL. However, the level of MOT, ALH, BCF, Linearity did not remarkably change. Pregnancy rate of AIH was 8.2% (5/61) per cycles and 13.5% (5/37) per cases using pentoxifylline-percoll treated sperm. In conclusion, pentoxifylline-percoll centrifugation method was valuable to the sperm treatment for cases of male factor infertility, specially for asthenozoospermia.

(受付: 1994年1月17日)

(受理: 1994年3月2日)

EFFECTS OF LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR ON MOUSE UTERINE EPITHELIAL CELLS AND BLASTOCYSTS

Eing-Mei TSAI

Department of Gynecology and Obstetrics, Kyoto University
Faculty of Medicine, Kyoto 606-01, Japan
Department of Gynecology and Obstetrics, Kaohsiung Medical College
Kaohsiung, Taiwan

Yasuo GOTO, Masahide SHIOTANI, Takahiro NAKAYAMA
and Takahide MORI

Department of Gynecology and Obstetrics, Kyoto University
Faculty of Medicine, Kyoto 606-01, Japan

Yoichi NODA

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

Abstract: To elucidate a physiological role for leukemia inhibitory factor (LIF) in implantation, we examined the effects of this cytokine on the protein synthesis in mouse uterine epithelial cells and on the development of mouse blastocysts. Uterine epithelial cells obtained from pseudopregnant day 3~5 ICR mice were cultured for 24 hr prior to adding different concentrations of mouse recombinant LIF (0, 250, 1,000, 2,500 and 5,000 units/ml) along with L- [4, 5-³H] leucine. After culturing for an additional 14hr, the incorporation of L- [4, 5-³H] leucine into uterine epithelial cells from pseudopregnant day 4 or day 5 mice was found to increase significantly when 1,000 units/ml or more LIF was added. In contrast, no significant effect of LIF, at any concentration, was observed on cultured uterine cells from pseudopregnant day 3 mice. In another series of experiments, blastocysts from ICR mouse were cultured without or with LIF (1,000, 2,500 and 5,000 units/ml). The percentages of degenerated embryos in LIF-treated groups were lower than in controls after 48 hr and 72 hr of culture. These results suggest that LIF may promote protein synthesis in uterine epithelial cells and play a role in supporting the survival of the embryo, and thus favor implantation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 244 - 249, 1994)

Introduction

A growing number of cytokines have been found but they cannot be readily categorized according to their function, because they have diverse and often overlapping effects on a variety of cell types. Leukemia inhibitory factor (LIF), one of the cytokines first isolated from mice, is a 45 to 56 kDa

secreted glycoprotein that induces differentiation and inhibits the proliferation of the M1 myeloid leukemia cell line^{1~3}). In the reproductive system, in contrast to the effects just described, LIF stabilizes mouse embryonal stem cells in culture, preventing them from undergoing spontaneous differentiation^{4,5}). Several other effects of LIF on embryogenesis have been described such as enhancement of the

development of 8-cell stage mouse embryos with murine LIF⁶⁾, and increased viability of cultured ovine embryos with human LIF⁷⁾. Stewart and his colleagues⁸⁾ reported intense LIF mRNA expression in the mouse uterine endometrial glands on days 4~5 of pregnancy. Furthermore, they demonstrated that female mice lacking a functional LIF gene are fertile but that blastocysts fail to implant and do not develop⁹⁾.

In this study, to gain further insight into a physiological role for LIF in the reproductive system, we have examined the effect of this cytokine on protein synthesis in mouse uterine epithelial cells. In addition, we examined the effects of LIF on the development of mouse blastocysts.

Materials and Methods

Culture of mouse uterine epithelial cells

Virgin ICR female mice, 6~10 weeks of age, were housed with vasectomized male mice of the same strain. Mating was confirmed by the presence of a vaginal plug on the following morning, which was designated as day 1 of pseudopregnancy. The mice were sacrificed by cervical dislocation on day 3~5 of pseudopregnancy between 13:00 hr and 15:00 hr, and the uterine tissue was collected for epithelial cell culture. We followed the culture methods described by Tomooka et al.¹⁰⁾ with minor modifications. The uterine were excised and cut longitudinally to expose the endometrial surface. These pieces were transferred to a disposable sterile 50 ml polypropylene tube and rinsed with culture medium; a 1:1 mixture of Ham's F-12 and DMEM (Sigma Co., St. Louis, U.S.A.) containing 10% fetal calf serum (Gibco, New York, U.S.A.). The uterine pieces were incubated in 10ml of Ca- and Mg- free phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine pancreatic trypsin (Sigma Co.). Tissues were first incubated at 4°C for 60 min and then at 37°C for another 40 min.

After discarding the supernatant, 30~40 ml of fresh culture medium was added and the tube was gently shaken to dissociate the epithelium from the uterine pieces. Sheet-like epithelial fragments in the supernatant were collected with a pipet. This procedure was repeated three times. The epithelial

fragments were then centrifugated at 100g for 5 min. To obtain good cell separation and avoid large fragments, the pellet was resuspended in culture medium and passed through a 27 gauge needle and mesh wire gauze (38 μ m/ aperture, TOP, Kyoto, Japan). A suspension of 5×10^5 cells per ml was prepared and 0.1 ml of the suspension was inoculated into each well of 96-well multiplate (Corning, New York, U. S. A.). The cells were cultured under 5% CO₂ in air at 37°C. Observation with a phase-contrast microscope revealed that most of the cells showed an epitheloid pattern.

Mouse embryo recovery and culture conditions

To induce superovulation, 4 week old ICR female mice were intraperitoneally injected with 5 units of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Teikoku Zoki Co., Tokyo, Japan) at 18:00 hr, followed by 5 units of human chorionic gonadotropin (hCG, Teikoku Zoki Co.) 48 hr later. After the hCG injection, the animals were housed with male mice of the same strain overnight. Vaginal plug formation was confirmed the next morning (day 1 of pregnancy). Embryos were recovered from uterus with PBS at 14:00 hr on day 4 (92 hr after hCG injection), and cultured in a drop of Biggers-Whitten-Whittingham's (BWW) medium¹¹⁾ under mineral oil and 5% CO₂ in air at 37°C in a 4-well multidish (Nunc, Roskilde, Denmark).

Incorporation of L- [4, 5-³H] leucine by uterine epithelial cells

The incorporation of L- [4, 5-³H] leucine (specific activity, 5.0 TBq/m mol; Amersham Japan, Tokyo, Japan) was used as an index of the amount of protein synthesized by the uterine epithelial cells. After culture for 24 hr, the culture medium was replaced with medium containing different doses of mouse recombinant LIF (ESGRO, AMRAD Corp. Ltd., Melbourne, Australia) along with L- [4, 5-³H] leucine at a concentration of 370 kBq/ml (1 μ Ci/100 μ l). The cells were then cultured for an additional 14 hr. At the end of the culture period, the medium was removed and the cells were rinsed twice with PBS and then lysed with 0.1 ml of 0.5 N NaOH. The NaOH solution was transferred to glass tubes. The wells were then rinsed with 0.1 ml of 0.5 N HCl and the rinsings were also transferred to the glass tubes.

Ice-cold trichloroacetic acid (TCA; Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan), at a final concentration of 10%, was added to each tube. The TCA-insoluble materials were collected on glass fiber filters, rinsed twice with 5% TCA and once with ethanol and dried. The radioactivity incorporated was then determined by a liquid scintillation counter.

Experiment 1: Effect of LIF on mouse uterine epithelial cells

By the method described above, we examined the effect of LIF at a variety of concentrations (0, 250, 1,000, 2,500 and 5,000 units/ml) on L- [4, 5-³H] leucine incorporation into cultured uterine epithelial cells obtained from pseudopregnant day 3~5 mice. For each experiment, which was performed 3 times, 8 wells of cells were exposed to each concentration of LIF.

Experiment 2: Effect of LIF on mouse blastocysts

Blastocysts recovered 92 hr after hCG injection were cultured in BWW to which LIF was added at a variety of concentrations (0, 1,000, 2,500 and 5,000 units/ml). The embryos were observed every 24 hr under a phase-contrast microscope and the numbers of degenerated embryos were noted. For each experiment, blastocysts were recovered from 6 mice and pooled in PBS, and 16 blastocysts were randomly introduced into droplets containing LIF. The experiments were performed 4 times.

Statistical analysis

For Experiment 1, one way ANOVA and Fisher's PLSD test were performed for statistical analysis, whereas Fisher's exact test was used for Experiment 2.

Results

Experiment 1

When LIF at concentrations of 1,000 units/ml or more was added to uterine epithelial cells from pseudopregnant day 4 mice, the incorporation of L- [4, 5-³H] leucine increased significantly ($P<0.05$). A maximum effect was observed with a LIF concentration of 5,000 units/ml (an increase of 73.0%). Similarly, with cultured uterine epithelial cells from pseudopregnant day 5 mice, incorporation of L- [4, 5-³H] leucine increased by 60.6% ($P<0.05$) with 5,000 units/ml of LIF. In contrast, no effect of LIF, at any concentration, was observed on cultured uterine cells from pseudopregnant day 3 mice (Table 1).

Experiment 2

The percentages of degenerated embryos in the LIF-added groups were lower than in untreated embryos after culturing for 48 hr (day 6) and 72 hr (day 7). A significant ($P<0.05$) decrease was observed with LIF at 5,000 units/ml. After culturing for 24 hr (day 5), no marked differences were observed between LIF-added groups and the control group (Table 2).

Table 1 Effect of LIF on incorporation of L- [4, 5-³H] leucine by cultured uterine epithelial cells of pseudopregnant mice

LIF (units/ml)	Incorporation (cpm/well)		
	day 3 ^a	day 4 ^b	day 5 ^c
0 (control)	247 ± 20.8	185 ± 8.6	274 ± 48.6
250	225 ± 23.8	210 ± 10.4	251 ± 16.9
1,000	305 ± 70.2	256 ± 14.4*	318 ± 33.3
2,500	272 ± 69.2	275 ± 24.1*	330 ± 19.2
5,000	198 ± 20.8	320 ± 22.0*	440 ± 25.7*

Values are mean ± s.e.m. for 24 replicates
(8 wells/experiment × 3 experiments)

^a Cultured uterine epithelial cells from pseudopregnant day 3 mice

^b Cultured uterine epithelial cells from pseudopregnant day 4 mice

^c Cultured uterine epithelial cells from pseudopregnant day 5 mice

* $P<0.05$, significantly different from control

Table 2 Effect of LIF on the in vitro development of mouse blastocysts

LIF (units/ml)	No. of Blastocysts ^a	No.(%) of Degenerated Embryos		
		day 5 ^b	day 6 ^c	day 7 ^d
0(control)	64	3(4.7)	7(10.1)	8(12.3)
1,000	64	1(1.6)	2(3.1)	3(4.7)
2,500	64	2(3.1)	3(4.7)	3(4.7)
5,000	64	1(1.6)	1*(1.6)	1*(1.6)

^a Recovered 92 hr after hCG injection (day 4)

^b Twenty four hr after the initiation of culture

^c Forty eight hr after the initiation of culture

^d Seventy two hr after the initiation of culture

* P<0.05, significantly different from control

Discussion

In Experiment 1, we showed that LIF enhanced the protein synthesis of cultured uterine epithelial cells obtained from pseudopregnant day 4 and 5 mice. LIF had no effect on uterine epithelial cells from pseudopregnant day 3 mice. Since implantation is known to occur in the morning on day 5 in mice, it is likely that LIF regulates implantation. Our results also showed that the effect of LIF on the protein synthesis of uterine cells occurs even if the embryos are not viable. From another study it is known that an intense LIF mRNA expression occurs in the uterus, specifically in endometrial glands, on days 4 ~ 5 of pregnancy, and that LIF is not expressed in the endometrial glands prior to the onset of implantation⁸). These investigators also reported that LIF expression is independent of the embryos and under maternal control⁸). Furthermore, they demonstrated by using transgenic mice lacking a functional LIF gene that blastocysts implantation depends on maternal expression of LIF⁹). However, it has not been known whether a dramatic, but transient, burst of LIF mRNA expression in endometrial glands in the uterus results in secreted LIF binding to and acting on endometrial cells. Considering our observation that LIF enhanced the protein synthesis of cultured uterine epithelial cells, it is probable that LIF has an autocrine effect on the uterine epithelial cells. Several different kinds of analyses have led to the suggestion that differences in the proteins synthesized in response to

progesterone or estradiol mediate uterine development¹²). Much effort has been directed towards indentifying specific proteins which characterize the different stages of uterine development. Considering the timing of LIF expression and the results of the present study, LIF might play an important role in the synthesis of proteins which might distinguish prereceptive, receptive, or refractory uterine cells.

Further analyses (for example, use of anti-LIF antibody) would be necessary to clarify whether the effects observed in this study are LIF specific or not. But, taking into account the above-mentioned results by us and other investigators, it would be likely that the effects are LIF specific. As to the dose of LIF used in this study, it is reported that the injection into mouse uterine lumen of 10,000~20,000 units of LIF stimulated implantation⁹), though the exact amount of LIF secreted into uterine lumen by endometrial cells is not well known. Therefore, it is likely that the amount of LIF used in this study might be a physiological dose.

LIF may also exert effects on the embryo. In Experiment 2, LIF decreased the degeneration rate of in vitro cultured mouse blastocysts. This result is consistent with described effects of human recombinant LIF (hLIF) on the ovine embryos at the morula or early blastocyst stage⁷). According to this report, fewer embryos degenerated when cultured in medium containing hLIF and the pregnancy rate increased when these embryos were transferred to recipient ewes. Thus, LIF may play a role in

supporting the survival of the embryo during the critical implantation period.

Several reports showed that LIF enhanced embryo hatching. Fry et al.⁷⁾ showed that the addition of hLIF to culture medium increased the number of morula- or early blastocyst-stage sheep embryos that hatched from the zona pellucida after 48 hr of culture. The addition of hLIF to culture medium containing mouse 8-cell embryos was also shown to result in a marked increase in the number of embryos completing the developmental changes associated with implantation⁶⁾. Kato et al.¹³⁾ showed that the proportion of mouse 8-cell embryos developed to hatched blastocysts increased when cultured with LIF. Little has been known about the action mechanism of LIF on embryos. However, considering the report that mRNA for LIF receptor is present in mouse embryos¹⁴⁾, LIF might have a direct effect on embryos.

In conclusion, we showed that LIF enhanced protein synthesis in cultured uterine epithelial cells obtained from pseudopregnant day 4 and 5 mice. In addition, this cytokine protected 4-day-old mouse embryos from degeneration. These results suggest that LIF may have an autocrine effect on uterine epithelial cells themselves and that it may regulate the embryo, directly or indirectly, so as to favor implantation. The next issue to be elucidated would be the relationship of this cytokine to other cytokines, since various cytokines have been recently implicated as positive or negative factors in pregnancy and early embryo development in vitro, forming a so-called "cytokine network"¹⁵⁾. Furthermore, the relationship to sex steroids, which have been known to be associated with implantation, also remains to be clarified.

References

- 1) Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M, Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* 259: 10978, 1984
- 2) Gearing DP, Gough NM, King JA, et al., Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 6: 3995, 1987

- 3) Gough NM, Gearing DP, King JA, et al., Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding for myeloid leukaemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci* 85: 2623, 1988
- 4) Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al., Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684, 1988
- 5) Gearing DP, Nicola NA, Metcalf D, et al., Production of leukaemia inhibitory factor in *Escherichia coli* by a novel procedure and its use in maintaining embryonic stem cells in culture. *Bio/Technology* 7:1157, 1989
- 6) Robertson SA, Lavranos TC, Seamark RF, In vitro models of the maternal fetal interface. In: Wegmann TG, Nisbett-Brown E, Gill TJ, eds, *The Molecular and Cellular Immunology of the Maternal-Fetal Interface III*. p191, Oxford University Press, 1990
- 7) Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, et al., Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol Reprod* 46:470, 1992
- 8) Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL, Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci* 88:11408, 1991
- 9) Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, et al., Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76, 1992
- 10) Tomooka Y, DiAugustine RP, McLachlan JA, Proliferation of mouse uterine epithelial cells in vitro. *Endocrinology* 118:1011, 1986
- 11) Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG, The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC Jr, ed, *Methods in Mammalian Embryology*. p86, Freeman Co, 1971
- 12) Mulholland J, Leroy F, Protein and mRNA synthesis in the peri-implantation rat endometrium. In: Yoshinaga K, ed, *Blastocyst Implantation*. p31, Adams Publishing Group Ltd, 1989
- 13) Kato Y, Odagaki S, Tsunoda Y, Effects of leukemia inhibitory factor(LIF) on the developmental ability of mouse 8-cell embryos in vitro and in vivo. *J Mamm Ova Res* 10:194, 1993
- 14) Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M, Pregnancy associated increase in mRNA for soluble D-factor/LIF receptor in mouse liver. *FEBS Lett* 334:193, 1993
- 15) Tartakovsky B, Ben-Yair E, Cytokines modulate preimplantation development and pregnancy, *Dev Biol* 146: 345, 1991

**白血病細胞増殖抑制因子 (LIF) のマウス子宮内
膜上皮細胞および胚盤胞に対する影響**

京都大学医学部婦人科学産科学教室
(現) 高雄医学院婦産科

蔡 英美

京都大学医学部婦人科学産科学教室

後藤康夫 塩谷雅英 中山貴弘
森 崇英

滋賀医科大学産科学婦人科学教室

野田洋一

白血病細胞増殖抑制因子 (LIF) の着床現象における生

理的役割を明らかにすることを目的として、LIFがマウス子宮内膜上皮細胞の蛋白合成能およびマウス胚盤胞の発育に及ぼす影響を検討した。偽妊娠3、4、5日のICR系雌マウスの子宮内膜上皮細胞を各種濃度の組換え型マウスLIF (0, 250, 1,000, 2,500, 5,000 units/ml) とともに24時間培養した後、L- [4, 5-³H] leucineの取り込み量を測定した。偽妊娠4日の細胞では、1,000 units/ml以上の濃度の添加で取り込み量は有意に上昇した。また、偽妊娠5日の細胞では、5,000 units/mlの濃度の添加で有意な取り込み量の上昇を認めた。一方、偽妊娠3日の細胞では、いずれの濃度においても取り込み量に有意な差は認めなかった。次に、ICR系雌マウスより得た胚盤胞の培養系にLIFを添加したところ、培養後48および72時間での変性卵の割合は、非添加群に比し有意に低下した。以上の結果から、LIFは子宮内膜上皮に対してその蛋白合成を促進している可能性が示唆された。また、着床期の胚に対しては、その生存に促進的に働くものと考えられた。

(受付：1994年2月1日)

(受理：1994年3月11日)

未婚または挙児希望の若年性子宮体癌 8 症例の検討 — 保存的治療の可能性 —

Treatment of Endometrial Carcinoma in Eight Unmarried or Infertile Women 40 Years of Age or Younger

群馬大学医学部産科婦人科学教室

小原 満雄

Mitsuo OBARA

宇津木 利雄

Toshio UTSUGI

上条 隆典

Takanori KAMIZYOU

水沼 英樹

Hideki MIZUNUMA

安藤 一道

Kazumichi ANDOH

伊吹 令人

Yoshito IBUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Gunma University
School of Medicine, Gunma 371, Japan

未婚または挙児希望の若年性子宮体癌 (22~34歳) 8 例を経験し、4例にプロゲステロン (MPA) を主体とした保存療法を試み、2例には妊娠・分娩例も経験した。8例中 4 例は肥満、排卵障害のあるPCO症例であった。筋腫核出時の筋腫に付着した子宮内膜よりadenocanthomaが発見された不妊婦人では、MPAと内膜搔爬にて以後異常所見は出現せず、2年と 4 年後に 2 人の健児を得た。子宮鏡、超音波断層法、MRIにて筋層および頸部浸潤が認められなかった 3 例にも MPA を主体に保存的治療を試み、1例に健児を得て、その後の経過に異常を認めていない。1例は保存療法では病変の進行が認められ、手術療法を行った。残りの 4 例は、本人の希望と超音波断層やMRIにて筋層浸潤が認められたため、primary operationを行った。

妊孕性温存を期待した若年性子宮体癌に対する保存的治療は、診断や治療効果、妊娠許可の点など多くの問題をもつが、適応を満たした症例には一度は試みてよい治療法と考えられる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 250 - 256, 1994)

緒 言

若年性子宮体癌の定義は一般的に40歳未満のものとする事が多いが、その発生頻度は全子宮体癌の5~10%である^{1,2)}。しかし、そのうちの多くが未婚や不妊婦人であることから、妊孕性の温存の可否が大きな問題となる。近年、若年性子宮体癌症例に対してプロゲステロンなどを用いた保存療法とその後の妊娠例の報告³⁻⁶⁾が散見されるようになったが、現時点では保存療法の適応についての明確な方針は定まっていないのが実状である。

今回我々は、未婚または挙児希望の0期(異型内膜増殖症)を含む若年性子宮体癌 8 例を経験し、うち 4

例に保存療法を試み、2例には妊娠・分娩例も経験したので報告する。

対象および方法

当教室では、1988年からの5年間に68例の異型内膜増殖症を含む子宮体癌症例を経験した。このうち8例(11.7%)が40歳以下(22~34歳)の若年性子宮体癌症例で、8例すべてが妊娠歴のない未婚または挙児希望婦人であった(表1)。2例が20歳代であり、既婚の4例のうち3例は不妊治療中に診断された。4例にPCOによる排卵障害があり、すべて体重80Kg以上の肥満を認めた。5例は不正出血の精査の結果診断され、2例は検診や不妊治療中の超音波断層法での子宮内膜

表1 未婚または挙児希望の若年子宮体癌症例

症例 (年齢)	月経歴 妊娠歴	合併症	主訴および 癌発見の経緯	治療と経過	組織診断 術後進行期 (FIGO)
1 (22)	無月経 OG	PCO 肥満83kg	不正出血	danazol, MPA治療後妊娠 分娩後10M異常無し	保存療法 ATH~G1 adenoca
2 (31)	月経順 OG	子宮筋腫 不妊	筋腫核出術時 内膜に癌(+)	MPA治療後異常無く, 2Y後 妊娠. その後ADH→MPA→妊娠	保存療法 adenoacanthoma
3 (33)	月経順 OG	不妊	不正出血	danazol→MPA2クール ATH消失せずfollow中	保存療法 ATH
4 (30)	月経順 未婚OG		検診での 超音波内膜肥厚	MPA1クール後, 内膜異型度 進行→手術	G1 adenoca I b期
5 (30)	月経順 未婚OG		不正出血	Primary ope	G1 adenoca I b期
6 (31)	無排卵 OG	PCO, DM 肥満90kg	不妊治療中 超音波内膜肥厚	Primary ope	adenoacanthoma I a期
7 (27)	月経不順 未婚OG	PCO 肥満88kg	不正出血	Primary ope	adenosquamous ca I b期
8 (34)	月経不順 未婚OG	PCO, DM 肥満90kg	大量の不正 性器出血	Primary ope	G1 adenoca I b期

ADH; Adenomatous hyperplasia

ATH; Atypical hyperplasia

肥厚により疑われ、診断された。子宮内膜厚は症例4が21mm(黄体期)あり、症例6では月経期でも13mmを示し、異常な内膜肥厚と判断し、精査・治療された。残りの1例(症例2)は子宮筋腫合併の不妊症例で、筋腫核出術時の筋腫に付着した一部子宮内膜よりadenoacanthomaが発見された。この症例では筋腫核出術後の子宮内膜よりその後悪性所見が認められなかったため、本人希望もあり保存療法を行った。その他の7例では細胞診、内膜組織診、子宮鏡、超音波断層法、骨盤部MRIなどを行い、以下の条件が揃った3症例に対してdanazolまたはmedroxyprogesterone acetate(ヒスロン®H200, 以下MPA)にて保存療法を行った。1)挙児希望が強くinformed consentが得られたもの、2)組織学的に異型内膜増殖症~高分化型腺癌であるもの(できればEstrogen receptor, Progesterone receptor陽性であるもの)、3)子宮鏡、超音波断層法、CT、MRIにより病変が子宮筋層や頸管内に浸潤していないことが確認できるもの。

結 果

保存療法を施行し、健児を得た症例1の経過を図1に示す。高PRL血症合併のPCO症例で、無排卵と不

正出血にて来院し、内膜組織診にて異型内膜増殖症と診断された(図2)。danazol 400mg/日を7週間投与するも腺管構造並びに細胞異型が強くなる傾向が認められ、引き続きMPA 600mg/日の投与に変更した。その後腺管構造の正常化、間質の脱落膜様変化が著明となりMPA 16週間の投与で終了とした。図3にMPA投与後8週間での内膜組織像を示す。MPA投与開始後、子宮鏡による狙い組織診でも悪性所見なく、MRIではintactな junctional zone(以下j.zone)が確認され(図4)、筋層浸潤はないものと判断した。経過をみる上で6ヶ月間の避妊を指示したが、排卵・月経の回復を計るためclomipheneまたはclomiphene-bromocriptine療法を開始したところ、3ヶ月後に妊娠に至った。本人の挙児希望強く、MPAへの反応も良好であったため、そのまま妊娠継続とし、妊娠40週にて男児を正常分娩した。その後産褥10ヶ月の時点までには、子宮内膜所見には異常を認めていない。

図5には、MPAによる保存療法を試みたにもかかわらず反応が不良で、子宮摘出に至った症例4の経過を示す。30歳の未婚女性で、肥満やPCOなどのリスク因子はない。会社の腹部超音波検診にて子宮内膜肥厚を指摘され、精査のために当科を受診した。初診時子宮内膜の厚さは21mm(黄体期)と厚く、内

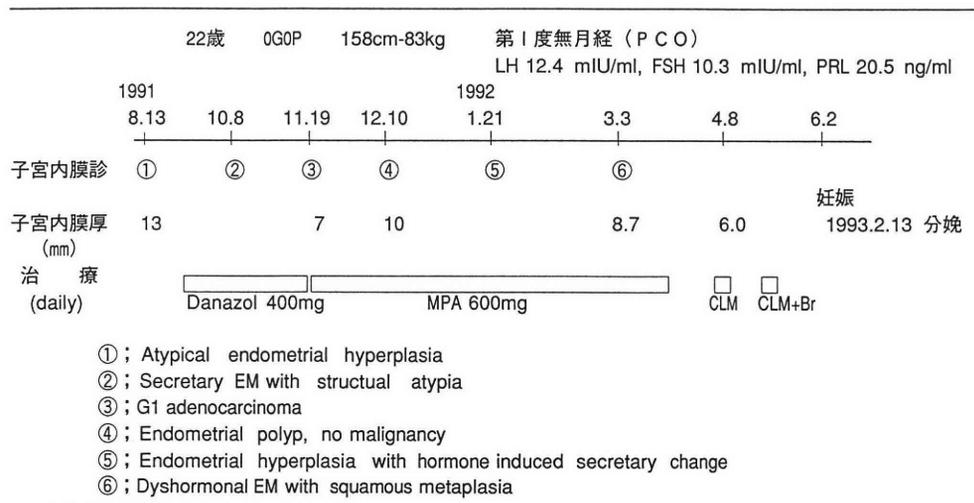


図1 症例1の臨床経過

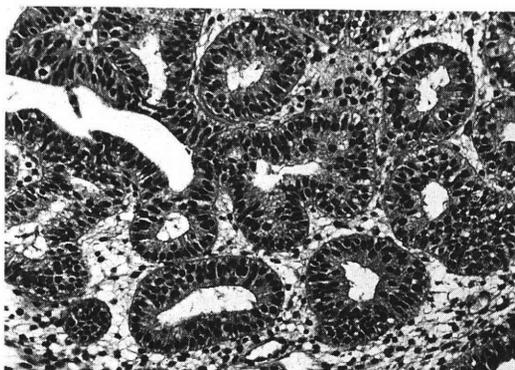


図2 症例1の治療前内膜組織像
 異型内膜増殖症。増生した内膜腺がみられ、軽度構造異型も認められる。

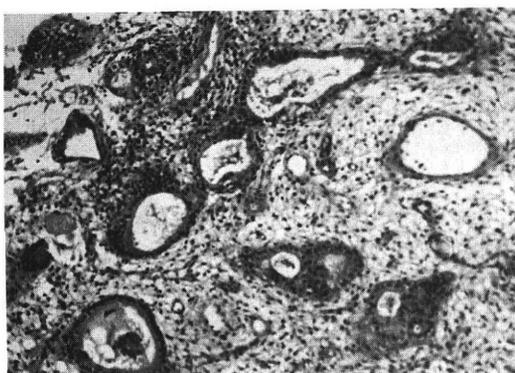


図3 症例1のMPA投与8週後内膜組織像
 腺組織の増加は認めるが、腺細胞の萎縮、間質細胞の腫大・脱落膜様変化が著明となっている。



図4 症例1の骨盤部MRI T₂強調画像
 Junctional zone (矢印)が全周で明瞭に認められる。

膜診の結果は異型内膜増殖症もしくはそれ以上の病変と診断された(図6)。子宮鏡にて頸管浸潤はなく、MRIではj. zoneがintactであったため保存療法可能と判断し、MPA 400mg/日の投与を開始した。12週間の投

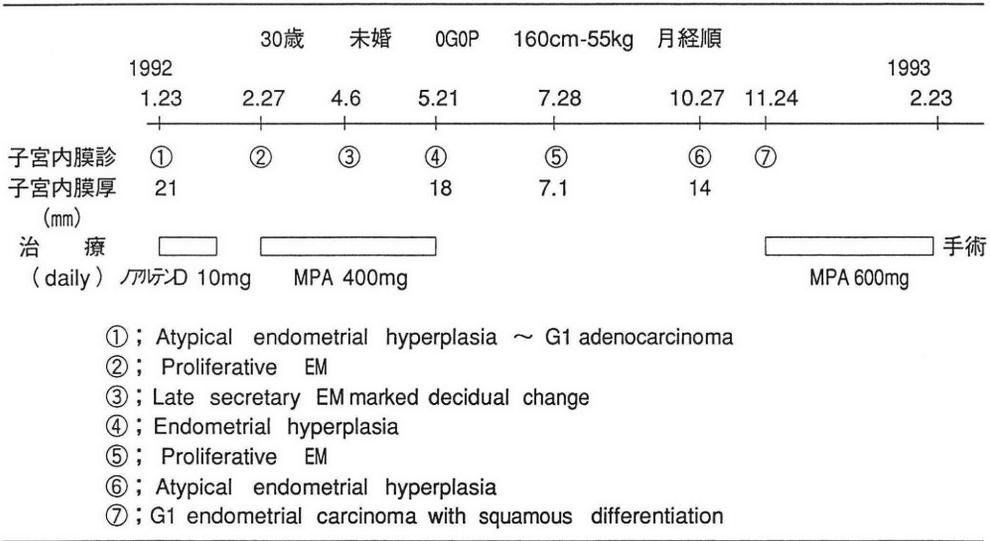


図5 症例4の臨床経過

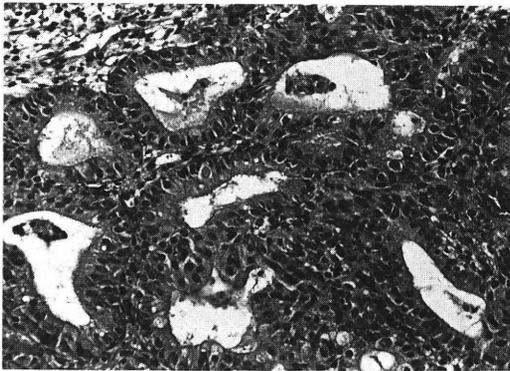


図6 症例4の治療前内膜組織像
異型内膜増殖症~G1腺癌. クロマチンが増加し、重積した核をもつ細胞からなる異型の腺管が増殖している。

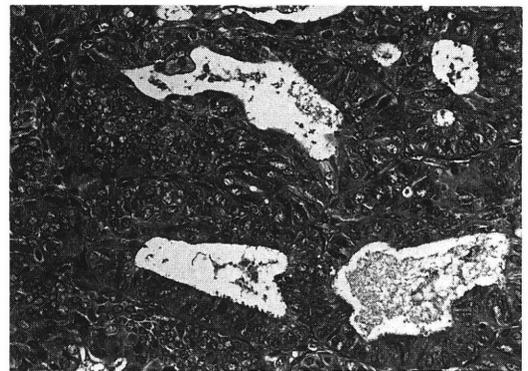


図7 症例4のMPA投与終了後6カ月の内膜組織像
G1腺癌. 異型の腺管の密な増殖を認め、核の腫大と核小体の明瞭化など細胞異型も強く認められる。

与で組織学的には子宮内膜間質の脱落膜様変化は著明となったものの、腺細胞の萎縮は軽度で、超音波断層法による子宮内膜厚も18mmとあまり変化しないため、MPA中止として一時経過観察とした。6ヶ月の観察で再度異型内膜増殖症、さらにはG1腺癌(図7)が出現したためMPA再投与を開始した。しかし、retrospectiveに病理標本を検討したところ、腺細胞の異型度が強くなっていること、間質への浸潤も疑われること、さらにMRIにてj. zoneが不明瞭になってきたことより病変の進行を疑い手術を施行した。術後診断はG1腺癌でわずかに筋層浸潤を認め、FIGO分類Ib期であった。

筋腫核出時の子宮内膜(ポリープ状部分)より adenoacanthomaが見つかった症例2は、MPA 600mg/

日の4ヶ月投与にて以後子宮内膜より異常が出現せず、約2年後不妊治療にて妊娠・分娩に至った。しかし、産褥6ヶ月の子宮内膜よりfocalな嚢胞状腺増殖症~腺腫性増殖症が出現したため、MPA 400mg/日を5ヶ月間投与した。この間子宮鏡、MRIなどでは特に異常所見は認めなかった。MPA終了2ヶ月でも一部腺腫性増殖症が認められたが、次周期の排卵にて自然妊娠し、最近第2児を正常分娩した。現在、子宮摘出も考慮しつつ外来follow up中である。

症例3は、不妊治療中に不正出血を認め、異型内膜増殖症と診断された例で、danazol400mg/日を3ヶ月間、その後MPA 400~600mg/日を4ヶ月間2クール施行した。投与中は腺組織、間質にMPAに対する反応が見られるが、投与終了1~2ヶ月で元の状態

に戻るため子宮摘出も考慮しつつ外来follow up中である。

8例中4例は本人の希望(症例6)や超音波断層法・MRIにより筋層浸潤が疑われたため(症例5, 7, 8), primary operationを施行した。症例5, 7, 8では、術後病理診断ではリンパ節転移はなかったものの既に筋層浸潤が1/3～1/2認められ、FIGO分類Ib期と診断された。

考 察

子宮体癌のうち40歳以下のいわゆる若年性子宮体癌は比較的稀で、最近の日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会の報告でも全子宮体癌の6.3%と報告されている¹⁾。従って、若年性子宮体癌では、まず子宮体癌の疑いをもち、正確な検査と診断がなされるかどうか²⁾が第一の問題として存在する。若年女性であっても、不正出血や不妊、PCOなどのホルモン異常がある場合には積極的に体癌検診を行うことが大切である。また、今回の我々の症例のように、機会があれば子宮内膜の厚さを測定し、異常な厚さを示すような症例には、自覚症状がなくても体癌検診を実施することも必要と考えられる。次に、若年性子宮体癌患者での大きな問題として、40歳以下の症例では特に未妊婦が多く、妊孕性温存を強く希望する場合には、子宮温存を目的とした保存的療法を考慮しなければならない。Farhi et al.³⁾は25歳以下の若年子宮体癌症例5例にProgesteroneによる保存療法を試み、1例に二人の健児を得ていると報告し、さらに考察の中で、Stein-Leventhal症候群で子宮体癌を合併した9例で健児を得ていることも報告している。また、Bokhman et al.⁴⁾は若年子宮体癌I期19例(平均28歳)のうち15例はhydroxyprogesterone caproate 25～83gの投与のみで治療し、手術は不要であったと報告している。本邦においても、細道ら⁵⁾や梅咲ら⁶⁾が各1例の若年性子宮体癌保存療法後の妊娠例を報告している。若年性子宮体癌の特徴として、今回の8例中4例にも認められたように、PCOを主とする排卵・内分泌障害や不妊、肥満症例が多いことは既に多くの報告^{7,8)}があるが、病理学的には高分化型腺癌が多く、腺腫性増殖症や異型内膜増殖症との混在例も多い。低分化型に比べて高分化型腺癌の場合には、性ステロイドホルモンレセプターの発現率も高く、ホルモン療法の有効性が高い可能性がある。また、若年性体癌はホルモン依存性のものが多いため限局して発育することは少なく、ポリープ状の腫瘍のみ摘出することは困難である。従って、保存的治療を考えるとす

ると、子宮内膜全面搔爬と黄体ホルモン剤投与を第一に選択することになると考えられる。

ここで問題となるのが、保存的治療をどのような症例に施行するかである。これに関する明確な方針はないのが現状であるが、本論文の方法で述べたような条件を満たした子宮体癌症例を対象とする、との考えが多いと思われる^{9,10)}。特に、組織分化度、体部筋層浸潤、頸管浸潤の有無・程度は子宮体癌の重要な予後因子でもあり、正確な組織診断とCTやMRI、超音波断層法、子宮鏡による治療前診断が重要である。筋層浸潤の有無については、現段階ではMRIによる診断が最も信頼性が高いと考えられ、T₂強調画像によるj. zoneの存在¹¹⁾やダイナミックMRIによるsubendometrial enhancement¹²⁾などが筋層浸潤の有無判定に大きな情報を提供してくれる。今回、症例4においてMRIでのj. zoneの一部断裂により筋層浸潤が疑われ、組織学的変化とも相まって子宮摘出が行われたが、治療方針を決定する上でMRIの情報は非常に重要であった。

実際に子宮温存を目的とした保存的治療を行うにあたっては、卵巣への不可逆的变化を避ける意味からも、抗癌ホルモン剤であるMPAが主に使われる。山本ら¹³⁾は高用量MPA 400mg/日以上、連日12週間以上の投与が必要と述べており、病変部が消失してさらに12週間の追加投与とその後の早い段階での排卵回復を薦めている。MPAの治療効果判定としては、腺細胞の核の形・大きさの均一化、核クロマチンの粗鬆性の減少、腺細胞の配列が一層化して腺上皮の萎縮が認められるようになり、さらに間質細胞の脱落膜様変化も重要な所見とされる^{9,10)}。保存療法が有効であった症例1では、MPA内服後8週間頃より腺細胞の萎縮、間質細胞の脱落膜様変化が著明となったのに対し、治療無効の症例4では、12週間の投与で間質細胞の変化は認められたものの腺細胞・腺構造の萎縮は軽度であった。いたずらに長期間に投与することを避け、無効と判定される場合には速やかに手術療法に変更することが大切と考えられる。症例2では、結果的には核出された筋腫部分にのみポリープ状に癌が存在したと考えられ、手術以後内膜の異常は出現せず健児を得た。しかし、分娩後6カ月で腺腫性増殖症が出現したことからもわかるように、内膜増殖症や早期子宮体癌は子宮内膜基底層より生ずると考えられ、内膜搔爬やホルモン治療を行っても一部病変が遺残していずれ再発する可能性が高く、ホルモン治療に良好な反応を示す症例でも早期に妊娠を計り、分娩後も長期にわたり定期的な

follow upが必要である。

子宮体癌に対する保存的治療薬剤としてはMPAが主体として使用されるが、前癌状態とも考えられる腺腫性増殖症ではdanazol¹⁴⁾やtamoxifen¹⁵⁾の治療効果も報告されている。しかし、今回我々が症例1, 3で行ったように、異型内膜増殖症以上の病変ではdanazolによる組織学的変化は乏しく、MPAが第一に選択されるべきと考えられる。最近、Gn-RH analogにより治療効果が認められたとの症例報告¹⁶⁾もあり、今後のデータの集積が期待される。

若年性子宮体癌に対する保存的治療は、診断や治療効果、妊娠許可の点など多くの問題をもつが、治療効果判定を正確に行うことにより、適応を満たした症例には一度は試みてよい治療法と考えられる。

文 献

- 1) Gallup DG, Stock RJ, Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger. *Obstet Gynecol* 64: 417, 1984
- 2) 山辺 徹, 婦人科腫瘍委員会報告. *日産婦誌* 44: 1487, 1992
- 3) Farhi DC, Nosanchuk J, Silverberg SG, Endometrial adenocarcinoma in women under 25 years of age. *Obstet Gynecol* 68: 741, 1986
- 4) Bokhman JV, Chepick OF, Volkova AT, et al., Can primary endometrial carcinoma Stage I b cured without surgery and radiation therapy? *Gynec Oncol* 20: 139, 1985
- 5) 細道太郎, 馬淵義也, 横田栄夫 他, Polycystic ovary syndrome合併若年子宮内膜癌の症例とその保存的療法・管理について. *和歌山医学* 39: 221, 1988
- 6) 梅咲直彦, 朝田拓治, 山本 彰 他, 若年子宮体癌でプロゲステロン療法後妊娠し健児を得た1例. *産婦実録* 38: 781, 1989
- 7) Crissmann JD, Azoury RS, Barnes AE, et al., Endometrial carcinoma in women 40 years of age or younger. *Obstet Gynecol* 57: 699, 1981
- 8) 田中昭一, 福江ひろみ, 金谷美加 他, 20歳代子宮体癌の2例. *産婦治療* 62: 250, 1991
- 9) 藤井信吾, 子宮内膜増殖症の診断と治療. *日産婦誌* 45: N-63, 1993
- 10) 斉藤良治, 子宮体癌のホルモン療法. *日産婦誌* 45: N-103, 1993
- 11) Hricak H, Stern JL, Fisher MR, et al., Endometrial carcinoma staging by MRI imaging. *Radiology* 162: 297, 1987
- 12) Yamashita Y, Harada M, Sawada T, et al., Normal uterus and FIGO stage I endometrial carcinoma: dynamic gadolinium - enhanced MR imaging.

Radiology 186: 495, 1993

- 13) 山本 宝, 岡田弘二, 子宮体部病変への適応と限界. *Oncology Chemotherapy* 9: 33, 1993
- 14) Terakawa N, Inoue M, Shimizu I, et al., Preliminary report on the use of danazol in the treatment of endometrial adenomatous hyperplasia. *Cancer* 62: 2618, 1988
- 15) El-Tomi NF, The effect of tamoxifen on endometrial hyperplasia. *J Kw Med Assoc* 19 (3): 175, 1985
- 16) Kullander S, Treatment of endometrial cancer with GnRH analogs. *Recent Results in Cancer Research* 124: 69, 1992

Treatment of endometrial carcinoma in eight unmarried or infertile women 40 years of age or younger

Mitsuo Obara, Takanori Kamizyo,
Kazumichi Andoh, Toshio Utsugi,
Hideki Mizunuma and Yoshito Ibuki

Department of Obstetrics and Gynecology
Gunma University, School of Medicine
Gunma 371, Japan

Eight patients with endometrial carcinoma in unmarried or infertile women aged 22 to 34 years are presented. Four of them had clinical evidence of the polycystic ovary syndrome (obesity, irregular menstruation or amenorrhea, hirsutism and infertility). In one infertile woman, adenoacanthoma was found at a part of endometrium on the enucleated myoma. She was treated with medroxyprogesterone acetate (MPA), 600 mg daily for 16 weeks and endometrial biopsies were repeated. Thereafter she had two successful term pregnancies, two and four years after her diagnosis of adenoacanthoma. In three patients with atypical hyperplasia (one) and with well differentiated adenocarcinoma (two), treatment consisted of MPA and curettages. After MPA therapy, one of them bore a child 13 months later. The other one was treated with abdominal hysterectomy, because of (1) the progression of architectural and cytologic atypia, and (2) the suspicion of superficial myometrial invasion by magnetic resonance imaging (MRI). Examination of a hysterectomy specimen showed well differentiated adenocarcinoma with less than one-third myometrial invasion. The remaining four women received primary surgery. In three women of them, myometrial invasion was recognized by preoperative MRI or transvaginal

ultrasonography, and confirmed by pathological finding. One woman did not want conservative therapy, in spite of well differentiated adenocarcinoma and no evidence of myometrial invasion. Seven patients are alive and have no evidence of recurrence, but one patient with atypical hyperplasia still shows the disease and is followed-up with repeated endometrial biopsies and

progestogens therapy.

In selected young patients with atypical hyperplasia and well differentiated adenocarcinoma without myometrial invasion, conservative hormonal therapy and repeated endometrial curettages may preserve fertility.

(受付：1994年2月16日)

(受理：1994年3月11日)

不妊症への超音波造影剤応用のための基礎的検討

Safety of a New Echo-contrast Agent on Early Embryo Development

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

石原 理 田谷 順子 飯野 好明
Osamu ISHIHARA Junko TAYA Yoshiaki IHNO
齊藤 正博 木下 勝之
Masahiro SAITOH Katsuyuki KINOSHITA

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

心エコー検査のための造影剤として開発されたヒトアルブミン製剤S-132 (Albunex) の不妊症検査における応用の可能性を追及するため、同製剤のマウスにおける初期胚発生に及ぼす影響および腹腔内投与後の癒着発生の可能性につき検討した。PMS-hCG処理により採取した、2細胞期の受精卵を体外培養し、培養液中へのS-132添加による受精卵のその後の発生への影響を観察したところ、胚盤胞に至るまでの発生過程は濃度依存的に阻害された。しかし、腹腔内投与では、癒着の発生を認めず、さらに、腹腔内投与を受けた動物より採取した卵を体外受精し、その発生を胚盤胞まで観察したが、その発生率は対象群と差がなかった。従って、子宮内膜の超音波断層法による観察や、子宮卵管造影法へ本剤を応用した場合の安全性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 257 - 260, 1994)

緒 言

子宮内膜の観察法として、従来より超音波断層法は広く用いられ、排卵期および黄体中期の子宮内膜の肥厚度とそのecho patternの観察は不妊症治療の上で重要なものと認識されている¹⁻⁵⁾。しかし、7.5MHzの高周波数プローベを用いても、得られる情報には限界があり、侵襲的検査である、Hysteroscopeによる直接的検査の必要とされることも多かった。一方、卵管の通過性と運動性また癒着の評価のためには、X線透視下の子宮卵管造影法が不可欠であるが、X線被曝や造影剤に対する過敏症などの問題を考慮すると、同一症例に繰り返し頻繁に施行するわけにはいかない。

最近心エコー検査の際のcontrast enhancementを目的として開発されたヒトアルブミンを原料とした製剤であるS-132⁶⁻⁸⁾は、超音波断層法による子宮内膜の観察や超音波下子宮卵管造影検査を実現する可能性

を持った造影剤である。しかし、その子宮内あるいは卵管内投与による初期胚の発生への影響や癒着を惹起する可能性についてはいまだ検討がなされていない。そこで、今回マウスを用いて、初期胚の胚発生に及ぼすS-132の影響と腹腔内投与による癒着発生の可能性につき検討し、今後のS-132の臨床応用上問題がないかを考察した。

実験材料および方法

材料

Echo contrast enhancement製剤S-132はシオノギ製薬より提供を受けた。同製剤は、同社からの提供資料によれば、5% human serum albumin (HSA) を無菌空気存在下で超音波処理して製した平均粒子径3~5 μ mの空気小球体を約400 \times 10⁶個/ml含有する懸濁注射剤で、保存剤としてアセチルトリプトファンナトリウムおよびカプリル酸ナトリウムを蛋白質1g当り各0.08m mole含むとされる。また、同製剤の浸透圧は

0.9m O sm, pHは6.4~7.4である.

実験 1

8 から10週齢のICR系雌マウスにpregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) 7.5 IUを腹腔内に投与し, 48時間後humann chorionic gonadotrophin (hCG) 7.5IUを投与した. 同系雄マウスと交配腔栓確認後, 約24時間後に開腹し, 2細胞期の卵を回収した. 回収した卵は, 0.3% bovine serum albumin (BSA) 添加HTF培養液に100 μ MのEDTAを添加した培養液で, 5% CO₂+airの条件下, 4日間培養し, 胚盤胞発生まで形態学的に観察した. 一部の卵には, S-132を10%, 1%, 0.1%の濃度で培養液中に添加し, 初期胚発生への影響を形態学的に検討した. この濃度は, S-132を臨床症例に用いる場合に予想される濃度が1%であることから, 胚移植の際の培養液への添加を想定して設定したものである.

実験 2

S-132を原液, 10倍希釈, 100倍希釈後, 500 μ lを実験 1 同様過排卵処理したICR系雌マウス (各n= 3) の腹腔内に投与し, 96時間後に開腹し腹腔内の癒着の

有無につき肉眼的に観察した. この希釈率および投与量は, S-132を臨床症例の卵管造影に用いる場合予想される投与量が, 5mlのS-132を20倍希釈した程度のものであることから, 体重比により計算して設定した. さらに原液投与群から得られた未受精卵を同系マウス精子により体外受精し, 胚盤胞に至るまで観察し, その発生率を対象群と比較した.

統計的検討

実験結果の有意差検定には χ^2 検定を用いた.

結 果

実験 1 における 2 細胞期胚の初期発生に及ぼすS-132の影響をTable 1 に示す. 2細胞期に採取して胚盤胞 (Blastocyst) にまで发育した初期胚は, control 97% (99/102) に対して, S-132最大濃度添加時で80.7% (113/140) と濃度依存的に抑制された.

一方, 実験 2 においてマウス腹腔内に投与したS-132は, Table 2 に示すように最大用量時にも腹腔内癒着を引き起こす原因とはならなかった. さらに, S-132投与を受けたマウスより採取した卵の体外受精

Table 1 The effect of S-132 on the development of mouse embryos at two cell stage

Concentration of S-132	No of embryos cultured	No of embryos developed to blastocyst (%)
0 %	102	99 (97.0%)
0.1%	144	129 (89.6%)*
1 %	163	144 (88.3%)**
10 %	140	113 (80.7%***)

*<0.05, **0.025, ***<0.01

Table 2 Intraperitoneal adhesion after S-132 administration in mouse model

	No of experiments	original concentration	10 times diluted	100 times diluted	control (saline)
96hours	10	-	-	-	-

Table 3 In vitro fertilization using oocytes recovered from S-132 injected mouse

	No of oocytes	unfertilized (%)	fertilized (%)	developed to blastocysts (%)
control	200	31 (15.5%)	169 (84.5%)	149/169(88.2%)
S-132	141	27 (19.1%)	114 (80.9%)	101/114 (88.6%)

NS NS NS

NS: not significant

率および胚盤胞への発育率は、Table 3のように対象群と差を認めなかった。

考 察

体外受精胚移植 (IVF-ET) の成功率を今後改善するためには、着床率を改善する必要のあることは一致した見解である⁹⁾。現在の満足できない着床率の原因のひとつとして、着床期子宮内膜における形態学的生化学的変化が十分に解明されていないことがあると思われる。ことに、IVF-ET周期における子宮内膜の性状や運動性を把握することは困難で、実際子宮内膜組織診やHysteroscopeを行うことの出来るのは、ETが出来なかった症例に限られるのが実情である。一方非侵襲的検査の代表として超音波断層法があり、最近の高周波数プローベの開発や経腔的観察により、以前と比較すればその情報量は格段の増加がある。しかし、ET時の子宮内膜性状の評価のためには、より詳細な観察を可能とする方法論が望まれていた。また、通水時の経腔超音波断層法により、左右通過性を個別に評価することは可能となったが、卵管運動性も含めた詳細な観察を可能にする方法があれば、極めて有用と思われる。

今回検討したS-132は、心エコー検査時に静脈注射して、contrast enhancementを得るために開発された造影剤で、すでに人体における静脈内投与による安全性などは確立した薬剤である⁶⁾。また、原材料は5%ヒトアルブミンであり、少量投与による悪影響は極めて考えにくい製剤である。しかし、保存剤など微量成分の初期胚の発生に及ぼす影響や腹腔内に流出した際の癒着の惹起についての検討は今まで行われておらず、今後前述したような子宮および卵管内投与を考慮した場合、その基礎的検討が不可欠と思われた。

本研究において、マウス初期胚を用いた初期発生に及ぼす影響を検討したところ、初期胚発生は濃度依存的に抑制され、胚移植時にS-132を培養液に添加することは、悪影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。しかし、腹腔内投与により癒着発生はなく、投与マウスから得た未受精卵の発生に影響はないことから、受精卵の培養液のような直接的投与でなければ、S-132は投与しても、大きな不利益の生ずる可能性は少ないことが示唆された。したがって、今後、S-132の臨床症例に対する応用の成果が期待されると思われる。

S-132を提供されたシオノギ製薬に深謝します。

文 献

- 1) Fleischer AC, Herbert CM, Sacks GA, et al., Sonography of the endometrium during conception and nonconception cycles of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 46: 442, 1986
- 2) Gonen Y, Casper RF, Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 7: 146, 1990
- 3) Ueno J, Oehninger S, Brzyski RG, et al., Ultrasonographic appearance of the endometrium in natural and stimulated in-vitro fertilization cycles and its correlation with outcome. *Hum Reprod* 6:901, 1991
- 4) Dickey RP, Curole DN, Olar TT, et al., Relationship of endometrial thickness and pattern to fecundity in ovulation induction cycles: effect of clomiphene alone and with human menopausal gonadotrophin. *Fertil Steril* 59: 756, 1993
- 5) Sher G, Dodge S, Maassarani G, et al., Management of suboptimal sonographic endometrial patterns in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 8: 347, 1993
- 6) Keller MW, Glasheen W, Kaul S. Alunex: a safe and effective commercially produced agent for myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2:48, 1989
- 7) Feinstein SB, Cheirif J, Ten-Cate FJ, et al., Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *J Am Coll Cardiol* 16: 316, 1990
- 8) Voci P, Bilotta F, Scibilia G, et al., In-vitro development and clinical applications of sonicated echo contrast agents. *Am J Card Imagin* 5: 192, 1991
- 9) Psychoyos A. The implantation window: basic and clinical aspects. *J Assisted Reprod Genetics* 10: 6S, 1993

Safety of a new echo-contrast agent on early embryo development

Osamu Ishihara, Junko Taya, Yoshiaki Ihino,
Masahiro Saitoh and Katusyuki Kinoshita

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

There have been several approaches to examine endometrium and fallopian tubes for the infertile patients, i.e. hysterosalpingography or hysteroscopy. However, these invasive techniques limits to repeat the application for a specific case. If a new echocardiographic contrast agent, Albunex (S-132), developed from sonicated 5% human serum albumin, is applied as a contrast agent in uterine cavity or fallopian tubes, it would be of use in getting more information on infertile patients by transvaginal ultrasonography. Therefore, we investigated the effect of the agent on early mouse embryos and the possible effect of inducing

peritoneal adhesion in order to assess the safety of the agent before clinical application. Though the addition of S-132 in culture medium inhibited the development of mouse two-cell stage embryos in vitro, intraperitoneal injection of S-132 did not induce any intraperitoneal adhesion, and the eggs derived from S-132 injected mouse normally developed to blastocysts after in vitro fertilization. This study suggests that S-132 could give us a new method to investigate uterine endometrium and tubes for infertile patients without adverse effects on fertilization and development of embryos and intraperitoneal adhesion of the patients.

