

ISSN
0029-0629
CODEN:NFGZAD

JAPANESE JOURNAL OF FERTILITY AND STERILITY

Vol. 40 No.1

January
1995

日本不妊学会雑誌

第40巻 第1号

平成7年1月1日

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

産
/

第40回日本不妊学会総会および学術講演会 (第2回予告)

第40回日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領で開催いたします。

なお、今回は、この10年来生殖(リプロダクション)を取り巻く生物学、医学が長足に進歩した中で、第40回目という節目の学会を担当することになりました。会員の皆様の多数のご参加をお願いします。

記

期 日：平成7年10月25日(水) 役員会*、学術講演会
平成7年10月26日(木) 学術講演会、評議員会、総会、総懇親会*
平成7年10月27日(金) 学術講演会

会 場：山形国際交流プラザ「山形ビッグウイング」
〒996 山形市平久保100番地
TEL 0236-35-3000, 3100 FAX 0236-35-3030
(*役員会・総懇親会はホテルメトロポリタンで行います)

今回は、10月25日(水)の役員会終了後、午後より学術講演会を開始し、3日間の日程で、十分な発表と充実したご討議をお願いする予定です。

10月27日(金)は午後の比較的早い時間帯で終了する予定です。

一般演題

演題申込み資格

講演者(共同発表者を含む)は本学会会員に限ります。会員以外の方は演題申込みと同時に、1995年度会費(8,000円)を納入の上会員になってください。

演題申込み要領

1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプまたはワープロでうち、書留郵便にて下記へお送りください。
〒990-23 山形市飯田西2-2-2
山形大学医学部産科婦人科学教室 第40回日本不妊学会総会事務局
TEL 0236-33-1871(直通), または0236-33-1122 内線3263, 3264(医局)
FAX 0236-25-2722
2. 抄録は800字以内、図、表はつけないでください。
3. 演題の申込みは一演者一題とさせていただきます。
4. 倫理面を十分に考慮した研究について応募ください。
5. 別紙演題申込書、受領書、採用通知書に所定の事項を記入して切手を貼り、抄録用紙(原本)および抄録用紙のコピー4部と共にお送りください。
6. 申込み締切日：1995年(平成7年)5月31日(水)(必着)

演題発表形式

口演・ポスターの2つの形式を予定しております。

なお、演題の採否、分類、発表形式(口演・ポスター)の決定は会長にご一任下さい。

参加申込方法

学会当日会場にて受け付けます。学会参加者 8,000円 懇親会費 8,000円

総懇親会は学術講演会2日目の10月26日(木)にホテルメトロポリタン(山形駅に隣接している)で行います。是非ご出席下さい。

第40回日本不妊学会会長 広 井 正 彦

日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊・交通・観光のご案内

このたび、山形市において第40回日本不妊学会総会および学術講演会が開催されるにあたり皆様の会期中の宿泊、交通、観光などのお世話を「山交観光株式会社」が担当させて戴くことになりました。『樹氷と紅花の里山形』に皆様をお迎えすることができますことを誠に光栄に存じております。

受入体制には万全を期し、意義あるこの学術集会が成功されますよう、きめ細かな配慮で準備を致しております。

どうぞ多数の皆様がお越し下さいますよう心からお待ち申し上げます。

なお、同時節は秋の観光シーズンのため混み合う時期でもございますのでお早めにお申込み賜りますようお願い申し上げます。

山交観光株式会社

営業本部長 村山 武久

記

1. 宿泊・交通・観光等のお問い合わせ先

山交観光株式会社 〒990 山形市香澄町2丁目2番36号 山形センタービル5F
 TEL 0236-41-4571 (学会専用) 0236-41-4567 (代表電話)
 FAX 0236-41-4573 25-5444
 社内担当 販売促進課 日本不妊学会担当(佐藤恵一)
 営業時間 9時30分→17時50分(土曜日は15時20分) 日祭休業

2. 宿泊ホテルなどは下記の通りです

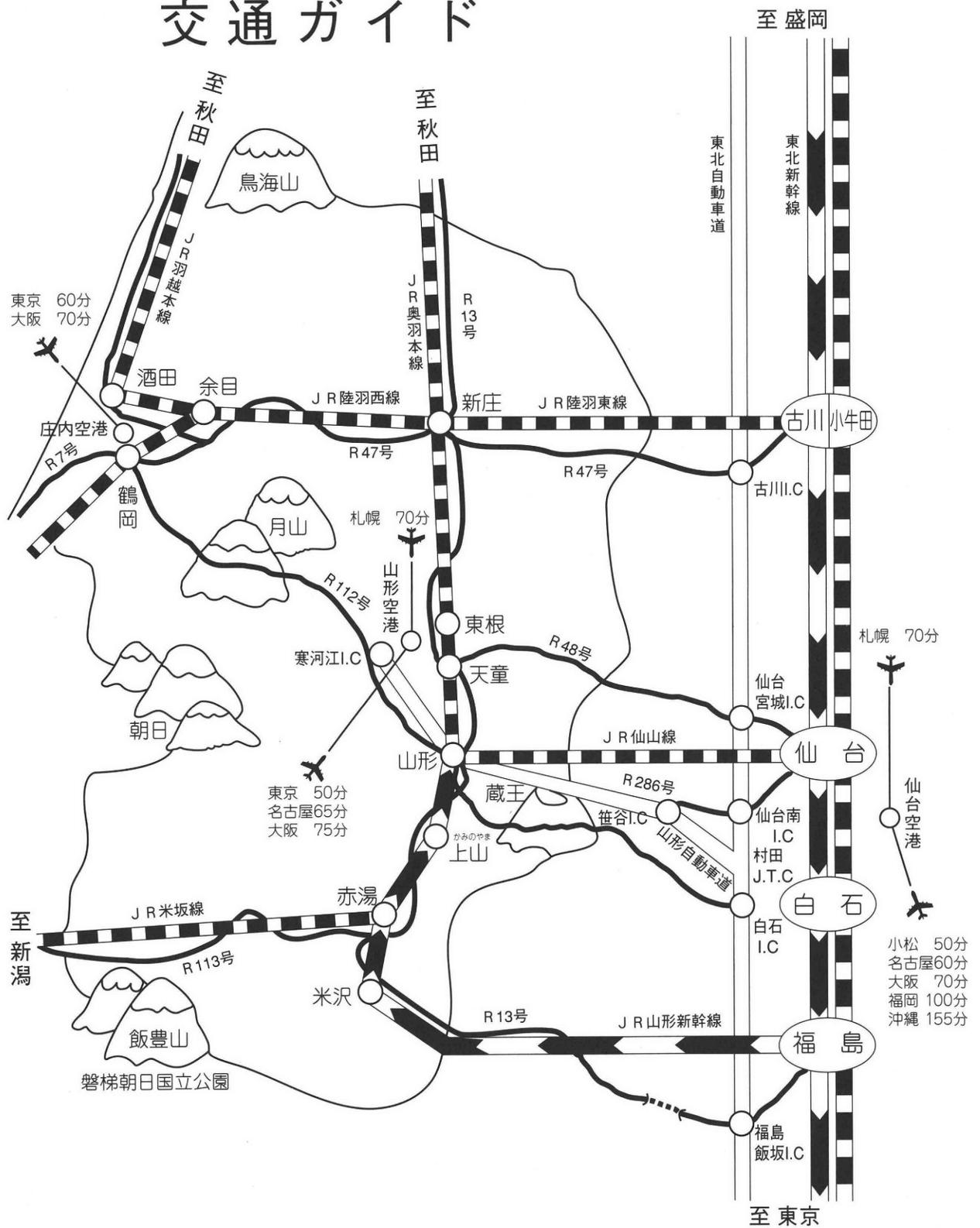
(料金は1泊朝食付一人当たりの料金です)

地区	施設 区別	施設名(ホテル)	ホテル部屋タイプ		
			シングル	ツイン	ツイン1名使用
山 形 市 内	A	ホテルメトロポリタン 山形グランドホテル ホテルキャッスル	10,300	9,500	15,500
	B	山形ワシントンホテル ホテルリモージュ 山形イン ホテルマーブル	8,800	7,800	12,500
	C	ホテルさくらんぼ グリーントーホク ホテル山形 コンフォートイン山形	7,000 ヨリ	6,000 ヨリ	

※山形市内の施設のみでは、参加される皆様のすべてのご要望にお応えできません。

山形市に隣接して『さくらんぼ、将棋の駒』の天童温泉(会場より車で20分)『温泉城下町』の上山温泉(会場より車で30分)の二つの温泉地がありますのでこれらの温泉地の宿泊施設もご利用いただき、温泉情緒を味わっていただければ幸いです。詳細は次回(40巻2号, 4月発行)のご案内をご覧ください。

交通ガイド



平成6年度第2回通常総会

平成6年度第2回通常総会は下記の如く富山市において開催され、入谷理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採決を行った。

日 時 平成6年10月27日(木) 13時～13時40分

場 所 富山市 富山県民会館

開会当時の会員数 4188名 当日の出席会員数 2108名(含委任状)

議 事

第1号議案：名誉会員推薦の件

理事会および評議員会より推薦された別記10名につき審議の結果、全会一致にて名誉会員とすることを承認した。

第2号議案：功労評議員推薦の件

理事会および評議員会より推薦された別記19名につき、審議の結果全会一致にて功労評議員とすることを承認した。

第3号議案：日本不妊学会学術奨励賞に関する件

理事会および評議員会より推薦された下記の3名に平成6年度日本不妊学会学術奨励賞を授与することを全会一致にて承認した。

佐々木宏子「ヒト精子表面におけるFibronectinの局在と受精への関与」

山海 直「抗プロジェステロン製剤(RU486)が家兔子宮内膜の着床性変化に及ぼす影響」

白瀧 敬「超音波カラードップラー法の精索静脈瘤への臨床応用－診断および静脈血逆流速度に基づいた分類の可能性－」

第4号議案：平成9年度学術講演会および総会に関する件

平成9年度学術講演会および総会は、理事会および評議員会の原案通り、下記の如く開催することを全会一致にて承認した。

平成9年度 担当支部 関東支部

会 長 白井将文

開 催 地 東京都

第5号議案：役員改選の件

評議員会で承認された候補者につき審議の上、全会一致にて別記の如く次期理事(20名)、監事(3名)を選出した。

第6号議案：評議員改選の件

定款第19条に定める評議員の支部別定数については理事会、評議員会の原案通り下記の如く定めることを全会一致にて承認した。

北海道支部 4名、東北支部 5名、関東支部 16名、中部支部 5名、

北陸支部 4名、関西支部 8名、中国・四国支部 6名、九州支部 7名

新名誉会員，功労評議員および新役員について

10月27日開催された平成6年度第2回通常総会において次の10名の方々が新たに名誉会員として，また，19名の方々が功労評議員として推薦，承認された。また役員(理事および監事)の改選が行なわれたので，10月28日臨時理事会を開き，互選により下記の如く理事長，副理事長，常任理事を選出するとともに，新評議員および幹事を選任した。

名誉会員	石田 一夫	磯島 晋三	岩崎 寛和
	川島 吉良	佐久間 勇次	清水 哲也
	西田 悦郎	久住 治男	町田 豊平
	森 憲正		

理 事	理 事 長	入 谷 明	(関西支部)
	副 理 事 長	島 崎 淳	(関東支部)
	〃	毛 利 秀 雄	(〃)
	〃	森 崇 英	(関西支部)
	理 事(常任)	青 野 敏 博	(中国四国支部)
	〃 (〃)	佐 藤 和 雄	(関東支部)
	〃 (〃)	白 井 将 文	(〃)
	〃 (〃)	武 谷 雄 二	(〃)
	〃 (〃)	玉 田 太 朗	(〃)
	〃 (〃)	豊 田 裕	(〃)
	〃 (〃)	平 川 舜	(〃)
	〃 (〃)	広 井 正 彦	(東北支部)
	〃 (〃)	水 口 弘 司	(関東支部)
	〃 (〃)	矢 内 原 巧	(〃)
	〃	小 柳 知 彦	(北海道支部)
	〃	八 神 喜 昭	(中部支部)
	〃	片 山 喬	(北陸支部)
	〃	友 吉 唯 夫	(関西支部)
	〃	岡 村 均	(九州支部)
	〃	永 田 行 博	(〃)
監 事	尾 川 昭 三	(関東支部)	
	熊 本 悦 明	(北海道支部)	
	浜 田 宏	(関東支部)	

功勞評議員

安部 宏	稲葉 芳一	入沢 俊氏	楠田 雅彦
熊坂 高弘	斎藤 宗吾	白岩 康夫	関場 香
高崎 悦司	堤 義雄	林 義夫	平野 睦
福島 穰	前川 正信	美甘 和哉	山辺 徹
山本 巖	吉田 茂子	吉田 孝雄	

定款評議員

北海道支部

金川 弘司	河田 啓一朗	工藤 隆一	藤本 征一郎
-------	--------	-------	--------

東北支部

折笠 精一	川越 慎之助	菅原 七郎	高橋 克幸
星 和彦			

関東支部

麻生 武志	雨宮 章	伊吹 令人	遠藤 克
大島 博幸	加藤 順三	河邊 香月	小林 俊文
佐藤 嘉兵	津端 捷夫	寺島 芳輝	百目鬼 郁男
中村 幸雄	穂坂 正彦	森沢 正昭	吉田 英機

中部支部

玉舎 輝彦	寺尾 俊彦	友田 豊	中西 正美
三宅 弘治			

北陸支部

泉 徳和	桑原 惣隆	舘野 政也	富永 敏朗
------	-------	-------	-------

関西支部

岡田 弘二	守殿 貞夫	香山 浩二	榎木 勇
杉本 修	谷沢 修	森 純一	吉田 修

中国・四国支部

大森 弘之	加藤 紘	北尾 学	相良 祐輔
竹中生 昌	丹羽 皓二		

九州支部

石丸 忠之	金澤 浩二	杉森 甫	立山 浩道
中村 元一	松浦 講平	宮川 勇生	

なお、定款評議員上記55名については、1995年1月1日より1996年12月31日まで評議員を委嘱します。本誌面をもって委嘱状とさせていただきます。また、支部評議員については次号(40巻2号)に掲載致します。

会 告

平成7年度日本不妊学会学術奨励賞について

日本不妊学会雑誌第39巻1～4号に掲載された原著論文で、その筆頭著者が掲載時に満40歳以下である論文を対象に、平成7年度日本不妊学会学術奨励賞の推薦を受付けます。

推薦資格は、本学会の理事、評議員、大学教授、学会誌レフリーに限り、所定の書式による推薦は平成7年4月末日まで受付けます。

予備選考委員会および選考委員会で推薦された論文の中から3編の授賞論文を決定します。筆頭著者には「(社)日本不妊学会学術奨励賞」賞状と副賞として各々に「日本不妊学会オルガノン学術奨励賞」賞状および記念品、学術奨励金50万円を授与します。

推薦は、本誌に綴じ込んだ所定の書式をご利用いただくか、または日本不妊学会事務局へご請求下さい。記載内容についてご不明の点は、日本不妊学会事務局へお問い合わせ下さい。

(記載内容)	論文名	掲載された	巻号頁	筆頭著者氏名と生年月日
	推薦理由	推薦者の	署名捺印	

推薦は、平成7年4月30日(土)までに(社)日本不妊学会事務局へお送り下さい。(消印有効)
(お問い合わせ・書式請求・推薦書送付先)

〒102 東京都千代田区麹町5-4 クロスサイド麹町ビル8階
(社)日本不妊学会事務局
TEL 03-3288-7266 (ファクシミリ兼用)

日本不妊学会学術奨励賞推薦書

日本不妊学会理事長 殿

下記の論文を日本不妊学会学術奨励賞に推薦いたします。

(論文名)

日本不妊学会雑誌 第39巻 号 _____ ~ _____ 頁(平成6年 _____ 月)

(筆頭著者氏名 生年月日)

生年月日： _____ 年 _____ 月 _____ 日

(推薦理由)

平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

推薦者所属・現職

氏名

印

日本不妊学会誌

第40巻 第1号

平成7年1月1日

—目 次—

原 著

- 精索静脈瘤術後の妊孕性を予測するLHRHテストの有用性(英文)……………山本・他 ……1
- 体外受精における初期胚発育に及ぼす共培養効果の発現の機序に関する研究……………山元慎一 ……6
- Sperm Quality Analyzerによる精子受精能の評価……………森・他 ……14
- 不妊カップルの性生活調査……………安達・他 ……19
- ヒト卵胞液に見いだされるアルギンアミダーゼ類とエストロゲン類の相関性(英文) ……向田・他 ……26
- 体外受精患者における精子アクロシン活性測定の意義……………清水・他 ……34
- 成熟精子回収法としての不連続2層Nycodenz法の臨床的有用性の検討……………中木・他 ……40
- 閉塞性無精子症に対するConventional Epididymovasostomyの臨床的検討……………岩崎・他 ……45
- Purified FSHのstep down dosage投与方法とGnRH agonistによる内因性LH surgeを利用した排卵誘発法：
卵巣過剰刺激症候群発生のハイリスク症例に対する新しい試み……………西川・他 ……50
- 高齢動物に不妊をもたらす卵母細胞側の要因(英文)……………成田 成 ……57
- 各種活性酸素のマウス精子運動能への影響(英文)……………児玉・他 ……66
- 不良な精液所見，男性小室の高度拡張を伴った尿道下裂の2例……………天野・他 ……73
- 精子機能と精漿中EGF，亜鉛，果糖濃度との相関……………太田博孝 ……78
- 排卵障害患者に対するクロミフェン・当帰芍薬散併用療法の有用性の検討……………安井・他 ……83
- 遅発型先天性副腎過形成症の一症例……………花岡・他 ……92
- 均衡転座型染色体異常をもつ夫婦における出生前診断(英文)……………山田・他 ……97
- 尿崩症を発症したプロラクチン産生下垂体腫瘍合併妊娠の1例……………藤澤 知 ……101
- 正常プロラクチン血症性視床下部性排卵障害に対するbromocriptineの有用性の検討……………合阪・他 ……107
- 当科における卵巣チョコレート嚢胞症例の検討……………平野・他 ……115
- 地方部会講演抄録……………121

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 40, No. 1, 1995)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- The Value of Provocative Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Test as
a Method to Predict Fertility after Varicocelelectomy *M. Yamamoto, Y. Tuji,*
H. Hibi & K. Miyake 1
- The Effect of Co-culture on the Development of Early Stage Embryos for
In Vitro Fertilization and Embryo Transfer *S. Yamamoto* 6
- The Assessment of Sperm Quality Using a Sperm Quality Analyzer *A. Mori, S. Nakamura,*
T. Oki, S. Yamamoto, K. Takeuchi,
T. Douchi & Y. Nagata 14
- Sexual Behavior of Infertile Couples *H. Adachi, H. Horita, Y. Sato,*
N. Suzuki, H. Wada, A. Shibuya,
T. Tsukamoto, Y. Kumamoto & K. Minami 19
- Relationships Among Arginine Amidases and Estrogens in Human Follicular Fluid
..... *T. Mukaida, M. Yemini, Y. Matsuda,*
S. Akihama, M. Katayama, H. Taniguchi,
Y. Kuroda, S. Kaneko & S. Nozawa 26
- Spermatozoal Acrosin Activity in the Patients who Underwent In Vitro Fertilization
..... *Y. Simizu, H. Kodama, J. Fukuda,*
H. Karube, T. Matsui & T. Tanaka 34
- Evaluation of a Discontinuous Nycodenz Gradient Method for the Preparation of
Good Human Spermatozoa *J. Nakaki, H. Katayose,*
K. Hoshi & A. Sato 40
- Clinical Review of 10 Azoospermic Patients Epididymovasostomized Conventionally for
Presumptive Diagnosis of Epididymal Obstruction *A. Iwasaki, E. Ishizuka, M. Hosaka,*
Y. Kinoshita, M. Hirokawa & T. Iwamoto 45
- Combined Ovulation Induction Method of Step-down Dosage Regimen of Purified FSH
and Application of GnRHa for Induction of an Endogeneous Pre-Ovulatory LH surge:
A New Approach to Treatment for Women at Risk of Developing OHSS
..... *A. Nishikawa, T. Kiya, R. Kudo,*
H. Mizumoto & S. Tanaka 50
- Endogenous Factors Affecting Sterility in Oocytes of Aged Animals *A. Narita* 57
- Investigation of Cytotoxic Effects of Reactive Oxygen Species on Mouse Spermatozoa
..... *H. Kodama, J. Fukuda, H. Karube,*
Y. Shimizu, M. Ikeda & T. Tanaka 66

Two Cases of Hypospadias with Semen of Poor Quality and Enlarged Prostatic Utricle	<i>T. Amano, K. Kunimi, S-W. Lee, M. Ohkawa & H. Fuse</i>	73
Correlation between Sperm Function and Concentrations of EGF, Zinc and Fructose in Human Seminal Fluid	<i>H. Ota</i>	78
Studies on the Combination Treatment with Clomiphene Citrate and Toki-shakuyaku-san	<i>T. Yasui, M. Irahara, T. Aono, H. Takahashi, H. Ino, O. Naka, T. Matsushita, A. Sakaguchi, T. Yoshimoto, Y. Kishi, A. Yamashita, M. Takemoto, Y. Ohno, M. Takayanagi, N. Nagamachi, S. Takeuchi & T. Miyake</i>	83
A Case Report of Late-onset Congenital Adrenal Hyperplasia	<i>J. Hanaoka, Y. Takeuchi, T. Yanase, T. Takayanagi & A. Tokunaga</i>	92
Prenatal Cytogenetic Diagnosis in Couples with a Balanced Translocation	<i>H. Yamada, K. Kakitani, N. Hoshi, K. Hanatani & S. Fujimoto</i>	97
A Case Report of a Pregnant Woman with Diabetes Insipidus Accompanied by Prolactin-Producing Pituitary Microadenoma	<i>S. Fujisawa</i>	101
A Study with Bromocriptine Effectiveness for the Treatment of Normoprolactinemic Hypothalamic Anovulations	<i>K. Aisaka, K. Yoshida, F. Kayama, Y. Kimura, S. Tamechika, K. Satoh, R. Matsuoka & H. Mori</i>	107
Retrospective Study on Patients with Ovarian Chocolate Cysts in Our Hospital	<i>T. Hirano, H. Kanzaki, K. Imai, N. Emi, T. Mori & K. Togashi</i>	115

THE VALUE OF PROVOCATIVE LUTEINIZING HORMONE- RELEASING HORMONE TEST AS A METHOD TO PREDICT FERTILITY AFTER VARICOCELECTOMY

Masanori YAMAMOTO, Yosikazu TUJI, Hatsuki HIBI
and Koji MIYAKE

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

Abstract: The cause-effect relationship between varicocele and infertility has remained a matter of controversy. Leydig cell dysfunction has been suggested as a cause of impaired spermatogenesis in varicocele patients. We performed a prospective study on testosterone and gonadotropin levels and luteinizing hormone response to the luteinizing hormone-releasing hormone test to clarify the plausible role of androgen derangement in subfertility. Luteinizing hormone-releasing hormone tests were carried out on 13 infertile men with varicocele preoperatively and 3 months postoperatively. There was significant decrease in maximal luteinizing hormone level in luteinizing hormone-releasing hormone test in 5 patients who became fertile. There was not significant decrease in peak response of luteinizing hormone to luteinizing hormone-releasing hormone test in 8 patients who sustained infertility. A correlation was found between decreased peak response of luteinizing hormone to luteinizing hormone-releasing hormone test and pregnancy. The luteinizing hormone-releasing hormone test may be useful to evaluate subtle Leydig cell dysfunction and to predict which men with varicoceles are likely to achieve pregnancy after varicocele repair.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 1 - 5, 1995)

Introduction

A varicocele is an abnormal dilatation of veins that drain the testicle. Though it is a common finding in the general male population with an incidence of up to 15%, it is found in approximately 1/3 of males being evaluated for infertility, making it the most identifiable cause for male factor infertility¹⁾. We are still unsure of the exact mechanism by which varicoceles impair fertility, and why interrupting the venous outflow at varicocelectomy results in improved fertility.

Varicocele has been shown to have an affect on seminal parameters (count, motility and morphology)²⁾, sperm function as determined by a sperm penetration assay and testicular size³⁾ and histology⁴⁾. Several theories on the pathogenesis including scrotal

hyperthermia⁵⁾, increased testicular blood flow⁶⁾, reflux of renal and adrenal metabolites⁷⁾ and endocrine dysfunction.

Leydig cell dysfunction and subsequent pituitary hormone abnormality may be involved in the mechanism responsible for infertility in varicocele patients^{8,9,10)}. Various endocrine characterizations were reported in association with gonadotropin and testosterone in both peripheral blood and intratesticular tissue^{11,12)}. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis was examined by the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) test to evaluate Leydig cell dysfunction^{13,14)}. However, only 2 studies in which LHRH test was performed preoperatively and postoperatively in varicocele patients were available in the literature^{13,15)}.

We performed prospectively LHRH test in 13

varicocele patients preoperatively and 3 months postoperatively to attempt to correlate LH responses to LHRH with changes in semen quality. We also correlated these values with pregnancy rate. We attempted to determine the significance of subtle Leydig cell dysfunction in varicocele patients with persistent infertility after varicocelectomy.

Materials and Methods

We studied 13 infertile patients 25 to 43 years old with varicocele and excessive preoperative gonadotropin responses to LHRH. Each man has been referred for detection of cause for fertility status because he was part of a couple which has not conceived after more than 2 year of unprotected intercourse. All patients underwent high retroperitoneal ligation of the left spermatic veins. They had normal preoperative levels of testosterone, LH, FSH and prolactin. At least three semen analyses were obtained from each man before the preoperative LHRH tests. Postoperative semen analyses and LHRH tests were performed three months after varicocelectomy. We studied the correlation between change the decrease in peak LH response and change in semen quality. We also studied correlation between change in LH response to LHRH test and patient fertility. All patients were followed up for 2 years to confirm pregnancy. Statistical analysis of the LHRH test results before and after operation in patients who became fertile or remained infertile was performed by Wilcoxon signed rank test. Statistical analyses for the

correlation between the LHRH test results and semen analyses or testosterone levels were performed by a computer programmed linear regression curve for $p < 0.05$. The data were presented as mean plus or minus standard error.

Results

Of the patients who underwent varicocelectomy 5 achieved pregnancy. There was no significant difference in basal luteinizing hormone levels preoperatively (3.64 ± 0.2 mIU/ml) and postoperatively (4.21 ± 2.1). There was no significant change in follicle-stimulating hormone levels between before and after operation. Results of LHRH tests were subdivided into patients who obtained pregnancy (5) and those who remained infertile (8). There was significant decrease in high peak response of luteinizing hormone to LHRH test in 5 patients who became fertile at 30 minutes (Fig. 1). There was not significant decrease in peak response of luteinizing hormone to LHRH test in 8 patients who sustained infertility at 30 minutes (Fig. 2). Serum testosterone levels were normal values in all patients before operation and did not increase significantly postoperatively (Table 1). Results of the semen analyses were shown in Table 1. Sperm concentrations increased significantly after operation in most patients (Table 1).

Table 2 compares the changes in semen quality, serum testosterone and decrease in peak response of luteinizing hormone to LHRH test as prognosticator for achieving fertility. An increase in testosterone

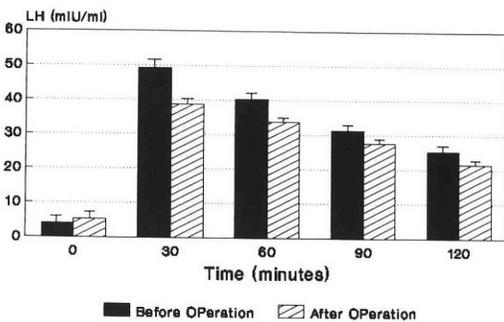


Fig. 1 Response of luteinizing hormone (LH) to LHRH before and 3 months after varicocelectomy in 5 patients who achieved pregnancy

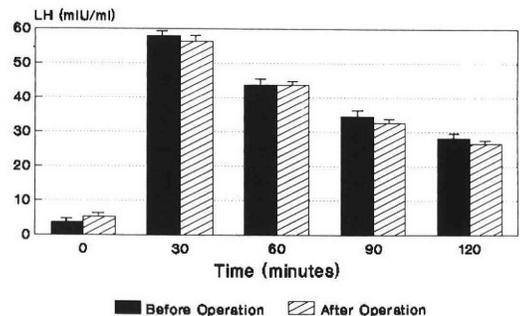


Fig. 2 Response of luteinizing hormone (LH) to LHRH before and 3 months after varicocelectomy in 8 patients who remained infertile

Table 1 Semen quality, serum testosterone and peak luteinizing hormone to LHRH test

Pt. No.	Sperm Concentration × 10 ⁶ /ml		Testosterone (ng/ml)		Peak Luteinizing Hormone (mIU/ml)	
	Preope.	Postop.	Preope.	Postop.	Preope.	Postop.
1	21	14	5.4	3.3	43.8	43.5
2	18	35	5.5	5.6	45.4	40.9
3	2	2	5.5	2.9	89.5	66.9
4	7	12	5	5.8	42.8	37.2
5	1	2	3.3	3.9	43.7	62
6	17	82	6.7	6.9	59.2	32
7	3	4	3.4	3.5	42.5	43
8	24	25	5.4	5.9	49.7	48
9	16	14	4.6	5.2	73.1	68
10	6	24	3.7	3.9	43.9	51.5
11	26	32	5.4	8.3	54.9	40.1
12	40	65	8	8.1	65.2	61
13	40	58	3.5	4.2	53.8	50.2

Table 2 Correlation of fertility to improvement in peak luteinizing hormone, semen quality and serum testosterone

Pt. No.	Fertility	Improvement in Semen Quality	Improvement in Testosterone	Improvement in Peak Luteinizing Hormone
1	Yes	No	No	Yes
2	Yes	Yes	Yes	Yes
3	No	No	No	Yes
4	Yes	Yes	Yes	Yes
5	No	Yes	Yes	No
6	Yes	Yes	Yes	Yes
7	No	Yes	Yes	No
8	No	Yes	Yes	Yes
9	No	No	Yes	Yes
10	No	Yes	Yes	No
11	Yes	Yes	Yes	Yes
12	No	Yes	Yes	Yes
13	No	Yes	Yes	Yes

level correlated with fertility in 4 of 5 patients. The best correlation of fertility was noted with decrease in peak response of luteinizing hormone to LHRH test.

Discussion

Following the last meiotic division further spermatozoal maturation and transport requires spermiogenesis and normal epididymal function. Both are androgen-dependent processes. The Sertoli cell and seminiferous tubule are bathed in a high intratesticular testosterone milieu which is necessary

to sustain full spermatozoal maturation.

On occasion men with varicoceles are found to have low plasma testosterone levels¹⁶⁾. In contrast, some studies have described no decrease in testosterone and gonadotropin levels in varicocele patients¹²⁾. Varicocele ligation resulted in an normalization of serum testosterone levels in those whose serum testosterone was subnormal prior to this surgical procedure. Therefore, possible Leydig cell dysfunction exists in varicocele patients.

Intragonadal testosterone synthesis has been explored in more detail. Bilateral testicular biopsies

of men with varicoceles reveal that total Leydig cell density is decreased. Further in vitro testosterone synthesis is severely impaired compared to values established for normal men¹⁷⁾. Weiss et al. found the most dramatic decrease in Leydig cell density and in vitro testosterone synthesis in oligozoospermic men^{18,19)}.

This defect in Leydig cell function is so subtle that it can only be appreciated at the intratesticular level. Peripheral testosterone levels were consistently normal in all oligozoospermic men studied in Weiss et al.'s series. Swerdloff and Walsh²⁰⁾ confirmed the normality of peripheral and spermatic vein testosterone levels in varicocele patients. In our present study basal gonadotropin and testosterone levels were almost normal as described by others^{17,20)}. There was significant change in basal levels after surgery. These results do not vitiate the importance of the concept of subtle Leydig cell dysfunction as a pathophysiological cause of decreased fertility in varicocele patients.

We conducted a prospective study on the provocative LHRH stimulation test to disclose the possible existence of deficit of androgen synthesis and subsequent impaired spermatogenesis in varicocele patient. Maximal luteinizing hormone levels (obtained 30 minutes after intravenous injection of 100 μ g LHRH) were significantly decreased 3 months after operation in the patients who achieved pregnancy while these levels were not significantly decreased in the patients who did not become fertile. Hudson and associates investigated severely oligozoospermic patients with varicocele, and demonstrated excessive increase in luteinizing hormone levels after LHRH administration²⁰⁾. A recent report showed a prognostic correlation between the change in response of luteinizing hormone to LHRH test and improvement in fertility¹⁵⁾.

Based on our results and those of others, it is conceivable that there is a subtle defect in Leydig cell function, not demonstrable by any diminution in peripheral serum testosterone level, but inadequate for normal intratesticular spermatogenesis. The implication is that the presence of the varicocele in some way contributes to the disordered Leydig cell

function. Ligation of the varicocele alone may correct this defect.

In conclusion, the LHRH test may be useful to predict the fertility potential after surgical correction of varicocele. If deficiencies in intratesticular testosterone biosynthesis play some pathogenetic role in varicocele-associated infertility, enhancement of intratesticular testosterone production after varicocelectomy should be expected to improve fertility.

References

- 1) Greenberg SH, Lipschultz LI and Wein AJ, Experience with 425 sub-fertile male patients. *J Urol* 119: 507, 1978
- 2) MacLeod J, Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* 16: 735, 1965
- 3) Etriby A, Girgis SJM, Hefnawy H, et al., Testicular changes in subfertile males with varicocele. *Fertil Steril* 18: 666, 1967
- 4) Ibrahim AA, Awad HA, El-Haggar S, et al., Bilateral testicular biopsy in men with varicocele. *Fertil Steril* 28: 663, 1977
- 5) Zorngiotti AW and MacLeod J, Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* 24: 854, 1973
- 6) Saypol DC, Howards SS, Turner TT, et al., Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 68: 39, 1981
- 7) Steeno O, Koumans J and De Moore P, Adrenal cortical hormones in the spermatic vein of 95 patients with left varicocele. *Andrologia* 8: 101, 1976
- 8) Hudson RW, Crawford VA and McKay DE, The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormones. *Fertil Steril* 36: 633, 1981
- 9) Hudson RW, Perez-Marrero RA, Crawford VA, et al., Hormonal parameters of men with varicoceles before and after varicocelectomy. *Fertil Steril* 43: 905, 1985
- 10) Nagao RR, Plymate SR, Berger RE, et al., Comparison of gonadal function between fertile and infertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 46: 930, 1986
- 11) Ibrahim II, Abdalla MI, Girgis SM, et al., FSH, LH, E₂, progesterone, and testosterone in peripheral blood, spermatic vein, and semen of subfertile men with varicocele. *Arch Androl* 10:

- 173, 1983
- 12) Swerdloff RS and Walsh PC, Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele. *Fertil Steril* 26: 1006, 1975
 - 13) Schiff I, Wilson E, Newton R, et al., Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone responses to gonadotropin-releasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril* 27: 1059, 1976
 - 14) Ospina LF, Leonard JM and Paulsen CA, Augmented gonadotropin response to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in infertile men with varicocele. *Clin Res* 25: 106A, 1977
 - 15) Bickel A and Dickstein G, Factors predicting the outcome of varicocele repair for subfertility: The value of the luteinizing hormone-releasing hormone test. *J Urol* 142: 1230, 1989
 - 16) Raboch J and Starka L, Hormonal testicular activity in men with a varicocele. *Fertil Steril* 22: 152, 1971
 - 17) Rodriguez-Rigau LJ, Weiss DB, Zukerman Z, et al., A possible mechanism for the detrimental effect of varicocele on testicular function in men. *Fertil Steril* 30: 577, 1978
 - 18) Weiss DB, Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, et al., Quantitation of Leydig cells in testicular biopsies of oligospermic men with varicocele. *Fertil Steril* 30: 305, 1978
 - 19) Weiss DB, Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD et al.,

Leydig cell function in oligospermic men with varicocele. *J Urol* 120: 427, 1978

- 20) Hudson RW and McKay DE, The gonadotropin response of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 33: 427, 1980

精索静脈瘤術後の妊孕性を予測する LHRHテストの有用性

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

精索静脈瘤と不妊との因果関係については議論が多い。精索静脈瘤患者における造精機能障害の原因としてLeydig細胞の機能障害が示唆されている。今回我々はそうした機能障害の存在を明らかにする目的で、血清テストステロンおよびゴナドトロピン値とLHRHホルモンに対するLHの反応性について検討した。13例の精索静脈瘤患者に対し、術前および術後3か月目にLHRHテストを行った。妊娠に成功した5例においては、LHRHテストに対するLHホルモンのピーク値は術後有意に減少した。しかし、術後も不妊が続く8例においてはその値は有意な減少を示さなかった。LHRHテストに対するLHホルモンのピーク値の減少と妊娠との間に良い相関が認められた。LHRHテストは、軽度のLeydig細胞機能障害を評価し、さらに術後の妊孕性を予測するうえで有用な検査法と思われる。

(受付：1993年9月29日)

(受理：1993年11月15日)

体外受精における初期胚発育に及ぼす 共培養効果の発現の機序に関する研究

The Effect of Co-culture on the Development of Early Stage Embryos for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

(主任：永田行博教授)

山 元 慎 一

Shinichi YAMAMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine
Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

マウス受精卵を他の細胞と共培養すると発育が促進されるが、その共培養効果の発現の機序についての解明を試みた。ヒト線維芽細胞、ヒト子宮内膜細胞、ヒト卵巣癌細胞およびマウス2細胞期胚そのものの4種類の細胞を共培養細胞として研究に供した。

5%CO₂ in air下でマウス2細胞期胚を96時間培養するとblastocystへの発育率は、対照群の22.9%に対しいずれの共培養細胞群でも高く、特にヒト卵巣癌細胞群では62.5% (P<0.01)と高発育を示した。また、培養細胞上清を用いた培地でのblastocyst発育率は、ヒト卵巣癌細胞で60.9% (P<0.01)、ヒト子宮内膜細胞で26.0%であった。培養開始96時間後の培地内最下層の酸素分圧は、対照群の144.9±3.9 mmHgに対し共培養群でいずれも低酸素分圧傾向であったが、ヒト卵巣癌細胞群での酸素分圧は129.7±3.5 mmHgと有意 (P<0.01)の低下を示した。高い受精卵発育促進を示したヒト卵巣癌細胞の共培養培地内の低酸素状態を解除してマウス前核期胚を培養すると、培養開始96時間後のblastocyst発育率は共培養群の25.0% (19/76)に対し、低酸素解除群で6.1% (3/49)と受精卵の発育が抑制された。

以上より、共培養の効果の発現の機序は、①共培養で培養液内酸素分圧濃度が低下して酸素毒としての酸素の作用が低下し、さらに②共培養細胞から何らかの受精卵発育促進因子が産生されていることによる、と考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 6-13, 1995)

緒 言

ヒト体外受精・胚移植法 (In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 以下IVF-ETと略す)の導入は、卵管因子による不妊のみならず、頸管因子・精子免疫・子宮内膜症・原因不明などの不妊や精子減少症・精子無力症といった男性因子による重症な不妊の治療を可能ならしめた。現在では、不妊症治療の切り札的存在として位置づけられている。しかし、その妊娠率は約20%程度であり、いまだ必ずしも満足できる成績ではない。

IVF-ETの妊娠率を向上させるには、多数の均一な成熟卵を回収すること、受精から胚移植までの体外培養の過程においてはqualityの高い受精卵を得ることが重要である。我々は、体外培養する時の培養環境を改善することがIVF-ETの成功率を高めると考え、培養液内のK⁺濃度の検討や培養液内の添加蛋白の効果^{1,2,3}および培養条件(酸素分圧)⁴などの一連の検討を行ってきた。これらの実験から得られた受精卵発育の至適条件はいずれもin-vivoの卵管内環境に近いものであった。

ところで、竹内らは1990年、ヒト卵管上皮細胞培

養法を確立し、マウス2細胞期胚をこの細胞と共培養すると発育が促進されることを報告した⁵⁻⁸⁾。最近の報告でも、ヒトあるいは他の動物の受精卵との共培養で同様な効果が得られたという報告が見られている^{9,10)}。本研究では、共培養によりなぜ受精卵の発育が促進されるのか、共培養効果のメカニズムを解明する目的でマウス受精卵を用いて検討した。

研究方法

1. 種々の共培養細胞を用いた共培養効果の検討

1) 共培養に供した細胞

ヒト線維芽細胞、ヒト子宮内膜細胞、ヒト卵巣癌細胞を共培養細胞として用いた。摘出された子宮筋腫(月経周期16日)から線維芽細胞および子宮内膜細胞を、図1のごとく培養した。ヒト卵巣癌細胞は、アドリアマイシン耐性ヒト卵巣癌株(AO2株、名古屋大学医学部産婦人科より提供)を用いた。以上の細胞をNunc 4 well Multidish内で培養し、細胞がconfluentになるまで、10%NCS (Newborn calf serum:GIBCO®) 添加Ham's F-10 (GIBCO®) で37°C・5%CO₂ in air下に48~72時間毎の培地交換を行った。さらに、多数個同時培養のマウス2細胞期胚をも共培養細胞の一つとして用いた。すなわち、マウス2細胞期胚の共培養とは、2細胞期胚そのものを共培養細胞とみなして2細胞期胚を同時に多数個培養したものとした。

2) マウス2細胞期胚発育培地の調整

共培養細胞がconfluentになった時点で280~290mOsmに調整したHuman Tubal Fluid (HTF)¹¹⁾で3~4回洗浄後、10%NCS添加HTFをそれぞれのwellに500 μ l滴下し37°C・5%CO₂ in air下で24時間前培養した。

3) マウスの過排卵処理法

8~12週齢のICR系雌マウスにPMS 5IUを、その48時間後にhCG 5IUを腹腔内投与した。hCG投与直後にICR系雄マウスと交配し、その36時間後に卵管采を灌流して2細胞期胚を回収した。

4) 共培養方法

2)で調整した共培養培地内(500 μ l)に2細胞期胚を約20個ずつ移し、24時間毎に96時間まで位相差顕微鏡下で形態学的観察をした。なお、マウス2細胞期胚との共培養は、100 μ lの培養液(24時間前培養)内に20個ずつ培養したものとした。

5) 共培養細胞の培養液上清を用いたマウス2細胞期胚の培養

共培養細胞培地の一部は上清回収用とし、96時間培養した後に細胞培養液上清を回収し、2細胞期胚との共培養の実験を行うまで-20°Cで保存した。

6) 培養液内ガス分析

培養液内ガス分析の方法は培養細胞表面ないしはdish最下層に近接した培養液の75~100 μ lを採取して

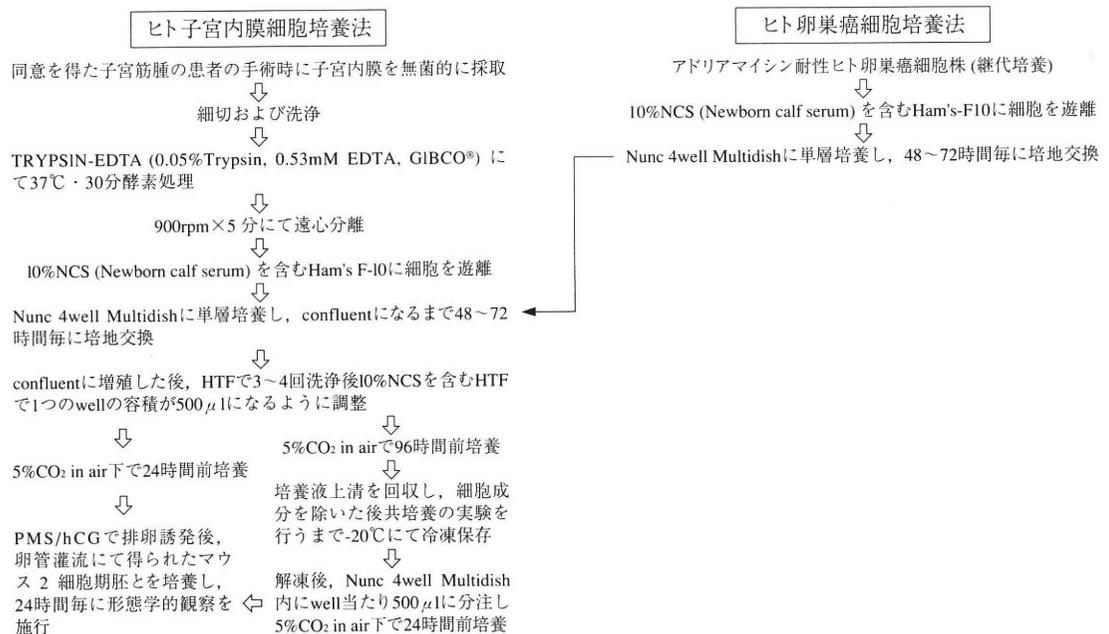


図1 ヒト子宮内膜細胞とヒト卵巣癌細胞培養法

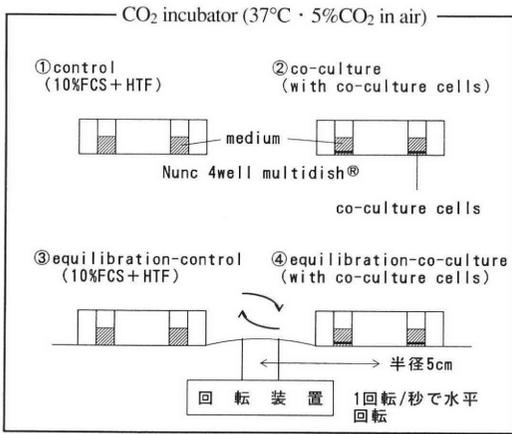


図2 検討した4種類の培地

その酸素分圧濃度をCORNING社製178 pH-Blood gas analyzer¹²⁾を用いて測定した。

7) 統計処理

統計学的解析は、受精卵の発育率は χ^2 検定で、培養液内酸素分圧はT検定で行った。

2. 共培養培地内の低酸素効果を除去した条件での胚発育の検討

1) 前述のヒト卵巣癌細胞を共培養培地とした。

2) 共培養培地内の低酸素効果を除去した環境作製

培地内の酸素分圧濃度をインキュベーター内のガス分圧と平衡になるような装置を作製した(図2, 回転装置)。これは、インキュベーター内の条件を終始 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ in airとし、dishが半径約5cmの円上を1周約1秒の速度で回転することによりdish内の培養液が攪拌され培地内酸素分圧をインキュベーターの条件と平衡状態におく目的で作製した。

3) 検討した培地

図2のごとく4種類の培地を作成した。すなわち、①のcontrol群は、10%FCS (Fetal Calf Serum) を含んだ

HTF培地をインキュベーター内に静置したものと、②のco-culture群は共培養細胞培地を静置したもので、さらにcontrol群およびco-culture群の培地を前述した装置の上で培養したものをそれぞれ、③equilibration-control群、④equilibration-co-culture群とした。

検討したマウス胚の発育は、2 cell-blockの関与の有無をみるために前核期胚を用いて検討をした。なお、培養液内ガス分析の方法は前述のごとく測定した。

4) 統計処理

前述と同様に統計処理を行った。

3. ヒト卵巣癌細胞培養上清中の各因子の濃度

共培養細胞上清中のestradiol (E_2), progesterone濃度を第一ラジオアイソトープ社のRIAキットを用いて測定した。Epidermal Growth Factor (EGF) 濃度はELISA法で、Superoxide Dismutase (SOD) 活性(阻害率)はNBT還元法¹³⁾で測定した。

成 績

1. 種々の細胞との共培養によるマウス2細胞期胚の発育

1) 共培養開始96時間後のblastocystへの発育率(表1)

共培養開始96時間後のblastocystへの発育率を表1に示す。Blastocystまでに発育したマウス2細胞期胚は、対照群の22.9%に対してヒト卵巣癌細胞の共培養(写真1)で62.5%と有意に($P<0.01$)高い発育率を示した。他の共培養群も対照群より高値を示したが有意差は認めなかった。

Hatching率は、ヒト卵巣癌細胞との共培養で53.1%、ヒト線維芽細胞で20.0%、ヒト子宮内膜細胞で23.0%であり、対照群の4.8%に対して、いずれも高値を示した($P<0.01$)。マウス2細胞どうしの共培養では9.3%であった。

表1 種々の共培養細胞を用いたマウス2細胞期胚の96時間後のBlastocystへの発育

Co-culture Cell	No. of 2 -Cell Embryos Cultured per Well	No. of 2 -Cell Embryos Cultured	Non Hatching		Hatching		Total Blastocysts
			No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	
①ヒト線維芽細胞(子宮)	20 embryos/500 μ l	95	6 (6.3)	19 (20.0) **	25 (26.3)		
②ヒト子宮内膜細胞	20 embryos/500 μ l	100	5 (5.0)	23 (23.0) **	28 (28.0)		
③ヒト卵巣癌細胞	20 embryos/500 μ l	96	8 (8.3)	52 (53.1) **	60 (62.5) *		
④マウス2細胞期胚	20 embryos/100 μ l	108	26 (24.1)	10 (9.3)	36 (33.3)		
⑤コントロール ^a	20 embryos/500 μ l	105	18 (18.1)	5 (4.8)	24 (22.9)		

^a HTF + 10%NCS (v/v) のみ

* $P<0.01$

** $P<0.01$

表2 種々の共培養細胞の上清を用いたマウス2細胞期胚の96時間後のBlastocystへの発育

Supernatant from Co-culture Cells	No. of 2-Cell Embryos Cultured	Non Hatching	Hatching	Total Blastocysts
		No. (%)	No. (%)	No. (%)
①ヒト線維芽細胞(子宮)	60	4 (6.7)	0 (0.0)	4 (6.7)
②ヒト子宮内膜細胞	100	19 (19.0)	7 (7.0)	26 (26.0)
③ヒト卵巣癌細胞	92	49 (53.3)	7 (7.6)	56 (60.9) *
④コントロール ^a	105	19 (18.1)	5 (4.8)	24 (22.9)

^a HTF+10%NCS (v/v) のみ
* P<0.01

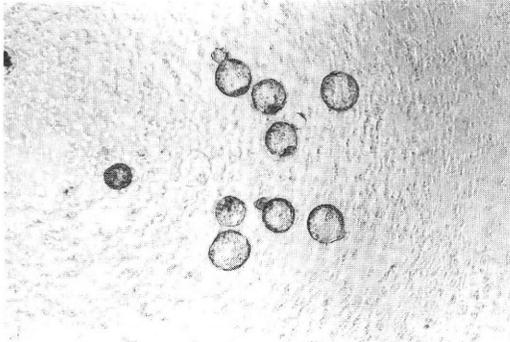


写真1 ヒト卵巣癌細胞とマウス2細胞期胚との共培養(受精卵培養開始96時間後) 癌細胞は一部重層しているが、マウス2細胞期胚はexpanded blastocyst および hatched blastocystに発育している。

2) 共培養細胞上清で培養したマウス2細胞期胚の発育(表2)

共培養細胞上清から得られた培養液で培養したマウス2細胞期胚の培養開始96時間後のblastocystへの発育率を表2に示す。ヒト卵巣癌細胞上清との培養では60.9%と有意(P<0.01)に高発育率を示した。ヒト子宮内膜細胞培養上清では26.0%、ヒト線維芽細胞培養上清では6.7%であった。

Hatching率は、ヒト卵巣癌細胞培養上清で7.6%、

ヒト子宮内膜細胞培養上清で7.0%であり、対照群と比較し高い傾向にあった。

もっとも高い発育促進効果が認められたヒト卵巣癌細胞において、共培養とその上清を用いた培養でのblastocystへの発育率はそれぞれ62.5%と60.9%であり、有意差はなかった。しかし、hatching率は共培養群は53.1%であり、上清群の7.6%に対して有意(p<0.01)に高かった(表1・表2)。

3) 培養液内の酸素分圧(表3)

培養液内の酸素分圧濃度を表3に示す。

共培養群では、対照群の144.9±3.9mmHgに対し、いずれの群でも酸素分圧が低い傾向にあった。特に、ヒト卵巣癌細胞との共培養群の培地内の酸素分圧は、129.7±3.5mmHgと有意(P<0.01)に酸素分圧は低下した。上清群の培養液内の酸素分圧は、対照群と比較していずれも有意の変化は認められなかった。

2. 共培養培地内の低酸素状態を解除した条件での胚発育の検討

1) 培地内酸素分圧の測定結果(表4)

培養開始24時間後の酸素分圧を表4に示す。control群の136.6±1.1mmHgに対し、co-culture群では108.5±10.7mmHgと有意の低酸素分圧を示した。一方、equilibration-co-culture群では、酸素分圧は130.9±1.8mmHgで共培養群に比べて有意に高く、control群

表3 各種の共培養培地内の酸素分圧

Co-culture Cells	n	With Co-culture cells (mmHg)	Supernatants from Co-culture cells(mmHg)
①ヒト線維芽細胞(子宮)	8	142.4 ± 3.6	150.6 ± 0.4
②ヒト子宮内膜細胞	6	141.9 ± 33.3	126.3 ± 21.0
③ヒト卵巣癌細胞	10	129.7 ± 3.5 *	149.4 ± 5.7
④マウス2細胞期胚	1	140.5	
⑤コントロール ^a	10		144.9 ± 3.9

^a HTF+10%NCS (v/v) のみ
* P<0.01

表4 培養開始24時間後の培養液内の酸素分圧濃度

Type of Culture Media	n	Oxygen Pressure (mmHg)
①control	4	136.6 ± 1.1
②co-culture	4	108.5 ± 10.7 *
③equilibration-control	4	136.4 ± 0.9
④equilibration-co-culture	4	130.9 ± 1.8

* P<0.05

表5 マウス前核期胚の発育

Type of Culture Media	No. of 1-Cell Embryos Cultured	4 cell ~ ^a		Non Hatching ^b	Hatching ^b	Total Blastocysts ^b
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
①control	32	2 (6.3)	2 (6.3)	0 (0.0)	2 (6.3)	
②co-culture	76	33 (43.4) *	15 (19.7)	4 (5.3)	19 (25.0) **	
③equilibration-control	31	4 (12.9)	1 (3.2)	0 (0.0)	1 (3.2)	
④equilibration-co-culture	49	7 (14.3)	3 (6.1)	0 (0.0)	3 (6.1)	

^a 培養開始48時間後^b 培養開始96時間後

* p<0.05

** p<0.05

表6 ヒト卵巣癌細胞培養上清中の各因子の濃度

		卵巣癌細胞上清	コントロール ^a
①E ₂	(pg/ml)	25.0 >	25.0 >
②progesterone	(ng/ml)	0.1 >	0.1 >
③EGF	(pg/ml)	1.0 >	1.0 >
④SOD	(%)	1.0	1.3

^a HTF+10%FCS (v/v) のみ

と差はなかった。

2) マウス前核期胚の発育 (表5)

マウス前核期胚の培養開始48時間後の時点での4細胞以上のstageへの発育率を表5に示す。control群での6.3% (2/32) に対して、co-culture群で43.4% (33/76) と有意に4細胞以上に発育した。しかし、低酸素分圧を解除したequilibration-co-culture群では、12.9% (4/31) と若干の発育促進を認めたのみであった。

培養96時間後のblastocyst発育率 (表5) は、control群の6.3% (2/32) に対しco-culture群では25.0% (19/76) と有意 (p<0.05) の発育を示した。一方、equilibration-co-culture群では、6.1% (3/49) とcontrol群に比較して発育率に差を認めなかった。

3. ヒト卵巣癌細胞培養上清の各因子の濃度 (表6)

ヒト卵巣癌細胞培養上清中の各因子の濃度を表6に示す。上清中のE₂やprogesterone値は測定感度以下であり、EGF, SOD濃度はいずれも対照群と比較して差を認めなかった。

考 察

IVF-ETの妊娠率を向上させるためには、まず成熟した卵細胞を回収することが重要であり、そのために種々の排卵誘発法が検討されている。さらに、受精方法や受精卵培養法が検討されている。とくに、受精卵をどのように培養するかは極めて重要であり、体外で受精卵の培養を行う際はできる限り"in-vivo"に近い状態で行えば最も理想的である。しかしながら、現在のところ"in-vivo"での受精から着床までの環境・メカニズムについては十分に解明されているとはいえない。

体外培養を続けるうえで、至適培養条件や種々の培養液の改良の検討がなされている。培養条件としては、まず至適pHがあげられる。動物種によって異なるが、John et al.¹⁴⁾はHam's F-10を用いたマウス受精卵培養ではpH7.17~7.37が至適であったと報告している。浸透圧については、Whitten¹⁵⁾によるとマウス1細胞期胚の至適浸透圧は250~280mOsmであるとい

う。

培養器内気相も重要な因子¹⁶⁾の一つである。諸家の報告をみると、5%の比較的酸素濃度下でマウス初期胚を培養することで高発育を示すことをQuinn and Harlowは報告しており¹⁷⁾、また、竹内ら⁴⁾は低酸素状態がマウス 2-cell blockを解除したことから酸素分圧は受精卵培養において重要な鍵を握っているとしている。

培養液の組成では、ヒト体外受精においてHam's F-10、Whittingham T₆やHTFなどが用いられている。特にHTFは卵管内分泌液の組成に近く、我々のマウス 2細胞期胚を用いた実験でもHam's F-10と比較してK⁺濃度が卵管液内組成に近いHTFのほうが高い受精卵発育促進効果を認めた³⁾。また、培養液内添加蛋白の効果について、我々¹⁸⁾の実験ではHTFあるいはHam's F-10単独による受精卵培養ではhatchingは起こらず、hatchingにはなんらかの血清が必要であり、特にNCS (Newborn calf serum) が有用であったと報告した。

より"in-vivo"に近い状態で培養することが理想的であるとの観点から、最近では卵管上皮細胞との共培養が報告され、それによって受精卵発育促進効果が認められている^{5,6,8)}。さらに卵管上皮細胞以外にも共培養効果があるという報告もある (Bongso et al.⁹⁾、Gandorfi et al.¹⁹⁾。しかし、卵管上皮細胞や他の細胞との共培養がなぜ発育促進効果を発現するのかについては、その機序はまだ明らかにされていない。

本研究では、卵管上皮細胞だけでなく、他の細胞との共培養によって受精卵の発育が促進されたが、むしろcytotoxicに作用すると思われたヒト卵巣癌細胞との共培養でより高い受精卵の発育促進効果が認められた。

体細胞培養の領域では、細胞培養を行うと細胞数により培地表面から培養細胞表面へとpO₂の勾配ができ²⁰⁻²²⁾、培養細胞表面は低酸素分圧状態であること^{20,22)}、また継代培養を行う際には細胞数が少ないと培養細胞の増殖能力が低下すること²¹⁾が知られている。このことは、卵管上皮細胞に限らず他の細胞との共培養は結果的に培養液内酸素分圧を低下させることを示唆する。この酸素分圧低下は、竹内ら⁴⁾やQuinn et al.¹⁷⁾が言う酸素毒性の低下につながり、結果的に受精卵発育促進につながるのではないかと、推測される。この研究でも、共培養により培養液内酸素分圧が低下し、とくに最も高いblastocystへの発育率を示したヒト卵巣癌細胞の共培養培地内の酸素分圧が著明に低下していた。

共培養効果が培地内の酸素分圧を低下させることであるとすると、その低酸素効果を除去すれば、2-cell blockがなくなり受精卵発育は促進されないと考え、共培養培地内の低酸素状態を解除する目的で回転装置を考案した。その結果、この回転装置で共培養培地内の低酸素状態を解除することによりマウス前期胚の発育は2-cell blockがなくなり受精卵発育促進効果は低下した。もっとも、この回転装置の共培養細胞の増殖に対する影響について考慮する必要があるが、形態学上は非回転装置内での培養と比較して著変は認めなかった。以上のことより、共培養により培養液内の酸素分圧を低下させることで受精卵の発育が促進されることが判明した。

次に、共培養の発育促進効果は共培養培地内の酸素分圧の低下のほかには他の因子が関与しているかを検討するために、その上清を用いてマウス 2細胞期胚の発育状況を検討した。その結果、対照群 (HTF+10%NCS) と比較してヒト卵巣癌細胞共培養上清に有意な受精卵発育促進効果が認められた。したがって、共培養における発育促進効果は培養液内酸素分圧の低下によるものだけではなく、共培養細胞からなんらかの受精卵発育促進因子が分泌されていることによる可能性が示唆された。

このことに関して、Bongso et al.⁹⁾は、ヒト卵管細胞からembryotrophic factorが分泌されている可能性を示唆し、Wiemer et al.²³⁾はウシ線維芽細胞からの'metabolism-enhancing substances, metabolic intermediates or stimulatory factors'の産生を示唆している。すなわち、これらの因子がparacrine的に受精卵の発育を促進している可能性がある。

さらに、癌細胞は細胞自身が産生する細胞成長因子がautocrine的に働く機構により無秩序に増殖する^{24, 25)}といわれ、培養上清中にTGF様²⁶⁾、FGF様²⁷⁾、PDGF²⁸⁾様の成長因子が見出されたとするものがある。今回の研究で使用したヒト卵巣癌細胞および他の細胞上清の中に、上記細胞成長因子が含まれている可能性が充分考えられたが、今回用いたヒト卵巣癌細胞培養上清中には、E₂やprogesteroneなどのステロイドホルモン産生はもちろんのこと、EGFも産生されていなかった。また、最近SODの受精・着床の関与が報告され、ヒト上皮性卵巣癌患者血中のSOD濃度が高いと報告されているが、今回用いたヒト卵巣癌細胞からもSODが検出された。SODが関与したのか断定できないが、今後、共培養細胞から産生される受精卵発育促進物質の解明が必要である。

また、Wiley et al.²⁹⁾は、in vitroにおけるマウスの着

床前期の発育について、より少量の培養液内に多数の受精卵を培養すると受精卵発育が改善されたと報告しているが、本実験でも受精卵を多数個培養するほうが受精卵の発育が促進された。本実験でのマウス受精卵を多数個培養した際の培地内の酸素分圧は、対照群と比較して若干の低下しか観察されなかった。したがって、この場合の受精卵発育促進効果は培養液内低酸素効果よりもむしろマウス受精卵自身が他のマウス受精卵に対し発育を促進する何らかの因子を産生していることによる関与が考えられる。

一方、ヒト卵巣癌細胞において共培養群とその上清群における受精卵の発育促進効果を比較すると、マウス2細胞期胚培養開始96時間でのblastocystへの発育率は、それぞれ62.5%および60.9%で有意差は認められなかった。しかし、そのblastocystの内容を詳細にみると、着床の前段階であるhatchingにまで発育しているものは共培養群の53.1%に対して、上清群では7.6%しか認められず、共培養群において有意に高率であった。このことは、共培養のほうが共培養細胞上清での培養よりも受精卵の細胞増殖速度が上回っていることを示す。したがって、共培養することのほうが共培養細胞上清を用いた培養法よりも一層効果的であるといえる。その理由は、共培養細胞による培養液内低酸素効果がプラスされることによると考えられ、その結果さらにより高い受精卵発育促進効果をもたらされたといえる。

以上の結果より、共培養による受精卵の発育促進効果発現の機序は、①共培養培地内の培養液内酸素分圧濃度が低下する、さらに②共培養細胞から何らかの受精卵発育促進因子が産生されていることによるものと考えられる。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました永田行博教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導を賜りました堂地勉講師、竹内一浩講師、中村行彦助手（現出水市立病院産婦人科部長）ならびに鹿児島大学医学部産科婦人科学教室 不妊・内分泌研究室の諸兄に感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第42回日本産科婦人科学会学術講演会(1990, 東京)において発表した。

文 献

- 1) Yamamoto S, Takeuchi K, Mori A, et al., Effects of Oxygen and Potassium Concentration in the Growth Medium on the Development of Mouse Embryos. *Acta Obst Gynaec Jpn* 39: 1505, 1987
- 2) 山元慎一, 竹内一浩, 福元清吾 他, マウス初期胚に及ぼす添加血清の影響. *哺乳卵研誌* 6: 55, 1989
- 3) Yamamoto S, Takeuchi K, Fukumoto S, et al., Effect of protein supplement and potassium concentration on mouse 2-cell embryo development in vitro. *Acta Obst Gynae Jpn* 41: 1302, 1989
- 4) 竹内一浩, 山元慎一, 森 明人 他, 酸素濃度の初期胚発育に及ぼす影響—2 cell blockとの関連について—. *日不妊会誌* 26: 34, 1989
- 5) 竹内一浩, 山元慎一, 沖 利通 他, ヒト卵管上皮細胞とマウス初期胚との共培養について, *日本受精着床雑誌* 7: 177, 1990
- 6) Takeuchi K, Nagata Y, Sandow Bruce A, et al., Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse pre-embryos. *Molecular reproduction and development* 32: 236, 1992
- 7) Oki T, Takeuchi K, Yamamoto S, et al., Effect of aging on human oviductal epithelial culture. *Assisted Reproductive Technology/Andrology* 1: 69, 1990
- 8) Takeuchi K, Yamamoto S, Mori A, et al., Co-culture of mouse embryos with human oviduct epithelial cells. In: Y. Boutaleb and A. Gzouli, eds, *New Concepts in Reproduction*. p187, The Parthenon Publishing Group, 1991
- 9) Bongso A, Soon Chye N, Sathananthan H, et al., Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 4: 706, 1989
- 10) Sakkas D, Trounson AO and Kola I, In vivo cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells. *Reprod Fertil* 1: 127, 1989
- 11) Quinn P, Kerin JF and Warnes GM, Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44: 493, 1985
- 12) 178 pH/Blood gas analyzer instruction manual, Corning Medical and Scientific. Catalog number 477664 Rev. F, 1983
- 13) 山本孝吉, 笹田昌孝, スーパーオキシドジスムターゼの測定法. *臨床検査* 33: 281, 1989
- 14) John DP and Kiessling AA, Improved pronuclear mouse embryo development over an extended pH range in Ham's F-10 medium without protein. *Fertil Steril* 49: 150, 1988
- 15) Whitten WK, Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv Biosci* 6: 129, 1971
- 16) Julio EPJ, William EF and William EG, The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen

- concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 51: 896, 1989
- 17) Quinn P and Harlow GM, The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool* 206: 73, 1978
 - 18) 山元慎一, 竹内一浩, 福元清吾 他, マウス2細胞期胚を用いた培養液内添加蛋白の効果について. *日本受精着床雑誌* 7: 164, 1990
 - 19) Gandolfi F and Moor RM, Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 81: 23, 1987
 - 20) 小山富康, 組織の酸素分圧とその意義. *代謝* 16: 2027, 1979
 - 21) 三井洋司, 高木良三郎, 市原 明 他, 機能細胞の分離と培養. p26, 丸善, 1987
 - 22) Werrlein RJ and Glinos AD, Oxygen micro-environment and respiratory oscillations in cultured mammalian cells. *Nature* 251: 317, 1974
 - 23) Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, et al., Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 52: 503, 1989
 - 24) 安光英太郎, 梅田 誠, 高岡聰子, 無蛋白質無脂質完全合成培地で生育する株細胞. *細胞工学* 7: 136, 1988
 - 25) Sporn MB and Roberts AB, Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313: 745, 1985
 - 26) Wigley CB, Trejdosiewicz LK, Southgate J, et al., Growth factor production during multistage transformation of epithelium in vitro: 1. Partial purification and characterization of the factor (s) from a fully transformed epithelial cell line. *J Cell Physiol* 125: 156, 1985
 - 27) van Veggel JH, van Oostwaard TM, de Laat SW, et al., PC13 embryonal carcinoma cells produce a heparin-binding growth factor. *Exp Cell Res* 169: 280, 1987
 - 28) Shimokado K, Ranines EW, Madtes DK, et al., A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43: 277, 1985
 - 29) Wiley LM, Yamami S and Van Muyden D, Effect of protein concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil Steril* 45: 111, 1986

The effect of co-culture on the development of early stage embryos for in vitro fertilization and embryo transfer

Shinichi Yamamoto

Department of Obstetrics and Gynecology
Faculty of Medicine, Kagoshima University
Kagoshima 890, Japan
(Director: Prof. Y. Nagata)

Mouse embryos were co-cultured to clarify the effects of co-culture on early mouse embryos. The co-culture cells used in this study consisted of human fibroblasts, human uterine endometrial cells, human ovarian carcinoma cells and mouse 2-cell embryos. The mouse 2-cell embryos were cultured under 5 %CO₂ in air at 37°C for 96 hr. The co-cultured embryos developed into blastocysts with a significantly high development rate, compared to that of the control (22.9%, without co-culture cells). The highest rate, 62.5% (P<0.01), was found in the embryos co-cultured with human ovarian carcinoma cells. When mouse 2-cell embryos were cultured in the supernatants from those co-cultured cells, then the development of the embryos was also accelerated. The development rates of the blastocysts in the supernatant from human fibroblasts and human ovarian carcinoma cells were 60.9% (P<0.01) and 26.0%, respectively.

The oxygen pressure in any kind of medium with co-culture cells was lower than that of the control (144.9 ± 3.9 mmHg), while, in particular, that in human ovarian carcinoma cells was 129.7 ± 3.5 mmHg (P<0.01).

When the oxygen pressure in the co-culture dish with human ovarian carcinoma cells was equalized with that of the control (without co-culture cells), then the development rate of mouse 1-cell embryo to blastocyst decreased to 6.1% (3/49) even though that rate in the co-culture was 25.0% (19/76).

Based on these results, it can thus be concluded that the co-culture cells may reduce the oxygen pressure in the medium, which is subsequently followed by a decrease in the oxygen toxicity to embryos, and such co-culture cells are considered to produce some 'embryo growth promoting factors'. Furthermore, the supernatant from human ovarian carcinoma cells was observed to contain such factors in high concentrations.

(受付: 1994年4月4日)

(受理: 1994年6月23日)

Sperm Quality Analyzerによる精子受精能の評価

The Assessment of Sperm Quality Using a Sperm Quality Analyzer

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

森 明 人

Akito MORI

山 元 慎 一

Shinichi YAMAMOTO

中 村 佐 知 子

Sachiko NAKAMURA

竹 内 一 浩

Kazuhiro TAKEUCHI

永 田 行 博

Yukihiro NAGATA

沖 利 通

Toshimichi OKI

堂 地 勉

Tsutomu DOUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine
Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

不妊治療において、従来の精液分析だけで精子の受精能を評価することは困難である。我々は新しく開発された Sperm Quality Analyzer (SQA:United Medical Systems社) を導入し、精子受精能の新しい評価法として有用か否かを検討した。対象は当科でIVF-ETを試みた30例34周期で、SQAを用いSperm Motility Index値 (SMI値) を測定した。次にSMI値と精子濃度、運動率、Penetrak値およびIVF-ET時の受精率との相関性を比較検討した。SMI値は精子濃度、運動精子数、運動率と正の相関を示し、受精率との相関も $R=0.699$ であり、Penetrak値と受精率との相関 ($R=0.547$) よりも高い相関を示した。SMI-Poor群 (SMI値80以下)、Fair群 (80~160)、Good群 (160以上) の受精率はそれぞれ57% (4/7)、93% (13/14)、100% (13/13) であった。また通常の精液分析で正常と判定したがSMI値がpoorで受精しなかったものが1例あった。SQAは極めて簡便な検査法であり、SMIは精子の受精能を評価する上で有用な指標となりうる。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 14 - 18, 1995)

緒 言

不妊症治療において、精子濃度、運動率測定などの精液分析は最も基本的な検査の一つである。しかし、それのみで精子の受精能を評価することは困難である。また既存の精子受精能評価法はいずれも簡便性に欠けルーチン検査として応用し難い面がある。

今回我々は新しく開発されたSperm Quality Analyzer (SQA) を導入し、精子受精能の新しい評価法として有用か否かを検討した。

対象および方法

1) 対象

当科にてIVF-ET (体外受精-胚移植) を試みた30例

34周期で、その適応は卵管因子が17例、男性因子9例、機能性不妊4例である。

2) SQA

写真1は今回用いたUnited Medical Systems社 (Santa Ana, Ca. USA) 製のSperm Quality Analyzerである。小型、軽量で毛細管現象により吸い上げられた精子を含むカートリッジを挿入すると40秒で即座にSMI (Sperm Motility Index) 値をデジタル表示する。SMI値は運動精子が起こす光学密度波動の容積で、これは運動精子数およびその運動の強度に依存するとされている。

3) 方法

体外受精に供する精液を室温で十分液化させ、まずMaklerのcounting chamberを用いて精子濃度、運動精子数、精子運動率を算定した。同時にSQA (Sperm

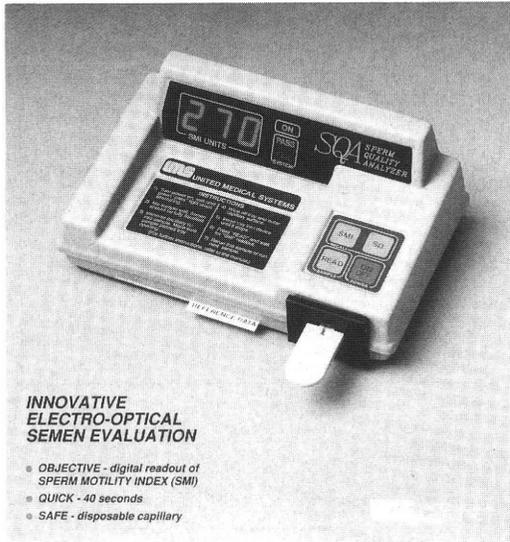


写真1 Sperm Quality Analyzer (SQA)

Quality Analyzer) によるSMI値の測定と精子運動能の評価法であるPenetrak testを行った。

SMI値はSQAにより40秒でデジタル表示され、5回の平均値をその患者のSMI値とした。したがって約4分でSMI平均値が得られることになる。SMI平均値が80以下をPoor群、80~160をFair群、160以上をGood群とした。

Penetrak testはウシの頸管粘液を用いヒト精子の貫通距離を測定するもので、その検査値は精子濃度、精子運動率、運動精子数および体外受精例での受精率と高い相関があり、精子の運動性、受精能力を評価するうえで簡便かつ優れた方法であるとされてお

表1 各群の受精率の比較

	SMI値	症例	受精	受精率
Good群	160以上	13	13	100%
Fair群	80~160	14	13	93%
Poor群	80以下	7	4	57%

り、判定時間に90分を要する。

液化精液はswim-up法により最終精子濃度が $1 \times 10^5/ml$ になるように調整、媒精し体外受精における受精率を検討した。ただし精子濃度が $1 \times 10^5/ml$ に満たないものは精子pelletに少量のmediumを加え、攪拌したものを用いた。

SMI値と精子濃度、運動精子数、運動率、Penetrak値およびIVF-ET時の受精率との関係を比較検討した。なお、有意差検定は χ^2 検定を用いて行った。

成績

1) SMI値と受精率(対症例あたり)(表1)

34周期中、SMI値が160以上のSMI-Good群では13例中全例が少なくとも一個は受精し、受精率は100%であった。SMI値80~160のFair群では14例中1例、4個の成熟卵がすべて未受精に終わり、受精率は93%であった。SMI値80以下のPoor群では7例中4例に受精を認め、受精率は57%と他の2群に比べ有意に低かった($P < 0.05$)。また、受精しなかった3例のSMI値はいずれも10以下であった。

2) SMI値と精子濃度、運動精子数、運動率および受精率(対卵あたり)との相関

図1はSMI値と精子濃度および運動精子数との相関をみたものであるが、いずれも正の相関を示した。

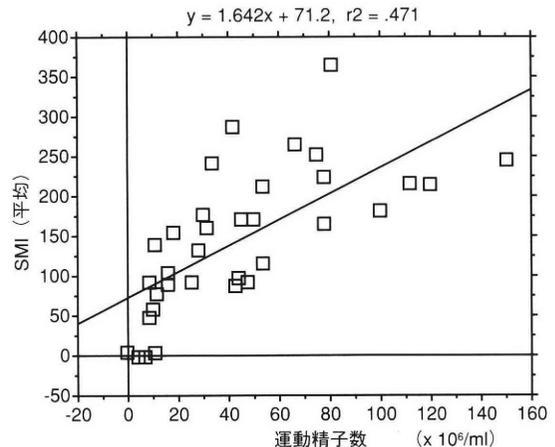
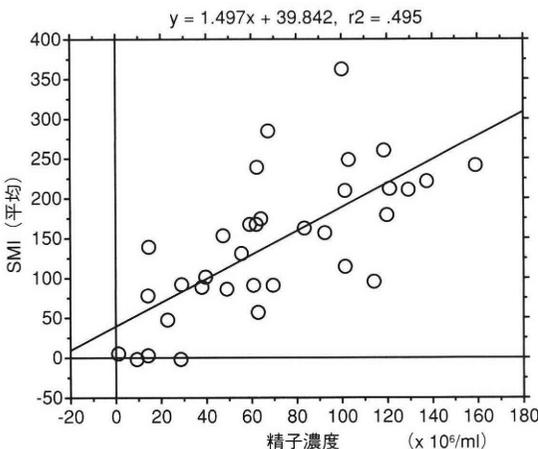


図1 SMI値と精子濃度および運動精子数との関係

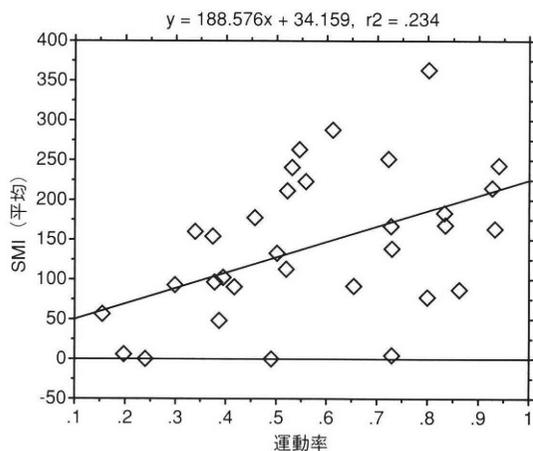


図2 SMI値と精子運動率および受精率との関係

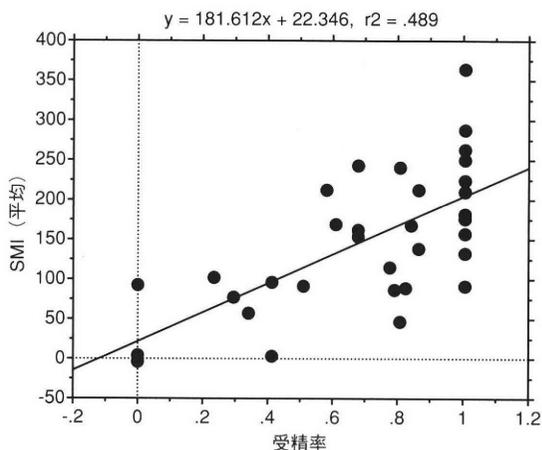


表2 相関率

	対Penetrak値	対SMI値
精子濃度	P=0.073 R=0.311	P=0.0001 R=0.703
運動精子数	P=0.049 R=0.339	P=0.0001 R=0.686
運動率	P=0.0717 R=0.313	P=0.0037 R=0.484
受精率	P=0.0008 R=0.547	P=0.0001 R=0.699

表3 精液分析から受精の有無が予測困難であった2例

	症例1	症例2
精子濃度(×10 ⁶ /ml)	62	15
運動精子数(×10 ⁶ /ml)	26	11
運動率(%)	42	73
受精卵数	0/4	2/5
SMI値	6	3.2

SMI値と精子運動率の相関、およびSMI値と採卵した成熟卵が何%受精したかをみた受精率との相関も高い正の相関を示した(図2)。

3) SMI値とPenetrak値の相関率の比較(表2)

一方、Penetrak値もSMI値と同様に精子の各パラメーターや受精率と正の相関を示すことはいくつか報告があるが^{3)~4)}、どちらが高い相関率を示すかを今回の症例において各々の相関係数(R)および危険率(P)で比較した。

精子濃度、運動精子数、精子運動率、受精率いずれにおいてもSMI値の相関率がPenetrak値よりも高いという結果であった。

4) SMI値と矛盾した結果を示した症例

表3に精液分析値およびSMI値から矛盾した結果が得られた症例を示した。症例1の精液所見は精子濃度6200万、運動率42%であったが4個の成熟卵すべて受精しなかった。この症例のSMI値は6であった。

一方、症例2は精液所見が悪く、SMI値も3.2と低値にもかかわらず5個中2個が受精し、この症例は妊娠に至った。

考 察

精子機能を客観的に評価する方法としては、Makler計算盤を用い、精子濃度、運動率、直進運動精子数などを算定する精液分析が現在では一般的になっている。なかでも直進運動精子数は妊娠率と相関する⁵⁾と考えられており、この計数的な精液分析法は男性不妊の基本的なスクリーニング検査としては有用である。しかし、これだけで精子の運動能や受精能を評価することは困難である。

これまで精子の運動能や受精能を評価する方法はいくつか考案されている。運動能に関しては、顕微鏡写真⁶⁾あるいは映画⁷⁾を撮影して運動精子の軌跡を解析する方法やレーザーを用いて精子運動量を解析する方法⁸⁾などが報告されている。また星ら⁹⁾はヒト精子の運動形態の変化を顕微鏡ハイスピードビデオで観察し、精子hyperactivationの出現頻度が高いほど妊娠性は高いとしている。しかしこれらの方法は高価な特殊装置が必要であったり、解析に時間を要したり、簡便性に欠けるなど臨床応用には問題が残されている。

精子受精能の評価法としては、Yanagimachiら¹⁰⁾はcapacitationとacrosome reactionを終えたヒト精子が透

明帯を除去したハムスター卵内へ侵入可能であることを報告し、これをハムスターテストと名付け、以後精子の受精能の検査法として臨床応用されるようになった。さらにOhashiら¹¹⁾はヒト精子と、先体反応を起こした精子に特異的なモノクローナル抗体を結合させたビーズとの抗原抗体反応による凝集を観察することによって精子の受精能を評価するアクロビーズテストがハムスターテストの成績とよく相関し、簡便性、再現性にすぐれているとしている。またJeyendranら¹²⁾は低浸透圧溶液中で認められる精子尾部の膨化の程度を形態学的に観察し、精子受精能を間接的に判定しようとするHypoosmotic swelling testを確立した。しかしながら、いずれの方法も臨床上、操作性、簡便性という点で優れているとは言いがたい。

これらに対して、今回SQAと比較する目的で使用したPenetrak testはウシ頸管粘液がヒトのそれと類似し、両頸管粘液中の精子の動態もほぼ同様であることを利用し、精子・頸管粘液適合試験をin vitroで行うもので、90分という短時間で簡便にできるヒト精子直進運動能検査である。既に我々も報告したが¹⁾、Penetrak値は精子濃度、精子運動率、運動精子数と有意に正の相関を示し、さらに体外受精症例でみたヒト精子と卵子との受精率とも正の相関があった。このことよりPenetrak testはヒト精子の運動能ひいては受精能もある程度予測できると考えられる。

今回我々が使用したSperm Quality Analyzer (SQA) はUnited Medical Systems社で開発された精子分析機で、測定結果が40秒で即座にSMI値としてデジタル表示されることから、今までの検査法に比較して簡便で短時間で結果が得られることに特徴がある。しかもSMI値は運動精子数およびその運動の強度に依存し、精子濃度、運動率、運動精子数と相関関係があると既に報告されている¹³⁾。しかし、SMI値と受精率の関係は不明のままであった。今回の我々の検討結果でもSMI値はPenetrak値と同様に精子濃度、精子運動率、運動精子数、さらに受精率と正の相関を示した。しかもその相関率はPenetrak値の相関率よりも高いものであった。このことは簡便で正確な精子機能評価法であったPenetrak test¹⁾に取って代わる可能性を示すものである。

また精液所見に問題がなくても、SMI値が低く受精しなかった症例があった。このことより、従来の精液分析では予測できない受精障害もSQAで容易に評価できる可能性が示唆される。しかしながら、我々の検討症例の中でSMI値が低くても受精したも

のが1例あった。この理由は今回の検討からは明らかにすることはできなかった。これは今後の検討課題である。

以上より、簡便性、迅速性にすぐれ、かつ客観的に測定できるこのSperm Quality Analyzer (SQA) は精子の運動能、受精能をみるスクリーニング検査として臨床的に非常に有用であると考えられる。

文 献

- 1) 森 明人, 永田行博, Penetrak test. 産と婦 33: 1441, 1993
- 2) 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
- 3) 宮崎豊彦, 田辺清男, 名取道也 他, ウシ頸管粘液を用いたヒト精子の運動性評価. 日不妊会誌 32: 100, 1987
- 4) 中島敬和, 水沼英樹, 宇都木利雄 他, ウシ頸管粘液 (Penetrak) を用いたヒト精子機能の評価. 日不妊会誌 34: 126, 1989
- 5) MacLeod J and Gold RZ, The male factor in fertility and infertility. Fertil Steril 4: 10, 1953
- 6) Janick J and Macloed J, The measurement of human spermatozoa motility. Fertil Steril 21: 140, 1970
- 7) Phillips DM, Comparative analysis of mammalian sperm motility. J Cell Biol 53: 561, 1972
- 8) Jouannet P, Measurement of human sperm motility of an optical doppler effect. P427, Urban and Schwarzenberg, 1979
- 9) 星 和彦, 藤森 淑, 吉松宣弘, 精子機能検査法. 産と婦 57: 1301, 1990
- 10) Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ, The use of zona free of animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Bio Reprod 15: 471, 1976
- 11) Ohashi K, Tanigawa O, Evaluation of acrosomal status using MH61-beads test and its clinical application. Fertil Steril 58: 803, 1992
- 12) Jeyendran RS, et al., Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil 70: 219, 1984
- 13) Bartoov B, Ben-Barak J and Mayevsky A, Sperm motility index: a new parameter for human sperm evaluation. Fertil Steril 56: 108, 1991

The assessment of sperm quality using a sperm quality analyzer

Akito Mori, Sachiko Nakamura, Toshimichi Oki,
Shinichi Yamamoto, Kazuhiro Takeuchi,
Tsutomu Douchi and Yukihiko Nagata

Department of Obstetrics and Gynecology
Faculty of Medicine, Kagoshima University
Kagoshima 890, Japan

The clinical usefulness of a newly developed sperm quality analyzer (SQA; United Medical Systems) was evaluated. The sperm motility index value (SMI value) was measured by the SQA, and the sperm concentration, the number of motile sperm, the sperm motility rate and the penetration index of the sperm were measured in semen samples obtained from the male partner of 34 women treated with IVF-ET. The correlations of each value with the fertilization rate were then compared.

The SMI values showed a positive correlation with the

sperm concentration, the number of motile sperm and the sperm motility rate. The correlation between the SMI and the fertilization rate was higher than that of the penetration index of the sperm and the fertilization rate. The fertilization rates were 57% (4/7) in the poor SMI groups (SMI<80), 93% (13/14) in the fair SMI groups (SMI: 80~160) and 100% (13/13) in the good SMI groups (SMI>160). The fertilization rate in the poor SMI groups was significantly ($P<0.05$) lower than those of fair SMI groups and good SMI groups.

Based on the above findings, the SQA is therefore considered to be a very convenient and useful instrument for the evaluation of sperm quality.

(受付：1994年3月10日)

(受理：1994年7月1日)

不妊カップルの性生活調査

Sexual Behavior of Infertile Couples

札幌医科大学医学部泌尿器科学教室

安達 秀樹

Hideki ADACHI

鈴木 伸和

Nobukazu SUZUKI

堀田 浩貴

Hiroki HORITA

和田 英樹

Hideki WADA

佐藤 嘉一

Yoshikazu SATO

渋谷 秋彦

Akihiko SHIBUYA

塚本 泰司

Taiji TSUKAMOTO

熊本 悦明

Yoshiaki KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical University

Sapporo 060, Japan

札幌東豊病院

南 邦弘

Kunihiro MINAMI

Department of Obstetrics and Gynecology

Sapporo Toho hospital

当科および関連施設である札幌東豊病院産婦人科を受診した不妊症の夫婦123組に対して、札幌医大式質問紙を用いて、性生活調査を行った。また、対照群として現在妻が妊娠中である夫婦119組にも同じ質問紙を用いて調査し、不妊症夫婦と比較検討した。

不妊症夫婦の性交頻度は、対照群と比較して有意な差は認められなかったが、不妊症でありながら性交頻度が月1回未満と少ない夫婦が約5%に認められた。不妊症夫婦の夫のうち、自覚的勃起能障害を訴えた例が4%に認められた。不妊という状況から受ける心理的ストレスの影響は、夫に比べて妻の側で強く、さらにその傾向は不妊期間が長くなるにつれて顕著に認められた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 19 - 25, 1995)

緒言

不妊原因の基礎的研究が進歩し、診断面において新しい開発が行われ、それにつれて治療面においても格段の進歩が認められている¹⁾。しかし妊娠を得るために不妊症カップルが実際にどのような性生活を送っているかに関する検討はほとんどなされていない。また不妊という状態は不妊夫婦それぞれに精神的影響を与えている可能性があるが、これは明らかとされていない。そこで今回不妊症夫婦を対象に

して、性生活調査および、抑うつ症状などの不定愁訴を中心とする心理的検討を行ったので報告する。

対象および方法

札幌医大泌尿器科、共同研究施設である札幌東豊病院産婦人科を受診した123組の不妊症夫婦を対象として、札幌医大式質問紙男性用、女性用(表1、表2)を1組ずつ別々の封筒で渡し、夫婦別々に解答を依頼し、回収した。なお対照群として現在妻が妊娠中であるカップル119組について、今回の妊娠が得られ

表1 性生活, 性機能に関する設問内容

男女共通

最近, ご主人(奥様)の健康状態はいかがですか?
 ご主人(奥様)はセックスに関して協力的ですか?
 全体として現在の性生活に満足していますか?
 あなたの性生活は, 生活に潤いを与えていると思いますか?
 現在のあなたのセックスの回数は?
 性的な絵や映画を見て興奮しますか?
 性的な雰囲気では触られるとセックス(性交渉)したくなりますか?

男性用

朝目覚めた時, 勃起しているのに気づくことがありますか?
 その時の陰茎の硬さはいかがですか?
 セックスしようとする時またはマスターベーションする時, 陰茎が硬くなりますか?
 勃起の持続時間は十分ですか?
 セックスまたは自慰を行った時, どの程度の頻度で射精できますか?

女性用

ご主人の前戯は十分であると思いますか?
 セックスしようとする時またはマスターベーションする時, 膣が濡れますか?
 セックスの時, ご主人の陰茎の硬さは十分ですか?
 セックスの時, ご主人の勃起の持続時間は十分ですか?
 セックスの際に満足感(絶頂感)はありますか?
 ご主人の後戯は十分であると思いますか?
 セックスの際, 膣に疼痛を感じることはありますか?
 セックスの際, 膣からの出血がありますか?
 セックスの際, 膣以外の部分に疼痛を感じることはありますか?

る直前の状態について同じ質問紙を用いて回答させた。

対象の年齢は, 不妊症カップルの夫23~44歳(平均32.9±4.3歳), 妻23~42歳(平均29.9±4.1歳), 妊娠が得られたカップルの夫21~46歳(平均30.9±4.8歳), 妻20~37歳(平均26.9±4.0歳)であった(表3)。年齢分布は, 妊娠例でやや若い傾向が認められた。

結 果

1) 性機能

性交頻度は, 夫, 妻の回答ともに不妊カップルと妊娠が得られたカップル両群間に χ^2 検定で有意な差は認められなかった(図1)。性交頻度が週1~2回

表2 各症状群の設問内容

抑うつ症状

[易疲労感] 疲れ易いですか? (Kupperman)
 [憂うつ感] 最近気が沈んだり気が重くなりますか? (SRQ-D)
 [朝の無気力] 朝のうち特に無気力ですか? (SRQ-D)
 [食欲不振] 食事がすすまず味がないことがありますか? (SRQ-D)
 [厭世感] 自分の人生がつまらなく感じますか? (SRQ-D)
 [おっくう] 仕事の能率があがらず何をやるにもおっくうになることがありますか? (SRQ-D)

神経症的症状

[入眠障害] 夜はなかなか寝つかれないですか? (Kupperman)
 [易興奮性] 興奮し易いですか? (Kupperman)
 [浅眠] 夜眠っていてもすぐ目をさまし易いですか? (Kupperman)
 [神経質] 神経質な方ですか? (Kupperman)
 [くよくよ] つまらないことにくよくよしますか? (Kupperman)
 [几帳面] 仕事熱心で几帳面ですか? (SRQ-D)

知覚障害

[腰や手足のひえ] 腰や手足がひえますか? (Kupperman)
 [手足のしびれ] 手足がしびれますか? (Kupperman)
 [知覚鈍麻] 手足の感覚がにぶいですか? (Kupperman)
 [肩こり, 腰痛] 肩こり, 腰痛, 手足に節々の痛みなどがありますか? (Kupperman)
 [蟻走感] 皮膚をアリがはうような感じがしますか? (Kupperman)

心血管系障害

[顔のほてり] 顔がほてりますか? (Kupperman)
 [発汗] 汗をかきやすいですか? (Kupperman)
 [息切れ] 息切れがしますか? (Kupperman)
 [動悸] 心臓のどろきがありますか? (Kupperman)
 [胸部圧迫感] 息がつまって胸が苦しくなることがありますか? (SRQ-D)
 [喉のつかえ] のどの奥に物がつかえている感じがすることがありますか? (SRQ-D)

以上の例の占める割合は, どの群においても35%前後と一定の傾向が認められた。不妊例で, 性交頻度が月1回未満と回答した例が夫の回答で6例4.9%, 妻の回答で7例5.7%に認められた。

不妊男子における自覚的勃起能(図2)は, 陰茎硬度の項目で123例中120例が正常であり, 3例2.5%であり硬くならないとの回答がみられた。しかし対照

表3 対象の年齢分布

	妊娠例 (%)		不妊例 (%)	
	夫	妻	夫	妻
20歳代	47例 (39.5)	75例 (63.1)	24例 (19.4)	55例 (44.7)
30歳代	68例 (57.1)	44例 (36.9)	86例 (69.4)	63例 (51.2)
40歳代	4例 (3.4)	0例 (0)	13例 (11.3)	5例 (4.1)

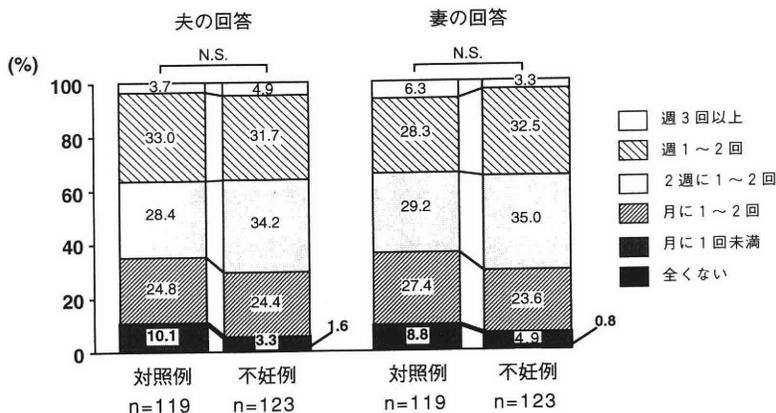


図1 性交頻度

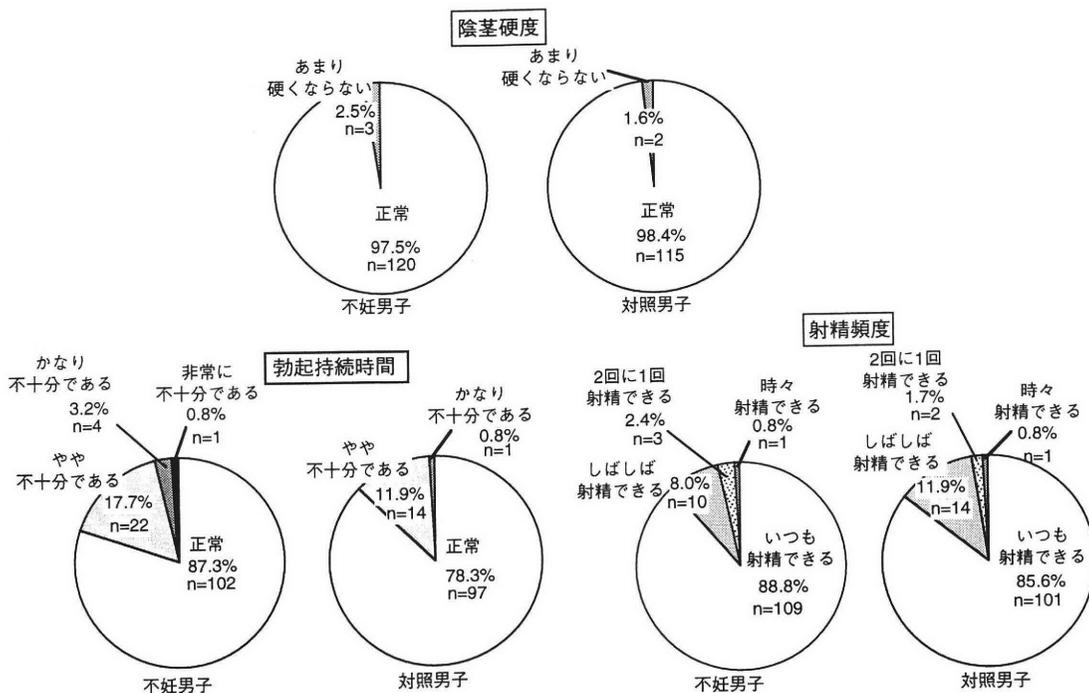


図2 不妊例，妊娠例の性機能

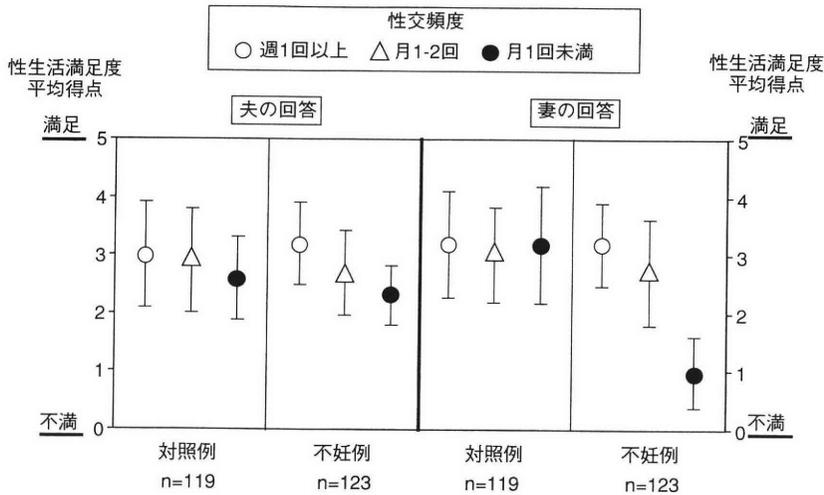


図3 性交頻度別の性生活満足度

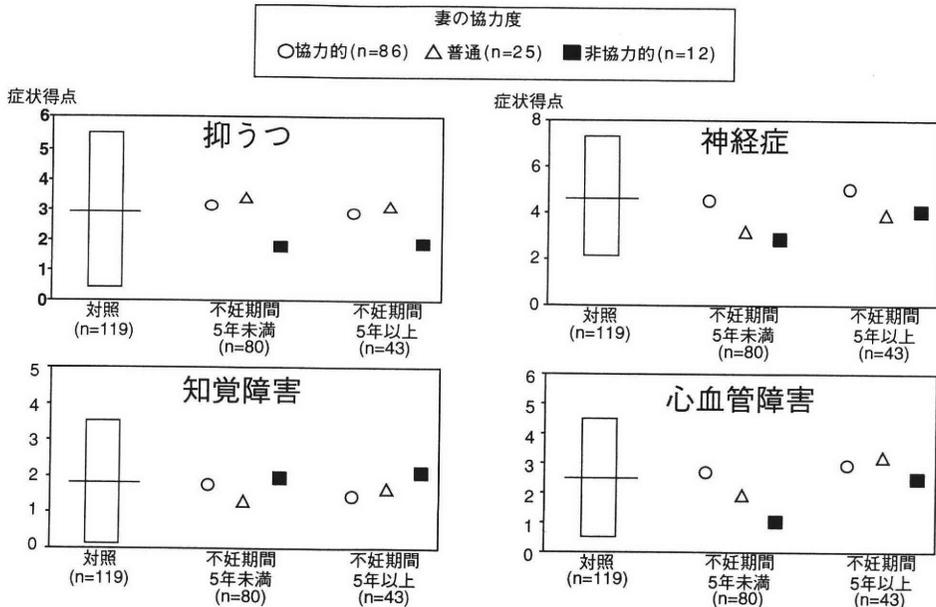


図4 不妊夫婦における妻の性交協力度別で見た夫の不定愁訴

男子でもほぼ同様の傾向が認められた。

勃起持続時間の項目では、非常に不十分である、かなり不十分であると回答した自覚的勃起障害を有すると思われる症例が不妊例で4%に認められた。妊娠例では、かなり不十分であるとの回答が、1例0.8%であった。

射精に関しては、射精頻度が多い(いつも射精できる、しばしば射精できる)回答例と、頻度が少ない(2回に1回、時々)回答例の割合は、不妊例、妊

娠例ではほぼ同様であり、両群を通して全く射精できないの回答は認められなかった。

不妊症例における精液検査上、無精子症が1例、乏精子症が5例認められた。これら6例と、精子数正常群との間で、性交頻度、自覚的勃起能得点、射精頻度得点に有意な差は認められなかった。

2) 性生活満足度・性生活協力度

図3に性生活の満足度を性交頻度別に3群に分けて示した。夫の回答によると、対照例、不妊例とも

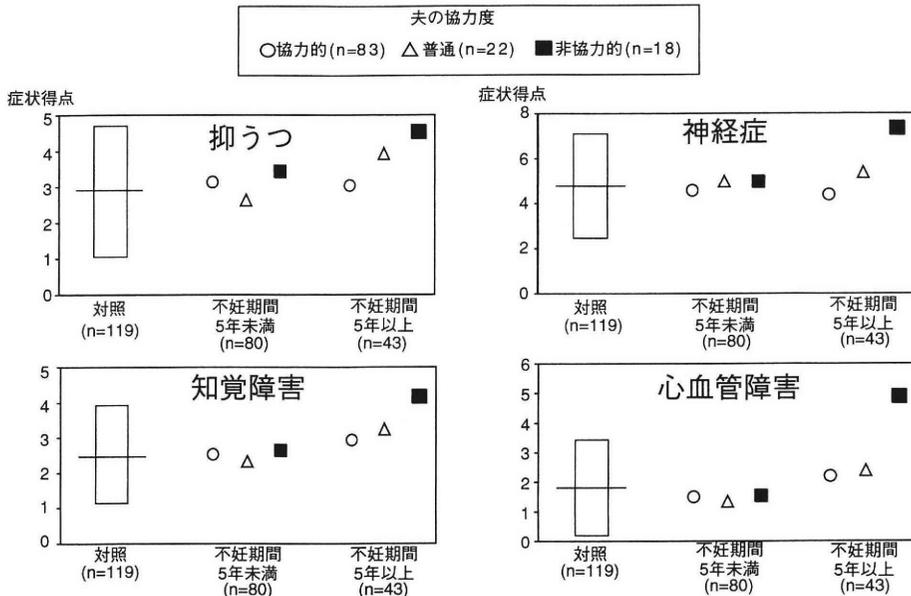


図5 不妊夫婦における夫の性交協力度別で見た妻の不定愁訴

に性交頻度が高い方が性生活満足度の得点もやや高くなる傾向が認められたが顕著ではなかった。

妻の回答では、不妊例のうち性交頻度が月1回未満と低い群で、満足度は他の群に比べて有意に低かった。(t検定, $p < 0.01$).

不妊や性生活に対する不満という心理的ストレスが存在する場合、身体、心理的不定愁訴の出現率は高くなることが知られている。次にこの不定愁訴の得点と性生活満足度の一因子を担う協力度とを比較した。

不定愁訴の項目は、表2のようにうつ病のスクリーニングであるSRQ-D (Self-Rating Questionnaire for Depression)²⁾とKuppermanの更年期指数設問³⁾より引用し、重複設問を除いたものである。これらの不定愁訴の設問は、抑うつ症状、神経症症状、知覚症状、心血管系症状の4つに分類可能であり、各症状群による検討を行った。

まず不妊カップルの夫について、妻の性交への協力度を協力的、普通、そして非協力的の3群に分けた。夫では対照群と比較して、妻の協力度と不定愁訴得点の間には、一定の関係は認められなかった(図4)。不妊期間を5年未満と5年以上の長期不妊例に分けたが、一定の傾向は見られなかった。

妻については、不妊期間5年未満の不妊例では不定愁訴の得点は対照例とほぼ同じであった(図5)。しかし不妊期間が5年以上の長期不妊例、特に夫の

性交への協力性が低い例で、不定愁訴の得点は他の群に比べて高い傾向があり、心血管系障害の項目では有意差が認められた(t検定, $p < 0.05$).

考 察

不妊症における診断技術、治療法が進歩している現在、諸施設での患者の増加はもちろんのこと、妊娠率も向上している。妊娠を得るためには、当然のことながら夫婦間で性生活が営まれなくては行けないが、これまで不妊症カップルの性生活について検討した報告は少ない。

三浦ら⁴⁾は、男性不妊症例と対照とで性生活の検討を行っており、不妊症例の方が性交頻度が多いと報告している。我々の検討では両群間で有意な差は認めなかったが、中には不妊症で治療しながらも、性交頻度が月1回未満と妊娠を得るには少ないと思われる夫婦が123組中7組に認められた。不妊症治療の際は、性交頻度の把握が必要であり、妻の排卵日を考慮して、患者にアドバイスすることが大切であると考えられた。

今西ら⁵⁾の男性不妊の統計では、0.6%にインポテンスを認めている。今回の検討でも勃起障害の存在が示唆される例は陰茎硬度の項目で2例、勃起持続時間の項目で5例と少ないながらも認められている。不妊の原因が勃起障害である患者は、性機能専門外来を受診することが予想され、実際にはもっと多数

存在することが考えられる。また、妻の排卵日を気にしすぎて過度に緊張して性交不能になる場合も考えられる。このこともふまえて不妊症治療の際には、常に性機能障害の存在を念頭におくことが必要であろう。

無精子症などの診断を受けたあとに一過性に勃起障害が生じることもある⁶⁾。今回の検討では、質問紙、精液検査とも初診時の結果であるが、乏精子症、無精子症の6例のうち勃起障害を示した例は認めなかったが、性交頻度が0の者が1例あった。

性交頻度と満足度の検討では、不妊例の妻で満足度が低い傾向がみられた。これは妊娠を得たいと願う一方で性交頻度が少ないという事実との間に葛藤が生じているものと考えられた。

不妊症患者では、治療に対する不安や焦り、検査に対する恐怖心、子供ができないことでの責任や罪の意識など様々な精神的ストレスを背負っている^{7,8,9)}。この心理的葛藤は、夫より妻に大きく、また、不妊期間が長いほど心身医学的な異常が多いとされている¹⁰⁾。

我々の結果でも妊娠例より不妊例の妻で不定愁訴の得点が高く、しかも不妊期間が5年以上ではその傾向が顕著であった。不妊期間5年以上の群は、5年未満の群と比較して年齢層が高く、加齢による影響が加わることが考えられる。

しかし、これまで我々は健康成人女性約3000例に同じ質問紙を用いて、性機能や不定愁訴の調査を行っており^{10,11)}、そのデータでは、40歳代までにおいては不定愁訴の得点に有意な差は認められず、今回の検討において加齢の影響は除外してもよいと思われる。

また不妊という状況から強い精神的負担を受け、そのストレスが卵管の痙攣や腔瘻や不感症などを引き起こし、妊娠の障害となることもある¹²⁾。また高橋ら¹³⁾は、不妊期間5年以上の長期不妊例は、5年未満の対照と比べて妊娠率が低かったと報告している。不妊期間が長期になると精神的なストレスが加わり、そのストレスが妊娠の障害を引き起こす可能性もあるものと思われる。

岡村は、心因性の不妊症に対し、心理療法を行い、実際に妊娠し挙児を得たと報告しており¹⁴⁾、明らかな器質的な異常を認めない不妊症例には、このような治療法も試みられるべきと考えられた。

以上より不妊症患者を治療するにあたり、検査所見も重要であるが、そのみにとらわれることなく、実際の夫婦関係がどのような状態にあるのかを把握す

ることが必要である。また不妊という状況から我々の予想以上に、妻は精神的ストレスを受けており、患者本人そして患者を取り巻く環境に十分な配慮がなされなくてはならないと考えられた。

結 語

不妊を主訴とした夫婦123組と現在妻が妊娠中である夫婦119組に対して、札幌医大式質問紙を用いて、性生活調査を行った。

1) 不妊症夫婦の性交頻度は、対照群と比較して有意な差は認められなかったが、不妊症でありながら性交頻度が月1回未満と少ない夫婦が約5%に認められた。

2) 不妊症夫婦の夫のうち、自覚的勃起能障害を訴えた例が4%に認められた。

3) 不妊という状況から受ける心理的ストレスの影響は、夫に比べて妻の側で強く、さらにその傾向は不妊期間が長くなるにつれて顕著に認められた。

文 献

- 1) 山本雅憲, 男子不妊症治療の最前線. 日泌尿会誌 84 (2): 229, 1993
- 2) 阿部達夫, 筒井末春, 難波経彦 他, Masked depression (仮面うつ病) のScreening testとしての質問紙表 (SRQ-D) について. 精神医 12: 243, 1972
- 3) Kupperman HS, Blatt MH, et al., Comparative clinical evaluation of estrogenic preparations by menopausal and amenorrheal indices. J Clin Endocrinol Metab 13: 688, 1953
- 4) 三浦一陽, 白井将文, 男性不妊症と性生活. 産婦治療 62: 905, 1991
- 5) 今西 治, 奥田喜啓, 篠崎雅史 他, 男性不妊の臨床統計的観察. 日不妊会誌 36 (2): 281, 1991
- 6) Wabrek AI, The relationship between sexual dysfunction and infertility. Jap J Fert Ster 36: 241, 1991
- 7) 加藤芳枝, 中西 勉, 不妊症患者の面接調査. 母性衛生 30 (3): 390, 1989
- 8) 郷久鉞二, 浅井冬世, 佐野敬夫 他, 不妊症に対する心身医学的研究. 日不妊会誌 31: 270, 1986
- 9) 杉内明子, 佐藤文彦, 川越慎之助 他, 不妊症夫婦の精神心理. 母性衛生 33 (2): 232, 1992
- 10) 熊本悦明, 佐藤嘉一, 高齢者にみる性行動の実態. 老年精神医学雑誌 4 (12): 1365, 1993
- 11) 佐藤嘉一, 更年期. カレントセラピー 12: 1066, 1994
- 12) 川越慎之助, 不妊症夫婦における精神・心理的考察. 助産婦 46 (2): 12, 1992
- 13) 高橋健太郎, 吉野和男, 荒木芳美 他, 島根医大

付属病院産科婦人科不妊外来における長期不妊の
臨床的統計. 日不妊会誌 32: 311, 1987

- 14) 岡村 靖, 不妊症治療としての心因分析. 産と婦
56: 781, 1989

Sexual behavior of infertile couples

Hideki Adachi, Hiroki Horita, Yoshikazu Sato,
Nobukazu Suzuki, Hideki Wada, Akihiko Shibuya,
Taiji Tukamoto and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology, Sapporo Medical University
Sapporo 060, Japan

Kunihiro Minami

Department of Obstetrics and Gynecology
Sapporo Toho hospital

We conducted a questionnaire on the sexual behavior of
123 infertile couples and 119 couples achieving pregnancy.

The frequency of sexual intercourse of the infertile
couples was nearly equal to that of pregnant couples. In
about 5% of the infertile cases, the frequency of sexual
intercourse was less than once a month, which is much
too infrequent to achieve pregnancy. About 4% of the
infertile husbands complained of erectile dysfunction.
Psychological stress is caused by infertility, and it was
more severe in the wives than the husbands. The stress
increased in direct proportion to the infertile period.

(受付: 1994年4月27日)

(受理: 1994年7月6日)

RELATIONSHIPS AMONG ARGININE AMIDASES AND ESTROGENS IN HUMAN FOLLICULAR FLUID

Tetsunori MUKAIDA and Matan YEMINI

Diamond Institute for Infertility, NJ 07111, USA

Yoshifumi MATSUDA and Sumiyuki AKIHAMA

Departments of Biochemistry, Meiji College of pharmacy

Tokyo 154, Japan

Masatoki KATAYAMA and Hirokazu TANIGUCHI

Department of Analytical Chemistry, Meiji College of pharmacy

Tokyo 154, Japan

Yukako KURODA, Satoru KANEKO and Shiro NOZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine

Keio University, Tokyo 160, Japan

Abstract: We measured the total amount and concentration of protein, arginine amidases, plasminogen, tissue plasminogen activator (t-PA) and estrogens in human follicular fluid (HFF) samples from 21 individuals in an attempt to examine the relationships among them. Strong correlations were observed among all combination of amounts of protein, N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (Bz-Arg-pNA), D-valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (Val-Leu-Arg-pNA) amidolytic activities, and plasminogen which was measured relative Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity of plasmin in HFF ($p < 0.01$). However, the concentration of these combinations showed relatively low correlations with two exception. The amount of t-PA showed strong correlation with amounts of Bz-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities ($p < 0.01$) and also had good correlation with that of plasminogen ($p < 0.05$). Among the amounts of estrogens, estradiol showed strong correlation with that of protein and plasminogen ($p < 0.01$), while estradiol had relatively good correlation with that of two forms of arginine amidases ($p < 0.05$). However, the concentration of t-PA showed strong correlation with that of two forms of arginine amidases ($p < 0.01$), but not with that of protein and plasminogen.

This study revealed strong correlations among the arginine amidases, plasminogen and tissue plasminogen activator in HFF, and between the amounts of plasminogen and estradiol in HFF.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 26 - 33, 1995)

Introduction

Ovulation is considered to be the most important and interesting phenomenon in female gynecological physiology. At present the proteinase cascade theory is widely accepted for the explanation of this phenomenon^{1,2}. According to this theory, the rise of the

pressure in the follicle and the LH surge, following the rise of FSH level which activate the tissue plasminogen activator (t-PA, EC 3. 4. 21. 67), that can cause the conversion of plasminogen to plasmin (EC 3. 4. 21. 7). This plasmin, then activates collagenase (EC 3. 4. 24. 7). Collagenase digests the collagen fabric in the connective tissue at the top of the

graafian follicle. The rise of the pressure in the follicle, and the interactions of proteinase cascade system, cause the rupture of the follicle, which leads to ovulation^{1,2)}. This theory has raised interesting questions regarding to the functions of the proteinases in the follicular fluid, in particular, the trypsin-like arginine amidases forming the cascade. Some researchers have detected tissue plasminogen activator in mature graafian follicles^{3~5)}. We previously demonstrated that human follicular fluid (HFF) contains a plasminogen/plasmin like substance, one of trypsin-like arginine amidase which has an affinity for lysine Cellulofine column, as well as various acidic and basic arginine amidases⁶⁾.

In this study we analyzed the relationships among arginine amidases, including plasminogen and tissue plasminogen activator, and estrogens in HFF.

Materials and Methods

Human follicular fluid

Individual mature HFF sample was collected from 21 participants in our in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program. Ovarian stimulation using human menopausal gonadotropin was followed by ovulation induction with human chlrionic gonadotropin. First directly aspirated HFF without blood contamination from a individual participant was only used in this investigation. Uncontaminated HFF was centrifuged at $1500\times g$ for 30 minutes, and the supernatant was then filtered to $0.45\ \mu\text{m}$ Millipore filter and stored at -40°C until use.

The volume of each HFF, the amounts and concentrations of protein, Bz-Arg-pNA amidolytic activity, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen, t-PA, estradiol, estriol and estrone in each samples were measured in this investigation.

Arginine amidase assay

Amidolytic activity was measured using N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Bz-Arg-pNA) and D-valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (Val-Leu-Arg-pNA) as the substrates by the method described by Amundsen et al.⁷⁾ with modification of the reaction volume (0.1 ml) and the substrate concentration (0.5mM) at 0.05 M Tris-HCl (pH 8.5)

at 37°C in a microplate. Amidolytic activity was expressed in terms of n mol of substrate hydrolyzed per minute (n mol/min) under the above described conditions after measurement of the absorbance at 405 nm of p-nitroaniline (pNA) as the product released by the amidolytic enzyme action from the substrate using a Multiskan Bichromatic microplate reader (Labsystems Co.,).

The detection of plasminogen was performed as follows: 20 μl of each sample and 50 IU of human urinary urokinase were mixed and incubated in a microplate at 37°C for 30 min. To obtain the relative plasmin activity, the spontaneously activated plasmin activity in the sample and urokinase was subtracted from the measured Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities. Plasminogen activity is expressed in terms of n mol/min of Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity of relative plasmin.

Tissue plasminogen activator assay

T-PA was measured using human enzyme immunoassay system which was kindly supplied by Fuji Rebio Co., Tokyo, Japan. The t-PA amount is expressed as μg .

Estrogen assay

A separate determination of the estrogens, i.e. estradiol, estriol and estrone was carried out using new method of high performance liquid chromatography combined with fluorometry which has been described by Katayama et al.⁸⁾. The amount of estradiol is expressed in mg, and estriol and estrone in μg .

Protein concentration

Protein concentration was estimated using BCA protein assay method developed by Redingaug and Turley⁹⁾, and bovine serum albumin was used as standard protein for calibration line.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by using t-Test with StatView J 4.02 for Macintosh.

Materials

N- α -Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Bz-Arg-pNA) was obtained from Peptide Institute Co., Osaka, Japan. D-valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (S-2266, Val-Leu-Arg-pNA) was supplied by Kabi Diagnostica Co., Sweden. Standard estrogens, estradiol, estriol and estrone, were

Table 1 Mean values of protein, arginine amidases and estrogens in human follicular fluid

	Protein	Arginine amidases				Estrogens		
	(mg)	Bz-Arg-pNA	Val-Leu-Arg-pNA	Plasminogen	t-PA	Estradiol	Estriol	Estrone
Total amount (per HFF)	153±74	1.85±1.106	138±101	293±191	11.3±14.2	444±443	33.6±34.2	29.3±27.3
Concentration (per ml of HFF)	43.2±4.3	0.517±0.169	37.5±18.4	79.4±25.5	2.90±3.57	112±94	10.6±11.8	10.1±11.4
Specific activity (per protein)		0.0121±0.0042	0.872±0.408	1.84±0.57	0.075±0.82			

Bz-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities are shown in terms of n mol/min.

Plasminogen is shown as n mol/min of Val-Leu-Arg-pNA amidolysis of relative plasmin activity.

T-PA is expressed as n g.

Estriol and estrone are expressed as μ g.

Estradiol is expressed as mg.

Values are shown mean \pm SD.

The mean volume of the 21 human follicular fluid samples was 3.54 \pm 1.74 ml (mean \pm SD).

Table 2 Correlation coefficients for pairs of measured values for protein, arginine amidases and estrogens in human follicular fluid: Quantitative analysis of individual total HFF samples

	Protein	Arginine amidases				Estrogens		
	(mg)	Bz-Arg-pNA	Val-Leu-Arg-pNA	Plasminogen	t-PA	Estradiol	Estriol	Estrone
Protein	---							
Bz-Arg-pNA	0.865*	---						
Val-Leu-Arg-pNA	0.826*	0.933*	---					
Plasminogen	0.900*	0.782*	0.856*	---				
t-PA	0.462**	0.713*	0.717*	0.526**	---			
Estradiol	0.682*	0.439**	0.498**	0.670*	0.353	---		
Estriol	0.384	0.327	0.316	0.389	0.049	0.365	---	
Estrone	0.192	0.115	0.151	0.220	-0.198	0.087	0.583*	---

All values are shown as correlation coefficients calculated for the total amounts in HFF samples (n=21).

*and** indicate P<0.01 and P<0.05, respectively.

Table 3 Correlation coefficients for pairs of measured values for protein, arginine amidases and estrogens in human follicular fluid: Consistency analysis

	Protein	Arginine amidases				Estrogens		
	(mg)	Bz-Arg-pNA	Val-Leu-Arg-pNA	Plasminogen	t-PA	Estradiol	Estriol	Estrone
Protein	---							
Bz-Arg-pNA	0.092	---						
Val-Leu-Arg-pNA	0.122	0.788*	---					
Plasminogen	0.108	0.021	0.476**	---				
t-PA	0.127	0.774*	0.746*	0.327	---			
Estradiol	0.160	-0.274	-0.039	0.214	0.117	---		
Estriol	0.044	-0.165	-0.156	-0.017	-0.187	-0.248	---	
Estrone	0.047	-0.234	-0.050	0.173	-0.064	-0.323	0.577**	---

All values are shown as correlation coefficients calculated for the mean concentrations per ml of HFF.

*and** indicate P<0.01 and P<0.05, respectively.

obtained from Sigma Chemical Co., USA. Human urinary urokinase (50000 IU/mg) from Serva Faine Chemicals GmbH, Germany was used.

All other materials used were of analytical reagents.

Results

The mean amount per HFF sample and concentration per ml of HFF for protein, each arginine amidases and each estrogens, as well as specific activity (activity per mg protein) for each enzyme were summarized in Table 1. The mean volume of the HFF samples was 3.54 ± 1.74 ml (mean \pm SD), but the volume showed wide distribution ranging from 1.6 ml to 9.0 ml. On the other hand, the mean protein concentration was 43.2 ± 4.3 mg/ml of HFF (mean \pm SD), with the range of variation that was relatively small from 27.4 to 48.7 mg/ml of HFF. These results indicated that the variation of protein concentration in HFF was smaller than the volume of the fluid itself. However,

the concentrations of the other substances examined in HFF varied greatly. In particular, CV values of both concentrations (per ml of HFF) and total amounts of the three estrogens were distributed over 80%.

Fig. 1 shows the relationship of pair of individual measured values for each substance for the entire HFF samples. Table 2 summarizes the corresponding correlation coefficients on the basis of the follicular fluid volume shown in Fig 1. Significant correlations were observed for all pair combinations of protein, Bz-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities, and plasminogen ($p < 0.01$). Highly significant correlations were also noted between t-PA value and the two arginine amidolytic activities ($p < 0.01$), and estradiol value also showed correlations with plasminogen and protein values ($p < 0.01$). Estradiol value was correlated with the two arginine amidase activities with BZ-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA hydrolysis ($P < 0.05$). In contrast, the value

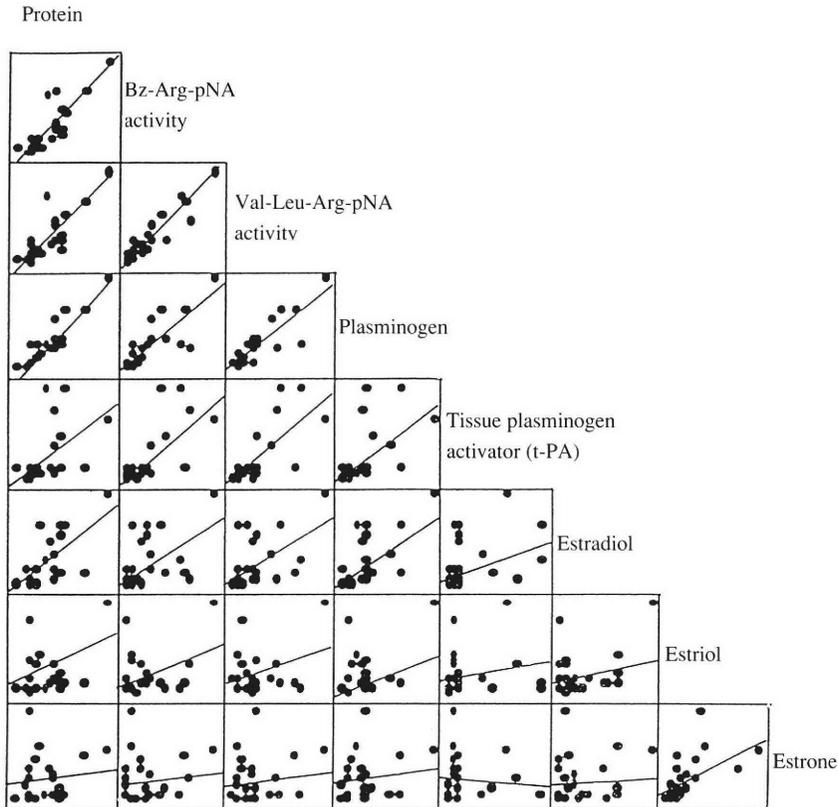


Fig. 1 Relationship of pairs of individual values for protein, amidolytic activities including t-PA and plasminogen, and estrogens
The corresponding correlation coefficients are shown in Table 2.

of estriol was not correlated with that of any other substance except estrone, which was also not correlated with that of any other substance. The value for t-PA was correlated with that for protein and plasminogen ($P < 0.05$, respectively).

The profiles of four strong correlations shown on the Table 1, i.e., that of Val-Leu-Arg-pNA with that of Bz-Arg-pNA amidolytic activities, plasminogen value and t-PA value, and that of plasminogen and estradiol values, are demonstrated in Fig.2.

Table 3 shows the correlation coefficients for the same pair of substances based on the concentration (per ml of HFF). The coefficients obtained are markedly lower than those which were calculated based on the total amount of HFF. A significant correlation was observed for only five pairs, i.e., the two arginine amidases with each other, each arginine

amidase with t-PA, and plasminogen with Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, and for estradiol with estrone ($p < 0.05$ or $P < 0.01$).

HFF volume was not correlated with the value for any substance. The coefficient of correlation value of HFF with estradiol, which had best correlation with HFF volume, was only $r = 0.286$ (value not shown in Table 3).

The relationships among specific activities of two arginine amidases, plasminogen measured by relative amidolytic activity of plasmin, and t-PA are presented in Fig.3. While a high correlation ($p < 0.01$) was observed between Bz-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities ($r = 0.748$), between Bz-Arg-pNA amidolytic activity and t-PA ($r = 0.664$), and between Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity and t-PA ($r = 0.594$), no correlation was

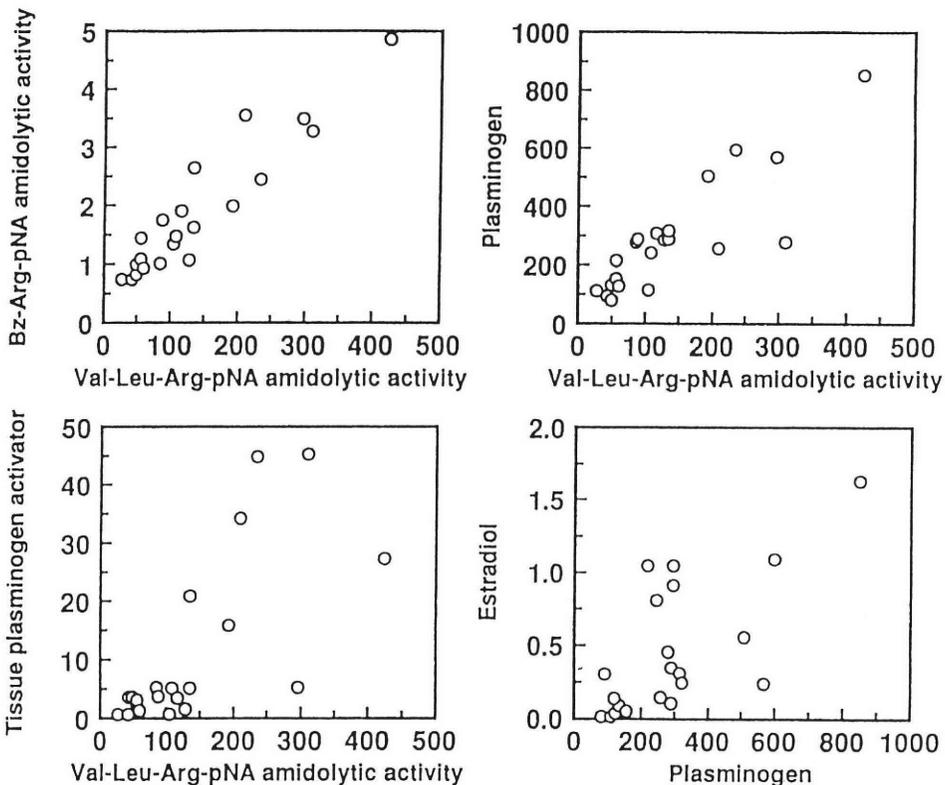


Fig. 2 Quantitative relationship of Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity to Bz-Arg-pNA amidolytic activity, t-PA, and plasminogen, and of estradiol to plasminogen

Bz-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities are shown in terms of n mol/min/HFF sample. Plasminogen is shown in terms of n mol/min of Val-Leu-Arg-pNA amidolysis of relative plasmin activity/HFF sample. T-PA is shown as μg /HFF sample, and estradiol as mg/HFF sample.

The average volume of the HFF sample was 3.54 ± 1.74 ml (mean \pm SD, $n=21$).

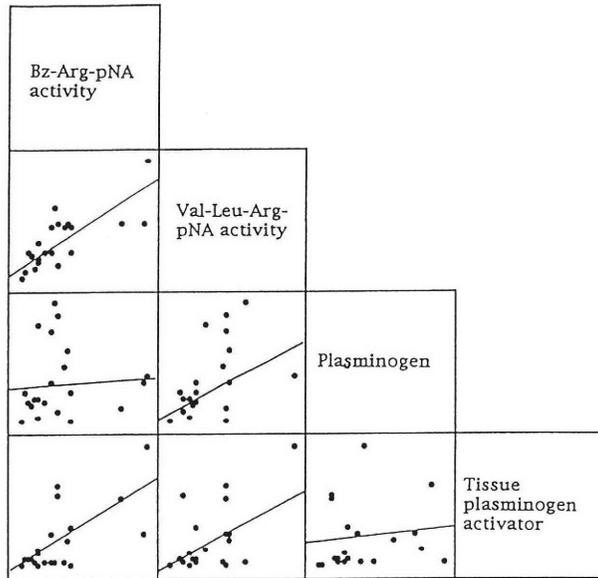


Fig. 3 Relationships among specific activities of the two arginine amidases, t-PA, and plasminogen

Bz-Arg-pNA and Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activities are expressed in terms of n mol/min/mg. Plasminogen is shown in terms of n mol/min of Val-Leu-Arg-pNA amidolysis of relative plasmin activity/mg. Tissue plasminogen activator is shown as μ g/mg.

detected for Bz-Arg-pNA with plasminogen ($r=0.046$) or t-PA ($r=0.178$). The coefficient of correlation for Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity with plasminogen was 0.486 in 5 % of significant difference level.

Discussion

The proteinase cascade theory is considered to be the most convincing theory to explain the follicular rupture process, in the last stage of ovulation^{1,2}. Proteinases, which are definitely involved in the cascade process of the rupture of follicle during ovulation include tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen/plasmin, and collagenase^{1,2}. T-PA and plasmin are one of trypsin like arginine amidases. On the other hand, level of estrogens in the blood under the control of FSH and LH significantly increases during ovulation¹⁰, which are playing an important role in the ovulation process. However, few research has been conducted to study the interaction of these substances in the follicle during ovulation. In this study, relationships among trypsin-like arginine amidases (Bz-Arg-pNA and Val-Leu-

Arg-pNA amidolytic activities), plasminogen detected as relative plasmin, t-PA and estrogens were examined in each individual sample of human follicular fluid (HFF) aspirated from matured graffian follicles during in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program in this investigation.

No significant differences between each individual sample were found in the protein concentration of HFF. But there were remarkable differences between individuals in its relationship with the other substances. It was also revealed that HFF obtained from the matured follicle just prior to ovulation contained large amounts of Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen, and a small amount of active t-PA (Table 1). These results clearly indicate the presence of t-PA and plasminogen in HFF during ovulation, which contribute to the formation of the proteinase cascade for ovulation^{1,2}.

The arginine amidase activities together with plasminogen detected as relative plasmin, t-PA and three estrogens (estradiol, estriol and estrone) were

measured in this study. The correlation coefficients of the total amounts in HFF samples were then calculated (Fig. 1 and 2, Table 2), and the degree of correlation of total amount for many pairs of substances was higher than that for concentration (Table 3) or for specific activity (Fig. 3). This result indicates a close relationship between the maturity of the follicles and amount of these substances in HFF.

Gonadotropin and progesterone are known to activate various proteinases in the follicle during the last stage of ovulation^{1,3,11}). But it is reported that the depression of t-PA occurred at the time of the increase of progesterone in the follicles⁴). The relationship and the interaction between estrogens and plasminogen/plasmin in the follicles have not been clarified. The present study revealed some positive correlation between the total amounts of plasminogen and estradiol in human follicular fluid (Fig. 1 and 2, Table 2). At the same time, these results indicate that the other estrogens measured (estriol and estrone) dose not seen to be involved in ovulation (Fig. 1). Furthermore, it was revealed that t-PA and plasminogen in HFF samples had a good correlation with the arginine amidase with Bz-Arg-pNA and/or Val-Leu-Arg-pNA hydrolysis (Fig. 1 and 2, Table 2). Plasminogen and t-PA in HFF samples, also showed a good correlation (Fig. 1 and Table 2). These results suggest that the acceleration of production of t-PA during the ovulation process differs from that of plasminogen (Fig. 3). Although the enzymes showing trypsin-like arginine amidase activity still remain, the results of this study suggest that these arginine amidases, either together with and/or distinct from plasminogen/plasmin and t-PA in the cascade, may be involved in the follicle rupture process by activating collagenase.

Recently, Silvan et al.¹²) reported that the estradiol concentration in rabbit follicular fluid increased with the growth of the antral follicle. This finding is inconsistent with our result that the HFF volume has not correlation with the estradiol concentration in the mature HFF ($r=0.286$, data not shown).

We have already found that HFF contains two different molecular of arginine esterases (amidases) which hydrolyze N- α -tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-Me), so-called major and minor peaks⁶). In

the future, further investigation is required to examine the relationship between the arginine amidase activities showing strong relation with tissue plasminogen activator and plasminogen (Fig. 2). Moreover, an attempt should be made to identify the arginine amidases and their roles in the ovulation mechanism.