(受付：1993年11月9日)

(受理：1994年3月12日)

多指標の統計的解析を用いた子宮腺筋症の診断的有効性

Evaluation of Multiparametric Analysis in the Diagnosis of Adenomyosis

秋田組合総合病院産婦人科

太田博孝

Hiroataka OTA

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

子宮腺筋症の治療前診断法として複数の指標による統計的解析を行い、その臨床的有用性をretrospectiveに検討した。対象は当院で種々の自・他覚的症状のため子宮全摘除術を施行した83例である。その内訳は、組織学的に診断された子宮腺筋症57例と子宮筋腫26例で、診断に用いた指標は子宮鏡での腺開口像(子宮鏡腺)、子宮鏡での血管像(子宮鏡血管)、子宮鏡(腺開口像か血管像)、血中CA125値、陽性自己抗体数、超音波断層法である。各項目のうち子宮鏡が感度80.7%、特異度76.9%、正確度79.5%で最も有用であった。次に子宮鏡腺、CA125の順となった。無効な項目は超音波断層法であった。ロジステックモデルによる鑑別能は感度94.7%、特異度92.3%、正確度94.0%とCA125のそれを上回った。子宮腺筋症の治療前診断は非典型例では困難とされてきたが、複数の指標を加え統計的解析をすることで診断が容易になることを明らかにした。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 261 - 265, 1994)

緒言

子宮腺筋症はその多くが妊娠・分娩を経験した婦人に発症する。本症と不妊との因果関係にはいまだ不明の点が多い。しかし、流・早産や異常分娩例を検討すると子宮腺筋症を合併している例がある¹⁾。また、高度貧血や月経困難症の症例に子宮腺筋症が多いことをよく経験する。従って、本症を治療前に診断することは重要である。

子宮腺筋症の診断は意外と難しい。子宮腺筋症の診断法には双合診、子宮卵管造影法、超音波断層法、CT、MRIなどがある。子宮が大きく、超音波断層法やMRIで明らかな子宮筋腫結節を認めない例では、その診断は比較的容易である。さらに約5~6割の症例に血中CA125値の上昇が見られ、その測定は子宮腺筋症の診断に有用である²⁾。しかし、大きな子宮筋腫を合併する例や、CA125値が正常範囲の例では極めて難しい。最近、子宮内膜症や子宮腺筋症では自己抗体、特に抗磷脂質抗体が高率に認められると

の報告がある^{3,4,5)}。また、子宮腺筋症では子宮鏡で特徴ある所見を示すことが明らかとなってきた^{6,7)}。そこで、本研究では子宮腺筋症で超音波断層法、CA125と共に、子宮鏡、自己抗体を新たに加えた複数の指標による統計的解析を行い、これらの診断的有用性をretrospectiveに検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は1988年4月より1992年3月までに強度の月経痛、過多月経、貧血や子宮腫大のため子宮全摘除術を施行した83例である。その内訳は術後組織学的に診断された子宮腺筋症57例と子宮筋腫26例である。子宮腺筋症例のうち、子宮筋腫合併例は34例、外性子宮内膜症合併例は11例であった。また子宮筋腫例のうち粘膜下筋腫のみの例は除外した。さらに習慣流産や自己免疫疾患などの既往を有する例は今回の検討から除外した。

表1 各項目の成績

項目	カットオフ	子宮腺筋症 感度(%; PiD) (n=57)	子宮筋腫 特異度(%; NiH) (n=26)	全症例 正確度(%) (n=83)
CA125	35U/ml	73.7	80.7	75.9
陽性自己抗体数	0-1	63.2	92.3	72.3
	1-2	29.8	100.0	51.9
	2-3	8.8	100.0	37.3
	3-4	3.5	100.0	33.7
	4-5	1.8	100.0	32.5
超音波断層法	0-1	52.6	84.6	62.7
子宮鏡	0-1	80.7	76.9	79.5
子宮鏡腺	0-1	63.2	96.2	73.5
子宮鏡血管	0-1	54.4	80.7	62.7
モデル確率	0.5	94.7	92.3	94.0

PiD; positive in disease (すなわち, 感度を示す), NiH; negative in health (すなわち, 特異度を示す)

2. 診断基準

診断に用いた指標は子宮鏡における腺開口像(子宮鏡腺), 子宮鏡における血管像(子宮鏡血管), 腺開口像か血管像の少なくともどちらかひとつある時(子宮鏡), CA125値, 陽性自己抗体数, 超音波断層法である。

子宮鏡はオリンパス社製の硬性鏡を用いた。灌流液は32%の高分子デキストラン(キセラン®; シオノギ製薬株式会社, 東京)を用いた。子宮鏡による子宮腺筋症の診断は異常な腺開口や血管像の所見が認められた時とした⁶⁾。すなわち, 手術前に子宮鏡により子宮体部の観察を行い, 集簇性ないし彌慢性の大きな腺開口, または網目状に怒張した走行不整な血管像を認めた例を子宮腺筋症と判断した。

CA125値による子宮腺筋症の診断は末梢血中でCA125値が35U/mlを越えた時とした。CA125値は統計解析上モデルに整合性を持たせるため対数変換値

表2 各項目単独でのロジステックモデルによる有効性の確認 (Not in the model)

Variable	ワルド χ^2	Pr > χ^2
子宮鏡腺	25.4242	0.0001
子宮鏡	25.3385	0.0001
陽性自己抗体数	16.3944	0.0001
CA125値	15.0828	0.0001
超音波断層法	10.2431	0.0014
子宮鏡血管	8.9847	0.0027

を用いた。

自己抗体による診断には最も陽性率の高い6種の抗燐脂質抗体を用いた⁸⁾。すなわち, 抗カルジオリピンIgG, IgM抗体(CL-G, CL-M), 抗フォスファチジックアシッドIgG抗体(PA-G), 抗フォスファチジ

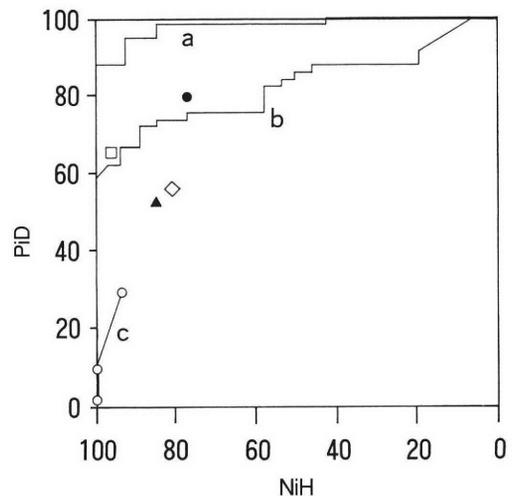


図1 各項目のROC曲線

PiD; positive in disease (すなわち, 感度を示す)

NiH; negative in health (すなわち, 特異度を示す)

a: モデル確率, b: CA125, c: 陽性自己抗体数, ●: 子宮鏡, □: 子宮鏡腺, ◇: 子宮鏡血管, ▲: 超音波断層法。a, b, cの3つのROC曲線のうち, aの曲線はもっとも左上方に近づいており, 理想的な診断指標であることを示す。

表3 組み合わせに有効な項目 (In the model)

Variable	Parameter estimate	ワルド χ^2	Pr > χ^2	Standardized estimate
陽性自己抗体数	4.0190	8.6163	0.0033	2.310773
CA125	1.9207	9.3321	0.0023	1.270657
子宮鏡腺	3.0497	4.7663	0.0290	0.840807
子宮鏡血管	2.7210	4.4962	0.0340	0.747974

表4 組み合わせ有効項目を用いたロジスティック回帰式

$$\begin{aligned} \text{Logit} = & -8.9772 \\ & + 4.0190 \times \text{陽性自己抗体値} \\ & + 1.9207 \times \ln(\text{CA125値}) \\ & + 3.0497 \times \text{子宮鏡腺値} \\ & + 2.7210 \times \text{子宮鏡血管値} \end{aligned}$$

表5 子宮腺筋症の確率計算式

$$\text{子宮腺筋症の確率 (P)} = \exp(\text{Logit}) \div \{1 + \exp(\text{Logit})\}$$

ールイノシトールIgG抗体 (PI-G), 抗フォスファチジルセリンIgG抗体(PS-G), 抗フォスファチジオールグリセロールIgG抗体 (PG-G) である。すなわち, 各自己抗体を硫酸プロタミンを固相化したELISA法で測定し, その値が正常範囲 (mean \pm SD) を越えた時を陽性とした。そして各症例毎に陽性自己抗体数を0-1, 1-2, 2-3, 3-4個に分け検討した。

超音波断層法はアロカ社製の超音波診断装置(SSD630)を用い, 経腔的に行った。子宮腺筋症の診断は子宮が子宮筋腫による結節状腫大ではないこと, かつ子宮が小鶯卵大以上に球状に腫大していること, また子宮筋腫内に高輝度点状エコー, ないし不規則な小嚢胞状の低エコー領域を呈した例とした^{9,10,11)}。

3. 統計分析法

各検査項目の鑑別能を定量的に評価し, それらの中から最も有効な検査の組み合わせを求めるためにロジスティック回帰分析を行った¹²⁾。ロジスティック回帰分析は各検査結果値の変化が, 疾患の鑑別確率をどう変化させるかを予測する方法である。この方法は画像データのような有無の結果や, 検査値などの連続量を等価に扱える優れた手法である。もし検査データが正規分布しているならば, その鑑別能の評価はROC分析 (relative operating characteristic curve)^{13,14)}を行っていることと同じである。

また, 検査の疾患鑑別能は検査毎に類似した情報

もあれば, 互いに相合う情報もある。最適な検査の組み合わせを求める場合, それがどんなに優れた検査であっても, 類似した情報をもつ検査を組み合わせるとはその鑑別効率は向上しない。互いに補い合う情報を集め, また項目を組み合わせた時初めて発生する組み合わせ効果 (項目間の比や差が臨床的な意味を持つこと) を評価するには, ロジスティック回帰分析のような統計的手法が必要である。

各項目の単独の鑑別能はROC曲線から検討した。ROC曲線とは感度と特異度を各々縦軸と横軸にとりグラフ化した表である。本曲線は良悪性の区分能や有効性を判断するもので, 左上方に近づくほど最良の指標となる。

インデックスにて得た成績 (感度, 特異度, 正確度) は χ^2 検定にて比較した。なお, データ数が5より小さい数のある時はYatesの補正を行った。また, その時の有意水準を5%とした。

結 果

各項目別でROC曲線から最も左上方に位置していたのは子宮鏡で, 次に子宮鏡腺, CA125の順となった (図1)。感度は子宮鏡が80.7%と最も高く, ついでCA125, 陽性自己抗体数, 子宮鏡腺の順となった (表1)。特異度は子宮鏡腺が96.2%と最も高く, ついで陽性自己抗体数, 超音波断層法の順となった。陽性自己抗体数はROC曲線では左下方に位置し, 特異度はよいが感度が低い成績であった。また, 正確度は子宮鏡で79.5%と最も高く, 次にCA125, 子宮鏡腺の順であった。

ワルド統計量による各項目単独の鑑別能の評価結果はいずれも統計的に有意であった (表2)。最も区分に優れていたのは子宮鏡腺で, ついで子宮鏡, 陽性自己抗体数の順であった。

ロジスティック回帰分析の変換選択法による最適な組み合わせ検査項目は陽性自己抗体数, CA125値, 子宮鏡腺, 子宮鏡血管の組み合わせで, 超音波断層法は有効ではなかった (表3)。

上記の検査項目を用いたロジスティック回帰モデル(表4)の確率値50%をカットオフとした場合、モデルによって算出された各症例の確率値による成績は感度94.7%、特異度92.3%、正確度94.0%であった(表5)。これは検診に用いたすべての検査成績を上回るものであった。

考 案

子宮腺筋症の診断法には問診、双合診や子宮卵管造影法などの従来の方法に加え、超音波断層法、CTスキャン、MRIによる方法や血中CA125測定による方法が広く行われるようになってきた。子宮腺筋症のうち子宮が丸く腫大し、血中CA125値が100U/mlを越え、かつ超音波断層法で筋腫結節を認めないような典型例ではその診断は容易である。しかしCA125値が100U/ml以下で、かつ超音波断層法で筋腫結節を認める例では子宮腺筋症との鑑別は困難となる。

本研究でCA125は感度73.7%、特異度80.7%であった。ただ、CA125は悪性腫瘍、炎症、月経、妊娠などでも影響を受け高くなることもあり、指標の採用時には注意を要した。

子宮鏡においてROC曲線からの分析では子宮鏡腺、あるいは子宮鏡血管のそれぞれの指標の有無より、少なくともどちらかの指標を認めた時を陽性とすることによりより良い指標となった。月経周期を通じて見られる嚢慢性、あるいは集族性の大きな腺開口は、子宮腺筋症に特徴的な所見となる⁶⁾。また、血管像はその数の多い例が多く、その走行も概して不規則であった。血管像は典型例では網目状のnetworkとして認められた。

超音波断層法による子宮腺筋症の所見としては径5ないし10mm程度の不規則な小嚢胞状低エコー領域として見られる場合と、高輝度点状エコーとして見られる場合がある^{9,10,11)}。本研究で超音波断層法による子宮腺筋症の鑑別能は最も低かった。

子宮腺筋症や子宮内膜症では血中自己抗体、特に抗燐脂質抗体が高率にみられる^{3,4,5)}。自己抗体は多くの自己免疫疾患でみられる。例えば、多形滲出性紅斑¹⁵⁾、関節リュウマチ¹⁶⁾などである。本研究でも自己抗体の感度は63.2%であったが、特異度は92.3%に達した。

複数の項目による診断では一般に感度は上昇するものの特異度は低下し、結果として正確度は低下する。したがって、診断に際しては最良の診断精度を有する指標を選択する必要がある。今回、よりよい診断指標を選択するためにロジスティック解析法を用

い、最も有効な組み合わせ項目を選択し得た。その結果陽性自己抗体数、CA125値、子宮鏡腺、子宮鏡血管の4項目が有効で、超音波断層法はこの組み合わせの限りでは無効であった。さらに上記指標を用いたロジスティックモデルの鑑別成績は感度、特異度、正確度が共に90%を越え、すばらしい鑑別能を得た。

今後子宮腺筋症や子宮内膜症の診断法としてより簡便で、かつよりよい診断精度を有する指標の開発が必要である。

稿を終えるにあたり、本研究の統計分析に多大な御協力を頂いた(株)エスアールエルの古川敏仁氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 西田正人, 岩崎憲和, 子宮内膜症と妊孕性, 子宮内膜症. 産婦人科Mook 26, p86, 金原出版, 1983
- 2) Ota H, Maki M, Evaluation of autoantibody and CA125 in the diagnosis of endometriosis or adenomyosis. *Med Sci Res* 18: 309, 1990
- 3) 太田博孝, 子宮内膜症の診断における自己抗体測定の有用性. エンドメトリオーゼス研究会会誌 11: 128, 1990
- 4) Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, et al., Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 70: 115, 1987
- 5) Ota H, Autoantibody sensitivity in the diagnosis of endometriosis and adenomyosis. *Jpn J Fertil (Steril)* 3: 6: 799, 1991
- 6) 太田博孝, 子宮鏡による子宮腺筋症の診断に関する臨床的検討. 日不妊会誌 37: 49, 1992
- 7) 福田吉彦, 杉山修成, 前田洋一 他, 子宮腺筋症における子宮鏡検査の診断的意義. 日産婦内視鏡誌 1: 37, 1985
- 8) Ota H, Maki M, Shidara Y, et al., Effects of danazol at the immunological level in patients with adenomyosis, with special reference to autoantibodies: a multi-center cooperative study. *Am J Obstet Gynecol* 167: 481, 1992
- 9) 田中善章, 子宮内膜症の超音波診断. 産婦治療 62: 33, 1991
- 10) Fedele L, Arcaini L, Bianchi S, et al., Transvaginal ultrasonography in the diagnosis of diffuse adenomyosis. *Fertil Steril* 58: 94, 1992
- 11) Murao F, Hata K, Shin K, et al., Ultrasonography for the diagnosis of adenomyosis. *Acta Obstet Gynecol Jpn* 38: 2073, 1986
- 12) Hosmer DW Jr, Lemeshow S, Applied logistic regression. p1, John Wiley & Sons Co, 1990
- 13) 古川敏仁, カットオフ値を判定基準とした臨床検査のindexによる評価法—腫瘍マーカーの有効性

を評価するときの注意事項一. SRL宝函 15: 27, 1991

- 14) 井上裕二, ROC曲線と陽性分岐点. 医療とコンピュータ 5: 113, 1992
- 15) Fort JG, Cowchock FS, Abruzzo JL, et al., Anticardiolipin antibodies in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 30: 752, 1987
- 16) Manoussakis MN, Gharavi AE, Drosos AA, et al., Anticardiolipin antibodies in unselected autoimmune rheumatic disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 44: 297, 1987

Evaluation of multiparametric analysis in the diagnosis of adenomyosis

Hirotaoka Ota

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

To improve diagnosis of adenomyosis before treatment, 6 parameters were employed, and the clinical efficacy was evaluated. The subjects consisted of 83 cases, in which 57 cases were diagnosed as

adenomyosis histologically and 26 cases with adenomyoma. They were preoperatively diagnosed using hysteroscopy, serum CA125, serum autoantibody, and ultrasonography. Criteria of adenomyosis by hysteroscopy is the presence of dilated glandular ostium (Hg) or vessels (Hv) with irregular running regardless of the menstrual cycles, and three parameters (Hg, Hv or Hg/Hv) were employed. Criteria by CA125 is the cases in whom the level exceeded 35 U/ml in serum. Criteria by autoantibody is the cases in whom the level exceeded the mean + SD of the control level.

Sensitivity was highest in hysteroscopy (Hg/Hv; 80.7%), followed by CA125 and autoantibody. Specificity was highest in hysteroscopy (Hg; 96.2%). Accuracy was highest in hysteroscopy (Hg/Hv; 79.5%). Logistic analysis revealed that the model sensitivity, specificity or accuracy was 94.7%, 92.3% or 94.0%, respectively, which was markedly higher, compared to the value of each parameter. In conclusion, multiparametric analysis using logistic model was quite useful in the diagnosis of adenomyosis.

(受付: 1993年11月22日)

(受理: 1994年3月17日)

不妊治療による妊娠例の不妊原因と診療法に関する検討

Statistical Analysis of Pregnant Cases after Treatment Infertility

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

斉藤 正博
Masahiro SAITOH

石原 理
Osamu ISHIHARA

飯野 好明
Yoshiaki IHNO

須野 敏章
Toshiaki SUNO

関 博之
Hiroyuki SEKI

竹田 省
Satoru TAKEDA

木下 勝之
Katsuyuki KINOSHITA

Department of Obstetrics and Gynecology

Saitama Medical School, Saitama Medical Center, Saitama 350, Japan

1990年から1991年までの2年間に経験した不妊症例597例中、169例に妊娠が成立した(妊娠率28.3%)。妊娠成立例の平均年齢は28.8歳で、原発性不妊症59.8%、続発性不妊症40.2%、経産婦は10.7%であった。平均不妊期間は2.7年であった。91.1%に無排卵症あるいは卵胞・黄体機能異常を伴っていた。何らかの排卵誘発法を施行した症例が79.3%を占め、クロミフェン投与は17.8%、hMG-hCG療法は61.5%であった。OHSSが29.8%に認められ、全例hMG療法により発症した。妊娠継続は多胎妊娠10.6%を含む85.2%であり、流産率は14.8%であった。

当科の不妊治療の特徴は、本来、無排卵症例にのみ用いたhMG-hCG療法を積極的に投与したことである。この結果、妊娠率は上昇したが、多胎妊娠の増加が問題であり、今後検討を要する。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 266 - 271, 1994)

緒言

近年、不妊症の治療に体外受精胚移植 (in vitro fertilization and embryo transfer: IVF-ET) をはじめとする種々の新しい治療法が試みられ、以前には治療困難であった症例の妊娠が可能となってきた。しかし、最新の治療技術をもってしても、妊娠しえない症例が存在し、原因の解明や治療法の開発が急務である。

今回、我々は不妊治療の成績の向上をはかるため、不妊患者のうち妊娠成功例の治療周期について調査し、その不妊原因と妊娠周期の治療法および妊娠の転帰につき検討し、その問題点を考察した。

対象および方法

1990年1月から1991年12月までの2年間に不妊を

主訴に当科外来を受診した597例中、妊娠に成功した169例を対象とし、これらの背景、不妊の原因、妊娠周期の治療法、妊娠の転帰等につき病歴を調査した。

当科不妊外来では、不妊原因の検索のためのルーチン検査として、基礎体温測定 (BBT)、超音波断層法による卵胞発育および排卵の確認、子宮卵管造影 (HSG)、卵胞初期のLH、FSH、PRLの基礎値およびLH-RH負荷試験、TRH負荷試験、甲状腺機能検査、精液検査などを原則として全例に行っている。また、必要に応じてCA-125や抗精子抗体、黄体機能検査として黄体中期の卵巣性ステロイドホルモン (プロゲステロン (P₄), エストラジオール (E₂)) の測定、子宮内膜日付診を検討した。

スクリーニング検査により明らかとなった異常については、無排卵と卵胞発育および黄体機能異常に

表1 患者背景

1. 経妊回数		
経妊回数	症例数	%
0	101	59.8
1	42	24.8
2	15	8.9
3	10	5.9
4	0	0
5	1	0.6
2. 経産回数		
経産回数	症例数	%
0	151	89.3
1	18	10.7
3. 不妊期間		
不妊期間	症例数	%
0~1年	5	3.4
1~2年	53	35.8
2~3年	34	23.0
3~4年	17	11.5
4~5年	15	10.1
5~6年	10	6.7
6~7年	1	0.7
7~8年	7	4.7
8~9年	1	0.7
9~10年	1	0.7
10年以上	4	2.7

対しては、まず、クロミフェンによる排卵誘発を原則として試み、無効例、妊娠非成立例にはhMG療法を施行した。高プロラクチン血症や潜在性高プロラクチン血症に対しては、プロモクリプチン投与を行い、無効例、妊娠非成立例にはhMG療法を施行した。子宮内膜症に対しては、原則としてGnRHアナログによる薬物療法を先行し、必要に応じて腹腔鏡や開腹術による保存的手術療法を施行後、積極的に排卵誘発を行った。卵管因子を有する症例に対してはmicro surgeryあるいはIVF-ETを施行した。また、男性因子や長期不妊夫婦に対しては配偶者間人工授精(AIH)を行った。

投与した薬剤としては、hMG製剤としてパーゴナル、ヒュメゴン、フェルチノームP、GnRHαとしてスプレキュア(塩酸ブセレリン)を用いた。

成績

1. 患者背景(表1)

妊娠症例の初診時平均年齢は28.8歳±3.7歳(20歳~38歳)であった。原発性不妊症は全体の59.8%(101例)を占め、続発性不妊症は40.2%(68例)であった。また、そのうち、未産婦は89.3%(151例)であった。

不妊期間は、全体の66.2%で3年以上であり、10年以上の不妊期間を有する症例も4例認められた。また平均不妊期間は2.7±2.2年であった。

2. 妊娠症例に認められた不妊原因(表2)

表2 妊娠症例に認められた不妊原因

原因別	症例数	頻度(%)
A. 無排卵	68	40.2
1. PCO	22	13.0
2. 稀発月経	16	9.5
3. 無月経(原発性2例, 続発性10例)	12	7.1
4. 無排卵周期	12	7.1
5. 高プロラクチン血症	6	3.6
B. 卵胞および黄体機能異常	86	50.9
1. 潜在性高プロラクチン血症	33	19.5
2. 黄体機能不全	28	16.6
3. long follicular phase	25	14.8
C. 卵管因子	23	13.6
D. 子宮内膜症	22	13.0
E. 男性因子	26	15.4
F. 子宮奇形	6	3.6
G. 原因不明の長期不妊	3	1.8
H. その他(子宮筋腫, 卵巣嚢腫, 性交障害, 頸管因子等)	14	8.3

※重複例を含む

前述したスクリーニング検査により判明した不妊原因を妊娠症例についてみると(表2), PCO, 稀発月経, 無月経, 無排卵周期症, 高プロラクチン血症のため無排卵が不妊に関与すると思われる症例は全体の40.2% (68例)であった。また, 潜在性高プロラクチン血症, 黄体機能不全などの排卵はするけれども卵胞発育および黄体の機能異常を呈する症例は全体の50.9% (86例)にのぼった。また, 卵管因子は13.6% (23例), 子宮内膜症は13% (22例), 乏精子症などの男性因子は15.4% (26例)の症例に認められた。(重複例を含む)

3. 妊娠周期の排卵誘発法(図1)

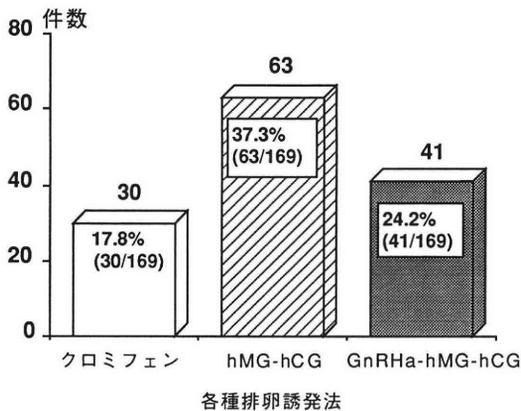


図1 妊娠周期の排卵誘発法

各種排卵誘発法を用いた周期に妊娠した症例は169例中, 79.3% (134例)であった。これらの症例の中で, クロミフェンを用いた周期に妊娠した症例は17.8% (30例)であった。一方, hMG-hCG療法周期に妊娠した症例はGnRHアゴニスト (GnRHa, Buserelin) を併用した24.2% (41例)を含め, 61.5% (104例)であった。

4. クロミフェン療法による妊娠例の背景(表3)

クロミフェン投与により妊娠の成立した症例の不妊原因を検討した。クロミフェン投与で妊娠した30例の不妊原因を表3に示した。PCOや無月経および稀発月経, 無排卵周期症, 高プロラクチン血症など無排卵が関与すると思われる症例が46.7% (14例), 卵胞発育および黄体機能異常が関与すると思われる症例が73.3% (22例), 卵管因子の関与する症例が10% (3例), 男性因子を有した症例が6.7% (2例), その他性交障害が3.3% (1例)であった。(重複例を含む)

5. hMG-hCG療法およびGnRHa-hMG-hCG療法による妊娠例の背景(表4)

GnRHa-hMG-hCG療法を含めたhMG-hCG療法により妊娠の成立した症例の不妊原因を検討した。hMG-hCG療法で妊娠した104例の不妊原因を表4に示した。PCOや無月経および稀発月経, 無排卵周期症, 高プロラクチン血症など無排卵が関与すると思われる症例が43.3% (45例), 卵胞発育および黄体機能異常が関与すると思われる症例が51.0% (53例), 卵管因

表3 クロミフェン療法による妊娠例の背景

原因別	症例数	頻度(%)
A. 無排卵	14	46.7
1. PCO	3	10
2. 無月経(原発性2例, 続発性0例)	2	6.7
3. 稀発月経	4	13.3
4. 無排卵周期症	4	13.3
5. 高プロラクチン血症	1	3.3
B. 卵胞および黄体機能異常	22	73.3
1. 黄体機能不全	5	16.7
2. 潜在性高プロラクチン血症	10	33.3
3. long follicular phase	7	23.3
C. 卵管因子	3	10
D. 子宮内膜症	0	0
E. 男性因子	2	6.7
F. 子宮奇形	0	0
G. 原因不明の長期不妊	0	0
H. その他(子宮筋腫, 卵巣嚢腫, 性交障害, 頸管因子等)	1	3.3

※重複例を含む (n = 30)

表4 hMG-hCGおよびGnRHa-hMG-hCG療法による妊娠例の背景

原因別	症例数	頻度(%)
A. 無排卵	45	43.3
1. PCO	17	16.3
2. 無月経(原発性2例, 続発性8例)	10	9.6
3. 稀発月経	10	9.6
4. 無排卵周期症	8	7.7
5. 高プロラクチン血症	4	3.8
B. 卵胞および黄体機能異常	53	51.0
1. 黄体機能不全	21	20.2
2. 潜在性高プロラクチン血症	18	17.3
3. long follicular phase	14	13.5
C. 卵管因子	14	13.5
D. 子宮内膜症	14	13.5
E. 男性因子	18	17.3
F. 子宮奇形	4	3.8
G. 原因不明の長期不妊	1	1.0
H. その他(子宮筋腫, 卵巣嚢腫, 性交障害, 頸管因子等)	7	6.7

※重複例を含む (n = 104)

表5 治療別の成績

治療法	症例数	頻度(%)
A. 排卵誘発法	104	79.3
1. clomiphene	30	17.8
2. hMG-hCG	63	37.3
3. GnRHa-hMG-hCG	41	24.2
B. AIH	32	18.9
C. IVF-ET	22	13
D. 手術療法(子宮筋腫核出術, 卵巣嚢腫核出術, 子宮奇形形成術等)	15	8.9
E. 薬物療法	26	15.4
1. bromocriptine (高プロラクチン血症およびOHP)	20	11.8
2. GnRHa(buserelin) (子宮内膜症の保存療法)	5	3.0
3. dexamethasone (高アンドロゲン血症)	1	0.6
F. HSGまたは通気, 通水後の妊娠	3	1.8
G. 自然妊娠	13	7.7

子の関与する症例が13.5%(14例), 子宮内膜症を有した症例が13.5%(14例), 男性因子を有した症例が17.3%(18例), 子宮奇形を有した症例が3.8%(4例), 原因不明の長期不妊が1.0%(1例), その他が6.7%(7例)であった。(重複例を含む)

6. 妊娠例の排卵誘発以外の治療(表5)

妊娠症例169例の妊娠成立周期に行った排卵誘発以外の治療を検討すると, AIHが18.9%(32例), IVF-ET13%(22例)に行われていた。一方, その他の妊娠成立に関与したと思われる治療法として, 子宮筋腫

核出術, 卵巣嚢腫核出術, 子宮奇形形成術などの手術療法後が8.9%(15例)の症例に行われていた。GnRHaによる子宮内膜症の薬物療法後の妊娠症例は5例(3.0%)に認められた。さらに, HSG, 通気, 通水後の妊娠は1.3%(3例), 特に, 治療を施行していない周期の自然妊娠は7.7%(13例)であった。(重複例を含む)

7. 妊娠後の転帰(表6)

妊娠に成功した169例のうち, 妊娠継続例は85.2%(144例)であり, そのうち, 単胎妊娠は74.6%(126例),

表6 妊娠後の転帰

	症例数	頻度(%)
A. 妊娠継続例	144	85.2
1. 単胎妊娠	126	74.6
2. 多胎妊娠	18	10.6
a. 双胎	14	
b. 品胎	2	
c. 四胎以上	2	
B. 流産症例	25	14.8
1. 自然流産	17	10.1
2. 治療的流産	2	1.2
3. 子宮外妊娠	6	3.5

多胎妊娠は10.6% (18例)であった。また、品胎以上の多胎妊娠は4例に認められた。流産は14.8% (25例)に認められた。そのうち、自然流産が10.1% (17例)、治療的流産が1.2% (2例)、子宮外妊娠が3.5% (6例)であった。

8. OHSSの発症状況

OHSSは、すべてhMG-hCG療法後に発症し、hMG-hCG療法による妊娠例のうち、29.8% (31例)に認められた。しかし、WHOの重症度分類でみると、そのうち、grade Iは35.5% (11例)、IIは25.8% (8例)であり、重症のIIIは11例、IVは1例にすぎなかった。

考 察

今回、我々は不妊治療の成績向上のため、1990年から1991年までの2年間に不妊を主訴に当科不妊外来を受診した症例のうち、妊娠に成功した症例につき検討した。

妊娠率は28.3%であり、他の報告¹⁻⁵⁾の10.0~46.9%と同等の成績ではあった。しかし、他院より紹介される難治性の不妊症例が多い当科の地域医療における位置付けを考慮すると良好な成績であったと考えられた。

妊娠症例における不妊原因は、卵胞発育および黄体機能異常に関連する原因が50.9%と最も多く、ついで、無排卵に関連する原因であった。一方、卵管因子が13.6%、子宮内膜症が13%、男性因子は15.4%にすぎなかった。これは、不妊治療において適切な排卵誘発法を施行することで妊娠成立の得られる症例が多数あることを示すと共に、他の因子、特に、男性因子などを有する症例の治療が困難であることを示すと思われた。また、原因不明の長期不妊は1.3%と少なく、このような症例における治療の困難性が証明された。

妊娠周期に何らかの排卵誘発を施行した症例は79.3%と高い頻度を示し、特に、hMG製剤を用いた排卵誘発が61.5%を占めている。これは諸家の報告¹⁻⁸⁾より高く、当科における不妊治療の特徴のひとつと思われる。

当科では、クロミフェン療法で妊娠に至らない症例や長期不妊症例において、排卵を有する場合でも、積極的にhMG-hCG療法を施行している⁹⁾。今回検討した症例においても、本来のhMG療法の適応である無排卵の症例は全体の43.3% (45例)にすぎず、残りの症例は排卵は認められても、卵胞または黄体の機能異常を伴う症例などに対して施行されている。

AIHは32例、18.9%に行われており、既報¹⁰⁾のように男性因子を有する症例以外にもAIHを適応とすることで妊娠成立に至る症例が少なからず存在していることを示している。卵管因子や長期不妊症例に対して、当科でもIVF-ETが開始され、今回の調査では妊娠例の13%を占めた。今後、長期不妊症例や難治性の不妊症例に対するIVF-ETの応用は増加すると思われる。他の治療からの変更のタイミングについて、さらに検討する必要がある。

妊娠の転帰をみると、妊娠継続率が85.2%と良好な成績がえられた。一般に不妊治療成功例の流産率は11~25%⁹⁾と報告されているが、今回の検討では14.8%と自然流産率と同等かわずかに高い程度の良好な成績であった。また、排卵誘発を積極的に行っているため多胎妊娠の頻度が10.6%と高値を示し、多胎妊娠の予防が当科における今後の課題のひとつといえる。

前述のように当科では積極的にhMG製剤を用いた排卵誘発を施行している。そのため、OHSSが29.8%に発症した。しかし、このような積極的な排卵誘発を行うことにより妊娠が成立する症例が数多く認め

られることから、今後、このように発症したOHSSの管理についても検討をすすめていくことが必要と思われた。

文 献

- 1) 小山雅子, 池田景子, 詠田由美 他, 当科における妊娠例の検討. 福大医紀 17 (4): 471, 1990
- 2) 川口とし子, 鈴木 猛, 飛鳥邦雄 他, 当教室における不妊クリニック患者の推移. 日不妊会誌 34 (1): 96, 1989
- 3) 西垣 新, 高橋健太郎, 山崎裕行 他, 当科不妊外来における臨床的統計の推移. 日不妊会誌 33 (3): 124, 1988
- 4) 山田紳介, 占部 清, 清水健治 他, 不妊症治療後の妊娠とその予後. 日不妊会誌 27 (1): 54, 1982
- 5) 西村敏雄, 岡村 均, 藤井信吾 他, 不妊外来における妊娠成功例とその予後の検討. 日不妊会誌 27 (2): 134, 1982
- 6) 大野洋介, 田村秀子, 田村尚也 他, 不妊夫婦における妊娠例の統計的解析. 日不妊会誌 35 (2): 180, 1990
- 7) 館野政也, 村田雅文, 中曽根敬一 他, 最近の当科不妊外来における妊娠成功例100例のretrospective observation. 産婦人科の治療 52 (2): 230, 1986
- 8) 三宅崇雄, 阿久津正, 西村 満 他, 不妊統計一佳子年間の妊娠症例を中心として. 日産婦新潟地方部会誌 45: 7, 1987
- 9) 石原 理, 飯野好明, 齊藤正博 他, 排卵を有する不妊婦人に対するhMG療法の有用性に関する検討. 日本産婦人科学会雑誌 46 (3): 221, 1994
- 10) 石原 理, 田谷順子, 飯野好明 他, AIHの成績から見た精子濃度の臨床的意義. 日不妊会誌 38 (1): 147, 1993

Statistical analysis of pregnant cases after treatment infertility

Masahiro Saitoh, Osamu Ishihara,
Yoshiaki Ihno, Toshiaki Suno,
Hiroyuki Seki, Satoru Takeda
and Katsuyuki Kinoshita

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

Of 597 treatment couples, 169 conceived (28.3%) during a period of 2 years from January 1990 to December 1991, on which the work up of the management was performed.

1) The average age of the conceived women were 28.8 ± 3.7 years old (range: 20 to 38) at the first visit. Primary infertility was 59.8%, and secondary was 40.2%. The average infertile period was 2.7 ± 2.2 years (range: 0 to 10).

2) Anovulation or the other disturbance of follicular growth and luteal phase (91.1%).

3) Ovulation induction was carried out in 79.3% of patients. Clomiphene-hCG was used for 17.8% of the conceived women, and hMG-hCG was 61.5%.

4) OHSS by hMG-hCG occurred in 29.8% of the successful cases.

5) The pregnant outcome was as follows: 85.2% of the infant was born after 37 week of pregnancy and the rate of multiple pregnancy was 10.6%.

The high success rate of conception is likely to be attributed to the wide use of hMG-hCG therapy for infertile couples, although the high incidence of OHSS and multiple pregnancy has to be solved in future.

(受付: 1993年12月27日)

(受理: 1994年3月17日)

原因不明不妊症における不妊症検査としての腹腔鏡の意義

Laparoscopy as an Infertility Examination in Cases of Unexplained Infertility

名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室

生田 克夫	鈴木 規敬	鈴木 真史
Katsuo IKUTA	Noritaka SUZUKI	Masashi SUZUKI
岡田 英幹	飯田 忠史	尾崎 康彦
Hideki OKADA	Tadashi IIDA	Yasuhiko OZAKI
花田 征治	八神 喜昭	
Seiji HANADA	Yoshiaki YAGAMI	

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

中日病院産婦人科

万歳 稔
Minoru MANZAI
Chunichi Hospital

東市民病院産婦人科

貝田 清隆
Kiyotaka KAIDA

Nagoya City Higashi General Hospital

子宮卵管造影検査および内診において異常が認められないとされていた70症例に腹腔鏡を施行したところ異常所見は70症例中47症例に認められた(67.1%)。卵管の通過性も考慮して腹腔内の異常所見と不妊との関連性を評価したところ、70症例中不妊の原因となりうると考えられる所見の認められたものは16症例(22.9%)で、卵管機能を期待した不妊治療で妊娠に至ったのは1例(6.3%)のみであった。主たる不妊の原因と考えられる所見の認められたものは11症例(15.7%)であり、妊娠に至ったのは卵管機能の回復を計った2症例(18.2%)であった。しかしながら正常所見を示した43症例では11症例(25.0%)が卵管機能に依存した不妊治療方法で妊娠に至った。内診や子宮卵管造影検査において異常が認められない70症例中27症例に腹腔鏡により何らかの不妊の原因となりうる所見が発見され、これらの異常所見が卵管の機能に依存した治療方法の成績を左右していたことより、この様な症例に対する適切な治療方法を選択するために腹腔鏡の施行は価値あるものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 272 - 277, 1994)

緒言

不妊症の検査や治療を行うに際し、腹腔内所見が

重要な鍵を握っていることは言うまでもない。しかしながら腹腔は容易に観察可能な部位ではなく、所見を得るためには少なからず侵襲的な処置を必要と

し、さらに麻酔も必要となる。ところが骨盤腔内の炎症の既往があり卵管周囲の癒着が強く疑われる症例や、卵管の閉塞、狭窄などの異常が子宮卵管造影検査で認められる症例、子宮内膜症が疑われる症例などの様に腹腔内に異常所見の存在が強く疑われる症例ではより詳細な腹腔内の所見を得るために腹腔鏡検査が必要となる。これら以外の腹腔内の異常を示唆する検査結果や既往歴のない症例では通常の不妊検査の一つとして全例に腹腔鏡検査は行いにくく、また患者の同意も得られにくい。しかしまた、通常の不妊検査で異常を認めず腹腔鏡検査により初めて腹腔内異常所見が確認され、この腹腔内異常所見が以後の治療方針の決定に大きく関与することも日常しばしば経験されることである。そこで当科を拳児希望を主訴として訪れ既往歴に特記すべき事はなく、双合診、子宮卵管造影検査、通気検査、精液検査に異常が認められない症例の腹腔鏡検査結果を検討し、不妊症における腹腔鏡検査の意義を考察した。

対象および結果

昭和63年1月より平成5年6月までの間に当科で不妊症のため腹腔鏡検査を行った不妊症例のうちで、不妊症の一般検査において排卵障害を認めず、精液検査、子宮卵管造影検査、内診所見においても異常が認められないと判断された70症例を対象とした。そしてこれらの症例は卵管が正常に機能していることを前提として少なくとも6ヶ月以上経過観察を行うも妊娠に至らないか、他院で種々の治療を行ったにもかかわらず妊娠が成立せず当科紹介となった症例であった。

これら症例のうち腹腔鏡検査において異常所見を認めなかったのは23症例(32.9%)で、残り47症例(67.1%)には何らかの異常所見を腹腔内に認めた(表1)。またこの腹腔鏡検査時に行われた卵管通色素検

表1 腹腔鏡検査による異常所見の有無

	症例数	通色素検査による卵管通過性異常
腹腔内異常所見 無し	23/70 (32.9%)	3/23 (13.0%)
腹腔内異常所見 有り	47/70 (67.1%)	9/47 (19.1%)
子宮内膜症	30/47 (63.8%)	2/30 (6.7%)
腹腔内癒着	13/47 (27.7%)	5/13 (38.5%)
子宮筋腫	4/47 (8.5%)	2/4 (50.0%)

表2 子宮内膜症症例のstage分類

rAFS	症例数	骨盤腔内癒着	
		無し	有り
stage I	10 (33.3%)	8	2
stage II	10 (33.3%)	2	8
stage III	7 (23.3%)	2	5
stage IV	3 (10.0%)	0	3
	30	12	18

査において腹腔内に異常所見を認めなかった23症例のうち3例(13.0%)に片側の卵管の閉塞が認められた。

腹腔内に異常所見が認められた47症例の異常の内訳は表1に示すように、子宮内膜症の所見が30症例(63.8%)、子宮内膜症以外の原因によると考えられる骨盤内癒着が13症例(27.7%)、子宮筋腫が4症例(8.5%)であった。これらの異常所見のうち子宮内膜症をrAFSのscoringにより分類すると、表2のようにstage Iが10例(33.3%)、stage IIが10例(33.3%)、stage IIIが7例(23.3%)、stage IVが3例(10.0%)であり、その頻度はstageが進むに従って減少していたが、子宮内膜症のstage III以上が1/3の症例に存在した。またこの子宮内膜症症例を骨盤腔内の癒着の有無でみると癒着の無いものが12例、癒着を有するものが18例であり、stage分類がIからIVと進むに従い癒着を有する症例の割合が高くなっていった。

表3 不妊との関連性の評価

関連なし	不妊症の原因と考えられる所見が存在しなかったもの：両側の卵管の通過性に異常を認めず、異常所見が存在しても卵巣卵管以外の部の癒着や病変で卵管卵巣の可動性に障害とならないと考えられるもの。(数個のblue berry spotのみの子宮内膜症症例はここに分類した)
関連の可能性	不妊の原因として関係する可能性のある所見が存在したもの：片側の卵管の通過性に異常を認めたもの。片側の卵管の可動性が障害されているもの。片側および両側の卵巣が癒着により位置の異常を来しているもの。片側のみの付属器周辺の著しい癒着が存在するもの。
関連有り	主要な不妊原因となると考えられる異常所見が両側の付属器に存在したもの：両側の卵管が閉塞しているもの。強固な癒着により両側の卵管の可動性が著しく障害されているもの。両側の卵巣の表面全体を覆うようなフィブリン膜の形成や癒着が存在するもの。

表4 腹腔鏡所見と不妊との関連性

腹腔鏡所見	腹腔内所見と卵管通過性による不妊との関連性		
	関連性なし	関連の可能性	関連有り
異常所見なし	20	3	0
子宮内膜症	18	6	6
腹腔内癒着	3	6	4
子宮筋腫	2	1	1
	43 (61.4%)	16 (22.9%)	11 (15.7%)

腹腔鏡下の電気焼灼、癒着剥離の処置は子宮内膜症以外のものも含めて21症例に行ったがこの処置のみで妊娠に至った症例はなかった。

つぎに腹腔鏡を行った70症例について骨盤腔内の所見が不妊の原因となっているか否かを腹腔鏡検査下での通色素検査結果を加味して表3の3群に分類した。

その結果は表4のごとくで、腹腔内に異常所見なしとされた23症例のうち3例は片側の卵管の通過性に異常を認め“関連の可能性”に分類された。子宮内膜症の30症例のうち癒着や卵管の通過性の異常から6症例が“関連の可能性”、また6症例が“関連有り”に分類された。腹腔内癒着の13症例のうち3例は不妊との関連性がないと判断され6例が関連の可

能性、4例が関連有りに分類された。また子宮筋腫の4症例では2症例が卵管の通過性からそれぞれ“関連の可能性”と“関連有り”に分類された。以上の計70症例の検討より何らかの不妊との関連性を示す異常所見が得られた症例は27症例で38.6%であった。

これら3群にその後の治療と妊娠について見てみると、表5の不妊と関連する所見なしの評価症例では卵管が受精の場としての機能を有する事を前提として治療を行い、排卵のmonitoringで2症例、人工授精で2症例、子宮内膜症の薬物治療により2症例、さらにsuperovulationにより5症例の計11症例で妊娠が成立した。そしてこれらの治療により妊娠に至らなかった15症例にたいしてIVF-ET治療を行い7症例の妊娠が得られた。腹腔鏡検査後や治療途中で来院を中断した脱落例が14症例存在するがこれを含めた43症例中18症例、41.8%で妊娠が成立した。続いて不妊と関連する可能性の有る所見有りと評価された16症例について見てみると表6に示す通り、卵管の機能に期待したsuperovulation治療で6症例中1症例しか妊娠の成立を見なかった。そして卵管の機能に依存しないIVF-ET治療で2症例の妊娠が得られ途中脱落例を含めた16症例中3症例、18.8%の妊娠率で

表5 腹腔鏡検査後の治療と妊娠：不妊との関連なし

腹腔所見	治療法と妊娠			妊娠症例数	
		superovulation	IVF-ET		
異常なし (20)	排卵 monitoring	2/13	1/9	5/8	8
子宮筋腫 (2)	—	—	1/2	1/1	2
腹腔内癒着 (3)	人工授精	1/2	1/1	—	2
子宮内膜症 (18)	GnRH _a , Danazol	2/5	—	—	6
	人工授精	1/4	2/9	1/6	
43		6	5/21	7/15	18

IVF-ET以外の妊娠症例数 11/43 (25.6%)

総妊娠数 18/43 (41.8%)

途中脱落例
14例を含む

表6 腹腔鏡検査後の治療と妊娠：不妊との関連の可能性有り

腹腔所見	治療法と妊娠		妊娠症例数
	superovulation	IVF-ET	
異常なし (3)	0/1	0/1	0
子宮筋腫 (1)	0/1	0/1	0
腹腔内癒着 (6)	1/3	1/3	2
子宮内膜症 (6)	0/3	1/2	1
16	1/8	2/7	3

IVF-ET以外の妊娠症例数 1/16 (6.3%)

総妊娠数 3/16 (18.8%)

途中脱落例
7例を含む

表7 腹腔鏡検査後の治療と妊娠：不妊との関連あり

腹腔所見	治療法と妊娠			妊娠症例数
		superovulation	IVF-ET	
腹腔内癒着 (4)	—	0/3	0/1	0
子宮筋腫 (1)	経頸管的卵管再疎通術 1/1	—	—	1
子宮内膜症 (6)	手術 1/2	0/3	2/3	3
11	2	0/6	2/4	4
IVF-ET以外の妊娠症例数		2/11 (18.2%)		
総妊娠数		4/11 (36.4%)	途中脱落例 4例を含む	

あった。表7は不妊の主たる原因と考えられる所見ありと評価された11症例で、経頸管的卵管再疎通術の1例と子宮内膜症の手術療法の1例で妊娠が得られたが、両側の卵管の通過性は保たれていたことから6症例にsuperovulationを行ったが妊娠は成立しなかった。そしてIVF-ETを行った4症例中2症例に妊娠が成立し、11症例中4症例、36.4%の妊娠率であった。

考 察

今回不妊症の一般検査において異常を認めないと判断した70症例に腹腔鏡を行い67.1%に腹腔内異常所見を認め、卵管の通過性異常を含めると71.4%にも達する異常所見を認めた。これらの異常所見と不妊との関連性を卵管の可動性の障害というmechanicalな因子を主とし卵管の通過性を加味して評価すると不妊の原因と成りうると考えられる異常所見の頻度は38.6%となった。

今回の検討で見られたような70症例中12症例、17.1%の子宮卵管造影検査と腹腔鏡検査時の卵管通色素検査結果との結果の不一致はこれまでも指摘されており、子宮卵管造影検査において卵管の疎通性に異常がないと判断されたにもかかわらず腹腔鏡検査において卵管の疎通性に異常が認められたといった検査結果の不一致率は7～33%^{1,2,3)}と報告されている。これには検査条件の差、すなわち麻酔の使用の有無、通過性を確認するために用いた試薬や、X線フィルムによる評価と光学視管を介した直視の評価の違いなど種々の要因が挙げられる。これに加えて卵管通過性の評価の不一致に関係していると考えられる因子として他院にて子宮卵管造影検査を2年以内に行っている場合には再撮影による患者のX線被曝を避けるためレントゲンフィルムを借用して評価していることや実際に腹腔鏡を行うのは子宮卵管造影検査を行ってからかなり時間が経過した後である症例の多いこと等が挙げられよう。

腹腔鏡検査時の癒着剥離や子宮内膜症の電気焼灼などの処置は計21症例にのべ25回行ったにもかかわらず処置のみでの妊娠は得られなかった。

腹腔鏡検査後の不妊治療成績では不妊の原因となりうる異常所見を認めなかった43症例では卵管が正常に機能することを前提とした治療方法で11症例の妊娠を得、途中脱落例も含めて妊娠率は25.6%であった。これに対して不妊の主たる原因とは考えられないが関係している可能性があるとして評価した群では少なくとも片側の卵管は正常に機能していると考えて治療を行っても妊娠は1症例、6.3%の低値にとどまった。しかも不妊の主たる原因と評価した群では卵管の機能回復のための治療を行った症例以外には妊娠を得ることは出来なかった。そしてこれらの3群のいずれにもIVF-ETの治療成績には明らかな差はないことから、今回我々が用いた評価法が妊娠成立における排卵、卵管の卵子捕獲、卵子の輸送までの過程の障害を良く反映しており、腹腔内の異常所見が不妊の主要な原因として重要であることが確認された。

腹腔鏡検査にて不妊の原因として関連する所見の得られなかった43症例のうちの18症例は卵管の可動性に直接影響を及ぼしていないと判断された子宮内膜症症例である。子宮内膜症と不妊との関連性について種々の報告が見られ、子宮内膜症組織から産出され腹水中に多く含まれるとされているアラキドン酸代謝産物^{4,5)}による卵管の運動機能の障害、腹腔内マクロファージからのinterleukinを介した卵分割の障害や精子受精能の障害⁶⁾、精子の輸送障害⁷⁾、卵捕獲抑制因子⁸⁾の産生などのいくつかの不妊の機序が報告されている。しかし卵管周囲癒着などの卵管の可動性の障害や卵巢の広範囲な周囲癒着などの明らかな不妊の因子を生じた症例は別として、臨床的な統計からはmild endometriosisの不妊への関与に関しては否定的な報告が多い^{9,10,11)}。今回の“関連なし”群の予後子宮内膜症の有無でみても、子宮内膜症の

存在しなかった25症例中6症例がIVF-ET以外の治療で妊娠したが、子宮内膜症存在例でも18症例中5症例がIVF-ET以外で妊娠しており両者間に大きな差は見られなかった。しかしこれらの子宮内膜症症例の大部分に対して腹腔鏡下電気焼灼や検査後の薬物療法が行われているためmild endometriosisの直接的な不妊への関与に評価を下すのは今回の検討では難しいと考えられる。

体外受精胚移植法の登場以前では腹腔鏡検査は卵管が正常に機能する事を前提とした治療法を続けるか、卵管の機能を回復させるべく外科的処置を行う必要が存在するか、または治療を断念すべきかといった以後の治療方法を選択する上で重要な検査方法であった。しかし体外受精胚移植法は卵管の機能に依存しない治療方法で、従来では異常所見が存在し妊娠を諦めるしかなかった症例に新たな希望を投げ掛けたばかりでなく、不妊原因となる所見の存在しない症例にも最終的に選択しうる新たな治療方法の一つとして選択肢を広げるとともに不妊の治療成績の改善に貢献することとなった。この治療方法は卵管の機能に依存しない不妊治療方法であることから腹腔鏡で腹腔内の所見を得る必要性は従来ほど大きくなくなったとも考えられがちであるが、体外受精胚移植が不妊症夫婦にとって時間的経済的に負担の大きい治療方法で、安易に選択できる治療方法とはいえないこと、そして今回の検討より腹腔内に不妊の原因となる異常所見の存在しない症例の4人に1人は卵管が正常に機能する事を前提とした治療方法で妊娠が成立すること、また逆に不妊の原因となりうる異常所見が存在した症例の妊娠率は極めて低く、早期に体外受精胚移植治療に移るほうが賢明であることなどが明らかとなり、個別により適切な不妊治療法を選択するために腹腔鏡を実施し、不妊原因となりうる異常所見の有無を検索することの意義は大きいと考えられる。

不妊症に対して腹腔鏡を実施する時期については、当科では子宮卵管造影検査において卵管性不妊と考えられたり双合診で子宮内膜症の存在が考えられる不妊症例ではさらに詳細な腹腔内所見を得るために直ちに腹腔鏡検査の実施を勧めている。一方不妊原因として男性因子のみが認められた症例においても著しく精液所見の不良な症例では強いて腹腔鏡検査を勧めてはいないが、不妊治療により妊娠が期待できる範囲の精液所見の症例でありながら6~8回の人工授精を行い妊娠に至らない症例では腹腔内の異常所見の存在をも疑い、腹腔鏡検査を勧めてい

る。そして今回検討の対象とした通常の不妊検査において異常所見の認められないいわゆる原因不明不妊の症例や頸管因子、黄体機能不全症例では6ヶ月を一つの治療単位としてこれらに対する治療を行い妊娠に至らなければ腹腔鏡検査を勧めている。

まとめ

排卵障害を認めず、子宮卵管造影検査、精液検査など通常の不妊症検査で異常を認めなかった70症例に対し腹腔鏡を行い47症例67.1%に腹腔内異常所見が認められた。このうち子宮内膜症が最も多く30症例63.8%の頻度であった。不妊の主要な原因として関与すると考えられる腹腔内異常所見は27症例38.6%に認めた。このことより通常の不妊検査において腹腔内異常所見の存在を疑わせる検査結果が得られなかった症例においても、一定の不妊治療を経ても妊娠に至らない症例は腹腔鏡検査を実施し、骨盤内病変と不妊との関連性の評価を行ったうえで個別に以後の治療方針を決定すべきであると考えられた。

文 献

- 1) Moghissi KS and Sim GS, Correlation between hysterosalpingography and pelvic endoscopy for the evaluation of tubal factor. *Fertil Steril* 26: 1178, 1975
- 2) World Health Organization, Comparative trial of tubal insufflation, hysterosalpingography and laparoscopy with dye hydrotubation for assessment of tubal patency. *Fertil Steril* 46: 1101, 1986
- 3) 田中俊誠, 藤本征一郎, 及川 衛 他, 卵管周囲癒着ならびに卵管疎通性のHysterosalpingographyによる診断とLaparoscopyによる確認. *日産婦誌* 39: 161, 1987
- 4) Drake TS, O'Brien WF, Ramwell PW, et al., Peritoneal fluid thromboxane B2 and 6-keto-PGF1 α in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 140: 401, 1981
- 5) Badawy SZ, Cuenca V, Marshall L, et al., Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 42: 704, 1984
- 6) 武谷雄二, 子宮内膜症の生化学的特性に関する基礎ならびに臨床的研究. *日産婦誌* 41: 971, 1989
- 7) Hoxsey RJ, Rao R, Scommegna A, Sperm recovery in peritoneal fluid of endometriosis versus "normal" infertile patient. *Fertil Steril* 41: 39s, 1984

- 8) Suginami H, Yano K, Watanabe K, et al., A factor inhibiting ovum capture by the oviductal fimbriae present in endometriosis peritoneal fluid. *Fertil Steril* 46: 1140, 1986
- 9) 井上正人, 子宮内膜症不妊に対する治療法の検討. *日産婦誌* 41: 960, 1989
- 10) Hull ME, Moghissi KS, Magyar DF, et al., Comparison of different treatment modalities of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 47: 40, 1987
- 11) Seibel MM, Berger MJ, Weinstein FG, et al., The effectiveness of danazol on subsequent fertility in minimal endometriosis. *Fertil Steril* 38: 534, 1982

Laparoscopy as an infertility examination in cases of unexplained infertility

Katsuo Ikuta, Noritaka Suzuki
Masashi Suzuki, Hideki Okada
Tadashi Iida, Yasuhiko Ozaki
Seiji Hanada and Yoshiaki Yagami

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

Minoru Manzai
Chunichi Hospital

Kiyotaka Kaida
Nagoya City Higashi General Hospital

Laparoscopy was carried out on 70 infertile women with normal hysterosalpingography and normal findings on bimanual examination. Abnormal findings were elucidated by laparoscopy in 47 of 70 patients (67.1%). The relationship between infertility and these abnormal findings including tubal patency was evaluated. Possible causes of infertility were obtained in 16 out of 70 patients (22.9%) and only one pregnancy (6.3%) was obtained by the further infertility treatment expecting tubal function. Major causes of infertility were found in 11 of 70 patients (15.7%) and 2 pregnancies were obtained after restoration of the tubal function. However, 11 out of 43 patients with normal pelvic findings (25.0%) got pregnant by the infertility treatment depending on the normal tubal function. Since abnormal findings relating infertility were obtained by laparoscopy from 27 out of 70 patients without abnormal findings on bimanual examination and hysterosalpingography and the results of infertility treatment expecting tubal function largely depended on these abnormal findings, laparoscopy is considered to be worth practicing to determine the appropriate treatment for these patients.

(受付: 1994年1月17日)

(受理: 1994年3月18日)

ACCELERATING EFFECTS OF KAMPO MEDICINES ON PROTEIN SYNTHESIS IN CULTURED HAMSTER EPIDIDYMAL CELLS

Takahiro NAKAYAMA, Yasuo GOTO,
Satoshi NATSUYAMA and Takahide MORI

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

Yoichi NODA

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

Abstract: The mechanisms of three kampo medicines, Hachimi-jio-gan (EK-7), Hochu-ekki-to (EK-41) and Ninjin-yoei-to (EK-108), which are frequently used in the treatment of male infertility to affect spermatogenesis in epididymides, were investigated. In order to elucidate how these drugs affect protein synthesis in epididymal cells, we investigated the effects of the sera from male mice to which these drugs were administered orally, on protein synthesis in cultured hamster epididymal cells. Golden hamster epididymal cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with FCS, under 5% CO₂ in air at 32°C for 7 to 10 days. The medium was then changed to RPMI1640 medium supplemented with 1 μCi/ml [³H]-leucine and 10% serum from male ICR mice to which EK-7, EK-41 or EK-108 was orally administered. The culture was continued for 20 hours, and the uptake of [³H]-leucine in the cultured hamster epididymal cells was measured by a liquid scintillation counter. Compared to controls, the uptake of [³H]-leucine was significantly higher ($p < 0.05$) in cells cultured in media supplemented with sera from mice to which EK-41 was administered. However sera from mice to which EK-7 or EK-108 was administered had no effect on [³H]-leucine uptake. Considering these data, the possibility was suggested that one of the actions of EK-41, which would improve sperm motility, would be to promote the synthesis of some proteins which might be involved in the functional maturation of spermatozoa in the epididymis. EK-7 and/or EK-108 might have an effect not on epididymal cells but on other organs thereby improving sperm quality in male infertility.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 278 - 282, 1994)

Introduction

There is no efficient remedy for idiopathic male infertility, but several kampo medicines, such as Hochu-ekki-to, Hachimi-jio-gan and Ninjin-yoei-to have recently been used in the treatment of such cases¹⁻⁶. Clinical data demonstrating the ability of these kampo medicines to improve total sperm density and motility have been reported¹⁻⁶. It is generally agreed that spermatozoa in many mammalian species achieve maturation, motility and fertile ability in the cauda

and corpus epididymis⁷⁻⁹). Maturation is a result of the translocation of certain factors such as glycoproteins secreted from the epithelium of the epididymal ducts to spermatozoa¹⁰⁻¹²). Therefore, in order to proceed the treatment of male infertility, it is important to study the effect of agents used to treat male infertility on epididymal function. It is also important to examine the effect of serum factors derived from digested kampo medicines, because all kampo medicines are administered orally. In this study, we investigated the effects of sera from male mice to which

kampo medicines had been administered, on protein synthesis in cultured hamster epididymal cells.

Materials and Methods

Preparation of animals

Hachimi-jio-gan (EK-7), Hochu-ekki-to (EK-41) and Ninjin-yoei-to (EK-108) were purchased from Kanebo Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Experimental chows containing kampo medicines were prepared by supplementing standard rodent chow CE-2 (Japan Clea Co., Tokyo, Japan) with 2% EK-7, EK-41 or EK-108 (specially prepared by Japan Clea Co.). Experimental chow or standard chow (CE-2, as a control) were given to male ICR mice aged 8 weeks. Mice were allowed free access to chow and water for 7 days before sacrifice. No difference could be seen in the body weights of mice between each experimental group before and after treatment. Blood samples were obtained from each of the 80 mice to which EK-8, EK-41, EK-108 or control chow was administered (20 mice in each agent). All sera were separated and heated at 56 °C for 30 minutes. Sera from 4 different mice were mixed and used for each experiment in order to eliminate any experimental variation. Culture medium supplemented with 10% mouse sera instead of fetal calf serum was used for these experiments. Male golden hamster aged 6 to 8 weeks were used for this experiment and were given F-2, a common hamster food (Funahashi-Nojyo Co., Chiba, Japan).

In vitro culture of hamster epididymal cells

Male golden hamsters were killed by cervical dislocation. The corpus and caudae epididymides were excised and the tissues were placed in phosphate buffered saline (PBS; Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) supplemented with 10% collagenase (Sigma Chemical Co., USA), and incubated at 32 °C in air for 60 minutes. The tissues were then transferred to fresh PBS, and gently swirled to dissociate the tubules from the remaining connective elements. The dissociated tubule fragments were transferred to fresh PBS, and cut into epithelial plaques 1 to 2 mm in length using 26 G needles and scissors. The spermatozoa were removed by washing several times with PBS and the epithelial plaques were transferred to 24-well multiplates (NUNC, Denmark) for culture. The culture medium was RPMI1640 (Nissui Pharmaceuti-

cal Co., Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal calf serum and 1 μ M sodium pyruvate, 100nM insulin, 200nM hydrocortisone, 200nM testosterone, 5 μ g/ml transferrin and 1 μ M/ml retinol. The cells were cultured under 5% CO₂ in air at 32 °C for 7 to 10 days, and were maintained by replacing the culture medium every other day. The cells were then detached from the bottom of the wells by PBS supplemented with 0.5% trypsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 0.02% EDTA (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and transferred to fresh medium. The medium containing the cultured epididymal cells was filtered by a cell strainer (FALCON, New Jersey, USA), and seeded into 96-well culture plates to give a final cell concentration of 1×10^5 /well. After incubation under 5% CO₂ in air at 32 °C for 48 hours, the culture medium was changed to RPMI1640 supplemented with 10% mouse sera instead of FCS and 1 μ Ci/ml [³H]-leucine, and the cells were further cultured for 20 hours. The cultured cells from each well were then collected onto glass-fiber filters by a cell harvester, and the radioactivity was measured by a liquid scintillation counter. This experiment was performed five times. In each experiment, four epididymides from two male hamsters and the mixed sera from 4 mice to which control or experimental chow was administered, were used and the radioactivity from five wells was measured for each experimental group.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The uptake of [³H]-leucine in each of the wells was compared by Two-way ANOVA, using commercially available software, Stat view SE (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA). Statistical significance was noted when the P value was <0.05.

Results

In vitro culture of hamster epididymal cells

Moore, et al. cultured hamster epididymal cells at 37 °C, and reported that epididymal cells became degenerate after 5 days of culture, the cause of which could not be elucidated¹²⁾. Therefore, we initially cultured epididymal cells at different temperatures from 28 °C to 37 °C to find the optimal temperature for in vitro culture. Epididymal cells developed rapidly in the culture at 37 °C and became confluent after 4 to 5

days, but were changed to fibroblasts after a few days. At 28 °C, development of epididymal cells was so slow that culture cells did not become confluent for 10 days (data not shown). At 32 °C, the cultured cells attached to the bottom of the wells for 24 hours, and proliferated from the initial tissue fragments. These cells exhibited the characteristic 'paving stones' appearance¹²⁾ and some of them contained fluid in their cytoplasm, which demonstrated their secretive ability (Fig. 1). This morphology was maintained for more than 9 ~ 10 days, until the experiment was completed. According to these results, the optimal

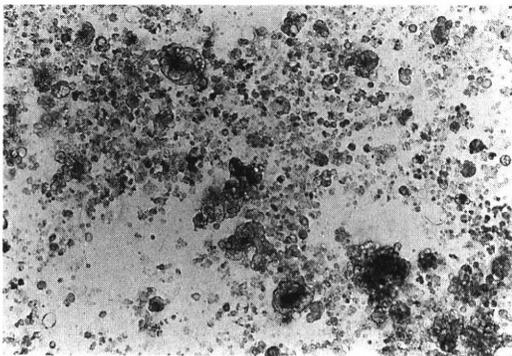


Fig. 1 A micrograph of epithelium from a hamster corpus and cauda epididymis 5 days after preparation

The epithelium is seen to exhibit the characteristic 'paving stones' appearance and some epithelial cells contained fluid in their cytoplasm, which demonstrated their secretive ability. (×200)

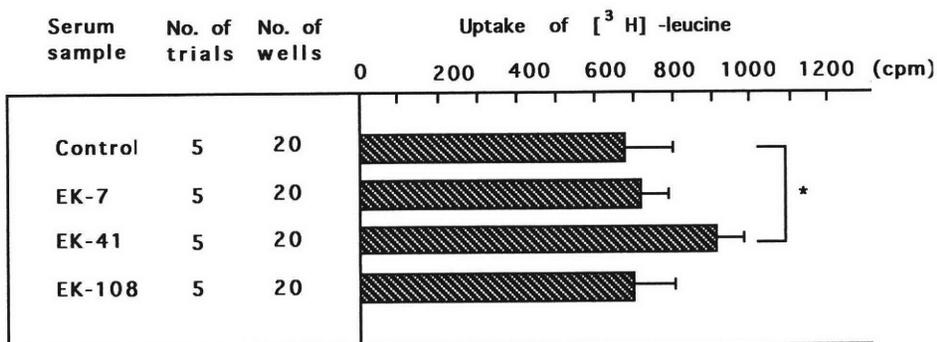
temperature for in vitro culture of hamster epididymal cells was thought to be 32 °C.