References

- 1) LeMaire WJ, Curry TE, Morioka N, et al., Regulation of ovulation processes. "Primate Ovary", p91 Plenum Publishing, 1987
- 2) Morioka N, Zhu C, Brannstrom M, et al., Mechanism of mammalian ovulation. *Prog Clin Biol Res* 294: 65, 1989
- 3) Shimada H, Mori T, Takada A, et al., Use of chromogenic substrate S-2251 for determination of plasminogen activator in rat ovaries. *Thrombos Hemostas* 46: 507, 1981
- 4) Tilly JL, Johnson AL, Presence and hormonal control of plasminogen activator in glanulosa cells of the domestic hen. *Biol Reprod* 37: 1156, 1987
- 5) Curry TH, Dean DD, Sanders SL, et al., The role of ovarian proteinases and their inhibitors in ovulation. *Steroids* 54: 501, 1989
- 6) Kobayashi T, Park J-Y, Matsuda Y, et al., Detection of arginine esterase activity in human follicular fluid. *Human Reprod* 8: 1030, 1990
- 7) Amundsen E, Putter J, Friberger P, et al., Methods for determination of glandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptides. In: Fujii S, Moriya H, Suzuki T, eds, *Adv Exp Med Biol kinin II*, Vol 120A. p83, Plenum Press 1979
- 8) Katayama M, Taniguchi H, Determination of estrogens in plasma by high performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5, 6-dimethylbenzimidazole. *J Chromatog* 616: 317, 1993
- 9) Redingaugh MG, Turley RB, Adaptation of bicinchoninc acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem* 153: 267, 1986
- 10) Igarashi M, *Genecologic endocrinology*, In: Igarashi M ed, *Reproductive and genecologic endocrinology*, p 119, Nanzando Co, 1977
- 11) Yoshimura Y, Santulli R, Atlas SJ, et al., The effect of proteolytic enzymes on in vitro ovulation in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 157: 468, 1987
- 12) Silvan G, Illera JC, Illera M, Determination of follicular fluid estradiol levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *Streroids* 58: 324, 1993

ヒト卵胞液中找到される
アルギンアミダーゼ類とエストロゲン類の相関性

ダイヤモンド不妊研究所

向田哲規 Matan Yemimni

明治薬科大学第一生化学教室

松田兆史 秋浜澄行

同第二分析化学教室

片山昌勅 谷口貫一

慶応大学医学部産婦人科学教室

黒田優佳子 兼子 智 野澤志朗

IVFにより得たヒト成熟卵胞液21例を用い、卵胞液中のアルギニンアミダーゼ活性とエストロゲン類との相関性の検討を行った。その結果、ヒト卵胞液中のBz-Arg-pNA水解活性およびVal-Leu-Arg-pNA水解活性はそれぞれプラスミノーゲン量および組織プラスミノーゲンアクチベーター (t-PA) 量と強い相関活性を示すことが明らかになった。また卵胞液中のプラスミノーゲンとt-PA量も同様に相関性を示すことが明らかになった。さらにエストラジオールはBz-Arg-pNA水解活性、Val-Leu-Arg-pNA水解活性およびプラスミノーゲンと相関性を示すことが明らかになった。これらの結果を基にこれら酵素と排卵機構の関連について考察した。

(受付：1994年6月21日)

(受理：1994年8月11日)

体外受精患者における精子アクロシン活性測定の意義

Spermatozoal Acrosin Activity in the Patients who Underwent In Vitro Fertilization

秋田大学医学部産科婦人科学教室

清水 靖	児玉 英也	福田 淳
Yasushi SIMIZU	Hideya KODAMA	Jun FUKUDA
軽部 裕子	松井 俊彦	田中 俊誠
Hiroko KARUBE	Toshihiko MATSUI	Toshinobu TANAKA

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

体外受精における精子アクロシン活性測定の意義を検討する目的で、体外受精の治療を行った不妊患者87例87周期で、精子のアクロシン活性を測定した。精子先体からtriton X-100でアクロシンを抽出し、pH 8.0の強アルカリの環境下でプロアクロシンをアクロシンに変換した上で、アクロシン活性の総和をBAPNAを用いた比色法で測定した。患者を体外受精時の受精率(受精卵数/成熟卵数×100)に基づいて受精率0%、0<受精率≤30%、受精率>30%の3群に分けた場合、各群の精子アクロシン活性は、それぞれ35.2±17.2、49.7±31.2、および57.3±35.9 μ IU/10⁶spermatozoaで、受精率0%と受精率>30%の群の間で有意差(p<0.01)を認めた。精子アクロシン活性の受精率との相関は、他の精液検査パラメータと受精率のそれと比較して特に高いものではなかった。また、アクロシン活性の高い(60 μ IU/10⁶spermatozoa以上)例は、他の例と比較して移植胚の形態学的な質や臨床的妊娠率で有意な差を認めず、高濃度のアクロシン活性が卵子に対する障害を惹起して胚の質を低下させる可能性は認められなかった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 34 - 39, 1995)

緒 言

アクロシンは、精子先体に特異的に存在するセリンプロテアーゼで、精子の卵子透明帯貫通に主要な役割を果たしている。最近ではそれに加えて、精子の透明帯結合¹⁾や受精能獲得現象²⁾に重要な役割を有することが報告されている。近年、ヒト精子のアクロシン活性の比較的簡便な測定法が開発され³⁾、不妊症治療におけるアクロシン測定の応用が検討されている。特に体外受精の患者においては、アクロシン活性が精子の受精能力評価のための優れたパラメーターとなる可能性が示唆されている。また、先体酵素の卵子への影響を検討する上でも、アクロシン活性の測定は有意義と考えられる。そこで、今回我々は体外受精患者のアクロシン活性の測定を行

い、その治療における有用性を種々の観点から検討を行ったので、報告する。

方 法

1) 対象患者

1990年5月から1990年10月までの6カ月の期間に、体外受精の目的で採卵を行った不妊夫婦87例87周期を対象とした。ただし、精液性状がきわめて不良で、アクロシン測定のために必要な精子が十分に確保できない周期、および成熟卵子が採取されなかった周期は、検討から除外した。夫婦の女性の平均年齢は、32.3±3.4歳(範囲23~42歳)、平均不妊期間は6.0±3.0年(範囲1~14年)であった。対象夫婦の体外受精の適応は、卵管性不妊26例、男性不妊27例、子宮内膜症11例、免疫性不妊(女性側)2例、原因不明不妊21例であった。

2) 体外受精の方法

当科で行っている体外受精のプログラムの詳細については以前に報告した³⁾が、ここで簡単に述べる。卵巢の刺激法としては、gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa, buserelin, Sprecur, Hoechst Japan)とhuman menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, Teikokuzouki またはhMG Nikken, Nikken kagaku)の併用によるlong protocolを主として用い、一部hMGに対する反応の不良な患者に対してshort protocolを採用した。GnRHa製剤は、経鼻的に一日900 μ gの投与量でlong protocolでは刺激前週期の黄体期中期から、short protocolでは月経開始日から使用した。hMGは、月経周期の2日目より1日150~300IUを患者の反応に合わせて連日投与した。経腔的超音波断層法を用いて卵胞発育をモニタリングし、基本的に最大卵胞径が17~18mmに達した段階でhCG 10,000IUに切り替えた。採卵は、経腔的に超音波断層法を用いて行った。精液は、用手法で採取し、液化後に精子濃度および精子運動率をマクラーの精子算定板で計算した。また、精液の一部で塗抹標本を作製し、後日ババニコロ染色し精子の奇形率算定に使用した。媒精用の精子は、培養液にて精液を2回洗浄後、swim-up法により回収した。媒精濃度は、運動精子で 10×10^4 個/mlとしたが、男性不妊や原因不明の受精障害例では 50×10^4 個/mlまで増加させた。配偶子の洗浄および培養に用いる培養液には、10%非動化患者血清を加えたhuman tubal fluid medium (HTF)を用い、37°C、3種混合ガス(90%N₂, 5%CO₂, 5%O₂)の気相で培養した。媒精後16~20時間で受精を確認、約48時間後に子宮腔内に胚を最高3個まで移植した。移植時に、胚の形態を観察し、fragmentationの割合が卵細胞質の10%以下の場合を良好胚として分類した。移植当日(0日)、3日目、6日目にhCG 2,000IUによる黄体刺激を行い、移植後17~19日目に尿のhCG検査(Testpak, Dinabot)で妊娠の有無を確認した。その後胎嚢が確認された例を、臨床的妊娠とした。

3) アクロシンの測定法

体外受精のために採取された精液から、媒精用の精子をswim-up法で回収した後の残りをアクロシン活性の測定に使用した。精子のアクロシン活性の測定は、Kennedy et al.⁴⁾の方法を一部変更して行ったので、その方法を以下に述べる。まず、PBS 100 μ l中に精子を $2 \sim 10 \times 10^6$ 個存在するように調整したチューブを、コントロール用とテスト用に2本、同時に精子の入らないPBS溶液100 μ lのみのチューブ(ブランク用)を1本準備した。ブランク用およびコントロール用

のチューブには、後に加える基質と反応を起こさないように、最初から反応停止液(500 mM benzamidine 溶液)を加えた。それぞれのチューブに基質緩衝液(後述)1 mlを加えて良く混和し、22~24°Cで3時間インキュベーションした。テスト用チューブには、反応後、反応停止液100 μ lを加えた。反応終了後、チューブを3000r.p.m.にて10分間遠心し、410 nmにて上清の吸光度(O.D.)を吸光度計にて測定した。精子のアクロシン活性は、アクロシン活性 μ IU/ 10^6 sperm=(テスト用チューブのO.D.-コントロール用チューブのO.D.) $\times 10^6/1485 \times$ 精子個数の式にて計算した。基質緩衝液は、0.01% tritonX-100, 0.055M NaCl, 0.055M Hepes (pH8.0)の緩衝液に、23mM N- α -benzoyl-PL-arginine-P-nitroanilide hydrochloride (BAPNA)を含むDMSO溶液の基質液と混和して作製した。基質液はアクロシン活性測定当日に調整し、使用直前に緩衝液で10倍希釈して使用した。本測定系の精度は、intra-assay variationで1.6%, interassay variationで5.6%であった。

なお、群間の平均値の有意差検定は、Student t-testで、体外受精の妊娠率の有意差検定は χ^2 乗検定で行った。

結 果

1) 体外受精の受精率と精子アクロシン活性の関係

図1に、体外受精の受精率とアクロシン活性の相

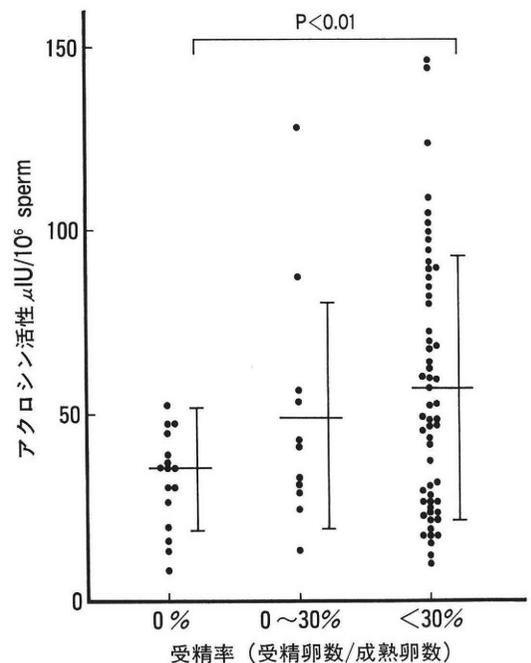


図1 体外受精の受精率と精子アクロシン活性の関係

表1 精子アクロシン活性、精液検査所見と体外受精の受精率との相関

	アクロシン	濃度	運動率	受精率
アクロシン活性	—	0.30 $p<0.01$	0.41 $p<0.01$	0.24 $p<0.05$
精子濃度		—	0.38 $p<0.01$	0.31 $p<0.01$
精子運動率			—	0.35 $p<0.01$
受精率*				—

*：受精卵数/採卵数

表2 アクロシン活性からみた、体外受精成績の比較

	I 群 (n=26)	II 群 (n=36)	III 群 (n=25)
平均年齢(歳)	32.8± 3.7	32.6± 3.3	31.3± 3.1
平均不妊期間(年)	5.7± 3.2	6.3± 3.0	5.7± 2.8
平均精子濃度(10 ⁶ /ml)	49.1±35.2	52.3±33.5	79.6±47.7
平均精子運動率(%)	46.4±21.1	51.2±33.5	65.8±18.4
平均採卵数(個)	7.1± 4.2	7.4± 3.6	8.8± 6.4
平均受精卵数(個)	3.0± 3.2	3.1± 3.1	4.5± 3.1
受精成立/総採卵周期	21/ 26 (80.8%)	27/ 36 (75.0%)	24/ 25 (96 %)
受精卵数/総採卵数	78/186 (41.9%)	108/264 (40.3%)	112/220 (50.9%)
平均移植胚数(個)	3.0±1.2	3.0±1.4	3.1±1.4
良好胚/総胚数	46/ 78 (59.0%)	57/108 (52.8%)	58/112 (51.8%)
臨床的妊娠率			
採卵当り	9/ 26 (34.6%)	6/ 36 (16.7%)	9/ 25 (36.0%)
移植当り	9/ 21 (42.9%)	6/ 25 (24.6%)	9/ 24 (37.5%)

関を示す。治療周期を、体外受精時の受精率(受精卵数/採取された成熟卵数×100)に従って、受精率0%、0<受精率≤30%、受精率>30%の3群に分類し、各群の精子アクロシン活性を比較検討した。各群のアクロシン活性は、35.2±17.2、49.7±31.2、および57.3±35.9 μ IU/10⁶spermで、受精率0%群と受精率>30%群の間で、有意($p<0.01$)な差を認めた。

2) 精子アクロシン活性、精液検査所見と体外受精の受精率との相関

87周期の精子アクロシン活性、精子濃度、精子運動率、および体外受精の受精率の相関係数を表1に示す。精子アクロシン活性は、精子濃度($r=0.30$)、精子運動率($r=0.41$)と有意($p<0.01$)な相関を示した。受精率とは、精子濃度($r=0.31$)および精子運動率($r=0.35$)が危険率1%以下で、アクロシン活性($r=0.24$)が危険率5%以下で有意な相関を示した。

3) 精子のアクロシン活性からみた体外受精成績の比較

精子のアクロシン活性に従って、アクロシン活性が30 μ IU/10⁶sperm未満であるI群(n=26)、30~60 μ IU/10⁶spermのII群(n=36)、60 μ IU/10⁶sperm以上の

表3 Swim-up法により回収された精子と沈渣内の精子でのアクロシン活性の比較

症例	アクロシン活性(μ IU/10 ⁶ sperm)	
	Swim-up精子	沈渣内精子
1	107.7	90.7
2	39.3	41.4
3	13.6	10.0
4	11.6	31.6
5	28.7	26.0
6	101.7	94.5
平均±SD	50.4±39.5	49.6±32.2

III群(n=25)で、体外受精の成績を比較して表2に示す。3群間で、夫婦の女性の平均年齢、平均不妊期間、平均採卵数、平均受精卵数には有意な差は認められなかった。採卵周期において受精が成立した周期の割合は、II群とIII群の間で有意($p<0.05$)な差を認めた。III群で受精が成立しなかった周期は、わずかに一例であった。総採卵数あたりの受精卵数は、3群間に有意な差を認めなかった。

3群間で、移植周期当りの平均胚移植数、総受精卵に対する良好胚の割合、臨床的妊娠率は有意な差を認めなかった。

4) swim-up法で回収された精子と沈渣の精子のアクロシン活性の比較

6症例においてswim-up法で回収された精子と沈渣から回収された精子で、アクロシン活性に差が認められるかを検討した結果を表3に示す。swim-up法で回収された精子と沈渣から回収された精子では、個々の症例でアクロシン活性に大きな差は認められず、両群の平均値に有意差は認められなかった。

考 察

アクロシンは、トリプシン様活性を有するプロテアーゼで、精子の先体に前駆体 (zymogen) のプロアクロシンとして保存され、受精に先立って活性化 (non-zymogen) されてアクロシンとなる。受精における先体反応では、90%のプロアクロシンはアクロシンに変換されると考えられている⁶⁾。通常の精子先体内では、そのほとんどは酵素活性のないプロアクロシンとして存在しており、一部は結合蛋白に結合して酵素活性がマスクされたアクロシンとして存在している。従って、精子のアクロシン活性を測定する場合は、先体に保存されたプロアクロシンをアクロシンに変換して精子の総アクロシン活性として測定する方法が一般的である。アクロシン活性の測定には、Welker et al.⁵⁾が報告したゼラチンプレートを用いて肉眼的に精子の蛋白分解活性を測定する方法がある。しかしこの方法は、定量化が困難で、近年の臨床的な試みの多くは、基質法を用いたものである。基質法によるアクロシン活性の測定方法としては、古典的にはGoodpasture et al.⁶⁾による合成基質N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) を用いた方法が有名である。この方法は、合成アクロシン阻害剤を用いてアクロシンを抽出し、プロアクロシン活性とアクロシン活性を別々に測定することが可能であるが、手技はかなり煩雑である。また、BAEEは、トリプシンの基質としては優れているが、その測定には紫外部での検出を必要とするので通常の吸光度計では測定困難である。今回我々が用いた方法は、最近Kennedy et al.⁴⁾によって報告された比較的簡便な方法で、この方法は総アクロシン活性を求めることのみを目標としており、基質緩衝液にtriton X-100を使用することで精子先体からプロアクロシンを抽出し、pH 8の強アルカリの環境下でこれをアクロシンに変換した上でその活性を測定している。また、基

質にBAPNAを用い、それにより分解産物であるp-NAの測定が⁴⁾410nmの吸光度で測定できることで、実用的になった。

従来は、正常な妊孕性を有する男性の精子と男性不妊の精子のアクロシン活性を比較した報告^{7,8)}が主であったが、近年は体外受精の成績等によって精子の受精能力がある程度正確に評価されることから、体外受精の成績とアクロシン活性の関連性を検討した報告が認められるようになった。Kennedy et al.⁴⁾の報告では、正常精子のアクロシン活性は $34.4 \pm 2.9 \mu \text{IU} / 10^6 \text{sperm}$ で、受精能力の障害されている精子のアクロシン活性 $20.3 \pm 3.2 \mu \text{IU} / 10^6 \text{sperm}$ と比較して有意差を認めたと報告している。また、Tummonr et al.⁹⁾は、市販のアクロシン測定キットを用いて測定した結果、受精成立例と受精非成立例で有意差を認めたと報告している。一方で、Kruger et al.¹⁰⁾やLiu et al.¹¹⁾は、アクロシン活性は体外受精の成績に相関しないとする報告を行っている。このように、アクロシン活性が精子の受精能力の正確な指標となり得るかについては、報告により意見が分かれている現状である。

今回の我々の検討では、実際に体外受精に用いる精子はswim-up法で回収した精子で、アクロシン活性の測定には残りの沈渣の精子を用いている (swim-up法で回収した精子だけでは、特に男性不妊例で測定に十分な精子が確保できないため)。この場合、swim-up法で回収した精子と沈渣に存在する精子との間でアクロシン活性が異なってくる可能性が懸念されるので、swim-up法で回収された精子と沈渣状の精子のアクロシン活性を一部の症例で比較検討した。その結果、両者間には差が認められないことが確認された。我々の成績では体外受精の成績と精子のアクロシン活性を比較した検討では、ある程度体外受精の受精率と相関は認められたものの、精子濃度や精子運動率等の一般的な精液検査のパラメーターと比較して特に優れた指標とは認められなかった。精子アクロシン活性が $60 \mu \text{IU} / 10^6 \text{sperm}$ 以上の強いアクロシン活性を示した例は、体外受精患者の約 $1/3$ を占めていたが、その群では1例の例外を除いて受精が成立していた。しかし問題は、 $30 \mu \text{IU} / 10^6 \text{sperm}$ 以下のアクロシン活性の低い例でも受精の成立が認められる場合が少なくないことである。従って、アクロシン活性の低下により受精障害を予測すると、非常に多くのfalse positive例が存在することになる。このような、正常精子に多く認められる活性低下が、我々の用いた測定法の何らかの問題を反映している

可能性はあるが、その原因は明らかでない。また、多精子症でアクロシン活性の低下が多いとの報告¹²⁾もあるが、今回の検討ではそのような傾向は認められなかった。

アクロシン活性の高さで症例を区分して、体外受精の成績を比較した結果では、体外受精の成績に有意な差を認めなかった。従来、体外受精の環境では、自然の受精環境に比べてはるかに多くの精子に暴露されることから、卵子が精子の先体酵素で障害される可能性も考えられる。しかし今回の検討では、高力価のアクロシン活性が、胚の形態学的な質の低下や妊娠率の低下に関連していると考えられる可能性は認めなかった。

以上の今回の我々の検討では、体外受精の治療におけるアクロシン活性の測定の積極的な意義を見いだすことはできなかった。今後は今回の測定法の妥当性について検討を進める必要があると同時に、男性不妊患者におけるアクロシン活性の低下の本質的な意義が解明されることが必要と考えられる。特に、男性不妊患者の一部にはアクロシン活性の低下が著明な症例もあることから、少なくともこのような症例に対しては、受精障害におけるアクロシンの関与を詳細に分析してみる必要があると思われる。近年、アクロシンの生物活性と免疫活性とを比較した報告¹³⁾もなされており、アクロシン分子の遺伝子解析¹⁴⁾やモノクローナル抗体の作製¹⁵⁾が進んでいることから、今後の分子生物学的な手法を用いた解析が期待されるところでもある。

文 献

- 1) Topfer-Petersen E and Henschen A, Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. FEBS lett 226: 38, 1988
- 2) De-Jonge CJ, Mack SR and Zaneveld LJ, Inhibition of human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. Gamete Res 23: 387, 1989
- 3) Kodama H, Kato M, Sekine K, et al., Efficacy of a gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for in vitro fertilization. J J Inf 36: 110, 1991
- 4) Kennedy WP, Kaminiski JM, van-der-Ven HH, et al., A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. J Androl 10: 221, 1989
- 5) Welker B, Bernstein GS, Diedrich K, et al., Acrosomal proteinase activity of human spermatozoa and relation of results to semen quality. Hum Reprod 3 : 75, 1988
- 6) Goodpasture JC, Polakoski KL, Zaneveld LJD,

Acrosin, proacrosin, and acrosin inhibitor of human spermatozoa: extraction, quantitation, and stability. J Androl 1: 16, 1980

- 7) Goodpasture JC, Zavos PM, Cohen MR, et al., Relationship of human sperm acrosin and proacrosin to semen parameters. I. Comparisons between symptomatic men of infertile couples and asymptomatic men, and between different split ejaculate fractions. J Androl 3 : 151, 1982
- 8) Mohsein M, Snyder FN, Moghissi KS, A study of sperm acrosin in patients with unexplained infertility. Fertil Steril 37: 223, 1982
- 9) Tummon IS, Yuzpe AA, Daniel SAJ, et al., Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro. Fertil Steril 56: 933, 1991
- 10) Kruger TF, Haque D, Acosta AA, et al., Correlation between sperm morphology, acrosin, and fertilization in an IVF program. Arch Androl 20: 237, 1988
- 11) Liu DY, Baker HWG, Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. Hum Reprod 5 : 298, 1990
- 12) Schill WB, Feifel M, Low acrosin activity in polyzoospermia. Andrologia 16: 589, 1985
- 13) Francavilla S, Cordeshi G, Palemo G, et al., Sperm acrosin activity and fluorescence microscopic assessment of proacrosin/acrosin in ejaculates of infertile and fertile men. Fertil Steril 57: 1311, 1992
- 14) Keime S, Adham IM, Engel W, Nucleotide sequence and exon-intron organization of the human proacrosin gene. Eur J Biochem 190: 195, 1990
- 15) Escalier D, Gallo JM, Albert M, et al., Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. Development 113: 779, 1991

Spermatozoal acrosin activity in the patients who underwent in vitro fertilization

Yasushi Simizu, Hideya Kodama,
Jun Fukuda, Hiroko Karube,
Toshihiko Matsui and Toshinobu Tanaka

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

Acrosin activity was measured in the semen used for in vitro fertilization (IVF) in 87 cycles of 87 patients to

evaluate the possible relationship between acrosin activity and outcome of IVF. The washed sperm pellet was suspended in a buffer (pH8) solution containing Triton X-100 and N- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA). Total acrosin activity of the solution was measured spectro-photometrically by converting total proacrosin into acrosin.

IVF cycles were classified into three groups by fertilization rate (FR, fertilized oocytes/ recovered oocyte), Group A, FR= 0 %; GroupB, $0 < \text{FR} \leq 30\%$; Group C,

$30\% < \text{FR}$. Total acrosin activity of each group was 35.2 ± 17.2 , 49.7 ± 31.2 , and $57.3 \pm 35.9 \mu \text{IU}/10^6 \text{sperm}$, and there was significant difference between Group A and Group C. However, total acrosin activity was not a superior parameter in predicting fertility potential of spermatozoa, as compared with standared semen parameters. Higher acrosin activity ($60 \mu \text{IU}/10^6 \text{sperm} \leq$) was not associated with decreased embryo quality and low pregnancy rate.

(受付：1993年3月11日)

(受理：1994年8月18日)

成熟精子回収法としての不連続2層Nycodenz法の 臨床的有用性の検討

Evaluation of a Discontinuous Nycodenz Gradient Method for the Preparation of Good Human Spermatozoa

福島県立医科大学産科婦人科学教室

中木 純子
Junko NAKAKI

片寄 治男
Haruo KATAYOSE

星 和彦
Kazuhiko HOSHI

佐藤 章
Akira SATO

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

最近注目されている精子回収法にNycodenz (N) を用いる方法がある。本研究は著者らが考案した不連続2層N法で精子回収を行い、良好精子の回収成績を調べるとともに回収された精子の核の成熟性についても検討することを目的とした。WHO精液分析基準から分類した精液所見良好群13例、不良群22例の精液を対象とした。不連続2層(33%, 66%)N法で精子回収を行い、各層から回収された精子の数、運動率、奇形率を求め良好精子回収率を計算した。またAcridine orange染色を施し精子核の成熟性を調べた。精液所見良好群、不良群とも66%N層とPellet層から運動性良好で形態学的正常かつ成熟した精子核を有する良好な精子を効率よく回収することができ、不連続2層N法の臨床的有用性が確認できた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 40 - 44, 1995)

緒 言

近年生殖医療技術 (assisted reproductive technology: ART) の進歩は目覚ましく、人工授精 (artificial insemination), 体外受精-胚移植 (in vitro fertilization and embryo transfer: IVF-ET), 配偶子卵管内移植 (gamete intrafallopian transfer: GIFT) 等が多くの施設で行われ、多数の妊娠例が報告されている。そしてこれらARTに不可欠なのが配偶子の操作である。精液から精子を回収する場合、精漿の除去とともに運動性が良好で形態学的にも正常な精子を効率よく集めることが要求される。そのため現在までにいくつかの精子回収法が考案されており¹⁾、代表的なものは精液静置法 (Swim-up法)²⁾とPercoll法^{3,4,5)}である。精液静置法は優れた精子回収方法であるが、液化が不良な精液や精子数の少ない精液では、十分な回収率が得られないという欠点を有し、Percoll法は精子の微細構造

や細胞膜に与える影響⁶⁾が報告されており、精子の運動性の低下や奇形精子数の増加が懸念されている⁷⁾。

最近注目されている精子調整法にGellert-Mortimer et al.⁸⁾により初めて報告されたNycodenzを用いる方法がある。NycodenzはこれをTris bufferに溶解したものがX線撮影用の造影剤として臨床ですでに用いられており、安全性は確認されている⁹⁾。本研究では、原法が5層の不連続多層法でやや煩雑であるため、これを簡便化させた2層法を考案し、良好精子の回収成績に回収された精子の核の成熟性の検討も加えてその有用性を評価した。

方 法

1) 被験精液

1987年に定められたWHO精液所見の基準¹⁰⁾にもとづいて分類した精液所見良好群13例、不良群22例を対象とした。不良群はすべてが精子無力症

(Asthenozoospermia)であり、またその中の4例は乏精子-精子無力症(Oligo-asthenozoospermia)であった。奇形精子症(Teratozoospermia)は含まれていなかった。研究に際しすべての対象者からは同意を得ており、妊孕性は不明である。

2) 実験方法

(1) 精子回収法

臨床に応用される精子回収方法はできるだけ簡便な方式が望まれるので、本研究では原法を大幅に簡便化し非イオン性低浸透圧造影剤イオヘキソール(オムニパーク140, 第一製薬)を直接用いた不連続2層Nycodenz(N)法を考案し精子を回収した。イオヘキソールは化学名土-N, N-bis(2,3-dihydroxypropyl)-5-[N-(2,3-dihydroxypropyl acetamido)]-2,4,6-triiodoisophalamide, 分子量は821.14で、物理化学的にも安定した媒体であることが確認されている¹¹⁾。原法すなわち不連続5層N法は35%, 50%, 65%, 75%そして85%, のN液を層積したものであるが、Gellert-Mortimer et al.⁸⁾の検討では運動性が良好でしかも運動性の維持も良好な精子は65%の層から最も効率的に回収されている。本研究では33%と66%のN液を精子洗浄用培養液human tubal fluid (HTF)を用いて調整し、1.0mlずつスピッツ試験管に層積して不連続2層Nを作成した。33%N液の比重は1.053G/ml, 66%N液のそれは1.100 G/mlであった。

用手法で採取され室温で十分に液化された被検精液を2層のN液の上に静かに置き、350×gで、20分間遠心分離した。その後、精液層、33%N層、66%N層、Pellet層のそれぞれの分画をパスツールピペットで分別回収し、それぞれにHTFを2.0mlずつ加えてさらに350×g, 10分間の遠心分離を行った。それぞれの上清を除去し、PelletにHTFを加えて最終的に1.0mlの精子浮遊液を作製した。

(2) 回収精子の解析

a. 精子運動性の評価

回収された精子浮遊液をMakler chamberにセットし、位相差顕微鏡(オリンパスBH2; オリンパス光学, 東京)とビデオカメラを介したComputer Assisted Sperm Analyzer (CASA; Cellsoft, USA)で画像解析して、精子の運動率、平均運動速度、直進運動性(Linearity)を求めた。Linearityは10段階で表現してある。

b. 精子形態の評価

精子の形態(精子頭部の異常の有無, 精子尾部の異常の有無)¹⁰⁾を光学顕微鏡下に評価し、奇形精子の割合を求めた。

c. 良好精子回収率

CASAで求めた精子濃度, 精子運動率そして精子奇形率から運動性がありしかも形態学的にも正常な良好精子の数とその回収率を計算した。

d. 精子核の成熟性評価

精子核の成熟性はAcridine orange (AO) 染色法で調べた。

細胞の核にAO染色を施し蛍光顕微鏡で観察すると、二重鎖DNAはgreenの蛍光を、一重鎖DNAやRNAはredの蛍光を発する。精子核を酸で前処理しても、成熟した精子核は核蛋白質内のS-S結合が豊富なため変化を起ささないが、S-S結合の少ない未熟精子は酸でdenaturationをうけDNA鎖が二重鎖構造から一重鎖構造に変化する。そのため酸処理後AO染色を行うと、成熟精子核はgreenに未熟な精子核はredに発色する¹²⁾。

精子浮遊液をスライドガラスに滴下し、風乾後、カルノイ液(メタノール:氷酢酸=3:1)にて一昼夜処理した。スライドガラスを風乾し、Tejada et al.の方法¹³⁾で最終濃度0.02%, 最終pH2.5に調整したAO溶液(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を用いて染色した。標本を蛍光顕微鏡(オリンパスBHT, オリンパス光学, 東京)にセットし450~490nm excitation filterと520nm barrier filterを用いて、1検体あたり100~200の精子核を観察した。

(3) 統計処理

おのおののデータの処理はまず標準検定により求め、mean values ± standard deviation (mean ± SD)で表示した。データ間の比較はStudent's t検定を行い、P<0.05を示したとき統計学的に有意差有りとした。精子運動性および精子形態と精子核の成熟性との相関性は、ピアソンの相関係数を求め判定した。

結 果

1) 不連続2層N法による精子の回収成績

精液所見良好群および不良群(精子無力症群)から回収された精子の運動率, 奇形率および良好精子の回収率を表1に示した。両群から回収された精子の核の成熟性の成績は表2に示した。

精液所見良好群, 不良群いずれにおいても66%N層, Pellet層から運動性良好の精子が多数回収されていた。66%N層から回収された精子の運動速度は原精液のと比べると有意に増加していた(P<0.05, P<0.05)。奇形率も66%N層とPellet層からの回収精子で減少していた。精液所見不良群, 中でも乏精子-精子無力症群のPellet層からの回収精子が原精液と比較して有意に減少していた(P<0.05)。

表1 不連続2層Nycodenz法による精子回収

	原精液	精液層	33%N層	66%N層	Pellet層
Motility (%)					
精液所見良好群	63.5 ± 9.8* ¹	19.5 ± 16.4	27.5 ± 17.6	65.2 ± 16.7* ¹	61.5 ± 19.3
精液所見不良群 (精子無力症群)	31.5 ± 11.2* ²	12.9 ± 17.6	13.9 ± 13.8	36.6 ± 17.3* ²	34.5 ± 18.3
乏精子-精子無力症群	15.0 ± 7.1	12.5 ± 17.7	12.6 ± 17.8	16.5 ± 9.3	19.5 ± 9.3
Velocity (μ m/sec)					
精液所見良好群	27.7 ± 6.8			33.8 ± 5.7	33.2 ± 8.8
精液所見不良群 (精子無力症群)	26.0 ± 5.9			31.4 ± 4.4	29.6 ± 6.7
Linearity					
精液所見良好群	4.0 ± 1.0			4.8 ± 1.8	4.6 ± 2.4
精液所見不良群 (精子無力症群)	4.0 ± 1.4			4.5 ± 1.5	4.0 ± 1.6
Anomaly (%)					
精液所見良好群	9.5 ± 4.3	18.7 ± 18.7	24.1 ± 17.2	6.8 ± 4.0	8.5 ± 6.7
精液所見不良群 (精子無力症群)	11.9 ± 5.8	21.0 ± 15.2	17.0 ± 14.2	9.2 ± 5.3	7.7 ± 4.7
乏精子-精子無力症群	10.0 ± 1.5* ³	11.2 ± 1.8	9.1 ± 12.9	7.0 ± 1.4	5.9 ± 3.9* ³
Good Sperm Collection Rate (%)					
精液所見良好群		2.9 ± 4.8* ⁴ * ⁵	2.0 ± 3.5* ⁶ * ⁷	36.3 ± 17.5* ⁴ * ⁶	54.1 ± 33.9* ⁵ * ⁷
精液所見不良群 (精子無力症群)		4.2 ± 8.4* ⁸ * ⁹	4.7 ± 7.7* ¹⁰ * ¹¹	32.6 ± 9.9* ⁸ * ¹⁰	57.1 ± 33.0* ⁹ * ¹¹
乏精子-精子無力症群		14.7 ± 20.8	17.2 ± 11.3	40.0 ± 0.1	35.1 ± 5.7

*¹, *², *³: P < 0.05*⁴, *⁵, *⁶, *⁷, *⁸, *⁹, *¹⁰, *¹¹: P < 0.01

表2 Acridine Orange染色による精子核の検討

	原精液	精液層	33%N層	66%N層	Pellet層
成熟精子核 (%)					
精液所見良好群	60.4 ± 22.6* ¹ * ²	57.2 ± 21.1	60.8 ± 21.6	78.7 ± 13.4* ¹	71.6 ± 14.4* ²
精液所見不良群 (精子無力症群)	65.2 ± 15.3* ³ * ⁴	62.7 ± 18.9	67.3 ± 21.8	86.7 ± 12.3* ³	75.8 ± 17.6* ⁴
乏精子-精子無力症群	76.9 ± 9.8* ⁵ * ⁶	74.6 ± 3.1	77.8 ± 18.4	83.4 ± 19.1* ⁵	84.8 ± 3.9* ⁶

*¹, *², *⁴, *⁵, *⁶: P < 0.05*³: P < 0.01

良好精子の回収率は、精液所見良好群、不良群ともPellet層において最も良好な成績が得られ、次いで66%N層であった。両層とも精液層あるいは33%N層に比べ有意に高い回収率であった。乏精子-精子無力症群に限定すると、最も良好な回収率が得られたのは66%N層で次がPellet層であった。

AO染色でgreenに発色した精子核すなわち成熟精子核の占める割合をみると、精液所見良好群では66%N層から回収された精子で最も高く、次いでPellet層、33%N層、精液層の順であった。成熟精子核の割合は原精液に比較し66%N層 (P < 0.01)、Pellet層

(P < 0.05) で有意に高値であった。不良群 (精子無力症群) でも同様の成績が得られ、66%N層とPellet層の成熟精子核の割合は、原精液より有意に高値であった (P < 0.01, P < 0.05)。乏精子-精子無力症群でみると、green染色核の割合が最も高いのはPellet層で、66%N層、33%N層、精液層がこれに続いていた。やはりPellet層と66%N層が原精液より有意に高値であった (P < 0.05, P < 0.05)。

2) 精子の運動率および奇形率と精子核成熟性との関連

精液所見良好群と不良群の回収精子において、精

子運動率や奇形率と成熟精子核の占める割合の間に相関はなかった(良好群:運動率と成熟性の相関係数は $r=0.669$, 運動速度と成熟性の相関係数は $r=0.005$, 直進運動性と成熟性の相関係数は $r=0.034$, 精子奇形率と成熟性の相関係数は $r=0.284$, 不良群:各々 $r=0.509$, $r=0.362$, $r=0.134$, $r=0.414$).

考 察

精液は精巣上体尾部より射出される精子と、副生殖腺液の混合物を主体とする精漿から構成される。精漿は一時的な媒液として精巣上体内よりも活発な代謝ができるような環境を射出精子に与え、同時に精子の受精部位到達にも補助的な役割を果たしている。しかし精漿内には受精能破壊因子または抗受精因子としての糖蛋白質が存在するため、受精に際しては精漿の除去が必要になる。In vivoでは、精漿は子宮頸管内で除去されるが、in vitroで受精をおこさせるときは精子調整法(回収法)でその役割を果たさなければならなくなる。従来からSwim-up法、Percoll法など優れた精子調整法が考案されてきてはいるが、前述したような問題点を抱えているのも事実である。最近、新しい精子調整法として注目されているのが等調性密度勾配担体であるNycodenzを用いた精子洗浄濃縮法である。Nycodenz¹¹⁾は、同様の性質を持つPercollがイオンの存在や低pHの状態ではコロイド粒子が障害を受け沈殿を生じるのに対し、物理化学的にも安定した媒体であることが確認されている。

本法は1988年、Gellert-Mortimer et al.⁸⁾によって最初に報告されたものである。Tris bufferで溶解した35%, 50%, 65%, 75%, 85%のN液の不連続5層N法で精子回収を行い、65%N層から回収された精子で運動性の改善が得られたこと、またその運動性は不連続多層Percoll法で回収された精子よりも長時間(少なくとも21時間)維持されることを確認している。Serafini et al.¹⁴⁾はHepes-HTF培養液で溶解したN液の不連続3層N法(35%, 50%, 65%)を行い、Pellet層から回収された精子は運動率、前進速度、頭部の振幅、透明帯除去ハムスター卵への侵入率とも不連続多層Percoll法による回収精子に匹敵する成績をあげたことを報告している。本研究は原法を臨床応用の目的から33%と66%の層からなる不連続2層N法に簡便化し、その臨床的有用性を検討したものである。評価手段としては、回収された精子の運動性や形態学的正常性だけでなく、AO染色法を施し^{12, 15, 16)}精子核の成熟度の面からも検討を加えてみた。不連続2

層N法にて精子回収を行った結果、精液所見が良好な群も不良な群も66%N層とPellet層で良好精子を有意に多く回収することができた。AO染色の結果でも66%N層とPellet層から回収された精子の成熟核の割合が有意に高くなっていた。

今回の検討では、精子の運動性や形態学的正常性と精子核の成熟性との間に関連性を認めることはできなかった。しかし、精子核クロマチンの異常は、精子頭部の形態異常につながるという報告¹⁷⁾や、精子形態と精子核の成熟度との間に相関を認めたとする報告^{18, 19)}もある。光学顕微鏡では鑑別できない微細な形態異常が存在しているのかもしれない。原精液の所見をみても、AO染色の成績と精液分析の成績には関連性がみられない。成熟した精子が受精能を有する確率が高いことを考えると、精液分析だけで妊孕能を判断することは危険といわざるを得ない。

Nycodenzを用いた簡便な精子回収法を考案し、臨床的有用性を確認することができた。Percollの生体に与える影響については不明な点が残されている。安全性が確認されているNycodenzのART領域における今後の応用が期待される。

文 献

- 1) 星 和彦, 吉松宣弘, Sperm preparationによるAIH. 産と婦 39: 39, 1990
- 2) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎 他, 我々のおこなっている精液静置法“layering method”による精液中からの良好精子の分離. 日不妊会誌 28: 101, 1987
- 3) Bruce AL, Garner DL, Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. Gamete Res 7: 49, 1983
- 4) Ord T, Patrizio P, Marelllo E, et al., Mini Percoll. a new method of semen preparation for IVF in severe male factor in fertility. Hum Reprod 5: 987, 1990
- 5) Englert Y, Bergh MV, Rodesch C, et al., Comparative auto controlled study between Swim-up and Percoll of fresh semen samples for in-vitro fertilization. Hum Reprod 7: 399, 1992
- 6) Arcidiacono A, Walt H, Campana A, et al., The use of Percoll gradients for the preparation of subpopulations of human spermatozoa. Int J Androl 6: 433, 1983
- 7) Menkveld R, Swanson RJ, Kotze TJ, et al., Comparison of a discontinuous Percoll gradient method versus a Swim-up method, effects on sperm morphology and other semen parameters. Androl 22:

- 152, 1990
- 8) Gellert-Mortimer ST, Hyne RV, Clarke GN, et al., Evaluation of Nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa. *Fertil Steril* 49: 335, 1988
 - 9) Almen T, Experimental investigation with iohexol and their clinical relevance. *Acta Radiol* 366: 9, 1983
 - 10) WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, Published on behalf of the World Health Organization, Cambridge University Press, USA p 1, 1987
 - 11) Rickwood D, Properties of iodinated density gradient media. In *Iodinated Density Gradient Media*. In: Rickwood D ed, A Practical Approach, Oxford, IRI Press, p 1, 1983
 - 12) Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR, Relation of mammalian sperm chromatin. *Science* 210: 1131, 1980
 - 13) 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
 - 14) Serafini P, Mansourian M, Blank W, et al., Enhanced penetration of zona-free hamster ova by sperm prepared by Nycodenz and Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 53: 551, 1990
 - 15) Le Lannou D, Blanchard Y, Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation of Swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 84: 551, 1988
 - 16) Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R, et al., Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 13: 342, 1988
 - 17) Jager S, Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch Androl* 25: 253, 1990
 - 18) Claassens OE, Mitchell JC, Norman A, et al., The acridine orange test, determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 7: 242, 1992
 - 19) Ibrahim ME, Pedersen HI, Acridine Orange fluorescence as male fertility test. *Arch Androl* 20: 125, 1988

Evaluation of a discontinuous Nycodenz gradient method for the preparation of good human spermatozoa

Junko Nakaki, Haruo Katayose,
Kazuhiko Hoshi and Akira Sato

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

The objective of this study is to evaluate the discontinuous two layers Nycodenz gradient (33%, 66%) method for the preparation of motile, morphologically normal and mature human spermatozoa. Sperm nuclear maturity was evaluated with acridine orange fluorescence method. The motile and morphologically normal sperm, and the spermatozoa which have mature nucleus were selected from 66% Nycodenz layer and Pellet after density gradient centrifugation. These results indicate that the new method using Nycodenz is useful for semen preparation of assisted reproductive technology.

(受付：1994年5月26日)

(受理：1994年8月22日)

閉塞性無精子症に対する Conventional Epididymovasostomy の臨床的検討

Clinical Review of 10 Azoospermic Patients Epididymovasostomized Conventionally for Presumptive Diagnosis of Epididymal Obstruction

横浜赤十字病院泌尿器科

岩崎 皓 石塚 栄一
Akira IWASAKI Eiichi ISHIZUKA

Department of Urology, Yokohama Red Cross Hospital, Yokohama 231, Japan

横浜市立大学泌尿器科

穂坂 正彦 木下 裕三
Masahiko HOSAKA Yuzo KINOSHITA

Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine

藤沢市民病院泌尿器科

広川 信
Makoto HIROKAWA

Department of Urology, Fujisawa Municipal Hospital

聖マリアンナ医科大学泌尿器科

岩本 晃明
Teruaki IWAMOTO

Department of Urology, St. Marianne University School of Medicine

正常精巣容積をもち、血中FSH値が正常で造精機能を保持することが精巣組織所見で確認され、また、精嚢造影において遠位側に閉塞部位を持たない無精子症例に、近位側の閉塞性無精子症を疑い、当施設では、conventional epididymovasostomyを施行してきた。今回これら10症例につき、retrospectiveに臨床的な検討を行った。

平均年齢32.8歳、精巣容積は平均18.5ml、血中平均FSH値は4.55mIU/mlで、modified Johnsen's scoreが9.0を超える症例(3例)では手術中に精巣上体切開部より精子を認めただけに対し、精子を認めなかった症例(7例)のscoreの平均値は6.8と低値を示した。漏出液中に精子の認められた3例中2例に術後の精液中に精子の出現を見たが、術中精子を認めなかった7例の中では、両側精巣上体炎後の症例のみに術後の精液中に精子を認めた。しかし、2年以上の観察期間内には、その3例中に妊娠成立を見ていない。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 45 - 49, 1995)

緒 言

精巣容積と血中FSH値が正常範囲にありながら、

無精子症を示す症例に対しては、通常精巣生検あるいは引き続いて精嚢造影が行われる。ここで、造精機能が保持されていることがわかり、精管欠損や精

囊嚢状拡張症のような精路の通過障害が発見されれば閉塞性無精子症の診断がなされる。

しかし、この精嚢造影において閉塞部が発見されない時には、より近位の閉塞、すなわち精巣上体より精巣側の閉塞を考えなければならない。しかし、現在でもこの部位に対する的確な診断方法は得られていない。そこで、我々は、精巣上体より近位の閉塞を疑った症例に対し、陰嚢内試験切開を行ったあと精巣上体精管吻合術を施行した。精巣組織所見において、Sertoli cell onlyの精細管がいくつか見られるものの、精子細胞まで存在する精細管を持つ症例にまで適応を拡げ、行われた10症例につきretrospectiveに臨床的検討を行ったので報告する。

対 象

1984年より、横浜市立大学、藤沢市民病院、横浜赤十字病院において施行された精巣上体精管吻合術10例で、年齢は25歳から43歳まで平均32.8歳、初診までの不妊期間は2年から12年、平均4年4カ月、また、明らかな閉塞原因と思われる精巣上体炎後の2例を除けばいずれも原因不明であった。

全例、精巣容積、血中FSH値、精巣生検、精嚢造影の所見から、精巣上体より近位側の閉塞性無精子症の疑われた症例で、これらにつき、手術中の精巣上体頭部の所見、精巣組織所見、術後成績について検討を行った。

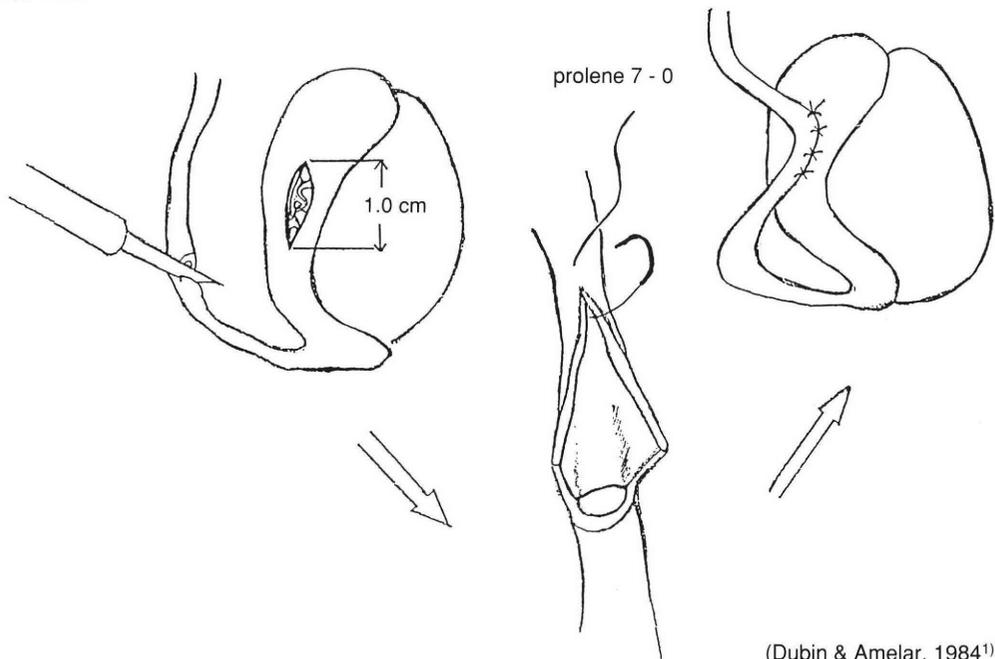
手術方法

Dubin & Amelarの方法¹⁾に準じて行われた。陰嚢内容を観察後、精巣上体体部の鞘膜に5mmの縦切開を加える。ここからの漏出液に鏡検にて精子を含むことの確認ができた場合、この切開線を10mmに伸ばし吻合を行うが、漏出の無い場合は、頭部に同様の切開を加える。ここで内容液の流出なき場合でも、術後の精子の出現を期待して精管との吻合を行った。吻合に適切な部位の精管を遊離し、側々吻合にあずかる部の最下端の精管に半周の割を加える。ここであらわになった精管内腔に対し、涙管ブジーを用い拡張する。生理食塩水を注入して遠位側に通過障害のないことを確認後、ここから遠位に向けて10mmの縦切開を加え精管内腔を開く。この切開創と精巣上体の切開創とをprolene 7-0により結節縫合する (Fig. 1)。以上の操作のうち、特に止血や粘膜面の縫合は、16~25倍の接眼レンズによる顕微鏡視野下に行われた。

結 果

全体をTable 1, 2に示した。

精巣容積は左右のうち、大きいものの容量を示し、その平均値は $18.5\text{ml} \pm 3.4$ (Mean \pm SD)であった。血中FSH値は平均 $4.55 \pm 1.21\text{mIU/ml}$ (Mean \pm SD)、LH



(Dubin & Amelar, 1984¹⁾)

Fig.1 Schema of conventional epididymovasostomy

Table 1 Pre-and postoperative findings of 10 conventional epididymovasostomies

No.	Case	Age	Size of Testis (ml)	FSH (mIU/ml)	LH	Testosterone (ng/ml)	Histol. of Testis*	Dilat. of Epi. Head	Sperm in Fluid	Sperm in Semen	Preg.	Past History or Presumptive Diagonosis
1	R.U.	43	20	6.2	3.8	5.04	8.1	(-)	(-)	(-)	(-)	unclear
2	Y.Y.	43	20	3.1	1.9	8.98	9.1	(-)	(+)	(+) #1	(-)	unclear
3	M.A.	30	20	2.9	0.6	7.88	9.2	(+)	(+)	(+) #2	(-)	unclear
4	O.T.	26	15	4.7	3.2	5.04	7.0	(-)	(-)	(-)	(-)	epididymitis? (unilat.)
5	F.M.	33	20	6.1	4.0	4.45	9.1	(+)	(+)	(-)	(-)	unclear** (right)
6	H.K.	41	15	3.1	4.8	3.37	6.5	(-)	(-)	(-)	(-)	unclear
7	T.N.	25	15	4.6	1.3	5.24	6.3	(-) cyst ⁺	(-)	(-) #3	(-)	epididymitis (bilt.)
8	O.N.	30	15	5.6	1.1	6.77	6.4	(-) cyst ⁺	(-)	(-)	(-)	unclear
9	A.H.	27	25	4.5	1.2	6.01	7.1	(-)	(-)	(-)	(-)	unclear
10	N.H.	30	20	4.7	2.0	5.99	6.5	(-)	(-)	(-)	(-)	unclear

* : modified Johnsen's score

** : congenital absence of epididymal tail (left)

Table 2 Postoperative semen analyses of 3 patients with spermatozoa present in the ejaculate after epididymovasostomy

		1Mo.	3Mo.	6Mo.	1Y.	1Y6Mo.	2Ys.	3Ys.
#1	semen volume (ml)		2.0	1.0	1.0	2.0		
Case2	sperm density ($\times 10^6/ml$)	(-)	9.6	19.2	39.2	10.4		
	sperm motility(%)		9	75	48	16		
#2	semen volume (ml)	4.0	5.0	4.0	5.0	3.5	4.5	
Case3	sperm density ($\times 10^6/ml$)	29.0	50.1	90.2	72.8	33.6	118.6	
	sperm motility(%)	15	30	40	35	45	70	
#7	semen volume (ml)				1.0	1.5	1.0	1.5
Case7	sperm density ($\times 10^6/ml$)	(-)	a few sperms	(-)	19.8	61.0	48.0	36.2
	sperm motility(%)				0	0	0	0

値は平均 2.39 ± 1.45 (Mean \pm SD)で、いずれの測定法も、1989年まではRIA法(2抗体法)により、それ以降の症例ではIRMA試験管固相法により測定された。それぞれ、 $Y = 0.717X + 0.328$ (FSH), $Y = 0.265X + 0.376$ (LH)の相関式により現法による値に換算された。それぞれの基準値はFSH = 1.8 ~ 13.6mIU/ml, LH = 1.1 ~ 8.8mIU/mlである。また、血中testosteroneは同様に1989年までは、RIA^{3H}DCC法にて、それ以降はRIA固相法により測定された。 $Y = 1.14X + 0.10$ の相関式により、現法による値に換算される。基準値は2.70 ~ 10.7ng/mlで、提示された症例の平均値は 5.88 ± 1.65 ng/mlであった。いずれの測定値も不妊外来受診時での1回のみ値ではあるが、正常範囲内にあることが示され、そのうち特に血中FSH値が正常範囲にあり、精巣容積が12mlを超える症例に精巣生検が行われている。精巣組織所見については、精子が存在する精細管のscoringを細分するJohnsen's scoreに対し、それらをすべてscore10で表し、sper-

matidをlate spermatidとealy spermatidにわけると考え²⁾、我々もこの方法により、精巣組織所見の量的評価を行っている。左右のうち良好な方の成績を表に示し、そのscoreの平均は 7.53 ± 1.22 (Mean \pm SD)となった。scoreが9.0を超える症例(症例2・3・5)では、術中に精巣上体切開部より精子を見出だしたのに対し8.0以下では精子を認めなかった。精巣上体頭部に肉眼的に拡張の認められた症例では2例中2例ともにその漏出液中が認められているのに対し、拡張の認められない場合でも漏出液から精子の認められた症例(症例2)もあり、いわゆるscrotal explorationにより閉塞の有無を判断するのも困難さが推定された。漏出液中に精子の認められた症例(症例2・3・5)では、術後の精液検査にて2例に(症例2・3)精子が出現したが、術中精子の認められなかった症例の中では、両側精巣上体炎の既往のある症例7のみに術後の精液中に精子の出現を見た。しかし、この症例

は未だ運動精子を認めておらず、また、3例ともに2年以上の観察でも妊娠には至っていない。精子出現までに1カ月から1年、良好な運動精子を得るまでに約6カ月を必要とした。

考 察

近年、microsurgeryの進歩は目覚ましく、この方法の導入により、epididymovasostomyの手術成績が向上しているといわれている。精子の存在を確認できた精巣上体管と精管とのend-to-end anastomosisやside-to-end anastomosisが、conventional epididymovasostomy, すなわち、精巣上体と精管とのあいだに瘻孔を形成するかたちの従来法精巣上体精管吻合術に比し、術後の開通率や妊娠率の良好なことが報告されている^{3,4)}。

しかし、我々の成績からは、精巣上体頭～体部から精子が認められる場合には、conventional epididymovasostomyによっても術後精液中に精子を得る可能性は決して低くはないものと考えられた。Dubin & Amelarはこの方法により、26例中64%の開通率を報告している¹⁾。しかし、Hendryらによれば、精巣上体精管吻合術を施行した30例中その半数にあたる15例にyoung症候群を認め、術中精巣上体より精子を証明できても、術後の精液中への精子出現率は低く、また、その運動性も極端に悪いことを報告している⁵⁾。前述のDubin & Amelarの報告¹⁾では、後天的な精巣上体尾部の炎症性閉塞例での術後の妊娠率が23%と低いことから、低妊娠率がYoung症候群を原因とするものばかりではないことが示唆され、ここにこの手術方法における問題点が残されているものと考えられる。今回提示した症例にはYoung症候群を疑わせた症例は認められず、この方法により得られた比較的良好な運動性を有する精子がなぜ妊娠性を持たないのかは不明であり、今後さらに検討を進めてゆきたいと考えている。

一方、精巣上体体部ないし頭部より精子を認めなかった症例に関しては、手術による再開通が非常に困難なものと考えられる⁶⁾。

我々の症例でも7例中、1例(症例7)のみに術後しばらくして精子が出現したが、未だ運動精子は得られていない。特にこの症例は、結婚前に起こした両側急性精巣上体炎を治療したあと経過を観察していた症例で、強く精巣上体での閉塞が疑われた無精子症である。この症例で、手術中に精巣上体漏出液に精子を認めず、手術後に精液中に精子が出現したことは、より精巣側の精巣上体管に閉塞があった可能性を疑わせる。その上で、この症例のscoreは6.3と

低いが、Sertoli cell onlyの精細管と造精機能を持つ精細管とが混在している組織像を示していた。また、精巣上体体部に精子の認められた症例では造精機能が比較的正常に近く保持されているのに反して、この症例のような精子の認められなかった症例では、一部に造精機能が保持されていても、全体としてのscoreの低下が目立つ。これらのことは、精巣に近い精巣上体管の閉塞が先行することにより、造精機能の低下を生じている可能性も充分考えられ興味深い。

そして、このような症例でも、精子を認める精巣上体管あるいは精巣輸出管を見い出せれば、microsurgicalに吻合が可能と考えられている。しかし、精子の妊孕性の獲得に、少なくとも精巣上体体部の通過が必要とされるならば⁷⁾、妊娠成立までには困難さが予想される。実際、Southwickらは、この部位での吻合ではmicrosurgeryの手法によっても妊娠率が低いことを報告している⁸⁾。

最近では、assisted reproductive technologyが発達し、精子を獲得することができれば挙児に至る可能性が高くなってきた。このconventional epididymovasostomyも、この点を考慮すると、少なくとも、精巣上体よりの漏出液中に精子を認めることができれば、充分適応があるものと考えている。しかし、精子が精巣上体頭部よりの漏出液中に認められず、しかも、より精巣側の閉塞が疑われる場合でも、この手術方法では限界がある。実際、我々の観察からも手術後精液中に精子が出現しはじめたのは上に挙げた一例のみで、その他の症例では一年以上の経過をみても変化を認めなかった。

顕微授精の技術を用いることができるようになれば、少数の精子により挙児を期待できることになる。現状ではいまだ困難さが予想されるものの、microsurgeryの技術をもって、この領域の病変に挑戦することの必要性を痛感した。これにより、この領域の知見が増えることになり、ひいては、この部位での閉塞症例に対する有用な検査法が見い出されることが期待される。

文 献

- 1) Dubin L, Amelar RD, Magnified surgery for epididymovasostomy. *Urology* 23: 525, 1984
- 2) de-Krester DM, Holstein AF, Testicular biopsy and abnormal germ cells. In: Hafez ESE eds, *Human semen and fertility regulation in men*. p332, The CV Mosby Co, 1976
- 3) Silber SJ, *Microsurgery for vasectomy reversal and*

- vasoepididymostomy *Urology* 23: 505, 1984
- 4) 松田公志, 堀井泰樹, 野々村光生 他, 顕微鏡下精巢上体精管吻合術 (side-to-end法) の経験. 泌尿紀要 37: 607, 1991
 - 5) Hendry WF, Knight RK, Whitfield HN, et al., Obstructive azoospermia: Respiratory function tests, electron microscopy and the results of surgery. *Brit J Urol* 50: 598, 1978
 - 6) 吉田謙一郎, 中目康彦, 金親史尚 他, Organic Obstructive Azoospermia 11 症例に対する副睾丸精管吻合術: その臨床的検討. 日不妊誌 29: 310, 1984
 - 7) Bedford JM, Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis, In: Fawcett DW, Bedford JM, eds, *The Spermatozoon*. p7, Urban & Schwarzenberg, 1979
 - 8) Southwick GJ, Temple-Smith PD, Epididymal microsurgery: current techniques and new horizons. *Microsurgery* 9: 266, 1988

**Clinical review of 10 azoospermic patients
epididymovasostomized conventionally
for presumptive diagnosis
of epididymal obstruction**

Akira Iwasaki, Eiichi Ishizuka

Department of Urology

Yokohama Red Cross Hospital, Yokohama 231, Japan

Masahiko Hosaka, Yuzo Kinoshita

Department of Urology, Yokohama City University

Makoto Hirokawa

Department of Urology, Fujisawa Municipal Hospital

Teruaki Iwamoto

Department of Urology, St. Marianne University

We have applied conventional epididymovasostomy to azoospermic patients with normal testicular volume, normal serum FSH level and intact spermatogenesis, whose vesiculograms showed no obstructive lesion in the distal portion of the seminal tract for presumptive diagnosis of epididymal obstruction.

Herein the clinical features and outcome of these 10 cases are discussed retrospectively.

The average age of the patients was 32.8 years old, the average of testicular volume 18.5 ml and the average level of serum FSH 4.55 mIU/ml. In 3 cases with modified Johnsen's score above 9.0, spermatozoa were recognized in the epididymal fluid. However, 7 cases with no spermatozoa from the epididymis showed average score 6.8. In 2 of 3 cases with spermatozoa from the epididymis, spermatozoa were obtained in the ejaculate postoperatively. Out of 7 cases who showed no spermatozoa in the epididymal fluid, only one case, diagnosed obstructive azoospermia due to acute bilateral epididymitis, showed a few sperms in the postoperative ejaculate. However, no pregnancy has been reported in the 3 cases within 2 years follow-up.

(受付: 1994年6月3日)

(受理: 1994年8月22日)

Purified FSHのstep down dosage投与方法と
GnRH agonistによる内因性LH surgeを利用した排卵誘発法：
卵巣過剰刺激症候群発生のハイリスク症例に対する新しい試み

Combined Ovulation Induction Method of Step-down Dosage Regimen of
Purified FSH and Application of GnRH_a for Induction of
an Endogeneous Pre-Ovulatory LH surge:
A New Approach to Treatment for Women at Risk of Developing OHSS

札幌医科大学産婦人科学教室

西川 鑑
Akira NISHIKAWA

木谷 保
Tamotsu KIYA

工藤 隆一
Ryuichi KUDO

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

函館五稜郭病院産婦人科

水元 久修
Hisanobu MIZUMOTO

田中 恵
Satoshi TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology
Hakodate Goryoukaku Hospital, Hokkaido 040 Japan

多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome ; PCOS) などの卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome ; OHSS) 発生のリスクが高い症例に、ゴナドトロピン療法を行う場合、OHSSの予防が重要な問題となる。OHSS発生の予防のためLHをほとんど含まないpure-FSHが開発され、step down dosage法などの投与方法が報告されている。また、最近hMGで卵巣を刺激した後、hCGの代わりにGnRH_aを投与し内因性LH surgeを利用した排卵誘発による良好な成績が報告された。今回、過去に重症のOHSSの既往を持つ3例のPCOSと1例の無月経患者を含む5例にpure-FSHのstep down dosage法とGnRH_aによる内因性LH surgeを利用した排卵誘発法を組み合わせた方法を試みた。その結果、排卵は14周期中12周期、86%にみられ、妊娠は4周期、29%、5例中4例が妊娠した。OHSSの発生は14周期中3周期、21%に見られたが、以前の治療に比べて軽症であった。本法は、OHSS発生のリスクの高い無排卵症例に対して有効であると考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 50 - 56, 1995)

緒 言

無排卵を呈する多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 症例に対する排卵誘発の場合、Clomiphene療法が最初に行われるが、無効の場合hMG-hCG療法が行われる。しかし、PCOS症例ではLHの分泌が過剰なこともあり、

副作用として重度の卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) が頻発するのが難点であった。OHSS発生の予防のためLHをほとんど含まないFSH製剤 (purified FSH ; 以下、pFSHと略す)が開発されその成績が報告されている。さらに、使用方法についても研究され、Low dose法^{1,3,7,9)}や、最初にやや大量のpFSHを投与し血

中のFSHレベルを上昇させた後、以後は投与量を減少させFSHレベルを漸減させ、この間FSHを優位に、LHを低値に保つことを目的としたstep down dosage法などの投与方法が報告されている^{5,11)}。また、最近、hMGで卵巣を刺激した後、hCGの代わりにGonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa)を投与し内因性LH surgeを利用した排卵誘発による良好な成績が報告された^{2,4,8)}。しかし、これらの報告がなされている一方で、OHSSの発症は完全には防止できず、時には非常に重篤な病態を呈することもある。

今回、我々はOHSS発症のハイリスク群であるPCOS症例を中心に、pFSHのstep down dosage法とGnRHaによる内因性LH surgeを利用した排卵誘発法を組み合わせ、良好な結果を得たので報告する。

対 象

今回、対象として札幌医科大学産婦人科外来ならびに函館五稜郭病院産婦人科外来通院中の患者のうち、OHSS発症のハイリスク群として過去に重症のOHSSの既往を持つPCOS患者3例とPCOS以外でOHSSの既往を持つ1例、また、Clomiphene citrateによる治療抵抗例の1例を選択した(表1)。各症例の経過を簡単に示す。

症例1：1987年、無月経のため外来受診以来、Clomiphene citrate(クロミッド®)、Bromocriptine(パロデル®)を中心に治療していたが、排卵のない周期が多く、消退出血を起こしながら治療を継続していた。結婚後、妊娠を目的としてゴナドトロピン療法に変更したが、1993年3月Clomiphene-pFSH-hCG療法により、腹部膨満感を強く訴え腹水もみられ、重症のOHSSを呈したため入院管理が必要となった。このためOHSS予防を目的として1993年7月より今回の方法を試みた。

症例2：1991年3月、無月経、不妊のため初診。

Clomipheneを中心とした治療では排卵せず、1992年10月HMG-hCGによる排卵誘発を行ったところ、重症のOHSSを発症した。その後、Clomiphene-pFSH-hCGの投与によりOHSSを起こさずに排卵していたが妊娠せず、1993年7月pFSH step down-hCG療法に切り替えたところ、中等度のOHSSの発症をみた。そのためOHSSの発症防止を目的として同年10月より本法を開始した。

症例3：1991年3月、無月経のため初診。Clomipheneを中心とした治療を行っていたが、排卵しない周期も多く、また、結婚したため妊娠を目的とした治療に切り替えた。1993年1月Clomiphene-pFSH-hCGの投与により重症OHSSを発症、さらに、同年6月pFSH step down-hCG療法に変更したが、同様にOHSSを発症した。そのため、OHSSの発症防止を目的として同年9月より本法を開始した。

症例4：1992年9月、無月経、不妊のため当科初診。5年前と6年前に妊娠初期での流産の既往あり。前医よりHMG-hCG療法を施行しており、当科でもHMG-hCG療法を開始した。各周期とも中等症～重症のOHSSを呈したが、2周期目で妊娠に成功したものの、妊娠5週で自然流産に至り、習慣性流産として原因を検索したところ、ループスアンチコアグラント陽性のため、プレドニン投与を開始し、陰性化したことを確認した。その後、OHSSのハイリスク群と考えpFSH step down-hCG療法を行い、軽症のOHSSを呈したものの妊娠に成功したが、また妊娠5週で流産に至った。そのため習慣性流産に対する免疫療法を施行し1994年1月本法を施行することとした。

症例5：1994年1月、不妊のため当科初診。前医にてClomiphene, Bromocriptineを中心とした治療を3年間続けていたが、基礎体温上は排卵のない周期も多くみられたため、ゴナドトロピン療法に変更する

表1 各症例の診断名とホルモン検査の結果

症例	年齢	診断名	不妊期間	男性因子	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	E ₂ (pg/ml)	Testosterone (ng/dl)	PRL (ng/ml)	Necklace sign	OHSS発症の既往
1	28	原発性不妊症, PCO, 高プロラクチン血症	2年	あり	16	8.2	52	98	30.2	あり	あり(重症)
2	27	原発性不妊症, PCO	5年	あり	16.1	7.3	43	n.t.	12	あり	あり(重症)
3	23	原発性不妊症, PCO	2年	なし	17	6.2	19.2	n.t.	12	あり	あり(重症)
4	32	第1度無月経, 習慣性流産	9年	あり	6.2	8.3	37.7	43.5	3.1	あり	あり(重症)
5	32	原発性不妊症, 高プロラクチン血症	5年	あり	7.7	9.9	33.2	0.6	22	あり	なし

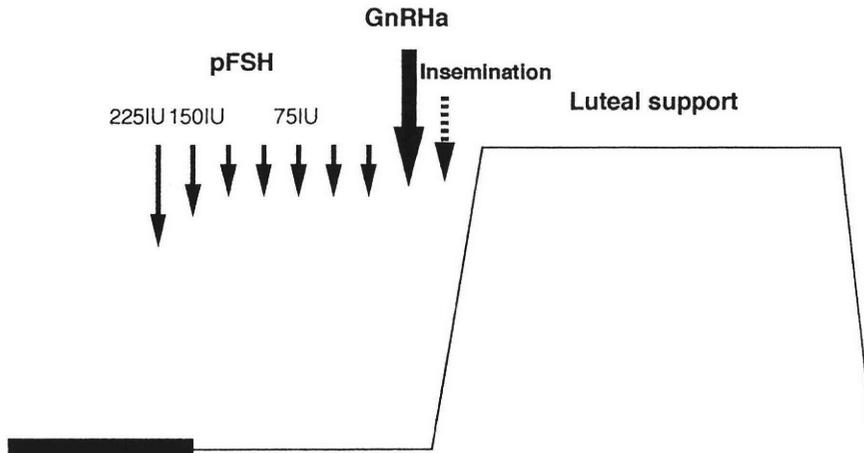


図1 排卵誘発のプロトコール

ことにした。またホルモン検査ではPCOSは否定的であったが超音波断層像にてOHSSのハイリスク群と考えられるnecklace signを認めたため、1994年1月、本法を施行することとした。

各症例の診断名とホルモン検査の結果等を表1に示す。なお、持続的におこる無排卵と、血中FSH基礎値が正常または低値で血中LH基礎値が15mIU/ml以上の症例をPCOと診断した。また、全例でOHSSのリスクファクターと考えられるいわゆる“Necklace sign”⁶⁾が卵巣の超音波検査にて認められた。さらに、症例3以外は精液検査にて男性不妊因子も認められた。

方 法

図1にこの方法を示す。すなわち、月経5日目からpFSH(フェルティノームP[®])の投与を開始し、初日にpFSH, 225IU, 第2日に150IU, と減量し、第3日目以降は75IUの低容量で連日筋注ないし皮下注を行い最大卵胞径が18mmを越えたところで、GnRH α (スプレキュア[®])150 μ gを1回、あるいは8時間毎に2ないし3回鼻腔内に投与し、その24~36時間後にPercoll法により調整した精液を用いて、人工授精を行った。卵胞の反応が悪い症例に関しては初日、第2日にpFSH, 225IU, 第3, 4日に150IU, と減量し、第5日目以降は75IUの低容量で連日筋注ないし皮下注を行った。基礎体温、超音波で排卵確認後、Duphastonを内服させたが、OHSS発生の可能性が低いと考えられた場合はLuteal supportとしてhCGを投与した。

成 績

表2に各症例の治療経過を示す。

症例1：pFSHを月経5日目から連日で225IU, 150IU, 75IU, 75IU.....と漸減する方法により、OHSSを発症することなく、5周期の排卵誘発を行い5周期目で妊娠に成功した。5周期目はGnRH α 150 μ gを8時間毎2回鼻腔内に投与し排卵を引き起こした。妊娠5週で子宮内に胎嚢を確認したが、妊娠6週にて流産に至った。なお、流産後、諸検査施行したところ、抗核抗体陽性であった。

症例2：1周期目はpFSHを月経5日目から連日で225IU, 225IU, 150IU, 150IU, 75IU, 75IU, 75IU.....と漸減して投与し、排卵がみられたがその後、軽度のOHSSが発症した。そのため2周期目は225IU, 150IU, 75IU, 75IU.....と漸減したところ卵胞の発育が悪く、pFSHによる刺激中に性器出血が始まりGnRH α を投与することなくキャンセルした。3周期目は2周期目と同様に排卵誘発を行ったが月経14日目で最大卵胞径が20mmとなり翌日GnRH α 150 μ gを8時間毎2回鼻腔内に投与し排卵誘発に成功した。4周期目も2周期目と同様に排卵誘発を行ったが、月経15日目で最大卵胞径が12mmと発育が悪く性器出血も始まったためGnRH α を投与することなくキャンセルした。

症例3：pFSHを月経5日目から連日で225IU, 150IU, 75IU, 75IU.....と漸減する方法により、1周期目は軽度の卵巣腫大がみられたが、2周期目はOHSSの所見はみられなかった。3周期目はGnRH α 150 μ gを8時間毎3回鼻腔内に投与し、排卵を起こした。軽

表2 各周期の治療内容と結果

症例	周期	pFSHの総投与単位 (IU)	GnRHa投与前の最大卵胞径 (mm)	GnRHaの投与方法	排卵の有無	AIH施行の有無	OHSSの発症	Luteal support	妊娠の有無
1	1	825	26	150 μ g	あり	あり	なし	Duphaston	なし
	2	750	20	150 μ g	あり	あり	なし	Duphaston	なし
	3	675	20	150 μ g	あり	あり	なし	Duphaston	なし
	4	675	18	150 μ g	あり	あり	なし	Duphaston	なし
	5	825	20	150 μ g \times 2	あり	あり	なし	hCG	あり
2	1	900	26	150 μ g	あり	あり	あり(軽症)	Duphaston	なし
	2	1125	12	キャンセル					
	3	975	20	150 μ g \times 2	あり	あり	なし	Duphaston	なし
	4	975	12	キャンセル					
3	1	750	21	150 μ g	あり	あり	あり(軽症)	Duphaston	なし
	2	825	20	150 μ g	あり	あり	なし	Duphaston	なし
	3	825	21	150 μ g \times 3	あり	あり	あり(軽症)	hCG	あり
4	1	1050	20	150 μ g \times 2	あり	あり	なし	hCG	あり
5	1	675	18	150 μ g \times 2	あり	あり	なし	hCG	あり

度の卵巣腫大がみられたが、Luteal supportのためhCGを投与し、月経34日目で妊娠反応陽性となり、その後品胎であることを確認した。現在妊娠16週で順調に経過している。

症例4：pFSHを月経5日目から連日で225IU, 225IU, 150IU, 150IU, 75IU, 75IU, 75IU.....と漸減し、GnRHa 150 μ gを8時間毎に2回鼻腔内に投与し、排卵確認後Luteal supportのためhCGを投与した。OHSSを発症することなく、1周期目で妊娠し、妊娠確認後3回目の免疫療法施行した。単胎で児心拍も検出され現在妊娠10週で妊娠継続中である。

症例5：pFSHを月経5日目から連日で225IU, 150IU, 75IU, 75IU, 75IU.....と漸減して投与し、GnRHa 150 μ gを8時間毎に2回鼻腔内に投与した。排卵確認後Luteal supportのためhCG 500IUを3回投与した。OHSSを発症することなく月経27日目で妊娠反応陽性となり単胎で児心拍が陽性であることを確認し、妊娠10週で転居のため他院を紹介した。

内因性LH surgeを確認するため、GnRHa投与前後にL-Check®を用いて尿中LHを測定し内因性LH surgeが起きているかどうかを検討した。その結果、GnRHa 150 μ gを1回鼻腔内に投与した場合でも、投与前は陰性であったが、投与翌日は陽性であることが確認され、内因性LH surgeが起きていることが確認された。

黄体期にはLuteal supportとしてDuphaston 15mgを内服させていたが、症例3において黄体中期の血中プロゲステロンが1.4ng/mlと低く、基礎体温も低下し

た周期があり、その後は排卵前のエストラジオール、排卵前後の卵巣の超音波像を観察しOHSSのリスクが低いと考えられた場合はLutesl supportとしてhCGの投与を行った。hCGはGnRHaにより排卵を引き起こしてから2～3日経過した後、5000IUを3～4日毎に投与した。妊娠した場合はいずれもhCGの投与を行った周期であったが1例で軽度の卵巣腫大を認めた他、OHSSは認められなかった。

GnRHaの投与方法については、150 μ g 1回の投与で始めたが、内因性LH surgeが確認され、排卵もGnRHaを投与した全周期で認められた。しかし、前述のように黄体機能不全が疑われたためhCGの追加投与と合わせGnRHaも150 μ gを8時間毎2回ないし3回投与したが、特に問題なく良好な結果を得た。

表3に以上の結果をまとめた。周期別に見た排卵率は12/14 = 85.7%。妊娠率は周期別に見ると4/14 = 28.6%。症例別にみると4/5 = 80%になる。OHSSの発症率は周期別にみると3/14 = 21.4%。多胎妊娠が1例で、全妊娠に対して1/4 = 25%。妊娠初期の自然流産が1例で、全妊娠に対して1/4 = 25%であった。また、血中LH値が高値を呈していた3例のPCOS中、2例が妊娠(1例は流産)に対し、血中LH値が正常の2例はいずれも妊娠し継続中である。

考 察

OHSSは排卵誘発によって生ずる医原性の疾患であるが、重症の場合、血液濃縮による血栓症などにより死に至る場合もある。近年、体外受精などの

表3 各症例の成績

症例	排卵誘発の周期数	キャンセルした周期	OHSSを呈した周期	併用療法	妊娠	妊娠経過/注
1	5	0	0	プロモクリプチン	あり	妊娠6週で自然流産
2	4	2*	1		なし	*卵胞の発育悪く中止
3	3	0	2	芍薬甘草湯	あり	品胎で妊娠16週、経過順調
4	1	0	0	習慣性流産に対するリンパ球療法	あり	妊娠10週で継続中
5	1	0	0	プロモクリプチン	あり	妊娠10週で転院のため他院紹介

reproductive technologyの進歩とともに排卵誘発法も発達し、卵巣の過剰刺激も日常的に行われるようになりOHSSの発症数は増加しその予防と治療法が重要な問題となっている⁶⁾。OHSSの発生に関与するリスクファクターとしては、若年齢、PCOS、やせ形、血中の高E₂濃度、多数の卵胞、特に、超音波上、卵胞期初期に直径2～8mm大の卵胞が卵巣表層に数珠つなぎ状に並んでいる所見、いわゆるNecklace sign、妊娠、hCGによる黄体機能賦活、GnRHaを用いたプロトコルなどがあげられている⁶⁾。また、PCOSの排卵誘発の場合、Clomiphene療法が最初に行われるが、無効の場合hMG-hCG療法が行われている。しかし、OHSSのリスクファクターであるPCOS症例においては、重度のOHSSが頻発するのが難点となっている。

OHSS発生の予防のため理想的と考えられるLHをほとんど含まないFSH製剤(フェルティノーム[®])が開発され、良好な成績が報告されているが、従来通りの投与方法ではhMGに比べOHSSの発症率は低いものの発生を防ぐことはできなかった。

さらに、内因性のLHの分泌を抑える目的でGnRHaを併用する療法が行われるようになったが、有効であるという報告の反面、OHSS発生のリスクファクターとも言われている⁶⁾。それは、GnRHaにより人体にとって防御的な役割を持つ早期の黄体化を抑えることで、卵巣刺激を延長することができるようになった結果、E₂値が上昇しかつ卵胞数も増加するためと考えられている。

pFSHの投与方法についてはこれまで種々の報告がなされている。低容量で投与を続けるlow-dose法や^{1,3,7,9)}、最初にやや大量のpFSHを投与し血中のFSHレベルを上昇させた後、以後は投与量を減少させFSHレベルを漸減させ、この間FSHを優位に、LHを低値に保つことを目的としたstep down dosage法などが報告されている^{5,11)}。しかし、この方法を用いても内因性FSHの分泌増加が認められる場合があり、このような場合はOHSSが発生する¹⁰⁾。

また、OHSSのほとんどがhCG投与後に起こり、

さらに、hCGは血中半減期が長く、luteotropicな作用が持続することから、hCGの投与がOHSSを重症化させると考えられている。そのためhCGのかわりにGnRHaを用い血中半減期の短い内因性のLHサージを起し排卵を誘発する方法が最近報告され良好な成績を得ている^{2,4)}。Empeiraら²⁾は、HMG刺激に引き続き8時間毎に3回GnRHa 200 μ gを鼻腔内に投与することにより内因性LH surgeを起す方法を報告している。LH surgeは初回のGnRHa投与後4時間で起きており、また、GnRHa投与後速やかに血中エストラジオール値は低下し、プロゲステロン値は上昇することを報告している。彼らは、hCGにより外因性LH surgeを引き起こした場合の16.8%の妊娠に比べ、この方法では21.6%の高い妊娠率を得ており、また、37例中1例のOHSSも、発生しなかったと述べている。Imoedemheら⁴⁾は、HMG刺激に引き続き8時間毎に2回GnRHa 100 μ gを鼻腔内に投与し、その後ホルモン動態を詳細に検討し、GnRHa投与後1時間でLHおよびFSHは上昇し始め4時間でピークに達したことを示している。また彼らはこの排卵誘発法を用いたIVF-ETにより38例中、1例のOHSSも発生せずに11例の妊娠に成功している。

これらの報告はいずれもGnRHa投与後4時間でLH surgeが起きることを示している。我々は150 μ gのGnRHaを1回だけの投与でもLH surgeが起り排卵の誘発に成功しているが、今回の妊娠成績を考えると150 μ gを8時間毎2回の投与が望ましいと思われる。一方Meerら⁸⁾はHMG刺激後にGnRHa 200 μ gを4時間毎に3回投与し、44周期中10周期(22.7%)の妊娠例を報告している。しかし、そのうち27周期においてOHSSのリスクが発生し、hCG投与を行わなくても3周期で中等度のOHSSが発生し、GnRHaによる排卵誘発法でもOHSSを妨げないとしている。

今回我々の方法により、高い妊娠率を得ることができた。また、臨床的にはほとんど問題とならない軽度のOHSSを3周期で認めた。しかし、これらの症例はpFSH step down-hCG療法でもOHSSを呈するな

ど、いずれもPCOS症例で過去の治療により重症のOHSSを呈した例であることより、OHSSの予防効果は高いと考えられる。Hamilton-Fairleyら³⁾は、血中LH値が高いPCOSの妊娠率は血中LH値が正常の群に比べ著しく低いことを報告しているが、今回の検討では症例数は少ないが3例中2例の妊娠に成功し、Clomiphene citrateなどの治療に抵抗するPCOSの治療法として有用であることが示唆された。さらに、血中LH値が正常の2例はいずれも妊娠し継続中であることから、PCOS以外でHMG-hCG療法の適応となるOHSS発生のハイリスク群や、また、それ以外の症例においても安全で有効な排卵誘発法と考えられた。このように高い妊娠率が得られるのであれば、AIHを併用することで、卵管因子や重症の乏精子症などによる不妊以外の難治性不妊症に対して、体外受精などに移行する前の段階の治療として試みる価値があると考えられる。

文 献

- 1) Dale PO, Tanbo T, Haug E, et al., Polycystic ovary syndrome: low-dose follicle stimulating hormone administration is a safe stimulation regimen even in previous hyper-responsive. *Human Reproduction* 7: 1085, 1992
- 2) Empeaire J-C and Ruffie A, Triggering ovulation with endogenous luteinizing hormone may prevent the ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction* 6: 506, 1991
- 3) Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, et al., Low-dose gonadotropin therapy for induction of ovulation in 100 women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 6: 1095, 1991
- 4) Imoedemhe DAG, Chan, RCW, Sigue AB, et al., A new approach to the management of patients at risk of ovarian hyperstimulation in an in-vitro fertilization programme. *Human Reproduction* 6: 1088, 1991
- 5) Mizunuma H, Takagi T, Yamada K, et al., The role of endogenous gonadotropin release in the etiology of ovarian enlargement during purified urinary follicle-stimulating hormone therapy. *Fertility Sterility* 55: 66, 1991
- 6) Navot D, Bergh PA and Laufer N, Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertility and Sterility* 58: 249, 1992
- 7) Shohan Z, Patel A and Jacobs HS, Polycystic ovarian syndrome: safety and effectiveness of step-wise and low-dose administration of purified folli-

cle-stimulating hormone. *Fertility Sterility*, 55: 1051, 1991

- 8) van-der-Meer S, Gerris J, Joostens M, et al., Triggering of ovulation using a gonadotrophin-releasing hormone agonist does not prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction* 8: 1628, 1993
- 9) 沖 利通, 森 明人, 堂地 勉 他, 多嚢胞性卵巣症候群に対する Low Dose Pure FSH 投与. *Jpn J Fertil Steril* 38: 408, 1993
- 10) 石丸忠之, OHSSの予防と管理. *臨床婦人科* 46: 1063, 1992
- 11) 藤澤 知, Purified FSH 製剤の Step-down dosage 投与法により妊娠に成功した多嚢胞性卵巣症候群の1例. *Jpn J Fertil Steril* 36: 408, 1991

Combined ovulation induction method of step-down dosage regimen of purified FSH and application of GnRHa for induction of an endogeneous pre-ovulatory LH surge: A new approach to treatment for women at risk of developing OHSS

Akira Nishikawa, Tamotsu Kiya and Ryuichi Kudo

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

Hisanobu Mizumoto and Satoshi Tanaka

Department of Obstetrics and Gynecology
Hakodate Goryoukaku Hospital, Hokkaido 040, Japan

It is important to prevent the ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) by gonadotropin therapy for women at risk of developing the OHSS such as polycystic ovary syndrome (PCOS). Purified follicle stimulating hormone (pFSH) contained no element of luteinizing hormone was exploited to reduce the risk of OHSS. Several regimens to use pFSH were reported such as low dose administration method and step-down method. Recently some articles have been published describing the application of the initial stimulating effect of a gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) for induction of an endogeneous pre-ovulatory luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) surge.