Effects of sera from mice to which kampo medicines were administered on protein synthesis in cultured hamster epididymal cells

The uptake of [³H]-leucine was significantly higher ($p < 0.05$) in cells cultured in the medium supplemented with sera from mice to which EK-41 was administered (896.7 ± 67.4 cpm), than in cells cultured with the control sera (694.2 ± 140.3 cpm; Fig. 2). There was no significant increase in the uptake of [³H]-leucine of the cells cultured with the sera from mice to which EK-7 or EK-108 was administered (733.0 ± 45.9 cpm or 712.8 ± 103.0 cpm respectively), compared to the cells cultured with control sera.

Discussion

Several traditional kampo medicines, especially, Hochu-ekki-to, Hachimi-jio-gan and Ninjin-yoei-to have been used clinically for the treatment of idiopathic male infertility in Japan. All these medicines have been reported to improve sperm motility and density in patients with oligozoospermia and asthenozoospermia^{1 ~ 6)}. Tamaya, et al.³⁾ and Ohota, et al.¹⁾ reported severe infertile male patients treated with Hochu-ekki-to, who experienced remarkable improvements in their oligozoospermia and/or asthenozoosper-



Values are mean \pm standard deviation (SD) for 5 experiments.

Fig. 2 Effects of kampo medicines on protein synthesis in cultured hamster epididymal cells
Epididymal epithelium of golden hamsters was cultured with RPMI1640 supplemented with 10% mouse sera and 1 μ Ci/ml [³H]-leucine for 20 hours. The cultured cells from each well were then collected onto glass-fiber filters by a cell harvester, and the radioactivity was measured by a liquid scintillation counter.

mia and succeeded in pregnancies. Shiina, et al.⁵⁾ also reported that combination therapy with Hachimi-jio-gan and Ninjin-to resulted in remarkable improvement in the fertility index of infertile males. Recently the mechanisms of these kampo medicines have been investigated^{14~19)}. Kataoka et al.¹⁵⁾ reported that TJ-41 activates macrophages and promotes the production of TNF, IL-2 and PGE2 from these activated macrophages, thereby producing increased cytotoxic activity. Hochu-ekki-to is also believed to prevent adriamycin-induced spermatogenic disorders in mouse testes¹⁷⁾. Ginseng Radix, a principle component of Hochu-ekki-to and Ninjin-yoei-to, is believed to promote the synthesis of DNA, RNA and lipids in the liver, myeloid cells and the testes^{14,15)}. However, kampo medicines, which are all composed of several different herbs, have different mechanisms of action which affect several portions in different ways and their clinical effects are also considered to be results not from the single particular element but from the all composed elements. So far, little is known concerning the basic mechanisms of action of kampo medicines in the therapy of male infertility.

Generally, the spermatozoa of many mammalian species develop their motility and fertile ability in the corpus and cauda epididymis^{7~9)}. The changes in the spermatozoa during this maturation period are thought to be the result of the translocation of proteins, secreted from the epithelia of the cauda and corpus epididymis^{10,11)}. Hoskins et al. reported that a glycoprotein secreted by principal cells in epididymis was implicated in promoting motility maturation changes in several mammals and designated it as forward motility protein¹²⁾. Therefore, it is important to elucidate the effect of kampo medicines, which improve the motility of spermatozoa, on protein synthesis in the corpus and cauda epididymal cells. Since all kampo medicines are administered orally, the effects of serum factors derived from digested kampo medicines on epididymal cells must be studied in order to yield more physiologically relevant data on the mechanism of action of kampo medicines.

Using hamsters, Moore, et al. co-cultured spermatozoa recovered from the caput epididymis with in vitro cultured epididymal epithelium and reported that a proportion of spermatozoa (30%) developed persis-

tent flagellum beats with slow progressive motility¹³⁾. They presumed that the maturation of spermatozoa was probably due to certain proteins secreted from cultured epithelium, which induce changes in the flagellum. In this study, we examined the factors responsible for promoting protein synthesis in the cauda and corpus epididymis, using the same in vitro culture system as Moore, et al., and found that the sera from mice to which Hochu-ekki-to were administered could promote protein synthesis. Considering these results, it can be hypothesized that Hochu-ekki-to promotes the synthesis of proteins involved in the functional maturation of spermatozoa in the epididymis.

However, the sera from mice to which Hachimi-jio-gan or Ninjin-yoei-to was administered did not promote protein synthesis in cultured hamster epididymal cells. These results suggest the possibility that these kampo medicines might have an effect not on epididymal cells but on other cells such as testicular cells, thereby improving sperm quality in male infertility. The combination of Hochu-ekki-to and Hachimi-jio-gan or Ninjin-yoei-to would then be more effective in the treatment of male infertility.

In this study, we decreased the in vitro culture temperature of epididymal cells to 32°C and were able to maintain good morphology for more than 10 days. Thus, this line of cultured hamster epididymal cells is useful as an in vitro model for studying epididymal function and evaluating the effects of any medicine used for the treatment of male infertility.

Acknowledgments

We thank Miss Chisato Yoneda, Miss Yumiko Tamura and Miss Atsuko Kitahara for their excellent technical assistances.

References

- 1) Ota H, Fukushima M, Kodama H, et al., Effects of Hotyu-ekki-to on the patients with oligospermia. *Jpn J Fertil Steril* 32: 624, 1987 (In Japanese)
- 2) Manabe F, Yoshii S, Ishikawa H, et al., Effect of Tsumura hochuekitoh on male infertility. *Jpn J Fertil Steril* 36: 683, 1991 (In Japanese)
- 3) Tamaya T, Ohno Y, Okada H, Treatment of hochuekki-to for oligospermic patients and implication of their clinical signs for therapeutic effi-

- cacy. *Jpn J Fertil Steril* 32: 385, 1987 (In Japanese)
- 4) Natsuyama S, Noda Y, Nonogaki T, et al., Effects of Hotyu-ekki-to on male infertility. *Jpn J Fertil Steril* 36: 843, 1991 (In Japanese)
 - 5) Shiina M, Sumi Y, Yoshimura S, et al., Clinical experience of Ninjinto and Hachimijogon for male infertility patients-especially regarding to the cases combined with AIH. *Jpn J Fertil Steril* 30: 303, 1985 (In Japanese)
 - 6) Ishikawa T, Zhongtao H, Manabe F, et al., Clinical effects of ninjinyoeito with keishibukuryogan on male infertility. *Jpn J Fertil Steril* 37: 180, 1992 (In Japanese)
 - 7) Hinrichsen MJ, Blaquier JK, Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 60: 291, 1980
 - 8) Horan AH, Bedford JM, Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. *J Reprod Fertil* 30:417, 1972
 - 9) Hoskins DD, Brandt H, Acott S, Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed Proc* 37: 2543, 1978
 - 10) Acott TS, Johnson DJ, Brandt H, et al., Sperm forward motility protein: Tissue distribution and species cross reativity. *Biol Reprod* 20: 247, 1979
 - 11) Brandt H, Acott TS, Johnson DJ, et al., Evidence for epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biol Reprod* 19: 830, 1978
 - 12) Hoskins DD, Johnson D, Brandt H, et al., Evidence for a role for a forward motility protein in the epididymal development of sperm motility. In: *The Spermatozoon*, P 43, Urban and Schwarzenberg, 1979
 - 13) Moore HDM, Hartman TD, Smith CA, In-vitro culture of epididymal epithelium and induction of sperm motility. *J Reprod Fert* 78: 327, 1986
 - 14) Oura H, Hiai S, Nakashima S, et al., Stimulating effects of the roots of panaxginseng on the incorporation of labeled precursors into rat liver RNA. *Chem Pharm Bull* 19: 453, 1971
 - 15) Oura H, Tsukada J, Nakagami H, Effect of radix ginseng extract on cytoplasmic polysome in rat liver. *Chem Pharm Bull* 20: 219, 1972
 - 16) Kataoka T, Akagawa KS, Tokunaga T, et al., Activation of macrophage with hochu-ekkito. *Jpn J Cancer Chemother* 16: 1490, 1989 (In Japanese)
 - 17) Sudo K, Fujii Y, A model of adriamycin-induced spermatogenic disorder in mice (2): improvement by application of Hachimi-jio-gan extract. *J Med Soc Toho* 38: 476, 1991 (In Japanese)
 - 18) Noda Y, Natsuyama S, Mori T, Effect of traditional herbal medicines on cultured hamster epididymal cells. *Jpn J Fertil Steril* 38: 262, 1993 (In Japanese)
 - 19) Natsuyama S, Mori T, Noda Y, The effects of ethical kanpos on the culture of hamster epididymal cells. *Jpn J Fertil Steril* 38: 269, 1993 (In Japanese)

漢方薬のハムスター精巣上皮培養細胞における蛋白合成促進作用について

京都大学医学部婦人科学産科学教室

中山貴弘 後藤康夫

夏山 知 森 崇英

滋賀医科大学産科学婦人科学教室

野田洋一

男性不妊症治療に使用されている3種の漢方薬、補中益湯(EK-41)、八味地黄丸(EK-7)、人參養榮湯(EK-108)の作用機序の解明のため、これらの漢方薬がハムスターの精巣上皮培養細胞の蛋白合成に与える影響について検討した。ハムスターの精巣上皮細胞の培養系を作成した。これに、漢方薬2%含有飼料を1週間摂取した8週齢雄マウスの10%血清入り培地と $1\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-leucineを加えた。20時間の培養後、培養細胞の [^3H]-leucine 取り込み量を測定した。この結果、EK-41含有飼料摂取マウスの血清添加培地のみにおいて有意に培養細胞の [^3H]-leucine 取り込み量の増加が認められた。以上より、EK-41のヒトにおける精子運動率の改善効果の作用機序の1つとして、精巣上皮細胞における精子の機能的成熟に関連する蛋白の合成促進作用を推察することが可能となった。またEK-7およびEK-108は、EK-41とは異なった作用機序を有することが示唆された。

(受付: 1994年1月21日)

(受理: 1994年3月18日)

Gossypolの精巢中DNA polymeraseに及ぼす影響

Effects of the Male Oral Contraceptive Gossypol on Testicular DNA Polymerases in Rat

大阪医科大学泌尿器科学教室

(主任：岩動孝一郎教授)

砺波博一

Hirokazu TONAMI

Department of Urology

Osaka Medical College, Takatsuki 569, Japan (Director: Prof. K. Isurugi)

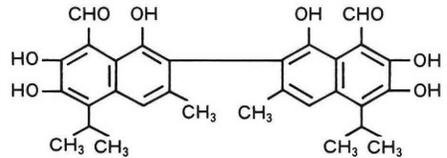
中国で発見された男性経口避妊薬Gossypolが造精機能に与える作用機序についてはまだ不明の点が多い。また、最近GossypolがDNA合成を抑制するという報告がみられ、抗癌剤としての可能性も検討されるようになってきている。そこで、Gossypol投与Ratを用いて、Gossypolが精巢中DNA polymeraseに及ぼす影響を調べた。RatにGossypol 40mg/kg/dayを21日間投与したところ、精巢中DNA polymerase α とDNA polymerase γ の酵素量に変化はなかったが、DNA polymerase β の酵素量が低下した。次にDNA polymerase反応に対するGossypolの直接作用を調べたところGossypolはDNA polymerase β とDNA polymerase γ の反応には影響を与えず、DNA polymerase α の反応を阻害した。このIn vivoおよびIn vitroでの結果から、Gossypolは精巢中DNA polymeraseに直接および間接に作用し造精機能に影響を及ぼしているものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 283 - 291, 1994)

緒言

Gossypol (Gossypol acetic acid: 以下GAAと略す)は中国で発見された綿実油の一種で、その服用により妊孕能力が低下することが知られており、中国ではすでに男性経口避妊薬として臨床応用も行われたこともある。本剤はGenus Gossypiumというゼニアオイ科の綿の実より抽出された黄色の物質(色素)で、その科学構造式は図1に示すごとく2基のアルデヒド基をもったフェノール誘導体である。

ヒトにGAAを投与すると、次第に精子の運動性低下と精子数の減少をきたし、最終的に無精子症となる。そしてこの効果は可逆的であることが知られている。しかし、その機序についてはまだ充分解明されていない。精子の運動能についてはGAAが精巢上体中での精子の運動能獲得を阻害するとの報告もある。しかし、Xue²⁾はGAA投与Ratでは精上皮中ですでに精細胞に組織学的な変化をおこしていることを報告しており、GAAは造精機能に何らかの影響を



[1, 1', 6, 6', 7, 7'-hexahydroxy-5, 5'-diisopropyl-3, 3'-dimethyl-(2, 2' binaphthalene)-8, 8'-dicarboxyaldehyde]

図1 Gossypolの構造式

及ぼしていると考えられる。Tsuiらは各種の培養細胞においてGAAはmitotic indexを減少させることを報告している³⁾。NordenskjoldとLambertはGAAがIn vitroでヒト線維芽細胞のDNA鎖を切断し、ヒトリンパ球のsister chromatid exchangeの頻度を増加させることを示した⁴⁾。さらにWangとRaoはHeLa細胞やChinese hamster ovary細胞の培養細胞を用いてGAAがDNAの合成を阻害することを報告し^{5, 6)}、KainzらはRat精巢の組織培養を用いた研究でGAAは精巢中の

DNAの合成を阻害することを示した⁷⁾。最近ではGAAが細胞の増殖をS期で止める性質があることから抗癌剤としての可能性についての報告も多くみられる⁸⁻¹³⁾。RosenbergらはHeLa細胞を用いた実験で、GAAがDNA合成に重要な役割をもつDNA polymerase α とDNA polymerase β の活性を抑制することを示した¹⁴⁾。しかし精細胞を用いてGAAがDNA合成にどのような影響を及ぼすかを詳細に検討した報告はまだない。またGAAは血清LH, testosteroneに影響を及ぼすことが知られているが⁵⁾、NagasakaとYoshida^{15, 16)}は精巢中DNA polymeraseがLH, testosteroneに制御されていることを報告している。そこで著者はGAAの精細胞に及ぼす影響が精巢のDNA polymeraseを介する精細胞中DNA代謝の抑制によるものではないかと考え、これを明らかにする目的でRatを用いてGAAが血清中LH濃度, testosteroneの濃度に与える影響と精巢中DNA polymerase α , β , γ に及ぼす影響をIn vivo, In vitroで検討した。

材料および方法

実験I. GAA投与Ratの精巢重量, 血清LHとtestosterone濃度および妊孕性に及ぼす影響に関する実験

実験材料: 実験動物として10週齢雄Wistar Ratを用いた。GossypolはGossypol acetic acid (GAA) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA. 純度98%以上)を使用した。

実験方法: GAAを100%エタノールで溶解し, 生理的食塩水で100倍以上に希釈, 均一化し, 最終濃度を100mg/mlとした。雄Wistar Ratに, 中国のNational Coordinating GroupやWallerらの投与方法に従って注射筒によりGAA 40mg/kg/dayを, 連日21日間, 経口投与した^{17, 18)}。対照群には1%エタノールを含む, 生理的食塩水を投与した。RatではGAA投与の有効量と中毒量が接近しているためGAA投与中週2回の体重測定を行った。投与直前に大腿静脈より採血し, 予定の投与が終了した後にエーテル麻酔下に採血し屠殺した。血液は採血後400×gで10分間遠心分離し測定まで-20℃で凍結保存した。

屠殺時に体重および右精巢の重量を測定した。血清LH濃度の測定はNIH提供のNIAMD anti rat serumを用い, 血清testosterone濃度の測定はミドリ十字社製の3Hテストステロンキットを用いてそれぞれRIA法にて二重測定した。

実験II. GAAの精巢中DNAおよびDNA polymerase α , β , γ に及ぼす影響に関する実験

実験材料: 抽出緩衝液として, 50mM Tris-HCl緩

衝液 (pH7.5) に10%グリセロール, 1mM Dithiothreitol, 1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 μ g/ml Leupeptin, 0.5% Triton X-100, 0.1mM EDTA, 0.5M KClを加えたものを用いた。DNA polymerase α の反応液として80mM Potassium phosphate緩衝液 (pH7.2), 8mM β -mercaptoethanol, 200 μ g/ml activated calf thymus DNA, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dGTP, 40 μ M dTTP, 1 μ Ci [³H] dTTP, 8mM MgCl₂の組成のものを用いた。DNA polymerase β の反応液として100mM Tris-HCl (pH8.8), 0.8 μ g poly (dA) (dT)₁₂₋₁₈, 80 μ M dTTP, 4mM N-Ethylmaleimide, 100mM NaCl, 0.5mM MnCl₂, 0.5 μ Ci [³H] dTTPの組成のものを用いた。DNA polymerase γ の反応液として100mM Tris-HCl (pH7.5), 0.8 μ g poly (rA) (dT)₁₂₋₁₈, 10mM Dithiothreitol, 40 μ M dTTP, 0.1M KCl, 0.5mM MnCl₂, 0.5 μ Ci [³H] dTTPの組成のものを用いた。DNA polymerase α の反応開始剤すなわち鋳型DNAの活性化はDNAase I, 2.5mg/ml Calf Thymus DNA, 10mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl₂の組成のものを37℃で25分間, さらに60℃で10分間保温したものを用いた。子牛胸線はWorthington Biochemical社製のもの, [³H] dTTPはDupont Nen Products製, Poly (dA) (dT)₁₂₋₁₈ (Base ratio of A/T = 5), およびPoly (rA) (dT)₁₂₋₁₈ (Base ratio of A/T = 5)はPharmacia社製を用いた¹⁹⁾。

実験方法: 酵素粗抽出液の調整: 実験Iと同様10週齢雄Wistar ratにGAA 40mg/kg/dayを21日間投与した後屠殺し, 右精巢を摘除した。その一部に1gあたり9mlの抽出緩衝液を加え超音波処理した。

3,000rpmで4分間遠心し, さらにその上清液を10,000rpmで2分間遠心した。その上清液を酵素液とした。

DNA polymerase活性の測定は, それぞれの反応液に酵素液を5 μ lずつ加え, DNA polymerase α は37℃で, DNA polymerase β , DNA polymerase γ は30℃で30分間それぞれ保温した。trichloroacetic acid 0.5mlを加えて反応停止後ガラスフィルターを通し, Liquid scintillation spectrometerで測定を行った。酵素活性の単位は1nmolのDNAの取り込みを触媒する量としている。Liquid scintillation spectrometerはPackard社製 (300型, S/N 31 955), ガラスフィルターはWhatman GK/B 2.4cmを用いた。これらの方法はYoshidaらの方法によった²⁰⁾。右精巢の一部を用いてSchneiderの方法²¹⁾により精巢中DNAの定量 (mg/g. tissue)を行った。左精巢を用いてLowryらの方法²²⁾で精巢中の蛋白の定量を行った。標準としてBovine Serum Albuminを用いた。

実験Ⅲ. In vitroにおけるGAAのDNA polymerase反応に及ぼす影響に関する実験

GAAは無水アルコールで溶解し、純水で100倍に希釈した。さらに100 μM, 10 μM, 1 μMに調整し、各DNA polymerase反応液中に2.5 μlずつ加えたものに無処理10週齢雄Wistar ratの右精巢を実験Ⅱと同じように処理して得られた酵素液を5 μl加えた。DNA polymerase αは37℃で30分間、DNA polymerase βとDNA polymerase γは30℃で30分間保温反応させ、停止後実験Ⅱと同じようにradioactivityの測定を行い、GAAを加えない反応と比較した。

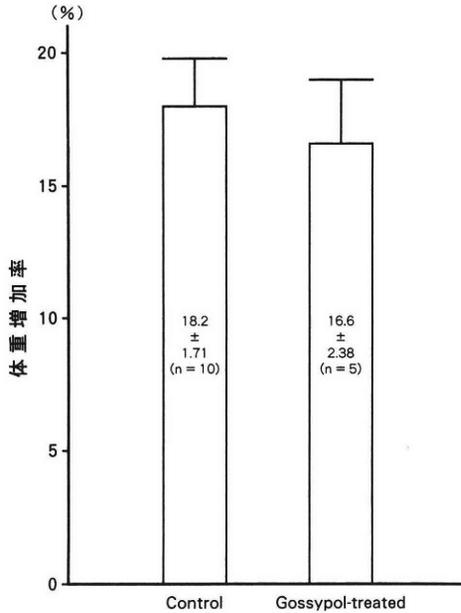


図2 体重の増加率

実験Ⅳ. GAAとDNAの相互作用についての実験

実験方法：Calf thymus DNA (Worthington社製)を10mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)で希釈し10mg/mlの濃度とした。GAAは無水アルコールで溶解した後、同じく10mM Tris-HClで希釈した。このCalf thymus DNAとGAAをモル比約10：1で混合し吸光度計(日立社製, 557-0032型)で吸光度を測定した。

結果

実験 I

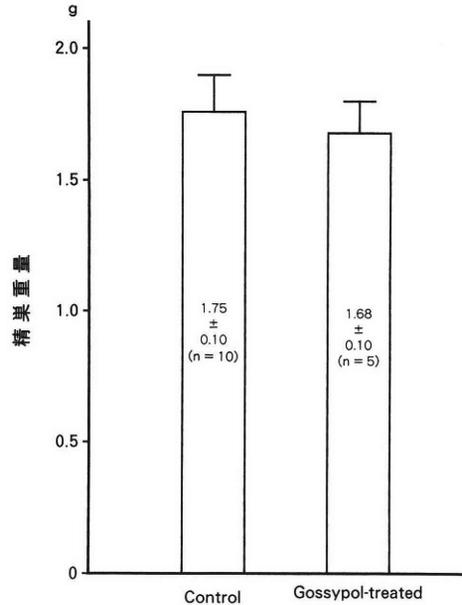


図3 Sacrifice時のGAA投与群とコントロール群との精巣重量

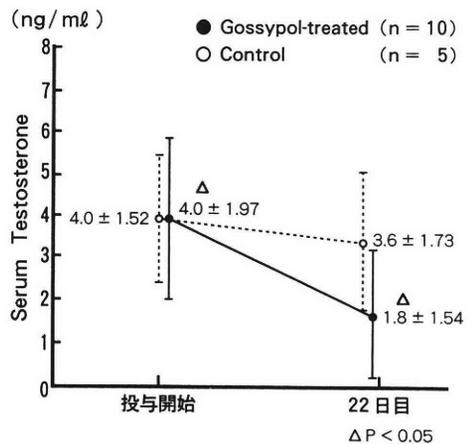
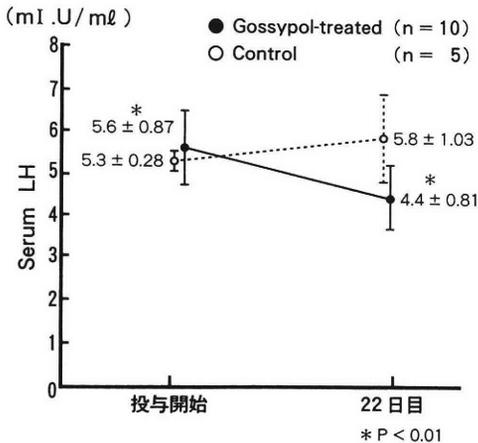


図4 40mg/kg投与群とコントロール群の血中LH, Tの変化

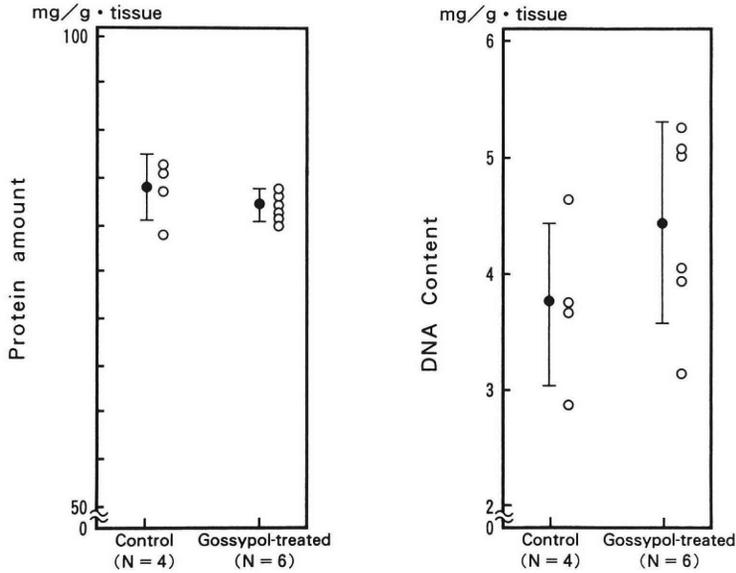


図5 Sacrifice時のGAA投与群とコントロール群との精巢内蛋白量とDNA量

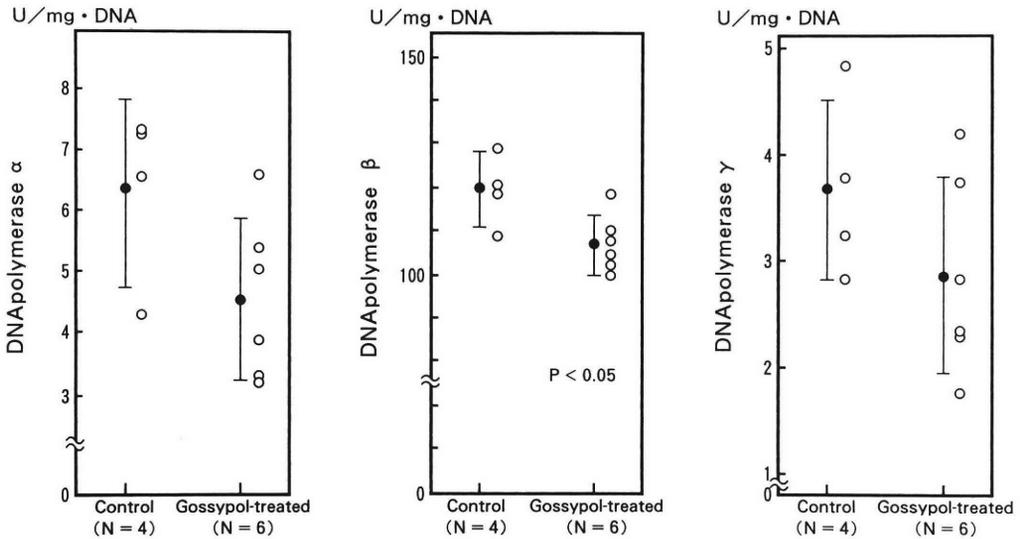


図6 Sacrifice時のGAA投与群とコントロール群とのDNA polymerase α, β, γの酵素量

実験経過中に死亡したRatは認められなかった。

- 1) 体重(図2)：投与群，対照群とも体重の平均値の低下は認めなかった。投与群は対照群に比べて体重増加率の平均値は低かったが有意な差ではなかった。
- 2) 精巣重量(図3)：投与群では対照群に比べてGAA投与後の精巣重量は低値を示すものの，有意差は認められなかった。
- 3) 血清LH濃度，血清testosterone (T)濃度(図4)：

GAA投与群では投与後，血清LH濃度が約20%低下し，血清testosterone濃度は約50%低下した。対照群では血清LH濃度，血清testosterone濃度とも投与前後では有意の変化はなく，投与群と対照群との間で投与後の血清LH濃度，血清testosterone濃度を比較すると投与群は有意に低値を示した(LH $P < 0.01$, testosterone $P < 0.05$)。

- 4) GAA投与Ratの避妊効果をみるために，屠殺したRatとは別に，GAA投与Ratと対照群Ratのそれぞれ

れ1匹と雌Rat 2匹ずつとをつがいにしたものを5組ずつ作り、1ヶ月半後に litter size を観察した。対照群での litter size 18.4 ± 3.8 匹に比べて、GAA 群では4組で出産を認めず、1組だけ2仔出産した。

実験II.

- 1) 蛋白量：GAA 投与群と対照群で有意差は認められなかったが、GAA 投与群の方がやや低い傾向がみられた(図5左)。
- 2) DNA 量：GAA 投与群の方が対照群よりやや高い傾向がみられたが有意の差ではなかった(図5右)。

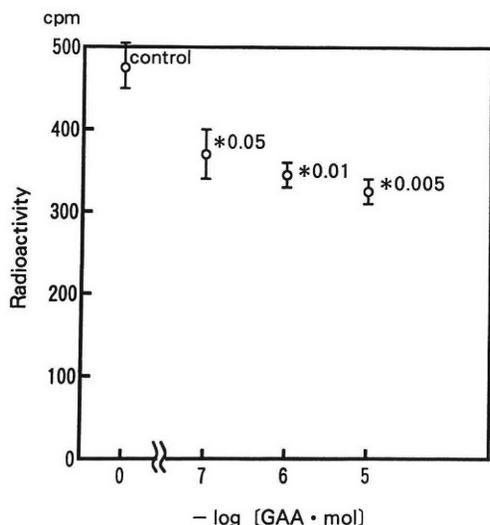


図7 In vitro におけるGAAのDNA polymerase α の活性に与える影響

3) DNA polymerase α ：GAA 投与群では対照群より酵素の活性量が低下しているが、有意差はなかった(図6左)。

4) DNA polymerase β ：GAA 投与群は対照群に比べて酵素の活性量が有意に低下していた ($P < 0.05$) (図6中)。

5) DNA polymerase γ ：GAA 投与群では対照群より活性量が低下していたが、有意な差ではなかった(図6右)。

実験III.

1) DNA polymerase α ：図7のように反応系に加えたGAAの濃度が高くなるにしたがってDNA polymerase α の活性が有意に低下する傾向がみられた(図7)。

2) DNA polymerase β ：図8のように、GAA 濃度 $10 \mu M$ でGAAを加えない反応系よりやや高くなり、 $1 \mu M$, $0.1 \mu M$ ではやや低下するもののいずれも有意な差は認められなかった(図8)。

3) DNA polymerase γ ：図9のように、GAAを加えてもGAAを加えない反応系と有意な差は認めなかった(図9)。

実験IV.

図10はCalf thymus DNA とGAAの混合液の吸光度を吸光度計で測定したものであるが、波長380nm (図▲)での吸光度がGAA 単独のものに比べて吸光度の増加がみられた。緩衝液を次の3種類A, B, C, つまり A: 50mM Potassium phosphate 緩衝液, B: 50mM

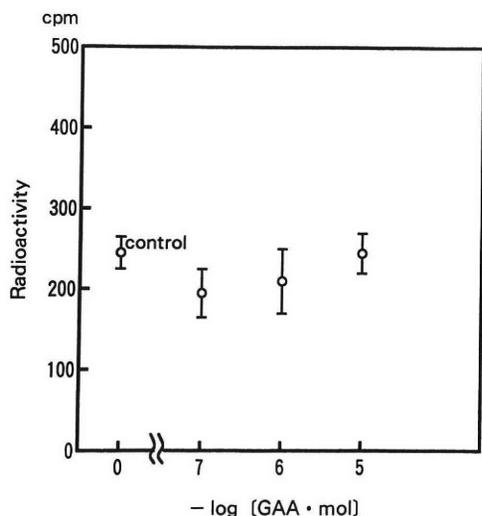


図8 In vitro におけるGAAのDNA polymerase β の活性に与える影響

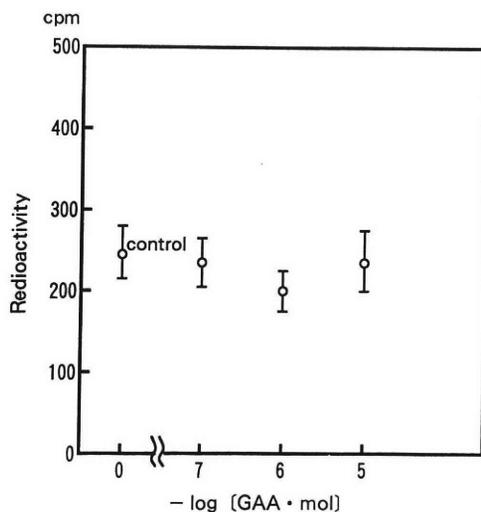


図9 In vitro におけるGAAのDNA polymerase γ の活性に与える影響

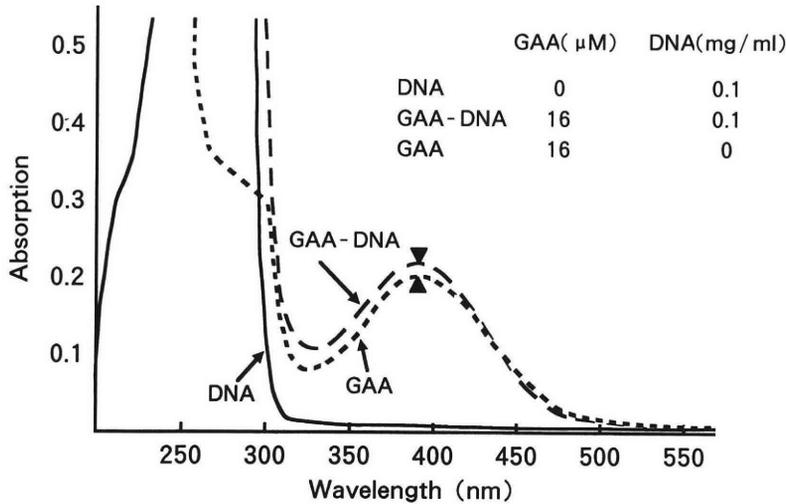


図10 GossypolのDNAに依存したスペクトル変化

Tris-HCl緩衝液 (pH7.5), 100mM Potassium Chloride, 1mM EDTA, C: 50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5), 100mM Potassium Chloride, 1mM EDTA, 10mM Mg Cl₂の組成のものにかえて同じように測定を行ったが緩衝液による影響は認められなかった。

考 察

1. GAAの有効投与量と中毒量

GAAをRatに投与すると、不妊となる有効量と食欲不振、嘔吐などを呈する中毒量が接近しているため体重の減少をみることもあるといわれている¹⁸⁾。しかし、今回我々の実験ではGAA投与で平均体重の減少はなく、体重増加率は対照群に比べて低下したが有意な差ではなかった。これまでの報告では、雄Rat有効投与量はGAA 15~40 mg/kg/dayを2~4週間投与するというものであり、この投与量では体重減少は認められないようである。また精巣重量に関しては我々の実験結果と同じく投与群と対照群とで有意な差はないとするものが多い^{23~25)}。

2. GAAの血清LHおよびtestosterone濃度に及ぼす影響

我々の実験で、雄Wistar RatにGAAを40mg/kg/dayを21日間投与したところ、血清LH濃度、testosterone濃度も有意に低下した。これまでの報告では、GAA投与は性ホルモンに影響しないとする報告もあるが²⁵⁾、性ホルモンを低下させるという報告が多い^{26~28)}。LiuらはRatにGAAを30 mg/kg/dayを6週間に投与し、血清LH濃度、血清testosterone濃度の低下を

みたが、この間Ratの体重も有意に減少したため、この性ホルモンの低下は、体重減少による二次的な現象によるものと述べている。我々の実験では投与期間中に有意な体重減少は認められず、血清LH濃度、血清testosterone濃度とも低下した。これはGAAは視床下部-下垂体系に働いて血清LH濃度を低下させ、Leydig細胞のtestosterone合成を抑制したもののかもしれない。一方、Leydig細胞のprimary cultureを用いた実験で、GAAが直接Leydig細胞に働きtestosterone合成を阻害することが示されており^{26,29)}、またさらに、精巣内testosterone生合成に関与する酵素をGAAが抑制することも報告されている^{23,24,30)}。

GAAの作用がLeydig細胞に対する直接効果のみであれば、negative feedback機序が働きLH濃度は高くなるはずである。我々の実験ではLH濃度も低下している点を考えると、GAAは下垂体のLH分泌細胞の機能を抑制する作用も有すると考えられる。すなわち、GAAは下垂体からのLH分泌抑制による間接的なLeydig細胞のtestosterone合成抑制とともに、直接Leydig細胞の機能を抑制すると考えられる。今回我々はGAAとFSHとの関係については検討しなかったが、これまでの報告ではGAAを投与しても血清FSH濃度は変化しないとする報告が多い^{23~25)}。

3. GAAの精巣中DNA polymerase α, β, γに及ぼす影響について

我々はlitter sizeによりGAAの避妊効果を見たが、もちろん血清testosterone値低下によるmountingの減少なども考慮すべきであった。しかし前にも述べた

ように、GAAの有効投与量はRatで15~40 mg/kg/day, 2~4週間であること²³⁻²⁵⁾, またGAA投与Ratにおける組織学的変化についても多くの報告があり, 光顕レベルではSpermatidに最初に変化があらわれ^{17,33)}, 投与量, 投与期間が増すごとにSpermatocyteからSpermatogoniaにまで変化があらわれるという。Udohら³¹⁾は最近, GAA 10mg/kgを5週間投与したWistar RatではSecondary spermatocyteで, 25 mg/kg投与ではSpermatogonia以外すべてのGerm cellに変化がみられたという。以上の文献による考察から我々の投与方法においてもGAAの避妊効果は発現されlitter sizeに反映したものと考えられた。そしてこの効果は, GAAにより精細胞のDNA合成が抑制され, これによって造精機能が障害されることによって起こる可能性があると考えた。つまり効果の発現を組織学的にではなく生化学的に確かめようとしたのである。そこでGAAのDNA合成に重要な働きをもつDNA polymerase α , β , γ に与える影響をRatを用いてIn vivoおよびIn vitroで検討した。

1) In vivoにおける検討

DNA polymeraseはこれまでのところ α , β , γ , δ およびTerminal transferase³²⁾の5種類存在することが知られている。精巣中のDNA polymeraseは90%以上が精細胞由来のものであるが, 特にDNAの修復に関与するDNA polymerase β の量は精巣では他の臓器よりも多く含まれている^{33,34)}。最近ではDNA polymerase β は減数分裂期の相同染色体組換え, もしくはその結果生じるDNA切断の修復に関与しているといわれ³⁴⁾, 精巣中の精子形成にきわめて重要な酵素と考えられている³⁵⁾。一方, NagasakaとYoshidaらは下垂体除去Ratを用いた実験で, 精巣中DNA polymerase β の発現量はGonadotropinおよびtestosteroneに制御されていることを示している¹⁵⁾。我々の実験ではGAA投与Ratでは対照群に比べて血清LH濃度および血清testosterone濃度が有意に低下し, また, DNA polymerase β の活性量も有意に低下した。このことからGAAはGonadotropinおよびtestosteroneを介してRat精巣中DNA polymerase β の活性量を低下させDNAの修復や組換えに影響を及ぼしている可能性があると考えられる。

DNA polymerase α はGAA投与群では対照群に比べて酵素量がやや低下するものの有意な差ではなかった。DNA polymerase α はDNAの複製に中心的な役割を演じている酵素である。精巣中は幹細胞であるSpermatogoniaのみがDNA polymerase α を含んでいるといわれている³⁶⁾。我々の結果ではGAA投与によ

ってDNA polymerase α の酵素量は低下する傾向はみられるものの有意の変化ではなかった。この様に精細胞のどの細胞周期にも恒常的に存在するDNA polymerase β に比べて, DNA合成期(S期)にのみ産生されるDNA polymerase α ³⁷⁾はGAAから受ける影響が少なかった。Rosenbergらの結果では10 μ MのGAAを加えてHeLa細胞を培養するとDNA polymerase α およびDNA polymerase β とも抑制されたという¹⁴⁾。我々の結果とこのような違いが生じたのは, 実験系の違いがあること, また我々はRatの正常精細胞を用いたのに対し, 彼らはヒトの体細胞系の腫瘍細胞を用いている点に違いが生じたものと考えられる。

ミトコンドリアでの複製に関与するDNA polymerase γ はHeLa細胞の結果と同じく有意な変化はみられなかった。このことからRosenbergらも述べているように¹⁴⁾GAAの作用がDNA polymerase α , およびDNA polymerase β に特異的であると考えられる¹⁴⁾。

2) In vitroにおける検討

GAAの精巣中DNA polymerase α , β , γ に対する直接的な作用をIn vitroで検討した。

In vitroの結果ではDNA polymerase α の反応のみがGAAの結合によって直接阻害された。さらにDNAとGAAの結合について自動吸光度計を用いて検討したが, DNAとGAAの混合液ではGAA単独のものより吸光度が増加した。このことからGAAがDNAに結合し, DNA合成の過程に影響を及ぼしている可能性が考えられる。GAAが芳香族環をもった分子構造を有することから, Adriamycinのように二本鎖DNA中の塩基間へ入り込み, DNA polymerase α の活性発現に影響を及ぼしているのかもしれない。ZaidiとHadiらも最近, S. nuclease hydrolysisとhydroxyapatite chromatographyを用いてGAAがDNAと結合することを示している³⁸⁾。我々のIn vitroでの結果ではGAA添加はDNA polymerase β およびDNA polymerase γ の活性には影響を及ぼさなかった。その理由としてこの実験ではDNA polymerase β とDNA polymerase γ の反応において反応液中の鋳型として一本鎖の人工polylnucleotideを用いている。一方DNA polymerase α の反応では二本鎖のDNAを鋳型として用いて測定していることが関係している可能性がある。つまりDNA polymerase β とDNA polymerase γ ではGAAとDNAと結合せずIn vitroの酵素反応に影響を与えなかったと考えられる。このことからIn vivoでの二本鎖DNAを鋳型とするような反応にはGAAはDNA polymerase α に対すると同じような影響をDNA polymerase β やDNA polymerase γ にも与える可能性があることは否定できない。

以上、In vivoでの結果をあわせて考えるとGAAはIn vivoではLH, testosteroneを介してDNA polymerase β の酵素量を低下させ、さらにはDNAと結合しDNA polymerase α の反応を抑制することによって精巢中のDNA代謝を阻害し、造精機能に影響を及ぼしているものと考えられる。

結 語

雄Wistar ratにGAA 40 mg/kg/dayを21日間経口投与することによって、血清LH濃度、血清testosterone濃度の変化を調べた。血清LH濃度、血清testosterone濃度は有意に低下した。GAA投与Ratでは精巢中DNA polymerase β の活性量が低下した。これはGAA投与による血清LH濃度、血清testosterone濃度の低下による二次的な結果と考えられた。DNA polymerase α , DNA polymerase γ は変化が認められなかった。GAAのDNA polymerase反応に対する直接効果はDNA polymerase α のみに認められた。これはGAAがDNAと結合しDNA polymerase α の働きを阻害するためにおきた可能性があると考えられた。以上の結果からGAAはDNA polymeraseに直接および間接的に作用し精巢中のDNA合成に影響を及ぼし、造精機能障害をきたすものと考えられた。

稿を終るにあたり、本研究の御指導ならびに御校閲を賜った恩師岩動孝一郎教授に深く感謝の意を述べるとともに直接実験の御指導を頂いた高崎登助教授、畠山和幸博士に深謝致します。

本論文の要旨は第5回国際アンドロロジー学会にて発表した。

文 献

- 1) Liu GZ, Clinical study of gossypol as male contraceptive. *Reproduction* 5: 189, 1981
- 2) Xue SP, Studies on the antifertility effect of gossypol, a new contraceptive for males. Symposium on recent advances in fertility regulation, Beijing, P2, 1980
- 3) Tsui YC, Creasy MR and Hulten MA, The effect of the male contraceptive agent gossypol on human lymphocytes in vitro: traditional chromosome breakage, micronuclei, sister chromatid exchange, and cell kinetics. *J Med Genet* 20: 81, 1983
- 4) Nordenskjold M and Lambert B, Gossypol induces DNA strand breaks in human fibroblasts and sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro. *J Med Genetics* 21: 129, 1984
- 5) Wang YC and Rao PN, Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian cell in vitro. *Cancer Res* 44: 35, 1984
- 6) Rao PN, Wang YC, Lotzova E, et al., Antitumor effect of gossypol on murine tumors. *Cancer Chemotherap Pharmacol* 15: 20, 1985
- 7) Kainz p, Nussbaumer V, Frick J, et al., Effect of gossypol on macromolecular synthesis in rat testis. An in vitro study. *Contraception* 31: 151, 1985
- 8) Tuszyński GP and Cossu G, Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. *Cancer Res* 44: 768, 1984
- 9) Molla MR, Yoshiga K and Takeda K, Influence of 5-hydroxytryptamine on the combination effect of lonidamine or gossypol and hyperthermia on Ehrlich tumour in vivo. *Anticancer Res* 7: 361, 1987
- 10) Wu YW, Chik CL and Knazek RA, An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13 adrenocortical carcinoma. *Cancer Res* 49: 3754, 1989
- 11) Band V, Hoffer AP, Band H, et al., Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive cancer cell lines. *Gynecologic Oncology* 32: 273, 1989
- 12) Ford JM, Hait WH, Matlin SA, et al., Modulation of resistance to alkylating agents in cancer cell by gossypol enantiomers. *Cancer Letters* 56: 85, 1991
- 13) Thomas M, Hagen V, Moustafa Y, et al., Effect of gossypol on the cell cycle phases in T-47D human breast cancer cell. *Anticancer Res* 11: 1469, 1991
- 14) Rosenberg LJ, Adlakh RC, Desai DM, et al., Inhibition of DNA polymerase α by gossypol. *Biochim Biophys Acta* 866: 258, 1986
- 15) Nagasaka A and Yoshida S, Regulation of DNA polymerase β in rat adrenal gland by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 111: 1345, 1982
- 16) Nagasaka A and Yoshida S, Hormonal regulation of deoxyribonucleic acid polymerase β activity in rat testes. *Endocrinology* 115: 1110, 1984
- 17) National Coordinating Group On Male Antifertility Agents (China). Gossypol-a new antifertility agent for males. *Gynecol Obstet Invest* 10: 163, 1979
- 18) Waller DP, Niu X and Kim, Toxicology and mechanism of action of gossypol. In: Male contraception-advances and future prospects, Zatučni GI, Coldsmith A, Spieler JM et al eds, P2, Harper and Row publishers, 1986
- 19) Fujisawa M, Kojima K, Yoshida S, et al., Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility* 50: 795, 1988
- 20) Yoshida S, Kondo T and Ando T, Multiple molec-

- ular species of cytoplasmic DNA polymerase from calf thymus. *Biochim Biophys Acta* 353: 463, 1974
- 21) Schneider WC, Phosphorus compounds in animal tissues III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J Biol Chem* 164: 747, 1946
 - 22) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265, 1951
 - 23) 原田宏行, 雄性ラットにおけるGossypolの下垂体-睾丸系におよぼす影響について. *西日泌尿* 49: 1425, 1987
 - 24) 馬場良和, Gossypol投与下雄性ラットに対するHCG負荷の影響について. *泌尿紀要* 34: 643, 1988
 - 25) Kalla NR, J-Foo TW and Sheth AR, Studies on the Male Antifertility Agent-Gossypol Acetic Acid. V. Effect of gossypol acetic acid on the fertility of male rats. *Andrologia* 14: 492, 1982
 - 26) Hadley MA, Lin YC and Dym M, Effect of gossypol on the reproductive system of male rats. *J Androl* 2: 190, 1981
 - 27) Lin YC, Harley MA, Klingener D, et al., Effect of gossypol on the reproductive system of male rats. *Biol Reprod* 22 (Suppl.1) Abstr, p95a, 1980
 - 28) Chang C, Gu Z and Tsong Y, Studies on gossypol. I. Toxicity, antifertility, and endocrine analyses in male rats. *Int J Fertil* 27 (4) : 213, 1982
 - 29) 星合 昊, 上原茂樹, 長池文博 他, 男性用経口避妊薬Gossypolの基礎的研究II: In Vivo Study (Leyding Cell). *日本不妊学会雑誌* 27: 156, 1982
 - 30) Waller DP, Fong HHS, Cordel GA, et al., Antifertility effects of gossypol and its impurities on male hamsters. *Contraception* 23:653, 1981
 - 31) Udoh P, Patil DR, Deshpande MK, Histopathological and biochemical effects of gossypol acetate on pituitary-gonadal axis of male albino rats. *Contraception* 45: 493, 1992
 - 32) 松影昭夫, 動物細胞DNAポリメラーゼ α と β . *細胞* 21 (3) : 22, 1989
 - 33) 山口政光, 広瀬富美子, DNAポリメラーゼ β 遺伝子の発現調節とその生理的意義. *蛋白質 核酸 酵素* 33: 1169, 1988
 - 34) 松影昭夫, マウス細胞におけるDNAポリメラーゼ β の発現調節. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 62: 1670, 1988
 - 35) Grippo P, Geremia R, Locorotondo G, et al., DNA-dependent DNA polymerase species in male germ cell of the mouse. *Cell Differ* 7: 237, 1978
 - 36) Kusakabe M, Sakakura T, Nishizuka Y, et al., Polyester wax embedding and sectioning technique for immunohistochemistry. *Stain Technology* 59: 127, 1984
 - 37) 坂口謙吾, 姉妹染色分体交換と減数分裂期染色体組換えは異なるDNAポリメラーゼ系を使用する. *蛋白質 核酸 酵素* 32: 1321, 1978
 - 38) Zaidi Z and Hadi SM, Interaction of gossypol with DNA. *Toxic, In vitro* 6 (1) : 71, 1992
 - 39) Ye WS, Liang JC and Hsu TC, Toxicity of a male contraceptive, gossypol, in mammalian cell culture. *In vitro (Rockville)* 19: 53, 1983

Effects of the male oral contraceptive gossypol on testicular DNA polymerases in rat

Hirokazu Tonami

Department of Urology

Osaka Medical College, Takatsuki 569, Japan

(Director: Prof. K. Isurugi)

The effects of gossypol (GAA), a male oral contraceptive, on the testicular DNA polymerase activity in male Wistar rats were studied. GAA was administered orally at a dose of 40mg/kg/day for 21 consecutive days, and the serum LH and testosterone concentrations were measured. LH and testosterone values showed significant decreases after GAA administration. The amount of DNA polymerase β in the testis was reduced after GAA administration, but no significant changes in the amounts of DNA polymerase α or DNA polymerase γ were found. The level of testicular DNA polymerase β is considered to be under control of LH and testosterone, and it is possible that the decrease in the amount of DNA polymerase β is a secondary effect of the reduction in serum concentrations of LH and testosterone. The direct action of GAA on the DNA polymerases was studied in vitro. In vitro, GAA reduced the reaction of DNA polymerase α , but not those of DNA polymerase β and γ . Spectrophotometric studies suggested that GAA binds with DNA, thereby inhibiting the reaction of DNA polymerase α . These results indicated that GAA has both direct and indirect action on DNA polymerases and affects the DNA synthesis during spermatogenesis.

(受付: 1993年12月24日)

(受理: 1994年3月22日)

Gn-RH agonist (buserelin) 経鼻噴霧による排卵誘発 —clomid-buserelin併用療法の試み—

An Ovulation Induction in Women with Clomiphene-Citrare-Resistant Amenorrhea by Intranasal Spray of Diluted Gn-RH Agonist (Buserelin) Combined with and without Clomiphene Citrate

滋賀医科大学産科学婦人科学教室

竹中 章 須戸 龍男 山出 一郎
Akira TAKENAKA Tatsuo SUDOH Ichirou YAMADE

高橋 良樹 野田 洋一
Yoshiki TAKAHASHI Youichi NODA

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

曾我産婦人科

曾我 洋士
Hiroshi SOGA

Soga Maternity Clinic, Kyoto, Japan

Gn-RH agonist (Gn-RHa) は、gonadotropinの放出作用を有し、本来排卵誘発が可能のはずであるが、Gn-RHaを市販されている標品のままの濃度で経鼻噴霧を行うと、速やかにdown-regulation (DR)が成立するため、直接的な排卵誘発には使用し難い。今回、DRの成立を回避する目的で、Gn-RHa (buserelin: BS)を1/2～1/4に希釈し、clomiphene citrate (CL)による排卵誘発が不成立であった婦人24例、71周期で排卵誘発を試みた。CL100～150mg/day 5日間の服用終了の次日より、またはCLの投与なく月経周期2～12日目より、希釈BSの投与を開始し、成熟卵胞が超音波断層法で確認されるまでの4～14日間経鼻噴霧を行った。さらに、卵胞成熟を確認した日よりhCG 5000i.u.を2日間筋注することで、以下の成績を得た。

- 1) BSを単独使用した時で46% (10/22周期)に、またCLをBSの噴霧前に併用した場合で75% (36/49周期)に排卵誘発が可能であった。
- 2) BSを1/2希釈 (225 μ g/day)で使用した場合、排卵誘発率は79.6%となり、1/4希釈 (112.5 μ g/day)での45.5%よりも高い誘発率となった。
- 3) 排卵成功周期での、血中FSH値は、治療開始前値に比べ有意に上昇したが、LH値には有意の変動を認めなかった。
- 4) 希釈BS噴霧による排卵誘発時には、LH-surgeが起こり難いことが推測された。

以上から、CL+希釈BS+hCG療法は、CL無効の無排卵症に有効と考えられ、患者負担の軽減に貢献することが期待された。

緒 言

無排卵症の症例で、CLが無効であった場合、hMG-hCG療法を行うことになる。しかし、hMG-hCG療法は連日の筋注を必要とし、患者負担は決して軽いものではない。このため、患者負担が軽減できる排卵誘発法の開発は、当然望まれることである。

Gn-RHaは、現在子宮内膜症および子宮筋腫の治療剤として、またhMG製剤と併用してIVF-ET時の排卵誘発として用いられていることは周知のことである。

Gn-RHaは、下垂体を刺激し、LH、FSHの分泌を促す。しかし、排卵誘発に用いられる場合、pulsatileに投与しないと効果が少ないとされるため、皮下注用pumpの装着によりpulsatile投与せざるを得ない^{1,2)}。このことから、現在Gn-RHaは大量を継続的に経鼻投与しdown-regulation (DR)を起こさせ、gonadot-opin (Gn)の減少と、これに引き続いて起こるestrogenの低下を利用することに主眼がおかれている。しかし、Gn-RHaはDRの成立が避けられれば、原理的には排卵誘発が可能と考えられる。

今回、CL無効の無排卵症婦人24例に対して、DRの成立を回避するためにGn-RHa (BS)を希釈して使用し、hMG製剤を使用することなく排卵誘発が可能であった。またCLと希釈BSを併用することにより排卵成功率が大幅に改善されることが明らかとなったので報告する。

対象および方法

1988年7月より滋賀医科大学産婦人科外来を受診した患者のうち、4カ月以上の無月経または原発性無月経を訴え、なおかつ100~150mg/日のCL投与で2周期連続して排卵誘発無効であった16~37歳(平均年齢30.7±8.1歳: mean±SD)の婦人24例・71周

期を対象とした。全例、本療法に対する同意を得たものである。そのうち未婚者は7例で、3例の間脳・下垂体性原発性無月経を含む。他14例は挙児希望があり、そのうち2例は夫に重度の乏精子症がある。

全例で、治療開始前に血中estradiol (E₂), testosterone, progesterone (P), TSH, freeT₃, freeT₄を測定し、月経周期5~10日目にdouble testの形でLH-RHとTRH loading testを行った。LH-RH loading testの結果から、症例は低Gn性、正Gn性および高Gn性の3群に分類した。すなわち、負荷後極大のLH値が15mU/ml未満を低Gn性、45mU/ml以上を高Gn性、15~45mU/mlのものを正Gn性と分類した。内訳は表1のとおりである。また、負荷前値のprolactin (PRL)値が15ng/ml以上の高(PRL)血症および負荷後15分後のPRLが80ng/mlを越える例では、bromocriptin 1.25~2.5mg/dayを連日投与し、またTSH値が5.0 μ U/ml以上で潜在性の甲状腺機能低下が疑われる症例では、thyradin-S 1 Tab./dayを投与し、PRLおよびTSHを正常化した後、CL 100~150mg/day 5日間の経口投与で2周期排卵誘発を試みた。月経周期21日目で超音波断層法上10mm以上の卵胞が認められない時を、CL無効として、次周期BSの噴霧による排卵誘発を行った。12日間の混合女性ホルモン剤norlutin D 1 (2 T/day)の内服により消退出血を起こした後、BSによる最も効果的な投与方法の確立を目指す目的で、CL併用か、単独使用のどちらが効果的か、噴霧開始の時期、期間について各種のprotocolにより検討を行った。図1に各protocolの方法と投与症例数、周期数および排卵成功率を記載した。CL併用周期での投与量は、排卵不成立の前周期と同量とし、噴霧用BSは注射用生食で1/2~1/4に希釈の上、0.45 μ のmilli-pore filterを通し、滅菌済み専用噴霧容器(ヘキストジャパン社の提供による)中に保存した。なおBSの希釈により、力価

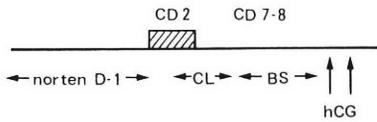
表1 対象症例数とbuserelinによる排卵誘発を試みた時の排卵誘発成績を示すどの型の無月経症例にもほぼ同様の排卵誘発率を示すが、単独使用よりCL併用例での成績が有意に高い。対象例の分類は、LH-RH負荷試験のLH値による。

	症例数	排 卵 成 功 数	
		buserelin+hCG	clomid+buserelin+hCG
1. 高gonadotropin性	8例(19周期)	2/4例(2/4周期)	6/8例(10/15周期)
2. 正gonadotropin性	6例(16周期)	1/3例(2/5周期)	4/5例(7/11周期)
3. 低gonadotropin性	10例(36周期)	6/10例(6/13周期)	9/10例(19/23周期)
総計	24例(71周期)	9/17例(10/22周期: 45.5%)	19/23例(36/49周期: 73.5%)

総有効率=64.8% (46/71周期: うち、妊娠成立周期4周期)

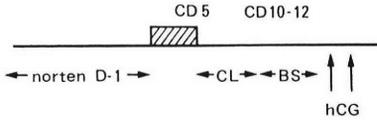
p<0.05; χ²検定: Yatesの修正

1) 消退出血後2日目より clomid → 7-8日目より buserelin



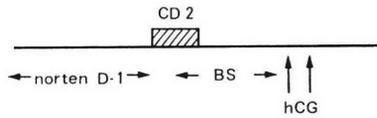
排卵成功率 84.6% (11/13例)
69.2% (18/26周期)

2) 5日目より clomid → 10-12日目より buserelin



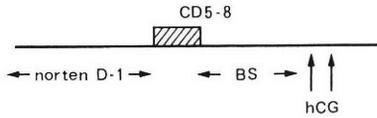
排卵成功率 84.6% (11/13例)
78.3% (18/23周期)

3) 2日目より buserelin



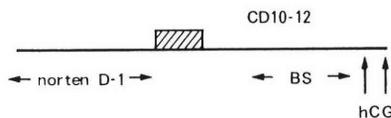
排卵成功率 40% (2/5例)
42.8% (3/7例)

4) 5-8日目より buserelin



排卵成功率 57.1% (4/7例)
50% (5/10周期)

5) 10-12日目より buserelin



排卵成功率 28.6% (2/7例)
40% (2/5周期)

図1 試みられた各種 protocol と、その成績を示す

月経周期5日目より clomid を投薬し、服薬終了後より希釈 buserelin の噴霧を開始した時が最も成績が高い。

の減弱や患者に発生した副作用等はなかった。

希釈BSの噴霧は、片鼻に一日3回行い、超音波断層法上の主席卵胞径が20mmを越えた時点で原則的にhCG 5000単位を1~2日間筋注し、注射3~4日後に基礎体温の上昇および超音波断層法で排卵の有無を確認した。さらに、基礎体温上の排卵日から7日目に血中PおよびE₂の測定を行った。

hCGの筋注で基礎体温の上昇が見られない場合および噴霧開始後14日目で主席卵胞径が10mmを越えない周期は無効周期とした。なお、LH、FSH、PRLの測定は第1ラディオアイソトープ社製SPAC-Sキットを、またE₂およびPはCIS社製、free T₃、free T₄およびTSHについては、各々栄研社、トラベノール社およびヘキスト社製のRIA-kitを使用した。

成績

表1にLH-RH loading testにより分類した3型の無排卵症の症例数と各々の排卵誘発の成功率を、BS単独噴霧療法とCL併用噴霧療法に分けてその成績を総括した。希釈BS療法は、その原因を問わずどの型の無月経にもほぼ同様の排卵率を示す。またCL併用例での排卵成功率は73.5%に達するのに比べ、単独使用例では45.5%に留まり、統計学的にも有意差を認める(P<0.05: χ^2 検定; Yatesの修正)ことからCL併用療法の優位性が示された。

図1に各protocolごとの排卵成功率を併記したが、ここでもCL併用例での成功率が高い。

表2に全症例での排卵誘発成績をhMG-hCG療法と

表2 治療全周期での成績を示す

希釈buserelin単独では排卵誘発に失敗し, clomidの併用で排卵に成功する例が存在する. preg.の注記は, 妊娠成立を示す.

name	age	hMG-hCG		Gn-RHa+hCG		colomid+Gn-RHa+hCG	
		ov./induction	%	ov./induction	%	ov./induction	%
A. H	32	13/13	100	1/1	100	2/2	100
O. S	29					1/1	100
K. K	32	2/3	67	1/1	100	3/4	75
K. Y	28	1/1	100	2/2	100	3/4	75
K. S	29					1/2 preg.	50
S. Y	38	3/3	100	0/1	0	1/1	100
T. Y	31	1/2	50	0/1	0	1/1	100
T. A	30	3/3	100	0/1	0	1/1	100
N. K	31					2/2	100
N. Y	28			1/1	100	3/3	100
H. H	27	1/1	100	0/1	0	0/2	0
H. T	24	2/2	100	1/1 preg.	100	1/1	100
H. K	32	5/5	100	1/2	50	3/5	60
H. A	26	0/1	0			0/1	0
Y. S	35	2/2	100	0/1	0	4/4	100
S. K	34	1/1	100	0/1	0	2/2 preg.	100
Y. K	32	2/2	100	1/1	100	1/1 preg.	100
M. Y	36	1/1	100	0/2	0	1/1	100
A. M	16			1/2	50	3/4	75
O. J	27	0/1	0			0/1	0
K. N	27	1/1	100			1/1	100
H. K	18			1/2	50	0/1	0
Y. A	22			0/1	0	1/2	50
H. N	20					0/2	0
total		38/42	90.5	10/22	45.4	36/49	73.5

比較し総括した. 単独のBS噴霧では排卵誘発に失敗し, CL併用で排卵に成功する例が存在することが示される. なおBSの経鼻噴霧期間は, 排卵成功例で最短4日間, 最長14日間, 平均噴霧期間は8.00±3.40日(M±SD N=43)であった.

表3に噴霧BSの使用量およびCL併用の有無と排卵成功率との関係を示した. CL併用の2例2周期は, 1/3希釈のBSを使用したため, 表3の統計より

表3 buserelinの一日使用量と成績の関係を示す
225 μg/dayでの成績が良く, 112.5 μg/dayの単独使用では, 成績が低い. CL併用例が, 単独使用例より有意に排卵率が高い.

	単独使用	clomid併用
225 μg/day	52.9% (9/17周期)	84.6% (33/39周期)
112.5 μg/day	20% (1/5周期)	60% (6/10周期)

削除した. CLを併用し225 μg/dayとした時の成績が最も良い. 225 μg/dayの使用では, 統計学的にも有意にCL併用例で排卵率が高いことが示される (P<0.05: Yatesの修正). CL使用と単独使用のいずれにおいても, 225 μg/dayの使用成績が112.5 μgの使用成績を上回った. 112.5 μgの単独使用例での排卵成功率は20%に過ぎないが, 112.5 μgの使用例数が少なく, 2群の間に統計的な有意差は認められなかった.

表4に排卵成功例での噴霧終了時, つまりhCG切り替えの時点での径20mm以上の卵胞数およびBS噴霧に要した日数およびこの時点での血中E₂値を示した. CL併用例でBS単独使用例に比べ, 卵胞発育数は多い傾向にあり (P<0.10), 血中E₂は有意に高い (P<0.05: いずれもT検定) が, 所要噴霧日数には差は見られなかった.

血中LHおよびFSH値の治療前とBS噴霧後hCG切

表4 排卵成立周期での卵胞発育数とhCG切り替えまでに要したbuserelin噴霧日数およびこの時の血中estradiol値を示す

	発育卵胞数 (径20mm以上)	希釈buserelin噴霧期間 (days)	血中estradiol (pg/ml)
単独使用	1.76 ± 0.79 (N = 9)	8.80 ± 4.51 (N = 10)	172.0 ± 58.2
clomid使用	2.97 ± 1.79 (N = 31)	7.76 ± 3.20 (N = 33)	491.1 ± 278.5

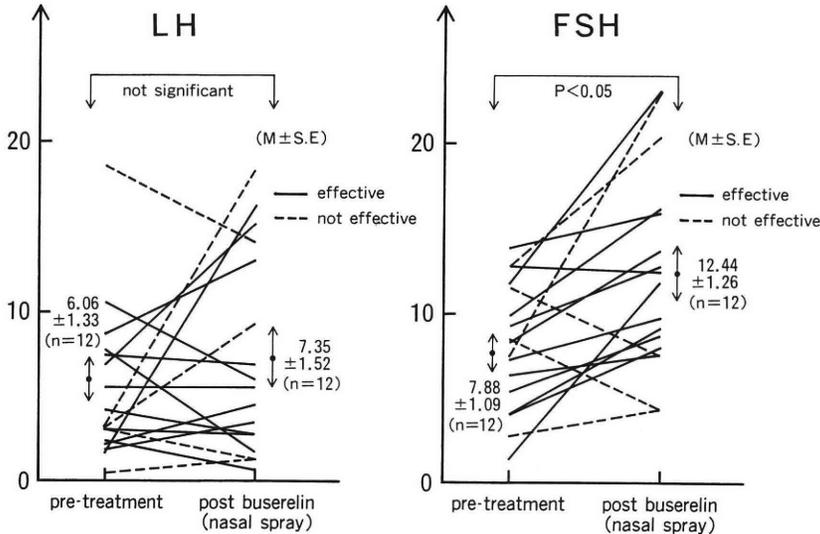


図2 治療前とhCG切り替え時点での、血中LHおよびFSH値の変化を示す
FSHは統計的に有意に増加したが、LHは有意の変化が見られなかった。縦軸の単位はいずれも、 μ U/ml.

り替え時点での比較は図2に示した。単独使用例での測定例数が少なく全protocolでの成績を図示した。排卵成功例でのFSHはBS噴霧後、7.88より12.44 mIU/mlに統計学的に有意の上昇を示した($P<0.02$)。これに反し、LHの変動は明らかではなく、一定の傾向を認めなかった。

排卵成功例の血中P値は平均 20.5 ± 6.9 ng/ml、 E_2 値は 410.5 ± 190.1 pg/ml ($M \pm SD$ N=14)と十分な値を示したが、血中P値が測定出来た14周期のうち2周期には、5ng/ml以下の明らかな黄体機能不全周期も存在した。

今回の検討では、十分な発育卵胞が見られた時点で原則的にhCGを筋注したが、3症例3周期でhCGの筋注なく自然に排卵が見られた例があった。しかし、排卵後の血中P値は、おのおの3.9、8.6、10.7 ng/mlと比較的低い値となった。一方、十分な卵胞成熟を認めたがhCGの筋注を行えず、排卵が不成立の症例も2例3周期で存在した。

表2のpreg.の注記を付した例は妊娠成功例であり、単独使用で1例、またCL併用で3例で見られた。併

用例の一例は双胎児であり帝王切開により出生し、生下時体重が2,572gおよび2,088gで、一児がSFDであったが、他にSFD児および先天奇形児も認められず、出生時apgar scoreは全例9点以上であった。

なお、単独噴霧療法により次周期CLが有効となるとの報告があるため⁴⁾、BS噴霧療法での初回誘発時の成績を見たが、単独使用例で28.7% (2/7周期)、CL併用例で70% (7/10周期)となり、例数が少なく有意差は認めないが、成績は、やはりCL併用での有効率が高く、protocol間の順序よりCL有効率が高くなったとは考え難い。

考 察

現在のBS経鼻噴霧の使用は大量を継続的に使用し、下垂体にDRを成立させることに治療応用が限定されている。しかし、BS噴霧の初期には、flare-up現象と呼ばれるGnとestrogenの急激な上昇が見られる。本来、pulsatileに投与されないと、効果を示さないはずのBSが、なぜ経鼻噴霧では、初期のGnの分泌刺激をもたらすかは不明である。しかし、この事

実はBSの経鼻噴霧による排卵誘発の可能性を物語るものと考えられる。事実、BSによるDRの成立を避ける目的で、BSの低用量を経鼻噴霧して直接的に排卵誘発に使用する試みは、比較的早期からなされている^{3,6-10)}が、一般的には良い成績とは言えないとされる⁹⁾。近年では、90 μ g/dayのBS噴霧を用いた武内らも、低用量でも下垂体のdesensitizationが起こる例があり、排卵は14例中1例も認めないと報告している³⁾。

今回の報告は、我々が1990年度よりこれらの報告とは別に独自に試みてきたものであり、当初からCL-hMG-hCG療法におけるhMG製剤筋注の代用として計画され、1992年に最初の妊娠例を経験した⁵⁾。

成績の項で述べたように、BSの単独使用でも112.5 μ g/day以上の使用、とくに225 μ gの使用では、CLに無反応の症例にもある程度排卵誘発に成功する。しかし、CLを併用した場合、70%以上の排卵誘発率となり、BSを直接的に排卵誘発の目的に用いた方法としては、ほぼ最高の成績と思われる。

各種protocolのうち、最も排卵率の高いものは、周期5日目よりCLを投与し、引き続いて225 μ g/dayの量でBSの投与を行うものである。周期2日目よりCLの投与を開始したものでも統計的には差はなく、噴霧開始時期にかかわらず、CLを併用することが重要と思われた。投与BS量と排卵率の関係では、112.5 μ gの使用例数が少なく統計的には有意差はないが、225 μ g使用例での成績が高い。現時点では、CLを併用し225 μ g/dayの量でBSの噴霧を行うのが最も有効であろうと判断された。

このように、CL併用での排卵率は有意に上昇する。今回の症例はそれまでの治療でCLが無効のものであり、CLを併用することにより排卵率が上昇することの内分泌学的な説明は難しい。石原らは、BS 600~900 μ gのBSを単独で経鼻噴霧し、排卵不成立例でも次周期CLが有効であると報告している⁴⁾。今回の成績は、この現象との関係とも考えられたため、BS噴霧による初めての治療周期での成績で、CL併用例と単独使用例を比較したが、やはりCL併用例で高く、前周期の治療による影響とは考え難い。理論的には無効のはずの症例にも、CLが何らかの意味で視床下部-下垂体に影響を与えている可能性を考える必要があるだろう。

今回の検討で、排卵誘発成功例での血中FSHは有意の上昇を示した。一方、LHは若干の増加を示すものの、有意な変動が示されなかった。LHの分泌はpulsatileであるため、このことにより単に増加が観察

出来なかったものか、あるいは、個々の症例により反応性の差異が大きいことを示すものか、不明と言わざるを得ない。しかし、今回の成績をそのまま解釈するならば、hCGの切り替え時点では完全なDRは成立せず、希釈BSの経鼻噴霧の直接作用によりFSHが優位に増加を示し卵胞発育を促したものと考えることが現時点では可能であろう。いずれにせよ、Gnの変動については連日の採血、あるいはBS噴霧終了時点でのLH-RH testなどで、今後の詳細な内分泌学的な検討を待ちたい。

BS噴霧によってLH surgeが起こるか否かは、今回はhCG使用を原則としたため確認することは出来なかった。少数例ながら、卵胞成熟が確認されたにもかかわらず、hCGの使用がなく排卵に失敗する周期が存在することは、やはり、LH surgeが起こり難いものと考えてよいのではなからうか。

今回のBSによる排卵誘発を試みた同一症例での、hMG-hCG療法の排卵成功率は90%を越え、原発性無月経の2症例を除き全例が排卵誘発に成功している。このことから、希釈BSの経鼻噴霧はhMG-hCG療法にはやはり及ばないものの患者負担の軽減の意味では、十分に満足すべき有用な排卵誘発法と言える。

今回の対象の24例の内、挙児希望者は14例で、うち妊娠例4例という成績は、夫の乏精子症2例が含まれることを考えると決して低いものではない。従って、今後は不妊症治療としての排卵誘発の可能性は十分に考えられる。今後、CL有効例や機能性不妊の症例への応用も可能であろう。

今回の検討では、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の発生は一例も観察していない。しかし、今回の症例は、CL無効例に限定し、またOHSSを起こし易いPCO症候群が2例と少ないことから、今後、不妊治療としての排卵誘発に用いた場合OHSSの発生が有意に低いとは速断し難く、今後の使用には、hMG-hCGと同様の注意を払う必要があろう。

今後は、不妊症例に対しても、真に有効な排卵誘発法であるのか、さらに症例を積み重ねる必要があるだろう。また、内分泌学的に詳細な検討を行い、Gnの分泌動態を特にCL併用例で明らかとして行く予定である。

謝 辞

滅菌済みサンプル瓶や情報を提供して頂いたヘキストジャパン社に謝意を表わす。

文 献

- 1) Crowley WJ Jr and MacArthur JW, Stimulation of the normal menstrual cycle in Kallman's syndrome by pulsatile administration of LH-RH. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 173, 1980
- 2) Leyendecker G, Struve T and Plotz EJ, Induction of ovulation with chronic intermittent (pulsatile) administration of LH-RH in women with hypothalamic and hyperprolactinemic amenorrhea. *Arch Gynecol* 229: 177, 1980
- 3) 武内裕之, 岡部親宜, 飯田 信 他, 視床下部性無月経に対する buserelin の低容量鼻腔内投与の検討. *日産婦誌* 44: 167, 1992
- 4) 石原 理, 飯野好明, 齊藤正博 他, GnRH agonist のゴナドトロピン放出刺激作用を用いた無排卵治療と負荷試験としての有用性について. *日内分泌会誌* 69: 87, 1993
- 5) 竹中 章, 須戸龍男, 山出一郎 他, 希釈 buserelin 経鼻噴霧による排卵誘発の試み—妊娠成功例の報告—. *内科宝函* 37: 300, 1992
- 6) Katorke T, Propping D, von-Derohe M, et al., Clinical evaluation of the effect of a new long-acting superactive luteneizing hormone-releasing hormone (LH-RH) analog D-Ser (TBU)6-des-GLY-10-ethylamide-LH-RH in women with secondary amenorrhea. *Fertil Steril* 33: 35, 1980
- 7) Etzrodt A and Friedrich E, Treatment of functional amenorrhea ovulation with D-Ser (TBU) 6LH-RH1-9EA (HOE766). *Acta Endocrinol* 94: 73, 1980
- 8) Menon V, Edwards RL, Lynch SS, et al., Luteneizing hormone releasing hormone analogue in treatment of hypergonadotrophic amenorrhea. *Br J Obstet Gynaecol* 90: 539, 1983
- 9) Sandow J, Clinical application of LH-RH and its analogues. *Clin Endocrinol* 18: 571, 1983
- 10) Zgliczynsk S, Baranowska B, Jeske W, et al., The effect of D-Trp6-LRH upon secretion gonadotropin — a possible therapeutic application in anorexia nervosa. *Acta Endocrinol* 105: 161, 1984

**An ovulation induction in the women
with clomiphen-citrate-resistant amenorrhea
by intranasal spray of diluted Gn-RH agonist
(Buserelin) combined
with and without clomiphen citrate**

Akira Takenaka, Tatsuo Sudoh

Ichirou Yamade, Yoshiki Takahashi
and Youichi Noda

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

Hiroshi Soga

Soga Maternity Clinic, Kyoto, Japan

An intranasal spray of low dose Gn-RH agonist (buserelin: BS) was used for ovulation induction in 24 women, aged 18 ~ 37 years, with clomiphen-citrate (CL)-resistant amenorrhea. Eight cases were hypergonadotropic amenorrhea, 6 were normogonadotropic, 10 were hypogonadotropic, judged from LH-RH loading test performed before the ovulation induction.

The women were given 100 ~ 150 mg/day of CL for 5 days followed by the intranasal administration of BS diluted with the physiological saline at a dose 112.5 ug or 225ug/day, until the day when the diameter of leading follicle exceeded 20 mm in the ultrasound monitoring. Five thousand i.u. of hCG was, then, injected for 2 days. In some cycles (22 cycles in 17 women), CL was not given prior to ovulation induction by diluted BS, to determine if the combination with CL can improve the ovulation rate comparing to the single use of diluted BS.

The single use of diluted BS could induce ovulation in 9 among 17 women (46%: 10/22 cycles) with CL-resistant amenorrhea. The combination with CL and diluted BS significantly improved the ovulation rate up to 74% (36/49 cycles).

The mean period of BS administration required for ovulation induction was 8.00 ± 3.49 days (mean \pm SD: N=43). The average number of growing follicles exceeding 18 mm in the diameter at the first day of hCG injection was 2.70 ± 1.58 (N=40). The mean serum progesterone and estradiol level at 7th day after ovulation was 20.5 ± 6.9 ng/ml and 410.5 ± 190.1 pg/ml, respectively.

Serum FSH level in the ovulating cycle before hCG injection was significantly elevated comparing with that before the treatment. Whereas, serum LH showed no significant rise after the treatment. The data are suggesting that down-regulation was not induced by low dose BS administration.

The combination therapy with CL per os and intranasal administration of diluted BS is shown useful in the treatment of CL-resistant amenorrhea.

(受付: 1993年12月22日)

(受理: 1994年3月25日)

停留精巣術後の妊孕性と精子機能

——Penetrak test, hypoosmotic swelling testによる評価——

Fertility and Sperm Function in Cryptorchidism after Orchiopexy —Evaluation with Penetrak Test and Hypoosmotic Swelling Test—

群馬大学医学部泌尿器科学教室

(主任：山中英寿教授)

川 田 敏 夫

Toshio KAWADA

Department of Urology

Gunma University School of Medicine, Maebashi 371, Japan

成人に達した停留精巣術後患者片側例24名，両側例3名に，精子濃度，精子運動率，Penetrak値，hypoosmotic swelling test (HOS test)の総精子膨化率，精巣容積を測定し検討を行った。またアンケートにより既婚者の妊孕率を調査した。その結果片側例既婚群(19名)の妊孕率は78.9%と良好であった。精液検査施行群で両側例では，無精子症2名(66.7%)，乏精子症1名(33.3%)と，精子濃度は高度に低下していた。片側例でも無精子症4名(16.7%)，乏精子症5名(20.8%)と精子濃度の低下をみたが，運動率，Penetrak値，HOS testの総膨化率からは，乏精子症の精子の質は比較的良好であると考えられた。手術年齢と精子濃度の相関は認めず，健側精巣容積と精子濃度は相関係数 $r = 0.429$ ($P < 0.05$)で有意の相関を認めた。停留精巣術後の精子濃度は片側例でも低下を認めるが，精子の質は良く，片側例の実際の妊孕率は比較的良好であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 299 - 304, 1994)

緒 言

停留精巣は臨床で遭遇する事の多い男子先天性疾患で，その頻度は満期出産児で2～3%，未熟児では15～30%とされている¹⁾。1歳までには自然下降が起り最終的には0.8%の発生率とされる²⁾。治療として一般的には造精機能保持の目的で精巣固定術が行われる。固定術後の予後としての妊孕性は，手術からその評価まで長期の観察期間を必要とするため治療成績の報告は少なく，その結果は様々である。諸家の報告によれば片側停留精巣術後で精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の患者数は30～69%³⁻⁶⁾，平均46%である。両側例では72～100%^{3,5,6)}，平均74%である。精子濃度からみると術後の造精機能はかなり低下していると考えられる。しかし実際の妊孕率は，片側で43～92%⁷⁻¹⁴⁾，平均77%，両側では13～62%⁷⁻⁹⁾，

11,12,14,15)，平均46%であり，片側例では比較的良好な妊孕率が得られている。この様に妊孕性を精液所見で論じる場合，精子濃度だけでは不十分であり精子の質も重要な要素になってくる。そこで今回著者は，精子濃度，運動率に加え，妊孕能を反映するといわれる低浸透圧精子尾部膨化試験(HOS test)，ウシ頸管粘液精子貫通検査(Penetrak test)を用い停留精巣術後の精子の質についても調べてみた。またアンケートにより，術後の妊孕性を調査してみた。

対象および方法

対象は，昭和36年以来群馬大学附属病院泌尿器科で停留精巣と診断され(移動精巣は除く)精巣固定術を受け18歳以上に達した178名である。調査用紙および電話で問い合わせ，結婚，挙児の有無，受診の不可を調べた。停留精巣手術の術式は，精巣動静脈

と精管を傷つけない様に剥離し精索を延長し、固有漿膜を開け精巣を陰嚢内に固定し絹糸で大腿に牽引する方法であった。陰嚢肉様膜にポケットを作製しその中に精巣を固定するいわゆる De Netto 法は、調査対象には行われていなかった。応答のあった症例は 69 名 (38.8%)、応答のなかった症例は 64 名 (36.0%)、現住所不明にて連絡がつかなかった症例 45 名 (25.3%) であった。69 名のうち 27 名 (全対象の 15.2%) が受診した。この 27 名には外来で精巣容積測定、用手法にて採取された精液 (原則として 4 日間の禁欲後) に対し、一般精液検査、HOS test、Penetrak test を施行した。また採血し LH、FSH、テストステロン (T) を RIA 法にて測定した。コントロールとして健康成人男子 24 名に、一般精液検査、HOS test、Penetrak test を施行した。また特発性男性不妊患者 4 名にも、一般精液検査と Penetrak test を施行した。

精巣容積測定には、山口大式 orchidometer を用いた。一般精液検査は、原則として 4 日間の禁欲後外来にて用手法にて精液採取し、30 分間室温放置後マクラール計算盤で精子濃度、運動率を測定する方法であった。HOS test は Jeyendran らの方法に従い、液状化した精子検体 0.1ml と、クエン酸ナトリウム 7.35 g/l と果糖 13.51 g/l を混合して作った 150m Osmole の低浸透圧液 1 ml を混合し 37°C・5% CO₂ in air 下で 60 分間培養した後、精子形態を観察した。判定は 100 以上の精子尾部の形態学的変化を観察し、膨化した総精子の % を算出した。Penetrak test は Serono Diagnostics 社のキットを用いた。すなわち添付の well 内に 0.2 ml の液状化精子を注入し、ウシ頸管粘液を充填したガラス毛細管を所定の部位でカットし、well 内に 2 本立てた。常温静置 90 分間後、目盛りの入ったスライドガラスの上にガラス管をのせ顕微鏡下 100 倍にて最大上昇距離を測定し、その 2 本の上昇距離の平均値をもって検体の運動距離とした。

統計学的解析には、t 検定を用い危険率 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

応答のあった 69 名のうち、独身 49 名 (71.0%)、既婚例 20 名 (29.0%) であった。既婚例は、片側例 19 名、両側例 1 名でそのうち片側例 15 名 (78.9%)、両側例 1 名 (100%) に挙児を認めた。片側例では、手術時年齢が高いからといって妊孕性が低いという結果は得られなかった。

来院して精液検査を施行した 27 名は、片側例 24 名、両側例 3 名であった。それぞれの精液所見と各種測定値を表 1 に示す。片側例 24 名のうち精子濃度 $20 \times 10^6/ml$ 以上の正常精子濃度症例は 15 名 (62.5%)、乏精子症は 5 名 (20.8%)、無精子症は 4 名 (16.7%) であった。手術年齢は、4 歳から 29 歳で 9.0 ± 6.1 歳 (平均値 \pm SD) であった。手術年齢が高くなるにつれて精子濃度が低くなる傾向が認められたが、手術年齢と精子濃度の間に統計学的に有意な相関は認めな

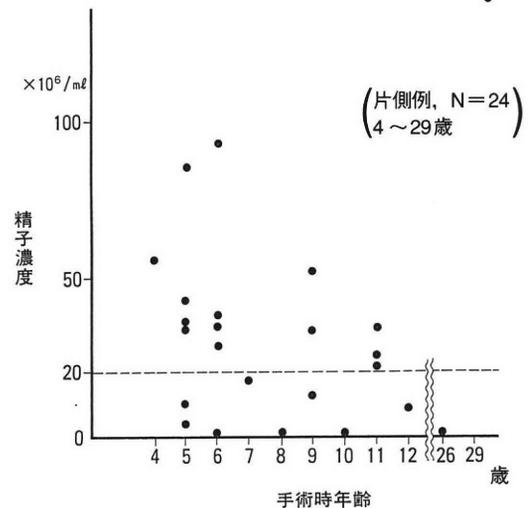


図 1. 手術時年齢と精子濃度

表 1 停留精巣術後の精液所見と各種測定値

	症例数 (%)	調査時年齢 歳	手術時年齢 歳	精子濃度 $\times 10^6/ml$	運動率 %	FSH mIU/ml	LH mIU/ml	T ng/ml	健側精巣容積 ml
片側									
正常精子濃度	15 (62.5)	26.0	8.5 ± 6.0	51.03 ± 32.50	58.01 ± 15.35	7.48	5.64	5.23	22.0
乏精子症例	5 (20.8)	22.4	7.6 ± 2.7	10.50 ± 4.48	51.04 ± 12.69	6.74	3.72	6.44	19.2
無精子症例	4 (16.7)	32.5	12.5 ± 7.9	0	--	31.30*	10.47	4.20	6.3**
計	24 (100)	26.3	9.0 ± 6.1	34.08 ± 33.97	56.27 ± 15.04	10.71	5.88	5.37	19.3
両側	3	24.0	5.7 ± 1.7	0.43 ± 0.61	56.00 ± 0	18.10	12.00	4.93	22.3

各値は平均値 \pm SD, または平均値。正常精子濃度と比較して, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 。両側例は総精巣容積。

表2 精子機能検査

	症例数	年齢 歳	精子濃度 ×10 ⁶ /ml	運動率 %	HOST %	PENETRAK mm
停留精巣術後(片側)						
正常精子濃度	13	26.3	54.42	56.85	60.55 ± 15.61	44.1 ± 13.6
乏精子症例	5	22.4	10.50	51.04	62.28 ± 9.45	38.4 ± 14.6
健康成人男子	24	27.3	93.10	55.74	62.90 ± 19.57	42.1 ± 17.0
特発性男性不妊	4	32.5	10.48	32.25	—	* 14.8 ± 8.8

各値は平均値±SD, または平均値. 乏精子症例と比較して, * p<0.05.

表3 停留精巣術後の妊孕性(Paternity)

報告者	報告年	調査 対象数	片側		両側	
			結婚 症例数	妊孕性	結婚 症例数	妊孕性
Gross	1956	—	—		16	43%
Hant	1956	90	61	77%	24	62%
Barcat	1957	156	88	71%	32	62%
Atkinson	1975	76	42	76%	18	44%
Lipschultz	1976	29	10	70%	—	
Gilhooly	1984	800	100	80%	45	36%
Faloon	1985	181	38	92%	15	13%
角谷	1991	—	14	43%	—	
Lee	1993	—	41	78%	10	60%
計			394	76.6% (平均)	160	46.3% (平均)
自験例		178	19	78.9%	1	100%

った(図1)。片側例の運動率は56.27±15.04%で、正常精子濃度群と乏精子症群の間に有意差を認めなかった。内分泌検査で血清FSH, LH, Tは、それぞれ10.71±11.43 mIU/ml, 5.88±4.5 8mIU/ml, 5.37±1.66 ng/mlであった。FSH, LHは無精子症群で高値であったが、FSHのみ正常精子濃度群に比べて統計学的に有意差を認めた(p<0.05)。Tは無精子症群で軽度低下していたが、3群間に有意差を認めなかった。正常値以下の症例は正常精子濃度群に1名いたがLH, FSHの上昇はなく第二次性徴の出現も正常であった。精巣容積は健側19.3±6.1 ml, 患側12.5±4.91 mlであった。左右同容積の症例1名を除きすべて患側が小さかった。健側精巣容積と精子濃度は、統計学的に有意に相関した(r=0.429, p<0.05)。患側精巣容積、総精巣容積と精子濃度の間にはその様な関係はみられなかった。両側例は、無精子症2名、乏精子症1名(1.3×10⁶/ml)であった。FSH, LHは上昇しており、Tは軽度低下していた。1名はTが正常値以下であった。

精子機能検査の結果を表2に示す。片側停留精巣

術後の正常精子濃度群と乏精子症群、および健常者コントロール群のHOS test値(総膨化率)は、それぞれ60.55±15.61%, 62.28±9.45%, 62.90±19.57%であった。Penetrak値は、それぞれ44.1±13.6 mm, 38.4±14.6 mm, 42.1±17.0 mmであった。両検査とも各群間に統計学的有意差を認めなかった。特発性男性不妊症例群では、精子濃度は乏精子症群と有意差がないのにPenetrak値は14.8±8.8 mmで乏精子症群と比較して有意に低下していた(p<0.05)。

考 察

術後の精子濃度について

停留精巣術後で精子濃度20×10⁶以下のsubfertileは、片側例1198例の集計では、平均46%(30~69%)³⁻⁶⁾である。両側例776例では平均74%(72~100%)^{3,5,6)}である。精子濃度からすると術後の造精機能は、両側性のみならず片側性でも低下していると考えられる。著者の成績では、片側で37.5%(9/24)、両側で100%(3/3)がSubfertileの状態であり、やはり造精機能の低下がみられた。両側例では数が少ないためか

非常に悪かった。片側例で、1198例の集計と比較するとやや良い成績であった。

この術後の精子濃度の低下の原因のひとつとして手術時期の問題が考えられる。従来は3歳～5歳が手術の時期として一般には考えられていた^{2,16)}。しかし1970年代に入ってより早期からの手術が薦められている。すなわち精巣の電子顕微鏡による病理学的検索で、2歳で既にミトコンドリアの変性や生殖細胞の不足、生殖細胞中のコラーゲンの沈着が認められ、2歳以下の手術が薦められている^{17,18)}。さらに、Mininbergらは1歳で特に精細管周囲組織のコラーゲンの著明な沈着がみられるため、手術は1歳前後で行うべきであると提唱している¹⁹⁾。しかし実際にはこの早期手術の長期評価はされておらず、妊孕性を保全できるか確認されていない。

一方で手術年齢は、術後の精子濃度に関係なく、思春期以前であれば問題ないとする説もある^{6,12)}。また、最近Grassoらは、思春期以降に固定術を受けた91例の片側停留精巣で83.5%に精子濃度の低下を報告している²⁰⁾。著者の症例では、手術年齢4歳から29歳で 9.0 ± 6.1 歳(平均値 \pm SD)であり、片側例において年齢と精子濃度の間に統計学的相関は認めなかった。また、既婚群においても挙児の有無と手術年齢は関係なかった。しかし、年齢の上昇とともに精子濃度の低下の傾向があった事やGrassoらの報告を考えると、少なくとも思春期以前に固定術をすべきであり、2歳～3歳位が妥当な手術年齢であると推測される。2歳以前の固定術で術後の精子濃度の低下(特に両側例で)が防げるかどうか今後の報告が待たれるところである。

精子の質について

以上固定術後の成績として精子濃度を中心に論じてきたが、精子濃度が必ずしも妊孕性を反映するとは限らない。そこで精子の質も妊孕性にとって重要になってくる。特に最近は人工授精の進歩により乏精子症でも挙児を期待できるようになっている。人工授精における男性側因子の研究により精子機能を評価する検査法が考えられている。

hypoosmotic swelling test (HOS test) は、1984年Jeyendranらによって開発され低浸透圧溶液内で精子の尾部が膨化する事を利用し、精子尾部細胞膜機能より精子の受精能を判定する検査である。この検査の測定内変動係数は3%から16%(N=4)で、妊孕性の良い指標とされる透明帯除去ハムスターテストと良く相関されると報告されている²¹⁾。Van der Venらによれば、ヒト体外受精において、受精したほとんどの

精子膨化率は60%以上であり、受精しない精子の精子膨化率はほとんど60%以下で、HOS testは受精に関する能力の指標になるとされる²²⁾。吉野らは、男性因子により3回以上のAIHを施行した10例に、その都度HOS testを施行し、3例に妊娠をみた。妊娠周期の精液所見が必ずしもその症例中最も良い値ではないのに対して、総精子膨化率は一番良い値であったと報告している²³⁾。

Penetrak testは、ウシ頸管粘液の性状がヒト頸管粘液と類似していることを利用しヒト精子のウシ頸管粘液に対する貫通性をもって精子の運動能を評価する検査である²⁴⁾。簡便な検査で広く臨床応用されている。月川らは、妊孕性と密接に関連する受精の前にみられる精子運動の活性化・hyperactivationとこの検査の間に、強い相関のある事を報告している²⁵⁾。この様にHOS testとPenetrak testは精子の妊孕性を反映する精子機能検査と考えられる。今回の測定結果では、片側停留精巣術後の正常精子濃度群と乏精子症群と健常者コントロール群との間に、両検査とも有意差を認めなかった。また特発性男性不妊群の精子濃度は術後乏精子症例群と有意差はないのに、Penetrak値は有意に低下していた。これらの結果から、片側停留精巣術後の精子の質は乏精子症でも良く、特発性男性不妊症のそれとは異なると考えられた。

ホルモン環境について

内分泌学的検討ではテストステロンが正常値以下は、片側正常精子濃度症例(15例中)、両側例(3例中)に、各々1例認めた。これは停留精巣術後のテストステロンは両側例でやや低値を示すが正常範囲内にあり、間質細胞の障害は比較的軽微で二次性徴は両側例であってもほぼ正常に出現するという従来の説¹⁰⁾を否定するものではなかった。LH、FSHは、両側例および片側例の無精子症例群で上昇しており、特に無精子症例群のFSHは片側例の他の2群に比較し有意差を認めた。これは健側精巣を含めた精細胞の障害の程度を反映しているものと思われた。

妊孕性, paternityについて

停留精巣術後の挙児の有無は、手術からその評価まで長期の観察期間を必要とするため、精液所見に比べより報告は少ない。妊孕性の保持という固定術の目的から考えると挙児の有無は、女性側の因子も加わるが、術後の精液所見に比べるとより直接的で術後成績として重要である。報告者によりその成績は様々であるが片側停留精巣術後の妊孕性は43%から92%であり平均すると76%(302/394)である^{7~14)}。

また両側では13%から62%であり平均46% (74/160) である^{7-9, 11, 12, 14, 15}(表3)。著者の成績は片側例で78.9% (15/19) で、ほぼ同様の成績であった。24例の精液所見からは、正常精子濃度症例は62.5%であるが、乏精子症例でも精子機能検査は良好であり挙児を呈する症例もでてくると推測され、既婚群の78.9%の妊孕性を裏付けていると思われる。片側停留精巣術後の妊孕性は良好である一方、無精子症を16.7%に認めた。成人健康男子に比べると無精子症の出現率は確かに高く、無精子症では人工授精もできない事から、今後はその手術時期以外の要因についても検討する必要があると思われた。

本論文の要旨は、第80回日本泌尿器科学会総会にて報告した。

稿を終わるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜りました群馬大学泌尿器科学教室山中英寿教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究のためPenetrakを提供して下さいましたセローノ・ジャパン社に深謝致します。

文 献

- 1) Colodny AH, Undescended testis is surgery necessary? N Engl J Med 314: 510, 1986
- 2) Scorer CG, Farington GH, Histological studies of the undescended testis. Surgical treatment of the undescended testis. In Congenital deformities of the testis and epididymis. p58, Batterworth Co, 1971
- 3) Chilvers C, Dudley NE, Gough MH, et al., Undescended testis: The effect of treatment on subsequent risk of subfertility and malignancy. J Pediatr Surg 21: 691, 1986
- 4) Ponchiottie R, Grechi G, Fertility in unilateral cryptorchidism: Review of 104 cases. Acta Eur Fert 21: 691, 1986
- 5) Kogan SJ, Fertility in cryptorchidism. An overview in 1987. Eur J Pediatr 146: S21, 1987
- 6) Okuyama A, Nonomura N, Nakamura M, et al., Surgical management of undescended testis: Retrospective study of potential fertility in 274 cases. J Urol 142: 749, 1989
- 7) Hand JR, Undescended testis: report of 153 cases with evaluation of clinical findings, treatment and results followed up to 33 years. J Urol 75: 973, 1956
- 8) Barcat J, Ectopie testiculaire; statistiques clinique et opératoire des services de chirurgie infantile des Enfants-Malades de 1914 à 1950. Mém Acad Chir 83: 909, 1957
- 9) Atkinson PM, A follow-up study of surgically treated cryptorchid patients. J pediatr Surg 10: 115, 1975
- 10) Lipschultz LI, Caminos-Torres R, Greenspan CS, et al., Testicular function after orchiopexy for unilaterally undescended testis. N Engl J Med 295: 15, 1976
- 11) Gilhooly PE, Meyers F, Lattimer JK, Fertility prospects for children with cryptorchidism. AJDC 138: 940, 1984
- 12) Fallon B and Kennedy TJ, Long-term follow-up of fertility in cryptorchid patients. Urol 25: 502, 1985
- 13) 角谷秀典, 始関吉生, 小竹 忠 他, 片側性停留辜丸の造精機能. 日泌尿会誌 82: 744, 1991
- 14) Lee PA, Bellinger MF, Songer NJ, et al., An epidimiologic study of paternity after cryptorchidism: initial results. Eur J Pediatr 152: S25, 1993
- 15) Gross RE and Jewett TC, Surgical experience from 1222 operations for undescended testis. J Am med Ass 160: 634, 1956
- 16) Numanoglu I, Kokturk I, Mutaf O, Light and electron microscopic examinations of undescended testis. J Pediatr Surg 4: 614, 1969
- 17) Mengel W, Hienz HA, Sippe WG, et al., Studies on cryptorchidism: A comparison of histological findings in the germinative epithelium before and after second year of life. J Pediatr Surg 9: 445, 1974
- 18) Hadziselimovic F, Herzog B, Seguchi H, Surgical correction of cryptorchidism at 2 years: electron microscopic and morphometric investigations. J Pediatr Surg 10: 19, 1975
- 19) Mininberg DT, Rodger JC, Bedford JM, Ultrastructural evidence of the onset of testicular pathological conditions in the cryptorchid human testis within the first year of life. J Urol 128: 782, 1987
- 20) Grasso M, Buonaguidi A, Lania C, et al., Postpubertal cryptorchidism: Review and evaluation of the Fertility. Eur Urol 20: 126, 1991
- 21) Jeyendran RS, Van-der-Ven HH, Perez-Pelaez M, et al., Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. J Reprod Fert 70: 219, 1984
- 22) Van-der-Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, et al., Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. J Androl 7: 190, 1986
- 23) 吉野和男, 高橋健太郎, 内田昭弘 他, 配偶者間人工授精(AIH)の適応における精液所見と精子機能テスト(Hypoosmotic swelling test). 日不妊

会誌 35: 325, 1990

- 24) Alexander NJ, Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. *Fertil Steril*, 36: 201, 1981
- 25) 月川 奏, 星 和彦, 柳田 薫 他, ヒト精子運動能と Penetrak test. *日不妊会誌* 35: 74, 1990

Fertility and sperm function in cryptorchidism after orchidopexy

Toshio Kawada

Department of Urology
Gunma University School of Medicine
Maebashi 371, Japan
(Director: Prof. H. Yamanaka)

The sperm density, sperm motility, Penetrak's index, total sperm swelling rate (hypoosmotic swelling test) and testicular volume were examined in 27 adults who had undergone surgical treatment of undescended testis (unilateral in 24 cases and bilateral in 3 cases). Of 178 patients, 20 married patients additionally received a

questionnaire survey concerning fertility. The survey revealed a high fertility rate (78.9%). The sperm density was often very low in patients after surgical treatment of bilateral undescended testis, including 2 cases (66.7%) of azoospermia and 1 case (33.3%) of oligozoospermia. This parameter was also low in patients after surgical treatment of unilateral undescended testis, including 4 cases (16.7%) of azoospermia and 5 cases (20.8%) of oligozoospermia. The quality of sperm in patients with oligozoospermia was relatively good, as assessed on the basis of motility, Penetrak's index and total sperm swelling rate.

The age at the time of surgery did not correlate with the postoperative sperm density, whereas the testicular volume on the healthy side had a significant correlation with the sperm density ($r = 0.429$, $P < 0.05$). The results of this study suggest that factors other than the timing of surgery (i.e., the age of patients at the time of surgery) also need to be studied in relation to a reduction in the sperm density after surgical treatment of undescended testis.

(受付: 1993年12月17日)

(受理: 1994年3月28日)

EFFECTS OF ANTIPROGESTERONE COMPOUND RU 486 ON PARTURITION INDUCTION IN PIGS

Kiichi KANAYAMA, Koichi NARIAI, Hiroshi KOIE,
Tuyoshi ENDO and Yuzi SAKUMA

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

Tadashi SANKAI

Tsukuba Primate Center for Medical Science
The National Institute of Health, Tsukuba 305, Japan

Abstract: The purpose of the study was to explore the potential of RU 486 in inducing parturition in pigs. Pregnant pigs were injected RU 486 intramuscularly at a dosage ranging from 100mg to 750mg on the day 112 or 113 of pregnancy. It was demonstrated that the higher the dosage of RU 486 was administered, the shorter the intervals between RU 486 injection and the parturition became. All the piglet obtained did not have any abnormalities. A potential of RU 486 for control of the birth timing in pigs was shown in this study.

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 39 (3), 305 - 307, 1994)

Introduction

The withdrawal of plasma progesterone is observed before parturition in rats^{1, 2}), rabbits³), sheeps^{4, 5}), goats⁶), pigs^{7, 8}), and cattle⁹). On the other hand, sustained levels of progesterone can extend the period of pregnancies^{10~12}). These results indicate that the withdrawal of progesterone dominance is one of the main factors playing a role in the timing of spontaneous parturition.

Attempts have been made to control the timing of parturition using antiprogesterone compound, RU 486, in rats^{13, 14}) and cattle¹⁵). Recently we have gotten an opportunity to use RU 486. In the present study, the authors conducted an experiment to explore the potential of RU 486 in inducing parturition in pigs.

Materials and Methods

The pigs used in this study were mature females weighing 200 ~ 250 kg. They were bred in a piggery

in Shizuoka Prefecture, Japan. Their breeds were Large Yorkshire, Landrace, or the cross between them. RU 486 dissolved in sesame oil was injected intramuscularly to the pigs on Day 112 or 113 of pregnancy. The day of performing artificial insemination was designated as Day 0. The animals were administered a single injection of RU 486 at a dosage ranging from 100mg to 750mg. Four experimental groups were set up according to the dosage of RU 486. The sows examined were isolated individually in farrowing pens and were closely observed thereafter for the onset of the parturition.

Results and Discussion

In a large number of non-treated sows in the piggery, intact control, the average parturition period was 115.2 days. In this study, the average time required from 100mg RU 486 administration on Day 112 to parturition was 38h 13min. In the group of 250mg RU486, it was 28h 11min.; 500mg, 23h 50min.; 750mg, 23h 57min. respectively as shown in Table 1.

Table 1 Relationship between the day of RU486 injection, dosage of RU486, and average interval to the parturition

Day of RU486 injection	Dosage of RU486 (mg)	No. of sows examined	Average interval between RU486 injection and onset of the parturition \pm S.D.
Day 112*	100	3	38h 13min \pm 1h 25min ^{a**}
	250	4	28h 11min \pm 2h 41min ^b
	500	3	26h 37min \pm 1h 38min ^b
	750	4	23h 57min \pm 4h 47min ^b
Day 113	250	3	28h 03min \pm 2h 01min
	500	4	24h 41min \pm 2h 37min

* The day of performing artificial insemination was designated as Day 0

** Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

*** NS: Not Significant

It was demonstrated that the higher the dosage of RU 486 was administered to the pigs, the shorter the intervals between RU 486 injection and the parturition became.

RU 486 administered on Day 113 induced parturition within 28h 03min, on average in the 250mg treatment group and 23h 55min, on average in the 500mg group. Thus we obtained data that suggested the time required for parturition depended, not on the day of RU 486 treatment, but on the dosage of RU 486 injected. All of the piglets obtained from RU 486-treated group were vigorous at birth, and maternal behavior of the sows were normal.

Control of parturition in pigs has already been reported using glucocorticoids¹⁶⁾, PGF_{2a}¹⁷⁾, and PGF_{2a} and oxytocin in combination¹⁸⁾. Since the amount of RU 486 we obtained this time was small, only a few pigs were used in this study. Therefore, it is difficult to compare the results in glucocorticoids, PGF_{2a} and oxytocin, with the results obtained by RU 486 administration. This study, however, demonstrates the potential of RU 486 in inducing parturition in pigs.

Progesterone is believed to inhibit myometrial contractility and ensure the quiescent state of the uterus throughout pregnancy. As the understanding for inducing parturition by RU 486, it would be reasonable to assume that RU 486 binds progesterone receptors in the uterus. The increase in myometrial contractility can be attributed to the development of gap junctions¹⁹⁾. Administration of RU 486 to pregnant rats developed gap junctions between myometrial cells²⁰⁾, therefore this could be one of the factors to

initiate parturition. However, the mechanism by which RU 486 induces parturition has not been fully elucidated¹⁵⁾.

It was reported that the offsprings from RU 486-treated groups did not have any abnormalities in cattle¹⁵⁾. Although the number of pigs examined in this study was small, the piglets from RU 486-treated groups did not show any abnormalities and were growing normally. Results of this study show that an antiprogesterone, RU 486 might be an efficient tool for the control of birth timing. In pigs particularly, it is considered that RU 486 would be useful for the control of birth timing to avoid nocturnal parturition.

References

- 1) Fajer AB, Barraclough CA, Ovarian secretion of progesterone and 20 α -Hydroxypregn-4-en-3-one during pseudopregnancy and pregnancy in rats. *Endocrinology* 81: 617, 1967
- 2) Hashimoto I, Henricks DM, Anderson LL, et al., Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82: 333, 1968
- 3) Challis JRG, Davies I, Ryan KT, The relationship between progesterone and prostaglandin F concentrations in the plasma of pregnant rabbits. *Prostaglandins* 4: 509, 1973
- 4) Bassett JM, Oxborrow TJ, Smith ID, et al., The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *J Endocr* 45: 449, 1969
- 5) Fylling P, The effect of pregnancy, ovariectomy and parturition on plasma progesterone level in sheep. *Acta Endocrinologica* 65: 273, 1970
- 6) Thorburn GD, Nicol DH, Bassett JM, et al., Partu-

- rition in the goat and sheep: Changes in corticosteroids, progesterone, oestrogens and prostaglandin F. *J Reprod Fert Suppl* 16: 61, 1972
- 7) Ash RW, Heap RB, Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentrations in peripheral plasma of sows during pregnancy, parturition, lactation and after weaning. *J Endocr* 64: 141, 1975
 - 8) Molokwn ECI, Wagner WC, Endocrine physiology of the puerperal sow. *J Anim Sci* 36: 1158, 1973
 - 9) Donaldson LE, Bassett JM, Thorburn GD, Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J Endocr* 48: 599, 1970
 - 10) Pepe G, Rothchild I, The effect of hypophysectomy on day 12 of pregnancy on the serum level of progesterone and time of parturition in the rat. *Endocrinology* 91: 1380, 1972
 - 11) Takahashi M, Shiota K, Suzuki Y, Introduction of a new crop of corpora lutea during pregnancy and its effect on luteal function and parturition in the rat. *Biol Reprod* 21: 813, 1979
 - 12) Garfield RE, Puri CP, Csapo AI, Endocrine, structural and functional changes in the uterus during premature labor. *Am J Obstet Gynec* 142: 21, 1982
 - 13) Bosc MJ, Germain G, Nicolle A, et al., Control of birth in rats by RU 486, an antiprogestosterone compound. *J Reprod Fert* 79: 1, 1987
 - 14) Tsujii T, Effects of the antigestagenic agent RU 486 in pregnant rats. *Jpn J Fertil Steril* 34: 37, 1989
 - 15) Li Y, Perezgrovas R, Gazal OS, et al., Antiprogestosterone, RU 486, Facilitates Parturition in cattle. *Endocrinology* 129: 765, 1991
 - 16) North SA, Hauser ER, First NL, Induction of parturition in swine and rabbits with the corticosteroid dexamethasone. *J Anim Sci* 36: 1170, 1973
 - 17) Boland MP, Herlihy MJ, Induction of parturition in the pig using a new prostaglandin analogue (K11941). *Theriogenology* 17: 193, 1982
 - 18) Welp C, Jochle W, Holtz W, Induction of parturition in swine with a prostaglandin analog and oxytocin: A trial involving dose of oxytocin and parity. *Theriogenology* 22: 509, 1984
 - 19) Saito Y, The Correlation between gap junction formation and changes of steroid hormone receptor concentration in the myometrial tissues of pregnant and postpartum rats. *Akita J Med* 9: 233, 1983
 - 20) Garfield RE, Grasc JM, Baulieu BB, Effects of the antiprogestosterone RU 486 on preterm birth in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1281, 1987

豚における抗プロゲステロン製剤,
RU486の分娩誘発効果

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 鯉江 洋
遠藤 克 佐久間勇次

国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センター
山海 直

豚において、少数例ではあるがRU486を用いた誘起分娩の可能性を検討した。妊娠112日または113日の豚にRU486 100～750mgを筋肉内に投与した。RU486の投与量を増加するにしたがって分娩誘起までの時間が短縮することが示された。RU486投与群において得られた産子に異常は認められなかった。

以上の結果より、夜間分娩を回避する等の目的でRU486を用いた豚の分娩調節の可能性が示された。

(受付：1994年1月4日)

(受理：1994年4月19日)

FK-506による同系精巣細胞に対する遅延型過敏反応の調節

Regulation of Delayed Type Hypersensitivity to Syngeneic Testicular Cells by FK-506

九州大学医学部泌尿器科学教室

坂本 泰樹

松本 哲朗

水之江 義充

Yasuki SAKAMOTO

Tetsuro MATSUMOTO

Yoshimitsu MIZUNOE

佐久本

操

熊澤 淨一

Misao SAKUMOTO

Joichi KUMAZAWA

Department of Urology

Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

免疫学的男子不妊症のモデルとして実験的自己免疫性精巣炎 (EAO) の研究がなされ、その発症に遅延型過敏反応 (DTH) の関与が考えられている。以前の報告のように、マウスを同系精巣細胞で皮下免疫するとDTH反応が誘導され、その反応はCY前処理により用量依存的に増強される。今回はFK-506によるこのDTH反応の抑制効果を調べた。免疫単独群、CY100mg/kg前処理および免疫群やCY200mg/kg前処理および免疫群の全ての群で3mg/kg以上のFK-506が抑制に有効であった。免疫寛容誘導を試みると、精巣細胞免疫前後にFK-506を連続投与した群では、完全寛容ではないが以後の精巣細胞免疫に対するDTH反応誘導を有意に抑制した。しかし、FK-506単独投与群では、以後の精巣細胞免疫に対するDTH反応誘導をむしろ有意に増強した。以上より、FK-506の同系精巣細胞に対するDTH反応の抑制が確認され、EAOの抑制の可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 308 - 313, 1994)

緒言

特発性男子不妊症の少なくとも一部は免疫学的機序が関与していると考えられ、免疫学的男子不妊症のモデルとして実験的自己免疫性精巣炎 (Experimental autoimmune orchitis; EAO) が研究されている。実験動物において、種々の精巣抗原免疫によってEAOが発症し^{1,2,3)}、その発症機序に重要な役割を果たすと考えられる細胞性免疫の一つである遅延型過敏反応 (Delayed type hypersensitivity; DTH) の誘導が見られる。我々は以前に、アジュバントを用いずに生きた同系精巣細胞をマウスの皮下に免疫することにより、DTH反応の誘導とEAOの発症がおこることを報告し、高用量のcyclophosphamide (CY) の前処理によりEAOの発症の頻度と程度が強くなることを報告した^{4,5)}。

FK-506は *Streptomyces tsukubaensis* の発酵培地から分離された物質であるが、細胞性免疫に対する強い免疫抑制作用を有している⁶⁾。臨床的には、同種肝移植の拒絶反応時⁷⁾や一部の自己免疫疾患の治療に使用されている^{8,9)}。

以前に、我々はシクロスポリン (CsA) の同系精巣細胞に対するDTH反応の抑制効果を調べた¹⁰⁾。すなわち、同系精巣細胞を皮下免疫するとDTH反応が誘導されるが、CsAを連日投与することにより用量依存的にDTH反応が抑制された。今回は、FK-506の同系精巣細胞に対するDTH反応の抑制効果を報告する。

材料と方法

1. 動物

九州大学医学部附属動物実験施設より供給された

オスのC3H/Heマウス(3~4カ月齢)を用いた。各実験群とも、各々5匹ずつのマウスを用いた。

2. 抗原

同系マウスからの生きた精巣細胞(細胞浮遊液)を免疫抗原および惹起抗原として用いた。実験によっては、同系マウスからの肝細胞を免疫抗原として用いた。細胞浮遊液はHanks液に溶解した後、トリパンブルー法にて生細胞数を調整した。

3. シクロフォスファミド(cyclophosphamide; CY)処理

CY(エンドキサン, 塩野義製薬)を生食水に溶解し、免疫の2日前に100または200mg/kgの用量で腹腔内に投与した。

4. 免疫

マウスの右側腹部皮下に 1×10^7 個の抗原細胞を0.1mlのHanks液に溶解して注射した。

5. 遅延型足蹠反応(delayed footpad reaction; DFR)の測定

精巣細胞に対するDTH反応の指標としてDFRを用いた¹⁾。惹起抗原として 1×10^6 個の精巣細胞を0.05mlのHanks液に調整し、右後肢足蹠内に注射し、左後肢足蹠内には同量のHanks液を注射した。24時間後に左右の後肢足蹠の厚さをdial thickness gauge (Peacock社)にて測定し、左右の差($\times 0.1$ mm)をDFRとした。DFRの測定は免疫6日目に施行した。

6. FK-506投与

藤沢薬品工業より提供していただいたFK-506を生

食水に溶解し、免疫前日より連続7日間0.1, 0.5, 1または3mg/kgの量で腹腔内に投与した。

7. 免疫寛容誘導

マウスを 1×10^7 個の同系精巣細胞または肝細胞で皮下免疫し、もしくは全く免疫せずに、免疫の前日より連続7日間3mg/kgのFK-506を投与した。それから、FK-506投与の最終日にCY100mg/kgを投与し2日後に同系精巣細胞で皮下免疫した。免疫後6日目にDFRを測定した。

8. 統計

実験結果は、平均値に標準誤差を付記し、惹起されたDFRについてStudentのt検定を行い、P値が0.05以下を有意とした。なお、非免疫の正常マウスを対照群とした。

結 果

1. 皮下免疫によるDFRの誘導とCY前処理による増強

マウスを同系精巣細胞で免疫すると対照群と比べ有意のDFRが測定された。免疫群のマウスをCY100または200mg/kgで前処理すると用量依存的にDFRは増強された(Fig. 1)。

2. 免疫のみで誘導されたDFRに対するFK-506の抑制

3mg/kgのFK-506を7日間連続投与された免疫群では有意にDFRの抑制が見られた。しかるに、0.5または1mg/kgのFK-506連続投与ではDFRは影響されな

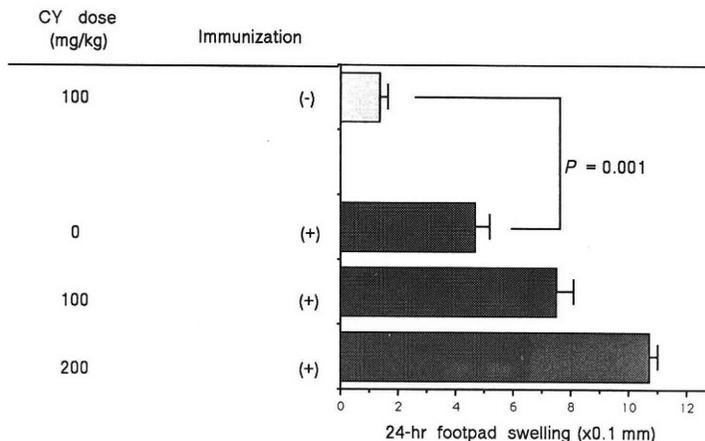


Fig. 1 Induction of DFR to syngeneic testicular cells by Subcutaneous (sc) immunization with and without CY-pretreatment

Mice were immunized sc with 1×10^7 viable syngeneic testicular cells with or without pretreatment of 100 or 200 mg/kg of CY 2 days before or not immunized at all. Footpad elicitation was carried out with 1×10^6 syngeneic testicular cells 6 days after immunization.

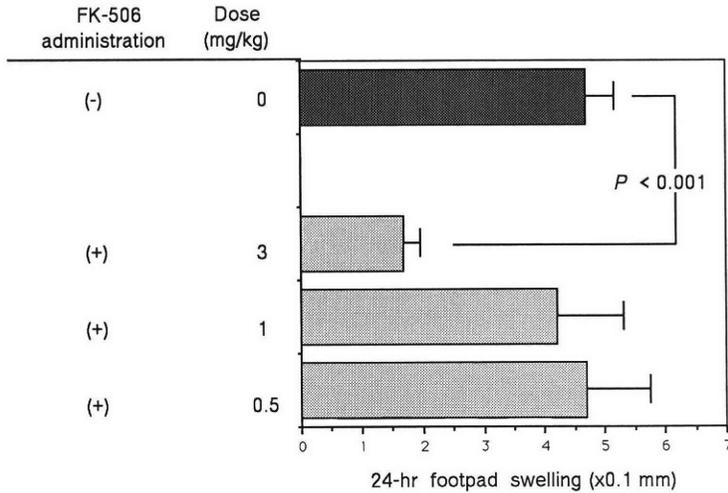


Fig. 2 Dose-dependent suppressive effect of FK-506 on DFR to syngeneic testicular cells induced by immunization alone. Mice were immunized sc with 1×10^7 viable syngeneic testicular cells without CY-pretreatment. FK-506 of 0.5, 1 or 3 mg/kg was administered for 7 consecutive days starting on the day before immunization. Footpad elicitation was carried out with 1×10^6 syngeneic testicular cells 6 days after immunization.

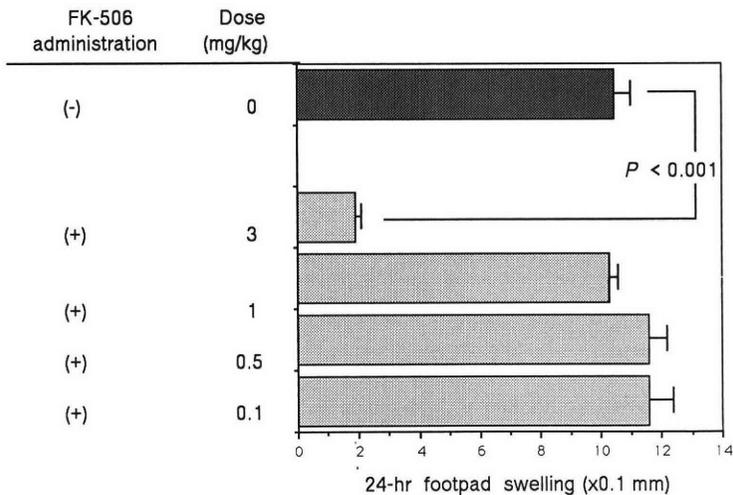


Fig. 3 Dose-dependent suppressive effect of FK-506 on DFR to syngeneic testicular cells induced by immunization with 100mg/kg of CY-pretreatment

Mice were immunized sc with 1×10^7 viable syngeneic testicular cells with pretreatment of 100mg/kg of CY 2 days before. FK-506 of 0.1, 0.5, 1 or 3 mg/kg was administered for 7 consecutive days starting on the day before immunization. Footpad elicitation was carried out with 1×10^6 syngeneic testicular cells 6 days after immunization.

かった (Fig. 2).