In this study, we report a combined method of the management of women at risk of OHSS, by the use of step-down dosage regimen of pFSH and the application of a GnRHa for induction of an endogeneous pre-ovulatory LH and FSH surge.

This study involved 4 women (3 women with PCOS and an amenorrhea women) who had the history of

severe OHSS by previous therapy and a woman with amenorrhea due to hyperprolactinemia who resisted clomiphencitrate/bromocriptine therapy. These women following ovarian stimulation by step-down dosage regimen of pFSH, received a GnRHa nasal spray for induction of the preovulatory endogeneous LH surge. (The ovulation was induced in 86% of 14 therapeutic cycles) Conception occurred 4 of 5 women (28.6% pregnancy

rate per therapeutic cycle), one of which ended spontaneous abortion and 3 of which are ongoing pregnancies (a single tripple pregnancy is included). Mild OHSS occurred in 3 of 14 therapeutic cycles.

This therapy is a relatively safe and effective method of inducing ovulation.

(受付：1994年5月23日)

(受理：1994年8月24日)

ENDOGENOUS FACTORS AFFECTING STERILITY IN OOCYTES OF AGED ANIMALS

Akira NARITA

Institute of Whole Body Metabolism, Chiba 270-14, Japan

Abstract: We have recently shown that mammalian oocytes morphologically change in the normal range as the animal becomes older. The stored oocytes in primordial follicles tended to diminish in size with age, there being a decrease in the number of mitochondria, Golgi apparatuses, smooth-surfaced endoplasmic reticula, ribosomes, microvilli and desmosomes. On the other hand, the grown oocytes, in antral follicles or immediately after ovulation, tended to enlarge, and to increase the amount of proteinic fibers and neutral-fat droplets with age, but to decrease that of glycogen granules, and to lessen the activities of cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase, Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and adenylate cyclase. These observations suggest that the main factors affecting sterility in the oocytes are a decline in the functions of cell-respiration and electron-transport, and a lack of sensitivity to external stimuli.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 57 - 65, 1995)

Introduction

Mikamo¹⁾ reported that aging of oocytes is classified into three types: 1) aging of intrafollicular oocytes before ovulation, 2) aging of oocytes in the oviduct after ovulation, and 3) aging of oocytes with advancing maternal age. It is generally mentioned that overripeness of oocytes belonging to 1)²⁻⁵⁾ and 2)⁶⁻¹¹⁾ may increase in the rates of abnormality¹²⁻²⁰⁾, atrophy^{7, 19)} and death^{21, 22)} of ova, and decrease the pregnancy rate²³⁻²⁶⁾ and litter size^{23, 27)} in aged animals. However, there is no denying the fact that aging of oocytes belonging to 3)^{5, 13, 18, 20, 28-35)} is recognized in mammal.

Mammalian oocytes derive from oogonia in the ovaries only about the time of their birth³⁶⁾, and do not increase thereafter^{4, 37-39)}. The surviving oocytes in the ovaries, therefore, could age as the animal becomes older. We have recently shown that mouse oocytes morphologically change, even in the normal range, as the animal grows older²⁸⁻³⁵⁾. In this paper, I introduce mainly the our studies on age-related changes in mammalian oocytes, and investigate endogenous factor affecting the sterility in the oocytes of aged animals.

Materials and Methods

In our experiments female mice of the ICR strain were kept and fed normally in a room at 24 °C and lit 14 hours a day, 4 a.m. through 6 p.m.. We used 313 female mice: 2-day-old, 20-day-old (proestrus), 60- to 90-day-old (proestrus) and 360- to 390-day-old (proestrus) mice for stored oocytes in primordial follicles and for grown oocytes in antral follicles in ovaries, and 30-day-old, 60- to 90-day-old and 180- to 210-day-old ones for the grown oocytes immediately after ovulation.

For measurement of size in the stored and grown oocytes, mouse ovaries were fixed in Rossman fluid, embedded in paraffin, serially sectioned at a thickness of 7 μ m, and stained by the hematoxylin and periodic acid-Schiff method⁴⁰⁾. The size of oocytes indicated by the value obtained when the long and short diameters in the largest cross section from each oocyte were added and then the answers were divided by two. A statistical analysis was carried out using the χ^2 -test.

For counting of mitochondrial number, mouse ovaries were removed, fixed in Champy fluid, embedded in paraffin, serially sectioned at a thickness of 3 μ m, and stained by Altmann-Kull method⁴¹⁾. Num-

ber of mitochondria was counted in the large cross section from each oocyte. Concerning the grown oocytes in antral follicles, an additional counting of mitochondria was made in five regions, each as wide as $100 \mu\text{m}^2$, selected at random in the cytoplasm of every oocyte, and then the average was taken. A statistical analysis was performed using the χ^2 -test.

For observation of ultrastructure, mouse ovaries and oocytes immediately after ovulation were fixed in 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde, and then in 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 1% osmium tetroxide, embedded in Quetol 812, cut at a thickness of $0.1 \mu\text{m}$, and stained with uranium acetate and lead citrate.

We used the method of Burstone⁴²⁾ for the demonstration of cytochrome oxidase (CO) activity and that of Nachlas et al.⁴³⁾ for succinate dehydrogenase (SDH) activity in the grown oocytes immediately after ovulation. Activities of CO and SDH were estimated according to the amounts of pyrazolon granules and diformazan granules, respectively. Each of these activities was graded into three groups; none, weak and strong. A statistical analysis was carried out using the t-test after the angle transformation of percentages.

For demonstration of Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (Δ^5 - 3β -HSD) activity, the grown oocytes immediately after ovulation were incubated for 60 minutes at 37°C in a substrate solution prepared according to the Dickmann and Day method⁴⁴⁾, using dehydroepiandrosterone as the substrate. Δ^5 - 3β -HSD activity in the grown oocytes was estimated according to the amount of diformazan granules, and the activity was graded into three groups; none, weak and strong. A statistical analysis was carried out by the same method as described in CO and SDH.

We used periodic acid-Schiff method⁴⁰⁾ for the observation of glycogen granules in the grown oocytes, and Nile blue sulfate method⁴⁵⁾ for the demonstration of neutral-fat droplets. Amounts of glycogen granules and neutral-fat droplets were estimated according to the amount red-purple granules stained with periodic acid-Schiff method⁴⁰⁾ and pink droplets stained with Nile blue sulfate⁴⁵⁾, respectively. These amounts were graded into three groups; none, small and large. A statistical analysis was carried out

by the same method as mentioned in CO and SDH.

We employed the method of Wagner et al.⁴⁶⁾ for demonstration of adenylate cyclase (AC) activity in the grown oocytes. Using this method, lead granules, high in electron density were deposited on the cytoplasmic membrane of the grown oocytes. AC activity was estimated according to the amount of lead granules, and graded into three groups; none, weak and strong. A statistical analysis was carried out by the same method as mentioned in CO and SDH.

Results

1) Size of Oocytes²⁸⁾

As shown in Fig. 1, the size of the stored oocytes in primordial follicles tended to diminish as the animals became older. There were significant differences among the age groups of the animals.

The size of the grown oocytes in antral follicles tended to increase with age (Fig. 2). There were significant differences among the age groups of the animals.

2) Number of Mitochondria²⁹⁾

The number of mitochondria in the largest cross section from each of the stored oocytes in primordial follicles, as shown in Fig. 3, tended to decrease as animals became older. There were significant differences in the number of mitochondria between 2-day-old animals and the others as well as between 360- to 390-day-old ones and the others.

The number of mitochondria in the largest cross section from each of the grown oocytes in antral follicles, as shown in Fig. 4, did not show a significant difference as animals became older.

The number of mitochondria per $100 \mu\text{m}^2$ in the largest cross section from each of the grown oocyte, however, tended to decrease with age (Fig. 5). There were significant differences among the age groups of the animals.

3) Ultrastructure³⁰⁾

Ultrastructural changes of the stored and grown oocytes with age were summarized in Table 1.

In the stored oocytes, microvilli and desmosomes became fewer as the mice grew older, and had an even wider space between oocytes and granulosa cells. Fibrous strands of higher electron density was observed in the cytoplasm of some oocytes in 360- to

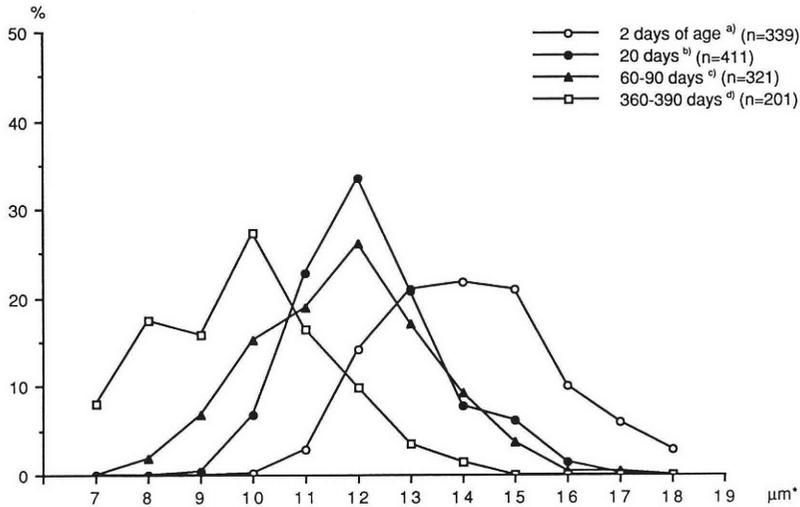


Fig. 1 Percentages of different sized stored oocytes in primordial follicles in mice at various ages
*Diameter of oocytes Significantly different among a), b), c) and d) (p<0.001)

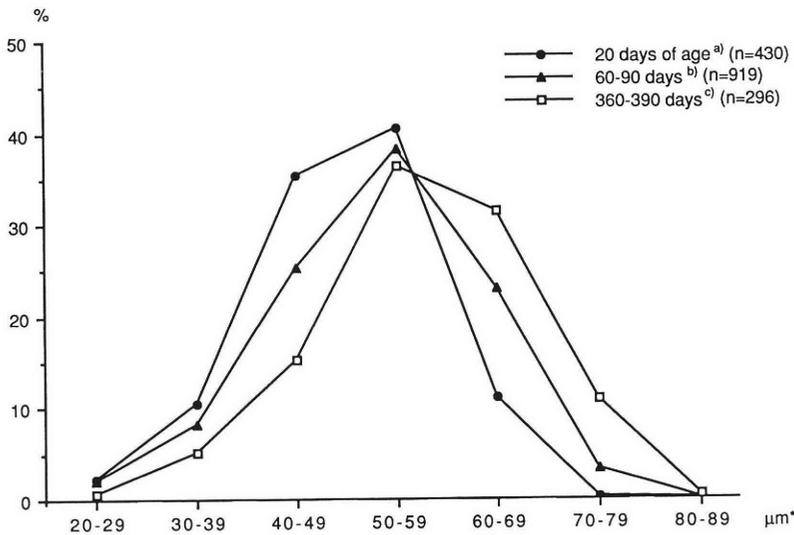


Fig. 2 Percentages of different sized grown oocytes in antral follicles in mice at various ages
*Diameter of oocytes Significantly different among a), b) and c) (p<0.001)

390-day-old mice (Fig. 6).

In the grown oocytes immediately after ovulation, the mitochondria tended to become smaller as the animals became older, and the number of their cristae to decrease. Cortical granules and proteinic fibers tended to increase with age.

4) Activities of CO and SDH³¹⁾

The number (%) of the grown oocytes immediately after ovulation showing CO and SDH activities was

shown in Table 2.

CO activity existed in all the grown oocytes immediately after ovulation, but the activity was strong in 89.4% of the oocytes in 30-day-old mice, in 77.9% of 60- to 90-day-old ones, and in 55.3% in 180- to 210-day-old ones, showing significant differences among the age groups.

SDH activity was lacking in some of the grown oocytes immediately after ovulation from every age

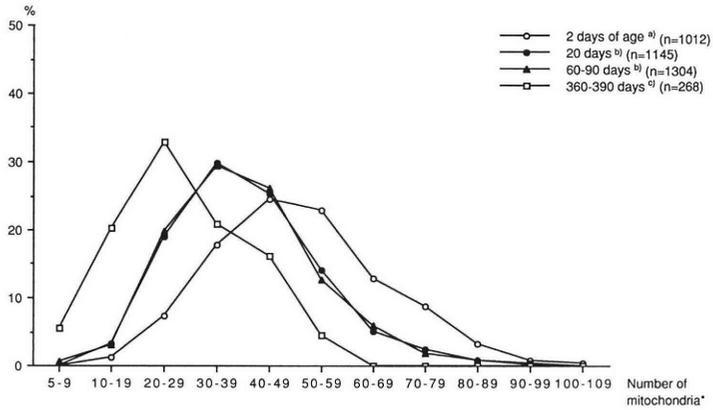


Fig. 3 Percentages of stored oocytes containing different number of mitochondria in primordial follicles in mice at various ages

*Number of mitochondria in the largest cross section from each oocyte

Significantly different among a), b) and c) ($p < 0.001$)

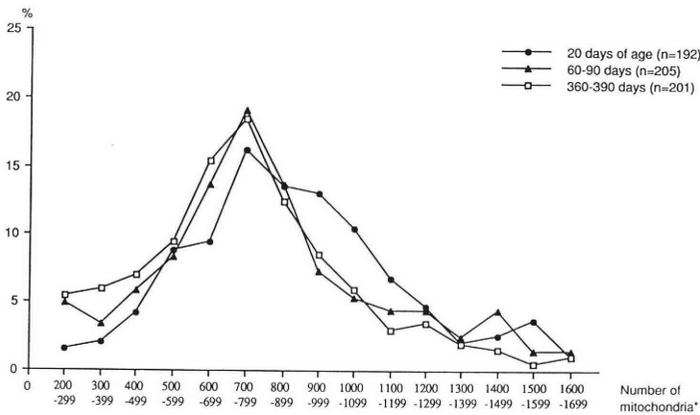


Fig. 4 Percentages of grown oocytes containing different number of mitochondria in antral follicles in mice at various ages

*Number of mitochondria in the largest cross section from each oocyte

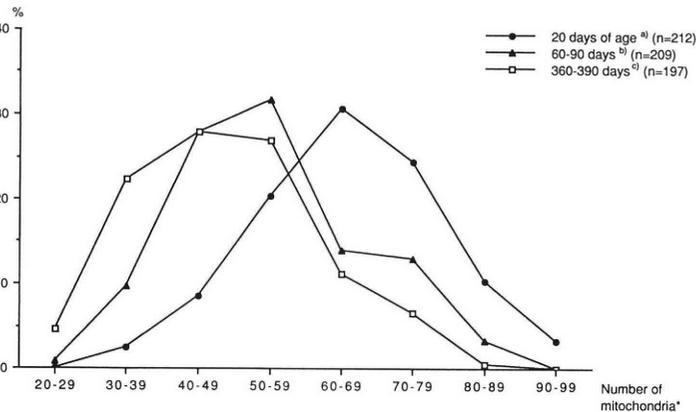


Fig.5 Percentages of grown oocytes containing different number of mitochondria per $100\mu\text{m}^2$ in antral follicles in mice at various ages

*Number of mitochondria in the largest cross section from each oocyte

Significantly different among a), b) and c) ($p < 0.001$)

Table 1 Ultrastructural changes of oocytes of mice with the advancement of age

Stored oocytes in primordial follicles	2 days of age	→	20 ~ 90 days	→	360 ~ 390 days
Size of mitochondria (Mt.)			>		>
No. of lamellar cristae in Mt.			>		>
Size of Golgi apparatuses			>		>
No. of smooth-surfaced ER			>		>
No. of ribosomes			>		>
No. of microvilli			>		>
No. of desmosomes			>		>
Grown oocytes immediately after ovulation	30 days of age	→	60 ~ 90 days	→	180 ~ 210 days
Size of Mt.			=		>
No. of lamellar cristae in Mt.			=		>
No. of cortical granules			<		=
No. of proteinic fibers			=		<

Table 2 The number (%) of grown oocytes immediately after ovulation showing CO and SDH activities in mice at various ages

Age groups (days)	CO activity			SDH activity				
	No. of oocytes observed*	None	Weak	Strong	No. of oocytes observed*	None	Weak	Strong
30	104	0 (0.0)	11 (10.6) ^{ac}	93 (89.4) ^{df}	166	24 (14.4) ^g	26 (15.7) ^{hj}	116 (69.9) ^{km}
60 ~ 90	145	0 (0.0)	32 (22.1) ^{ab}	113 (77.9) ^{de}	115	21 (18.3)	30 (26.1) ^{hi}	64 (55.6) ^{kl}
180 ~ 210	94	0 (0.0)	42 (44.7) ^{bc}	52 (55.3) ^{ef}	103	22 (21.4) ^g	37 (35.9) ^{ij}	44 (42.7) ^{lm}

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters [a, d, g, i, k: $P < 0.05$; h, l: $P < 0.01$; b, c, e, f, j, m: $P < 0.001$].

group. The activity was strong in 69.9% of the oocytes of 30-day-old mice, in 55.6% of 60- to 90-day-old ones, and in 42.7% of 180- to 210-day-old ones, respectively. There were significant differences among the age groups.

5) Δ^5 -3 β -HSD Activity³²⁾

Δ^5 -3 β -HSD activity existed in all the grown

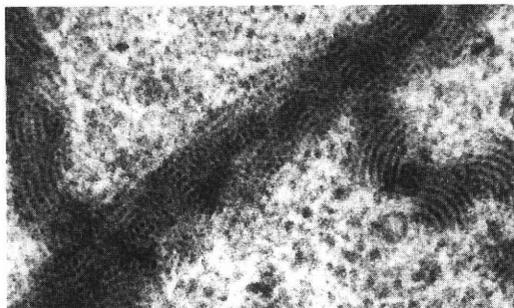


Fig. 6 Aggregates of fibrous strands in a stored oocyte in primordial follicles of 390-day-old mouse ($\times 100,000$)

oocytes immediately after ovulation, but the activity was strong in 62.9% of the oocytes of 30-day-old mice, in 63.4% of 60- to 90-day-old ones, and in 36.2% of 180- to 210-day-old ones, showing significant differences among the age groups (Table 3).

6) Glycogen Granules³³⁾ and Neutral-Fat Droplets³⁴⁾

The number (%) of the grown oocytes immediately after ovulation containing glycogen and neutral-fat droplets in mice at various ages were shown in Table 4.

Table 3 The number (%) of grown oocytes immediately after ovulation showing Δ^5 -3 β -HSD activity in mice at various ages

Age groups [days]	No. of oocytes observed*	Δ^5 -3 β -HSD activity		
		None	Weak	Strong
30	97	0 (0.0)	36 (37.1) ^a	61 (62.9) ^c
60 ~ 90	153	0 (0.0)	56 (36.6) ^b	97 (63.4) ^d
180 ~ 210	105	0 (0.0)	67 (63.8) ^{ab}	38 (36.2) ^{cd}

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters [a, b, c, d: $P < 0.01$].

Table 4 The number (%) of grown oocytes immediately after ovulation containing glycogen granules and neutral-fat droplets in mice at various ages

Age groups (days)	No. of oocytes observed*	Glycogen granules			No. of oocytes observed*	Neutral-fat droplets		
		None	Small	Large		None	Small	Large
30	358	0 (0.0)	111 (31.0) ^{ab}	247 (69.0) ^{cd}	150	150 (100.0) ^e	0 (0.0) ^g	0 (0.0)
60 ~ 90	519	2 (0.4)	214 (41.2) ^a	303 (58.4) ^c	208	206 (99.0) ^f	2 (1.0) ^h	0 (0.0)
180 ~ 210	329	3 (0.9)	149 (45.3) ^b	177 (53.8) ^d	160	150 (93.7) ^{ef}	10 (6.3) ^{gh}	0 (0.0)

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters [f, h: $P < 0.05$; a, b, c, d, e, g, : $P < 0.01$].

Table 5 The number (%) of grown oocytes immediately after ovulation showing AC activity in mice at various ages

Age groups [days]	No. of oocytes observed*	AC activity		
		None	Weak	Strong
30	29	0 (0.0)	11 (37.9) ^a	18 (62.1) ^c
60 ~ 90	35	0 (0.0)	15 (42.9) ^b	20 (57.1) ^d
180 ~ 210	31	0 (0.0)	18 (58.1) ^{ab}	13 (41.9) ^{cd}

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters [a, b, c, d: $P < 0.001$].

Most of the grown oocytes were containing glycogen granules. The percentages of the oocytes containing large amount of glycogen granules, however, significantly decreased as mice grew older.

All of the grown oocytes were not containing neutral-fat droplet in 30-day-old mice. But the percentages of oocytes containing small amount of neutral-fat droplets were 1.0% in 60- to 90-day-old ones, 6.3% in 180- to 210-day-old ones, showing a significant difference between 180- to 210-day-old mice and the other two age groups.

7) AC Activity³⁵⁾

AC activity was detected as lead granules high in electron density on the cytoplasmic membrane. All of the grown oocytes were showing AC activity, but a strong activity was observed in 62.1% of the grown oocytes from 30-day-old mice, in 57.1% of those from 60- to 90-day-old ones, in 41.9% of those from 180- to 210-day-old ones (Table 5). There were significant differences between 180- to 210-day-old ones and the others.

Discussion

We stated that the stored oocytes tend to diminish

in size as the mice get older, there being a decrease in the number of mitochondria, Golgi apparatuses, smooth-surfaced endoplasmic reticula, ribosomes, microvilli and desmosomes discovered in this study (28 ~ 30). And we mentioned that the grown oocytes tend to enlarge, and to increase the amount of proteinic fibers and neutral-fat droplets, but to decrease that of glycogen granules and to lessen the activities of CO, SDH, $\Delta^5-3\beta$ -HSD and AC^{28, 30 ~ 35)}. These facts concerning the oocytes suggest that the main factors affecting sterility are a decline in the capacity for cell-respiration and electron-transport which depend on the decrease in mitochondrial function in the stored and grown oocytes, and a lack of sensitivity to external stimuli caused by the decrease in the number of junctions with granulosa cells in the stored oocytes and by that in AC activity on the plasma membrane in the grown oocytes.

Parkening and Soderwall⁴⁷⁾ reported that SDH activity in hamster blastocysts was not significantly different in young rats (90- to 150-day-old) from that in aged ones (420- to 510-day-old). This discrepancy may be due, not to the difference in the species or the age, but rather to the developmental stage of the ova. Oocytes showing only weak CO and SDH activity or none at all will usually atrophy. The activity of some of the oocytes, however, may become strong after fertilization and the fertilized eggs will develop into blastocysts. The blastocysts which survived, therefore, may show the same activity in any aged animal. The oocytes will age with the advance of maternal age, but the embryos after fertilization will not do so because the fertilized ones are cytologically new life. SDH activity in hepatic cells⁴⁸⁾ of mice, rats and man, renal cells⁴⁹⁾ and brain cells⁵⁰⁾ of rats, and mus-

cle fibers⁵¹⁾ of hamsters decreases as the animals grow older. And CO activity in hepatic cells⁵²⁾ and renal cells⁴⁹⁾ of rats, and muscle fibers of human beings^{53~55)} also decreases with age. Thus the activities of mitochondrial enzymes in mammalian cells may generally decrease as the animals become older, suggesting a decline in the functions of cell-respiration and of electron-transport.

In recent years, it has been reported that alterations in mitochondrial DNA in cells are concerned with age-related changes^{56~61)}. Linnane et al.⁵⁶⁾ mentioned that the accumulation of mitochondrial DNA mutations in the reproductive germ cell line would also probably result in the formation of non-functional gametes, or non-viable zygotes after fertilization. On the other hand, Kitagawa et al.⁶²⁾ stated that most mitochondrial DNA in fertilized eggs must originate in the oocytes because the number of mitochondria in spermatozoa is much smaller than that in oocytes. The decrease in mitochondrial function in the oocytes of aged animals in our studies^{29~31)} may therefore be due to the alteration of mitochondrial DNA.

Δ^5 -3 β -HSD activity directly relates to steroid biosynthesis, and was increased by hCG⁶³⁾. However, we mentioned that Δ^5 -3 β -HSD activity of the grown oocytes decreased as the mice grew older, and that the activity was not increased by hCG in aged animals³²⁾. Parkening et al.^{64, 65)} reported that the amounts of FSH and LH in the sera of senescent mice were significantly larger than those in the sera of young ones either at estrus or diestrus. These facts suggest that sensitivity to gonadotrophic hormone (GTH) decreases in the grown oocytes as animals grew older. On the other hand, it is generally agreed that in the steroid synthesizing cells, GTH accelerates steroid synthesis through activating the AC in the plasma membrane⁶³⁾. We reported that AC activity of the grown oocytes decrease with age³⁵⁾. The reason for the reduction of sensitivity to hCG in the grown oocytes of aged mice, therefore, would be attributed to the reduction of AC activity.

Acknowledgements

I am grateful to Prof. K. Ishida, Dr. S. Kusuhara and Dr. S. Niimura, Faculty of Agriculture, and Prof.

H. Iwasawa and Prof. Y. Honma, Faculty of Science, Niigata University, and Prof. A. Shigematsu, Institute of Whole Body Metabolism, for giving me helpful advice and criticism.

References

- 1) Mikamo K, Ranshi no Eijingu to Sentenijo. Hokkaido Igaku Zasshi 52: 226, 1977
- 2) Jongbloet PH, The effects of preovulatory over-ripeness of human eggs on development. In: Blandau RJ, ed, Aging Gametes, 1 ed, p300, S Karger, 1975
- 3) Butcher RL, The role of intrauterine environment and intrafollicular aging of the oocyte on implantation rates and development. In: Blandau RJ, ed, Aging Gametes, 1 ed, p201, S Karger, 1975
- 4) Talbert GB, Effect of aging of the ovaries and female gametes on reproductive capacity. In: Schneider EL, ed, The Aging Reproductive System, 1 ed, p59, Raven Press, 1978
- 5) Peluso JJ, England-Charlesworth C, Hutz R, Effect of age and of follicular aging on the preovulatory oocyte. Biol Reprod 22: 999, 1980
- 6) Szollosi D, Mammalian eggs aging in the fallopian tubes. In: Blandau RJ, ed, Aging Gametes, 1 ed, p98, S Karger, 1975
- 7) Parkening TA, Soderwall AL, Delayed fertilization and preimplantation loss in senescent golden hamsters. Biol Reprod 12: 618, 1975
- 8) Webb M, Howlett SK, Maro B, Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. J Embryol Exp Morph 95: 131, 1986
- 9) Wissen BV, Bomsel-Helmreich O, Debey P, et al., Fertilization and ageing processes in non-divided human oocytes after GnRH treatment: an analysis of individual oocytes. Hum Reprod 6: 879, 1991
- 10) Bergere M, Selva J, Dulioust E, et al., Influence of male sexual rest and oocyte aging on parthenogenesis frequency in mice: cytogenetic analysis after *in vitro* fertilization. Arch Androl 28: 115, 1992
- 11) Jongbloet PH, Aging gametes in relation to incidence, gender, and twinning in Down Syndrome. Am J Med Genet 42: 855, 1992
- 12) Talbert GB, Krohn PL, Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy in mice. J Reprod Fertil 11: 399, 1966
- 13) Henderson SA, Edwards RG, Chiasma frequency and maternal age in mammals. Nature 218: 1968
- 14) Fabricant JD, Schneider EL, Studies of the genetic and immunologic components of the maternal age

- effect. *Dev Biol* 66: 337, 1978
- 15) Maudlin I, Fraser LR, Maternal age and the incidence of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos. *J Reprod Fertil* 54: 423, 1978
 - 16) Yamauchi S, Ageing and sexual function — General discussions and particular reference to the case in cattle —. *Jpn J Zootech Sci* 49: 387, 1978
 - 17) Tease C, Similar dose-related chromosome non-disjunction in young and old female mice after X-irradiation. *Mut Res* 95: 287, 1982
 - 18) Tease C, Fisher G, Oocytes from young and old female mice respond differently to colchicine. *Mut Res* 173: 31, 1986
 - 19) Onodera M, Ishijima Y, Effect of maternal age on viability of ova in mice. *Jpn J Fertil Steril* 32: 114, 1987
 - 20) Yamaguchi T, Study of incidence of anuclear oocyte *in vitro* in aged mouse. *Hokkaido Igaku Zasshi* 62: 537, 1987
 - 21) Finn CA, Embryonic death in aged mice. *Nature* 194: 499, 1962
 - 22) Finn CA, Reproductive capacity and litter size in mice: effect of age and environment. *J Reprod Fertil* 6: 205, 1963
 - 23) Kita M, Ino T, Reproductive performance of aged female mice. *Jpn J Fertil Steril* 18: 216, 1973
 - 24) Mizoguchi H, Dukelow WR, Fertilizability of ova from young or old hamsters after spontaneous or induced ovulation. *Fertil Steril* 35: 79, 1981
 - 25) Padilla SL, Garcia JE, Effect of maternal age and number of *in vitro* fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 52: 270, 1989
 - 26) Tappa B, Amao H, Ogasa A, et al., Changes in the estrous cycle and number of ovulated and fertilized ova in aging female IV CS mice. *Exp Anim* 38: 115, 1989
 - 27) Donahue RP, Normal and abnormal chromosomal behavior in the meiotic divisions of mammalian oocytes. In: Blandau RJ, ed, *Aging Gametes*, 1 ed, p50, S Karger, 1975
 - 28) Narita A, Ishida K, Aging changes of mice in the size of oocytes, nuclei and nucleoli. *Jpn J Fertil Steril* 34: 353, 1989
 - 29) Narita A, Ishida K, Age-related changes in the number of mitochondria in mouse oocytes. *Jpn J Zootech Sci* 61: 30, 1990
 - 30) Narita A, Niimura S, Ishida K, Ultrastructural changes of oocytes of mice with the advancement of age. *Jpn J Anim Reprod* 36: 83, 1990
 - 31) Narita A, Niimura S, Ishida K, Age-related changes in the activities of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase in mouse oocytes. *Bull Fac Agr Niigata Univ* 43: 129, 1991
 - 32) Narita A, Niimura S, Ishida K, Age-related changes of $\Delta^5-3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse oocytes. *J Mamm Ova Res* 7: 55, 1990
 - 33) Narita A, Niimura S, Ishida K, Age-related changes in the percentage of glycogen-laden oocytes in mice. *Jpn J Fertil Steril* 35: 444, 1990
 - 34) Narita A, Niimura S, Ishida K, Age-related changes in the amount of lipids in mouse oocytes. *J Mamm Ova Res* 7: 61, 1990
 - 35) Narita A, Niimura S, Ishida K, Age-related changes in adenylate cyclase activity in mouse oocytes. *J Reprod Devel* 38: 1, 1992
 - 36) Hamaguchi S, Tanimura A, Shibata N, et al., Seisen no Pasupekutibu. In: Ishida K, Iwasawa H, eds, *Seisen no Baiomekanizumu*, 1 ed, p397, IPC, 1990
 - 37) Jones EC, The ageing ovary and its influence on reproductive capacity. *J Reprod Fertil* 12: 17, 1970
 - 38) Foote RH, The gametogenic function of the aging ovary in the mammal. In: Blandau RJ, ed, *Aging Gametes*, 1 ed, p179, S Karger, 1975
 - 39) vom Saal FS, Finch CE, Reproductive senescence: phenomena and mechanisms in mammals and selected vertebrates. In: Knobil E, Neill J, eds, *The Physiology of Reproduction*, 1 ed, p2351, Raven Press, 1988
 - 40) McManus JFA, Histological and histochemical use of periodic acid. *Stain Technol* 23: 99, 1948
 - 41) Sano Y, *Histological Technics*, 6 ed, p251, Nanzando, 1985
 - 42) Burstone MS, *Enzyme Histochemistry*, p462, Academic Press, 1962
 - 43) Nachlas MM, Tsou KC, Souza EDE, et al., The cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 5: 420, 1957
 - 44) Dickmann Z, Dey SK, Two theories: the pre-implantation embryo is a source of steroid hormones controlling (1) molura-blastocyst transformation, and (2) implantation. *J Reprod Fertil* 35: 615, 1973
 - 45) Mallory FB, *Pathological Technique*, p117, Hafner Pub Co, 1961
 - 46) Wagner RC, Kreiner P, Barnett RJ, et al., Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. *Proc Nat Acid Sci USA* 69: 3175, 1972
 - 47) Parkening TA, Soderwall AL, *Preimplantation*

- stages from young and senescent golden hamsters: presence of succinic dehydrogenase and non-viable ova. *J Reprod Fertil* 35: 373, 1973
- 48) Tauchi H, Roka no Keitaigaku, 1 ed, p85, Rikogakusha, 1980
- 49) Barrows CH, Yiengst MJ, Shock NW, Senescence and the metabolism of various tissues of rats. *J Gerontol* 13: 351, 1958
- 50) Kugler P, Vogel S, Gehm M, Quantitative succinate dehydrogenase histochemistry in the hippocampus of aged rats. *Histochemistry* 8: 299, 1988
- 51) Howells KF, Goldspink G, The effects of age and exercise on the succinic dehydrogenase content of individual muscle fibres from fast, slow and mixed hamster muscles. *Histochemistry* 38: 195, 1974
- 52) Vorbeck ML, Martin AP, Park JK, et al., Aging-related decrease in hepatic cytochrome oxidase of the Fischer 34 rat. *Arch Biochem Biophys* 214: 67, 1982
- 53) Müller-Höcker J, Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart— an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *Am J Pathol* 134: 1167, 1989
- 54) Trounce I, Byrne E, Marzuki S, Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in aging. *Lancet* i: 637, 1989
- 55) Müller-Höcker J, Schneiderbanger K, Stefani FH, et al., Progressive loss of cytochrome c oxidase in the human extraocular muscles in ageing— a cytochemical-immunohistochemical study. *Mut Res* 275: 115, 1992
- 56) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, et al., Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* i: 642, 1989
- 57) Wei YH, Mitochondrial DNA alteration as ageing-associated molecular events. *Mut Res* 275: 145, 1992
- 58) Gadaleta MN, Rainaldi G, Lezza AMS, et al., Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rat. *Mut Res* 275: 181, 1992
- 59) Linnane AW, Zhang C, Mitochondrial DNA mutation and aging process: bioenergy and pharmacological intervention. *Mut Res* 275: 195, 1992
- 60) Miquel J, An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mut Res* 275: 209, 1992
- 61) Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, et al., Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol Cell Biochem* 119: 95, 1993
- 62) Kitagawa Y, Kadowaki T, Nakamura K et al., Regulatory mechanism in animal mitochondrial DNA transcription. *Jpn Biochem Soc* 64: 316, 1992
- 63) Niimura S, Ishida K, Morphological and histochemical characteristics of the mammalian egg. In: Izawa H, Shimizu Y, Mikami S, et al., eds, *Progress in Veterinary Science*, p148, Kindai Press, 1989
- 64) Parkening TA, Collins TJ, Smith ER, Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH and prolactin in aged female C57BL/6 mice. *J Reprod Fertil* 5: 377, 1980
- 65) Parkening TA, Collins TJ, Smith ER, Luteinizing hormone levels in aged female laboratory rodents as measured by a radioimmunoassay and a radio-receptor assay. *J Endocr* 95: 417, 1982

高齢動物に不妊をもたらす卵母細胞側の要因

生体科学研究所

成田 成

近年、我々はマウス卵母細胞が母体の加齢に伴い形態学的に正常な範囲内で変化すると報告した。すなわち、原始卵胞に貯蔵中の卵母細胞は、動物の加齢に伴い小型化し、ミトコンドリア、ゴルジ装置、滑面小胞体、リボソーム、微絨毛およびデスモソームの数を減少させた。一方、胞状卵胞または排卵直後の発育した卵母細胞は、動物の加齢に伴い大型化し、タンパク質性の線維構造物と中性脂肪の量を増加させたが、グリコゲン顆粒の量を減少させ、チトクロム酸化酵素、コハク酸脱水素酵素、 $\Delta^5,3\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素およびアデニル酸シクラーゼの活性を低下させた。これらの卵母細胞に関する観察結果は、高齢動物に不妊をもたらす卵母細胞側の主な要因がエネルギー代謝能、呼吸能、および外部刺激に対する感受性の低下であることを示唆した。

(受付：1994年3月1日)

(受理：1994年8月30日)

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON MOUSE SPERMATOZOA

Hideya KODAMA, Jun FUKUDA, Hiroko KARUBE,
Yasushi SHIMIZU, Masato IKEDA and Toshinobu TANAKA

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

Abstract: We have investigated the effects of reactive oxygen species (ROS) on mouse spermatozoa through a xanthine oxidase (XO) free radical generating system, and identified the ROS responsible for impairing mouse sperm motility. When xanthine (X) (0.1 mM or more) and XO (20 mU/ml) was added to mouse sperm suspension, an immediate and progressive decrease in sperm motility occurred. The addition of superoxide dismutase (from bovine erythrocytes) at the concentration of 100 μ g/ml did not confer protection on spermatozoa, whereas catalase, as low as 1.0 μ g/ml, conferred almost full protection on spermatozoa from the toxicity of X (0.5 mM) and XO (20 mU/ml). The data demonstrated that H₂O₂ is the primary toxic ROS responsible for most damage done to mouse spermatozoa. However, part of the toxicity might be due to \cdot OH, since the toxicity of X and XO was slightly higher than the amount of H₂O₂ generated by this system. The responses of mouse spermatozoa to such ROS were almost similar to those of human spermatozoa. So, mouse spermatozoa damaged by oxidative stress may be a good animal model of defective spermatozoa in human male infertility.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 66 - 72, 1995)

Introduction

The toxic effects of reactive oxygen species (ROS), such as the superoxide anion (\cdot O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (\cdot OH), on mammalian sperm function were recognized more than four decades ago¹⁾. Mammalian spermatozoa are especially sensitive to oxygen-induced damage, because of their high content of polyunsaturated fatty acids and their lack of sufficient scavenging system^{2, 3)}. Although little is known of the etiology of male infertility in human, peroxidative damage to the sperm plasma membrane is suggested to be an important pathological mechanism in the onset of this condition^{4, 5, 6)}. However, most of these data so far were only correlative and proper experiments to investigate the direct effects of ROS on sperm function have been required.

Recently, a xanthine oxidase (XO) free radical generating system was introduced to investigate the patho-

logical mechanism of oxygen-induced damage on human spermatozoa^{7, 8)}. This experimental system is interesting, since it enable us to evaluate the effects of various ROS on sperm function and identify the ROS responsible for impairing sperm functions. In the present study, we have investigated the effects of ROS on mouse spermatozoa through this system, and concluded that H₂O₂, not \cdot O₂⁻, is the primary toxic ROS responsible for most damage done to spermatozoa.

Materials and Methods

Materials

The culture medium for the experiments was BWB medium⁹⁾, and all agents used for the medium were at least analytical grade. Xanthine (X) and XO (from bovine milk) were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Catalase (from bovine liver), superoxide dismutase (SOD, from bovine erythrocytes), nitroblue tetrazolium (NBT), horseradish peroxidase (HRPO), 4-aminoantipyrine, phenol, and allopurinol

were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Percoll was purchased from Pharmacia (Doval, Canada).

Detection of ROS

The generation of $\cdot\text{O}_2^-$ by X and XO in BWW medium was monitored by NBT assay¹⁰. Two hundred ml of BWW medium (without phenol red) containing 200 mM of NBT were mixed with various concentrations of X and XO. The change of NBT (pale yellow) to blue formazan in the medium was monitored every five min by spectrophotometer with an absorbance at 560 nm.

The generation of H_2O_2 in BWW medium was assessed by the HRPO-dependent oxidation of phenol ntipyrine to a red derivative¹¹. Forty ml of aliquots were removed every 15 min from 400 ml of BWW medium (without Phenol red) containing various concentrations of X and XO, and reacted with 160 ml of reaction mixture. The reaction mixture was 100 mM potassium phosphate solution (pH 7.0) that contained 3,000 U HRPO, 1.5 mM 4-aminoantipyrine, 0.11 M phenol, and 100 ml of allopurinol. A red derivative in the mixtures was detected by spectrophotometer with an absorbance at 490 nm, and amounts of H_2O_2 present in the BWW media were calculated by a standard curve.

Preparation of spermatozoa

Mouse spermatozoa were obtained from CD1 retired breeders (Charles Rivers, Wilmington, MA) by placing minced cauda epididymis into one ml of BWW medium allowing 15 min for release of spermatozoa from the tissues. The tissues were then removed and the sperm suspension was placed on a two-layer Percoll gradient, which consisted of 0.4 ml of 80% and 0.4 ml of 40% Percoll solution buffered with BWW medium in a Eppendorf tube. The tube was centrifuged at room temperature at 1000 rpm for five min and fractions at the bottom of the tubes were collected. These Percoll-separated spermatozoa were diluted with BWW medium and divided into an appropriate number of wells (Microwell Plate, 96 wells, Nunc) at the final concentration of approximately 1×10^5 sperm/ml. Two or three mice were used for one experiment.

Monitoring of sperm motility in various conditions

At first, effects of a XO free radical generating system on sperm motility were evaluated. Various concentrations of X and fixed concentration of XO were added to sperm suspension, and motility of the spermatozoa was evaluated by an inverted microscope at room temperature at 30 minute's interval after the beginning of the treatment. Next, the effects of scavenging enzymes, such as SOD or catalase, on the toxicity of X and XO treatment were investigated. Finally, the effects of H_2O_2 on sperm motility were investigated by adding various concentrations of H_2O_2 to sperm suspension.

Results

Generation of superoxide and hydrogen peroxide in BWW medium

Generation of $\cdot\text{O}_2^-$ in BWW medium containing various concentration of X (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) and fixed concentration of XO (20 mU/ml) is shown in Fig. 1a. Xanthine and XO were added to sperm suspension at time zero, and absorbance at 560 nm in each well was monitored every five minutes for 30 min. Maximum absorbance of BWW medium increased in a manner dependent on concentration of X in the medium. When 0.5 mM of X was added, $\cdot\text{O}_2^-$ was generated continuously for 25-min period, and no significant change of absorbance was detected after then. Decrease of XO from 20 to 10 mU/ml in the presence of same amount of xanthine (0.2 mM) reduce the rate of generation of $\cdot\text{O}_2^-$, but maximum absorbance was not affected (Fig. 1b). Generation of H_2O_2 in medium containing various concentrations of X (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) and fixed concentration of XO (20 mU/ml) is shown in Fig. 1c. The combination of X and XO generated H_2O_2 (from the spontaneous dismutation of $\cdot\text{O}_2^-$) in a manner dependent on concentrations of X in the medium. The level of H_2O_2 reached almost maximum within 30 minutes after the beginning of treatment in each well, and was stable for at least one hour. Xanthine at 0.5 mM (combined with 20 mU/ml of XO) produced 0.25 mM of H_2O_2 , and molar ratio of added X to generated H_2O_2 was about 2:1.

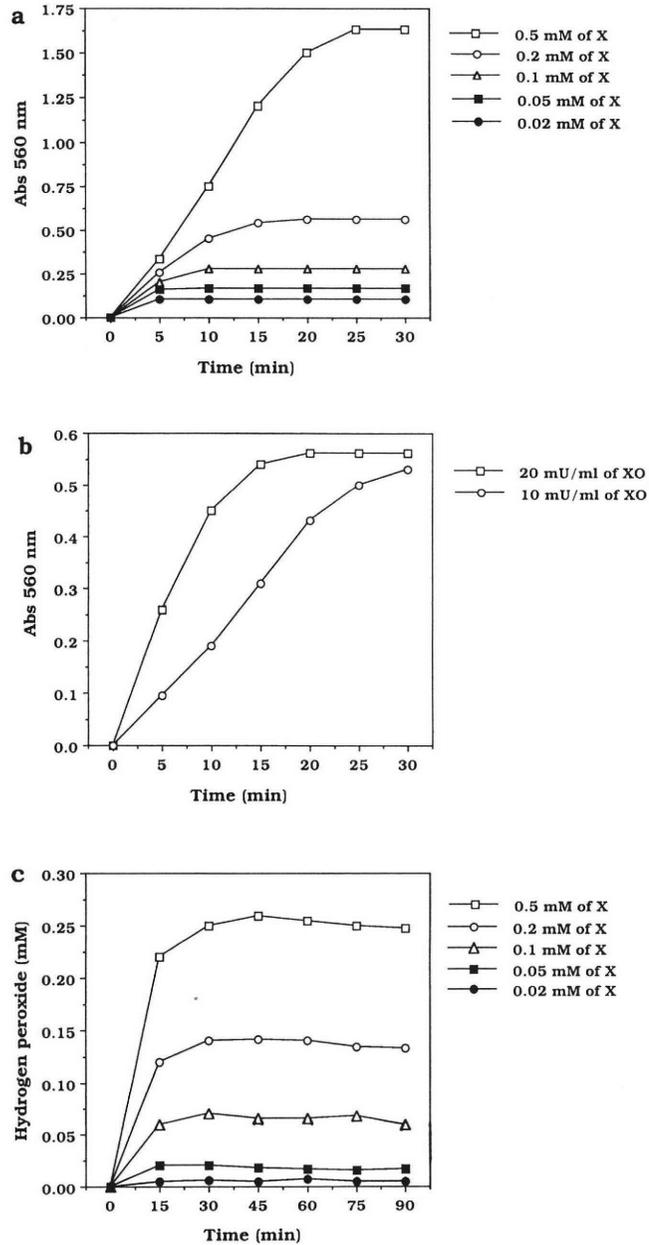


Fig. 1 Generation of $\cdot\text{O}_2^-$ and H_2O_2 in BWW medium containing X and XO

Generation of $\cdot\text{O}_2^-$ in the BWW medium containing X and XO is shown in Fig. 1a. Various concentrations of X (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) and fixed concentration of XO (20 mU/ml) were added to the medium at time zero, and the generation of $\cdot\text{O}_2^-$ was monitored by NBT assay with an absorbance at 560 nm every 5 minutes for 30 min. Generation of $\cdot\text{O}_2^-$ in the medium containing 0.2 mM of X and two different concentrations of XO (10 or 20 mU/ml) is shown in Fig. 1b. Generation of H_2O_2 in the medium containing various concentrations of X (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) and fixed concentration of XO (20 mU/ml) is shown in Fig. 1c. The concentration of H_2O_2 was assessed using the HRPO-dependent oxidation of phenol ntipryne.

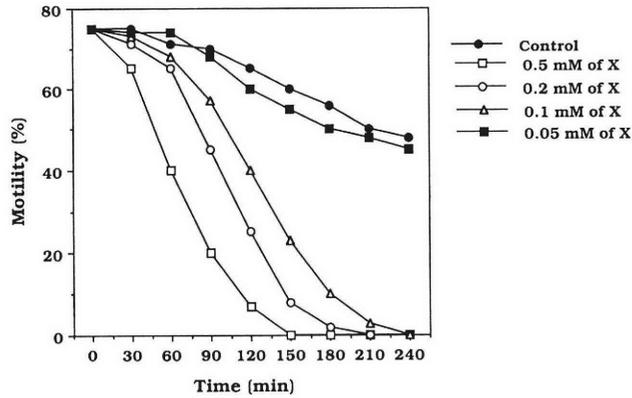


Fig. 2 Effects of X and XO on mouse sperm motility

Various concentrations of X (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) and XO (20 μU/ml) were added to the sperm suspension at time zero, and motility was monitored every 30 min for four hours. The experiment was repeated five times. All of the SE values were less than 10% of mean values, and only the mean values are indicated.

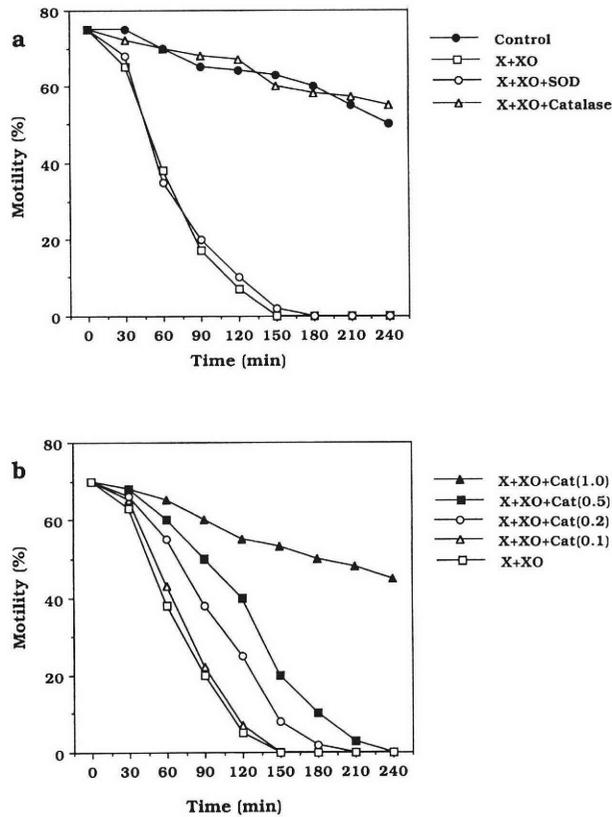


Fig. 3 Effects of scavenging enzymes on the toxicity of X and XO on mouse spermatozoa

Effects of scavenging enzymes on the sperm toxicity of X and XO are shown in Fig. 3a. Xanthine (0.5 mM) and XO (20 μU/ml) were added to the sperm suspension in the presence of either SOD (100 μg/ml) or catalase (50 μg/ml), and sperm motility was monitored every 30 minutes for four hours. No agents were added to the control spermatozoa. Effects of various concentrations of catalase (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 μg/ml) on the toxicity of X (0.5 mM) and XO (20 μU/ml) are shown in Fig. 3b. The experiments were repeated two times. All of the SE values were less than 10% of mean values, and only the mean values are indicated.

Effects of Xanthine and xanthine oxidase on sperm motility

The effects of various concentration of X (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) and XO (20 mU/ml) treatment on the motility of mouse spermatozoa are shown in Fig. 2. When the final concentration of X in the reaction mixtures was 0.05 mM, the percentage of motility remained at the control level for at least three hours after the treatment. On the other hand, an immediate and progressive decrease in the sperm motility occurred when final X concentration increased to 0.1 mM or more. The decrease was more rapid when concentration of X increased. When 0.5 mM of X was added to sperm suspension, almost all spermatozoa were immobilized within 150 min.

Effects of scavenging enzymes on the toxicity of xanthine and xanthine oxidase

Effects of scavenging enzymes, such as SOD and catalase, on the toxicity of X and XO treatment are shown in Fig. 3a. The addition of superoxide dismutase at the concentration of $100 \mu\text{g/ml}$ completely scavenged $\cdot\text{O}_2^-$ which was generated by the combination of 0.5 mM of X and 20 mU/ml of XO (data is not shown). However, SOD did not confer protection on spermatozoa treated with the concentration of X and XO. On the other hand, catalase ($50 \mu\text{g/ml}$) conferred almost full protection on spermatozoa. Effects of various concentration of catalase (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml) on the toxic effect of X (0.5 mM) and XO (20 mU/ml) are shown in Fig. 3b. The minimal concentra-

tion of catalase to completely protect the toxicity of X and XO at the concentration was 1.0 mg/ml (Fig. 3b).

Effects of hydrogen peroxide on sperm motility

Our data suggested that toxicity of a XO free radical generating system on mouse spermatozoa was attributed to H_2O_2 , which was generated by spontaneous dismutation from $\cdot\text{O}_2^-$. So, we investigated direct action of H_2O_2 on mouse sperm motility (Fig. 4). Various concentrations of H_2O_2 (0.05, 0.1, 0.2 mM) were added to sperm suspension and their motility were evaluated. The percentage of motility remained at the control level for at least four hours when concentration of H_2O_2 in the sperm suspension was 0.05 mM. When concentration of H_2O_2 was 0.1 mM or more, spermatozoa were immobilized within four hours. Toxicity of H_2O_2 was completely vanished when catalase was added together (data is not shown).

Discussion

A XO free radical generating system primary generates $\cdot\text{O}_2^-$, which, by subsequent reduction or spontaneous dismutation, generates H_2O_2 . The highly reactive $\cdot\text{OH}$ could be produced by a subsequent reduction of H_2O_2 by ferrous ions (Fenton reaction) or a combination of H_2O_2 and $\cdot\text{O}_2^-$ in the presence of ferrous ions (Harber-Weiss reaction)¹². Kinetics of generation of $\cdot\text{O}_2^-$ in BWW medium showed that the maximum absorbances of the medium were proportional to concentrations of X in the medium. This finding means that the amount of generated $\cdot\text{O}_2^-$ in

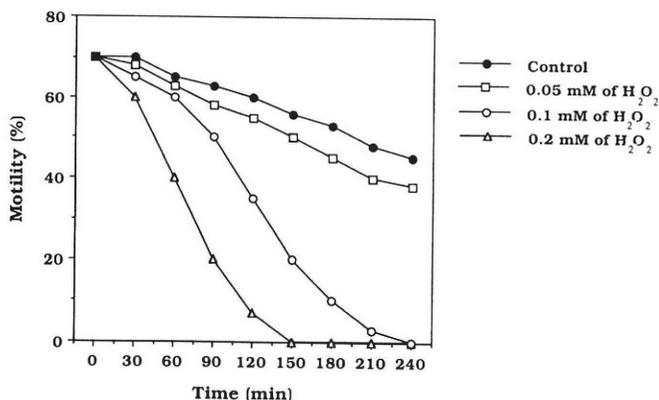


Fig. 4 Effects of H_2O_2 on sperm motility

Various concentrations of H_2O_2 (0.05, 0.1, 0.2 mM) were added to the sperm suspension, and sperm motility was monitored every 30 minutes for four hours. The experiment was repeated two times. All of SE values were less than 10% of mean values, and only the mean values are indicated.

this system is affected by the concentration of X (rather than XO). Generation of H_2O_2 in the BWW medium reached maximum levels within 15 min and then the levels were stable for at least one hour. Although there was no ferrous ion in the BWW medium, small amount of $\cdot OH$ may be produced by a reaction between $\cdot O_2^-$ and H_2O_2 or by a direct conversion from H_2O_2 on the sperm membrane. The amount of $\cdot OH$ generated in the medium was unknown, since determination of $\cdot OH$ levels in the solution is very difficult because of its short life (9 ~ 10 sec)¹³. The present study showed that 0.1 mM of X combined with 10 mU/ml of XO was toxic enough to immobilize mouse spermatozoa within three hours. One of interesting finding related to this phenomenon was the time lag between the generation of $\cdot O_2^-$ in the medium and beginning of sperm immobilization. When 0.1 mM of X was mixed with XO, generation of $\cdot O_2^-$ and H_2O_2 in the mixture was almost finished within 25 min. However, decrease in sperm motility was manifested more than 60 min after the treatment. The biological responses during the time lag between generation of $\cdot O_2^-$ and sperm immobilization seem to be an important factor to understand the mechanism of oxygen-induced damage in the spermatozoa.

The toxicity of the various ROS varies from one species to the other. The superoxide anion usually has a relatively low toxicity since its half-life is short (less than one millisecond) and it is a weak oxidant. However, $\cdot O_2^-$, rather than H_2O_2 , has been considered to be a more toxic ROS in rabbit spermatozoa¹⁴. Hydrogen peroxide, due to its stability and its powerful oxidant ability, usually appears to be more cytotoxic than $\cdot O_2^-$. We used the scavenging enzymes, SOD and catalase to selectively remove $\cdot O_2^-$ and H_2O_2 from the sperm suspensions and thereby determine their relative cytotoxicity toward the mouse spermatozoa. The addition of SOD did not confer protection, whereas catalase conferred almost full protection on the spermatozoa. So, it is concluded that H_2O_2 is the primary toxic ROS responsible for most damage done to mouse spermatozoa. A combination of 0.1 mM of X (minimal concentration of X necessary for immobilizing spermatozoa) was estimated to produce 0.05 mM of H_2O_2 . When H_2O_2 was directly added to sperm suspension, at least 0.1 mM of H_2O_2

was necessary to immobilize mouse spermatozoa. So, part of toxicity of a XO free radical generating system on mouse spermatozoa might be attributed to $\cdot OH$, which may be generated in this system. The hydroxyl radical is extremely reactive but its action is limited by its short life.

The properties of mouse spermatozoa on the reaction against various ROS are similar to those of human spermatozoa. As for human spermatozoa, a positive correlation between the level of SOD in spermatozoa and sperm motility was reported¹⁶. These data suggested that $\cdot O_2^-$, rather than H_2O_2 , is the main cytotoxic molecule, and SOD has been proposed as a major determinant of the susceptibility of human spermatozoa to peroxidative damage. However, contrary to this suggestion, recent a few studies using a XO free radical generating system suggested that H_2O_2 is primary cytotoxic ROS to human spermatozoa. This finding was consistent with the data obtained from the present study.

In summary, the data presented here demonstrated that H_2O_2 is the primary toxic ROS responsible for most damage done to mouse spermatozoa in a XO free radical generating system. However, part of toxicity to mouse spermatozoa might be attributed to $\cdot OH$ which was spontaneously generated in the solution. The responses of mouse spermatozoa to such ROS were almost similar to those of human spermatozoa. So, mouse spermatozoa damaged by oxidative stress may be a good animal model of defective spermatozoa in human male infertility.

Acknowledgments

The authors thank Eve De Lamirande and Claude Gagnon at the Urology research laboratory, Royal Victoria Hospital and Faculty of Medicine, McGill University, for their helpful suggestion and technical assistance.

References

- 1) Totic J, Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino acids in sperm motility. *Nature* 159: 544, 1947
- 2) Jones R, Mann T, Sherins RJ, Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acids and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31: 531, 1979

- 3) Alvarez JG, Storey BT, Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23: 77, 1989
- 4) Aitken RJ, Clarkson JS, Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81: 459, 1987
- 5) Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, et al., Analysis of relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 10: 214, 1991
- 6) Iwasaki A, Gagnon C, Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57: 409, 1992
- 7) De-Lamirande E, Gagnon C, Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13: 368, 1992
- 8) Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D, Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 97: 441, 1993
- 9) Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG, et al., The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel LC ed, *Methods in Mammalian Embryology*. p86, Freeman, 1971
- 10) Beauchamp C, Fridovich I, Superoxide dismutase: improved assay and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276, 1971
- 11) Luck H, Catalase. In: Bergmeyer HU, ed, *Methods of enzymatic analysis*. p885, Academic Press, 1963
- 12) Grisham MB, McCord JM, Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Taylor AE et al. eds, *Physiology of oxygen radicals*, p1, American Physiological Society, Bethesda Maryland, 1986
- 13) Bielski BH, Shiue GG, Reaction rates of superoxide radicals with the essential amino acids. In: *Oxygen Free Radicals and tissue Damage*. p43, Elsevier, 1986
- 14) Alvarez JG, Storey BT, Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29 :548, 1983
- 15) Alvarez JG, Storey BT, Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23: 77, 1989
- 16) Alvarez LG, Touchstone JC, Blasco L, et al., Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 8 : 338, 1987

各種活性酸素の マウス精子運動能への影響

秋田大学医学部産婦人科

児玉英也 福田 淳 軽部裕子
清水 靖 池田雅人 田中俊誠

Xanthine oxidase (XO) 活性酸素産生系のマウス精子に対する影響を検討し、運動能に有害な活性酸素種を特定した。Xanthine (X) (0.1 mM以上)とXO (20mU/ml)をマウス精子懸濁液に添加すると、運動率の急速な減少が認められた。この系に100 μ g/mlのSODを加えても影響は認めなかったが、catalaseを添加するとその毒性は完全に抑制された。0.5mMのXと20mUのXOによる毒性を消去するためには、1.0 μ g/mlのcatalaseで十分であった。以上より、XO活性酸素産生系においてマウス精子に対する毒性をになう活性酸素種は、 H_2O_2 であると特定された。ただ、実際のXO活性酸素産生系の毒性が産生される H_2O_2 量よりもわずかながら強いことから、この系で産生されると考えられる $\cdot OH$ もこの毒性に一部関与している可能性がある。マウス精子の各種活性酸素種に対する反応はヒト精子と類似していることから、活性酸素で障害されたマウス精子はヒト男性不妊患者における障害精子の良好な動物モデルとなるかもしれない。

(受付：1994年6月20日)

(受理：1994年9月1日)

不良な精液所見，男性小室の高度拡張を伴った尿道下裂の2例

Two Cases of Hypospadias with Semen of Poor Quality and Enlarged Prostatic Utricle

金沢大学医学部泌尿器科学教室

天野 俊 康
Toshiyasu AMANO

國 見 一 人
Kazuto KUNIMI

李 秀 雄
Soo-Woogn LEE

大 川 光 央
Mitsuo OHKAWA

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

辰口芳珠記念病院泌尿器科

布 施 春 樹
Haruki FUSE

Department of Urology
Tatsunokuchi Houju Memorial Hospital, Tatsunokuchi 923-12, Japan

不良精液所見，男性小室の高度拡張を伴った尿道下裂の2例を報告する。

症例1は，22歳男性。主訴は外尿道口の開口異常。生後3か月で右精巣欠損を指摘され，5歳時に索切除術，尿道形成術を受けた。排尿時膀胱尿道撮影にて拡張した男性小室を認めた。精液検査では，高度乏精子症であった。前部尿道形成術および左精巣生検を施行し，精巣所見は，精細管内にわずかに精子を認めるのみであった。

症例2は，29歳男性。主訴は右陰囊の腫脹。4歳時に索切除術，尿道形成術を受けた。排尿時膀胱尿道撮影にて拡張した男性小室を認めた。両側精巣上体尾部の硬結を認め，精液検査では無精子症であった。精巣生検所見は，精細管内に精子形成を示さないものもあり，両側精管精囊造影上，精路通過障害は認められなかった。左精管-精巣上体吻合術を施行したが，精巣上体頭部で精子は確認できず，術後の精液検査でも精子はなく，現在外来にて経過観察中である。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 73 - 77, 1995)

緒 言

男子の外陰部奇形である尿道下裂は，0.32%程度の発生頻度と考えられている¹⁾。尿道下裂患者の主な合併奇形として停留精巣や単径ヘルニアがあげられる²⁾が，その他にも下部尿路奇形として男性小室(prostatic utricle)の拡張を27.3%に認めたと報告されている³⁾。尿道下裂患者の精巣所見に関しては，8例の停留精巣を含む33例中17例(51.2%)にhyospermato-genesisが認められ⁴⁾，妊孕性に関しては，既婚41名

の尿道下裂患者のうち24名が挙子を得たとの報告もある⁵⁾。今回我々は，不良精液所見，男性小室の高度拡張を伴った尿道下裂の2例を経験したので，報告する。

症 例

(症例1) 患者：22歳，男性

主訴：外尿道口の開口異常

既往歴：生後3か月時に，右単径ヘルニアにて某医にて手術を受けたが，その際右精巣の欠損を指摘

された。5歳時に同医で尿道下裂として、索切除術および尿道形成術を施行されたが、6歳以後通院しなかった。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：1993年11月■，外尿道口の異常に対する治療を希望して当科を受診した。

現症：外尿道口はpenoscrotal regionに開口していた。右精巣は触知できず、左精巣容量は約3mlと小さかった。前立腺は胡桃大で弾性硬に触れ、精嚢は触れなかった。

精液所見：精液量0.1ml，精子濃度 1×10^4 /ml，運動率50%と高度乏精子症の所見であった。

内分泌学的検査：LH 7.5mIU/ml (正常値0.6～16.8)，FSH 25.7mIU/ml (正常値2.7～22.9)，PRL 14.6ng/ml (正常値2.3～14.6)，Testosterone 365.4ng/dl (正常値270～1070)とFSHの高値を認めた。なお、末梢血リンパ球培養による染色体検査では46XYと正常男子型であった。

排尿時膀胱尿道造影：外尿道括約筋付近に開口する嚢胞状の拡張が膀胱後面にまでおよび、男性小室と考えられた。また、外尿道口から約3cm中枢側に尿道狭窄を認め、その中枢側尿道の拡張がみられた(図1)。

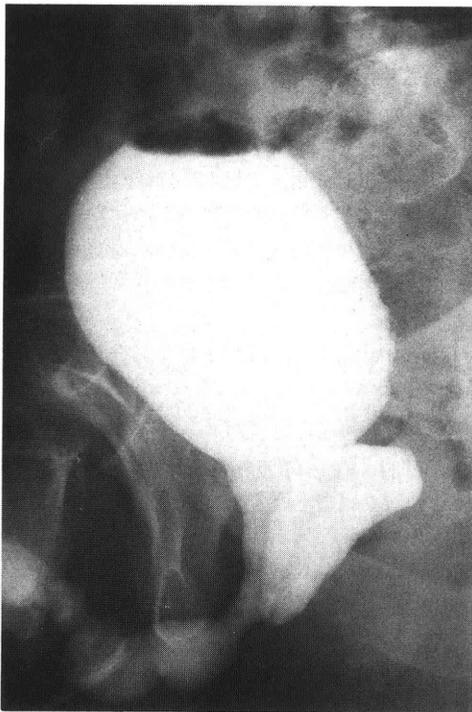


図1 症例1 排尿時膀胱尿道造影像

経過：遠位部尿道形成と尿道狭窄部の切開を目的に入院し、1994年2月■全麻下に内尿道切開術、尿道形成術および左精巣生検を施行した。すなわち、まず小児用内尿道切開刃(Fr. 13)にて尿道狭窄部を切開し、次いで前立腺部尿道を観察したところ、精丘部の中枢側に男性小室の開口部を認め、Fr. 20の成人用内尿道切開用の内視鏡が挿入可能であった。男性小室の内腔は平滑、青白色で鏡検上内容液中に精子は認められなかった(図2)。さらに前部尿道の形成術および左精巣生検を行い手術を修了した。精巣生検の所見は、いずれの精細管にも精子を認めるがその数は少なく、成熟した精子の認められない精細管も散在していた(図3)。なお右精巣は腹部～骨盤部CTにて検出されなかった。術後経過は順調で現在外来的に経過観察中である。

(症例2)患者：29歳，男性

主訴：右陰嚢内容の腫脹

既往歴：4歳時に尿道下裂にて、索切除術および尿道形成術を受けた。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：1993年10月■，約4日前より無痛性の右陰嚢内容腫脹に気付き受診した。

現症：外尿道口は冠状溝より約1.5cm中枢側に存

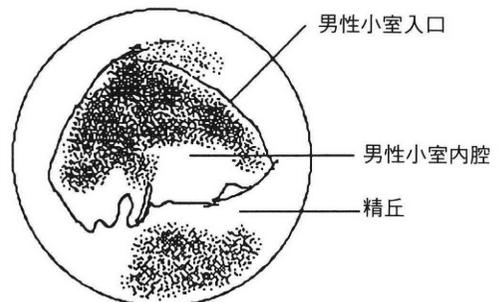
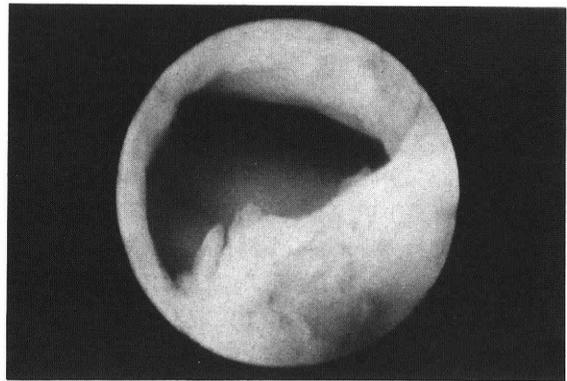


図2 症例1 男性小室口部の内視鏡所見

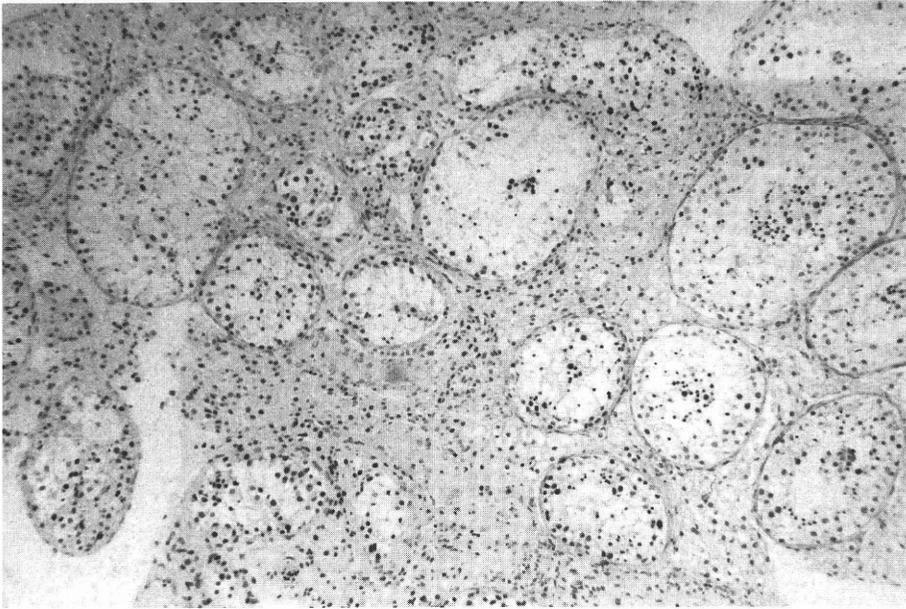


図3 症例1 精巢生検所見(×40)

在していた。右精巢上部尾部および左精巢上部尾部にも硬結が認められ、精巢容量は左右とも12mlであった。前立腺は胡桃大で弾性硬に触れ、精嚢は触れなかった。

精液所見：精液量2.0ml，精子濃度0で無精子症であった。

内分泌学的検査：LH 12.5mIU/ml，FSH 16.7mIU/ml，PRL 12.2ng/ml，Testosterone 941.1ng/dlといずれも正常範囲内であった。末梢リンパ球培養による染色体検査では46XYと正常男子型であった。

排尿時膀胱尿道造影：外尿道括約筋付近に開口する嚢胞状の拡張が前立腺部尿道後面に認められ、男性小室と考えられた。また、外尿道口から約3cm中枢側に尿道狭窄を認め、その中枢側尿道の拡張が見られた(図4)。

経過：無精子症の検索のためまず1993年10月、左精巢生検および両側精管精嚢造影を施行した。両側精嚢の主軸のなす角度は幼若型であったが、末梢の精路に通過障害は認められなかった(図5)。精巢生検所見では、精子形成のある精細管も認めるが、精祖細胞のみのものや、成熟した精子形成を示さないものも混在し、精細管壁も肥厚もあり、高度の造精機能障害と考えられた(図6)。精巢上部炎による精巢上部での通過障害と考え、1994年4月、左精管—精巢上部吻合術および外尿道口形成術を施行した。しかしながら、精巢上部頭部内にも精子は確認

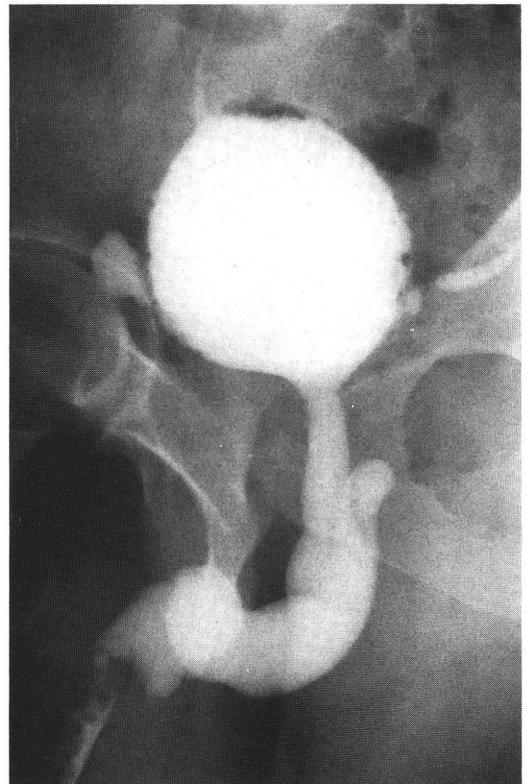


図4 症例2 排尿時膀胱尿道造影像

できず、術後の精液検査でも無精子症であり、現在外来的に経過観察中である。

考 察

尿道下裂には様々な合併症が報告されている。下部尿路合併奇形のうち男性小室の拡張は高頻度に認められ、その程度は尿道下裂の程度と強い相関関係が認められ³⁾、Ikomaら³⁾の分類では症例1はgrade II、症例2はgrade Iに相当する。男性小室は胎生期のミ

ユラー管に由来し、胎生初期にミユラー管退縮物質により退化する。男性小室拡張を合併した尿道下裂患者は、胎生初期における胎児精巣機能不全、不十分なアンドロゲン刺激などがあったと推察される⁶⁾。すなわち、胎生期のアンドロゲン自体の減少あるいは組織でのアンドロゲンの感受性の減少が原因となりミユラー管組織の退縮が不完全となる⁶⁾。その結果、尿道下裂さらに退縮不全が強度であると男性小室の拡張が起こり、今回の症例もミユラー管組織の退縮が不完全であったため、高度の尿道下裂および男性小室が残存するミユラー管遺残例と推察される。

一方、陰嚢内容の合併奇形では、10～20%程度の頻度で停留精巣が認められ、停留精巣、精巣低形成などの頻度も尿道下裂が高度なほど高い⁶⁾。高度尿道下裂患者では胎生期の内外性器の分化時期での精巣機能障害が強いものと考えられる⁶⁾。今回経験した2症例は、胎生期からの精巣機能不全が存在し、尿道下裂、男性小室の拡張および精子形成不全を生じたものであろう。

不妊症の面からみると、尿道下裂患者の精巣所見に関して、51.2%にhypospermatogenesisが認められ⁴⁾、既婚41名の尿道下裂患者のうち24名のみが挙子を得たと報告されており⁵⁾、尿道下裂患者での不妊は決してまれなものではない。外陰部皮膚のアンドロゲン受容体の研究から、尿道下裂や男子不妊症患者の

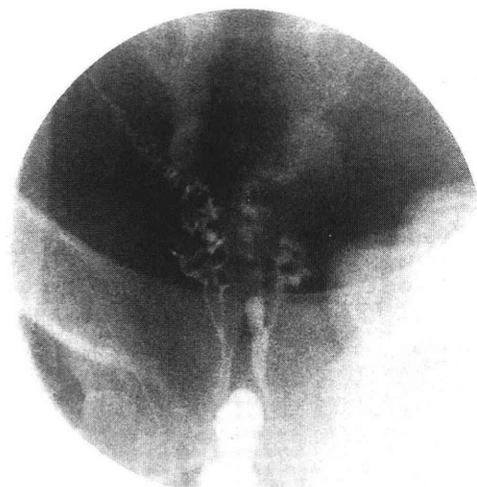


図5 症例2 精管精囊造影像

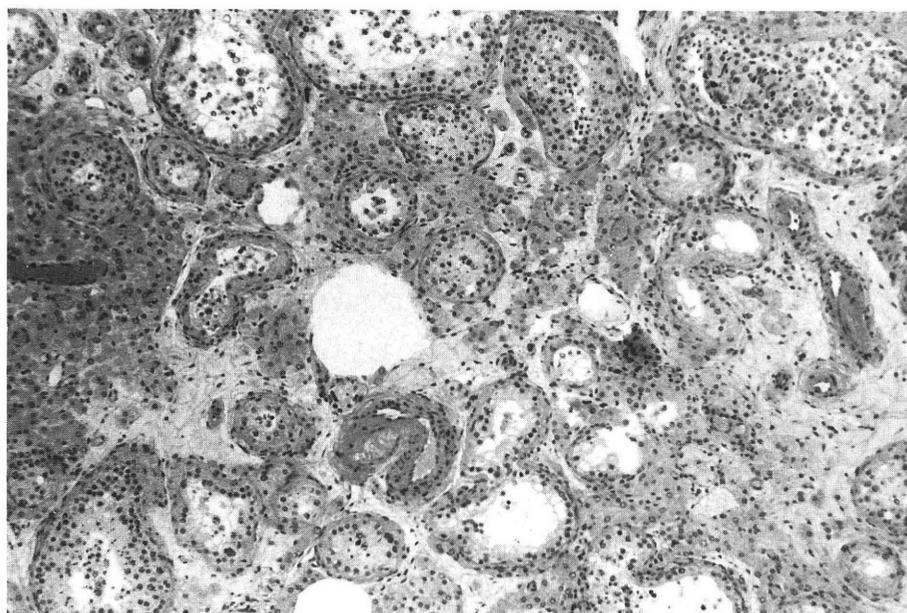


図6 症例2 精巣生検所見(×40)

中には外陰部皮膚アンドロゲン受容体異常症例が存在することが推察されており^{7,8)}また、アンドロゲン受容体の測定より incomplete androgen insensitivity syndrome と診断されエストロゲン受容体拮抗剤で治療された症例も報告されている⁹⁾。アンドロゲン受容体異常の程度や体内分布、さらにその遺伝子学的問題と尿道下裂、精巣機能不全、他の合併奇形との関係を今後検討することにより尿道下裂と精巣機能不全および合併奇形との関連性やその成因が一元的に説明可能となるかもしれない。

尿道下裂患者における不妊の原因として、症例2のように精巣上体頭部でも精子が認められず、精巣と精巣上体との間での通過障害、さらに精巣上体炎など逆行性感染による閉塞性不妊症にも注意を払う必要がある。しかしながら高度尿道下裂症例では、胎生期からの精巣機能障害があり、成人となっても精巣の hyospermatogenesis が存在する精巣性不妊症が最も重要な位置を占める。したがって尿道下裂患者では、合併奇形の頻度が高くその発見に努めるとともに、男子不妊症にも留意する必要があるものと考えられた。

結 語

不良精液所見、男性小室を伴った尿道下裂の2例の報告するとともに、尿道下裂、男性小室の拡張および精巣機能障害の合併につき文献的考察を加えた。

なお本論文の要旨は1994年日本不妊学会北陸支部学術総会にて報告した。

文 献

- 1) Bauer SB, Retik AB and Colodny AH, Genetic aspect of hypospadias. *Urol Clin North Am* 8: 559 1981
- 2) Khuri FJ, Hardy BE and Churchill BM, Urological anomalies associated with hypospadias. *Urol Clin North Am* 8: 565, 1981
- 3) Ikoma F, Shima H and Yabumoto H, Classification of enlarged prostatic utricle in patients with hypospadias. *Brit J Urol* 57: 334, 1985
- 4) Jugenburg I and Kipikasa A, Fertility in patients with hypospadias. *Acta Chir Plast* 30: 86, 1988
- 5) Avellan L, The development of puberty, the sexual debut and sexual function in hypospadiacs. *Scand J Plast Reconstr Surg* 10:29 1976
- 6) 生駒文彦, 島 博基, 薮元秀典, 尿道下裂の合併症と予後成績. *小児医学* 14: 448, 1981
- 7) 戦 泰和, 森岡政明, 小浜吉照, Dispersed Cell Method による外陰部皮膚 androgen receptor に関する研究. *日泌尿会誌* 80: 814, 1989
- 8) 梅原次男, 熊本悦明, 大野一典, 外性器奇形および発育異常症例に於ける外陰部皮膚組織中 androgen receptor の研究. *日泌尿会誌* 77: 379, 1986
- 9) Gooren L, Improvement of spermatogenesis after treatment with the antiestrogen tamoxifen in a man with the incomplete androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 1207, 1989

Two cases of hypospadias with semen of poor quality and enlarged prostatic utricle

Toshiyasu Amano, Kazuto Kunimi,
Soo-Woong Lee and Mitsuo Ohkawa

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

Haruki Fuse

Department of Urology
Tatsunokuchi Houju Memorial Hospital
Tatsunokuchi 923-12, Japan

Two cases of hypospadias with semen of poor quality and markedly enlarged prostatic utricle are reported.

Case 1 was 22-year-old male, who consulted our hospital with a complaint of anomaly of external meatus. Seminal analysis revealed severe oligozoospermia. Voiding cystourethrography showed enlarged prostatic utricle. Anterior urethroplasty and testicular biopsy were performed. Histological report revealed mild hyospermatogenesis.

Case 2 was 29-year-old male, who complained right scrotal swelling. On physical examination, swelling of bilateral epididymal tails were found. No spermatozoon was observed in semen. Voiding cystourethrography showed enlarged prostatic utricle. Vesiculography revealed no obstruction in bilateral seminal ducts. Specimen from left testis showed mild hyospermatogenesis. Left vasoepididymostomy was performed, but no spermatozoon was found in fluid from epidermal head. It is important to find not only associated anomaly disorders, but the presence of hyospermatogenesis for hypospadias patients.

(受付: 1994年7月6日)

(受理: 1994年9月6日)

精子機能と精漿中EGF, 亜鉛, 果糖濃度との相関

Correlation between Sperm Function and Concentrations of EGF, Zinc and Fructose in Human Seminal Fluid

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

精漿中には精子機能に関与する多くの因子が存在する。今回、精漿因子のうち特に重要と考えられるEGF, 亜鉛, 果糖濃度を測定し、精子機能との相関を検討した。対象は当院産婦人科不妊外来を受診した53例である。症例は精子運動率からI群($\geq 50\%$: $n=16$), II群($< 50\%$: $n=37$)に分けた。また、II群のうち運動精子濃度が $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の例をIII群($n=17$)として検討した。EGFは2抗体法によるRIAで、亜鉛は原子吸光分析法で、果糖は紫外部吸光度法で測定した。EGF, 亜鉛濃度はI, II, III群間で差はなかった。果糖濃度はIII群で高い傾向を示した。亜鉛対運動精子濃度はII群で有意($P < 0.05$)の正の相関($r = 0.357$)を、果糖対運動精子濃度は有意($P < 0.05$)の負の相関を示した。I, II, III群でEGF対亜鉛は強い正の相関を、亜鉛対果糖は負の相関を示した。

結論として、精漿中EGF, 亜鉛, 果糖の各因子は精子機能、特に運動濃度と密接に関与していることが明らかになった。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 78 - 82, 1995)

緒言

精子機能に関与する因子は数多い。精漿中には各種ホルモン、成長因子、電解質、サイトカイン、糖などが存在する。このうち、成長因子として上皮成長因子(Epidermal growth factor; EGF)は精漿中に大量に存在し、その意義が目玉されてきた。ヒト精子は先体の細胞表面にEGF受容体を持ち、EGFを結合させることが知られている。EGFは最近精子のcapacitationを促進することが明らかになってきたが²⁾、精子運動機能への直接作用については否定的な報告が多く³⁻⁵⁾、今まであまり明確でなかった。

亜鉛はヒト前立腺や精漿中に末梢血中より極めて高濃度に存在し、精子機能に深く関与していることが知られている⁶⁾。すなわち、亜鉛は精子の酸素消費⁷⁾、運動率⁸⁾、アクロシン活性⁹⁾などに関与している。さらに果糖はブドウ糖とともに精子エネルギー代謝に不可欠な基質である。

EGF, 亜鉛, 果糖と精子機能のうち、運動精子濃度や精子運動能との関連についての報告は現在まであまりみられていない。本研究では精漿中上記3因子が精子機能の促進、あるいは抑制という観点から相互にどのように関連しつつ影響しているか検討した。

対象および方法

1989年2月より1991年1月までに当科不妊外来を受診した53例を対象とした。症例は精液所見から正常、異常の2群に分類した。精液検査は少なくとも3日間の禁欲期間をおいて行った。治療前の成績は2回の検査結果の平均値である。年齢は26歳から43歳で、平均33.2歳であった。

症例は精子運動率の程度からI群($\geq 50\%$: $n=16$), II群($< 50\%$: $n=37$), III群(II群のうち運動精子濃度が $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満例: $n=17$)に分け検討した。

血中ホルモンはテストステロン、エストラジオー

ルを測定した。精漿成分としてEGF, 亜鉛, 果糖濃度を測定した。精液は液化後、一部を通常の精液検査用, すなわち運動精子濃度, 精子運動率, 精子運動能を測定した。残りは直ちに精漿を分離し、-20℃で保存した。

精子運動能は主に前進運動精子の比率を評価する指標で、光川の方法によった¹⁰⁾。

亜鉛濃度はInstrumentain Lab社製原子吸光分光光度計IL VIDEO・12型を用いたフレーム原子吸光分光分析法を用い、213.9nmの波長で定量した¹¹⁾。亜鉛濃度の表示にはμg/mlを用いた。EGFは2抗体法(Amersham International plc, UK)によるRIAを用い、ng/mlで表示した。果糖濃度は紫外吸光度法(F-キットグルコース/フルクトース:ペーリンガー/マンハイム山之内株式会社, 東京)を用いて測定した。精液の一定量を過塩素酸溶液, およびK₂CO₃溶液を添加して除蛋白を行った後、果糖濃度を定量した。表示はmg/dlによった。

成 績

1. 精液所見

各群における精子機能の成績を図1に示した。I, II, IIIの各群での運動精子濃度はそれぞれ、43.9×10⁶, 19.5×10⁶, 2.4×10⁶/mlであった。運動率はそれぞれ58.6, 32.8, 23.1%であった。運動能は60.8, 10.3, 3.2とIII群で著明に低い値となった。

2. 精漿中EGF, 亜鉛, 果糖および血中ホルモンの各濃度

I, II, III群における平均EGF濃度はそれぞれ、48.1±16.5, 44.0±16.1, 42.8±17.3ng/mlで精液所見が悪化するほど低下傾向を示した(表1)。平均亜鉛濃度は各群間に有意の差はなかった。平均果糖濃度

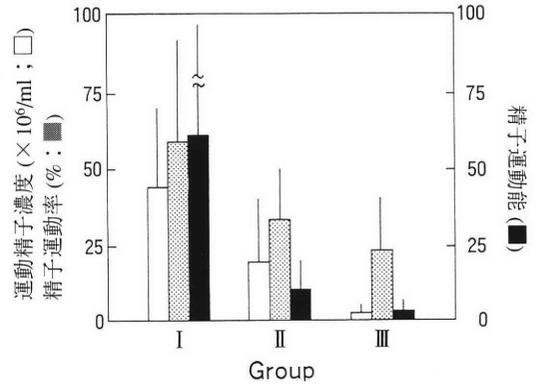


図1 各群の精液所見

はI群で147±88mg/dlであり、III群では215±127mg/dlと増加傾向を示した。

一方、末梢血中テストステロン, エストラジオール値は共に各群間で有意の差はなかった。

3. 精漿因子と精液所見との相関

精漿中各因子と精子機能との相関について検討した。まず、I群でEGF, 亜鉛, 果糖各因子と精子機能との間に有意の相関はなかった。次にII群については、表2に示すように亜鉛と運動精子濃度との間に有意の相関(r=0.357; P<0.05)を認めた。逆に果糖と運動精子濃度との間には有意の負の相関(r=-0.406; P<0.05)を認めた。III群では各因子に相関はなかった。

4. 精漿因子間の相関

精漿各因子間の相関について検討した。表3に示すように、各因子間に大きな特徴を認めた。すなわち、EGFと亜鉛との間には各群間に有意の強い正の相関を認めた。特にII群では危険率が0.1%以下と著

表1 各群の精漿中EGF, 亜鉛, 果糖濃度と血中ホルモン値

	EGF	Zn	Fructose	Testosterone	Estradiol
I 群	48.1 ± 16.5	126 ± 67	147 ± 88	635 ± 315	19.1 ± 6.9
II 群	44.0 ± 16.1	147 ± 92	151 ± 117	616 ± 189	19.9 ± 7.2
III 群	42.8 ± 17.3	134 ± 105	215 ± 127	651 ± 150	20.4 ± 5.8

表2 II群における精漿因子と精子機能との相関

	Zn		EGF		Fructose	
	r	p	r	p	r	p
運動精子濃度	0.357	0.05	0.120	NS	-0.406	0.05
精子運動率	0.008	NS	0.001	NS	-0.133	NS
精子運動能	0.138	NS	0.048	NS	-0.326	NS

r: 相関係数 p: 危険率 NS: 有意差なし

表3 各精漿因子間の相関

	Zn vs EGF		Zn vs F		EGF vs F	
	r	p	r	p	r	p
I 群	0.706	0.05	-0.628	0.05	-0.498	NS
II 群	0.701	0.001	-0.404	0.01	-0.265	0.05
III 群	0.584	0.05	-0.186	NS	-0.233	NS

F: 果糖 r: 相関係数 p: 危険率 NS: 有意差なし

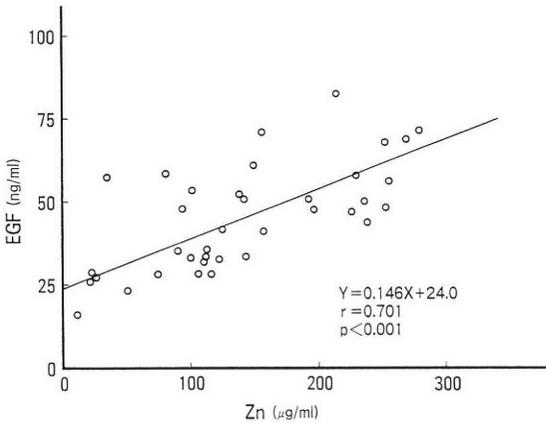


図2 精漿中EGFと亜鉛濃度との相関

表4 II群における各精漿因子と血中ホルモン値との相関

	Zn	EGF	Fructose
Testosterone	-0.455*	-0.313	0.299
Estradiol	0.261	-0.259	0.164

* p < 0.05

明であった(図2)。一方、亜鉛と果糖との間にはI, II群でそれぞれ有意の負の相関(P < 0.05, 0.01)を認めた。EGFと果糖との間ではII群においてのみ軽い負の相関(P < 0.05)を認めた。

5. 精漿因子と血中ホルモンとの相関

精漿中各因子と末梢血中テストステロン, エストラジオール値との相関について検討した。I群では各因子と両ホルモン値との間に有意の差はなかった。II群では、亜鉛とテストステロン値との間に有意の負の相関(r = -0.455; P < 0.05)を認めた(表4)。III群でも同様の結果であった。

考 察

精子機能には多くの精漿中因子が関与する。このうち、EGFはマウス顎下腺より発見された強力な成長因子である¹²⁾。EGFは唾液中のみならず精液中にも高濃度に存在する。精漿中の高濃度のEGFは精子

機能との直接の関連はないとの報告が多い^{3~5)}。本研究でもEGFは精子各機能との直接の相関はなく、諸家の報告と一致した。しかし、EGF濃度は精漿中亜鉛濃度と強い相関があり、亜鉛を介する何らかの機序が考えられた。この機序の一つとして、精漿中で亜鉛の大部分は糖蛋白、あるいはクエン酸と結合している。従ってこれらの結合物質にEGFが関与している可能性があげられた。もう一つの機序として、EGF受容体が精子頭部先体に存在することが認められている¹⁾、また精漿中亜鉛は精子エネルギー代謝⁷⁾、精子運動機能への関与のみならず、アクロシン活性に関与するとの報告がある⁹⁾。EGFは精子先体反応を促進するとの報告があり²⁾、アクロシンはEGF受容体とともに精子先体中に存在していることから同受容体を介する相互作用も考えられた。

今回、精漿中亜鉛濃度と末梢血中テストステロン濃度は負の相関を示し、興味ある成績となった。しかし、今回の研究では測定しなかったが、精漿中テストステロン濃度は血中のそれとあまり相関せず、精子機能との関連もあまりないという¹³⁾。一方、ヒト前立腺中の亜鉛濃度は生体内で最も高濃度で¹⁴⁾、精漿中亜鉛の大部分は前立腺由来と報告されている。前立腺における亜鉛の蓄積はアンドロゲン依存性と言われ、アンドロゲン代謝、すなわちテストステロンから5 α -dihydrotestosteroneへの転換を低濃度で促進し、高濃度で抑制する¹⁵⁾。精漿中亜鉛濃度は精子濃度や運動率の低下とともに低下する⁸⁾、あるいは変動がないとの報告がある⁶⁾。本研究では亜鉛濃度は各群間で差はなかった。これらのことから精漿中亜鉛濃度は前立腺からの分泌調節を介していること、前立腺はさらにテストステロンにより調節を受けていることが示唆された。

果糖は精子にとって重要なエネルギー源となっている。ヒトでは去勢すると血中テストステロン濃度の著明な減少に一致して精漿中果糖濃度も痕跡程度となる¹⁶⁾。しかし、本研究で血中テストステロン濃度と果糖濃度との間には、一定の相関関係はなかった。精漿中果糖は精囊から分泌され、その濃度と精

子数および精子運動率は逆相関の関係になる^{17,18)}。今回の研究でも、有意ではないものの運動精子濃度が低下するほど果糖濃度は上昇傾向を認めた。

男性において未梢血中エストロジオールの約1/3は精巣より分泌されるという。実際、乏精子症では高エストロゲン血症を合併する¹⁹⁾。高レベルのエストロゲンは精巣に直接作用し²⁰⁾、ステロイド代謝や精子機能に影響している可能性がある。本研究では精液所見の悪化するほど増加傾向を示したが、有意の差ではなく、精子機能との相関もなかった。

以上、精漿中EGF、亜鉛、果糖の各因子は、精子機能のうち、特に運動精子濃度に深く関与していることが示唆された。

本論文の要旨は、第36回日本不妊学会総会(1991年11月、名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Naz RK and Ahmad K, Presence of expression products of c-erbB-1 and c-erbB-2/HER2 genes on mammalian sperm cell, and effects of their regulation on fertilization. *J Reprod Immunol* 21: 223, 1992
- 2) 古屋 悟, 遠藤芳広, 大庭三紀子 他, マウス受精能獲得過程における Epidermal Growth Factor (EGF) の作用. *日産婦誌* 45: 1313, 1993
- 3) Elson D, Browne CA and Thorburn GD, Identification of epidermal growth factor-like activity in human male reproductive tissues and fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 589, 1984
- 4) Hirata Y, Uchihashi M, Hazama M, et al., Epidermal growth factor in human seminal plasma. *Horm Metab Res* 19: 35, 1987
- 5) Richards RC, Lewis-Jones DI, Walker JM, et al., Epidermal growth factor (urogastrone) in human seminal plasma from fertile and infertile males. *Fertil Steril* 50: 640, 1988
- 6) Arver S, Studies on zinc and calcium in human seminal plasma. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 507: 1, 1982
- 7) Eliasson R, Oxygen consumption of human spermatozoa in seminal plasma and a ringer solution. *J Reprod Fertil* 27: 385, 1971
- 8) 志田圭三, 島崎 淳, 古谷信雄 他, 男子不妊症の精液内化学成分の研究. *日不妊会誌* 16: 217, 1971
- 9) Johnsen Ø, Eliasson R, Löfman CO, Inhibition of the gelatinolytic and esterolytic activity of human sperm acrosin by zinc. *Acta Physiol Scand* 114: 475, 1982
- 10) 光川史郎, 精子運動の新測定法. *日泌尿会誌* 70: 1221, 1979
- 11) 船越泰子, 奥村 恂, 原子吸光分光分析法による亜鉛, 銅の定量法の検討と測定値の生理的ならびに肝, 胆道疾患における変動. *臨床病理* 19: 293, 1971
- 12) Cohen S and Savage CR-Jr, Recent studies on the chemistry and biology of epidermal growth factor. *Recent Prog Horm Res* 30: 551, 1974
- 13) 齊藤誠一, 大野一典, 熊本悦明 他, 男子不妊症患者に於ける血中ならびに精漿中LH, FSH, Prolactin, testosterone, および5 α -dihydrotestosteroneに関する検討(ヒト精漿成分に関する研究, 第2報). *日不妊会誌* 33: 92, 1988
- 14) Whitmore WF-Jr, Comments on zinc in the human and canine prostates. In: *Biology of the prostate and related tissues. Natl Cancer Inst Monograph* 12: 337, 1963
- 15) Wallace MA and Grant JK, Effect of zinc on androgen metabolism in the human hyperplastic prostate. *Biochem Soc Trans* 3: 540, 1975
- 16) Moon KH and Bunge RG, Seminal fructose as an indicator of androgenic activity: Critical analysis. *Invest Urol* 8: 373, 1971
- 17) Jathar VS, Hirwe R, Desai S, et al., Seminal fructose, citric acid and phosphatase levels and their relation to the sperm count in man. *Ind J Physiol Pharmac* 21: 186, 1977
- 18) Biswas S, Ferguson KM, Stedronska J, et al., Fructose and hormone levels in semen: Their correlations with sperm counts and motility. *Fertil Steril* 30: 200, 1978
- 19) Usuki S, Hachimijioan changes serum hormonal circumstance and improves spermatogenesis in oligospermic men. *Am J Chin Med* 14: 37, 1986
- 20) Hseuh AJW, Dufau ML, Catt KJ, Direct inhibitory effect of estrogen on Leydig cell function of hypophysectomized rats. *Endocrinology* 103: 1096, 1978

Correlation between sperm function and concentration of EGF, zinc and fructose in human seminal fluid

Hirotaoka Ota

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

In the present study, we measured the concentrations of EGF, zinc and fructose in seminal fluid, and evaluated the correlation with sperm function. The subjects consisted of 53 cases consulted at the Infertility clinic at Akita Kumiai General Hospital. The subjects were

divided into 3 groups according to the sperm motility. That is, group I ($\geq 50\%$; $n = 16$), group II ($< 50\%$; $n = 37$) and group III ($< 10 \times 10^6/\text{ml}$ in group II; $n = 17$). Concentration of EGF was determined by RIA, zinc by atomic absorption spectrophotometry and fructose by enzymatic-ultraviolet determination.

There were no differences of the concentration of EGF, zinc or fructose among the groups. Fructose tended to increase in group III. While positive correlation between zinc and motile sperm concentration and negative corre-

lation between fructose and motile sperm concentration were found in group II. Zinc and EGF revealed a strong positive correlation in all groups, while zinc and EGF showed a negative correlation in groups I and II. Zinc and serum testosterone had a significant negative correlation ($p < 0.05$).

In conclusion, it was revealed that zinc, EGF and fructose in seminal fluid are deeply involved in sperm function, particularly in motile sperm concentration.

(受付: 1994年6月16日)

(受理: 1994年9月9日)

排卵障害患者に対するクロミフェン・当帰芍薬散併用療法の 有用性の検討

Studies on the Combination Treatment with Clomiphene Citrate and Toki-shakuyaku-san

徳島大学医学部産婦人科

安井 敏之
Toshiyuki YASUI

苛原 稔
Minoru IRAHARA

青野 敏博
Toshihiro AONO

Department of Obstetrics and Gynecology

The University of Tokushima, School of Medicine, Tokushima 770, Japan

麻植協同病院産婦人科

高橋 久寿
Hisatoshi TAKAHASHI
Oe Kyodo Hospital

小松島赤十字病院産婦人科

猪野 博保
Hiroyasu INO
Komatsujima Red Cross Hospital

徳島県立中央病院産婦人科

奈賀 脩
Osamu NAKA
Tokushima Prefectural Central Hospital

徳島県立三好病院産婦人科

松下 光彦
Teruhiko MATSUSHITA
Tokushima Prefectural Miyoshi Hospital

徳島市民病院産婦人科

阪口 彰
Akira SAKAGUCHI

吉本 忠弘
Tadahiro YOSHIMOTO

Tokushima Municipal Hospital

徳島通信病院産婦人科

岸 恭也
Yasuya KISHI

山下 明美
Akemi YAMASHITA

Tokushima Teishin Hospital

大川総合病院産婦人科

武本 幹彦
Mikihiko TAKEMOTO
Okawa General Hospital

大樹会回生病院産婦人科

大野 義雄
Yoshio OHNO
Kaisai General Hospital

香川県立津田病院産婦人科

高柳 真
Makoto TAKAYANAGI
Kagawa Prefectural Tsuda Hospital

国立善通寺病院産婦人科

長町 典夫
Norio NAGAMACHI
Zentsuji National Hospital

高知県農協総合病院産婦人科

竹内 悟
Satoru TAKEUCHI
Kochi Nokyo General Hospital

札幌東豊病院産婦人科

三宅 敏一
Toshikazu MIYAKE
Sapporo Toho Hospital

稀発月経、無排卵周期症、第一度無月経などの排卵障害に対して、クロミフェン単独療法とクロミフェン・当帰芍薬散併用療法を行い、その成績を比較検討した。対象はクロミフェン単独療法群(単独群)52例、クロミフェン・当帰芍薬散併用療法群(併用群)41例であり、両群間で、年齢、不妊期間、内分泌学的背景に差を認めなかった。排卵率は単独群では、症例別で86.5% (45/52)、周期別で72.6% (138/190)、併用群では症例別で87.8% (36/41)、周期別で70.0% (98/140)であり、両群間に有意差を認めなかった。妊娠率は単独群で21.2% (11/52)、併用群では34.1% (14/41)であり両群間に有意差を認めなかったが、併用療法の方が妊娠率が高い傾向がみられた。初めて排卵および妊娠した時期をみると、排卵した周期には差を認めなかったが、妊娠した周期は、単独群で3.82周期目、併用群では1.83周期目と併用群において有意に($p < 0.05$)早期に妊娠が成立した。治療開始3周期目の内分泌学的検討では、卵胞期中期のLH、FSH、プロラクチン値は治療法別に投与前後で有意差を認めなかったが、排卵前期のエストラジオール値については治療によりいずれも有意に($p < 0.01$)増加を認め、特に単独群においてその値は高かった。また排卵前期のプロゲステロン値についてみると、単独群で 0.72 ± 0.16 ng/ml、併用群では 0.34 ± 0.03 ng/mlと併用群において有意($p < 0.05$)の減少が認められた。この結果、排卵前期のプロゲステロン/エストラジオール比は、単独群の 3.38 ± 1.40 に比し、併用群では 0.92 ± 0.19 と有意に($p < 0.05$)低かった。また黄体期中期のプロゲステロン値は、単独群で 12.1 ± 1.97 ng/ml、併用群では 15.0 ± 0.2 ng/mlといずれの群においても有意に($p < 0.01$)増加を認め、特に併用群においてその値が高かった。以上のことにより、クロミフェンに当帰芍薬散を併用することにより、妊娠する時期が早まること、その理由として排卵前期および黄体期中期における性ステロイドホルモン分泌の改善が考えられ、クロミフェン単独療法にて排卵はするが、妊娠に至らない症例に対して、有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 83 - 91, 1995)

緒 言

稀発月経、無排卵周期症、第一度無月経などの比較的軽症の排卵障害に対して、第一選択としてクロミフェンが用いられ、60～80%と高い排卵率を得ており有効な治療法とされているが、その一方で妊娠率は20%程度にすぎず、排卵率が高いにもかかわらず、妊娠率が低い問題点も指摘されている。そのため、クロミフェンにより排卵は認められるがなかなか妊娠しない症例については、クロミフェンと種々の薬剤との併用療法が試みられている^{1,2)}。その一つとして漢方薬との併用療法が行われ、温経湯を初めとして当帰芍薬散、桂枝茯苓丸などが用いられ、その有効性の検討や、科学的に漢方薬の作用機序を解明するための基礎的³⁻⁵⁾、臨床的検討成績⁶⁻⁸⁾が報告されている。我々もすでに、温経湯とクロミフェンの併用療法について、その有効性や作用機序について報告してきた⁹⁾。そこで今回我々は当帰芍薬散について稀発月経、無排卵周期症、第一度無月経と比較的軽症の排卵障害に対するクロミフェンとの併用療法の有用性を検討し、その機序について内分泌学的検討を行った。

対象および方法

1 対象

本研究は1992年1月から1994年3月までに徳島大学医学部産科婦人科学教室および関連病院の産婦人科の共同研究として行った。稀発月経、無排卵周期症および第一度無月経の患者を対象とし、封筒法によりクロミフェン単独投与群とクロミフェン・当帰芍薬散併用群に分け、この2群間で比較検討を行った。対象患者の内訳はクロミフェン単独投与群が52例、クロミフェン・当帰芍薬散併用群が41例であり、排卵障害の程度はクロミフェン単独投与群で稀発月経14例、無排卵周期症25例、第一度無月経13例、クロミフェン・当帰芍薬散併用群で稀発月経12例、無排卵周期症20例、第一度無月経9例であった。また年齢分布はクロミフェン単独投与群で21歳から43歳(平均29.2歳)、クロミフェン・当帰芍薬散併用群で20歳から41歳(平均29.1歳)、不妊期間はクロミフェン単独投与群で平均35.9か月、クロミフェン・当帰芍薬散併用群で平均37.0か月であり、両群間に差を認めなかった。

2 薬剤投与スケジュール

クロミフェン単独投与群では、クロミフェン(クロミッド®)を月経または消退出血開始5日目より50

mg/日を5日間投与し、排卵しなければ1周期毎に100 mg/日、150 mg/日と増量した。一方クロミフェン・当婦芍薬散併用群では、クロミフェンの投与方法は単独群と同様に増量を行い、さらに月経または消退出血開始2日目より当婦芍薬散(N023ツムラ当婦芍薬散エキス顆粒)7.5 g/日を28日間投与した。なお妊娠が成立しない限り、原則として両群とも3周期以上の治療を行った。

3 検討項目

1) 排卵および妊娠の有無の確認

両群において排卵および妊娠の有無を確認するとともに、治療開始からはじめて排卵あるいは妊娠に至った期間およびそのときのクロミフェンの投与量を算定した。なお、排卵の確認は基礎体温の高温相が10日間以上続いたか妊娠に至ったもの、あるいは黄体期中期のプロゲステロン値が10 ng/ml以上のものとした。

2) 内分泌学的検討

両群における内分泌学的検査として、まず無治療周期における血中LH、FSH、プロラクチン(PRL)、エストラジオール、プロゲステロンの各値を測定した、さらに両群の治療第3周期において卵胞期中期(月経周期6~7日目)にLH、FSH、PRLを、排卵前期(月経周期13~15日目)に血中エストラジオール値およびプロゲステロン値を測定し、超音波検査により卵胞径を計測し、頸管粘液量の測定を行い、さらに黄体期中期(高温相6~7日目)に血中プロゲステロン値、超音波検査によって子宮内膜の厚さを測定した。なお、血中LH、FSH、PRL値の測定はそれぞれ、スパッカー-S LHキット、スパッカー-S FSHキット、スパッカー-Sプロラクチンキット(第一ラジオアイソトープ社製)で、血中エストラジオールおよびプロゲステロン値はE₂キット「第一」II、プロゲステロンキット「第一」II(第一ラジオアイソトープ社製)を用いて測定を行った。これらのキットを用いて無治療周期において測定した値を平均±標準誤差で示すと、クロミフェン単独投与群でLHは7.23 ± 0.79 mIU/ml、FSHは6.69 ± 0.37 mIU/ml、プロラクチンは6.26 ± 0.64 ng/ml、エストラジオールは77.0 ± 6.84 pg/ml、プロゲステロンは0.62 ± 0.55 ng/mlであり、クロミフェン・当婦芍薬散併用群の値はLHは8.81 ± 1.06 mIU/ml、FSHは8.09 ± 0.63 mIU/ml、プロラクチンは6.39 ± 0.66 ng/ml、エストラジオールは77.9 ± 10.6 pg/ml、プロゲステロンは0.60 ± 0.53 ng/mlであり、両群間に有意差を認めなかった。

結 果

1 排卵妊娠成績

クロミフェン単独投与群における症例別排卵率は52例中45例、86.5%、周期別排卵率は、190周期中138周期、72.6%であり、クロミフェン・当婦芍薬散併用群では症例別排卵率は41例中36例、87.8%、周期別排卵率は、140周期中98周期、70.0%であり、両群間に有意差を認めなかった。また妊娠率についてはクロミフェン単独投与群では、52例中11例、21.2%、修正妊娠率は48例中11例、22.9%であったが、クロミフェン・当婦芍薬散併用群では41例中14例、34.1%に妊娠がみられ、修正妊娠率は39例中14例、35.8%であり、クロミフェン・当婦芍薬散併用群では妊娠率が高くなる傾向にあったが(表1)、有意差は認められなかった。次に、それぞれの治療に

表1 クロミフェン単独療法と当婦芍薬散併用療法による排卵妊娠成績

	症例別 排卵率	周期別 排卵率	症例別 妊娠率
クロミフェン 単独療法	86.5% (45/52)	72.6% (138/190)	21.2% (11/52)
当婦芍薬散 併用療法	87.8% (35/41)	70.0% (98/140)	34.1% (14/41)

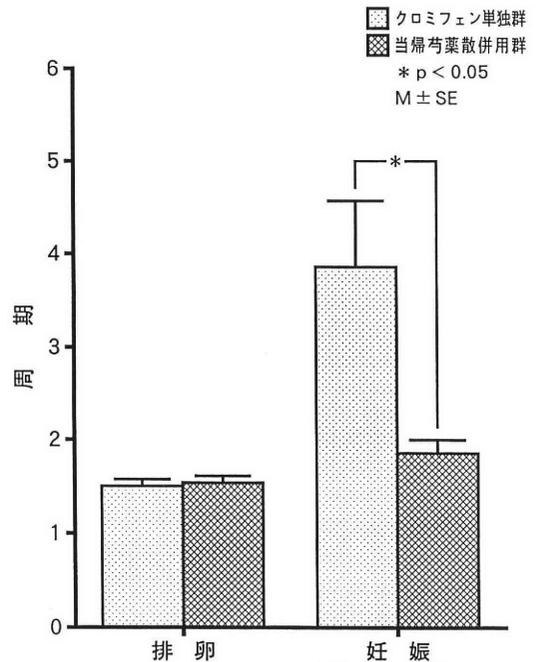


図1 初めて排卵および妊娠した時期(治療開始からの周期)

より初めて排卵および妊娠した時期をみると、初めて排卵した周期はクロミフェン単独投与群では平均1.23周期、クロミフェン・当帰芍薬散併用群では平均1.33周期と両群間に有意差を認めなかった。一方初めて妊娠した周期はクロミフェン単独投与群では平均3.82周期目、クロミフェン・当帰芍薬散併用群では平均1.86周期目と併用群は有意に ($p < 0.05$) 早くから妊娠が認められた(図1)。

さらに、それぞれの治療により初めて排卵および妊娠した周期に要したクロミフェンの投与量を調べた。初めて排卵した周期においてはクロミフェン単独投与群では平均78.9 mg/日、クロミフェン・当帰芍薬散併用群では平均79.2 mg/日と両群間に有意差

を認めず、初めて妊娠した周期においてもクロミフェン単独投与群で平均85.0 mg/日、クロミフェン・当帰芍薬散併用群では平均85.7 mg/日と両群間に有意差を認めなかった。

2 治療周期における内分泌学的検討

1) 卵胞期中期LH, FSH, PRL値

排卵のあった群における卵胞期中期LH, FSH, PRL値を治療前と治療周期とで比較すると、クロミフェン単独投与群でLHは6.83 ± 0.80から6.38 ± 1.05 mIU/mlに、FSHは6.53 ± 0.4から6.55 ± 0.99 mIU/mlに、PRLは6.30 ± 0.73から6.58 ± 1.27 ng/mlといずれも有意な変動を示さなかった。また、クロミフェン・当帰芍薬散併用群においてもLHは7.49 ± 0.68から

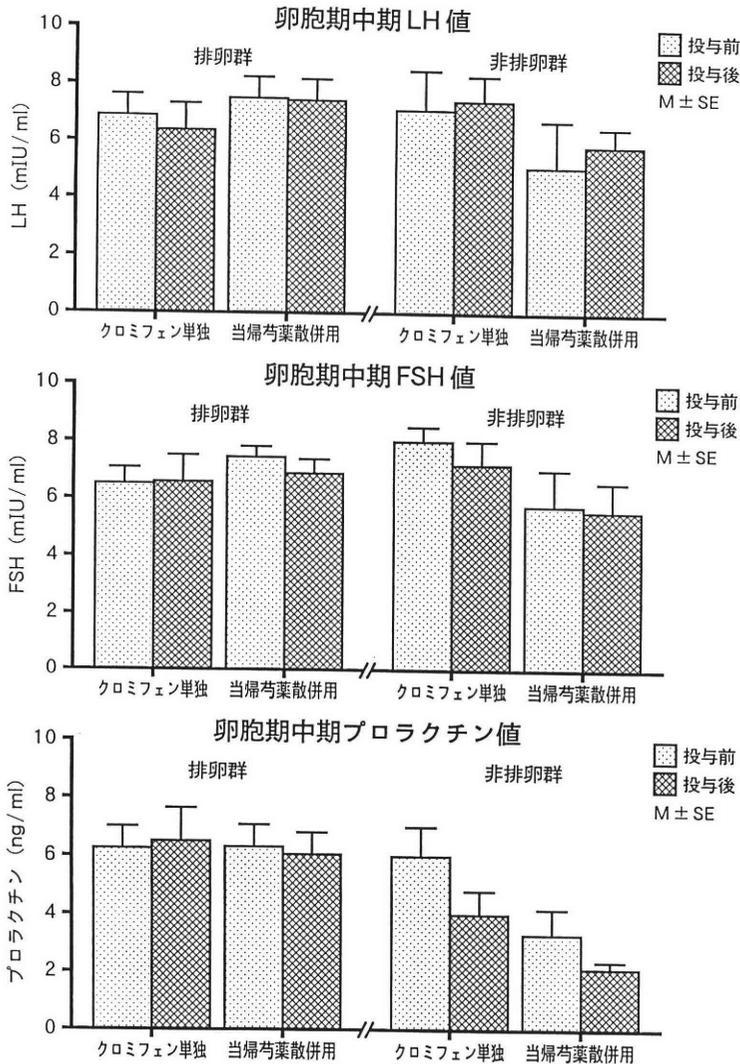


図2 治療前後における卵胞期中期LH, FSH, プロラクチン値

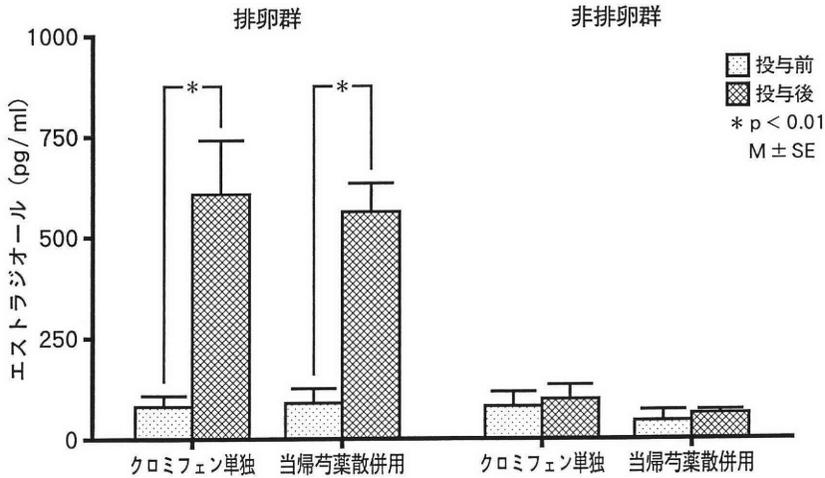


図3 治療前後における排卵前期エストラジオール値

7.46 ± 0.66 mIU/mlに, FSHは7.42 ± 0.4から6.92 ± 0.59 mIU/mlに, PRLは6.40 ± 0.7から6.09 ± 0.7 ng/mlといずれも有意な変動を示さなかった(図2).

2) 排卵前期のエストラジオール値

排卵のあった群における排卵前期の血中エストラジオール値を治療前と治療周期とで比較すると, クロミフェン単独投与群で78.5 ± 7.56から619.0 ± 133.3 pg/mlへ, クロミフェン・当婦芍薬散併用群では83.8 ± 11.9から560.1 ± 87.3 pg/mlへといずれの群においても有意に(p < 0.01)増加をみとめ(図3), 特に単独投与群の方が高値を示したが, 両群間には有意差は認めなかった.

3) 排卵前期における発育卵胞数

排卵のあった群において卵胞径が18 mm以上の発育卵胞数を比較すると, クロミフェン単独投与群では1.55 ± 0.18個, クロミフェン・当婦芍薬散併用群では1.32 ± 0.16個であり, 両群間には有意差を認めなかった.

4) 排卵前期における頸管粘液量

排卵のあった群において頸管粘液量を比較すると, クロミフェン単独投与群では0.21 ± 0.04 ml, クロミフェン・当婦芍薬散併用群では0.29 ± 0.03 mlとやや多かったが, 両群間には有意差を認めなかった(図4).

5) 排卵前期における血中プロゲステロン値

排卵のあった群において, 排卵前期における血中プロゲステロン値を2群間で比較すると, クロミフェン単独投与群では0.72 ± 0.16 ng/ml, クロミフェン・当婦芍薬散併用群では0.34 ± 0.03 ng/mlであり,

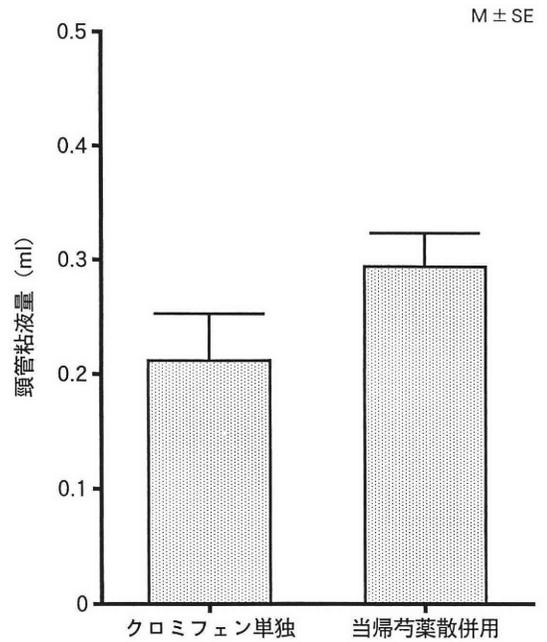


図4 排卵前期における頸管粘液量

当婦芍薬散併用群が有意に(p < 0.05)排卵前期のプロゲステロン値が低値であった(図5).

6) 排卵前期のプロゲステロン/エストラジオール比
排卵前期のプロゲステロン値を同時に測ったエストラジオール値で除した比は, クロミフェン単独投与群では3.38 ± 1.40であり, クロミフェン・当婦芍薬散併用群の0.92 ± 0.19に比べ有意に(p < 0.05)低かった(図6).

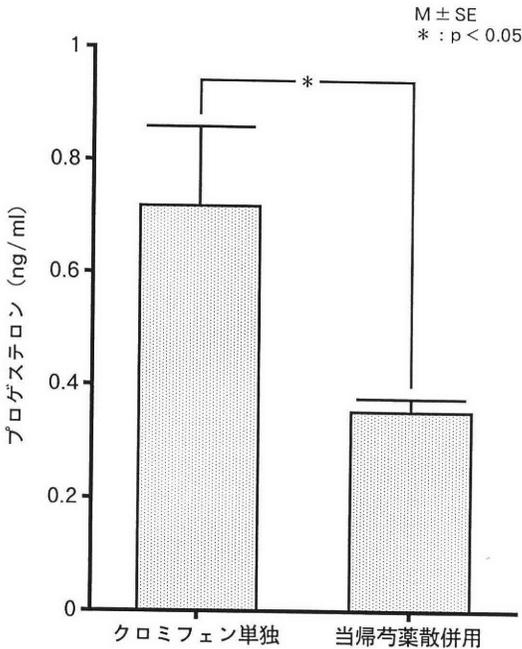


図5 排卵前期におけるプロゲステロン値

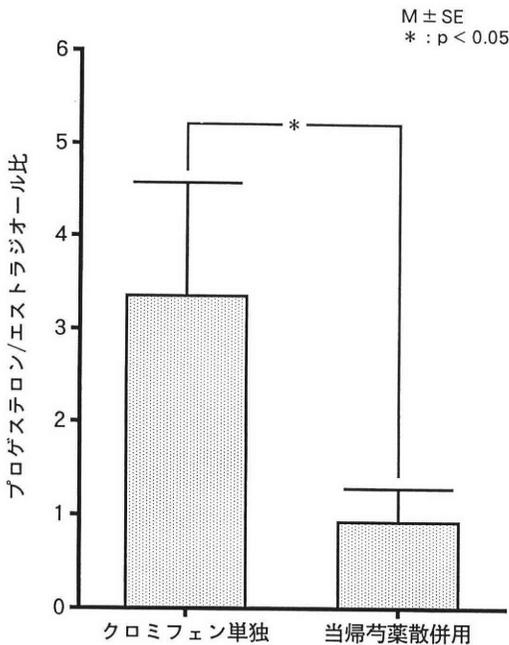


図6 排卵前期におけるプロゲステロン/エストラジオール比

7) 黄体期中期の血中プロゲステロン値

排卵のあった群において、黄体期中期の血中プロゲステロン値を治療前と治療周期とで比較すると、

クロミフェン単独投与群で 1.52 ± 0.62 から 12.1 ± 1.97 ng/mlへ、クロミフェン・当帰芍薬散併用群では 2.42 ± 0.6 から 15.0 ± 0.2 ng/mlへといずれの群においても有意に ($p < 0.01$) 増加をみとめ(図7), 特に当帰芍薬散併用群でその値は高値を示したが、単独群との間には有意差を認めなかった。

8) 黄体期中期の子宮内膜の厚さ(超音波検査による)

排卵のあった群において、黄体期中期の子宮内膜の厚さを計測し、両群間で比較すると、クロミフェン単独投与群では 8.85 ± 0.90 mm, クロミフェン・当帰芍薬散併用群では 8.55 ± 0.44 mmであり、両群間には有意差を認めなかった。

9) 基礎体温における高温相の期間

排卵のあった群において、基礎体温上の高温相の期間を2群間で比較すると、クロミフェン単独投与群では 14.6 ± 0.41 日, クロミフェン・当帰芍薬散併用群では 14.3 ± 0.39 日であり、両群間に有意差を認めなかった。

考 察

当帰芍薬散は、当帰、芍薬、川芎、茯苓、蒼朮、沢瀉の6種類の構成生薬よりなる漢方薬であり、「金匱要略」によれば、妊娠中の腹痛、婦人の諸種の腹痛に効果があることになっている¹⁰⁾。しかしその後、冷え症で貧血の傾向があり、筋肉が軟弱で疲労しやすい人に目標がおかれ、更年期障害、妊娠中の諸病(浮腫、腹痛など)、月経困難、月経不順、不妊症などに用いられてきた。このうち排卵障害に対する効果について、五十嵐ら⁷⁾は持続性無排卵周期症および中枢性第一度および第二度無月経の患者に対して、当帰芍薬散の単独治療を行い、64.3% (18/28) に排卵が認められ、20.8% (5/24) に妊娠を認めたと報告している。また、小山ら⁸⁾は無排卵周期症患者に当帰芍薬散を用いて、37.8% (14/37周期) の周期別排卵率を、また21.4% (3/14) の妊娠率を得ている。さらに証を考慮した漢方医学的見地から機能性不妊を対象にして、村田ら¹¹⁾は6/28 (21.4%)、亀井ら¹²⁾は5/24 (20.8%) の妊娠率を得ている。

一方クロミフェンとの併用療法については、五十嵐ら⁷⁾はそれぞれの単独療法において排卵の認められない10例に対して併用療法を施行し、中枢性第一度無月経で100%、持続性無排卵周期症で60%に排卵を認めたと報告している。また岩淵ら¹³⁾は第一度無月経、第二度無月経、月経不順、無排卵周期症11例にセキノビットあるいはクロミフェンと当帰芍薬散を併用し、11例中7例 (63.6%) に妊娠を認めている。今

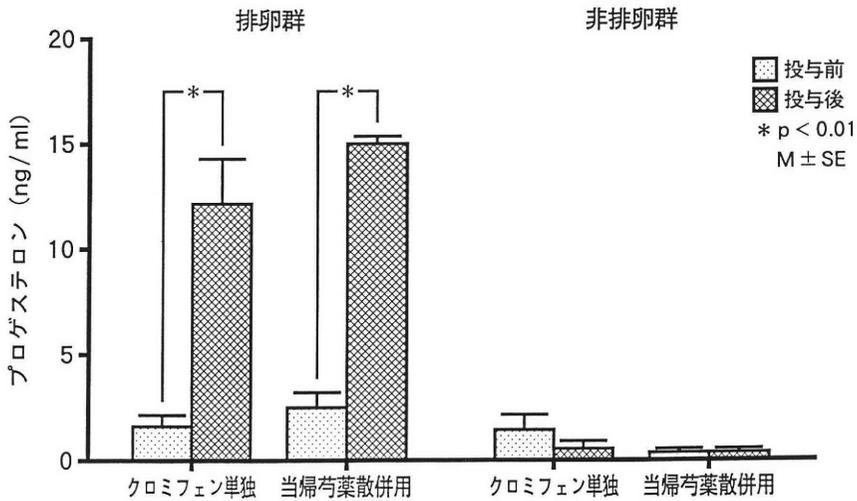


図7 治療前後における黄体期中期プロゲステロン値

回我々は稀発月経、無排卵周期症、第一度無月経を示す排卵障害患者を対象として、無作為にクロミフェン単独とクロミフェン・当婦芍薬散併用とに割付け比較検討したが、排卵率については併用療法においてもクロミフェンの効果を増強する結果は得られなかった。しかし、妊娠率についてみると、当婦芍薬散を併用することにより、クロミフェン単独の21.2%が34.1%とクロミフェン単独の効果を増強する傾向が認められた。また、初めて妊娠が認められた周期についても、クロミフェン単独では3.82周期目であったのが当婦芍薬散を併用することにより1.86周期目と有意に早まり、当婦芍薬散が妊娠に関してクロミフェンの効果を高める作用のある可能性が示された。

このような効果をもたらす当婦芍薬散の作用機序を解明する目的で、内分泌学的変動について検討を行った。以前、小山ら⁸⁾は当婦芍薬散を投与することによりプレマリンテストおよびLH-RHテストの改善傾向が認められ、血中エストラジオール、プロゲステロン値の増加が認められたことから、当婦芍薬散が視床下部-下垂体系に作用して下垂体からのゴナドトロピン放出を促し、結果として卵巣機能を活性化することを推察している。我々の今回の検討ではまず、卵胞期中期のLH、FSHおよびプロラクチンの測定値については、治療前後でも差を認めず、また両群間でも差を認めなかった。排卵前期の頸管粘液量や発育卵胞数にも両群間で有意差を認めなかった。また排卵前期の血中エストラジオール値はいずれの群においても治療前に比べ有意に増加を示した

が、特にクロミフェン単独投与群の方が、当婦芍薬散併用群に比べ高値を示した。この時期のプロゲステロン値およびプロゲステロン/エストラジオール比について検討したところ、いずれも当婦芍薬散併用群の方が、クロミフェン単独投与群に比べ有意に低値を示した。この排卵前期におけるプロゲステロン/エストラジオール比の低下が卵の発育や子宮内膜の状態に好影響を及ぼした結果、妊娠が促進される可能性が考えられた。さらに、黄体期中期の子宮内膜の厚さや高温相の期間についての検討では両群間で差を認めなかった。黄体期中期の血中プロゲステロン値についてはいずれの群においても治療前に比べ有意に増加を示した。特に当婦芍薬散併用群の方が高値を示し、黄体期においても黄体からの性ステロイドホルモンが亢進し、着床期内膜の環境が改善する可能性が推察された。

このような卵巣に対する当婦芍薬散の効果についてはいくつかの基礎検討の報告がある。田中ら¹⁴⁾によると培養顆粒膜細胞を用いた実験においてブタでは、当婦芍薬散を投与することにより、培養上清中のエストラジオールは低下し、プロゲステロンは増加するとしている。ヒトにおいても同様の実験を行っているが、それではエストラジオールもプロゲステロンも増加し、特に72時間前培養後の当婦芍薬散添加前の培養液中のプロゲステロン/エストラジオール比が重要な値であり、この値の高いものほど添加後の培養液中のプロゲステロン産生を促進したと述べている。また白杵¹⁵⁾は、ラット排卵前卵胞のperfusion実験において当婦芍薬散は黄体を刺激し、

プロゲステロン産生分泌を促進させることを報告し、その後の検討¹⁶⁾によりさらにcyclic AMP-adenylate cyclase系の活性化が関与することを示唆している。さらに当帰芍薬散の各種構成生薬について、黄体機能に及ぼす影響を検討¹⁷⁾しており、当帰、芍薬、茯苓をブレンドすると有意にプロゲステロン産生が高まるとしている。

今回の我々の検討では、クロミフェン単独療法と当帰芍薬散併用療法を比較すると、両群間で排卵前期のプロゲステロン値およびプロゲステロン/エストラジオール比に有意差を得た。このような排卵前期のプロゲステロン値やプロゲステロン/エストラジオール比と妊娠成立についての検討については種々の報告がある¹⁸⁾。前川ら¹⁹⁾は原因不明不妊において過排卵刺激を施行して妊娠した10例の排卵前期のホルモン状態を妊娠した周期、妊娠しなかった周期すべてにわたって詳細に解析し、妊娠した周期では有意に排卵前期のプロゲステロン/エストラジオール比が低いと報告している。今回の我々の検討から、当帰芍薬散が排卵前期のプロゲステロン/エストラジオール比を低下させる可能性も考えられ、妊娠について好影響を及ぼしたことが推測される。しかし当帰芍薬散についてはこのような卵巣に対する影響だけでなく、中枢にも作用して、脳内のアセチルコリンレセプターを増加させたり⁴⁾、下垂体においてLH、FSHの分泌を促進する報告⁵⁾もあり、卵巣だけの作用でなく、中枢においても視床下部・下垂体系に対して重要な役割を果たしていると思われる。今後さらに研究が進めば視床下部・下垂体・卵巣と一連の流れにおける当帰芍薬散の作用が明らかになると思われ、臨床的にも広く応用される可能性がある。一般的にクロミフェンについては排卵率が高いにもかかわらず妊娠率がかならずしも高くなく、その理由として頸管粘液分泌不全、黄体機能不全、黄体化未破裂卵胞症候群などが推察されている。当帰芍薬散はそのようなクロミフェンの欠点を補う可能性が考えられ、クロミフェン単独療法において排卵は認められるが、妊娠に至らない症例においては、今後積極的に当帰芍薬散を併用することが有用であると思われる。

まとめ

1) 稀発月経、無排卵周期症、第一度無月経の排卵障害例について、クロミフェン単独療法と当帰芍薬散併用療法を行い、排卵率については改善はみられなかったが、妊娠を早める効果が認められた。

2) 当帰芍薬散併用により、クロミフェン単独に比べ、排卵前期のプロゲステロン値およびプロゲステロン/エストラジオール比が有意に低下した。

3) 以上より、今回の検討においては当帰芍薬散は卵巣において性ステロイドホルモン環境を是正することにより妊娠率を向上させる可能性が示された。

稿を終えるにあたり、本研究に御協力いただいた斎藤真平先生、小笹皓雍先生、河野美香先生、岡山哲也先生、大頭敏文先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 青野敏博, 山口正明, Clomiphene citrate と他剤の併用による排卵の誘発. 産婦の実際 36: 151, 1987
- 2) 東敬次郎, クロミフェンのバリエーション療法: 産婦人科におけるホルモン療法の実際, 青野敏博編著, p63, 永井書店, 1994
- 3) Miyake A, J-W Lee, Aono T, et al., Wen-Jing-Tang, a traditional Chinese herbal medicine increases luteinizing hormone release in vitro. Am J Chinese Medicine XIV: 157, 1986
- 4) 小山嵩夫, 萩野信義, ラット排卵における当帰芍薬散の神経内分泌学的効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ VI: 76, 1989
- 5) 青野敏博, 苛原 稔, 安井敏之 他, 無排卵と漢方. 産婦治療 63: 191, 1991
- 6) 矢内原巧, 月経異常, 不妊症の漢方療法—その現代医学的評価—. 日産婦誌 36: 451, 1984
- 7) 五十嵐正雄, 宇津木利雄, 鹿沼達哉 他, 不妊症に対する漢方療法. Therapeutic Research 2: 1022, 1985
- 8) 小山嵩夫, 大原基弘, 斎藤 幹 他, 排卵障害に対する漢方薬の作用. 産婦人科漢方研究のあゆみ IV: 21, 1987
- 9) 安井敏之, 青野敏博, 苛原 稔 他, クロミフェン無効の正プロラクチン血性排卵障害症例に対するクロミフェン—温経湯併用療法の検討. 日不妊会誌, 35: 86, 1990
- 10) 何 任, 金匱要略解説(勝田正泰監訳), p566, 東洋学術出版社, 1979
- 11) 村田高明, 増田良平, 飯塚理八 他, 機能性不妊における漢方薬療法について. 漢方医学 3: 10, 1979
- 12) 亀井 清, 中村幸雄, 村田高明 他, 不妊領域における漢方薬療法による治療. 産婦世界 32: 731, 1980
- 13) 岩淵慎助, 米本行範, ツムラ当帰芍薬散による女性不妊症の治験成績. 産婦治療 45: 383, 1982
- 14) 田中俊誠, 古田伊都子, 藤本征一郎 他, 培養顆

粒膜細胞のestradiolおよびprogesterone産生に及ぼす漢方製剤の影響. 産婦人科漢方研究のあゆみ Ⅷ: 34, 1991

- 15) 臼木 愨, 岩崎寛和, 宮川創平 他, 漢方製剤とgonadal steroidogenesis. 和漢医薬誌 3: 219, 1986
- 16) Usuki S, Effects of Chinese herbal medicines on progesterone secretion by corpus luteum. Jpn J Fertil Steril 31: 482, 1986
- 17) Usuki S, Effects of Tokishakuyakusan and its components on rat corpus luteum function in vitro. Am J Chinese Medicine XVI: 11, 1988
- 18) Kagawa T, Yamano S, Aono T, et al., Relationship among serum levels of luteinizing hormone, estradiol, progesterone during follicle stimulation and results of in vitro fertilization and embryo transfer. J Assist Reprod Genet 9: 106, 1992
- 19) Maegawa M, Kamada M, Aono T, et al., Difference of the hormonal profile at the periovulatory phase in pregnant and nonpregnant cycles of infertile women with unexplained etiology. Gynecol Obstet Invest 35: 228, 1993

Studies on the combination treatment with clomiphene citrate and Toki-shakuyaku-san

Toshiyuki Yasui, Minoru Irahara
and Toshihiro Aono

Department of Obstetrics and Gynecology
The University of Tokushima, School of Medicine
Tokushima 770, Japan

Hisatoshi Takahashi
Oe Kyodo Hospital

Hiroyasu Ino
Komatsujima Red Cross Hospital

Osamu Naka
Tokushima Prefectural Central Hospital

Teruhiko Matsushita
Tokushima Prefectural Miyoshi Hospital

Akira Sakaguchi and Tadahiro Yoshimoto
Tokushima Municipal Hospital

Yasuya Kishi and Akemi Yamashita
Tokushima Teishin Hospital

Mikihiko Takemoto
Okawa General Hospital

Yoshio Ohno
Kaisei General Hospital

Makoto Takayanagi
Kagawa Prefectural Tsuda Hospital

Norio Nagamachi
Zentsuji National Hospital

Satoru Takeuchi
Kochi Nokyo General Hospital

Toshikazu Miyake
Sapporo Toho Hospital

The clomiphene treatment and the combination treatment with clomiphene citrate and Toki-shakuyaku-san, which is a traditional Chinese herbal medicine, were applied for 93 patients with ovulatory disturbances. The clomiphene treatment restored ovulation in 45 of 52 patients (86.5%) and 11 patients (21.2%) became pregnant, and the combination treatment induced ovulation in 36 of 41 patients (87.8%) and 14 patients (34.1%) conceived. The duration of treatment till the first ovulated cycle was not significantly differ in two groups, however the first pregnant cycle with combination treatment was significantly ($p < 0.05$) earlier than that of clomiphene cycle. Both patients with clomiphene treatment and combination treatment showed significant ($p < 0.01$) increase in the serum level of estradiol in the preovulatory phase and of progesterone in the mid-luteal phase, but the serum level of progesterone and the ratio of progesterone/estradiol in the preovulatory phase with combination treatment was significantly ($p < 0.05$) lower than that with clomiphene treatment. These results indicate that the combination treatment is effective for treatment of patients who have not become pregnant with clomiphene treatment, and suggests that Toki-shakuyaku-san may be effective by improvement of ratio of estrogen and progesterone secretion.