3. 100mg/kgのCY前処理後免疫群のDFRに対するFK-506の抑制

マウスは免疫の2日前に100mg/kgのCYを投与された。3mg/kgのFK-506の連続投与によりDFRは有意に抑制された。しかしながら、0.1、0.5または1

mg/kgのFK-506投与は無効であった (Fig. 3)。

4. 200mg/kgのCY前処理後免疫群のDFRに対するFK-506の抑制

マウスの免疫の2日前に200mg/kgのCYを投与した群では、3mg/kgのFK-506の投与でしかDFRを有意に抑制できなかった。0.1または0.5mg/kgのFK-506の

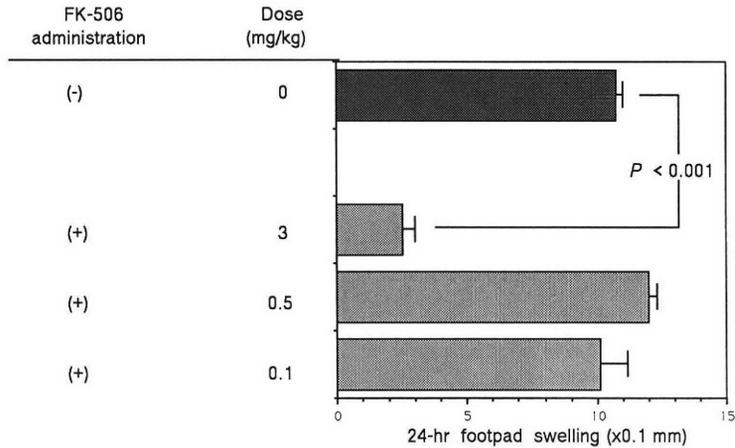


Fig. 4 Dose-dependent suppressive effect of FK-506 on DFR to syngeneic testicular cells induced by immunization with 200mg/kg of CY-pretreatment

Mice were immunized sc with 1×10^7 viable syngeneic testicular cells with pretreatment of 200mg/kg of CY 2days before. FK-506 of 0.1, 0.5, or 3mg/kg was administered for 7 consecutive days starting on the day before immunization. Footpad elicitation was carried out with 1×10^6 syngeneic testicular cells 6 after immunization.

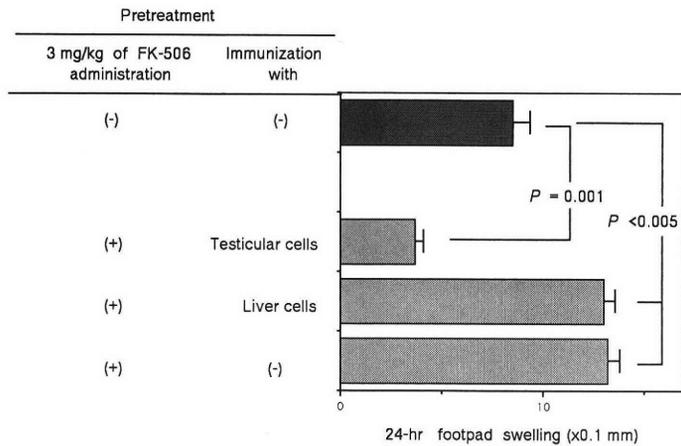


Fig. 5 Immunoregulatory effect of pretreatment with immunization and/or administration of FK-506 on the induction of DFR to syngeneic testicular cells by immunization with 100mg/kg of CY-pretreatment

Mice were preimmunized sc with 1×10^7 viable syngeneic testicular cells or liver cells or not preimmunized and 3 mg/kg of FK-506 was administered for 7 consecutive days starting on the day before preimmunization. Then, the mice were given 100 mg/kg of CY on the final day of FK-506 administration, followed by sc immunization with syngeneic testicular cells 2 days later. Footpad elicitation was carried out with 1×10^6 syngeneic testicular cells 6 days after immunization.

投与では抑制効果はなかった (Fig. 4).

5. FK-506単独または免疫およびFK-506投与による寛容誘導

前処理としてマウスを同系精巣細胞で免疫し、免疫前日より連続7日間3 mg/kgのFK-506を投与した。それから、CY100mg/kgを前投与し2日後に同系精巣

細胞で免疫した。その結果、完全な免疫寛容ではないが有意にDFRの誘導の抑制が見られた。しかしながら、前処理として精巣細胞のかわりに肝細胞で免疫したり、免疫を全くせずにFK-506のみ7日間連続投与した場合にはDFRはむしろ有意に増強された (Fig. 5).

考 察

近年、男子不妊症の治療法として体外受精や顕微授精の進歩は目覚ましいが、一方では造精能の治療法に結びつくような研究は精索静脈瘤を除いて少ない。そこで我々は、造精能障害のモデルとしてEAOの研究をしてきた。生きた同系精巢細胞をC3H/Heマウスに皮下免疫することにより弱いながらもEAOを発症するモデルを報告し、100mg/kgのCY前処理により中等度のEAOの発症が誘導されることを報告した⁵⁾。すでに多くの報告によりEAOの発症・維持にDTH反応が重要な役割を果たすことが示唆されている^{1,12)}。我々の系では、免疫により同系精巢細胞に対する有意なDFRが誘導され、その反応は高用量のCY前処理によって増強される(Fig. 1)。

FK-506は日本ではすでに同種肝移植の拒絶反応の抑制に認可されている。泌尿器科領域では、腎移植への認可拡大が待たれている。FK-506はまた一部の臓器特異的自己免疫性疾患(たとえば難治性ぶどう膜炎)などでも治療薬としての応用が期待されている⁸⁾。FK-506と同様の免疫抑制活性を持つCsAを男子不妊症の患者に用い一部有効であったという報告もあり¹³⁾、実験動物によるCsAやFK-506の免疫抑制効果を調べることは非常に有意義だと思われる。

今回の我々の実験では、まずFK-506によるDTH反応の抑制効果を調べた。同系精巢細胞による皮下免疫群とCY100mg/kg前処理および免疫群とCY200mg/kg前処理および免疫群の全ての3群において3mg/kgのFK-506によってDTH反応の有意な抑制が見られたが1mg/kg以下では無効であった(Figs. 2, 3, 4)。CsAを用いて同様の実験をすると、免疫単独群およびCY100mg/kg前処理および免疫群では30mg/kg以上でDTH反応抑制効果があったが、CY200mg/kg前処理および免疫群では50mg/kg以上のCsAが必要であった¹⁰⁾。つまり、FK-506の必要量はCsAの1/10~1/20で充分であった。現在は、実際にFK-506がEAOの抑制に有効か否かを検索中である。

免疫とFK-506投与により抗原特異的免疫寛容誘導を試みた。Fig. 5に示すように、精巢細胞免疫前後にFK-506を連続投与した群では完全な寛容状態ではないが、以後の精巢細胞免疫に対するDTH反応誘導を有意に抑制した。しかし、第三者の免疫前後にFK-506投与した群やFK-506単独投与群では、以後の精巢細胞免疫に対するDTH反応誘導をむしろ有意に増強した。この点も以前の我々のCsAのデータと同じである¹⁰⁾。この理由は不明であるが、一部のCsAの

報告にあるように^{14,15)}、FK-506は場合によっては抑制性T細胞の活性化を障害することにより免疫反応を高めるのかもしれない。現在、この点に関しても検索中である。

本論文の要旨の一部は、第81回日本泌尿器科学会総会(京都、1993年)において発表した。

文 献

- 1) Waksman BH, A histologic study of the auto-allergic testis lesion in the guinea pig. *J Exp Med* 109: 311, 1959
- 2) Sanui H, Yoshida S, Himeno K, et al., Experimental allergic orchitis induced by unilateral intratesticular bacterial infection in guinea-pigs. *Immunology* 49: 45, 1983
- 3) Kohno S, Munoz JA, Williams TM, et al., Immunopathology of murine experimental allergic orchitis. *J Immunol* 130: 2675, 1983
- 4) Sakamoto Y, Sanui H, Yoshida S, et al., Local passive transfer of delayed type hypersensitivity to syngeneic testicular cells in mice. *Clin Exp Immunol* 56: 353, 1984
- 5) Sakamoto Y, Himeno K, Sanui H, et al., Experimental allergic orchitis in mice. I. A new model induced by immunization without adjuvants. *Clin Immunol Immunopathol* 37: 360, 1985
- 6) Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al., FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot* 40: 1256, 1987
- 7) Fung JJ, Todo S, Tzakis A, Current status of FK-506 in liver transplantation. *Transplant Proc* 23: 1902, 1991
- 8) Mochizuki M, Ikeda E, Shirano M, et al., Preclinical and clinical study of FK 506 in uveitis. *Curr Eye Res* 11(Suppl): 87, 1992
- 9) Jegasothy BV, Ackerman CD, Todo S, et al., Tacrolimus (FK 506)-A new therapeutic agent for severe recalcitrant psoriasis. *Arch Dermatol* 128: 781, 1992
- 10) 坂本泰樹, 松本哲朗, 原岡正志 他, シクロスポリンによる同系精巢(辜丸)細胞に対する遅延型過敏反応の調節. 西日泌尿56: 印刷中, 1994
- 11) Miller TE, Mackaness GB, Lagrange PH, et al., Immunopotential of the response to sheep red blood cells. *J Natl Cancer Inst* 51: 1669, 1973
- 12) Tung KSK, Leong C, McCarty T, Pathogenesis of experimental allergic orchitis. III. T lymphocyte requirement in local adoptive transfer by peritoneal exudate cells. *J Immunol* 118: 1774, 1977
- 13) Bouloux PMG, Wass JAH, Parslow JM, et al.,

Effect of cyclosporin A in male autoimmune infertility. *Fertil Steril* 46: 81, 1986

- 14) Aldridge RD, Thomson AW, Factor influencing the enhancement of delayed-type hypersensitivity to ovalbumin by cyclosporin A in the guinea pig: possible role of suppressor cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 81: 17, 1986
- 15) Thomson AW, Moon DK, Inoue Y, et al., Modification of delayed-type hypersensitivity reactions to ovalbumin in cyclosporin A-treated guinea-pigs. *Immunology* 48: 301, 1983

Regulation of delayed type hypersensitivity to syngeneic testicular cells by FK-506

Yasuki Sakamoto, Tetsuro Matsumoto
Yoshimitsu Mizunoe, Misao Sakumoto
and Joichi Kumazawa

Department of Urology, Faculty of Medicine
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

Delayed type hypersensitivity (DTH) to syngeneic testicular cells was induced by subcutaneous (sc) immunization with viable syngeneic testicular cells and was augmented by a high dose of cyclophosphamide (CY)-pretreatment as previously reported. We have investi-

gated the immunosuppressive effect of FK-506 on DTH to syngeneic testicular cells. DTH was suppressed by administration of FK-506 in a dose-dependent manner. When the mice were immunized alone or with 100 or 200 mg/kg of CY-pretreatment, 3mg/kg or more of FK-506 suppressed DTH to testicular cells. FK-506 has a similar effect as CsA, but the dose required is 1/10 to 1/20 as little as that of CsA.

DTH is thought to play a key role in the induction and/or maintenance of experimental autoimmune orchitis (EAO). Our data show that DTH to syngeneic testicular cells induced by immunization is suppressed by administration of FK-506. Pretreatment of mice with immunization and administration of FK-506 suppressed DTH significantly when the mice were challenged with immunization with CY-pretreatment. However, DTH was rather enhanced significantly in mice pretreated with administration of FK-506 alone without preimmunization. Therefore, even though administration of FK-506 with immunization suppresses DTH, administration of FK-506 alone might rather eliminate suppressive mechanism resulting in augmentation of DTH in a similar fashion as CsA.

These data might imply that FK-506 may be effective on suppression of EAO.

(受付：1994年2月15日)

(受理：1994年4月26日)

マウス脱落膜反応および着床に及ぼす インドメタシンとプロスタグランジンの影響

Effect of Indomethacin and Prostaglandins on Decidual Cell Reaction and Embryo Implantation in Mouse

信州大学農学部生物資源開発学講座

辻井 弘 忠

Hirotsada TSUJII

諸 真 人

Makoto MORO

Department of Agriculture Biotechnology Faculty of Agriculture
Shinshu University, Nagano 399-45, Japan

マウスの脱落膜反応および着床に及ぼすインドメタシンおよびプロスタグランジンの影響について調べた。偽妊娠誘起マウスの子宮角に創傷を与え、経時的に観察した結果、創傷後8日の子宮重量、脱落膜細胞の形成が最高であった。インドメタシン100 μ g または1.0mg単一投与すると脱落膜反応は誘起されなかった。また、インドメタシン投与後、プロスタグランジンE₂またはF₂ α を子宮角内に注入すると、脱落膜反応が誘起された。妊娠4日にインドメタシン単一投与したところ、着床遅延が誘起され、着床数は有意に減少し、子宮浮遊卵子が有意に増加した。さらにプロスタグランジンE₂またはF₂ α を子宮腔内に注入すると、子宮内浮遊卵子が着床を開始し、着床数が増加した。

これらのことから、マウスにおける脱落膜反応ならびに着床にはプロスタグランジンが関与していることが推察された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 314 - 321, 1994)

緒 言

ラットにおいて、子宮内膜の基質細胞の中に脱落膜細胞が形成される脱落膜反応は、受精卵が着床する上で必須の条件であり、着床機構解明上、重要な課題である。この脱落膜反応は、胚盤胞の存在または人為的な物理的的刺激によって誘起される¹⁾。また脱落膜細胞の分化の過程で、必ず子宮内膜の脈管系の浸透圧が増加する¹⁾。この現象において、プロスタグランジンが、脈管系の浸透圧を高め、さらに脱落膜細胞の分化も共に引き起こすことが判明している²⁾。しかし、これら脱落膜反応機構の細胞学的機構について未だ十分解明されていないが、プロスタグランジンによって脈管系の浸透圧が高まることによって、cAMPが高まり、さらにプロテインキナーゼCが活性化し、脱落膜反応が起こると推察されている³⁾。

マウス脱落膜反応について、Rankinら⁴⁾は、脱落

膜反応誘起の刺激を行うとプロスタグランジンおよびcAMPが上昇すること、またプロスタグランジン生合成阻害物質であるインドメタシンを投与すると脱落膜反応が抑制されることを報告している。

そこで、本実験では、マウス子宮腔内にプロスタグランジンを投与して脱落膜反応が誘起出来るか、またインドメタシン投与したマウスの子宮腔内へのプロスタグランジン注入による脱落膜形成および着床時の卵子に及ぼす影響について検討を行った。

材料および方法

供試動物：当研究室で系統維持しているICR系未経産マウス8週齢のものを使用した。飼育条件は、12LD(午前6時点灯)、20 \pm 1 $^{\circ}$ C条件下で飼育し、市販の実験動物用飼料および水は自由摂取させた。実験には4日周期を2回以上繰り返したものをを用いた。実験スケジュールを図1に示した。

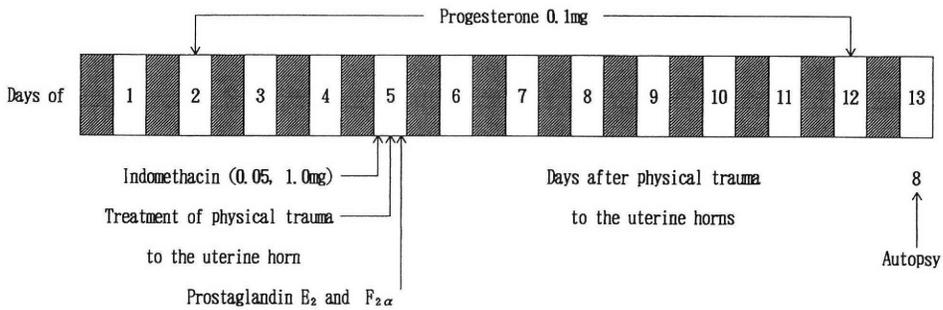


Fig. 1 Experimental time schedule

I: 脱落膜反応に及ぼす影響

偽妊娠誘起：腔垢像が発情期を示した日を偽妊娠第1日として、発情後期より連日、午前10時にプロゲステロン1mg/0.1ml皮下投与を行った。

脱落膜反応の誘起：偽妊娠5日目の午前10時頃にエチルエーテルでマウスを麻酔した。マウスの背部より切開し、左側の子宮角に全く触れないように注意して、右側の子宮角を脂肪ごと引き出した。右側の子宮頸管の上部に針で穴を開け、その穴から針金を挿入し、子宮角内全体を針金で3往復させて創傷を与えた。創傷後、切開部を縫合した。

組織切片：創傷を与えた子宮角を取り出し、重量等を測定後、ブアン固定し連続切片を作りヘマトキシリン・エオシン染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

実験は以下の3区で行った。

実験1：マウスの脱落膜化過程に及ぼす影響

子宮創傷後4～10日(偽妊娠9～15日)、午後1時に剖検を行い、子宮重量等を測定し、組織切片を作製した。

実験2：インドメタシン投与が脱落膜反応に及ぼす影響

脱落膜形成の誘起の創傷を行う2時間前にインドメタシンを1匹当たり10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 1.0mgの各濃度を単一皮下投与を行った。対照区には溶媒のオリーブ油を皮下投与した。剖検は、創傷後6, 7, 8日目に行った。

実験3：インドメタシン投与後、子宮腔内にプロスタグランジン注入による脱落膜形成に及ぼす影響

実験2と同様、創傷を与える2時間前にインドメタシンを1匹当たり50 μ g, 100 μ gの各濃度を単一投与した。子宮創傷後、直ちにPGE₂ならびにF₂ α 50 μ gを子宮腔内にマイクロシリンジで注入した。対照区には溶媒の生理食塩水を50 μ l注入した。剖検は創傷後8日目に行った。

II: 着床に及ぼす影響

妊娠マウス：雌マウスの腔垢像が発情前期を示した日の夕方、受精能力のある雄マウスと一晚同居させた。翌朝腔栓の有無により交尾を確認し、妊娠1日とした。

着床の判定：剖検15分前に1%ボンタミンスカイブルー溶液約0.15mlをマウスの尾静脈より注入し、青く反応した部位を着床陽性部位とした。

黄体：黄体は卵巣を実体顕微鏡下で押しつぶして数えた。

子宮内卵子の採取：子宮浮遊卵子は、子宮内を修正KRB液で灌流後、実体顕微鏡下で卵子数ならびに卵子の形態等を観察した。実験は以下の3区で行った。

実験4：インドメタシン投与による着床に及ぼす影響

妊娠4日の午前10時にインドメタシンを1匹当たり、0, 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 1.0mgの各濃度を単一皮下投与した。対照群には溶媒のオリーブ油0.1ml皮下投与した。剖検は妊娠6日目に行った。

実験5：インドメタシン投与後の着床の経時的变化

妊娠4日の午前10時にインドメタシンを1匹当たり100 μ g単一皮下投与し、妊娠6, 7, 8日に剖検した。

実験6：インドメタシン投与後、プロスタグランジン子宮内注入が着床に及ぼす影響

妊娠4日の午前10時にインドメタシンを1匹当たり100 μ g単一皮下投与し、24時間後にPGE₂またはPGF₂ α を各50 μ g子宮腔内に注入した。剖検は6日目に行った。

統計処理：回帰、一元配置分散分析およびt検定を用い、P<0.05を有意水準とした。

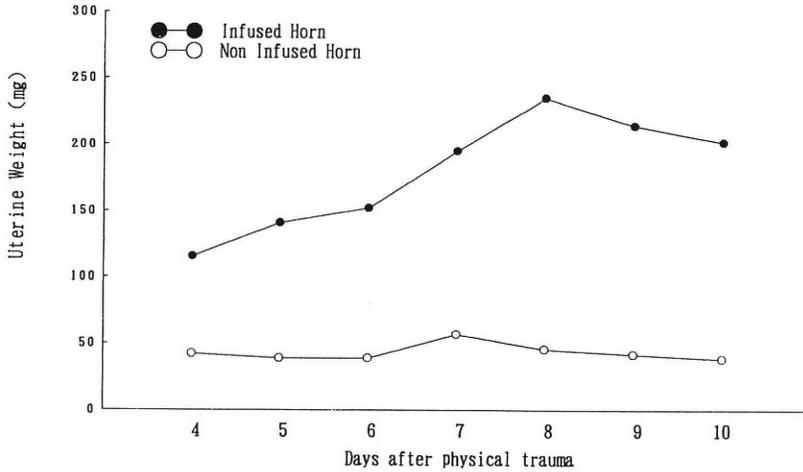


Fig. 2 Effect of physical trauma on uterine weight of mouse

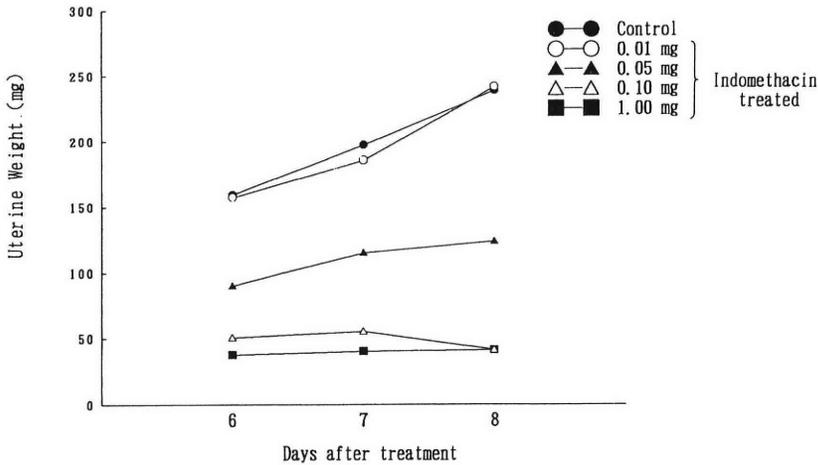


Fig. 3 Change of uterine weight by administration of indomethacin in different days

結果

実験1：マウス脱落膜化過程の子宮重量の変化を 図2に示した。マウスの体重には統計的な差は見られなかった。子宮重量は、子宮創傷後4日から10日まで全て創傷子宮角の方が有意に大きかった ($P < 0.01$)。創傷子宮角の重量の経時変化は、創傷後8日まで有意に増加がみられ ($P < 0.01$)、9日以降減少がみられた。比体重値の経時変化も同様であった。また、子宮の組織像において、脱落膜細胞が存在すること、また創傷後9日以降脱落膜細胞が退行していくのが観察された。

実験2：インドメタシン投与による子宮重量の経時変化を図3に示した。インドメタシン $10 \mu\text{g}$ およ

び $50 \mu\text{g}$ 投与群は、対照群と同様に子宮創傷後6日から8日まで有意に増加した ($P < 0.05$)。しかし、インドメタシン $100 \mu\text{g}$ および 1.0mg 投与群には有意な増加がみられなかった。また、組織切片での観察においても、インドメタシン $100 \mu\text{g}$ 投与で創傷子宮角には脱落膜化形成がほとんどみられなかった。これらのことから、インドメタシン $100 \mu\text{g}$ 以上の投与で脱落膜化形成が抑制されることが判明した。

実験3：インドメタシン投与後、子宮腔内に PGE_2 および $\text{F}_2\alpha$ 注入後の子宮重量の変化を図4に示した。インドメタシン $50 \mu\text{g}$ 投与区で創傷後、生理食塩水、 PGE_2 および $\text{F}_2\alpha$ を注入した区において、創傷子宮角の方が非創傷子宮角より有意に重かった ($P < 0.05$)。インドメタシン $100 \mu\text{g}$ 投与区において、生理食塩水

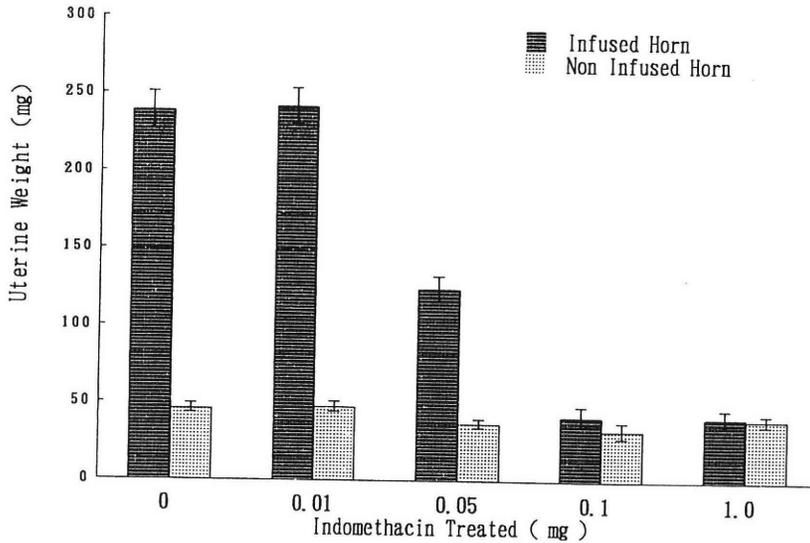


Fig. 4 Effect of indomethacin on uterine weight of mouse (8 days after physical trauma)

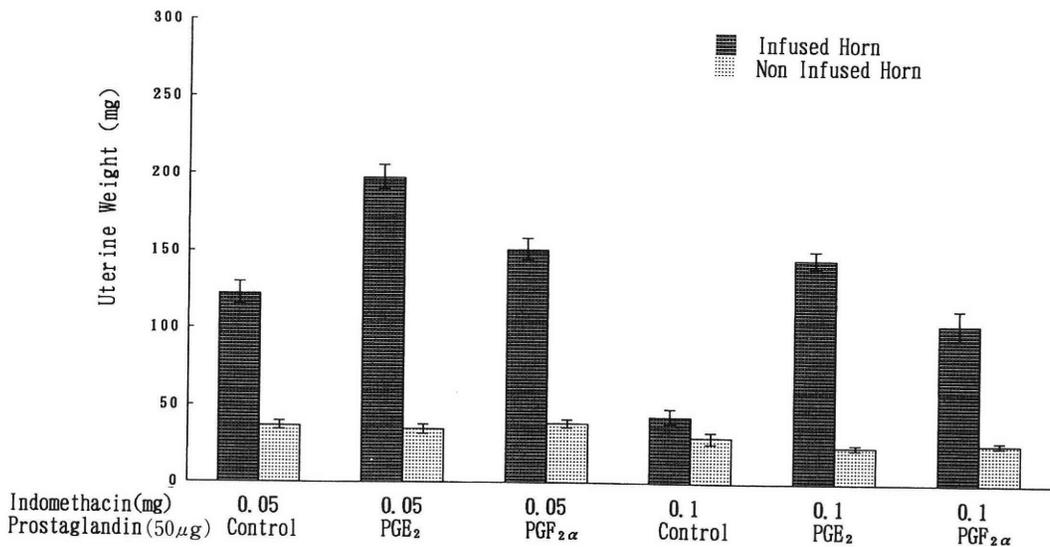


Fig. 5 Effect of prostaglandin E₂ and F₂ α following injection of indomethacin on uterine weight of mouse

を注入した対照区の創傷と非創傷との間には有意差がみられなかった。しかし、PGE₂およびF₂ α注入群で、創傷子宮角が非創傷子宮角より有意に増加した (P<0.05)。PGE₂投与群とF₂ α投与群との間には有意差はみられなかった。

組織切片の観察の結果、インドメタシン100 μg投与群において、脱落膜細胞が観察されなかったが、インドメタシン100 μg投与群、PGE₂およびF₂ α投与群において脱落膜細胞が観察された。

実験4：インドメタシン投与による着床に及ぼす

影響を表1に示した。妊娠6日の各群の黄体数には差がなかったが、着床数はインドメタシン100 μgおよび1.0mg投与群では有意に減少がみられた (P<0.05)。また子宮内浮遊卵子は、インドメタシン100 μgおよび1.0mg投与群で有意に増加がみられ (P<0.05)、変形・退行した卵子については、インドメタシン100 μg投与群と1.0mg投与群の間に統計的な有意差はみられなかったが、1.0mg投与群において増加する傾向がみられた。

実験5：インドメタシン100 μg投与後の着床の経

Table 1 Pretreatment with indomethacin on the status of implantation at 6 days of pregnancy

Dose of Indomethacin	n	No. of Corpus Luteum	No. of Implanted Embryos (%)	No. of Floating Embryos in Uterus	
				Blastocyst (%)	Degenerated (%)
0.00	6	9.8 ± 0.6	9.4 ± 0.4 (96.3)	0	0
0.01	6	8.6 ± 1.0	8.0 ± 1.1 (91.8)	0	0
0.05	6	10.3 ± 0.7	9.5 ± 1.1 (91.4)	0	0
0.10	6	9.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4 (13.8)*	5.5 ± 0.6 (58.9)	1.0 ± 0.4 (11.2)
1.00	6	8.0 ± 0.6	0.5 ± 0.3 (6.9)*	0.8 ± 0.4 (7.1)*	2.5 ± 0.6 (30.6)

*: P<0.05 (Mean ± S.E.)

Table 2 The various status of implantation after injection of 0.1mg indomethacin throughout 6, 7, 8 days of pregnancy

Days of Pregnancy	n	No. of Corpus Luteum	No. of Implanted Embryos (%)	No. of Floating Embryos in Uterus	
				Blastocyst (%)	Degenerated (%)
6	6	9.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4 (13.8)	5.5 ± 0.6 (58.9)	1.0 ± 0.4 (11.2)
7	6	8.9 ± 0.6	2.5 ± 0.6 (27.8)	5.0 ± 0.8 (56.2)	1.5 ± 0.6 (16.8)
8	6	9.3 ± 0.5	7.0 ± 0.5 (76.5)*	0.3 ± 0.6 (4.2)*	1.3 ± 0.5 (16.7)

*: P<0.05 (Mean ± S.E.)

Table 3 Influence of injection of prostaglandin E₂ or F₂α following treatment of 0.1mg indomethacin on implantation

Treatment	n	No. of Corpus Luteum	No. of Implanted Embryos (%)	No. of Floating Embryos in Uterus	
				Blastocyst (%)	Degenerated (%)
Control	5	9.2 ± 0.3	1.3 ± 0.5 (13.6) ^a	5.7 ± 0.6 (59.2) ^a	1.0 ± 0.3 (11.2)
E ₂	5	9.0 ± 0.5	4.0 ± 0.5 (44.0) ^b	3.2 ± 0.5 (36.5) ^b	1.0 ± 0.2 (11.8)
F ₂ α	5	8.8 ± 1.2	1.7 ± 0.3 (27.8) ^a	4.3 ± 0.3 (53.2) ^c	1.0 ± 0.5 (13.1)

^{a-c} Values are significantly different: P<0.05 (Mean ± S.E.)

時的变化を表2に示した。各剖検日の黄体数には統計的有意差がみられなかった。着床数は、妊娠6日と7日の間に差はなく、妊娠8日に有意に減少した(P<0.05)。子宮内浮遊卵子は妊娠6日と7日の間には差がなく、妊娠8日に有意に増加した(P<0.05)。変形・退行卵子数には各妊娠日における差はみられなかった。妊娠6日の子宮内灌流で採取した胚盤胞は、発育段階の違いによるばらつきが観察された。妊娠7日において子宮内灌流で得た胚盤胞は、形態的に正常ではあったが、透明帯剥離の段階のもの、ならびにハッチングしたものなどの卵形で、着床している正常妊娠のものに比べて、かなり遅延していた。

実験6：インドメタシン投与後、プロスタグランジン子宮腔内注入による着床に及ぼす影響を表3に示した。黄体数には差がみられなかったが、着床数はプロスタグランジンF₂αおよびE₂投与によって有意に増加し、PGE₂の方がF₂αより有意に高かった(P<0.05)。子宮内浮遊卵子はPGF₂αおよびE₂投与群の方が対照群より有意に少なく、PGE₂の方がF₂αより有意に少なかった(P<0.05)。変形・退行卵子数には有意な差はみられなかった。

考 察

不完全性周期のラット、マウスにおける脱落膜反応のホルモン支配は、プロジェステロンとエストロジェンによって制御されている¹⁾。Tachi and Tachi⁵⁾は、ラットおよびマウスの脱落膜の形成過程を1)準備期 2)感受状態 3)形成期の3つの部分に分けている。準備期は主として卵巣ホルモンの支配下に行われ、その結果、感受状態に至り、この間に卵子および人為的な刺激が加えられると形成期に入って、脱落膜が形成される。準備期および感受状態の時期には、それぞれの時期に特有な内膜の細胞増殖活動が見られ、それが脱落膜形成の根幹となっている。前者を準備期細胞増殖、後者を形成期細胞増殖と呼んでいる。この準備期細胞増殖の特徴は、プロジェステロンとエストロジェンの相互作用の結果引き起こされ、子宮内膜の間質細胞に局在して起こる^{1,5,6)}。準備期細胞増殖の結果、感受状態が生ずる。この感受状態は、Kraicer and Shelesnyak⁷⁾により10時間前後続く一過性の状態であると報告されており、この間に刺激が加われば間質細胞はさらに増殖し、

形成期に移行するが、刺激が加わらなければ、準備期細胞増殖が終わると同時に、間質細胞の増殖能は失われてしまう。この形成期細胞増殖を誘発する刺激については、子宮内にオイルを入れる、糸を通す、針金で創傷を与える等、様々な種類の物理的な刺激が知られており、いずれも子宮全体の広範囲の刺激が有効である。

これら物理的な刺激以外、Shelesnyak⁸⁾は、脱落膜反応の感受期にあるラットの子宮腔内に、抗ヒスタミン剤を注入しておく、その後内膜に加えた外傷性の刺激による脱落膜反応が制御されることから、ヒスタミンが内膜間質の細胞分裂を誘起する内因性の物質であると推論した。また、Kahlson et al.⁹⁾は、増殖性の高い組織でヒスタミン合成能が増大していると報告し、組織内で新しく生産されたヒスタミンが、細胞増殖能を制御しているのではないかと推察した。さらに、Tachi and Tachi⁹⁾は、内膜組織中に内在性のヒスタミン誘発因子が存在し、脱落膜の細胞増殖に関与すると報告した。

ヒスタミン以外の、内膜組織に内因性の誘発因子として作用する物質の候補として、Tachi and Tachi¹⁰⁾は、プロスタグランジンを考え、偽妊娠5日即ち脱落膜形成の感受期に相当する時期にPGE₂あるいはF₂αを腹腔内に投与したところ、子宮角に脱落膜腫が形成されたと報告した。また、Sananes et al.¹¹⁾は子宮間質細胞を培養して、*in vitro*で脱落膜反応を引き起こさせ、そこにプロスタグランジンが作用していることを示唆した。これらのことから、脱落膜反応にはプロスタグランジンが関与していることが示唆された。

一方、Psychoyos¹⁾は、ラットにおいて、着床卵による誘起または、人為的刺激による誘起のどちらでも、脱落膜反応は子宮内膜の血管の透過性の増加の後に起こり、そして、この増加は脱落膜反応を誘起する上で必須であると報告した。その後、この脱落膜反応に先立って起こる子宮内膜の血管の透過性に関して多くの研究が行われた^{12,13,14)}。その結果、プロスタグランジン生合成阻害物質であるインドメタシンの投与によって、子宮内膜の血管の透過性が減少することを報告し、これらの現象は、インドメタシンによりプロスタグランジンの生合成が阻害された結果であると推察した。さらに、Kennedy¹⁵⁾は、子宮内膜の血管の透過性が増加した部分において、プロスタグランジンの濃度が増加しており、子宮内膜の血管透過性の増加にはプロスタグランジンが関与していると報告した。

Kennedy and Lukash¹⁶⁾は、子宮内膜の血管の透過性が増加した後に、インドメタシンを投与すると脱落膜反応が阻害されたと報告し、プロスタグランジンは、子宮内膜の血管の透過性のみならず、脱落膜反応にも影響するものと推察されている。さらにインドメタシンで脱落膜反応を阻害した後、PGF₂α投与によって、脱落膜反応が誘起されることが報告されている^{17,18)}。

マウスおよびラットにおいて、偽妊娠を誘起する方法は、精管結紮雄との交尾、黄体ホルモン投与、レセルピン投与¹⁹⁾、クロルプロマジン投与、卵巣除去後黄体ホルモン投与等が挙げられる。本実験の偽妊娠誘起率は100%であった。この誘起法における脱落膜反応誘起日を予備実験で調べたところ、偽妊娠5日が最も感受性が高かった。

本実験1の脱落膜反応は、創傷後8日が最高値を示した。また組織学的にも最も良く発達しているのが観察された。

Jonsson et al.²⁰⁾は、マウスを用いて脱落膜反応誘起する前に、2回インドメタシン150 μg/0.1mlを投与したが、脱落膜反応を完全に阻害できなかったと報告している。一方、Rankinら⁴⁾は、インドメタシン150 μg/0.1ml投与によって脱落膜反応を阻害し、またインドメタシン投与によってプロスタグランジンF₂αが急減したと報告している。本実験2において、インドメタシン100 μg投与で脱落膜反応が抑制された。このことから、Rankinら⁴⁾の報告と同様に、インドメタシン単一投与でも脱落膜反応が抑制されることが判った。

Kennedy²¹⁾は、ラットの脱落膜反応において、インドメタシンを皮下投与後の子宮重量の変化から、インドメタシンの阻害効果は比較的短時間だけ作用すると示唆している。本実験3のインドメタシン50 μg投与区において、経時的に子宮重量が増え、Kennedy²¹⁾と同様な結果が得られた。

本実験3の結果から、マウス脱落膜反応にはPGE₂およびF₂αが関与していることが推察された。

Castracane and Shaikh²²⁾やHoffman et al.²³⁾は、脱落膜反応にはPGE₂が関与していると報告し、Jonsson et al.²⁰⁾は、脱落膜反応にはPGF₂αが関与していると推察した。さらに、Kennedy²¹⁾は、インドメタシンの投与により脱落膜反応を抑制したラットの子宮腔内にPGE₂およびF₂αを投与した結果、子宮重量が増加したことより、脱落膜腫の発達には、PGE₂とF₂αの双方が関与していると推察した。Rankinら⁴⁾は、マウスに脱落膜反応誘起の刺激を行うと5分以内にプロ

スタグランジン $F_2\alpha$ が10倍に上昇し、15分以内に cAMP と cGMP が上昇したと報告している。本実験3において、 PGE_2 を注入した子宮重量は、 $PGF_2\alpha$ を注入した子宮重量より重かったことから、脱落膜反応には PGE_2 の関与の方が効果が大いだと推察した。

マウス・ラットの着床機構は、胚盤胞の透明帯剝離の後、胚盤胞の最外壁をなす栄養芽細胞が増殖を繰り返し、粘膜性を増して子宮内膜上皮に接着を開始する。着床の際の胚と子宮内膜上皮細胞との間の接着は、エストロジェンとプロゲステロンの卵巣ホルモンによって制御されている。

Saksena²⁴⁾は、エストロジェンとプロゲステロンに加えてプロスタグランジンが着床に関与しているのではないかと示唆した。また Kennedy¹²⁾ や Phillips and Poyser¹⁴⁾ は、ラットの子宮上皮において、卵子の着床部位が他の部位より PGE_2 、 $PGF_2\alpha$ の濃度が共に高いことを報告している。さらに、Kennedy¹²⁾ や Phillips and Poyser¹⁴⁾ は、妊娠ラットにインドメタシンを投与すると、卵子は着床遅延を引き起こすことを報告している。本実験4において、インドメタシン $100\mu g$ および $1.0mg$ 単一投与区で、同様な着床遅延が観察された。Kennedy¹²⁾ および Phillips and Poyser¹⁴⁾ は、妊娠ラットにインドメタシンを2回もしくは4回投与して、同様な実験を行っている。本実験において、単一投与によって着床遅延が誘起された。

インドメタシン投与後、子宮内を浮遊している卵子が正常に着床するかを実験5で調べたところ、妊娠8日には、子宮内を浮遊していた胚盤胞の大半が着床を開始した。これは、インドメタシンによるプロスタグランジンの生合成阻害効果がなくなり、プロスタグランジンが合成されたためであると推察した。また、辻井²⁵⁾ は、妊娠ラットにインドメタシンを投与すると、卵子は一部着床、一部子宮内浮遊の状態の着床遅延が起り、同一子宮内全部が子宮内浮遊卵子を有する着床遅延ではなかったと報告した。本実験でも同様な状態が観察され、さらに、子宮内浮遊卵子を観察したところ、透明帯剝離の段階やハッチングを起こしたものなど、胚盤胞の発育段階に差がみられた。このことから卵子の発育段階にもプロスタグランジンが関与することが推察された。また、本実験においてポンタミンスカイブルーによる着床部位の判定の際、着床部位が子宮角全体にわたらず、卵管や子宮頸管付近に着床がかたまっているものが数例観察された。このことから、着床時の卵子のスペーシングにもプロスタグランジンが

関与するものと推察された。

実験6において、インドメタシン投与により着床遅延を起こしているマウスの子宮腔内へ PGE_2 および $F_2\alpha$ を注入した結果、 PGE_2 の注入により着床数は有意に増加し、 $PGF_2\alpha$ の注入においても増加する傾向がみられた。

これらのことから、マウスの脱落膜反応および卵子の着床には、ラットと同様プロスタグランジンが関与することが明らかになった。

文 献

- 1) Psychoyos A, Endocrine control of egg implantation. In: Greep RO, Astwood EG, Geiger SR eds, Handbook of Physiology, Section 7 Vol.2 Part 2 Berthesda, MD American Physiological Society p187, 1973
- 2) Kennedy TG, Evidence for the involvement of prostaglandins throughout the decidual cell reaction in rat. Biol Reprod 33: 140, 1985
- 3) Feyles V, Kennedy TG, Inhibitory effect of the intrauterine infusion of phorbol 12-myristate 13-acetate and 1-oleoyl-2-acetyl glycerol on the decidual cell reaction in rat. Biol Reprod 37: 96, 1987
- 4) Rankin JC, Ledford BE, Jonsson HT, et al., Prostaglandins, Indomethacin and the Decidual Cell Reaction in Mouse Uterus. Biol Reprod 20: 399, 1979
- 5) Tachi C, Tachi S, Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. J Reprod Fert 31: 59, 1972
- 6) Marcus GJ, Mitosis in the rat uterus during the estrus cycle, early pregnancy and early pseudo-pregnancy. Biol Reprod 10: 447, 1974
- 7) Kraicer PF, Shelesnyak MC, A physiological method for inducing experimental decidualization of the rat uterus: standardization an evaluation. J Reprod Fert 2: 438, 1963
- 8) Shelesnyak MC, Some experimental studies on the mechanism of ova-implantation in the rat. Recent Progr Horm Res 13: 296, 1957
- 9) Kahlson G, Rosengren E, Steinhardt C, Activation of histidine decarboxylase in tumour cell in mice. Naturer London 194: 380, 1962
- 10) Tachi C, Tachi S, Physiology and genetics of reproduction. In: Coutinho EM and Fuchus F eds, part B Plenum Press, p263, 1974
- 11) Sananes N, Baulieu EE, Le-Goascogne C, Prostaglandin (s) as inductive factor of decidualization in the rat uterus. Mol Cell Endocrinol 6:

- 153, 1976
- 12) Kennedy TG, Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol Reprod* 16: 286, 1977
 - 13) Lundkvist O, Nilsson BO, Ultrastructural changes of the trophoblast-epithelial complex in mice subjected to implantation blocking treatment with indomethacin. *Biol Reprod* 22: 719, 1980
 - 14) Phillips CA, Poyser NL, Studies on the involvement of prostaglandins in implantation in the rat. *J Reprod Fert* 62: 73, 1981
 - 15) Kennedy TG, Prostaglandins and increased endometrial vascular permeability resulting from the application of an artificial stimulus to the uterus of the rat sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 20: 560, 1979
 - 16) Kennedy TG, Lukash LA, Induction of decidualization in rats by the intrauterine infusion of prostaglandins. *Biol Reprod* 27: 253, 1982
 - 17) Lau IF, Saksena SK, Chang MC, Pregnancy blockade by indomethacin, and inhibitor of prostaglandin synthesis: its reversal by prostaglandins and progesterone in mice. *Prostaglandins* 4: 795, 1973
 - 18) Saksena SK, Lau IF, Chang MC, Relationship between estrogen, prostaglandin $F_2\alpha$ and histamin in delayed implantation in the mouse. *Acta Endocrinol* 81: 801, 1976
 - 19) 辻井弘忠, レセルピン投与ラットにおける脱落膜反応について, *日本不妊学会誌* 34: 361, 1989
 - 20) Jonsson HT, Rankin JC, Ledford BE, et al., Uterine prostaglandin levels following stimulation of the decidual cell reaction: effects of indomethacin and tranilcypromine. *Prostaglandins* 18: 847, 1979
 - 21) Kennedy TG, Evidence for the involvement of prostaglandins throughout the decidual cell reaction in the rat. *Biol Reprod* 33: 140, 1985
 - 22) Castracane VD, Shaikh AA, Effect of decidual tissue on the uterine production of prostaglandins in pseudopregnant rats. *J Reprod Fert* 46: 101, 1976
 - 23) Hoffman LH, Strong GB, Davenport GR, et al., Deciduogenic effect of prostaglandins in the pseudopregnant rabbit. *J Reprod Fert* 50: 231, 1977
 - 24) Saksena SK, Lau IF, Chang MC, Relationship between oestrogen, prostaglandin- $F_2\alpha$ and histamin in delayed implantation in the mouse. *Acta Endocr* 91:801, 1976
 - 25) 辻井弘忠, インドメタシンによるラット着床遅延について, *信州大学農学部紀要* 21:49, 1984

**Effect of indomethacin and prostaglandins
on decidual cell reaction
and embryo implantation in mouse**

Hirotada Tsujii and Makoto Moro

Department of Agriculture
Biotechnology Faculty of Agriculture
Shinshu University, Nagano 399-45, Japan

This experiment was conducted to determine the effect of indomethacin and prostaglandins on decidual cell reaction and embryo implantation in mice. The uterine horns of mouse pseudopregnant by progesterone were received the treatment of physical trauma and were observed with time course.

The result was that both the uterine weight and formation of decidual cells by 8 days after physical trauma were the highest. Pretreatment of 0.1 or 1.0 mg indomethacin completely blocked the decidual cell reaction. Decidual cell reaction, however, was induced when uterine horn was treated with the injection of prostaglandin E_2 or $F_2\alpha$ following the injection of indomethacin. At 4 days of pregnancy, the single injection of indomethacin resulted in the delay of implantation, therefore significantly decreased the number of implanted embryos, and significantly increased the number of floating embryos within uterus. Furthermore, intraluminal injection of prostaglandin E_2 or $F_2\alpha$ influenced the beginning of embryo implantation and increased the number of implanting embryos. From these results, it is considered that prostaglandins is related to decidual cellreaction and may stimulate the implantation of embryo in mice.

(受付: 1994年2月23日)

(受理: 1994年4月26日)

男性不妊の精子DNAに関する基礎的研究 — Acridine Orange test および Flow cytometry による ヒト精子DNAヒストグラム —

A Basic Research for Male Infertility

— Acridine Orange Test and Flowcytometric DNA Analysis of Human Sperm —

神戸大学医学部泌尿器科学教室

(主任：守殿貞夫教授)

岡本 恭行
Yasuyuki OKAMOTO

岡田 弘
Hiroshi OKADA
守殿 貞夫
Sadao KAMIDONO

松本 修
Osamu MATSUMOTO

Department of Urology

Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan

男性不妊に対してA.O.testとFCMによる精子DNAヒストグラム解析を行い検討した。A.O.testを正常群(n=60)と不妊群(n=129)を比較し、緑染率は正常群が有意に高かった(p<0.05)。不妊群において、他の精子パラメータと比較したところ、精子侵入率のみと有意な相関(p<0.01)を認めしたが、濃度、運動率、奇形率とは相関を認めなかった。

FCMによる精子DNAヒストグラムで% sperm peakを測定し、正常群(n=43)と不妊群(n=81)を比較したところ正常群が有意に高かった(p<0.05)。% sperm peakを他の精子パラメータと比較したところ濃度、奇形率、侵入率と相関を認めしたが運動率とは相関を認めなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 322 - 330, 1994)

緒 言

男性の妊孕力の評価は主として精子濃度、精子運動率、精子奇形率など量的および形態的な精液検査によってなされてきた。しかし、これらの精液検査所見だけでは必ずしも妊孕力を正確に把握しえないことは、臨床上経験されることである。そのような背景から妊孕力の評価には精子の質(quality)すなわち精子の機能的な面からの新しい評価が必要と考えられるに至った。その方法としては透明帯除去ハムスター卵を使用した精子侵入試験 sperm penetration assay (以下SPA)による精子授精能検査や hyposmotic swelling test などの有用性が報告されている¹⁻³⁾。しかし、最も有用とされるSPAは手技が繁雑すぎるた

めにルーチン検査として実施することは困難であるため、妊孕力と相関し比較的容易に施行できる精子の質の評価法が求められている。

今回は男性不妊を対象として、acridine orange test⁴⁾およびflow cytometry (以下FCM)による精子DNAヒストグラム解析の両者を用い、精子の質の評価の一つとしての精子DNA解析の臨床的有用性について検討した。また、精子濃度など従来の精液検査のパラメータとDNA解析結果の関連性についても述べる。

対象および方法

1. Acridine orange (以下AO) test

対象：対象は当施設の男性不妊外来に通院中の、不妊歴が1年以上で、配偶者に不妊原因を認めない

患者129例。内訳は精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の乏精子症62例(乏精子症群), 精子濃度は $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上と正常であるが, 運動率が50%未満と低い精子無力症44例(精子無力症群)および精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上, 精子運動率50%以上, 正常形態精子率50%以上とこれら精液所見には異常がないにもかかわらず不妊歴1年以上の23例(原因不明不妊群)である。対照は, 不妊エピソードが全くなく, 妻が現在妊娠中か1年以内に児を得ている妊孕性の確認された男子60例(正常対照群)である。

方法: 4日間の禁欲の後, マスターベーションにより清潔なカップに精液を採取, その一部をAO testに供した。AO testの手技はTejadaら⁴⁾の方法に準じた(Fig. 1)。

TC-Tyrod's solutionで精子浮遊液を作製, Carnoy液で固定, スライドガラスに塗沫風乾後, 0.1%AOを含むstaining solutionで染色し, 蛍光顕微鏡下に精子頭部の染色性を観察した。蛍光顕微鏡はカールツァイス社製スタンダード18落射型, 励起フィルターは

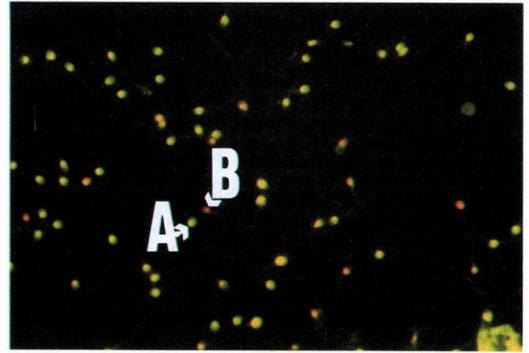


Fig. 2 Acridine Orange testの染色像
頭部が緑染した正常精子(A)と赤染した変性精子(B)

485nm, カットフィルターは520nmのものを使用し, 1検体あたり200精子を評価した。

本法では, 頭部が緑染する精子と赤染する精子とが観察され(Fig. 2), 緑染精子がDNAに変性を認めない精子である⁴⁾。これら緑染精子が全精子中に占める率を精子緑染率とした。この値が高いほど良好精子の割合が高いことを意味する。精子のなかには黄色などの中間色や, 緑色と赤色の部分が混在して不均一に染色されるものも少数存在したが, これらの非定型的な精子は緑染精子から除外した。

2. FCMによる精子DNA解析

対象: 不妊外来患者81例(乏精子症群40例, 精子無力症群30例および原因不明不妊群11例)を対象とした。濃精液(白血球数 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以上)の症例は対象から除外した。AO testと同様の正常対照群43例を用いた。

方法(Fig. 3): 精液を約1時間静置し十分に液化後PBSを加え攪拌後, 400g, 5分間の遠沈処理にて精子を2回洗浄した。ついで 4°C にて70% ethanolで24時間固定した。つづいて, 0.1% RNase (Sigma Type II -B)で30分間(37°C), さらに0.5% pepsin (Sigma)で15分間(37°C)処理した。PBSで洗浄後 $10 \times 10^6/\text{ml}$ に濃度調整した精子浮遊液0.5mlに等量のPropidium iodide溶液($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS)を加え 37°C で5分間染色したものを測定試料とし, Flow cytometer (Ortho社 Spectrum III)で上記試料のDNAヒストグラムを測定した。測定に際して, ヒト末梢血リンパ球をdiploid (2C)の標準試料として用い, このpeakを蛍光強度80 channelに調整した。正常対照群で得られた精子DNAヒストグラムは, 高くシャープなsperm peakがhaploid (1C)の左方に出現していた。これに対して不妊患者では, sperm peakが右方に拡大する傾向があり, 2Cにpeakを認める例もみられた(Fig. 4)。cell debrisはsperm



Fig. 1 Acridine Orange test

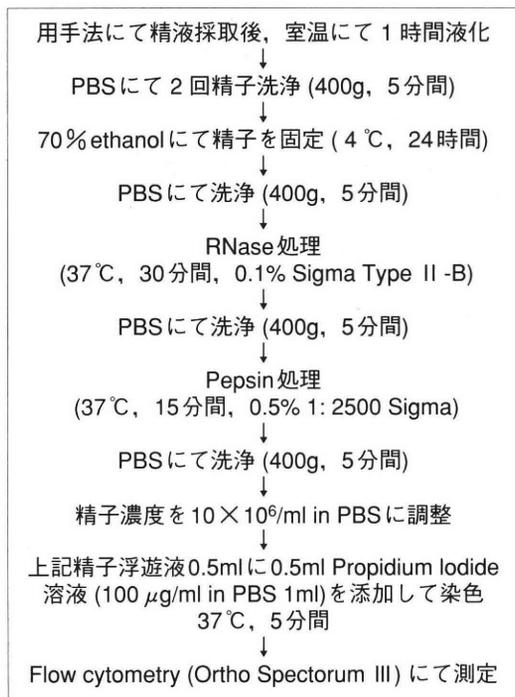


Fig. 3 flow cytometry による精子 DNA 測定

peak の左方に位置していた。

DNA ヒストグラムの評価は、付属のコンピュータシステム DS-1 によって % sperm peak (sperm peak 内の細胞数/全細胞数-cell debris の数) と sperm peak の分散係数 coefficient of variation (以下 CV 値) を算定しこれらをパラメータとした。% sperm peak は大きい程 mature sperm の占める率が高いことを、逆に小さい場合には

immature sperm や spermatid などの混在する割合が大きいことを示している、sperm peak の CV 値は sperm peak 内の細胞の DNA 量のばらつきを表し、その (標準偏差/平均) $\times 100$ (%) で求められる。FCM による精巣組織内 DNA 量分布測定では不妊群では正常群に比べて 1-C の peak の CV 値は有意に大きい⁵⁾。

3. 一般的精液検査成績との関連

AO test および DNA ヒストグラム解析を行った検体について、精子濃度、精子運動率および精子奇形率などの各パラメータを測定し、それらとの関連を検討した、奇形率は Papanicolaou 染色により算定した。一部の検体については浜口ら³⁾の方法により SPA を行い、AO test および DNA ヒストグラム解析の成績との関連を検討した。SPA は透明帯を除去したハムスター卵と、前培養した精子を混和培養し、精子が卵内に侵入のうえ雄性前核の発生を確認することで精子の受精能を評価した。

結 果

1. AO test

(1) 不妊群と正常対照群の精子緑染率 (Fig. 5)

正常対照群の精子緑染率は 66 ~ 100% に分布したが、大部分の症例が 85 ~ 100% に集中し、平均 \pm SD は $92.3 \pm 7.3\%$ であった。これに対して、不妊群 129 例の緑染率は 12 ~ 97% と広範囲に分布し、その平均 \pm SD は $76.0 \pm 19.5\%$ で、正常対照群に比して推計学的に有意に ($p < 0.05$) 低い精子緑染率を示した。不妊群を病態別にみると、乏精子症群では $73.7 \pm 20.8\%$ 、精子無力症群では $70.9 \pm 20.5\%$ 、原因不明不妊群では

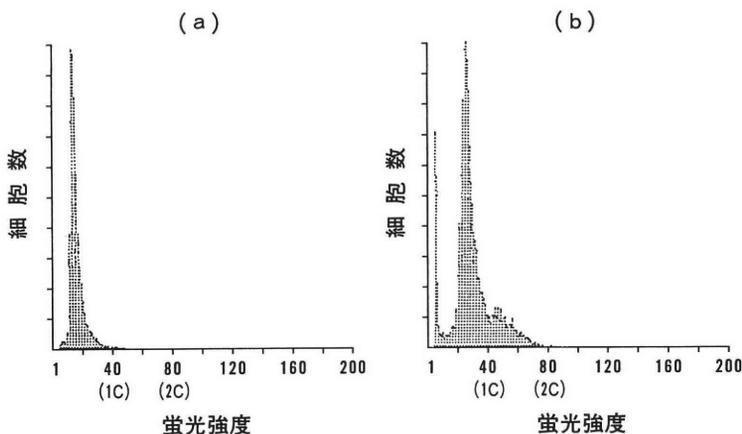


Fig. 4 FCM による精子 DNA 量分布

縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。蛍光強度 40 は 1C, 80 は 2C に相当する。

(a) 正常男子例。1/2-C に集中し、CV 値は小さい。

(b) 不妊症例。1/2-C の右側に spermatid の peak がみられる。CV 値は大きい。

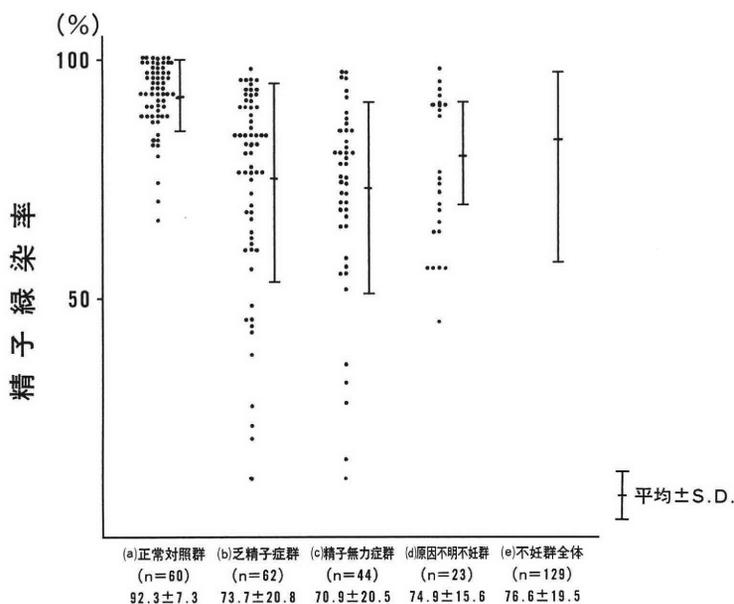


Fig. 5 Acridine orange testにおける精子緑染率 (不妊群と正常対照群)
 推計学的に, (a) vs (b) $p < 0.05$, (a) vs (c) $p < 0.05$, (a) vs (d) $p < 0.05$, (a) vs (e) $p < 0.05$

74.9 ± 15.6%で、3群間に有意差はみられなかった。しかし、正常対照群と比較すると、上記3群ともに有意に低い精子緑染率を示した ($p < 0.05$)。正常対照群の平均 - 2SDである77%を精子緑染率の正常下限値とし、77%未満を異常とすると、不妊群全体では129例中66例(51.2%)が、乏精子症群では62例中28例(45.2%)、精子無力症群では44例中24例(54.5%)、原因不明不妊群では23例中14例(60.9%)がそれぞれ異常と判定された。

(2) AO test と他の精子パラメータ (Table 1)

精子濃度、精子運動率および精子奇形率と精子緑染率との関連を不妊群全体129例で検討したが、いずれも相関関係を認めなかった。

精子無力症群および原因不明不妊群の計67例に限定した検討でも、 $r = 0.11$ と精子運動率と精子緑染率に相関は認められなかった。

乏精子症群30例、精子無力症群19例、原因不明群11例の計60例での精子緑染率とSPAにおける精子侵

入率 (Table 1) との間には相関関係を認めた。また、精子緑染率が正常 (77%以上) のものでは29例中23例 (79.3%) が正常の精子侵入率 (10%以上³⁾) を示したのに対して、精子緑染率が異常 (77%未満) のものでは31例中11例 (35.5%) と低く、有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

2. FCMによる精子DNAヒストグラム

(1) % sperm peak と sperm peak のCV値

検討した正常対照群と不妊群の全例124例について、% sperm peak と sperm peak のCV値との2つのパラメーターの相関性を検討したところ、推計学的に有意に ($p < 0.001$) 強い負の相関を認めた (Fig. 6)。他の精子パラメーターとの関連性についての検討でも、両

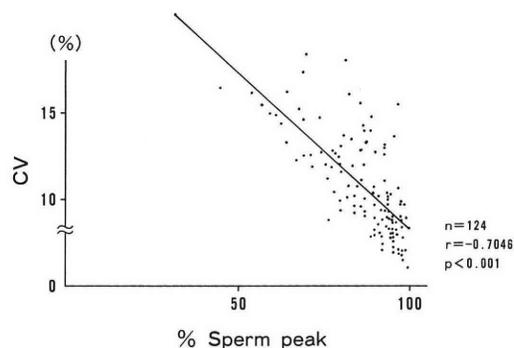


Fig. 6 FCMによる% sperm peak と sperm peak のCV値
 良好な負の相関を認めた

Table 1 精子緑染率と各精子パラメータとの相関

精子パラメータ	相関係数	有意差
精子濃度 ^{a)}	$r = 0.004$	n.s.
精子運動率 ^{a)}	$r = 0.105$	n.s.
精子奇形率 ^{a)}	$r = 0.128$	n.s.
精子侵入率 ^{b)}	$r = 0.404$	$p < 0.01$

a); $n = 129$, b); $n = 60$, n.s.; not significant

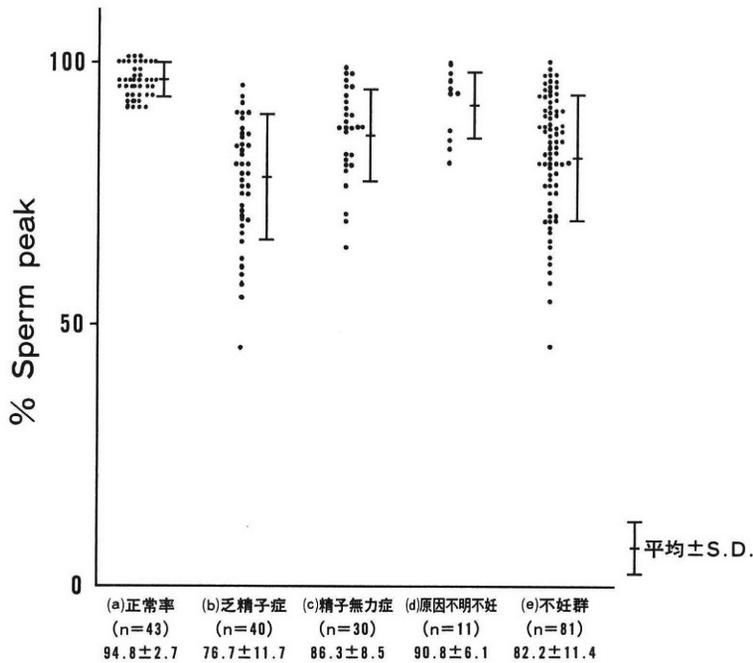


Fig. 7 FCMによる% sperm peak (正常対照群と不妊群)
 (a) vs (b) $p < 0.05$, (a) vs (c) $p < 0.05$, (a) vs (d) n.s., (a) vs (e) $p < 0.05$

者ともにほぼ同様の傾向を示したので、これ以降は原則として% sperm peakに関する成績を示す。

(2) 不妊群と正常対照群の比較 (Fig. 7)

% sperm peakは正常対照群43例では $94.8 \pm 2.7\%$ (平均 \pm SD)であったのに対して、不妊群全体81例では $82.2 \pm 11.4\%$ と低値を示し、有意差 ($p < 0.01$) が認められた。sperm peakのCV値は正常対照群 $8.3 \pm 1.1\%$ に対して、不妊群 $12.2 \pm 3.3\%$ と有意に ($p < 0.01$) 大きかった。このことは正常群ではmature spermが精液中の細胞の大部分を占め、しかもsperm peakがsharp、すなわちspermのDNA量が均一であるのに対して、不妊群ではsperm peakがゆるやかでspermのDNA含量にばらつきが多く、mature sperm以外の細胞成分を比較的多く含むことを示している。不妊群の% sperm peakを乏精子症群、精子無力症群、原因不明不妊群別にみると、それぞれ 76.7 ± 11.7 、 86.3 ± 8.5 および $90.8 \pm 6.1\%$ (平均 \pm SD)で、とくに乏精子症群では正常対照群および精子無力症群に比して有意に ($p < 0.01$, $p < 0.05$) 低かった。

正常対照群の平均-2SDである89%を% sperm peakの正常下限値とすると、乏精子症群では40例中34例(85.0%)、精子無力症群では30例中19例(63.3%)、原因不明不妊群では11例中4例(36.4%)がそれぞれ異常と判定された。

(3) % sperm peakと他の精子パラメータとの関連 (Table 2)

不妊群81例の% sperm peakと精子濃度とは、有意の正の相関がみられた。しかし、運動率との相関は認められなかった。精子濃度の影響を少なくするために、精子無力症群と原因不明不妊群の計41例に限定して検討しても、運動率と% sperm peakとの間には相関はなかった。

精子奇形率とは有意に負の相関が認められた。しかし、不妊群の81例を奇形率が50%未満の49例と50%以上の32例に分けて% sperm peakの異常(89%未満)頻度をみると、前者では49例中31例(63.3%)、後者では32例中25例(78.1%)と後者で高率であったが、両者間に有意差を認めなかった。

SPAを同時に施行した乏精子症22例、精子無力症18例および原因不明不妊7例の計47例の精子侵入率

精子パラメータ	相関係数	有意差
精子濃度 ^{a)}	$r=0.483$	$p < 0.001$
精子運動率 ^{a)}	$r=0.139$	n.s.
精子奇形率 ^{a)}	$r=-0.398$	$p < 0.001$
精子侵入率 ^{b)}	$r=0.343$	$p < 0.05$

a); $n = 81$, b); $n = 47$, n.s.; not significant

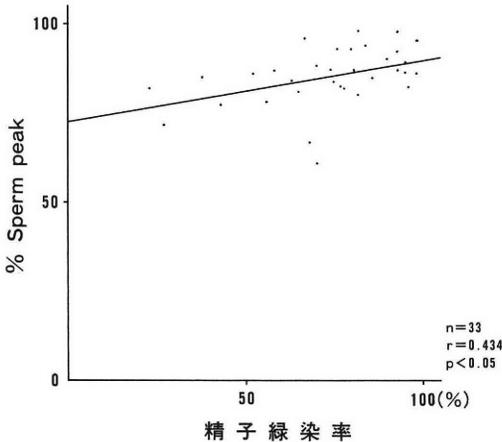


Fig. 8 精子緑染率と% sperm peak
両者に正の相関を認めた

と% sperm peakとの間には相関を認めた。これらの症例を% sperm peakが正常(89%以上)の21例と異常(89%未満)の26例に分けて、精子侵入率が正常(10%以上)である割合をみると、前者では21例中17例(68%)であったのに対して、後者では26例中10例(38.5%)と有意に($p<0.01$)低く、% sperm peakとSPAの関連性が示唆された。

(4) % sperm peakと精子緑染率の関係

不妊群33例(乏精子症19例, 精子無力症13例, 原因不明不妊症1例)の精子緑染率と% sperm peakとの間には正の相関を認めた(Fig. 8)。

考 察

受精により精子核は膨潤し、精子DNAは脱凝縮して卵DNAとの相互作用で受精卵のゲノムを形成する⁹⁾。このように精子DNAは受精後の最も初期において重要な役割をはたすので、その変性は授精力の低下につながる可能性がある。

精子核クロマチンは主に塩基性蛋白である histone および微量の non-histone 蛋白からなるDNAにより構成されRNAと結合状態にある。精巣内での spermatid → spermatozoa への成熟過程で、somatic type histone が sperm specific basic histone (protamine) に置換されることにより、核クロマチンの凝縮が起こる⁷⁾。しかし、精巣内に滞留している精子核クロマチンはまだ不安定で、精巣上体・精管と精路を通過してゆくにしたがって、安定化する⁸⁾。精子の成熟ともなってクロマチンやDNAの安定化もおこってくるので、精子核の成熟度と精子の質とが相関する可能性が示唆される。

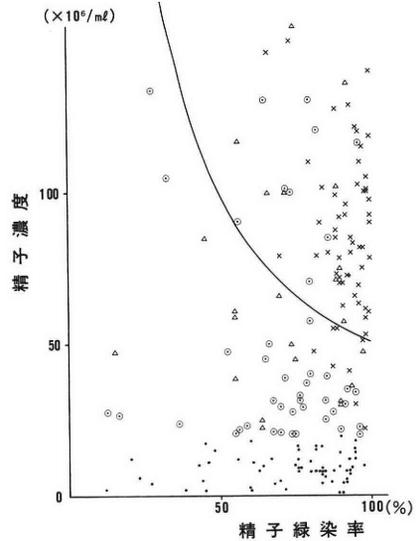


Fig. 9 精子緑染率と精子濃度
× 正常対照群 (n=60) ○ 精子無力症群 (n=44)
・ 乏精子症群 (n=62) △ 原因不明不妊群 (n=23)
曲線はeffective sperm count
(精子濃度×精子緑染率)= $50 \times 10^6/ml$ を表す

精子核の成熟度をみる方法として、未熟な精子は sodium dodecyl sulfate 溶液中で核の膨化がおこることを利用した、精子核クロマチン脱凝縮試験⁹⁾、somatic type histone を暗青色に染色し、protamine は染色されないため未熟な精子頭部は青色に染まることを利用した acidic aniline blue 染色^{10,11)}、そして今回検討した AO による染色が報告されている。

AO は、2本鎖DNAと結合すると緑色の蛍光を、1本鎖DNAとの場合には赤色の蛍光を発する色素である。精子の凍結融解処理や加熱処理によって、精子緑染率が低下する^{11,12)}ことから AO test は変性精子クロマチンの検出に有用と考えられている。また、その結果が acidic aniline blue 染色の結果と有意な相関を示すことから¹⁴⁾、AO test もまた精子核クロマチンの成熟度の指標と考えられる。今回の AO test の検討で、正常対照群の精子緑染率に比して、不妊群のそれは有意に低率であったが、これは Tejada らの報告⁴⁾と一致した結果であった。精液所見上は全く異常のない原因不明不妊群においても乏精子症群および精子無力症群と同程度の異常率を示したことは、AO test が不妊の機能的診断法として有用であることを示唆している。これは原因不明不妊群と正常群との2

群間比較で、前者の精子緑染率が有意に低かったとする Peluso らの成績¹⁵⁾と一致するものである。

精子緑染率と精子濃度、精子運動率、および精子奇形率との各精子パラメータとは明らかな相関を認めなかった。精子濃度、運動率と相関しないことは他の報告と一致しているが、精子奇形率については精子緑染率と逆相関するとされており^{4,16)}、今回の成績は一致しなかった。今回の検討では個々の精子奇形と AO test の染色結果との関連を詳細にはみていないが、奇形精子が形態正常精子に比べて赤染する率が明らかに高いという成績ではなかった。ここにデータを示していないが、swim up 法によって回収した運動良好精子は、原精液の精子に比して奇形率は低く、精子緑染率は高くなっていったことから、精子奇形と精子核の異常とはある程度は関連するものと考えている。

精子緑染率と精子侵入率 (SPA) とは有意な相関があり、AO test は精子授精能の評価に有用と考えられた。

AO test における精子緑染率が、IVF における受精率と関連するという報告¹⁶⁾がある。一方で、精子緑染率と SPA の結果には全く関連がないとする報告¹⁷⁾もあり、これらの報告の範囲では DNA の異常と精子授精能の関連性を明確にすることはできない。受精に際しての卵膜への結合部位として、先体反応や DNA の脱凝縮を惹起するとされている精子膜のヘパリン結合部位が、正常例と同じように AO test 異常例にも存在することから、DNA の異常が直接的には受精機構に影響しないとする報告もある¹³⁾。

精子核 DNA 量測定に使用する色素としては、他の細胞核 DNA 量測定と同様に、PI のほか ethidium bromide (EB)²²⁾、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)²³⁾ が使用されているが、今回は一般的に DNA 解析に最もよく使用される PI を使用した。PI は DNA および 2 重鎖 RNA に intercalate する蛍光色素で、生細胞の膜は通過しない。したがって細胞の DNA 量測定には、細胞の固定および 2 重鎖 RNA の除去を目的とした RNase による前処理が必要である。精巣組織や精子の場合にも、固定には一般に DNA 解析に使用される 70% エタノールを使用する^{18,22)}。

今回の測定の前処理としては、70% エタノールによる固定、RNase 処理、ついで pepsin 処理を行った。これらは FCM による核 DNA 量測定法として一般的な方法であるが¹⁸⁾、RNase 処理は、予備実験ではほとんどヒストグラムに影響しなかった。これは、精子ないし精巣組織細胞にほとんど 2 重鎖 RNA が含ま

れないため^{18,21)}、RNase 処理の省略も可能と考えられる。それに対し pepsin 処理は裸核化し、核の DNA 以外の影響をとりのぞき、mature sperm peak の CV 値を小さくすると報告もあり²⁴⁾、必要な処理と考えた。

正常対照群では sperm peak が sharp なのに対して、不妊群では sperm peak が幅広く、ゆるやかな症例が多かった。不妊群では immature sperm や spermatid が精液中に多く含まれる結果と考えられる^{22~24)}。精巣での spermatogenesis および spermiogenesis の過程での spermatogonia → primary spermatocyte → secondary spermatocyte → spermatid → spermatozoa の変化にもなって DNA 量は diploid (2C) → tetraploid (4C) → diploid (2C) → haploid (1C) → haploid (1C) と変化するが、spermatid が spermatozoa に成熟するにつれて核の凝縮により本来の DNA 量の 1C よりも小さく測定され、ヒストグラム上は左方に移動する^{18,26)}。従って、mature sperm の peak は 1C よりも左方 (1/2C 付近) に位置するとされており^{18,23,24)}、今回の検討でも同様の結果であった。また、不妊群では前述のように sperm peak が幅広いのみでなく、diploid (2C) の位置に spermatogonial G₁ cell, preleptotene primary spermatocyte, secondary spermatocyte の各精上皮細胞あるいは白血球などの体細胞によると考えられる peak が存在する症例もみられる^{23,24)}。精子ヒストグラムの評価には、今回 % sperm peak と sperm peak の CV 値とをパラメータとしたが、両者は有意な負の相関を示し、正常対照群に比して不妊群では % sperm peak が有意に低値で、sperm peak の CV 値は有意に大きかった。不妊群では mature sperm 以外の細胞成分すなわち immature sperm や spermatid あるいは剥離精上皮細胞が精液中に多く混入しているため % sperm peak が小さく、また、immature sperm が多いため DNA 量が不均一であることが、sperm peak の CV 値を大きくしていると考えられる。今回の検討では明らかな濃精液症を対象から除外したが、濃精液があれば % sperm peak は当然影響を受けて小さくなると考えられる。

Hettwer ら²⁵⁾は sperm peak の CV 値が乏精子症例では正常例より有意に大きく、また、haploid peak の幅、高さ、位置から算出したパラメータによって造精機能障害の状態が診断可能としている。今回の成績でも乏精子症群では、% sperm peak が異常に小さい症例が大部分で、造精機能障害例では DNA ヒストグラムに異常を示すことが明らかにされた。

精子奇形率と % sperm peak は負の相関を示し、中川らの報告²²⁾と類似していた。しかし、teratozoospermia

の有無で2群に分けて検討した結果では、両群間で有意差はなく、精子奇形が直接DNAヒストグラムの異常に関連する可能性は少ないと考えられた。

SPAとの関連では% sperm peakとSPAの精子侵入率とが有意な相関を示し、また、% sperm peakが異常な症例では、正常群よりも精子侵入率が低いことから、精子DNAの異常が精子授精能と関連するものと考えられた。

今回のAO testならびにFCMによる精子DNAヒストグラムの解析から、両者ともSPAと相関関係を持ち、AO testの緑染率とFCMの% sperm peak間にも正の相関をもつことが確かめられ、これらは互いに関連性をもつことより、精子核クロマチンの未熟性が精子授精能の低下と関連する可能性が示唆された。

以上より、精子の質の評価のためには、AO testやFCMをはじめとする精子DNAについての検討は有用な方法と考えられた。

結 語

1. A. O. testにおいて、不妊群は正常群に比べ有意に低い精子緑染率を示した。
2. A. O. testと他の精子パラメータとの関連をみたところ、精子濃度、運動率、奇形率とは相関関係を認めなかったがSPAとは有意な正の相関を認めた。
3. FCMにより% sperm peakを測定したところ不妊群は正常群に比べ有意に低かった。
4. FCMで測定した% sperm peakと他の精子パラメータとの関係をみたところ濃度、SPAとは正の相関、奇形率とは負の相関を認めた。
5. A. O. testやFCMによる精子DNAヒストグラム分析の成績は精子授精能と関連性を持ち、精子の質の評価に有用であると考えられた。

本研究の要旨は第30回(東京, 1985年)および第32回(金沢, 1987年)日本不妊学会総会で発表した。

文 献

- 1) 松本 修, 浜口毅樹, 篠崎雅史 他, 精子からみた問題点—とくに精液検査の正常値と妊孕力の評価に関する検討. 泌尿紀要 34: 1959, 1988
- 2) 片山 喬, 総説 男性不妊. 日泌尿会誌 81: 1287, 1990
- 3) 浜口毅樹, 松本 修, 守殿貞夫, 男性不妊における精子授精能に関する研究—透明帯除去ハムスター卵使用によるハムスターテスト. 泌尿紀要 32: 1867, 1986
- 4) Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, et al., A test for the practical evaluation of male fertility by acridine

orange (AO) fluorescence. Fertil Steril 42: 87, 1984

- 5) 川井修一, Flow cytometryによる睾丸内精子形成能の評価判定 第2報: 男性不妊症患者の精子形成能の評価. 泌尿紀要 31: 87, 1985
- 6) Zirkin B, Soucek D, Chang TSK, et al., In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. Gamete Res 11: 349, 1985
- 7) Grimes SR, Meistrich ML, Platz RD, et al., Nuclearprotein transition in rat testis spermatids. Exp Cell Res 119: 31, 1977
- 8) Bedford JM, Carvin HZ, Cooper GW, The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Reprod Fertl 18 (suppl.): 199, 1973
- 9) Colleu D, Lescoat D, Boujard D, et al., Human sperm nuclear maturity in normozoospermia and asthenozoospermia. Arch Androl 21: 155, 1988
- 10) Pellicciari C, Hosokawa Y, Fukuda M, et al., Cytofluorometric study of nuclear sulphhydryl and disulphide groups during sperm maturation in the mouse. J Reprod Fertl 68: 371, 1983
- 11) Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML, Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. Andrologia 20: 211, 1988
- 12) Royere D, Hamamah S, Nicholle JC, et al., Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa; fluorescence acridine orange staining and feulgen-DNA cytophotometric studies. Gamete Res 21: 51, 1988
- 13) Evenson D, Darzyn Kiewics Z, Melaned MP, Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 210: 1131, 1980
- 14) Roux C, Dadoune JP, Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat treatment; evaluation of the chromatin condensation. Andrologia 21: 275, 1989
- 15) Peluso JJ, Luciano AA, Nulsen JC, The relationship between alterations in spermatozoal deoxyribonucleic acid, heparin binding sites, and semen quality. Fertil Steril 57: 665, 1992
- 16) Ibrahim, ME, Pedersen H, Acridine orange fluorescence as male fertility test. Arch Androl 20: 125, 1988
- 17) Sterzik K, Rosenbusch B, Sasser V, et al., The acridine orange test. A new parameter in assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. Zentralbl Gynakol 111: 1361, 1989
- 18) 中川恵彰, 浅井光興, 野口昌良 他, 精液検査としてのヒト精子DNA量の測定. 日不妊会誌 32: 614, 1987

- 19) Hartmann W, Hettwer H, The flow cytometry for diagnosis of male fertility. *Acta histochem* 73: 243, 1983
- 20) 川井修一, Flow cytometry による 辜丸内精子形成能の評価判定 第1報: ヒト辜丸組織内DNA量分布測定の基礎的検討. *泌尿紀要* 30: 1021, 1984
- 21) Evenson DP, Melamed MR, Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 248, 1983
- 22) Spano M, Calugi A, Capuano V, et al., Flow cytometry and sizing for routine and andrological analysis. *andrologia* 16: 367, 1984
- 23) Clausen OP, Abyholm T, Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cell in the investigation of male infertility. *Fertil Steril* 34: 369, 1980
- 24) Hettwer H, Hofmann N, Ehle B, et al., Shape and position of the haploid peak in flow cytometric sperm histograms for the assessment of andrological diseases. *andrologia* 18: 312, 1986

A Basic research for male infertility

—Acridine orange test and flowcytometric DNA analysis of human sperm—

Yasuyuki Okamoto, Hiroshi Okada
Osamu Matsumoto and Sadao Kamidono

Department of Urology

Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan

Spermatozoa from infertile patients were submitted Acridine Orange (A.O.) test using fluorescent microscopy and DNA histogram analysis to know the possible deficit of the sperm function.

A.O. test revealed that spermatozoa from fertile donors (n=60) had more green-stained sperm (good sperm) than those from infertile patients (n=129) (p<0.05). Percentage of green-stained sperm was solely correlated with hamster-egg sperm penetration rate. We could not find any correlation between percentage of green-stained sperm and the other sperm parameters, (eg. sperm density, sperm motility, and percentage of abnormal formed sperm).

A flowcytometry was utilized to analyze the DNA histogram of spermatozoa to calculate the % sperm speak, which represents the percentage of good spermatozoa. Spermatozoa from fertile donors (n=43) had higher value of % sperm peak than those from infertile patients (n=81). And % sperm peak had correlation with sperm density, percentage of abnormal formed sperm and hamster-egg sperm penetration rate, however it had no correlation with sperm motility.

From these results A.O. test and DNA histogram analysis can be effective methods to evaluate the sperm function.

(受付: 1994年3月25日特掲)

(受理: 1994年4月28日特掲)

体外受精・胚移植 (IVF-ET) における排卵誘発法に関する検討 —GnRH agonist long protocol法と short protocol法の比較—

Ovarian Stimulation with Long Protocol or Short Protocol of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist for In Vitro Fertilization

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

(主任：永田行博教授)

福元清吾

Seigo FUKUMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology

Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

IVF-ETの排卵誘発にGnRH agonist long protocol (long) 法と short protocol (short) 法のいずれが有用かを検討した。long法群58例(99周期)とshort法群35例(45周期)でhMG投与日数、hMG総投与量、採卵成績、受精率、卵割率、着床率、妊娠率、流産率、子宮内膜厚および内分泌動態を比較し、次の結果が得られた。

①hMG投与日数およびhMG総投与量は両法間に差はなかった。②採卵キャンセル率、穿刺卵胞数、採卵数および採卵率に両法間で差はなかった。③Grade IIIの卵子はlong法で71.6%、short法で57.6%であり、long法で質の高い卵子が有意に多く得られた($P < 0.05$)。④hCG投与日の子宮内膜の厚さはlong法で 11.7 ± 2.8 (平均 \pm SD) mm、short法で 10.1 ± 2.6 mmであり、long法で有意に厚かった($P < 0.05$)。⑤hCG投与日のLH、FSH、 E_2 およびP値に差はなかった。⑥受精率はlong法で有意に高かったが、卵割率および胚移植数に差はなかった。⑦着床率はlong法で5.9%、short法で2.5%、妊娠率はlong法で14.1%、short法で5.4%といずれもlong法で有意に高かった($P < 0.05$)。

以上から、IVF-ETの排卵誘発にはlong protocol法がすぐれていると結論した。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 331 - 337, 1994)

緒言

体外受精・胚移植 (IVF-ET) では多数の成熟卵を得るために排卵誘発が行われ、そのためにどのような排卵誘発法を選択するかは重要である。世界で初めてのIVF-ETの妊娠・分娩例は自然排卵周期によるものであったが、その後、多数の均一な成熟卵を得ることが妊娠率の向上に繋がることから、clomiphene citrate、clomiphene + hMG (human menopausal gonadotropin) /hCG (human chorionic gonadotropin)、hMG/hCGなどの排卵誘発剤が用いられるようになった。しかし、これらの方法では採卵前に排卵する例もあり、採卵のタイミングをとるのが困難であった。

GnRH agonistを用いて下垂体をdesensitizationした状

態でhMGを投与するとpremature LH surgeが起こらず、多数の成熟卵を採取することが可能であることが報告されて以来、GnRH agonistを併用して排卵誘発することが一般的になった。しかし、GnRH agonistの投与方法に関しては今に至るも必ずしも意見の一致を見ていない。

そこで我々はGnRH agonistを先行周期の黄体中期から投与するlong protocol法と月経開始と同時に投与するshort protocol法のいずれが有用であるかをretrospectiveに検討した。

対象および方法

1. 対象(表1)

鹿児島大学医学部産科婦人科で1992年1月から1993

表1 対象の背景

	long 法群	short 法群	
患者数	58	35	
周期数	99	45	
年齢(歳)	33.3 ± 5.4	33.3 ± 3.6	NS
不妊期間(年)	6.1 ± 3.8	6.2 ± 3.0	NS
不妊原因(重複あり)			
卵管因子	59 (59.6%)	29 (64.4%)	NS
男性因子	27 (27.3%)	9 (20.0%)	NS
子宮内膜症	5 (5.0%)	2 (4.4%)	NS
抗精子抗体	0	1 (2.2%)	NS
多嚢胞卵巣	2 (2.0%)	0	NS
原因不明	6 (6.1%)	4 (9.0%)	NS

NS: 有意差なし

年12月までの2年間に施行したIVF-ET患者93例144周期を対象とした。long protocol(long)法は58例(99周期)、平均年齢(±SD)33.3 ± 5.4歳、平均不妊期間(±SD)は6.1 ± 3.8年、short protocol(short)法は35例(45周期)、平均年齢は33.3 ± 3.6歳、平均不妊期間は6.2 ± 3.0年であり、両法間に差を認めなかった。

不妊原因は、long法群、short法群とも卵管因子が最も多く、ついで男性因子であった。両群間で不妊原因に差を認めなかった。

2. 方法

(1) 排卵誘発法

1) long法

Long法は前周期の黄体中期よりプセリリン(ヘキスト・ジャパン)900 μg/日を鼻腔噴霧し、月経周期day 3よりhMG 150IUを連日投与した。以後主席卵胞が16mmを越えるまで150IUを投与した。卵胞発育が不良の場合は一回あたりのhMG量を225IUに増量した。

2) short法

Short法は月経開始と同時にプセリリン900 μg/日を鼻腔噴霧開始し、月経周期day 3よりhMGを連日150IU投与した。以後主席卵胞が16mmを越えるまで150IUのhMGを投与し続けた。卵胞発育が不良の場合は一回あたりのhMG量を225IUに増量した。

両法とも主席卵胞径が16mmを越えた時点でプセリリンとhMGの投与を中止し、40～48時間後にhCG 10,000IU筋注後、33～38時間後に経腔超音波ガイド下に採卵した。

精子はSwim up法にて調整して、媒精濃度は1～5 × 10⁵/mlとした。培養液は非動化患者血清10%を加えたHTF (Human tubal fluid²⁾)を用いた。媒精後18時

間後に卵丘細胞を除去し、受精を確認後さらに24時間培養した。採卵から48時間後に2～8細胞期で胚移植した。

(2) long法とshort法の比較

次の項目をlong法群とshort法群間でretrospectiveに比較し、排卵誘発法としての優劣を検討した。統計学的比較はStudent-T testおよびχ²検定により行った。

1) hMG投与日数および総投与量: IVF-ET時の排卵誘発に要したhMG投与日数とhMG総投与量を比較した。

2) 採卵成績

①採卵キャンセル率: 卵胞発育不良や採卵前排卵により採卵に至らなかった症例(採卵キャンセル例)の率を比較した。

②穿刺卵胞数: 経腔超音波ガイド下で穿刺した卵胞数を比較した。経腔超音波断層装置は横河メディカルRT3600を使用した。

③採卵数(回収卵数)および採卵率: 経腔超音波ガイド下に卵胞穿刺し、回収し得た卵の数を比較した。採卵率は回収卵数/穿刺卵胞数で算定した。

④卵子の質

回収した卵子を下記のVeeckの分類³⁾に従ってGrade IからIVに分類した。

Grade I: 卵丘を形成する細胞が密で暗く放射冠の幅が狭く卵の内容が明瞭でない卵。

Grade II: 卵丘を形成する細胞間の結合が粗となり、ある程度伸展性がみられる。放射冠は広がっているが、十分な伸展性がなく辺縁に凹凸がみられる卵。

Grade III: 卵丘を形成する細胞の間隔が不均一で結合性も粗である。卵丘全体は不十分な伸展性を有し高い牽糸性が見られる。放射冠は幅が広く薄く卵内容が十分に観察出来る卵。

Grade IV: 卵丘は進展性を帯びているが変性が見られ、放射冠も著しく変性して暗く見える卵。

3) 受精率および卵割率: 受精率は受精卵数/回収卵数で算定した。卵割率は総受精卵数に対する2細胞以上に分割した受精卵数の割合とした。

4) 平均胚移植数: 周期あたりの胚移植数を比較した。

5) 着床率および妊娠率: 着床率(着床胚数/総移植胚数)は移植胚数あたり何個妊娠したかで算定した。妊娠率は胚移植周期数あたりの妊娠成立周期数で算定した。なお妊娠は妊娠反応陽性で胎嚢の確認できた臨床的妊娠のみとした。

6) 流産率: 流産率は流産周期数/妊娠周期数で

算定した。

7) 子宮内膜厚：子宮内膜厚は子宮体部内膜像の長軸方向における最大前後径を経腔超音波断装置で計測した。

8) 内分泌学的検査：hCG投与日の血清LH, FSH, estradiol (E₂) およびprogesterone (P) 値を第一ラジオアイソトープ社製のRIAキットで測定した。

成績

1. hMG 投与日数, hMG 総投与量 (表2)

hMG 投与日数はlong法群 8.7 ± 1.8 (平均 \pm SD) 日, short法群 9.1 ± 2.1 日であり, hMG 総投与量はそれぞれ 1728 ± 611 (平均 \pm SD) IU, 1698 ± 674 IUであり, いずれも両法群間で有意差はなかった。

2. 採卵成績 (表2)

(1) 採卵キャンセル率：採卵キャンセル率はlong法群2.0% (2/99), short法群0% (0/45) であり, 有意差はなかった。

(2) 穿刺卵胞数：穿刺卵胞数はlong群 13.5 ± 2.9 (平均 \pm SD) 個, short群 15.1 ± 3.6 個であり, 有意差はなかった。

(3) 採卵数：採卵数はlong法群 8.9 ± 5.0 (平均 \pm SD) 個, short群 9.0 ± 6.0 個であり, 有意差はなかった。

(4) 採卵率：採卵率はlong法群 65.8 ± 13.8 (平均 \pm SD) %, short群 60.7 ± 32.1 % であり, 有意差はなかった。

(5) 卵子の質：Grade I の占める割合は, long法群6.1%, short法群21.2%, Grade II はそれぞれ19.5%, 18.4%, Grade III はそれぞれ71.6%, 57.6%, Grade IV はそれぞれ2.8%, 2.8% であり, long法群でgrade III が有意 ($P < 0.05$) に多く, Grade I が有意 ($P < 0.05$) に少なかった。

3. 受精率, 卵割率 (表3)

受精率はlong法群で72.5% (464/640), short法群で58.6% (249/425) でありlong法群で有意に高かった ($p < 0.001$)。卵割率はそれぞれ69.4% (322/464), 67.1% (167/249) であり有意差はなかった。

4. 平均胚移植数 (表3)

平均胚移植数はlong法群で 2.6 ± 1.6 (平均 \pm SD) 個, short群で 2.7 ± 1.8 個であり, 有意差はなかった。

5. 着床率および妊娠率 (表3)

着床率はlong法群で5.9% (17/290), short法群で2.5% (3/122) であり, long法群で有意 ($P < 0.05$) に高かった。妊娠率はlong法群で14.1% (11/78), short法群で5.4% (2/37) であり, long法群で有意 ($P < 0.05$) に高かった。

表2 排卵誘発効果と採卵成績

	long法群	short法群	
hMG 投与日数 (日)	8.7 ± 1.8	9.1 ± 2.1	NS
hMG 総投与量 (IU)	1728 ± 611	1698 ± 674	NS
キャンセル率 (%)	2 (2/99)	0 (0/45)	NS
穿刺卵胞数 (個/周期)	13.5 ± 2.9	15.1 ± 3.6	NS
採卵数 (個/周期)	8.9 ± 5.0	9.0 ± 6.0	NS
採卵率 (%)	65.8 ± 13.8	60.7 ± 32.1	NS
卵の quality			
Grade I	39 (6.1%)	90 (21.2%)	*
Grade II	125 (19.5%)	78 (18.4%)	NS
Grade III	458 (71.6%)	245 (57.6%)	*
Grade IV	18 (2.8%)	12 (2.8%)	NS

* $P < 0.05$, NS: 有意差なし

表3 受精率, 卵割率, 着床率, 妊娠率および流産率の比較

	long法群	short法群	
総採卵数	640	425	
受精率 (%)	72.5 (464/640)	58.6 (249/425)	*
卵割率 (%)	69.4 (322/464)	67.1 (167/249)	NS
胚移植率 (%)	80.4 (78/97)	82.2 (37/45)	NS
総胚移植率	290	122	
平均胚移植	2.6 ± 1.6	2.7 ± 1.8	NS
着床率 (%)	5.9 (17/290)	2.5 (3/122)	*
妊娠率 (%)	14.1 (11/78)	5.4 (2/37)	*
流産率 (%)	18.2 (2/11)	50.0 (1/2)	NS

* $P < 0.05$, NS: 有意差なし

表4 hCG 投与日の子宮内膜厚

	long法群	short法群
子宮内膜厚 (mm)	11.7 ± 2.8	$10.1 \pm 2.6^*$

* $P < 0.05$

6. 流産率 (表3)

流産率はlong法群で18.2% (2/11), short法群で50% (1/2) であり有意差はなかった。

7. 子宮内膜厚 (表4)

子宮内膜厚はlong法群で 11.7 ± 2.8 (平均 \pm SD) mm, short法群で 10.1 ± 2.6 mm であり, long法群で有意 ($P < 0.05$) に厚かった。

8. 内分泌動態 (表5)

long法群とshort法群のhCG投与日の血中ホルモン値はそれぞれ, LH値 3.5 ± 3.1 (平均 \pm SD) mIU/ml, 4.7 ± 2.9 mIU/ml, FSH値 6.9 ± 5.0 mIU/ml, 7.7 ± 6.5 mIU/ml, E₂値 1121 ± 576 pg/ml, 833 ± 652 pg/ml, P値

表5 hCG投与日の各種ホルモン値

	long法群	short法群	
LH (mIU/ml)	3.5 ± 3.1	4.7 ± 2.9	NS
FSH (mIU/ml)	6.9 ± 5.0	7.7 ± 6.5	NS
E ₂ (pg/ml)	1121 ± 576	833 ± 652	NS
P (ng/ml)	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.3	NS

NS:有意差なし

0.9 ± 0.2 ng/ml, 0.7 ± 0.3 ng/mlであり、いずれも両群間に有意差はなかった。

考 察

従来 IVF-ETの排卵誘発には clomiphene citrate, clomiphene + hMG/hCG, hMG/hCGなどが用いられてきた。しかし、clomipheneは抗エストロゲン作用を有し子宮内膜レベルでエストロゲンレセプターと競合して、子宮内膜に悪影響を及ぼすことが報告されている^{4~6}。また、採卵前に内因性LHサージが起こり、自然に排卵する症例も少なからずあった。このような背景からPorter et al.¹⁾はIVF-ETの排卵誘発に内因性LHサージを抑制する目的でGnRH agonistを初めて臨床応用した。実際、GnRH agonistの併用でIVF-ETの排卵誘発がコントロール可能になり、GnRH agonistの併用が一般的になってきた。

GnRH agonistの投与法は大きく分けて、GnRH agonistを先行周期の黄体中期から投与するlong protocol法と月経開始と同時に投与するshort protocol法がある。しかし、GnRH agonistを併用した場合のIVF-ET成績に関しては両者のいずれが優れているかが明確でなく、また必ずしも意見の一致をみていない。

Hypogonadotropicな無月経患者とnormogonadotropicな無月経患者の排卵誘発に必要なhMG総投与量は一般的には前者が多い。Gonen et al.⁷⁾はIVF-ETの排卵誘発にlong法、short法およびGnRH agonistを併用しないhMG/hCG法の3法について卵胞発育に要したhMG総投与量を比較して、GnRH agonist併用群がhMG/hCG群より有意に多かったと報告した。Tan et al.⁸⁾もGnRH agonist群のhMG総投与量がhMG/hCG群より多かったと報告している。これはGnRH agonist投与により下垂体のGnRH receptorのdown regulationによる内因性ゴナドトロピン分泌低下により、hypogonadotropic hypogonadismが惹起されたために、結果的にhMG投与量が増加したものと考えられる。しかし、hMG投与回数に関してはGnRH agonist群とhMG/hCG群で差がないとする報告が多い^{7~9)}。

Long法は低ゴナドトロピン状態でhMG投与開始す

ること、またshort法はGnRH agonist投与開始初期にみられるゴナドトロピンのflare upが卵胞発育を促進させる可能性があることから、short法がlong法に比較してhMG総投与量が少ないのではないかと考えられる。しかし、今回の我々の検討ではlong法とshort法でhMG総投与量および投与期間に差を認めなかった。同様の報告は多い^{7,9~11)}。Tan et al.⁸⁾もlong法とshort法の間で差があったのはlong法での余分に投与したGnRH agonistの値のみであり、hMG総投与量には差を認めなかったと報告している。すなわち、GnRH agonist投与初期にみられるゴナドトロピンのflare upは卵のrecruitmentにはそれほど影響を及ぼしていないものと考えられる。このことはGnRH agonistによるflare upが卵胞発育を促進するFSHよりもLH優位である^{11~12)}という本質の問題に起因している可能性がある。

IVF-ETでのGnRH agonistを使ったlong法とshort法の排卵誘発効果、受精率および妊娠率は報告者により様々であり、一定しない。我々の今回の検討では、long法とshort法の間で年齢、不妊期間、不妊因子はもちろんのこと、hMG投与回数、hMG総投与量、採卵数、採卵率、卵割率および胚移植数のいずれにも全く差を認めなかった。しかしlong法群で受精率と着床率と妊娠率が有意に高い結果が得られた。この理由の一つにlong法群では良質の卵子が回収されたことが挙げられる。この結果は多くの報告^{8,9,13,14,15)}とも一致する。

一方、short法が優れているとする報告もある。Gonen et al.⁷⁾はshort法ではlong法よりも妊娠率が高く流産率が低かったが、受精率と胚移植数にlong法との間に差を認めなかったことから、long法では内因性LH低下による黄体機能に問題がある可能性があるかと推察している。また、回収卵数や受精率および妊娠率に両群間で差がなかったとする報告^{10,16)}もある。このようにlong法とshort法で成績が一致しない理由は、症例の違い、投与するGnRH agonistの種類、GnRH agonistの投与ルートおよび使用したhMG製剤が異なることも関係するのではないかと考えられる。

我々の検討では、hCG投与直前の血清LH値に両群間で差を認めなかった。しかし、GnRH agonistの投与開始初期はLHのflare upがみられることが知られており、short法では月経周期の3日目に血中LH値はピークとなり、4日目より下降傾向を示す⁹⁾。このflare upした血清LHは黄体を刺激して未熟卵胞の黄体化を促進するという¹⁷⁾。また卵胞期の高LHは妊娠

率を低下させるとい報告^{18, 19, 20, 21)}もある。このようにshort法ではflare upしたLHが卵子の質を低下させ受精率を低下させ、結果的に妊孕能を低下させている可能性が考えられる。一方long法では前周期黄体中期からGnRH agonistを投与開始するから下垂体はすでにdesensitization状態にありhMG投与中のLHのflare upは極めて少ないと考えられ、従って卵胞発育に対するの高LHの影響はないといえよう。

血清のP値についてみると、我々の検討ではhCG投与日の血清P値は両群間で差はなかった。しかし渡部⁹⁾はhCG投与日でshort法においては血中P値が1.0ng/mlを越える症例が40%存在し、一方long法では24.3%であったとし、P値がshort法で高かったと報告している。ヒトIVF-ETにおいて卵胞期の血中P値の上昇は胚のfragmentationを惹起し受精卵のqualityを低下させることが報告され²²⁾、また動物実験においても上昇したPが卵に悪影響を及ぼすという報告があることから卵胞期のP上昇は着床には不利に作用する可能性が考えられる^{23, 24, 25)}。なお我々のP値に関する検討はlong法群とshort法群で差はなかったが、これは連続採血による観察ではないことに起因するのかもしれない。

Long法群とshort法群で受精卵を受容する側の子宮内膜から比較検討した報告は少ない。我々の検討ではhCG投与日の子宮内膜厚がlong法群で有意に厚かった。その結果が着床率および妊娠率がshort法群に比較して高いということと結びついていると考えられる。子宮内膜厚については採卵時の子宮内膜厚と妊娠率には高い正の相関がある^{26, 27)}との報告があり、また非IVF-ET周期でも子宮内膜厚と妊娠率は相関するという報告^{28, 29)}もある。またoocyte donationにおいても妊娠成立周期の子宮内膜厚は非妊娠周期のそれに比較して有意に厚かったとする報告^{30, 31)}があり、我々の結果を補強するものと思われる。このように子宮内膜厚からもlong法群が着床にふさわしい環境を形成しているといえる。

では、なぜ子宮内膜厚に差が出たのであろうか。我々の検討ではhCG投与日の血中E₂値や卵胞発育に要したhMG総投与量に両群間で差を認めなかった。hCG投与日の血中E₂値に差を認めないとする報告や逆にhCG投与日の血中E₂値がshort法群でむしろ高いとする報告もある⁸⁾。このようなことを総合すると、long法群で子宮内膜が厚かった理由を血中E₂値に求めることには無理がある。しかしこの点は今後解明されなければならない問題である。

以上よりIVF-ETの排卵誘発にはGnRH agonist long

protocol法がshort protocol法よりもやや優れていると結論出来る。その理由としてshort法ではGnRH agonist投与開始初期に起こるLHやプロゲステロンのflare up現象が卵子の質や子宮内膜の発育に悪影響を及ぼしている可能性が推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師永田行博教授に深甚なる敬意を表します。また直接御指導下さった堂地勉講師、竹内一浩講師ならびに鹿児島大学産科婦人科学教室不妊内分泌研究室の諸兄に感謝致します。

文 献

- 1) Porter RN, Smith W, Craft IL, et al., Induction of ovulation for in vitro fertilization using busserelin and gonadotropins. *Lancet* 2: 1284, 1984
- 2) 柳田 薫, 星 和彦, 村岡栄一 他, ハムスターテストとマウス受精卵初期発生成績からみた体外受精用培養液の検討. *哺乳卵研誌* 3: 114, 1986
- 3) Veck MLT, *In Vitro Fertilization*, p81 Williams & Wilkins, 1986
- 4) Clark JH, Peck EJ and Anderson JN, Oestrogen receptors and antagonism of steroid hormone action. *Nature* 251: 446, 1974
- 5) Sterzik K, Dallenbach C, Schneider V, et al., In vitro fertilization: the degree of endometrial insufficiency varies with the type of ovarian stimulation. *Fertil Steril* 50: 457, 1988
- 6) Rogers PA, Polson D, Murphy CR, et al., Correlation of endometrial histology, morphology, and ultrasound appearance after different stimulation protocols for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 55: 583, 1991
- 7) Gonen Y, Dirnfeld M, Goldman S, et al., The use of long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a; Decapeptyl) and gonadotropins versus short-acting GnRH-a (Buserelin) and gonadotropins before and during ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *J Vitro Fertil Embryo Transfer* 8:254, 1991
- 8) Tan SL, Kingsland C, Campbell S, et al., The long protocol of administration of gonadotropin-hormone releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 57: 810, 1992
- 9) 渡部秀哉, GnRH agonist併用による過排卵刺激法: Long protocol法とShort protocol法の有用性に関する比較検討. *日不妊会誌* 38: 22, 1993

- 10) Acharya U, Small J, Randall J, et al., Prospective study of short and long regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist in in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 57: 815, 1992
- 11) 許山浩司, 小田原靖, 川勝雅秀 他, Gn-RH analog + hMG併用療法による体外受精-胚移植法の検討-特にLong protocolとShort protocolの比較を中心に-. *日本受精着床学会雑誌* 7: 49, 1990
- 12) 水口弘司, 植村次雄, 白須和裕 他, Buserelin (Hoe 766)の長期投与における内分泌動態-下垂体・性腺系機能へ及ぼす影響を中心にして-. *産科と婦人科* 54: 1395, 1987
- 13) 森本義晴, 堀越順彦, 桑名博士 他, GnRH agonist使用下の体外受精プログラムにおける妊娠を示唆する重要因子の選択. *日本産科婦人科学会雑誌* 43: S-149, 1991
- 14) 別所健史, 繁田 実, 小林真一郎 他, 体外受精-胚移植におけるbuserelin-hMG併用による卵巣刺激法の有効性. *日本受精着床学会雑誌* 7: 57, 1990
- 15) Loumaye E, Vankrieken L, Depreester S, et al., Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for an in vitro fertilization and their consequences for embryo development. *Fertil Steril* 51: 105, 1989
- 16) Serafini P, Stone B, Kerin J, et al., An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in poor responder: pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil Steril* 49: 90, 1988
- 17) Fleming R, Jamieson ME, McQueen D, et al., Follicular phase initiation of GnRH-A therapy for ovarian stimulation. *Gynecol Endocrinol* 4 Supl 2: 87, 1990
- 18) Stanger J and Yovich JL, Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol* 92: 385, 1985
- 19) Regan R, Owen EJ and Jacobs HS, Hypersecretion of luteinizing hormone, infertility and miscarriage. *Lancet* 336: 1141, 1990
- 20) Homburg R, Armar NA, Eshel A, et al., Influence of serum luteinizing hormone concentration on ovulation, conception and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Br Med J* 297: 1024, 1988
- 21) Shoham Z, Jacobs HS and Insler V, Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effects when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil Steril* 59: 1153, 1993
- 22) 吉田壮一, 高尾成久, 片桐知恵子 他, 卵巣刺激周期における卵胞期血中progesterone値とembryo qualityとの関連性. *日本受精着床学会雑誌* 10: 176, 1993
- 23) Tyler J and Collins W, The effect of progesterone and oestradiol on gonadotropin-induced oocyte maturation in isolated ovarian follicles from mice. *Gamete Res* 3: 59, 1980
- 24) Tyler J, Moore-Smith D and Bigger J, Effect of steroids on oocyte maturation and atresia in mouse ovarian fragments in vitro. *J Reprod Fertil* 58: 203, 1980
- 25) Smith DM and Tenney D, Effects of steroids on mouse oocytes maturation in vitro. *J reprod Fertil* 60: 331, 1980
- 26) Gonen Y, Casper RF, Jacobson W, et al., Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 52: 446, 1989
- 27) Glissant A, de-Mouzon J and Frydman R, Ultrasound study of the endometrium in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 44: 786, 1985
- 28) Dickey RP, Olar TT, Taylor SN, et al., Relationship of endometrial thickness and pattern to fecundity in ovulation induction cycles: effect of clomiphene citrate alone and with human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 59: 756, 1993
- 29) Shoham Z, Di-Carlo C, Patel A, et al., Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial measurements. *Fertil Steril* 56: 836, 1991
- 30) Shapiro H, Cowell C and Casper RF, The use of vaginal ultrasound for monitoring endometrial preparation in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 59: 1055, 1993
- 31) Antinori S, Versaci C, Gholami GH, et al., Oocyte donation in menopausal women. *Human Reproduction*, 8: 1487, 1993

Ovarian stimulation with long protocol or short protocol of gonadotropin-releasing hormone agonist in vitro fertilization

Seigo Fukumoto

Department of Obstetrics and Gynecology
Faculty of Medicine, Kagoshima University
Kagoshima 890, Japan

The clinical usefulness of both a long administration protocol using gonadotropin-releasing hormone agonist

and a short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization was investigated. In this study, 58 women comprising 99 cycles were included in the long protocol group while 35 women comprising 45 cycles made up the short protocol group. The total amount of hMG and days of hMG administration required for follicular maturation, the number of recovered oocytes, the fertilization rate, the cleavage rate, the implantation rate, the pregnancy rate, the abortion rate and thickness of the endometrium together with endocrinological aspects were also compared between the two groups.

No significant differences were observed in either the total amount of hMG or days of hMG administration between the two groups. The cancellation rate of the oocytes pick-up, the number of recovered oocytes were similar between the two groups. However, the number of

oocytes of higher quality recovered in the long protocol group was significantly more than those in the short protocol group ($P<0.05$). The endometrium of the women in long protocol group on the day of hCG administration was significantly thicker than that of the short protocol group ($P<0.05$), although no significant differences were observed in the serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone between the two groups. The fertilization rate, the implantation rate and the pregnancy rate in the long protocol group were higher than those of short protocol group ($P<0.05$).

Based on these results, we thus conclude that the long administration protocol using gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization.

(受付：1994年3月11日特掲)

(受理：1994年5月11日特掲)

加齢の妊孕能に及ぼす影響に関する臨床的・基礎的研究

Clinical and Experimental Study on the Aging Effects on Fertility

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

(主任：永田行博教授)

森 明 人

Akito MORI

Department of Obstetrics and Gynecology

Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

加齢による妊孕能低下の原因について検討するため臨床的・基礎的実験を行った。

IVF-ET患者を29歳以下、30～34歳、35～39歳、40歳以上の4群に分けて検討した。卵胞発育に要したhMG量は40歳以上群で有意に多かった。穿刺卵胞数、回収卵胞数および受精卵数は40歳以上群で有意に減少した。残りの3群間にはいずれも差を認めなかった。卵回収率および受精率は35～39歳群から低下し始め、40歳以上群で著明に低下した。残りの2群間には差を認めなかった。

ICR系未経産雌マウス8～15週齢(A群)、20～25週齢(B群)、35～45週齢(C群)を過排卵誘起し得られた2細胞期胚を実験に用いた。2細胞期胚の回収数はC群で低く、体外培養による胚盤胞への発育率もC群で有意に低かった。同様に交配後4日目に各群の胚盤胞を回収して15週齢のレシピエントマウスに移植した結果、C群で着床率が有意に低く、流産率が有意に高かった。

以上より、加齢により1)排卵数が減少すること、2)受精率が低下すること、3)着床率が低下すること、4)流産率が上昇することが妊孕能の低下の原因であることが明らかになった。これらの原因として卵巣の老化によるゴナドトロピンへの反応性の低下と卵子の質の低下が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 39 (3), 338 - 344, 1994)

緒 言

加齢により妊孕能が低下することは一般に良く認められている事実である。一戸ら¹⁾は出産数を2歳きざみに検討し、19歳～38歳までは変動は少なかったが、39～40歳より激減し、45歳までにはほぼ底をつく²⁾と報告した。加齢により妊娠率が低下するだけでなく、流産率も上昇する。40～45歳で40%、45歳以上で50%以上の流産率であったとする報告³⁾がある。最近のIVF-ETの成績からも同様の傾向がうかがわれる。Padilla et al.⁴⁾はIVF-ETの妊娠成功率は加齢とともに低下し、40歳代では50%が流産したと報告した。Romeu et al.⁴⁾も40歳代では60%の流産率であったと報告している。一方加齢により染色体異常も増加する。母体年齢が35～39歳で1.6%、40～44歳で3.7%、45

～48歳で25%の染色体異常を認めたとする報告もある⁵⁾。染色体異常も加齢による流産率の増加の一因となっている。

加齢による妊孕能の低下の原因としては排卵数の低下^{6,7)}、受精能の低下⁸⁾および子宮内膜の受容性の低下⁹⁾などが考えられてきた。しかし、詳細な点になると必ずしも意見の一致を見ない。

我々はIVF-ET患者における臨床的データを解析し、加齢による影響を検討した。さらにそれに基づいてマウスにおいては受精卵の加齢にのみ着目し、卵の発育能および受精能に及ぼす加齢の影響を検討した。

研究対象と方法

1. ヒトのIVF-ETの成績からみた加齢の妊孕能に及

ぼす影響に関する検討

対象は、1990年1月から1991年12月までに鹿児島大学産婦人科でIVF-ETを施行した不妊患者59症例120周期である。これらを年齢により29歳以下群9症例22周期(29歳以下群)、30～34歳群27症例51周期(30～34歳群)、35～39歳群19症例37周期(35～39歳群)、40歳以上群4症例10周期(40歳以上群)の4群に分けた。4群間で一人あたりのIVF-ET施行回数、主席卵胞径、夫の精子数、精子運動率およびペネトラク値(ウシ頸管粘液における精子貫通距離)に関して有意差を認めなかった。そして以下の事項を検討した。

排卵誘発法は前周期の黄体中期よりプセレリン(ヘキスト・ジャパン)900 μ g/日を鼻腔噴霧し、月経周期day3よりhMG 150IUを連日投与した。以後主席卵胞径が16mmを超えるまで150IUのhMGを投与し続けた。卵胞発育が不良の場合は一回あたりのhMG量を225IUに増量した。主席卵胞径が16mmを超えた時点でプセレリンとhMGの投与を中止し、40～48時間後にhCG 10,000IU筋注、さらにその33～38時間後に経膈超音波ガイド下に採卵した。

(1) hMG総投与量

卵胞発育を目的に投与したhMG総投与量を4群で比較した。

(2) 回収卵

以下の項目について4群間で比較した。

① 穿刺卵胞数：経膈超音波ガイド下で採卵を目的に穿刺した卵胞数

② 回収卵数：経膈超音波ガイド下で穿刺・吸引し得られた卵数

③ 卵回収率：回収卵数/穿刺卵胞数

(3) 受精卵数および受精率

受精卵数と受精率(受精卵数/回収卵数)を比較した。ただし乏精子症(精子濃度 40×10^6 /ml以下あるいは精子運動率40%未満)の患者は受精率の検討から除外した。

なお妊娠率は、この期間の妊娠例が少なく統計的検討を行わなかった。また、排卵誘発、採卵、媒精はすべて当科IVF-ETのプロトコルに基づいて行った。

2. マウス受精卵の発育能および着床能に及ぼす年齢の影響

ICR系未経産雌マウスを8～15週齢(A群)、20～25週齢(B群)、35～45週齢(C群)の3群に分け、PMS 5 IUを用いて過排卵処理し同系15週齢マウスと交配させ、翌朝陰栓を確認したものをを用い以下の実験を行った。

(1) 受精卵の回収率と発育率

A(n=25), B(n=17), C(n=15)各群のマウスから交配48時間後の卵管を摘出し、modified Whitten's mediumで卵管内を灌流し、受精卵を回収した。

さらに形態的に正常な2細胞期胚のみを集め、10% new calf serumを含むmodified Whitten's mediumを用い、5%CO₂ in air, 37℃の条件下で培養し、後期胚盤胞期まで24時間ごとの発育を観察した。

(2) 着床率、流産率

A(n=21), B(n=19), C(n=22)各群のマウスを交配後4日目に子宮内灌流法により形態学的に正常な胚盤胞期胚のみを集め、偽妊娠3日目のレシピエント(15週齢ICR系雌マウス)の子宮内に移植した。一子宮角あたり平均6個の胚を移植した。移植後4日目のレシピエントの尾静脈よりプリリアントブルーを静注し、ネンプータル麻酔下に開腹し着床の状態を観察したのち閉腹した。

(3) 胎仔重量

さらに交配後17日目に再開腹し、胎仔の重量を計量した。

有意差検定はStudent-T testあるいは χ^2 検定によった。

成 績

1. ヒトのIVF-ETの成績からみた年齢の妊孕能に及ぼす影響

(1) hMG総投与量(図1)

年齢別に卵胞発育に要したhMG総投与量は29歳以下群で平均 1377 ± 527 IU, 30～34歳群で平均 1387 ± 513 IU, 35～39歳群で平均 1539 ± 390 IU, 40歳以上群で 3008 ± 1098 IUであり、40歳以上群が他の3群のいずれと比較しても有意に多かった($P < 0.05$)。

(2) 卵回収数

① 穿刺卵胞数(図2)

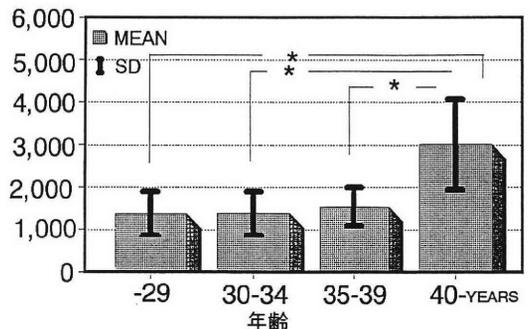


図1 年齢とhMG総投与量

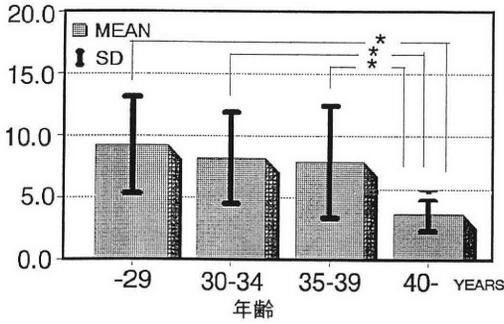


図2 年齢と穿刺卵胞数

穿刺卵胞数は29歳以下の群で平均 9.2 ± 3.9 個、30歳～34歳群では 8.2 ± 3.7 個、35歳～39歳群では 7.9 ± 4.5 個と、年齢が高くなるに従い減少する傾向にあったが、これらの3群間では有意差はなかった。しかし、40歳以上群の穿刺卵胞数は平均 3.7 ± 1.4 個と激減し、他の3群のいずれと比較しても有意に少なかった ($P < 0.05$)。

②回収卵数と回収率(図3, 表1)

回収卵数は29歳以下群では平均 6.7 ± 3.4 個、30歳～34歳以下群では 6.1 ± 3.5 個、35歳～39歳群では 5.1 ± 3.3 個と年齢が高くなるに従い減少する傾向にあったがこれらの3群間には有意差はなかった。さらに40歳以上群では平均 1.0 ± 0.8 個と激減し、40歳

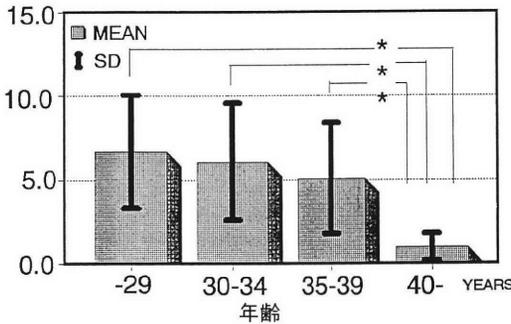


図3 年齢と回収卵数

表1 年齢と穿刺卵胞あたりの卵回収率

年齢	穿刺卵胞数 (個)	回収卵数 (個)	卵回収率 (%)
～29歳	183	140	76.5 ^a
30～34歳	392	298	76.0 ^a
35～39歳	268	183	68.3 ^b
40歳～	22	6	27.3 ^c

a-b : $P < 0.05$

a-c : $P < 0.01$

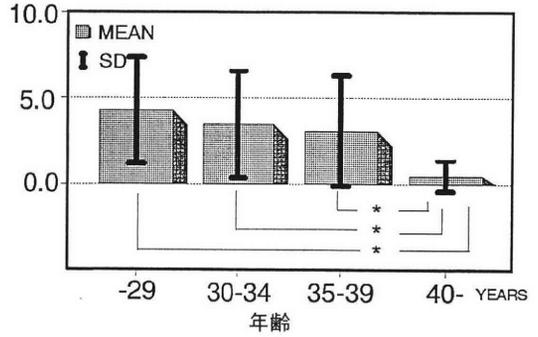


図4 年齢と受精卵数

表2 年齢と回収卵あたりの受精率

年齢	回収卵数 (個)	受精卵数 (個)	受精率 (%)
～29歳 (22周期)	133	84	63.2 ^a
30～34歳 (22周期)	187	135	72.2 ^a
35～39歳 (19周期)	63	34	54.0 ^b
40歳～ (10周期)	6	2	33.3 ^c

a-b : $P < 0.01$

a-c : $P < 0.05$

未満のどの群と比較しても有意に少なかった ($P < 0.05$)。

卵回収率は29歳以下群では76.5%、30歳～34歳群では76.0%であり、35歳～39歳群では68.3%と低下し、40歳以上群では27.3%とさらに有意に低下した。40歳以上群ではどの群と比較しても有意に低く ($P < 0.01$)、35～39歳群では34歳以下の2群に比べて有意に低かった ($P < 0.05$)。