(受付: 1994年7月8日)

(受理: 1994年10月3日)

遅発型先天性副腎過形成症の一症例

A Case Report of Late-onset Congenital Adrenal Hyperplasia

新潟市民病院産婦人科

花岡 仁一

竹内 裕

柳瀬 徹

Jin-ichi HANAOKA

Yutaka TAKEUCHI

Toru YANASE

高柳 健史

徳永 昭輝

Takeshi TAKAYANAGI

Akiteru TOKUNAGA

Department of Obstetrics and Gynecology

Niigata City General Hospital, Niigata 950, Japan

遅発型先天性副腎過形成症の1症例を経験したので報告する。

症例は28歳、女性。多毛、無月経、不妊を主訴に受診。男化徴候を認め、testosterone, androstenedioneなど血中アンドロゲンが高値を示した。副腎、卵巣腫瘍を認めず、血中17-hydroxyprogesterone, 21-deoxycortisolの高値より遅発型21-水酸化酵素欠損症と診断した。Dexamethasoneの投与により血中アンドロゲンレベルは正常化し男化徴候は軽快、自然月経が発来しclomipheneの併用により排卵が認められた。

先天性副腎過形成症では、従来から副腎性器症候群として知られた古典的病型に加え遅発型の存在が明らかにされ、多毛など男化徴候を伴う月経異常、不妊の原因となりうる事が指摘されている。本邦における本症の報告はまれであるが少なからず存在すると思われ、高アンドロゲン状態の場合は本症についても注意すべきである。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 92 - 96, 1995)

緒言

先天性副腎過形成症とは、副腎皮質におけるステロイドホルモン生成に関与する酵素の先天性欠損によりcortisol分泌の低下をきたし、ネガティブフィードバックによるACTHの分泌亢進により副腎皮質が過形成をきたす症候群である。欠損した酵素の種類によりいくつかの病型に分類されるが、21-水酸化酵素欠損症(21-hydroxylase deficiency: 21-OHD)、11 β -水酸化酵素欠損症(11 β -hydroxylase deficiency: 11 β -OHD)、3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase: 3 β -HSD)欠損症では胎児期からアンドロゲンの過剰分泌が認められ、臨床的には副腎性器症候群と呼ばれることがあり、産婦人科領域では女性仮性半陰陽をきたす疾患の一つとして認識されている。

一方、近年、これら従来から知られた古典的病型に加え、生下時には異常を認めないものの小児期か

ら思春期前後より発症する、より軽症型の存在が明らかにされてきた。これは今日遅発型と呼ばれ、多毛など、男化徴候を伴う月経異常などの原因疾患としての意義が指摘されている¹⁾が、本邦における本疾患名としての報告は少ない。

このたび、我々は、男化徴候を伴い、無月経、不妊を主訴とした性成熟期婦人で、遅発型21-OHDと考えられる症例を経験したので報告する。

症例

患者: 28歳, 主婦.

主訴: 多毛, 無月経, 不妊.

家族歴: 特記すべき事項なし. 同胞, 弟2人.

既往歴: 特記すべき事項なし.

月経歴: 初経17歳, 以後不順.

妊娠歴: なし. 結婚27歳.

現病歴: 初経後19歳まで無月経. この頃より顔面, 下腹部, 下肢の多毛, 痤瘡, 声の低音化が増強.

19歳および26歳時、各3カ月程近医にてピルの投与を受けた。平成4年5月、約1年間の無月経を訴え、当科を初診した。

現症：身長155cm、体重59kg。血圧120/70mmHg。声の低音化、痤瘡(写真1)、陰核肥大、多毛(写真2)を認める。顔面、下腿は剃毛されている。内性器には内診上特記すべき所見はない。無月経第Ⅱ度。



写真1 痤瘡



写真2 陰核肥大および多毛

検査成績：検血、検尿、肝機能、電解質いずれも正常。血中ホルモン値は表1のごとくで、testosteroneの異常高値を認めた。超音波断層法にて多嚢胞卵巣(写真3)を認めたが卵巣腫瘍はなく、CTにて副腎腫瘍も認めなかった。

経過：検査後受診せず、平成5年6月再診。血中17-hydroxyprogesterone、21-deoxycortisolを測定したところ高値を認めた(表1)ため、スクリーニングとして遅発型21-OHDと診断、dexamethasoneの投与を開始した。その後は血中アンドロゲンレベルは正常化し、男化徴候も軽快、自然月経が発来し、clomipheneの併用により排卵も認め、現在治療継続中である(図1)。

考 察

21-OHDでは従来から知られた古典型に加え、近年、非古典型として、生下時には異常を認めないが小児期から思春期前後に発症する遅発型や、臨床症状は示さず内分泌学的検査により初めて判明する無症候型といった、より軽症型の存在が明らかになってきた。病型を規定する遺伝子には21-OHD severe、21-OHD mild、21-OHD normalの3種があり、これらの組み合わせにより、21-OHD severe/21-OHD severeでは古典型が、21-OHD severe/21-OHD mildまたは21-OHD mild/21-OHD mildでは非古典型が、いずれも常染色体劣性遺伝により発症すると説明されており²⁾、各型における内分泌動態²⁻⁵⁾やHLA抗原との関連性、遺伝子異常⁶⁾も報告されている。

遅発型の臨床像としては、多毛、男化徴候を伴う

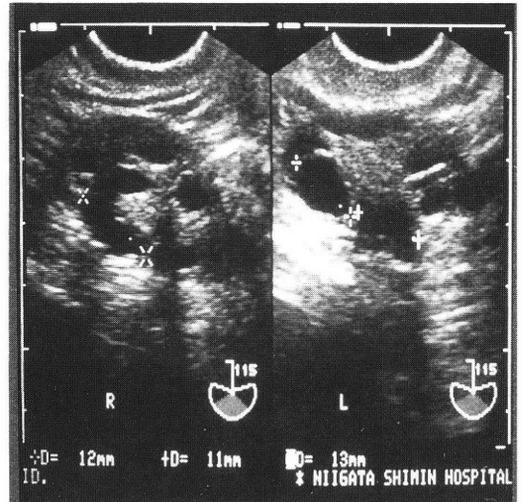


写真3 多嚢胞卵巣

表1 内分泌検査成績

	4年5月	5年6月	5年8月
LH (mIU/ml)	23.9	8.7 → 134.9#	
FSH (mIU/ml)	4.3	4.5 → 15.5#	
prolactin (ng/ml)	27.4	17.4 → 78.1*	
estrone (pg/ml) @	217	153	
estradiol (pg/ml)	166	105	
testosterone (ng/ml)	4.4	3.8	3.6
free-testosterone (pg/ml) @		8.9	
dehydroepiandrosterone (ng/ml) @		9.47	
dehydroepiandrosterone-sulfate (ng/ml) @		4594	
androstenedione (ng/ml) @		5.59	
cortisol (μg/dl)	16.1	12.8	
17-hydroxyprogesterone (ng/ml) @		19.0	180 → 200以上¶
21-deoxycortisol (ng/ml)			59.1

@ : 大塚アッセイ, # : LH-RH test, * : TRH test, ¶ : ACTH test

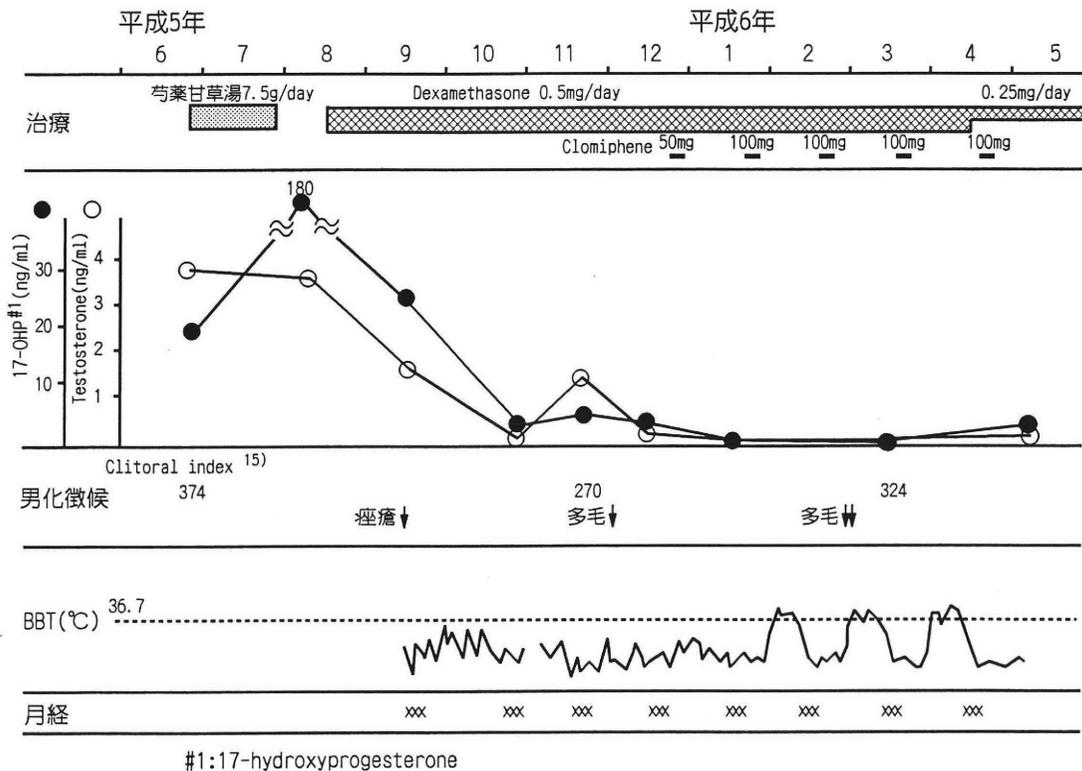


図1 治療経過

月経異常, 不妊などが指摘されており, Brodie et al.¹⁾ は諸家の報告例を集計し, 804例の多毛婦人中5%が遅発型21-OHDであったと述べている。

本症では, 1) 治療の基本は副腎皮質ホルモン (dexamethasone) であり, その適切な投与が長期にわたり

必要となりうること, 2) 遺伝性疾患であることから, 妊娠時には出生前診断, 胎児治療の必要性もありうること, 3) 重篤なストレス下ではcortisol欠乏が危惧されること, などの点からその診断的意義は大きい^{1,7)}。

診断にあたっては、基質である17-hydroxyprogesterone (17-OHP)の高値を確認することが最も重要である。その基礎値は、遅発型では健常人よりも高い傾向にあるが、健常人の範囲内に存在する場合も見られることからACTH負荷試験が正確である⁴⁾。しかし、スクリーニングとしてACTH負荷試験をすべきか否かについては議論があり¹⁾、Speroff et al.⁷⁾は基礎値200 ng/dlをカットオフポイントとしている。我々の症例では17-OHPおよび特異的とされる21-deoxycortisol基礎値の高値を認めたので、ACTH負荷試験による各種ステロイドホルモンの測定など詳細な内分泌学的検索は施行しなかったが、スクリーニングとしては、ほぼ遅発型21-OHDとしてよいものと思われる。

本邦における非古典的21-OHDの発症頻度は不明であるが、古典的21-OHDの頻度は、マスキューリングによると約19000人に1人、保因者頻度は70人に1人と見込まれている⁸⁾。白人においては非古典型は古典型よりさらに多く、約100人に1人と常染色体劣性遺伝性疾患の中では最も高頻度と推測されている⁹⁾。

また、遅発型先天性副腎過形成症の原因疾患としては、21-OHDに限らず11 β -OHDや3 β -HSD欠損症の報告^{10~13)}も見られ、これらにおいても、古典型の頻度は多くはないものの、遅発型の頻度は21-OHDに匹敵すると推測されている¹⁴⁾。

したがって、本邦では本疾患名としての報告は少ないが、多嚢胞卵巣症候群などと診断されている症例の中に少なからず存在するものと思われる。したがって、高アンドロゲン例では遅発型先天性副腎過形成症の存在にも注意すべきと思われる。

稿を終えるにあたり、本症例の検索にご協力いただいた、浜松医科大学小児科学教室小川治夫講師に深謝致します。

文 献

- 1) Brodie BL, Wentz AC, Late onset congenital adrenal hyperplasia: a gynecologist's perspective. *Fertil Steril* 48: 175, 1987
- 2) Kohn B, Levine LS, Pollack MS, et al., Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: A variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 817, 1982
- 3) Levine LS, Dupont B, Lorenzen F, et al., Cryptic 21-hydroxylase deficiency in families of patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1316, 1980

- 4) New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, et al., Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: Hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 320, 1983
- 5) Speiser PW, New MI, Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 86, 1987
- 6) Speiser PW, New MI, White PC, Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *N Engl J Med* 319: 19, 1988
- 7) Speroff L, Glass RH, Kase NG, Hirsutism. In: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 5th ed, p483, Williams & Wilkins Co, 1994
- 8) 税所純敬, 豊浦多喜雄, 関野高弘 他, 諸外国における先天性副腎過形成症. *ホと臨* 41: 785, 1993
- 9) Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, et al., High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37: 650, 1985
- 10) Newmark S, Dluhy RG, Williams GH, et al., Partial 11- and 21-hydroxylase deficiencies in hirsute women. *Am J Obstet Gynecol* 127: 594, 1977
- 11) Birnbaum MD, Rose LI, Late onset adrenocortical hydroxylase deficiencies associated with menstrual dysfunction. *Obstet Gynecol* 63: 445, 1984
- 12) Pang S, Lerner AJ, Stoner E, et al., Late-onset adrenal steroid 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. *J Clin Endocrinol Metab* 60: 428, 1985
- 13) Eldar-Geva T, Hurwitz A, Vecsei P, et al., Secondary biosynthetic defects in women with late-onset congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 323: 855, 1990
- 14) White PC, New MI, Dupont B, Congenital adrenal hyperplasia (Second of two parts). *N Engl J Med* 316: 1580, 1987
- 15) Tagatz GE, Kopher RA, Nagel TC, et al., The clitoral index: A bioassay of androgenic stimulation. *Obstet Gynecol* 54: 562, 1979

A case report of late-onset congenital adrenal hyperplasia

Jin-ichi Hanaoka, Yutaka Takeuchi,
Toru Yanase, Takeshi Takayanagi
and Akiteru Tokunaga

Department of Obstetrics and Gynecology
Niigata City General Hospital, Niigata 950, Japan

We experienced a case of late-onset congenital adrenal hyperplasia (CAH).

The patient was a 28-year-old Japanese woman. She complained of hirsutism, amenorrhea and infertility. In physical and pelvic examinations, acne, deepening of the voice, hirsutism and clitoromegaly were recognized. The measurement of serum testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate revealed hyperandrogenism. CT-scan showed no adrenal or ovarian mass. Hormonal assays demonstrated high levels of serum 17-hydroxyprogesterone and 21-deoxycortisol. Therefore, we diagnosed the case as late-onset 21-hydroxylase deficiency. Administration of dexamethasone normalized levels of serum androgens, and viri-

lism was lightened. Spontaneous menses occurred and ovulation was observed by use of clomiphene.

Classical CAH has been well known as adrenogenital syndrome by gynecologists. On the other hand, recently, late-onset type has been recognized. It is pointed out that this type may accompany menstrual disturbances and infertility due to excess androgen production. In Japan, case reports of this type are rare, however, it is estimated that more patients may exist. Therefore, we must consider late-onset CAH in the practice of hyperandrogenism.

(受付：1994年 7月 8日)

(受理：1994年10月 5日)

PRENATAL CYTOGENETIC DIAGNOSIS IN COUPLES WITH A BALANCED TRANSLOCATION

Hideto YAMADA, Kadomi KAKITANI, Nobuhiko HOSHI,
Kaoru HANATANI and Seiichiro FUJIMOTO

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

Abstract: Translocations causally account for the greatest incidence of structural chromosome anomalies in recurrent abortion. We summarized results of genetic amniocentesis obtained from 26 pregnancies of a reciprocal translocation-carrier and 13 pregnancies of a Robertsonian translocation-carrier in these seventeen years, in order to understand the frequency of genetically balanced/imbalanced conceptus from these couples.

After karyotypic analysis of genetic amniocentesis, the normal karyotype of a fetus was observed predominantly (55.6%), followed by carrier (25.9%), partial trisomy (11.1%) and partial monosomy (7.4%) in couples with a reciprocal translocation. Frequency of prior spontaneous abortion and still-birth in a history of pregnancies was 59.1%.

In case of couples with Robertsonian translocation, eight pregnancies (61.5%) had the normal karyotype and the others had the same karyotype as a carrier. Other abnormal karyotype was not observed. Frequency of prior spontaneous abortion and still-birth was up to 70.0%.

These data may be useful for the genetic counselling on couples with a balanced translocation.

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 40 (1), 97 - 100, 1995)

Introduction

Translocations causally account for the greatest incidence of structural chromosome anomalies in recurrent abortion¹⁾. Crossover or break and exchange of chromatin between any two nonhomologous chromosomes during meiosis may result in a reciprocal translocation. This process may occur without loss of genetic material and is then known as a balanced translocation. Individuals with a balanced translocation are predisposed to abnormal offspring with chromosomal imbalance. When the translocation is unbalanced, phenotypic abnormalities result, including mental retardation. Gametes from couples with a balanced translocation often contain genetic excesses and deficiencies, resulting in zygotes that have partial monosomy and trisomy. This is manifested as a spontaneous abortion or the birth of a child with defects and retardation²⁾.

Genetic amniocentesis is a powerful method for the detection of chromosomally abnormal conceptus, especially recommended for aged mother³⁾. This procedure is also available for these couples with a balanced translocation, because such couples have often repeated miscarriages and a history of birth with defects and retardation caused by chromosomal imbalance of a gamete.

We summarized results of genetic amniocentesis obtained from 26 pregnancies of a reciprocal translocation-carrier and 13 pregnancies of a Robertsonian translocation-carrier in these seventeen years, in order to understand the frequency of genetically balanced/imbalanced conceptus from these couples.

Materials and Methods

From April 1976 through January 1994 we carried out a cytogenetic amniocentesis of a total of 3087 pregnancies in Hokkaido University Hospital. Karyo-

typic analysis was performed by conventional banding methods, G-banding and/or quinacrine mustard banding. Twenty-six pregnancies of a reciprocal translocation-carrier and 13 pregnancies of a Robertsonian translocation-carrier admitted to this study. All couples were informed based on genetic counselling in Hokkaido University Hospital, about each type of a balanced translocation in terms of predisposition to an abnormal conceptus and clinical significance of genetic amniocentesis prior to the procedure.

Amniocentesis was performed between 15 and 20 the week of gestational age. Karyotypic results were divided into two tables according to a type of parental balanced translocations, a reciprocal translocation or a Robertsonian translocation.

Results

Twenty-seven karyotypes of fetuses from 26 pregnancies contained one twin pregnancy of couples with a reciprocal translocation (Table 1). Thirteen (50.0%) out of 26 couples had female carriers. Age of couples, a history of previous pregnancies and each karyotype were shown in Table 1. After karyotypic analysis of genetic amniocentesis, normal karyotype of a fetus was observed predominantly (55.6%), followed by carrier (25.9%), partial trisomy (11.1%) and partial monosomy (7.4%) (Table 3). Frequency of prior spontaneous abortion and still-birth in a history of pregnancies was 59.1% in couples with a reciprocal translocation.

Table 1 Genetic Amniocentesis in Couples with a Reciprocal Translocation

Case number	Age of couple		History of pregnancy (*)		Karyotype of carrier	Karyotype of fetus
	F	M	Abortion	Birth		
1	25	27	1	0	F 46XX, t (5q-; 13q+)	46XY, 13q+
2	28	30	3 (1)	0	F 46XX, t (5q-; 13q+)	46XX
3	30	32	4	0	F 46XX, t (5q-; 8q+)	46XX, t (5q-; 8q+)
4	29	32	3	1 (1)	M 46XY, t (8q-; 17q+)	46XX
5	32	31	1	1	M 46XY, t (5q-; 9q+)	46XY
6	35	34	1	2	M 46XY, t (5q-; 9q+)	46XX, 5p-
7	21	24	1	1 (1)	F 46XX, t (2q+; 3q-)	46XX, t (2q+; 3q-)
8	24	27	1	2 (1)	F 46XX, t (2q+; 3q-)	46XX
9	31	31	1	1	F 46XX, t (5q-; 9q+)	46XX, 5p-
10	27	26	1	1	F 46XX, t (4; 21) (q27; q22)	46XX, t (4; 21) (q27; q22)
11	26	30	2 (1)	1	M 46XX, t (4q; 21q)	46XX
12	33	34	3	1	M 46XX, t (11p-; 22p+)	46XY
13	30	31	3	0	F 46XY, t (6q+; 14q-)	①46XY②46XY
14	26	31	2 (1)	2	M 46XY, t (14; 16) (q32; q13)	46XY
15	36	—	2	1	F 46XX, t (6; 15) (q27; q15)	46XX, t (6; 15) (q27; q15)
16	32	—	3	1	M 46XY, t (5q+; 14q-)	46XY
17	29	—	0	1	F 46XX, der (13), t (13; 16)	46XY
18	31	34	0	1	F 46XX, t (1p-; 14q+)	46XX, t (1p-; 14q+)
19	29	29	0	2	M 46XY, t (3p-; 12q+)	46XX
20	29	34	2 (1)	3	M 46XY, t (14; 16) (q32; q13)	46XY, 14q+
21	33	34	3	1	F 46XX, t (12q+; 13q-)	46XY
22	34	38	1 (1)	3	M 46XY, t (4q; 21q)	46XX, t (4; 21) (q27; q22)
23	32	32	0	2	F 46XX, t (18q-; 20q+)	46XX
24	29	34	1	1	M 46XY, t (10p+; 13q+)	46XY, 13q+
25	30	35	2 (1)	1	M 46XY, t (10p+; 13q+)	46XX, t (10p+; 13q+)
26	28	28	2 (1)	0	M 46XY, t (3; 18) (q21; q21)	46XX

* Numbers in parentheses indicate frequency of prior induced abortion or still-birth

Table 2 Genetic Amniocentesis in Couples with a Robertsonian Translocation

Case number	Age of couple		History of pregnancy (*)		Karyotype of carrier	Karyotype of fetus
	F	M	Abortion	Birth		
1	30	31	4 (1)	1 (1)	F 45XX, t (Dq; Gq)	46XX
2	25	26	1	0	M 45XY, t (Dq; Gq)	46XY
3	28	27	1	0	M 45XY, t (Dq; Gq)	46XX
4	29	28	0	1	M 45XY, t (Dq; Gq)	45XX, t (Dq; Gq)
5	22	24	0	1	M 45XY, t (Dq; Gq)	46XY
6	33	42	2	1	F 45XX, t (Dq; Gq)	46XY
7	36	40	2	2	F 45XX, t (Dq; Gq)	45XX, t (Dq; Gq)
8	23	23	3	1 (1)	M 45XY, t (14; 21)	45XY, t (14; 21)
9	25	—	0	1	M 45XY, t (14; 21)	46XY
10	32	33	0	1	M 45XY, t (21q; 22q)	45XY, t (21q; 22q)
11	28	31	3	1	F 45XX, t (13q; 21q)	45XY, t (13q; 21q)
12	30	32	3	1	F 45XX, t (14q; 21q)	46XY
13	27	26	1	0	M 45XY, t (14q; 21q)	46XX

* Numbers in parentheses indicate frequency of prior induced abortion or still-birth

Table 3 Karyotype of a Total of 40 Genetic Amniocentesis

Karyotype of fetus	Karyotype of carrier (%)	
	Reciprocal translocation	Robertsonian translocation
Normal	15 (55.6)	8 (61.5)
Carrier	7 (25.9)	5 (38.5)
Partial monosomy	2 (7.4)	0
Partial trisomy	3 (11.1)	0

On the other hand, out of 13 couples with a Robertsonian translocation, 5 (38.5%) had female carriers (Table 2). None of carrier had a Robertsonian translocation involving homologous chromosomes. Eight pregnancies (61.5%) had normal karyotype and the other had the same karyotype as a carrier. Other abnormal karyotype was not found in this study. Frequency of prior spontaneous abortion and still-birth was up to 70.0% in couples with a Robertsonian translocation.

Discussion

Of the 4% to 6% couples with recurrent pregnancy loss is thought to be due to parental translocations, approximately 65% have reciprocal and 35% have Robertsonian translocations⁴. The risk of clinically apparent spontaneous abortions for carriers of reciprocal translocations have been estimated to be as

high as 50%⁵). However, the rate of clinically apparent spontaneous abortions has been reported to be less than 25% for carriers of Robertsonian translocations^{5, 6}). In Japanese population, the rate of spontaneous abortion and still-birth for the carriers with a balanced translocations was 74.5% in our previous study⁷). In the current study, couples who received genetic amniocentesis had a history of prior spontaneous abortion and still-birth at the frequency of 59.1% with a reciprocal translocation and 70.0% with a Robertsonian translocation. The frequencies of spontaneous abortion of the above two groups were 54.5% and 63.3%, respectively. Higher frequency of spontaneous abortion than reported data in couples with a Robertsonian translocation was found. One of the possible explanations may be due to a bias of the cases, because our subjects were mostly women who received genetic counselling and amniocentesis after experienced unfavored pregnancies. The frequency of prior spontaneous abortion and still-birth was 73.5% for female carriers (n = 18) and 54.2% for male carriers (n = 21), respectively. Significant difference of sexual predisposition to unfavored outcomes was not observed in balanced translocations.

Boué and Gallano⁸) reported 11.7% of unbalanced fetuses were detected for reciprocal translocation carriers, and 10 ~ 15% of unbalanced fetuses were

detected for a Robertsonian translocation carrier in prenatal diagnosis. In our 17 year-genetic amniocentesis, more than a half of a reciprocal translocation carrier had results of normal karyotype. Including cases with the same karyotype as the carrier, more than 80% of amniocentesis revealed balanced fetuses. When the pregnancy exceeded 15 the week of gestational age, normal karyotype of fetus was predominant after natural selection of abnormal conceptus in case of a reciprocal translocation carriers. This situation may occur also in case of Robertsonian translocation carrier, because normal conceptus was found predominant after amniocentesis and all results were balanced fetuses. Fortunately, a Robertsonian translocation involving homologous chromosomes was not observed in our subjects. If a Robertsonian translocation involves homologous chromosomes, the prognosis is dismal. The only liveborn is cytogenetically abnormal (trisomy). The other conceptions from these patients are monosomies, and terminate in spontaneous abortion. Women with such Robertsonian translocations should be informed about sterilization.

Thus, the current study revealed types and frequency of abnormal karyotypes of the conceptuses in a total of 40 genetic amniocentesis for the past 17 years. The karyotypic results were consistent with the previous collaborative study of genetic amniocentesis for prenatal diagnosis⁸⁾. These data may be useful for the genetic counselling on couples with a balanced translocation.

References

- 1) Keliñhout J, Madan K, Repeated abortions and chromosome analysis. In: Hafez ESE ed, Spontaneous abortion. p143, MTP Press, 1984
- 2) Petrosky DL, Borgaonkar DS, Segregation analysis in reciprocal translocation carriers. *Am J Med Genet* 19: 137, 1984

- 3) Fujimoto S, Makinoda S, Hoshi N, Elderly pregnancy and labor. *Asian Med J* 37: 117, 1994
- 4) Campana M, Serra A, Neri G, Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: A study of 269 balanced translocations. *Am J Med Genet* 24:341, 1986
- 5) Neri G, Serra A, Campana M, et al., Reproductive risks for translocation carrier: Cytogenetic study and analysis of pregnancy outcome in 58 families. *Am J Med Genet* 16: 535, 1983
- 6) Fryns JP, Kleczkowska A, Van-den-Berghe H, Robertsonian (Dq; Dq) translocations in man. *J Genet Hum* 30: 101, 1982
- 7) Fujimoto S, Recurrent abortion and chromosome abnormality. *World Obstet Gynecol* 39: 519, 1987 (in Japanese)
- 8) Boué A, Gallano P, A collaborative study of the segregation inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenatal Diagnosis* 4: 45, 1984

均衡転座型染色体異常をもつ夫婦における 出生前診断

北海道大学医学部産婦人科学教室

山田秀人 柿谷圭美 星 信彦
花谷 馨 藤本征一郎

北大医学部附属病院で行った過去17年間の羊水穿刺による出生前診断のうち、均衡転座型染色体異常をもつ39妊娠(相互転座型26妊娠、ロバートソン転座型13妊娠)の結果をまとめた。相互転座型染色体異常をもつ夫婦の26妊娠のうち、55.6%が正常核型、25.9%が保因者と同型、11.1%が部分トリソミー、7.4%が部分モノソミーであった。また、ロバートソン転座型染色体異常をもつ夫婦の13妊娠のうち、61.5%が正常核型、38.5%が保因者と同型の核型であった。過去の妊娠歴のうち流死産の頻度は、相互転座型染色体異常をもつ夫婦で59.1%、ロバートソン転座型染色体異常をもつ夫婦で70.0%であった。保因者の性別によって、流死産の頻度の有意な差異は認められなかった。

(受付: 1994年7月14日)

(受理: 1994年10月7日)

尿崩症を発症したプロラクチン産生下垂体腫瘍合併妊娠の1例

A Case Report of a Pregnant Woman with Diabetes Insipidus Accompanied by Prolactin-Producing Pituitary Microadenoma

豊川市民病院産婦人科

藤 澤 知

Satoshi FUJISAWA

Department of Obstetrics and Gynecology

Toyokawa City Hospital, Aichi 442, Japan

尿崩症を発症したプロラクチン産生下垂体腫瘍合併妊娠のまれな1症例を経験した。

プロラクチン産生下垂体腫瘍は、特に妊娠中に、胎盤や卵巣より分泌されるエストロゲンにより急速に増大することがある。

また、妊娠中に胎盤より分泌される、ADH分解酵素(シスチンアミノペプチダーゼ; CAP)によりADHが分解されるために、一過性の尿崩症を認めることもある。

今回の症例は、メシル酸プロモクリプチンと酢酸デスマプレッシンの組合せによる治療で妊娠経過も、分娩に関しても母児共に全く異常を認めず良好な経過をたどった。しかしながら、分娩後も双方の薬剤に関しては、その投与量は減量できたものの、なお投与が必要な状態が続行している。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 101 - 106, 1995)

緒 言

プロラクチン(PRL)産生下垂体腫瘍では、乳漏症のほか、腫瘍の増大、鞍上伸展により、頭痛、悪心、視力障害等の臨床症状が生じることが知られている。特に女性では無排卵、月経不順、無月経、などの下垂体-卵巣系機能の異常が高頻度に認められる。またPRL産生下垂体腫瘍は無月経などの治療の際に投与されるエストロゲンの影響を受けて増大し、前述の臨床症状を発症した場合をPeillon-Racadot syndromeと呼んでいる¹⁻⁴⁾。ゆえに妊娠中は卵巣や胎児胎盤系より分泌される大量のエストロゲンにより腫瘍が急速に増大し腫瘍内出血を引き起こし臨床症状が増悪することに留意しなければならない。また、最近の報告では、妊娠、分娩を契機として腫瘍が縮小し、分娩後血中PRL値が正常化する症例があることが報告されている^{5,6)}。

一方、中枢性尿崩症は、外傷、腫瘍、髄膜炎、サルコイドーシスなど、様々な原因により発生することが知られているが、従来、約半数は原因が不明の

ため特発性と分類されてきた。ところが、最近のMRI画像診断法の導入により、視床下部、下垂体柄部、下垂体後葉などの小さな器質的病変の同定が可能になり、病態の究明が進められている⁷⁾。また、下垂体腫瘍摘出後には一過性の尿崩症が認められることは珍しくないが、手術侵襲により下垂体後葉が傷害を受け抗利尿ホルモン(ADH)の分泌レベルが低下した症例では、妊娠中胎盤から大量に分泌されるADH分解酵素(シスチンアミノペプチダーゼ; CAP)作用によりADH代謝が亢進するため、妊娠中に尿崩症が発症し易くなるとの報告がある^{8,9)}。同じ理由から、特発性の中枢性尿崩症が妊娠の度に妊娠後期に繰り返し発症し、分娩の後自然に軽快する症例のあることも知られている¹⁰⁾。

今回、妊娠期間中に尿崩症を発症したプロラクチン産生下垂体腫瘍合併妊娠の1例を経験したので報告する。

症 例

J.M. 30歳、主婦、身長159cm、体重54kg

家族歴，既往歴：特記すべきことなし

月経歴：初経13歳，月経周期 28日型，持続7日間
妊娠歴：なし。

現病歴：平成2年10月■に結婚。平成3年2月■，無月経を主訴として当科初診。最終月経は平成2年8月■より7日間で以後無月経が持続した。基礎体温は低温一相性であり，両側乳房はやや緊満していたが，乳汁分泌はなく，圧乳テストも陰性であった。同日施行の内分泌学的検査の成績では，PRL値は86 ng/mlと高値を示し，LH，FSHは正常，LH-RHテスト(100 μ g 静注負荷)に対してLH，FSHは正常型の反応を示した(表1)。同年3月■頭部MRI検査施行，下垂体および周辺部には異常所見は認められなかった(写真1)。以上より，プロラクチン産生下垂体マイクロアデノーマ(プロラクチノーマ)の存在が疑われた。そして，同4月■よりメシル酸プロモクリプチン(以下プロモクリプチンと略す)2.5 mg/日による治療を開始した。同6月■よりプロモクリプチンを3.75 mg/日へ増量，血中PRL値は正常域まで低下(図1)，基礎体温も二相性となった。以上の治療のまま，平成4年5月■より7日間の最終月経にて妊娠に至った。同7月■，妊娠を確認した時点でプロモクリプチンの投与を中止した。妊娠経過は順調であったが，血中PRL値は妊娠の進行につれ上昇し，妊娠12週の時点で350 ng/mlとなったが，下垂体腺腫の増大を疑わせる頭痛や視力障害などの

表1 初診時の内分泌学的検査(H 3.2/9)

	LH-RHテスト					
	前	15'	30'	60'	120'	
LH	6.8	—	—	58	31	(mIU/ml)
FSH	6.8	—	—	23	20	(mIU/ml)
PRL	86	89	90	—	—	(ng/ml)



写真1 平成3年3月6日頭部MRI検査

自覚症状を認めず無治療で経過観察とした(図1)。同年9月下旬，妊娠16週頃より多飲多尿が出現したが頭痛や視力障害などは認めなかった。同11月■MRI検査施行したところ下垂体の腫大を認め，後葉は同定不能であった(写真2)。ゆえに妊娠によるプロラクチノーマの増大が疑われ同11月■(妊娠24週)よりプロモクリプチン2.5 mg/日の投与を再開した。同12月■血中PRL値は低下傾向を示したが，多飲多尿症状の増悪を訴えたため入院管理とした。入院後の諸検査では，血液は高張性脱水状態であり(表2)，血中ADH値の低下(図1)，水抑制試験，NaCl負荷試験，ピトレッシンテストなどの所見より(表3，4，5)下垂体後葉からのADHの分泌低下によ

表2 入院後の検査所見

尿量	5,600 ml/日
尿中Na量	3.735 g/日
尿中K量	3.2 g/日
血中Na	151 mEq/l
血中K	3.9 mEq/l
血中Cl	115 mEq/l
血中浸透圧	311 mosm/l
尿中浸透圧	251 mosm/l

表3 水抑制試験(H 4.12/17)

	体重	尿量	尿比重
14:00	54.6kg	86ml	1.008
14:30	—	116	1.005
15:00	54.5kg	140	1.005
15:30	—	152	1.004
16:00	54.1kg	152	1.004
16:30	—	144	1.004
17:00	53.8kg	146	1.004



写真2 平成4年11月6日頭部MRI検査

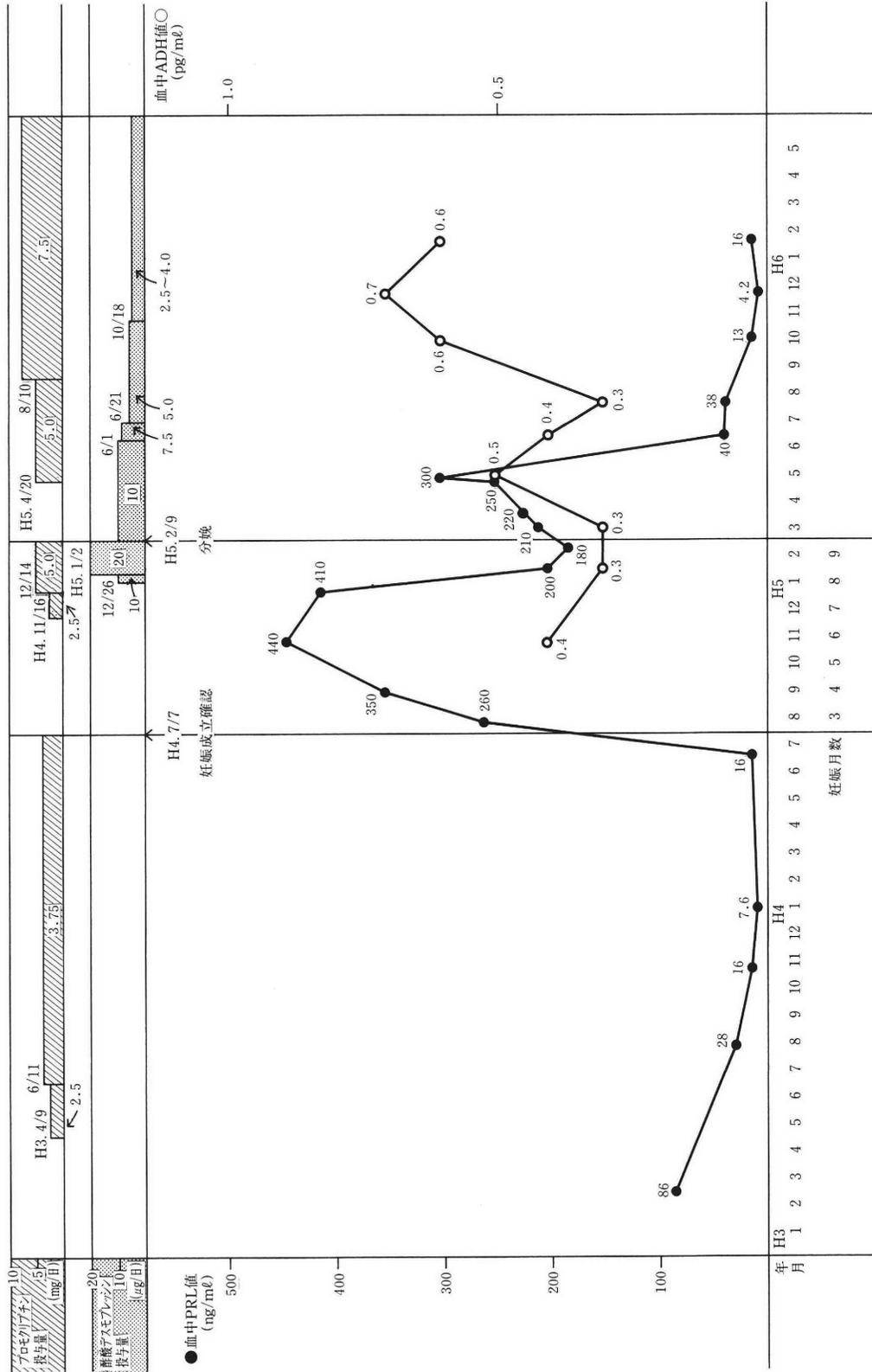


図1 プロモクリプラチン、酢酸ドスモプレシンの投与量の経過と血中PRL値・ADH値の変化

表4 NaCl負荷試験 (H 4. 12 / 18)

尿量			尿量	
9:00	110	11:05 ~ 12:05	12:30	38
9:15	92	(蒸留水440ml + 10%NaCl 123ml)	12:45	22
9:30	94		13:00	22
9:45	105		13:15	50
10:00	92		13:30	66
10:15	97	点滴	13:45	56
10:30	78			
10:45	54			

表5 ピトレスシンテスト (H 4. 12 / 19)

	尿量	尿比重
7:00	230	1.005
8:00	250	1.006
9:00 ← ピトレスシン $\frac{1}{2}$ A皮下注	200	1.007
10:00	54	1.014
11:00	147	1.005

る尿崩症と診断し、同12月 \blacksquare 酢酸デスマプレシンの点鼻治療(10~20 μ g/日)を開始した。同剤とプロモクリプチン5~7.5mg/日の投与により血中PRL値レベルは妊娠時の正常域まで低下し、尿量も速やかに正常化し、下垂体腫瘍の増大も停止した(図1, 写真3)。平成5年2月 \blacksquare (妊娠36週6日)、骨盤位にて陣痛発来を認めたため、選択的帝王切開術を施行した。出生児は男児で3216gアプガールスコア8点、外表奇形は認めなかった。分娩後は母乳栄養の強い希望があったためプロモクリプチンの投与を中止した。血中PRL値は分娩後若干の増加傾向を示したが(図1)、同年4月 \blacksquare (分娩後63日)のMRI検査(写真4)では下垂体は縮小傾向にあり、尿量も酢酸デスマプレシン10 μ g/日の減量投与でほぼ正常に保たれた。同4月 \blacksquare 乳汁の分泌は不良でしかも血中PRL値が300ng/mlと上昇傾向を認めたため、プロモクリプチン(5mg/日)の投与を再開した。その結果血中PRL値レベルは低下し、血中ADH値は明らかな増加を示さなかったが、酢酸デスマプレシンの投与量は、5 μ g/日と妊娠中よりも減量することができた。その後、同8月 \blacksquare からプロモクリプチンの投与を7.5mg/日と増量したところ、血中PRL値は正常域に落ち着き、血中ADH値も若干増加傾向を示した(図1)。そして、酢酸デスマプレシンの投与量も2.5~4.0 μ g/日と減量でき、同年10月(分娩後8ヶ月)より排卵を有する月経周期も回復した。しかしながら平成6年1月 \blacksquare に施行したMRI検査の所見



写真3 平成5年1月11日頭部MRI検査



写真4 平成5年4月13日頭部MRI検査

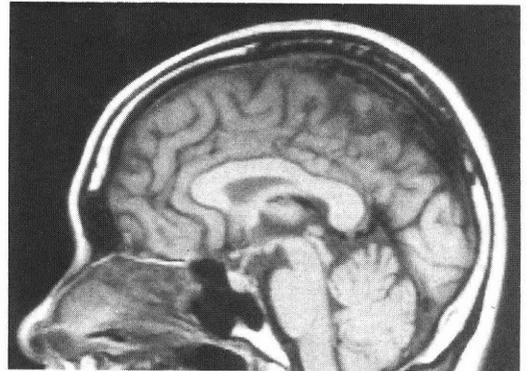


写真5 平成6年1月10日頭部MRI検査

では、下垂体の腫大は認めないものの後葉は同定できず(写真5)、なお同量のプロモクリプチンと酢酸デスマプレシン2.5~4.0 μ g/日の投与を必要とする状態が継続している(図1)。

考 察

今回経験した症例は、まず非妊時に排卵障害と血

中PRL値の異常高値を認め、MRI画像診断からプロラクチン産生下垂体マイクロアデノーマが疑われ、プロモクリプチンによる治療を行った。その結果、血中PRL値は正常レベルとなり、排卵を伴う正常月経周期が回復した。妊娠の成立を確認した時点で、一旦プロモクリプチン治療を中止した。妊娠の進行に従い血中PRL値の異常上昇を認めたが、頭痛や視野障害などの症状は認めなかった。妊娠16週頃より突然、口渇と多飲多尿が出現したため、頭部MRI検査施行、下垂体の腫大と腫瘍の鞍上発育を認めたので多飲多尿の原因はプロラクチン産生下垂体腫瘍の下垂体後葉の圧迫によるものと考えられた。倉智ら¹⁾は、プロモクリプチンを妊婦に投与した場合の、胎児に対する影響は少なく、妊娠中もPRL産生下垂体腫瘍が腫大した場合には、プロモクリプチンの投与を勧めている。そこで本症例に対しても腫瘍の腫大を抑制するためプロモクリプチンの投与を再開した。血中PRL値は暫減したが尿崩症症状は増悪したため入院管理とした。入院後の、種々のADH分泌に関する内分泌学的検査の結果から中枢性尿崩症と診断した。そして、尿崩症の原因は、頭部MRI検査にて、視床下部および下垂体周辺部に器質的病変を認めないこと、下垂体前葉の腫大、T1強調画像で下垂体後葉が鮮明に描出されないことから、下垂体前葉のPRL産生下垂体腫瘍が妊娠によるエストロゲン分泌の増加により腫大して鞍上に発育し、下垂体柄もしくは下垂体後葉が圧迫されて後葉機能が低下し、ADH分泌不全を来し、さらには妊娠の進行に伴う胎盤由来のCAPの分泌増加によりADH代謝が亢進したことによって尿崩症を発症した可能性が考えられた。尿崩症に対しては、酢酸デスマプレッシン10~20 μ g/日の投与で尿量は正常域にコントロールできた。また、プロモクリプチン治療の継続により、妊娠末期に下垂体は縮小傾向を認めた。妊娠期間中、プロモクリプチン、酢酸デスマプレッシンの母体投与を継続したが、出生児には外表奇形は認めず、新生児期の経過にも異常は認めなかった。酢酸デスマプレッシンは、CAPにより代謝されることはなく、また、子宮収縮作用も持たないため妊娠中に投与しても流産の危険はなく、胎児に対する安全性も確立されている²⁾。

プロラクチン産生下垂体腫瘍の約10%は分娩後血中PRL値が正常化し、月経周期が回復するとの報告があり³⁾、患者が母乳栄養を希望したため分娩後プロモクリプチンの投与を中止した。尿量は酢酸デスマプレッシン10 μ g/日の投与により正常域にコント

ロールされたが、血中PRL値は分娩後若干の増加傾向を示した。分娩2か月後、PRL値が300 ng/mlと再度上昇傾向を示し、しかも乳汁分泌も不良であったため、母乳をあきらめることとしプロモクリプチン5 mg/日の投与を再開した。その後、プロモクリプチンの投与を7.5 mg/日としたところ、血中PRL値は正常域に落ち着き、月経周期も回復した。分娩後11か月の時点で施行した、頭部MRI検査の結果では、下垂体の腫大は認めないものの、後葉はT1強調画像で高信号を示すまでには至っていない。血中ADHレベルは妊娠中の尿崩症発症当時より若干改善はされたものの、なお酢酸デスマプレッシンは2.5~4.0 μ g/日の投与を必要としている。

以上の経過より、この症例は、マイクロプロラクチノーマが妊娠の経過中に腫大し、下垂体柄もしくは後葉の圧迫によると思われる中枢性尿崩症を併発し、しかも妊娠により増加した胎盤性CAPの影響を受けてADH代謝が亢進したため、妊娠中は尿崩症が増悪していたものと考えられた。分娩後、下垂体腫瘍はプロモクリプチンの投与により縮小し、PRL値は正常化したものの、後葉機能の回復が不良なため、酢酸デスマプレッシンの投与を必要とする状態が継続しているものと考えられた。

稿を終えるにあたり、本論文の御校閲を戴いた、名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室花田征治助教に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Peillon F, Vila-Porcile E, Olivier L, et al., L'action des œstrogènes sur les adénomes hypophysaires chez l'homme. Documents histopathologiques en microscopie optique et électronique et apport de l'expérimentation. Ann End (Paris) 31: 259, 1970
- 2) Landolt AM, Ultrastructure of human sella tumours - correlation of Clinical findings and morphology. Acta Neurochir (supple) 22: 71, 1975
- 3) Peillon F, Racadot J, Moussy D, et al., Prolactin-secreting adenomas. A correlative study of morphological and clinical data. In: Fahlbusch R and Werder K, ed., Treatment of pituitary adenomas, p114, Georg Thieme Publishers, 1978
- 4) Labdort AM, Progress in pituitary adenoma biology Results of research and clinical applications, In: Krayenbühl HA, ed., Advances and technical standards in neurosurgery. Vol. 5, p4, Springer-Verlag, 1978
- 5) Rjosk H-K, Fahlbusch R, Werder K, Hyperpro-

- lactinemia and pregnancy. In: Tolis G, Stefanis C, Mountokalakis T, et al., eds, Prolactin and prolactinomas. p193, Raven Press, 1983
- 6) Yamada M, Miyake A, Koike K, et al., Spontaneous pregnancy after a pregnancy induced by treatment in hyperprolactinemic women. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 35: 125, 1990
 - 7) Fujisawa I, Asato R, Kawata M, et al., Hyperintense signal of the posterior pituitary on T1-weighted MR images: An experimental study. *J Comput Assist Tomogr* 13: 371, 1989
 - 8) Roth K, Slater S, Inactivation of vasopressin during pregnancy. *Am J Obst Gynec* 83: 1325, 1962
 - 9) Magyar DM, Marshall JR, Pituitary tumors and pregnancy. *Am J Obst Gynec* 132: 739, 1978
 - 10) Hughes JM, Barron WM, Vance ML, Recurrent diabetes insipidus associated with pregnancy: Pathophysiology and therapy. *Obstet Gynecol* 73: 462, 1989
 - 11) 倉智敬一, 青野敏博, 五十嵐正雄 他, 妊娠中にプロモクリプチンの投与を受けたプロラクチノーマを主とする下垂体腫瘍症例における妊娠の転帰と新生児所見. *産科と婦人科* 52: 1689, 1985
 - 12) Burrow GN, Wassenaar W, Robertson GL, et al., DDAVP treatment of diabetes insipidus during pregnancy and the post-partum period. *Acta Endocrinol* 97: 23, 1981

A case report of a pregnant woman with diabetes insipidus accompanied by prolactin-producing pituitary microadenoma

Satoshi Fujisawa

Department of Obstetrics and Gynecology
Toyokawa City Hospital, Aichi 442, Japan

The author encountered a rare case of diabetes insipidus with prolactin-producing pituitary adenoma during pregnancy.

Prolactin-producing microadenoma is although well controlled by the administration of bromocriptine, it may become enlarged due to the elevated estrogen secretion from the placenta and maternal ovaries throughout pregnancy. Transient diabetes insipidus with inactivating ADH (antidiuretic hormone) by vasopressinase (cystine aminopeptidase; CAP) from the placenta have occasionally observed in pregnant women.

The treatment by the combination with bromocriptine and desmopressin resulted in good maternal outcome, and a normal and healthy baby was born at term. However, the administration of both agents, even though in a decreased dose, could not be discontinued after the parturition.

(受付: 1994年7月21日)

(受理: 1994年10月7日)

正常プロラクチン血症性視床下部性排卵障害に対する bromocriptineの有用性の検討

A Study with Bromocriptine Effectiveness for the Treatment of Normoprolactinemic Hypothalamic Anovulations

賛育会病院産婦人科

合 阪 幸 三
Kohzo AISAKA

吉 田 浩 介
Kohsuke YOSHIDA

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

三楽病院産婦人科

香 山 文 美
Fumiyoshi KAYAMA

木 村 好 秀
Yoshihide KIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Sanraku Hospital

虎ノ門病院産婦人科

爲 近 慎 司
Shinji TAMECHIKA

佐 藤 孝 道
Kohdo SATOH

Department of Obstetrics and Gynecology, Toranomom Hospital

戸塚日立病院産婦人科

松 岡 良
Ryo MATSUOKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Totsuka-Hitachi Hospital

帝京大学医学部産婦人科

(主任教授, 研究代表者)

森 宏 之
Hiroyuki MORI

Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University, School of Medicine
(Chairman, Representative of this study)

多施設において、LH-RH・TRH負荷テストを施行することにより選択した正常プロラクチン血症性視床下部性排卵障害患者216例に対して、bromocriptineをat randomに投与し、有効例、無効例における内分泌学的背景を比較検討して以下の成績を得た。

- 1) 有効例：154例、無効例：62例と、前者が多数を占めた(71.3%)。
- 2) 有効例ではTRH500 μ g負荷30分後の血中プロラクチン値(PRL₃₀)は、 74.1 ± 36.5 ng/mlと無効例(38.0 ± 18.2 ng/ml)に比べて有意に高値を示した。(p < 0.01)。
- 3) PRL₃₀値の正規確率紙上の分布より、bromocriptineはPRL₃₀ ≥ 50 ng/mlを示した症例(潜在性高プロラクチン血症)に対して有効であると考えられた。

4) それ以外にも bromocriptine 有効例がみられたが、それらの LH-RH100 μ g 負荷30分後の血中 LH 値 (LH₃₀) は 81.3 ± 49.1 mIU/ml で、無効例のそれ (47.7 ± 38.6 mIU/ml) に比べて有意に高値を示した ($p < 0.01$)。また、LH/FSH 比はそれぞれ 1.3 ± 0.6 , 1.0 ± 0.5 と、やはり前者で有意に高値を示した ($p < 0.02$)。

5) LH/FSH 比の正規確率紙上の分泌より、有効例は LH/FSH ≥ 1 を示す、いわゆる内分泌学的 PCO (多嚢胞性卵巣) 症例であると考えられた。

6) 以上より、正常プロラクチン血症性視床下部障害において、bromocriptine 有効例が多数存在することが明らかとなり、本研究によって定められた基準 (PRL₃₀ ≥ 50 ng/ml, LH/FSH ≥ 1) により、あらかじめ有効と思われる症例を選択できるものと考えられた。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 107 - 114, 1995)

緒 言

高プロラクチン血症や潜在性高プロラクチン血症といった、いわゆるプロラクチン関連疾患および高 LH 血症性視床下部障害 (内分泌学的 PCO 症例) に対する bromocriptine の有効性に関しては、すでによく知られている¹⁻¹¹⁾。一方、1988 年以來、わが国の代表的なゴナドトロピンおよびプロラクチンの radioimmunoassay (RIA) kit を供給している第一 RI 社が standard および測定法を一新した^{12,13)}。その結果、潜在性高プロラクチン血症や高 LH 血症性視床下部障害 (いわゆる内分泌学的 PCO) といった新しい概念に対する疾患の診断基準も新たに設定する必要が生じた。我々は以前、新しいキットによる潜在性高プロラクチン血症および内分泌学的 PCO に対する診断基準を設定し、前者に対しては、TRH 500 μ g 負荷30分後の血中プロラクチン値 (PRL₃₀) ≥ 70 ng/ml (50 ~ 70 ng/ml は境界領域とする)¹⁰⁾、後者に対しては、排卵期周辺をのぞいて LH/FSH ≥ 1 という指標を設けたが¹¹⁾、1施設での検討であったため、症例の偏りなどから普遍性に欠ける可能性が考えられた。今回は、多施設による共同研究を行い、多数の正常プロラクチン血症性視床下部障害に基づく排卵障害患者に対して bromocriptine を at random に投与し、その有効例の内分泌学的背景を詳細に検討することにより、これらの基準が妥当かどうかを確認するため、以下の研究を行った。

対象および方法

表 1 に示した 5 施設において、1992 年 1 月より 1993 年 12 月までの 2 年間における視床下部障害に基づく排卵障害患者 (合計 216 例) を対象とした。事前に十分なインフォームドコンセントのもとに、まず全例 LH-RH (100 μ g) \cdot TRH (500 μ g) 負荷テストを行い、正常プロラクチン血症性の視床下部障害に基づ

く排卵障害であることを確認し、その後 bromocriptine (5 mg/day) を 8 週間以上連続投与して、その効果について retrospective に解析を行った。対象とした症例は、いずれも基礎体温表 (BBT) 上無排卵のパターンを示しており、LH-RH 負荷テストのパターンでは、LH-RH に良好に反応し、いずれも hypergonadotropic state ではなかったため、視床下部障害に基づくものと考えられた。Bromocriptine 投与の有効性の判定として、排卵の有無を経膈超音波断層法により確認し、投与中に 1 周期でも最大直径 18 mm 以上の成熟卵胞が確認され、BBT 上高温相が 12 日以上持続し、黄体中期の血中エストラジオール (E₂) およびプロゲステロン (P₄) がそれぞれ 200 pg/ml, 10 ng/ml 以上を示した場合を排卵ありと判定した。

すべてのデータを集積後、対象を bromocriptine の単独投与により排卵が認められ、有効であったと考えられた症例 (Bromocriptine 有効例)、および排卵が認められず無効であったと考えられた症例 (Bromocriptine 無効例) の 2 群に分け、それぞれの群の内分泌学的背景を比較検討して、bromocriptine が有効であった症例のデータより潜在性高プロラクチン血症および内分泌学的 PCO 症例の診断基準を設定した。

各種ホルモンの測定は、SRL 社に依頼し、FSH, LH およびプロラクチンは、第一 RI 社の新しい standard による IRMA 法により^{12,13)}、E₂, P₄ は RIA 法により測定した。本研究期間中のそれぞれのキットの intra および interassay variance は、いずれも 5% 未満と満足すべき値であった。

表 1 本研究の参加施設 (所属はいずれも当時のもの)

帝京大学医学部	森 宏之 (主任教授)
三楽病院	香山文美, 木村好秀 (部長)
虎ノ門病院	為近慎司, 佐藤孝道 (部長)
戸塚日立病院	松岡 良 (部長)
賛育会病院	合阪幸三, 吉田浩介 (部長)

推計学的処理は、Student paired t-test, および χ^2 検定によった。

成 績

1) Bromocriptineの有効性とTRH負荷テストに対する血中プロラクチン値の反応

対象症例216例中、bromocriptine有効例は154例、無効例は62例と、有効例が多数を占めた(71.3%)。血中E₂、P₄値もそれぞれ118.0 ± 74.0 → 228.1 ± 70.7 pg/ml, 4.9 ± 6.0 → 15.0 ± 5.9 ng/mlといずれも有意に改善された(p < 0.01)。

まず、この2群間で、TRH負荷テストによる血中プロラクチン値の反応を比較したところ、表2のように、いずれのポイントにおいても前者が有意に高値をとることが明らかとなった(p < 0.01)。今回の検討では、症例数が多くなったため前値においても有意差がみられたが、表2に示したように標準偏差(S.D.)が大きく、前値のみではこの両者を明確に鑑別するのは困難であると考えられた。実際、これらのデータの正規確率紙上の分布状況を見ると、図1～2に示すようにbromocriptine有効例では10 ng/ml以上を示す症例が約25%であるが、bromocriptine無効例でも約10%で10 ng/ml以上を示していることから、やはり前値のみでの鑑別は難しいと思われた。

次に、PRL₃₀値について検討したところ、表2のように、bromocriptine有効例、無効例ではっきりと有意差が認められた。データの分布状況も図3～4のように両者に差がみられ、正規確率紙上の分布から、PRL₃₀値が50 ng/ml未満の場合は約75%の確率でbromocriptine無効例である可能性が示唆され、PRL₃₀値が70 ng/ml以上の場合は約50%の確率でbromocriptine有効例であると考えられた。以上より、PRL₃₀値では、50～70 ng/mlが潜在性高プロラクチン血症の診断のためのcut off pointとなるものと考えられた。そこで、PRL₃₀値のcut off値を50, 60, 70 ng/ml以上に設定し、bromocriptineの有効性を検討したところ、図5のように、cut off値の上昇に従って、bromocriptineの有効性が高率となることが明らかとなった。各cut off値を詳しく検討すると、図6～8のように、PRL₃₀値が高くなればなるほどbromocriptineの有効性は高率となるが、潜在性高プロラクチン血症の診断基準を高い値に設定すると、逆にPRL₃₀値がその設定値より小さくてもbromocriptineが有効な症例が増加することとなることが判明した。そこで、潜在性高プロラクチン血症の診断基準としては、PRL₃₀ ≥ 70 ng/mlの場合は确实、50～70 ng/mlは境界領域とした前回の基準より、むしろPRL₃₀ ≥ 50 ng/mlとした方が妥当であると考えられた。

表2 Bromocriptine (Br.) 有効例、無効例におけるTRH負荷テストによる血中プロラクチン値の反応

Prolactin (ng/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 154)	9.7 ± 9.8	74.1 ± 36.5	38.1 ± 17.5
Br. 無効例 (n = 62)	6.1 ± 3.3	38.0 ± 18.2	23.7 ± 11.6

有効例、無効例間で、いずれも p < 0.01

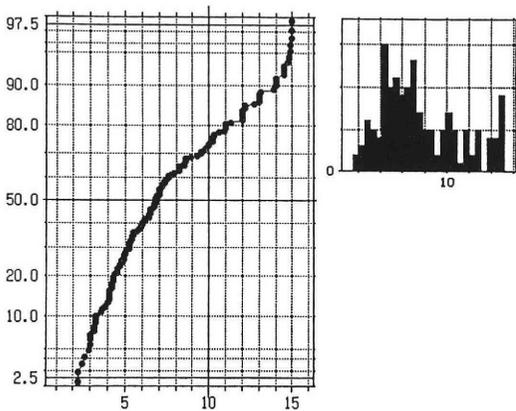


図1 Bromocriptine有効例における血中PRL₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

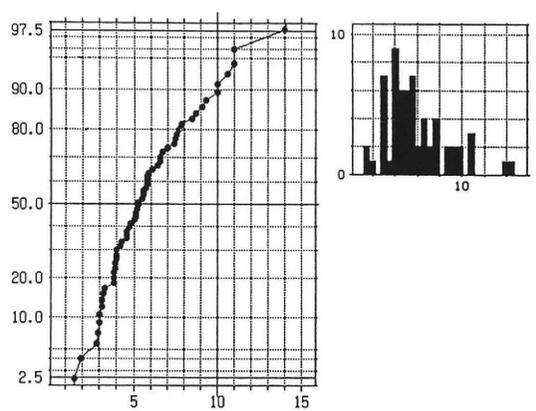


図2 Bromocriptine無効例における血中PRL₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

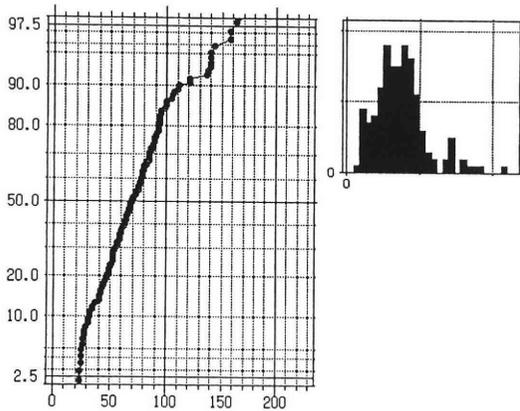


図3 Bromocriptine有効例における血中PRL₃₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

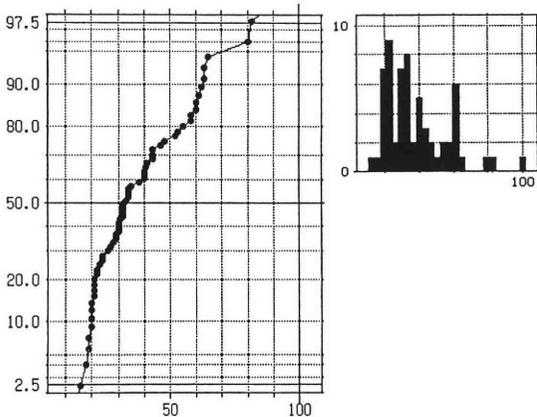


図4 Bromocriptine無効例における血中PRL₃₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

2) PRL₃₀値が50ng/ml未満の症例における bromocriptine 有効例の内分泌学的背景

PRL₃₀値が50 ng/ml未満の症例は今回81例登録されたが、このうち34例(42.0%)はbromocriptineが有効であった。これらのLH-RH・TRH負荷テストの成績をbromocriptine無効例と比較した(表3)。これらのデータより、PRL₃₀<50 ng/mlでbromocriptineが有効な症例は、LHの基礎値が高く、LH-RHに対するLHの過剰反応を示す、いわゆる内分泌学的PCOであると考えられた。LHの基礎値には有意差がみられなかったが、LH/FSH比をとると、有効例、無効例でそれぞれ、 1.3 ± 0.6 vs 1.0 ± 0.5 と、前者で有意に高値を示した($p < 0.02$)。Bromocriptineの投与により、有効例でLHの反応は有意に低下し(表4、図9)、LH/FSH比も有効例で 1.0 ± 0.4 と有意に低下したが($p < 0.02$)、無効例では 0.8 ± 0.7 と有意の変化を示さなかった。

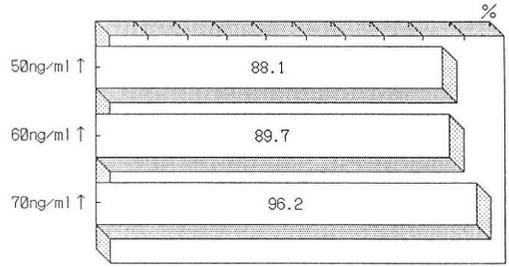


図5 PRL₃₀値のcut off値によるBromocriptine (Br.)の有効性

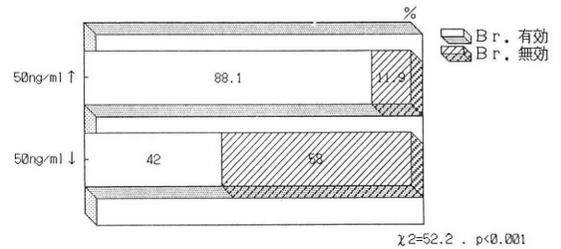


図6 PRL₃₀値 50ng/mlを境としたBromocriptine (Br.)の有効性

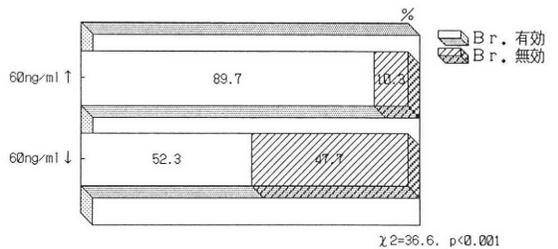


図7 PRL₃₀値 60ng/mlを境としたBromocriptine (Br.)の有効性

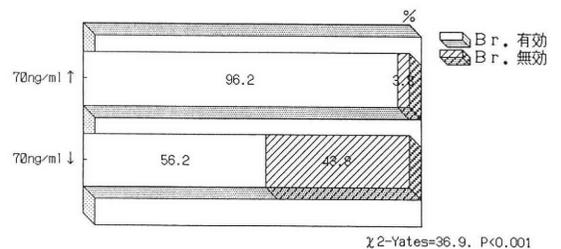


図8 PRL₃₀値 70ng/mlを境としたBromocriptine (Br.)の有効性

表3 PRL₃₀ < 50 ng/mlの症例におけるLH-RH・TRH負荷テストのデータ

FSH (mIU/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 34)	6.6 ± 3.0	13.2 ± 8.0	14.8 ± 9.3
Br. 無効例 (n = 47)	6.1 ± 2.2	11.1 ± 4.2	11.9 ± 4.6