③受精卵数と受精率(図4, 表2)

年齢と受精卵数との関係を見ると、受精卵数は29歳以下群では平均 4.3 ± 3.1 個、30～34歳群では 3.5 ± 3.1 個、35～39歳群では平均 3.1 ± 3.2 個と年齢が高くなるに従い減少する傾向にあったが、これらの3群間には有意差はなかった。40歳以上群では平均 0.5 ± 0.9 個と激減し、40歳未満のどの群との間にも有意差を認めた ($P < 0.05$)。受精率は29歳以下群では63.2%、30～34歳群では72.2%であったが、35～39歳群では54.0%、40歳以上群では33.3%であった。35～39歳群では34歳以下の2群との間に有意差 ($P < 0.05$) を、40歳以上群では39歳以下のどの群との間にも有意差 ($P < 0.01$) を認めた。

2. マウス受精卵の発育能および着床能に及ぼす加

齢の影響

①受精卵の回収率と発育率(表3, 表4)交配後2日目に回収された各群の2細胞期胚数はA群で24.2個/匹, B群で18.6個/匹, C群で9.6個/匹であり, A群とB群の間には有意差を認めなかったが, C群はA群, B群に比較して有意($P < 0.001$)に少なかった。

各群の体外培養による胚盤胞への発育率はA群86.6%(299/345), B群83.9%(151/180), C群48.4%(62/128)であり, A群とB群の間には有意差を認めなかったが, C群はA群, B群に比較して有意($P < 0.001$)に低値であった。

②着床率, 流産率(表5, 表6)

交配後4日目に得られた胚盤胞の数はA群の29.4個/匹およびB群の23.7個/匹に比較してC群は7.5個/匹であり, A群とB群の間には有意差を認めなかつ

たが, C群はA群, B群に比較して有意($P < 0.001$)に少なかった。

移植した胚の着床率はA群で78.9%(112/142), B群で73.5%(122/166), C群で40.6%(63/155)であり, C群がA群およびB群に比較して有意($P < 0.001$)に低値であった。

流産率はA群24.1%(27/112), B群23.8%(29/122), C群63.5%(40/63)であり, C群がA群, B群に比して有意($P < 0.001$)に高値であった。流産に至らず, 17日目までに妊娠が継続している割合はA群75.9%(85/112), B群76.2%(93/122), C群36.5%(23/63)であり, A群とB群の間には有意差を認めなかったが, C群はA群, B群に比較して有意($P < 0.001$)に低値であった。

(3) 胎仔重量

妊娠17日目に娩出した生存胎仔の体重の平均値はA群0.98g, B群1.02g, C群0.92gであり3群間に有意差を認めなかった。また形態的にも異常を認めなかった。

考 察

女性は何歳まで妊娠可能であるかは個体差が大きく明確ではない。しかし, 加齢により妊孕能が低下することは明らかである。そして加齢により妊孕能が低下する原因として排卵数の減少^{6,7)}, 受精能の低

表3 2細胞期胚回収率の比較

	回収卵数 (2細胞期胚)	マウス数 (匹)	平均回収 卵数/匹
Group A (8~15週齢)	605	25	24.2 ^a
Group B (20~25週齢)	316	17	18.6 ^b
Group C (35~45週齢)	144	15	9.6 ^c
			a-c: $P < 0.001$ b-c: $P < 0.001$

表4 発育の比較

	培養胚数 (2細胞期胚)	胚盤胞数 (%)
Group A (8~15週齢)	345	299 (86.6) ^a
Group B (20~25週齢)	180	151 (83.9) ^b
Group C (35~45週齢)	128	62 (48.4) ^c
		a-c: $P < 0.001$ b-c: $P < 0.001$

表5 胚盤胞回収率の比較

	回収卵数 (胚盤胞)	マウス数 (匹)	平均回収 卵数/匹
Group A (8~15週齢)	617	21	29.4 ^a
Group B (20~25週齢)	451	19	23.7 ^b
Group C (35~45週齢)	165	22	7.5 ^c
			a-c: $P < 0.001$ b-c: $P < 0.001$

表6 着床率, 流産率, 妊娠継続率の比較

	移植胚盤胞数	着床率 (%)	流産率 (%)	妊娠継続率 (%)
Group A (8~15週齢)	142	112 (78.9) ^a	27 (24.1) ^a	85 (75.9) ^a
Group B (20~25週齢)	166	122 (73.5) ^b	29 (23.8) ^b	93 (76.2) ^b
Group C (35~45週齢)	155	63 (40.6) ^c	40 (63.5) ^c	23 (36.5) ^c
				a-c: $P < 0.001$ b-c: $P < 0.001$

下⁸⁾、着床能の低下および受精卵が着床する側の子宮内膜の受容能の低下⁹⁾などが考えられてきた。しかし、詳細な原因は不明であり報告者により一致しない点もある。

IVF-ETでは多くの成熟卵を採取することが妊娠率の向上に繋がることから、規則的な月経周期を有する患者に対しても排卵誘発を行う。従って高齢婦人の卵巣のゴナドトロピンに対する反応性を観察するには都合が良い。さらに受精および着床現象を直接観察できる利点もある。このような理由から、我々はヒトにおいては年齢別のIVF-ET成績、マウスにおいては卵子提供 (oocyte donation) により加齢が妊孕能にどのように影響を及ぼしているかを検討した。

卵巣重量は20歳代でピークとなり、それ以降徐々に低下し40歳代になると著明に低下する¹⁰⁾。卵巣重量は卵胞数と相関するから卵胞数は40歳以降著しく減少するといえる。卵胞数を観察するには卵巣が排卵誘発剤にどのように反応するかによっても推測することができる。我々のIVF-ETの成績では、40歳以降ではそれ未満の年齢に比較して排卵誘発に要したhMG量は多かった。Dicker et al.¹¹⁾もIVF-ETで同様の検討を行い、37歳以上ではそれ未満に比較してhMG総投与量が多く投与期間も長期であったと報告している。広井ら¹²⁾は各年代別にhMG 150 IUを5日間投与して血中estradiol値を観察し、20歳代では良好な反応を示したのに対し、30歳代、40歳代と高齢になるにしたがいestradiolの分泌は低下し、50歳代ではほとんど反応は認められなかったとした。また卵巣皮質培養液中にhMGを添加したin vitroの実験でも同様の結果が得られたことより、卵巣のゴナドトロピンに対する反応の低下は30歳代よりすでに始まっているとした。すなわちこれらの報告からも加齢により卵巣のゴナドトロピンに対する反応が低下することが示唆される。

我々の成績では高齢婦人へのhMG総投与量が多かったにもかかわらず発育卵胞数が減少した。またヒトにおいてもラットにおいても加齢により卵回収率が低下した。これは加齢により発育卵胞数が減少し、その結果穿刺卵胞数が減少したことは明らかである。加齢により発育卵胞数が減少するという報告は多い。Sauer et al.¹³⁾は40歳以上の婦人では採卵数も胚移植数も少なかったとし、Dicker et al.¹¹⁾は37歳から採卵数が有意に減少したと報告した。斉藤ら¹⁴⁾も年齢が高くなるにつれ総採卵数が減少したと報告している。これら採卵数の減少は発育卵胞数の減少を当然のことながら意味する。排卵数に関しては北ら⁶⁾は

高齢マウスの排卵数が若齢マウスに比較して有意に少なかったと報告した。他にも同様の報告がある^{7, 15)}。加齢により排卵数が低下することを示している。

加齢によるヒトIVF-ETにおける受精率は報告によって必ずしも一致しない。Romeu et al.⁴⁾やPadilla et al.³⁾およびDicker et al.¹¹⁾は加齢によっても受精率は低下しなかったと報告した。しかし、我々の検討ではヒトにおいてもマウスにおいても受精率は低下した。ヒトにおいては35～39歳ですでに受精率の低下が認められ、40歳以上では著明に低下した。これらの結果は40歳以上で受精率が低下したとするSauer et al.¹³⁾の報告と一致する。また加齢により21トリソミーなどの染色体異常児の頻度や高齢妊娠では胎状奇胎の発生頻度が急増することが知られている。これらの事実を考えあわせると、加齢により染色体異常を含めた卵の質の低下が増加することが示唆される。このような卵の質の低下が加齢による受精率の低下と関係していると思われる。また、加齢マウスでは卵の透明帯が硬化し、精子の貫通が妨げられ受精能が低下するという報告もある¹⁶⁾。

受精卵の胚盤胞期胚への発育率は高齢群が若齢群に比較して明らかに低下した。培養条件に差はなく、形態的にも異常は認められなかったにもかかわらず低下した。小野寺ら¹⁵⁾はそれぞれの月齢で回収した形態的に正常な2細胞期胚を体外培養して発育能を観察し、高齢マウスでは若齢マウスに比較して拡張期胚盤胞への発生率が有意に低下したことより、加齢動物では形態が正常にみえる胚でも発育能が低いものが含まれている可能性があるとしている。胚盤胞期胚への発育率が低いのは、高齢マウスでは第一卵割期に異数体の出現率が若齢マウスより高いこと¹⁷⁾や異数体の一部が桑実胚までの間に淘汰されること¹⁸⁾から、染色体異常やなんらかの機能異常を持つ受精卵が発育段階で退化していくためと考えられる。

加齢によりヒトIVF-ETの妊娠率は低下する^{3, 4, 11, 13, 19)}。我々は15週齢マウスをレシピエントにして着床する子宮を同一環境下において加齢の着床に及ぼす影響を検討した。高齢マウスから得た受精卵の着床率は低く流産率は高かった。加齢により流産率が高くなることはヒトでもよく知られているが、着床率が低いことはさらに重要なことといえる。しかし、Gosden²⁰⁾はわれわれと同様の実験で加齢による差は全くなかったとも述べている。北ら⁶⁾も排卵した卵子はほとんどが着床して高齢マウスでも着床率の低下は認められなかったとし、産仔数の減少は着床後

の胚死亡率の増加が主な原因であるとしている。しかし、北ら⁶⁾の実験は若齢マウスに移植した実験ではないから、子宮側の加齢による因子を考慮しなければならない。加齢がすすむと分割しない卵子および異常卵の割合の増加、さらに形態的には正常でも発育能力の低いものが含まれているとする報告がある¹⁵⁾。

加齢による妊孕能の低下には排卵数の減少や卵の質の低下が一義的な原因となっているとしたが、最近、欧米で臨床応用され始めた高齢婦人への oocyte donation による妊娠の観察は加齢による妊孕能の低下の原因を研究するのに都合が良い。Navot et al.²¹⁾は若い女性から卵の提供を受けた40歳以上の高齢婦人の妊娠率は若い女性のそれと同等であったと報告している。また Sauer et al.¹³⁾は40歳以上で卵子の提供を受けた婦人と自分の卵子でIVF-ETを受けた婦人の妊娠率を比較して前者が有意に高く、しかも若い女性の妊娠率と同等であったと報告した。これらの事実は年齢による妊孕能の低下が子宮内膜の受容能の低下ではなく、一義的には受精卵の方に問題があることを直接証明するものである。すなわちヒトにおける高齢婦人へのIVF-ETの成績も加齢による妊孕能の低下が卵に起因することを示唆する。

このような卵の老化は何歳頃から起こるのであろうか。我々は5歳ごとに年齢を区切り検討し、卵回収率と受精率は35歳頃から低下し始めるという結果を得た。Dicker et al.¹¹⁾は2歳ごとに年齢を区切り検討し、回収卵数と妊娠率は37歳から低下したと報告している。一戸ら¹⁾は2歳ごとに年齢を区切り39歳から急激に妊娠率が低下したと報告した。老化の開始時期は報告者により若干の違いがある。この相違は年齢の分け方や症例数あるいは個人差に起因するものと考えられる。

以上述べたように加齢による妊孕能の低下は40歳前後からしだいに認められるようになる。そして40歳以上になると排卵数の減少、受精率の低下、着床能の低下、流産率の上昇が著明となる。これらの原因はゴナドトロピンに対する卵巣の反応性の低下と卵子の質の低下に起因することが示唆された。

謝 辞

本研究の発表にあたり、終始ご指導・御校閲賜りました恩師永田行博教授に感謝します。また臨牀的、基礎的方面から御指導頂きました鹿児島大学産婦人科学教室堂地勉講師と竹内一浩講師に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 一戸喜兵衛, 馬淵義也, 北嶋朋子, 更年期の卵巣背景. 産婦の世界 42: 797, 1990
- 2) 椎名美博, 岡田雄一, 一戸喜兵衛, 加齢に伴う性器の機能形態変化. 産婦人科MOOK 30: 37, 1985
- 3) Padilla SL and Garcia J, Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. Fertil Steril 52: 270, 1989
- 4) Romeu A, Muasher SJ, Acosta A, et al., Results of in vitro fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. Fertil Steril 47: 130, 1986
- 5) 辻 清, 一戸喜兵衛, 高齢妊娠と染色体異常に関する研究. 日産婦誌 30: 435, 1978
- 6) 北 徳, 猪 貴義, 高齢未経産マウスの繁殖能力. 日本不妊会誌 18: 216, 1973
- 7) Blaha GC, Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova. Anat Rec 150: 413, 1964
- 8) Harman SM and Talbert GB, The effect of maternal age on ovulation, corpora lutea of pregnancy and implantation failure in mice. J Reprod Fert 23: 33, 1970
- 9) Yaron Y, Botchan A, Amit A, et al., Endometrial receptivity: the age-related decline in pregnancy rates and the effects of ovarian function. Fertil Steril 60: 314, 1993
- 10) 西田悦郎, 赤祖父一知, 閉経後女性と内分泌. 産科と婦人科 41: 130, 1974
- 11) Dicker DD, Goldman JA, Ashkenazi J, et al., Age and pregnancy rates in in vitro fertilization. J Vitro Fert Embryo Transfer 8: 141, 1991
- 12) 広井正彦, 斉藤憲康, 婦人の老化と卵巣. 臨婦産 38: 41, 1984
- 13) Sauer MV, Paulson RJ and Lobo RA, Reversing the natural oocytes decline in human fertility. JAMA 268: 1275, 1992
- 14) 斉藤英和, 佐藤文彦, 平山寿雄 他, 体外受精・胚移植における母体年齢の影響について. 日本不妊会誌 36: 975, 1991
- 15) 小野寺政一, 石島芳郎, マウス卵子の生存能に及ぼす加齢の影響. 日本不妊会誌 32: 114, 1987
- 16) Nagues C, Ponsa M, Vidal F, et al., Effect of aging on the zona pellucida surface of mouse oocytes. J In Vitro Fert Embryo Transfer 5: 225, 1988
- 17) Maudlin RR and Foote RH, Maternal aging and embryonic mortality in the rabbit. I Repeated superovulation, embryo culture and transfer. J Reprod Fert 25: 329, 1971

- 18) 水野正彦, 佐藤孝道, 卵の発育淘汰. 受精・着床 84, 飯塚理八, 坂元正一, 鈴木雅州, 高木繁夫 編, P171, 学会出版センター, 1985
- 19) Edwards RG, Fishel SB and Cohen J, Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro fertil Embryo Transfer* 1: 3, 1984
- 20) Gosden RG, Survival of transferred C57BL mouse embryos: Effect of age of donor and recipient. *Fertil Steril* 25: 348, 1974
- 21) Navot D, Bergh PA, Williams MA, et al., Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age related decline in female fertility. *Lancet* 337: 1375, 1991

Clinical and experimental study on the aging effects on fertility

Akito Mori

Department of Obstetrics and Gynecology
Faculty of Medicine, Kagoshima University
Kagoshima 890, Japan
(Director: Prof. Y. Nagata)

The effects of aging on fertility were studied in human in vitro fertilization and oocyte donation in mice.

The patients were classified according to their age into 4 groups; GR-I: less than 29 years old, GR-II: 30 to 34 years old, GR-III: 35 to 39 years old and GR-IV: 40 years old or more. In GR-IV, gonadotropin therapy for

follicle maturation required significantly more doses of hMG ($P < 0.05$). The numbers of recovered oocytes and fertilized oocytes were significantly less in GR-IV ($P < 0.05$). No significant differences were obtained among the other three groups. The recovery rate of oocytes and fertilization rate decreased in GR-III ($P < 0.001$) and more significantly declined in GR-IV ($P < 0.001$). No significant differences were observed in the other two groups.

ICR mice were classified according to their age into 3 groups; GR-A: 8 to 15 weeks, GR-B: 20 to 25 weeks and GR-C: 35 to 45 weeks. On day 2 of pregnancy, 2-cell stage embryos were recovered and cultured until blastocyst stage. On day 4, blastocysts were transferred to pseudopregnant mice of 15 weeks. In GR-C, the number of 2-cell stage embryos recovered was significantly lowered compared to GR-A and GR-B ($P < 0.001$). The rate of development from 2-cell stage to blastocyst stage was lower than that of the other two groups ($P < 0.001$). The implantation rate of in vivo blastocyst in GR-C was also lower and the abortion rate was higher than those of GR-A and GR-B ($P < 0.001$).

From the results of the experiments in mice, it was suggested that reduced frequency of ovulation, reduced fertilization of oocytes, lower rate of implantation and higher rate of miscarriage occurred with aging. Also clinically in human, the low response to gonadotropin and poor oocyte quality due to ovarian aging were suggested to be responsible for impaired fertility with aging.

(受付: 1994年2月28日特掲)

(受理: 1994年5月12日特掲)

地方部会講演抄録

平成5年度日本不妊学会東北支部総会

日時：平成5年11月13日(土)

会場：ホテルリッチ盛岡

1. 牛内部細胞塊由来細胞の分化能について

○稲垣 宏, 菅原七郎

(東北大学農学部動物生殖)

マウス内細胞塊をフィーダーレイヤー上で培養することにより分化の多能性を保持した胚幹(ES)細胞が得られる。これまでのところ家畜ではES細胞の分化能、発生能の証明となる初期胚への注入によるキメラ動物は作出されていない。そこで我々は牛ES細胞の樹立を試み分化能を確認した。

と場由来卵巣から採取した卵をIVM, IVF, IVCにより作出した胚盤胞をSTO細胞のフィーダーレイヤー上で培養した。58個の胚盤胞のうち43個が着床し、継続的な増殖を示した内細胞塊由来細胞は1例のみであった。3回の継代の後、一様で強いアルカリフォスファターゼ活性が確認されたため、浮遊培養により胚様体の形成能を調べた。数日後2層構造を持つ単純型胚様体を形成し、約10日で嚢胞型胚様体へ成長した。また、単純型胚様体を組織培養ディッシュに接着させた。はじめに内胚葉細胞が現われ次第に様々な分化した細胞が現われた。したがって培養内細胞塊由来細胞は多能性でありES細胞である可能性が示唆された。

2. 人工透明帯の開発とその有用性

○渡辺美佳, 矢沢浩之, 柳田 薫

星 和彦, 佐藤 章

(福島県立医大産婦)

透明帯除去卵の受精は、極めて少数の精子で可能であるが、透明帯は受精卵発育に重要なものである。今回、透明帯除去受精卵に対し人工透明帯の開発を試みその有用性を検討した。

人工透明帯としてアルギン酸カルシウムを用いた。B6C3F1マウスの2細胞期受精卵の透明帯を除去後に直径3mmの人工透明帯を装着させた結果、胚盤胞までの発育率は93.1%で透明帯除去卵(77.6%)より良好で無処理卵(93.0%)と同様の結果を示した。また、人工透明帯内で胚盤胞まで発育した卵を偽妊

娠マウスに移植し3仔の妊娠を確認した。

アルギン酸カルシウムは物理的、生物学的刺激から卵を保護する働きがあると考えられる。囲卵腔内精子注入法のかわりとして人工透明帯を応用した体外受精法が期待できる。

3. ハムスター卵透明帯の外側、内側および卵細胞表面の精子先体反応誘起能の比較検討

○矢沢浩之, 渡辺美佳, 吉松宣弘

柳田 薫, 星 和彦, 佐藤 章

(福島県立医大産婦)

近年、重症乏精子症例などに顕微授精が一般的に行われるようになってきているが、このような場合、精子がどこでどのように先体反応を起こすかは明らかでない。そこで、透明帯内面および卵細胞表面の精子先体反応誘起能の比較検討を行った。

透明帯内面の先体反応誘起能をみるために、ハムスター卵をPZD法にて“empty zona”を作製しこれに媒精し、透明帯内面付着精子の先体の状態を観察した。媒精後120分で、透明帯外面に付着した精子では70~80%が先体反応を起こしていたが、内面付着精子では10~15%が先体反応を起こしているにすぎなかった。また、卵細胞表面付着精子でも先体反応陽性率は培養液内の精子とほぼ同程度であった。

以上のことよりハムスター卵においては、透明帯内面および卵表面には強い先体反応誘起能は認められず、囲卵腔内での先体反応誘起はさほど期待できず、精子を注入する際には、何らかの方法であらかじめ先体反応を誘起させておくことが重要であると思われた。

4. 細胞間接着物質であるSuccinyl Concanavalin Aが受精卵およびその着床に与える影響

○千田 智, 森 滋, 飯田修一

渡辺洋子, 熱海 泰, 鈴木雅洲

(スズキ病院産婦)

体外受精・胚移植における問題点のひとつに着床率の低さがある。透明帯に包まれた移植胚は着床までの間、子宮内を浮遊しているが、その半数は子宮外へ流出するものと考えられている。そこで本研究は、着床期子宮内膜へ良く接着する細胞間接着物質、succinyl concanavalin Aを用い、その受精卵への接着度

および毒性について *in vitro* にて、さらにその接着卵を移植した場合の着床率について *in vivo* にて検討した。

(1) 蛍光抗体法にてマウス 2 細胞期から胞胚期まで接着を認め、(2) 濃度 5 mg/ml、5 分以上の暴露で発育が抑制され、(3) 接着胞胚を受容雌マウスに移植しても着床率の向上は認められなかった。

以上の結果より、着床期子宮内膜への接着作用の強い succinyl concanavalin A は透明帯へは接着するものの、その細胞毒性のため着床率の向上は望めないことが判明した。

5. トレハロースを用いた Vitrification

○石田ガブリエラ、野原 理、松田秀雄
平山寿雄、斎藤英和、広井正彦
(山形大産婦)

卵・胚の凍結保存によって不妊症の夫婦は、不妊治療を受けても多胎妊娠がなく妊娠できる可能性が高まった。ヒトにおいても緩徐凍結法によって妊娠分娩例の報告がなされるようになった。しかしこの方法は、胚を凍結するために比較的長い時間を要し、また、高価な装置を必要とする。

最近マウス 8 細胞期において vitrification による胚の超急速凍結法が開発された。凍結保護剤として、DMSO, acetamide, propylene glycol, polyethylene glycol の組み合わせを用いたり、ethylene glycol, Ficoll, sucrose の組み合わせを用いた報告がある。

我々は trehalose を凍結保護剤として用い、ethylene glycol, Ficoll, trehalose の組み合わせで 8 細胞期胚の vitrification による凍結保存を試みた。

この結果、vitrification によって凍結保存融解後 hatched blastocyst まで発育を認め、また、液体窒素に暴露する前の凍結保護剤と平衡する時間は摂氏 4 度で 5 分が最も良好な胚発育を示した。

6. 高電圧パルスが精子受精能に及ぼす影響の検討

○藤井俊策、相良守峰、樋口 毅
斎藤良治 (弘前大産婦)

ヒト精子に高電圧直流パルスを負荷し、精子生存性と先体反応の誘起率を検討した。

正常精液 ($n=5$) を $5 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、コントロール、Ca ionophore 処理群、矩形パルス処理群、減衰パルス処理群の 4 群における精子生存率 (Eosin-Y 染色) と先体反応誘起率 (FITC-PSA 染色) を比較・検討した。パルス刺激は電極間隔 1 mm の細胞融合

用チャンバーに精子浮遊液 (0.25 M sucrose, 1mM Mg, 0.1mM Ca) を入れ、1.0~5.0 kV/cm のパルスを 1 回加えた。精子生存率はコントロールの 94.3% に対し、矩形パルス処理群では 1.0kV/cm では 60.6%, 5.0kV/cm では 13.2% と著明に低下し、減衰パルス処理群においても 5.0kV/cm で 70.4% と有意に低下した。先体反応誘起率はコントロールの 4.2% に対し、4.0 kV/cm および 5.0kV/cm の矩形パルス処理群において、それぞれ 26.7% および 21.0% と有意な増加を認めた。

7. 原因不明受精障害例における Proacrosin 異常についての分子生物学的検討

○清水 靖、福田 淳、松井俊彦
軽部裕子、田中俊誠 (秋田大産婦)

プロアクロシン (以下 pa) は、アクロシン (以下 a) の前駆体として精子先体内に含まれ、a は精子が透明帯に結合、通過する際に、重要な酵素のひとつであると考えられている。今回、受精障害例のなかに精子側特に pa に異常があるかどうか検討した。

対象は不妊患者 16 組で、以前に体外受精を施行し、受精が認められない群および受精が低率であった群である。

精子よりタンパク質は酸性液 (10% glycerol, 2% 酢酸, 10mM benzamizine 液) で 4℃ で 20~24 時間 incubation し抽出した。Western blot (wb) は第 1 抗体として、抗ブタアクロシン抗体を用いた。SDS-PAGE では、同様な泳動パターンを示し、wb では 52~55Kd のバンドに pa が検出された。対象症例中 2 例に wb で pa が検出されなかった。

原因不明の受精障害例のなかに pa の免疫原性の異常が存在することが示唆された。

8. 精巣上体精子による体外受精の成績に関する因子について

○福田 淳、児玉英也、松井俊彦
軽部裕子、清水 靖、田中俊誠
(秋田大産婦)

精路通過障害による男性不妊において、精巣上体精子を用いた体外受精は有用な方法であるが、必ずしも全例に良好な精子が回収できるわけではない。

当科で施行した精巣上体精子による体外受精 11 症例のうち受精が成立した群 (受精成立群) は 6 例 (顕微授精 2 例を含む) で、2 例に妊娠が成立したが、残り 5 例 (受精不成立群) は精子回収が不良なため受精が成立しなかった。精子回収不良例の特徴を明らかにする目的で、この 2 群間で、通過障害の原因、血中

ホルモン値、精巣組織での造精機能の程度について比較検討した。

その結果、原因が先天性と考えられる症例、血中LH値の高値症例、精巣組織のKresterの平均score値が7以下の症例、精巣の炎症が著明で精細管での閉塞がある場合は予後不良と考えられ、今後の治療方針についてさらなる検討が必要と考えられた。

9. IVF-ETにおける品胎以上の多胎妊娠の発生頻度を低下させるための至適移植胚数の検討

○松井俊彦, 福田 淳, 児玉英也
軽部裕子, 清水 靖, 田中俊誠

(秋田大産婦)

(目的) IVF-ETにおいて品胎以上の多胎妊娠を防止する適切な移植胚数について検討した。

(方法) ①当科でのIVF-ET周期のうち、2個移植した164周期、3個移植した175周期、4個移植した232周期の予後を比較した。②3個移植後に妊娠成立した症例を単胎、双胎、品胎の3群に分け、適応、年齢、不妊期間、採卵数、受精卵数、移植胚の形態学的評価等について比較した。

(結果) ①2個、3個、4個移植周期のongoingの妊娠率は、16%、26%、27%で、多胎率は22%、24%、31%であった。②3個移植した症例の年齢に関しては、品胎群は単胎群、双胎群より有意に低かった。移植胚を形態学的にgradeにより1点から4点に分類すると、3個の総和に関しては、品胎群(12.0点)は単胎群(9.9点)、双胎群(10.9点)に比し、有意に高かった。

(結論) 移植胚が形態学的に良質胚と確認され、年齢が30歳未満の症例においては移植胚数を2個とすれば良いことが示唆された。

10. PCOに対するレーザー治療前後のLH-RHテスト

○古橋信之, 松崎幸子, 倉林由美代
河野秀昭, 渡辺英子

(太田西ノ内病院産婦)

PCO症例の卵巣に対し腹腔鏡下KTP-YAGレーザー蒸散、あるいは電気メス焼灼法を施行し、術前術後のLH基礎値の変化、また、LH-RHテストの変化について検討した。

症例は、過去にHMG-HCG療法により重症OHSSの既往のある4症例とクロミフェン無効の2症例で、ホルモンの測定系としては、IMX, LH, FSHダイナマップキットを使用した。

(結果) 1) LHの基礎値は10.8mIUより6.1mIUに低下した。2) LH-RHテストの反応パターンは、最大反応値で50.1mIUから22.4mIUに下降した。3) 2症例に術後自然排卵を認めた。4) 4症例において術後HMG-HCG療法による妊娠を得たが、OHSSの発症は、軽症のみであった。

11. PCOに対する臨床効果に関する検討

○吉田英宗, 渡辺 正, 菅原準一
千田定則, 陳 偉業, 深谷孝夫
矢嶋 聰

(東北大産婦)

Polycystic Ovarian Diseaseは排卵障害を伴うため女性不妊を惹起する。今回我々は、PCODに対して施行したlaparoscopic laser vaporizationの成績を術後の排卵状況の推移を中心にして検討したので報告する。対象は平成2年～平成5年までの期間に排卵障害を有するPCODと診断され当院にてlaparoscopic laser vaporizationを施行した37例。

今回の検討の結果、laser vaporizationにより術直後2週間後で自然排卵の起こる可能性があり、直後無排卵性月経となった場合でも次の周期で自然排卵が期待できた。しかし直後に排卵性月経を認めても次第に排卵までの卵胞期日数が延長する傾向にあり、また、4～6週間待機しても排卵あるいは月経を認めなかった場合、その後の自然排卵はほとんど期待できなかった。

従って排卵性月経を認めても次第に排卵までの卵胞期日数が延長するため、症例に応じ5～6周期目以降は積極的な排卵誘発を検討すべきであり、また、1年以上経過した症例については妊娠例が減少しており症例の内分泌環境を含めた不妊因子の再評価が必要だと考えた。

12. 妊娠を合併した卵巣過剰刺激症候群の茎捻転症例に対する腹腔鏡下手術

○永瀬 智, 今野 良

(岩手県立磐井病院産婦)

卵巣過剰刺激症候群(以下、OHSSと略す)の治療は、卵巣破裂、茎捻転等を生じた場合は手術療法が必要となる。

今回我々は、妊娠を合併したOHSSの茎捻転症例に対し、腹腔鏡下手術を施行し良好な成績を得たので報告する。

症例は、25歳、1妊0産。既往歴、7歳、急性虫垂炎で手術。平成3年より不妊症の治療を開始。平成4年、子宮外妊娠で開腹手術。現病歴。最終月経は

平成5年5月6日から5日間、hMG-hCG-percoll AIH法で6月2日妊娠反応陽性。6月9日両側卵巣が拳大に腫大、腹水も認めOHSSで入院となった。6月21日、激烈な下腹痛出現、莖捻転の診断で手術を決定した。手術は、妊孕性の温存が必要なことから腹腔鏡下手術を選択。手術は硬膜外麻酔とし腹腔鏡下で卵巣嚢腫を穿刺、排液し捻転を解除した。術後経過は順調で現在妊娠27週である。手術療法が必要となったOHSS症例に対しては、適切な術中管理の下では腹腔鏡下手術は有効な治療法と考える。

13. 腹水ろ過濃縮再静注における重症OHSSの治療

○原谷博信, 寺田幸弘, 船山由有子
田村みどり, 高屋りさ, 深谷孝夫
矢嶋 聰 (東北大産婦)

従来の治療法でも症例の改善が見られない重症OHSSに対し、腹水濾過濃縮還元再静注法を施行したところ、症状が改善した症例を3例経験した。

症例1は、輸液、蛋白補充などの従来行われていた治療法を施行したが、腹水の増強、肺水腫の増悪が見られたため、この方法を幾度か施行することにより危機から脱却することができた。症例2では、同法を1回のみで施行で症状は劇的に改善し、追加の治療は必要としなかった。症例3では、同法を都合2回施行し、症状が改善した。

このように、腹水濾過濃縮還元再静注法は、抗原性のない濃縮蛋白成分を静注するため、アルブミン製剤の静注より、患者に対しより安全に施行できる上、重症例に対しても効果を発揮する。それゆえ、この設備がある施設においては、症状が悪化する前に腹水濾過濃縮還元再静注法を施行する価値はあるものとする。

14. 粘膜下筋腫にGn-RH analog療法後、子宮鏡下手術を施行し妊娠に至った一例

○高橋 真, 渡辺 正, 高山和人
田村みどり, 村上 節, 深谷孝夫
矢嶋 聰 (東北大産婦)

今回我々は、粘膜下子宮筋腫に対し、術前にGnRHアナログを投与し筋腫径縮小後に経頸管の筋腫切除術を施行、自然妊娠した症例を経験した。

(症例) 30歳, 0妊0産。月経歴, 既往歴: 特異なし。現病歴: 平成3年5月より月経過多・月経痛出現。近医受診し、HSGにて子宮腔に陰影欠損認め、粘膜下筋腫疑われ平成3年11月当院紹介受診。超音

波: 筋腫径32×24mm。子宮鏡: 子宮底～左側壁に付着する粘膜下筋腫あり。治療経過: ゴセリン4クール皮下注射, 筋腫14×15mmに縮小。ついで経頸管の筋腫切除術施行。術後FD-1を3カ月間挿入, プレマリン1.25mg/日投与。4カ月後HSGにて子宮腔内に陰影欠損なし。その後自然経過にて妊娠, 3300gの女児を自然分娩。

(考察) GnRHアナログ投与で筋腫径の縮小が期待でき、内視鏡下手術の術中操作が容易となるので、今後粘膜下筋腫のある不妊症例などに積極的に用いるべき治療法であると考え。

15. 去勢後のKaufmann療法によりLHのpositive feedback効果がみられた男性仮性半陰陽の1例

○金子尚仁, 川越慎之助, 広井正彦
(山形大産婦)

性steroidによるLHのpositive feedback効果は女性に特異的であり、男性仮性半陰陽でも通常はみられない。我々はKaufmann療法の直後にpositive feedback効果がみられた男性仮性半陰陽の1例を経験したので報告する。

症例の家族歴には特記すべきことはない。原発性無月経のため内科を受診し、ソケイ部腫瘍、陰核肥大、尿道下裂、scrotal foldsを指摘された。染色体は46, XYで、testosterone (348 ng/dl), E₂ (22 pg/ml) は男性の正常範囲であるが、LH, FSH (60.4; 43.1 miu/ml) は高値であった。15歳で性腺(精巣)を摘出し、術後ホルモン補充療法を行った。21歳で3コースのKaufmann療法直後にPremarin testを施行すると、LHは48時間以降は前値(6.6 miu/ml)の240%以上と著明なreboundがみられたが、FSH(前値16.3 miu/ml)には大きな変化はみられなかった。

以上より、男性仮性半陰陽でもsteroidによるprimingの後にはpositive feedback効果が認められることが明らかとなった。

16. 絨毛癌の脳転移・肺転移後に開頭術・化学療法・全脳照射等の集学的治療法を施行し生児を得た一症例

○三浦史晴, 吉崎 陽, 松田壮正
井筒俊彦, 利部輝雄, 西谷 巖
(岩手医科大産婦)
芳賀健一 (岩手県立福岡病院産婦)
善積 昇 (岩手県立久慈病院産婦)

症例は31歳, 2妊0産, 1985年4月県立福岡病院

で全胎状奇胎の診断にて子宮内容清掃術施行し、経過観察をしていたが、途中より受診しなくなった。1987年4月痙攣発作にて同院を受診、絨毛癌の脳転移・肺転移の診断で当科紹介となった。MAC1コース後、頭部転移巣を摘出し、さらにMAC5コース、LINAC(全脳照射)40Gy、MEA-Co3コース施行後、肺転移巣切除術を行った。その後はhCGの良好な下降を認め、治療後5年経過した後に妊娠を許可し、1993年自然妊娠に至った。同年10月に妊娠40週で帝王切開術にて3074gの男児(Ap8/9)を出産し、現在のところ児に異常は認められていない。

今回、絨毛癌の脳転移・肺転移に対して化学療法(総投与量 MTX 1350mg, ACT-D 13.5mg, VCR 3mg, CPA 4800mg, VP-16 600mg)、手術療法(開頭術、左下肺葉部分切除術)、放射線療法(全脳照射 40Gy)を行った後に自然妊娠、分娩に至った症例を経験したので報告する。

特別講演

「着床のメカニズムをめぐる」

富永敏朗(福井医大産婦)

着床は卵と子宮内膜との緊密な情報交換のもとに両者の共同作用によって円滑に進行する。しかし着床のメカニズムには不明の点が多く、不妊診療の向上にその解明が期待されている。

まず着床のメカニズムを考察し、ついでこの解明をめざすための我々の着床モデル実験を紹介し、最後に臨床的観点から着床の実態に迫りやすい体外受精・胚移植における子宮内膜並びに卵のqualityについての研究結果を述べる。

1. 着床の過程とそのメカニズム

子宮腔内に入った卵(胚)は狭小化した子宮腔内に位置を定めたのち、卵と内膜上皮の接着分子により互いの認識と接着が起こり、ついで胚のトロホプラストは内膜上皮細胞層を貫通し、基底膜を貫通し、内膜間質内へ進入する。以上の着床の過程で問題になるのは、細胞接着分子、内膜上皮細胞層の解離・脱落、基底膜並びに内膜間質基質の構成成分とこれらの分解酵素である。胚トロホプラストと子宮内膜上皮細胞の接着には多くの細胞接着分子が関与している。内膜上皮細胞の解離・離脱にはapoptosisなどprogrammed cell deathの機構の存在が考えられる。基底膜、内膜間質基質の分解はトロホプラストの産生するmatrix metalloproteinase (MMP), serine proteinaseなどの細胞外マトリックス分解酵素による。

子宮内膜は着床前には間質基質のremodelingが起こり、着床時のトロホプラストの侵入を容易にする。着床が始まると内膜間質細胞は脱落膜変化を起こし、物理的barrierとして、またtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)や種々のサイトカインによる細胞外マトリックス分解酵素の調節機構によってトロホプラストの侵入を制御するものと考えられる。

2. IN VITRO子宮内膜組織構築

In vitro着床モデル作成のために、ヒト、家兔の子宮内膜上皮細胞を基底膜構成成分上で培養した。腺管形成に続いて被膜上皮が形成され、生体内と同じ組織構築を示し、形態的にも機能的にも生体内子宮内膜上皮にごく近い性格を示すものがえられた。

3. IN VITRO着床モデル実験

次に家兔胚をIn vitro組織構築子宮内膜上皮の上で培養する着床モデル実験を行った。その結果、生体内における着床ときわめて似たembryo-endometrium interactionが認められた。すなわち、In vitro組織構築子宮内膜は着床時の胚に対して受容能をもち、着床のメカニズムの解明に有用な実験系であることが示された。

4. 平行培養による着床期子宮内膜のquality評価

In vitro子宮内膜組織構築を臨床的に応用する試みとして、体外受精・胚移植の前周期に患者自身の子宮内膜上皮細胞の培養を開始し、卵巣刺激治療時の患者血清を加えて培養する平行培養を行い、血清成分の影響による内膜上皮の組織構築の状態を観察した。体外受精・胚移植成功例と不成功例との培養内膜所見の比較検討から内膜の着床受容状態の不良が着床障害を来す可能性が示唆された。この試みは着床時の子宮内膜のquality評価とその所見に応じた着床障害改善の治療法の可能性を示すものと考えられる。

5. CO-CULTUREと卵のQUALITY

体外受精・胚移植における着床率の改善を目指して、ウシ、ヒトで卵を各種体細胞と共培養し、体外受精並びにその後の発育に及ぼす影響を検討した。その結果体細胞の共培養は卵の発育促進とqualityの改善に有用であることがわかった。

以上、着床のメカニズムを考察し、この解明へのIn vitroの実験系を用いたアプローチとその臨床的応用について述べた。生命科学の進歩の導入によって不明の点が多かった着床現象にも解明の糸口が見えてきたように思う。今後の研究の進展が期待される。

第109回日本不妊学会関東地方部会

日時：平成6年2月19日(土)

場所：東京大学 安田講堂

1. 新しい卵管鏡システムによる卵管形成術の治療成績と卵管内腔所見についての一考察

○浅田弘法, 末岡 浩, 橋場剛士
久慈直昭, 宮崎豊彦, 小林俊文
野澤志明 (慶応大産婦)

新しく開発された, 卵管鏡下卵管形成システムを, 子宮卵管造影その他の方法で完全閉塞と診断された卵管へ応用し, 腹腔鏡下で卵管の形成術を施行するとともに, その内腔所見について検討した。

対象患者は15名, 計30卵管に卵管鏡下卵管形成術を試みた。カテーテルの全長は10cmであるが, 全長にわたり挿入されたものを卵管形成術成功例とした。閉塞部位別形成術成功率は, 間質部40%, 峡部94%, 膨大部50%であった。卵管別の卵管形成術成功率は68%, 患者別の成功率は73%であった。卵管内腔所見としては, 閉塞・癒着による狭窄, 血管が退縮して蒼白な色調の卵管上皮, などの異常所見が認められた。卵管内を閉塞部位を解除しながら挿入し内腔上皮も観察しうるこのシステムは, 従来の方法で改善が困難と考えられていた卵管閉塞を治療することができ, また, 腹腔鏡と同時に施行することが卵管鏡による観察と治療に有効であった。

2. 子宮鏡下選択的通水治療症例の臨床成績について

○中山摂子, 網野幸子, 酒井啓治
工藤美樹, 安達知子, 岩下光利
武田佳彦 (東京女子医大産婦)

(対象) HSGで片側または両側卵管起始部の閉塞が存在したものを対象とした。

(方法) 子宮鏡下に卵管口を確認し, 約1cm卵管内にカテーテルを挿入し, 生理食塩水10mlを注入した。

(判定) 注入時抵抗なく注入できたものを疎通性回復とし, 一方, 抵抗が大きく注入不可能なもの, あるいは注入圧をさらに高めることにより, 子宮内へ逆流したものを疎通性回復不可と判定した。

(結果) 17症例中, 卵管口へ挿入不可能であった症例は2例であり, 計20卵管に選択的通水術が試みられた。20卵管中13卵管65%に疎通性が回復した。また, 術後HSGが施行された4症例は全例卵管の疎通性が回復していた。15症例中妊娠成立を4例に認め,

いずれも正常妊娠経過であった。なお本法施行の後, 数例に腹痛を認めたが, いずれも短時間に消失している。

(考察) 本法は卵管に障害を持つ不妊患者の治療法として, 安全かつ有効な治療法であると考えられた。

3. 腹腔鏡所見に対する子宮卵管造影所見の予備診断的有用性

○丸山正統, 伯野直美, 高井 泰
酒井英明, 森田 豊, 宮内彰人
大須賀穰, 藤原敏博, 林 直樹
矢野 哲, 堤 治, 武谷雄二
(東京大産婦)

(目的) 子宮卵管造影(HSG)の有用性の検証

(対象と方法) 対象は1991年から1993年までに腹腔鏡を施行した症例のうち当科でHSGを施行した90例。HSGの所見を卵管通過性と腹腔内の癒着に分け, 腹腔鏡との所見を比較検討した。癒着の判定は間質部で閉塞し腹腔内へ造影剤が漏出しなかった7例を除いた83例とした。卵管通過性は両側の所見が一致したものを一致例とした。

(結果) 83例中HSGで癒着と判定したものは61例で腹腔鏡で癒着を確認したものの49例(80%)。癒着なしとした22例中, 腹腔鏡で癒着のないことを確認したものの17例(77%)。卵管通過性は90例中80例(89%)に一致を認めた。癒着偽陽性症例ではクラミジア抗体陽性例や子宮筋腫の合併が多く, 偽陰性例では子宮内膜症の合併を多く認めた。

(結論) HSGは癒着の診断に対しても有用であり, 腹腔鏡下手術の計画を立てる上で, 重要であると考えられた。

4. 視床下部障害による排卵障害患者に対するBromocriptineの効果—多施設における検討—

○合阪幸三, 吉田浩介 (賛育会病院産婦)
香山文美, 木村好秀 (三楽病院産婦)
為近慎司, 佐藤孝道 (虎ノ門病院産婦)
松岡 良 (戸塚日立病院産婦)
森 宏之 (帝京大産婦)

高プロラクチン血症を除外した視床下部障害に基づく排卵障害患者に対するbromocriptineの効果を多施設において検討した。

(方法) 上記施設における216例について, bromocriptine 5mg/dayを8週間以上連続投与し, その効果をretrospectiveに解析した。

(成績) ①bromocriptine有効例(154例, A群), 無効

例(62例, B群)では, 投与前のTRH負荷30分後のプロラクチン値(PRL₃₀)はそれぞれ, 74.1±36.5 vs. 38.0±18.2 ng/mlで, A群で有意に高値を示した(p<0.01). 血中プロラクチン値の分布から, PRL₃₀≥50ng/mlの場合はbromocriptineが有効と考えられた. ②A, B群間でLH/FSH比はそれぞれ1.5±1.2, 1.1±0.6とA群で有意に高かった(p<0.02). PRL₃₀<50ng/mlの症例においても有効・無効群間で1.3±0.6 vs 1.0±0.5と前者で有意に高かった(P<0.02).

(結論) 視床下部障害の71.3%はbromocriptineが有効で, PRL₃₀≥50ng/ml, LH/FSH≥1が有効性の基準と考えられた.

5. プロラクチノーマの長期経過—分娩後石灰化の一例—

○田村 貴 (宮内庁病院産婦)
水上尚典 (自治医大産婦)

プロラクチノーマ(P)のnatural historyについては不明な点が多く, 特にマクロPで顕著である. その理由の1つはPの発育が緩かで観察に長期間を必要とするためと思われる. 今回我々はマクロPの1例を15年間にわたり観察した.

患者は昭和54年不妊と続発性無月経を主訴に来院. 初診時血清PRLは195Mg/lと高値, LH基礎値およびGnRHに対するLHの反応性はともに低下. トルコ鞍単純撮影でdouble floorを認めPの疑と診断. hMG-hCG療法で3胎妊娠, 37Wで帝切分娩. 妊娠前CT上にトルコ鞍内および鞍上部に進展する下垂体腫瘍が存在, そして分娩2カ月後この腫瘍内に壊死巣と石灰化巣を認め, 分娩2年後鞍上部腫瘍は消失, さらに1年後Empty sella (ES)を認め, この腫瘍の縮小に平行して血清PRL濃度は減少, GnRHへのLHの反応性で示されるGn分泌能は回復して自然月経が発来した. ESと石灰化は緩かに進行し分娩12年後の今日CT上腫瘍は消失, 鞍底は石灰化しその上をESが覆っているがその進行は停止したかに見える.

6. 習慣流産患者におけるプロラクチン測定の意義

○根本泰子, 牧野恒久, 松林秀彦
小沢伸晃, 細川知俊, 染谷健一
野澤志朗 (慶応大産婦)

不妊症の原因は多種多様であるが, 現在, 当院不妊症外来では原因不明のものが30%と最も多く, ついで, 自己抗体陽性, 黄体機能不全, 高プロラクチン血症となっている.

今回, この中でとくに高プロラクチン血症について検討した.

過去3年間の不妊症外来におけるプロラクチン測定者361名中, 高プロラクチン血症患者は55名(潜在性高プロラクチン血症2名を含む), 15.2%であった. これらの症例に対し, プロモクリプチンを36名(65.5%)に投与したところ, 24例(43.6%)が妊娠し, 延妊娠回数は28回であった. 流産率は, プロモクリプチン投与群で33.3%, 非投与群で55.6%で, 2nd trimesterをこえて妊娠が継続したのは, 投与群で66.7%, 非投与群で40.0%で, 投与群で妊娠継続率が高い傾向にあった.

7. 子宮内膜症の妊孕性とプロラクチン(PRL)分泌に関する臨床的検討

○町田稔文, 松永裕子, 多賀理吉
水口弘司 (横浜市大産婦)

不妊症における子宮内膜症とPRL分泌異常の関連性および妊孕性の予後を臨床的に検討した.

不妊等を主訴として, 昭和62年1月より平成2年7月までに開腹または腹腔鏡が施行された80例(非内膜症: 16例, 内膜症: 64例)を対象とし, R-AFS分類と血中PRL値を比較検討した. 内膜症の有無と血中PRL基礎値およびTRH負荷値の比較では, 非内膜症の方がやや高値を示した. 子宮内膜症のR-AFS Stage別の検討では, Stage I, IIの軽症内膜症のPRL基礎値, TRH負荷値は, 非内膜症やStage III, IVの重症内膜症よりも低値を示した. 子宮内膜症症例のうち, 挙児希望例としてフォローアップできた41例につき, 重症内膜症で術後のGn-RHアナログ等による後療法施行群(妊娠5例, 非妊娠17例), 軽症内膜症で後療法未施行群(妊娠8例, 非妊娠11例)の4群に分類し, 血中PRL基礎値, TRH負荷値と妊孕性の予後とを検討したが, 血中PRL値は, 各群間に有意差は認められなかった.

8. 顆粒膜細胞増殖機序の研究 —不死化ブタ顆粒膜細胞を用いて—(IV)ステロイドホルモンの影響

○北岡芳久, 田辺清男, 菊池正晃
斉城綾子, 小林俊文, 野澤志朗 (慶應大産婦)
亀井 清 (済生会中央病院産婦)
木戸 進 (東京電力病院産婦)

(目的) 顆粒膜細胞の増殖は, 卵胞発育に重要な役割を担っているが, その機序は未だ解明されていない。

い。今回我々は、不死化ブタ顆粒膜細胞 (PGV) をモデルとして、 17β -estradiol (E_2), progesterone (P_4), testosterone (T) の PGV 増殖に及ぼす影響を検討した。

(方法) PGV を 1×10^5 /well の割合に調整し、これに E_2 , P_4 , T を各種濃度 ($10^{-5} \sim 10^{-12}$ M) で添加し、 37°C で96時間培養後の細胞数を算定した。

(成績) E_2 , P_4 , T のいずれも、各濃度間における PGV の細胞数には有意差を認めなかった。

(結論) E_2 , P_4 , T は、PGV 増殖に影響を及ぼさなかった。しかし、primary culture を用いた同様の実験系で、我々とは異なる結果を報告しているものもあり、PGV の characterization をすすめ、他のステロイドホルモンや成長因子等についてもさらに検討を重ねたいと考えている。

9. 重症卵巣過剰刺激症候群に対する低用量ドーパミン療法の使用例について

○栗原 務, 関 守利, 小原満雄
田村 仁, 高木 剛, 竹内 巧
水沼英樹, 伊吹令人 (群馬大産婦)

重症卵巣過剰刺激症候群 (severe OHSS) に対し、1992年 Fenoretti 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。今回我々は、6例の severe OHSS に対しこのドーパミン療法を施行した。1例が非妊娠例であり、5例が妊娠例であった。ドーパミンの使用量は、原則として $3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で持続投与した。

6例中4例は、ドーパミン療法開始2日以内に著明な尿量増加を認めたのに対し、Ht 高値の2例は、3~4日を要した。ドーパミン使用日数は、非妊娠例では6日間であり、妊娠例では14~18日間であった。妊娠例では、妊娠4週前後でドーパミン療法を開始し、6週間前後で終了した。ドーパミン投与中は、母体に重篤な副作用はなく、児にも奇形は認められなかった。

以上より、severe OHSS に対するドーパミン療法は安全で、一治療法として選択されると考えられる。

10. 排卵誘発時の LH の上昇と早期黄体化の出現

○斉藤正博, 石原 理, 須野敏章
竹田 省, 木下勝之
(埼玉医大総合医療センター産婦)

(目的) 不妊症例の排卵時期を超音波断層法によって推測し、LH 上昇および早期黄体化の有無につき検討した。

(対象および方法) 対象：1992年1月より3月までに不妊外来を受診した98例。方法：超音波断層法に

よる主席卵胞径の計測により排卵時期を推測し、同時に血中 LH, FSH, E_2 , P_4 を測定した。

(成績) ①排卵前の平均主席卵胞をはクロミフェン周期 $22.7 \pm 3.7\text{mm}$, hMG 周期 $19.8 \pm 2.0\text{mm}$, 自然周期 $20.0 \pm 3.8\text{mm}$ 。②LH 上昇 (LH>20) はクロミフェン周期 9.3%, hMG 周期 2.2%, 自然周期 22.2%。③早期黄体化 ($P_4 > 1.5$) はクロミフェン周期 14%, hMG 周期 10.9%, 自然周期 0%。④クロミフェン周期では hCG 投与前の LH 上昇や早期黄体化の多くは主席卵胞径が 24mm 以上であった。

(結論) 排卵前に LH 上昇や早期黄体化を来す前に hCG を投与するには主席卵胞径が 20mm 程度の段階で投与することが重要であると思われた。

11. GnRHa-hMG療法により妊娠に至った POF の1例

○中野義宏, 武内裕之, 豊成由佳
阿久津聡, 町田正弘, 三橋直樹
桑原慶紀 (順天堂大産婦)

POF (premature ovarian failure) は、排卵誘発が困難な卵巣性無月経の代表的疾患である。今回我々は腹腔鏡による卵巣生検で卵胞が認められなかった POF に対して排卵誘発を行い、妊娠に至った1症例を経験したので報告する。

症例は28歳の主婦、整順であった月経が23歳から稀発月経となり、25歳で無月経となった。平成4年11月当科初診し、LH: $18\text{mIU}/\text{ml}$, FSH: $48\text{mIU}/\text{ml}$, E_2 $10\text{pg}/\text{ml}$ で卵巣性無月経と診断し、12月に腹腔鏡下卵巣生検を施行した。卵巣は委縮しており、生検組織内に卵胞は認めなかった。Kaufmann療法3クール行い、その後 GnRHa $900\mu\text{g}/\text{day}$ 投与により30日目に基礎体温が上昇し排卵した。さらに GnRHa を継続し、HMG を併用し AIH を施行したところ2周期目で妊娠が成立した。

POF は排卵誘発が困難な疾患であるが、GnRHa を用いた排卵誘発を積極的に行うことにより、妊娠可能な症例も存在することが確認された。

12. 妊娠初期胚の流産前心拍変化

○池川 明 (池川クリニック)

流産する前の徐脈にどのような傾向が認められるかを検討する目的で徐脈の経時的変化を調べた。

1989年1月から1992年12月までの期間に心拍確認後流産した胎児頭腎長30mm以下の20症例中除脈をビデオテープに記録し、再度心拍が確認できた4症例を対象とした。徐脈は186例の正常妊娠から得ら

れた95%信頼区間下限を下回る場合とした。

(症例1)約2分間で52bpmから徐々に心拍停止した。(症例2)7分間で82-0-102-106-0bpmと急激に変化した。(症例3,4)心拍が一度停止したように思われたが翌日拍動を確認し、その後数分で再び心拍停止した。

以上のことから流産前の胎芽期の徐脈には1)短時間で心拍数の変化がみられることがある2)超音波上心拍が停止したように思われても再び拍動の確認ができることがある、という所見が得られた。胎芽心拍の詳細な検討により早期流産予測の可能性が示唆されるとともに徐脈発生機序の解明に貢献するものと期待される。

13. 卵管留症の治療成績とその限界

○角田郁男, 長田尚夫, 本田利江
藤井トム清, 吉田孝雄, 佐藤和雄
(日本大産婦)

卵管開口術の予後因子として、卵管粘膜の損傷程度と卵管内腔の癒着の有無が重要である。いずれにしても、卵管開口術の際の所見から得られる情報で、術前に予測することは困難と思われることと、卵管留症を放置することは、卵管貯留液による子宮内環境への悪影響が予測されること、卵管開口術を行うことによって、卵管貯留液の子宮内への逆流防止にもなり、その後の、体外受精やギフトを行うのに、好都合となることから、術後の妊娠率は低い、その臨床的意義は、大きいものと思われる。

14. 最近経験した内外同時妊娠の3例

○奥野 隆, 笠井 剛, 端 晶彦
木下俊彦, 加藤順三 (山梨医大産婦)

子宮内外同時妊娠は、自然発生的には極めてまれな疾患であるが、排卵誘発周期やAssisted reproductive therapy (ART)では、増加することが問題となっている。当科で最近経験した内外同時妊娠の3例について報告する。

(症例1)hMG周期妊娠。4週0日OHSSが出現、腹水穿刺にて血性腹水を吸引。妊娠4週6日に子宮内GS確認。妊娠16週6日、右卵巢腫瘍の縮小傾向を認めず開腹手術。右卵巢ルテイン嚢胞および左卵管膨大部妊娠であった。

(症例2)hMG-hCG周期妊娠。妊娠5週1日、子宮内GS確認、卵巢腫大と腹水を認めた。妊娠10週0日、下腹痛出現、子宮外に胎児確認、直腸前壁の腹膜妊娠であった。

(症例3)IVF-ET妊娠。妊娠5週2日、子宮内GS確認。下腹痛とダグラス窩の暗血性腹水吸引により内外同時妊娠を疑い早期に開腹手術。左卵管膨大部妊娠流産であった。

3例とも卵巢腫大のため外妊の診断が困難であったが、血性腹水は、内外同時妊娠の早期診断のひとつの手がかりとなることが示唆された。

15. 不妊症検査および治療の不妊夫婦に与える心理的影響

○中川博之, 堀口 文, 莊隆一郎
齊城綾子, 田辺清男, 小林俊文
野沢志朗 (慶応大産婦)

16. 当科不妊外来における妊娠症例の解析

○伯野直美, 高井 泰, 丸山正統
酒井英明, 森田 豊, 宮内彰人
大須賀穰, 藤原敏博, 林 直樹
矢野 哲, 堤 治, 武谷雄二
(東京大産婦)

当科不妊外来における88-93年の6年間の妊娠症例481例の治療内容および予後について検討した。

(治療法) 1)全妊娠数に占めるclomiphene妊娠の割合は著変なく、93年は20例(17.8%)であった。2)gonadotropin投与周期の妊娠症例は増加傾向にあり、93年は27例(24.1%)であった。特にAIH周期の排卵誘発として投与される症例が増加していた。3)92年のpercoll法導入を契機にAIH試行数が増加したのに伴いAIH妊娠も急増し、93年は32例(28.6%)であった。4)93年のIVF-ET妊娠は、110回の採卵周期中19周期であった。

(妊娠予後) 93年は流産32例(28.6%)、多胎妊娠7例(6.3%)、子宮外妊娠1例(0.9%)であった。

(結語) 当科では他施設より紹介される難治症例が多いため、排卵障害がない症例でも積極的に排卵誘発を試行しているが、厳重な管理により多胎妊娠の発生率は比較的強く抑えられていると思われる。

17. 当科不妊外来における男性因子の過去20年間にわたる検討 一第1報一

○高井 泰, 伯野直美, 丸山正統
酒井英明, 森田 豊, 宮内彰人
大須賀穰, 藤原敏博, 林 直樹
矢野 哲, 堤 治, 武谷雄二
(東京大産婦)

Carlsenらによれば、これまでの諸家の報告を検討

すると、1940年から1990年の50年間に、精子濃度は60%に減少したとされる。しかし、この報告ははまだ controversial である。当科不妊外来を受診した男性の精液所見を過去20年間にわたり検討し、この報告が当科を受診した男性にも共通した現象かどうか検証した。(方法) 1973, 1978, 1983, 1988, 1992年度に当科で精液検査を施行した380例を対象に、ANOVAなどの統計学的手法を用いて比較・検討した。

(結果) 精液検査施行症例にしめる異常所見症例の割合は、各年度とも40%前後であり、有意差はなかった。正常所見症例の精子濃度は減少しておらず、1992年度は $(117 \pm 13) \times 10^6/\text{ml}$ (95%信頼区間) だった。(結論) 当科不妊外来を受診した男性においては、近年報告される「精子濃度の減少」を支持する所見は得られなかった。

18. Y染色体腕間逆位による高度乏精子症例について

○岩本晃明, 矢島通孝, 長田尚夫
(聖マリアンナ医大泌尿器)
里見佳昭 (横須賀共済病院泌尿器)
中堀 豊, 中込弥男
(東京大人類遺伝学)