LH (mIU/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 34)	8.9 ± 7.9	81.3 ± 49.1*	76.7 ± 48.4*
Br. 無効例 (n = 47)	6.4 ± 4.0	47.7 ± 38.6**	41.7 ± 32.4**

* ~ ** : p < 0.01

PRL (ng/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 34)	5.5 ± 2.5	33.7 ± 11.0	21.2 ± 7.1
Br. 無効例 (n = 47)	6.0 ± 3.5	29.4 ± 8.9	19.2 ± 7.2

表4 Bromocriptine (Br.) 投与後のLH-RH・TRH負荷テストの成績

FSH (mIU/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 34)	6.7 ± 2.3	14.8 ± 5.1	15.3 ± 6.0
Br. 無効例 (n = 47)	5.6 ± 1.9	11.9 ± 3.6	12.3 ± 3.5

LH (mIU/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 34)	6.6 ± 3.3	58.0 ± 38.3*	51.1 ± 30.7**
Br. 無効例 (n = 47)	5.9 ± 2.8	39.7 ± 28.3***	39.6 ± 27.4

* : p < 0.05, ** : p < 0.02, *** : p < 0.01 いずれも bromocriptine 投与前と比較

PRL (ng/ml)	前値	30分値	60分値
Br. 有効例 (n = 34)	0.8 ± 0.5*	1.8 ± 1.3*	1.6 ± 0.9*
Br. 無効例 (n = 47)	0.8 ± 0.5*	1.4 ± 0.6*	1.5 ± 0.8*

* : p < 0.01 いずれも bromocriptine 投与前と比較

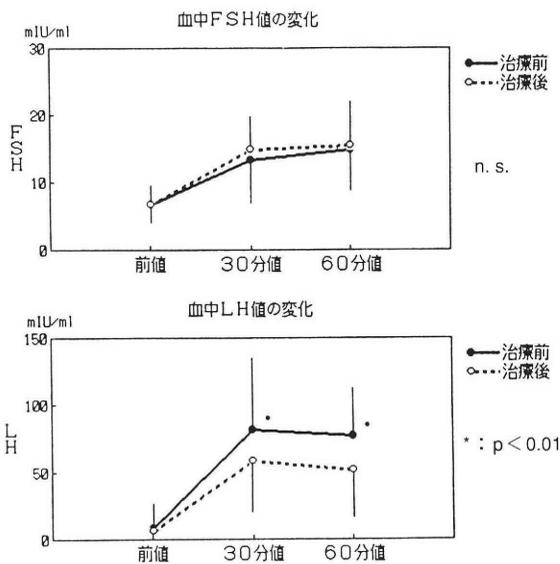


図9 PRL₃₀値 < 50ng/mlにおけるBromocriptine有効例のLH-RHテスト

以上より、bromocriptineは、潜在性高プロラクチン血症および内分泌学的PCOに有効で、それぞれの診断基準として、PRL₃₀ ≥ 50 ng/ml、排卵期周辺を除外してLH/FSH ≥ 1が妥当ではないかと考えられた。

3) Bromocriptine有効例、無効例における血中LH₀とLH₃₀値およびLH/FSH比の分布

各群のデータを正規確率紙上にプロットしたところ、図10のように無効例ではLH₀値が10 mIU/ml以上のものが約20%であったが、有効例でも約30%に10 mIU/ml以上の症例が認められた(図11)。LH₃₀値でも、無効例の約25%、有効例の約40%が50 mIU/ml以上を示した(図12, 13)。

一方、LH/FSH比の分布を検討したところ、図14, 15のように無効例では1未満を示した症例が約60%であったが、有効例では約40%で、多くの症例で1以上を示していた。このことから、LH/FSH ≥ 1という基準はその症例がbromocriptine有効例であるかどうかの判定基準として妥当なものと考えられた。

以上より、いわゆる内分泌学的PCOの診断は、LH

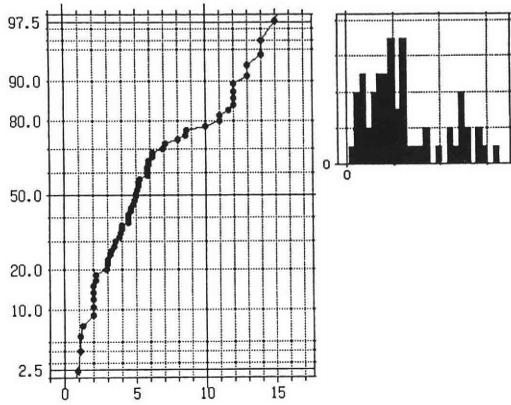


図10 Bromocriptine無効例における血中LH₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

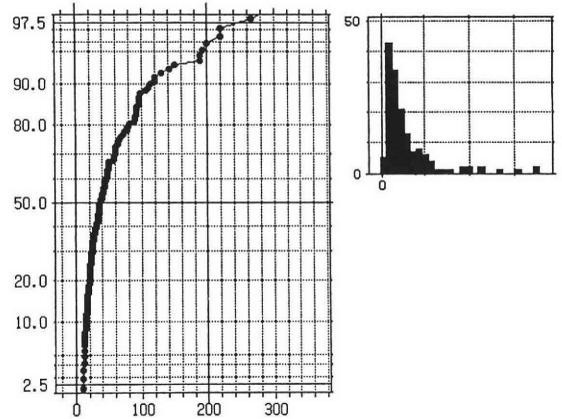


図13 Bromocriptine有効例における血中LH₃₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

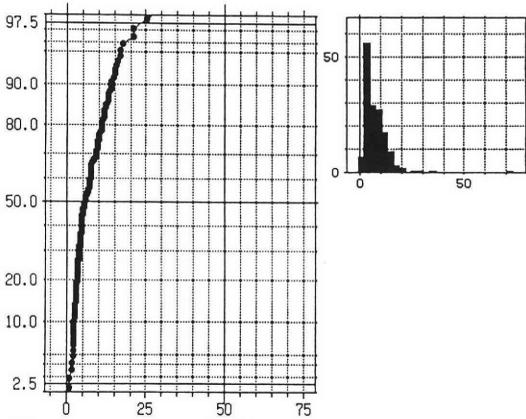


図11 Bromocriptine有効例における血中LH₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

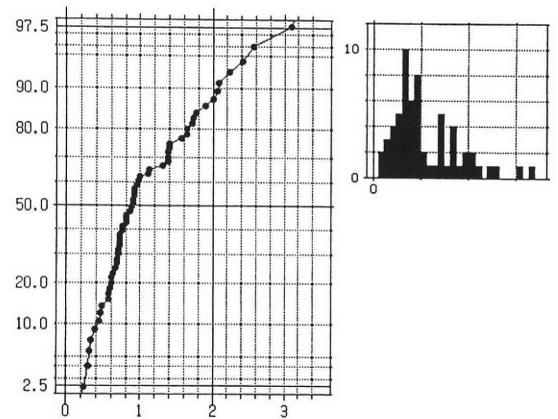


図14 Bromocriptine無効例におけるLH/FSH比の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

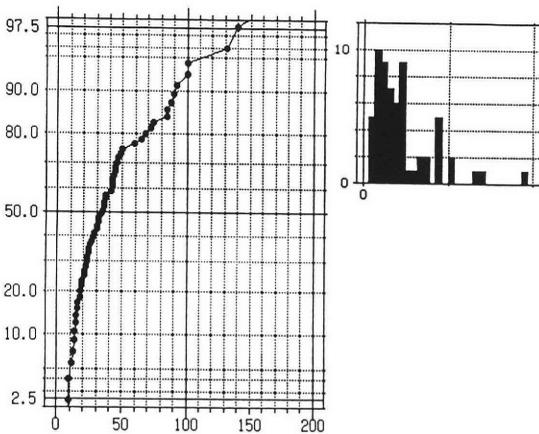


図12 Bromocriptine無効例における血中LH₃₀値の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

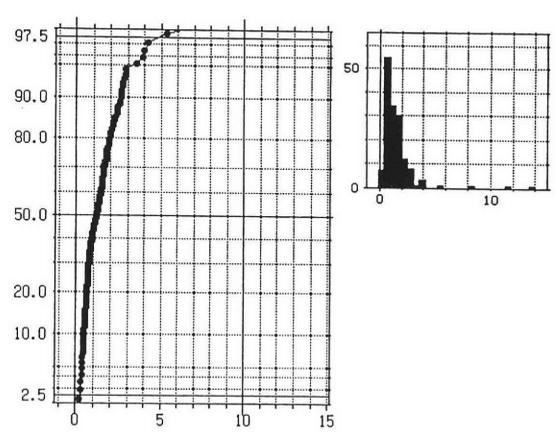


図15 Bromocriptine有効例におけるLH/FSH比の分布 (ヒストグラムと正規確率紙上の分布)

のみならずFSH値も考慮に入れ、LH/FSH比でみた方が確実であると考えられた。

考 察

正常プロラクチン血症性排卵障害患者に対して bromocriptine が有効性を示すことがあることは以前より指摘されてきた¹⁻⁸⁾。我々もそれらの多くが潜在性高プロラクチン血症もしくは内分泌学的PCO症例といった疾患であること^{3,4)}、視床下部障害に基づく排卵障害例の中には、これらの疾患が思いのほか多く含まれていることなどについて報告を重ねてきた^{6,7)}。しかしながら、いずれも1施設のデータであったため、症例の偏りがあった可能性も否定できないため、今回、多施設によるオープントライアルを試みた。

まず、BBT上排卵障害と考えられた症例に対して、LH-RH・TRH負荷テストを施行し、視床下部障害に基づく症例を選別した後、全例にbromocriptineを8週間以上連続投与してその効果を判定した。その結果、216例中154例(71.3%)にbromocriptine有効例がみられた。この頻度は、排卵障害の約70%にbromocriptine有効例がみられるとした以前の報告^{6,7)}にほぼ一致していた。これらの症例の内分泌学的背景をみると、その多くがTRH負荷30分後に血中プロラクチン値が過剰反応を示す、いわゆる潜在性高プロラクチン血症であることが判明した。本疾患の診断基準として、以前PRL₃₀値が50 ng/ml以上という値を示したが¹⁰⁾、多施設による今回の検討でもこの基準はbromocriptine有効性の目安として妥当なものであることが確認された。

潜在性高プロラクチン血症以外でもbromocriptineの有効例がみられたが、それらは血中のLH/FSH比の高い、高LH血症性視床下部障害(内分泌学的PCO症例)であった^{9,11)}。PCO症候群については、最近、日産婦の生殖・内分泌委員会報告で本邦婦人における診断基準が示された¹⁴⁾。それによると、月経異常、LHの基礎分泌値高値・FSHは正常範囲、超音波断層法で卵巣に多数の嚢胞状変化が認められた場合にPCO症候群と診断するとされている。本研究では、全例において必ずしも超音波断層法による卵巣の形態をbromocriptine投与前に確認しておらず、内分泌学的な指標のみで判定したため、内分泌学的PCOという表現としたが、基本的には日産婦のPCO症候群と同様の疾患であると思われる。日産婦では、内分泌学的所見として、LH高値、FSH正常としているのみで、具体的な数値は示されていない。本研究では、

bromocriptineの有効性といった視点からのみの判定ではあるが、有効例ではLH/FSH \geq 1を示す例が多かったことから、内分泌学的PCO症例の診断基準としてLH/FSH \geq 1を設定した。Bromocriptineの投与により、内分泌学的PCO症例の多くに排卵周期が回復し、高値を示したLHは低下し、LH/FSH比も有意に改善されたことから、この診断基準は臨床的にきわめて有用であると考えられた。

以上より、多施設、多症例の検討の結果、視床下部障害に基づく排卵障害の多くにbromocriptine有効例が存在し、それらの多くは、潜在性高プロラクチン血症および内分泌学的PCO症例であることが判明した。また、これらの疾患の診断基準としては、潜在性高プロラクチン血症では、PRL₃₀ \geq 50 ng/ml、内分泌学的PCO症例では、LH/FSH \geq 1とするのが妥当であると考えられた。

本研究発足に当たり、あたたかいご協力とご理解を賜った各施設の関係諸先生、ならびに各種ホルモン測定にご協力いただいたSRL社に深謝いたします。なお、本論文の要旨は第109回日本不妊学会関東部会(1994年2月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Board JA, Storlazzi E and Schneider V, Nocturnal prolactin levels in infertility. *Fertil Steril* 36: 720, 1983
- 2) De-Vane GW and Gusick DS, Bromocriptine therapy in normoprolactinemic women with unexplained infertility and galactorrhea. *Fertil Steril* 46: 1026, 1986
- 3) 森 宏之, 合阪幸三, 松岡 良 他, 正プロラクチン性排卵障害婦人におけるbromocriptineの排卵誘発作用の機序—いわゆる正プロラクチン血症性排卵障害における潜在性高プロラクチン血症の意義—。日内分誌 61: 38, 1985
- 4) 森 宏之, 合阪幸三, 松岡 良 他, 正プロラクチン血症性排卵障害におけるプロラクチン分泌予備能とプロラクチンの日内変動との相関。日産婦誌 37: 287, 1985
- 5) 水口弘司, 植村次雄, 白須和裕 他, 正常プロラクチン血症性排卵障害のbromocriptine療法—潜在性高プロラクチン血症と多嚢胞性卵巣症候群—。産婦実録 36: 187, 1987
- 6) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他, 排卵障害の原因別分類とその治療。日不妊会誌 35: 650, 1990
- 7) 合阪幸三, 不妊診療ハンドブック—新しい概念による排卵障害の診断と治療—。新興医学出版社, p35, 1993

- 8) Speroff L, Glass RH and Kase NG, The polycystic ovary. In: Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. p220 Williams and Wilkins, 1989
- 9) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他, 内分泌学的PCO症例の臨床的背景および bromocriptine の効果に関する研究. 日内分泌会誌 66: 101, 1990
- 10) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他, 潜在性高プロラクチン血症の診断基準と bromocriptine の臨床効果に関する研究. 日内分泌会誌 69: 1017, 1993
- 11) 合阪幸三, 都築浩雄, 鳥谷葉子 他, 高LH血症性視床下部障害の内分泌学的特徴と bromocriptine の効果. 日不妊会誌 38: 688, 1993
- 12) LH・FSH研究会(代表:青野敏博), 下垂体性ゴナドトロピン標準品を用いたLHおよびFSHのImmunoradiometric測定法(スパッカーS LH, スパッカーS FSH)の多施設における臨床的検討. ホと臨床 36: 1087, 1988
- 13) PRL研究会(代表:青野敏博), WHO標準品を用いた血中プロラクチンのImmunoradiometric測定法(スパッカーS プロラクチンキット)の多施設における基礎的および臨床的検討. ホと臨床 37: 441, 1989
- 14) 生殖・内分泌委員会(委員長:杉本 修, 小委員長:青野敏博), 本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準設定に関する小委員会(平成2年度~平成4年度)検討結果報告. 日産婦会誌 45: 1359, 1993

**A study with bromocriptine effectiveness
for the treatment of normoprolactinemic
hypothalamic anovulations**

Kohzo Aisaka and Kohsuke Yoshida

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

Fumiyoshi Kayama and Yoshihide Kimura

Department of Obstetrics and Gynecology
Sanraku Hospital

Shinji Tamechika and Kohdo Satoh

Department of Obstetrics and Gynecology
Toranomon Hospital

Ryo Matsuoka

Department of Obstetrics and Gynecology
Totsuka-Hitachi Hospital

Hiroyuki Mori

(Chairman, Representative of this study)

Department of Obstetrics and Gynecology
Teikyo University, School of Medicine

Present study was performed to investigate the endocrinological backgrounds of bromocriptine effective normoprolactinemic hypothalamic anovulations (NHA). 216 cases of the NHA were selected by LH-RH and TRH loading test and 5 mg/day of bromocriptine was administered for more than 8 weeks, and the effectiveness of bromocriptine administration was estimated by the ultrasonic examination of the follicular development. The endocrinological backgrounds were compared between bromocriptine effective (154 cases, group A) and not effective (62 cases, group B) patients. Serum prolactin levels of 30 min. after LH-RH and TRH loading (PRL₃₀) in the group A were significantly higher than those of the group B (74.1 ± 36.5 vs 38.0 ± 18.2 ng/ml, $p < 0.01$). The LH/FSH ratio before loading was also higher in the group A (1.3 ± 0.6) than that of the group B (1.0 ± 0.5 , $p < 0.02$). From these results, the standards of $PRL_{30} \geq 50$ ng/ml and $LH/FSH \geq 1$ were suitable to detect whether the NHA patients were effective for bromocriptine administration.

(受付: 1994年 8月 3日 特掲)

(受理: 1994年 10月 11日 特掲)

当科における卵巣チョコレート嚢胞症例の検討

Retrospective Study on Patients with Ovarian Chocolate Cysts in Our Hospital

京都大学医学部婦人科学産科学教室

(主任：森 崇英教授)

平野 剛 神崎 秀陽 今井 公俊
Takeshi HIRANO Hideharu KANZAKI Kimitoshi IMAI
江見 信之 森 崇英
Nobuyuki EMI Takahide MORI

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

京都大学医学部放射線医学核医学教室

富樫 かおり
Kaori TOGASHI

Radiology and Nuclear Medicine
Faculty of Medicine Kyoto University

京都大学病院産婦人科における過去5年間の卵巣チョコレート嚢胞手術症例96例をretrospectiveに解析した。47.8%が未妊婦であり不妊率は44%と高く、不妊症との関連が再確認された。婦人科合併症では子宮筋腫が52%と最も多く、両疾患の発生に共通のバックグラウンドのある可能性が示唆された。画像診断では、MRIが87.7%の正診率を示し非常に有用な検査であるが、1cm以下の病変では術前診断は困難であった。また超音波断層法では筋腫の合併により子宮が手拳大以上に腫大した場合、卵巣病変が見逃されることがあり要注意と思われた。腫瘍マーカーではCA125が陽性率72%と有用であり、特に月経困難症を認める症例では有意に高値を示した。拳児希望例の術後妊娠率はわずか14.3%であり、不妊婦人での本疾患の開腹保存手術の問題点が示唆された。

(Jpn. J. Fertil. Steril., 40 (1), 115 - 120, 1995)

緒 言

子宮内膜症は月経困難症や不妊症等の原因疾患として、性成熟期婦人に好発し婦人科診療に占める重要性はますます増加しつつある。また、その発生機序や不妊症との因果関係についても議論のあるところであり、診断や治療に関しても検討すべき課題が多い。そこで、当科における過去5年間のチョコレート嚢胞症例を解析し、その臨床像、診断上の問題点、ならびに不妊症例ではその予後などについての検討を試みた。

対 象

1988年1月～1992年12月の5年間に当科にて開腹術を施行し組織学的に卵巣チョコレート嚢胞と確認された96症例を対象とし、主訴、診断、合併症などについてretrospectiveに解析した。なお、他の診断名で開腹し、その際チョコレート嚢胞が確認された症例も含んでいる。

結 果

1. 患者背景(表1)

平均年齢は39.0±7.1(23～51)歳で初経年齢は平均

表1 患者背景

平均年齢	39.0 ± 7.1 (23 ~ 51) 歳	
初経年齢	12.8 ± 2.0 (11 ~ 17) 歳	
月経周期	27.8 ± 2.0 (22 ~ 32) 日 整が87例 不整が9例	
結婚年齢	25.5 ± 3.0 (20 ~ 37) 歳	
妊娠歴	GPO0	46 (未婚を除くと33例)
	G1P0AA1	3
	G1P0SA1	3
	G2P0AA2	1
不妊率	44% (36/81)	
流産率	18.7% (14/75)	

*AA:人工妊娠中絶 SA:自然流産

12.8 ± 2.0 (11 ~ 17) 歳。月経周期は87例が規則正しく平均27.8 ± 2.0 (22 ~ 32) 日で、9例が不規則であった。未婚が15例、既婚が81例で平均結婚年齢は25.5 ± 3.0 (20 ~ 37) 歳であった。妊娠歴については未経妊未経産が46例 (未婚を除くと33例)、妊娠の経験はあるが拳児のないものが7例で、残り43例に分娩歴があった。不妊率は44.0%と一般の10%に比べて高値を示した。流産率は18.7%と若干高い傾向にあった。

2. 主訴 (表2, 表3)

主訴で最も高頻度なものは月経困難症の50例で52.1%を占めた。これらの症例中で、子宮筋腫のみの合併が18例 (36%) に、子宮腺筋症のみの合併が12例 (24%) に認め、両者ともに認めた例も5例 (10%) があった。しかし残る15例ではいずれの合併も見られなかった。逆に、月経困難症を認めない46症例中では子宮筋腫のみの合併が24例 (52.1%)、子宮腺筋症のみの合併は3例 (6.5%) 認め、両者の合併は2例

表2 主訴

月経困難症	50 (例)	52.1 (%)
拳児希望	28	29.2
下腹痛	27	28.1
過多月経	12	12.5
その他	8	8.3

表3 月経困難症と合併症

	月経困難症 (+) 50例	月経困難症 (-) 46例
子宮筋腫	18 (例)	24
子宮腺筋症	12	3
両者合併	5	2

(4.3%) にあった。17例ではいずれの合併も見られなかった。子宮筋腫や腺筋症の合併のない32例中では15例 (46.9%) に月経困難症が出現していた。

過多月経を主訴とした12例は全例が子宮筋腫を合併していた。月経時以外で下腹部痛を訴える例が27例 (28.1%)、また拳児希望が28例 (29.2%) にあった。その他8例は不正性器出血、下腹部腫瘍感等であった。

3. 婦人科合併症 (表4)

婦人科合併症で最も多いのは子宮筋腫の49例 (52%) と過半数を占めており、一方、子宮腺筋症との合併は22例 (23%) にすぎなかった。他の卵巣腫瘍については、皮様嚢腫合併が2例 (一例は同側、一例は他側卵巣) 認められた。

4. 診断

1) 超音波画像 (表5)

術前の超音波断層法にて嚢胞性の病変が指摘されていたのは96例中76例 (79.2%) で、20例は開腹時に初めて発見されたものである。チョコレート嚢胞に典型的とされる、内部に瀰漫性の微細点状エコー像を示すものは96例中35例 (36.5%) で、嚢胞性病変が検出された76例中では46.1%と半数以下にすぎなかった。また悪性を疑わせる充実部を含む嚢胞エコーは6例 (6.3%) あった。残り35例は単純嚢胞性病変としてとらえられていた。

超音波断層法で術前に指摘されていなかった20例の中15例 (嚢胞のサイズは2 cm ~ 8 cm) 子宮筋腫合併例であり、いずれも子宮が手挙大以上に腫大していた。残りの5例は2 cm以下の嚢胞であった。またこの20例中15例にMRIが施行されており、12例がチョコレート嚢胞が指摘され、3例は卵巣病変なしとされていた。これらはいずれも1 cm以下の病変であった。

2) MRI (表6)

96例中81例に術前のMRIが施行されていた。T1、

表4 婦人科合併症

子宮筋腫	49 (例)	52 (%)
子宮腺筋症	22	23
皮様嚢腫	2	2.1

表5 超音波画像所見

diffuse fine echo	35 (例)	36.5 (%)
cyst	35	36.5
cyst (solid partあり)	6	6.3
no ovarian lesion	20	20.7

表6 MRI所見

definitive chocolate cyst	52 (例)	64.2 (%)
suggestive chocolate cyst	19	23.5
ovarian cyst	5	6.2
dermoid cyst	1	1.2
no ovarian lesion	4	4.9

T2強調画像共に高信号である卵巣病変を"suggestive chocolate cyst", さらに multiplicity を認めるかT2強調画像で shading を認める場合を"definitive chocolate cyst" とする Togashi らの診断基準を用いると, 81例中71例(87.7%)にチョコレート嚢胞の診断がつけられていた(サイズは1cm~15cm). 残り10例のうち6例では嚢胞性病変は指摘されていたが, チョコレート嚢胞以外の診断が得られていた(サイズは1cm~20cm).

MRIで卵巣病変なしと診断されたのは, 4例でいずれも1cm以下の病変であった. この4例中1例は超音波断層法で嚢胞が指摘されていた. また1cm以下の病変6例のうちMRIでチョコレート嚢胞を診断できたのは1例であった.

3) 腫瘍マーカー(表7)

腫瘍マーカーのなかで今回CA125とCA19-9について検討を加えた. カットオフ値をCA125は35 U/ml, CA19-9は37 U/mlとするとそれぞれの陽性率は71.4%, 53.4%で, 平均値はCA125が143.0 ± 33.9 (74~2345) U/ml, CA19-9が290 ± 172.3 (2~12475) U/mlであった.

表7 腫瘍マーカー陽性率

CA125 (>35U/ml)	60/84 (7.4~2345)	71.4%
CA19-9 (>37U/ml)	39/73 (2~12475)	53.4%

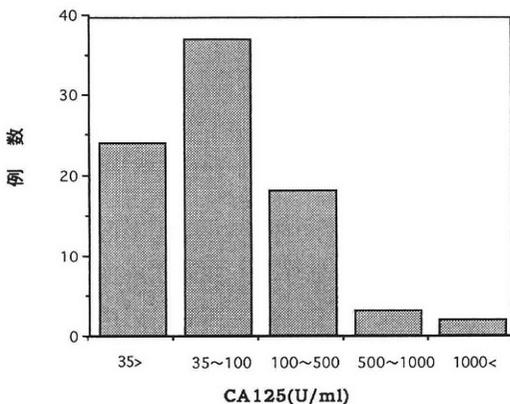


図1 CA125の分布

陽性率の高いCA125についてさらに検討を加えると, その値の分布は図1に示すように, 陽性例60例中37例(62%)が100 U/ml以下であったが, 1000 U/ml以上の高値をとるものも2例あり, それらはすべて10cm以上の嚢胞と強度の腹膜癒着症例であった. 今回の検討対象としたチョコレート嚢胞手術例では, 平均嚢胞径が5.8 ± 3.3 (0.5~20) cmであったが, 図2に示すように, 嚢胞のサイズが大きくなるほどCA125の値は高値をとる傾向はみられたものの, 有意な相関関係は認められなかった. しかし嚢胞のサイズとCA125の陽性率との間には有意な相関が見られた(図3). また月経困難症を伴う症例のCA125の

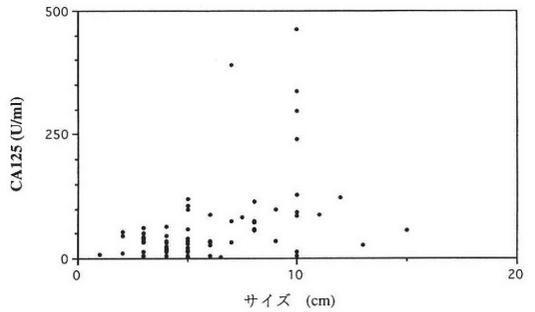


図2 嚢胞サイズとCA125

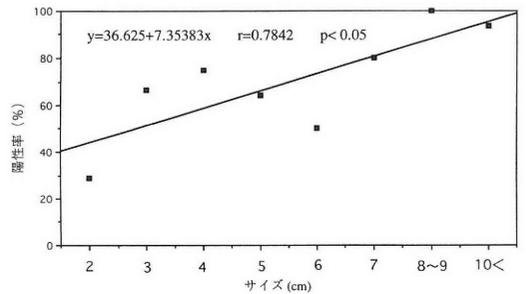


図3 嚢胞サイズとCA125陽性率

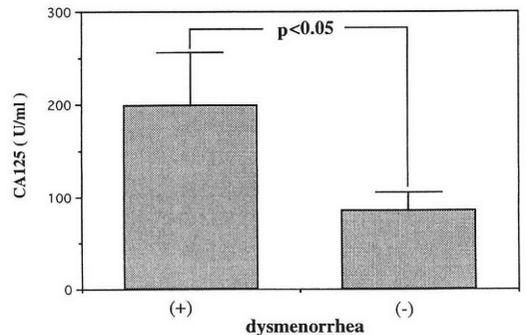


図4 CA125と月経困難症

平均値は、月経困難症のない症例に比べ有意に高かった(図4)。しかし、子宮腺筋症合併の有無と血中CA125値については明確な因果関係は認められなかった。

以上、臨床症状、画像、腫瘍マーカー、内診所見などを総合してチョコレート嚢胞を診断できたのは96例中71例(74.0%)で、術前診断にMRIを用いた症例では81例中66例(81.5%；実際MRIでチョコレート嚢胞と診断したのは71例であるが、腫瘍マーカーや超音波断層法等の他の検査方法で悪性を否定し切れなかった症例があったため66例となった)、MRIを用いなかった症例では15例中5例(33.3%)であった。悪性卵巣腫瘍とされていた例が7例、他の卵巣嚢腫として手術されたものが10例あり、その他は子宮筋腫あるいは子宮腺筋症の手術に際してチョコレート嚢胞合併を診断されたものである(表8)。

5. 挙児希望例について(表9～11)

手術時に挙児希望があった例は28例であり、その平均年齢は 33.9 ± 4.2 (25～42)歳で、平均不妊期間は6年9か月(2年3か月～17年)であった。挙児希望例の術後追跡期間は平均32か月(4か月～72か月)で、28例中手術後現在までに妊娠に成功している症例はわずか4例にすぎなかった。術後IVFが施行されている症例も6例あり、3例が卵巣の低反応性に

よる発育卵胞数が少ないことが原因で採卵にまで至らず、1例は妊娠成立が見られたものの自然流産に終わっている。

考 察

今回京都大学病院における過去5年間のチョコレート嚢胞手術症例96例についてretrospectiveに検討した。外性子宮内膜症のリスクは初経年齢が若く周期が短い女性に高いとされているが²⁾、今回のチョコレート嚢胞症例での検討では、そのような傾向は認められなかった。未妊婦人は全体の47%を占め、不妊率からみても44%となっていた。子宮筋腫や子宮腺筋症の合併のためにこのような結果が出たとも考えられたが、両者を合併しない症例の不妊率は46.9%(32例中15例)と高く、やはりチョコレート嚢胞症例では妊孕能が著しく障害されているという従来からの報告と一致していた³⁾。他方、分娩歴を有するものも半数あり、妊娠、分娩が子宮内膜症の進行を抑えるとしても^{4,5)}、その発生を予防するとは必ずしも言えない。また内膜症合併婦人には自然流産が多いとする報告⁶⁾や変わらないとする報告⁷⁾があるが、今回のチョコレート嚢胞の症例については、流産率は18.7%と一般の10～15%と比べて若干高い傾向があった。

主訴では月経困難症を訴える者が半数を超え、主要な臨床症状であるが、逆に半数の症例に全く認めおらず、単純な因果関係は求められない。子宮内膜症における月経困難症の発現について、Vernonら⁸⁾はProstaglandinを産生する異所性子宮内膜の代謝活性の差によると推測しているが、Prostaglandin合成阻害剤によっても月経困難症が完全に消失しない例も多く⁹⁾、月経困難症の発生要因についてはさらなる検討が必要と思われる。

婦人科合併症では子宮筋腫が52%と非常に多く、Scott¹⁰⁾やEggerら¹¹⁾も高い合併率を報告しており(それぞれ57%、42%)、一般の筋腫の頻度(20%)に比べて明らかに高い。共にエストロゲン依存性である両疾患の発生あるいは進展に共通のバックグラウンドがある可能性が強く示唆される。一方子宮腺筋症との合併は23%と一般の子宮腺筋症の頻度(10～47%)と大差なく、子宮内膜症の卵巣病変と子宮病変がそれぞれ異なった機序により引き起こされているとする最近の仮説¹²⁾を支持する結果であった。

診断法に関しては、超音波断層法による術前検査で、卵巣病変についてのかかなり高い正診率(79.2%)が得られてはいたが、子宮筋腫により手挙大以上の

表8 チョコレート嚢胞と診断できなかった症例の内訳(25例)

ovarian tumor(malignant)	7(例)
ovarian cyst	10
no ovarian lesion	8

表9 挙児希望症例(28例)

平均年齢	33.9 ± 4.2 (25～42)歳
平均不妊期間	6年9か月(2年3か月～17年)
妊娠	4例(14.3%)

表10 妊娠例(4例)

正常妊娠	2(例)
自然流産	1
子宮外妊娠	1

表11 IVF施行例(6例)

採卵不可	3(例)
受精せず	1
着床せず	1
流産	1

子宮腫大がある場合には、かなり大きな嚢腫でも見逃されている症例もあったことは留意すべき点と思われる。また、嚢胞性病変は検出されていたものの、チョコレート嚢胞に典型的な像が指摘されたのは半数以下にすぎず(46.1%)、悪性卵巣腫瘍を疑われた症例も6例あったことは、内部エコーの多彩性により超音波画像鑑別診断が困難であるという本疾患の特徴を表わしている。

嚢胞内容の質的診断を含め、卵巣病変に対するMRI検査の有用性は高く評価されてきているが、今回の解析でもチョコレート嚢胞のMRIによる正診率は87.7%と高かった。超音波断層法で卵巣病変なしと診断した症例でMRI検査が行われた15例でも、そのうち12例はチョコレート嚢胞を指摘されていた。しかし、1cm以下の卵巣病変は今回我々の用いたMRI撮像システムでは検出できない場合が多かった。子宮内膜症の小病変に対しては脂肪抑制T1強調画像の併用によりその同定が11%から47%に飛躍的に向上することが報告されており¹³⁾、今後内膜症の検索に際してさらにMRIが貢献することが期待される。

腫瘍マーカーについては従来報告されているように、CA125は陽性率の面で非常に有用であった。しかし、今回の検討ではPittawayらが報告¹⁴⁾しているような嚢胞サイズとCA125の値との間には有意な相関は見られなかった。また月経困難症を伴う症例では、伴わない症例に比べてCA125の値が高い傾向にあったことや、子宮筋腫や子宮腺筋症などの子宮病変の有無とCA125値には相関がなかったことは、現在なお明確でない月経困難症の発症病理を考える上で非常に興味深い。

嚢胞サイズ、超音波における充実部の存在、腫瘍マーカーの異常高値等により悪性を否定できなかった症例や、開腹した時点で初めて確認された1cm以下の症例の存在のため、術前診断の正診率は74%となっていた。悪性との鑑別が困難な症例をいかに正しく診断するかが問題となるが、Gd-DTPA (Gadolinium diethylenamino pentaacetic acid) を用いた造影MRI診断がさらに有用であるとの報告もあり¹⁵⁾、今後試みるべき方法であろう。

挙児希望例では、手術後の妊娠率がわずかに14.3%であり、引き続いてIVFを施行した症例の予後も悪い。これには手術に踏み切らなければならなかったほどの重症例であったことも関与しているであろうが、手術操作に続発する二次的不妊因子(癒着、卵巣の低反応性)の発生が大きなウエイトを占めてい

ると推測される。子宮内膜症開腹手術後では実に90.6%に高度、中等度の付属器周囲癒着が認められたと小林ら¹⁶⁾は報告している。従って、挙児希望例のチョコレート嚢胞の治療として、できるだけ開腹術は行うべきではなく、腹腔鏡下での治療が望ましいという意見が主流となりつつある。しかし、腹腔鏡下でのエタノール固定法や嚢胞摘出術に関しては、再発率や妊娠率についてなお今後の検討が必要である。

まとめ

過去5年間のチョコレート嚢胞手術症例をretrospectiveに解析した。不妊症との関連が再確認され、婦人科合併症では子宮筋腫が半数以上に認められた。超音波断層法による診断では、子宮筋腫の合併症例の中に卵巣病変が見逃されていた場合があったことは留意すべきであろう。MRIは非常に高い正診率を示し、より有用な画像診断法であった。腫瘍マーカーではCA125が陽性率72%と有用であり、特に月経困難症を認める症例では高値を示した。挙児希望例の開腹術後妊娠率は低く、チョコレート嚢胞合併不妊婦人ではより侵襲の少ない治療法が望ましいと考えられる。

文 献

- 1) Togashi K, Nishimura K, Kimura I, et al., Endometrial cysts: Diagnosis with MR imaging. *Radiology* 180: 73, 1991
- 2) Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, et al., The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *JAMA* 255: 1904, 1986
- 3) Dmowski WP, Pitfalls in clinical, laparoscopic and histologic diagnosis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 123: 61, 1984
- 4) Meigs JV, Endometriosis; etiologic role of marriage and parity. *Obstet Gynecol* 1: 46, 1953
- 5) 増崎英明, 倉田須和子, 山辺 徹, 妊娠が外性子宮内膜症に及ぼす影響. *エンドメトリオージス研究会誌* 12: 291, 1991
- 6) Wheeler JM, Johnston BM, Malinak LR, The relationship of endometriosis to spontaneous abortion. *Fertil Steril* 39: 656, 1983
- 7) Metzger DA, Olieve DL, Association of endometriosis and spontaneous abortion: effect of control group selection. *Fertil Steril* 45: 18, 1986
- 8) Vernon MW, Beard JS, Graves K, et al., Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prosta-

glandin F. *Fertil Steril* 46: 801, 1986

- 9) Kauipillia A, Poulakka J, Ylikorkala O, Prostaglandin biosynthesis inhibitors and endometriosis. *Prostaglandins* 18: 655, 1979
- 10) Scott RB, TeLinde RW, External endometriosis-The scourge of the private patient. *Annals of Surgery* 131: 697, 1950
- 11) Egger H, Weigmann P, Clinical and surgical aspects of ovarian endometriotic cysts. *Arch Gynecol* 233: 37, 1982
- 12) Ricardo A, Adenomyosis: current perspectives. *Obstet Gynecol Clin of North America* 16: 221, 1989
- 13) Sugimura K, Ishida T, et al., Pelvic endometriosis: Detection and diagnosis with chemical shift MR imaging. *Radiology* 188: 435, 1993
- 14) Pittaway DE, Fayez JA, Douglas JW, Serum CA125 in the evaluation of benign adnexal cysts. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1426, 1987
- 15) 中村 靖, 高田道夫, 桑鶴良平 他, 子宮内膜症性嚢胞画像診断における超音波断層法とMRIとの比較検討成績. *エンドメトリオーゼス研究会会誌* 12: 378, 1991
- 16) 小林善宗, 井上正人, 藤井明和, 子宮内膜症開腹術後不妊85例の腹腔鏡所見と予後. *エンドメトリオーゼス研究会会誌* 10: 299, 1989

Retrospective study on patients with ovarian chocolate cysts in our Hospital

Takeshi Hirano, Hideharu Kanzaki, Kimitoshi Imai
Nobuyuki Emi and Takahide Mori

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

Kaori Togashi

Radiology and Nuclear Medicine
Faculty of Medicine Kyoto University

We analyzed retrospectively 96 patients with ovarian chocolate cysts surgically treated in the Department of Gynecology and Obstetrics of Kyoto University Hospital during 1988 ~ 1992. The relationship between chocolate cyst and infertility was suggested since 44% of the patients were infertile. Co-existent uterine myoma was found in 52% of the patients, whereas only 23% of them had adenomyosis. This suggests that uterine endometriosis (adenomyosis) and ovarian endometriosis (chocolate cyst) have different etiology, and implies the existence of some common etiological factor both in uterine myoma and ovarian chocolate cyst. As compared to ultrasound examination, MR imaging was more useful and accurate diagnostic method for ovarian lesions more than 1cm in diameter. More than 70% of the patients exhibited elevated serum CA125 level, and the concentration of this marker in patients with a symptom of dysmenorrhea was significantly higher than patients without the symptom. Among 28 patients with infertility, only 4 women (14.3%) successfully became pregnant. Low ovarian response to hyperstimulation protocol was recorded in 3 of 6 patients progressed to IVF/ET treatment. These results suggested the importance of lessinvasive treatment such as laparoscopic cystectomy for infertile patients with ovarian chocolate cyst.

(受付: 1994年 7月15日)

(受理: 1994年10月12日)

地方部会講演抄録

第36回日本不妊学会北海道地方部会
総会・学術講演会

日 時：平成6年2月26日(土)

会 場：ムトウ会議室

1. エチレングリコールと糖(スクロースあるいはトレハロース)の混合溶液を用いたマウス排卵卵子の急速凍結

○Rayos AA, 高橋芳幸, 菱沼 貢
金川弘司 (北海道大獣医)

マウス排卵卵子を3Mエチレングリコールと0.25Mスクロースあるいはトレハロース(凍結媒液)を用いて室温で5, 10, 20および40分平衡後, 直接液体窒素ガス中に投入して急速凍結した。融解後, 卵子は体外受精に供試し, 受精率およびその後の胚発育を調べた。

その結果, 糖による差異は認められず, いずれも平衡時間が20および40分の場合, 高い正常受精率(約68%)および胚盤胞への発育率(約60%)が得られた。これら数値は対照(未凍結卵子; 87%の正常受精率と88%の胚盤胞への発育率)に比べ, 有意に低い値であった。

20分間平衡後に急速凍結した卵子を体外受精して得られた胚盤胞をレシピエントに移植した。その結果, 正常胎子への発育率(約52%)は対照(約56%)に比べて差異はなく, 急速凍結した卵子の約20%が正常胎子へ発育することが確認された。

2. ヒトおよびマウス未受精卵凍結融解過程における活性酸素一消去系の影響について

○堀川道晴, 玉手健一, 伊藤秀行
片山英人, 山下 剛, 西野共子
千石一雄, 石川睦男 (旭川医大産婦)

体外受精-胚移植における胚凍結保存技術は一般的になりつつある。我々は, 凍結融解過程のなかでsuperoxide anionの発生が認められ, 生存率低下の一因になっていることを報告した。今回, ヒトおよびマウス未受精卵の凍結融解における消去酵素添加による影響を検討した。

体外受精-胚移植時に得られたヒト未受精卵, ICR系マウスより採取した未受精卵を用い, SOD+

Catalaseを添加した耐凍剤を作成し, 凍結および融解を行い対照群に対する生存率と受精率を比較した。ヒト未受精卵の生存率は対照群に比し凍結融解時にSOD-Catalase添加した群で高値を示した。マウス未受精卵の生存率も対照群に比し添加群で有意に高く, 受精率も高値を示した。未受精卵の凍結融解において耐凍剤に抗酸化酵素を添加することにより, 生存率, 受精率が改善され, 臨床応用の可能性が示唆された。

3. 透明帯開口術の受精率評価法としてのヒト透明帯除去卵の検討

○片山英人, 伊藤秀行, 堀川道晴
山下 剛, 玉手健一, 西野共子
千石一雄, 石川睦男 (旭川医大産婦)

体外受精時の受精不成功症例の精子受精能の評価は重要な課題であり, また受精促進法の一つとして期待される顕微授精法における受精成立の予知法の確立も期待される。今回体外受精時の未受精卵を使用した透明帯除去ヒト卵が精子受精能の評価法ならびに顕微授精法選択の指標と成りうるか否かに関し検討した。

体外受精時に受精の認められなかったヒト卵を患者の同意を得て透明帯除去卵として使用した。受精能の評価は前核形成の有無により行った。また未受精卵に透明帯開口術(PZD)を施行し, PZDの受精率と透明帯除去卵の受精率との相関を検討した。透明帯除去卵の受精率はその周期における受精率に比例し, 多精子受精も同様の結果となった。

またPZDの受精率は透明帯除去卵の受精率に比し低値を示した。ヒト未受精卵を使用した透明帯除去卵と配偶者精子を用いたassay法はヒト精子受精能評価および顕微授精法選択の指標に應用可能であることが示唆された。

4. 低浸透圧処理によるマウス初期胚の発生能判定の試み

○亀山祐一, 橋詰 良一, 石島芳郎
(東京農大生産)

2細胞胚芽を低浸透圧(190mOsm)のM16液で10分間処理した時の膨らみ方の違いにより, 胚盤胞への発生能に差があるかを検討した。

供試胚はUV照射で1または2時間、室温放置(20~30℃)と冷蔵保存(4℃)でそれぞれ1, 2, 4, 6, 8または16時間処理した。前処理した胚は、低浸透圧下で割球界面が不明瞭なものを膨化、明瞭なものを膨化不全に分類し、M16液で96時間培養した。前処理を行わなかった場合、低浸透圧処理胚は対照区(98.3%)と遜色ない発生率(95.0%)が得られた。膨化型の割合は前処理を行わなかった場合で32.5%であったが、室温放置および冷蔵保存すると前処理1時間で80%程度と高値を示し、前処理がある時間を越えると経時的に低下する傾向を示した。膨化型が60%以下の場合、すべての前処理で低い発生率を示したが、膨化型と膨化不全型に分けてみると発生率の差は認められなかった。

低浸透圧処理による発生能の判定は、個々の胚では困難であるものの、群全体ではある程度指標となることが判明した。

5. 发育鶏胚羊膜内でのブタ胚の体外培養による胚盤胞への发育

○Marlon B. Ocampo, 金川弘司
(北海道大獣医臨繁)
Lerma C. Ocampo, 鈴木啓太, 森 匡
上田純治, 清水 弘
(北海道大農畜産改良増殖)

供胚豚に過剰排卵処理を施して、hCG投与60~72時間後に初期胚を回収し、ブタ卵管上皮細胞との共培養および发育鶏胚羊膜腔内培養の比較を行った。

その結果、収縮桑実胚および胚盤胞への发育率についてみるとブタ卵管上皮細胞との共培養(18.0%)よりは发育鶏胚羊膜腔内培養(60.0%)が有意に高い値を示した。

以上のことから、ブタ初期胚の发育鶏胚羊膜腔内培養は有効であり、この方法はCO₂培養器を使用しなくても初期ブタ胚の対外培養に役立てることが示された。

6. ラット structural luteolysis と proteinase について

○遠藤俊明, 後藤妙子, 木谷 保
山本 弘, 田中昭一, 工藤隆一
(札幌医大産婦)

ラットの黄体退縮では progesterone 分泌が低下する functional luteolysis (FL) と黄体組織がマクロ的に縮小する structural luteolysis (SL) の2つの段階が時期を隔てて起こる。

我々は bromocryptine (Br) 投与により FL, Br と ovine prolactin を組み合わせて投与することにより SL の実験モデルを作成し、そのメカニズムを検討した。FL と SL の黄体 wet weight 当たりの蛋白と DNA 含量を比較すると、DNA 含量に差はないが、SL の黄体の蛋白含量は有意に減少していた。次に proteinase 活性を gelatin zymography, casein-agar-plasminogen gel, resorufin-tagged casein を用いて検討した。SL の黄体は FL の黄体に比較して 66, 72kd gelatinase 活性が有意に上昇していた。また EDTA, EGTA, phenanthroline-sensitive caseinase 活性ならびに urokinase type, tissue type plasminogen activator 活性が有意に上昇しており、SL への各種 proteinase の関与が示唆された。

7. インターロイキンの排卵に及ぼす影響について—新しい in-vitro ラット卵巣灌流系を用いて—

○三国雅人, 牧野田 知, 根岸広明
藤本征一郎 (北海道大産婦)
小山富康 (北海道大電子科学研)

マクロファージやプロスタグランジンなど免疫や炎症に関係する細胞や物質が排卵に強く関わっていることが知られている。そこで今回我々は免疫に関連した物質であるインターロイキン(特に IL-2, IL-6)の排卵に及ぼす影響について検討した。

in vitro 卵巣灌流系は in vivo 実験では免れない種々の因子の影響を受けないで実際に排卵(排卵数)を確認できることなどが大きな特長である。我々は、既存の装置を改良した新しい in vitro ラット卵巣灌流系を作成し、これを用いて今回の検討を行った。

28日齢未熟SD系雌ラットにPMSG 30 IUを皮下注射し、48~49時間後に動脈にカテーテル挿入された卵巣を摘出し灌流した。LHまたはLH+IL添加の直前ならびに添加後2時間おきに10時間目までと灌流終了時に灌流液を採取しホルモン濃度を測定し、灌流終了後に排卵された卵を採取し排卵卵子数を算定した。

LHにより6.0±0.6個の排卵が得られエストラジオールは4時間目に15.8ng/ml、プロゲステロンは2時間目に16.4ng/mlのピークを示した。IL-2 100ng/mlの添加により排卵数は2.5個に抑制された。また、プロゲステロン濃度は2時間目と4時間目にLH群よりも高い傾向を示した。50ng/mlのIL-2添加では排卵数、ホルモン濃度ともにLH群と有意差なく、IL-6も50ng/mlの添加ではLH群と排卵数に有意差を認めなかった。

8. 精巣内血管障害の精子発生能に及ぼす影響— 脳卒中易発症rat (SHRSP) を用いた検討—

○赤樫圭吾, 伊藤直樹, 熊本悦明
(札幌医大泌尿器)
鈴木庸之, 太田善夫 (近畿大第一病理)

(目的) 我々は高齢者と男子不妊症の精巣内血管障害が精子発生能障害と密接な関係にあり, 高血圧自然発症ratにおいて血管障害による精子発生障害が成熟した精細胞より障害されることを報告した. 今回さらに血管障害の顕著なSHRSPを用い組織学的, 生化学的に検討した.

(対象と方法) 11から23週齢のSHRSPで精巣内血管障害, 精子発生能を検討した. また精巣cytosol中transferrin濃度を測定した. ControlとしてWKYを用いた.

(結果) WKYでは血管障害, 精子発生障害は経過中認めなかった. SHRSPでは19週以降20%以上に血管障害が認められた. 精子発生能は23週でimmatureおよびmature spermatid/Sertoli細胞が2.67, 2.06とWKYの6.98, 7.04に比較し低下していた. Transferrin濃度はSHRSPの23週齢で低下していた.

(結論) 以上から精巣内血管障害に伴いSertoli細胞機能障害が生じlate spermatogenesis過程から障害される可能性が示唆された.

9. 習慣流産患者に認められた絨毛細胞抗原に対する細胞性免疫の活性化

○山田秀人, 香城恒磨, 佐々木隆之
藤本征一郎 (北海道大産婦人)

原因不明の習慣流産患者(RA)の末梢リンパ球を用い, Lymphocyte proliferation assayにより絨毛細胞抗原(JEG-3)に対する細胞性免疫の活性化の有無を調べた. また, この結果とEmbryotoxic factor (ETF)産生との関連を調べた. Stimulation index (SI)が3以上を特異的反応とした. マウス受精卵を用いたETF assayには, 絨毛細胞抗原とリンパ球との培養上澄を使用した.

RA群の30例(52.6%)で3以上のSIが認められたが, コントロール群(n=10)では特異的な反応は認められなかった. 絨毛細胞抗原に対するSIが3以上のRAの90%がETFを産生し, SIとETF産生との間に正の相関($p < 0.01$, $r^2 = 0.4$)が認められた. 原因不明の習慣流産の病因成立機構に, 絨毛細胞抗原に対する細胞性免疫の活性化が関与している可能性がある.

10. 犬子宮蓄膿症の子宮内膜の走査電子顕微鏡による観察

○森好政晴, 矢羽田真臣, 中尾敏彦
河田啓一郎 (酪農学園大獣医臨牀)

子宮蓄膿症(PM)罹患犬13頭および正常子宮犬5頭を用いて, それらの子宮内膜の微細構造を走査電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した.

PMは病理組織所見に基づき, 軽度慢性PM, 中等度慢性PM, 重度慢性PMの3つに分類された. 上皮細胞のSEM像は微絨毛の密度や長さの減少および消失が全例で著明に認められ, 細胞の萎縮に伴う細胞の大小不同は重度になるほど多く認められた. 上皮細胞の剥離は軽度および中等度例に多く認められた. また微絨毛が消失しているものでは細胞表面の膨隆, 粗造化した海綿状構造, 細胞表面の張力の減少に伴う虚脱状変化などが観察され, 細胞が剥離しているものでは虫食い状脱落, 上皮が連なって皺状をなすものが観察された. 断面においては, 重度になるほど細胞浸潤や子宮腺の変性が顕著に認められた.

以上の結果からPMの程度が重度に移行するに従い変性の程度が顕著になることが認められた.

11. 性分化異常症に対するEnterovaginoplastyの経験

○野々村克也, 柿崎秀宏, 松村欣也
関 利盛, 山下哲史, 村雲雅志
金川匡一, 小柳知彦 (北海道大泌尿器)

腔の無形性あるいは極めて高度の形成不全の症例に対し, 腸管を用いた腔形成術を経験したので報告する.

対象は1991年7月より現在までの4例, 手術時年齢8~20歳(平均15歳)で, 観察期間は3~18ヵ月(平均11ヵ月)である. 疾患の内訳はAgonadism 1例, 男性仮性半陰陽1例(いずれも腔無形成), および真性半陰陽1例(いずれも腔形成不全)と様々であった. 3例では15cmの盲腸(長さの足りない時は同時に遊離した回腸終末で延長する.)の一方の断端を会陰部に開口させる術式を行い, 総排泄腔外反症では直腸肛門形成を断念したことで余剰となったS状結腸を遊離し, 一側の断端を子宮・遺残腔と端々吻合し, 他側を会陰部に開口させた. 術直後は分泌液等により会陰皮膚の炎症がみられたが, 3ヵ月以降は全例無処置で経過観察可能となった. また, 本法により形成腔の口径・深さは十分に得られ, 社会的適応を可能にする術式として推奨される.

第5回 日本不妊学会春季九州支部会

日時：平成6年4月24日(日)
会場：メディカルホール

1. 中等度の習慣飲酒を契機として無月経となった不妊患者の1例

○石 明寛, 吉田耕治, 柏村正道
(産業医大産婦)

女性のアルコール依存症患者では高プロラクチン血症から卵巣機能不全になることを、我々はすでに報告してきた。

アルコール依存症にかぎらず急性の中等度のアルコール摂取でピブプロラクチンは上昇するといわれているが今回は、36歳の原発性不妊(不妊期間4年)の患者が飲酒後3か月程してから続発性無月経を来した症例について報告する。

飲酒前は毎月月経をみていたが飲酒後続発性の第1度無月経状態となり性欲も低下していた。内診上は子宮がやや小さい他は所見を認めず。KAST(久里浜アルコールリズムスクリーニングテスト)は1.2点の問題飲酒者で、血質でヘモグロビン9.5g/dlと貧血を認め、LHは0.2mIU/ml、FSHは0.3mIU/mlとhypogonadotropicで、プロラクチンは41.6ng/mlと高く、E₂は300pg/mlであった。LH-RHテストは正常な反応であった。

2. 非妊娠時の子宮内膜搔爬に続発した無月経症例

○生田幸生, 松村小百合, 河野哲郎
松浦講平, 岡村 均 (熊本大産婦)

子宮腔癒着症は、その大半が妊娠に関連した子宮内搔爬術や子宮内感染(結核等)など子宮内膜の損傷に続発して生じ、月経異常や不妊、不育の原因となる。

今回、妊娠や結核の既往のない婦人に不正性器出血の精査・治療目的に行われた子宮内操作に続発したと考えられる症例を経験したので報告する。症例は32歳の未妊婦人で、主訴は無月経と挙児希望である。22歳で結婚し25歳時、少量の不正性器出血が2ヶ月間持続するため近医で子宮内膜搔爬術を受け、その後無月経となった。HSGでは造影剤の注入が不可能であり、軟性子宮鏡検査では外子宮口から5cmの部位で子宮腔は盲端となっていた。腹腔鏡、硬性子宮鏡検査では、腹腔内に異常所見はなく、子宮内腔のはほぼ全面をクモの巣状に交錯する索状構造物が占拠していた。内腔の全面搔爬を行って、IUDを留

置し、エストロゲン・プロゲステロン療法を施行中である。2周期目より通常月経量程度の消退出血を認めるようになってきている。

3. 高DHEAS血症を伴う不妊症患者の臨床的背景と妊娠成績に関する検討

○有吉端葉, 詠田由美, 桜井景紀
池田真一, 本庄 考, 新堂昌文
吉満陽考, 白川光一 (福岡大産婦)

DHEASの測定は、主にPCO症例を対象に実施されているが、一般不妊検査としての意義は確立されていない。我々は、高DHEAS血症(1.5 μ g/ml以上)を伴う不妊症患者54例の臨床的背景および妊娠成績の分析を行い、不妊検査としてのDHEAS測定の有用性を検討した。

54例の年齢は26.6 \pm 4.5歳、不妊期間が38.4 \pm 38.9ヶ月で、原発不妊37例、続発不妊17例であった。続発不妊の妊娠歴では、流産の既往が11例(64%)に見られた。BBTおよびgestagen testでは、第2度無月経1例、第1度無月経19例(8例はclomiphene無効)、無排卵周期症9例と53.7%が無排卵であったが、25例(46.3%)は排卵周期を有していた(黄体機能不全17例、正常周期8例)。これら54例中26例、のべ35例の妊娠が成立し、48%と高い妊娠率であったが、そのうち15例(42.9%)が流産となった。

DHEASは、不妊検査として有用であり、妊娠予後改善のため、今後の高DHEAS血症の解析が必要と考えられた。

4. 卵巣腫瘍核出術後のIVF-ET成績

○沖 利通, 伊集院博文, 大西英資
中村佐知子, 森 明人, 山元慎一
福元清吾, 竹内一浩, 堂地 勉
永田行博 (鹿児島大産婦)

卵巣腫瘍核出術後に排卵障害をきたすことはまれではない。今回、我々は卵巣腫瘍核出術が体外受精胚移植における排卵誘発効果に及ぼす影響を検討したので報告する。

対象は1986~1992年までに体外受精胚移植を行った症例、対照群、127症例366周期。卵巣腫瘍核出術症例(以下、核出術群)、6症例19周期、片側付属器切除し、対側の付属器が温存されている例(以下、卵巣切除群)、6症例22周期である。方法は当科体外受精胚移植プロトコルに従った。

検討の結果、核出術群の排卵誘発成績の特徴は、術後の排卵誘発剤への反応性低下ばかりでなく、受

精後の胚発育の低下が認められた。特に子宮内膜症でその傾向が強かった。

文献では、片側卵巢をそのまま温存すれば排卵障害なしとの報告から、卵巢楔状切除単独での術後無排卵症例も報告されているように、卵巢への外科的侵襲を極力避けることが重要と思われる。従って、妊孕性温存に卵巢への侵襲を最少限に止めること、また、不必要な手術をさけるよう手術適応の検討には細心の注意が必要と思われる。特に、子宮内膜症の手術では極力卵巢正常部分を残すよう留意しなければならない。

5. 卵胞液中トランスフェリンの存在と卵巢機能への影響

○河野康志, 榎原久司, 松 敬文
吉松 淳, 宮村研二, 宮川勇生

(大分医大産婦)

(目的) トランスフェリン(Tf)は鉄の輸送に関与する蛋白質であるが、細胞の機能調節も注目されている。卵胞液中のトランスフェリンを測定することで、排卵期での顆粒膜細胞へ及ぼす影響を性ステロイドホルモンを指標に検討した。

(方法) IVF-ETを施行した25周期を対象とした。hCG投与日に得られた血清中のestradiol (E₂), progesterone (P)をRIAで、また卵胞液中のトランスフェリンをネフェロメトリーで測定し、トランスフェリンと血清E₂, P値との関係を検討した。

(結果) 卵胞液中のトランスフェリンは血清E₂とは相関を示さなかったが、血清Pとは有意な負の相関を示した。トランスフェリンは、血清P値が1 ng/ml以上の群と、1 ng/ml以下の群では1 ng/ml以上の群で有意(P<0.05)に低値であった。

(結論) IVF-ETにおける排卵誘発時に血清P値の微小変動が注目されているが、その原因の一つに卵胞液中のトランスフェリン濃度が関係している可能性が示唆された。

6. 視床下部性無排卵無月経の難治性不妊症に対する希釈GnRHaによる排卵誘発にて妊娠成立した一例について

○当間 敬, 佐久川政男, 上原清昇
佐久本哲郎, 金城忠雄

(沖縄県立那覇病院産婦)

今回我々は、視床下部性無月経のある難治性不妊症患者に対して、GnRHaの希釈点鼻投与により排卵誘発後、妊娠が成立した症例を経験したので報告す

る。

患者は35歳、原発性の10年不妊である。月経歴は初経が12歳、以後順調であったが、25歳より低ゴナドトロピン性無排卵無月経となった。hMG-hCG療法を数年にわたり試行するも妊娠せず、またOHSSもしばしば発生していた。難治性不妊のためIVFを4回行うも成功に至らなかった。hMG-hCG療法での受精卵の質が悪いこととOHSSを避ける目的でGnRHaの20倍希釈液を作成し排卵誘発を試みた。消退出血2日目より7.5 μgを隔日の点鼻投与した。開始時のE₂は3.9 pg/mlであったが、24回投与後、発育卵胞は1個で21×16mmであり、E₂も320 pg/mlとなりhCG投与にて排卵した。2周期目に同様な刺激にて排卵し、妊娠が成立した。

7. hMG-hCG療法後の子宮内外同時妊娠

○河野哲郎, 松浦講平, 鄭 俊明
愛甲 朗, 岡村 均 (熊本大産婦)
瀬戸致行 (瀬戸産婦人科医院)

hMG-hCG療法後に発生した子宮内外同時妊娠症例を報告する。

患者は27歳の未妊婦で、近医にて無排卵を適応にhMG-hCG療法が施行され、重症のOHSSを発症し当科に救急搬送された。安静と輸液療法で症状は一旦改善したが、再び悪化したため低用量ドーパミン療法を施行した。妊娠5週0日に左下腹部痛を訴え、左卵巢茎捻転と診断し用手整復を行った。妊娠6週4日には子宮内に胎嚢を3個認めたが、再び左下腹部痛が出現し、用手整復を試みても軽快せず、子宮外妊娠の合併を疑い緊急腹腔鏡検査を施行した。左卵管膨大部は暗赤色でソーセイジ様に腫大し、左卵管采から出血を認めたため、未破裂卵管膨大部妊娠と診断し、引き続き開腹術へ移行し左卵管を摘出した。

hMG製剤による複数卵胞発育後の妊娠例ではOHSSによる腫大卵巢のために子宮外妊娠の早期診断が困難なこともあるため、子宮内外同時妊娠の可能性を念頭に入れておくことが重要である。

8. 他人全血輸血が効果的であったと思われる週間流産の1例

○高尾直大, 河野雅洋, 石丸忠之
山辺 徹 (長崎大産婦)

症例は37歳の助産婦。既往妊娠歴は8回経妊未産であり、すべて妊娠初期に自然流産をきたしている。不育症に対するスクリーニング検査では流産の原因

となるような異常はみられなかったが、血液型がA型、Rh(D)陰性であった。一方、夫の血液型はA型Rh(D)陽性であり、HBs抗原が陽性であった。

今回、平成5年9月4日から7日間を最終月経として妊娠したため、患者の同意を得た上で、10月13日(妊娠5週4、胎嚢長径13mmの時点)、交叉反応陰性他人全血200mlをX線500Gy照射後に輸血した。現在妊娠20週(平成6年1月22日)であり、妊娠経過には特に異常を認めていない。

すなわち、本例では、妊娠初期の他人全血輸血により早期流産を免れた可能性がある。他人全血輸血の理論的根拠は不明であるが、今回の症例のように、免疫療法の適応と考えられる症例であって、夫の血液を用いた治療ができない場合には、妊娠初期に他人全血輸血を試みてもよいのではないかと考える。

9. Mumps orchitisによる高度異常精液所見を呈するAIHによる妊娠例

○布施正樹, 石丸忠之, 山辺 徹
(長崎大産婦)

我々は、mumps orchitisによると思われる高度精巣萎縮を伴った高度異常精液所見を呈する例を経験した。この例にAIHを行い妊娠の成立がみられたので報告する。

夫は、28歳で、12歳の時mumps orchitisになり、高度の精巣萎縮を示していた。一般的精液所見は、精子数、運動率および奇形率は $0.2 \times 10^6/ml$ 、42.9%および57.1%であった。妻は27歳で未妊であった。HSG, TRHテスト、BBTおよびクラミジア抗原および抗体に異常所見はみられなかった。そこで排卵日の推定を行い、AIHを施行していくことにした。AIH施行3回目に妊娠した。この時の精液所見は精子数 $0.1 \times 10^6/ml$ 以下で、パーコル処理後運動精子数万前後を子宮内に注入した。妊娠経過は順調で、1993年8月6日(妊娠39週)に2880grの女児をApgar score 9点で経陰分娩した。

10. 不妊および男性化徴候を示した右卵巢Sertoli-Leydig cell tumorの一例

○井上善仁, 井上丈彦, 野崎雅裕
嘉村敏治, 佐野正敏, 中野仁雄
(九州大産産)

症例: K.M. 29歳。G0P0。既婚。主訴: 挙児希望, 続発性無月経, 座瘡。家族歴・既往症: 特記すべきことなし。病歴, 経過: 6年間の不妊と無月経を主訴にして来院。両頬の座瘡の集簇と陰核肥大が

あり、経腔超音波断層法で非薄化した子宮内膜と正常大の両側卵巢を認めた。

内分泌学的検査ではLH; 16.9 IU/ml, FSH; 3.3 IU/ml, PRL; 3.8 ng/ml, E₁; 32 pg/ml, E₂; 32/ml, DHEAS; 1.280 ug/ml, androstenedione; 1.65 ng/ml, testosterone (T); 278 ng/dlで、染色体は46XXであった。T産生腫瘍を疑い選択的静脈採血を施行、右卵巢静脈で特異的な高値(4.132ng/dl)を得た。平成6年1月、腹腔鏡下右付属器切除術を施行した。術中迅速病理検査では未分化型のSertoli-Leydig cell tumorであった。病変の広がりを確認するため開腹し骨盤・傍大動脈節生検、大網・虫垂切除術を追加した。術後7日目にはT値が $< 10 \text{ ng/dl}$ に低下し、現在は排卵障害の改善の有無を観察中である。

11. HSG造影剤におけるリピオドールとイソビストの優劣に関する検討

○伊集院博文, 大西英資, 沖 利通
丸田邦徳, 川俣和弥, 中村佐知子
森 明人, 古謝将一郎, 山元慎一
堂地 勉, 永田行博 (鹿児島大産婦)

現在我々は、HSG造影剤としてエステル化ヨード油であるリピオドールUFを使用している。これに対し、近年開発された非イオン化2量体型水溶性造影剤であるイソビストの造影効果、腹痛の発現、HSG後の妊娠率について比較検討した。

1992年8月から1993年12月まで当院でHSGを施行した症例73例(リピオドール群44例, イソビスト群29例)を対象とした。

造影効果に関しては、リピオドールの方がコントラストに優れ診断が容易であった。腹痛の発現に関してはイソビストの症例にはほとんど発現せずリピオドールより優れていた。HSG後の妊娠率に関してはリピオドール群16%, イソビスト群8%とリピオドール群の方が上回っていた。

以上の結果と薬価を考慮にいれ、痛みに過敏な症例以外はリピオドールのほうがHSG造影剤としては有用であると判断した。

12. 腹腔鏡検査による卵管形態と妊娠について

○宇津宮隆史 (セント・ルカ産婦人科)
馬場真澄, 谷口一郎 (大分県立病院)

腹腔鏡検査は、不妊症診断において欠かすことのできない検査である。昨年、我々は卵管閉塞や無精子症のような決定的な不妊因子を除いた例で腹腔鏡所見を検討した結果、その卵管采の形状がその後の

妊娠率へ影響を与えることを報告した。

今回はさらに症例を加え、その後の妊娠率との関係を検討した。その結果、腹腔鏡検査後に妊娠するのは6か月以内が80%を占め、腹腔鏡手術(子宮内膜症・焼却術・腹腔内洗浄・癒着剥離等)の不妊症に対する治療という側面が明らかとなった。また、現在までに腹腔鏡を行って6か月以上経過した例は203例あり、妊娠例89例、43.8%、また1年以上経過した例は116例で、妊娠例は56例、48.2%であった。また前回と同様に卵管スコアと妊娠率との関係を見ると、やはり卵管采の大きさと卵管開口部の位置が妊娠率に関係していることが明らかとなった。

このように、腹腔鏡を行うことによって、不妊症診療において、的確な治療指針が得られ、また治療手段としての面も明らかとなった。

13. 卵管妊娠に対するMTX局注療法の検討

○寺尾公成、永井義雄、三部正人
本田正之 (宮崎県立延岡病院産婦)

子宮外妊娠に対する診療において、早期発見に加え妊孕性温存を図る治療法が定着してきた昨今である。

当科では平成3年1月より卵管妊娠の治療法に、開腹下MTX局注療法を取り入れて、平成5年12月までの3年間に、本療法施行症例は18例を数えている。その適応基準は、①好孕性温存希望、②尿注hCG8000IU/l以下、③未破裂卵管妊娠、④病巣最大径4cm以下、⑤圧出不能、の全てを満たす症例と定めている。

今回、当科で行っているMTX局注療法の実際と治療成績(尿注hCGの推移・再来月経開始までの日数・HSG判定による卵管通過性・治療後の妊娠分娩)について報告する。

14. 精子処理法におけるペントオキシフィリンの有用性について

○田中威づみ、田中 温、塩見秀明
永吉 基、栗田松一郎、竹本洋一
高崎博幸、井手紀子、有本恭子
(セントマザー産婦人科医院)

ART (Assisted Reproductive Technology) を用いた精子処理法としてペントオキシフィリンの有用性が報告されている。今回我々はこのペントオキシフィリンの臨床上的効果について検討したのでその結果について報告する。

対象としては良好精子群、精子無力症(高度、中

等度)群、凍結精子を用いた。

ペントオキシフィリンの濃度は1ng/ml、4mg/ml、8mg/ml、12ng/mlとした。

液化精液をパーコール法にて洗浄し、沈澱した精子ペレットに核濃度のペントオキシフィリンを加え、混和し4～5時間培養し30分毎に精子運動率を観察した。

結果：①添加後30～60分以内の精子運動率は核濃度で上昇(8mg/mlが顕著)傾向を示したがそれ以後では運動率は低下した。②良好精子群では著変は認めなかった。③高度の精子無力症ではあまり効果は認めなかった。④精子凍結の際、凍結融解後より、凍結前に投与した方に効果がやや認められた。

15. 不妊症における精索静脈瘤の診断と治療 (第一報)

○緒方俊一 (大分県立病院泌尿器)
安東桂三、宇津宮隆史
(セント・ルカ産婦人科)

臨床症状を呈さない精索静脈瘤は精子無力症の一因と考えられる。しかし、精索静脈瘤の診断基準が多角的な方法で確立されていない点や、妊娠可能な精索静脈瘤の存在が診断と治療を困難にしている。

我々は、7.5MHzリニア深触子を用いた画像診断と触診によって精索静脈の拡張を4段階に分類し診断基準を検討した。精巣静脈が臥位とバルサルバ法で1段階以上拡張し、しかも左右差が有る症例を精索静脈瘤と診断した。軽症例に桂枝茯苓丸、十全大補湯による保存的治療を行い成績を検討した。臨床的精索静脈瘤には高位切開による精索静脈切断を行っているが、今回の検討から除外した。投与後平均1ヶ月の経過観察期間で精子数、運動率、奇形率の改善を検討した。

統計学的有意差はなかったものの治療前後で12例中9例に精子数の増加を認めた。しかし、運動率、奇形率では効果の判定はできなかった。

16. 不妊外来における注射の副作用調査

○指山実千代、磯崎美智子、安達明子
曾根崎トシ子、宇津宮隆史
(セント・ルカ産婦人科)

不妊外来ではホルモン剤や造影剤の注射は診察上大きな位置を占める。注射の副作用を早期にキャッチし、診療を円滑に進めるため外来患者942例(延べ1782例)に注射の副作用、副反応の聞き取り調査を行った。

副反応としての注射後疼痛は、HMG-Iは強い痛みを訴えた例が404例中169例41.8%で、卵胞ホルモン剤やHMG-IIより多くみられた。次に副作用では、注射後疼痛、発赤は90例中17例で18.8%でもっとも多く、頭痛は13例14.4%であった。卵胞ホルモン剤では吐気、胃部不快感、倦怠感がみられた。副作用がもっとも多かったのはHMG-IIIで、次にHMG-II、卵胞ホルモン剤の順であった。しかし副反応が最も多かったHMG-Iではわずか404例中19例であった。造影剤テスト液による副作用は造影剤Aが19例中6例、31.5%、造影剤B45例中6例13.3%であった。

このように同種類の薬剤でも副作用、副反応の出現頻度が異なり、またその出現時期ではHMG剤で初回に出現したのは48.8%であったが8回目、11回目に症状が出現した例もあったことは見逃せない思われた。

17. 外来のみの体外受精・胚移植法の検討

○岡本純英 (岡本ウーマンズクリニック)

体外受精・胚移植において、超音波断層による採卵法とGnRHの導入は臨床成績の安定と実施法の簡便化をもたらした。当クリニックにおいても入院を必要としない外来のみの体外受精・胚移植の実施方法を検討し、一定の成績をおさめたので報告する。

スタッフは術医、麻酔医(非常勤)、清潔看護婦、外廻り看護婦およびラボ(臨床検査技師)各1名で計5名である。

排卵誘発法はGnRH・HMG・HCG法、モニタリングは超音波断層および血中エストロゲン(EIA)即時迅速測定法によった。採卵術は日曜祝日を除く午前8時開始、媒精および胚移植は午後2時とした。麻酔はケタミン・ドロレプタン・ジアゼパムのバランス麻酔法で行い、午後には帰宅させた。年間延べ45例(平均34.6歳)に実施し11例(平均34.9歳)に臨床妊娠が成立(24.4%)した。

体外受精・胚移植ユニットの小型簡便化はこれからの地域医療に於ける不妊症治療に有用である。

18. 体外受精妊娠症例の分割細胞数からみた各種排卵誘発法の比較

○永吉 基, 田中 温, 塩見秀明

粟田松一郎, 田中威づみ, 竹本洋一

高崎博幸, 井手紀子, 有本恭子

(セントマザー産婦人科医院)

(目的) 今回我々は、体外受精妊娠症例の分割細胞数からみた各種排卵誘発法 {Short法, Long法,

Short II法(スプレキュアとHMGを月経周期3日目より同時投与), クロミフェン(CI)+HMG法}の比較検討を行った。

(結果) 2細胞の平均細胞数は、Short法:1.40個、Long法:1.45個、Short II法:1.22個、CI+HMG法:1.41個で、4細胞の平均細胞数は、Short法:2.55個、Long法:2.43個、Short II法:2.61個、CI+HMG法:1.30個であった。4細胞数が1個以上の症例は、Short法:79%、Long法:85%、Short II法:84%、CI+HMG法:62%であった。

(結論) 1. Short II法は、Short法、Long法と比較し、有意差は認められず、有用な排卵誘発法と考えられる、2. Long法は、各分割細胞の平均細胞数において良好な成績が得られたが、Short法間に有意差は認められなかった。

19. 重症男性不妊症におけるZona-free inseminationによる胚発育

○粟田松一郎, 田中 温, 永吉 基

塩見秀明, 田中威づみ, 竹本洋一

高崎博幸, 井手紀子, 有本恭子

(セントマザー産婦人科医院)

従来の顕微授精でも受精困難な、重症乏精子症(>10,000/ml)や精子無力症(<10%)に対して、透明帯を完全に除去して培精し、精子と卵細胞との接着可能面積をできる限り拡大した。

採卵後0.5M sucroseを含む培養液で卵細胞を縮小させ卵腔を拡大し、27G注射針で手動的に透明帯切開を入れZona-freeの状態とする。乏精子症では遠心分離後のペリットを直接HTF小球内へ注入、無力症ではミニバーコール後、“K-Ⅲ法”で先体反応誘起後に媒精へ供する。精子の運動率によって培精時精子濃度を調整し、多精子受精を極力少なくする。3時間の培精後、20% HTFへ移し、12時間後に前核の状態を確認する。受精率は60%で、25%が2細胞期へ進むが従来のIVFと比較して率は低い。しかしひとたび2細胞期になると、8細胞期や桑実胚期まで分割する率はさほど悪くない。だがさらに胚盤胞期まで至る割合は少なかった。また、受精後前核期で再び透明帯の中へ戻して培養を続けると16%が分割へ至った。

20. 新しい分割凍結卵の検討

○井手紀子, 田中 温, 田中威づみ
永吉 基, 塩見秀明, 粟田松一郎
竹本洋一, 高崎博幸, 有本恭子
(セントマザー産婦人科医院)

不妊症治療において, 分割卵の凍結は, 非常に大切なことであるが, 凍結成績が不十分なため, 現状では, 前核期の凍結が主流になっている. しかし, 現場での体外受精の胚移植においては, 移植時に残った良好分割卵(2~4 cell)の凍結が, 必要不可欠となっている. そこで今回, 我々は分割卵の凍結の改良を試みた.