症例は38歳, 1年間の不妊で来院。配偶者は34歳, 婦人科的異常はない。理学的所見に異常なく精巣サイズも正常であった。精液検査; $0 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率0%。内分泌検査はすべて正常。精巣生検像; Johnsen scoreの平均値は3.5, 8以上の精細管が7%みられた。染色体検査; 46, X, inv(Y)(p11.2 q11.23), Qバンド法でY-bodyが観察された。DNA検索; 17種のY染色体特異的DNA断片をプローブとしてサザンプロット法を行い23lociの存在を検討したところDYS7CとDYS1の欠失を認めた。

(まとめ) 本症例はY染色体の短腕p11.2と長腕q11.23とが断裂しその間のsegmentが逆になった極めてまれな症例であった。AZF(azoospermia factor gene)と関連するDYS7C, DYS1の欠失が起こった理由として腕間逆位に伴って欠失した, あるいは偶然に欠失した可能性が考えられた。

19. 幼児期の鼠径ヘルニア根治手術時精管損傷による無精子症3例の治療経験

○養和田滋, 金子正志
(東京通信病院泌尿器)
国武 剛, 西古 靖, 河邊香月
(東京大泌尿器)

幼児期の鼠径ヘルニア根治手術の際両側の精管損

傷を生じ、閉塞性無精子症となった3例について、顕微鏡下精管再吻合術を行ったので、その治療経験について報告する。

症例は30歳, 28歳, 29歳で、それぞれ4歳, 2歳, 3歳でヘルニア手術をうけた。手術時の所見ではいずれの症例も鼠径管あるいはその付近で精管の断裂が認められた。

3例中2例は精管の再開通は確認されたものの術後も無精子症のまま改善はみられなかった。この2例では吻合前の精巣側精管に精子の存在が確認されなかった。他の1例で術後精子濃度 $23 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率45%まで回復がみられ、AIHによる妊娠の成立が得られた。この症例では吻合前に精巣側精管に精子の存在が確認された。文献的にもこうした症例で良い結果が得られている。

20. 治療により精子の出現をみた射精管閉塞症の一例

○斎藤和男, 釜井隆夫, 芝 龍寛
広川 信 (藤沢市民病院泌尿器)

33歳男性, 原発性不妊。15歳時に右鼠径ヘルニアの手術を受けている。右は停留精巣, 左精巣は陰嚢内にあり容量は13ml。精液量は平均2.3mlで無精子症を示した。FSHは14.8と高値を示した。右停留精巣を摘除したところ10gで精子形成は認められなかったが、左精巣生検では精子形成が見られた。左精囊腺造影では、精囊腺は拡張し膀胱内への流出は見られなかった。精管に留置したカニューレより約7mlの褐色内容液が逆流し、多数の精子を含んでいた。経直腸的超音波検査では、左精囊腺と射精管は拡張していた。尿道鏡では精阜の後左側が隆起し、穿刺すると褐色内容液が流出したため、約5mmの縦切開を加えた。

術後の精液量は変化しなかったが、精子が出現するようになり6カ月後には $17.2 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率46.8%を示した。

21. 精管欠損症12例の検討

○大橋正和, 石川博通, 矢内原仁
早川邦弘, 島 亮,
(東京歯科大市川総合病院泌尿器)
兼子 智 (同産婦)

当院で経験した精管欠損症12例の臨床的検討を行った。

精管欠損症の頻度は全男子不妊症患者の1.1%であった。精管欠損症は注意深い精索の触診により診断

され、12例中10例が両側、2例が片側に認められた。精液検査では全例無精子症であり、全例精液量が1.0ml未満でありWHO基準における乏精液症であった。精漿中果糖値は著しく低値であった。また、全例精巣容積、ホルモン値、染色体に異常を認めなかった。画像診断では腎に異常を認めず、精嚢腺については10例が両側欠損、1例が片側欠損、1例が両側低形成であった。尿道膀胱鏡にて後部尿道～膀胱三角部に全例異常を認めなかった。

12例中8例に人工精液瘤造設術が施され、4例より良好な運動性を有する精子が回収され、体外受精のために凍結備蓄中である。

22. 先体反応未誘起精子の分離の試み

- 兼子 智, 郡山 智, 吉田丈児
赤星晃一, 小宮山慎一, 勝又木綿子
斉藤 優, 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, 野澤志朗
(慶應大産婦)

23. Sperm Washing Medium を用いた Percoll-AIH 法

- 新家 秀, 小田原靖, 松本和紀
楠原浩二, 寺島芳輝 (慈恵医大産婦)

市販HTF, Sperm Washing Medium (SWM) を用いた簡易な Percoll 調整による AIH 法の有効性について検討した。

(対象および方法) 平成5年6月～12月に110例290周期に対して市販HTF, SWMにより80%Percollを調整し、攪拌密度勾配法によりAIHに共した。

(結果) Percoll処理により精子運動率は52.1%から83.7%へ有意に向上した。精子回収率は49%であった。妊娠率は対周期5.2%, 対患者13.6%であった。不妊因子別妊娠率では排卵障害28.5%, 卵管形成術後16.7%, 原因不明16.2%, 男性因子12.5%であった。卵巣刺激方法により妊娠率に差はなかった。1～4回目までは周期毎約8%であり87%が4回までに妊娠に至った。

(結論) 本法は精子調製として有効であると考えられた。一方AIH施行回数については4～5回に留めるべきと考えられる。

24. 当教室における過去2年間の Percoll-AIH の成績

- 上原桂子, 高井 泰, 伯野直美
丸山正統, 酒井英明, 森田 豊
宮内彰人, 大須賀稜, 藤原敏博
林 直樹, 矢野 哲, 堤 治
武谷雄二 (東京大産婦)

25. 男性不妊患者の体外受精胚移植時の至適媒精精子濃度に関する検討

- 吉田あゆみ, 清水康史, 久保田俊郎
坂本秀一, 依光 毅, 尾林 聡
己斐秀樹, 麻生志武
(東京医科歯科大産婦)

(目的) 男性不妊患者の体外受精胚移植時の至適媒精精子濃度について検討を試みた。

(方法) WHOの基準で精液検査の異常を呈した3症例に対し、同一周期で2～3種類の精子濃度で媒精を行い、受精率および分割率を比較した。同時に sperm penetration assay (SPA) を施行した。

(成績) 症例1は精子濃度(C: $\times 10^6/\text{ml}$) 1.1, 運動率(M:%) 27であった。媒精精子濃度(ISC: $\times 10^4/\text{ml}$) をA群: 12, B群: 22.5としたところ、受精率, 分割率は各々, A群: 0/5, 0/5, B群: 1/10, 1/10であった。SPA (5 μM のA23187を使用) は侵入率25%と軽度の異常を呈した。症例2はC: 10.5, M: 40であった。ISCをA群: 10, B群: 15, C群: 20としたところ、受精率, 分割率は各々, A群: 0/2, 0/2, B群: 1/3, 1/3, C群: 2/2, 2/2であった。SPAは侵入率52%と正常であった。症例3はC: 170, M: 48であった。ISCをA群: 12, B群: 15, C群: 20としたところ、受精率, 分割率は各々A群: 13/15, 11/15, B群: 9/10, 9/10, C群: 2/2, 2/2であり, A群で4個, C群で1個の多精子受精を認めた。

(結論) 精子所見が軽度の異常を示してもSPAで正常の場合は, ISCは10～20が至適濃度であるが, 精子所見およびSPAがともに異常の場合は, それ以上の濃度が必要と考えられる。

26. 顕微授精で妊娠した重症乏精子症の3例

- 佐藤芳昭, 三宅崇雄, 秦 和子
大沢章吾 (相模原協同病院産婦)
望月愛郎 (衣笠病院産婦)

重症乏精子症または受精障害の不妊症に対しては顕微授精の適応が考えられており、当科においても

当院倫理委員会、日産婦登録の許可を得て実施に入った。

1992年2月より1993年12月までにPZD 6例(6周期)SUZI 11例(14周期)に施行しSUZIで3例の妊娠を得た。うち1例は流産、2例は順調にon going pregnancyである。

第1例は全精子数70万と重症な乏精子症であり、妻側には一過性のPOFあり。一個の採卵へのSUZIで受精着床するも流産に終わった。第2例は夫の運動精子200~250万であり2回目のSUZIにて単胎着床、3例目は受精障害があり、計6回のIVT-ETで、通常の媒精では受精卵を得られなかったが、3回目のSUZIにて妊娠が成立した。

顕微授精についてはどのような例を適応とするか、卵の損傷率を低めるにはどうするかなど、改善すべき点が残されているが、通常のIVFでの妊娠が期待され得ない患者に対しては、有力な治療法となり得よう。

27. 凍結受精卵を用いた子宮鏡下卵管内胚移植法(h-TET)により妊娠した1例

○北村誠司, 境田通泰, 竹原祐志

片山恵利子, 杉山 武, 飯田悦郎

(荻窪病院産婦)

IVFでの妊娠困難な症例に対し、卵管内胚移植法や内膜埋め込み法が試みられている。今回我々は、2回IVFを施行しても妊娠しない症例に対し、凍結受精卵を用いた子宮鏡下卵管内胚移植法(hysteroscopic tubal embryo transfer:h-TET)を実施、妊娠例を得たので報告する。

(症例) 34歳で9年間の不妊期間、卵管通過性は両側共に良好。他院で1回IVFを施行ののち、93年4月当院でIVFを施行したが妊娠せず。余剰卵を凍結保存した。約半年後、月経周期14日目に経腔式超音波検査で、排卵直後と判断。3日後、凍結卵の解凍を行い、8細胞の卵を2個、子宮鏡を用いて左側卵管に移植。移植後14日目、妊娠反応陽性となり、現在妊娠20週2日で経過順調。

(方法) 子宮鏡はオリンパスHYF-type Pを用い、カテーテルは、テフロン性、オリンパスと共同開発したもので、径は3Fr.、先端3cmは2Fr.と細くなっている。胚の凍結方法として、凍結液には、1.5MのDMSOを用いた。解凍の際は、緩速融解法を用いた。

(総括) IVF困難例に対し、凍結受精卵を用いた子宮鏡下卵管内胚移植法(h-TET)を施行した結果、妊娠例を得、このh-TETが有用であると考えられる。

28. 採卵時の卵胞液中各種steroid濃度比と卵胞径との関係

○岩崎信爾, 小塚和人, 鈴木 真

佐藤美幸, 田原隆三, 斉藤 裕

矢内原巧

(昭和大産婦)

(目的) GIFT症例における採卵時に卵胞液を採取し、卵胞液中の各種steroid hormone(S)濃度比より卵胞内におけるsteroidogenesisと卵胞径との関係を検討した。

(対象および方法) 機能性不妊と診断された患者5名を対象としてGnRHa-FSH-hMG-hCGのlong protocolにて卵巣刺激を行い、GIFT療法を施行、卵胞液(56検体)を採取した。卵胞液中のpregnenolone(P₅), progesterone(P), 17 α -hydroxy-P₅(17P₅), 17 α -hydroxy-P(17P), androstenedione(A), testosterone(T), estrone(E₁)およびestradiol(E₂)をRIA法で、PRLはEIA法にて測定した。S値はすべてホルモン比として表した。(成績) T/A, (T+E₂)/(A+E₁), E₂/Tと卵胞径との間には有意な正の相関を、A/17Pにおいては有意な負の相関を認め、卵胞径の大きな卵胞では17 β HSD, aromatase活性の亢進が推察された。

以上より、卵胞サイズにより黄体化にともなう卵胞内のsteroidogenesisが異なっている可能性が示唆された。

29. 体外受精14日後における血中hCG値と妊娠予後との関係

○生方良延, 神野正雄, 羽生一朗

佐藤 学, 吉村泰典, 中村幸雄

(杏林大産婦)

(目的) 体外受精10日および14日後の血中hCG値とその後の妊娠転帰との相関を検討した。

(方法) 体外受精症例のうち受精が得られず胚移植が施行されなかった症例および子宮因子不妊症例を除く225例を対象とした。採卵後10, 14日に血清hCG値を酵素免疫法(Stratus System, Baxter社)にて迅速測定し、その上昇をもって妊娠と判定した。

(結果) on going妊娠、臨床的流産、化学的妊娠、非妊娠における採卵後14日の血中hCG値(mIU/ml)はそれぞれ252.3 \pm 31.3 \cdot 113.6 \pm 19.5 \cdot 25.0 \pm 4.8 \cdot 0.5 \pm 0.1であり体外受精転帰が良好になるに従い高値を示した。特にon going妊娠では他3群に比し有意な上昇を示した。しかしhCG値上昇率(14日後値/10日後値)と体外受精転帰の間には有意な相関を認めなかった。

(結論) 体外受精14日後の血中hCG値は妊娠判定のみならず妊娠転帰の予測にも有用であることが示された。

30. IVF-ETにより妊娠に至ったFitz-Hugh-Curtis Syndromeの1例

○石田徳人 (聖マリアンナ医大産婦)

症例は25歳0経0妊の主婦。23歳で結婚後約7ヶ月の不妊を訴え他院受診し、子宮卵管造影施行時、両側卵管閉鎖を指摘され、精査希望にて平成5年10月2日当院不妊外来を受診。既往歴、家族歴、月経歴、内診所見、血液・生化学検査、ホルモン検査、精液所見は、特記事項なし。子宮頸部のクラミジア抗原(DNA)は陰性。血清中の抗体(ELISA)はIgA, IgG共に陽性であった。子宮卵管造影は子宮腔のみ造影された。子宮鏡は正常所見。腹腔鏡は、両側卵管閉鎖、ダグラス窩癒着、腹腔内癒着、肝臓周囲炎を認め、色素通水は両側通過性認められず。

以上より、Fitz-Hugh-Curtis症候群と診断し、クラリスロマイシン200mg/日、14日間投与するも抗体価陰転化せず、同剤を1クール追加投与。さらにミノサイクリン200mg/日、14日間投与したが、結局、抗体価は陰転化せず。3クルールの治療施行、治療抵抗性、早期の挙児希望などを考慮し、体外受精の適応とした。

不妊症患者におけるクラミジア抗体陽性率は、健常者に比べ高く、特に卵管性不妊の群で高率である。Fitz-Hugh-Curtis症候群は、淋菌性卵管炎に肝臓周囲炎を合併する症例として発表され、今日ではクラミジアによる感染が重要視されている。一般的な臨床症状は、上腹部痛、下腹部痛、帯下、不妊症、発熱などが報告されている。治療は、テトラサイクリン系、マクロライド系、ニューキノロン系薬剤などが用いられている。本症例は、自覚症状に乏しく、不妊が唯一の訴えであった。また、治療抵抗性であり、抗体価は陰転化しなかった。両側卵管周囲癒着が強度であった為、顕微鏡下卵管再疎通術は困難と判断し、体外受精の適応とした。なお、本症例は現在、双胎妊娠、妊娠4カ月目に入り順調に経過している。

特別講演

「胎盤形成における免疫的制御」

森 庸厚(東京大医科学研免疫学)

第112回 日本不妊学会関西支部集談会

日 時:平成6年3月26日(土)

会 場:日本シエーリング株式会社 本社2F講堂

1. 一般高齢者における精嚢容積

○沖原宏治, 東勇太郎, 畑 佳伸
井上 亘, 飯田明男, 渡辺 真
斉藤雅人, 渡邊 決

(京都府立医大泌尿器)

秋山喜久夫 (秋山泌尿器科)

1981年から1985年にかけて全国各地で行った前立腺集団検診受診者1127例のうち、経直腸超音波断層法で精嚢容積測定可能な413例を対象として、プランメーターでその容積を測定した。

その結果平均精嚢容積は $14.55 \pm 5.11 \text{cm}^3$ で最大 37.54cm^3 、最小 2.85cm^3 であった。また精嚢容積と対象者の身長、体重、BMI (Body Mass Index) とは相関がなかった。しかし精嚢容積と年齢の関係をみると、加齢とともに精嚢は縮小する傾向がみられた。とくに前立腺疾患を有しない正常者ではその加齢に伴う縮小が顕著であった。精嚢容積と前立腺容積を比較検討すると、前立腺重量が増加するに従って精嚢容積も増大傾向を示した。これは前立腺肥大症の病期の進行に伴う精嚢容積の増大と思われた。

以上のことから精嚢もまた前立腺と同様にアンドロゲン依存性であることが示唆された。

2. 外傷性陰茎持続勃起症の一例

○大口尚基, 松田公志, 藤田一郎

川村 博, 小松洋輔 (関西医大泌尿器)
播磨敬三 (同 放射線)

症例は24歳、男性。作業中に陰部を打撲。翌日より勃起を認めるも疼痛なく放置していた。その後も勃起が持続しているため、当科紹介となった。

陰茎は勃起状態をなしていたが自発痛、圧痛ともに、認めず、陰茎海綿体は触診上、比較的柔軟であった。

入院後ただちに血管造影施行。左内陰部動脈よりの造影剤の漏出を確認し、自己血栓による塞栓術を施行した。

勃起はやや軽減するも消失はしなかった。一週間後、再度血管造影を施行。同一部位よりの造影剤の漏出を認め自己血栓は再開通したと思われた。自己血栓では塞栓は無理と判断し、ペリプラストPにて再度塞栓術を施行。塞栓後、陰茎は縮少し、勃起は

消失した。

その後、経過良好で18日目に退院した。退院後、現在性交渉も可能で経過良好である。本症例のように、High flow typeの場合、受傷後ある程度期間を経ても、Potencyを保つ事が可能であり、動脈塞栓術が非常に有効であると思われる。

3. 精巣輸尿管閉塞と考えられた無精子症の2例

○松宮清美, 並木幹夫, 高田晋吾
近藤宣幸, 奥山明彦 (大阪大泌尿器)
高田 剛, 北村雅哉, 清原久和
(健保連大阪中央病院泌尿器)

(症例1) 35歳。不妊期間3年。46XY。精索静脈瘤認めず。精巣容積；右19ml, 左21ml。LH 2.6mIU/ml, FSH 2.4mIU/ml, T 4.3ng/ml。JSC；右9, 左9。

(症例2) 36歳。不妊期間4年。46XY。精索静脈瘤認めず。精巣容積；右13ml, 左12ml。LH 5.1mIU/ml, FSH 10.9mIU/ml, T 8.5ng/ml。JSC；右9, 左9。

2症例とも精巣上体精管吻合術の予定で試験切開。遠位精管造影に閉塞認めず。近位は精巣上体尾部まで造影された。精巣上体、精巣輸尿管に精子を認めないため吻合術を断念、精巣生検を施行した。

(考察) 我々は閉塞性無精子症を遠位精管造影の結果で分ける報告を行ってきた。精管閉塞を認めない閉塞性無精子症の中には、精巣上体の閉塞のみならず精巣輸尿管の閉塞症例も相当数含まれるものと思われる。

4. Kallmann症候群の一卵性双生児例

○細川彰子 (大倭病院)
竹川 隆, 岡本新悟, 辻井 正
(奈良医大第三内科)
三馬省二, 平尾佳彦, 岡島英五郎
(同 泌尿器)

Kallmann症候群の一卵性双生児例を経験したので報告する。症例は19歳男子で二次性徴の遅れを主訴に受診した。一卵性双生児の兄も同様の症状を有し精査を行った。両親は不妊治療を受けたが妊娠したのは治療後という。生下時体重、兄3100g, 弟1990g。

(初診時所見) 兄；身長181cm, 体重100kg。外性器はTanner 2°。精巣容量, 右=左, 2ml。陰毛Tanner 3°。腋毛疎。弟；身長173cm, 体重76kg。外性器Tanner 2°。精巣容量, 右=左 1 ml。陰毛Tanner 3°。腋毛なし。兄弟とも声変わりはしていない。糞臭は認識できるが他の臭いは識別不可。頭部MRにて異常なし。染色体46XY。知能正常

(ホルモン検査) 兄弟ともLH, FSH基礎値は0.5mIU以下。LHRH連続負荷によりLHRHテストの頂値は, 兄；LH 1.6→5.4mIU/ml, FSH 2.5→4.8mIU/ml。弟；LH 2.6→10.1mIU/ml, FSH 4.8→10.2mIU/mlと上昇した。HCGテストでは兄；T. 0.4→0.7ng/ml。弟；T. 0.3→0.7ng/mlと低反応であった。クロミフェンテストでは兄弟とも無反応。

以上よりKallmann症候群と診断した。一卵性双生児でありおそらく同一の遺伝子異常による症状と考えられるが臨床像やホルモン負荷試験の反応には相違が見られ、興味深い症例である。

5. AIHにより治療を行った逆行性射精の4例の検討

○高島桂子, 後藤康夫, 神埼秀陽
中山貴弘, 姫野隆雄, 高倉賢二
蘇 鈞煌, 片岡信彦, 伊原由幸
泰井俊造, 森 崇英 (京都大産婦)
橋村孝幸, 吉田 修 (同 泌尿器)
都倉 隆, 玉井恒夫
(大津市民病院産婦)
松田公志 (関西医大泌尿器)

逆行性射精は男性不妊のひとつの原因であり、挙児希望症例に対しては様々な治療が試みられている。今回、我々は最近6年間に当科で経験した4例について報告する。

症例は治療開始時25歳より32歳で、逆行性射精の原因は精腫瘍術後が2名、原因不明が2名であった。3名にイミプラミンを中心とした投薬治療を行い、これにより1名に症状の改善が認められたが、いずれも妊娠に至らなかったため、すべての症例にAIHを施行した。うち2名が生児を得、1名は妊娠継続中である。妊娠に至った例は各々1回、5回、6回にて成功した。

AIHに際してはホッチキス法変法に従って、導尿にて膀胱を空虚にした後に、培養液を注入し、自慰にて射精後排尿したものを遠沈して精子を回収した。

今回の検討からAIHは逆行性射精により不妊に対して有効な方法と考えられた。

6. Reifenstein症候群の2例

○倉岡哲郎, 岡本英一, 藪元秀典
島 博基, 生駒文彦 (兵庫医大泌尿器)
橋本知子, 古山順一 (同 遺伝学)

Reifenstein症候群は高度な尿道下裂、無精子症、女

性化乳房を示すX関連劣性遺伝性疾患であり、Partial androgen insensitivity syndrome (pAIS) と総称されている。

今回我々はReifenstein症候群である2症例について、外陰部の皮膚線維芽細胞のandrogen receptor (AR)と5 α -reductase activityを検索したので報告する。リガンドとして³H]DHTおよびR1881 (Methyltrienolone)を用いた。

本疾患の2症例のARはincubation温度を42度に上げると活性が著明に低下し温度不安定性であった。両症例とも5 α -reductase活性は正常であった。

7. プロモクリプチンが不妊症の治療の一助となったと思われる下垂体微小腺腫の1例

○河野 学 (明治橋病院泌尿器)
安本亮二, 辻野 孝
(大阪市立十三市民病院泌尿器)
望月邦三 (同 放射線)
阪倉民浩 (馬場記念病院泌尿器)
西阪誠泰, 岸本武利
(大阪市立大泌尿器)

患者は43歳, 男性, 不妊症を主訴として来院した。理学的所見では左精索静脈瘤を認め, 精液所見は液量2.4ml, 精液濃度4.3000万/ml, 運動率39%であった。また, 血液生化学検査ではLH 1.6mIU/ml, FSH 5.2mIU/ml, プロラクチン37.5ng/ml, テストステロン271.9ng/dl, フリーテストステロン4.4pg/mlと高プロラクチン血症を認めた。MRIを含めた諸検査の結果, 下垂体微小腺腫による高プロラクチン血症と判明しプロモクリプチン2.5mg/dayを4ヶ月投与した。

その結果, 妊娠が判明した。その時期の検査所見ではLH 2.3mIU/ml, FSH 6.2mIU/ml, プロラクチン2.2ng/ml, テストステロン500.9ng/dl, フリーテストステロン20.4pg/mlと高プロラクチン血症の改善を認めMRIでは下垂体腺腫の縮小を認めた。下垂体腺腫へのプロモクリプチンの反応性と高プロラクチン血症の精巣におよぼす影響を中心に考察を加えた。

8. 男性不妊における高プロラクチン血症

○岡田 弘, 神埼正徳, 林 晃史
岩本孝弘, 田中宏和, 藤澤正人
守殿貞夫 (神戸大泌尿器)
龍見 昇 (原泌尿器科病院)
松本 修 (兵庫県立加古川病院泌尿器)
大塚角義 (末光病院)

男性におけるプロラクチン (PRL) の作用は明らか

ではないが, リビドーの低下や, spermatogenesisに関与するとの報告もある。我々は, 1992年~1993年に, 不妊外来を受診した患者のうちazoospermiaを除外した264例について, 早朝空腹時にホルモン検査を行い血中PRL値を測定した。

対象のうち18例に, PRL 15ng/ml以上の高PRL値症を認めた。このうち, 15例に関しては抗潰瘍薬等のdrug induced hyperprolactinemiaと診断され, 休薬後の再検で, 正常範囲内の値となった。残り3例に対して血中GH, TSH, T₃, T₄の測定, TRHテスト, プリンペランテストを行い, 2例に下垂体microadenomaを認めた。また, 1例はmicroadenomaを証明しえなかった。治療は3例とも, パーロデル内服を行い血中PRL値は正常化した。治療後1例にのみ精液パラメータの改善をみたが, 妊娠にはいたらなかった。

9. アクロビーズテストを用いた精子先体反応についての検討

○加藤浩志, 小林真一郎, 磯島晋三
(府中病院不妊センター)

体外受精胚移植, 特に顕微授精においては精子の先体反応を確認することは重要である。精子先体反応確認法として, トリプルステイン法, 蛍光抗体法などがあるが操作の煩雑さや蛍光顕微鏡などの特殊装置が必要なことから一般的に取り入れられるには難点がある。アクロビーズテストキットは, 精子先体反応を比較的簡単に確認でき, 他の精子先体反応検査法と相関する。今回我々は, この方法を用いて各精子処理法と先体反応との関係を検討した。

(対象) 精液検査を施行した患者30例。方法: 3.6 mM Pentoxifylline, 50%卵胞液, Test Yolk Buffer (TYB)の各々で精子処理し, 1, 2, 4, 24, 48時間後にアクロビーズテストを用いて精子先体反応を確認した。

(結果) 1, 2時間値では, Pentoxifylline処理精子の先体反応誘起率が高く, 24時間値では卵胞液処理精子の先体反応誘起率が高い傾向がみられた。

10. 顕微授精による妊娠例の検討

○宮崎 和典
(宮崎レディースクリニック)

顕微授精法の開発, 進歩は, 従来方法では受精しなかった難治性男性不妊症夫婦に対し, 受精の確率を高め妊娠の可能性を大きく広げた。当院でも顕微授精法の臨床応用を開始しており, 平成5年中に行った症例は45例72周期であった。

顕微授精の方法は透明帯切開法 (PZD) 31例46周

期, 閉卵腔精子注入法 (SUZI) 36例50周期であった (重複施行例22例24周期)。

受精したのは, それぞれ19例27周期, 27例38周期で, 胚移植に至ったのは16例21周期, 23例30周期であった。卵あたりでは受精率が, それぞれ26.9%, 39.1%で分割率は60%, 56.6%であった。妊娠例はPZDが1例 (対移植4.8%), SUZIが5例 (16.7%) とSUZIの方が良好な成績であった。

11. New ART (経筋層胚移植法, 顕微授精, 精巢上体精子採取) を用いた体外受精成績

○森本義晴, 小林理章, 牧野 滋

桑名博士, 森本武晴

(河内総合病院不妊センター)

堀越順彦, 榎木 晋

(関西医大香里病院)

榎木 勇

(関西医大産婦)

当センターは1989年以来体外受精を中心とする不妊治療に取り組んでいる。特に最近では, 一般体外受精に加えて種々の新しいAssisted Reproductive Technology (ART) を取り入れ, より困難な不妊症の解決に努力しているので今回この成績を報告する。

体外受精全体についてみると実施数は1992年までは漸増し93年に急増している。妊娠率は, 92年, 93年と約26から29%と安定してきている。92年9月よりほとんどの症例に経筋層胚移植法を採用し, 着床率は34.5%から42.9%に上昇した。顕微授精では, 初期の頃PZDを試みたが現在では主にSUZIを実施しており, ICSIを一部開始したところである。また, 神戸大学泌尿器科と共同で精巢上体精子による体外受精および顕微授精を実施しており11例中2例の妊娠をみている。

最近の成績をみると93年下半期では一般体外受精の妊娠率は35.0%, 顕微授精および精巢上体精子体外受精では, 36.5%であった。妊娠維持率も高く, 妊娠例のうち, 前者では75.0%が, 後者では100%が妊娠4ヵ月以上に順調に発育している。

12. GnRH類縁物質の徐放剤による雌犬の受胎促進

○萩平啓子, 権田昌弘, 稲葉俊夫

森 純一 (大阪府立大獣医臨床繁殖)

鳥居隆三 (滋賀医大附属動物実験施設)

最近開発されたGnRH類縁物質 (GnRH-A) の徐放剤を用いて, 雌犬の受胎促進作用について, 自然発情のものと比較検討した。

分娩後4~5ヵ月の非発情期のピークル種雌犬を用いて, GnRH-Aの徐放剤 (GnRH-Aとして0.1mg/kg) を1回皮下注射した。発情開始日に雄犬と交配させるとともにGnRH-A (3 μ g/kg) を1回筋肉内に注射した。その後経時的に血中エストロゲンおよびプロゲステロン濃度をRIA法により測定するとともに, 開腹して排卵数の確認と胚の発育状態を観察した。

その結果, 分娩後4ヵ月の雌犬に本徐放剤を投与すると, 発情は誘起されたが, 雄犬と交配させても妊娠にはいたらなかった。分娩後5ヵ月で投与した群では, 血中ホルモン濃度および排卵数ともに自然発情犬と同様の値を示し, 胚の発育も良好で, 正常子犬を分娩した。

以上の結果から, GnRH-Aの徐放剤の投与により, 雌犬の受胎を促進できることが示唆された。

13. recombinant FSHによる下垂体摘除rat卵巣の卵胞刺激効果とステロイド分泌動態

○岡崎 審, 奥田喜代司, 佐伯理男

鈴木佳彦, 奥田弘賢, 杉本 修

(大阪医大産婦)

最近, 遺伝子工学でつくられたrecombinant FSH (recFSH) が臨床応用されつつあり, 今回このLHを含有しないrecFSHを用いてrat卵胞発育・性ステロイド分泌に及ぼすLHの役割を検討した。

(実験方法) 下垂体摘除幼若ratにrecFSHおよび異なる濃度のhCGを添加して投与した。卵巣組織にHE・免疫染色を施行し, 卵巣中17 α -hydroxylase活性・各種性ステロイド血中濃度を測定した。

(成績) 卵巣重量はrecFSHのみで増加し, 添加したhCGの用量に依存してさらに増加した。卵胞はrecFSHのみでも発育したが, hCGを添加するとさらに発育を認めた。免疫染色ではhCGをrecFSHに添加して投与すると17 α -hydroxylaseは莢膜に局在してみられたが, recFSHのみでは17 α -hydroxylaseの局在はみられず, また17 α -hydroxylase活性は低かった。各種性ステロイド血中濃度は, recFSHのみでは17 α -OH-progesterone, testosterone, estradiolは低値で, 添加したhCGの用量依存性に増加した。

(結論) recFSHのみでも卵胞発育はみられるが, 莢膜層の肥厚や間質細胞の肥大はみられず, 17 α -hydroxylaseも活性化されないことが明らかとなり, 2-cell 2-gonadotropin theoryにおけるLH (hCG) の役割をより明らかにした。

14. ラット黄体における Insulin-Like Growth Factor-I mRNA の発現に及ぼす Prostaglandin F₂α の影響

○北新秀一, 玉田尋通, 澤田 勉
森 純一 (大阪府立大獣医臨床繁殖)

(目的) 黄体における insulin-like growth factor-I (IGF-I) の発現や作用についてはほとんど明らかにされていない。本研究ではラットの黄体における IGF-I mRNA の発現に及ぼす prostaglandin F₂α (PGF₂α) の影響を検討した。

(材料と方法) SD系ラットを用いた。妊娠6日から分娩後5日にかけて黄体を採取し、³²Pで標識した IGF-I の cDNA フラグメントを用いてノーザンブロット解析とドットブロット解析を行った。次に、PGF₂α 1mg または生理食塩液 (対照群) を妊娠17日の午後1時と6時に皮下投与し、投与後1, 2および3日の黄体における IGF-I mRNA の発現を解析し、血中 progesterone (P) 濃度を RIA 法で測定した。

(結果) 黄体における IGF-I mRNA の発現は妊娠末期に強くなった。PCF₂α 投与により黄体における IGF-I mRNA の発現が強くなり、血中 P 濃度は低下した。

(結論) 黄体における IGF-I mRNA の発現と黄体機能の低下との間に何らかの関係のある可能性が示唆された。

15. ヒト精子不動化および受精阻害モノクローナル抗体 MAb1G12 が認識する対応抗原について

○田中宏幸, 小森慎二, 阪田和子
山崎則行, 辻 芳之, 香山浩二
(兵庫医大産婦)

ヒト受精現象に関与する精子膜抗原の解析とその

遺伝子の分離を目的とし、ヒト凍結保存精子より精子膜構成成分を分離した後 Complete Freund's Adjuvant と共に CBA/N マウスを免疫した。同マウスより得た脾細胞を用いて型の如く NS-1 細胞と細胞融合を行いモノクローナル抗体 (MAb) 1G12 産生株を樹立した。MAb1G12 は (1) 蛍光抗体法にて、ヒト精子の頭部一尾部を染色した。(2) ハムスターテストにてヒト精子の受精を阻害した。さらにヒト卵透明帯への精子の進入を阻害した。また hemizona assay により、明らかにヒト精子の結合の阻害を認めた。(3) 精漿にて精子不動化活性は完全に吸収された。(4) Western Blotting にて Polymorphic な 15-25KDa の band を認めた。さらに TFMS 処理で抗原の deglycosylation を行ったところ、15KDa の単一 band が認められた。

この結果より、この対応抗原エピトープは peptide であることが解った。そこで現在ヒト精巣および精巢上体 cDNA Alibrary を用いて対応抗原をコードする cDNA クローンの分離を試みている。以上精子不動化および受精阻害作用を有する MAb1G12 を樹立しその対応抗原の解析について報告する。

特別講演 I

「性分化異常におけるアンドロジェンリセプターの病的意義」

島 博基 (兵庫医大泌尿器)

特別講演 II

「不妊女性に検出される精子不動化抗体とその対応抗原の分析」

香山 浩二 (兵庫医大産婦)

関連学会のお知らせ

ART (Assisted Reproductive Technology) Forum '94

日本に於ける Assisted Reproductive Technology の
さらなる発展, 飛躍の一助となることを目的として, 開催されます

日 時 : 1994年10月28日 (金) 15:40~18:00
18:00~20:00 (懇親会)

場 所 : 富山第一ホテル 3F 白鳳の間
3F 飛鳥の間 (懇親会)
TEL. 0764-31-1522 FAX 0764-42-6232

演 者 : 入谷 明 (近畿大学生物理工学部教授)
Dr. Ann Kiessling (Harvard University)
Prof. Carl Wood (Monash University) もしくは Prof. Kavac (Monash University)

後 援 : 日本不妊学会 / 日本受精着床学会

協 賛 : 株式会社 東機貿
WILLIAM A. COOK AUSTRALIA PTY LTD.
Life Technologies, Inc.

連絡先 : 〒141 東京都品川区西五反田 8-1-10
小沢西五反田ビル 4F
リプロダクションアカデミー
飯 塚 理 八
TEL. 03-3495-8761 FAX 03-3495-8762

平成6年5月

代表世話人 : 飯 塚 理 八 (慶應義塾大学名誉教授)
森 崇 英 (京都大学産婦人科教授)
入 谷 明 (近畿大学生物理工学部教授)

第9回日本更年期医学会学術集会

テーマ「健やかな更年期を」

日 時：平成6年11月26日(土) 9:00～18:10
27日(日) 9:00～17:00

会 場：シェーンバツハ砂防(砂防会館)
東京都千代田区平河町2-7-5 TEL. 03-3261-8386 FAX 03-3261-5449

プログラム：

- 会長講演：「ホルモン補充療法(HRT)におけるプロゲステンの選択」
演者：熊坂 高弘(獨協医科大学教授) 座長：中野 仁雄(九州大学教授)
- 特別講演：「加齢と免疫」
演者：伊藤 幸治(東京大学医学部内科物理療法学教室教授)
座長：熊坂 高弘(獨協医科大学教授)
- シンポジウム：Ⅰ ホルモン補充療法(HRT)の基礎と臨床
Ⅱ 更年期医学における学際的交流
Ⅲ 骨粗鬆症の今日的課題
Ⅳ 更年期における最近の話題
- パネルディスカッション：「更年期のヘルスプロモーションへの接近」
サテライトミーティング・ラウンドテーブル・一般講演を予定しております。

一般演題申込み要領：

抄録用原稿用紙を下記演題係にご請求の上、邦文タイプ5号またはワープロでプリントをして書留でお送り下さい。一般演題の発表形式につきましては、口演6分、討論3分を予定しています。

抄録送付先：第9回日本更年期医学会学術集会 演題係
〒321-02 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学産婦人科
TEL. 0282(86)2166 Fax 0282(87)6856

抄録締切日：平成6年8月15日(月)消印有効

なお演者は日本更年期医学会会員に限ります。必ずご入会下さい。

学会参加費：8,000円

懇 親 会：会場・シェーンバツハ砂防第3会場
期日・11月26日(土) 18:30～20:30
会費・未定

第9回日本更年期医学会
会長 熊 坂 高 弘

第15回国際不妊学会 (IFFS)

期 日：1995年9月17日(日)～22日(金)

会 場：モンペリエ(フランス)

Convention Center (CORUM)

Esplanade Charles de Gaulle

34027 Montpellier Cedex I

France

Tel : +33-67 61 67 61

抄 録：1995年2月28日締切(現地必着)

登 録 費：	1995年2月28日まで	1995年3月1日から
Regular fee	2,700FF	4,000FF
Reduced fee *	1,700FF	3,000FF
Accompanying Person	350FF	550FF

* laboratory scientists, research people (public institutes), nurses, midwives,
Residents and students (max, age 32)

詳細および登録用紙・アブストラクトフォームは日本不妊学会事務局 (tel : 03-3288-7266)
へご請求下さい。



SUMMER 1994

NEWSLETTER

INTERNATIONAL FEDERATION OF FERTILITY SOCIETIES

The President's column

Every third year, the IFFS organizes a World Congress in order to confront the researches and opinions, to sum up the advances in Human Reproduction. The IFFS 95 World Congress on Fertility and Sterility will take place in Montpellier south of France, from 17 to 22 September.

Montpellier's university has just celebrated its 700th anniversary. The faculty of Medicine is one of the oldest in France. Across the centuries, hospitals have sprung up around the school of Medicine, creating one of the most important group of hospitals in France. The choice of Montpellier by the French Society for the study of fertility is the expression of the purpose to modify the location of our Congress : instead of a big hotel in a large city, we preferred an historic city with a warm tradition of hospitality.

The scientific programme is provided under 3 headings :

- practical sessions physicians attending this session intend to learn the basics as well as the personal practical experience of the speaker.
- up date review for those who wish an overview of recent datas concerning an important subject
- on the scope of research for those who wish to learn where the trend is going.

Pr Bernard Hedon, our assistant secretary-general, has organized with the local organizing committee a warm and friendly reception. As he says "Every detail is looked closely into so that each participant may feel that he is expected personally by a friend who is proud to welcome him in his city and region..."

This will undoubtedly contribute not only to success of a congress of a high scientific level but also leave in our memories the astonishingly beautiful landscapes of Southern France.

Jean Cohen
President of IFFS.

IFFS Workshops

At the last general Assembly meeting on the occasion of the 14th world Congress Caracas, it was decided to try and organize IFFS workshop in countries where nationals have difficulties in attending the federation Congress.

Two workshops are already planned :

- June 1994
Bialystok - Poland
Prof. Marian Szamatowicz
- November 1994
Budapest - Hungary
Prof. Papp Zoltan - Dr Janos Urbancsek

Would those who are interested please contact :

Dr Jean Cohen
8 rue Marignan - Paris 75008 France
Fax : 33-1-45 63 37 78
Tel : 33-1-49 53 08 56

OFFICERS

PRESIDENT

Dr Jean Cohen

VICE-PRESIDENT

Pr. Otto Rodriguez

TREASURER

Dr. Elizabeth
Johannisson

VICE-TREASURER

Dr. William Thompson

SECRETARY GENERAL

Pr. Robert Harrison

ASSISTANT

SECRETARY-GENERAL

Pr. Bernard Hedon

EXECUTIVE COMMITTEE

Argentina
Nigeria
Canada
Yugoslavia
Venezuela
Australia
UK
Singapore
France
Greece
Morocco

SCIENTIFIC PROGRAMME COMMITTEE

Pr. Sakamoto
Dr. Semm
Pr. Harrison
Dr Cohen
Pr. Otto Rodriguez
Pr. Hedon
Australia
Italy
Spain
USA
Scandinavia
UK

Scientific Programme Committee for IFFS Montpellier 1995

Since the last newsletter during 1993 Scientific Programme Committee meetings have been held at Thessaloniki Greece on Sunday 27th June during the ESHRE meeting and on Sunday 10th October during the AFS/Canadian Fertility and Andrology Society meeting in Montreal Canada.

Both meetings concerned themselves specifically with the scientific programme for Montpellier 1995. Reports were received also from Congress President B. Hedon about the general arrangements for the Congress, its plan, news of the already extensively booked exhibition area, the participation of pharmaceutical colleagues in a number of sponsored symposia and the extensive social programme. In this latter regard the cooperation of Montpellier has been excellent and extremely encouraging for a memorable meeting. In reciprocation for this we propose and we in IFFS believe uniquely for the first time at a World Congress that a number of public lectures will be scheduled to be given by delegates aimed at the general public to whom the International Museum of Contraception will also be open.

The format of the scientific meeting will allow submissions from would be delegates to present communications, posters and videos. For the first time however there will be three different types of main session in parallel. All will be of equal importance and designed to appeal to the differing needs of delegates that will be attending Montpellier 1995. Each day will have Practical Type Sessions in which physicians will learn the basics of the subject as well as the personal practical experience of the lecturer. Such delegates will be able to improve their own clinical practice in the light of what will

be presented and discussed during the session. Review Sessions will be given for those who wish to have an overview of recent data concerning an important subject with clinical significance to patients and Research Sessions will expect to learn where the future trends of fertility and sterility are going. Tomorrow's medicine begins with today's research.

The Thessaloniki meeting was particularly concerned with finding subject titles for the sessions. The Montreal meeting discussed the more intimate organisational details. Potentially invited speakers were defined (usually three per session). In both these activities sadly few communications were received from constituent societies, although all those who did reply had their suggestions thoroughly aired at committee. Delegates can be assured that the final choices made were arrived at in a true democratic manner.

During these meetings reports were also received from the American Fertility Society regarding IFFS 1998 San Francisco October 2-9th and the Secretary General is now willing to accept bids for IFFS 2001 in accordance with relevant procedures as circulated.

To date the Australia Fertility Society (Melbourne) has submitted a bid but a number of other countries Societies including Canada have also intimated their wish to be considered. Deadline for submissions is June 1st 1994 so that bids can be perused by the Executive before cases are put to the General Assembly 1995 for a final decision.

Robert HARRISON

Montpellier IFFS 1995 News from the Organizing Committee



The count-down has started. IFFS 95 is now only 18 months away.

With the year 94, time has come to circulate the second and final announcement which contains details regarding the scientific programme, all information necessary for early registration, hotel reservation, and abstract submission. This announcement is printed now and will be sent to more than 50,000 gynaecologists, endocrinologists, andrologists, and biologists throughout the world by Organon together with the April issue of ORGYN. All those having sent back the flyer contained in the 1st announcement will also receive a copy at the indicated address.

Check that you receive yours and if not, please contact the organizing secretariat :

Société Internationale de Congrès et Service
10, rue Charles Amans - 34000 Montpellier - France
Phone (33) 67 58 59 03 - Fax (33) 67 58 31 60.
They will send you the copies needed.

The Organizing Committee has been very careful indeed to propose a cheap registration fee for early registrants (2700 FF, ± 460 \$US) with special reduced fee for a number of colleagues (laboratory scientists, research fellows, nurses, midwives, students, and participants from Developing Countries) (1700 FF, ± 290 \$US), counting on all future participants to register early, which makes things much easier and smoother for all the organization.

Especially choice of hotel rooms might well be significantly reduced for late registrants.

Special efforts have also been made in order to propose a large choice of courses (in different languages) and satellite symposia on different topics. Details on all of them are included in the announcement.

A combination of one of these together with the IFFS World Congress would make a very special scientific opportunity for the trip to Montpellier in September 95.

Let us add to this the temperate climate of this period of the year in the South of France, the proximity of beaches as well as the "back country" offering multiple cultural, gastronomic, and sporting interests and you get a cocktail for an exceptional family holiday. A specially appointed tourism agency, working in close relation with the Organizing Committee, is offering a large choice to participants:

Alpha Congrès Voyages
1, rue Philippy - 34000 Montpellier-France
Phone (33) 67 66 30 80 - Fax (33) 67 66 31 10

Please note the **deadline** which by all means must not be missed

February 28th, 1995

for :

- Abstract submission.
- Congress registration fee for early registrants.
- Accommodation requests.
- Touristic programme bookings.

Executive Committee IFFS

A second meeting of the 1992-95 IFFS Executive Committee was held on Sunday 10th October in Montreal Canada. A full agenda was discussed. Possible year clashes with other Conferences in the area of fertility and sterility were deliberated. Our meetings have however been planned triennially for many years now. It was therefore the feeling of the meeting that whilst we would certainly welcome any participants at IFFS we would continue to plan our conferences as before.

Planning towards Sponsored workshops in central Europe continues. Following positive response from Poland, Hungary, Czechoslovakia and the Ukraine sponsorship is now being sought to help defray expenses. It is hoped that 1994 will see at least the first of these meetings going ahead, whereby with the aid of local help two IFFS speakers will join with locals in putting on a weekend of science.

The case of the membership of Yugoslavia was discussed. The modus operandi of Who in this regard was endorsed by the committee. This allows for any of the new states that used to constitute Yugoslavia to apply for membership of IFFS. However automatically taking up any office positions previously occupied by Yugoslavia is not possible.

The Constitution and Bye-Laws are at present being totally overhauled. New drafts have been prepared but despite being circulated to all constituent societies of IFFS few replies have yet been received by the secretariate. Therefore mindful of the need to have new agreed versions in place by Montpellier 1995 following further discussions at the meeting a final draft will be sent out to Constituent Societies soon. This will include instructions that any final comments must be brought back to the next Executive Committee Meeting on the occasion of the FIGO Congress Montreal 1994. This will then allow an extraordinary General Meeting of IFFS to be planned prior to Montpellier 1995 on either the Saturday or Sunday 16th/17th September.

The next meeting of the IFFS Executive Committee is to be held on Sunday 25th September 1995 in Montreal. The Secretary General will be delighted to receive items for the agenda and constituent societies should note that named delegates from member societies not on the committee are welcome to sit in as participating observers.

Secretary General - Change of Phone Numbers and Fax.
Telephone 353 1 8727599 - Fax 353 1 8727831

From the treasurer's corner

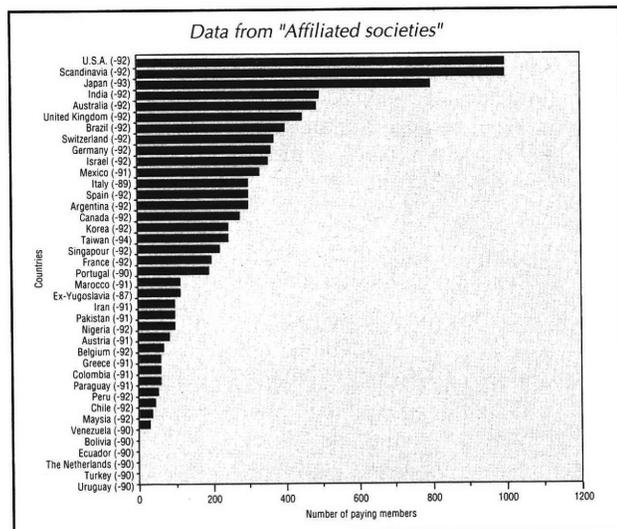
The International Federation of fertility Societies (IFFS) was created in 1968 having been started once in 1951 under the name of the International Fertility Association. The IFFS was founded on the basis of accepting national societies as members of the Federation. A constitution for the new federation was drawn in 1968 and according to this each affiliated society should pay an annual contribution in proportion to the number of ordinary members. This contribution was set at a rate of US\$ 1 per ordinary member of the affiliated society and

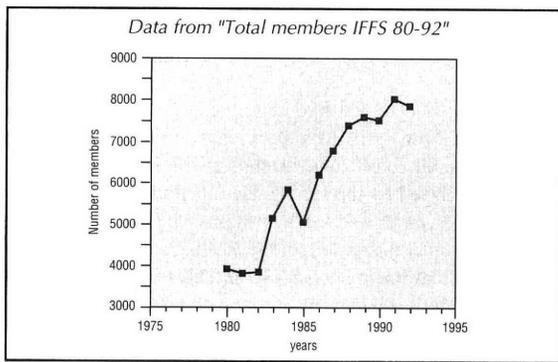
this fee has remained the same for the last 25 years.

The contribution per individual member per society is still US\$ 1 per year. Fortunately, the IFFS activities are not depending on the membership fee as it is set today. If the IFFS should have to work on the basis of a membership fee of US\$ 1 per individual member, the IFFS should not be able to pay the secretarial help and the stamps for the reminders sent on to pay the annual fee. The profits of the World Congresses on fertility and Sterility are crucial for the existence of the organisation.

However, the interest for the IFFS has increased during the years following the creation in 1968. Today the International Federation of Fertility Societies counts 40 affiliated societies out of which 35 are paying their regular annual fee to the IFFS. As shown from Fig. 1, USA and Scandinavia have more than 1000 members in their national society. According to the Constitution the number of votes allotted to each affiliated society at the General Assembly is related to the number of ordinary members and the following scale is applied:

- from 20 to 50 members 1 vote
- from 51 to 100 members 2 votes
- from 101 to 200 members 3 votes
- from 201 to 500 members 4 votes
- from 501 to 1000 members 5 votes
- over 1000 members 6 votes.





Therefore, each affiliated member society has the right to be represented at the General Assembly in relation to the number of ordinary members provided the annual fee of the society is paid. According to par. 13 of the by-laws, the membership is lost if the annual contribution has not been paid for three consecutive years or in case of restrictions for export of currency not deposited for IFFS on a national account.

According to Fig. 1, there are 5 affiliated societies which have not paid their membership fee for more than 3 years: Bolivia, Ecuador, Turkey, Uruguay and the Netherlands. They all have the possibility to pay their membership fee or to declare a deposit of the membership fee in the country. Should we take it for granted that there is no interest in fertility and sterility in these countries? Maybe there is simply a lack of information about the IFFS. The reasons not to be an active affiliated society of the IFFS may be numerous.

Not only, the number of active affiliated societies have significantly increased during the last 15 years but also the number of members of the national societies. The total number of members affiliated to IFFS between 1980 and 1992 is shown in Fig. 2. As you will see from this figure there is an increase in the number of members paying their annual fee of US\$ 1 to the IFFS. The Fertility Societies of Cuba, Malaysia, Nigeria, Pakistan, Paraguay, Peru and Sudan joined the Federation during the period 1989 to 1992. Other countries like the former Yugoslavia have envisaged political problems which for obvious reasons introduced changes in their relationships with the IFFS. Furthermore, new independent states have been formed in Central and Eastern Europe. From several seminars and workshops in these countries it has become obvious that there are serious problems of infertility in many of the countries in Central and Eastern Europe. At present, it is not known whether or not these problems are linked to sexually transmitted diseases or to the high rate of induced abortions but the fact that the infertility is a problem of major importance in these countries calls for actions to be taken by the IFFS.

What can the IFFS do?

Every third year the IFFS is organising a World Congress for Fertility and Sterility. These Congresses generally evoke a great interest and they are attended by 4000 to 5000 participants from countries all over the world. Each Congress represents a forum for discussions not only of problems related to infertility but to any

questions concerning reproductive health.

The Constitution of the World Health Organization (WHO) (1948) defines health as a state of complete physical, mental and social well-being and not merely the absence of disease or infirmity. As stated in the Szeged declaration (1994) "Viewed against this definition, reproductive health has a number of basic elements, such as the ability for procreation, regulation of fertility and enjoying sex, success as far as the outcome of pregnancy, infant and child survival, growth and development is concerned, and safety in pregnancy and childbirth, fertility regulation and in having sex. Hence the five fundamental pillars of any reproductive health policy are: family planning, maternal care, infant and child care, the prevention of sexually transmitted diseases and the prevention, diagnosis and treatment of infertility." The infertile couple is certainly an intriguing problem in reproductive health. To overcome infertility remains a great challenge but to prevent infertility may be even more important. At the XIIIth IFFS World Congress on Fertility and Sterility in Marrakech 1989, the President Prof. Boutaleb confirmed previous findings that sexually transmitted diseases often lead to sterility in men and women and "that the sterility problem could even lead to social problems". Now five years later we are facing the problem of abortions which unfortunately is the method of contraception most commonly used in several countries of Central and Eastern Europe. Maternal mortality, sterility due to infections and unsafe abortions are problems which have to be taken into consideration by the IFFS in the future.

The IFFS is an international non-governmental organisation. The contribution per ordinary member of each national society affiliated to IFFS is only 1 US\$ per year. It is a small contribution but it could be important in relation to the number of ordinary members of each national society.

Speaking from the treasurer's corner, I would like to draw your attention to the numerous problems of reproductive health. The IFFS is not only an organisation for treatment of infertility. Since several years it is an organisation also working with the prevention of infertility. This problem still remains a great challenge and perhaps the greatest challenge is to make the next generation of gynaecologists, endocrinologists, biologists and epidemiologists aware of the necessity to raise human and financial resources to meet the future requirements of reproductive health.

第61回日本医学会定例評議員会

第61回日本医学会定例評議員会が、1994年2月22日(火)に開催された。冒頭、村瀬敏郎日本医師会長から挨拶があり、「日本医師会と日本医学会とは、車の両輪のように一体感の下に協力している。1995年4月には名古屋で第24回日本医学会総会をひかえており、全力を挙げて協力したい」と述べられた。

続いて挨拶に立った森亘日本医学会会長は「世界の内外を見渡すと激動の1年であり、医学医療の世界においても、大変動きの多い年であった。例えば本学会においても、認定医問題、移植に関係する学会の合同委員会、医学用語の管理、医学界と薬業界等との関係、医学会への新規加盟のあり方の検討等々の課題があり、今から振り返ると、必ずしも満足いただける成果を得たとは言いがたいが、一応、できる限りの努力を重ねてきたつもりである。また、社会の中では學術団体の発言力が一般にやや落ちているようで、そのことは世の中全体にとって必ずしも良いことではないと思われる。日本医学会は自らの襟を正し、かつそれなりに力をつけ、正しい意見を述べて医学医療を良い方向に導いていく必要がある」と、日本医学会のあるべき姿を表明した。

当日、日本医学会役員選挙が行われ、次のごとき結果であった。日本医学会長：森亘、副会長：石田名香雄(基礎)、小泉明(社会)、高久史麿(臨床)。任期は、平成6年4月1日～平成8年3月31日まで。

第24回日本医学会総会

日本医学会総会は、4年に1回の開催を機に、医学・医療の進歩の現状を把握し、医学界全体の将来への展望を図ることを第一義の目的としている。第24回総会のメインテーマには「人間性の医学と医療—生命の世紀をひらく—」が選ばれた。

今総会は、1995(平成7)年4月7日(金)、8日(土)、9日(日)に名古屋において飯島宗一会頭の下に開催の予定で、総会の準備委員会の下には學術、展示、総務、式典、広報、登録、財務および記録の8委員会が設置されている。學術講演には名古屋国際会議場、総合医学展示には名古屋市国際展示場(ポートメッセなごや)を主会場に予定し、登録は、平成6年1月より受け付けを開始した。

医学用語管理事業

1. 医学用語辞典

1991年4月の「日本医学会 医学用語辞典 英和」刊行に引き続き、1994年1月に「日本医学会 医学用語辞典 和英」が刊行された。これで英和・和英の医学用語辞典が完成したことになる。辞典は各日本医学会分科会ならびに関係各位に配布した。

2. 文部省の學術用語制定

一昨年度から文部省の學術用語制定事業との連携について検討を重ねていたが、これに関連して1993年11月12日に「医学用語に関する委員会(研究会)」を文部省科学研究費の補助を受けて開催した。この委員会(研究会)では、89分科会中70学会という多数の出席を得て、多大の協力をいただいた。

3. 厚生省の疾患傷病名監修

1993年5月に厚生省保検局から日本医学会にレセプト電算処理システムに係わる傷病名監修の依頼があった。本件については、医学用語管理委員会で検討の結果、ワーキンググループをつくり具体的な検討を行っている。

認定医制についての三者懇談会

本懇談会は、日本医学会が学会認定医制協議会および日本医師会を招請して開催している。検討を重ねた結果、下記のとおり「認定医の公認に関する三者懇談会の見解」を合意発表した。

「認定医の公認に関する三者懇談会の見解」

認定医に関する三者懇談会

1993年11月5日

1. 認定医の目的

認定医制度をもつ各学会の判断と努力によって、それぞれの専門領域における医師の質の向上、また一定レベルの維持をはかり、国民の期待に応えるのが目的である。

2. 三者懇談会

認定医制度に関して三者懇談会は重要な機能になう機関である。しかし、この会は認定医についての認可権をもつものではなく、学会認定医制協議会、日本医学会、日本医師会、三者間の連絡・調整をはかるとともに、各学会と社会との間に立って、医療全体からみた認定医制度の必要性、妥当性などを考

慮する役割を有する。

3. 認定医公認の方法

1) 認定医制度の立案，運営については各学会の主体性を尊重する。しかし，公認のためには各学会の認定医制度間の調整をはかることが必要であり，これは学会認定医制協議会が行う。

2) 認定医公認に際しては，各学会の認定に基づき，学会認定医制協議会議長，日本医学会長，日本医師会会長がこれを承認する手続きを取る。

3) 具体的事務作業については，三者懇談会公認事項検討小委員会の立案を待ち，その結果を三者懇談会で検討し，決定する。

4. 認定医の表示

1) 医療法に基づく診療科名表示の問題と認定医の表示とは切り離して考える。

2) 認定医の表示は医療施設内にとどめ，これは以下のごとき節度のもとに行うべきものとする。

①医師および医療機関の能力格差の表示とならないよう配慮する。

②学会認定医制協議会でいう基本的領域診療科(下記)に関しては，重複して表示できない。

③更新が認定されない認定医の表示は，撤去される

ものとする。

5. 診療報酬との関係

認定医の公認と医療保険点数など診療報酬とは関連しないものとする。

6. 日本医師会の認定医制度

日本医師会の認定する認定医制度は，将来，必要に応じて立案されるものとする。

記

基本的領域診療科(学会認定医制協議会の定めるもの)

内科系：内科，小児科，皮膚科，精神神経

外科系：外科，整形外科，産科婦人科，

耳鼻咽喉科，眼科，泌尿器科

その他：麻酔，医学放射線，病理，臨床病理

新規加盟学会審査制度検討委員会

本会では，4年毎に学会の新規加盟審査を行っている。この度，そのあり方について検討するため標記委員会を発足させた。委員は，出月康夫，遠藤實，京極方久，小泉明，笹月健彦，中尾真，久道茂，本間光夫の8氏。

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入れて括弧で囲む、すなわち
著者名、題名、誌名 巻数(号数)：ページ数、年次

- 例 1. 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、ご注意下さい。(平成4年9月)
- 論文をワープロ、パーソナルコンピューター等で作成された場合は、出来れば文書フロッピーをいっしょにお送りください。その際、機種とソフト名をお書き添えください。MS-DOSのテキストファイル出力が可能であればその形式でお願いします。(平成4年10月)

編 集 委 員

白 井 将 文 (委員長)

味 香 勝 也	伊 藤 晴 夫	石 島 芳 郎
遠 藤 克	楠 原 浩 二	小 林 俊 文
平 川 舜	穂 坂 正 彦	三 橋 直 樹
水 口 弘 司	毛 利 秀 雄	

EDITORIAL BOARD

Masafumi SHIRAI (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Haruo ITO	Yoshiro ISHIJIMA
Tsuyoshi ENDO	Koji KUSUHARA	Toshihumi KOBAYASHI
Shun HIRAKAWA	Masahiko HOSAKA	Naoki MITSUHASHI
Koji MINAGUCHI	Hideo MORI	

日本不妊学会雑誌 39 卷 3 号

1994年6月24日 印刷

1994年7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