凍結培地に, 0.2M シュークローズ添加1.8M エチレングリコールを使用. 分割卵を直接培地に入れ, ストロウ充填を行い, プログラムフリーザー(フジヤ矢野株式会社ET, U3)にセットする. -7℃で植氷開始. 0.5℃/minで-30℃まで冷却. 完了後は, 直接LN₂に入れて保存. 溶解は, 5秒間空中保持した後, 30℃の温水中に入れ, 氷晶が消えてから取り出し, 10分以内に10% HTFに直接移す.

この方法を卵32個に対して行った結果, 生存率16/32 (50%), 分割率10/32 (31.2%)を得た.

21. 顕微授精における精子性状と胚について

○安東桂三, 広津留恵子, 片山道子
宇津宮隆史 (セント・ルカ産婦人科)

当院において男性不妊症に対する治療として顕微授精法を1993年10月より開始した. 対象は通常のIVF-ETに於いて2度以上受精卵が得られなかった症例, あるいは明らかに高度乏精子症・精子無力症などの精子因子不良の症例, 機能的に射精障害である男性因子を対象とした.

方法は当院におけるIVF-ET法(GnRH_a-HMG-HCG)プロトコールを使用した. 採取卵は前培養後swim-up精子を使用し, PZDあるいはSUZI処理を行い約48時間後にETを行った.

対象はPZD 15症例SUZI 20症例それぞれのswim-up処理後の有効精子数は $3.2(\pm 4.4) \times 10^6$ 個, $1.3(\pm 3.3) \times 10^6$ 個, ベネトラック値 $39.1(\pm 11.5)$ mm, $29.8(\pm 12.7)$ mm, SST-score(試案)は, $1.14(\pm 1.10)$, $0.71(\pm 1.02)$, Embryo-Grade (by Puissant etc)は $2.36(\pm 0.97)$, $1.80(\pm 0.68)$, 受精率は30.5%, 34.5%であった.

今回, 処理後の有効精子数が 0.03×10^6 個以下の症例に対して, SUZIを行いGrade-1の受精卵を移植することができ, 極端な男性因子不良例に対しても有効法であると確信した.

22. 卵細胞質内精子法の臨床的評価

○田中 温, 塩見秀明, 永吉 基
粟田松一郎, 田中威づみ, 竹本洋一
高崎博幸, 井手紀子, 有本恭子
(セントマザー産婦人科医院)

重症男性不妊症の究極の治療法として期待されている卵細胞質内精子注入法(ICSI)は, 世界中で試みられているが, いまだ十分な結果は得られていない.(ベルギーのみ好成績)

今回, 我々は1992年4月より現在までに行ってきたICSIの臨床成績について, その結果を評価する.

精子処理法としては ①凍結, 融解2回繰り返して②蒸留水につける ③K-Ⅲ法の3通りを用いた. 卵子の活性化としては ①なし ②A23187Caアイオホノア ③エタノール ④ピュロマイシンを用いた. 細胞内Ca⁺⁺を高めるため ①IP₃(イノシトール3リン酸) ②GTP(G蛋白)を用いた. 以上を条件として組み合わせた.

現在までに251周期にICSIを施行し, 8例妊娠した. その内3例が流産となり, 現在5例が妊娠継続中である.

条件下における臨床成績について報告する.

教育講演

「睾丸性女性化症候群のアンドロゲン受容体遺伝子の点突然変異に関する検討」

○有馬隆博(九州大生体防御医学研)
(共同研究者: 松田貴雄, 和氣徳夫)

精巣性女性化症候群(T.F.)は46XYの男性核型を有するが, 表現型は全くの女性である伴性遺伝病である. その原因として, アンドロゲン受容体遺伝子の構造異常が指摘されている.

我々は, TF7症例のアンドロゲン受容体遺伝子について解析し, さらに家系調査を行い遺伝形式の解析を加えた. 方法としては, 症例の末梢血DNAを抽出し, 12セットのPCR産物を用い, SSCP法にて点突然変異をスクリーニングし, ジデオキシ法により塩基配列を決定した. また家系調査についてはドットプロット法にて解析を行った.

現在までに2症例の解析を行い, いずれもアンドロゲン受容体遺伝子のステロイド結合領域に点突然変異を認めた. また, 2症例ともアミノ酸の置換がアンドロゲンの結合活性を低下させ, T.F.の病態を引き起こしたものと推察された. さらに5症例について現在検討中である.

1994年日本不妊学会北陸支部学術総会

日 時：1994年6月25日(土)

会 場：金沢シティモンドホテル

1. 男子不妊症例におけるPentoxifyllineの効果

○横山豊明, 高峰利充, 風間泰蔵

布施秀樹, 片山 喬

(富山医科薬科大泌尿器)

Pentoxifyllineは、一般に末梢循環改善剤として用いられているが、精液中に添加することで精子の運動能を賦活化することが知られているが、今回我々は精子無力症患者にPentoxifyllineを経口投与し、その精液所見の変化を検討したので報告する。

1992年1月から1993年8月までの間に不妊を主訴に当院外来を受診した精子無力症患者11例、年齢は27歳から39歳。方法はPentoxifyllineを1日300mg、3ヶ月から6ヶ月間投与し、精子濃度、精子運動率、精子膨化率、Penetrak値、Velocity、Linearityについて比較検討した。

その結果、精子濃度、精子の膨化率、Linearityは前後で変化は認められなかったが、精子運動率、Penetrak値、Velocityは投与後に有意に改善していた。

Pentoxifylline経口投与による精子運動率の改善は、精液中に添加した場合と同じ機序によるものであるか、また精巣機能やその他の臓器に間接的に作用するものであるかは不明であり、その正確なメカニズムを明らかにすることが必要であろう。

2. 不良精子所見、男性小室を伴った尿道下裂の2例

○天野俊康, 國見一人, 李 秀雄

大川光央 (金沢大泌尿器)

布施春樹 (辰口芳珠記念病院泌尿器)

尿道下裂患者には、約1/4に男性小室の拡張が認められ、造精機能に関しても約半数が低下していると報告されている。今回、不良精子所見、男性小室の高度拡張を伴った尿道下裂の2例を経験したので報告する。

症例1は、22歳男性。主訴は外尿道口の開口異常。生後3ヶ月で右鼠径ヘルニアの手術を受け、その際右精巣欠損を指摘された。5歳時に索切除術、尿道形成術を受けた。排尿時膀胱尿道撮影にて拡張した男性小室を認めた。精液検査では、精子濃度 $1 \times 10^4/\text{ml}$ と高度乏精子症であった。前部尿道形成術および左精巣生検を施行した。精巣の生検所見は、精

細管内にわずかに精子を認めるのみで現在外来にて経過観察中である。

症例2は、29歳男性。主訴は右陰囊の腫脹。4歳時に索切除術、尿道形成術を受けた。排尿時膀胱尿道撮影にて拡張した男性小室を認めた。両側精巣上体尾部の硬結を認め、精液検査では無精子症であり両側精巣上体炎による通過障害を疑い、左精巣生検および両側精管精囊造影を施行した。精巣の生検所見は、精細管内に多数の精子を認めるが、精子形成を示さないものもあり、また末梢の精路通過障害は認められなかった。左精管-精巣上体吻合術を施行したが、精巣上体頭部で精子は確認できず、術後の精液検査でも精子なく、現在外来にて経過観察中である。

文献的に、男性小室を合併した尿道下裂患者は、胎生期における精巣機能不全の存在が示唆され、精子形成不全を生じやすいと推察された。さらに、尿道下裂では逆行性に尿路性器感染を起こしやすく、精巣上体炎などの精路通過障害にも留意する必要があると考えられた。

3. 精巣上体精子の運動パラメーター

○高塚亮三, 寺元章吉, 道倉康仁

加藤 修

(永遠幸マタニティクリニック)

風間泰蔵, 片山 喬

(富山医科薬科大泌尿器)

(目的) 哺乳類の精子形成において精巣からの精子は、精巣上体を通過する過程で成熟すると考えられている。従って精巣上体精子がどの程度の妊孕性を有しているかは議論の多いところである。本研究においては配偶子卵管内移植(GIFT)に用いた精巣上体精子と射精精子の運動パラメーターを比較し、精巣上体精子の運動様式について検討した。

(方法) 1992年10月から1994年4月までに実施した精巣上体精子を用いたGIFT17症例、17周期と1994年1月から4月までに実施した射精精子を用いたGIFT83症例、83周期を対象とした。精巣上体精子は顕微鏡下で手術的に吸引を行い採取した。精巣上体精子、射精精子ともミニパーコール法で処理後、直ちにcomputer aided sperm analysis (CASA)を行い、精子速度、直進性、amplitude of lateral head displacement (ALH)を測定した。

(結果) 平均精子速度が $60 \mu\text{m/s}$ 未満の症例の割合が精巣上体精子では全症例の23.5%に対し、射精精子では15.6%、 $80 \mu\text{m/s}$ 以上の症例の割合は精巣上体

精子では11.8%に対し射精精子では22.9%であった。一方精巣上体精子と射精精子には平均精子速度とALHに正の相関関係が成立した。他方射精精子には平均精子速度と直進性に負の相関関係があるが、精巣上体精子ではそのような相関関係が認められなかった。

(結論) 精巣上体精子の運動力学的挙動は射精精子とは異なる。特に低い精子速度の精巣上体精子は直進性も低く、滑るように泳ぐ低速度の射精精子とは区別する必要があると思われる。

4. Kallmann症候群の一例

○村上弘一, 佐川哲生, 平林はやと
瀬川智也, 金谷太郎, 荒木克己

(金沢大産婦)

Kallmann症候群は、嗅覚脱失ないし低下を伴う低ゴナドトロピン性性腺機能低下症である。男性症例の報告は、これまでに数多くなされているが、女性症例に関してはあまりなされていない。今回、Kallmann症候群と考えられた女性症例を経験したので報告する。

(症例) 19歳の女性(大学生)。主訴：原発性無月経。既往歴：生下時より外斜視を認め、6歳の時に外斜視手術をうけている。家族歴：特記すべきことなし。現病歴：小学3年生の頃より嗅覚の鈍いことの自覚あり。17歳の時に原発性無月経にて近医受診し、内服投与にて月経様出血を認めた。以後、無月経が持続するため当科を受診した。現症：身長165cm, 体重50kg, 左外斜視, 両側外転神経麻痺を認めるも顔貌の異常なし。乳房発育Tanner分類Ⅱ度。内・外性器の異常なし。嗅覚鈍麻あり。X線学的検査：CTおよびMRIにて下垂体および視床下部の腫瘍性病変なし。内分泌学的検査：LH<0.5 mIU/ml, FSH 1.1 mIU/ml, PRL 4.1 ng/ml, E₂ 16 pg/ml, T 15.5 ng/dl。LH-RH testにて無反応であったが、LH-RH (100 μg) 7日間筋注後に反応性の改善あり。PRL, TSH, GH, ACTHの分泌能は正常。プレマリンテストにて反応性なし。副腎および甲状腺機能の異常なし。耐糖能異常も認められなかった。染色体検査：46XX。HMG 150IU 7日間筋注にてもE₂の上昇を認めないため、卵巣生検を施行し、原始卵胞の存在を認めた。嗅覚検査：検知域値4.2, 認知域値5.4と著明な嗅力消失を認めた(正常域値1.3~1.5以下)。

以上より、視床下部性の異常による低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に嗅覚障害を伴った原発性無月経患者であり、Kallmann症候群と診断した。

5. 女性不妊患者における温経湯の治療効果 (特にclomiphene無効症例について)

○国部久也, 井浦俊彦, 桑原惣隆

(金沢医科大産婦)

(緒言) 無月経、挙児希望を訴え、外来を受診する患者には病因検索が行われ、個別化された治療が必要であり、様々な治療法が開発されている。この中でも漢方薬を用いた治療が注目され、妊娠率も10~15%と良好な成績が報告されている。今回当科外来を受診した挙児希望の患者で、第1度無月経や無排卵性周期症で高PRL血症が除外できた症例で、clomipheneを第1選択剤として使用するも治療に抵抗を示す患者20例に対して温経湯を併用し、若干の成績を得たので報告する。

(方法) 不妊を主訴とする排卵障害患者のうち、視床下部性無排卵周期症および第1度無月経でclomiphene 1日50 mg単独療法にて3周期以上排卵しないかまたは妊娠に至らない患者20例を対象とした。投与スケジュールは、月経または消退出血開始第1日目よりツムラ温経湯7.5gを投与し、周期5日目よりclomiphene 50 mg/日を5日間投与した。排卵については、基礎体温で高温相が10日以上続いたものを正常排卵周期と判定し、B-scopeによる卵胞の観察および尿中LHの測定を判定の際の参考とした。

(成績) 20症例72周期に温経湯-clomiphene併用療法を施行し、20症例中11例(55%)に排卵を認め、72周期中35周期(48.6%)に排卵がみとめられた。また本療法施行20例72周期中5例(25%)において妊娠が認められた。投与中に副作用など異常所見は1例も認めなかった。

(考察) 従来のhMG-hCG療法では、連日の通院を要し時には卵巣過剰刺激症候群の発生が問題となる。今回のclomiphene-温経湯併用療法においては副作用を認めず、併用により両薬剤の強調効果でgonadotropin分泌を促進し、排卵を誘発したものと考えられる。

(結論) clomiphene無効例での温経湯併用療法は、gonadotropin療法を行う前に試みてみるべき治療法と考えられる。

6. GnRHアナログを用いた体重減少性無排卵症の治療の可能性

○後藤健次, 小辻文和, 細川久美子

富永敏朗

(福井医科大産婦)

我々は体重減少ラットへのGnRHの連日投与が、

下垂体ゴナドトロピン (Gn) 含量および血中Gnレベルを上昇させるという実験結果に基づき、GnRHを用いた体重減少性無月経症の治療を行ってきた。近年、同症例に対するGnRHアナログ (GnRHa) を用いた治療報告も散見される。そこでGnRHaがGnRHと同様の作用をもつか否かを、体重減少ラットを用いて比較検討し、以下の結論を得た。

①血中Gnレベル：GnRH、GnRHa投与によりLH、FSHともに有意の増加を認めた。②下垂体Gn含量：GnRH投与群ではLH、FSHともに有意に増加したのに対し、GnRHa投与群では逆に両者の用量依存的減少が観察された。③下垂体ゴナドトロフ：GnRH投与後は細胞数の著明な増加と細胞の肥大を認めたのに対し、GnRHa投与群では両者の減少、縮小傾向を認めた。体重減少ラット下垂体前葉に対し、GnRHとGnRHaは異なる作用を発揮する。

体重減少性無月経症例に対するGnRHaの投与に際しては、慎重な配慮が必要であることが示唆された。

7. 卵巣過剰刺激症候群に対する低用量ドーパミン療法

○副田善勝, 長谷川 徹, 山口圭子
新居 隆, 泉 陸一

(富山医科薬科大産婦)

排卵誘発におけるゴナドトロピン療法の普及に伴い、卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) の発生が問題となっている。今回、重症OHSSに低用量ドーパミン療法が有用であった症例を経験したので報告する。

症例1は24歳の原発性不妊症。近医にてPCO-typeの無排卵性周期の診断。月経周期5日目よりHMG 150 IUを6日間筋注。14日目にHCG 5,000 IU注射。18日目に腹部膨満感の増悪、腹痛にて近医入院。補液開始。19日目腹水穿刺施行するも、腹水の増加、腹痛・嘔吐があり紹介となる。入院時超音波にて両側卵巣腫大と腹水を認めた。また、Ht 44.8%と血液濃縮を認めた。入院後、電解質輸液とアルブミン製剤の投与を開始したが、尿量の減少、腹水の増加、呼吸促進を認めた。ChestXPにて著明な胸水。また、PO2 71.3 mmHgと低下。以上より、ドーパミン (5 μ g/kg/min) 療法開始した。投与2日目より腹部膨満感、胸苦感の自覚症状が軽快した。また、尿量の増加、血液所見の改善、胸水・腹水の減少が認められた。

症例2は29歳の原発性不妊症。男性不妊の診断にて、IVF施行。周期1日目よりGn-RHa開始、3日目よりpFSH300IU \times 3 days, HMG225IU \times 8 days。15日目HCG10000IU筋注、16日目採卵。採卵卵数26、採

卵数11。SUZI施行。21日目嘔気、嘔吐出現し入院。超音波にて、両側卵巣腫大と腹水を認めた。また、Ht56.3%と血液濃縮を認めた。輸液療法開始。22日目にはHt44.4%と改善はみられたが、尿量の減少および腹水の増加を認めたため、ドーパミン療法 (5 μ g/kg/min) 開始。ドーパミン開始1日目より、腹部膨満感、嘔気、嘔吐の自覚症状軽快。尿量の増加、血液学的所見の改善、体重・腹水の減少が認められた。

重症卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) に対する低用量ドーパミン療法にて、臨床所見の改善が認められた症例を経験した。低用量ドーパミン療法は重症OHSSに有用な治療法であると思われる。

8. 初回腹腔鏡検査施行時にGIFTを行う意義についての検討

○小嶋康夫, 大口昭英, 佐竹紳一郎
舟本 寛, 中野 隆, 館野政也

(富山県立中央病院産婦)

近年腹腔鏡検査やGIFT、IVF-ETなどの配偶子・胚操作による不妊治療は不妊患者の診療において不可欠なものとなってきている。GIFTはIVF-ETに比べ手術室や腹腔鏡などの設備が必要であり患者負担も大きいため実施率が低い傾向にあるが、その一方で極めて高い妊娠率の報告もみられる。当院では1990年10月よりIVF-ET、GIFTを開始したが、最近では全身麻酔を必要とし患者負担の大きなdiagnostic laparoscopyとGIFTはなるべく同時に行うようにしている。今回、初回腹腔鏡検査施行時にGIFTを行った29例について検討を行ったので報告する。

対象は1990年10月より1994年3月までに初回腹腔鏡検査施行時にGIFTを行った29例 (平均年齢33.0歳) であり、うち16例 (55.2%) はmale factorを有していた。すべて長期不妊症例でありHSGで少なくとも片側の卵管が正常と思われる症例を対象とした。

卵巣刺激は原則としてGnRH agonist-hMG-hCGによるlong protocol法。採卵は当初腹腔鏡下に行ったが最近ではすべて経腔的に行っている。腹腔鏡所見では軽度の子宮内膜症9例、片側の卵管水腫または卵管閉塞2例、卵管周囲癒着2例を認めたが全ての症例でGIFT可能であった。臨床的妊娠を10例 (34.5%) に認め、分娩7例、妊娠継続3例であり現在まで流産は認めていない。妊娠に至った症例のうち7例はmale factorを有しており、なかには精子数 430×10^4 /ml、運動率20%のoligo-asthenozoospermia症例も含まれている。妊娠に至らなかった19例は引き続き治療を行っているが、これまでに2例が自然妊娠、

IVF-ETを施行した8例中3例が妊娠し、対象患者29例中15例(51.7%)が妊娠に至った。

9. 不妊症治療への赤外線腹腔鏡の導入—子宮内膜症の治療病変の評価

○根上 晃 (笠原病院産婦)
佐々木博正, 富永敏朗 (福井医科大産婦)

子宮内膜症はその発生や進展の機序が不明の疾患であり、月経困難症や不妊症の原因として注目されている。子宮内膜症の治療法は薬物療法や手術療法が行われるが再発例も多く治療方針も含め対応に苦慮する疾患のひとつである。子宮内膜症はその進行度分類(Re-AFS分類)によって分類されるが、付随する月経困難症や不妊症は進行度に一致しないことが多い。今回、組織深部透過性に優れた赤外線を光源に採用した新しい赤外線腹腔鏡を導入し、子宮内膜症病変の深部血管の分布を検討し病変の活動性や血管存在部位の選択的治療を試み、薬剤効果を評価した。

まとめ

- 1) 婦人科腹腔鏡に赤外線を光源とした新しい赤外線腹腔鏡を導入した。
- 2) 赤外線の深部透過性を利用し、病変の深部情報を得ることが可能になった。
- 3) 病変部の状態に左右されず正確に病変を評価できた。
- 4) 病変部の血管分布を観察することができた。
- 5) 病変の主要な血管、血管支配、分布を決定できた。
- 6) 薬剤投与の伝達理論の基礎が可能になった。
- 7) 薬剤投与の可否が決定できる。
- 8) 病変の治療の必要性が決定できた。
- 9) 病変の活動性が推測される。
- 10) 病変の血管分布や主要血管の決定から治療の選択性、方向性が新たに必要となり、子宮内膜症や骨盤内癒着病変にも適応できる新しい方法であると思われた。

第110回日本不妊学会関東地方部会

日 時：平成6年7月2日(土)
会 場：埼玉県民健康センター

1. 当院における最近4年間の不妊統計

○長沢 敢, 野島美知夫, 測脇泰介
山本 勉 (越谷市立病院産婦)

平成2年1月より平成5年12月までの4年間に当科不妊外来を受診した478例を集計し以下の成績を得た。

- 1) 原発性不妊は25～29歳、続発性不妊は30～34歳のものが多かった。
- 2) 不妊期間は原発性不妊は5年以上のもの、続発性不妊は2年以内のものが多かった。
- 3) 不妊因子は男性因子26.4%、卵管因子21.3%、排卵因子20.3%で機能性不妊は20.3%であった。
- 4) 妊娠率は32.0% (原発性不妊31.0%、続発性不妊33.3%)であった。
- 5) 1年以内の通院で妊娠に至ったものが妊娠成功例の約3/4を占めた。
- 6) 排卵誘発やAIMによる妊娠例が多かったが特別な治療なしに妊娠したものも多くみられた。
- 7) 妊娠症例の転帰は正期分娩54例、流産25例、外妊2例、胎状奇胎1例であった。

2. 1993年の当科における不妊症妊娠例の検討

○笠井 剛, 水野薫子, 奥野 隆
端 晶彦, 木下俊彦, 加藤順三
(山梨医科大産婦)

1993年の1年間に当科不妊外来を受診し、治療によって妊娠が確認された38症例について、妊娠に至るまでの期間を治療法、不妊因子から検討した。

38症例の不妊因子の内訳は、原因不明不妊症、排卵障害、卵管因子、男性因子などが挙げられた。治療方法としては、体外受精・胚移植によって妊娠した症例が14例、他の方法によって妊娠した症例が24例であった。平均不妊期間、治療期間、不妊期間+治療期間は体外受精群で有意に長かった。初診時から妊娠に至るまでの期間は、非体外受精群では、1年以内にその約70%が妊娠しており、2年以内にその約80%が妊娠し、3年以内にそのすべてが妊娠した。不妊因子別には、平均年齢、不妊期間、治療期間に有意差は認められなかった。非体外受精群では初診日より3年以内にすべてが妊娠していたことから治療期間が3年を越える場合、体外受精・胚移植を考慮してもよいことが示唆された。

3. 1992年不妊外来登録症例193例の予後調査

○齊藤正博, 須野敏章, 石原 理
竹田 省, 木下勝之
(埼玉医大総合医療センター産婦)

1992年当科不妊外来登録例の妊娠成功例の治療法, 未妊娠例の問題点を検討した。

(対象および方法) 1992年1月から12月までに不妊を主訴に当科を初診した193例の不妊原因, 治療法, 妊娠の有無および1994年3月までの通院状況を調査した。

(成績) 妊娠率は40.4%(通院1年目15.5%, 2年目24.9%), 治療継続中29%, drop out 30.6%であった。妊娠例の治療法は排卵誘発が1年目53.3%, 2年目66.7%であり, 特に, hMG療法が36.7%, 45.8%と高く認められた。また, AIH妊娠も1年目16.7%, 2年目27.1%であった。不妊原因を未妊娠例と1992年不妊登録者全例の比率と比較すると, 卵管因子, 子宮内膜症および男性因子が未妊娠例で多く認められた。

(結論) 不妊治療の長期化した症例にhMG療法やAIHは有用であった。また, Drop out症例の背景を検討しこれを減少させることが今後の課題の一つであると思われた。

4. 当院不育症外来における臨床統計

○根本泰子, 牧野恒久, 松林秀彦
小澤伸晃, 細川知俊, 染谷健一
野澤志朗 (慶応大産婦)

不育症は妊娠維持機構にかかわる未知の部分を経験し、その検査, 診断基準, 治療方針は未だ確立されたものばかりではないため, 当然ながら施設によって差異がある。

今回, 当院不育症外来で施行している一般検査について検討したので報告する。

子宮感染症検査陽性率は, クラミジア0.8%, 子宮腔内細菌8.7%であった。内分泌検査異常は, subclinicalなものが多いが, 甲状腺機能低下症4.1%, 甲状腺機能亢進症1.2%, 高プロラクチン血症15.1%, 糖尿病0.2%であった。子宮卵管造影による子宮腔内異常は22.1%で, このうち約50%が弓状子宮であった。染色体異常は, 妻5.8%, 夫3.9%に認められた。免疫学的検査陽性率では, 抗核抗体が22%, 抗カルジオリピン抗体が12.2%に認められた。

以上の結果をふまえ, 今後検査項目の見直しを行うとともに, 検査の評価に細心の注意を払いながら, 診断, 治療に役立てていきたい。

5. 流行性耳下腺炎 (mumps) 罹患による精子への悪影響を漢方薬“板藍根”により予防し得た1症例

○菅井正朝 (菅井クリニック)

“板藍根”は藍の根を乾燥した生薬で, 藍の葉である大青葉などとともに煎じて用いるが, 中国では顆粒状あるいは角砂糖に似た塊状のエキス剤として市販されている。グラム陰性, 陽性の細菌のほか, 多種類のウイルス感染症にも有効である。

症例: 平成4年5月より不妊加療中であった夫(26歳)が, 平成4年8月6日mumpsに罹患, 高熱が続き8月10日に精巣痛を訴えた。8月12日板藍根の顆粒状エキス12g×10包を投与, 2日ばかりで発熱, 精巣痛は消退した。精液検査値は下記の通りである。

	精子濃度	運動	直進
発病前	35×10 ⁶ /ml	90%	1/2
平成4年9月5日	10×10 ⁶ /ml	80%	1/2
11月5日	20×10 ⁶ /ml	65%	1/3
12月5日	40×10 ⁶ /ml	80%	2/3
平成5年12月11日	50×10 ⁶ /ml	90%	2/3

罹病による影響は約4ヵ月で回復した。

6. 男子不妊症の検討—精巣容積からの検討—

○内島 豊, 吉田謙一郎, 小林信幸
遠坂 顕, 竹内信一, 齊藤 博
(埼玉医大総合医療センター泌尿器)

1985年6月から1993年12月の8年6ヵ月の間に埼玉医科大学総合医療センターの不妊外来を受診した不妊主訴患者461例の中で不妊期間が1年未満の44症例を除く417例について検討し, 以下の結果を得た。

1) 右精巣容積は左精巣容積より有意に大きい容積を示した。2) 精巣容積は精索静脈瘤を合併する症例の方が, 左右の精巣容積の差が大きい傾向を示した。3) 精索静脈瘤の程度による精巣容積の差は認められなかった。4) 精子運動率と精巣容積の間には有意の相関は認められなかった。5) 精子濃度が増加するにつれて精巣容積は有意に増加を示した。6) 精巣容積が30ml以下の症例からFSH値が高値を示す症例が増加し, 精巣容積が10ml以下の症例では全例がFSH高値を示した。7) 精巣容積が20ml以下の症例からLH値が高値を示す症例が増加し, 精巣容積が10ml以下の症例では全例がLH高値を示した。8) 精巣容積が大きい症例の中にもFSH値あるいはLH値が低値を示す症例を認めた。

7. 男子不妊症における無精子症の多様性について

○遠坂 顕, 吉田謙一郎, 小林信幸
竹内信一, 内島 豊, 斉藤 博
(埼玉医大総合医療センター泌尿器)

1985年6月から1993年12月までの期間に, 男子不妊症を主訴に当科を受診した患者は456人(結婚後1年未満の者を含む)で, そのうち68人(15%)に無精子症を認めた.

原因は1) 精巣の異常44人(65%), 2) 精路の異常13人(19%), 3) 逆行性射精5人(7%), 4) 染色体および遺伝子の異常4人(6%), 5) 下垂体性性腺不全2人(3%)であった.

精巣の異常の4人は, 両側停留精巣によるもので, 残る40人は原因不明の不妊精巣と考えられた. このうち31人に精巣生検を施行し, 7人にmaturation arrest (A), 15人にSertoli cell only (B), 1人に硝子化精巣の組織像(C)を認めた. 残る8人はこれらの組織像が様々に混合した像を呈し, (A)+(B)を5人, (B)+(C)を2人, (A)+(B)+(C)を1人に認めた. これら不妊精巣の治療としてホルモン療法を22人に施行し, 6人は精液中に精子が出現, 1人は出産に至った.

無精子症であっても適切な治療を行えばassisted reproductive technologyの対象になり得るものと期待された.

8. Sperm Check Assayによる抗精子抗体検出について

○石田徳人, 近藤俊彦, 松本一彦
大野祐子, 斉藤寿一郎, 渡辺潤一郎
工藤芳子, 阿部有子, 石塚文平
雨宮 章 (聖マリアンナ医大産婦)

(目的) Sperm Check Assay (SC) による抗精子抗体検出を検討するため, 蛍光抗体法に対し, SCを精子不動化試験, ELISAと比較した.

(方法) 48組の夫婦に行い, direct SCは運動精子が $2 \times 10^7/\text{ml}$ 以上に調整後, latex beads (LB) を混合し, 運動精子を対象に, LBの付着率と部位を顕微鏡で観察した. indirect SCは被検血清中の抗精子抗体をコントロール精子に付着させ観察した. LB付着率が17%以上を陽性と判定. ELISA法はAlkaline phosphataseを用い, 75U/ml以上を陽性とした. 精子不動化試験はSIV値2.0以上を陽性, 蛍光抗体法はYoungの方法を用い20%以上を陽性とした.

(結果) 蛍光抗体法に対する感受性は各々, direct

SC 100%, indirect SC 100%, ELISA法0%, 精子不動化試験55.5%だった. SC陰性例の蛍光抗体法は14%以下だった.

(結論) SCは, 比較的操作が簡易であり, 蛍光抗体法をスタンダードとすると, 感受性に優れていることが示された.

9. human testisにおけるインヒビン染色

○小澤聖史, 水沼英樹, 伊吹令人
(群馬大産婦)
長谷川喜久 (北里大獣医畜産実験動物)

(目的) 今回我々は免疫組織化学の手法を用いヒト精巣におけるインヒビン染色性について検討した.

(方法) 組織は当大学において乏精子症または無精子症と診断された男性不妊症患者の精巣組織検査に採取された精巣を用いた. 精巣の使用に際しては本人に十分な説明後承諾を得て使用した. 摘出精巣は直ちにブアン固定液にて固定した. 固定後の組織は脱水後パラフィンに包埋しマイクロームにて $4 \mu\text{m}$ の切片とした. スライス後の切片は脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止のため0.3%過酸化水素処理, 非特異染色を防止するため正常血清による処理を施行した. 染色の1次抗体はウシのインヒビンをマウスに免疫して作成したインヒビンベータサブユニットに対するモノクローナル抗体と精製したウシインヒビンをヤギで免疫し作成したインヒビンアルファサブユニットに対するポリクローナル抗体を使用した.

(結果) 今回我々の染色において乏精子症または無精子症, 両方においてもライディッヒ細胞とセルトリ細胞両方の細胞のインヒビン染色性が見られた.

(結論) 精巣におけるインヒビンの染色性は諸家から様々な報告がなされているが今回の実験で我々はセルトリ細胞とライディッヒ細胞両方にインヒビン染色性があることを示した.

10. GnRH agonist投与マウスにおける下垂体 Interleukin-6 産生の動態に関する検討

○今泉英司, 牧村紀子, 平田純子
古谷健一, 菊池義公, 永田一郎
(防衛医大産婦)

近年, 下垂体ではInterleukin (IL)-6などのcytokineが産生されており, 下垂体前葉hormone産生の調整に関与していることが報告されている. 今回我々は, マウスにGnRH agonist (GnRHa) を投与し, ELISA法を

用い下垂体IL-6産生について検討を行った。

8週齢ICRマウスにコントロール群として生食を連日皮下注射し、GnRHa処置群としてbusserelin acetateを連日皮下注射した。処置終了後、断首したマウスから下垂体を摘出し、10%FCS含有RPMI-1640培養液で組織培養し、培養上清中のマウスIL-6をELISA法で測定した。8週齢ICRマウスにbusserelinを連日皮下投与すると、子宮重量は減少し、卵巣では発育卵胞の障害がみられた。マウスの下垂体IL-6量は24時間まで増加し、busserelin投与により下垂体IL-6量は減少した。

以上より、GnRHaが下垂体IL-6産生の調整に関与している可能性が示唆された。

11. 無月経を伴ったPCOに於けるlow dose gonadotropin療法の有用性 (同一症例による検討)

○山田悦郎, Josie Baral, 岩城妙子
井坂恵一, 高山雅臣 (東京医大産婦)

無月経を伴った、クロミフェン、プロモクリプチンにて排卵しなかった、PCO、4症例に於て、OHSS発症既往後、low dose gonadotropin療法にて、OHSS発症せず、排卵や妊娠成立となったケースを経験したので報告する。

GnRHa long protocol併用にてlow dose gonadotropin療法で、7周期中全例に排卵を確認。一例は、short protocolのGnRHa併用療法により妊娠となったが、品胎となった。gonadotropinの1日投与量は、排卵率の向上や、OHSS予防に影響し、GnRHa long protocol併用は、発育卵胞数を抑え、排卵率を高めることが示唆された。

12. 卵巣過剰刺激症候群に対する低用量ドーパミン療法の効果 (第2報)

○新家 秀, 松本和紀, 小田原靖
遠藤尚江, 楠原浩二, 寺島芳輝
(東京慈恵会医大産婦)

卵巣過剰刺激症候群は、重症例では、腹水、胸水をきたし、血清電解質のアンバランスや循環血液量の減少に伴う血液濃縮、さらには血液凝固障害まで起こす重篤な病態を呈する。一方でその病態生理は未だ解明されておらず、それぞれの症状に対して対症的に治療が行われているのが現状である。我々は近年注目されている低用量ドーパミン療法の有用性を検討するため、従来の補液療法と低用量ドーパミン療法を比較検討した。

対象および方法：従来の補充療法のみを行った症例群4例と、低用量ドーパミン療法を施行した症例群9例を比較検討した。いずれの症例もアルブミン製剤を使用せず、非妊娠周期であった。

結果：入院日数、入院後体重、入院後腹囲については両群間に有意な差は認められなかった。治療開始後尿量はドーパミン投与群では開始直後より1000 ml/dayを確保したが、非投与群では1000 ml/day確保するのに数日を要した。また入院後平均血圧は非投与群で一過性に20 mmHg前後の上昇を認めたが、投与群ではその上昇が認められなかった。ヘマトクリット、血清総蛋白は非投与群では、一過性に低下する傾向が認められたが、投与群では早期に正常範囲内に改善する傾向が認められた。

まとめ：低用量ドーパミンを使用することによって、生理的に尿量を確保することができ、かつ血液濃縮、低蛋白血症を早期に改善することができることが示唆された。

13. 不妊症治療における子宮外妊娠のMTX療法の意義

○吉永明里, 小山典宏, 荻部正隆
山田春彦, 神野正雄, 吉村泰典
中村幸雄 (杏林大産婦)

(目的) 近年、高感度hCG測定法や経膈超音波法の進歩により、子宮外妊娠の早期発見、早期治療が可能である。卵管妊娠における代表的な薬物療法であるMTX療法は、卵管機能を温存し妊孕性を保持するという利点がある。そこで今回、当科における頸管妊娠を含めた子宮外妊娠におけるMTX療法の有用性や、妊孕性につき検討した。

(対象・方法) 平成3年1月より平成6年5月までに、当科において薬物療法を施行した16例を調査の対象とした。薬物療法は、MTX 20mg/day、5日間連日筋注法を第一選択とした。

(結果・結論) 未破裂子宮外妊娠16例に対してMTXによる薬物療法を施行し、15例において手術を回避し得た。治療経過中、MTXによる重篤な副作用は認めなかった。MTX療法は、一部症例において卵管疎通性が認められたが(2/11)、IVFに移行する症例(8/11)が効率を占めた。

14. Fitz-Hugh-Curtis症候群における卵管不妊因子の検討

○阿久津聡, 中野義宏, 豊成由佳
淡路正則, 武内裕之, 三橋直樹
桑原慶紀 (順天堂大産婦)

Fitz-Hugh-Curtis症候群 (FHCS) は最近ではChlamydia trachomatis (CT) 感染を原因とするSTDのひとつと考えられている。今回、FHCSと診断された24例について卵管不妊因子を中心に検討した。

腹腔鏡検査の適応は、不妊・PID・子宮外妊娠などであった。不妊症の適応で腹腔鏡を行った107例のうちFHCSと診断されたものは15例(14.0%)であった。FHCSと診断された症例をPID群と不妊・子宮外妊娠群とに分けてみると、CT抗原は前者で高頻度に検出されたが、後者では検出されないことが多かった。従って、CT感染の急性期がPIDであり慢性期が不妊症や子宮外妊娠という病態を示すものと考えられた。付属器の癒着をAFSの分類に従ってみると平均値は11.19±7.39で、severeの例はなかった。しかし不妊症の症例15例のうち11例73.3% (計26卵管中17卵管65.4%)と高頻度に卵管の通過障害が認められた。さらに付属器周囲の癒着は通過障害のある方が強い傾向があった。

15. 不妊患者における子宮内膜症の有無とLAPAROSCOPY施行後の妊娠率との関係

東京大学医学部産科婦人科学教室

○丸山正統, 金子 實
(東京厚生年金病院産婦人科)
森田 豊, 藤原敏博, 大須賀穰
国府田きよ子, 林 直樹, 矢野 哲
堤 治, 武谷雄二

(目的) laparoscopy施行例について内膜症の有無で妊娠率を比較し、内膜症に特徴的な不妊因子が存在するかどうかを検討した。

(対象) 当科でlaparoscopyを施行した不妊患者88例を対象にした。内膜症群42例でr・AFSで、I期16例、II期2例、III期12例、IV期12例であった。非内膜症群46例あった。IVFによる妊娠例以外は絶対的な卵管性不妊と高度男性因子を認めなかった。

(結果) laparoscopy後、内膜症群は42例中12例(28.6%)に、非内膜症群は46例中17例(37.0%)が妊娠した。両群からIVF-ET施行例を除外すると、妊娠は内膜症群、29例中8例(27.6%)、非内膜症群、29例中11例(37.9%)にみられた。laparoscopy後IVF-ET以外の

妊娠はほとんどが1年以内であった。またIVF-ETによる妊娠率は両者に差はなかった。

(結論) 内膜症に特徴的な不妊因子が存在するとは認めがたかった。

16. IVF-ETにおける卵胞液中グルコース濃度の検討

○島内昌仁, 堤 治, 森田 豊
藤原敏博, 林 直樹, 武谷雄二
(東京大産婦)
本藤 徹, 菅生元康 (長野赤十字病院)

卵の成熟と卵胞液中のグルコース濃度の関係を検討した。

対象は、IVF-ET症例の7症例8周期(67卵胞48卵)である。年齢は36±2.8歳。卵巣刺激法はすべてショートプロトコル法で、HMG投与を開始し、HCG投与後、約34時間で卵胞を穿刺して卵と卵胞液を採取した。卵胞液は液量とグルコース濃度を測定し、卵の成熟度はgrade IからVに分類した。卵のgradeと卵胞液量には相関があり($r=0.42$)、grade Iでは4.1±1.8 ml、grade IIでは2.6±1.1 ml、grade IIIでは2.5±0.7 mlであった。卵のgradeとglucose濃度には相関があり、grade Iでは83.5±17.8 mg/dl、grade IIでは98.6±13.5 mg/dl、grade IIIでは91.5±13.8 mg/dlで、前者と後2者の間には有意な差を認めた($P<0.02$)。卵胞液量とglucose濃度には負の相関を認めた($r=0.6$)。

卵胞液中グルコース濃度は卵の成熟に関係することが示唆された。

17. IVF-ETによる14qトリソミーの一例

○須野敏章, 斉藤正博, 石原 理
竹田 省, 木下勝之
(埼玉医大総合医療センター産婦)
福岡義光
(埼玉県立小児医療センター遺伝)

体外受精による妊娠例から出生した児の奇が、体外受精との因果関係を有するかは不明である。しかし児の染色体異常の原因の一つは両親の染色体異常である。今回体外受精後出生した児が、父の染色体転座に起因する14qトリソミーであったので報告し、不妊症例の染色体検査の必要性を考察する。

症例は31歳、1G0P、不妊症診断はPCO、男性因子。体外受精後妊娠38週2日で出生し、1996g女児。顔貌の異常、短頭、大泉門の開大、大動脈弁狭窄などを認めた。父に4番と14番の均衡転座を認め、児は14qトリソミーと診断した。本例では体外受精に

よる妊娠と染色体異常は無関係で、今後体外受精施行前に両親の染色体検査が望ましいことを示唆した。

原因不明の不妊症や長期不妊症症例の治療時も染色体検査は習慣性流産症例と同様有意義と思われる。

18. 卵巣刺激法と卵のqualityに関する検討

○森田哲夫, 田村彰浩, 飯野好明

大川亮一, 森 宏之 (帝京大産婦)

(目的) 体外受精・胚移植法で高齢者に対し有効と思われる卵巣刺激法について検討した。

(対象) 35歳未満の14症例, 23周期をコントロールとし, 40歳以上の8症例, 17周期を対象とした。

(結果) 40歳以上の症例では35歳未満に比べ排卵数, 胚移植数において低下傾向を認めたが, 妊娠率は症例あたり37.5%, ETあたり17.6%と良好な結果を得た。採卵時得られた卵のqualityは35歳未満の群でも40歳以上の群でもあまり差は認められなかったが, 両群においてBuserelin (short protocol) + pFSH + hMG + hCG法を用いた卵巣刺激法ではBuserelin (short protocol) + hMG + hCG法よりも良好な卵が多く得られた。

(結論) 高齢者の体外受精・胚移植法においては採卵数, 胚移植数は少ないが, qualityの高い卵を採取し, 受精卵を移植することにより妊娠率の向上へとつながると思われる。その際に卵巣刺激法のpFSHを用いることは有効であった。

19. 新方式採卵培養システムによるIVFの当院における検討

○小埜 清, 常磐佳代子, 高田たか子

(小埜医院)

郡山 智, 兼子 智

(東京歯科大市川病院産婦)

対木 章

(国立水戸病院)

(目的) IVF-ETにおける採卵, 培養操作の簡易化および省スペース, 省人化を目的とした卵操作チャンパー, 採卵用カラム管, 培養用密閉ボトルおよび小型恒温培養槽を小施設にて使用し, 充分な操作, 成果を得ることができるかどうかを検討した。

(方法) アクリルフード内に実体顕微鏡を設置卵操作チャンパー内は電子制御にて37℃に保温, ガスセンサー制御下に5% CO₂-Airとし, 採卵時穿刺した卵胞内内容物はチャンパー内に設置したカラム管内に一括して吸引, 静置した。卵子をカラム底部に沈澱

させた後底部コックより回収し, 鏡検, 観察した。

(結果) 採卵卵胞からの卵子回収率はほぼ98%, 平均卵子分割率は64%, 良好胚発達は52%であった。26症例中14症例は精子無力症, 精子減少例で良好卵子分割率は25%だった。

(考察) 本研究で使用した採卵一培養システムは卵・胚操作の簡易化を可能とし, 小施設におけるIVF-ETに有用。

20. POST (腹腔内卵子精子移植) についての症例検討

○小埜 清

(小埜医院)

兼子 智 (東京歯科大市川総合病院)

(目的) 精子の進入経路より順行性, 逆行性と考えた場合, 前者を利用した例としては, AIH (IUI), HITがある。後者の例は, DIPI (直接腹腔内授精), DIFI (直接卵胞内授精), POST (腹腔内卵子精子移植) である。前回のDIFIの報告より, 妊娠例が卵胞内精子注入後, 24~12時間で卵胞破裂, 消失した症例であったことより, 積極的に穿刺-破裂を加えた, いわゆる人工的排卵-DIFI方式を利用したPOSTを施行し検討した。

(方法) 施行した14症例は重症~中等度の卵管通過障害を有しない例で, 排卵誘発はLH-RH-Agonistを使用してIVFの方法に準じた。

(結果) 14症例中2例の妊娠成立をみた。

(考察) リピーターの症例がなく, 症例数も100を越えないため, 真の比較はできないが諸外国の妊娠率30~40%という報告には全く及ばなかった。今後の検討を要する。

21. レーザー顕微授精の有用性と問題点

○小池俊光, 荒木重雄, 出居貞義

真中千明, 佐藤郁夫 (自治医大産婦)

荒木康久, 本山光博

(先端医研中央クリニック)

重度男性不妊症例を対象に, レーザーを用いたPZDを行い良好な成績を得ましたので報告する。使用したレーザーは非接触型のナイトロジェンレーザーで, 排卵誘発法はGnRH-a, pure FSH, HMGを用いたロングプロトコールで行った。レーザー処理はレーザー光源を装着したカールツァイスのアクシオバート倒立顕微鏡を使用し, レーザービームを接線方向から照射し直径5 μ mの裂孔を透明帯に開窓した。

結果: 対象は反復IVFで受精に至らない症例および運動精子濃度200万/ml以下の重度男性不妊症30例

で、平均採卵数は9.5個であった。30例のうち、17例(57.1%)で胚移植が可能であり、また、妊娠例は5例で、採卵あたりの妊娠率は16.7%、移植当たりの妊娠率は29.4%であった。

レーザーを用いたPZDは簡単に再現性も高いが、器具が高価で、DNA、蛋白等への影響が充分解明されていない点が問題であり、今後の検討を要する。

特別講演

「体外受精からみた着床の問題点」

神崎秀陽(京都大学産婦)

不妊診療において解明が最も遅れている領域は、いわゆる「着床不全」の診断と治療であり、体外受精・胚移植治療によっても、着床はblack boxとなっている。我々の施設で形態良好胚を移植した症例を解析してみると、採卵後の移植日が4日目以降では、急激に妊娠率が低下し、また良好胚の移植を3回以上繰り返しても妊娠に至らなかった婦人では、その

後の治療周期でもほとんど成功していない。そして各種パラメーターの解析でも、この着床不全例の原因は、従来の検査法からは同定できなかった。これは体外胚培養の限界を示すと共に、着床には子宮内膜の分化と胚発育の両者が適正に進行することが必須であること、また内膜に原因のある着床不全という病態の存在することを示唆している。各種発育段階のマウス受精卵を偽妊娠各時期の子宮へ移植した実験成績からも、適正な子宮内膜分化と胚発育の両者が整って始めて着床が成立することが示されている。最近、子宮内膜より分泌される各種のサイトカインが、性ステロイドホルモンとネットワークを形成してparacrine/autocrineに内膜の分化を制御し、またさらに、着床期胚の発育にも影響していることが知られてきた。内膜機能評価と着床不全の病態解明を目指した、子宮内膜におけるサイトカインの研究が、ヒトにおける“implantation window”を明らかとし、子宮内膜に起因する着床不全の治療への手掛かりを与えることが期待される。

関連学会のお知らせ

第36回 哺乳動物卵子学会

下記により第36回哺乳動物卵子学会および総会を開催します。多数の会員の参加をお願い致します。
記

I. 期日：1995年5月18日(木), 19日(金)

II. 会場：仙台サンプラザ3階 クリスタルルーム
〒980 仙台市宮城野区^{フツジガオカ}榴岡5丁目11-1
電話：022(257)3333

III. 内容：特別講演：「マウス毛色形成と初期発生にかかわる遺伝子の分子機構」
東北大学名誉教授 竹内拓司(クラスター・コア・日本遺伝子研究所)
教育講演：「生殖細胞の起源とその特異性の維持機構」
東北大学教授 松居靖久(東北大学・加齢医学研究所)
ワークショップ：「哺乳動物卵子の体外取扱い法の問題点—体外培養系を中心に」
一般講演

講演申込の締切は1995年1月28日(土)必着

演題の申込は、葉書に演題名(和文および英文)、発表者名および共同研究者名(ローマ字)を記入のうえ、下記宛にお送り下さい。折り返し発表内容を掲載する原稿用紙をお送り致します。講演要旨はオフセット印刷し、哺乳動物卵子学会誌12巻1号に掲載します。講演は会員1人1題、講演時間1題7分、討論時間3分で、プロジェクター1台を使用します。

講演原稿の締切は1995年2月28日(火)必着とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室内

電話：0466-81-6241(内線2125)

哺乳動物卵子学会事務局 遠藤 克宛

IV. 事前申込：参加費 5000円(当日6000円)と懇親会費5000円(当日6000円)を前納できます。

V. 総会：5月19日(金)13:15~13:45

仙台サンプラザ3階 クリスタルルーム

懇親会：5月18日(木)講演終了後、仙台サンプラザ3階 宮城野で開催致します。

大会事務局：〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

東北大学農学部動物生殖科学講座内 第36回哺乳動物卵子学会大会事務局

電話：022(272)4321(内線231) Fax：022(272)1870

幹事 梅津元昭

当大会では日本産科婦人科学会の認定シールが発行される予定です。

第36回哺乳動物卵子学会

大会長 菅原七郎

第12回世界性科学学会

下記により第12回世界性科学学会を開催します。多数の先生方のご参加をお待ち申し上げます。

I. 期日：1995年8月12日(土)～16日(水)

II. 会場：パシフィコ横浜

〒220 横浜市西区みなとみらい1-1

電話：045(221)2121

III. 主催：第12回世界性科学学会組織委員会

財団法人 地域医学研究基金

日本思春期学会

日本インポテンス学会

社団法人 日本家族計画協会

財団法人 日本性教育協会

日本セックスカウンセラーセラピスト協会

IV. 内容：会長講演：「セクシュアリティと人間の絆」 松本清一(第12回世界性科学学会会長)

特別講演：John Money(アメリカジョーンズホプキンス大学)

Debra Haffner(アメリカSIECUS常務理事)

中込弥男(東京大学医学部人類遺伝学)

シンポジウム：「インポテンス研究における最近の進歩」

「十代の妊娠と中絶」

「セクシュアリティと性的障害」

「最近の性治療」

「性行動」

「子どもの性的虐待」

「HIV・AIDS・STD」

「セクシュアリティと看護」

「避妊と家族計画」 他

一般演題：29のトピックスについて一般演題を募集します。

講演申込の締切は1995年2月28日(火)です。

演題申込要項を含むサーキュラーを下記学会事務局宛にご請求下さい。

(お問合せ、サーキュラー請求先) 〒101 東京都千代田区神田神保町1-3 ミヤタビル2階

財団法人日本性教育協会事務局(JASE)

TEL：03-3291-7726

FAX：03-3291-6238

第12回世界性科学学会	会 長	松 本 清 一
	副会長	白 井 将 文
		高 石 昌 弘
		武 田 昌 敏
		野 末 源 一
		間 宮 武

第100回日本医学会シンポジウム

1994年8月26日～28日に「新薬と評価」をテーマに、パレスホテル箱根で開催された。

本シンポジウムに関しては、野々村禎昭，上田慶二，佐々木弥生の3氏によるシンポジウム組織委員でプログラムの編成が行われた。

プログラムは、Ⅰ. 新薬の評価—基礎的側面—，Ⅱ. 臨床治験のあり方，Ⅲ. 国際協調よりみた新薬評価，の3セッションから構成され，時宜を得たテーマとして，活発な議論が展開された(参加者総数45名)。

第101回日本医学会シンポジウム

「シナプスの可塑性と高次脳機能」が，1994年12月15日(木，10:00～17:15)に日本医師会館大講堂で開催される。

本シンポジウムの組織委員は，津本忠治，黒田洋一郎，酒田英夫の3氏からなる。参加希望者は，日本医学会に葉書で申し込またい。参加費は無料。

プログラムの概要は，下記のとおりである。

Ⅰ. 脳の発達とシナプス可塑性

1. 大脳皮質層形成の分子機構／小川正晴(高知医大・生理学) 2. 視覚野の層構造の形成機序／外山敬介(京都府立医大・生理学) 3. 大脳皮質コラムと可塑性シナプス／津本忠治(大阪大バイオメディカル教育研究センター・高次神経医学)

Ⅱ. 記憶・学習とシナプスの可塑性

4. 海馬シナプスの長期増強およびその消去のメカニズム／加藤宏司(山形大・生理学) 5. 小脳長期抑圧の生理学的意義とその分子メカニズム／渋谷克栄(新潟大脳研・神経生理学) 6. ニューロン回路網の可塑性とシナプスの形態変化／黒田洋一郎(都神経科学総合研・神経生化学)

Ⅲ. 高次脳機能の最近の進歩

7. 大脳連合野における視覚認知の機能分化／酒田英夫(日本大・生理学) 8. 視覚連合野における知覚と記憶の統合メカニズム／酒井邦嘉・宮下保司(東京大・生理学) 9. 海馬体における空間記憶のニューロン機構／小野武年(富山医薬大・生理学)

新規加盟学会審査制度検討委員会

1993年度に発足した標記委員会の目的は，分科会の新規加盟審査のあり方を見直すことにある。日本医学会の動向が多方面から注目されている現在の状況を考慮しながら，できるだけ広い視野からの検討を行っている。

医学会と薬業界等との連携に関する検討委員会

第2回標記委員会が，1994年7月25日に開催された。今回は，薬業界からオブザーバーを招き，「医薬品の臨床試験の依頼に係わる研究費等の取扱いに関する綱領」の説明を伺い，それをもとに種々意見を交換した。

認定医制についての三者懇談会

1994年7月29日に，第17回認定医制についての三者懇談会が開催された。長年にわたって検討されてきた「認定医公認」がようやく実現することになり，承認対象の13学会の認定医を学会認定医制協議会議長，日本医学会長，日本医師会長の三者連名のもとに1994年4月1日付で承認することになった。これに従い，9月以降に学会認定医制協議会事務局から「承認通知書」，「承認通知書送付にあたっての添書」，「承認シール」が13学会に送付され，有資格者に配付される手順となる。

承認対象の13学会は，次のとおりである。内科，小児科，皮膚科，外科，整形外科，産科婦人科，耳鼻咽喉科，眼科，泌尿器科，麻酔，医学放射線，病理，臨床病理。なお，精神神経学会は学会認定医制協議会でいう基本的領域診療科に含まれているが，認定医制度を実施していないので当面は対象にならない。

医学賞・医学研究助成費授賞の決定

医学賞・医学研究助成費選考委員会は，日本医師会から本会に委託されており，本年度は9月12日に開催された。授賞は，日本医師会設立記念医学大会(11月1日)において行われる。

日本医師会医学賞は，22件から下記の3名を選考し，日本医師会に推薦した(敬称略)。

基礎部門：北村幸彦(大阪大・病理学)「マスト細胞の分化・生存・癌化の制御機構」

臨床部門：井形昭弘(国立療養所中部病院・内科学)「難治性神経疾患の解明—SMONからHAMへ—」, 宇都宮讓二(兵庫医大・外科学)「機能温存的大腸全摘術の研究—J型回腸囊肛門吻合術の確立—」

また日本医師会医学研究助成費は、86件中、次の16件を選考した。

基礎部門：「筋細胞における機能的収縮構造構築の機構とダイナミクスに関する分子細胞生物学的研究」嶋田 裕(千葉大・解剖学), 「遺伝子標的組込みによる疾患モデルマウス作製系の確立」島田和典(大阪大微生物病研・生化学), 「抗不整脈薬の有効性を判定する動物モデル不整脈の開発」橋本敬太郎(山梨医大・薬理学), 「癌免疫における癌拒絶抗原としての熱ショック蛋白質の研究」佐藤昇志(札幌医大・腫瘍免疫学), 「虚血性心疾患の発生・進展におけるサイトカインの役割に関する基礎的・臨床的研究」下川宏明(九州大・内科学)

社会部門：「久山町の地域住民における老年期痴呆の有病率および発症率の疫学調査」藤島正敏(九州大・内科学)

臨床部門：「イオンチャネルの制御による血管平滑筋細胞の増殖コントロール法の確立」小島 至(群馬大・内科学), 「アルツハイマー病脳における β 蛋白分子種のELISAおよびマスマスペクトロメトリーによる検討」玉岡 晃(筑波大・内科学), 「アルツハイマー病におけるイノシトールリン脂質代謝異常の分子生物学的研究」下濱 俊(京都大・内科学), 「癌の放射線治療効果と種々の癌関連遺伝子発現に関する免疫組織化学的検討」小川恭弘(高知医大・内科学), 「眼皮膚白皮症の原因となるチロジナーゼ遺伝子の変異についての研究」富田 靖(秋田大・皮膚科学), 「ヒト生理活性物質のみから構成される新しい治療薬の開発」上田政和(慶應大・外科学), 「パーキンソン病に対する星状神経節移植術が認知機能に及ぼす影響について」前島伸一郎(和歌山医大・リハビリテーション医学), 「加齢による性機能低下の実態およびその中枢性要因に関する検討」佐藤嘉一(札幌医大・泌尿器科学), 「脊髄におけるプロスタグランジンの痛覚に及ぼす影響」南 敏明(大阪医大・麻酔学), 「細胞傷害性遺伝子を用いた上皮性卵巣癌に対する遺伝子治療の基礎的臨床的検討」田中憲一(新潟大・産科婦人科学).

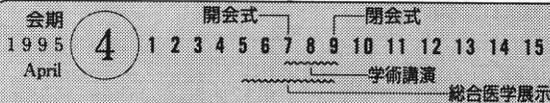


第24回 日本医学会総会 1995 名古屋

名古屋総会広報

No.5

THE 24TH GENERAL ASSEMBLY OF THE JAPAN MEDICAL CONGRESS 1995 NAGOYA



開会・閉会講演者

開会講演 中村元氏

インド哲学、仏教学：東方研究会理事長：東方学院院長
東京大学名誉教授：日本学士院会員

「古代インドの生命観 —アーユルヴェーダへの道」

東京大学教授、文学部長を経て東方学院を開校。平成6年、125年振りに復活した足利学校の24代座主となる。著書に「初期ヴェーダーンタ哲学史」「東洋人の思惟方法」「中村元選集(インド史、ゴータマ・ブッダ、原始仏教の思想など)」「仏教語大辞典」などがある。日本学士院恩賜賞、紫綬褒章、毎日出版文化賞特別賞、文化勲章、勲一等瑞宝章、日本翻訳文化賞など数々を受賞。

閉会講演 大江健三郎氏

小説家、評論家
芥川賞選考委員：日本文芸家協会理事：日本ペンクラブ副会長

「癒される者として」

東京大学文学部仏文学科卒。「死者の奢り」で脚光を浴び、「飼育」で芥川賞受賞、「万延元年のフットボール」で谷崎潤一郎賞、「洪水はわが魂に及び」で野間文芸賞、「河馬に噛まれる」で川端康成文学賞など多数受賞。昨年、森と再生をめぐる三部作「燃えあがる緑の木」の執筆に取り組む。世界的に普通の文学を作ってきたことが評価され、平成8年ノーベル文学賞受賞。

海外からの招待講演者

Luc Montagnier
(パスツール研究所：フランス)
「エイズの現状と将来」

Claudio Bordignon
(ラファエロ研究所：イタリア)
「遺伝子治療の現状と将来」

Robert N. Butler
(国際長寿社会リサーチセンター所長：アメリカ)
「加齢と疾患」

Bruce A. Reitz
(スタンフォード大学：アメリカ)
「世界における心肺移植の現況」

Arnold Nicogossian
(NASA：アメリカ)
「宇宙空間における人の適応能力」

※「世界にひらかれた医療」等のシンポジストとして、東南アジアを中心に約10名の方が参加されます。

特別割引登録料の適用は1995年1月31日までです。お申し込みはお早めに。

登録のご案内

登録に関するお問い合わせは **052-735-4333**

区分	医師または研究者	左記のうち卒業後6年まで または大学院生	コ・メディカル	学生または同伴者 (登録者のご家族)	会誌
特別割引登録料 ～平成7年1月31日	30,000円	15,000円	8,000円	5,000円	12,000円
通常登録料 平成7年2月1日～当日	35,000円	20,000円	12,000円	8,000円	

名古屋観光案内



博物館 明治村 (愛知県犬山市内山1番地 TEL0568-67-0314)

近代日本の礎を築いた明治の文化を伝える明治村は、国の重要文化財9件を含む68件の建造物がある。明治の香り漂う村内にこれらを見事に配し、明治そのままの街が鑑賞できる。資料展示も興味深い。特別展・特別公開も随時催している。

●名鉄電車・名古屋駅から犬山線犬山駅下車・名鉄バス乗換え20分、タクシー20分 ●名古屋駅前・名鉄バスセンターから特急バス60分 ●車で、小牧I.C.から国道41号線兼清交差点経由30分、小牧東I.C.から県道多治見犬山線経由10分 開村時間(年中無休)：夏期(3/1～10/31)9時30分～17時、冬季(11/1～2/末)9時30分～16時 入村料金：大人・大学生¥1,500 高校生¥1,000 小中学生¥600 駐車場：普通車900台 バス100台収容

お問い合わせ——第24回 日本医学会総会事務局 TEL052-732-6622 FAX052-732-0036
〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部附属病院共済会館内

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(etal.)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、校正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は実費は著者負担とする。
15. 投稿のさいは、原稿とともにコピー2部を添付する。ただし写真は原稿を含めてオリジナルを3部とする。
16. 投稿先および諸費用の送付先は、〒102 東京都千代田区麹町5-4 クロスサイド麹町ビル8階、社団法人 日本不妊学会 事務所とする。

編集会議からのお知らせ

- 原稿用紙はB5判横書き400字詰のものを使用し、組版に差し支えないよう清書してください。ワープロを使用しても結構です。(昭和62年9月)
- ランニング・タイトル(和文で25字以内、英文では40 letters以内)を記載してください。(昭和63年1月)
- 論文にはKey Wordsを付け、査読用コピー2部を添えることにしました。また英文については専門家の査読を受ける(費用、著者負担)ことがありますので、ご注意ください。(平成4年9月)
- 論文をワープロ、パーソナルコンピューター等で作成された場合は、出来れば文書フロッピーをいっしょにお送りください。その際、機種とソフト名をお書き添えください。MS-DOSのテキストファイル出力が可能であればその形式でお願いします。(平成4年10月)

編 集 委 員

白 井 将 文 (委員長)

味 香 勝 也	石 島 芳 郎	岩 本 晃 明
遠 藤 克	押 尾 茂	久 保 春 海
楠 原 浩 二	小 林 俊 文	平 川 舜
穂 坂 正 彦	三 浦 一 陽	三 橋 直 樹
	毛 利 秀 雄	

EDITORIAL BOARD

Masafumi SHIRAI (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Yoshiro ISHIJIMA	Teruaki IWAMOTO
Tsuyoshi ENDO	Shigeru OSHIO	Harumi KUBO
Koji KUSUHARA	Toshihumi KOBAYASHI	Shun HIRAKAWA
Masahiko HOSAKA	Kazukiyo MIURA	Naoki MITSUHASHI
	Hideo MORI	

日本不妊学会雑誌 40巻1号

1994年12月26日 印刷

1995年1月1日 発行

編集兼発行者 白 井 将 文

印刷者 武 田 昭 彦

印刷所 株式会社 デンプロ
東京都台東区元浅草4-9-13

発行所 社団法人 日本不妊学会
東京都千代田区麹町5-4
クロスサイド麹町ビル8階
Tel (03) 3288 - 7266
振替口座番号 00170 - 3 - 93207